ฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อน
ในการป้องกันความเสื่อมของเซลล์ประสาท

นางสาวศุทธิรัตน์ ชุ่มปิยะ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF *ORYZA SATIVA* VAR.GLUTINOSA AND *ZEA MAYS* VAR.RUGOSA EXTRACTS

Miss Suttirat Chumpiya

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine
Department of Clinical Chemistry
Faculty of Allied Health Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2015
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อนในการป้องกันความเสื่อมของเซลล์ประสาท
โดย	นางสาวศุทธิรัตน์ ชุ่มปิยะ
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาว์

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. ประวิตร เจนวรรธนะกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาว์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร ชื้อชวาลกุล)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. เทวฤทธิ์ สะระชนะ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร. ภญ.วรัญญา อรุโณทยานันท์)

ศุทธิรัตน์ ชุ่มปิยะ : ฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อนในการป้องกันความเสื่อมของเซลล์ประสาท (NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF *ORYZA SATIVA* VAR.GLUTINOSA AND *ZEA MAYS* VAR.RUGOSA EXTRACTS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. เทวิน เทนคำเนาว์, 89 หน้า.

โรคความเสื่อมของเซลล์ประสาท คือ โรคที่มีการทำลายของเซลล์ประสาทในสมอง ซึ่งพบว่าภาวะ Oxidative stress ซึ่งเกิดจากการสะสมของไฮโดรเจอเปอร์ออกไซด์ H_2O_2 เป็นสาเหตุหนึ่งส่งผลให้เกิดการทำลายของเซลล์สมอง โดยสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นสามารถยับยั้งได้ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้สนใจข้าว และข้าวโพด ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ในการรักษาโรค โดยพบว่ามีสารทริปโตเฟน และเมลาโทนินอยู่ ซึ่งมีการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ได้ ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์ประสาทโดยผ่าน kinase signaling pathway คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำสารสกัดจากข้าว และข้าวโพด มาศึกษาความสามารถในการออกฤทธิ์ในการต้านการตายของเซลล์โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อเซลล์ประสาท โดยการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Hippocampal neuronal cell line (HT-22) เป็นโมเดลในการศึกษา (*in vitro* model) ด้วยวิธี MTT assay, Annexin V-FITC and Propidium Iodide staining assay, DPPH assay, ABTS assay และ DCFH-DA staining และวิเคราะห์หาปริมาณเมลาโทนิน และทริปโตเฟนด้วยวิธี HPLC รวมถึงจะศึกษาในระดับกลไกถึงการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน BDNF ที่เกี่ยวข้องกับโรคความเสื่อมของเซลล์ประสาทด้วยวิธี real time-PCR และ western blot ซึ่งผลการทดลองพบว่าข้าว และข้าวโพด 3 ชนิด ได้แก่ ข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และเอทานอล มีฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ HT-22 จากการถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 และลดการเกิดภาวะ oxidative stress ภายในเซลล์ โดยมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และมีสารทริปโตเฟนและเมลาโทนินเป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้สามารถเพิ่มการแสดงออกของ BDNF mRNA และโปรตีนได้ จากการศึกษาบอกได้ว่าสารสกัดข้าว และข้าวโพด ป้องกันเซลล์ HT-22 จากอนุมูลอิสระ H_2O_2 และยับยั้ง ROS ที่เกิดภายในเซลล์ และมีฤทธิ์ต่อเซลล์ประสาท โดยมีกลไกในการเพิ่มการแสดงออกของ BDNF mRNA และโปรตีน

ภาควิชา เคมีคลินิก ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2558

5576664137 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE
KEYWORDS: NEUROPROTECTIVE EFFECT / HT22 / RICE / CORN / REACTIVE OXYGEN SPECIES

SUTTIRAT CHUMPIYA: NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF *ORYZA SATIVA* VAR. GLUTINOSA AND *ZEA MAYS* VAR. RUGOSA EXTRACTS. ADVISOR: ASST. PROF. TEWIN TENCOMNAO, Ph.D., 89 pp.

This study evaluated the protective effects of rice (*Oryza sativa* var.glutinosa) extracts including white, brown and black glutanious rice and corn (*Zea mays* var. rugosa) extracts including sweet corn and baby corn , and their underlying mechanisms against H_2O_2-induced neuronal cell death in HT-22 cells. H_2O_2-induced neurotoxicity was characterized by decrease in cell viability, increase in ROS production and decrease in BDNF mRNA and protein expression. Pretreatment with rice and corn extracts significantly attenuated H_2O_2-induced neurotoxicity, and also significantly decreased ROS production. Rice and corn extracts could upregulate of the expression of BDNF mRNA and protein. They possessed melatonin and tryptophan contents. Therefore, it is evident that rice and corn extracts protected HT22 cells from the cytotoxic effect of H_2O_2, and inhibition of ROS production in conjunction with modulation of BDNF expression may contribute to the underlying mechanisms. This result suggested that rice and corn extracts might be beneficial as potential way to prevent of neurodegenerative diseases.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Department:	Clinical Chemistry	Student's Signature	.....
Field of Study:	Clinical Biochemistry and Molecular Medicine	Advisor's Signature	.....
Academic Year:	2015		

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่องนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.เทวิน เทนคำเนาว์ ซึ่งรับหน้าที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่คอยชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหาในระหว่างการทำวิจัยตลอดจนโอกาสดีๆทางการศึกษาที่อาจารย์ได้แนะนำ ดิฉันขอขอบพระคุณอาจารย์ไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณารับเป็นประทานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.ศิริพร ชื้อชวาลกุล และ อ.ดร.เทวฤทธิ์ สะระชนะ ที่กรุณามาเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ ดร.ภญ.วรัญญา อรุโณทยานันท์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการนอกมหาวิทยาลัยในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 25 ครั้งที่ 3/2557 และทุนส่งเสริมการวิจัยในภูมิภาคเอเชียของมูลนิธิเกาหลีเพื่อการศึกษาขั้นสูง จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณคณะทันตแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ที่ให้โอกาสทางการศึกษา

ขอขอบพระคุณอาจารย์ เพื่อนๆ บุคลากรทุกท่าน ในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกทางด้านสถานที่ และอุปกรณ์บางส่วนในการศึกษาวิจัย และเป็นที่ปรึกษาและกำลังใจในระหว่างการศึกษาวิจัยครั้งนี้

และสุดท้ายขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่สาว และครอบครัว ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นแรงสนับสนุน และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดการศึกษาเสมอมา

ความดีของการศึกษาและคุณค่าของการศึกษาวิทยานิพนธ์นี้ ข้าพเจ้าขออุทิศให้แด่บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฎ
สารบัญภาพ ..... ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
2.1 โรคความเสื่อมของระบบประสาท 5
2.2 อนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ 6
2.3 เมลาโทนิน และทริปโตเฟน 8
2.4 กลไกการสร้างเมลาโทนิน 9
2.5 พืชที่พบสารเมลาโทนิน 10
2.6 ข้าวและข้าวโพด กับ งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคความเสื่อมของเซลล์ประสาท 11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 15
3.1 สารเคมี เครื่องมือ และอุปกรณ์ ที่ใช้ในการทดลอง 15
3.1.1 สารเคมี 15
3.1.2 เครื่องมือ 17

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

3.1.3 อุปกรณ์ 18
3.2 กลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย 20
3.2.1 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง 20
3.2.2 ตัวอย่างข้าว และข้าวโพด 20
3.3 ระเบียบวิธีวิจัย 21
3.3.1 การเตรียมสารสกัดข้าวและข้าวโพดในการศึกษาวิจัย 21
3.3.1.1 การสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเฮกเซนโดยวิธีการหมักหรือมาเซอเรชัน (Maceration) 21
3.3.1.2 การสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยตัวทำละลายน้ำโดยวิธีการเพิ่มความร้อน (Heat up) 22
3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยเทคนิค MTT assay ... 22
3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดต่อการตายของเซลล์แบบ early และ late apoptosis/necrosis ด้วยเทคนิค Annexin V-FITC and Propidium Iodide staining assay / Flow cytometry analysis 23
3.3.4 การทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและข้าวโพด 25
3.3.4.1 การทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยวิธี DPPH• assay 25
3.3.4.2 การทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ assay 26
3.3.5 การทดสอบหาปริมาณสารเมลาโทนินและทริปโตเฟนในสารสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยวิธี HPLC 29
3.3.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดในการป้องกันเซลล์เพาะเลี้ยงจากภาวะ oxidative stress ด้วยวิธี DCFH-DA assay 30
3.3.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน BDNF ด้วยวิธี Real time RT-PCR 31

หน้า

3.3.7.1 การสกัด Total RNA โดยใช้น้ำยา TRIzol 31
3.3.7.2 การกำจัด DNA ปนเปื้อนออกจาก RNA ด้วยเอนไซม์ DNase I 32
3.3.7.3 การสร้าง complementary DNA (cDNA) จาก RNA 33
3.3.7.4 การทดสอบการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน BDNF ด้วยเทคนิค Real time - PCR 34
3.3.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดต่อการแสดงออกระดับโปรตีน ของโปรตีน BDNF ด้วยวิธี Western blot analysis 35
3.3.8.1 การสกัดโปรตีนจากเซลล์ HT-22 35
3.3.8.2 การวัดโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay 36
3.3.8.3 ขั้นตอนการแยก และประกบโปรตีนด้วยวิธี western blot 36
3.3.9 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 39
บทที่ 4 ผลการวิจัย 40
4.1 ผลการพิสูจน์ชนิดของพืชที่สนใจทั้ง 5 ชนิด 40
4.2 ผลการสกัดพืชทั้ง 5 ชนิดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเฮกเซนด้วยวิธีการหมัก (maceration) 40
4.3 ผลการสกัดพืชทั้ง 5 ชนิดด้วยตัวทำละลายน้ำ ด้วยวิธีการเพิ่มความร้อน (Heat up) 41
4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดข้าว และข้าวโพดต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HT-22 ด้วยวิธี MTT assay 41
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดต่อการตายของเซลล์แบบ early และ late apoptosis/necrosis ด้วยเทคนิค Annexin V-FITC and Propidium Iodide staining assay / Flow cytometry analysis 50
4.6 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและข้าวโพด 52
4.6.1 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยวิธี DPPH• assay 52

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

4.6.2 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยวิธี ABTS assay 53
4.7 ผลการทดสอบหาปริมาณสารเมลาโทนินและทริปโตเฟนในสารสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยวิธี HPLC 55
4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าว และข้าวโพด ในการป้องกันเซลล์ HT-22 จากภาวะ oxidative stress ด้วยวิธี DCFH-DA assay 57
4.9 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน BDNF ด้วยวิธี Real time RT-PCR 59
4.10 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดต่อการแสดงออกระดับโปรตีน ของโปรตีน BDNF ด้วยวิธี Western blot analysis 61
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 63
5.1 สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผล 63
5.2 สรุป และข้อเสนอแนะ 69
รายการอ้างอิง 70
ภาคผนวก 77
ภาคผนวก ก ข้อมูลจากการทดลอง 78
ภาคผนวก ข น้ำยา และสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ 82
ภาคผนวก ค คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย 87
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 89

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 : สรุปพืชที่พบมีสารเมลาโทนิน 10

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของพืชทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 21

ตารางที่ 3 แสดงขั้นตอนทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี DPPH assay 26

ตารางที่ 4 แสดงขั้นตอนทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ assay 28

ตารางที่ 5 แสดงขั้นตอนการกำจัด DNA ปนเปื้อนในตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้ 33

ตารางที่ 6 แสดงขั้นตอนการเติมน้ำยาในการสร้าง cDNA จาก RNA 33

ตารางที่ 7 แสดงขั้นตอนการเติมน้ำยาเพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการ 34

ตารางที่ 8 แสดง primers ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการ 35

ตารางที่ 9 แสดงปฏิกิริยา และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวน DNA ของยีน BDNF 35

ตารางที่ 10 ขั้นตอนการใส่น้ำยาสำหรับเตรียมเจล (SDS-PAGE) 37

ตารางที่ 11 แสดงแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษา 39

ตารางที่ 12 ผลการพิสูจน์ชนิดของพืชที่สนใจทั้ง 5 ชนิด 40

ตารางที่ 13 ผลการสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน 41

ตารางที่ 14 แสดงถึงผลการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดอ่อน และข้าวโพดหวานที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ด้วยวิธี DPPH• assay 52

ตารางที่ 15 แสดงถึงผลการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดอ่อน และข้าวโพดหวานที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ด้วยวิธี ABTS assay 54

ตารางที่ 16 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารทริปโตเฟน และเมลาโทนินในสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดอ่อน และข้าวโพดหวาน ด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ด้วยวิธี HPLC 55

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ N-acetyl-5-methoxytryptamine และ L-tryptophan [31]..... 8

ภาพที่ 2 กลไกการสร้างเมลาโทนิน [34] 9

ภาพที่ 3 วิถีการทำงานของโปรตีน brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [58]..... 14

ภาพที่ 4 กลไกการทำงานระหว่างเมลาโนนิน และตัวรับเมลาโทนินต่อการแสดงออกของ 14

ภาพที่ 5 เซลล์สมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนู (Hippocampal neuronal cell line, HT-22 cell)..... 20

ภาพที่ 6 ปฏิกิริยารีดักชั่น (Reduction reaction) ของวิธี MTT assay [62]..... 22

ภาพที่ 7 แสดงการจับของสี Annexin V-FITC และ Propidium iodine 24

ภาพที่ 8 แสดงปฏิกิริยาของ DPPH ต่อสารต้านอนุมูลอิสระ [64]..... 25

ภาพที่ 9 แสดงปฏิกิริยาของ $ABTS^{\bullet+}$ ต่อสารต้านอนุมูลอิสระ [65]..... 27

ภาพที่ 10 แสดงกระบวณการตรวจวัดสารด้วยวิธี HPLC [66]..... 29

ภาพที่ 11 แสดงปฏิกิริยาของ DCFH-DA ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ [67]..... 30

ภาพที่ 12 แสดงปฏิกิริยาระหว่าง Coomassie Brilliant Blue G-250 กับโปรตีน [68]..... 36

ภาพที่ 13 แสดงภาพการแยกโปรตีนด้วยเจล Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ทั้งแบบ Stacking Gel เพื่อให้โปรตีนตกลงมารวมกัน.. 37

ภาพที่ 14 แสดงลำดับการวางฟองน้ำ กระดาษกรอง เจล 38

ภาพที่ 15 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ ด้วยวิธี MTT assay..... 42

ภาพที่ 16 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ด้วยวิธี MTT assay..... 43

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 17 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ด้วยวิธี MTT assay 44

ภาพที่ 18 แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ด้วยวิธี MTT assay 45

ภาพที่ 19 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำในการป้องกันเซลล์ HT-22 ต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ด้วยวิธี MTT assay 47

ภาพที่ 20 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ในการป้องกันเซลล์ HT-22 ต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ด้วยวิธี MTT assay 48

ภาพที่ 21 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ในการป้องกันเซลล์ HT-22 ต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ด้วยวิธี MTT assay 49

ภาพที่ 22 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ในการป้องกันเซลล์ HT-22 ต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ด้วยวิธี Annexin V-FITC and Propidium Iodide staining assay / Flow cytometry analysis 51

ภาพที่ 23 กราฟวิเคราะห์ความสัมพันธ์ โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (R^2) ระหว่างความแตกต่างของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ กับ ปริมาณทริปโตเฟน และเมลาโทนิน ในสารสกัดข้าวและข้าวโพด 56

ภาพที่ 24 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล(BlE) และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ(BaH) และ เอทานอล (BaE) ในการป้องกันเซลล์ HT-22 จากภาวะ oxidative stress ที่ถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ด้วยวิธี DCFH-DA assay 58

ภาพที่ 25 แสดงผลการวัดการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน BDNF ในเซลล์ HT-22 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล(BlE) และ

ข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ(BaH) และ เอทานอล(BaE) ด้วยวิธี Real time-PCR 60

ภาพที่ 26 แสดงผลการวัดการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน BDNF ในเซลล์ HT-22 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล(BlE) และ ข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ(BaH) และ เอทานอล(BaE) ด้วยวิธี western blot 62

ภาพที่ 27 แสดงชนิดของตัวทำละลายเรียงตามความเป็นขั้วน้อยไปมาก 64

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคความเสื่อมของเซลล์ประสาท คือ โรคที่มีการทำลายของเซลล์ประสาทในสมอง ทำให้สมองในบริเวณที่ถูกทำลายไม่สามารถทำงานได้ ส่งผลให้ปริมาตรของสมองจะค่อย ๆ ฝ่อเล็กลง โดยโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาทมีด้วยกันหลายโรค เช่น โรคอัลไซเมอร์, โรคมะเร็งสมอง, โรคพาร์กินสัน, Encephalitis, Epilepsy, Genetic Brain Disorders, Stroke, Multiple Sclerosis และ Huntington's Disease รวมถึงภาวะโรคซึมเศร้าด้วย [1] ซึ่งสาเหตุของการเกิดโรคความเสื่อมของเซลล์ประสาท เกิดจากทั้งปัจจัยทางพันธุกรรม และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมปัจจุบันเข้ามามีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคต่างๆ มากขึ้น ทั้งสิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ การดำเนินชีวิตประจำวันที่ส่งผลก่อให้เกิดความเครียดในหลายๆ ด้าน และการบริโภคอาหารที่ไม่มีประโยชน์ จากข้อมูลของ the National Institute of Neurological Disorders and Stroke ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า มีภาวะความผิดปกติของระบบประสาทมากกว่า 600 ภาวะ ที่มีผลกระทบต่อชาวอเมริกัน ประมาณ 50 ล้านคนต่อปี [2] และพบว่ามีโรคความเสื่อมของเซลล์ประสาทที่สำคัญที่พบมาก ได้แก่ โรคอัลไซเมอร์ และโรคพาร์กินสัน ซึ่งโรคดังกล่าวเกิดขึ้นกับ 20 ล้านคนทั่วโลก และมีเปอร์เซ็นต์เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ในประเทศไทยพบว่ามีประชากรอายุเกิน 60 ปี ถึง 3 ล้าน 1 แสนคน คิดเป็นเปอร์เซนต์ ได้ร้อยละ 5.7 ของประชากรไทย (พ.ศ 2532) ดังนั้นกลุ่มประชากรกลุ่มนี้จึงมีความโน้มเอียงสูงที่จะเกิดภาวะความเสื่อมของเซลล์ประสาทได้ ภาวะความเสื่อมของเซลล์ประสาทนี้ไม่เฉพาะเกิดแต่ในผู้สูงอายุเท่านั้น ในประชากรที่อายุน้อยก็อาจเกิดภาวะนี้ได้เช่นกัน ซึ่งมักจะมีสาเหตุมาจากโรคพันธุกรรม [3] และยังพบว่าผู้ที่มีภาวะซึมเศร้าบ่อยๆสามารถพัฒนาการดำเนินโรคเป็นโรคอัลไซเมอร์ได้ [4]

นอกจากนี้ อีกหนึ่งสาเหตุที่สำคัญและกำลังเป็นปัญหาในด้านสาธารณสุขที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงสูงขึ้นต่อการเกิดโรคความเสื่อมของเซลล์ประสาท คือ ความชรา (aging) โดยเฉพาะในปัจจุบันประเทศไทยกำลังมีสัดส่วนประชากรผู้สูงวัยเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด แม้มีอายุยืนยาวเพิ่มขึ้น แต่ก็ปฏิเสธการป่วยเป็นโรคต่างๆ ไม่ได้ โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากความเสื่อม ในระบบต่างๆ ในผู้สูงวัย อาทิ เช่น โรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท เช่น โรคอัลไซเมอร์ และโรคซึมเศร้า เป็นต้น โรคเหล่านี้กำลังเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทยและประเทศต่างๆ ทั่วโลก ที่ทวีความรุนแรงมากขึ้นในสภาวะปัจจุบัน ดังนั้น ต้องเตรียมรับกับปัญหาโรคเรื้อรังในผู้สูงอายุในทุกมิติ

เนื่องจากยังไม่มียาที่พร้อมทั้งด้านสรรพคุณ ไร้ผลที่ไม่พึงประสงค์ และราคาไม่แพง การศึกษาเพื่อพัฒนาการป้องกันและรักษาผู้ป่วยโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ประสาท จึงต้องดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง แม้ว่ายังไม่ได้ผลเป็นที่น่าพอใจนัก แต่ก็มีความเป็นไปได้สูงที่สมุนไพร หรือผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ เช่น ข้าว และข้าวโพด จะเป็นทางเลือกที่ได้รับความนิยมสำหรับการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ประสาทได้

การรักษาโรคความเสื่อมของเซลล์ประสาท ปัจจุบันยังไม่มียาที่สามารถรักษาโรคความเสื่อมทางระบบประสาทเหล่านี้ให้หายขาดได้ มีเพียงยาที่ใช้บรรเทารักษาตามอาการเท่านั้น ทำให้ผู้ที่ป่วยเป็นโรคเหล่านี้จะต้องทานยาอยู่ตลอด ไม่สามารถจะหยุดยาได้ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคสูงขึ้น เพราะนำยาเข้ามาจากต่างประเทศ นอกจากนี้ ยาที่ใช้ในการรักษา ก็ยังส่งผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยได้ ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้ป่วยด้วย ตัวอย่างยารักษาโรคอัลไซเมอร์ เช่น โดเนเพซิล, กาแลนทามีน และไรวาสติกมีน ซึ่งเป็นยาที่ใช้เพื่อลดอัตราการทำลายแอซิทิลโคลีนจากการที่เซลล์สมองถูกทำลาย ซึ่งยากลุ่มเหล่านี้มีผลข้างเคียงของยาที่พบบ่อยคือ คลื่นไส้ อาเจียน อันเนื่องจากปริมาณโคลิเนอร์จิกมากเกินไป พบได้ประมาณร้อยละ 10-20 ของผู้ใช้ยาและมีความรุนแรงในระดับน้อยถึงปานกลาง ส่วนผลข้างเคียงที่พบได้น้อยคือตะคริว หัวใจเต้นช้า เบื่ออาหาร น้ำหนักลด และเพิ่มการสร้างกรดกระเพาะ [5]

ดังนั้น การรักษาด้วยสมุนไพร หรือผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความปลอดภัย และราคาไม่แพง จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้มีการศึกษาถึงข้าว และข้าวโพด ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย และเป็นอาหารหลักที่คนไทยนิยมบริโภค พบว่าข้าว และข้าวโพดมีคุณสมบัติในการป้องกันและรักษาโรคทางระบบประสาทด้วยสารที่มีชื่อว่า เมลาโทนิน และทริปโตเฟน(สารตั้งต้นของเมลาโทนิน) โดยพบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ [6] นอกจากนี้ยังพบว่าสารเมลาโทนินช่วยลดอาการนอนไม่หลับในผู้ป่วยซึมเศร้า [7] และมีผลต่อผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ [8] และพาร์กินสันด้วย [9] นอกจากข้าวแล้วยังพบว่าข้าวโพดยังประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ และสามารถป้องกันความเสื่อมของโรคความเสื่อมของเซลล์ประสาทได้เช่นกัน โดยเฉพาะในโรคอัลไซเมอร์ [10] ที่สำคัญกว่านั้น ถ้าข้าวและข้าวโพดที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ มีฤทธิ์ทางชีวภาพจริง การบริโภคข้าวและข้าวโพดเหล่านี้ จะเป็นแนวทางในการป้องกันโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ประสาทได้เป็นอย่างดีด้วย

ด้วยเหตุนี้ คณะผู้วิจัย จึงสนใจที่จะนำสารสกัดจากข้าวและข้าวโพด ได้แก่ ข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อนมาศึกษาความสามารถในการออกฤทธิ์ โดยการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Hippocampal neuronal cell line (HT-22) เป็นโมเดลในการศึกษา (*in vitro* model) เพื่อทดสอบว่า สารสกัดจากข้าวและข้าวโพดเหล่านี้ จะออกฤทธิ์ต้านการตายของเซลล์

โดยมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระต่อเซลล์ประสาท หรือไม่ อย่างไร รวมถึง จะศึกษาในระดับกลไกว่าการออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น อาจเป็นเพราะสารสกัดจากข้าวและข้าวโพด มีสารเมลาโทนิน และ/หรือสารตั้งต้นในการสร้างเมลาโทนิน (ทริปโตเฟน) เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ นอกจากนี้ สารสกัดจากข้าวและข้าวโพดเหล่านี้ อาจมีสารอื่นๆที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วย ซึ่งมีสรรพคุณในการต้านความเสื่อมของเซลล์ประสาท อนึ่งมีรายงานที่แสดงว่า เมลาโทนินออกฤทธิ์โดยมีกลไกในระดับโมเลกุล โดยการกระตุ้นการเพิ่มการแสดงออกของยีน brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ในด้านการเพิ่มประสิทธิภาพ เพื่อต้านความเสื่อมของเซลล์ประสาท นอกจากนี้ยังพบว่าเมลาโทนินสามารถลดอาการ cognitive impairment ในหนูที่มีความผิดปกติในการนอนหลับ โดยสารมารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน cerebral cortex และ hippocampus ของหนู [11-14] และยังพบว่า BDNF ยังเป็นตัวที่เชื่อมระหว่างโรคอัลไซเมอร์และภาวะซึมเศร้า เนื่องจากพบว่าในภาวะซึมเศร้าเป็นสาเหตุทำให้เกิดการทำลายของเซลล์สมองส่วน hippocampus และพบว่าในโรคอัลไซเมอร์ก็เช่นเดียวกันพบว่ามีการทำลายของเซลล์สมองส่วน hippocampus เช่นกัน และส่งผลให้เกิดการลดระดับของ BDNF ลง [15] โดยโครงการวิจัยนี้ จะพิสูจน์ด้วยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการวิจัย คณะผู้วิจัยหวังว่า การวิจัยในครั้งนี้ จะเป็นแนวทางในการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดอื่นๆ และเป็นประโยชน์สำหรับผู้ต้องการศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับประสิทธิภาพของข้าวและข้าวโพดชนิดอื่นที่ส่งผลในการป้องกันและรักษาโรคความเสื่อมของเซลล์ประสาทต่อไป ผลลัพธ์ที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ เป็นแนวทางในการช่วยผลักดันด้วยหลักฐานเชิงประจักษ์ เพื่อนำไปสู่การเพิ่มมูลค่าของข้าวและข้าวโพดไทย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อน ต่อการต้านการตายของเซลล์ประสาท

2. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารเมลาโทนิน และทริปโตเฟน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างเมลาโทนิน และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ในสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อน

3. เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อน ต่อการแสดงออกของโปรตีน brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาเมล็ดข้าวเหนียว 3 ชนิด ได้แก่ ข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง และข้าวเหนียวดำ พันธุ์กข6 ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อน ซึ่งมีอยู่ทั่วไปในประเทศไทย โดยคณะผู้วิจัยจะทำการประเมินผลของสารสกัดจากข้าว และข้าวโพดต่อการมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์สมอง ตามด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่ออกฤทธิ์ ได้แก่ เมลาโทนิน และทริปโตเฟน รวมทั้งความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ จะวิเคราะห์กลไกในระดับโมเลกุล คือ การแสดงออกของโปรตีน BDNF ที่จะบ่งชี้ได้ว่าการออกฤทธิ์ป้องกันความเสื่อมของเซลล์ประสาทนั้น มีเมลาโทนิน และ/หรือ ทริปโตเฟน(สารตั้งต้นในการสร้างเมลาโทนิน) เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ทั้งนี้ จะทำการศึกษาในเซลล์สมองส่วนฮิปโปแคมปัสเพาะเลี้ยงของหนู (Hippocampal neuronal cell line, HT-22) ซึ่งเป็นการศึกษาในลักษณะ *in vitro* model

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้รับองค์ความรู้ เพื่อให้มีความเข้าใจต่อกลไกการทำงานของสารเมลาโทนิน และทริปโตเฟน (สารตั้งต้นของเมลาโทนิน) ในสารสกัดจากข้าว และข้าวโพดตลอดจนกลไกในระดับการแสดงออกของโปรตีน BDNF ที่เพิ่มประสิทธิภาพในการต้านความเสื่อมของเซลล์ประสาท

2. สามารถนำข้าวและข้าวโพด มาเป็นแนวทางหรือเป็นเป้าหมายใหม่ในการป้องกันและรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ประสาท

3. สามารถนำความรู้และข้อมูลที่ได้ของสารเมลาโทนิน และทริปโตเฟน (สารตั้งต้นของเมลาโทนิน) ในสารสกัดจากข้าวและข้าวโพด ไปใช้ในการศึกษาวิจัยต่อในอนาคตเพื่อพัฒนาอาหารเสริม หรือยา ในการรักษา สร้างเสริมสุขภาพให้แข็งแรง และป้องกันโรคจากความเสื่อมของเซลล์ประสาท

4. สามารถนำความรู้ที่ได้มาเผยแพร่ต่อประชาชนผู้บริโภคถึงคุณประโยชน์ต่อสุขภาพของตนเอง และทำให้คนไทยนิยมบริโภคข้าวและข้าวโพดไทยมากขึ้น และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของข้าวและข้าวโพดไทย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคความเสื่อมของระบบประสาท

โรคความเสื่อมของเซลล์ประสาท คือ โรคที่มีการทำลายของเซลล์ประสาทในสมอง ทำให้สมองในบริเวณที่ถูกทำลายไม่สามารถทำงานได้ ส่งผลให้ปริมาตรของสมองจะค่อย ๆ ฝ่อเล็กลง โดยโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาทมีด้วยกันหลายโรค เช่น โรคอัลไซเมอร์, โรคมะเร็งสมอง, โรคพาร์กินสัน, Encephalitis, Epilepsy, Genetic Brain Disorders, Stroke, Multiple Sclerosis และ Huntington's Disease รวมถึงภาวะโรคซึมเศร้าด้วย [1] ซึ่งสาเหตุของการเกิดโรคความเสื่อมของเซลล์ประสาท เกิดจากทั้งปัจจัยทางพันธุกรรม และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมปัจจุบันเข้ามามีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคต่างๆ มากขึ้น ทั้งสิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ การดำเนินชีวิตประจำวันที่ส่งผลก่อให้เกิดความเครียดในหลายๆ ด้าน และการบริโภคอาหารที่ไม่มีประโยชน์ อีกหนึ่งสาเหตุที่สำคัญและกำลังเป็นปัญหาในด้านสาธารณสุขที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงสูงขึ้นต่อการเกิดโรคความเสื่อมของเซลล์ประสาท คือ ความชรา (aging) โดยเฉพาะในปัจจุบันประเทศไทยกำลังมีสัดส่วนประชากรผู้สูงวัยเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด แม้มีอายุยืนยาวเพิ่มขึ้น แต่ก็ปฏิเสธการป่วยเป็นโรคต่างๆ ไม่ได้ โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากความเสื่อม ในระบบต่างๆ ในผู้สูงวัย อาทิ เช่น โรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท เช่น โรคอัลไซเมอร์ และโรคซึมเศร้า เป็นต้น การรักษาโรคความเสื่อมของเซลล์ประสาท ปัจจุบันยังไม่มียาที่สามารถรักษาโรคความเสื่อมทางระบบประสาทเหล่านี้ให้หายขาดได้ มีเพียงยาที่ใช้บรรเทารักษาตามอาการเท่านั้น ทำให้ผู้ที่ป่วยเป็นโรคเหล่านี้จะต้องทานยาอยู่ตลอด ไม่สามารถจะหยุดยาได้ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคสูงขึ้น เพราะนำยาเข้ามาจากต่างประเทศ นอกจากนี้ ยาที่ใช้ในการรักษา ก็ยังส่งผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยได้ ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้ป่วยด้วย ตัวอย่างยารักษาโรคอัลไซเมอร์ เช่น โดเนเพซิล, กาแลนทามีน และไรวาสติกมีน ซึ่งเป็นยาที่ใช้เพื่อลดอัตราการทำลายแอซิทิลโคลีนจากการที่เซลล์สมองถูกทำลาย ซึ่งยากลุ่มเหล่านี้มีผลข้างเคียงของยาที่พบบ่อยคือ คลื่นไส้ อาเจียน อันเนื่องจากปริมาณโคลิเนอร์จิกมากเกินไป พบได้ประมาณร้อยละ 10-20 ของผู้ใช้ยาและมีความรุนแรงในระดับน้อยถึงปานกลาง ส่วนผลข้างเคียงที่พบได้น้อยคือตะคริว หัวใจเต้นช้า เบื่ออาหาร น้ำหนักลด และเพิ่มการสร้างกรดกระเพาะ [5]

2.2 อนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ เป็นสารซึ่งมีอิเล็กตรอนซึ่งไม่มีคู่อยู่ในวงรอบของอะตอม หรือโมเลกุล ซึ่งอนุมูลอิสระมีมากมายหลายชนิดเช่น hydroxyl radical, superoxide, peroxyl, alkoxyl และ oxides ของ nitrogen โดยปกติสารเหล่านี้เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้ว โดยเฉพาะเวลามีธาตุเหล็ก ทองแดง แมงกานีส โคบอลต์ โครเมียม นิเกิล อยู่เป็นจำนวนน้อยๆ มักเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่และร่างกายก็จะมีระบบของสารต้านอนุมูลอิสระขจัดออกไป แต่ถ้าร่างกายได้รับสารอนุมูลอิสระจากภายนอกมากเกินไป ตัวอย่างเช่น ได้รับจากอาหารบางชนิดที่รับประทาน จากสิ่งแวดล้อมรอบตัวเรา เช่น แสงอาทิตย์ซึ่งมีรังสี ultraviolet การแผ่รังสี (radiation) รังสี x-ray หรือจากมลพิษ เช่น ควันบุหรี่ ก๊าซจากท่อไอเสียรถยนต์ ถ้าสารเหล่านี้มีมากขึ้นภายในร่างกาย และมากกว่าความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายเราจะสามารถขจัดหมด หรือในภาวะที่จำนวนของสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายลดลง เช่น ผู้สูงอายุ ก็จะทำให้มีสารอนุมูลอิสระเช่น ไฮโดเจนเปอออกไซด์ ซึ่งมีออกซิเจนเป็นศูนย์กลาง โดยรวมเรียกว่า reactive oxygen species (ROS) มากเกินไปก่อให้เกิดอันตรายได้ ซึ่งสารอนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อไขมัน (โดยเฉพาะ low density lipoprotein) โปรตีน หน่วยสารพันธุกรรม DNA และคาร์โบไฮเดรต ทำให้เพิ่มอัตราการเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลายชนิด โรคที่สำคัญและมีการศึกษากันมาก ได้แก่ โรคอัลไซเมอร์ หรือโรคความจำเสื่อม โรคความแก่ โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว โรคมะเร็งบางชนิด โรคไขข้ออักเสบ เป็นต้น [16] โดยสารอนุมูลอิสระที่เราสนใจและใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ ไฮโดเจนเปอออกไซด์ H_2O_2 ซึ่งเกิดจาก O_2^{2-} เมื่ออยู่ใน pH ร่างกายปกติจะเกิดปฏิกิริยา dismutation reaction ได้รับโปรตอนเกิดเป็น H_2O_2 แต่หากอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดปฏิกิริยานี้จะเกิดเร็วขึ้นเนื่องจากค่า pKa ของ H_2O_2 สูง ซึ่ง H_2O_2 มีอัตราการทำปฏิกิริยาต่ำแต่สามารถผ่านผนังเซลล์ได้ง่าย [17] โดยการทำปฏิกิริยาของ H_2O_2 เป็นตัวออกซิไดซ์เข้าทำลายผนังเซลล์ โปรตีน และ DNA ให้เสียหาย ทำให้ Ca^{2+} รั่วไหลออกมาจากแหล่งเก็บภายในเซลล์ไปกระตุ้นเอนไซม์ proteolytic ให้ทำลายระบบการสร้างพลังงานของเซลล์ เช่น เอนไซม์ในกระบวนการ glycolytic คือ glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase ทำให้เซลล์ขาดแคลนพลังงานและตาย [18] ในปัจจุบันเชื่อว่าสาเหตุโรคมากมายเกิดจากการเสื่อมของเซลล์และสารต่างๆ ในร่างกายที่เกิดจากการทำลายของอนุมูลอิสระทั้งที่เกิดจากร่างกายสร้างขึ้นมาเอง เช่น ระบบภูมิคุ้มกันในการต่อสู้เชื้อโรค และที่ได้รับมาจากภายนอกร่างกาย เช่น มลภาวะจากสิ่งแวดล้อม อาหาร การออกกำลังกายอย่างหนัก อนุมูลอิสระนี้จะไปทำอันตรายส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์และเนื้อเยื่อ เช่น ผนังเยื่อหุ้มเซลล์ ไซโทพลาซึม ไมโทคอนเดรีย และนิวเคลียส ทำให้สูญเสียโครงสร้าง หน้าที่การทำงาน และทำให้เซลล์ตาย เกิดเป็นพยาธิสภาพของโรคต่างๆ [19, 20] นอกจากร่างกายมีการเกิดอนุมูลอิสระได้ตลอดเวลาแล้ว ร่างกายจึงมีการปรับสมดุลเพื่อให้ร่ายกายสมดุลและ เซลล์ไม่ได้รับบาดเจ็บหรือเกิดพยาธิสภาพ

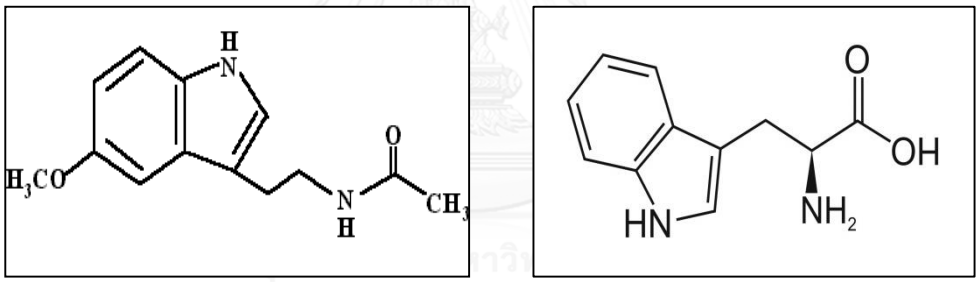
ต่างๆจากการเกิดอนุมูลอิสระ ร่างกายจึงมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อปรับลดระดับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นไม่ให้มีมากเกินไป

ร่างกายมนุษย์เรามีระบบการป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระไม่ให้มาทำอันตรายนั่นก็คือสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการสะเทิน (neutralize) อนุมูลอิสระโดยการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมหนึ่งตัวหรือมากกว่าแก่อนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระมีความไวในการทำปฏิกิริยากับสารอื่นลดลงหรือหมดไป โดยเมื่อสารต้านอนุมูลอิสระให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระไปแล้วก็จะกลายเป็นอนุมูลอิสระที่เฉื่อย ไม่ไวต่อปฏิกิริยา ร่างกายเรามีสารต้านอนุมูลอิสระรูปแบบต่างๆ มากมาย ทั้งที่สร้างขึ้นเองในร่างกายซึ่งจะเป็นพวกเอนไซม์หรือโปรตีนต่างๆ เช่น Superoxides dismutase (SODs), Catalase (Cat), Glutathione peroxidase (GPX), Glutathione reductase (Gred), Glutathione (GSH), Peroxiredoxin, เอนไซม์เฟส II, โปรตีนที่ทำหน้าที่จับโลหะ เช่น transferrin, ferritin, ceruloplasmin, hemoglobin และอัลบูมิน และ สารอื่นๆ ที่แสดงคุณสมบัติในการป้องกันเซลล์ เช่น กรดอะมิโน Carnosine, Ansenine และเมลาโทนิน (melatonin) [21, 22] แต่ถ้าเรามีภาวะอนุมูลอิสระมากกว่าที่สารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายเราจะต้านทานได้ ซึ่งอาจจะเกิดจากการบาดเจ็บ ป่วยไข้ ฯลฯ จึงต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกมาเสริม แหล่งที่พบสารต้านอนุมูลอิสระมากและหาง่ายก็คืออาหารที่เรารับประทาน โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในอาหารมีมากมายเช่น วิตามิน, เกลือแร่, กรดไขมันจำเป็น และโพลีฟีนอลและไบโอฟลาโวนอยดส์ [23] ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระที่กล่าวมาข้างต้นที่ผู้วิจัยสนใจคือเมลาโทนิน (melatonin) ซึ่งพบว่านอกจากจะพบสามารถสร้างเองได้ในร่างกายแล้ว ยังพบมีในพืชต่างๆหลายชนิดอีกมากมาย ซึ่งจะได้รายงานต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.3 เมลาโทนิน และทริปโตเฟน

เมลาโทนิน หรือ N-acetyl-5-methoxytryptamine (ภาพที่ 1) เป็นสารที่เกิดจากการเมทาบอลิซึมของทริปโตเฟน (L-tryptophan) [24] ซึ่งถูกค้นพบโดย Lerner และคณะ ปี 1958 [25] เมลาโทนินเป็นฮอร์โมนในระบบประสาทที่สำคัญ สร้างมาจากต่อมไพเนียลของสัตว์มีกระดูกสันหลัง และจะหลั่งออกมาในตอนกลางคืนโดยจะหลังออกมาสูงสุดในช่วงระหว่าง 02.00 น. – 04.00 น. ดังนั้นจากการตรวจวัดระดับเมลาโทนินในเลือดแล้ว จะพบว่า ระดับเมลาโทนินตอนกลางคืนจะสูงกว่าตอนกลางวัน โดยในตอนกลางวันจะมีระดับที่ต่ำมาก [26] ซึ่งค่าเฉลี่ยของการผลิตเมลาโทนินในแต่ละวันเฉลี่ยประมาณ 30ug ต่อวัน และมีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 30-60 นาที [27] นอกจากเมลาโทนิน จะพบในกระแสเลือดแล้ว เมลาโทนินยังสามารถพบได้ในของเหลวในร่างกายอื่นๆด้วย ได้แก่ น้ำลาย, น้ำไขสันหลัง, น้ำอสุจิ, น้ำดี และน้ำคร่ำ [28-30]

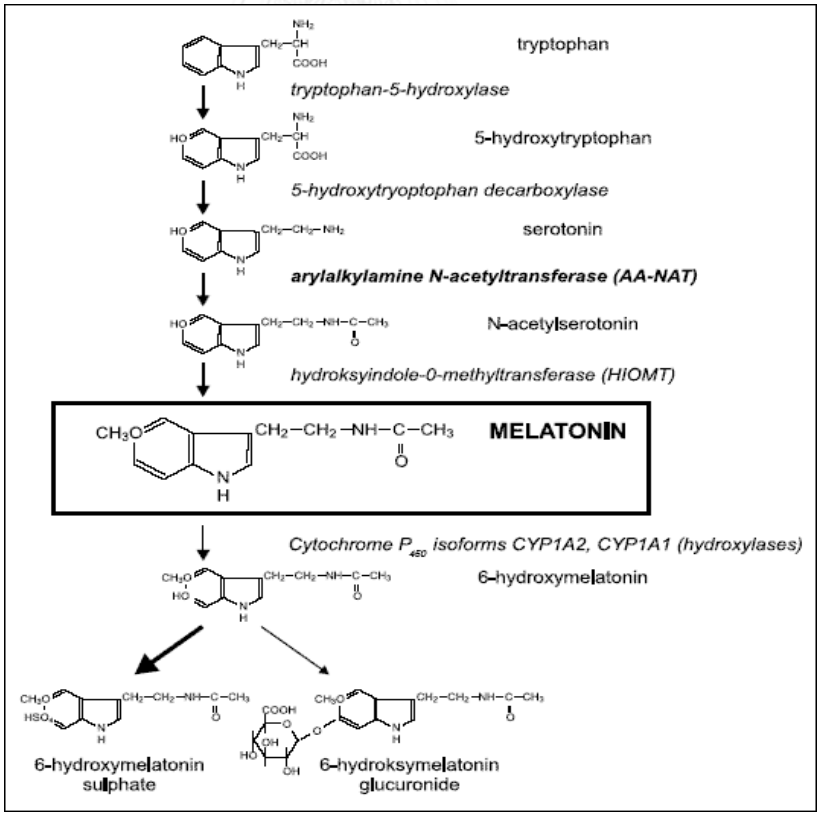


ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ N-acetyl-5-methoxytryptamine(ซ้าย)
และ L-tryptophan(ขวา) [31]

Chulalongkorn University

2.4 กลไกการสร้างเมลาโทนิน

กลไกการสร้างเมลาโทนิน ดังภาพที่ 2 โดยเริ่มจากการได้รับทริปโตเฟนเข้ามา เนื่องจากกรดอะมิโนชนิดนี้เป็นกรดอะมิโนจำเป็น ซึ่งร่างกายไม่สามารถสร้างได้จึงต้องได้รับมาจากภายนอกเท่านั้น ทริปโตเฟนจะถูกส่งมายังเซลล์ไพเนียล ซึ่งมีเอนไซม์ tryptrophan-5-hydroxylase เปลี่ยนทริปโตเฟนเป็น 5-hydroxytryptophan ซึ่งต่อมาถูก decarboxylated เปลี่ยนเป็นซีโรโทนินด้วยเอนไซม์ L-aromatic amino acid decarboxylase จากนั้น ซีโรโทนินถูกเปลี่ยนเป็น N-acetylserotonin ด้วยเอนไซม์ arylalkulamine N-acetyltransferase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในขั้นตอนการสร้างเมลาโทนิน จึงถือว่าเป็น rate-limiting enzyme และจากนั้น N-acetylserotonin ถูก hydroxyindole-O-methyltransferase เปลี่ยนเป็น เมลาโทนินในที่สุด [28, 32] และหลังจากการสร้างเมลาโทนิน จะไม่มีการสะสมไว้ภายในเซลล์ไพเนียลนาน เมลาโทนินจะถูกหลั่งออกมาสู่กระแสเลือดอย่างรวดเร็ว [33] ซึ่งเมลาโทนินจะถูกเมทาบอไลซ์ครั้งแรกที่ตับ และครั้งที่สองที่ไต และประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของเมลาโทนินใน serum ที่ไม่ถูกเมทาบอไลซ์ จะถูกขับออกมาทางปัสสาวะ [28]



ภาพที่ 2 กลไกการสร้างเมลาโทนิน [34]

2.5 พืชที่พบสารเมลาโทนิน

นอกจากเมลาโทนินพบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแล้ว ยังพบว่าเมลาโทนินที่มีโครงสร้างเหมือนกันนี้สามารถพบได้ในพืชหลายชนิดด้วย จากหลักฐานการศึกษาวิจัยวัดระดับเมลาโทนินโดยวิธี radioimmunoassay ในพืช ของ Dubbels [35] และ Hattori [36] ในปี 1995 รายงานว่า มีในพืชหลายชนิด เช่น ข้าว, มะเขือเทศ, มันฝรั่ง, หัวหอม, แตงกวา, กล้วย, แอบเปิ้ล, สตรอเบอรี่ และกีวี เป็นต้น พบว่ามีระดับของสารเมลาโทนินในพืชพวกนี้สูงตั้งแต่หน่วยพิโคกรัมถึงไมโครกรัม นอกจากนี้ ยังมีการค้นพบว่าในพืชจำพวกธัญพืชเช่น ข้าว, ข้าวโพด, ข้าวโอ๊ต และข้าวบาร์เล่ [37] มีปริมาณสารเมลาโทนินที่แตกต่างกันตั้งแต่ นาโนกรัมต่อกรัม จนถึงหลายพันพิโคกรัมต่อกรัม ซึ่งจากหลักฐานแสดงให้เห็นว่าถึงแม้พืชสปีชีส์เดียวกันแต่ก็มีระดับเมลาโทนินที่แตกต่างกัน [38] จากหลักฐานการค้นพบจะเห็นได้ว่าพืชชนิดหนึ่งที่พบว่ามีสารเมลาโทนินและเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของไทยนั้น คือ ข้าว (rice) และ ข้าวโพด (corn)

ตารางที่ 1 : สรุปพืชที่พบมีสารเมลาโทนิน

ชนิด	พืช	แหล่งอ้างอิง
ผักและผลไม้	มะเขือเทศ	[35, 36]
	มันฝรั่ง	[35, 36]
	หอมหัวใหญ่	[35, 36]
	แตงกวา	[35, 36]
	กล้วย	[35, 36]
	แอบเปิ้ล	[35, 36]
	สตรอเบอรี่	[35, 36]
	กีวี	[35, 36]
เมล็ด	อัลมอน	[39]
	เมล็ดทานตะวัน	[39]
	Alfalfa	[39]
	Black and white mustard	[39]
	Coriander	[39]

ชนิด	พืช	แหล่งอ้างอิง
ธัญพืช	ข้าวโพด	[36, 37]
	ข้าว	[36, 37]
	Wheat	[36, 37]
	ข้าวบาร์เลย์	[36, 37]
	ข้าวโอ๊ท	[36, 37]
	ข้าวกล้องงอก	[40]
Medicinal herb	St. John's wort (Hypericum perforatum)	[41]
	Feverfew (Tanacetum parthenium)	[42]

2.6 ข้าวและข้าวโพด กับ งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคความเสื่อมของเซลล์ประสาท

ข้าวมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* เป็นพืชในกลุ่ม POACEAE (GRAMINEAE) เพาะปลูกมากในเขตอากาศอบอุ่นโดยเฉพาะที่ทวีปเอเชีย เช่น ไทย อินเดีย อินโดจีน จีน และ ทวีปแอฟริกาตะวันออก ข้าวมีประโยชน์ต่อสุขภาพ [43] เนื่องจากพบว่าข้าวมีสารที่มีประโยชน์มากมาย เช่นcycloartenol ซึ่งเป็นสารกลุ่มเดียวกับ γ-oryzanol จะมีโครงสร้างที่คล้ายกับคลอเรสเตอรอล ดังนั้น cycloartenol จึงสามารถแย่งจับกับ active binding sites ของคลอเรสเตอรอลในตับ และสามารถขับคลอเรสเตอรอลออกจากเซลล์ โดยเปลี่ยนเป็นกรดน้ำดีและสีน้ำดีทางลำไส้เล็ก ส่งผลให้เกิดภาวะ hypocholesterolemic propionic acid ซึ่งเป็นโพลีฟีนอลที่พบมากในข้าวเช่นกัน จะขัดขวางมิให้ร่างกายดูดซึมไขมัน จึงช่วยลดระดับคลอเรสเตอรอล LDL และไตรกลีเซอไรด์ในซีรัมได้ [44] นอกจากนี้ ยังมีสารชีวภาพในข้าวที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอีกมากมาย ดังนี้ carotenoids, Niacin, Pyridoxin, Biotin, Inositol,วิตามินอี, γ -oryzanol, Oryzafuran, Phytosterol และแร่ธาตุต่างๆรวมถึงใยอาหารด้วย [45]

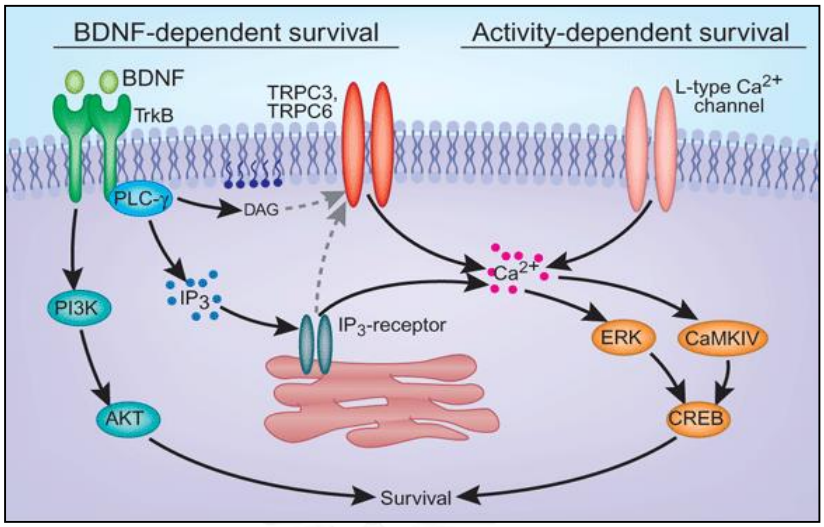
ข้าวโพดมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays* เป็นพืชอยู่ในกลุ่ม POACEAE (GRAMINEAE) [46] นอกจากข้าวแล้วพบว่า ข้าวโพดมีประโยชน์ต่อสุขภาพเช่นกัน พบว่านักวิจัยของมหาวิทยาลัย

คอร์เนลล์แห่งสหรัฐฯ รายงานในวารสารสมาคมเคมีแห่งอเมริกาว่า ข้าวโพดหวานที่ปรุงสุกแล้วจะออกฤทธิ์ล้างพิษในร่างกายสูงขึ้นได้อย่างเด่นชัด โดยข้าวโพดหากต้มหรือปรุงสุกแล้ว ข้าวโพดหวานยังคงสามารถเก็บสารต้านอนุมูลอิสระไว้ได้ แม้ว่าจะสูญเสียวิตามินซีไป นักวิจัยยังพบอีกว่าการต้มข้าวโพดหวาน ด้วยอุณหภูมิสูง 115 องศาเซลเซียส ในเวลานานต่างกัน 10, 25 และ 50 นาที พบว่ายิ่งต้มนานเท่าไหร่ จะทำให้มันมีสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเป็น 22, 44 และ 53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าสารที่ออกฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) มีส่วนเกี่ยวพันกับโรคอันสืบเนื่องมาจากความแก่ชราต่างๆ เช่น ต้อกระจก และโรคความเสื่อมของเซลล์ประสาทอีกด้วย [47] คณะนักวิจัยชี้แจงว่าข้าวโพดหวาน ที่ต้มหรือปิ้งจะปล่อย สารประกอบที่เรียกว่า กรดเฟอรูลิก (Ferulic acid) ซึ่งมีประโยชน์กับร่างกาย และจะยิ่งมากขึ้นเมื่อถูกความร้อนสูงขึ้น หรือเวลานานขึ้น กรดเฟอรูลิกเป็นพวก พฤกษเคมี (Phytochemical หรือ Phytonutrients) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ พบเฉพาะในผักและผลไม้และมีอยู่ไม่มากนัก แต่กลับพบว่ามีอยู่อย่างอุดมในข้าวโพด ซึ่งผสมปนเปรวมอยู่กับพฤกษเคมีอื่นๆเพราะฉะนั้นการทำให้มันสุก จึงช่วยให้มันปล่อยกรดเฟอรูลิกออกมาได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าข้าวโพดสีค่อนข้างเข้ม เช่น เหลืองเข้มจะมีสารต้านอนุมูลอิสระ กลุ่มลูทีน และ ซีแซนทีน มาก ซึ่งจะช่วยชะลอปัญหาจอประสาทตาเสื่อม หรือตาบอดจากจอตาเสื่อมได้ สำหรับฝักอ่อนของข้าวโพดก็พบว่ามีประโยชน์เช่นกัน พบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ เบตาแคโรทีน สามารถป้องกันเซลล์ถูกทำลายจากสารอนุมูลอิสระได้ [48, 49] นอกจากนี้ในข้าวโพดยังมีสารอื่นๆอีกมากมายเช่น วิตามินและเกลือแร่ ได้แก่ วิตามินซี แต่วิตามินเอ จะมีเฉพาะในสายพันธุ์ที่มีเมล็ดสีเหลืองเท่านั้น วิตามินเอ จะอยู่ในรูปเบต้าแคโรทีน ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์ สารคาโรทีนอย ช่วยป้องกันตาเสื่อมสภาพ นอกจากนี้ยังมีวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ด้วย สำหรับเกลือแร่ที่พบได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส และเหล็ก เป็นต้น สำหรับไขมันในเมล็ดข้าวโพดที่แก่จัดมีไขมันอยู่ประมาณร้อยละ 4 เมื่อนำข้าวโพดไปผลิตเป็นน้ำมันข้าวโพด ใช้ประกอบอาหารจะได้น้ำมันที่ประกอบไปด้วยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเป็นส่วนใหญ่ โดยมีกรดไลโนเลอิก 50% และกรดโอเลอิก 37% ซึ่งกรดไขมันชนิดนี้จะมีคุณประโยชน์ต่อร่างกาย คือจะช่วยควบคุมระดับคลอเลสเตอรอลให้เป็นปกติ [50]

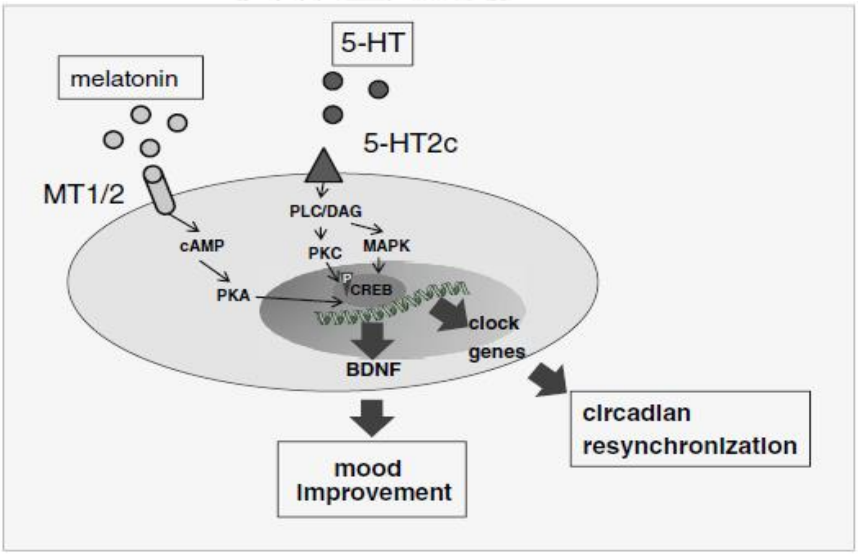
นอกจากนี้ข้าวและข้าวโพดมีสารที่มีประโยชน์จำนวนมาก และหนึ่งในนั้นคือ เมลาโทนิน ซึ่งเป็นสารที่ปัจจุบันมีการใช้สารตัวนี้ในรูปของ nonconventional drug หรือ อาหารเสริมด้วยคุณสมบัติที่มากมายเช่น ต้านอนุมูลอิสระ, ต้านความเครียด, ต้านความแก่ชรา และเป็น immunomodulatory agent ด้วย และยังมีการศึกษามากมายสนับสนุนการใช้เมลาโทนินว่า มีประโยชน์ในเรื่องของการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ เช่น circadian rhythm sleep disorders (CRSD), อาการนอนไม่หลับ, โรคมะเร็ง, โรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ประสาท, โรคซึมเศร้า,

seasonal affective disorder, ไมเกรน, กลุ่มโรคอาการปวดหัว, ความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน และการที่เซลล์ถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ [51-54] นอกจากนี้ ยังมีการทดลองเกี่ยวกับข้าว พบว่า ข้าวกล้องงอก มีคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระสูงมาก และยังสามารถลดอัตราการตายของเซลล์ SH-SY5Y (เซลล์ประสาทของคน) โดยไปยับยั้งกลไกของวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) และการตายแบบอะพอพโทสิส (apoptosis) ดังนั้น จะเห็นได้ว่า ข้าวกล้องงอกมีประโยชน์ สามารถป้องกันโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ประสาท ที่มีสาเหตุจากการสะสมของอนุมูลอิสระ (free radicals) การเกิดอ็อกซิเดทีฟสเตรส (oxidative stress) และการตายแบบอะพอพโทสิสได้ และนอกจากการศึกษาในเซลล์แล้ว ยังพบว่า ข้าวกล้องงอกยังสามารถต้านอนุมูลอิสระในหนูได้ด้วย [6]

นอกจากนี้ ยังมีการรายงานถึงคุณสมบัติในการป้องกันโรคทางระบบประสาทของเมลาโทนินอีกมากมาย โดยพบว่าในผู้ป่วยที่มีอาการนอนไม่หลับ เมื่อได้รับเมลาโทนินเข้าไปแล้ว พบว่าสามารถช่วยให้ผู้ป่วยหลับได้ดีขึ้น [55-57] นอกจากนี้ เมลาโทนินยังมีบทบาทในการป้องกันและรักษาโรคทางระบบประสาทอื่นๆ อีก เช่น โรคอัลไซเมอร์ และโรคพาร์กินสัน เนื่องจากมีงานวิจัยของ (Kwong-Man Ng, *et al*. 2010) พบว่า เมลาโทนินสามารถลดการสูญเสียของเซลล์สมองหรือระบบประสาทในโรคอัลไซเมอร์ได้ โดยการเปลี่ยนกระบวนการเกิด amyloid-β ส่งผลให้เซลล์มีชีวิตรอดเพิ่มมากขึ้น [8] สำหรับในโรคพาร์กินสันก็มีข้อมูลจากงานวิจัยของ (Joshua W. Miller, *et al.* 1996) พบว่าเมลาโทนินอาจสามารถไปช่วยลด dopamine auto-oxidation ได้ [9] และยังสามารถลดภาวะซึมเศร้าในผู้ป่วยซึมเศร้าได้ เนื่องจากเมลาโทนินช่วยให้ผู้ป่วยสามารถหลับได้ง่ายขึ้น เพราะผู้ป่วยโรคซึมเศร้ามักจะมีอาการนอนไม่หลับร่วมด้วย [7] อนึ่ง มีรายงานที่แสดงว่า เมลาโทนินออกฤทธิ์โดยมีกลไกในระดับโมเลกุล โดยการกระตุ้นการเพิ่มการแสดงออกของยีน brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [11-14] ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ในด้านการเพิ่มประสิทธิภาพ เพื่อต้านความเสื่อมของเซลล์ประสาท โดยเป็นการทำงานผ่านในระดับโมเลกุลผ่าน signaling pathway ซึ่งมีเอนไซม์ไคเนสเป็นสารชีวโมเลกุลหลัก ดังแสดงในภาพที่ 3 [58] นอกจากนี้ยังพบว่าเมลาโทนินสามารถลดอาการ cognitive impairment ในหนูที่มีความผิดปกติในการนอนหลับโดยสารมารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน cerebral cortex และ hippocampus ของหนู [14] และยังพบว่า BDNF ยังเป็นตัวที่เชื่อมระหว่างโรคอัลไซเมอร์และภาวะซึมเศร้า เนื่องจากพบว่าในภาวะซึมเศร้าเป็นสาเหตุทำให้เกิดการทำลายของเซลล์สมองส่วน hippocampus และพบว่าในโรคอัลไซเมอร์ก็เช่นเดียวกัน พบว่ามีการทำลายของเซลล์สมองส่วน hippocampus เช่นกัน และส่งผลให้เกิดการลดระดับของ BDNF ลง [15]โดยคาดว่ากลไกการแสดงออกของ BDNF จะสามารถแสดงออกผ่านเมลาโทนิน pathway ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 3 วิถีการทำงานของโปรตีน brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [58]



ภาพที่ 4 กลไกการทำงานระหว่างเมลาโนนิน และตัวรับเมลาโทนินต่อการแสดงออกของ BDNF ผ่าน melatonin pathway [59]

ดังนั้น ถ้าสารสกัดจากข้าวและข้าวโพดที่ศึกษาในครั้งนี้ มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกิดจากเมลาโทนินหรือสารอื่นๆที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจริง การตรวจพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ BDNF จะเป็นการทดลองที่ยืนยันกลไกในระดับโมเลกุลนี้ได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี เครื่องมือ และอุปกรณ์ ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 สารเคมี

1. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
2. Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
3. Penicillin-Streptomycin Solution	Corning, สหรัฐอเมริกา
4. EDTA-Trypsin 0.25% (1X)	Gibthai, ไทย
5. Phosphate Buffered Saline	HyClone, สหรัฐอเมริกา
6. Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Merk, เยอรมนี
7. Hydrogenperoxide (H_2O_2)	Merk, เยอรมนี
8. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)	Bio basic Inc., แคนาดา
9. Trypan Blue Stain 0.4%	Gibthai, ไทย
10. Sodium hydrogen carbonate	Merk, เยอรมนี
11. Ethanol	RCI Labscan, ไทย
12. Hexane	RCI Labscan, ไทย
13. Quercetin	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
14. Ascorbic acid	Calibiochem, สหรัฐอเมริกา
15. DPPH reagent	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
16. ABTS reagent	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
17. Potassium persulphate	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

18. DCFH-DA	life technology, สหรัฐอเมริกา
19. Annexin V FITC and PI kit	Biolegend, สหรัฐอเมริกา
20. HPLC water	RCI Labscan, ไทย
21. TRIzol RNA isolation reagent	Invitrogent, สหรัฐอเมริกา
22. Chloroform	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
23. 2-propanol	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
24. ชุดน้ำยา Taq DNA polymersase	Biolab, อังกฤษ
25. Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP)	Fermentas, แคนาดา
26. ชุดน้ำยา Super-Script™ II Reverse Transcriptase	Invitrogent, สหรัฐอเมริกา
27. เอนไซม์ DNase I	Promega, สหรัฐอเมริกา
28. Ribolock™ RNase inhibitor	Fermentas, แคนาดา
29. Diethyl pirocarbonate (DEPC)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
30. 30% Acrylamide and Bis-Acrylamide Solutions	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
31. N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine TEMED	Omnipur, เยอรมนี
32. Sodium Luaryl Sulphate (SDS)	Bio basic Inc., แคนาดา
33. Ammonium persulfate	Omnipur, เยอรมนี
34. Dithiothreitol (DTT)	Omnipur, เยอรมนี
35. Methanol	RCI Labscan, ไทย
36. Protein ladder	Thermoscientific, สหรัฐอเมริกา
37. Bovine Serum Albumin	GE healthcare, อังกฤษ
38. Tris	Vivantis, สหรัฐอเมริกา
39. Glysine	Vivantis, สหรัฐอเมริกา

Chulalongkorn University

40. Tween-20	Vivantis, สหรัฐอเมริกา
41. Sodium chloride	Merk, เยอรมนี
42. Tris-Hydrochloride	Vivantis, สหรัฐอเมริกา
43. GBX Developer	KODAK, สหรัฐอเมริกา
44. Fixer	KODAK, สหรัฐอเมริกา
45. Select and Start Substrate solution	GE healthcare, อังกฤษ
46. NP-40 lysis buffer	Biochemica, สหรัฐอเมริกา

3.1.2 เครื่องมือ

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Synergy Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader	BioTek, สหรัฐอเมริกา Instrument, Inc.
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง NanoDrop 100	ThermoScientific, สหรัฐอเมริกา
3. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) รุ่น Olympus CK30	Olympus, ญี่ปุ่น
4. กล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast	Olympus, ญี่ปุ่น
5. เครื่อง Flow cytometer	BD Biosciences, สหรัฐอเมริกา
6. เครื่อง thermal cycler รุ่น Mastercycler EP	Eppendrof AG, เยอรมนี
7. เครื่อง Exicycler Real Time Quantitative Thermal Block	Bioneer, เกาหลี
8. เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Doc)	Syngene, อังกฤษ

9. เครื่อง Micro High Speed Refrigerated Centrifuge รุ่น VS-15000CFNII	Vision Scientific, เกาหลีใต้
10. เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) รุ่น Fine Vortex	FINEPCR, เกาหลีใต้
11. เครื่อง vacuum concentrator (DNA speedVacs)	ThermoScientific, สหรัฐอเมริกา
12. เครื่อง Evaporator รุ่น miVAC	Genevac, อังกฤษ
13. เครื่อง Lyophilizer รุ่น MODULYOD	Thermo Electron CROP, สหรัฐอเมริกา
14. เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น AB204-S CLASSIC	METTLER TOREDO, สวิสเซอร์แลนด์
15. ตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2	Sheldon , สหรัฐอเมริกา Manufacturing Inc.
16. ตู้อบ (Incubator)	Memmert, เยอรมนี
17. ตู้ปลอดเชื้อ	E.S.I. FLUFRANCE, ฝรั่งเศส
18. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	Memmert, เยอรมนี
19. ตู้แช่แข็ง -20 ℃ (Top Open Chest Freezer)	SANYO Electric Co.,ltd., เกาหลีใต้
20. เครื่องทำน้ำ Milli-Q	MERK Millipore, สหรัฐอเมริกา
22. ถัง liquid nitrogen รุ่น XT20	TAYLOR-WHARTON, สหรัฐอเมริกา

3.1.3 อุปกรณ์

1. Auto pipette (ขนาด 20, 200, 1000 µL)	GILSON, ฝรั่งเศส
2. Auto pipette (ขนาด 10, 20, 200, 1000 µL)	Eppendrof AG, เยอรมนี

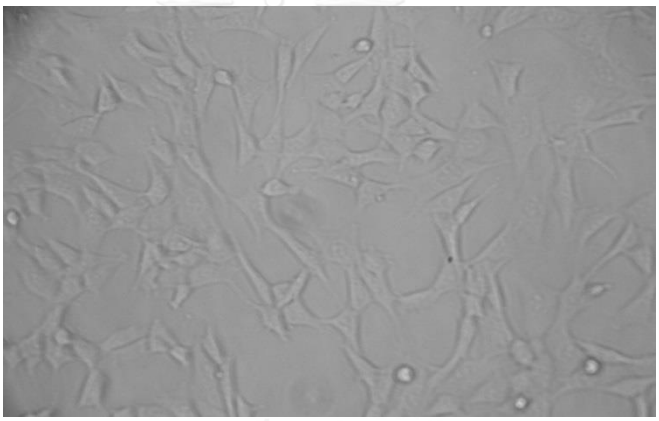
3. Pipette aid รุ่น Portable XP	Drummond, สหรัฐอเมริกา
	Scientific
4. Pipette tips (ขนาด 10, 200, 1000 µL)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
5. Barriertips (ขนาด 10, 20, 200, 1000 µL)	Thermo Fisher Scientific,
	สหรัฐอเมริกา
6. Microcentrifuge tube (ขนาด 0.5 mL และ 1.5 mL)	Continental Lab Products,
	สหรัฐอเมริกา
7. Centrifuge tube (ขนาด 1.5 mL และ 50 mL)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
8. 96-well cell culture plate	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
9. 6-well cell culture plate	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
10. cell culture flask (ขนาด 25 cm^2 และ 75 cm^2)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
11. Disposable serological pipette (5 mL และ 10 mL)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
12. Pasture pipette	Copan Innovation.,
	สหรัฐอเมริกา
13. Cryovial tube (ขนาด 2 mL)	Simport plastics, แคนาดา
14. Syringe Filter	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
15. เมมเบรน polyvinyldifluoride (PVDF)	GE healthcare, อังกฤษ
16. กระดาษกรอง	GE healthcare, อังกฤษ
17. HyperFilm ECL	GE healthcare, อังกฤษ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 กลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย

3.2.1 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ เซลล์สมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนู (Hippocampal neuronal cell line or HT-22 cell) ได้รับมาจาก Professor. David Schubert at the Salk Institute, San Diego, CA, USA เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ซึ่งมีส่วนผสมของ 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) และยาปฏิชีวนะ penicillin 100 U และ streptomycin 100 µg/mL บ่มเพาะเลี้ยงไว้ในตู้ Incubator ที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส และ 5 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์



ภาพที่ 5 เซลล์สมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนู (Hippocampal neuronal cell line, HT-22 cell) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast (phase contrast microscope, 10X)

3.2.2 ตัวอย่างข้าว และข้าวโพด

ข้าว และข้าวโพดที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีทั้งหมด 5 ชนิด ซึ่งได้มาจากตลาดในจังหวัดเชียงราย และได้ส่งพิสูจน์ชนิดของพืชที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้โดย ศ.กสิน สุวะตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยรายละเอียดของพืชทั้ง 5 ชนิดดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของพืชทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ชื่อทั่วไป	แหล่งที่มา	ส่วนที่ใช้
ข้าวเหนียว พันธุ์ กข6	ตลาด จ.เชียงราย	เมล็ด, ใบ และรวงข้าว
ข้าวเหนียวกล้อง พันธุ์ กข6	ตลาด จ.เชียงราย	เมล็ด, ใบ และรวงข้าว
ข้าวเหนียวดำ พันธุ์ กข6	ตลาด จ.เชียงราย	เมล็ด, ใบ และรวงข้าว
ข้าวโพดหวาน พันธ์ สตาร์พลัส	ตลาด จ.เชียงราย	เมล็ด, ใบ, เกสรตัวเมีย และตัวผู้
ข้าวโพดอ่อน พันธ์ สตาร์พลัส	ตลาด จ.เชียงราย	เมล็ด, ใบ, เกสรตัวเมีย และตัวผู้

3.3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.3.1 การเตรียมสารสกัดข้าวและข้าวโพดในการศึกษาวิจัย

3.3.1.1 การสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเฮกเซนโดยวิธีการหมักหรือมาเซอเรชัน (Maceration)

วิธีการสกัดแบบหมักหรือมาเซอเรชันเป็นการสกัดองค์ประกอบสำคัญจากข้าวและข้าวโพดโดยแช่ผงข้าวและข้าวโพดในตัวทำละลาย จนกระทั่งตัวทำละลายสามารถเข้าไปแทรกซึมละลายองค์ประกอบภายในของข้าวและข้าวโพดออกมา ซึ่งจะแช่ผงข้าวและข้าวโพดกับตัวทำละลายนานประมาณ 2-3 วัน จากนั้นจึงนำมาแยกกากข้าวและข้าวโพดออก แล้วนำตัวทำละลายมาปรับปริมาตรตามต้องการ โดยการศึกษาครั้งนี้นำเมล็ดข้าวทั้ง 3 ชนิดและข้าวโพด 2 ชนิด มาบดให้เป็นผงแห้ง จากนั้นนำผงข้าวทั้ง 3 ชนิดและข้าวโพด 2 ชนิดมาสกัดด้วยวิธีการหมัก (maceration) โดยบ่มด้วยเอทานอล และ เฮกเซนแยกกัน โดยใช้อัตราส่วนข้าวหรือข้าวโพด 1 กรัม ต่อตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยวิธี evaporation ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสสำหรับตัวทำละลายเอทานอล และที่ 45 องศาเซลเซียสสำหรับตัวทำละลายเฮกเซน จะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) นำไปละลายด้วย dimethyl sulfoxide

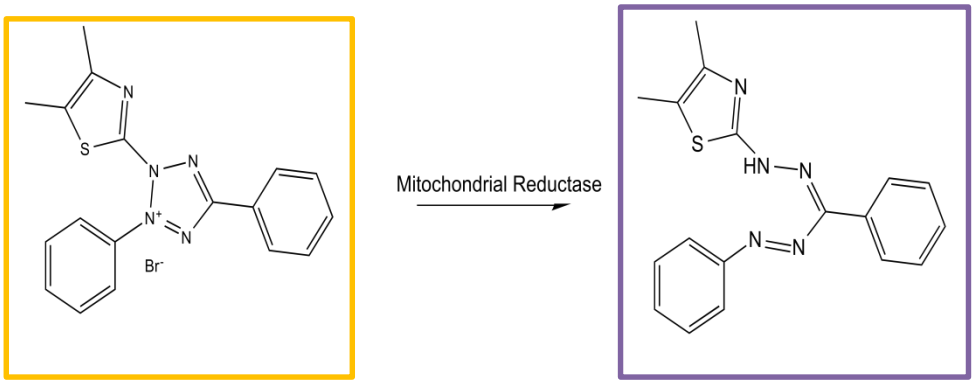
(DMSO) ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ในที่มืด

3.3.1.2 การสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยตัวทำละลายน้ำโดยวิธีการเพิ่มความร้อน (Heat up)

สำหรับตัวทำละลายน้ำจะสกัดด้วยวิธีการเพิ่มความร้อน (Heat up) โดยนำผงข้าวทั้ง 3 ชนิด และข้าวโพด 2 ชนิดมาต้มในน้ำ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งสารสกัดให้เย็นลง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำไปแช่ -20 องศาเซลเซียสจนแข็ง เพื่อนำไประเหิดแห้งด้วยวิธี Lyophilization จนได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) นำไปละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ในที่มืด

3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยเทคนิค MTT assay

MTT assay เป็นเทคนิคที่วัดการเปลี่ยนแปลงของสี (Colorimetric assay) โดยสารสีเหลือง MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) จะถูกรีดิวส์โดยเอนไซม์ NADPH ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เปลี่ยนเป็นตะกอนของ formazan สีม่วง สามารถละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ซึ่งมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้ [60, 61]



ภาพที่ 6 ปฏิกิริยารีดักชั่น (Reduction reaction) ของวิธี MTT assay [62]

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HT-22 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยให้มีเซลล์จำนวน 10,000 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นนำเซลล์ไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกับสารสกัดข้าวและข้าวโพด โดยเตรียมสารสกัดข้าวทั้ง 3 ชนิดและข้าวโพด 2 ชนิดที่มีช่วงความเข้มข้นระหว่าง 2-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำมาทดสอบกับสารทดสอบดังนี้ 1.) นำเซลล์ที่หว่านเอาไว้มาเติมสารสกัดจากข้าวและข้าวโพดที่เตรียมไว้แล้ว Incubate ที่ 5 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 2.) นำเซลล์ที่หว่านเอาไว้มาเติม H_2O_2 ที่ช่วงความเข้มข้น 31-2000 ไมโครโมลลาร์ แล้ว Incubate ที่ 5 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 3.) และเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าวและข้าวโพดในการป้องกันการตายของเซลล์ HT-22 จากการถูกกระตุ้นด้วยไฮโรเจนเปร์ออกไซด์ นำเซลล์ที่หว่านเอาไว้มาเติมสารสกัดจากข้าวที่เตรียมไว้ แล้ว Incubate ที่ 5 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เติม H_2O_2 แล้ว Incubate ที่ 5 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนด เติมสารละลาย MTT 20 ไมโครลิตร แล้วนำกลับเข้าไปในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงเติม DMSO 200 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงจนตะกอนถูกละลายหมด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 550 nm ด้วยเครื่อง ELISA Reader คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) โดยการคำนวณ % cell viability ดังนี้

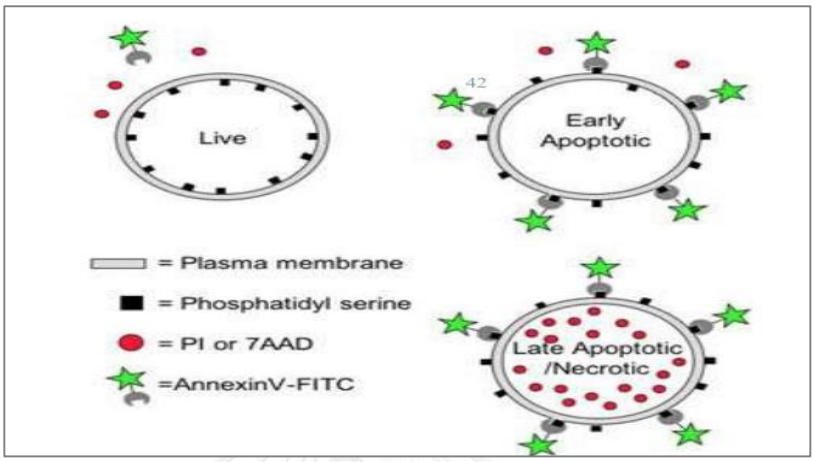
% cell viability = (Treated cell-blank) X 100 / (Untreated cell – blank)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดต่อการตายของเซลล์แบบ early และ late apoptosis/necrosis ด้วยเทคนิค Annexin V-FITC and Propidium Iodide staining assay / Flow cytometry analysis

เมื่อเซลล์มีการตายแบบ early apotosis จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์โดยการเปลี่ยนที่ของ Phosphatidyl serine ออกมาที่ผิวด้านนอกเยื้อหุ้มเซลล์ทำให้ Annexin V-FITC ไปจับกับ Phosphatidyl serine ได้ แต่เมื่อเกิดเซลล์ตายแบบ late apoptosis ผนังเซลล์เกิดการเสียหายนอกจากทำให้ Annexin V-FITC ไปจับกับ Phosphatidyl serine ได้ ยังทำให้ Propidium iodine สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปจับกับ nucleic acid ภายในเซลล์ได้ แต่ถ้าหากเซลล์มีการตายแบบ

necrosis ผนังเซลล์เกิดการเสียหายทำให้ Propidium iodine สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปจับกับ nucleic acid ภายในเซลล์ได้ [40]



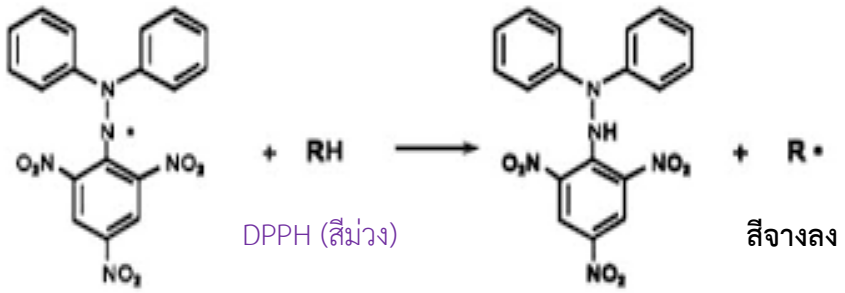
ภาพที่ 7 แสดงการจับของสี Annexin V-FITC และ Propidium iodine ในแต่ละขั้นของการเกิดการเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์ [40]

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HT-22 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม จำนวนเซลล์ต่อหลุมเท่ากับ 2 x 10^5 เซลล์ จากนั้น treat สารสกัดข้าวทั้ง 3 ชนิดและข้าวโพด 2 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ว treat H_2O_2 ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลลาร์ อีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ แล้วทำการเก็บเซลล์ด้วย 0.1% trypsin-EDTA ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 1X binding buffer ในกล่องน้ำแข็ง แล้วเติมสารละลาย Annexin V-FITC 5 ไมโครลิตร และ propidium iodide 10 ไมโครลิตร ในเซลล์ที่เตรียมไว้ใน 1X binding buffer 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดไปบ่มไว้ในน้ำแข็ง 15 นาทีในที่มืด แล้วเติม 400 ไมโครลิตร ของ 1X binding buffer ในกล่องน้ำแข็ง แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

3.3.4 การทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและข้าวโพด

3.3.4.1 การทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยวิธี DPPH• assay

อนุมูล DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปของอนุมูลอิสระที่คงตัวมีสีม่วงซึ่งสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรและพร้อมที่จะทำปฏิกิริยาต่อสารที่ให้อิเล็กตรอนหรือสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) เมื่ออนุมูล DPPH รับอิเล็กตรอนมาแล้ว สารละลายสีม่วง จะมีสีจางลงเนื่องจากอนุมูล DPPH เปลี่ยนเป็นสีเหลือง จึงสามารถนำอนุมูล DPPH มาใช้ในการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดข้าวและข้าวโพดได้ โดยจะใช้ L-ascorbic acid ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ในการสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้ในการคำนวณเปอร์เซ็นต์ scavenging activity [61, 63]



ภาพที่ 8 แสดงปฏิกิริยาของ DPPH ต่อสารต้านอนุมูลอิสระ [64]

เตรียมสารละลายอนุมูล DPPH ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ใช้ตัวทำละลาย ethanol แล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเจือจางอนุมูล DPPH ด้วยตัวทำละลาย ethanol ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง 0.7 ± 0.03 จากนั้นเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน โดยใช้ L-ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน ความเข้มข้น 125 – 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารสกัดข้าวและข้าวโพดความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามขั้นตอนโดยละเอียดดังนี้

ตารางที่ 3 แสดงขั้นตอนทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี DPPH assay

Reagent	Control (µL)	Positive control(µL)	Sample blank(µL)	Sample(µL)
สารสกัดจากข้าวและข้าวโพด (1mg/mL)	-	-	20	20
L-ascorbic acid (125-1 µg/mL)	-	20	-	-
DPPH working solution	180	180	-	180
Absolute ethanol	20	-	180	-

หมายเหตุ ทำการทดสอบกับ DMSO ควบคู่ด้วยทุกครั้ง (Blank sample และ Sample)

บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร คำนวณหา เปอร์เซ็นต์ scavenging activity และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (mg ascorbic acid/g sample) ของสารสกัดข้าวและข้าวโพดเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid โดยสูตรคำนวณดังสมการต่อไปนี้

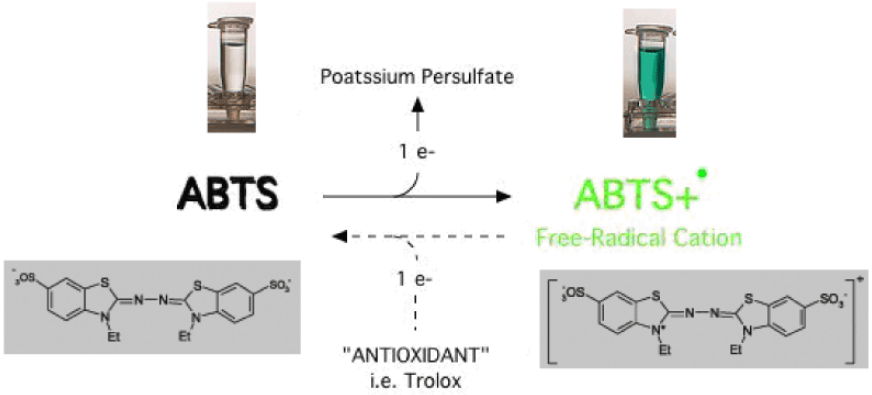
$$\% \text{ scavenging activity} = \frac{100x\,[\text{Absorbance control} - (\text{Absorbance sample} - \text{Absorbance blank})]}{\text{Absorbance control}}$$

หากเปอร์เซ็นต์ scavenging activity มากกว่า 50 จะต้องทำการเจือจางสารสกัดข้าวและข้าวโพด ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อนำมาทำกราฟ log วิเคราะห์หาค่า IC50 ต่อไป

3.3.4.2 การทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$ assay

การวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS$^{\bullet}$ หรือ 2, 2'-azino-bis

(3 ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) ซึ่งมีสีเขียวปนน้ำเงินให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปจะทำให้สีลดลง จึงสามารถนำอนุมูล ABTS˙ มาใช้ในการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและข้าวโพดได้ ทั้งในส่วนที่ละลายในน้ำและไขมันโดยจะใช้ L-ascorbic acid เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานในการทำกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณเปอร์เซ็นต์ scavenging activity และ ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (mg ascorbic acid/g sample) ของสารสกัดข้าวและข้าวโพด



ภาพที่ 9 แสดงปฏิกิริยาของ $ABTS^{\bullet+}$ ต่อสารต้านอนุมูลอิสระ [65]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เตรียมอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลลาร์ ในน้ำ 10 มิลลิลิตร นำมาทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 2.45 มิลลิโมลลาร์ ในน้ำ 12.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดเป็นอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ จากนั้นนำไปเจือจางด้วยเอทานอล ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.7 ± 0.03 จากนั้นเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน L-ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 60 – 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายในเอทานอล และเตรียมสารสกัดข้าวและข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีขั้นตอนการเติมสารละลายดังนี้

ตารางที่ 4 แสดงขั้นตอนทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ assay

Reagent	Control (µl)	Positive control(µl)	Sample blank(µl)	Sample(µl)
สารสกัดจากข้าวและข้าวโพด (1mg/mL)	-	-	20	20
L-ascorbic acid (60-1 µg/mL)	-	20	-	-
$ABTS^{\bullet}$ working	180	180	-	180
Absolute ethanol	20	-	180	-

หมายเหตุ ทำการทดสอบกับ DMSO ควบคู่ด้วยทุกครั้ง (Blank sample และ Sample)

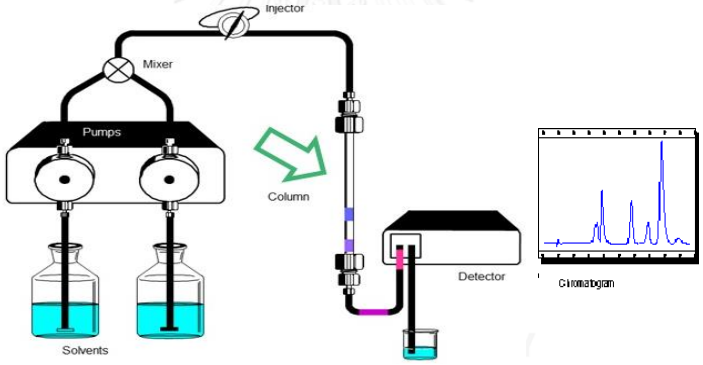
บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร คำนวณเปอร์เซ็นต์ scavenging activity และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (mg ascorbic acid/g sample) ของสารสกัดข้าวและข้าวโพดเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid โดยสูตรคำนวณดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ scavenging activity} = \frac{100x\,[\text{Absorbance control} - (\text{Absorbance sample} - \text{Absorbance blank})]}{\text{Absorbance control}}$$

หากเปอร์เซ็นต์ scavenging activity มากกว่า 50 จะต้องทำการเจือจางสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อนำมาทำกราฟ log วิเคราะห์หาค่า IC_{50} ต่อไป

3.3.5 การทดสอบหาปริมาณสารเมลาโทนินและทริปโตเฟนในสารสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยวิธี HPLC

เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) กับ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งสารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน โดยสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้น ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับ mobile phase หรือ stationary phase สารประกอบตัวไหนที่สามารถเข้ากันได้ดีกับ mobile phase จะเคลื่อนที่ผ่าน column ได้เร็วสารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับ mobile phase หรือเข้ากันได้ดีกับ stationary phase จะเคลื่อนที่ผ่าน column ได้ช้า ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัด สัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งจะเรียกว่า โครมาโตแกรมโดย HPLC สามารถทดสอบได้ทั้งเชิงคุณภาพ และทดสอบเชิงปริมาณ โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

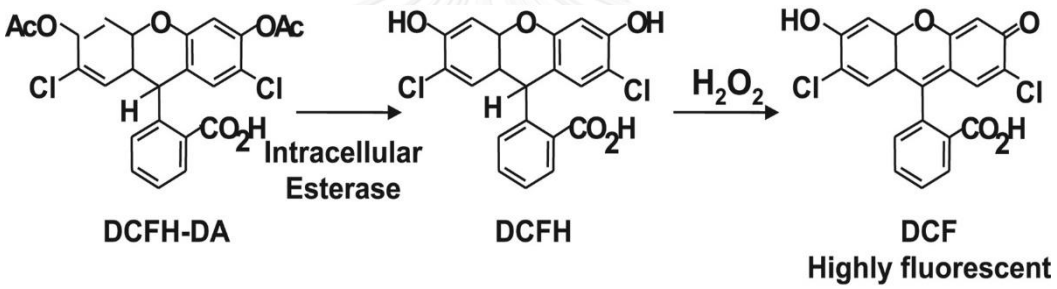


ภาพที่ 10 แสดงกระบวณการตรวจวัดสารด้วยวิธี HPLC [66]

นำสารสกัดข้าวและข้าวโพดที่สกัดได้แล้วนั้นมาทำการตรวจวัดระดับทริปโตเฟนและเมลาโทนิน ด้วยวิธี HPLC โดย ทำการฉีดสารสกัดที่เตรียมแล้วเข้าคอลัมน์ Eclipse XDB C18 column (15 cm x 45 ; 5 µm) No.1 ที่ปริมาน 20 ไมโครลิตร โดยจะใช้เฟสเคลื่อนที่ หรือ mobile phase อยู่ 2 ตัวได้แก่ A (1% acetic acid ในน้ำ) และ B (absolute methanol) ซึ่งระยะเวลาและเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสารดังนี้ (เวลา, ตัวทำละลาย B) : 0.1 นาที, 10% ; 15 นาที, 40% ; 20-30 นาทีn, 70% ; 32-50 นาที, 10% โดย flow rate ของทริปโตเฟน และเมลาโทนิน อยู่ที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดแบบยูวี (DAD UV detector) ที่ 280 นาโนเมตร โดยใช้สารทริปโตเฟนและเมลาโทนินเป็นสารมาตรฐานในการทำกราฟมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 10 – 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดในการป้องกันเซลล์เพาะเลี้ยงจากภาวะ oxidative stress ด้วยวิธี DCFH-DA assay

DCFH-DA assay เป็นเทคนิคที่นิยมในการตรวจวัดระดับ ROS ภายในเซลล์กันมาก สาร DCFH-DA (Dichlorofluorescin-diacetate) สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้ด้วยกระบวนการแพร่ผ่าน เมื่อเข้าไปอยู่ในเซลล์แล้ว DCFH-DA จะถูกเอนไซม์ esterase ภายในเซลล์ตัดหมู่อะซิเตตออก กลายเป็น DCFH ซึ่งไม่สามารถออกจากเซลล์ได้และจะถูกออกซิไดซ์ต่อโดยสารออกซิเดนซ์ทั้งหมดภายในเซลล์ได้แก่ $ONOO^-$, $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2, OH• และ lipid hydreperoxides เปลี่ยนเป็นสารเรืองแสง 2',7'-dichlorouorescein (DCF) สามารถวัดการเรืองแสงด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์โดยใช้ความยาวคลื่นแสงกระตุ้นที่ 488 นาโนเมตรและวัดการเรืองแสงที่ 525 นาโนเมตร



ภาพที่ 11 แสดงปฏิกิริยาของ DCFH-DA ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ [67]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HT-22 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม จำนวนเซลล์ต่อหลุมเท่ากับ 2×10^5 เซลล์ จากนั้นนำมาทดสอบกับ สารสกัดข้าวและข้าวโพด ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกระตุ้นด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลลาร์ พร้อมกับ DCFH-DA dye ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลลาร์ ห่อฟรอยด์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาล้างด้วย PBS แล้วเก็บเซลล์ด้วย 0.1% trypsin-EDTA นำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ และละลายตะกอนเซลล์ด้วย PBS จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) โดยใช้ความยาวคลื่นแสงกระตุ้นที่ 488 นาโนเมตรและวัดการเรืองแสงที่ 525 นาโนเมตร

3.3.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน BDNF ด้วยวิธี Real time RT-PCR

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HT-22 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม จำนวนเซลล์ต่อหลุมเท่ากับ 2 x 10^5 เซลล์ จากนั้นนำมาทดสอบกับ สารสกัดข้าวและข้าวโพด ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกระตุ้นด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลลาร์ อีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาสกัด RNA (Total RNA) ด้วยน้ำยา TRIzol

3.3.7.1 การสกัด Total RNA โดยใช้น้ำยา TRIzol

เมื่อเตรียมเซลล์ในสภาวะที่ต้องการแล้ว นำเซลล์ที่ได้มาล้างด้วย 1X phosphate buffer (PBS) 1 มิลลิลิตร ทั้งหมด 2 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำยา TRIzol 1 มิลลิลิตร หรือพอท่วมเซลล์ จากนั้นบ่มทิ้งไว้ 15 นาที เมื่อครบเวลาใช้ปิเปตต์ดูดผสมขึ้นลงแล้วดูดทั้งหมดใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม (chloroform) ที่เย็น ลงไปในหลอดที่เตรียมเซลล์ไว้แล้ว 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่น vortex 20 วินาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำหลอดที่ปั่นเสร็จแล้วมาแยกส่วนใสที่อยู่ส่วนบนออกมาใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ แล้วเติม 100% isopropanol ที่เย็น ลงไปในหลอดที่แยกส่วนใสออกมาได้ ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วทำการเขย่าผสมกลับไปมา (mix inverse) แล้วนำไปแช่ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซเซียส เพื่อตกตะกอน RNA ตะกอน RNA จะอยู่ที่ก้นหลอด ให้ทิ้งส่วนใส แล้วคว่ำหลอดไว้บนกระดาษทิชชูที่ฉีดพรมด้วย RNase away จากนั้นเติม 75% ethanol ใน DEPC 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างตะกอน RNA แล้วทำการเขย่าผสมกลับไปมาแบบ inverse แล้วนำไปปั่นที่ 7,500 g นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้วคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชูที่ฉีดพรมด้วย RNase away ทิ้งไว้ให้แห้งนาน 1 ชั่วโมง ระหว่างรอเวลานำ DEPC ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาแล้วจึงนำไปปั่นแห้ง (speed vac) นาน 5 นาที ด้วยความเร็วต่ำ เพื่อไม่ให้มีกราฟของ aromatic ขึ้น จากนั้นนำ DEPC ที่อุ่นไว้ 65 องศาเซลเซียส ใส่ลงไปในหลอด 30 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน RNA แล้วดีดก้นหลอดเพื่อผสมตะกอน RNA กับ DEPC ให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 – 10 นาที จากนั้นผสมกันอีกครั้งโดยดีดที่ก้นหลอด แล้วนำไป spin down แล้ววัดปริมาณ RNA ด้วยการวัดค่า Optical Density (OD) ด้วยเครื่อง NanoDrop เก็บ RNA ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

3.3.7.2 การกำจัด DNA ปนเปื้อนออกจาก RNA ด้วยเอนไซม์ DNase I

นำ RNA ที่สกัดได้ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม มาใช้ในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ DNase I ดังขั้นตอนตาราง 5 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ DNase I ด้วย Stop solution (25 มิลลิโมลลาร์ EDTA, pH 8.0) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 5 แสดงขั้นตอนการกำจัด DNA ปนเปื้อนในตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้

น้ำยา	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
10X DNase I Reaction buffer	1
DNase I	1
RNA	ขึ้นกับความเข้มข้นของ RNA ตัวอย่าง
DEPC-treated water	เติมให้ปริมาตรครบ 10 ไมโครลิตร
ปริมาตรรวมทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ทิ้งไว้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที	
25 มิลลิโมลลาร์ EDTA, pH 8.0	1
บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที	

3.3.7.3 การสร้าง complementary DNA (cDNA) จาก RNA

นำ RNA ที่ผ่านการกำจัด DNA ปนเปื้อนมาแล้วมาทำโดยใช้ RNA 10 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ reverse transcriptase (RT) ดังตาราง 6 จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในภาวะที่เหมาะสมคือ ขั้น pre-extention 25 องศาเซลเซียส 5 นาที ขั้น extention 50 องศาเซลเซียส 60 นาที และขั้น inactivation 70 องศาเซลเซียส 15 นาที จะทำให้ Oligo-dT เข้าจับกับปลาย poly-A ที่ด้าน 3’ ของ mRNA ซึ่งจะเป็นการคัดเลือก mRNA ออกจาก RNA ชนิดอื่น

ตารางที่ 6 แสดงขั้นตอนการเติมน้ำยาในการสร้าง cDNA จาก RNA

น้ำยา	**ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)**
5X buffer ImProm II	4
1.5 มิลลิโมลลาร์ $MgCl_2$	1.2
10 นาโนโมลลาร์ dNTP Mix	1
10 ไมโครโมลลาร์ Oligo-dT 20 mer	1
40 Unit Ribolock	0.5

น้ำยา	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
Reverse Transcriptase	1
RNA	10
DEPC-treated water	1.3
ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร	

3.3.7.4 การทดสอบการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน BDNF ด้วยเทคนิค Real time - PCR

การทำ Real time-PCR เพื่อทดสอบการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน BDNF ของเซลล์สมอง HT-22 โดยใช้ cDNA จากขั้นตอน 3.3.7.3 มาเป็น DNA ต้นแบบในการทำ real time-PCR โดยนำมาทำปฏิกิริยากับชุดน้ำยาดังตาราง 7 และใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการตรวจสอบการแสดงออกดังตาราง 8 ซึ่งปริมาตรรวมทั้งหมดของปฏิกิริยาจะเท่ากับ 25 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค real time-PCR ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา ดังตาราง 9 โดยใช้เครื่อง Exicycler Real Time Quantitative Thermal Block ซึ่งสาย double-strand DNA จะถูกตรวจวัดได้ด้วยแสงฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้นจาก SYBR Green และค่าที่ได้วิเคราะห์ด้วย Light Cycler Relative Quantification Software โดยมียีน β-actin ใช้ควบคุมการทดสอบครั้งนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 7 แสดงขั้นตอนการเติมน้ำยาเพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการ

น้ำยา	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
Forward primer (BDNF และ β-actin)	1
Reward primer (BDNF และ β-actin)	1
DEPC	9.5
Master Mix (สำเร็จรูป)	12.5
Template (cDNA)	1

ตารางที่ 8 แสดง primers ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการ

ยีน	ลำดับเบส	ขนาดของผลิตภัณฑ์
BDNF forward	5' AACCATAAGGACGCGGACTTG 3'	51bp
BDNF reward	5' TTGACTGCTGAGCATCACCC 3'	
β-actin forward	5' GGCTGTATTCCCCTCCATCG 3'	154 bp
β-actin reward	5' CCAGTTGGTAACAATGCCATGT 3'	

ตารางที่ 9 แสดงปฏิกิริยา และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวน DNA ของยีน BDNF

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
initial denaturation	95	10 นาที	1
melting	95	15	35
annealing	57	15	
elongation	72	30	
temperature ramp	60 - 94	1°C/s	-

3.3.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดต่อการแสดงออกระดับโปรตีน ของโปรตีน BDNF ด้วยวิธี Western blot analysis

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HT-22 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม จำนวนเซลล์ต่อหลุมเท่ากับ 2 x 10^5 เซลล์ จากนั้น treat สารสกัดข้าวและข้าวโพด ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ว treat H_2O_2 ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลลาร์ อีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาสกัดโปรตีนด้วย NP40 Lysis buffer

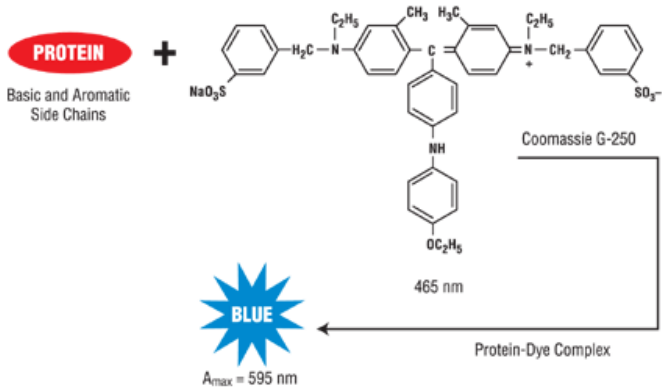
3.3.8.1 การสกัดโปรตีนจากเซลล์ HT-22

เมื่อเตรียมเซลล์ในสภาวะที่ต้องการแล้ว นำเซลล์ที่ได้มาล้างด้วย 1X phosphate buffer (PBS) 1 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ Lysis buffer ลงไปในหลุมเซลล์ แล้วทำการขูดเซลล์ จากนั้นดูดเซลล์ที่ได้ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ทุกขั้นตอนทำบนน้ำแข็งเพื่อป้องกันการสลายของโปรตีน)

จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปเขย่าบนเครื่อง shaker เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการดูดส่วนใสออกมา ซึ่งเป็นส่วนโปรตีนที่เราต้องการ นำไปวัดโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ต่อไป โปรตีนที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3.8.2 การวัดโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

การวัดโปรตีนด้วยวิธี Bradford หลักการสมดุลระหว่าง Coomassie Brilliant G-250 และการจับกันระหว่าง Coomassie Brilliant Blue G-250 กับโปรตีนแบบจำเพาะ ซึ่งภายใต้สภาวะที่เป็นกรด Coomassie Brilliant Blue G-250 จะแสดงคุณสมบัติเป็นสีแดง แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับโปรตีนจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน โดยความเข้มของสีจะแปรผันตรงกับกรดอะมิโน สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร



ภาพที่ 12 แสดงปฏิกิริยาระหว่าง Coomassie Brilliant Blue G-250 กับโปรตีน [68]

การวัดโปรตีนเริ่มจากทำการเจือจางความเข้มข้นโปรตีนก่อน โดยผสมน้ำกลั่น 70 ไมโครลิตร กับโปรตีน 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำโปรตีนที่ทำการเจือจางแล้วปิเปตต์มา 10 ไมโครลิตร ใส่หลุม 96 หลุม โดยทำซ้ำ 2 จากนั้นเติม Bradford working solution 200 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ใส่โปรตีนแล้ว ทำการดูดขึ้นลงผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader โดยคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.87 – 0.0017 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

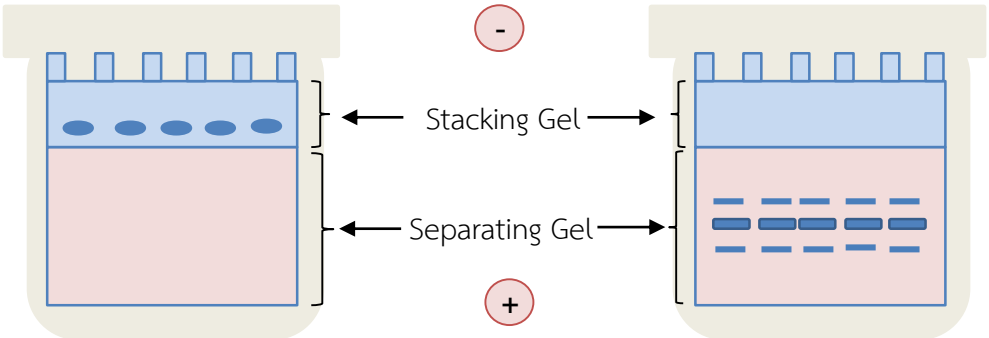
3.3.8.3 ขั้นตอนการแยก และประกบโปรตีนด้วยวิธี western blot

เริ่มจากการนำโปรตีนที่สกัดได้มารันเจลเพื่อแยกโปรตีนช่วงที่เราต้องการ โดยเริ่มจากการเตรียมเจล Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ดังตาราง 10 จากนั้นเตรียมโปรตีน โดยผสมโปรตีนของเรา กับ Leamli ในอัตราส่วน 1 : 1

จากนั้นนำไปบ่มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลา นำโปรตีนมาโหลดลงเจล ที่เราเตรียมไว้แล้ว โดยเท Running buffer ลงไปให้ท่วมเจลก่อนจึงโหลดโปรตีน และโปรตีนแลดเดอร์ลงไปได้ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการรัน จะ Run Stacking ที่ 70 volt 30 นาที (เพื่อให้โปรตีนตกลงมารวมกันก่อน) จากนั้นจะ Run Separating ที่ 120 volt 60 นาที (เพื่อแยกโปรตีนตาม molecular weight)

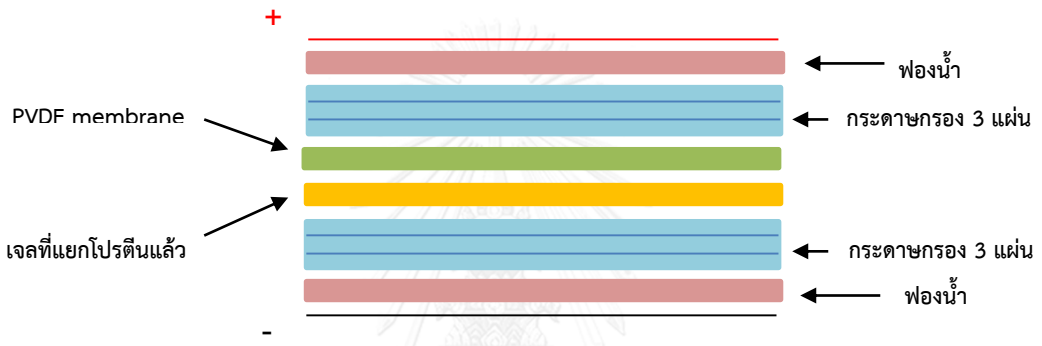
ตารางที่ 10 ขั้นตอนการใส่น้ำยาสำหรับเตรียมเจล (SDS-PAGE)

สารเคมี	**12% Separating Gel (มิลลิลิตร)**	**5%Stacking Gel (มิลลิลิตร)**
น้ำกลั่น	3.3	3.4
30% Acrylamide	4.0	0.83
1.5 โมลลาร์ Tris (pH 8.8)	2.5	-
1.0 โมลลาร์ Tris (pH 6.8)	-	0.63
10% SDS	0.1	0.05
10%Ammonium persulfate	0.1	0.05
TEMED	0.004	0.005
ปริมาตรรวม	**10**	**5**



ภาพที่ 13 แสดงภาพการแยกโปรตีนด้วยเจล Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ทั้งแบบ Stacking Gel เพื่อให้โปรตีนตกลงมารวมกัน และแบบ Separating Gel เพื่อแยกโปรตีนตาม molecular weight

เมื่อทำการรันแยกโปรตีนเสร็จแล้ว ขั้นต่อไปจะเป็นการถ่ายโอนโปรตีนจากเจลลงเมมเบรน (Transfer) โดยเตรียมเมมเบรน polyvinyldifluoride (PVDF) ตัดขนาดพ่อดีตามเราต้องการ นำมาแช่ใน methanol พอท่วม 5 นาที เมื่อครบเวลาเททิ้ง แล้วใส่ transfer buffer ลงไปพอท่วม จากนั้นเตรียมกระดาษกรอง และฟองน้ำ โดยนำมาแช่ใน transfer buffer พอท่วม เป็นเวลา 15 นาทีเมื่อครบเวลานำเจลที่ทำการรันแจกโปรตีนแล้วมาวางประกบลงบนกระดาษกรองดังภาพที่ 14 จากนั้นนำเข้าเครื่องถ่ายโอนโปรตีน แล้วเท transfer buffer ลงไปเป็นให้ท่วม โดยสภาวะที่เหมาะสมคือ 150 มิลลิแอมแปร์ 60 นาที โดยขั้นตอนนี้ต้องทำบนน้ำแข็งเพราะขณะกระบวณการถ่ายโอนโปรตีนจะเกิดความร้อนขึ้น



ภาพที่ 14 แสดงลำดับการวางฟองน้ำ กระดาษกรอง เจล
และเมมเบรนในขั้นตอนการถ่ายโอนโปรตีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เมื่อทำการถ่ายโอนโปรตีนเสร็จแล้ว จะมาทำการ Blocking non-specific โดยการนำเมมเบรนที่ผ่านการถ่ายโอนโปรตีนแล้วนั้นมาล้างด้วย TBS-T buffer 1 ครั้ง จากนั้นเททิ้งแล้วเติม Blocking buffer หรือ 5% non-fat dry milk ลงไป นำไปเขย่าที่เครื่อง shaker ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อครบเวลา เท blocking buffer ทิ้ง แล้วล้างเมมเบรนด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 15 – 20 นาที จากนั้นเติมแอนติบอดีตัวที่ 1 หรือ primary antibody ลงไปดังตารางที่ 11 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเท primary antibody กลับเก็บไว้ได้ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างเมมเบรนด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วเติมแอนติบอดีตัวที่ 2 หรือ secondary antibody ลงไปดังตารางที่ 3.10 เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นเท secondary antibody กลับเก็บไว้ได้ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างเมมเบรนด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วนำไปประกบฟิล์ม

ตารางที่ 11 แสดงแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษา

แอนติบอดี	Dilution ที่ใช้	Molecular weight (kDa)
BDNF primary antibody	1 : 1000	28
β-actin primary antibody	1 : 16,000	42
HRP-linksecondary antibody	1 : 16,000	-

ขั้นตอนการประกบฟิล์ม หลังจากใส่ secondary antibody แล้ว นำ PVDF membrane มาประกบฟิล์ม โดยวัดการเปล่งแสง Chemiluminescence ที่เกิดขึ้นหลังจากหยดสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยา โดยเตรียมสารตั้งต้นผสม Solution A Luminol enhancer กับ Solution B Peroxide solution ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วหยดหลงบน PVDF membrane จากนั้นนำมาวางบนแท่นประกบฟิล์มจับเวลา 1 นาที เพื่อรอการเกิดสัญญาณโดยการเปล่งแสงที่ PVDF membrane เมื่อครบเวลา ตัดฟิล์ม x-ray ให้ได้ขนาดพอดี membrane จากนั้นนำมาประกบทับลงบน PVDF membrane ประมาณ 3 นาที เมื่อครบเวลา นำฟิล์ม x-ray มาล้างในน้ำยา developer ประมาณ 30 วินาที จากนั้นล้างในน้ำประมาณ 30 วินาที แล้วนำฟิล์ม x-ray มาล้างในน้ำยา fixer ประมาณ 30 วินาที จากนั้นล้างในน้ำประมาณ 30 วินาที แล้วนำไปตากให้แห้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.3.9 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการศึกษาครั้งนี้แต่ละการทดสอบจะทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) จากนั้นนำค่าได้มาหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้หลักสถิติ one-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์โดยใช้ pearson correlation

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการพิสูจน์ชนิดของพืชที่สนใจทั้ง 5 ชนิด

พืชที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีทั้งหมด 5 ชนิด ซึ่งได้มาจากตลาดในจังหวัดเชียงราย และได้ส่งพิสูจน์ชนิดของพืชที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้โดย ศ.กสิน สุวะตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผลแสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ผลการพิสูจน์ชนิดของพืชที่สนใจทั้ง 5 ชนิด

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อทั่วไป	แหล่งที่มา	ส่วนที่ใช้	Herbarium number
Oryza sativa L.	ข้าวเหนียว พันธุ์ กข6	ตลาด จ.เชียงราย	เมล็ด	HN : A013730 (BCU)
Oryza sativa L.	ข้าวเหนียวกล้อง พันธุ์ กข6	ตลาด จ.เชียงราย	เมล็ด	HN : A013730 (BCU)
Oryza sativa L.	ข้าวเหนียวดำ พันธุ์ กข6	ตลาด จ.เชียงราย	เมล็ด	HN : A013731 (BCU)
Zea mays var.rugosa	ข้าวโพดหวาน พันธุ์ สตาร์พลัส	ตลาด จ.เชียงราย	เมล็ด	HN : A015135 (BCU)
Zea mays var.rugosa	ข้าวโพดอ่อน พันธุ์ สตาร์พลัส	ตลาด จ.เชียงราย	เมล็ด	HN : A015135 (BCU)

4.2 ผลการสกัดพืชทั้ง 5 ชนิดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเฮกเซนด้วยวิธีการหมัก (maceration)

จากการสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเฮกเซนด้วยวิธีการหมัก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลผลิตสุดท้ายดังตาราง 13

4.3 ผลการสกัดพืชทั้ง 5 ชนิดด้วยตัวทำละลายน้ำ ด้วยวิธีการเพิ่มความร้อน (Heat up)

จากการสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยตัวทำละลาย ด้วยวิธีการต้ม ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ได้ผลผลิตสุดท้ายดังตาราง 13

ตารางที่ 13 ผลการสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน

Types of plant	% Yield of plant extractions (w/w)		
	Water	Ethanol	Hexane
ข้าวเหนียว	7.630	0.168	0.630
ข้าวเหนียวกล้อง	6.400	3.360	3.950
ข้าวเหนียวดำ	12.870	2.583	2.990
ข้าวโพดหวาน	7.530	7.076	4.572
ข้าวโพดอ่อน	18.23	9.590	4.820

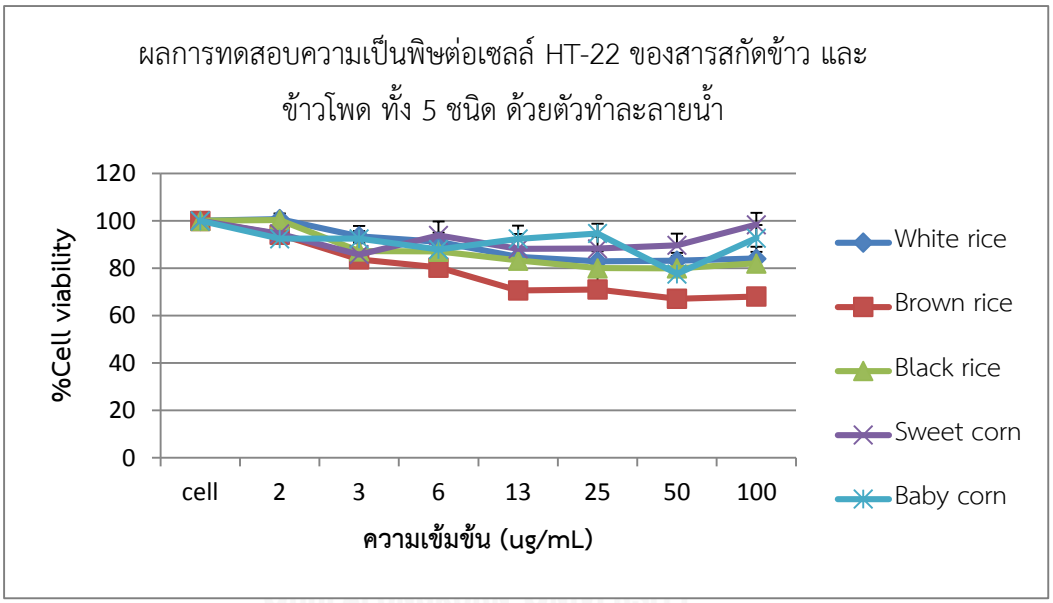
จากตารางพบว่า ผลผลิตสุดท้ายจากการสกัดข้าวและข้าวโพดทั้ง 5 ชนิดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน มีช่วงอยู่ที่ 0.168% ถึง 18.23% โดยพบว่าสารสกัดที่สกัดจากตัวทำละลายน้ำได้ผลผลิตสุดท้ายมากที่สุด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

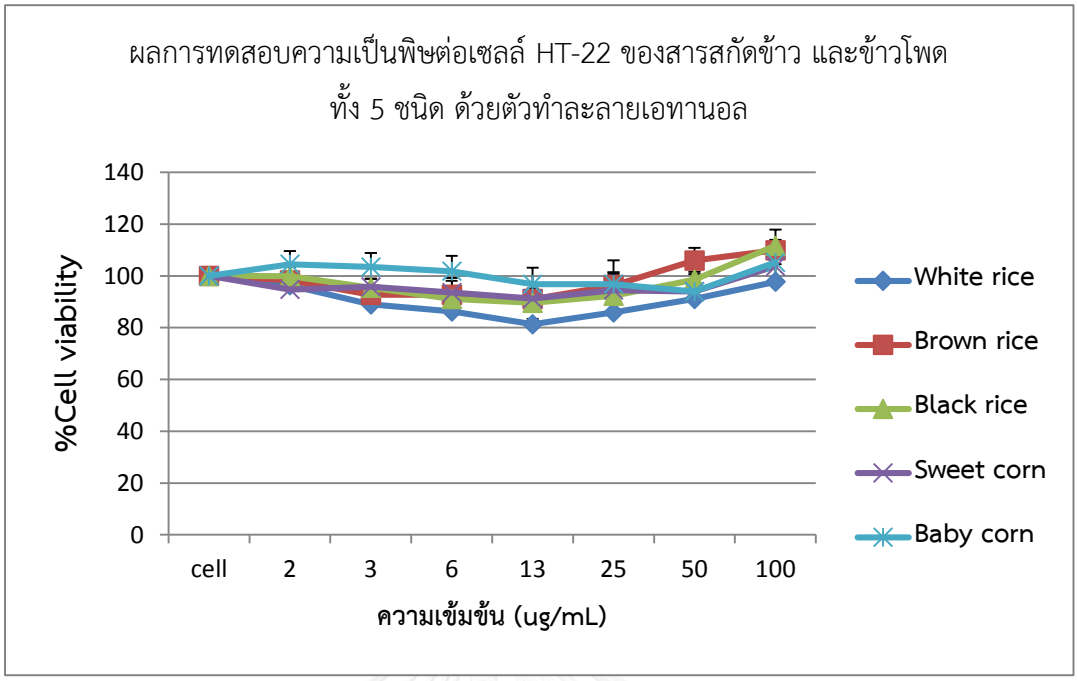
4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดข้าว และข้าวโพดต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HT-22 ด้วยวิธี MTT assay

จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบถึงความเป็นพิษของสารสกัดข้าว และข้าวโพดต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HT-22 โดยทำการหว่านเซลล์ในหลุม 96 หลุม หลุมละ 10,000 เซลล์ จากนั้นนำสารสกัดข้าว และข้าวโพดที่ความเข้มข้น 2-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา treat กับเซลล์แล้วบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 เปอร์เซ็นต์ CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้เซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัดข้าว และข้าวโพดเป็นกลุ่มควบคุมลบ (Negative control) มีค่าเปอร์เซ็นต์ของอัตราการรอดชีวิตเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ นำกลุ่มทดสอบมาคำนวณเทียบกับกลุ่มควบคุมเพื่อหาร้อยละของอัตราการรอดชีวิต (%Cell viability) และนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบโดยใช้หลักสถิติ one-way ANOVA โดยให้ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

พบว่าทั้งสารสกัดข้าว และข้าวโพดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำ เอทานอล และเฮกเซน ที่ความเข้มข้น 2-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการตายของเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ สารสกัดข้าว และข้าวโพดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำ เอทานอล และเฮกเซน ที่ความเข้มข้น 2-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่า 80% จึงสรุปได้ว่าสารสกัดข้าว และข้าวโพดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำ เอทานอล และเฮกเซน ที่ความเข้มข้น 2-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากสารสกัดข้าวเหนียวกล้องที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำพบว่า มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น (ภาพที่ 15 – 17)

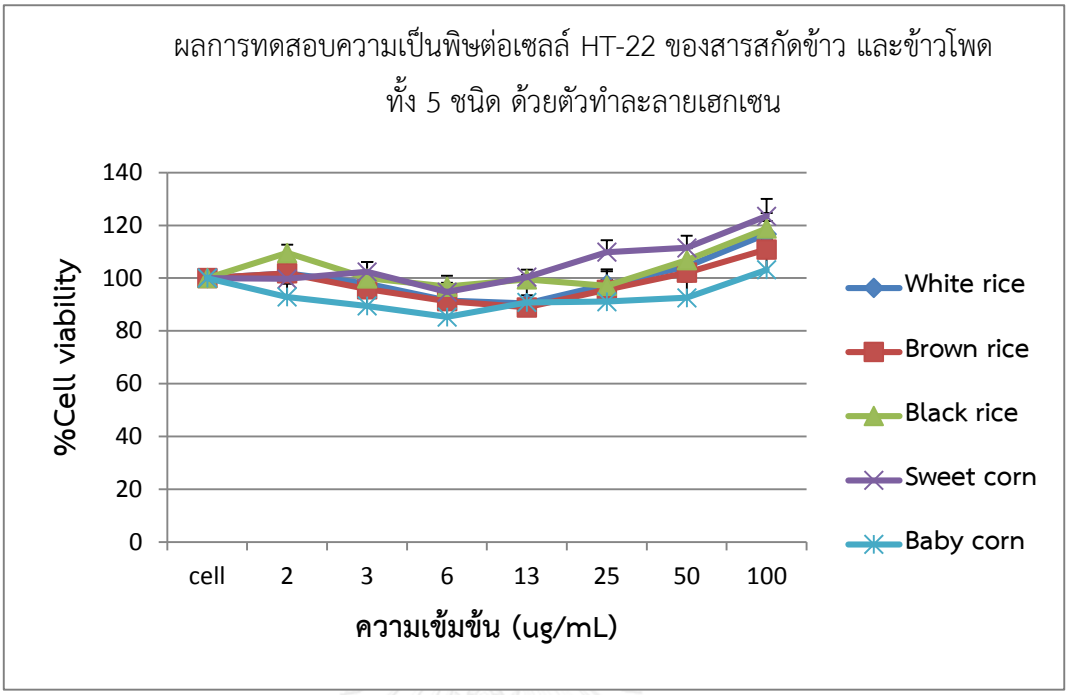


ภาพที่ 15 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ ที่ความเข้มข้น 2, 3, 6, 13, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HT-22 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี “cell”(เซลล์ กับอาหารเลี้ยงเซลล์) เป็นกลุ่มควบคุมลบ ด้วยวิธี MTT assay ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง



ภาพที่ 16 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 2, 3, 6, 13, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HT-22 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี “cell” (เซลล์ กับ อาหารเลี้ยงเซลล์) เป็นกลุ่มควบคุมลบ ด้วยวิธี MTT assay ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

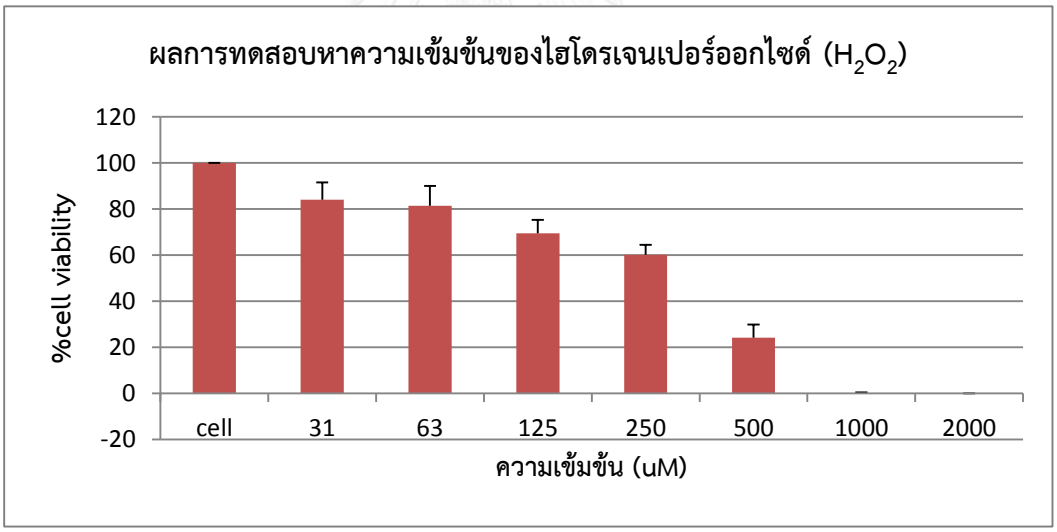


ภาพที่ 17 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ที่ความเข้มข้น 2, 3, 6, 13, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HT-22 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี “cell” (เซลล์ กับ อาหารเลี้ยงเซลล์) เป็นกลุ่มควบคุมลบ ด้วยวิธี MTT assay ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดข้าว และข้าวโพดทั้ง 5 ชนิดแล้ว พบว่าสารสกัดทั้งข้าว และข้าวโพดทั้ง 5 ชนิดที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงนำมาทดสอบกับตัวกระตุ้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยทำการหาความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เหมาะสมที่ทำให้การมีชีวิตรอดของเซลล์อยู่ที่ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการหว่านเซลล์ HT-22 ลงในหลุม 96 หลุม หลุมละ 10,000 เซลล์ จากนั้นนำสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 31 - 2000 ไมโครโมลลาร์ มา treat กับเซลล์แล้วบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 เปอร์เซ็นต์ CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้เซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบกับสาร H_2O เป็นกลุ่มควบคุมลบ (Negative control) มีค่าเปอร์เซ็นต์ของอัตราการรอดชีวิตเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

พบว่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่เหมาะสมที่ทำให้การมีชีวิตรอดของเซลล์อยู่ที่ 60% อยู่ที่ 250 ไมโครโมลลาร์ (ดังภาพที่ 18) ดังนั้นในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าวและข้าวโพดในการป้องกันเซลล์ HT-22 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ในขั้นตอนต่อไปจึงเลือกไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลลาร์ มาใช้ในการทดสอบต่อไป

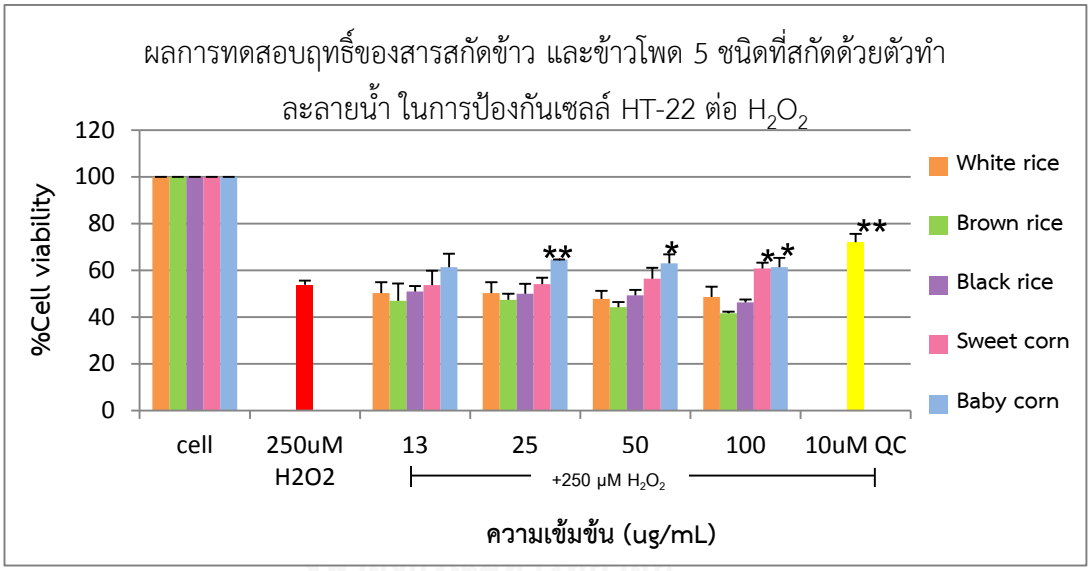


ภาพที่ 18 แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 31, 63, 125, 250, 500, 1000 และ 2000 ไมโครโมลลาร์ ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HT-22 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี “cell” เป็นกลุ่มควบคุมลบ ด้วยวิธี MTT assay ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

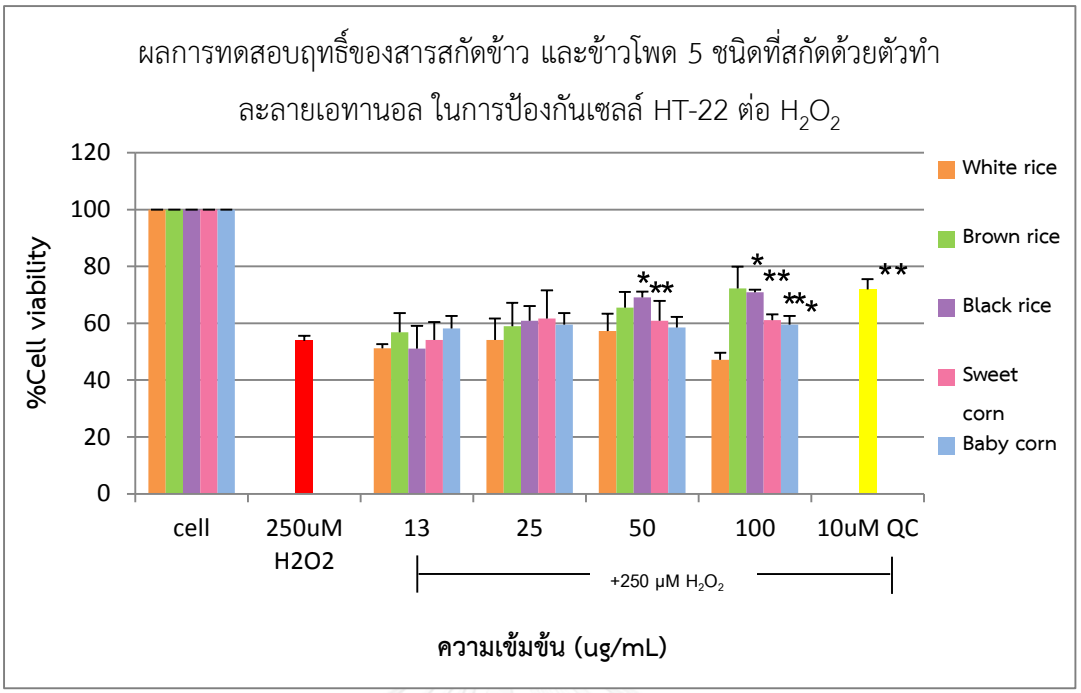
ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าว และข้าวโพดในการป้องกันเซลล์ HT-22 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยทำการหว่านเซลล์ในหลุม 96 หลุม หลุมละ 10,000 เซลล์ จากนั้นนำสารสกัดข้าว และข้าวโพดที่ความเข้มข้น 13 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา treat กับเซลล์แล้วบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 เปอร์เซ็นต์ CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลลาร์ มา treat กับเซลล์แล้วบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 เปอร์เซ็นต์ CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้เซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัดข้าว และข้าวโพดเป็นกลุ่มควบคุมลบ (Negative control) มีค่าเปอร์เซ็นต์ของอัตราการรอดชีวิตเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และให้เคอวซิติน 10 ไมโครโมลลาร์เป็นตัวควบคุมตัวอย่าง (Control sample) และให้เซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัดข้าว และข้าวโพด แต่ทดสอบกับเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เพียงอย่างเดียว เป็นกลุ่มควบคุมบวก (Positive control) นำกลุ่มทดสอบมาคำนวณเทียบกับกลุ่มควบคุมเพื่อหาร้อยละของอัตราการรอดชีวิต (%Cell viability) และนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบโดยใช้หลักสถิติ one-way ANOVA โดยให้ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง และข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ ไม่สามารถป้องกันเซลล์ตายจากการถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (positive control) สำหรับสารสกัดจากข้าวโพดหวานที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ พบว่าที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราการตายของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (positive control) และสารสกัดข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีอัตราการตายของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (positive control) (ดังภาพที่ 19) สำหรับผลการทดสอบสารสกัดจากข้าว และข้าวโพดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่าสารสกัดจากข้าวเหนียว ไม่สามารถป้องกันเซลล์ตายจากการถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (positive control) ในขณะที่สารสกัดจากข้าวเหนียวกล้องและข้าวเหนียวดำ ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราการตายของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (positive control) นอกจากนี้สารสกัดจากข้าวโพดหวานและข้าวโพดอ่อนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราการตายของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (positive control) (ดังภาพที่ 20) สำหรับผลการทดสอบสารสกัดจากข้าว และข้าวโพดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน พบว่าสารสกัดจากข้าวเหนียว ไม่สามารถป้องกันเซลล์ตาย

จากการถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (positive control) ในขณะที่สารสกัดจากข้าวเหนียวกล้อง ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราการตายของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (positive control) และสารสกัดจากข้าวเหนียวดำที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราการตายของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (positive control) นอกจากนี้สารสกัดจากข้าวโพดหวานและข้าวโพดอ่อนที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีอัตราการตายของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)และ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (positive control) (ดังภาพที่ 21)

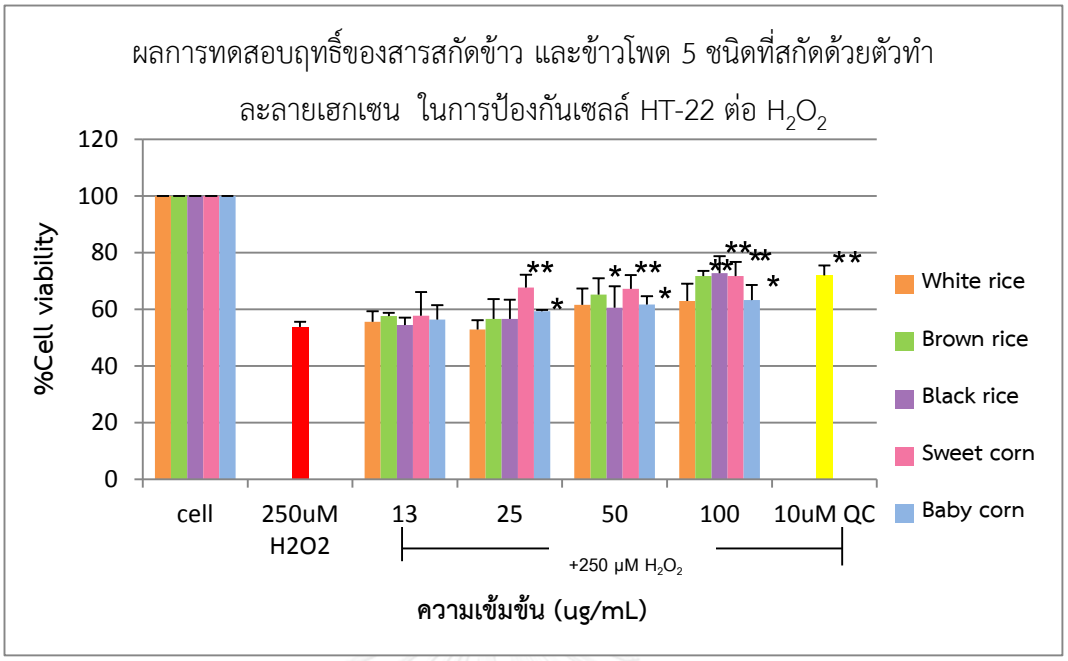


ภาพที่ 19 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำในการป้องกันเซลล์ HT-22 ต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 13, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี cell (เซลล์ กับอาหารเลี้ยงเซลล์) เป็นกลุ่มควบคุมลบ มี 250 ไมโครโมลลาร์ H_2O_2 เป็นกลุ่มควบคุมบวก และมี 10 ไมโครโมลลาร์เคอวซิติน เป็นกลุ่มควบคุมตัวอย่าง ด้วยวิธี MTT assay ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง โดย * เท่ากับ $p < 0.05$ และ ** เท่ากับ $p < 0.01$



ภาพที่ 20 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ในการป้องกันเซลล์ HT-22 ต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 13, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี cell (เซลล์ กับอาหารเลี้ยงเซลล์) เป็นกลุ่มควบคุมลบ มี 250 ไมโครโมลลาร์ H_2O_2 เป็นกลุ่มควบคุมบวก และมี 10 ไมโครโมลลาร์เคอวซิติน เป็นกลุ่มควบคุมตัวอย่าง ด้วยวิธี MTT assay ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง โดย * เท่ากับ ($p < 0.05$) และ ** เท่ากับ ($p < 0.01$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



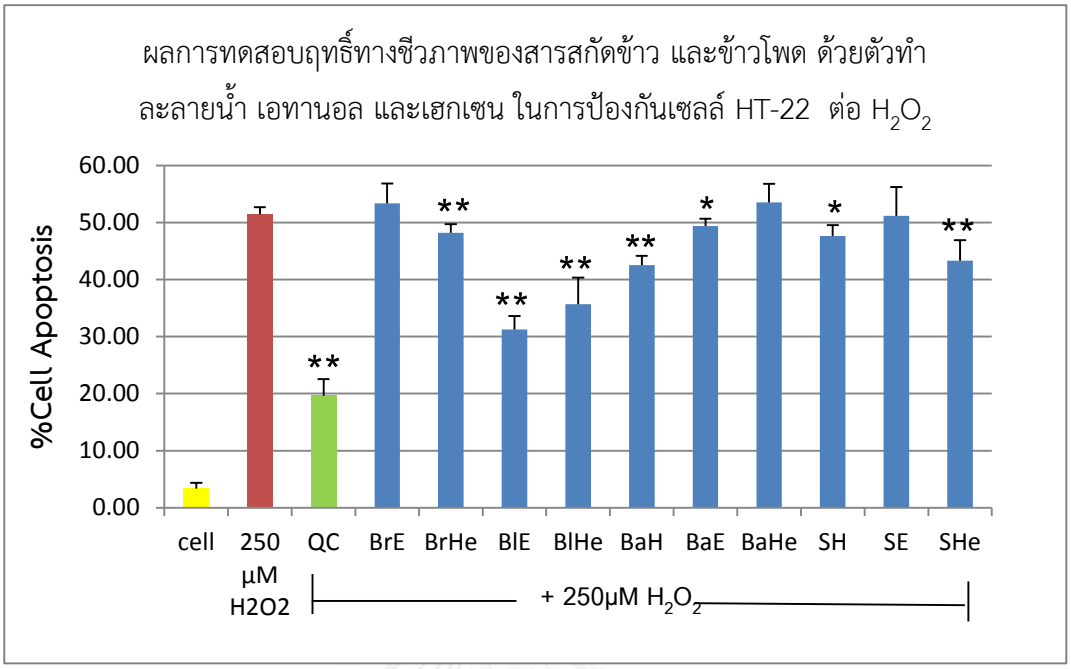
ภาพที่ 21 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ในการป้องกันเซลล์ HT-22 ต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 13, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี cell (เซลล์ กับอาหารเลี้ยงเซลล์) เป็นกลุ่มควบคุมลบ มี 250 ไมโครโมลลาร์ H_2O_2 เป็นกลุ่มควบคุมบวก และมี 10 ไมโครโมลลาร์เคอวซิติน เป็นกลุ่มควบคุมตัวอย่าง ด้วยวิธี MTT assay ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง โดย * เท่ากับ ($p < 0.05$) และ ** เท่ากับ ($p < 0.01$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดต่อการตายของเซลล์แบบ early และ late apoptosis/necrosis ด้วยเทคนิค Annexin V-FITC and Propidium Iodide staining assay / Flow cytometry analysis

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวานและข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ในการป้องกันเซลล์ HT-22 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ทำการหว่านเซลล์ในหลุม 6 หลุม หลุมละ 2 x 10^5 เซลล์ จากนั้นนำสารสกัดข้าว และข้าวโพดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา treat กับเซลล์แล้วบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 เปอร์เซ็นต์ CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลลาร์ มา treat กับเซลล์แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 เปอร์เซ็นต์ CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้เซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัดข้าว และข้าวโพดเป็นกลุ่มควบคุมลบ (Negative control) มีค่าเปอร์เซ็นต์ของอัตราการรอดชีวิตเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และให้เคอวซิติน 10 ไมโครโมลลาร์ เป็นตัวควบคุมตัวอย่าง (Control sample) และให้เซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัดข้าว และข้าวโพด แต่ทดสอบกับเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เพียงอย่างเดียว เป็นกลุ่มควบคุมบวก (Positive control) นำกลุ่มทดสอบมาคำนวณเทียบกับกลุ่มควบคุมเพื่อหาร้อยละของอัตราการตายของเซลล์ (%Cell Apoptosis) และนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบโดยใช้หลักสถิติ one-way ANOVA โดยให้ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวานและข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ในการป้องกันเซลล์ HT-22 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) พบว่าสารสกัดข้าวเหนียวกล้อง และข้าวโพดหวานที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และสารสกัดข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไม่สามารถป้องกันเซลล์ตายจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (positive control) ในขณะที่ข้าวเหนียวกล้องที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน(BrHe) ข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล(BlE)และตัวทำละลายเฮกเซน(BlHe) ข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ(BaH)และตัวทำละลายเอทานอล(BaE) และข้าวโพดหวานที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ (SH)และเฮกเซน(SHe) มีอัตราการตายของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และ ($p < 0.01$) ดังนี้ 48.2%, 31.27%, 35.66%, 42.52%, 49.37%, 47.67% และ 43.325% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (positive control) หรือกลุ่มที่ treat ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) อย่างเดียว 51.47% (ดังภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ในการป้องกันเซลล์ HT-22 ต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น treat ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลลาร์อีก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี “cell” เป็นกลุ่มควบคุมลบ มี “250 ไมโครโมลลาร์ H_2O_2” เป็นกลุ่มควบคุมบวก และมี “10 ไมโครโมลลาร์เคอวซิติน” เป็นกลุ่มควบคุมตัวอย่าง ด้วยวิธี Annexin V-FITC and Propidium Iodide staining assay / Flow cytometry analysis ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง โดย * เท่ากับ ($p < 0.05$) และ ** เท่ากับ ($p < 0.01$)

4.6 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและข้าวโพด

4.6.1 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยวิธี DPPH• assay

จากผลการทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและข้าวโพดที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ด้วยวิธี DPPH• assay ซึ่งจะวัดออกมาเป็นค่าของ radical scarvenging activity (%) และนำไปเปรียบเทียบค่ากับกรดแอสคอร์บิก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณเป็นค่ามิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อน้ำหนักเป็นกรัมของสารสกัด จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล สามารถต้านออกซิเดชั่นอนุมูล DPPH ได้มากที่สุด ซึ่งมีค่า radical scarvenging activity (%) อยู่ที่ 13.44 ± 1.99 และเมื่อนำไปเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระกรดแอสคอร์บิก พบว่ามีปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 9.54 ± 1.21 mg Vit C g^{-1} fresh weight of sample ซึ่งแสดงผลในรูปของ mean ± SEM โดยทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง และจำนวน 3 การทดลอง (ดังตาราง 14)

ตารางที่ 14 แสดงถึงผลการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดอ่อน และข้าวโพดหวานที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ด้วยวิธี DPPH• assay

Types of plant	% Scavenging activity (%SC)			mg Vit C g^{-1} fresh weight of sample		
	น้ำ	เอทานอล	เฮกเซน	น้ำ	เอทานอล	เฮกเซน
ข้าวเหนียว	0.62 ±2.17	5.67 ± 2.62	4.73 ± 2.51	0.32 ± 1.56	4.46 ± 1.28	3.61 ± 1.56
ข้าวเหนียวกล้อง	4.28 ± 3.74	4.89 ± 2.84	4.46 ± 3.00	3.60 ± 2.18	3.82 ± 1.76	3.68 ± 1.65
ข้าวเหนียวดำ	6.34 ± 1.25	13.44 ± 1.99	5.76 ± 2.80	4.39 ± 0.76	9.54 ± 1.21	3.47 ± 1.94
ข้าวโพดหวาน	2.21 ± 2.66	5.28 ± 2.98	8.39 ± 3.01	1.45 ± 2.11	3.61 ± 2.33	6.38 ± 1.73
ข้าวโพดอ่อน	4.27 ± 4.13	5.42 ± 3.93	4.12 ± 2.59	3.55 ± 2.88	4.44 ± 2.53	3.07 ± 1.94

4.6.2 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยวิธี ABTS assay

จากผลการทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและข้าวโพดที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ด้วยวิธี ABTS assay ซึ่งจะวัดออกมาเป็นค่าของ radical scarvenging activity (%) และนำไปเปรียบเทียบค่ากับกรดแอสคอร์บิก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณเป็นค่ามิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อน้ำหนักเป็นกรัมของสารสกัด (mg Vit C g^{-1} fresh weight of sample) จากการทดสอบพบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลให้ผลไปในทางเดียวกันกับวิธี DPPH assay โดยมีค่าความสามารถต้านออกซิเดชั่นอนุมูล ABTS ซึ่งมีค่า radical scarvenging activity (%) อยู่ที่ 26.73 ± 0.42 และเมื่อนำไปเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระกรดแอสคอร์บิก พบว่ามีปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 17.80 ± 0.65 mg Vit C g^{-1} fresh weight of sample นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และเอทานอลมีความสามารถต้านออกซิเดชั่นอนุมูล ABTS ด้วย โดยมีค่า radical scarvenging activity (%) อยู่ที่ 23.42 ± 0.10 และ 27.63 ± 0.93 ตามลำดับ และเมื่อนำไปเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระกรดแอสคอร์บิก พบว่ามีปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 15.73 ± 0.35 และ 18.36 ± 0.42 mg Vit C g^{-1} fresh weight of sample ตามลำดับ ซึ่งพบว่า สารสกัดจากข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มีความสามารถต้านออกซิเดชั่นอนุมูล ABTS มากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และสารสกัดจากข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ตามลำดับ (ดังตาราง 15)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 15 แสดงถึงผลการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดอ่อน และข้าวโพดหวานที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ด้วยวิธี ABTS assay

Types of plant	% Scavenging activity (%SC)			mg Vit C g^{-1} fresh weight of sample		
	น้ำ	เอทานอล	เฮกเซน	น้ำ	เอทานอล	เฮกเซน
ข้าวเหนียว	2.57 ± 0.99	6.02 ± 2.09	2.22 ± 1.93	2.77 ± 0.12	4.93 ± 0.85	2.56 ± 0.71
ข้าวเหนียวกล้อง	2.05 ± 2.06	4.49 ± 0.46	2.34 ± 0.94	2.46 ± 0.79	3.97 ± 0.20	2.64 ± 0.13
ข้าวเหนียวดำ	8.97 ± 1.22	26.73 ± 0.42	8.06 ± 1.49	6.75 ± 0.41	17.80 ± 0.65	6.19 ± 1.13
ข้าวโพดหวาน	5.72 ± 1.14	9.83 ± 0.64	4.79 ± 0.87	4.74 ± 0.89	7.28 ± 0.86	4.16 ± 0.42
ข้าวโพดอ่อน	23.42 ± 0.10	27.63 ± 0.93	2.62 ± 0.85	15.73 ± 0.35	18.36 ± 0.42	2.80 ± 0.59

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

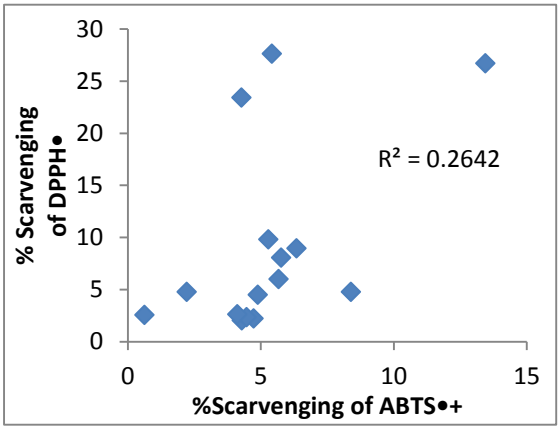
4.7 ผลการทดสอบหาปริมาณสารเมลาโทนินและทริปโตเฟนในสารสกัดข้าวและข้าวโพดด้วยวิธี HPLC

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารทริปโตเฟน และเมลาโทนินในสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดอ่อน และข้าวโพดหวาน ด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ด้วยวิธี HPLC แล้วพบว่า สารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มีปริมาณสารเมลาโทนินมากที่สุดอยู่ที่ 396.38 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และพบว่าสารสกัดจากข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และเอทานอลมีปริมาณสารทริปโตเฟนมากที่สุดที่ 2898.44 และ 1303.09 ตามลำดับ (ดังตารางที่ 16)

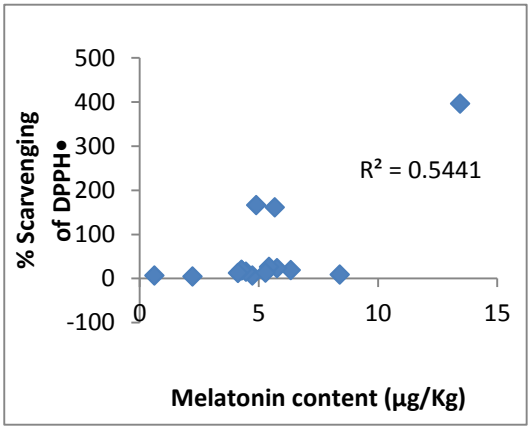
ตารางที่ 16 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารทริปโตเฟน และเมลาโทนินในสารสกัดข้าวเหนียว ข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดอ่อน และข้าวโพดหวาน ด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ด้วยวิธี HPLC

Types of plant	Tryptophan (μg Kg^{-1})			Melatonin (μg Kg^{-1})		
	น้ำ	**เอทานอล**	**เฮกเซน**	**น้ำ**	**เอทานอล**	**เฮกเซน**
ข้าวเหนียว	34.88	486.89	1.97	6.62	161.12	6.99
ข้าวเหนียวกล้อง	3.40	59.73	1.29	18.10	166.26	15.17
ข้าวเหนียวดำ	317.56	103.26	3.64	19.16	396.38	23.24
ข้าวโพดหวาน	344.40	448.99	37.74	4.39	13.36	8.97
ข้าวโพดอ่อน	2898.44	1303.09	103.22	19.70	26.36	12.42

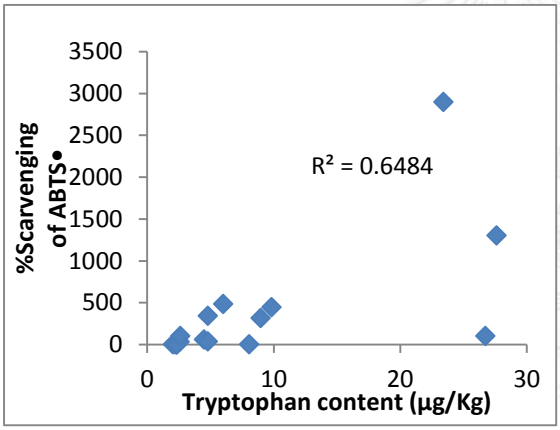
(ก)



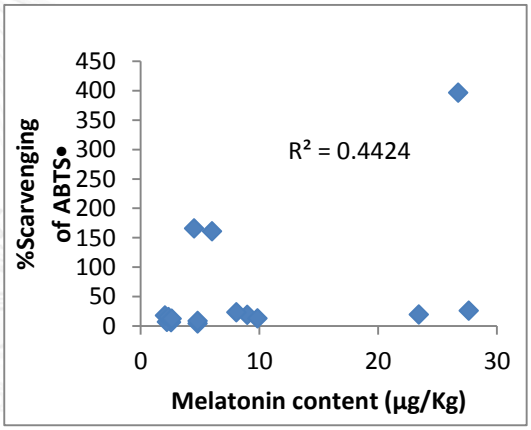
(ข)



(ค)



(ง)



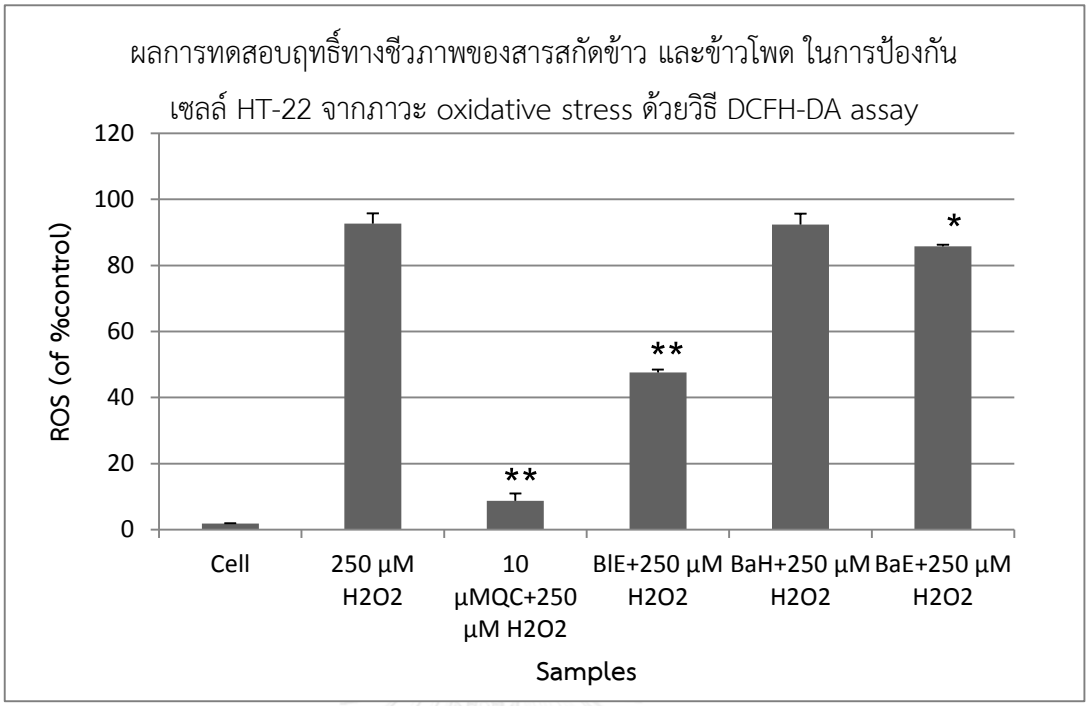
Chulalongkorn University

ภาพที่ 23 กราฟวิเคราะห์ความสัมพันธ์ โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (R^2) ระหว่างความแตกต่างของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ กับ ปริมาณทริปโตเฟน และเมลาโทนิน ในสารสกัดข้าว และข้าวโพดที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน (ก) DPPH และ ABTS assay (R^2=0.5140) ; (ข) DPPH assay และปริมาณเมลาโทนิน (R^2=0.7376) ; (ค) ABTS assay และปริมาณทริปโตเฟน (R^2=0.6484) ; (ง) ABTS assay และปริมาณเมลาโทนิน (R^2=0.4424)

4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าว และข้าวโพด ในการป้องกันเซลล์ HT-22 จากภาวะ oxidative stress ด้วยวิธี DCFH-DA assay

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และ เอทานอล ในการป้องกันเซลล์ HT-22 จากภาวะ oxidative stress ที่ถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยทำการหว่านเซลล์ในหลุม 6 หลุม หลุมละ 2 x 10^5 เซลล์ จากนั้นนำสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา treat กับเซลล์แล้วบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 เปอร์เซ็นต์ CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลลาร์ มา treat กับเซลล์พร้อมกับ DCFH-DA 10 ไมโครโมลลาร์ แล้วบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 เปอร์เซ็นต์ CO_2 เป็นเวลา 30 นาที (เนื่องจากเป็นเวลาที่เหมาะสมต่อการวัดปริมาณ ROS ในเซลล์ เพราะถ้าใช้เวลานานกว่านี้ ROS ภายในเซลล์จะสลายตัวไปทำให้ไม่สามารถตรวจวัดได้) โดยให้เซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัดข้าว และข้าวโพดเป็นกลุ่มควบคุมลบ (Negative control) มีค่าเปอร์เซ็นต์ของอัตราการรอดชีวิตเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และให้เคอวซิติน 10 ไมโครโมลลาร์ เป็นตัวควบคุมตัวอย่าง (Control sample) และให้เซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัดข้าว และข้าวโพด แต่ทดสอบกับเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เพียงอย่างเดียว เป็นกลุ่มควบคุมบวก (Positive control) นำกลุ่มทดสอบมาคำนวณเทียบกับกลุ่มควบคุมเพื่อหาร้อยละของปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ (ROS of %Control) และนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบโดยใช้หลักสถิติ one-way ANOVA โดยให้ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล(BlE) และสารสกัดข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล(BaE) มีฤทธิ์สามารถลดปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) และ ($p < 0.05$) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (positive control) หรือกลุ่มที่ treat ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) อย่างเดียว ในขณะที่สารสกัดจากข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ ไม่สามารถลดระดับ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้ (ดังภาพที่ 24)

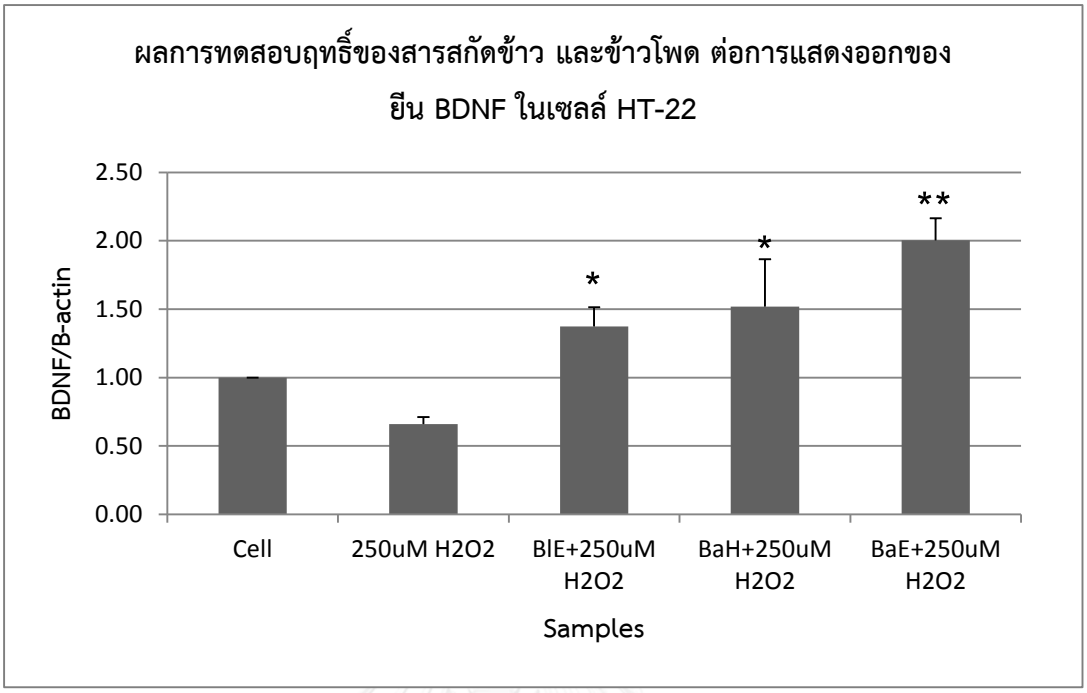


ภาพที่ 24 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล(BlE) และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ(BaH) และ เอทานอล(BaE) ในการป้องกันเซลล์ HT-22 จากภาวะ oxidative stress ที่ถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ด้วยวิธี DCFH-DA assay โดยมี “cell” เป็นกลุ่มควบคุมลบ มี “250 ไมโครโมลลาร์ H2O2” เป็นกลุ่มควบคุมบวก และมี “10 ไมโครโมลลาร์เคอวซิติน” เป็นกลุ่มควบคุมตัวอย่าง ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง โดย * เท่ากับ ($p < 0.05$) และ ** เท่ากับ ($p < 0.01$)

4.9 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน BDNF ด้วยวิธี Real time RT-PCR

จากการวัดการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน BDNF ในเซลล์ HT-22 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และสารสกัดข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และ เอทานอล โดยทำการหว่านเซลล์ในหลุม 6 หลุม หลุมละ 2×10^5 เซลล์ จากนั้นนำสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา treat กับเซลล์แล้วบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 เปอร์เซ็นต์ CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลลาร์ มา treat กับเซลล์แล้วบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 เปอร์เซ็นต์ CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้เซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัดข้าว และข้าวโพดเป็นกลุ่มควบคุมลบ (Negative control) และให้เซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัดข้าว และข้าวโพด แต่ทดสอบกับเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เพียงอย่างเดียว เป็นกลุ่มควบคุมบวก (Positive control) โดยนำไปเปรียบเทียบอัตราส่วนกับ housekeeping gene ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ β-actin จากนั้นนำค่าอัตราส่วนของกลุ่มทดสอบไปเปรียบเทียบหาค่าร้อยละของการแสดงออกของยีนกับกลุ่มควบคุมลบ โดยให้ค่าอัตราส่วนของกลุ่มควบคุมลบเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้ค่าร้อยละแล้วจึงนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ โดยใช้หลักสถิติ one-way ANOVA โดยให้ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล(BlE) และสารสกัดข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ(BaH) และเอทานอล(BaE) มีฤทธิ์ในการเพิ่มการแสดงออกของยีน BDNF อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และ ($p < 0.01$) โดยมีค่าร้อยละของการแสดงออกของยีนมากกว่ากลุ่มควบคุมบวก (Positive control) ที่ treat 250 ไมโครโมลลาร์ H_2O_2 เพียงอย่างเดียว ดังภาพ 25

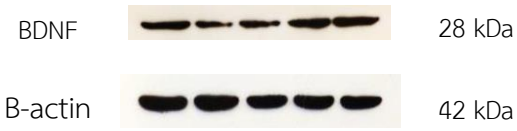


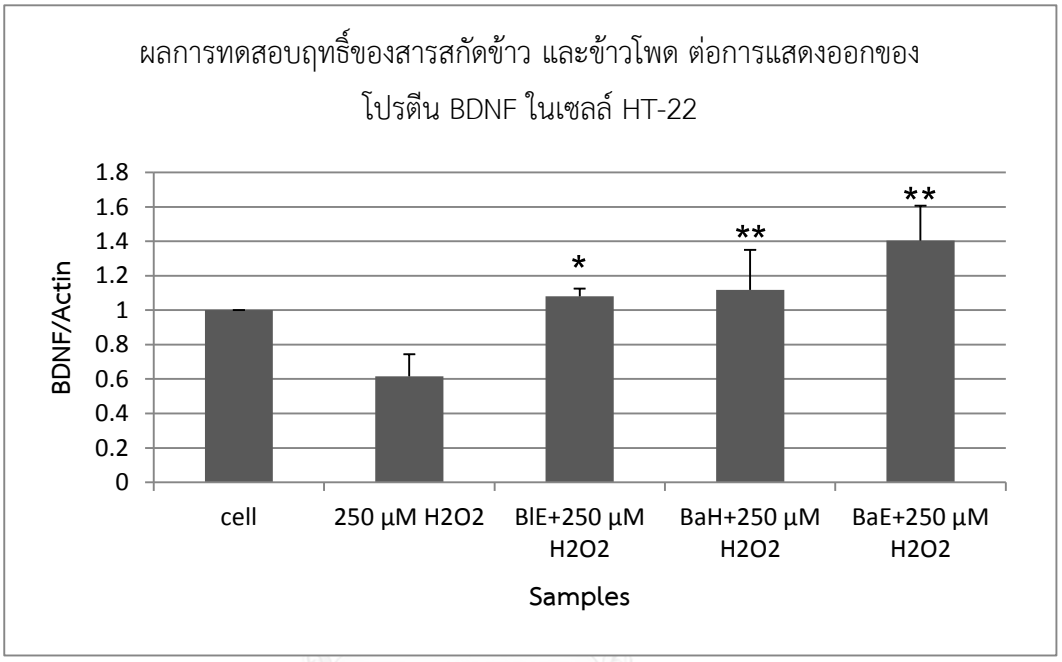
ภาพที่ 25 แสดงผลการวัดการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน BDNF ในเซลล์ HT-22 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล(BlE) และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ(BaH) และ เอทานอล(BaE) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น treat ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลลาร์อีก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี “cell” เป็นกลุ่มควบคุมลบ มี “250 ไมโครโมลลาร์ H_2O_2” เป็นกลุ่มควบคุมบวก ด้วยวิธี Real time-PCR ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง โดย * เท่ากับ ($p < 0.05$) และ ** เท่ากับ ($p < 0.01$)

4.10 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดต่อการแสดงออกระดับโปรตีนของโปรตีน BDNF ด้วยวิธี Western blot analysis

จากการวัดการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน BDNF ในเซลล์ HT-22 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และสารสกัดข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และ เอทานอล โดยทำการหว่านเซลล์ในหลุม 6 หลุม หลุมละ 2×10^5 เซลล์ จากนั้นนำสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และสารสกัดข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และ เอทานอล ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา treat กับเซลล์แล้วบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 เปอร์เซ็นต์ CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลลาร์ มา treat กับเซลล์แล้วบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 เปอร์เซ็นต์ CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้เซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัดข้าว และข้าวโพดเป็นกลุ่มควบคุมลบ (Negative control) และให้เซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัดข้าว และข้าวโพด แต่ทดสอบกับเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เพียงอย่างเดียว เป็นกลุ่มควบคุมบวก (Positive control) โดยนำไปเปรียบเทียบอัตราส่วนกับ housekeeping protein ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ β-actin จากนั้นนำค่าอัตราส่วนของกลุ่มทดสอบไปเปรียบเทียบหาค่าร้อยละของการแสดงออกของยีนกับกลุ่มควบคุมลบ โดยให้ค่าอัตราส่วนของกลุ่มควบคุมลบเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้ค่าร้อยละแล้วจึงนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ โดยใช้หลักสถิติ one-way ANOVA โดยให้ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล(BlE) และสารสกัดข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ(BaH) และเอทานอล(BaE) มีฤทธิ์ในการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน BDNF อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และ ($p < 0.01$) โดยมีค่าร้อยละของการแสดงออกของโปรตีนมากกว่ากลุ่มควบคุมบวก (Positive control) ที่ treat 250 ไมโครโมลลาร์ H_2O_2 เพียงอย่างเดียว ดังภาพ 26





ภาพที่ 26 แสดงผลการวัดการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน BDNF ในเซลล์ HT-22 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล(BlE) และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ(BaH) และ เอทานอล(BaE) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น treat ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลลาร์อีก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี “cell” เป็นกลุ่มควบคุมลบ มี “250 ไมโครโมลลาร์ H_2O_2” เป็นกลุ่มควบคุมบวก ด้วยวิธี western blot ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง โดย * เท่ากับ ($p < 0.05$) และ ** เท่ากับ ($p < 0.01$)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผล

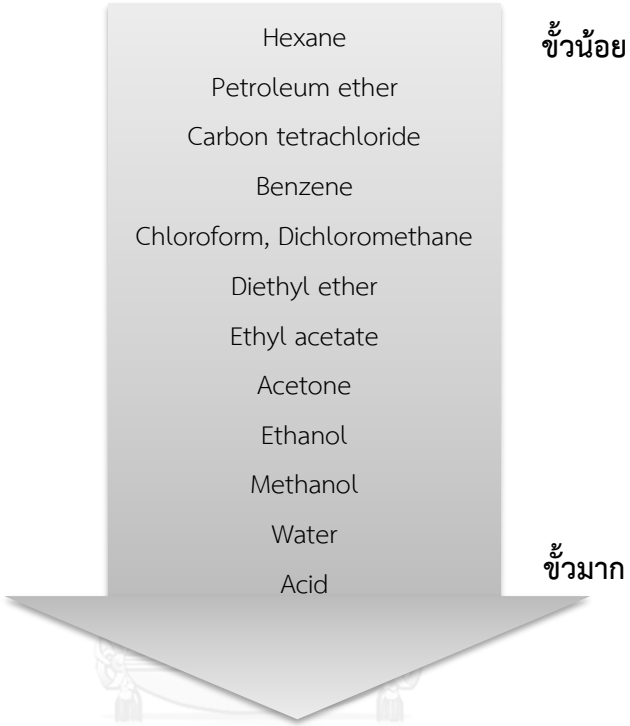
แหล่งที่มาของข้าว และข้าวโพดที่สนใจ

การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ใช้ข้าวและข้าวโพดที่ซื้อจากตามท้องตลาดในจังหวัดเชียงราย ซึ่งเป็นภูมิลำเนาของผู้วิจัย โดยนำข้าวและข้าวโพดที่สนใจมาทำในเดือน พฤษภาคม 2557 ดังนั้นผลการศึกษาที่ได้อาจไม่สามารถเป็นตัวแทนของข้าวและข้าวโพดทั้งประเทศได้ เนื่องจากมีปัจจัยที่ส่งผลถึงสารสำคัญ หรือองค์ประกอบภายในของข้าวและข้าวโพดชนิดนั้น เช่น ปัจจัยของสภาพแวดล้อม (สภาพดิน น้ำ และอากาศ)

วิธีการสกัดสารจากข้าว และข้าวโพด

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยใช้วิธีการหมัก (Maceration) ในการสกัดสารสำคัญจากข้าว และข้าวโพด โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล และเฮกเซน ซึ่งสาเหตุใช้วิธีการสกัดแบบ maceration เนื่องจากเป็นวิธีการสกัดที่ไม่มีการใช้ความร้อนเนื่องจากสกัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันสารสำคัญต่างๆสลายจากการถูกความร้อน โดยเฉพาะสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้มีการวิเคราะห์หาสารต้านอนุมูลอิสระ และในการสกัดข้าว และข้าวโพดตัวทำละลายน้ำ ใช้วิธีการเพิ่มอุณหภูมิ (Heat up) ซึ่งสาเหตุที่ใช้การสกัดด้วยวิธีนี้เนื่องจากใช้หลักการต้มข้าวและข้าวโพดเป็นโมเดล โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ข้าวโพดหวาน ที่ต้มมีสารประกอบที่เรียกว่า กรดเฟอรูลิก(Ferulic acid) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ[49] ในการศึกษาครั้งนี้สาเหตุที่ใช้ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดนี้เพราะสามารถหาได้ทั่วไปในประเทศ มีความปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม และเนื่องจากความแตกต่างของขั้วของตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด (ภาพที่ 27) ส่งผลให้การสกัดข้าว และข้าวโพดจะทำให้ได้สารที่มีทั้งขั้วมาก และขั้วน้อยออกมาแตกต่างกัน และบางตัวสามารถรับประทานได้ซึ่งถือว่าเป็นข้อสำคัญ เนื่องจากงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำไปพัฒนาใช้ในการรักษามนุษย์ หลังจากที่ได้ทำการสกัดสารสำคัญออกจากพืชแล้ว จะนำตัวทำละลายเอทานอล และเฮกเซนมาระเหยออกด้วยวิธี evaporation และสำหรับตัวทำละลายน้ำ จะนำมาระเหิดออกด้วยวิธี lyophilization เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาละลายด้วย DMSO เนื่องจาก DMSO สามารถละลายสารต่างๆได้ทั้งส่วนที่มีขั้ว (polar) และ ไม่มีขั้ว (nonpolar) ถึงแม้ว่าจะมีการ

รายงานว่า DMSO มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นของ DMSO 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นที่ยอมรับกันว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง



ภาพที่ 27 แสดงชนิดของตัวทำละลายเรียงตามความเป็นขั้วน้อยไปมาก

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าว และข้าวโพดต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HT-22

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าว และข้าวโพดต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ผู้วิจัยเลือกใช้เซลล์ HT-22 ในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากเซลล์ HT-22 เป็นเซลล์สมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนู ซึ่งสมองส่วนฮิปโปแคมปัสนี้มีความสำคัญ และเกี่ยวข้องต่อกระบวนการต่างๆที่เกิดขึ้นกับโรคความเสื่อมทางระบบประสาท ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดนี้มาใช้เป็น *in vitro* model สำหรับการศึกษากระบวนการ และกลไกที่เกิดขึ้นของโรคความเสื่อมทางระบบประสาท โดยการศึกษาครั้งนี้จะใช้เซลล์ HT-22 เพื่อทำการศึกษา 1. ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดข้าว และข้าวโพดต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HT-22 เซลล์ โดยวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดข้าว และข้าวโพด 2. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดข้าว และข้าวโพดในการป้องกันเซลล์ HT-22 ต่อการกระตุ้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

(H_2O_2) โดยใช้เวลาในการทดสอบสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมา treat ด้วยตัวกระตุ้นให้เกิดภาวะ oxidative stress ด้วย H_2O_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดข้าว และข้าวโพดเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ treat ด้วยตัวกระตุ้น H_2O_2 โดยใช้วิธี MTT assay และวิธี การย้อมสี AnexinV-FITC และ PI / Flowcytometry[40] 3. ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าว และข้าวโพดโดยใช้วิธี DPPH และ ABTS assay เนื่องจากวิธีทั้งสองนี้ใช้ในการทดสอบหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดอย่างแพร่หลาย และเป็นที่นิยม เนื่องจากทำง่ายไม่ยุ่งยาก และมีความไวแม่นยำสูง นอกจากนี้วิธี ABTS ยังสามารถใช้ทดสอบสารทั้งที่เป็น aqueous และ lipid phase 4. วิเคราะห์หาปริมาณสารทริปโตเฟน และเมลาโทนินในสารสกัดข้าว และข้าวโพด ด้วยวิธี HPLC ซึ่งสารทริปโตเฟน และเมลาโทนินนี้ พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ [6] และมีการพบว่ามีสารนี้ในพืชหลายชนิดเช่น ข้าว และข้าวโพดเป็นต้น [37] 5. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดข้าว และข้าวโพดต่อการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ด้วยการย้อมสี DCFH-DA โดยใช้เวลาในการทดสอบสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมา treat ด้วยตัวกระตุ้นให้เกิดภาวะ oxidative stress เกิดเป็น ROS ขึ้นภายในเซลล์ ด้วย H_2O_2 เป็นเวลา 30 นาที สาเหตุที่การทดสอบครั้งนี้ treat ด้วยตัวกระตุ้น H_2O_2 เป็นเวลา 30 นาที เนื่องจากต้องการตรวจวัดปริมาณของ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ซึ่ง H_2O_2 นั้นมีการสลายตัวได้ง่าย เนื่องจากมีค่าครึ่งชีวิตที่สั้น และที่อุณหภูมิสูงก็จะยิ่งสลายตัวเร็วขึ้น ทำให้ในขั้นตอนนี้จึงใช้เวลาในการ treat ด้วยตัวกระตุ้น H_2O_2 ลดลง 6.ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดข้าว และข้าวโพดต่อการแสดงออกระดับ mRNA และโปรตีน ของยีน BDNF เนื่องจากมีการศึกษาพบว่า BDNF เป็นยีนที่ทำหน้าที่ในด้านการเพิ่มประสิทธิภาพ เพื่อต้านความเสื่อมของเซลล์ประสาท โดยเป็นการทำงานผ่านในระดับโมเลกุลผ่าน signaling pathway ซึ่งมีเอนไซม์ไคเนสเป็นสารชีวโมเลกุลหลัก [69] และนอกจากนี้ยังพบว่าสารเมลาโทนินออกฤทธิ์โดยมีกลไกในระดับโมเลกุล โดยการกระตุ้นการเพิ่มการแสดงออกของยีน brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [12-14]

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดข้าว และข้าวโพดต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HT-22 เซลล์ โดยวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดข้าว และข้าวโพดด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดข้าว และข้าวโพดทั้ง 5 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ที่ความเข้มข้น 2-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเป็นข้อดีในการสามารถนำสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆมาศึกษาต่อไปได้ และทำให้ทราบว่าพืชที่นำมาศึกษาคือข้าว และข้าวโพดซึ่งเป็นอาหารที่เรารับประทานเป็นประจำนั้น ไม่มีความเป็นพิษ หรือเป็นอันตรายต่อการบริโภคในชีวิตประจำวัน ยกเว้นสารสกัดจากข้าวเหนียวกล้องที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นพบว่ามีอัตราการตายของเซลล์ที่เพิ่มสูงขึ้น จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าว และ

ข้าวโพดในการป้องกันเซลล์ HT-22 ต่อการกระตุ้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เพื่อให้เกิดภาวะ oxidative stress เนื่องจากมีการศึกษาพบว่า H_2O_2 เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์สมอง หรือเซลล์ต่างๆในระบบประสาท ในโรคความเสื่อมของระบบประสาทเช่นโรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน และโรคซึมเศร้า เป็นต้น [70, 71] ผลจากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดข้าว และข้าวโพด พบว่า สารสกัดจากข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดอ่อน และข้าวโพดหวาน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซนมีฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ HT-22 จาก H_2O_2 ได้ แต่ในขณะที่ข้าวเหนียว ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดไม่มีฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ HT-22 จาก H_2O_2 ได้ อาจเนื่องจากว่าข้าวเหนียวต่างจากข้าวชนิดอื่นเนื่องจากข้าวเหนียวได้ผ่านกระบวนการขัดสีมา ทำให้สูญเสียส่วนที่เป็นกากใย ซึ่งเป็นส่วนที่อุดมไปด้วยแร่ธาตุ สารอาหารต่างๆมากมายที่จะมีฤทธิ์ช่วยในการป้องกันเซลล์ HT-22 จาก H_2O_2 ได้ และเนื่องจากมีการศึกษาอีกมากมายรายงานว่า H_2O_2 เป็นตัวที่ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ภายในเซลล์ประสาท [72, 73] ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าว และข้าวโพดพบว่า สารสกัดจากข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดอ่อน และข้าวโพดหวาน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซนในการป้องกันเซลล์ HT-22 จาก H_2O_2 ด้วยอีกวิธีหนึ่งเพื่อยืนยันผลการทดสอบวิธี MTT assay ด้วยวิธีการย้อม AnexinV-FITC และ PI ด้วย Flowcytometer ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดจากข้าวเหนียวกล้อง ข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดอ่อน และข้าวโพดหวาน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซนมีฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ HT-22 จาก H_2O_2 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบด้วยวิธี MTT assay แต่ในขณะที่พบว่านอกจากข้าวเหนียวที่ไม่มีฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ HT-22 จาก H_2O_2 ได้แล้ว ยังพบว่ามีข้าวเหนียวกล้อง และข้าวโพดหวานที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ทั้ง 3 สารสกัดนี้ไม่มีฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ HT-22 จาก H_2O_2 ซึ่งวิธีการย้อม AnexinV-FITC และ PI ด้วย Flowcytometer ให้ผลที่น่าเชื่อถือกว่าเนื่องจากใช้เครื่องมือในการตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่ละเอียดกว่า และมีความถูกต้อง แม่นยำมากกว่า วิธี MTT assay เนื่องจากวิธีนี้เป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดจากการรีดิวซ์สารประกอบ MTT ด้วยตัวรีดิวซ์ NADH และ NADPH ต้องใช้เอนไซม์ภายในเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม และไมโทคอนเดรีย เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และเนื่องจาก H_2O_2 เป็นสารอนุมูลอิสระตัวหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท จึงมีหลายงานวิจัยพบว่ามีสารอนุมูลอิสระเหล่านี้ถูกยับยั้งได้ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ [70, 71, 74, 75] ผู้วิจัยจึงได้นำสารสกัดข้าว และข้าวโพดทั้ง 5 ชนิดที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซนมาทดสอบ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าว และข้าวโพดโดยใช้วิธี DPPH และ ABTS assay ผลการทดลองพบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล สารสกัดจากข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และเอทานอล มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับหลายๆงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ใน

การต้านอนุมูลอิสระในข้าว และข้าวโพด [40, 49, 76, 77] นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าในข้าว และข้าวโพดมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่น่าสนใจคือทริปโตเฟน และเมลาโทนิน ซึ่งมีการรายงานพบอยู่ในข้าว และข้าวโพด และสารดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านอนุลูลอิสระ [6, 37] ผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารทริปโตเฟน และเมลาโทนินในสารสกัดข้าว และข้าวโพดทั้ง 5 ชนิดที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ด้วยวิธี HPLC จากผลการวิเคราะห์พบว่า สารสกัดจากข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีปริมาณสารเมลาโทนินมากที่สุด และสารสกัดข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และเอทานอลพบว่ามีปริมาณสารทริปโตเฟนมากที่สุด และรองลงมาตามลำดับ ซึ่งผลดังกล่าวพบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิดนี้ได้ผลที่สอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay ซึ่งความสัมพันธ์ของความแตกต่างในการต้านอนุมูลอิสระ กับปริมาณสารทริปโตเฟน และเมลาโทนินในสารสกัดข้าวและข้าวโพดแต่ละชนิด พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH กับ ABTS assay, ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับปริมาณสารเมลาโทนิน, ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS กับ สารทริปโตเฟน และเมลาโทนิน มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าความสัมพันธ์ (R^2) ที่ 0.5140, 0.7376, 0.6483 และ 0.4424 ตามลำดับ(ภาพที่23) จากการทดสอบที่ผ่านมาข้างต้นผู้วิจัยจึงเลือกสารสกัดที่ได้ผลที่น่าสนใจโดยมีทั้งฤทธิ์ในการลดอัตราการตายของเซลล์โดยการป้องกันเซลล์ HT-22 จาก H_2O_2 จากขั้นตอน MTT assay และวิธีการย้อม AnexinV-FITC และ PI ด้วย Flowcytometer และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จากขั้นตอน DPPH และ ABTS assay และมีสารที่สนใจคือ มีสารทริปโตเฟน และเมลาโทนินอยุ่ในปริมาณมาก ได้แก่ สารสกัด 3 ชนิดคือ สารสกัดจากข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และสารสกัดจากข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และเอทานอล นำมาทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป ซึ่งจากการทดลองผู้วิจัยใช้ H_2O_2 ในการกระตุ้นเซลล์ HT-22 ให้เกิดสภาวะ oxidative stress ซึ่งมีหลายงานวิจัยรายงานว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 จะทำให้เกิด ROS เกิดขึ้นภายในเซลล์ และนอกจากนี้มีการศึกษาก่อนหน้านี้เช่นกันพบว่า เมื่อหลังจากกระตุ้นเซลล์ด้วย 250 ไมโครโมลลาร์ H_2O_2 พบว่ามีการเกิดขึ้นของ ROS ภายในเซลล์ [70-74] ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดข้าว และข้าวโพดต่อการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ด้วยการย้อมสี DCFH-DA โดยใช้เวลาในการทดสอบสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบด้วยตัวกระตุ้นให้เกิดภาวะ oxidative stress เกิดเป็น ROS ขึ้นภายในเซลล์ ด้วย H_2O_2 เป็นเวลา 30 นาที สาเหตุที่การทดสอบครั้งนี้ treat ด้วยตัวกระตุ้น H_2O_2 เป็นเวลา 30 นาที เนื่องจากต้องการตรวจวัดปริมาณของ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ซึ่ง H_2O_2 นั้นมีการสลายตัวได้ง่าย เนื่องจากมีค่าครึ่งชีวิตที่สั้น และยิ่งที่อุณหภูมิสูงก็จะยิ่งสลายตัวเร็วขึ้น ทำให้ในขั้นตอนนี้จึงใช้เวลาในการ treat ด้วยตัวกระตุ้น H_2O_2 ลดลง ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และสารสกัดข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มีฤทธิ์สามารถลดปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้

ในขณะที่สารสกัดจากข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำไม่มีฤทธิ์ในการลดปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้ สาเหตุที่สารสกัดจากข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำให้ผลที่แตกต่างออกไปอาจเป็นเพราะเป็นสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายที่เป็นน้ำ และมีวิธีการสกัดที่แตกต่างกับตัวทำละลายเอทานอลโดยตัวทำละลายที่เป็นน้ำจะใช้วิธีการสกัดแบบเพิ่มอุณหภูมิ (Heat up) แต่ในขณะที่ตัวทำละลายเอทานอลจะใช้วิธีการสกัดแบบหมัก (Maceration) จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ได้ปริมาณของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพออกมาแตกต่างจากตัวทำละลายเอทานอลได้ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และสารสกัดข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และเอทานอล ต่อการแสดงออกระดับ mRNA และโปรตีน ของยีน BDNF ด้วยวิธี real time-RCR และ western blotเนื่องจากมีการศึกษาพบว่า BDNF เป็นยีนที่ทำหน้าที่ในด้านการเพิ่มประสิทธิภาพเพื่อต้านความเสื่อมของเซลล์ประสาท [69] และพบว่ามีหลักฐานการศึกษาจากหลายงานวิจัยรายงานว่า BDNF มีกลไกการทำงานที่เกี่ยวข้องกับ H_2O_2 โดยพบว่าเมื่อเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 พบว่าเซลล์นั้นมีการแสดงออกของ BDNF ลดลง [78, 79] และนอกจากนี้มีการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่า BDNF มีความเกี่ยวข้องกับโรคความเสื่อมของระบบประสาท โดยพบว่าในโรคอัลไซเมอร์ และโรคซึมเศร้า จะพบว่าเซลล์สมองส่วนฮิปโปแคมปัสจะถูกทำลายไปส่งผลให้ระดับของ BDNF ลดลง และเมื่อให้ยาต้านซึมเศร้าไป พบว่าระดับของ BDNF เพิ่มสูงขึ้นและสามารถป้องกันเซลล์สมอง และเซลล์ส่วนอื่นๆได้ [15] ซึ่งจากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า H_2O_2 ส่งผลให้ระดับของ BDNF mRNA และ โปรตีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ดังนั้นจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า BDNF โปรตีน มีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคความเสื่อมของระบบประสาท โดยป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายจากการกระตุ้นด้วยอนุมูลอิสระจากภาวะ oxidative stress ได้ หลังจากนั้นผู้จัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และสารสกัดข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และเอทานอล ต่อการแสดงออกระดับ mRNA และโปรตีน โดยการ ทดสอบเซลล์ HT-22 ด้วยสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และสารสกัดข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และเอทานอลก่อนแล้วจึงกระตุ้นเซลล์ด้วย H_2O_2 พบว่า สารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และสารสกัดข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และเอทานอล มีฤทธิ์ในการเพิ่มการแสดงออกของ BDNF mRNA และ โปรตีน เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น H_2O_2 เพียงอย่างเดียว จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และสารสกัดข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และเอทานอล มีฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท โดยมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีปริมาณของสารทริปโตเฟน และเมลาโทนินเป็นส่วนประกอบ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สารมารถสรุปได้ชัดเจนว่าการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน BDNF ที่เกิดขึ้น เกิดจากฤทธิ์ของสารทริปโตเฟน และเมลาโทนินที่พบในสารสกัด เนื่องจากในสารสกัด

ข้าว และข้าวโพดนอกจากสาร ทริปโตเฟน และเมลาโทนินแล้วยังมีสารที่สำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต่อระบบประสาทอยู่มากมาย เช่นในข้าวพบว่ามีสารชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอีกมากมาย ได้แก่ carotenoids, Niacin, Pyridoxin, Biotin, Inositol,วิตามินอี, γ -oryzanol, Oryzafuran, Phytosterol และแร่ธาตุต่างๆรวมถึงใยอาหาร เป็นต้น[45] และในข้าวโพดมีรายงานพบว่าข้าวโพดหวาน ที่ต้มจะมี สารประกอบที่เรียกว่า กรดเฟอรูลิก(Ferulic acid) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ สำหรับฝักอ่อนของข้าวโพดก็ พบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ เบตาแคโรทีน สามารถป้องกันเซลล์ถูกทำลายจากสารอนุมูลอิสระได้[48, 49]

5.2 สรุป และข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบทั้งหมดที่กล่าวมานั้นสรุปได้ว่าข้าว และข้าวโพดทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และเอทานอล มีฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ HT-22 จากการถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพผ่านกลไกต่างๆโดยการลดการเกิดภาวะ oxidative stress ภายในเซลล์ และยังสามารถเพิ่มการแสดงออกของ BDNF mRNA และโปรตีนได้ โดยมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีปริมาณสารทริปโตเฟน และเมลาโทนินเป็นส่วนประกอบ และส่งผลให้อัตราการตายของเซลล์ลดลงด้วย แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ก็ไม่สามารถระบุชัดเจนได้ว่า ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของข้าว และข้าวโพดนี้มาจากสารสารทริปโตเฟน และเมลาโทนินที่พบในข้าว และข้าวโพด เนื่องจากในการทดลองไม่ได้นำสารทริปโตเฟน และเมลาโทนินมาทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับเซลล์โดยตรง และเนื่องจากในข้าว และข้าวโพดยังมีสารอื่นๆอีกมากมายที่อาจมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ แต่อย่างน้อยการศึกษาครั้งนี้ก็ทำให้ทราบว่าในข้าว และข้าวโพดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และส่งผลต่อการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่สำคัญต่อโรคความเสื่อมของระบบประสาทมีสาร ทริปโตเฟน และเมลาโทนินเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย ซึ่งจะเป็นแนวทางในการศึกษาถึงคุณสมบัติของสารทริปโตเฟน และเมลาโทนินนี้ต่อไป และจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงคุณสมบัติ และประโยชน์ของข้าว และข้าวโพดที่เราบริโภคเป็นประจำทุกวันว่ามีคุณค่ามากน้อยเพียงใด และสามารถนำไปเป็นแนวทางในการศึกษาเพื่อผลิตยา หรือแนวทางในการป้องกันโรคความเสื่อมของระบบประสาทที่ให้ผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยน้อยที่สุด และมีประสิทธิภาพในการรักษาอย่างสูงสุดในอนาคตต่อไปได้

รายการอ้างอิง

1. the Task Force on Major and Chronic Diseases of DG SANCO's Health Information Strand, *Major and Chronic Diseases REPORT 2007*. 2007: Luxembourg.
2. Rebecca C. Brown, Alan H. Lockwood, and Babasaheb R. Sonawane, *Neurodegenerative Diseases: An Overview of Environmental Risk Factors.* Environmental Health Perspectives, 2005. **113**(9): p. 1250-1256.
3. ศ.นพ.นิพนธ์ พวงวรินทร์. ชุดความรู้สำหรับประชาชน. . 2010 [cited 2014 April 1]; Available from: http://www.otat.org/index.php?lay=show&ac=article&Id=538668927&Ntype=3.
4. Mayeux, R., *EPIDEMIOLOGY OF NEURODEGENERATION.* Annu. Rev. Neurosci., 2003. **26**: p. 81–104.
5. Corporation, N.P., *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION*. 2013: East Hanover, New Jersey.
6. Takayoshi Mamiya, et al., *Effects of pre-germinated brown rice on depression-like behavior in mice.* Pharmacology, Biochemistry and Behavior., 2007. **86**: p. 62–67.
7. Konstantin V Danilenko and Arcady A Putilov, *Melatonin Treatment of Winter Depression Following Total Sleep Deprivation: Waking EEG and Mood Correlates.* Neuropsychopharmacology, 2005. **30**: p. 1345–1352.
8. Kwong-Man Ng, Chi-Fai Lau, and M.-L. Fung., *Melatonin reduces hippocampal β-amyloid generation in rats exposed to chronic intermittent hypoxia.* Brain research, 2010. **1354**: p. 163 – 171.
9. JOSHUA W. MILLER, JACOB SELHUB, and J.A. JOSEPH., *OXIDATIVE DAMAGE CAUSED BY FREE RADICALS PRODUCED DURING CATECHOLAMINE AUTOXIDATION: PROTECTIVE EFFECTS OF O-METHYLATION AND MELATONIN.* Free Radical Biology & Medicine., 1996. **21**(2): p. 241-249.

10. Losebabyweight. *The Health Benefits Of Sweetcorn.* . [cited 2014 April 1]; Available from: http://www.losebabyweight.com.au/the-health-benefits-of-sweetcorn/.
11. Yong Hwan No, Dai Han Wi, and Jae Hwang Park, *Effect of Melatonin on Expression of c-Jun Proteins and BDNF mRNA in Transient Global Ischemia-Reperfusion Injury of Rat Brain.* Journal of The Korean Society of Emergency Medicine, 2002. **13**(3): p. 329-340.
12. Marta Imbesi, Tolga Uz, and Hari Manev, *Role of melatonin receptors in the effects of melatonin on BDNF and neuroprotection in mouse cerebellar neurons.* J Neural Transm., 2008. **115**: p. 1495–1499.
13. Marta Imbesi, et al., *Stimulatory effects of a melatonin receptor agonist, ramelteon, on BDNF in mouse cerebellar granule cells.* Neuroscience Letters, 2008. **439**: p. 34–36.
14. Lei Zhang, et al., *Melatonin ameliorates cognitive impairment induced by sleep deprivation in rats: Role of oxidative stress, BDNF and CaMKII.* Behavioural Brain Research., 2013. **256**: p. 72– 81.
15. Mattson, M.P., *Glutamate and Neurotrophic Factors in Neuronal Plasticity and Disease.* Ann N Y Acad Sci., 2008. **1144**: p. 97–112.
16. Halliwell, B., *Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life.* Plant Physiology, 2006. **141**: p. 312–322.
17. Barry HALLIWELL and John M. C. GUTTERIDGE, *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.* Biochem. J., 1984. **219**: p. 1-14.
18. Barry Halliwell and Carroll E. Cross, *Oxygen-derived Species: Their Relation to Human Disease and Environmental Stress.* Environmental Health Perspectives, 1994. **102**: p. 5-12.
19. Toren Finkel and Nikki J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.* NATURE, 2000. **408**: p. 239-247.
20. Davies, K.J.A., *Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems.* IUBMB Life, 2000. **50**: p. 279–289.
21. NINA FEDOROFF, *Redox Regulatory Mechanisms in Cellular Stress Responses.* Annals of Botany, 2006. **98**: p. 289–300.

22. Barry Halliwell and M. Grootveld., *The measurement of free radical reactions in humans Some thoughts for future experimentation.* Federation of European Biochemical Societies, 1986. **213**(1): p. 9-14.
23. JED W. FAHEY, YUESHENG ZHANG, and PAUL TALALAY, *Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997. **94**: p. 10367–10372.
24. Julius Axelrod and Richard J. Wurtman, *Photic and Neural Control of Indoleamine Metabolism in the Rat Pineal Gland.* Advances in Pharmacology., 1968. **6**: p. 157–166.
25. Lerner AB, et al., *Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes.* J Am Chem Soc., 1958. **80**.
26. Daniel P. Cardinali and P. Pevet., *Basic aspects of melatonin action.* Sleep Medicine Reviews., 1998. **2**(3): p. 175-190.
27. Lane EA and M. HB., *Pharmacokinetics of melatonin in man: first pass hepatic metabolism.* J Clin Endocrinol Metab., 1985. **61**(6): p. 1214-6.
28. S. R. Pandi-Perumal, et al., *Melatonin Nature's most versatile biological signal?* FEBS Journal., 2006. **273**: p. 2813–2838.
29. Ru¨ diger Hardeland and B. Poeggeler., *Non-vertebrate melatonin.* Journal of Pineal Research, 2003. **34**: p. 233–241.
30. EMERY N. BROWN, et al., *mathematical model of diurnal variations in human plasma melatonin levels.* Am J Physiol Endocrinol Metab., 1997. **272**: p. E506-E516.
31. อมรรัตน์ นรานันทรัตน์. *Melatonin* ทางเลือกในการรักษาอาการนอนไม่หลับ. . [cited 2013 Oct 3]; Available from: http://www.gpo.or.th/rdi/html/melatonin.html. .
32. Karasek M, *Melatonin in humans-where we are 40 years after its discovery.* Neuro Endocrinol Lett., 1999. **20**(3-4): p. 179-188.
33. Russel J. Reiter, *Melatonin: clinical relevance.* Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism., 2003. **17**(2): p. 273–285.
34. Tomasz Sliwinski, et al., *Protective action of melatonin against oxidative DNA damage—Chemical inactivation versus base-excision repair.* Mutation Research., 2007. **634**: p. 220–227.

35. Zhi-Gen Jiang, Cole Stanley Nelson, and Charles Norman Allen, *Melatonin activates an outward current and inhibits I h in rat suprachiasmatic nucleus neurons.* Brain Research, 1995. **687**: p. 125-132.

36. Hattori A, et al., *Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates.* Biochem Mol Biol Int., 1995. **35**(3): p. 627-34.

37. J. HERNA´NDEZ-RUIZ and M. B. ARNAO, *Distribution of Melatonin in Different Zones of Lupin and Barley Plants at Different Ages in the Presence and Absence of Light.* J. Agric. Food Chem, 2008. **56**: p. 10567–10573.

38. Wang Jinying, et al., *Study on Analysis Method of Melatonin and Melatonin Content in Corn & Rice Seeds.* Chinese Agricultural Science Bulletin., 2009. **25**: p. 20-4.

39. Lucien C. Manchester, et al., *High levels of melatonin in the seeds of edible plants Possible function in germ tissue protection.* Life Sciences., 2000. **67**: p. 3023–3029.

40. Norsharina Ismail, et al., *Neuroprotective Effects of Germinated Brown Rice against Hydrogen Peroxide Induced Cell Death in Human SH-SY5Y Cells.* Int. J. Mol. Sci., 2012. **13**: p. 9692-9708.

41. Susan J. Murch and Praveen K. Saxena, *A melatonin-rich germplasm line of St John's wort (Hypericum perforatum L.).* J Pineal Res., 2006. **41**: p. 284–7.

42. Guofang Chen, et al., *Melatonin in Chinese medicinal herbs.* Life Sciences., 2003. **73**: p. 19–26.

43. Bidlack WR., et al., *Phytochemicals as Bioactive Agents*. 2000: CRC Press.

44. Hsing-Hsien Cheng and Ming-Hoang Lai, *Fermentation of Resistant Rice Starch Produces Propionate Reducing Serum and Hepatic Cholesterol in Rats.* American Society of Nutrition 2000. **130**: p. 1991-5.

45. Monica Panigati, et al., *Determination of selenium in Italian rices by differential pulse cathodic stripping voltammetry.* Food Chemistry., 2007. **105**: p. 1091–1098.

46. สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน). ข้าวโพดหวาน. . 2013 [cited 2014 April 1]; Available from: http://www.hrdi.or.th/knowledge/detail/1775/.

47. M. Srinivasan, et al., *Influence of ferulic acid on -radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes.* Toxicology., 2006. **228**: p. 249–258.

48. หน่วยสารสนเทศมะเร็ง โรงพยาบาลสงขลานครินทร์. คุณประโยชน์ 'ข้าวโพด'. 2010 [cited 2014 April 3]; Available from: http://medinfo2.psu.ac.th/cancer/db/news_showpic.php?newsID=627&tyep_ID=2.

49. Paolo Torre, et al., *Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis.* Biochemical Engineering Journal., 2008. **40**: p. 500–506.

50. ปรายแก้ว เข็มเพ็ชร. สารอาหารดีดี..ที่มีในข้าวโพด. . [cited 2014 April 1]; Available from: http://www.traphukao.com/articles/56-nutrients-of-corn.

51. S.R. Pandi-Perumal, et al., *Melatonin and sleep in aging populatio.* Experimental Gerontology., 2005. **40**: p. 911–925.

52. V Srinivasan, et al., *Melatonin, immune function and aging.* Immunity & Ageing., 2005. **2**(17).

53. Karasek M, et al., *Future of melatonin as a therapeutic agent. .* Neuro Endocrinol Lett. , 2002: p. 118-21.

54. Srinivasan V, et al., *Role of melatonin in neurodegenerative diseases.* Neurotox Res., 2005. **7**(4): p. 293-318.

55. Cardinali DP, et al., *Melatonin in sleep disorders and jet-lag. .* Neuro Endocrinol Lett. , 2002. **23**(1): p. 9-13

56. Zisapel N, *The use of melatonin for the treatment of insomnia.* Biol Signals Recept. , 1999. **8**(1-2): p. 84-9.

57. Monti JM and Cardinali DP, *A critical assessment of the melatonin effect on sleep in humans. .* Biol Signals Recept., 2000. **9**(6): p. 328-39.

58. Sossin WS and Barker PA, *Something old, something new: BDNF-induced neuron survival requires TRPC channel function.* Nat Neurosci. , 2007. **10**(5): p. 537-8.

59. James M. Brimson and Tewin Tencomnao, *Rhinacanthus nasutus Protects Cultured Neuronal Cells against Hypoxia Induced Cell Death.* Molecules., 2011. **16**: p. 6322-6338.

60. James M. Brimson, et al., *Rhinacanthus nasutus Extracts Prevent Glutamate and Amyloid-β Neurotoxicity in HT-22 Mouse Hippocampal Cells: Possible Active Compounds Include Lupeol, Stigmasterol and β-Sitosterol.* Int. J. Mol. Sci., 2012. **13**: p. 5074-5097.

61. Laurence Lanfumey, Raymond Mongeau, and Michel Hamon, *Biological rhythms and melatonin in mood disorders and their treatments.* Pharmacology & Therapeutics., 2013. **138**: p. 176–184.

62. R.-E. Duval, et al., *Interest of designed cyclodextrin-tools in gene delivery.* Annales Pharmaceutiques Françaises, 2012. **70**: p. 360—369.

63. Thongrakard V, et al., *Protection from UVB Toxicity in Human Keratinocytes by Thailand Native Herbs Extracts. .* Photochem Photobiol., 2013.

64. Indrani Mitra, Achintya Saha, and Kunal Roy, *Chemometric modeling of free radical scavenging activity of flavone derivatives.* European Journal of Medicinal Chemistry, 2010. **45**: p. 5071-5079.

65. Aline Augusti Boligon, Michel Mansur Machado, and Margareth Linde Athayde, *Technical Evaluation of Antioxidant Activity.* Medicinal chemistry, 2014. **4**(7).

66. Fengchang WU and Eiichiro TANOUE, *Sensitive determination of dissolved tryptophan in freshwater by alkaline hydrolysis and HPLC.* ANALYTICAL SCIENCES., 2001. **17**(9): p. 1063-1066.

67. abcam, *ab113851 DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit*. Cambridge,USA. p. 1-18.

68. *Bradford assay. .* [cited 2014 April 1]; Available from: http://www.qcbio.com/pierce/23236.htm.

69. M Mizuno, et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase: a molecule mediating BDNF-dependent spatial memory formation.* Molecular Psychiatry, 2003. **8**: p. 217–224.

70. Uday Bandyopadhyay, Dipak Das, and Ranajit K. Banerjee, *Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis.* CURRENT SCIENCE, 1999. **77**(5).

71. CHRISTIAN BEHL, *ALZHEIMER'S DISEASE AND OXIDATIVE STRESS: IMPLICATIONS FOR NOVEL THERAPEUTIC APPROACHES.* Progress in Neurobiology., 1999. **57**: p. 301-323.

72. Wei Rao, et al., *Blockade of SOCE protects HT22 cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013. **441**: p. 351–356.

73. Zhong-Yan Zhao, et al., *Edaravone Protects HT22 Neurons from H2O2-Induced Apoptosis by Inhibiting the MAPK Signaling Pathway.* CNS Neuroscience & Therapeutics, 2013. **19**: p. 163–169.

74. Julie K Andersen, *Oxidative stress in neurodegeneration : cause or consequence?* Neuroscience, 2004: p. S18-S25.

75. IRWIN FRIDOVICH, *Fundamental Aspects of Reactive Oxygen Species, or What's the Matter with Oxygen?* ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES: p. 13-18.

76. Rungtip Soi-ampornkul, et al., *Antioxidative and Neuroprotective Activities of the Pre-Germinated Brown Rice Extract.* Food and Nutrition Sciences, 2012. **3**: p. 135-140.

77. Sarinthorn Thummayot, et al., *Neuroprotective effect of purple rice extract and its constituent against amyloid beta-induced neuronal cell death in SK-N-SH cells.* NeuroToxicology., 2014.

78. Yang Zhong Huang and James O. McNamara, *Neuroprotective Effects of Reactive Oxygen Species Mediated by BDNF-Independent Activation of TrkB.* The Journal of Neuroscience, 2012. **32**(44): p. 15521–15532.

79. Hadi Ghaffari, et al., *Antioxidant and Neuroprotective Activities of Hyptis suaveolens (L.) Poit. Against Oxidative Stress-Induced Neurotoxicity.* Cell Mol Neurobiol, 2014. **34**: p. 323–331.

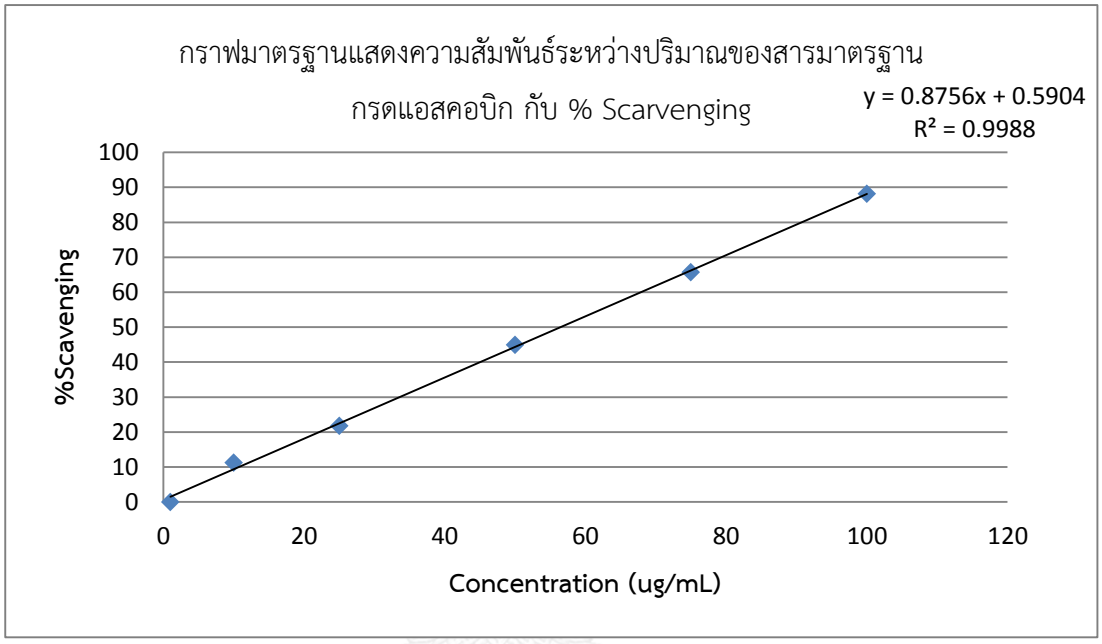
ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

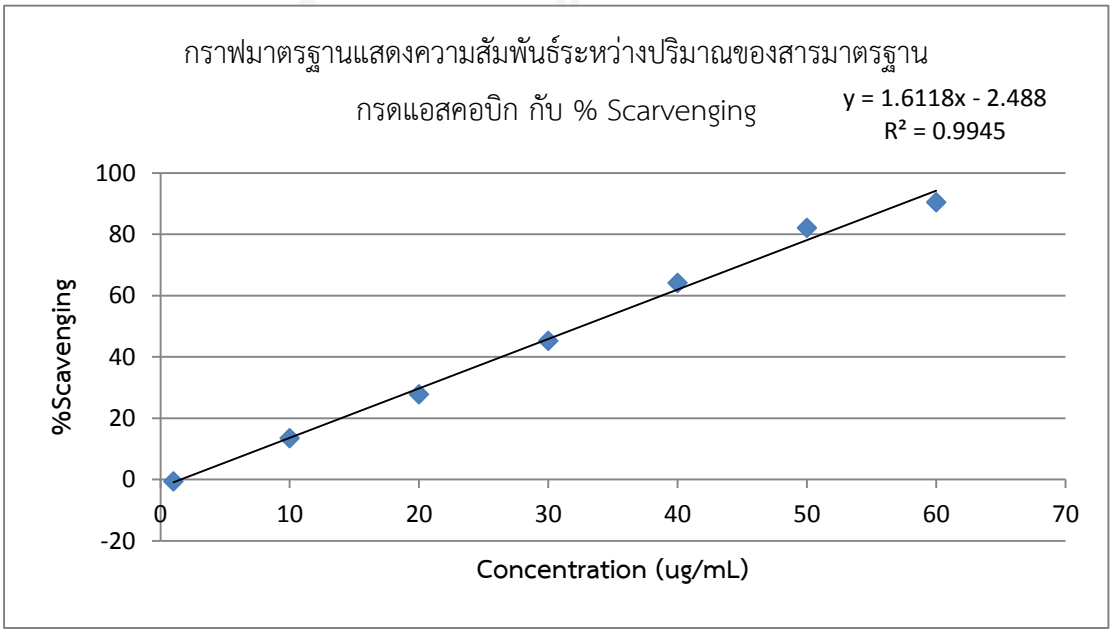
ภาคผนวก ก

ข้อมูลจากการทดลอง

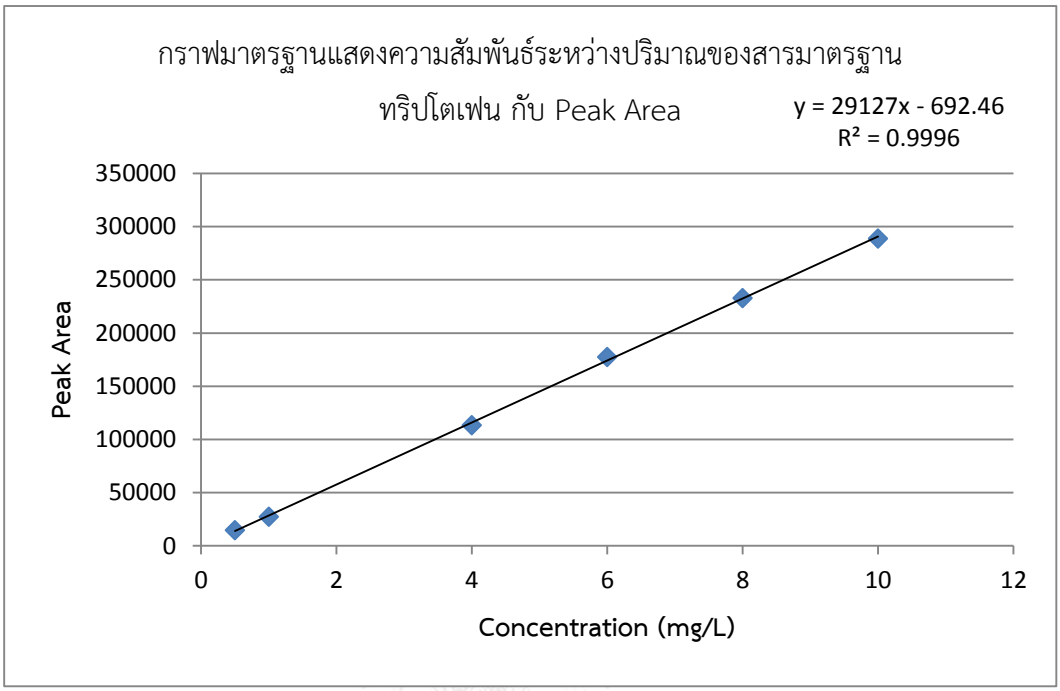
1. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดข้าว และข้าวโพดที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ด้วยวิธี DPPH assay



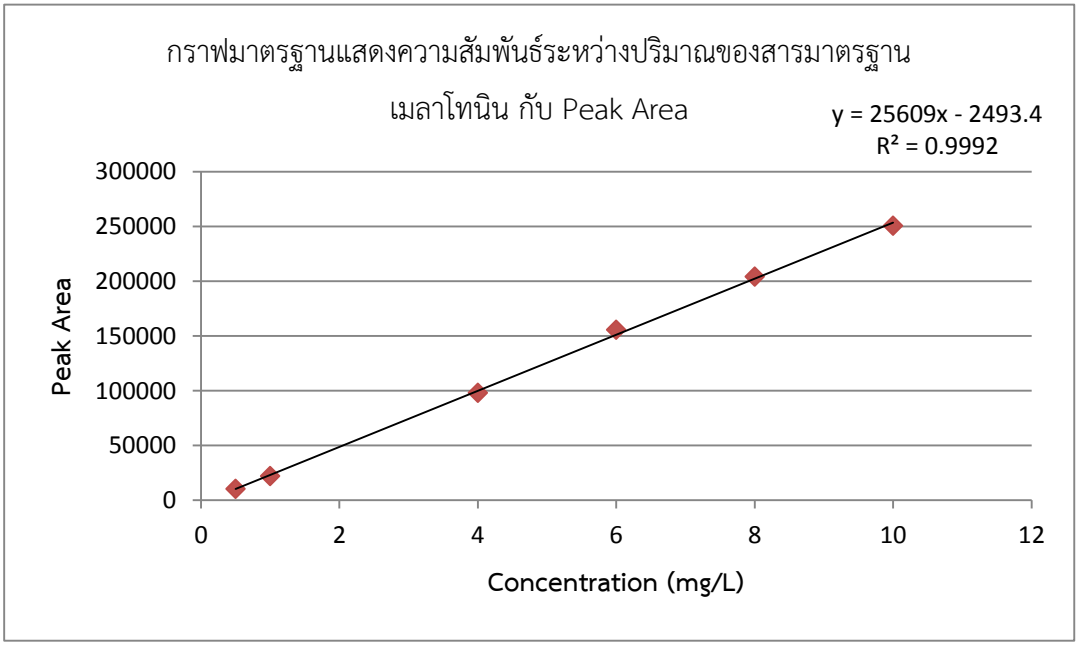
2. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดข้าว และข้าวโพดที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ด้วยวิธี ABTS assay



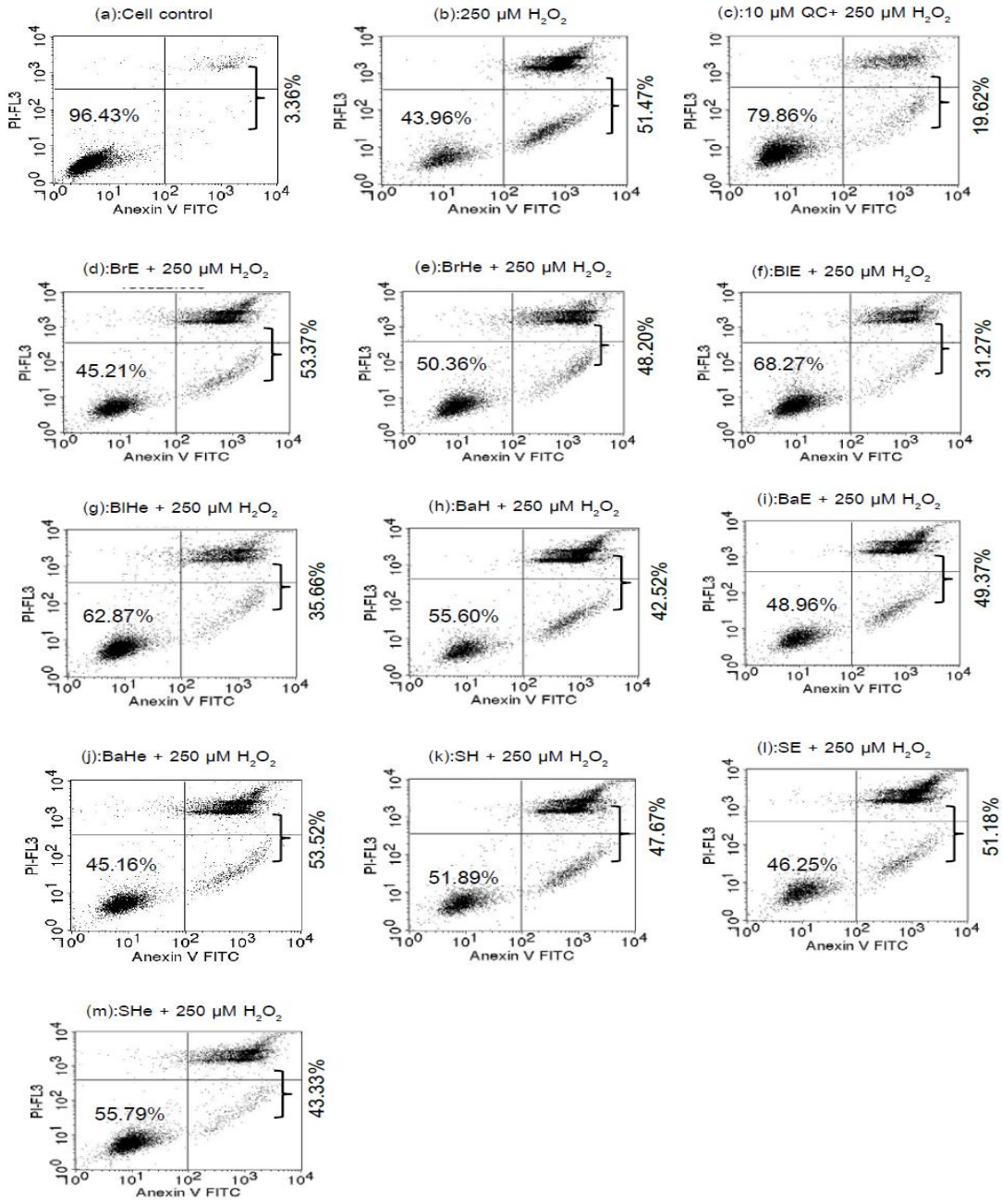
3. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารทริปโตเฟนในสารสกัดข้าว และข้าวโพดที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ด้วยวิธี HPLC



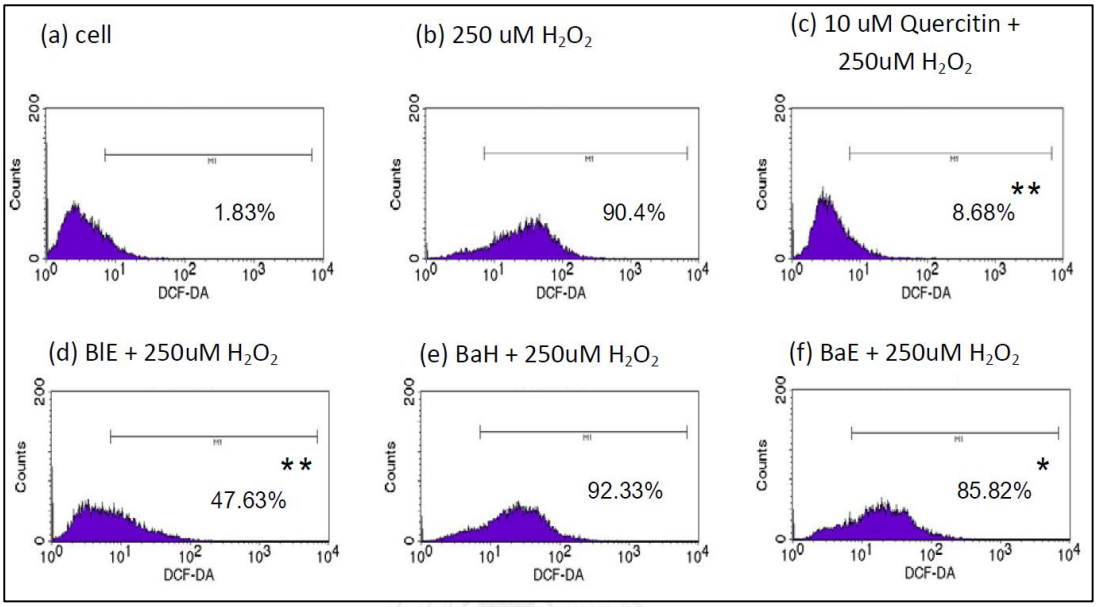
4. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารเมลาโทนินในสารสกัดข้าว และข้าวโพดที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ด้วยวิธี HPLC



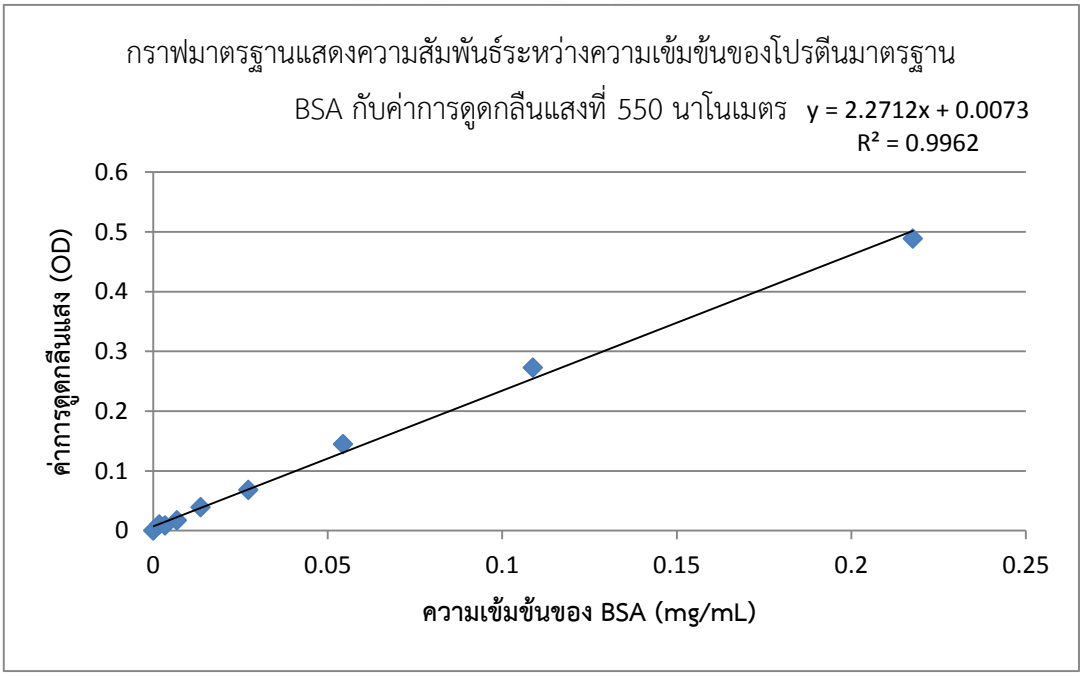
5. ภาพแสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดต่อการตายของเซลล์แบบ early และ late apoptosis/necrosis ด้วยเทคนิค Annexin V-FITC and Propidium Iodide staining assay / Flow cytometry analysis



6. ภาพแสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าว และข้าวโพด ในการป้องกันเซลล์ HT-22 จากภาวะ oxidative stress ด้วยวิธี DCFH-DA assay



7. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณโปรตีนรวมใน HT-22 cells ด้วยวิธี Bradford assay



ภาคผนวก ข
น้ำยา และสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1. น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดในการต้าน H_2O_2

1.1 10% FBS DMEM + Penicillin streptomycin

DMEM ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมกับ Fetal bovine serum (inactivated serum) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับ Penicillin streptomycin (Penicillin 100 U และ Streptomycin 100 µg/mL) 1000 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.2 1X phosephate buffer saline pH 7.4

เจือจาง stock 10X PBS โดยการเติมน้ำ Milli Q ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ผสมกับ stock 10X PBS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป autoclave แล้วเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.3 MTT reagent

เตรียมความเข้มข้นของ MTT reagent ที่ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่ง MTT dye หนัก 50 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าจนละลายหมด จากนั้นนำมากรองผ่าน filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

1.4 H_2O_2 250 ไมโครโมลลาร์

เตรียมเป็น 100 มิลลิโมลลาร์ H_2O_2 ก่อนโดยผสม 30% H_2O_2 ปริมาตร 56 ไมโครลิตร กับ PBS 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเตรียม 250 ไมโครโมลลาร์ H_2O_2 โดยนำ 100 มิลลิโมลลาร์ H_2O_2 ที่เตรียมไว้มาปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ PBS 5 มิลลิลิตร

1.5 เคอวซิติน 10 ไมโครโมลลาร์

เคอวซิตินมี molecular weight 302.24 กรัมต่อโมล

เตรียมเคอวซิติน 10 ไมโครโมลลาร์ โดยชั่งเคอวซิตินมา 0.030224 กรัม ละลายใน DMSO 10 มิลลิลิตร

Chulalongkorn University

2. น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและข้าวโพด

2.1 DPPH assay (DPPH standard stock solution)

2.1.1 น้ำยา DPPH 0.2 มิลลิโมลลาร์

DPPH มี molecular weight 394.32 กรัมต่อโมล

เตรียมโดยการชั่ง DPPH 0.079 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 0.80 – 0.90 ที่ 517 นาโนเมตร โดยน้ำยาห่อฟรอยด์และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.1.2 L-ascorbic acid 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

L-ascorbic acid มี molecular weight 176.1 กรัมต่อโมล

เตรียมโดยการชั่ง L-ascorbic acid มา 1 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 1 มิลลิลิตร

เก็บไว้ได้ที่ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส เก็บได้นานขึ้น

2.2 ABTS assay (ABTS 7 มิลลิโมลลาร์)

2.2.1 ABTS stock solution 7 มิลลิโมลลาร์

ABTS มี molecular weight 548.68 กรัมต่อโมล

เตรียมโดยชั่ง ABTS 153.63 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร

น้ำยาห่อฟรอยด์และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.2.2 Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) 2.45 มิลลิโมลลาร์

$K_2S_2O_8$ มี molecular weight 270.32 กรัมต่อโมล

เตรียมโดยชั่ง $K_2S_2O_8$ 33.1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

น้ำยาเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.2.3 การเตรียม ABTS working solution (เตรียม fresh ก่อนจะทำการทดลองทิ้งไว้ 1 คืน)

เตรียมโดยการผสม ABTS stock solution 7 มิลลิโมลลาร์ กับ Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) 2.45 มิลลิโมลลาร์ ในอัตราส่วน 8 : 12 แล้วทิ้งไว้ 16 – 18 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อต้องการทำการทดลอง นำ working solution มาเจือจางด้วยเอทานอลในอัตราส่วน
1 : 20 ที่ค่าการดูดกลืนแสง 0.7 ± 0.02 ที่ 734 นาโนเมตร
น้ำยาห่อฟรอยด์และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3. น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวและข้าวโพดในการลด ROS ในเซลล์

3.1 DCFH-DA 10 ไมโครโมลลาร์

เตรียมน้ำยา DCFH-DA 10 ไมโครโมลลาร์ โดยการผสม DCFH-DA stock 10 มิลลิโมลลาร์ปริมาตร 44 ไมโครลิตร กับ PBS ปริมาตร 11 มิลลิลิตร

4. น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีน

4.1 NP-40 Lysis buffer stock solution

เตรียมโดยผสมชั่ง 150 มิลลิโมลลาร์ NaCl 1.7532 กรัม และชั่ง 50 มิลลิโมลลาร์ Tris มา 1.2114 กรัม มาละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 1% NP-40 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
น้ำยาเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

4.2 NP-40 Lysis buffer working solution

เตรียมโดยชั่ง DTT มา 1.3 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 87.42 ไมโครลิตร และชั่ง PMSF มา 2.3 มิลลิกรัมละลายใน 2-propanol 300 ไมโครลิตร จากนั้นผสม NP-40 Lysis buffer stock solution 3 มิลลิลิตร กับ DTT ที่เตรียมไว้ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ PMSF ที่เตรียมไว้ปริมาตร 30 ไมโครลิตร โดยน้ำยาแช่ไว้ในน้ำแข็งตลอดเวลา

5. น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการวัดปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford assay

5.1 Bradford solution

เจือจาง stock Bradford solution 1 ส่วน ด้วยน้ำกลั่น 4 ส่วน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บน้ำยาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

5.2 เตรียมโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA)

เตรียม stock โปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่ง BSA หนัก 1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกันจากนั้นเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

6. น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทำ western blot

6.1 10% Ammonium persulfate

ชั่ง Ammonium persulfate 0.1 กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ไม่ควรเตรียมทิ้งไว้

6.2 1X Running buffer (pH 8.75) ปริมาตร 1 ลิตร

เตรียมโดยชั่ง 25 มิลลิโมลลาร์ Tris 3.03 กรัม และชั่ง 192 มิลลิโมลลาร์ Glycine 14.42 กรัม และชั่ง 0.1% SDS 1 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำ MilliQ water 1 ลิตร

6.3 Transfer buffer (pH 8.75) ปริมาตร 1 ลิตร

เตรียมโดยชั่ง 25 มิลลิโมลลาร์ Tris 3.03 กรัม และชั่ง 192 มิลลิโมลลาร์ Glycine 14.42 กรัม นำมาละลายด้วย 100% methanol 200 มิลลิลิตร และน้ำ MilliQ water 800 มิลลิลิตร

6.4 Blocking buffer

เตรียมโดยชั่ง non-fat dry milk มา 1 กรัม ผสมกับ TBS-T 20 มิลลิลิตร

6.5 TBS-T solution

เตรียมโดยชั่ง 20 มิลลิโมลลาร์ Tris-HCl (pH 7.5) 2.42 กรัม และชั่ง 150 มิลลิโมลลาร์ NaCl 8.76 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำ MilliQ water 1 ลิตร แล้วเติม 1%Tween-20 1 มิลลิลิตร

6.6 Developer and Fixer working solution

เตรียมน้ำยา developer และ fixer โดยผสม น้ำยา developer หรือ fixer 15 มิลลิลิตร กับ น้ำกลั่น 65 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ค
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

สัญลักษณ์ คำย่อและคำอธิบาย

คำย่อ	คำอธิบาย
HT-22	Hippocampal neuronal cell line
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
FBS	Fetal bovine serum
PBS	Phosephate buffer saline
PS	Penicillin streptomycin
H_2O_2	Hydrogenperoxide
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
QC	Quercetin
DPPH	1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical
ABTS	2, 2'-azino-bis (3 ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
DCFH-DA	Dichlorofluorescin-diacetate
HPLC	High-performance liquid chromatography
PCR	Polymerase chain reaction
RT	Reverse transcriptase
RNA	Ribonucleic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
BrH	ข้าวเหนียวกล้องที่สกัดด้วยน้ำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

BrE	ข้าวเหนียวกล้องที่สกัดด้วยเอทานอล
BrHe	ข้าวเหนียวกล้องที่สกัดด้วยเฮกเซน
BlH	ข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยน้ำ
BlE	ข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยเอทานอล
BlHe	ข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยเฮกเซน
SH	ข้าวโพดหวานที่สกัดด้วยน้ำ
SE	ข้าวโพดหวานที่สกัดด้วยเอทานอล
SHe	ข้าวโพดหวานที่สกัดด้วยเฮกเซน
BaH	ข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยน้ำ
BaE	ข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยเอทานอล
BaHe	ข้าวโพดอ่อนที่สกัดด้วยเฮกเซน
µg	ไมโครกรัม
µM	ไมโครโมลลาร์
mL	มิลลิลิตร
%	เปอร์เซ็นต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศุทธิรัตน์ ชุ่มปิยะ เกิดเมื่อวันที่ 7 เมษายน พ.ศ. 2533 ณ โรงพยาบาลเชียงราย ประชานุเคราะห์ จังหวัดเชียงราย สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 โดยได้รับทุนการอุดหนุนทางการศึกษา จาก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 25 ครั้งที่ 3/2557 และทุนส่งเสริมการวิจัยในภูมิภาคเอเชียของมูลนิธิเกาหลีเพื่อการศึกษาขั้นสูง จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University