หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดรำข้าวก่ำต่อการเกิดไมโครนิวเคลียสในตับหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ระดับโมเลกุล
ผู้เขียน	นางสาว ณัฐวรรณ สุวรรณกุล
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร. รวิวรรณ วงศ์ภูมิชัย

บทคัดย่อ

รำข้าวเป็นส่วนหุ้มด้านนอกสุดของเมล็ดข้าวประกอบด้วยสารอาหารและสารพฤกษเคมีปริมาณสูง ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าข้าวก่ำสายพันธุ์พะเยามีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์จากการทดสอบเอมส์ และฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ต้านการเกิดมะเร็งในเซลล์ Hepa1c1c7 สูงกว่าข้าวก่ำสายพันธุ์ดอยสะเก็ดและน่าน ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์และต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดรำข้าวก่ำสายพันธุ์พะเยาโดยทดสอบการเกิดไมโครนิวเคลียสในตับหนู

ในการศึกษานี้ทำการสกัดรำข้าวก่ำด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอลตามลำดับ และตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์ แอนโธซัยยานิน แกมมาออไรซานอล และโทคอล พบว่าสารสกัดรำข้าวก่ำส่วนเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคสูง ซึ่งประกอบด้วย ฟลาโวนอยด์ และแอนโธซัยยานิน ในขณะที่สารสกัดรำข้าวก่ำส่วนไดคลอโรมีเทนพบแกมมาออไรซานอล และโทคอลในปริมาณสูง

ในการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดรำข้าวก่ำ ใช้หนูวิสตาร์เพศผู้ แบ่งเป็น 5 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมลบ กลุ่มที่ 2 และ 3 ป้อนสารสกัดรำข้าวก่ำส่วนไดคลอโรมีเทนความเข้มข้น 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ 4 และ 5 ป้อนสารสกัดรำข้าวก่ำส่วนเมทานอลความเข้มข้น 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวตามลำดับ หลังจากการป้อนสารทดสอบเป็นเวลา 28 วัน ทำการตัดตับออก 2 ใน 3 ส่วนเพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์ตับมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน หลังจากนั้น 4 วัน ทำการแยกเซลล์ตับ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดรำข้าวก่ำส่วนไดคลอโร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มีเทนและเมทานอลไม่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำการเกิดไมโครนิวเคลียสในตับหนู แสดงให้เห็นว่าสารสกัดรำข้าวก่ำไม่มีคุณสมบัติก่อกลายพันธุ์ในหนูวิสตาร์เพศผู้ นอกจากนี้พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดรำข้าวก่ำส่วนไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้นต่ำ สามารถเหนี่ยวนำกัมมันตภาพของเอนไซม์กำจัดสารแปลกปลอมในตับบางชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ cytochrome P450 1A1, 1A2, cytochrome P450 reductase และ UDP-glucuronyltransferase อีกทั้งยังมีผลเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกในระดับโปรตีนของเอนไซม์ cytochrome P450 1A1/2

ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็งชนิดหนึ่งคือการได้รับสารก่อมะเร็งที่การปนเปื้อนในอาหาร โดยสารอะฟลาทอกซิน บี 1 (AFB_1) ที่ปนเปื้อนในอาหาร จัดเป็นสารก่อมะเร็งตับในสัตว์และคน งานวิจัยนี้ได้หาสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสในตับหนูด้วยสาร AFB_1 โดยทำการฉีดสาร AFB_1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทางช่องท้อง 1 หรือ 2 ครั้ง พบว่าการฉีดสาร AFB_1 ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว จำนวน 2 ครั้ง สามารถเหนี่ยวนำจำนวนไมโครนิวเคลียสในตับหนู เหนี่ยวนำกัมมันตภาพของเอนไซม์ CYP 1A2 และลดกัมมันตภาพของเอนไซม์ glutathione *S*-transferase ในตับหนูได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองนี้จึงเลือกการฉีดสาร AFB_1 ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว จำนวน 2 ครั้ง เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดรำข้าวก่ำ

การศึกษาฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ต่อสาร AFB_1 ของสารสกัดรำข้าวก่ำ ใช้หนูวิสตาร์เพศผู้ แบ่งเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 และ 2 เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 3 และ 4 ป้อนสารสกัดรำข้าวก่ำส่วนไดคลอโรมีเทนความเข้มข้น 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวตามลำดับ กลุ่มที่ 5 และ 6 ป้อนสารสกัดรำข้าวก่ำส่วนเมทานอลความเข้มข้น 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวตามลำดับ เป็นเวลา 28 วัน หนูกลุ่มที่ 2 ถึง 6 ฉีดสาร AFB_1 ทางช่องท้อง จำนวน 2 ครั้ง เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียส ส่วนหนูกลุ่มที่ 1 ฉีดด้วยสารละลาย normal saline แทน และทำการแยกเซลล์ตับเป็นเซลล์เดี่ยว 4 วัน หลังจากทำการตัดตับออกบางส่วน ผลการทดลองพบว่าสารสกัดรำข้าวก่ำสามารถลดจำนวนการเกิดไมโครนิวเคลียสในตับหนูที่ได้รับสาร AFB_1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีผลลดกัมมันตภาพของเอนไซม์กำจัดสารแปลกปลอมในระยะที่ 1 และเหนี่ยวนำกัมมันตภาพของเอนไซม์กำจัดสารแปลกปลอมในระยะที่ 2 ในตับหนูได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการที่สารสกัดส่วนไดคลอโรมีเทนสามารถลดจำนวนไมโครนิวเคลียสในหนูที่ได้รับสาร AFB_1 นั้นพบว่าไม่สัมพันธ์กับกัมมันตภาพของเอนไซม์กำจัดสารแปลกปลอมในระยะที่ 2 แสดงว่าสารประกอบที่มีขั้วสูงที่พบในรำข้าวก่ำอาจมีผลลดการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วยสาร AFB_1 ได้โดยมีผลต่อระบบเอนไซม์กำจัดสารแปลกปลอมในระยะที่ 1 และ 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดรำข้าวก่ำสายพันธุ์พะเยาไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในหนูขาว และมีคุณสมบัติเป็นสารเคมีป้องกันการเกิดไมโครนิวเคลียสในตับหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร AFB_1 โดยมีกลไกการยับยั้งที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของสาร AFB_1 ดังนั้นรำข้าวก่ำจึงมีประโยชน์ในการป้องกันการเกิดมะเร็งตับในระยะเริ่มต้นจากการเหนี่ยวนำด้วยสาร AFB_1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Effect of Purple Rice Bran Extract on Micronucleus Formation in Rat Liver Induced by Aflatoxin B_1 at a Molecular Level
Author	Ms. Nattawan Suwannakul
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Advisor	Asst. Prof. Dr. Rawiwan Wongpoomchai

ABSTRACT

Rice bran, an external coat of rice, contains high values of nutrients and phytochemicals which contain several pharmacological properties. Previous studies found that the antimutagenicity in Ames test and anticarcinogenic enzyme-inducing properties in Hepa1c1c7 cells of the purple rice variety Phayao were stronger than those of other purple rice varieties including Doisaket and Nan. Therefore, the present study was aimed to evaluate clastogenic and anticlastogenic activities of Kum Phayao bran extracts using rat liver micronucleus test.

In this study, purple rice bran was sequentially extracted with dichloromethane and methanol. The contents of total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, gamma-oryzanol and tocols were determined. The high contents of phenolic compounds including flavonoids and anthocyanins were found in the methanol extract, while the high amounts of gamma-oryzanol and tocols were detected in the dichloromethane extract.

To assess clastogenic effect of purple rice bran extracts, male Wistar rats were divided into five groups. Group 1 was a negative control group. Groups 2 and 3 were fed the dichloromethane extract at the concentrations of 100 and 500 mg/kg bw, respectively. While Groups 4 and 5 were orally received the methanol extract at the concentrations of 100 and 500 mg/kg bw, respectively. After feeding for 28 days, all rats were 2/3 partially hepatectomized to induce cell proliferation and then performed liver perfusion at day 4th after partial hepatectomy. The results showed that the dichloromethane and methanol extracts did not induce micronucleus formation in rat liver. These results indicated that

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

purple rice bran extracts did not present clastogenicity in male Wistar rats. Furthermore, the effect of purple rice bran extracts on xenobiotic-metabolizing enzymes was evaluated. The results showed that treatment of the dichloromethane extract at low dose significantly increased the activities of hepatic cytochrome P450 1A1 and 1A2, cytochrome P450 reductase and UDP-glucuronyltransferase. In addition, it also significantly induced protein expression of cytochrome P450 1A1/2.

The carcinogen contamination in food is one risk factor of carcinogenesis. Aflatoxin B_1 (AFB_1), a contaminant of stored foods, is a potent hepatocarcinogen in animal and human. To verify an optimal condition of AFB_1-induced micronucleated hepatocyte formation, rats were submitted to single or double intraperitoneal injection of various doses of AFB_1. The double injection of AFB_1 at dose 200μg/kg bw could enhance the number of micronucleus and significantly induced CYP 1A2 activity and reduced glutathione *S*-transferase activity in rat liver. From these results, double injection of 200 μg/kg bw of AFB_1 was used as a protocol for determining anticlastogenicity of purple rice bran extracts.

To investigate the anticlastogenicity of purple rice bran extracts against AFB_1, male Wistar rats were divided into six groups. Groups 1 and 2 were vehicle control groups. Groups 3 and 4 were administered 100 and 500 mg/kg bw of dichloromethane extract, respectively. Groups 5 and 6 were fed with 100 and 500 mg/kg bw of methanol extract, respectively for 28 days. Groups 2 to 6 were given a double intraperitoneal injection of AFB_1 to induce micronucleus formation, while group 1 was administrated a normal saline solution instead. Liver perfusion was performed 4 days after partial hepatectomy to isolate single hepatocytes. The results were found that purple rice bran extracts significantly reduced the number of micronuclei in AFB_1-treated rats. The administration of purple rice bran extracts significantly decreased the activities of phase I and increased the activities of phase II detoxifying enzymes in the liver of AFB_1-induced rats. However, the reduction of micronucleated hepatocytes in AFB_1-initiated rats by dichloromethane extract did not correlate with the modulation of phase II xenobiotic metabolizing enzymes. These results indicated that hydrophilic components in purple rice bran might attenuate AFB_1-induced mutagenesis through modulation of phase I and II xenobiotic metabolizing system.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

In conclusion, purple rice bran variety Phayao did not show clastogenicity in rats. It exhibited chemopreventive effects on AFB_1–induced liver micronucleus in rats. The inhibitory mechanism might be partly due to attenuation of metabolism of AFB_1. These findings suggested that purple rice bran might be beneficial in the prevention of AFB_1-induced hepatocarcinogenesis.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved