

Thesis Title	Antiproliferative Action and Increase of Antibody Production with Gamma Oryzanol and Proanthocyanidin from Purple Glutinous Rice	
Author	Mr. Montri Punyatong	
Degree	Doctor of Philosophy (Biotechnology)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Puntipa Pongpiachan	Chairperson
	Assoc. Prof. Petai Pongpiachan	Member
	Assoc. Prof. Dr. Yanee Pongpaibul	Member
	Assoc. Prof. Dr. Samlee Mankhetkorn	Member

ABSTRACT

Gamma oryzanol (GO) and proanthocyanidin (PA) of purple glutinous rice (Kum Doi Saket variety) have antioxidant property. The aimed of this research is to verify the beneficial effect of GO and PA in purple glutinous rice to cancer cells and to find the optimal ratio between oxidant and antioxidant (GO and PA) by the immune level and bleeding time detection for best beneficial use of antioxidant substances.

In the experiment 1, anticancer effect was verify, it was found that crude PA extract showed a dose-dependent decrease in percentage cell viability of the control in PA group. A significant difference ($p < 0.05$) began at 100 $\mu\text{g/ml}$ and IC_{50} (50 % inhibitory concentration) was 62.29 $\mu\text{g/ml}$. The cyaniding 3-glucoside (C3G) also exhibited a dose-dependent decrease but the significant difference ($p < 0.05$) began at 10 $\mu\text{M/ml}$ and IC_{50} was 8.4 $\mu\text{M/ml}$.

In the experiment 2, optimal ratios of oxidant to antioxidants of purple glutinous rice in *in vitro* and *in vivo* test were measured. The equilibrium ratio of rancid rice bran oil (RO) to GO was 1.25 which had antioxidant activity or total equivalent antioxidant capacity (TEAC) at 25.114 mM Trolox/mg after the reaction and PA was 1.66 which had TEAC at 3.768 mM Trolox/mg after the reaction. IgG level in RO treated mice group was significantly decreased ($p < 0.05$) from day 0, but in the RO plus antioxidants mice groups, the IgG level were significantly higher than RO mice group at day 28, 42 and 56. The IgM levels in the RO plus antioxidants mice groups were significantly higher ($p < 0.05$) than RO mice group in every day of serum collected (day 14, 28, 42 and 56). Malondialdehyde level (MDA) in RO treated mice group was significantly increased ($p < 0.05$) from day 0. In the RO plus antioxidants mice groups, the MDA level did not change from base line and significantly lower than RO mice group. Glutathione level (GSH) in RO mice group was significantly decreased ($p < 0.05$) than in other groups which not change from day 0. The GSH levels in the RO plus antioxidants mice groups were constant and significantly higher ($p < 0.05$) than RO group. The oxidant to antioxidants ratios which increase immune levels were measured. In the GO test, the IgG level in day 14 was highest ($p < 0.05$) at ratio 1:1.6 of RO to GO ($354.00 \pm 2.273 \mu\text{g/ml}$) but it decreased ($p < 0.05$) when ratio was increased to 1:1.8 ($348.75 \pm 1.493 \mu\text{g/ml}$). In day 28, IgG was highest ($p < 0.05$) at ratio 1:2.0 $353.50 \pm 0.645 \mu\text{g/ml}$ but decreased ($p < 0.05$) at ratio 1:2.2 ($343.00 \pm 0.912 \mu\text{g/ml}$). In day 42, IgG was highest ($p < 0.05$) at ratio 1:1.8 ($351.50 \pm 0.288 \mu\text{g/ml}$) but decreased ($p < 0.05$) at ratio 1:2.0 ($341.50 \pm 2.533 \mu\text{g/ml}$). In day 56, IgG level was highest ($p < 0.05$) at ratio 1:1.8 ($350.75 \pm 2.096 \mu\text{g/ml}$) but decreased at ratio 1:2.0

(345.5 ± 0.500 $\mu\text{g/ml}$). In the PA test, the IgG level in day 14 was highest ($p < 0.05$) at ratio 2.60 of oxidant to PA (345.50 ± 0.645 $\mu\text{g/ml}$) but it decreased ($p < 0.05$) when ratio was increased to 1:1.8 (337.25 ± 3.065 $\mu\text{g/ml}$). In day 28, IgG was highest ($p < 0.05$) at ratio 1:1.6 (341.25 ± 3.198 $\mu\text{g/ml}$) but decreased ($p < 0.05$) at ratio 1:1.8 (338.00 ± 0.408 $\mu\text{g/ml}$). In day 42, IgG was highest ($p < 0.05$) at ratio 1:1.6 (342.00 ± 1.080 $\mu\text{g/ml}$) but decreased ($p < 0.05$) at ratio 1:1.8 (333.25 ± 2.594 $\mu\text{g/ml}$). In day 56, IgG level was highest ($p < 0.05$) at ratio 1:1.2 (348.00 ± 2.121 $\mu\text{g/ml}$) but decreased at ratio 1:1.8 (329.75 ± 0.853 $\mu\text{g/ml}$). In the purple rice bran (RB) test, the IgG level in day 14 was highest ($p < 0.05$) at ratio 1:1.7 of RO to RB (337.25 ± 1.796 $\mu\text{g/ml}$) but it decreased ($p < 0.05$) when ratio was increased to 1:1.9 (335.50 ± 1.544 $\mu\text{g/ml}$). In day 28, IgG was highest ($p < 0.05$) at ratio 1:1.5 (332.50 ± 1.544 $\mu\text{g/ml}$) but decreased ($p < 0.05$) at ratio 1:1.9 (330.5 ± 0.288 $\mu\text{g/ml}$). In day 42, IgG was highest ($p < 0.05$) at ratio 1:1.5 (330.00 ± 0.408 $\mu\text{g/ml}$) but decreased ($p < 0.05$) at ratio 1:1.7 (325.75 ± 0.478 $\mu\text{g/ml}$). In day 56, IgG level was highest ($p < 0.05$) at ratio 1:1.3 (327.75 ± 1.108 $\mu\text{g/ml}$) but decreased at ratio 1:1.7 (323.25 ± 1.493 $\mu\text{g/ml}$). In this experiment, bleeding time were recorded, it was found that bleeding time in RO supplemented mice group was longer than in the other groups and than the initial day ($p < 0.05$) (141.6 ± 0.4938 seconds at initial to 166.8 ± 0.0100 seconds at day 28) while all of RO plus antioxidants at equilibrium ratio mice groups could retain bleeding time close to initial day of experiment. However, in RO plus PA group, bleeding time was decreased from initial day ($p < 0.05$) as 127.8 ± 0.3348 seconds at day 0, 119 ± 0.3265 seconds at day 14, 119.4 ± 0.0057 seconds at day 28, 116.6 ± 0.3292 seconds at day 42 and 119.6 ± 0.3150 seconds at day 56.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง และการเพิ่ม
การผลิตแอนติบอดี ด้วยแกมมาโอไรซานอล และ
โปรแอนโทไซยานิน จากข้าวเหนียวดำ

ผู้เขียน นายมนตรี ปัญญาทอง

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. พันทิพา พงษ์เพ็ญจันทร์ ประธานกรรมการ

รศ. เพทาย

พงษ์เพ็ญจันทร์ กรรมการ

รศ. ดร. ญานี พงษ์ไพบูลย์ กรรมการ

รศ. ดร. สารี

มันเขตกรณ์ กรรมการ

บทคัดย่อ

แกมมาโอไรซานอล (GO) และ โปรแอนโทไซยานิน (PA) มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ในข้าวเหนียวดำ (*Oryza sativa L.*) วัตถุประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้คือการศึกษาประโยชน์ของ GO และ PA จากข้าวเหนียวดำต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง และการหาสัดส่วนของอนุมูลอิสระต่อสารต้านอนุมูลอิสระที่มีผลต่อระดับภูมิคุ้มกันและการหยุดไหลของเลือด

การทดลองที่ 1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของ PA จากข้าวเหนียวดำ และ ไซยานิน 3-กลูโคไซด์ (C3G) บริสุทธิ์ ต่อเซลล์ไมโอโลมาชนิด X63 พบว่า จำนวนเซลล์มะเร็งที่รอดชีวิต ลดลงตามความเข้มข้นของ PA และ C3G ที่เสริมเพิ่มขึ้น โดยเซลล์มะเร็งเริ่มลดจำนวนลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อ PA เพิ่มขึ้นเป็น $100 \mu\text{g/ml}$ และ ค่า IC_{50} (50 % inhibitory concentration) ของ PA เท่ากับ $62.29 \mu\text{g/ml}$ ส่วน C3G ทำให้เซลล์มะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้น $10 \mu\text{M/ml}$ และค่า IC_{50} ของ C3G เท่ากับ $8.4 \mu\text{M/ml}$

การทดลองที่ 2 การหาสัดส่วนที่ทำปฏิกิริยาพอลิในหลอดทดลองระหว่างน้ำมันรำที่หืน (Rancid rice bran oil, RO) กับสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สัดส่วนที่พอลิระหว่าง RO กับ GO เท่ากับ 1.25 (Total Equivalent Antioxidant Capacity หรือ TEAC = $25.114 \text{ mM Trolox/mg}$) และ PA เท่ากับ 1.66 (TEAC = $3.768 \text{ mM Trolox/mg}$) เมื่อนำสัดส่วนที่เหมาะสมในหลอดทดลองนี้ไปทดสอบในหนูพบว่าค่าภูมิคุ้มกัน Immunoglobulin G (IgG) ในหนูกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ RO มีค่า

ลดลงจากวันเริ่มการทดลอง ส่วนหนูที่ได้รับ RO บวกสารต้านอนุมูลอิสระในสัดส่วนที่เหมาะสม ค่าภูมิคุ้มกัน IgG สูงกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ RO เพียงอย่างเดียวในวันที่ 28, 42 และ 56 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วน Immunoglobulin M (IgM) ในหนูกลุ่มที่ได้รับ RO มีค่าลดลงจากวันเริ่มการทดลอง ส่วนหนูที่ได้รับ RO บวกสารต้านอนุมูลอิสระในสัดส่วนที่เหมาะสมค่าภูมิคุ้มกัน IgM สูงกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ RO เพียงอย่างเดียวในวันที่ 14, 28, 42 และ 56 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ระดับ malondialdehyde bis (di) methyl acetate (MDA) ในหนูกลุ่มที่ได้รับ RO มีค่าสูงเพิ่มขึ้นจากวันเริ่มการทดลอง ส่วนหนูที่ได้รับ RO บวกสารต้านอนุมูลอิสระในสัดส่วนที่เหมาะสม พบว่าระดับ MDA ก่อนข้างคอกที่ และต่ำกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ RO เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ระดับ glutathione (GSH) ในหนูกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ RO มีค่าลดต่ำลงจากวันเริ่มการทดลอง ส่วนหนูที่ได้รับ RO บวกสารต้านอนุมูลอิสระในสัดส่วนที่เหมาะสม ระดับ GSH ก่อนข้างคอกที่ และต่ำกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ RO เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การหาสัดส่วนระหว่างอนุมูลอิสระต่อสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ทำให้ระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น พบว่า เมื่อทำการเพิ่มระดับของ GO ขึ้น ทำให้ระดับภูมิคุ้มกัน IgG เพิ่มขึ้นสูงสุดที่วันที่ 14 เท่ากับ $354.00 \pm 2.273 \mu\text{g/ml}$ ที่สัดส่วน 1:1.6 แต่เริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อสัดส่วนเพิ่มขึ้นเป็น 1:1.8 ($348.75 \pm 1.493 \mu\text{g/ml}$), ในวันที่ 28 เท่ากับ $353.50 \pm 0.645 \mu\text{g/ml}$ ที่สัดส่วน 1:2.0 เมื่อเพิ่มสัดส่วนขึ้นไปอีกที่ 1:2.2 ระดับภูมิคุ้มกันลดลงเป็น $343.00 \pm 0.912 \mu\text{g/ml}$, ในวันที่ 42 ระดับภูมิคุ้มกันสูงสุดที่สัดส่วน 1:1.8 ($351.50 \pm 0.288 \mu\text{g/ml}$) และเริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่สัดส่วน 1:2.0 ($341.50 \pm 2.533 \mu\text{g/ml}$), ในวันที่ 56 ระดับภูมิคุ้มกันสูงสุดที่สัดส่วน 1:1.8 ($350.75 \pm 2.096 \mu\text{g/ml}$) และเริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่สัดส่วน 1:2.0 ($345.50 \pm 0.500 \mu\text{g/ml}$) เมื่อเพิ่มสัดส่วนของ PA ขึ้นพบว่าในวันที่ 14 ระดับภูมิคุ้มกันสูงสุด ($p < 0.05$) ที่สัดส่วน 1:1.6 ($345.50 \pm 0.645 \mu\text{g/ml}$) แต่เริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อสัดส่วนเพิ่มขึ้นเป็น 1:1.8 ($337.25 \pm 3.065 \mu\text{g/ml}$), ในวันที่ 28 ระดับภูมิคุ้มกันสูงสุด ($p < 0.05$) ที่สัดส่วน 1:1.6 ($341.25 \pm 3.198 \mu\text{g/ml}$) และเริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อสัดส่วนเพิ่มขึ้นเป็น 1:1.8 ($338.00 \pm 0.408 \mu\text{g/ml}$), ในวันที่ 42 ระดับภูมิคุ้มกันสูงสุด ($p < 0.05$) ที่สัดส่วน 1:1.6 ($342.00 \pm 1.080 \mu\text{g/ml}$) แต่เริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อสัดส่วนเพิ่มขึ้นเป็น 1:1.8 ($333.25 \pm 2.594 \mu\text{g/ml}$), ในวันที่ 56 ระดับภูมิคุ้มกันสูงสุด ($p < 0.05$) ที่สัดส่วน 1:1.0 ($348.00 \pm 2.121 \mu\text{g/ml}$) แต่เริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อสัดส่วนเพิ่มขึ้นเป็น 1:1.8 ($329.75 \pm 0.853 \mu\text{g/ml}$) เมื่อเพิ่มสัดส่วนของรำข้าวเหนียวก้ำขึ้นพบว่าในวันที่ 14 ระดับภูมิคุ้มกันสูงสุด ($p < 0.05$) ที่สัดส่วน 1:1.7 ($337.25 \pm 1.796 \mu\text{g/ml}$) แต่เริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อสัดส่วนเพิ่มขึ้นเป็น 1:1.9 ($335.50 \pm 1.544 \mu\text{g/ml}$), ในวันที่ 28 ระดับภูมิคุ้มกันสูงสุด ($p < 0.05$) ที่สัดส่วน 1:1.3 ($332.50 \pm 1.554 \mu\text{g/ml}$) แต่เริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อ

สัดส่วนเพิ่มขึ้นเป็น 1:1.9 ($330.50 \pm 0.288 \mu\text{g/ml}$), ในวันที่ 42 ระดับภูมิคุ้มกันสูงสุด ($p < 0.05$) ที่ สัดส่วน 1:1.5 ($330.00 \pm 0.408 \mu\text{g/ml}$) แต่เริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อสัดส่วนเพิ่มขึ้น เป็น 1:1.7 ($325.75 \pm 0.478 \mu\text{g/ml}$), ในวันที่ 56 ระดับภูมิคุ้มกันสูงสุด ($p < 0.05$) ที่สัดส่วน 1:1.3 ($327.75 \pm 1.108 \mu\text{g/ml}$) แต่เริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อสัดส่วนเพิ่มขึ้นเป็น 1:1.7 ($323.25 \pm 1.493 \mu\text{g/ml}$) และการหาระยะเวลาในการหยุดไหลของเลือด พบว่า ระยะเวลาในการ หยุดไหลของเลือดของหนูกลุ่มที่ได้รับ RO อย่างเดียวยาวนานกว่ากลุ่มอื่น ๆ และยาวนานขึ้นจาก วันที่ 0 ($p < 0.05$) ส่วนในกลุ่มอื่น ๆ ที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระด้วยมีระยะเวลาใกล้เคียงกับวันเริ่ม การทดลอง ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามในหนูกลุ่ม RO+PA ระยะเวลาลดลงจากวันที่ 0 ($p < 0.05$) คือ 127.8 ± 0.3348 วินาที ในวันที่ 0, 119 ± 0.3265 วินาที ในวันที่ 14, 119.4 ± 0.0057 วินาที ในวันที่ 28, 116.6 ± 0.3292 วินาที ในวันที่ 42 และ 119.6 ± 0.3150 วินาที ในวันที่ 56

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved