

นิพนธ์ฉบับ

ผลของน้ำมันรำข้าวต่อการสะสมไขมันในเซลล์ไขมันชนิด 3T3-L1

จิรดา ระเบาเลิศ*, ณรงค์ศักดิ์ มั่นคง**, วสันต์ ภาคลักษณ์**, นุชลิรี เลิศวุฒิสโรภณ***

บทคัดย่อ

- บทนำ:** น้ำมันรำข้าวสามารถลดภาวะความผิดปกติของไขมันในเลือดได้ โดยมีกรดไขมันโอเลอิกเป็นส่วนประกอบหลัก แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ได้รับการศึกษาในเซลล์ไขมันมากนักดังนั้นจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลของน้ำมันรำข้าวและกรดไขมันโอเลอิกต่อการสะสมไขมันในเซลล์ไขมันชนิด 3T3-L1
- วิธีการศึกษา:** การให้น้ำมันรำข้าว กรดไขมันโอเลอิกและกรดไขมันปาล์มมิติกที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ในช่วงที่เซลล์มีการเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ไขมันเต็มตัว จากนั้นทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTS วัดปริมาณไขมันสะสมภายในเซลล์โดยการย้อมเซลล์ด้วย oil red O และวัดขนาดเซลล์ไขมันภายใต้กล้องจุลทรรศน์
- ผลการศึกษา:** พบว่าน้ำมันรำข้าว กรดไขมันโอเลอิกและกรดไขมันปาล์มมิติก ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไขมันชนิด 3T3-L1 แต่กรดไขมันปาล์มมิติกที่ความเข้มข้น ๘๐ และ ๑๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีพิษต่อเซลล์ไขมัน นอกจากนี้พบว่าน้ำมันรำข้าวและกรดไขมันโอเลอิก มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสะสมเซลล์ไขมันในช่วงเป็นเซลล์ไขมันเต็มตัวแล้ว แต่กรดไขมันปาล์มมิติก (๖๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีไขมันสะสมเพิ่มขึ้น และพบว่าน้ำมันรำข้าวและกรดไขมันโอเลอิกช่วยลดขนาดเซลล์ไขมันในช่วงที่เป็นเซลล์ไขมันเต็มตัวแล้ว แต่กรดไขมันปาล์มมิติกไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดเซลล์
- วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา:** น้ำมันรำข้าวมีฤทธิ์ช่วยลดการสะสมไขมันและขนาดของเซลล์ไขมัน โดยที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งคาดว่าจะกรดไขมันโอเลอิกเป็นสารที่ออกฤทธิ์ในน้ำมันรำข้าว ผลการศึกษานี้จะนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันโรคอ้วนได้
- คำสำคัญ:** เซลล์ไขมัน ชนิด 3T3-L1, น้ำมันรำข้าว, กรดโอเลอิก, กรดปาล์มมิติก

วันที่รับบทความ: ๑๒ ธันวาคม ๒๕๕๘

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๕ พฤษภาคม ๒๕๕๙

* นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** นักศึกษาหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

*** สาขาชีวเคมี สถาบันวิทยาศาสตร์พระคิริน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผู้ให้ติดต่อ: นางสาวจิรดา ระเบาเลิศ สาขาเภสัชโภชนศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ๑๒๑๒๐

บทนำ

ภาวะอ้วนลงพุง (abdominal obesity) นั้นเป็นผลมาจากการสะสมไขมันที่มากเกินไปโดยเฉพาะไตรกลีเซอไรด์

บริเวณเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue)^{๑, ๒} ซึ่งความผิดปกติเหล่านี้ทำให้เซลล์ไขมันมีการหลั่งสารต่างๆ มากเกินกว่าภาวะปกติ เช่น กรดไขมันอิสระ สารสื่ออักเสบ ซึ่งถือเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (chronic non-communicable diseases) ต่างๆ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวานในปัจจุบันภาวะอ้วนลงพุงจึงถูกจัดให้เป็นหนึ่งในเกณฑ์การวินิจฉัยที่สำคัญสำหรับผู้ป่วยกลุ่มอาการเมตาบอลิก (metabolic syndrome) ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ มีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ภายในเซลล์ไขมันชนิด 3T3-L1 ซึ่งถือเป็นรูปแบบจำลองพื้นฐานที่ใช้ในการศึกษาทั้งชีววิทยาและความผิดปกติของเซลล์ไขมัน พบว่าเซลล์ชนิดนี้สามารถเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ได้ โดยแบ่งการเจริญเติบโตได้เป็น ๓ ระยะ คือ การเพิ่มจำนวนเซลล์เริ่มต้นของเซลล์ไขมัน (preadipocyte) การเปลี่ยนแปลงเซลล์เริ่มต้นเป็นเซลล์ไขมัน (adipocyte) และการเปลี่ยนเป็นเซลล์ไขมันเต็มตัว (mature adipocyte) แต่การศึกษามักนิยมศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ไขมัน ช่วงการเปลี่ยนเป็นเซลล์ไขมัน (preadipocyte) และการเปลี่ยนเป็นเซลล์ไขมันเต็มตัว (mature adipocyte)^๓ ซึ่งมีกลไกการสะสมไขมัน โดยเซลล์ไขมันชนิด 3T3-L1 สามารถถูกกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ adipogenesis เปลี่ยนรูปร่างเป็นเซลล์ไขมันได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วย dexamethasone, 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) และ insulin โดยเซลล์จะสะสมไขมันในรูปหยดไขมัน (lipid droplets) ภายในไซโทพลาสซึม^๔

น้ำมันรำข้าวเป็นน้ำมันพืชชนิดหนึ่งผลิตจากรำข้าวซึ่งมีสารแกมมาโอไรซานอล (γ -oryzanol) มีวิตามินอีทั้งในรูปของโทโคเฟอรอล (tocopherols) และโทโคไตรอีนอล (tocotrienols) ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือด^๕ โดยสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำ (low-density lipoprotein cholesterol) ไตรกลีเซอไรด์และเพิ่มระดับเอชดีแอล คอเลสเตอรอล (high-density lipoprotein cholesterol) ในเลือดของหนูทดลองได้^๖ ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในมนุษย์ที่พบว่าน้ำมันรำข้าวสามารถลดภาวะไขมันในเลือดสูงได้^๗ เช่นเดียวกับการศึกษาพบว่า กรดไขมันไม่อิ่มตัว ๑ ตำแหน่ง สามารถลดระดับแอลดีแอลคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดได้โดยไม่ทำให้ระดับเอชดีแอล คอเลสเตอรอลในเลือดลดลงและยังช่วยลดอัตรา

การเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจต่ำของชาวเมดิเตอร์เรเนียน^{๘-๑๐} ซึ่งมีกรดไขมันโอเลอิกเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญในน้ำมันรำข้าวถึง ร้อยละ ๓๘ ถึงแม้ว่าจะมีรายงานพบว่าน้ำมันรำข้าวสามารถลดความผิดปกติของสมดุลไขมันได้แต่ผลโดยตรงต่อเซลล์ไขมันนั้นยังไม่ได้ศึกษา รวมทั้งการศึกษาผลของกรดไขมันโอเลอิกต่อเซลล์ไขมันก็มีเพียงบางรายงาน จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของน้ำมันรำข้าวและกรดโอเลอิกต่อการสะสมไขมันและขนาดของเซลล์ไขมันชนิด 3T3-L1 โดยเปรียบเทียบกับผลของกรดไขมันปาล์มมิติ

วิธีการศึกษา

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไขมัน (3T3-L1 preadipocyte)

การเลี้ยงเซลล์ mouse embryonic ชนิด 3T3-L1 จาก American Type Culture Collection (ATCC, USA) ด้วยวิธีของ Robin Erickson โดยเลี้ยงใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ซึ่งประกอบด้วย calf bovine serum (CS) 10% และ antibiotic solution (Sigma, USA) 1% ทำการเพาะเลี้ยงใน บรรยากาศที่มี แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ๕% และเลี้ยงในอุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๒ วัน เซลล์จะเพิ่มจำนวนเต็มพื้นที่ หลังจากนั้นกระตุ้นเป็นเซลล์ไขมันโดยการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ ซึ่งประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS) 10%, dexamethasone ๐.๒๕ ไมโครโมลาร์, IBMX ๐.๕ มิลลิโมล และ insulin (Sigma, USA) ๑ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา ๒ วัน เพื่อชักนำเซลล์ตั้งต้นไขมันชนิด 3T3-L1 (preadipocytes) ให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์ไขมัน (adipocytes) จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ซึ่งมี FBS 10% และ insulin ๑ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อีก ๒ วัน และเปลี่ยนมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่มี FBS 10% โดยเปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยงทุกๆ ๒ วัน เป็นเวลา ๘ วัน จะสังเกตเห็นลักษณะเซลล์จะมีรูปร่างกลมขึ้นพร้อมๆ กับการสะสม lipid droplet จำนวนมากในไซโทพลาสซึม โดยจะสังเกตเห็นได้ในวันที่ ๔ จนกลายสภาพเป็นของเซลล์ไขมันเต็มรูปแบบในวันที่ ๘ ของการกระตุ้นเซลล์

การทดสอบการมีชีวิตรอดของน้ำมันรำข้าวและกรดไขมันต่อเซลล์ไขมันชนิด 3T3-L1

หลังจากเซลล์ไขมันที่ถูกทดสอบด้วยน้ำมันรำข้าวที่มีความเข้มข้น ๑๐๐, ๒๐๐, ๓๐๐, ๔๐๐ และ ๕๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรดไขมันโอเลอิกและกรดไขมันปาล์มมิติที่มีความเข้มข้น ๒๐, ๔๐, ๖๐, ๘๐ และ ๑๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา ๔ และ ๘ วัน หลังจากกระตุ้นให้

เป็นเซลล์ไขมัน เซลล์ไขมันจะถูกทดสอบการมีชีวิตรอดด้วยวิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) โดยการเติม MTS ปริมาณ ๒๐ ไมโครลิตรต่อหลุมและป่มเป็นระยะเวลา ๒ ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ๔๙๐ นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์

การย้อมไขมันด้วย oil red O และการวัดขนาดเซลล์ไขมัน

หลังจากเซลล์ไขมันที่ถูกทดสอบด้วยน้ำมันรำข้าวที่ความเข้มข้น ๑๐๐, ๒๐๐, ๓๐๐, ๔๐๐ และ ๕๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรดไขมันโอเลอิกและกรดไขมันพาล์มมีติกที่มีความเข้มข้น ๒๐, ๔๐, ๖๐, ๘๐ และ ๑๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา ๔ และ ๘ วัน หลังจากที่ได้กระตุ้นให้เป็นเซลล์ไขมัน เซลล์ไขมันจะถูกวัดปริมาณสะสมไขมันโดยการย้อมไขมันด้วย oil red O โดยการเตรียม 0.5% oil red O ใน isopropanol และนำไปเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วนน้ำต่อสารละลาย oil red O (๖:๔) แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง จากนั้นย้อมไขมันในเซลล์ไขมันโดยการเติมสารละลาย oil red O เป็นเวลา ๒ ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และล้างด้วยน้ำกลั่นอีก ๒ ครั้ง จากนั้นทำการละลายสีที่ย้อมติดไขมันในเซลล์ไขมันออกจาก isopropanol นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ๕๒๐ นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละการสะสม

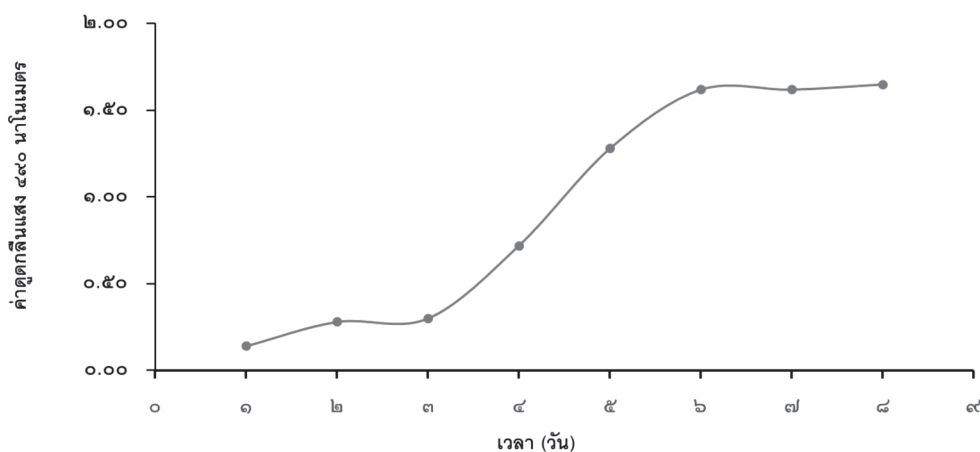
ไขมันของเซลล์ไขมัน จากนั้นทำการถ่ายภาพเซลล์ไขมันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope และจะนำไปหาขนาดเซลล์ไขมัน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 16.0 (SPSS Inc., USA) ในการคำนวณค่าเฉลี่ยเลขคณิต (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (S.E.M.) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล ANOVA และทดสอบความแตกต่างแบบ multiple comparisons ด้วยการทดสอบ Least significant difference (LSD) โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่ ๐.๐๕

ผลการศึกษา

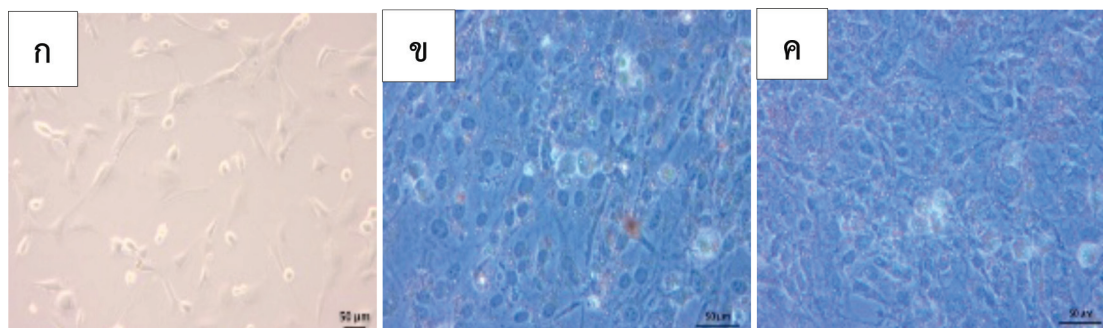
จากการประเมินการเจริญเติบโตของเซลล์ไขมันชนิด 3T3-L1 ที่มีความหนาแน่น 2×10^3 cells/well พบว่า การเจริญเติบโตของเซลล์ในช่วง lag phase เซลล์มีการปรับตัวและใช้ระยะเวลานั้น ในขณะที่ระยะ log phase เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว มีอัตราการเจริญเติบโตมากที่สุดและเป็นช่วงที่เซลล์มีการแบ่งตัวได้ยาวนาน จากนั้นเซลล์จะเข้าสู่ระยะ stationary phase เป็นระยะที่เซลล์มีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก ดังนั้น ความหนาแน่น 2×10^3 cells/well จึงเป็นความหนาแน่นที่เหมาะสมสำหรับการทดลองนี้ ดังรูปที่ ๑



รูปที่ ๑ ประเมินการเจริญเติบโตของเซลล์ไขมันภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงที่เหมาะสม ก่อนการเหนี่ยวนำเซลล์ไขมันโดยการเพิ่มปริมาณเซลล์ และการเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ไขมันภายใต้สภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย dexamethasone, IBMX และ insulin โดยตรวจสอบด้วยวิธี MTS

หลังจากเหนี่ยวนำเซลล์ไขมันชนิด 3T3-L1 ด้วย dexamethasone, IBMX และ insulin พบว่าเซลล์มีการเพิ่มจำนวนและเมื่อย้อมดูรูปร่างของเซลล์ด้วยวิธี oil red O ดังแสดง

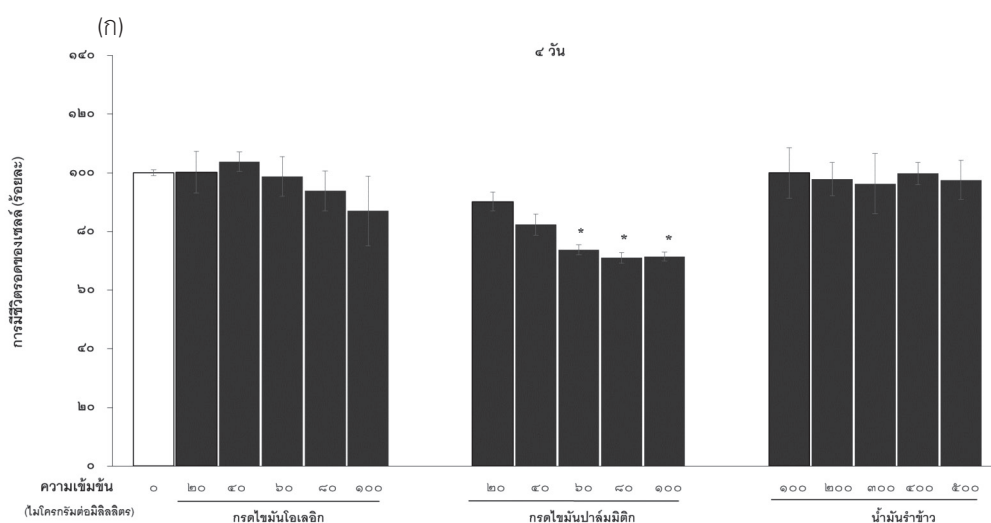
ในรูปที่ ๒ พบว่าเซลล์เริ่มมีรูปร่างกลมและมีการสะสมไขมันในไซโตพลาสซึมในวันที่ ๔ (รูปที่ ๒ ข) และกลายเป็นเซลล์ไขมันเต็มตัว ในวันที่ ๘ (รูปที่ ๒ ค) อย่างสมบูรณ์

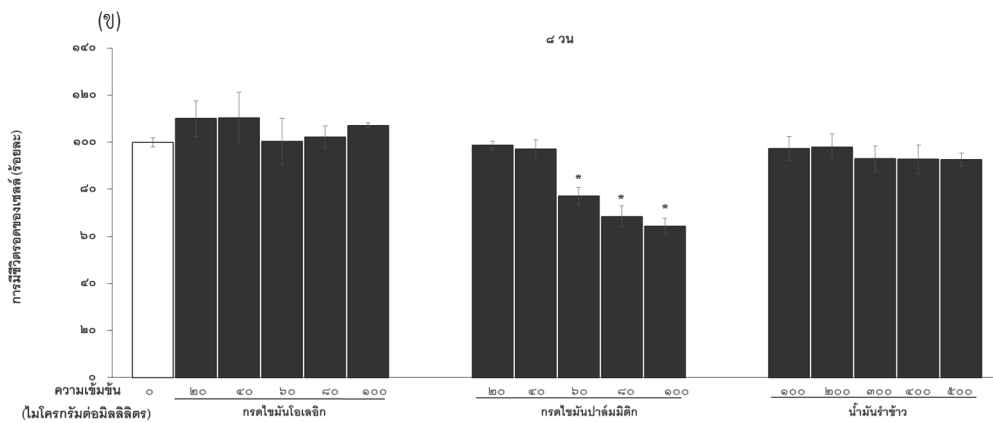


รูปที่ ๒ ลักษณะรูปร่างของเซลล์ไขมันชนิด 3T3-L1 ก่อนเหนี่ยวนำเซลล์ไขมัน (ก) และหลังเหนี่ยวนำเซลล์ไขมัน (ข-ค) ย้อมด้วยสี oil red O (ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ที่ดูด้วย objective กำลังขยาย ๒๐ เท่า สเกลในภาพเท่ากับ ๕๐ ไมโครเมตร)

เมื่อนำกรดไขมันโอเลอิก กรดไขมันปาล์มมิติก และน้ำมันรำข้าว มาทดสอบการมีชีวิตรอดต่อเซลล์ไขมันชนิด 3T3-L1 ในช่วงหลังการเหนี่ยวนำเป็นเซลล์และช่วงที่เป็นไขมันแล้วโดยใช้วิธี MTS พบว่ากรดไขมันโอเลอิก ความเข้มข้นที่ ๒๐, ๔๐, ๖๐, ๘๐, ๑๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิตร น้ำมันรำข้าวที่ความเข้มข้นที่ ๑๐๐, ๒๐๐, ๓๐๐, ๔๐๐ และ ๕๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไขมัน 3T3-L1 เนื่องจากปริมาณการมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) แต่เมื่อนำเซลล์ไขมันชนิด 3T3-L1 มาทดสอบกับกรดไขมันปาล์มมิติกที่ความเข้มข้นที่ ๖๐, ๘๐ และ ๑๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบว่าปริมาณการมีชีวิตรอดของเซลล์

ในช่วงการเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ไขมัน มีค่าอยู่ที่ร้อยละ ๗๓.๗๘ ± ๑.๖๘, ๗๑.๐๐ ± ๑.๗๕ และ ๗๑.๔๒ ± ๑.๕๘ ตามลำดับ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ ๓ (ก) ซึ่งอยู่ในระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เนื่องจากปริมาณการอยู่รอดของเซลล์ยังมากกว่าร้อยละ ๗๐ แต่การได้รับกรดไขมันปาล์มมิติกก็มีแนวโน้มที่จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไขมัน นอกจากนี้ยังพบในช่วงกลายเป็นเซลล์ไขมันเต็มตัวแล้วเมื่อได้รับกรดไขมันปาล์มมิติกพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ไขมันที่ความเข้มข้น ๘๐ และ ๑๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบปริมาณการอยู่รอดของเซลล์ไขมันมีค่าอยู่ที่ร้อยละ ๖๘ ± ๑.๑๗ และ ๖๕ ± ๒.๗๕ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ ๓ (ข)





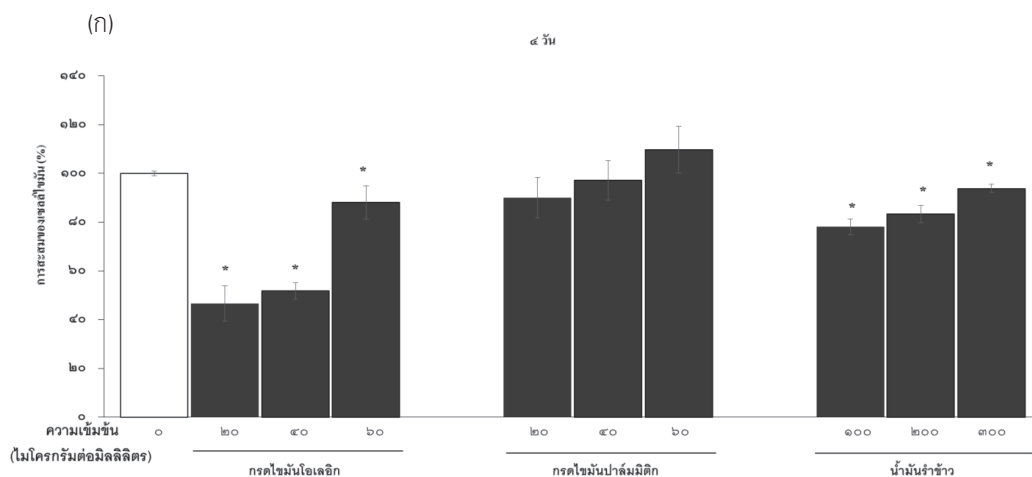
แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.M)

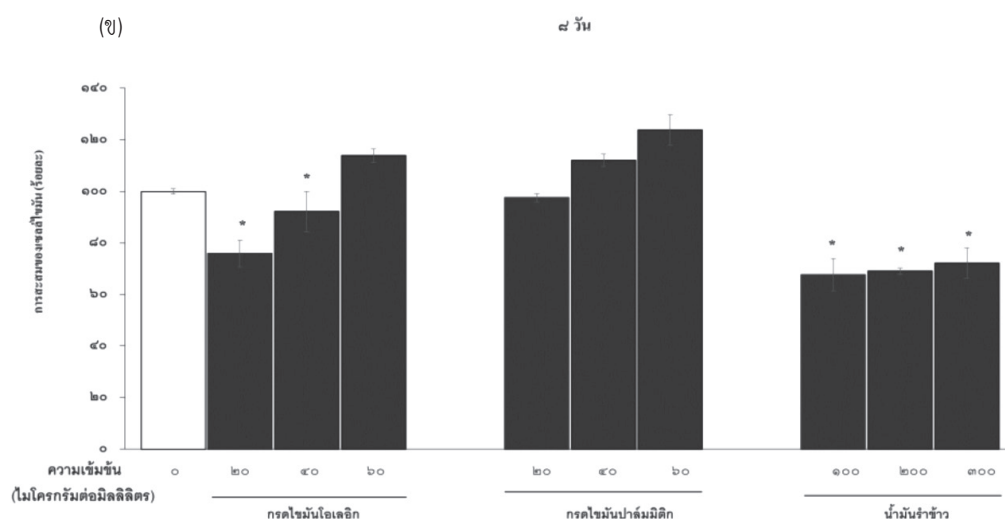
* แสดงความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มควบคุมกลุ่มที่ ๑ ที่ค่า $p < 0.05$

รูปที่ ๓ แสดงการมีชีวิตรอดของกรดไขมันโอเลอิก กรดไขมันปาล์มมิติก และน้ำมันรำข้าวต่อเซลล์ไขมันชนิด 3T3-L1 ในช่วง ๔ วัน (ก) และในช่วง ๘ วัน (ข) ถูกทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTS

เมื่อทดสอบการสะสมไขมันของเซลล์ไขมันชนิด 3T3-L1 ด้วยกรดไขมันโอเลอิก กรดไขมันปาล์มมิติก และน้ำมันรำข้าว โดยอาศัยวิธี adipogenesis ซึ่งตรวจวัดปริมาณไขมันสะสมภายในเซลล์ด้วย oil red O ในช่วงของการเปลี่ยนรูปร่างเป็นเซลล์ไขมันพบว่าน้ำมันรำข้าวช่วยลดการสะสมปริมาณไขมันภายในไซโทพลาสซึมเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมมีค่าอยู่ที่ร้อยละ ๗๘.๐๘ $\pm$ ๑.๓๕ และ ๘๓.๕๓ $\pm$ ๒.๒๖ ในปริมาณความเข้มข้นที่ ๑๐๐ และ ๒๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ ๔ (ก) โดยให้ผลลดลงในทำนองเดียวกันเมื่อศึกษาผลของน้ำมันรำข้าวในช่วงของการเปลี่ยนเป็นเซลล์ไขมันเต็มตัว พบว่าปริมาณการสะสมไขมันมีค่าอยู่ร้อยละ ๖๗.๖๑ $\pm$ ๓.๗๘, ๖๘.๐๓ $\pm$ ๒.๘๘ และ ๗๒.๑๘ $\pm$ ๓.๒๕ ในปริมาณความเข้มข้นที่ ๑๐๐, ๒๐๐ และ ๓๐๐

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ ๔ (ข) นอกจากนี้ยังพบว่ากรดไขมันโอเลอิกยังช่วยลดการสะสมไขมันในช่วงที่มีการเปลี่ยนเป็นเซลล์ไขมัน ค่าอยู่ร้อยละ ๔๖.๖๑ $\pm$ ๑.๔๔, ๕๑.๘๗ $\pm$ ๔.๒๘ และ ๘๘.๑๐ $\pm$ ๔.๗๗ ในปริมาณความเข้มข้นที่ ๒๐, ๔๐ และ ๖๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรดังแสดงในรูปที่ ๔ (ก) และช่วยลดการสะสมไขมันในช่วงของการเปลี่ยนเป็นเซลล์ไขมันเต็มตัว ร้อยละ ๗๕.๘ $\pm$ ๕.๑๘, ๘๒.๒๓ $\pm$ ๗.๘๔ ในปริมาณความเข้มข้นที่ ๒๐ และ ๔๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ ๔ (ข) แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองพบว่าการสะสมไขมันมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันปาล์มมิติกเป็น ๖๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มากขึ้นร้อยละ ๒๓.๗๘ $\pm$ ๕.๘๘ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ ๔ (ข)





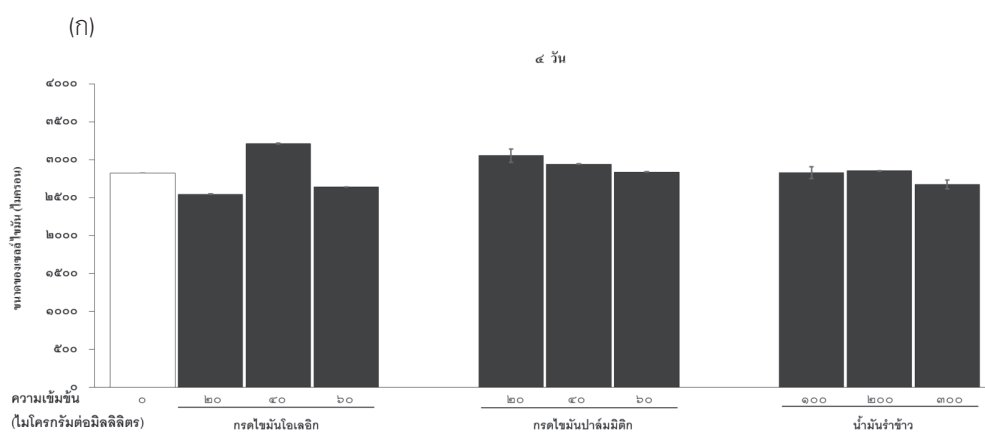
แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.M)

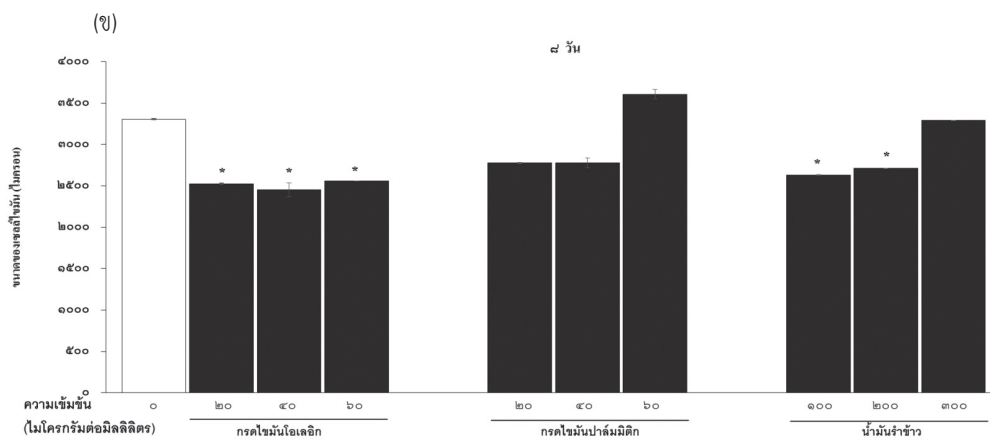
* แสดงความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มควบคุมกลุ่มที่ ๑ ที่ค่า $p < 0.05$

รูปที่ ๔ แสดงการย้อมการสะสมไขมันของกรดไขมันโอเลอิก กรดไขมันปาล์มมิติก และ น้ำมันรำข้าวต่อเซลล์ไขมันชนิด 3T3-L1 ในช่วง ๔ วัน (ก) และในช่วง ๘ วัน (ข) ถูกทดสอบด้วยวิธี oil red O

นอกจากนี้ยังพบว่า การได้รับน้ำมันรำข้าว ทำให้ขนาดของเซลล์ไขมันในช่วงการเป็นที่เป็นเซลล์ไขมันเต็มตัว ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (282 ± 3.78 ไมครอน) โดยมีค่าอยู่ที่ 287 ± 1.56 , 285 ± 2.38 และ 287 ± 2.68 ไมครอน ในปริมาณ

ความเข้มข้นที่ ๑๐๐, ๒๐๐ และ ๓๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ ให้ผลในการทำงานเกี่ยวกับการได้รับกรดไขมันโอเลอิก แต่ในขณะเดียวกันขนาดของเซลล์ไขมันไม่ได้ลดลงเมื่อทดสอบด้วยกรดไขมันปาล์มมิติก เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ ๕ (ข)





แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.M)

* แสดงความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มควบคุมกลุ่มที่ ๑ ที่ค่า $p < 0.05$

รูปที่ ๕ แสดงผลการวัดขนาดเซลล์ไขมันของ กรดไขมันโอเลอิก กรดไขมันปาล์มมิติก และน้ำมันรำข้าวต่อเซลล์ไขมันชนิด 3T3-L1 ในช่วง ๔ วัน (ก) และในช่วง ๘ วัน (ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

ในการศึกษานี้พบว่าน้ำมันรำข้าวไม่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งในช่วงการเหนี่ยวนำเป็นเซลล์ไขมันและช่วงการเปลี่ยนเป็นเซลล์ไขมันเต็มตัวแล้วเช่นเดียวกับการดไขมันโอเลอิกซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ ร้อยละ ๓๘ ของน้ำมันรำข้าว ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่าการได้รับกรดไขมันปาล์มมิติกมีแนวโน้มที่จะเป็นพิษต่อเซลล์ไขมันในช่วงการเหนี่ยวนำเป็นเซลล์ไขมันเต็มตัวแล้ว จากผลการศึกษาข้างนี้ชี้ว่าการได้รับน้ำมันรำข้าวและกรดไขมันโอเลอิกอาจมีความปลอดภัยต่อเซลล์ไขมัน ซึ่งกรดไขมันโอเลอิกอาจเป็นสารสำคัญของรำข้าวในการป้องกันฤทธิ์ของกรดไขมันปาล์มมิติกที่เหนี่ยวนำให้มีการตายของเซลล์ไขมันได้ แต่อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาต่อไป

ในการศึกษานี้ยังพบว่าการได้รับน้ำมันรำข้าวสามารถลดการสะสมของไขมันได้ทั้งในช่วงการเหนี่ยวนำเป็นเซลล์ไขมันและในช่วงการเหนี่ยวนำเป็นเซลล์ไขมันเต็มตัวแล้วรวมทั้งสามารถลดขนาดของเซลล์ไขมันได้โดยเฉพาะในช่วงที่มีการเจริญเป็นเซลล์ไขมันเต็มตัวแล้ว จากข้อมูลนี้อาจบ่งชี้ได้ว่าการได้รับน้ำมันรำข้าวอาจป้องกันการเพิ่มขึ้นของมวลเนื้อเยื่อไขมันได้สนับสนุนผลการศึกษาข้างนี้โดยการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า น้ำมันรำข้าวสามารถให้ฤทธิ์ในการปรับเมตาบอลิซึมของไขมันที่ผิดปกติผ่านการลดระดับไขมันคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ได้ในทั้งสัตว์ทดลองและมนุษย์^{๑๑, ๑๒} ซึ่งการได้รับกรดไขมันโอเลอิกเพียงอย่างเดียวก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน

ทั้งในการลดการสะสมและขนาดของเซลล์ไขมัน บ่งชี้ได้ว่ากรดไขมันชนิดนี้อาจเป็นสารสำคัญชนิดหนึ่งของรำข้าวที่ออกฤทธิ์ในการควบคุมเมตาบอลิซึมของไขมัน ขนาดของเซลล์ไขมันและเป็นที่น่าสังเกตว่าการได้รับกรดไขมันโอเลอิกในขนาดที่เพิ่มขึ้นกลับมีแนวโน้มที่จะเพิ่มการสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน แสดงให้เห็นการได้รับกรดไขมันโอเลอิกก็ต้องอยู่ในสัดส่วนที่เหมาะสมถ้าได้รับปริมาณมากเกินไปอาจนำไปสู่การสะสมของไขมันภายในเซลล์ไขมันได้ แต่อย่างไรก็ตามผลดังกล่าว ซึ่งต่างจากรายงานของ Kotta และคณะ ที่พบว่าการกรดไขมันโอเลอิกช่วยเพิ่มการสะสมในเซลล์ไขมัน^{๑๓} แต่ยังไม่มีการรายงานที่แน่ชัดว่า กรดไขมันโอเลอิกช่วยลดขนาดเซลล์และช่วยลดการสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน มีเพียงรายงานกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดหลายตำแหน่งช่วยลดมวลเนื้อเยื่อไขมันเพื่อยับยั้งการพัฒนาเป็นโรคอ้วนในหนู^{๑๔} นอกจากนี้ยังพบว่ากรดไอโคซาเพนตาอีนอิก (eicosapentaenoic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า ๓ ช่วยลดขนาดของเซลล์ไขมัน, การสะสมไขมันและช่วยลดการแสดงออกของยีน peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเซลล์ไขมัน^{๑๕}

สรุปผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าน้ำมันรำข้าวสามารถลดขนาดของเซลล์ไขมันโดยอาจมีกลไกผ่านการลดการสะสมของไขมันในเซลล์ไขมัน สารสำคัญที่คาดว่าจะมีสารออกฤทธิ์ก็คือ กรดไขมันโอเลอิกโดยอาจจะมีสารอื่นออกฤทธิ์ร่วมด้วย เช่น กรดไขมันไลโนเลอิก จากผลการทดลองสามารถนำไป

ประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาผู้ที่มีภาวะอ้วนลงพุงได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังเป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้น ยังต้องมีการศึกษาต่อไปในระดับชีววิทยาโมเลกุล รวมทั้งการศึกษาในสัตว์ทดลองเพื่อสนับสนุนผลการศึกษานี้ต่อไปซึ่งอาจจะมีผลต่อการนำไปสู่การพัฒนาวิธีการป้องกันและรักษาผู้ป่วยโรคอ้วนลงพุงให้ดียิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่ให้ทุนและเอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, et al. Hypertrophy and/or hyperplasia: Dynamics of adipose tissue growth. *PLoS computational biology* 2009;5:e1000324.
- Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 1996;87:377-89.
- Symonds ME, Budge H, Perkins AC, Lomax MA. Adipose tissue development-impact of the early life environment. *Prog Biophys Mol Biol* 2011;106:300-6.
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 2000;14:1293-307.
- Qureshi AA, Sami SA, Salser WA, Khan FA. Synergistic effect of tocotrienol-rich fraction (TRF(25) of rice bran and lovastatin on lipid parameters in hypercholesterolemic humans. *J Nutr Biochem* 2001;12:318-29.
- Sharma RD, Rukmini C. Rice bran oil and hypocholesterolemia in rats. *Lipids* 1986;21:715-7.
- Kuriyan R, Gopinath N, Vaz M, Kurpad AV. Use of rice bran oil in patients with hyperlipidaemia. *Natl Med J India* 2005;18:292-6.
- Berry EM, Eisenberg S, Haratz D, Friedlander Y, Norman Y, Kaufmann NA, et al. Effects of diets rich in monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins--the Jerusalem Nutrition Study: high MUFAs vs high PUFAs. *Am J Clin Nutr* 1991;53:899-907.
- Garaulet M, Perez-Llomas F, Perez-Ayala M, Martinez P, de Medina FS, Tebar FJ, et al. Site-specific differences in the fatty acid composition of abdominal adipose tissue in an obese population from a Mediterranean area: relation with dietary fatty acids, plasma lipid profile, serum insulin, and central obesity. *Am J Clin Nutr* 2001;74:585-91.
- Lairon D. Intervention studies on Mediterranean diet and cardiovascular risk. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:1209-14.
- Cicero AF, Gaddi A. Rice bran oil and gamma-oryzanol in the treatment of hyperlipoproteinaemias and other conditions. *Phytother Res* 2001;15:277-89.
- Minhajuddin M, Beg ZH, Iqbal J. Hypolipidemic and antioxidant properties of tocotrienol rich fraction isolated from rice bran oil in experimentally induced hyperlipidemic rats. *Food Chem Toxicol* 2005;43:747-53.
- Manickam E, Sinclair AJ, Cameron-Smith D. Suppressive actions of eicosapentaenoic acid on lipid droplet formation in 3T3-L1 adipocytes. *Lipids in Health and Disease*. 2010;9:57.
- Kokta TA, Strat AL, Papasani MR, Szasz JI, Dodson MV, Hill RA. Regulation of lipid accumulation in 3T3-L1 cells: insulin-independent and combined effects of fatty acids and insulin. *Animal* 2008;2:92-9.
- Madsen L, Petersen RK, Kristiansen K. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 2005;1740:266-86.

Abstract

Effects of rice bran oil on lipid accumulations on 3T3-L1 cells

Jierada Rabalert *, Narongsuk Munkong **, Wason Parklak**, Nusiri Lerdvuthisopon***

* M.Sc. Candidate, Graduate program in Medical Science (Nutraceutical Science), Faculty of Medicine, Thammasat University

** Ph.D. Candidate, Graduate program in Medical Science (Nutraceutical Science), Faculty of Medicine, Thammasat University

*** Division of Biochemistry, Department of Preclinical Science, Faculty of Medicine, Thammasat University

Corresponding author: Jierada Rabalert, Division of Nutraceutical Science, Faculty of Medicine, Thammasat University Praholyothin Road, Khlong Luang, Pathumthani

Introduction: Rice bran oil (RO) reduced hyperlipidaemia, oleic acid is a major fatty acid of RO. However, the direct effects of RO in 3T3-L1 adipocyte have not been previously investigated. Thus, the aim of this study investigated the direct effects of RO and oleic acid (OA) on lipid accumulation *in vitro* on 3T3-L1 cells.

Method: Cells were treated with different concentrations of RO, OA and palmitic (PA). After incubation, the cells were determined cells viability by MTS assay, the lipid accumulation by oil red O staining assay and cell size by microscope.

Result: In this study, on cytotoxicity results demonstrated that RO, OA treatments showed no toxicity. However, PA at 60 and 80 µg/mL of PA treatments were found to be toxic on 3T3-L1 cells. Moreover, RO and OA treatments were found to inhibit lipid accumulation for mature adipocyte. At 60 µg/mL PA incubation, the lipid accumulation increased. Adipocyte size was significantly reduced in RO and OA, however palmitic acid had no effect to increase cell size.

Discussion and Conclusion: RO treatments were found to inhibit lipid accumulation and reduced adipocyte size. Rice bran oil has no effect on the viability of cell which probably oleic acid is the important active ingredient. These properties, may be used to prevent anti-obesity.

Key words: 3T3-L1 cells, Rice bran oil, Oleic acid, Palmitic acid