

Research article

Anti-inflammatory and Antioxidant Activities of Germinated Small Red Bean (*Vignaangularis*) Extracts on Hyperglycemia Condition in Murine Macrophage Cell Line

Chusana Mekhora^{1*}, Siriporn Tonjor¹, Nednapis Vattanasuchart¹

¹Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

ABSTRACT

Hyperglycemia has been associated with chronic inflammation that contributed to complications in diabetic patients. High blood glucose levels induce proinflammatory mediators such as nitric oxide (NO), TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8 cytokines expression including intracellular reactive oxygen/nitrogen species in several cell types. Small red bean (*Vignaangularis*) is a high nutritious legume. It contains several nutrients and phenolic compounds exhibiting many health benefits including anti-inflammatory and antioxidant properties. Seed germination is used to improve desirable nutrients and bioactive compounds. During germinated process, the biological changing of seed occurs for growth that might affect nutrient quantity and functional properties. Due to its high nutrients and bioactive compounds, this study aims to determine anti-inflammatory and antioxidant activity of methanol extract from germinated small red bean on hyperglycemia condition in mouse macrophage cell line (RAW264.7 cells). RAW264.7 cells were culture in normal glucose condition (5.5 mM D-glucose), or high glucose condition (30 mM D-glucose) and co-treatment with germinated red bean extracts (0 or 24 h) at concentration 62.5, 125 and 250 μ g/ml for 48 h. The total phenolic contents in germinated red bean extracts at 0 and 24 h were 12.62 ± 0.86 mg/g and 10.60 ± 1.55 mg/g dry weight, respectively. The results showed that high glucose activated RAW264.7 cells to secrete NO, TNF- α , and intracellular ROS compared with normal glucose condition. Co-treatment the germinated red bean extracts at 0 or 24 h significantly inhibited NO, TNF- α , and intracellular ROS producing by RAW264.7 cells without cytotoxicity. Extract from germinated red bean at 0 h exhibited a greater anti-inflammatory activity than extract from 24 h which correlated with their phenolic contents in the extract. These results suggested that phenolic compounds in germinated small red bean may contribute to decrease proinflammatory mediators related with diabetic complications. However, the molecular mechanisms and animal study should be further explored.

Keywords: Chronic inflammation, Hyperglycemia, Red bean germination

Received: 11 August 2018

Accepted: 3 December 2018

Available online: 24 December 2018

*Corresponding author's email: ifrcnm@ku.ac.th

<http://www.Nutritionthailand.org>



บทความวิจัย

คุณสมบัติด้านการอักเสบและอนุมูลอิสระจากภาวะน้ำตาลสูง ของสารสกัดถั่วแดงเม็ดเล็กเพาะงอกในเซลล์เม็ดเลือดขาวหนู

ชัชญา เมฆโหรา^{1*} ศิริพร ตันจ่อ¹ เนตรนิส วัฒนสุชาติ¹

¹สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

บทคัดย่อ

ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงเกี่ยวข้องโดยตรงกับการอักเสบเรื้อรัง ที่นำไปสู่การเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ในผู้ป่วยเบาหวาน น้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงเป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของสารสื่อการอักเสบหลายชนิด ได้แก่ Nitric oxide (NO), TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8 cytokines รวมถึงกระตุ้นการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์หลายชนิด ถั่วแดงเม็ดเล็กเป็นธัญพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีสารอาหารและสารพฤกษเคมีหลายชนิด โดยเฉพาะสารกลุ่มฟีนอลิกที่มีคุณสมบัติด้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระ ปัจจุบันได้นำการเพาะงอกของเมล็ดพืชมาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของสารอาหาร เนื่องจากระหว่างกระบวนการงอกเมล็ดพืชจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งอาจส่งผลต่อปริมาณสารอาหารและคุณสมบัติในเชิงสุขภาพ เนื่องจากถั่วแดงเม็ดเล็กเป็นแหล่งของสารอาหาร และ สารออกฤทธิ์ชีวภาพ ดังที่กล่าวมาแล้ว การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการยับยั้งการอักเสบและอนุมูลอิสระจากภาวะน้ำตาลกลูโคสสูงของสารสกัดจากถั่วแดงเม็ดเล็กในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 โดยเลี้ยง RAW264.7 cells ในภาวะน้ำตาลกลูโคสปกติ (5.5 mM D-glucose) หรือภาวะน้ำตาลกลูโคสสูง (30 mM D-glucose) ร่วมกับสารสกัดถั่วแดงเม็ดเล็กเพาะงอกที่ 0 หรือ 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 62.5, 125 และ 250 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดถั่วแดงเพาะงอกที่ 0 และ 24 เท่ากับ $12.62 \pm 0.86 \text{ mg/gDW}$ และ $10.60 \pm 1.55 \text{ mg/gDW}$ ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่เลี้ยงในภาวะน้ำตาลกลูโคสสูง กระตุ้นการผลิต NO, TNF- α และอนุมูลอิสระภายในเซลล์สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในภาวะน้ำตาลกลูโคสปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับสารสกัดถั่วแดงเพาะงอกที่ 0 หรือ 24 ชั่วโมง ยับยั้งการเกิด NO, TNF- α และ ลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสารสกัดถั่วแดงเพาะงอกที่ 0 ชั่วโมงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการอักเสบดีกว่าสารสกัดถั่วแดงเพาะงอกที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกรวมที่วิเคราะห์ได้ในสารสกัดดังกล่าว การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกจากถั่วแดงเม็ดเล็กเพาะงอกอาจจะมีส่วนในการยับยั้งการอักเสบและ ต้านอนุมูลอิสระจากภาวะน้ำตาลสูง ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษากลไกเชิงลึก หรือศึกษาในสัตว์ทดลองเพื่อยืนยันผลที่ชัดเจนต่อไป

คำสำคัญ: การอักเสบเรื้อรัง ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ถั่วแดงเพาะงอก

*Corresponding author's email: ifrcnm@ku.ac.th



บทนำ

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่เป็นปัญหาสุขภาพของประชากรทั่วโลก ความชุกของโรคเบาหวานในคนไทยที่มีอายุ 15 ปีขึ้นไปเท่ากับร้อยละ 6.9 หรือประมาณ 3.69 ล้านคนทั่วประเทศ¹ ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงเกี่ยวข้องโดยตรงกับการอักเสบเรื้อรังในผู้ป่วยเบาหวาน การศึกษาทางอนุชีววิทยา พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นตัวกระตุ้นโปรตีน Nuclear factor-KB (NF-KB) ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิด ได้แก่ cytokines, chemokines, adhesion molecules และ enzymes ต่าง ๆ²⁻⁴ สอดคล้องกับการศึกษาทางคลินิก ซึ่งพบว่าผู้ป่วยเบาหวานจะมีการแสดงออกของตัวชี้วัดการอักเสบ เช่น acute-phase proteins (CRP), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukins-8 (IL-8), และ tumor necrosis factor- α (TNF- α) สูงกว่าคนที่ไม่มีระดับน้ำตาลปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁵⁻⁷ นอกจากนี้ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการเพิ่มของอนุมูลอิสระ (free radicals) เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ในผู้ป่วย⁸⁻⁹ การเพิ่มขึ้นของสารอักเสบ และอนุมูลอิสระเป็นระยะเวลานาน เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ความรุนแรงของโรคมากขึ้นและนำไปสู่การเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ที่ส่งผลเสียต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยเบาหวาน เช่น จอประสาทตาเสื่อม, ปลายประสาทอักเสบ, โรคไต และโรคหลอดเลือดสมอง-หัวใจตีบ เป็นต้น¹⁰⁻¹²

ถั่วแดงเม็ดเล็ก (*Vigna angularis*) เป็นธัญพืชที่มีการบริโภคกันแพร่หลาย มีโปรตีนและคุณค่าโภชนาการสูง รวมถึงมีคุณสมบัติที่ดีในเชิงสุขภาพ เช่น ลดระดับน้ำตาลในเลือด ต้านอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบ ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น¹³⁻¹⁷ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าถั่วแดงเม็ดเล็ก เช่น ถั่วแดงอะซูกิ พบสารใน

กลุ่มฟีนอลิกสูงกว่าถั่วแดงเม็ดใหญ่หรือถั่วแดงหลวง¹⁸ ถั่วแดงประกอบด้วยสารอาหารและสารฟีนอลิกหลายชนิด เช่น hydroxycinnamic acids, quercetin, anthocyanin, catechin, eriodictyol, และ hesperitin glycosides เป็นต้น^{16, 19} หลายการศึกษาได้นำประโยชน์จากการเพาะงอกเมล็ดพืชมาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของสารอาหารเนื่องจากกระบวนการงอกเมล็ดพืชจะมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและเกิดการสังเคราะห์สารอาหารต่างๆ ภายในเซลล์ เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต และในขั้นตอนนี้อาจมีผลต่อคุณสมบัติเชิงสุขภาพและปริมาณสารออกฤทธิ์ชีวภาพ รวมถึงสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมในถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วแดงเพาะงอกเพิ่มขึ้นร้อยละ 17, 26 และ 31 ตามลำดับ²⁰ บางการศึกษาพบว่าสารฟีนอลิกรวมในถั่วแดงเพาะงอกเพิ่มสูงสุดถึงร้อยละ 50²¹ นอกจากนี้การศึกษาคูสมบัติเชิงสุขภาพของถั่วเขียวเพาะงอก พบว่า สามารถยับยั้งการเกิดไนตริกออกไซด์ในเซลล์ RAW264.7 รวมถึงช่วยลดการอักเสบและการปวดในหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร arachidonic acid ได้²²

อย่างไรก็ตามจากการทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมา ยังไม่มีการศึกษาคุณสมบัติของถั่วแดงเม็ดเล็กเพาะงอกต่อการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบและอนุมูลอิสระจากภาวะน้ำตาลสูง ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมความรุนแรงของโรคและนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ในผู้ป่วยเบาหวาน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาศักยภาพของสารสกัดถั่วแดงเม็ดเล็กเพาะงอกต่อการยับยั้งการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่เลี้ยงในภาวะน้ำตาลกลูโคสสูง ผลการศึกษาค้นคว้านี้จะทำให้ได้องค์ความรู้ที่นำไปสู่แนวทางการใช้ประโยชน์จากถั่วแดงเพาะงอก เพื่อป้องกันหรือลด

ความเสี่ยงในการเกิดภาวะแทรกซ้อนที่ส่งผลเสียต่อคุณภาพชีวิตในผู้ป่วยเบาหวานได้ต่อไปในอนาคต อีกทั้งสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้วัตถุดิบทางการเกษตรอีกทางหนึ่ง

วิธีการวิจัย

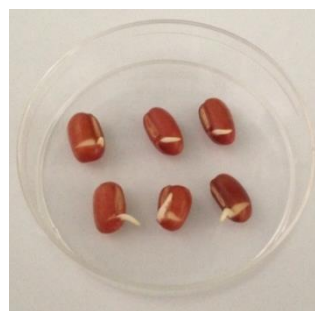
1. การเตรียมตัวอย่างและการเพาะงอก

จัดซื้อตัวอย่างถั่วแดงเมล็ดเล็กสายพันธุ์อะชูกิ (*Vigna angularis*) โดยวิธีการสั่งซื้อจากแหล่งขาย 3 แหล่งในท้องตลาด (มูลนิธิโครงการหลวง,

ห้างสรรพสินค้าท็อป และห้างสรรพสินค้าเดอะมอลล์) นำตัวอย่างแต่ละแหล่งมารวมกันอย่างละเท่าๆกัน ทำการเพาะงอกโดย ล้างเมล็ดถั่วแดงให้สะอาด แช่น้ำทิ้งไว้เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด ล้างน้ำสะอาด 1 ครั้ง ผึ่งให้พอแห้ง (เพาะงอก 0 ชั่วโมง-รูปที่ 1) ทำการเพาะงอกถั่วแดงต่อในภาชนะปิดที่บ่มแสงที่อุณหภูมิห้อง ($30\pm 3^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พรมน้ำให้ชุ่มทุกๆ 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำตัวอย่างมาล้างน้ำ 1 ครั้ง (เพาะงอก 24 ชั่วโมง-รูปที่ 2) จากนั้นนำตัวอย่างเข้าอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55°C จนกระทั่งแห้งสนิท บั่นให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ร้อนผ่านตะแกรงและเก็บในถุงออลูมิเนียมฟรอยด์ที่อุณหภูมิ -20°C



รูปที่ 1 ถั่วแดงเพาะงอก 0 ชั่วโมง



รูปที่ 2 ถั่วแดงเพาะงอก 24 ชั่วโมง

2. การสกัดตัวอย่าง

สกัดถั่วแดงเพาะงอก 1 กรัมด้วย 10 ml 80% methanol นำไป sonicate (Transsonic 460/H, Auckland) ที่ความถี่ 35 kHz เป็นเวลา 15 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge (Hermle Z323 K, Germany) ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ($1917 \times g$) เป็นเวลา 10 นาที แยกสารสกัดออก ทำการสกัดซ้ำอีก 1 ครั้งตามขั้นตอนเดิม นำสารสกัดที่ได้รวมกัน ระเหยตัวทำละลายด้วย evaporator จนกระทั่งเหลือสารสกัดประมาณ 2 ml ตูดสารสกัดใส่ 1.5 ml tube นำไประเหยตัวทำละลายอีกครั้ง จนกระทั่งแห้งสนิทด้วยเครื่อง speed evaporator

(miVac Series, UK) เป่าใส่อากาศออกด้วยก๊าซไนโตรเจนปิดฝาให้สนิท เก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ -20°C (125 mg/tube) ในการทดสอบคุณสมบัติต้านการอักเสบและอนุมูลอิสระในเซลล์ ทำการละลายสารสกัดกลับด้วย 100 μl DMSO และเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูงสุด 250 $\mu\text{g/ml}$ กรองด้วย 0.2 μm sterile filter ก่อนนำไปทำสอบกับเซลล์ โดยร้อยละของ DMSO ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในการทดลองเท่ากับ 0.2

3. การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ชีวภาพ

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดถั่วแดงเพาะงอกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

ดัดแปลงจากการศึกษาของ Mustafa และคณะ (2010) และ Xu and Chang (2007) สกัดตัวแดง เพาะงอก 1 กรัม ด้วย 20 ml 80% acetone เขย่า ต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมงกรองสารสกัด ด้วยเยื่อกระดาษกรอง เบอร์ 1 เก็บสารสกัด ส่วนใสมาทำปฏิกิริยากับสาร Folin-Ciocalteu และ โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 เป็น เวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 760 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid²³⁻²⁴

4. คุณสมบัติของสารสกัดตัวแดงเพาะงอกต่อ การยับยั้งการอักเสบและอนุมูลอิสระในเซลล์ แมคโครฟาจ RAW 264.7 cells

4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เพาะเลี้ยง Mouse macrophage RAW264.7 cells ระหว่าง passage no. 12-25 ใน อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% FBS, 1% antibiotic เลี้ยง เซลล์ ใน สภาวะ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37°C และความชื้น ร้อยละ 85-95 ในการทดลองทำการเลี้ยง RAW264.7 cells ที่ ความเข้มข้น 0.75×10^6 cells/ml ใน 12 well-plates เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ และเลี้ยงเซลล์ต่อ ในภาชนะน้ำตาลกลูโคสปกติ (5.5 mM D-glucose) หรือภาชนะน้ำตาลกลูโคสสูง (30 mM D-glucose) ร่วมกับให้สารสกัดตัวแดงเพาะงอก 0 และ 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 62.5, 125 และ 250 µg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้ 0.2% DMSO เป็น vehicle control

4.2 การทดสอบผลของสารสกัดต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ในภาชนะน้ำตาลกลูโคสสูง

ทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยชุด ทดสอบ WST-1 proliferation assay

(05015944001, Roche, Switzerland) ซึ่งเป็นการ ทดสอบปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่โดยอาศัย หลักการเปลี่ยนแปลงสีของสาร Tetrazolium salt ด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ mitochondrial reductase ศึกษาโดยเลี้ยง RAW264.7 cells ใน 96 well-plates ที่ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ในภาชนะ น้ำตาลปกติ (5.5 mM D-glucose) หรือภาชนะน้ำตาล สูง (30 mM D-glucose) ร่วมกับให้สารสกัดตัวแดง เพาะงอก 0 และ 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น สุทธิ 62.5, 125 และ 250 µg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมงใส่สาร WST-1 10 µl/well และบ่มต่อในตู้เลี้ยง เซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ 420/600 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer microplate reader

% เซลล์ที่มีชีวิตคำนวณจาก [(mean absorbance of the sample/mean absorbance of the reference) * 100] โดย reference คือค่า absorbance of the control-absorbance of the blank

4.3 ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดต่อการยับยั้ง การผลิตไนตริกออกไซด์

ทำการศึกษาโดยเลี้ยง RAW264.7 cells ที่ ความเข้มข้น 0.75×10^6 cells/ml ใน 12 well-plates ตามวิธีการที่อธิบายข้างต้นเมื่อครบระยะเวลาที่ กำหนด ทำการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาทำการวิเคราะห์ หาไนตริกออกไซด์โดยใช้ปฏิกิริยา Griess reaction ซึ่งเป็นการวัดทางอ้อมผ่านค่า nitrite โดยปฏิกิริยา จะเกิดขึ้นเมื่อไนตริกออกไซด์ทำปฏิกิริยากับ สารละลาย sulphanilamide ได้เป็น diazonium salt จากนั้นเกลือจะเกิดปฏิกิริยากับ N-(1-Naphthyl) ethylenediamine ได้เป็นสาร azo dye ซึ่งเป็นสี ชมพูอมม่วง ทดสอบโดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ 100 µl ใส่ สารละลาย 1% sulphanilamide 50 µl บ่มในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที และใส่สารละลาย 1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in 5%



concentrated phosphoric acid 50 μ l บ่มต่อในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer microplate reader โดยใช้ Sodium nitrite (NaNO_2) เป็นสารละลายมาตรฐาน

4.4 ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดต่อการยับยั้ง

การผลิต TNF- α cytokines

ทำการศึกษาโดยเลี้ยง RAW264.7 cells ที่ความเข้มข้น 0.75×10^6 cells/ml ใน 12 well-plates ตามวิธีการที่อธิบายข้างต้น เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด ทำการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาทำการวิเคราะห์หา TNF- α ด้วยชุดทดสอบ ELISA assay kit (ab46105, abcam, UK)

4.5 ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระในเซลล์

ทำการศึกษาโดยเลี้ยง RAW264.7 cells ตามวิธีการที่อธิบายข้างต้นใน 96 black well-plates เมื่อครบ 24 ชั่วโมงหลังจากใส่สารสกัดแล้วทำการล้างเซลล์ด้วย PBS 1 ครั้ง เติมสาร 5 μ M 2', 7'-dichlorofluoresceindiacetate (DCFH-DA)(D6883,

sigma, USA) เลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 30 นาที ล้างออกด้วย PBS 2 ครั้ง จากนั้นวัดการเรืองแสงด้วย Fluorescence microplate reader โดยใช้ excitation wavelength ที่ 485 nm และ emission wavelength ที่ 530 nm

5. การทดสอบทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้รายงานเป็นค่าเฉลี่ย และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD) โดยแต่ละทดลองทำอย่างน้อย 3 ซ้ำทำการวิเคราะห์แตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้โปรแกรม SPSS การวิเคราะห์ข้อมูลที่มีการแจกแจงแบบปกติใช้ one way ANOVA โดยทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$)

ผลการทดลอง

1. ปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดถั่วแดงเพาะงอก

ปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดถั่วแดงเพาะงอกที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณสารฟีนอลิกมีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับที่เวลา 0 ชั่วโมง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลปริมาณฟีนอลิกรวมในถั่วแดงเพาะงอกที่ช่วงเวลาต่างๆ

ตัวอย่าง	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณรวมฟีนอลิก(n=6) ต่อหน้าหนักตัวอย่างแห้ง (mg/gDW)
ถั่วแดงเมล็ดเล็กเพาะงอก	0	12.62 ± 0.86^a
	24	10.60 ± 1.55^b

2. ผลของสารสกัดถั่วแดงเพาะงอกต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดถั่วแดงเพาะงอก 0 และ 24 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 62.5, 125 และ 250 μ g/ml ด้วยชุดทดสอบ WST-1

proliferation assay ผลการศึกษา พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่เลี้ยงในภาชนะน้ำตาลสูงและได้รับสารสกัดถั่วแดงเพาะงอกที่ 0 ชั่วโมง (กราฟสีขาว) และ 24 ชั่วโมง (กราฟสีดำ) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบ

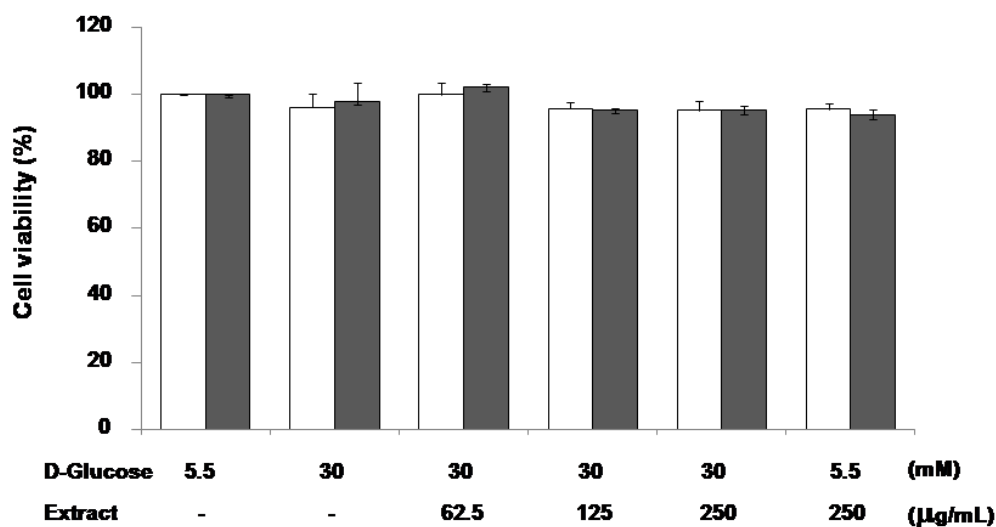
กับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในภาวะน้ำตาลกลูโคสปกติ อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ แสดงเป็นค่าร้อยละ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (vehicle control) (รูปที่ 3)

3. ผลของสารสกัดถั่วแดงเพาะงอกต่อการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

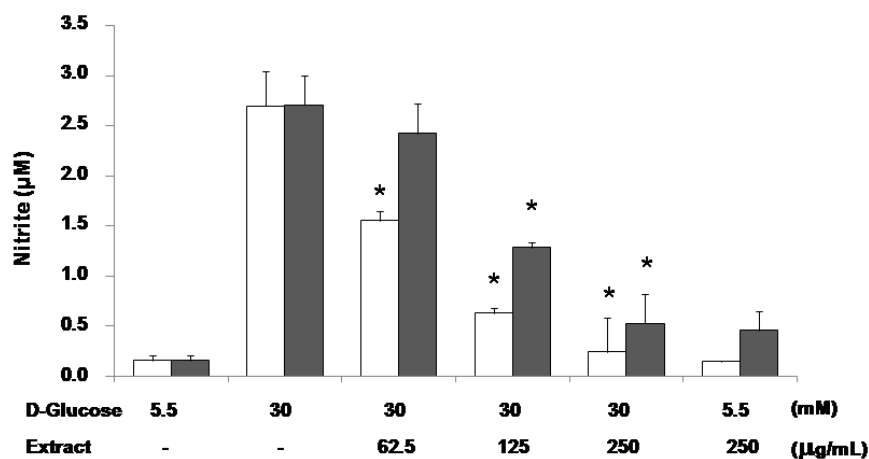
RAW264.7 cells ที่เพาะเลี้ยงในภาวะน้ำตาลกลูโคสสูง มีการผลิตไนตริกออกไซด์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในภาวะน้ำตาลกลูโคสปกติ สารสกัดถั่วแดงเพาะงอก 0 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 62.5, 125 และ 250 µg/ml สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 42.30%, 76.46%, และ 90.70% ตามลำดับ (กราฟสีขาว) และสารสกัดถั่วแดงเพาะงอก 24 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 125 และ 250 µg/ml สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 52.61% และ 80.39% ตามลำดับ (กราฟสีดำ)เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัด (รูปที่ 4)

4. ผลของสารสกัดถั่วแดงเพาะงอกต่อการยับยั้งการผลิต TNF- α cytokines

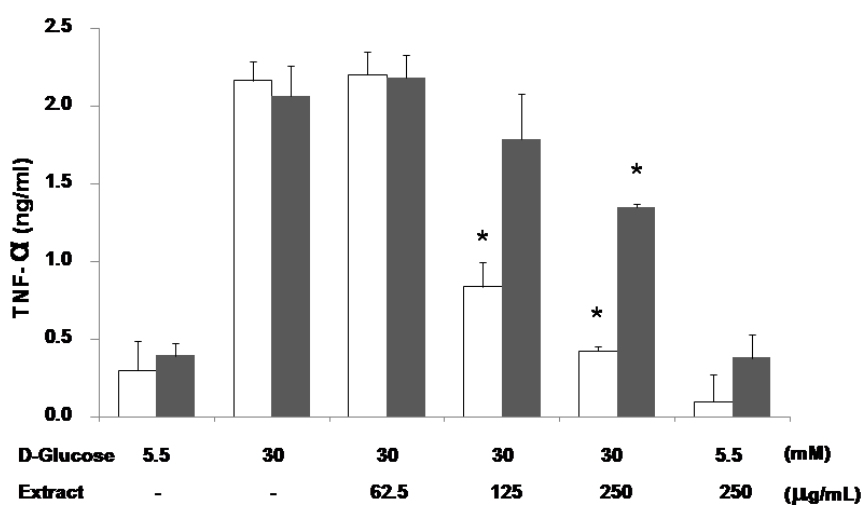
เมื่อทำการเพาะเลี้ยง RAW264.7 cells ในภาวะน้ำตาลกลูโคสสูงส่งผลให้เซลล์ผลิตไซโตไคน์ TNF- α เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเลี้ยงในภาวะน้ำตาลกลูโคสปกติ สารสกัดถั่วแดงเพาะงอก 0 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 125 และ 250 µg/ml สามารถลดการผลิตไซโตไคน์ TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 68.44% และ 81.99% ตามลำดับ (กราฟสีขาว) และสารสกัดถั่วแดงเพาะงอก 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml สามารถลดการผลิตไซโตไคน์ TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 34.78 % (กราฟสีดำ) (รูปที่ 5)



รูปที่ 3 ผลของสารสกัดถั่วแดงเพาะงอกต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์: เพาะเลี้ยง RAW264.7 cells ใน 96 well-plates ในภาวะน้ำตาลกลูโคสปกติ (5.5 mM D-glucose) หรือภาวะน้ำตาลกลูโคสสูง (30 mM D-glucose) ร่วมกับให้สารสกัดถั่วแดงเพาะงอก 0 (กราฟสีขาว) หรือ 24 ชั่วโมง (กราฟดำ) ที่ความเข้มข้น 62.5, 125 และ 250 µg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบความอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย WST-1 proliferation assay วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420/600 nm. แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย mean $\pm$ SD จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ



รูปที่ 4 สารสกัดถั่วแดงเพาองอกยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์: เพาะเลี้ยง RAW264.7 cells ในภาวะน้ำตาลกลูโคสปกติ (5.5 mM D-glucose) หรือภาวะน้ำตาลกลูโคสสูง (30 mM D-glucose) ร่วมกับให้สารสกัดถั่วแดงเพาองอก 0 หรือ 24 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 62.5, 125 และ 250 µg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาทำการวิเคราะห์หาไนตริกออกไซด์ด้วยปฏิกิริยา Griess reaction แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย mean $\pm$ SD จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ* $p < 0.05$



รูปที่ 5 สารสกัดถั่วแดงเพาองอกยับยั้งการผลิต TNF-α cytokines : เพาะเลี้ยง RAW264.7 cells ในภาวะน้ำตาลกลูโคสปกติ (5.5 mM D-glucose) หรือภาวะน้ำตาลกลูโคสสูง (30 mM D-glucose) ร่วมกับให้สารสกัดถั่วแดงเพาองอก 0 หรือ 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 62.5, 125 และ 250 µg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาวัดหาปริมาณ TNF-α ด้วยวิธีการ ELISA แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย mean $\pm$ SD จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ* $p < 0.05$

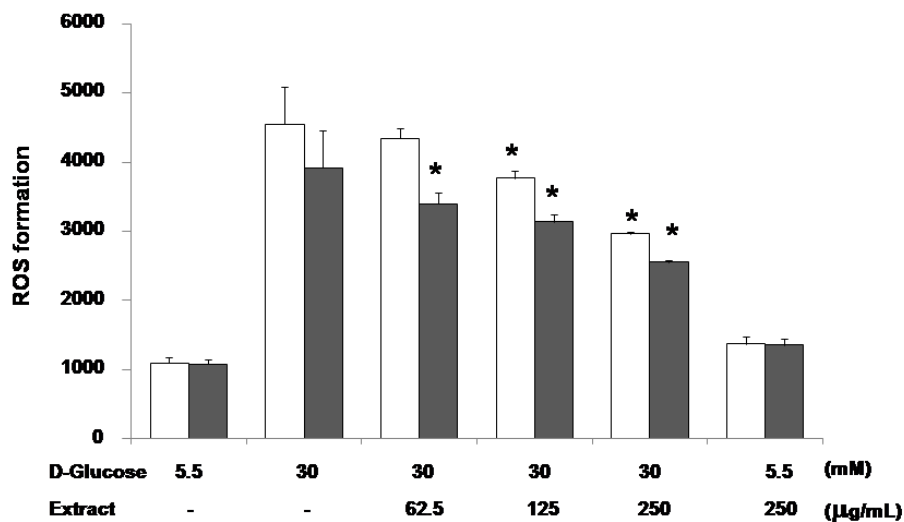
5. ผลของสารสกัดถั่วแดงเพาองอกต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระภายในเซลล์

RAW264.7 cells ที่เพาะเลี้ยงในภาวะน้ำตาลกลูโคสสูง เกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์

เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเลี้ยงในภาวะน้ำตาลกลูโคสปกติ สารสกัดถั่วแดงเพาองอก 0 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 125 และ 250 µg/ml สามารถลดอนุมูลอิสระในเซลล์ได้

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 18.08% และ 34.07% ตามลำดับ และสารสกัดถั่วแดงเพาะงอก 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 62.5, 125 และ 250 µg/ml (กราฟสี

ขาว) สามารถลดอนุมูลอิสระในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 9.72%, 16.58% และ 31.60% ตามลำดับ(กราฟสีดำ) (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 สารสกัดถั่วแดงเพาะงอกลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์: เพาะเลี้ยง RAW264.7 cells ในภาชนะน้ำตาลกลูโคสปกติ (5.5 mM D-glucose) หรือภาชนะน้ำตาลกลูโคสสูง (30 mM D-glucose) ร่วมกับให้สารสกัดถั่วแดงเพาะงอก 0 หรือ 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 62.5, 125 และ 250 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสาร 2', 7'-dichlorofluoresceindiacetate (DCFH-DA) และวัดการเรืองแสง แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย mean $\pm$ SD จากการทดลองทั้งหมด 3ซ้ำ * $p < 0.05$

วิจารณ์ผลการทดลอง

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่เป็นปัญหาสุขภาพของประชากรทั่วโลก โดยมีประชากรป่วยเป็นโรคเบาหวานสูงถึง 347 ล้านคนและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าตัวในอีก 10 ปีข้างหน้า จากข้อมูลการสำรวจสุขภาพประชากรของประเทศไทย พบว่ามีประชากรกว่า 3.69 ล้านคนป่วยเป็นโรคเบาหวาน โดยร้อยละ 31.2 ของผู้ป่วยไม่ทราบว่าตนเองเป็นโรคเบาหวาน และร้อยละ 37 ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลให้อยู่ในเกณฑ์ปกติได้ แนวทางการรักษาโรคเบาหวานนอกจากการควบคุมระดับน้ำตาลให้อยู่ในเกณฑ์ปกติแล้ว การป้องกันหรือลดความรุนแรงของการเกิด

ภาวะแทรกซ้อนต่างๆ จากภาชนะน้ำตาลในเลือดสูง ยังคงมีความสำคัญ

ภาชนะน้ำตาลในเลือดสูงเรื้อรังเป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิด ได้แก่ TNF- α , IL-6, cyclooxygenase-2 (COX-2) และ Inducible nitric oxide synthase (iNOS) ผ่านการกระตุ้นโปรตีน NF-KB อีกทั้งยังส่งผลเสียต่อกลไกอื่นๆ ในร่างกาย เช่น กระตุ้นการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ กระตุ้น Protein kinase C, glucose autooxidation, และทำให้เกิด advanced glycation end products (AGEs) เป็นต้น ปัจจัยเหล่านี้ส่งเสริมความรุนแรงของโรคและนำไปสู่การเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ในผู้ป่วยเบาหวาน¹⁰⁻¹²,



²⁵เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นจะผลิตสารอักเสบหลายชนิดซึ่งส่งเสริมให้เกิดภาวะแทรกซ้อนหรือเพิ่มความรุนแรงของโรคเบาหวาน ผลจากการศึกษานี้ พบว่าเซลล์ RAW264.7 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่มีน้ำตาลกลูโคสสูง (30 mM) มีการหลั่งตัวชี้วัดการอักเสบ ได้แก่ NO, TNF- α และอนุมูลอิสระภายในเซลล์สูงกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสปกติ (5.5 mM) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าระดับน้ำตาลกลูโคสสูงสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิดใน RAW264.7 cells เช่น iNOS, TNF- α , IL-10, IL-12 ผ่านการกระตุ้นกลไกภายในเซลล์ ได้แก่ NF-KB, VDR-PPARY, และ SIRT-1²⁶⁻²⁷

หลายการศึกษาใช้ประโยชน์จากการเพาะงอกมาเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการทั้งสารอาหารหลัก เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน รวมทั้งสารออกฤทธิ์ชีวภาพอื่น ๆ ที่มีผลต่อสุขภาพ รวมถึงสารประกอบฟีนอลิก^{16,19} ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดถั่วแดงเพาะงอกมีแนวโน้มลดลง โดยปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดถั่วแดงเพาะงอกที่ 0 และ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 12.62 ± 0.86 mg/gDW และ 10.60 ± 1.55 mg/gDW ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Monrerrat และคณะ 2015 พบว่า ถั่วแดงเพาะงอกจะมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับถั่วที่ไม่ผ่านการเพาะงอกโดยสารที่ลดลงได้แก่ flavan-3-ols และ anthocyanin แต่พบการเพิ่มขึ้นของสาร flavonones และ flavonols เล็กน้อยในระหว่างกระบวนการงอก¹⁹ ปริมาณสารฟีนอลิกรวมที่ลดลงอาจเกิดจากการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) รวมถึงถูกชะ

ล้างไปกับน้ำที่ใช้ในระหว่างการเพาะงอก เช่นเดียวกับบางการศึกษาที่พบว่า ปริมาณฟีนอลิกรวมในถั่วเหลือง และถั่วลิสงเพาะงอกลดลง ร้อยละ 22 และ 57 ตามลำดับ²⁸ อย่างไรก็ตามผลที่ได้ขัดแย้งกับบางการศึกษาที่พบว่า การเพาะงอกถั่วแดงทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากสายพันธุ์ ระยะเวลาหรือสภาวะการเพาะงอกที่แตกต่างกัน²⁹

TNF- α เป็น pro-inflammatory cytokines ที่ผลิตจากเซลล์เม็ดเลือดขาว มีบทบาทสำคัญในแง่การกระตุ้นการอักเสบและส่งเสริมความรุนแรงของโรค เนื่องจาก TNF- α เป็นตัวกระตุ้นโปรตีน NF-KB ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น COX-2, iNOS, Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) และ Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) เป็นต้น³⁰ นอกจากนี้ปริมาณที่เพิ่มขึ้นของ TNF- α ในผู้ป่วยเบาหวานมีความสัมพันธ์กับภาวะ insulin resistance การควบคุมขบวนการเมตาบอลิซึมของกลูโคสและ ไขมัน และสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของหลอดเลือดขนาดเล็กในตา^{6, 31-32} รายงานการใช้ยาแก้อักเสบกลุ่ม Nonsteroid พบว่าสามารถป้องกันการเสื่อมของจอประสาทตาในสัตว์ทดลอง ผ่านการยับยั้งกลไก NF-KB และการ TNF- α ³³⁻³⁴ ลดอาการชาจากภาวะปลายประสาทอักเสบในผู้ป่วยเบาหวาน³⁵ นอกจากนี้การลดลงของ TNF- α สามารถลดความเสื่อมของปลายประสาทได้อีกด้วย³⁶ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดถั่วแดงเพาะงอกที่ 0 ชั่วโมง สามารถลดระดับ TNF- α จากเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสภาวะน้ำตาลกลูโคสสูงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 125 และ 250 $\mu\text{g/ml}$ ในขณะที่สารสกัดถั่วแดงเพาะงอกที่ 24 ชั่วโมงสามารถลดระดับ TNF- α ได้ที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$ เท่านั้น



ระดับน้ำตาลสูงยังเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ เช่น superoxide anion, hydroxyl radical, singlet oxygen, nitric oxide, nitrogen dioxide, peroxynitrite ผ่านกลไกหลักๆ เช่น NF-KB, Mitogen activated protein kinase (MAPK), advanced glycation end products (AGEs), Protein kinase C (PKC) และ NADH reductase²⁵ นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้เซลล์หลั่งสารบางชนิดที่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระ เช่น angiotensin II, amylin/amyloid, triglyceride, และ homocysteine เป็นต้น³⁷ การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยเบาหวานผลิตอนุมูลอิสระสูงกว่าเม็ดเลือดขาวจากคนที่มีระดับน้ำตาลในเลือดปกติ และเป็นปัจจัยนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนต่างๆ⁸⁻⁹ ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดถั่วแดงเพาะงอกที่ 0 และ 24 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยถั่วแดงเพาะงอกที่ 0 ชั่วโมงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิต ไนตริกออกไซด์ดีกว่าถั่วแดงเพาะงอกที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณสารฟีนอลิกรวมที่สูงกว่า โดยคุณสมบัติยับยั้งการอักเสบและอนุมูลอิสระดังกล่าวน่าจะเกิดจากสารฟีนอลิกในถั่วแดงเพาะงอก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารฟีนอลิกในถั่วแดงและถั่วแดงเพาะงอก ได้แก่ quercetin, catechinglucoside, proanthocyanidins ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการอักเสบ และอนุมูลอิสระ¹⁶

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดถั่วแดงเม็ดเล็กเพาะงอกมีคุณสมบัติยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ TNF- α และอนุมูลอิสระจากเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่เลี้ยงในภาวะน้ำตาลกลูโคสสูงโดยระยะเวลาการเพาะงอกถั่วแดงเม็ด

เล็กที่นานขึ้นทำให้แนวโน้มของปริมาณสารฟีนอลิกรวมและคุณสมบัติยับยั้งการอักเสบในเซลล์ลดลง อย่างไรก็ตามอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงชนิดและปริมาณของสารฟีนอลิกที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างกระบวนการเพาะงอก รวมถึงการศึกษาในสัตว์ทดลองหรือมนุษย์เพื่อยืนยันผลที่ชัดเจนและใช้เป็นแนวทางส่งเสริมการใช้สารพฤกษเคมีจากถั่วแดงเม็ดเล็กเพื่อลดการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ในผู้ป่วยเบาหวานต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสมาคมโภชนาการแห่งประเทศไทย ในพระราชูปถัมภ์ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีที่ให้การสนับสนุนทุนในการดำเนินโครงการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. ผลการสำรวจสภาวะสุขภาพอนามัยของประชาชนไทย ครั้งที่ 4 ประจำปี 2551-2552. นนทบุรี: เดอะกราฟโก ซิสเต็มส์; 2554.
2. Gonzalez Y, Herrera MT, Soldevila G, Garcia-Garcia L, Fabián G, Pérez-Armendariz EM, et al. High glucose concentrations induce TNF-alpha production through the down-regulation of CD33 in primary human monocytes. BMC immunol. 2012;13:19.
3. Devaraj S, Venugopal SK, Singh U, Jialal I. Hyperglycemia induces monocytic release of interleukin-6 via induction of protein kinase c-{alpha} and -{beta}. Diabetes. 2005;54(1):85-91.



4. Devaraj S, Jialal I. Increased secretion of IP-10 from monocytes under hyperglycemia is via the TLR2 and TLR4 pathway. *Cytokine*. 2009;47(1):6-10.
5. Temelkova-Kurktschiev T, Henkel E, Koehler C, Karrei K, Hanefeld M. Subclinical inflammation in newly detected Type II diabetes and impaired glucose tolerance. *Diabetologia*. 2002;45(1):151.
6. Stentz FB, Umpierrez GE, Cuervo R, Kitabchi AE. Proinflammatory cytokines, markers of cardiovascular risks, oxidative stress, and lipid peroxidation in patients with hyperglycemic crises. *Diabetes*. 2004;53(8):2079-86.
7. de Rekeneire N, Peila R, Ding J, Colbert LH, Visser M, Shorr RI, et al. Diabetes, hyperglycemia, and inflammation in older individuals: the health, aging and body composition study. *Diabetes care*. 2006; 29(8):1902-8.
8. Orie NN, Zidek W, Tepel M. Increased intracellular generation of reactive oxygen species in mononuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus type 2. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2000;108(3):175-80.
9. Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2000;85(8):2970-3.
10. Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, Ballantyne CM, Couper D, Vigo A, et al. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes*. 2003;52(7):1799-805.
11. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
12. Sharpe PC, Liu WH, Yue KK, McMaster D, Catherwood MA, McGinty AM, et al. Glucose-induced oxidative stress in vascular contractile cells: comparison of aortic smooth muscle cells and retinal pericytes. *Diabetes*. 1998;47(5):801-9.
13. Yu T, Ahn HM, Shen T, Yoon K, Jang HJ, Lee YJ, et al. Anti-inflammatory activity of ethanol extract derived from *Phaseolus angularis* beans. *J ethnopharmacol*. 2011;137(3):1197-206.
14. Oomah BD, Corbe A, Balasubramanian P. Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hulls. *J Agric Food Chem*. 2010;58(14):8225-30.
15. Zou YP, Chang Sam KC. Antioxidant and Antiproliferative Properties of Extract and Fractions from Small Red Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Food Nut*. 2014;1(105):1-11.
16. García-Lafuente A, Moro C, Manchón N, et al. In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red



- common beans. Food Chem. 2014;161: 216-23.
17. Atchibri, Ocho-Anin AL, Brou KD, Kouakou TH, Kouadio JY, Gnakri D. Screening for anti- diabetic activity and phytochemical constituents of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. Journal of Medicinal Plants Research. 2010;4(17):1757-61
 18. Eunhye K, Hongkeun S, Yongjin P, Jeong ran L, Minyoung K, Illmin C. Determination of Phenolic Compounds in Adzuki bean (*Vignaangularis*) Germplasm. Korean J Crop Sci. 2011;56(4):375-84.
 19. Duenas M, Martinez-Villaluenga C, Limon RI, Penas E, Frias J. Effect of germination and elicitation on phenolic composition and bioactivity of kidney beans. Food Res Int. 2015;70:55-63.
 20. Khampang E, Kerdchoechuen O, Laohakunjit N. Change of chemical composition of rice and cereals during germination. Agricultural Sci J. 2009;3: 341-4.
 21. ภัสจันท์ หิรัญ, อรพิน เกิดชูชื่น, ณัฏฐา เลหากุลจิตต์. การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอาหารและสารต้านอนุมูลอิสระของถั่วแดงงอกหลังผ่านกระบวนการหมัก. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 2554;2:321-5.
 22. Ali NM, Yusof HM, Yeap SK, Ho WY, Beh BK, Long K, et al. Anti-Inflammatory and antinociceptive activities of untreated, germinated, and fermented Mung bean aqueous extract. Evid Based Compl Alt Med. 2014:350507.
 23. Xu BJ, Chang SKC. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. J Food Sci. 2007;72(2):S159-S66.
 24. Mustafa RA, Abdul Hamid A, Mohamed S, Bakar FA. Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. J Food Sci. 2010;75(1):C28-35.
 25. King GL, Loeken MR. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. Histochem Cell Biol. 2004; 122(4):333-8.
 26. Zhang X, Zhou M, Guo Y, Song Z, Liu B. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) Promotes High Glucose-Induced M1 Macrophage Switching to M2 via the VDR-PPARgamma Signaling Pathway. BioMed research international. 2015;2015:157834.
 27. Jia YH, Zheng Z, Wang YC, Zhou Q, Cai W, Jia W, et al. SIRT1 is a regulator in high glucose-induced inflammatory response in RAW264.7 Cells. PloS one. 2015;10(3):e0120849.
 28. Khandelwal S, Udipi SA, Ghugre P. Polyphenols and tannins in Indian pulses: Effect of soaking, germination and pressure cooking. Food Res Int. 2010; 43(2):526-30.



29. López-Amorós ML, Hernández T, Estrella I. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *J Food Compos Anal.* 2006;19(4):277-83.
30. Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F. Glucose-dependent interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro. *Diabetes.* 1996;45(7):954-9.
31. Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes care.* 2004;27(3):813-23.
32. Demircan N, Safran BG, Soylu M, Ozcan AA, Sizmaz S. Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye (Lond).* 2006;20(12):1366-9.
33. Joussen AM, Poulaki V, Mitsiades N, Kirchhof B, Koizumi K, Dohmen S, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression. *Faseb J.* 2002;16(3):438-40.
34. Zheng L, Howell SJ, Hatala DA, Huang K, Kern TS. Salicylate-based antiinflammatory drugs inhibit the early lesion of diabetic retinopathy. *Diabetes.* 2007;56(2):337-45.
35. Cohen KL, Harris S. Efficacy and safety of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the therapy of diabetic neuropathy. *Arch Intern Med.* 1987;147(8):1442-4.
36. Shi X, Chen Y, Nadeem L, Xu G. Beneficial effect of TNF-alpha inhibition on diabetic peripheral neuropathy. *J Neuroinflammation.* 2013;10:69.
37. Hayden MR, Tyagi SC. Islet redox stress: the manifold toxicities of insulin resistance, metabolic syndrome and amylin derived islet amyloid in type 2 diabetes mellitus. *JOP.* 2002;3(4):86-108.