ประสิทธิภาพข้าวก่ำไทยต่อการปรับเปลี่ยนระบบ เอนไซม์ต้านออกซิเดชัน ไซโตไคน์ และลำไส้ใหญ่ในสัตว์ทดลอง

Efficacy of Thai Black Rice to Antioxidant Enzyme, Cytokines and Colon System Modification in Animal Model

นพวัฒน์ เพ็งคำศรี[1*], ไชยวัฒน์ ไชยสุต[2], กนิษฐา แก้วดู[3]
[1]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
[2]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[3]คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
[*]E-mail: P_arkasus@hotmail.com

บทคัดย่อ

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) คือ ภาวะความไม่สมดุลของการเกิดอนุมูลอิสระ และกระบวนการป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระโดยสารต้านออกซิเดชัน ความเครียดออกซิเดชันจึงเกิดจากปฏิกิริยาทางชีวภาพและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ซึ่งปัจจุบันเราทราบกันดีว่าความผิดปกติบางอย่างของร่างกายและโรคหลายโรคล้วนมีสาเหตุเกี่ยวข้องกับความเครียดออกซิเดชัน การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นศึกษาองค์ประกอบสำคัญในสารสกัดข้าวก่ำ และผลของสารสกัดข้าวก่ำต่อการปรับเปลี่ยนระบบต้านออกซิเดชันและไซโตไคน์ในร่างกายสัตว์ทดลอง ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดข้าวก่ำมีสารฟีนอลิกและแอนโธไซยานินเป็นองค์ประกอบหลัก และเมื่อป้อนสารสกัดนี้ในขนาด 500 และ 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว แก่หนูทดลองทุกวันเป็นเวลานาน 14 วัน ปริมาณเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน (คาตาเลส ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส) และไซโตไคน์ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (อินเตอร์ลิวคิน-10 และ ทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์-เบต้า) ในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สารสกัดข้าวก่ำมิได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ ที่ผนังเซลล์และเนื้อเยื่อของลำไส้ใหญ่ จึงน่าจะมีการศึกษาวิจัยประสิทธิภาพและความปลอดภัยของข้าวก่ำเพิ่มเติมเพื่อสนับสนุนการใช้ข้าวก่ำเป็นอาหารเสริมสุขภาพ

คำสำคัญ: ข้าวก่ำ เอนไซม์ต้านออกซิเดชัน ไซโตไคน์ ลำไส้ใหญ่

Abstract

Oxidative stress is an imbalance between the production of reactive oxygen species (free radicals) and antioxidant defenses. Oxidative stress is therefore originated from biological sources and may also be triggered by some environmental factors. Importantly, many pathologic conditions and diseases have been associated with oxidative stress. This study intended to identify the phytochemical composition of black rice extract and demonstrate its effect on antioxidant enzyme activity as well as anti-inflammatory cytokines in animal model. The result of our study indicated that the black rice extract really contained anti-oxidative constituents, the phenolics and anthocyanins compounds. Moreover, when rats were administered black rice extract 500 or 1000 mg/Kg daily for 14 days, increases significantly in blood antioxidant enzymes (CAT, SOD and GPx) and anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF-β) were obtained. This treatment, however, did not induce any change in cell wall and tissue of colon. Our finding

suggests that black rice could be used for health promotion. But, further studies on the efficacy and safety of black rice are necessary.

Keywords: Black rice, Antioxidant enzyme, Cytokine, Colon

บทนำ

ปัจจุบันสังคมอยู่ภายใต้สภาวะความเครียดที่เพิ่มทวีขึ้นจากทุกๆ ด้าน ซึ่งภาวะความเครียดที่เกิดขึ้นมาจากทั้งทางร่ายกายและสิ่งแวดล้อม โดยภาวะที่เกิดขึ้นนี้เรียกอีกอย่างว่า “ภาวะเครียดออกซิเดชัน”[1] กระบวนการนี้จะสร้างอนุมูลอิสระซึ่งเป็นอนุมูลอะตอมหรืออนุมูลโมเลกุลของสารทางชีวภาพที่มีความสามารถในการทำลายสารชีวโมเลกุล ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และสารพันธุกรรมได้โดยตรง[2] อนุมูลอิสระสามารถแบ่งได้ 2 ชนิด คือ รีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (ROS) และ รีแอคทีฟไนโตรเจนสปีชีส์ (RNS)[3] อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นกำจัดได้ยากเนื่องจากมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลและมีอายุสั้น[4] ดังนั้นภาวะเครียดออกซิเดชันจึงส่งผลกระทบต่อทุกระบบของร่างกายทั้งทางตรงและทางอ้อม ซึ่งมีการรายงานโรคและความผิดปกติที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ระบบตา ระบบผิวหนัง ระบบสืบพันธุ์ ระบบเลือด ระบบข้อต่อ ระบบตับ ระบบตับอ่อน ระบบปอด ระบบสมอง ระบบหัวใจ และระบบไต[3,5,6]

ความเครียดออกซิเดชันเป็นกลไกที่เชื่อมโยงก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบอย่างซับซ้อนและมีแบบแผน[5] ซึ่งกระบวนการอักเสบเป็นระยะแรกสำหรับเหตุที่นำไปสู่ความเสื่อมและความผิดปกติของเซลล์และการแสดงออกของอวัยวะต่างๆ ตามมา อย่างไรก็ตามกระบวนการอักเสบไม่ใช่กระบวนการเดียวที่ควบคุมกลไกทางชีวภาพยังมีกระบวนการทางภูมิคุ้มกันที่เข้ามามีบทบาทในการควบคุมและแสดงผลทางชีวภาพด้วย กล่าวได้ว่ากระบวนการเกิดความความผิดปกติต่างๆ จะมีการทำงานร่วมกันระหว่างกระบวนการอักเสบและกระบวนการทางภูมิคุ้มกันอย่างเป็นระบบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการเกิดโรคมะเร็งมีกระบวนการและขั้นตอนที่ซับซ้อนซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการอักเสบของเซลล์และการควบคุมด้วยระบบภูมิคุ้มกัน[7,8] ซึ่งกุญแจสำคัญหนึ่งในกระบวนการทางชีวภาพในการทำงานของเซลล์ คือ ไซโตไคน์ สามารถแบ่งได้ 2 ชนิด คือ ไซโตไคน์ชนิดต้านการอักเสบและชนิดกระตุ้นการอักเสบ[7,9] ดังนั้น จึงกล่าวได้ว่าองค์ประกอบของสารใดที่สามารถยับยั้งความเครียดออกซิเดชันกระบวนการอักเสบ และกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ จะเป็นสารที่สามารถส่งเสริมสุขภาพและนำมาใช้ในการป้องกันโรคได้

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นแหล่งอาหารให้แก่ทั้งคนและสัตว์ ซึ่งสามารถพบแหล่งปลูกได้มากถึงร้อยละ 95 ในแถบทวีปเอเชีย[10] โดยทั่วไปแล้วข้าวจะถูกนำใช้ในทางอาหารมากกว่าประโยชน์ด้านอื่น เนื่องจากข้าวเป็นแหล่งอุดมของคาร์โบไฮเดรต[11] แต่อย่างไรก็ตามนอกจากคาร์โบไฮเดรตแล้วยังพบว่าในข้าวยังมีสารพฤกษเคมีอื่นอีก เช่น สารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ วิตามินอี แกมมา-ออไรซนอล และกรดไฟติก[12] นอกจากนี้ยังมีข้าวสายพันธุ์หนึ่งซึ่งถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางยามากกว่าอาหาร ในประเทศไทยเรียกข้าวสายพันธุ์นี้ว่าข้าวก่ำ (*Oryza sativa* L. indica) หากไม่นับคุณประโยชน์ทางอาหารแล้วข้าวก่ำมีองค์ประกอบอื่นที่อุดมมากกว่าข้าวทั่วไป ได้แก่ โปรตีน วิตามิน แร่ธาตุ และสารพฤกษเคมีต่างๆ ที่สำคัญในการส่งเสริมสุขภาพ[13] สารพฤกษเคมีที่เป็นจุดเด่นในข้าวก่ำคือสารแอนโธไซยานินถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อยของสารกลุ่มฟีนอลิกซึ่งเป็นรงควัตถุสีดำหรือม่วงที่หุ้มส่วนของเมล็ดข้าวไว้[14] มีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพฤกษเคมีในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวก่ำว่าสามารถช่วยส่งเสริมสุขภาพ[15,16] และป้องกันโรคในระบบองค์รวมได้[17,18,19]

ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของสารพฤกษเคมีที่มีความสามารถในการส่งเสริมสุขภาพและป้องกันการเกิดความผิดปกติต่างๆ ของร่างกายจากสภาวะความเครียดในสังคมปัจจุบัน โดยมุ่งเน้นการศึกษาผลของสารสกัดข้าวก่ำซึ่งมีแหล่งปลูกในประเทศไทยต่อการแสดงออกและปริมาณของเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน รวมทั้งการแสดงออกและปริมาณของไซโตไคน์ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการอักเสบและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

โดยการศึกษาและประเมินผลของสารสกัดข้าวก่ำในสัตว์ทดลองที่ปกติ นอกจากนี้ยังศึกษาผลของสารสกัดข้าวก่ำต่อการเปลี่ยนแปลงจุลภาคศาสตร์เนื้อเยื่อของลำไส้ใหญ่ในสัตว์ทดลองที่ปกติ เพื่อประเมินผลที่เกิดกับระบบทางเดินอาหารในส่วนของลำไส้ใหญ่และความสามารถในการพัฒนาเป็นโภชนเภสัชภัณฑ์ที่ใช้ในการส่งเสริมสุขภาวะของระบบลำไส้และการป้องกันการเกิดโรคในระบบลำไส้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดข้าวก่ำต่อเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดข้าวก่ำต่อไซโตไคน์ต้านการอักเสบในระบบภูมิคุ้มกัน
3. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดข้าวก่ำต่อการเปลี่ยนแปลงจุลภาคศาสตร์เนื้อเยื่อของลำไส้ใหญ่

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมและการสกัดสารพฤกษเคมีจากข้าวก่ำ

วัตถุดิบข้าวก่ำมีแหล่งปลูกในอำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ ทำการขัดสีเพื่อคัดเลือกเฉพาะส่วนของรำข้าว จากนั้นทำการคัดแยกส่วนปลอมปนออกด้วยตะแกรงเบอร์ 60 และทำการอบให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดรำข้าวก่ำด้วยตัวทำละลายสกัด 0.1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริกในเอธานอล (15:85) ในอัตราส่วนวัตถุดิบต่อตัวทำละลายสกัด 1:10 ทำการเขย่าด้วยความเร็วรอบสกัด 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ทำการสกัด 5 รอบ จากนั้นกรองสารละลายสกัดผ่าน 0.45 ไมโครเมตร กระดาษกรองชนิดไนลอน ก่อนนำไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ จากนั้นทำการประเมินปริมาณในรูปของผงแห้ง ก่อนเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปศึกษาต่อไป

2. การวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดข้าวก่ำ

2.1. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยสเปกโทรโฟโตเมทรี

เตรียมสารสกัดข้าวก่ำความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารสกัดข้าวก่ำ 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำปราศจากไอออน 1,500 ไมโครลิตร เติมสารละลายเจือจาง 10 เท่า folin-ciocalteau ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างดีก่อนเติมสารละลายอิ่มตัว 20% w/v แคลเซียมคาร์บอเนต ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างดีก่อนทำการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด จากนั้นนำปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ทำการเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกรวมกับสารมาตรฐานกรดกอลลิก

2.2. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานินรวมด้วยสเปกโทรโฟโตเมทรี

เตรียมสารสกัดข้าวก่ำความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารสกัดข้าวก่ำ 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 และ 4.5 หลอดละ 2,250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างดี ในแต่ละหลอดทำการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด จากนั้นนำปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร ทำการเปรียบเทียบปริมาณแอนโธไซยานินรวมกับสารมาตรฐานไซยานิดิน

3. การออกแบบการศึกษาผลของข้าวก่ำในสัตว์ทดลอง

การศึกษาผลของข้าวก่ำต่อการปรับเปลี่ยนระบบเอนไซม์ต้านออกซิเดชันและภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง ได้รับการพิจารณาอนุมัติจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมสัตว์ทดลองคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่ 01/2015 โดยการศึกษาในหนูทดลองสายพันธุ์วิสต้า จำนวน 36 ตัว ที่ได้รับจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นระยะเวลา 21 วัน โดยการปรับสภาวะก่อนการศึกษาเป็นเวลา 7 วัน และช่วงการศึกษาเป็นเวลา 14 วัน ภายใต้สภาวะมาตรฐาน (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council, 1996) หนูทดลองถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 12 ตัว เมื่อทำการศึกษาครบ

ตามกำหนดหนูทดลองทุกตัวจะถูกทำการการุณยฆาตและทำการเก็บตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อลำไส้ใหญ่เพื่อทำการประเมินต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 1

กลุ่มที่ 1	ได้รับน้ำและอาหารปกติ	n = 12
กลุ่มที่ 2	ได้รับน้ำและอาหารปกติและสารสกัดข้าวก่ำ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	n = 12
กลุ่มที่ 3	ได้รับน้ำและอาหารปกติและสารสกัดข้าวก่ำ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	n = 12

ภาพที่ 1 การศึกษาผลของสารสกัดข้าวก่ำในสัตว์ทดลอง

4. การประเมินเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน

เอนไซม์ต้านออกซิเดชันที่ทำการประเมิน ได้แก่ คาตาเลส ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ซึ่งเตรียมได้จากเลือดสัตว์ทดลองที่ถูกเก็บและปั่นแยกเก็บเฉพาะส่วนของซีรัมก่อนนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี ตามวิธีการของ Luczaj และคณะ[20]

5. การประเมินไซโตไคน์ในระบบภูมิคุ้มกัน

หลังจากทำการการุณยฆาตสัตว์ทดลองแล้วเลือดจะถูกเก็บและปั่นแยกเก็บเฉพาะส่วนของซีรัมเพื่อทำการประเมินไซโตไคน์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน-10 และ ทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์-เบต้า การศึกษาทำได้โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป R&D-ELISA kit ตามหลักการของ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) โดยการเตรียมสารละลายทดสอบตามวิธีของชุดทดสอบสำเร็จรูป จากนั้นเติมสารตัวอย่าง สารมาตรฐาน และสารควบคุม อย่างละ 50 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate ที่ถูกเคลือบด้วย monoclonal antibody จำเพาะ จากนั้นทำการล้างส่วนเกินของปฏิกิริยาออกด้วยบัฟเฟอร์ และเติมสารละลาย detected substrate 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายหยุดปฏิกิริยา 100 ไมโครลิตร วัดการเปลี่ยนสีด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร[21]

6. การประเมินเนื้อเยื่อของลำไส้ใหญ่

ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal) และลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal) ของหนูทดลองจะถูกเก็บไว้ใน 10% buffered formalin จากนั้นทำการเตรียมเนื้อเยื่อในพาราฟินและทำการตัดชิ้นเนื้อเพื่อนำไปย้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E) ทำการประเมินการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตามเกณฑ์ของ Erben และคณะ[22]

7. การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและมีการเปรียบเทียบผลมากกว่า 2 กลุ่มขึ้นไป จึงใช้การทดสอบทางสถิติ one way analysis of variance (one way ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ Least Significant Difference (LSD) post hoc test การทดสอบทางสถิติในครั้งนี้ใช้โปรแกรม SPSS V.17.0 โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (α=0.05)

ผลการวิจัย

1. ปริมาณสารฟีนอลิกและแอนโธไซยานินรวมในสารสกัดข้าวก่ำ

สารสกัดข้าวก่ำจากอำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีร้อยละสารสกัด 10.52±0.85 โดยคิดจากน้ำหนักรำข้าวก่ำ และมีร้อยละสารสกัด 1.97±0.01 โดยคิดจากน้ำหนักข้าวกล้องก่ำ เมื่อ

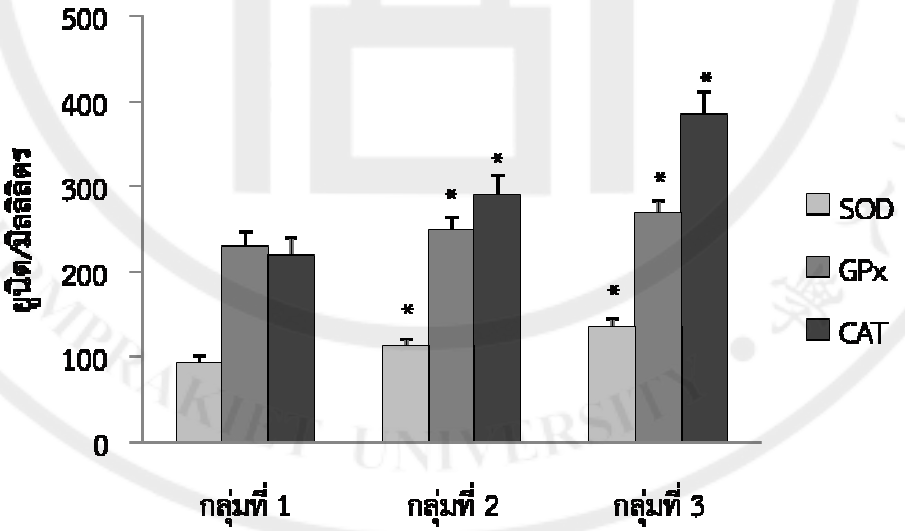
ทำการวิเคราะห์สารพฤกษเคมี พบว่า มีปริมาณสารฟีนอลิกและแอนโธไซยานินเป็นองค์ประกอบ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณสารพฤกษเคมีที่ตรวจพบในข้าวก่ำ

สารพฤกษเคมี	ข้าวกล้องก่ำ	สารสกัดข้าวก่ำ
ฟีนอลิกรวม (เทียบเท่ากรดกอลลิก มิลลิกรัม/กรัม)	5.12±0.48	259.60±24.48
แอนโธไซยานินรวม (เทียบเท่าไซยานิดิน มิลลิกรัม/กรัม)	17.05±0.82	864.43±41.48

2. ผลของข้าวก่ำต่อปริมาณเอนไซม์คาตาเลส ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในระบบเลือด

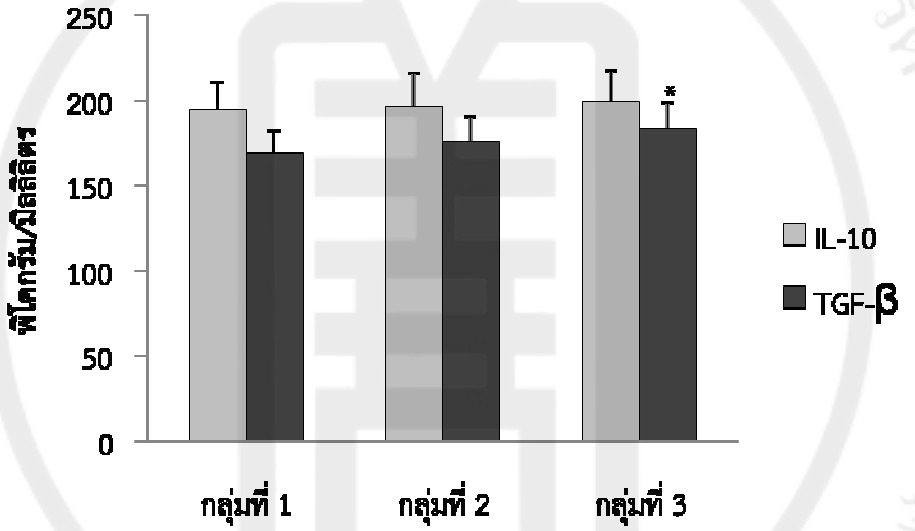
ปริมาณเอนไซม์ต้านออกซิเดชันทั้ง 3 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย เอนไซม์คาตาเลส (CAT) เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) และเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) ถูกตรวจพบในส่วนของซีรัมของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่มการศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่าหนูทดลองกลุ่มที่ 2 และ กลุ่มที่ 3 ซึ่งได้รับสารสกัดข้าวก่ำ 500 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ตามลำดับ ถูกตรวจพบปริมาณของเอนไซม์ต้านออกซิเดชันที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1) ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์คาตาเลสในซีรัม พบว่า กลุ่มที่ 2 และ กลุ่มที่ 3 มีปริมาณเพิ่มขึ้นร้อยละ 32.40 และ 75.28 ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสในซีรัม พบว่า กลุ่มที่ 2 และ กลุ่มที่ 3 มีปริมาณเพิ่มขึ้นร้อยละ 21.03 และ 46.46 ตามลำดับ และเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในซีรัม พบว่า กลุ่มที่ 2 และ กลุ่มที่ 3 มีปริมาณเพิ่มขึ้นร้อยละ 8.07 และ 16.79 ตามลำดับ การเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ต้านออกซิเดชันในซีรัม ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ปริมาณเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) และ คาตาเลส (CAT) เปรียบเทียบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (* $p<0.05$)

3. ผลของข้าวก่ำต่อการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-10 และ ทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์-เบต้าในระบบเลือด

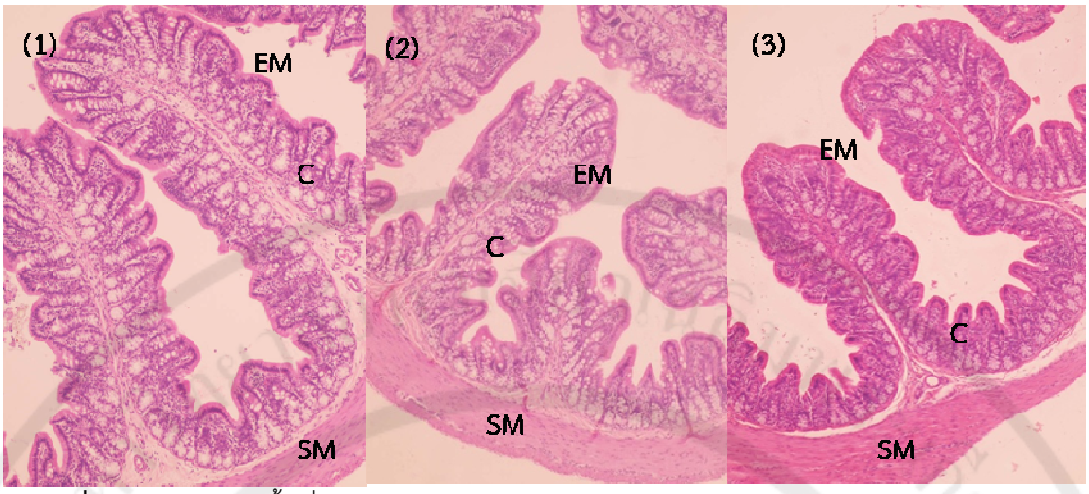
ไซโตไคน์ต้านการอักเสบที่ทำการประเมินในการศึกษานี้ ได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน-10 (IL-10) และ ทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์-เบต้า (TGF-β) ซึ่งไซโตไคน์ทั้งสองชนิดนี้สามารถตรวจพบได้ในระบบเลือดและสามารถนำไปวิเคราะห์หาปริมาณที่แสดงออกในส่วนซีรัม พบว่า ทั้งอินเตอร์ลิวคิน-10 และ ทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์-เบต้า มีปริมาณที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดข้าวก่ำ 500 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เมื่อเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1) จากการศึกษา พบว่า ปริมาณอินเตอร์ลิวคิน-10 เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ 2 และ กลุ่มที่ 3 ร้อยละ 0.87 และ 2.32 ตามลำดับ ส่วนปริมาณทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์-เบต้าเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ 2 และ กลุ่มที่ 3 ร้อยละ 4.30 และ 8.78 ตามลำดับ ซึ่งจากผลการศึกษา พบว่า การเพิ่มขึ้นของ ทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์-เบต้าในกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดข้าวก่ำ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว แตกต่างจากกลุ่มทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) การเปรียบเทียบปริมาณไซโตไคน์ต้านการอักเสบในซีรัม ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ปริมาณไซโตไคน์ต้านการอักเสบ อินเตอร์ลิวคิน-10 (IL-10) และ ทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์-เบต้า (TGF-β) เปรียบเทียบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (* p<0.05)

4. ผลของข้าวก่ำต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของลำไส้ใหญ่

เกณฑ์การประเมินการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของลำไส้ใหญ่อ้างอิงตาม Erben และคณะ[22] ซึ่งหัวข้อการประเมินจะยึดตามเกณฑ์ (1) การสูญเสียผนังลำไส้ (epithelial changes) ซึ่งประกอบด้วย ระดับการสูญเสีย (erosion) และ การสูญเสียเซลล์ผลิตเมือก (goblet cell lose) (2) การเกิดการอักเสบ (inflammatory cell infiltrate) ประกอบด้วย ระดับความรุนแรง (severity) และ ระดับการอักเสบในเนื้อเยื่อชั้นต่างๆ (extent) จากการศึกษา พบว่า เนื้อเยื่อลำไส้ใหญ่ทั้งส่วนต้นและส่วนปลายของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวก่ำ 500 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของจุลภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ โดยเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมปกติ ซึ่งไม่พบการสูญเสียเนื้อเยื่อและการอักเสบโดยการกระจายตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว เป็นการยืนยันได้ว่าสารสกัดข้าวก่ำมีความปลอดภัยต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในระบบลำไส้ การเปรียบเทียบลักษณะของเนื้อเยื่อของลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 จุลภาคศาสตร์เนื้อเยื่อลำไส้ใหญ่ของสัตว์ทดลองกลุ่ม (1), (2) และ (3) ตามลำดับ กำลังขยาย 100x กำหนด EM คือ epithelium mucosa C คือ crypt และ SM คือ submucosa

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ปริมาณสารพฤกษเคมีในสารสกัดข้าวก่ำที่ทำการวิเคราะห์แบบผลรวม แสดงปริมาณสารฟีนอลิกและสารแอนโธไซยานินในสารสกัดและในข้าวกล้องก่ำ พบว่า มีปริมาณสารที่สูงกว่างานวิจัยก่อนหน้าของ Sompong และคณะ ในปี ค.ศ. 2011[23] โดยการศึกษาในข้าวที่มีสีจำนวน 13 สายพันธุ์ ซึ่งมีแหล่งปลูกในประเทศไทย จีน และศรีลังกา พบว่า ในข้าวที่มีสีแดงจำนวน 10 สายพันธุ์ ตรวจพบปริมาณสารฟีนอลิกรวม 79.18-691.37 มิลลิกรัม/100 กรัม และข้าวที่มีสีดำจำนวน 3 สายพันธุ์ ตรวจพบปริมาณสารฟีนอลิกรวม 336.69-555.16 มิลลิกรัม/100 กรัม ส่วนปริมาณสารแอนโธไซยานินรวมในข้าวที่มีสีแดงจำนวน 10 สายพันธุ์ ตรวจพบปริมาณสาร 0.6-1.38 มิลลิกรัม/100 กรัม และข้าวที่มีสีดำจำนวน 3 สายพันธุ์ ตรวจพบปริมาณสาร 109.52-256.61 มิลลิกรัม/100 กรัม นอกจากนี้ยังพบว่าแอนโธไซยานินที่สามารถวิเคราะห์ได้ ประกอบด้วย ไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ และ พีโอนิดิน 3-กลูโคไซด์ ซึ่งมีปริมาณ 19.39-140.83 และ 11.07-12.75 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ การวิเคราะห์ปริมาณชนิดของสารในข้าวก่ำด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของ Pengkumsri และคณะ ในปี ค.ศ. 2015[24] พบว่า สารฟีนอลิกที่สามารถวิเคราะห์ได้ ประกอบด้วย กรดโปรโตแคทีชูอิก กรดคาเฟอิก กรดไซริงจิก และ กรดพารา-คูมาริก มีปริมาณ 0.87, 1.02, 0.20 และ 11.40 มิลลิกรัม/กรัมสารสกัด ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่ตรวจพบสารสองชนิดนี้เป็นองค์ประกอบหลักในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวก่ำ[25,26]

การศึกษาผลของสารสกัดข้าวก่ำในขนาด 500 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ต่อเอนไซม์ต้านออกซิเดชันในหนูทดลองสายพันธุ์วิสต้า พบว่า ในซีรัมมีปริมาณเอนไซม์คาตาเลส เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส และเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Chiang และคณะ[27] ในหนูทดลองสายพันธุ์ C57BL/6 ที่ได้รับสารสกัดข้าวก่ำที่อุดมไปด้วยสารแอนโธไซยานินผสมในอาหารร้อยละ 5 พบว่า ปริมาณเอนไซม์คาตาเลส ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นร้อยละ 33.25, 54.49 และ 23.05 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ Lee และคณะ[28] ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดข้าวก่ำความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในเซลล์ HepG2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันด้วยสารเคมี พบว่า ปริมาณของเอนไซม์กลูตาไธโอนที่ลดลงจากการเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันมีปริมาณเพิ่มขึ้นร้อยละ 158.92 ในขณะที่เอนไซม์กลูตาไธโอนรีดักเตส กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส คาตาเลส และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส ถูกปรับเปลี่ยนให้มีปริมาณเทียบเท่ากับกลุ่มควบคุม มีรายงานการศึกษาก่อนหน้าอ้างถึงบทบาทของเอนไซม์ต้านออกซิเดชันในระบบทางชีวภาพอย่าง

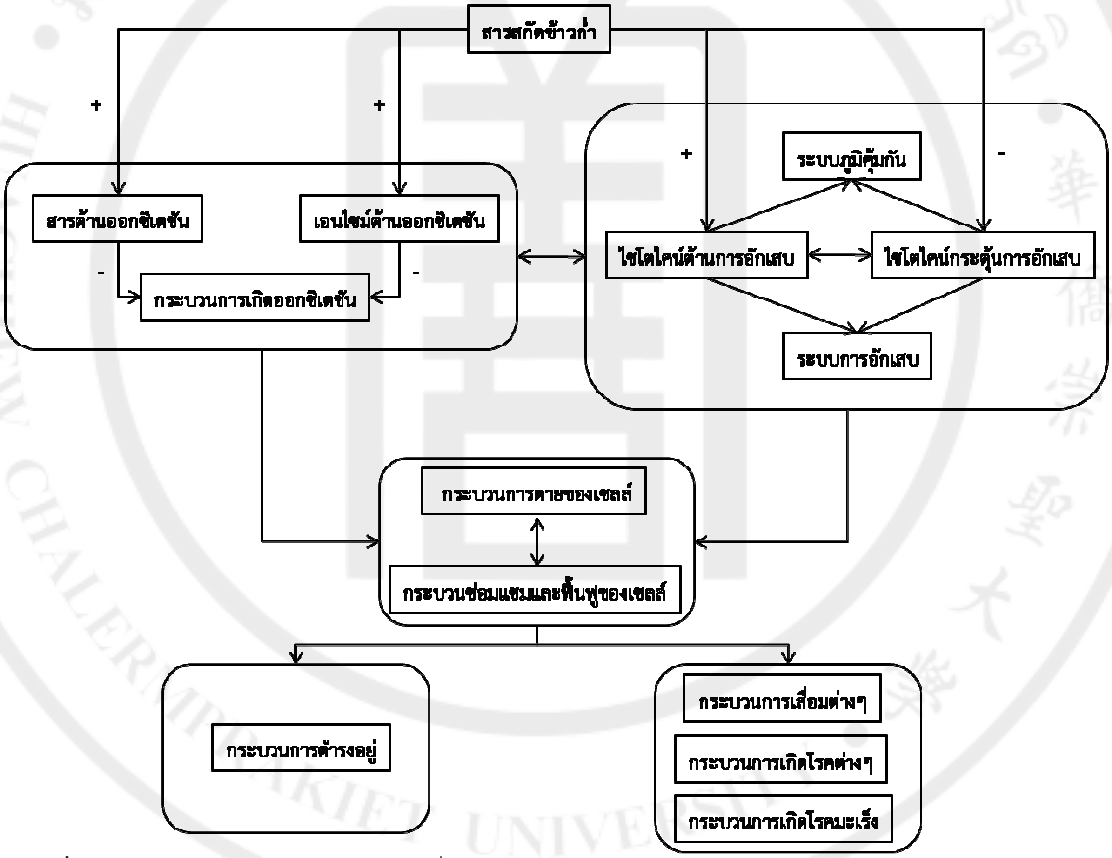
มากมาย เช่น การป้องกันและกำจัดอนุมูลอิสระ[29] การป้องกันและรักษา ulcerative colitis[30] การฟื้นฟูและรักษา diabetic neuropathy[31] และ การชะลอและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง[32] เป็นต้น กลไกในการต่อต้านและป้องกันเซลล์จากการทำลายของรีแอคทีฟออกซิเจนและไนโตรเจนสปีชีส์ สามารถแบ่งได้ตามแหล่งที่มาและกลไกดังนี้ สารต้านออกซิเดชันภายใน (บิลลิรูบิน ไธออล โคเอนไซม์คิว-10 กรดยูริก เอนไซม์ต้านออกซิเดชัน) สารต้านออกซิเดชันจากภายนอก (วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน พอลีฟีนอล) สารต้านออกซิเดชันในการกำจัดโลหะดักจับโปรตีน (อัลบูมิน เฟอร์ริติน ไมโอโกลบิน ทรานสเฟอริน)[33] เอนไซม์ต้านออกซิเดชันมีบทบาทที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการกำจัดและทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการทางชีวภาพภายในร่างกายและมลพิษในสิ่งแวดล้อม โดยเอนไซม์คาตาเลสจะทำลายโมเลกุลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นโมเลกุลตั้งต้นในการเกิดอนุมูลอิสระที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาทำลายสารชีวโมเลกุล เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสจะทำลายอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์โดยตรงซึ่งเป็นรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ที่มีอำนาจการทำลายที่สูงมาก เอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสจะทำลายโมเลกุลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เช่นเดียวกับเอนไซม์คาตาเลสแต่จะเกี่ยวข้องกับระบบการกำจัดสารพิษของกลูตาไธโอนซึ่งสามารถทำลายอนุมูลเปอร์ออกซิลได้ด้วย[34] ดังนั้น ระบบการทำงานของเอนไซม์ต้านออกซิเดชันจึงเป็นส่วนสำคัญในการป้องกันและยับยั้งการเกิดความผิดปกติที่จะเกิดขึ้นในระบบของสารชีวโมเลกุล

อินเตอร์ลิวคิน-10 และ ทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์-เบต้า เป็นไซโตไคน์ชนิดต้านการอักเสบที่ตรวจพบในซีรัมมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นร้อยละ 0.87 และ 4.30 ตามลำดับ จากผลของสารสกัดข้าวก่ำที่ให้ในหนูทดลองขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และเพิ่มขึ้นร้อยละ 2.32 และ 8.78 ตามลำดับ จากผลของสารสกัดข้าวก่ำขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นการยืนยันถึงผลทางชีวภาพของสารแอนโธไซยานินและฟีนอลิกในการลดการแสดงออกของไซโตไคน์ชนิดกระตุ้นการอักเสบ และเพิ่มการแสดงออกของไซโตไคน์ชนิดต้านการอักเสบ[35] อีกทั้งยังสอดคล้องกับการศึกษาผลของสารสกัดข้าวก่ำในการต้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง พบว่า สารสกัดข้าวก่ำที่อุดมไปด้วยแอนโธไซยานินแสดงผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS) cyclooxygenase-2 (COX-2) และ nuclear factor-kappaB (NF-kB) ซึ่งเป็นยีนในกระบวนการก่อให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดข้าวก่ำเป็นสารพฤกษเคมีที่มีผลต่อการป้องกันและรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ การอักเสบที่เชื่อมโยงกับการเกิดโรคมะเร็ง[36,37] และโรคมะเร็งลำไส้ได้[38] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลในโรคลำไส้อักเสบในสัตว์ทดลอง พบว่า สารสกัดที่อุดมไปด้วยสารแอนโธไซยานินสามารถฟื้นฟูและป้องกันการเกิดโรคลำไส้อักเสบได้ทั้งชนิด inflammatory bowel disease (IBD)[39] และ Crohn's disease (CD)[40] โดยการปรับเปลี่ยนระบบการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งไซโตไคน์ชนิดกระตุ้นการอักเสบ (อินเตอร์ลิวคิน-12 ทูเมอร์เนคโครสีสแฟกเตอร์-แอลฟา) และกระตุ้นไซโตไคน์ชนิดต้านการอักเสบ (อินเตอร์ลิวคิน-10) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Cheng และคณะ[41] ในการลดการอักเสบของสารฟีนอลิกและแอนโธไซยานินโดยการปรับสมดุลของไซโตไคน์ชนิดกระตุ้นการอักเสบ (อินเตอร์ลิวคิน-1-เบต้า อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-12) ให้เข้าสู่ระดับสมดุล

จากผลการประเมินผลของสารสกัดข้าวก่ำต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของลำไส้ใหญ่ พบว่า เนื้อเยื่อลำไส้ใหญ่ทั้งส่วนต้นและส่วนปลายของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวก่ำไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของจุลภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมปกติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Summart และ Chewonarin[42] ได้เสนอผลของสารสกัดข้าวก่ำได้ต่อการกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ ผลพบว่าปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดการก่อตัวของเซลล์มะเร็งถูกยับยั้งด้วยสารสกัดข้าวก่ำ แต่ไม่มีผลต่อเซลล์ปกติแต่อย่างใด นอกจากนี้ Tammasakchai และคณะ[43] ได้ศึกษาผลของสารสกัดข้าวไทยต่อลำไส้ใหญ่ปกติและผลต่อกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในสัตว์ทดลอง พบว่า สารสกัดข้าวไทยสามารถปรับเปลี่ยนและเพิ่มความสามารถในการต้านออกซิเดชันแบบผลรวมในระบบเลือดทั้งกลุ่มปกติและกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ และสามารถลดการเกิด aberrant crypt foci (ACF) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดสำคัญของพยาธิสภาพเนื้อเยื่อในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อไม่นานมานี้ Tan และ Norhaizan[44] ได้ทำการรวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับข้าวในการป้องกันมะเร็งชนิดต่างๆ พบว่า มีงานวิจัยที่สนับสนุนมากกว่า 100 ฉบับ ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากข้าวเป็นสารพฤกษเคมีที่มีความปลอดภัยและมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการป้องกันมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งผิวหนัง มะเร็งเต้านม มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งลำไส้

ใหญ่ แม้ว่าความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งมีอย่างหลากหลายแต่มีเพียงมะเร็งลำไส้ใหญ่เท่านั้นที่มีงานวิจัยรองรับผลมากที่สุดเนื่องจากสารพฤกษเคมีในข้าวจะเดินทางผ่านในระบบทางเดินอาหารเป็นส่วนใหญ่และเป็นลำดับแรก ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2005 สมาคมการแพทย์อเมริกัน (American Health Association) ได้เสนอให้ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ (ข้าวก่ำ) ใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับป้องกันและรักษาโรคมะเร็งร่วมกับยาเคมีบำบัด ซึ่งเป็นการยอมรับสารฟีนอลิกและสารแอนโธไซยานินต่อการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์อย่างเป็นทางการ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้และรายงานก่อนหน้า[5,7,15,19,44,45] สามารถเสนอแผนภาพผลของสารสกัดข้าวก่ำต่อกระบวนการเกิดออกซิเดชัน ระบบการอักเสบ ระบบภูมิคุ้มกัน และกระบวนการเกิดโรคต่างๆ ได้ ดังแสดงในภาพที่ 5 กล่าวคือ สารสกัดข้าวก่ำที่อุดมไปด้วยสารฟีนอลิกและแอนโธไซยานินเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สามารถกระตุ้นเอนไซม์ต้านออกซิเดชันในระบบสิ่งมีชีวิตได้ อีกทั้งสารสกัดข้าวก่ำยังสามารถเข้าไปมีส่วนร่วมในกระบวนการทำงานของระบบการอักเสบและระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งมีผลโดยตรงในการกระตุ้นการแสดงออกของไซโตไคน์ชนิดต้านการอักเสบและปรับสมดุลกระบวนการอักเสบ สุดท้ายจึงส่งผลต่อการควบคุมระบบการตายของเซลล์ตามโปรแกรม (apoptosis) และการฟื้นฟูเซลล์ (repairing) และการคงอยู่ของเซลล์ปกติ รวมไปถึงเป็นการปิดกั้นโอกาสการเกิดความผิดปกติและการป้องการเกิดโรคต่างๆ ได้



ภาพที่ 5 แผนภาพเสนอผลของสารสกัดข้าวก่ำต่อระบบเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน ระบบภูมิคุ้มกัน ระบบการอักเสบและกระบวนการเกิดโรค

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และภาควิชาพยาธิชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้ออำนวยให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมทั้งคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวที่สนับสนุนการเผยแพร่ผลงานในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Sies H. Biochemistry of oxidative stress. Angewandte Chemie International Edition in English. 1986; 25(12):1058-71.
2. Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. Exp Gerontol. 2001; 36(9):1495-502.
3. Rahman T, Hosen I, Islam MT, Shekhar HU. Oxidative stress and human health. Adv Biosci Biotechnol. 2012; 3(7A):997-1019.
4. Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. Japi. 2004; 52(10):794-804.
5. Spector A. Review: Oxidative stress and disease. J Ocul Pharmacol Th. 2000; 16(2):193-201.
6. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A. Asian Pac Cancer Prev. 2014; 15:4405-09.
7. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. J Clin Invest. 2007; 117(5):1175-83.
8. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. Cell. 2010; 140(6):883-99.
9. Hopkins SJ. The pathophysiological role of cytokines. Leg Med. 2003; 5:S45-57.
10. Bhattacharjee P, Singhal RS, Kulkarni PR. Basmati rice: a review. Int J Food Sci Technol. 2002; 37(1):1-12.
11. Muthayya S, Sugimoto JD, Montgomery S, Maberly GF. An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. Ann New York Acad Sci. 2014; 1324(1):7-14.
12. Henderson AJ, Ollila CA, Kumar A, Borresen EC, Raina K, Agarwal R, et al. Chemopreventive properties of dietary rice bran: current status and future prospects. Adv Nutr: An Int Rev J. 2012; 3(5):643-53.
13. Suzuki M, Kimura T, Yamagishi K, Shinmoto H, Yamaki K. Comparison of mineral contents in 8 cultivars of pigmented brown rice. J Jpn Soc Food Sci Technol (Japan). 2004; 51(8):424-7.
14. Chaudhary RC. Speciality rices of the world: effect of WTO and IPR on its production trend and marketing. J Food, Agric Environ. 2003; 1(2):34-41.
15. Hu C, Zawistowski J, Ling W, Kitts DD. Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. J Agric Food Chem. 2003; 51(18):5271-7.
16. Goufo P, Trindade H. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ-oryzanol, and phytic acid. Food Sci Nutr. 2014; 2(2):75-104.
17. Patel M, Naik SN. Gamma-oryzanol from rice bran oil: a review. J Sci Ind Res. 2004; 63:569-78.
18. Salgado JM, de Oliveira AGC, Mansi DN, Donado-Pestana CM, Bastos CR, Marcondes FK. The role of black rice (*Oryza sativa* L.) in the control of hypercholesterolemia in rats. J Med Food. 2010; 13(6):1355-62.

19. Walter M, Marchesan E, Massoni PFS, da Silva LP, Sartori GMS, Ferreira RB. Antioxidant properties of rice grains with light brown, red and black pericarp colors and the effect of processing. Food Res Int. 2013; 50(2):698-703.
20. Luczaj W, Stankiewicz-Kranc A, Milewska E, Roszkowska-Jakimiec W, Skrzydlewska E. Effect of sweet grass extract against oxidative stress in rat liver and serum. Food and Chem Toxicol 2012; 50(2):135-40.
21. Pengkumsri N, Sivamaruthi BS, Sirilun S, Suwannalert P, Rodboon T, Prasitpuriprecha C, et al. Dietary supplementation of Thai black rice bran extract and yeast beta-glucan protects the dextran sodium sulphate mediated colitis induced rat. RSC Adv. 2017; 7(1):396-402.
22. Erben U, Loddenkemper C, Doerfel K, Spieckermann S, Haller D, Heimesaat MM, et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. Int J Clin Exp Pathol. 2014; 7(8):4557-76.
23. Sompong R, Siebenhandl-Ehn S, Linsberger-Martin G, Berghofer E. Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. Food Chem. 2011; 124(1):132-40.
24. Pengkumsri N, Chaiyasut C, Saenjum C, Sirilun S, Peerajan S, Suwannalert P, et al. Physicochemical and antioxidative properties of black, brown and red rice varieties of northern Thailand. Food Sci Technol (Campinas). 2015; 35(2):331-8.
25. Chen PN, Kuo WH, Chiang CL, Chiou HL, Hsieh YS, Chu SC. Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. Chem-Biol Interact. 2006; 163(3):218-29.
26. Lee JH. Identification and quantification of anthocyanins from the grains of black rice (*Oryza sativa* L.) varieties. Food Sci Biotechnol. 2010; 19(2):391-7.
27. Chiang AN, Wu HL, Yeh HI, Chu CS, Lin HC, Lee WC. Antioxidant effects of black rice extract through the induction of superoxide dismutase and catalase activities. Lipids. 2006; 41(8):797-803.
28. Lee SM, Choi Y, Sung J, Kim Y, Jeong HS, Lee J. Protective effects of black rice extracts on oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide in HepG2 cells. Prev Nutr Food Sci. 2014; 19(4):348-52.
29. Rana POOJA, Vadhera S, Soni GIRIDHAR. In vivo antioxidant potential of rice bran oil (RBO) in albino rats. Indian J Physiol Pharmacol. 2004; 48(4):428-36.
30. Nieto N, Torres MI, Fernandez MI, Giron MD, Rios A, Suarez MD, et al. Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. Digest Dis Sci. 2000; 45(9):1820-7.
31. Ghatak SB, Panchal SS. Protective effect of oryzanol isolated from crude rice bran oil in experimental model of diabetic neuropathy. Rev Bras Farmacognosia. 2012; 22(5):1092-103.
32. Khan MA, Tania M, Zhang DZ, Chen HC. Antioxidant enzymes and cancer. Chinese J Cancer Res. 2010; 22(2):87-92.
33. Mark P. Antioxidants. Clinical Nutrition Insights. 1998; 31:01-4.
34. Krishnamurthy P, Wadhwani A. Antioxidant enzymes and human health. Antioxidant enzyme. 2012:3-18.

35. Peiffer DS, Wang LS, Zimmerman NP, Ransom BW, Carmella SG, Kuo CT, et al. Dietary consumption of black raspberries or their anthocyanin constituents alters innate immune cell trafficking in esophageal cancer. Cancer Immunol Res. 2016; 4(1):72-82.
36. Min SW, Ryu SN, Kim DH. Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O-β-D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid. Int Immunopharmacol. 2010; 10(8): 959-66.
37. Limtrakul P, Yodkeeree S, Pitchakarn P, Punfa W. Suppression of inflammatory responses by black rice extract in RAW 264.7 macrophage cells via downregulation of NF-kB and AP-1 signaling pathways. Asian Pac J Cancer Prev. 2015; 16(10):4277-83.
38. Suwannalert P, Payuhakrit W, Koomsang T. Anti-Oxidant, Pro-Oxidant and Anti-Inflammatory Effects of Unpolished Rice Relevant to Colorectal Cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2016; 17(12):5047-56.
39. Wu LH, Xu ZL, Dong D, He SA, Yu H. Protective effect of anthocyanins extract from blueberry on TNBS-induced IBD model of mice. Evid-based Compl Alt Med. 2011:1-8.
40. Martin DA, Bolling BW. A review of the efficacy of dietary polyphenols in experimental models of inflammatory bowel diseases. Food Funct. 2015; 6(6):1773-86.
41. Cheng A, Yan H, Han C, Wang W, Tian Y, Chen X. Polyphenols from blueberries modulate inflammation cytokines in LPS-induced RAW264. 7 macrophages. Int J Biol Macromol. 2014; 69:382-7.
42. Summart R, Chewonarin T. Purple rice extract supplemented diet reduces DMH-induced aberrant crypt foci in the rat colon by inhibition of bacterial β-glucuronidase. Asian Pac J Cancer Prev. 2014; 15(2):749-55.
43. Tammasakchai A, Reungpatthanaphong S, Chaiyasut C, Rattanachitthawat S, Suwannalert P. Red strain Oryza sativa-unpolished Thai rice prevents oxidative stress and colorectal aberrant crypt foci formation in rats. Asian Pac J Cancer Prev. 2012; 13(5):1929-33.
44. Tan BL, Norhaizan ME. Scientific Evidence of Rice By-Products for Cancer Prevention: Chemopreventive Properties of Waste Products from Rice Milling on Carcinogenesis In Vitro and In Vivo. BioMed Res Int. 2017:1-18.
45. Reungpatthanaphong S, Chaiyasut C, Sirilun S, Suwannalert P. Unpolished Thai Rice Prevents Aberrant Crypt Foci Formation through the Invovement of ?catenin and COX2 Expression in AzoxymethaneTreated Rats. Asian Pac J Cancer Prev. 2016; 17(7):3551-8.