



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ไทยต่อเซลล์ตับ
Antioxidant activity of Thai fruits in human hepatocyte

โดย รจนา ชุณหะวัณทิติ และคณะ

กันยายน 2553

สัญญาเลขที่RDG5220009

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ไทยต่อเซลล์ตับ
Antioxidant activity of Thai fruits in human hepatocyte

คณะผู้วิจัย	สังกัด
รจนา ชุณห์บัณฑิต	มหาวิทยาลัยมหิดล
รัชนี คงคาอุยฉาย	มหาวิทยาลัยมหิดล
ธิดารัตน์ รุจิวรรณ	มหาวิทยาลัยมหิดล
ยุพิน วิเศษพานิช	มหาวิทยาลัยมหิดล

ชุดโครงการสมุนไพรเพื่อคุณภาพชีวิต

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป

Antioxidant activity of Thai fruits in human hepatocyte

Abstract

Fruits and vegetables are important sources of fiber and nutrients with a recognized antioxidant capacity. Liver is the primary target for several toxicants able to induce oxidative injury. Increased hepatic iron levels may aggravate oxidative stress and its consequences. The objectives of the present study were to investigate the chemical and cellular antioxidant potential of fruit extracts. Then, the effect of fruit extracts on cell survival, ROS generation, lipid peroxidation, and induction of antioxidant enzyme in HepG2 cells subjected to Fe-NTA induced oxidative stress was evaluated. The chemical antioxidant activity assays showed that strawberry, carambola, guava which rich in phenolic content had higher activity in the DPPH, FRAP, and ORAC assays than long kong, pomelo and tangerine which had lower phenolic content. Except long kong, the antioxidant efficacy of fruits in CAA values was in agreement with that measured by using chemical assays. Despite having the lowest total phenolic content and chemical antioxidant activity, long kong ranked the highest activity in CAA assay. Cell viability and other oxidative stress biomarker measured after co-treatment the fruit extracts with iron showed antioxidant and/or pro-oxidant ability of fruit extracts depending on type of fruits and concentrations used.

Keywords: Fruit extracts, HepG2, iron, antioxidant

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ไทยต่อเซลล์ตับ

บทคัดย่อ

ผักและผลไม้เป็นแหล่งสำคัญของใยอาหารและสารอาหารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ตับเป็นอวัยวะเป้าหมายอวัยวะแรกที่สารพิษหลายชนิดเข้าถึงและทำให้เกิดความเสียหายแก่เนื้อเยื่อซึ่งรวมถึงการบาดเจ็บจากภาวะ oxidative stress เมื่อมีภาวะเหล็กสูงก็จะยิ่งทำให้ภาวะ oxidative stress และการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อรุนแรงมากขึ้น การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ไทยด้วยวิธีทางเคมีและวิธีการใช้เซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์ตับ จากนั้นจะทำการทดสอบผลของสารสกัดจากผลไม้ต่อการเกิด oxidative stress ในเซลล์ HepG2 จากการได้รับเหล็กเกินโดยประเมินจาก จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต ระดับของ ROS การเกิด lipid peroxidation และ โปรตีนที่เป็น antioxidant enzyme ในเซลล์ จากการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีทางเคมีพบว่า สตรอเบอรี่ มะเฟือง ฝรั่ง มีปริมาณสารฟีนอลิกและค่า antioxidant activity DPPH FRAP และ ORAC สูงกว่าลองกอง ส้มโอ และส้มเขียวหวานซึ่งมีปริมาณสารฟีนอลิกต่ำกว่า เมื่อวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการใช้เซลล์พบว่าค่า cellular antioxidant activity ของผลไม้มีความสอดคล้องกับค่า chemical antioxidant activity ยกเว้นลองกองซึ่งมีสารฟีนอลิกและค่า chemical antioxidant activity ต่ำสุดแต่กลับมีค่า cellular antioxidant activity สูงสุด ในเซลล์ที่ทำให้เกิด oxidative stress เมื่อให้สารสกัดจากผลไม้รวมไปกับเหล็ก จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและ oxidative stress biomarkers อื่นๆบ่งชี้ว่าสารสกัดจากผลไม้ที่ใช้ในการทดสอบแสดงคุณสมบัติเป็นได้ทั้ง antioxidant และหรือ pro-oxidant ขึ้นอยู่กับชนิดของผลไม้และความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้

คำสำคัญ : Fruit extracts, HepG2, iron, antioxidants

บทนำ

สารต้านอนุมูลอิสระในผักผลไม้ประกอบด้วย fibre, polyphenols, flavonoids, conjugated isomers of linoleic acid, D-limonene, epigallocatechin, gallate, soya protein, isoflavanones, vitamins A, B, C, E, tocopherols, calcium, selenium, chlorophyllin, alipharin, sulphides, catechin, tetrahydrocurecumin, sesaminol, glutathione, uric acid, indoles, thiocyanates และ protease inhibitors ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารเหล่านี้ อาทิเช่น สารประกอบฟีนอลิกเกิดจากคุณสมบัติทางรีดอกซ์ซึ่งทำให้สารประเภทนี้เป็นตัวรีดิวซ์ เป็นสารที่ให้ไฮโดรเจนหรือกำจัด singlet oxygen นอกจากนี้ยังเป็น chelators จับกับ metal ions ป้องกันไม่ให้ไอออนเหล่านี้ไปกระตุ้นปฏิกิริยาซึ่งทำให้เกิด initiating radical species ผลไม้ที่เป็นแหล่งของฟลาโวนอยด์และสารฟีนอลิกอื่นๆ ได้แก่ องุ่น ผลไม้จำพวกเบอรี่ซึ่งนอกจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้วยังมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ยับยั้งการอักเสบ แบคทีเรีย ไวรัส การเกิดภูมิแพ้ด้วย ผลไม้จำพวกส้ม มีสาร flavanone glycosides ซึ่งไม่พบในผลไม้อื่นๆ triterpene limonoids และ hydroxy-cinnamates สารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ ที่พบในผลไม้ ได้แก่ fat soluble antioxidants เช่น vitamin E, coenzyme Q10, lycopene, β -carotene, α -carotene และ water soluble antioxidants เช่น vitamin C (Kaur และ Kapoor, 2001)

ในเซลล์ตับเช่นเดียวกับเซลล์อื่นๆ มีการสร้างอนุมูลอิสระเช่น reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาในเซลล์ ได้แก่ oxidative respiration, growth, regeneration, apoptosis และ microsomal defense อย่างไรก็ตามเมื่อเกิดความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและระบบต้านอนุมูลอิสระของร่างกาย ก็จะทำให้เกิดภาวะ oxidative stress อนุมูลอิสระเช่น ROS และ RNS ที่กำจัดไม่ทันสามารถทำความเสียหายต่อเซลล์ทุกชนิดในตับไม่ว่าจะเป็น hepatocytes, Kupffer, stellate และ endothelial cells จากการทำให้เกิดความเสียหายกับชีวโมเลกุล lipids, proteins, และ DNA กระตุ้นให้เกิด inflammation, fibrosis, necrosis, apoptosis และ malignant transformation ในเซลล์ ภาวะ oxidative stress เป็นกลไกสำคัญของการเกิดพยาธิสภาพหรือโรคตับเช่น ischemia/reperfusion injury, fibrosis, hepatocellular carcinoma, Wilson's disease, sepsis, acetaminophen overdose และ iron overload (Diesen และ Kuo, 2010)

การวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระทำได้โดยวิธีการทางเคมีเช่น oxygen radical absorbance capacity (ORAC), trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และ total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) หรือการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{+3} หรือ อนุมูลอิสระ 2,2-diphenylpicrylhydrazyl ด้วยวิธี ferric reducing/antioxidant power

(FRAP) และ DDPH free radical method ตามลำดับ อย่างไรก็ตามวิธีการวัดเหล่านี้ไม่ได้รวมกระบวนการ องค์ประกอบของสิ่งมีชีวิต เช่น กระบวนการดูดซึมผ่านผนังเซลล์ เมตาโบลิซึม substrate และสาร oxidant ที่เกิดในเซลล์ วิธีการวัดที่ดีกว่าควรจะทำในสัตว์ทดลองหรือมนุษย์ แต่ต้องใช้เวลานานและค่าใช้จ่ายสูงไม่เหมาะกับการวัดเพื่อเปรียบเทียบระหว่างอาหารหรือผลิตภัณฑ์หลายๆชนิด ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการใช้เซลล์มาเป็นเครื่องมือในการวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสาร การวัดในเซลล์จะลดเวลา ค่าใช้จ่ายและสามารถนำเอากระบวนการที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตเข้ามารวมเป็นปัจจัยร่วมในการวัดด้วย

การศึกษานี้เป็นการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ไทย ซึ่งวัดด้วยวิธีทางเคมีในหลอดทดลองและการวัดในเซลล์ จากนั้นจะนำข้อมูลจากทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ สำหรับสารสกัดจากผลไม้ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงจะนำมาศึกษาต่อเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการป้องกัน หรือลดพิษจากการเกิด oxidative stress ในเซลล์ตับซึ่งเกิดจากภาวะเหล็กเกิน (iron-loaded cell) ซึ่งตัวบ่งชี้ที่ใช้วัดประสิทธิภาพของการลดภาวะ oxidative stress ได้แก่ ปริมาณ reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation product, โปรตีน antioxidant enzyme ในเซลล์ รวมทั้งจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่หลังจากมีภาวะ oxidative stress จากการได้รับเหล็ก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวัดและเปรียบเทียบความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ไทยโดยวิธี chemical และ cellular antioxidant activity assay
2. ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ไทยในการป้องกันหรือลดพิษจากภาวะ oxidative stress ที่เกิดจากเหล็กในเซลล์ตับของมนุษย์ (HepG2)

วิธีทดลอง

1. เตรียมตัวอย่างสารสกัดจากผลไม้ไทย 6 ชนิด

1.1 เลือกผลไม้ไทย 6 ชนิด จากข้อมูลบางส่วนของงานวิจัยสารต้านอนุมูลอิสระในผลไม้ โดยสถาบันวิจัยโภชนาการ ม.มหิดล โดยเลือกชนิดของผลไม้ที่มีค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระวัดโดยวิธี ORAC, FRAP, DPPH assays และ Total polyphenolic content อยู่ใน 10 อันดับแรกของผลไม้ทั้งหมด และมีอยู่ในฤดูกาล ผลไม้ 6 ชนิดดังกล่าวได้แก่ สตรอเบอรี่ (strawberry), ฝรั่ง (guava), มะเฟือง (carambola), ลองกอง (long kong), ส้มโอ (pomelo) พันธุ์ทองดี และ ส้มเขียวหวาน (tangerine) พันธุ์สายน้ำผึ้ง

1.2 นำตัวอย่างผลไม้แต่ละชนิดซื้อจากผู้ขาย 3 ราย มาแยกเฉพาะเนื้อส่วนที่รับประทานได้ บั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยไม่เติมน้ำโดยชั่งเนื้อผลไม้จากแต่ละเจ้าแต่ละ 200 กรัมผสมรวมกัน หลังจากนั้นนำมาเตรียมสารสกัดทันที

1.3 เตรียมสารสกัดโดยใช้วิธีดัดแปลงมาจากวิธีของ Sun และคณะ (2002) ผสมตัวอย่างผลไม้ 100 กรัม กับ 80% acetone ที่แช่เย็น ในอัตราส่วน 1:2 W/V ใน beaker ขนาด 1000 ml คนตัวอย่างด้วย magnetic stirrer ใน cold room อุณหภูมิ 5-8 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 2 บน Buchner funnel ระเหย solvent ออกจาก filtrate ด้วย rotary evaporator ที่ 45 °C จน acetone ระเหยหมดไป ละลาย filtrate ที่เหลือด้วย 70% methanol ให้ได้ปริมาตร 50 ml แบ่งใส่หลอดเก็บไว้ที่ -40°C ไว้ใช้ตลอดการทดลอง ก่อนใช้นำสารสกัดมาระเหยเอา methanol ออกโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วใช้ double distilled water ละลายสารสกัดอีกครั้งให้ได้ปริมาตรเท่าเดิม ดังนั้นสารสกัดที่นำไปใช้ในการทดลองจะมีความเข้มข้นของเนื้อผลไม้ 2 กรัม ต่อสารสกัดปริมาณ 1 ml

2. วัดค่า Total phenolic content

ใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method ดัดแปลงโดย Dewanto และคณะ (2002) เจือจางสารสกัดผลไม้ 10-20 เท่า ด้วย double distilled water นำสารสกัดผลไม้ที่เจือจางแล้วหรือสารละลาย gallic acid ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน 125 μ l ผสมกับ double distilled water 0.5 ml แล้วเติม Folin-Ciocalteu reagent 125 μ l ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติม 7% sodium carbonate 1.25 ml ตามด้วย double distilled water 1 ml ผสมกันอีกครั้งทิ้งไว้ 90 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำมาวัด absorbance ที่ความยาวคลื่น 760 nm อ่านผลเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid ซึ่งมีความเข้มข้นในช่วง 50-450 μ g/ml ผลการวิเคราะห์แสดงเป็น mg gallic acid equivalents (GAE) per 100 gm fruit วิเคราะห์ตัวอย่างสองครั้ง แต่ละครั้งทำ triplicate

3. วัดค่า Chemical antioxidant activity ของสารสกัดจากผลไม้วัดด้วยวิธี 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay, ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay, oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay แต่ละตัวอย่างวิเคราะห์ 2 ครั้ง แต่ละครั้งทำ duplicate

3.1 DPPH free radical scavenging assay

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Krings และ Berger (2001) ซึ่งตัวอย่าง 2-3 กรัม ใส่ลงใน centrifuge tube เติม 95% methanol เขย่าด้วยมือ 5 นาที แล้วนำไป centrifuge 10 นาที แยกส่วนใสมาทำปฏิกิริยากับ 0.2 M DPPH 1 ml ซึ่งเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง ผสมสารละลายให้เข้ากันเก็บในที่มืดที่ 25 °C เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นวัดความเข้มของสีที่ลดลง ที่ความยาวคลื่น 517 nm จาก linear regression ของกราฟ plot ระหว่าง % absorbance ที่ลดลงต่อความเข้มข้นของตัวอย่าง วัดค่า IC₅₀ คือ ความเข้มข้นของตัวอย่าง (mg ของเนื้อผลไม้ในสารสกัด 1 ml) ซึ่งสามารถลด absorbance ลงได้ 50% ซึ่งได้ ผลการวิเคราะห์แสดงเป็น ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AEAC) per 100 gm fruit homogenate

3.2 Ferric reducing ability of plasma assay (FRAP)

ใช้วิธีของ Benzie และคณะ (1996) เตรียม FRAP reagent ใหม่ทุกครั้งโดยผสม 300 mM sodium acetate buffer (pH3.6) 10 mM 2-4-6-tri(2-pyridyl)-S-triazine และ 20 mM ferric chloride ในอัตราส่วน 10:1:1 incubate FRAP reagent 1.5 ml ใน water bath ที่ 37 °C เติม 500µl ของตัวอย่างที่เจือจางด้วย deionized water หรือสารมาตรฐานความเข้มข้น 6.25-100 µM บันทึกค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 593 nm นาน 4 นาที ที่ 37 °C ผลการวิเคราะห์แสดงเป็น micromole Trolox equivalents per gram (µmole TE/g)

3.3 Oxygen radical absorption capacity (ORAC)

เป็นวิธีของ Huang และคณะ (2002) นำตัวอย่างของสารสกัดมาเจือจางด้วย 75 mM potassium phosphate buffer (pH7.2) ผสม 500µl ของตัวอย่างเจือจางแล้วหรือสารมาตรฐานกับ 8.16x 10⁻² µM fresh fluorescein 1.5 ml incubate ใน water bath ที่ 37 °C นาน 10 นาที เติม 500µl ของ 153 mM AAPH วัด fluorescence ทุก 15 วินาที เป็นเวลา 35 นาที โดยใช้ excitation wavelength 493 nm, emission wavelength 515 nm คำนวณ ORAC antioxidant activity จากพื้นที่ใต้กราฟของ FL decay (AUC) ผลการวิเคราะห์แสดงเป็น micromole Trolox equivalents per gram (µmole TE/g)

4. วัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ในเซลล์ (Cellular antioxidant activity หรือ CAA assay) ใช้วิธีของ Wolfe และ Liu (2007) ซึ่งพัฒนาขึ้นเพื่อวัด antioxidant activity ของสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากอาหาร

เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 บน 96 well plate จำนวน 6×10^4 cells/ well ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ผสม 10% fetal bovine serum และ 1% penicillin-streptomycin 100 μ l ภายใน incubator อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชม. หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน Hank balance salt solution (HBSS) ซึ่งมี quercetin หรือ สารสกัดจากผลไม้ความเข้มข้นต่างๆและ 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 25 μ M incubate นาน 1 ชม. ล้างด้วย PBS 100 μ l ก่อนเติม 2, 2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP) 600 μ M ใน HBSS 100 μ l ใส่ plate ใน microplate reader อุณหภูมิ 37°C วัด fluorescence โดยใช้ excitation ที่ 485 nm emission ที่ 538 nm ทุก 5 นาที เป็นเวลา 1 ชม.

จากนั้นใช้พื้นที่ใต้กราฟของค่า fluorescence versus time หลังจากลบ blank และ initial fluorescence value มาคำนวณค่า CAA ของสารแต่ละความเข้มข้นก่อน โดยใช้สูตร

$$\text{CAA unit} = 1 - \left(\frac{\int \text{SA}}{\int \text{CA}} \right)$$

$\int \text{SA}$ = integrated area under the sample fluorescence versus time curve

$\int \text{CA}$ = integrated area from control curve

Plot กราฟ median effect ระหว่าง $\log(fa/fu)$ versus $\log(\text{dose})$

fa = fraction affected (CAA unit)

fu = fraction unaffected (1-CAA unit)

อ่านค่า Median effective dose (EC50) หรือ CAA ซึ่งเป็นความเข้มข้นของสารที่ $\log(fa/fu) = 0$ นั่นคือเซลล์ที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระสร้างอนุมูลอิสระในเซลล์ลดลง 50% เทียบจากเซลล์ควบคุม เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง

EC50 = ความเข้มข้นที่ $(fa/fu) = 1$ หรือ $\log fa/fu = 0$

5. ทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากผลไม้ไทยในการป้องกันหรือลดพิษจากภาวะ oxidative stress ที่เกิดจากเหล็กในเซลล์ HepG2 (Hepatoprotection assay)

5.1 Iron overload in cultured hepatocytes

Fe-NTA solution

เตรียม สารละลาย iron (III) nitrate enneahydrate และ nitrilotriacetic acid disodium salt ใน HBSS ความเข้มข้น 20 และ 80 mM ตามลำดับ ผสมสารละลายทั้งสองชนิดในอัตราส่วน 1:1 (molar ratio 1:4) ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย solid sodium bicarbonate เตรียมสารทันทีก่อนใช้

Iron loaded cells

เพาะเลี้ยง เซลล์ HepG2 จำนวน 1×10^4 cells /well บน 96 well plate โดยเซลล์อยู่ใน DMEM media ผสม supplement 10% FBS เลี้ยงใน 5%CO₂ incubator ที่ 37°C นาน 24 ชม. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมสารละลาย Fe-NTA ใน HBSS ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป 100 μ l สำหรับเซลล์ในกลุ่มควบคุมเติม HBSS และ HBSS ผสม NTA ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ เลี้ยงเซลล์ ต่ออีก 24 ชม. ก่อนนำมาวัดจำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโตด้วย MTT assay ทำการทดสอบ triplicate ในแต่ละความเข้มข้นของสาร

5.2 Cytotoxicity test (MTT assay)

ในการทดสอบผลของสารสกัดจากผลไม้หรือ quercetin ต่อเซลล์ที่ได้รับเหล็ก จะทำการ ผสม quercetin หรือ สารสกัดจากผลไม้ลงไป ใน HBSS ซึ่งมีเหล็กละลายอยู่ หลังจากครบ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เติม tetrazolium reagent (CHEMICON) 10 μ l ทั้งไว้ที่ อุณหภูมิ 37 °C 2 ชม. ดูดออก จากนั้นเติมสาร isopropanol ผสมกับกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.04 N เพื่อละลายผลึก formazan ที่เกิดขึ้น เก็บ plate ไว้ในตู้เย็น 37 °C 1 ชม. ก่อนนำออกมา เขย่า 1 นาที วัด absorbance ด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570nm ใช้ความยาวคลื่น reference 630 nm. คำนวณค่าเฉลี่ย absorbance ของเซลล์ที่ได้ treatment เดียวกัน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ absorbance ของเซลล์ควบคุม ข้อมูลคือค่าเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของเซลล์ ที่คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (% cell viability) เทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับสาร

5.3 ROS assay

ใช้วิธีการวัด Reactive oxygen species ในเซลล์ โดยใช้ DCFH-DA เป็น probe ในการ วัด เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 จำนวน 3×10^4 cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 μ l บน 96 well Black plate (Corning) เป็นเวลา 24 ชม. ก่อนให้ Fe-NTA, Fe-NTA ร่วมกับ quercetin หรือ Fe-NTA ร่วมกับสารสกัดจากผลไม้ หลังจากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS pH 7.4 150 μ l เติม DCFH-DA 25 μ M ใน HBSS 100 μ l incubate ที่อุณหภูมิ 37°C 30 นาที นำไปวัด fluorescence ด้วย microplate

reader ใช้ excitation ที่ 485 nm emission ที่ 538 nm คำนวณค่า fluorescence ของแต่ละ treatment เทียบกับ control ที่ให้เป็น 100%

5.4 Lipid peroxidation measurement

ใช้วิธีดัดแปลงมาจากวิธีของ Ringwood และคณะ (2003) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 จำนวน 2×10^5 cells/well บน six well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 24 ชม. ก่อนให้ treatment เมื่อครบตามเวลาดูด media เดิมออก เติม 1% Triton X ใน PBS 1.5 ml ใช้ cell scraper ขูดเซลล์ออก ใส่ลงใน microcentrifuge tube 2 ml นำไป centrifuge 13000g ที่ 4 °C นาน 5 นาที แยก pellet ไว้วิเคราะห์โปรตีน ส่วน supernatant นำมาวิเคราะห์ lipid peroxidation product โดยเติม 0.375% Thiobarbituric Acid (TBA) 1000 μ l และ 2% Butylated Hydroxytoluene (BHT) 20 μ l ลงใน supernatant 500 μ l ผสมกันแล้วต้มใน 100°C water bath นาน 15 นาที ก่อน centrifuge ที่ 13000g 5 นาที นำ supernatant ไปวัด absorbance ที่ 532 nm เทียบ absorbance ของตัวอย่างที่วัดได้กับกราฟของสารมาตรฐาน malondialdehyde (MDA) รายงานผลเป็น μ mole MDA / mg protein

5.5 Western blot analysis of SOD-2 expression

เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 และให้ treatment เช่นเดียวกับเซลล์ที่วัด ROS และ lipid peroxidation จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาทำการแตกเซลล์ด้วย RIPA buffer จากนั้นปั่นแยก cell lysate วัดปริมาณโปรตีนใน cell lysate โดย Bio-Rad Protein Assay นำโปรตีนจำนวน 30 ไมโครกรัม ไปทำการแยกขนาดโปรตีนใน 10% SDS-PAGE จากนั้น transfer โปรตีนจากแผ่นเจลไปยัง nitrocellulose membrane เติม primary antibody ที่เฉพาะต่อเอนไซม์ SOD (SOD2; sc-30080 Santa Cruz Biotechnology) 1: 1000 dilution incubate ให้ antibody จับกับโปรตีน ล้าง แล้วจึง incubate ต่อด้วย secondary antibody (anti-IgG-HRP) ตรวจทดสอบ band โปรตีนที่เกิดขึ้นด้วย enhanced chemiluminescence detection kit ใช้โปรตีน β -actin ตรวจทดสอบ ปริมาณของโปรตีนแต่ละตัวอย่างในการทำ Electrophoresis แต่ละครั้ง

ผลการทดลองและบทวิจารณ์

ส่วนที่1 ความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ไทยโดยวิธี cellular และ chemical antioxidant activity assay

1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้

ตารางที่1 Total phenolic contents and total antioxidant activity

Fruit	FRAP umolesTE/100g	ORAC umolesTE/100g	DPPH mgAA/100g	Polyphenol mgGAE/100g
Strawberry	1459.25	2584.5	322.04	272.87
Carambola	745.125	2031.125	248.99	137.82
Guava	870.375	1355.625	210.62	176.57
Pomelo	225.75	1186.375	5.90	55.18
Tangerine	318.375	984.5	8.23	53.1
Long kong	118.5	585.375	13.04	64.21

จากตารางที่1. จะเห็นได้ว่าปริมาณสารฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ทั้ง 6 ชนิด ที่วัดด้วยวิธี FRAP ORAC และ DPPH เป็นไปในทางเดียวกัน สามารถแบ่งผลไม้ออกเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่มีสารฟีนอลิกสูงได้แก่ สตรอเบอรี่(strawberry) มะเฟือง(carambola) และฝรั่ง(guava) จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงด้วยไม่ว่าจะใช้วิธีการใดวัด ส่วนกลุ่มที่มีปริมาณสารฟีนอลิกต่ำก็จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำด้วย ผลไม้ในกลุ่มนี้คือ ส้มโอ(pomelo:tongdee) ส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้ง (tangerine: special honey) และลองกอง (Long Kong)

1.2 ความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ในเซลล์ (Cellular antioxidant activity หรือ CAA assay)

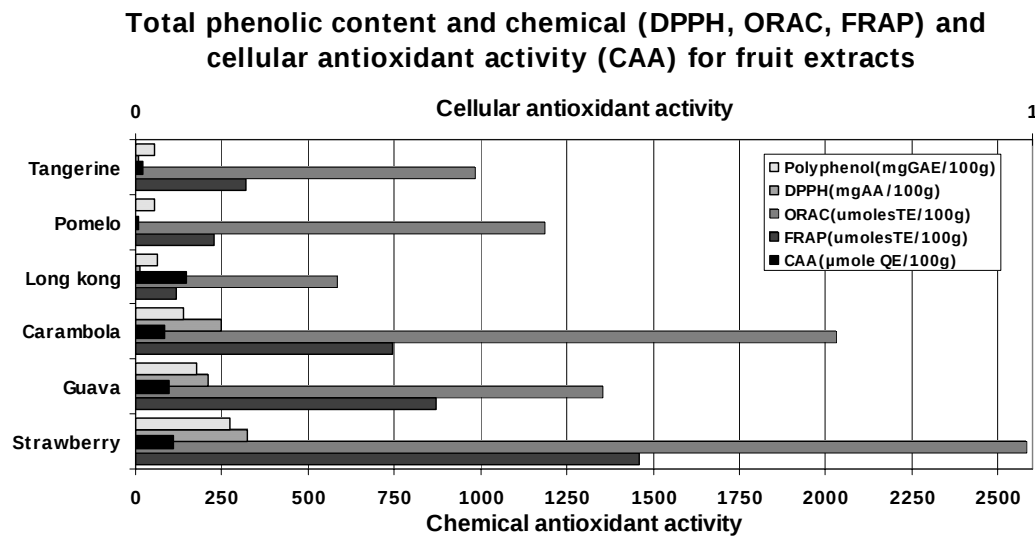
ตารางที่ 2 Cellular antioxidant activity (CAA) ของ quercetin และผลไม้ วัดในเซลล์ HepG2

	^b EC ₅₀	CAA(μmoleQE/100g)	^a Cytotoxic conc.
Quercetin	4.83 μM		> 20 μM
Strawberry	5.75 mg/ml	0.042	> 2 mg/ml
Carambola	7.5 mg/ml	0.032	> 2 mg/ml
Guava	6.36 mg/ml	0.038	> 2 mg/ml
Long kong	4.35 mg/ml	0.056	> 10 mg/ml
Tangerine	27.72 mg/ml	0.004	> 10 mg/ml
Pomelo	55.95 mg/ml	0.008	> 10 mg/ml

^a Dose at which the cell number is reduced by >10% after 24 h of treatment

^b median effective dose (EC₅₀) was determined from the median effect plot of log(*fa*/*fu*) versus log(dose), where *fa* is the fraction affected (CAA unit) and *fu* is the fraction unaffected (1 - CAA unit) by the treatment. The EC₅₀ values were stated as mean for triplicate sets of data obtained from the same experiment.

จากตารางที่ 2 เมื่อพิจารณาจากค่า EC₅₀ ที่ได้จากกราฟ median effect plot เป็นความเข้มข้นที่ทำให้ log (*fa*/*fu*) = 0 ซึ่งก็คือความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระในเซลล์ได้ 50% พบว่าค่า EC₅₀ ของ quercetin 4.83 μM และ สตรอเบอรี่ 5.75 mg/ml ใกล้เคียงกับค่า EC₅₀ ของ quercetin 5.92 μM และสตรอเบอรี่ 5.46 mg/ml ที่รายงานโดย Wolfe และคณะ (2007, 2008) ซึ่งใช้วิธีและทดสอบในเซลล์เดียวกัน ที่ต่างกันคือส้ม ค่าที่ Wolfe รายงาน คือ 54 mg/ml ซึ่งค่านี้จะใกล้เคียงกับ EC₅₀ ของส้มโอที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้



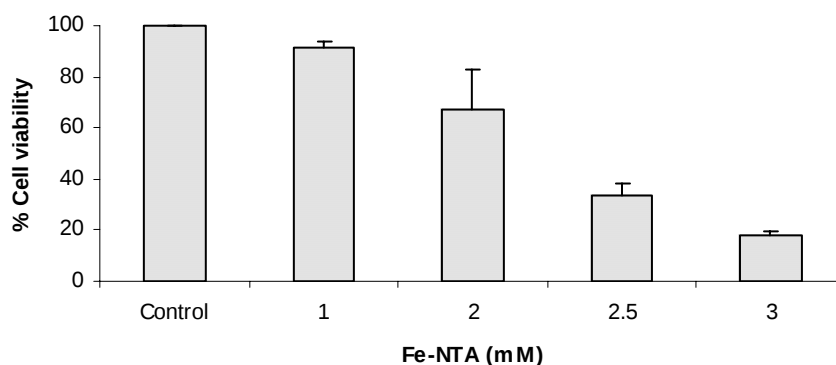
รูปที่ 1 Chemical และ Cellular antioxidant activity ของสารสกัดจากผลไม้

จากรูปที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบกับ Antioxidant activity ที่ได้จาก chemical assay 3 วิธีแรก กับค่า cellular antioxidant activity (CAA) ซึ่งคำนวณออกมาในหน่วยของ micromoles of QE per 100 g of fruit จะเห็นได้ว่าผลการทดสอบเป็นไปในทางเดียวกันคือ ผลไม้ที่มีค่า chemical antioxidant activity สูง ก็จะมีความสามารถในการยับยั้งการเกิด ROS ในเซลล์ได้ดีกว่าผลไม้ที่มี Chemical antioxidant activity ต่ำ และแปรตามปริมาณสาร polyphenol ในผลไม้ ยกเว้น ลองกองซึ่งแม้ว่าค่า ORAC FRAP DPPH และ polyphenol จะต่ำสุดแต่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์กลับสูงกว่าผลไม้ชนิดอื่นๆ

CAA assay เป็นการวัด antioxidant activity ของสารในเซลล์ดังนั้นผลที่ออกมา นอกจากจะขึ้นอยู่กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารแล้วยังขึ้นอยู่กับกระบวนการดูดซึมและส่งผ่านสารเข้าไปในเซลล์ metabolism และการกระจายตัวของ bioactive compound ในส่วนต่างๆของเซลล์ ในการศึกษา นี้มีการล้างเซลล์ด้วย PBS หลังให้สารสกัดแล้วจึงใส่ oxidant เพื่อวัด CAA ดังนั้น antioxidant activity จึงมาจากสารต้านอนุมูลอิสระที่เซลล์สามารถดูดซึมเข้าไปได้ ลองกองมีค่า CAA สูงสุด ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากสาร antioxidant ในสารสกัดจากลองกองเป็นกลุ่มที่มี bioavailability สูง หรือการออกฤทธิ์ขึ้นอยู่กับกระบวนการ metabolism ในเซลล์ได้เมตาโบไลต์ที่ต่างไปจากเดิม ซึ่งอาจจะต่างไปจากผลไม้ชนิดอื่นๆในกลุ่มที่ให้ CAA สูง ดังนั้นการใช้ CAA assay น่าจะมีประโยชน์เพิ่มขึ้นจากการใช้เฉพาะวิธีทางเคมีในการวัด antioxidant activity โดยเฉพาะการ screen สารจากอาหารหรือจากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติอื่นๆ ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระไม่สูงมากแต่ อาจจะเป็นชนิดที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ได้

ส่วนที่ 2 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ไทยในการป้องกันหรือลดพิษจากภาวะ oxidative stress ที่เกิดจากเหล็กในเซลล์ตับของมนุษย์

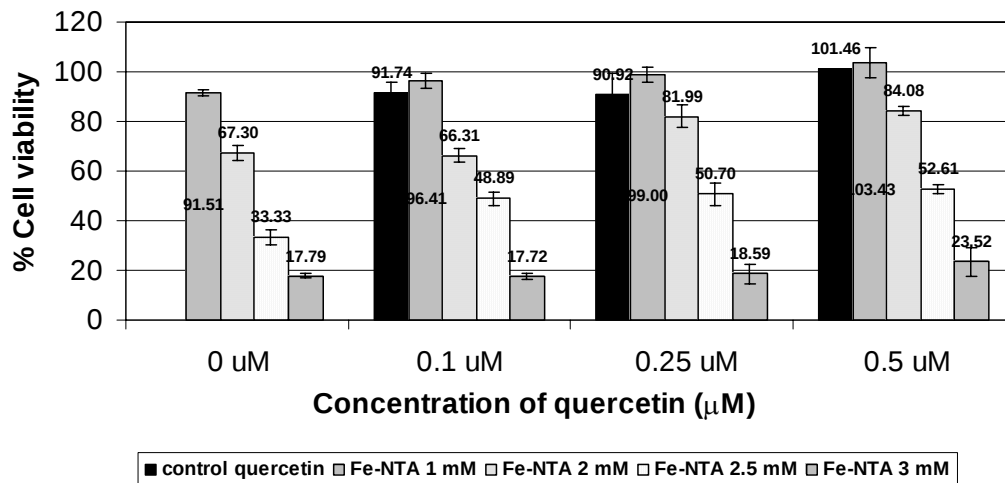
2.1 ผลของ Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ HepG2



รูปที่ 2 ผลของ Ferric Nitrilotriacetate (Fe-NTA) ต่อ % cell viability ของ HepG2 cells เลี้ยงใน Fe-NTA 24 ชม. แสดงผลเป็น mean±SEM จาก 3 การทดลอง

Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) เป็นสารประกอบระหว่างเหล็กและ nitrilotriacetic ละลายน้ำได้ดีใน pH ที่เป็นกลาง มี 2 ฟอรัมสามารถจับกับประจุตรงข้ามในmembrane ทำให้เกิด lipid peroxidation เมื่อ lipid ในmembrane สัมผัสกับ O_2 และ chelated Fe^{3+} โดยมีองค์ประกอบอื่นๆเช่น preformed lipid peroxides , สารที่สามารถรีดิวซ์ chelated Fe^{3+} ให้เป็น Fe^{2+} จากนั้น ferrous ion ที่เกิดขึ้นในขั้นแรกจะต้องออกซิไดซ์ lipid ก่อนจึงจะเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ขึ้นต่อไป (Fukuzawa และคณะ, 2000)

2.2 ผลของ quercetin ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ HepG2 ที่ได้รับเหล็ก

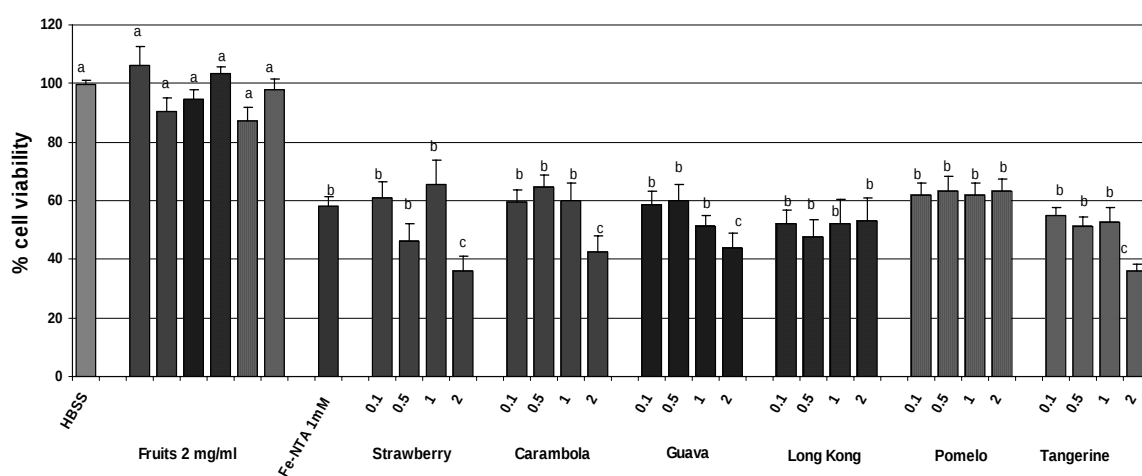


รูปที่ 3 ผลของ quercetin 0.1-0.5 μM ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ HepG2 ด้วย Fe-NTA แสดงผลเป็น mean ± SEM จาก 3 การทดลอง

จากรูปที่ 3 พบว่า quercetin 0.1-0.5 μM เพิ่ม % cell viability ของเซลล์ที่ได้รับ Fe-NTA โดยแปรไปตามขนาดของ quercetin และ quercetin ที่ความเข้มข้นดังกล่าวเมื่อให้กับ HepG2 ภายในเวลา 24 ชั่วโมงไม่มีผลต่อ % cell viability

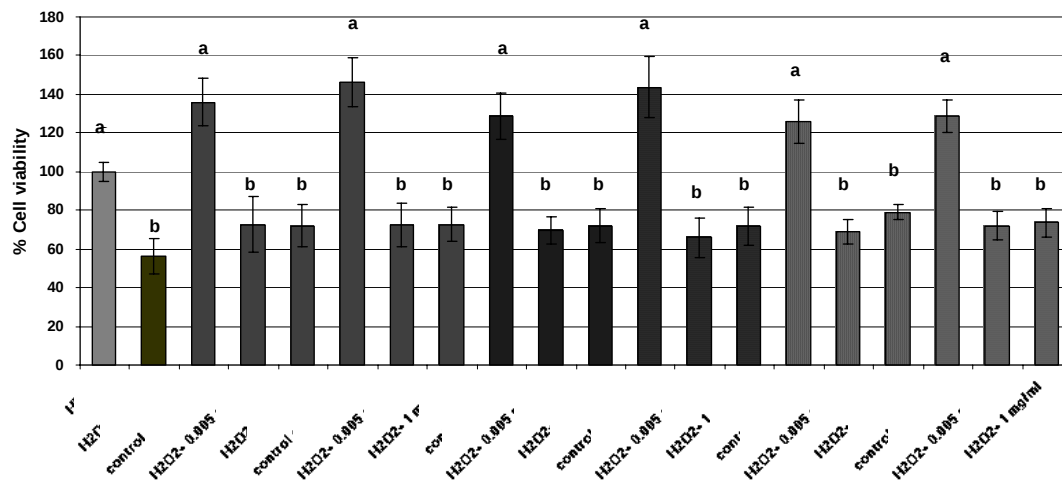
2.3 ผลของสารสกัดจากผลไม้ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ HepG2 ที่ได้รับเหล็กหรือ H_2O_2

จากการทำ Cytotoxicity tests ของสารสกัดจากสตรอเบอรี่ มะเฟือง ฝรั่ง ส้มโอ ลองกอง และส้มสายน้ำผึ้งต่อเซลล์ HepG ทดสอบในเวลา 24 ชม. พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ %cell viability ต่ำกว่า 90% เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมคือ มากกว่า 2 mg/ml สำหรับสตรอเบอรี่ ฝรั่ง มะเฟือง และ มากกว่า 10 mg/ml สำหรับส้มโอ ลองกองและส้มสายน้ำผึ้ง จึงใช้ความเข้มข้นไม่เกิน 2 mg/ml ในการทดสอบผลของสารสกัดจากผลไม้ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ HepG2 ที่ได้รับเหล็ก



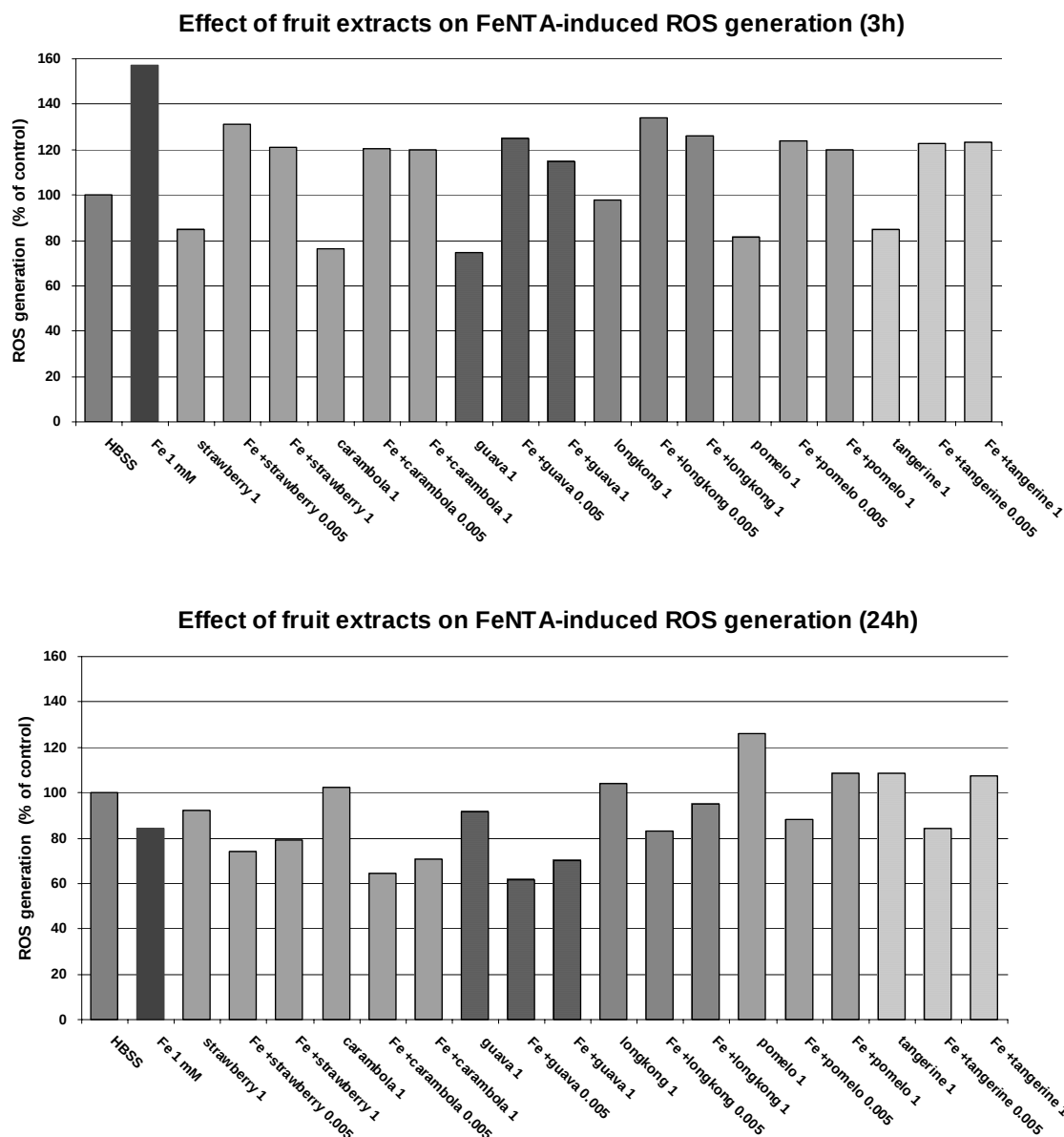
รูปที่ 4 ผลของสารสกัดจากผลไม้ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ HepG2 ด้วย Fe-NTA แสดงผลเป็น mean $\pm$ SEM จาก 4 การทดลอง

จากรูปที่ 4 เป็นผลการทดสอบให้สารสกัดจากผลไม้แก่เซลล์ HepG2 ที่ได้รับเหล็ก พบว่า Fe-NTA 1mM ลด % viability ของเซลล์เหลือประมาณ 60% ของกลุ่มควบคุม เมื่อให้สารสกัดจากผลไม้ร่วมกับเหล็กพบว่าที่ความเข้มข้น 0.1-1 mg/ml สารสกัดจากผลไม้ทุกชนิดไม่มีผลต่อการลดลงของ % cell viability ที่เกิดจากเหล็ก และที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ซึ่งสารสกัดจากผลไม้ทั้ง 6 ชนิดไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ HepG2 แต่เมื่อให้ร่วมกับเหล็กพบว่าช่วยส่งเสริมความเป็นพิษของเหล็กคือยับยั้งการเจริญเติบโตของ HepG2 มากกว่าการให้เหล็กอย่างเดียว



รูปที่ 5 ผลของสารสกัดจากผลไม้ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ HepG2 ด้วย H₂O₂ แสดงผลเป็น mean ± SEM จาก 2 การทดลอง

จากรูปที่ 5 เป็นผลการทดสอบให้สารสกัดจากผลไม้แก่เซลล์ HepG2 ที่ได้รับเหล็ก พบว่า H₂O₂ 200 mM ลด % viability ของเซลล์เหลือประมาณ 60% ของกลุ่มควบคุมใกล้เคียงกับการให้ Fe-NTA 1mM สารสกัดจากผลไม้ทั้ง 6 ชนิดในความเข้มข้นสูงสุดไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ HepG2 เมื่อให้สารสกัดจากผลไม้ร่วมกับ H₂O₂ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.005-1 mg/ml สารสกัดจากผลไม้ทุกชนิดสามารถลดการเกิดพิษของ H₂O₂ โดยลดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HepG2 ทำให้ %viability ของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากผลไม้ร่วมกับ H₂O₂ สูงกว่าในเซลล์ที่ได้ H₂O₂ อย่างเดียวอย่างชัดเจนแม้จะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ



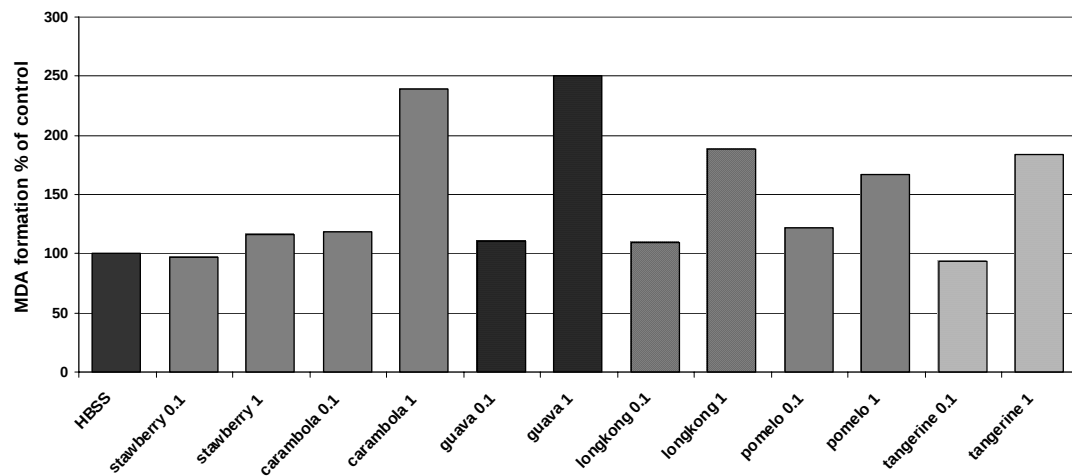
รูปที่ 7 ผลของสารสกัดจากผลไม้ต่อระดับ ROS ในเซลล์ HepG2 ที่ได้รับ Fe-NTA

การทดสอบผลของสารสกัดจากผลไม้ต่อการสร้าง ROS ในเซลล์ HepG2 ที่ได้รับเหล็กใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 0.005 และ 1 mg/ml โดยให้รวมไปกับ Fe-NTA 1mM เป็นเวลา 3 และ 24 ชั่วโมง พบว่าในเวลา 3 ชั่วโมงเซลล์ที่ได้รับเหล็กอย่างเดียวมีระดับ ROS ในเซลล์เพิ่มสูงถึง 160 % ของเซลล์ควบคุม เซลล์ที่ได้สารสกัดผลไม้แต่ละชนิด 1 mg/ml มีระดับ ROS ประมาณ 80% ของเซลล์ควบคุม ส่วนระดับ ROS ในเซลล์กลุ่มที่ได้รับเหล็กรวมไปกับสารสกัดจากผลไม้ 0.005 และ 1 mg/ml มีค่าอยู่ในช่วง 120-134 % ของกลุ่มควบคุม

สำหรับเซลล์ที่ทำการทดสอบเช่นเดียวกันแต่ใช้เวลา 24 ชั่วโมงพบว่า เซลล์ที่ได้เหล็กอย่างเดียวนี้อาจมีระดับ ROS ลดลงเป็น 80% ของเซลล์ควบคุม ในเซลล์ที่ได้สารสกัดจากผลไม้ 1 mg/ml มีระดับ ROS ใกล้เคียงกับเซลล์ควบคุมยกเว้นส้มโอซึ่งมี ROS สูงถึง 125% ของเซลล์ควบคุม เซลล์ที่ได้เหล็กพร้อมกับสารสกัดจาก สตรอเบอรี่ มะเฟือง และ ฝรั่ง มีระดับ ROS ในช่วงต่ำกว่าเซลล์ที่ได้เหล็กอย่างเดียวคือ 60-70% ส่วนเซลล์กลุ่มที่ได้เหล็กและสารสกัดจาก ลองกอง ส้มโอ และ ส้มเขียวหวานที่ความเข้มข้น 0.005 mg/ml มีระดับ ROS ใกล้เคียงหรือสูงกว่าเซลล์ที่ได้เหล็กอย่างเดียวเล็กน้อยคือ 80-90% ของกลุ่มควบคุม ในขณะที่สารสกัดจากผลไม้กลุ่มนี้ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml เมื่อให้รวมไปกับเหล็กมีผลให้ระดับ ROS สูงกว่าเซลล์ที่ได้เหล็กอย่างเดียวคือประมาณ 90-100%

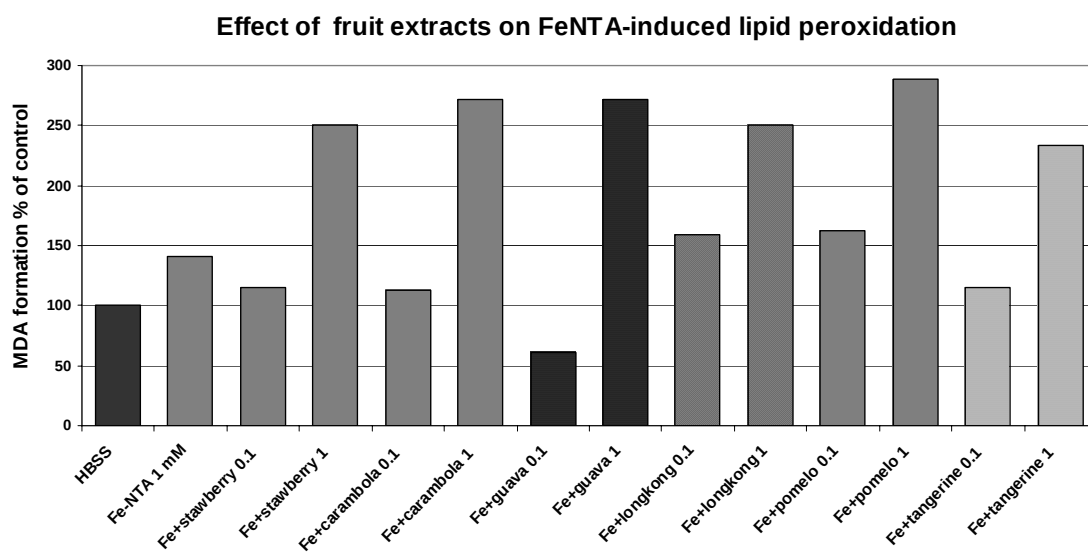
2.5 ผลของสารสกัดจากผลไม้ต่อการเกิด lipid peroxidation ในเซลล์ HepG2

ทำการทดสอบผลของสารสกัดจากผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 mg/ml ต่อการเกิด lipid peroxidation ในเซลล์ทั้งที่ได้และไม่ได้รับเหล็กพร้อมด้วยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 8 ผลของสารสกัดจากผลไม้ต่อระดับ MDA ในเซลล์ HepG2

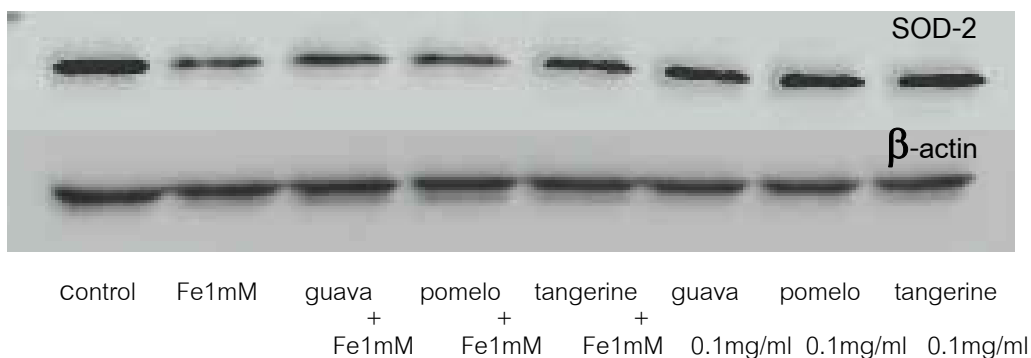
สารสกัดจากผลไม้ทุกชนิดที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ไม่มีผลต่อจำนวน MDA แต่ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml สารสกัดจากผลไม้ทุกชนิดยกเว้นสตรอเบอรี่มีผลเพิ่มระดับ MDA สูงกว่ากลุ่มควบคุม



รูปที่ 9 ผลของสารสกัดจากผลไม้ต่อระดับ MDA ในเซลล์ HepG2 ที่ได้รับ Fe-NTA

เมื่อให้เหล็กและสารสกัดจากผลไม้รวมไปกับเหล็กพบว่าในเซลล์ที่ได้เหล็กในรูปแบบ Fe-NTA 1mM มีระดับ MDA สูงขึ้นถึงประมาณ 160% ของเซลล์ควบคุม ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ในเซลล์ที่ได้สารสกัดจากสตอเบอรี่ มะเฟือง ฝรั่งและส้มเขียวหวานรวมไปกับเหล็กลดระดับ MDA ลงใกล้เคียงหรือต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนลองกองและส้มโอไม่มีผลต่อระดับ MDA ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ที่ได้รับเหล็ก ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml สารสกัดจากผลไม้ทุกชนิดเมื่อให้รวมกับเหล็กมีผลทำให้ระดับ MDA ในเซลล์สูงกว่าเซลล์ที่ได้เหล็กอย่างเดียว

2.6 ผลของสารสกัดจากผลไม้ต่อปริมาณเอนไซม์ SOD-2 (MnSOD) ในเซลล์ HepG2



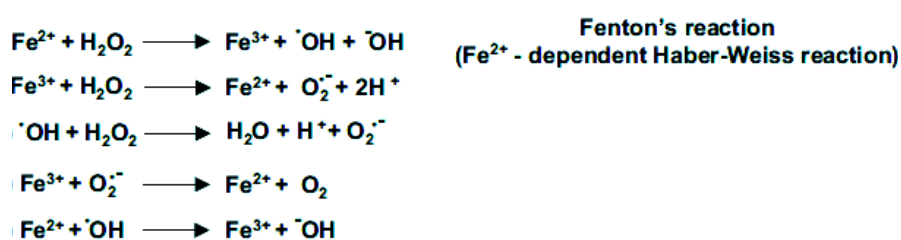
รูปที่ 10 ผลของ Fe-NTA และสารสกัดจากผลไม้ต่อปริมาณโปรตีน SOD-2 ในเซลล์ HepG2

จากรูปที่ 10 ระดับเอนไซม์ SOD-2 ในเซลล์แสดงโดยความเข้มของ band ในเซลล์กลุ่มควบคุมมีระดับ SOD-2 สูงสุด ในเซลล์ที่ได้สารสกัดจากผลไม้คือ ฝรั่ง ส้มโอ ส้มเขียวหวาน 0.1 mg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มของ band ใกล้เคียงกับเซลล์ควบคุม ในเซลล์ที่ได้เหล็กอย่างเดียวให้ band ของโปรตีน SOD-2 ที่บางที่สุด แต่เมื่อให้สารสกัดจากฝรั่ง ส้มโอ ส้มเขียวหวาน 0.1 mg/ml ร่วมไปกับเหล็ก band ของ SOD-2 มีความเข้มมากกว่าในเซลล์ที่ให้เหล็กอย่างเดียว

จากผลการศึกษาในส่วนที่ 2 พบว่าการ induce ให้เซลล์มีภาวะ oxidative stress จากเหล็กในรูปแบบ Fe-NTA ต้องให้ Fe-NTA เตรียมใน HBSS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงจะทำให้ cell viability ลดลงตามความเข้มข้นของ Fe-NTA ซึ่งการให้เซลล์อยู่ใน HBSS อาจจะทำให้ GSH ในเซลล์ลดลงมี lipid peroxidation เกิดขึ้นจำนวนหนึ่งในเซลล์ ทำให้ได้ lipid peroxides ส่งเสริมให้เกิด lipid peroxidation และ oxidative damage จาก Fe-NTA ได้ง่ายขึ้น ซึ่งจากการศึกษาของ Wang และ Hu (2000) มีการใช้ buthionine sulfoximine (BSO) ยับยั้งการสังเคราะห์ GSH ในเซลล์ HepG2 48 ชม. ก่อนให้ Fe-NTA

เนื่องจาก quercetin เป็นสารฟลาโวนอลซึ่งพบได้เป็นปกติในผัก ผลไม้ ชา ไวน์ ถั่วเปลือกแข็ง และเมล็ดพืช มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งทดสอบได้ในเซลล์ HepG2 (Alia และคณะ 2005, 2006) ในการทดสอบผลของสารสกัดจากผลไม้ต่อพิษที่เกิดจากการได้รับเหล็กในรูปแบบของ Fe-NTA ในเซลล์ HepG2 ได้ทดสอบผลของ quercetin ก่อน เพื่อเป็นแนวทางหาช่วงความเข้มข้นของเหล็ก วิธีการ และระยะเวลา treatment ที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถเห็นประสิทธิภาพของสารสกัดได้ พบว่า ความเข้มข้นของ quercetin 0.1-0.5 μM สามารถลดการตายของเซลล์ที่เกิดจาก Fe-NTA และแปรตาม dose ของ quercetin แต่เมื่อทำการทดสอบให้สารสกัดจากผลไม้แก่เซลล์ HepG2 ที่ได้รับเหล็ก โดยใช้ความเข้มข้นซึ่งต่ำกว่า cytotoxic dose เมื่อให้สารสกัดจากผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.1-1 mg/ml ร่วมไปกับเหล็กพบว่าสารสกัดจากผลไม้ทุกชนิดไม่มีผลช่วยยับยั้งการตายของเซลล์ที่เกิดจากเหล็กอย่างชัดเจน และที่ความเข้มข้นสูงสุด 2 mg/ml เมื่อให้ร่วมกับเหล็กพบว่าแสดงคุณสมบัติ pro-oxidant เพิ่มความเป็นพิษของเหล็กคือยับยั้งการเจริญเติบโตของ HepG2 มากกว่าการให้เหล็กอย่างเดียว นอกจากนี้เมื่อทดสอบสารสกัดจากผลไม้ในเซลล์ HepG2 ที่ induce ให้มีภาวะ oxidative stress ด้วย H_2O_2 ด้วยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายเท่ากับที่ให้ Fe 1 mM พบว่าที่ความเข้มข้น 0.005 และ 1mg/ml ผลไม้ทุกชนิดสามารถลดการตายของเซลล์จาก H_2O_2 ได้ชัดเจนแม้ว่าจะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ดังนั้นผลของสารสกัดจากผลไม้ต่อการลดพิษจาก oxidative damage ในเซลล์ที่ได้ Fe-NTA ซึ่งต่างกับโมเดลที่ใช้ H_2O_2 เป็นสาร oxidant สาเหตุส่วนหนึ่งอาจจะมาจากตัวเหล็กเองซึ่งในการทดสอบกับเซลล์แม้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ในผลไม้จะได้ทำหน้าที่ลดอนุมูลอิสระในเซลล์แต่ในขณะเดียวกันเหล็กที่สูงอยู่ตลอดเวลา ก็สามารถทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ซึ่งเกิดจากกระบวนการ dismutation ได้ ROS เกิดขึ้นอีกเช่นกันดังปฏิกิริยาข้างล่าง (Novo และ Parola, 2008)



นอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์บางตัวในขณะกำจัดหรือ neutralize อนุมูลอิสระก็สามารถสร้าง H_2O_2 ขึ้นมาใหม่ได้ด้วย โดยเฉพาะฟลาโวนอยด์ที่มี radical scavenging activity สูงๆ ได้แก่ myricitrin และ quercetin เช่น เมื่อให้ myricitrin ร่วมไปกับ H_2O_2 แก่เซลล์หลังจาก 2 ชั่วโมงพบว่าระดับของ H_2O_2 สูงกว่าระดับที่ให้กับเซลล์เริ่มแรก ซึ่งความสามารถในการสร้าง H_2O_2 อาจจะเป็นเนื่องมาจากคุณสมบัติ strong hydrogen donating ที่มีต่อออกซิเจนของฟลาโวนอยด์ ความสามารถในการสร้าง H_2O_2 กับ radical scavenging activity ของฟลาโวนอยด์จะเป็นไปในทางเดียวกันแต่จะแปรผกผันกับความสามารถลด ROS ที่เกิดขึ้นในเซลล์ ดังนั้นฟลาโวนอยด์ที่มี radical scavenging activity ก็แสดงคุณสมบัติ pro-oxidant ได้ง่ายด้วย (Yokomizo และ Moriwaki, 2005)

ดังนั้นคุณสมบัติ Pro-oxidant ของฟลาโวนอยด์ร่วมกับระดับของเหล็กที่สูงตลอดเวลา อาจจะทำให้การลดหรือป้องกัน oxidative damage ของสารสกัดจากผลไม้เป็นไปได้ไม่ได้ไม่ โดยเฉพาอย่างยิ่งการ treat เซลล์ด้วยเหล็กและสารสกัดเป็นเวลานานถึง 24 ชั่วโมง ซึ่งข้อจำกัดมาจากการ induce ให้เกิด oxidative stress จาก Fe-NTA จะต้องใช้เวลา 24 ชั่วโมงขึ้นไปจึงจะเห็น cytotoxic effect ที่แตกต่างกับเซลล์ควบคุมอย่างชัดเจน

จากการศึกษาครั้งนี้ Quercetin แสดงคุณสมบัติ cytoprotective effect ต่อเซลล์ที่ได้เหล็ก เมื่อให้ใน dose สูงก็แสดงคุณสมบัติ pro-oxidant เช่นเดียวกับสารสกัดจากผลไม้เช่นกัน โดยเห็นได้จากทั้งผลของ cytoprotective assay, ROS generation และ MDA formation ซึ่งสารสกัดจากผลไม้ dose ต่ำ อาจจะทำให้ผลต่อเซลล์ที่ไม่ต่างหรือดีกว่าการได้เหล็กอย่างเดียว แต่ถ้าให้ dose สูงก็จะส่งเสริม oxidative damage จากเหล็ก ในการทดสอบวัด ROS generation ในเซลล์ที่ได้เฉพาะสารสกัดจากผลไม้ สารสกัดจากผลไม้สามารถลด ROS ในเซลล์ได้แม้ในเวลานานถึง 24 ชั่วโมง แต่เมื่อให้เหล็กด้วยการลด ROS ที่ 3 จะดีกว่า 24 ชั่วโมง ผลดังกล่าวอาจจะแสดงถึงผลของเหล็กที่รบกวนการทำงานของ antioxidant

SOD-2 หรือ Mn-SOD ในไมโทคอนเดรียทำหน้าที่เปลี่ยน superoxide เป็น hydrogen peroxide ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำด้วย catalase หรือ glutathione peroxidase จากการศึกษาของ Jagetia และคณะ (2004) พบว่า naringin ซึ่งเป็นสารฟลาโวนพบมากใน เกรปฟรุ๊ตและพีชตระกูลส้มสามารถเพิ่มโปรตีน SOD catalase ในเซลล์ HepG2 แต่เมื่อเซลล์ได้รับเหล็กอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดการออกซิเดชันของชีวโมเลกุลรวมทั้งโปรตีน ทำให้เกิดการ denature และสูญเสีย biological activities ของโปรตีน ซึ่ง naringin สามารถลดการเกิดออกซิเดชันของโปรตีน antioxidant enzymes ในเซลล์ที่ได้รับเหล็กด้วย ในการศึกษาพบว่าในเซลล์ที่ได้สารสกัดจากฝรั่ง ส้มโอ และส้มเขียวหวานมีโปรตีน SOD-2 ไม่ต่างจากเซลล์ควบคุม เมื่อได้ Fe-NTA 1 mM ความเข้มของ band โปรตีน SOD-2 ลดลงจากผลของเหล็ก แต่เมื่อให้สารสกัดจากฝรั่ง ส้มโอ และ

สัมผัสเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระจะช่วยลดความเสียหายที่เกิดกับโปรตีนในเซลล์ band ของ SOD-2 จึงเข้มกว่าของเซลล์ที่ได้เหล็กอย่างเดียว

สรุปผลการทดลอง

1. ผลการวัด antioxidant activity โดยวิธีทางเคมี กับการวัดในเซลล์ให้ผลเป็นไปในทางเดียวกันเป็นส่วนมาก ยกเว้นลองกองซึ่งผลเป็นไปในทางตรงข้าม อาจจะเนื่องมาจาก bioavailability ของสาร antioxidant ในสารสกัดจากลองกอง กระบวนการ metabolism ในเซลล์ วิธีทางเคมีจึงยังสามารถใช้ได้และเป็นประโยชน์ในการศึกษาเบื้องต้น แต่การใช้ CAA assay จะได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับปัจจัยทางชีววิทยา เช่น การนำไปใช้และการออกฤทธิ์ในเซลล์
2. ในการศึกษาี้ผลการวัด antioxidant activity ของผลไม้ด้วยการวิธีเคมีและการใช้เซลล์ อาจจะใช้ประเมินคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระจากผลไม้ได้โดยเบื้องต้น ในเรื่องของประสิทธิภาพต่อเซลล์ที่มีภาวะ oxidative stress ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด เช่น ลักษณะของเซลล์ โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระ ส่วนประกอบและปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในผลไม้แต่ละชนิดที่ต่างกัน ชนิดของ oxidant
3. ผลของสารสกัดจากผลไม้ไม่ได้ลดการตายของเซลล์ที่เกิดกับเซลล์อย่างชัดเจน และมีแนวโน้มว่าใน dose ที่สูงจะทำให้เกิดพิษจากเหล็กต่อเซลล์มากขึ้น อาจจะเกิดจาก interaction ของสาร antioxidant บางตัวหรือสารอื่นๆในผลไม้กับเหล็ก เช่น สามารถ reduce Fe^{3+} ให้เป็น Fe^{2+} ได้มากขึ้น ทำให้เหล็กเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น หรือ สารฟีนอลบางตัวมีลักษณะโครงสร้างที่เอื้อต่อการเป็น pro-oxidant ในขณะที่กำจัดอนุมูลอิสระก็อาจจะสร้างสาร เช่น H_2O_2 ซึ่งส่งเสริมการสร้าง ROS ในเซลล์ได้ในขณะเดียวกัน
4. ควรจะมีการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับเรื่องดังกล่าวถึงในแง่ของกลไกและการค้นหาสารต้านอนุมูลอิสระที่ให้ผลเหมาะสมกับสาเหตุของ Oxidative stress เพราะมีความสำคัญต่อความปลอดภัยในการใช้สารต้านอนุมูลอิสระในรูปของ food supplement หรือสารสังเคราะห์ โดยเฉพาะในภาวะที่พยาธิสภาพมีลักษณะเฉพาะเช่น มีเหล็กเกิน

เอกสารอ้างอิง

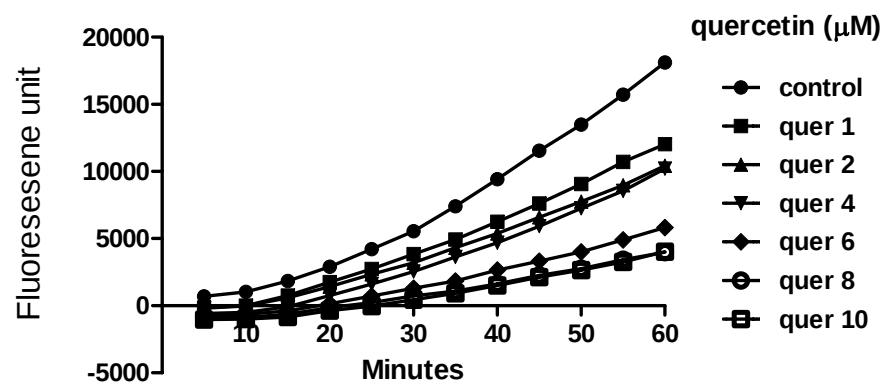
- Alia M, Ramos S, Mateos R, Granado-Serrano AB, Bravo L, Goya L (2005). Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology* 212: 110-118.
- Alia M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L (2006). Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur J Nutr* 45: 19-28.
- Chu F, Sun J, Wu X, Liu R (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *J Agri Food Chem* 50: 6910-6916.
- Chandrasekaran CV, Sundarajan K, David K, Agarwal A (2009) In vitro efficacy and safety of poly-herbal formulations. *Toxicology in Vitro* (in press).
- Dewanto V, Wu X, Adom K, and Liu R (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 3010 – 3014.
- Diesen DL, Kuo PC (2010). A nitric oxide and redox regulation in the liver: Part II. Redox biology in pathologic hepatocytes and implications for intervention. *J Surg Res*: 1–17. (Article in Press)
- Fukuzawa K, Tokumura A, Kogure K, Iemura M, Gondoh N, Fujii M, Ueno S, Shibata A (2000) A comparative study of the ability of ferric nitriloacetate and other iron chelators to assist membrane lipid peroxidation by superoxide radicals. *Chemistry and Physics of Lipids* 110: 69-84.
- Jagetiaa, Reddya, Venkateshaa, Kedlayab (2004) Influence of naringin on ferric iron induced oxidative damage in vitro. *Clinica Chimica Acta* 347: 189–197.
- Kaur C, Kapoor HC (2001). Antioxidants in fruits and vegetables: the millennium's health *Int J Food Sci Tech* 36: 703-725.
- Novo E and Parola M (2008) Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis & Tissue Repair* 13: 1-5.

- Ringwood AH, Hoguet J, Keppler CJ, Gielazyn ML, Ward BP, Rourk AR (2003) Cellular Biomarkers (Lysosomal Destabilization, Glutathione & Lipid Peroxidation) in Three Common Estuarine Species: A Methods Handbook. *Marine Resources Research Institute South Carolina Department of Natural Resources, SC 29412*.
- Szeto Y, Chu W, Benzie I (2006). Antioxidant in fruits and vegetables: a study of cellular availability and direct effects on human DNA. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 2552-2555.
- Tanaka Y, Aleksunes LM, Goedken MJ, Chen C, Reisman SA, Manautou JE, Klaassen CD (2008) Coordinated induction of Nrf2 target genes protects against iron nitrilotriacetate (FeNTA)-induced nephrotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 231: 364-373.
- Wang YF and Hu ML (2000) Use of rat liver slices for the study of oxidative DNA damage in comparison with isolated rat liver nuclei and HepG2 human hepatoma cells. *Food and Chemical Toxicology* 38: 451-458.
- Wolfe K, Liu R (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 55: 8896–8907.
- Wolfe K, Kang X, He X, Dong M, Zhang Q, Liu R (2008). Cellular Antioxidant Activity of Common Fruits. *J Agric Food Chem* 56: 8418–8426.
- Yokomizo A, Moriwaki M (2006) Effects of uptake of flavonoids on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human intestinal Caco-2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:1317-1324.

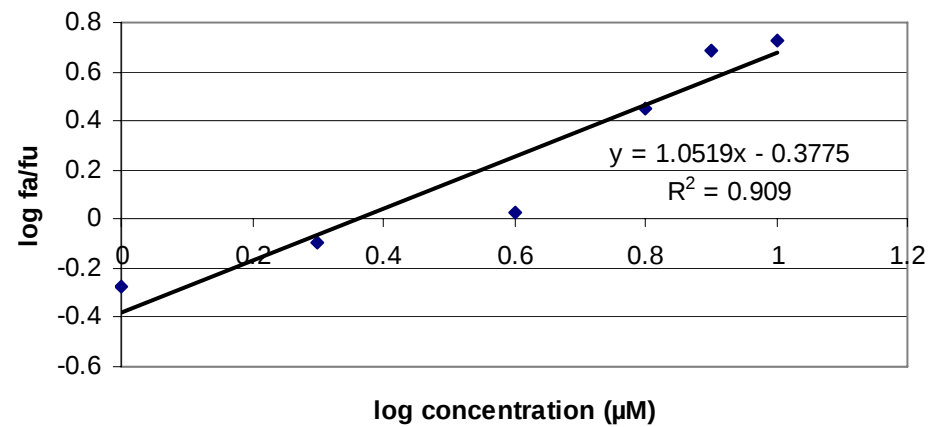
ภาคผนวก
ข้อมูลดิบของผลการวิจัย

ตารางที่ 1. Chemical antioxidant activities of fruit extracts												
Fruits	FRAP/ml	FRAP/100g	average	SD	ORAC/ml	ORAC/100g	average	SD	DPPH/100ml	DPPH/100gm	average	SD
Strawberry	32.83	1641.5	1459.25	200.12	56.5	2825	2584.5	311.55	642.92	321.46	322.04	15.36
Strawberry	32.46	1623			57.64	2882			663.9	331.95		
Strawberry	25.95	1297.5			46.15	2307.5			668.39	334.195		
Strawberry	25.5	1275			46.47	2323.5			601.12	300.56		
Carambola	16.17	808.5	745.13	62.72	40.1	2005	2031.13	40.11	433.02	216.51	248.99	31.87
Carambola	15.79	789.5			40.04	2002			453.68	226.84		
Carambola	13.78	689			40.58	2029			556.7	278.35		
Carambola	13.87	693.5			41.77	2088.5			548.54	274.27		
Guava	19.08	954	870.38	77.88	25.62	1281	1355.625	68.85	386.86	193.43	210.62	16.96
Guava	18.38	919			26.42	1321			398.03	199.015		
Guava	15.95	797.5			27.66	1383			456.11	228.055		
Guava	16.22	811			28.75	1437.5			443.93	221.965		
Pomelo	4.63	231.5	225.75	11.72	22.33	1116.5	1186.375	69.97	9.57	4.785	5.90	1.34
Pomelo	4.79	239.5			23.31	1165.5			9.54	4.77		
Pomelo	4.32	216			23.61	1180.5			14.82	7.41		
Pomelo	4.32	216			25.66	1283			13.29	6.645		
Tangerine	8.25	412.5	318.38	106.49	20.64	1032	984.5	52.25	14.02	7.01	8.23	1.49
Tangerine	8.17	408.5			19.9	995			13.88	6.94		
Tangerine	4.64	232			18.2	910			18.03	9.015		
Tangerine	4.41	220.5			20.02	1001			19.87	9.935		
Long kong	2.71	135.5	118.50	18.51	11.34	567	585.375	26.35	22.92	11.46	13.04	2.60
Long kong	2.67	133.5			11.17	558.5			20.49	10.245		
Long kong	2.07	103.5			12.16	608			31.37	15.685		
Long kong	2.03	101.5			12.16	608			29.54	14.77		

ตารางที่ 2. Total Phenolic Content in Fruit Extracts									
Fruit	mgGAE/100g	average	SD	%CV		mgGAE/100g	average	SD	%CV
strawberry1	271.86	272.87	3.56	1.31	guava1	176.21	176.48	2.82	1.60
strawberry2	271.86				guava2	176.21			
strawberry3	269.08				guava3	178.99			
strawberry4	270.17				guava4	171.19			
strawberry5	278.50				guava5	178.14			
strawberry6	275.72				guava6	178.14			
carambola1	137.32	137.82	3.62	2.62	long kong1	62.32	64.21	2.95	4.60
carambola2	138.71				long kong2	59.54			
carambola3	138.71				long kong3	63.71			
carambola4	130.92				long kong4	67.03			
carambola5	140.64				long kong5	65.64			
carambola6	140.64				long kong6	67.03			
pomelo1	55.38	55.18	3.02	5.48	tangerine1	48.43	53.10	3.59	6.76
pomelo2	56.76				tangerine2	51.21			
pomelo3	59.54				tangerine3	51.21			
pomelo4	54.53				tangerine4	58.69			
pomelo5	50.36				tangerine5	54.53			
pomelo6	54.53				tangerine6	54.53			



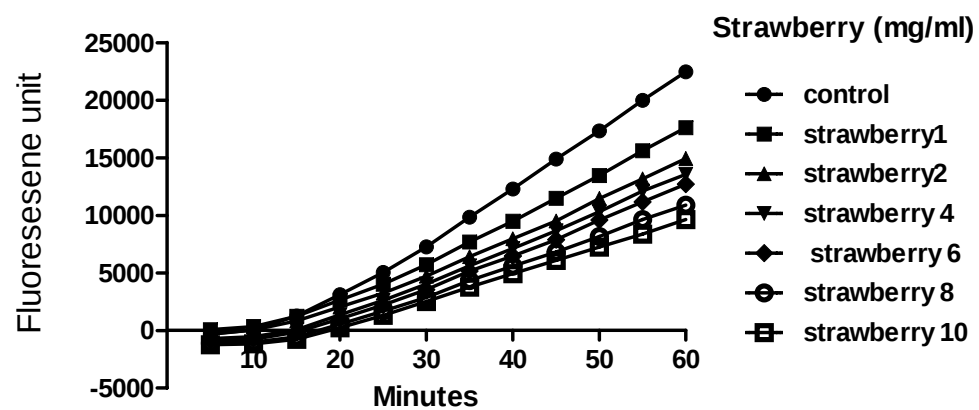
1A



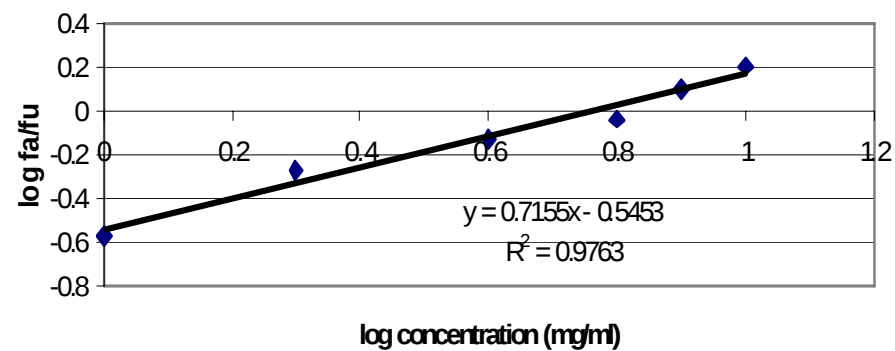
1B

รูปที่ 1A. Peroxyl radical-induced oxidation of DCFH to DCF in HepG2 cells and the inhibition of oxidation by quercetin

1B. Median effect plots for inhibition of peroxyl radical-induced DCFH oxidation by quercetin



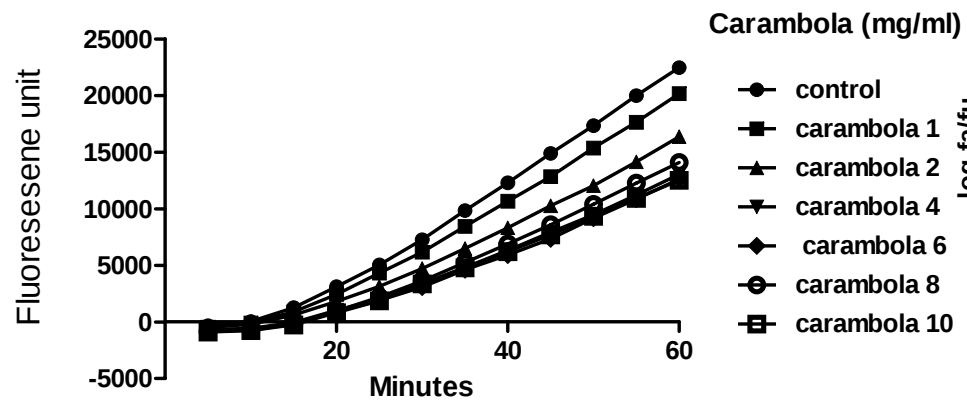
2A



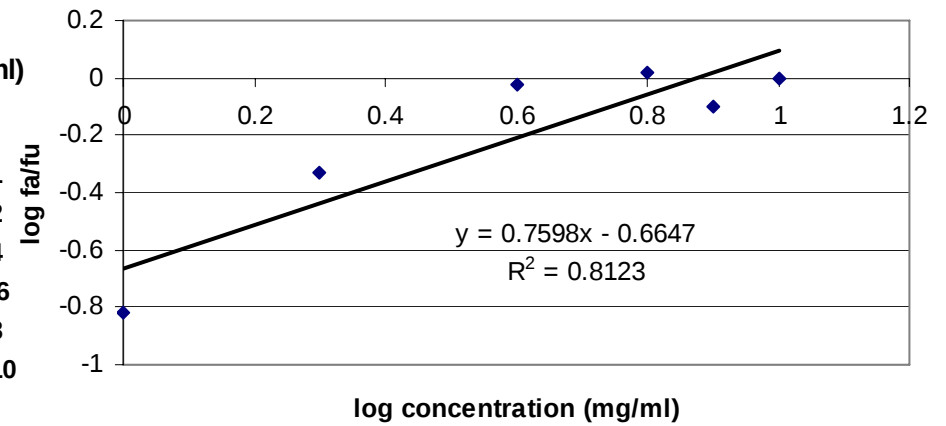
2B

รูปที่ 2A. Peroxyl radical-induced oxidation of DCFH to DCF in HepG2 cells and the inhibition of oxidation by strawberry

2B. Median effect plots for inhibition of peroxyl radical-induced DCFH oxidation by strawberry



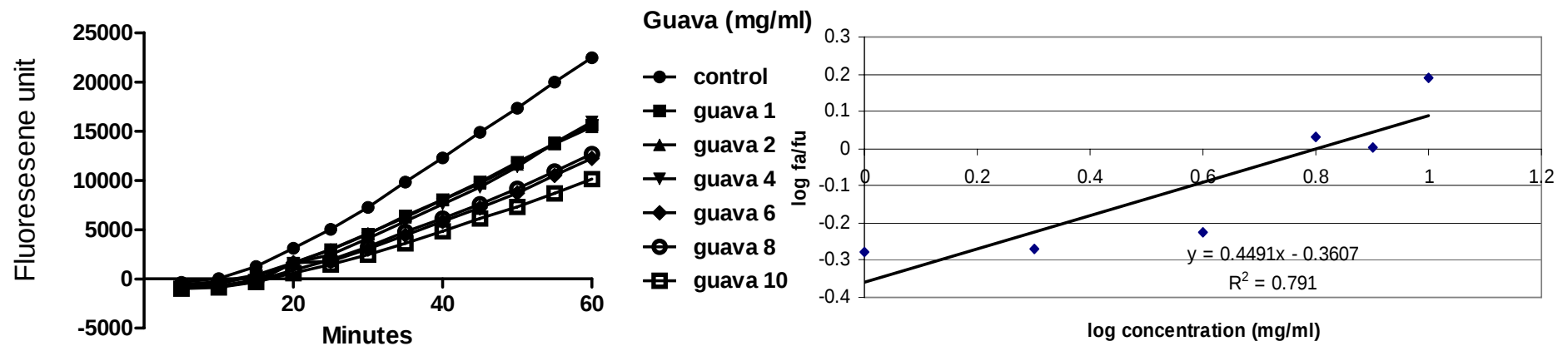
3A



3B

រូប 3A. Peroxyl radical-induced oxidation of DCFH to DCF in HepG2 cells and the inhibition of oxidation by carambola

3B. Median effect plots for inhibition of peroxyl radical-induced DCFH oxidation by carambola

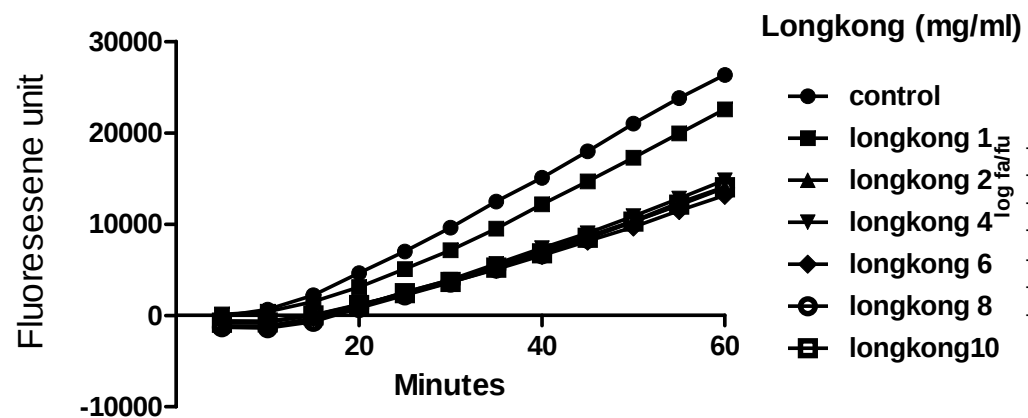


4A

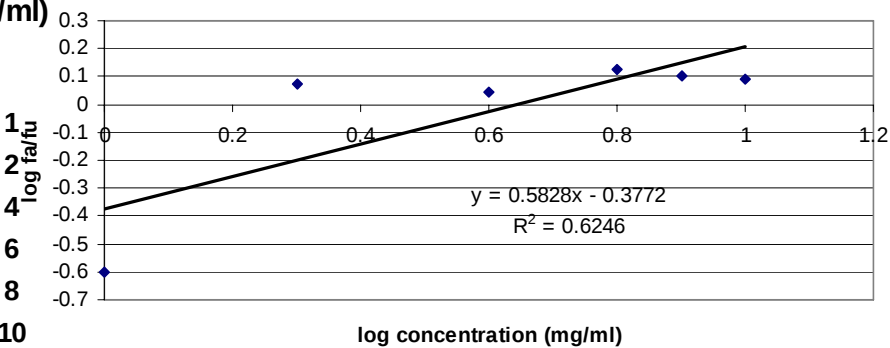
4B

รูปที่ 4A. Peroxyl radical-induced oxidation of DCFH to DCF in HepG2 cells and the inhibition of oxidation by guava

4B. Median effect plots for inhibition of peroxyl radical-induced DCFH oxidation by guava



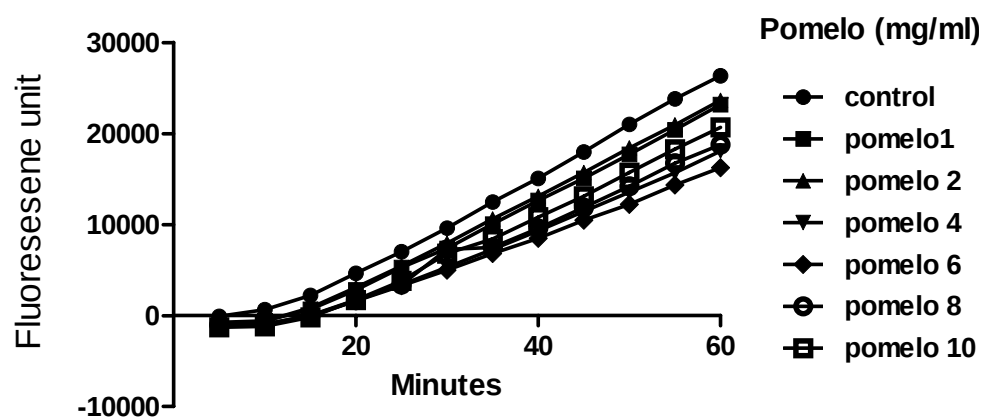
5A



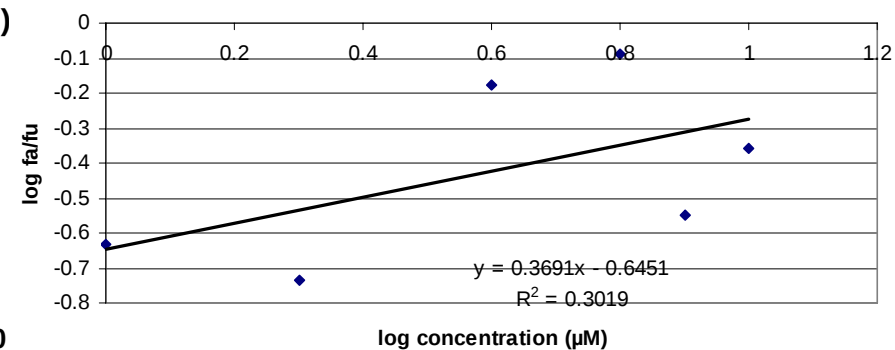
5B

รูปที่ 5A. Peroxyl radical-induced oxidation of DCFH to DCF in HepG2 cells and the inhibition of oxidation by longkong

5B. Median effect plots for inhibition of peroxyl radical-induced DCFH oxidation by longkong



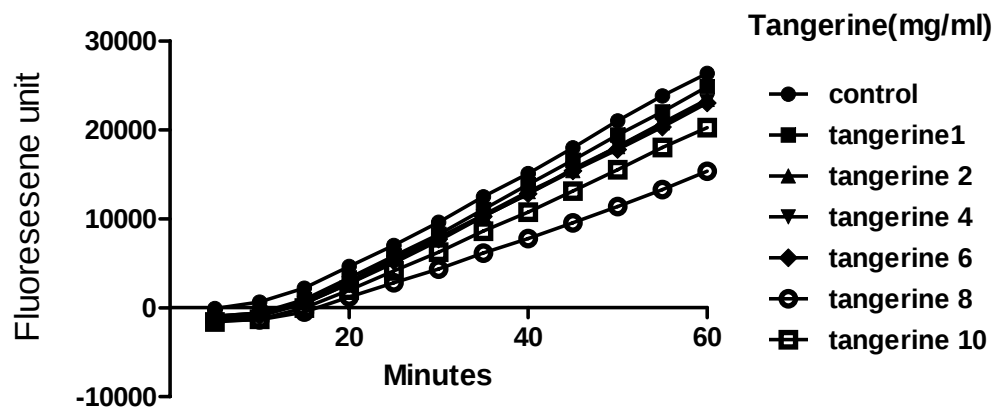
6A



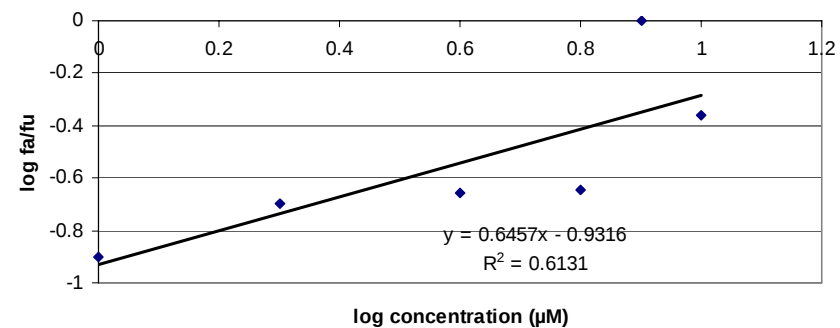
6B

รูปที่ 6A. Peroxyl radical-induced oxidation of DCFH to DCF in HepG2 cells and the inhibition of oxidation by pomelo

6B. Median effect plots for inhibition of peroxyl radical-induced DCFH oxidation by pomelo



7A



7B

รูปที่ 7A. Peroxyl radical-induced oxidation of DCFH to DCF in HepG2 cells and the inhibition of oxidation by tangerine

7B. Median effect plots for inhibition of peroxyl radical-induced DCFH oxidation by tangerine

