

สารสกัดจากข้าวมีสียับยั้งการเกิดผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลต และการเกาะจับเซลล์เพาะเลี้ยงท่อไตสุนัข

Pigmented Rice Extracts Inhibit Calcium Oxalate Crystal Formation and Adhesion to MDCK Renal Tubular Cell Line

ปริญญพร นูรูไ¹, ธิตาภรณ์ ภู่วัณ¹, ฮามีเดห์ ชฟา¹, วิฑูร ขาวสุข¹, ทิชฎยา เสมาเงิน^{2*}

Parinyaporn Nurai¹, Thitaporn Pukhan¹, Hameedah Shafa¹, Witoon Khawsuk¹, Tistaya Semangoen^{2*}

บทคัดย่อ

โรคนิ่วในไต เป็นโรคเรื้อรังที่พบได้ทั่วโลกและมีอัตราการเป็นซ้ำประมาณ 21-53% มีการใช้สารจากธรรมชาติในการป้องกันการเกิดโรคนิ่วในไต โดยเฉพาะสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น มะนาว ชาเขียว และกระเจี๊ยบแดง โดยงานวิจัยนี้มุ่งศึกษาผลของสารสกัดจากข้าวมีสีต่อการเกิดและการเกาะเกี่ยวของผลึกแคลเซียมออกซาเลต (CaOx) ในหลอดทดลอง และการเกาะจับของผลึกกับเซลล์ท่อไต MDCK โดยใช้ข้าวมีสี 2 สายพันธุ์ คือข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดสกัดด้วย 75% เอทิลแอลกอฮอล์ ทดสอบการเกิด การเกาะเกี่ยวกันของผลึก CaOx ในหลอดทดลอง และฤทธิ์ยับยั้งการเกาะจับของผลึกกับเซลล์ MDCK และวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One-way analysis of variance การทดสอบพบว่าสารสกัดข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเกิดและการเกาะเกี่ยวของผลึก CaOx ได้ทุกความเข้มข้นและเป็นแบบ Dose dependent อีกทั้งลดการเกาะจับของผลึกกับเซลล์ MDCK โดยสารสกัดข้าวเหนียวดำให้ผลการทดสอบที่ดีกว่าสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยด สรุปได้ว่าสารสกัดจากข้าวมีสีโดยเฉพาะข้าวที่มีสีม่วงดำให้ผลในการยับยั้งการเกิดและการเกาะจับของผลึกนิ่วในเซลล์ท่อไต MDCK สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาสารสกัดเพื่อป้องกันการเกิดโรคนิ่วในไตได้ในอนาคต อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องศึกษากลไกเชิงลึกในการป้องกันการเกิดผลึกนิ่วในไตต่อไป

คำสำคัญ: นิ่วในไต, แคลเซียมออกซาเลต, สารสกัดข้าวมีสี, ข้าวเหนียวดำ, ข้าวเหนียวสังข์หยด

Citation:

Nurai P, Pukhan T, Shafa H, Khawsuk W, Semangoen T. Pigmented rice extracts inhibit calcium oxalate crystal formation and adhesion to MDCK renal tubular cell line. Health Sci J Thai 2025; 7(4): 1-8. (in Thai); <https://doi.org/10.55164/hsjt.v7i4.269541>

¹ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

² สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

¹ Department of Medical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

² Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

* Corresponding author: Email: tistaya@go.buu.ac.th, Tel: 062-9642492

Received: 3 Jun 2024; Revised: 7 Aug 2025; Accepted: 15 Aug 2025

Abstract

Kidney stone is a worldwide chronic disease with a recurrence rate ranging from 21–53%. Natural antioxidant-rich substances, particularly plant extracts such as lemon, green tea, and okra, have been explored for their potential in preventing kidney stone formation. This study aimed to investigate the effects of Black glutinous rice extract (BR) and Sung-Yod glutinous rice extract (SY) on calcium oxalate crystal nucleation, aggregation in vitro, and crystal adhesion to MDCK renal tubular epithelial cells. The statistical analyses were performed using a one-way analysis of variance with a significance level of $P < 0.05$. The results demonstrated that BR and SY extracts significantly inhibited calcium oxalate crystal formation and aggregation in a dose-dependent manner. Furthermore, treatment with BR and SY extracts reduced the number of crystal-MDCK cell adhesions. It can be concluded that rice extracts, particularly those from black glutinous rice, inhibit calcium oxalate crystal formation and adhesion in MDCK renal tubular cells. It contributes to the development of potential preventive agents against kidney stones. Further studies are warranted to elucidate the underlying mechanisms by which these rice extracts exert their anti-urolithiatic effects.

Keywords: Kidney stone, Calcium oxalate, Pigmented rice extract, Black glutinous rice, Sung-Yod glutinous rice

บทนำ

โรคนิ่วในไต (Kidney stone) เป็นโรคที่มีแนวโน้มความชุกเพิ่มขึ้นในหลายประเทศทั่วโลก โดยประเทศในแถบเอเชียมีความชุกของการเกิดโรคประมาณ 1-19.1% ส่วนในประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของโรคถึง 15-16.9% ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปัจจัยการเกิดโรค ได้แก่ พันธุกรรม เพศ อาหาร พฤติกรรม ภูมิอากาศ และเชื้อชาติ เป็นต้น⁽¹⁾ โดยชนิดของนิ่วที่พบบ่อยคือนิ่วแคลเซียมออกซาเลต (CaOx) โดยเฉพาะชนิดแคลเซียมออกซาเลตโมโนไฮเดรต (COM) กลไกการเกิดนิ่วในไตเริ่มจากการตกผลึก (Crystal nucleation) ของแคลเซียม และ ออกซาเลตไอออน บริเวณท่อไตส่วนปลาย มีการเติบโตของผลึก (Crystal growth) การเกาะเกี่ยวของผลึก (Crystal aggregation) และการจับของผลึกกับผิวเซลล์ท่อไต (Crystal adhesion) จนก้อนนิ่วมีขนาดใหญ่⁽²⁾ ออกกันทางเดินปัสสาวะทำให้ผู้ป่วยแสดงอาการ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดบริเวณบั้นเอว ปัสสาวะได้น้อยและเจ็บปวด อาจมีเลือดปนในปัสสาวะ และอาจเกิดการติดเชื้อการรักษาโรคนิ่วในไต ได้แก่ การดื่มน้ำให้มากขึ้น การใช้ยา และการผ่าตัดสำหรับนิ่วที่มีขนาดใหญ่⁽³⁾ แต่ยังคงพบอัตราการเกิดโรคซ้ำประมาณ 21-53% ได้ภายใน 3-5 ปี⁽¹⁾

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาสารสกัดจากธรรมชาติจำนวนมากในการป้องกันและจัดการกับโรคนิ่วในไต เช่น ชาเขียว กระเจี๊ยบแดง ทับทิม และราสเบอร์รี่ เป็นต้น พืชธรรมชาติเหล่านี้มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin-3-gallate, Rutin, Quercetin และ Curcumin เป็นต้นโดยมีการทดสอบการยับยั้งการเกิดนิ่วในไต ภายในหลอดทดลอง ในสัตว์ทดลองหรือทดสอบในมนุษย์⁽⁴⁾ ข้าว (*Oryza sativa*) เป็นพืชเศรษฐกิจ

ที่สำคัญและมีการบริโภคอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ มีสารอาหาร เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามิน เกลือแร่ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น γ -oryzanol, Tocopherol, Protocatechuic acid, syringic acid, Ferulic acid, Cinnamic acid, p-coumaric acid, Quercetin, Apigenin, Catechin, Luteolin และ Myricetin เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่พบการศึกษาในข้าวเจ้าและข้าวหอม โดยเมล็ดข้าวที่มีสี เช่น สีแดง สีน้ำตาล สีม่วงดำ จะมีสารแอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นเม็ดสีสะสมอยู่บริเวณเปลือก โดยพบ Cyanidin-3-glucoside (C3g) ประมาณ 93% ของแอนโทไซยานินทั้งหมด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ⁽⁵⁾ มีรายงานวิจัยพบว่าข้าวที่มีสีมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดและการเกาะกลุ่มของผลึกแคลเซียมออกซาเลตในหลอดทดลอง ได้แก่ ข้าวหอมเหนียวดำ⁽⁶⁾ และข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่⁽⁷⁾ เป็นต้น

จากรายงานการศึกษารายการออกฤทธิ์ของสารสำคัญที่พบในข้าวเหนียวดำ เช่น สารแอนโทไซยานิน Acetylated procyanidin สารแกมมา-โอโรซานอล วิตามินอี และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็ง ยับยั้งการอักเสบ ด้านเบาหวานและลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด นอกจากนี้พบสารประกอบระเหยง่าย เช่น สารประเภทอัลดีไฮด์และแอลกอฮอล์ เช่น Pentanal, Hexanal, Heptanal, 2-pentylfuran, Octanal, Nonanal, (E)-2-octenal, Nonanal, 1-octen-3-ol, Decanal, (E)-2-nonenal, 1-octanol และ vanillin รวมถึงสารกลุ่มไฟโรลีน เช่น 2-acetyl-1-pyrroline ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารที่มีคุณค่าต่อสุขภาพ นอกเหนือจากการเป็นแหล่งสารอาหารพื้นฐานสำหรับการบริโภคของมนุษย์ได้⁽⁸⁾ อย่างไรก็ตามการศึกษาค้นคว้าประกอบและสารออกฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวเหนียวที่มีสีต่อการเกิดผลึกนิ่วในไตยังมีไม่มากนัก

งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำ และข้าวเหนียวสังข์หยดซึ่งเป็นข้าวพื้นเมืองที่เพาะปลูกในเขต จังหวัดสงขลา เป็นพืชเศรษฐกิจที่นิยมมาบริโภคและแปรรูปเป็น อาหารต่างๆ โดยทำการศึกษการยับยั้งการเกิดผลึกแคลเซียม ออกซาเลต ภายในหลอดทดลอง ได้แก่ การเกิดผลึก การเกาะเกี่ยว ของผลึก และการเกาะจับของผลึกกับเซลล์ท่อไต MDCK เพื่อให้ ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปต่อยอดพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ เพื่อเพิ่มมูลค่า ส่งเสริมการเพาะปลูกข้าว หรือเป็นแนวทางในการ บริโภคข้าวที่มีสีเพื่อป้องกันโรคไตในไต

วิธีการวิจัย

เตรียมสารสกัดข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด

นำเมล็ดข้าวเหนียวดำ (BR) และข้าวเหนียวสังข์หยด (SY) จำนวน 1 กิโลกรัมมาบดให้ละเอียด และสกัดด้วย 75% เอทิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1:2 ห่อฟอยด์แล้วนำไปทำการสกัดซ้ำ เชย้าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองแล้วนำไปทำการสกัดซ้ำ อีกครั้ง นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Vacuum rotary evaporator และ Lyophilizer แล้วนำไปคำนวณร้อยละ ของสารสกัด (%yield) = (ปริมาณสารสกัดที่ได้ / ปริมาณสารเริ่ม ต้น) x100 จากนั้นเก็บสารสกัดไว้ที่ -20 °C

ทดสอบการเกิดผลึก CaOx

การทดสอบทำตามรายงานของ Ly และคณะ⁽⁹⁾ เตรียมสารสกัด BR และ SY ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/ml ปริมาตร 250 µl ผสมกับ 5 mM CaCl₂ ปริมาตร 750 µl ในหลอดทดลอง เชย้าให้เข้ากันจากนั้นเติม 7.5 mM Na₂C₂O₄ ปริมาตร 750 µl เพื่อให้เกิดการตกผลึก CaOx นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm การทดลองนี้ใช้ โพแทสเซียม ซิเตรท (KC) เป็น positive control และใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.05 M ที่มี NaCl 0.15 M (pH 6.5) เป็นกลุ่มควบคุม ทำการทดสอบซ้ำสามครั้ง คำนวณร้อยละการยับยั้งการตกผลึก (% inhibition) = [(OD กลุ่มควบคุม - OD กลุ่มตัวอย่าง) / OD กลุ่มควบคุม] x 100

ทดสอบการเกาะเกี่ยวของผลึก CaOx

การทดสอบทำตามรายงานของ Ly และคณะ⁽⁹⁾ เตรียม ผลึก COM จากสารละลาย 50 mM CaCl₂ ผสมกับ 50 mM Na₂C₂O₄ ในบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris-HCl mM และ 0.15 M NaCl (pH 6.5) นำไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน เก็บผงผลึกแห้งนำไปเตรียม เป็นสารละลายผลึก 5 mg/mL ในบัฟเฟอร์ ทำการทดสอบโดย ผสมสารสกัดความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/ml ปริมาตร 1 mL กับสารละลายผลึก 3 mL นำไป vortex และบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm ทำการ ทดสอบซ้ำสามครั้ง จากนั้นนำค่าไปคำนวณร้อยละการยับยั้งการ

เกาะเกี่ยวของผลึก (%inhibition) = [(OD กลุ่มควบคุม - OD กลุ่มตัวอย่าง) / OD กลุ่มควบคุม] x 100

ทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุท่อไตส่วนปลาย MDCK ด้วยวิธี flow cytometry

ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เยื่อบุ ท่อไตส่วนปลาย MDCK ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ห้องปฏิบัติการ อนุเวชศาสตร์ ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ปริมาณ 4 x 10⁴ เซลล์ใน 96-well plate ด้วยอาหาร DMEM ที่มี 1.2% penicillin-streptomycin และ 10% fetal bovine serum บ่มที่ 37°C ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบ่งการทดลองเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 บ่มกับอาหาร DMEM (negative control) กลุ่มที่ 2 positive control บ่มกับ C3g (CAS No.7084-24-4, Axo Chemicals and Services Co. Ltd.) ความเข้มข้น 1.5-100 µM กลุ่มที่ 3 และ 4 เป็นกลุ่ม ทดสอบ บ่มกับสารสกัด BR และ SY ความเข้มข้น 25-1,600 µg /mL ทำการบ่มที่ 37°C ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ด้วย PBS และเก็บเซลล์ลงในหลอด 1.5 mL ย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบ เวลานั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer (BD accuri™ C6 Plus Flow cytometer, BD Biosciences) ทำการทดสอบ ซ้ำสามครั้ง นำผลที่ได้ไปคำนวณร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) = 100 - ร้อยละของเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis

ทดสอบการเกาะจับของผลึก CaOx กับเซลล์เยื่อบุท่อไต ส่วนปลาย MDCK

การทดลองนี้ทำตาม Semangoen T และคณะ⁽¹⁰⁾ โดย เตรียมผลึก COM จาก 10 mM CaCl₂·2H₂O ผสมกับ 10 mM Na₂C₂O₄ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ CaCl₂·2H₂O เป็น 5 mM และ Na₂C₂O₄ 0.5 mM ใน 10 mM Tris buffer ที่มี 90 mM NaCl (pH 7.3) นำไป vortex แล้วบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง นำมา ปั่นเก็บผลึกด้วยความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทำการ ปั่นล้างด้วยเมทานอล หลังจากดูดเมทานอลทิ้งปล่อยให้ผลึก แห้ง เก็บที่อุณหภูมิห้อง กำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยการฉายรังสี UV เป็นเวลา 30 นาทีก่อนนำไปทดสอบกับเซลล์

เลี้ยงเซลล์ MDCK 6 x 10⁶ cells/well ใน 6-well plate ด้วยอาหาร DMEM นำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารสกัด BR และ SY ความเข้มข้น 100 - 400 µg/ml และเติม C3g ความ เข้มข้น 25-100 µM ลงในแต่ละหลุม จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดูดสารสกัดออก เตรียมผลึก COM ความเข้มข้น 200 µg/mL ที่อยู่ในอาหาร DMEM โดยกำหนดให้หลุมที่เติม อาหาร DMEM เป็น negative control จากนั้นนำไปบ่มในตู้ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ตรวจดู การเกาะจับของผลึกกับเซลล์ MDCK ด้วยกล้อง inverted

microscope ที่กำลังขยาย 40X แบบสุ่ม จากนั้นนับจำนวนผลึกที่เกิดขึ้นในแต่ละกลุ่มจำนวน 5 บริเวณ โดยใช้โปรแกรม Image J ทำการทดสอบซ้ำสามครั้ง แล้วนำไปคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งการเกาะจับระหว่างผลึกกับเซลล์ = [(จำนวนผลึกกลุ่มควบคุม - จำนวนผลึกกลุ่มตัวอย่าง) / จำนวนผลึกกลุ่มควบคุม] × 100

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลค่าจริงที่ได้จากการทดลองมาหาค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อน (SD หรือ SE) จากนั้นวิเคราะห์ทางสถิติด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) ทดสอบ Tukey HSD test เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 22 ซึ่งมีค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ p-value <0.05

ผลการศึกษา

ปริมาณสารสกัดหยาบข้าวเหนียวดำ (BR) และข้าวเหนียวสังข์หยด (SY) คิดเป็นร้อยละเมื่อเทียบกับน้ำหนักผงข้าวก่อนสกัดมีค่าเท่ากับ 1.1% และ 0.3% ตามลำดับ ผลของสารสกัดข้าวทั้งสองชนิดต่อการเกิดผลึก CaOx ในหลอดทดลองพบว่า

สารสกัด BR และ SY มีร้อยละการยับยั้งการเกิดผลึก CaOx เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นตามลำดับ โดยกลุ่มที่ได้รับสารสกัด BR ความเข้มข้น 200 และ 400 µg/mL มีร้อยละการยับยั้งการเกิดผลึก CaOx เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกที่ได้รับสารละลายโพแทสเซียมซิเตรต และกลุ่มที่ได้รับสารสกัด SY ดังแสดงในภาพที่ 1A (Figure 1A) ในขณะที่สารสกัด SY มีความสามารถในการยับยั้งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมบวก

ผลการทดสอบสารสกัดข้าวทั้งสองชนิดต่อการเกาะเกี่ยวของผลึก CaOx ในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัด BR ทุกความเข้มข้น (100-400 µg/mL) มีร้อยละการยับยั้งการเกาะเกี่ยวของผลึก CaOx เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด SY ส่วนสารสกัด SY มีร้อยละการยับยั้งการเกาะเกี่ยวของผลึก CaOx น้อยกว่ากลุ่มควบคุมบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ดังแสดงในภาพที่ 1B (Figure 1B) จากผลการทดสอบจะเห็นได้ชัดเจนว่าสารสกัด BR มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดและการเกาะเกี่ยวของผลึก CaOx ได้ดีกว่าสารสกัดจากข้าว SY

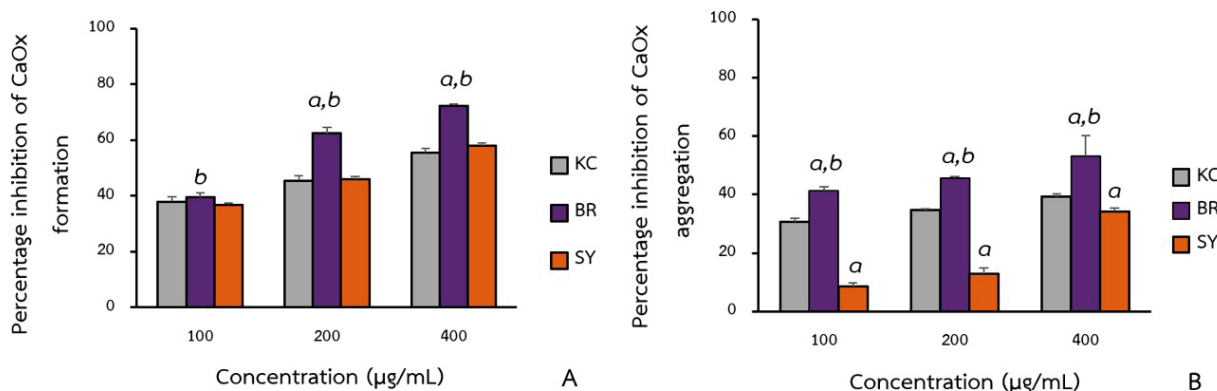


Figure 1 The percentage inhibition of CaOx formation (A) and CaOx aggregation (B) in the positive control group (KC), Black glutinous rice extract (BR), and Sung-Yod glutinous rice extract (SY) treated groups at the concentrations of 100, 200 and 400 µg/mL, respectively (n = 3/group). “a” and “b” indicated a statistically significant difference at p<0.05 compared to the positive control and SY treated groups, respectively.

ความเป็นพิษของสารสกัด BR และ SY ต่อเซลล์ท่อไตส่วนปลาย MDCK พิจารณาได้จากร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ ผลการทดสอบพบว่าเซลล์ MDCK ที่บ่มร่วมกับแอนโทไซยานิน C3g ทุกความเข้มข้น มีร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่าร้อยละ 80 ทุกความเข้มข้น โดยความเข้มข้นของ C3g ที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดร้อยละ 50 (IC50) มีค่าเท่ากับ 2,621 µM ดังแสดงในภาพที่ 2A (Figure 2A) เมื่อบ่มเซลล์ MDCK กับสารสกัด BR พบว่าการมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่าร้อยละ 80 ทุกความเข้มข้น ยกเว้นที่ความเข้มข้น 1,600 µg/mL ที่การมีชีวิตรอดของเซลล์

ลดลงเหลือร้อยละ 60.48 เมื่อคำนวณ IC50 พบว่ามีค่าเท่ากับ 2,434 µg/mL ผลการทดสอบสารสกัด SY กับเซลล์ MDCK พบว่าการมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่าร้อยละ 80 ทุกความเข้มข้น แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 800 และ 1,600 µg/mL พบว่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงเหลือร้อยละ 79.37 และ 42.89 ตามลำดับ โดย SY มีค่า IC50 เท่ากับ 1,536 µg/mL โดยทั้งสองกลุ่มของสารสกัดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value <0.05) กับกลุ่มควบคุม ที่มีค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ร้อยละ 100 ดังแสดงในภาพที่ 2B (Figure 2B)

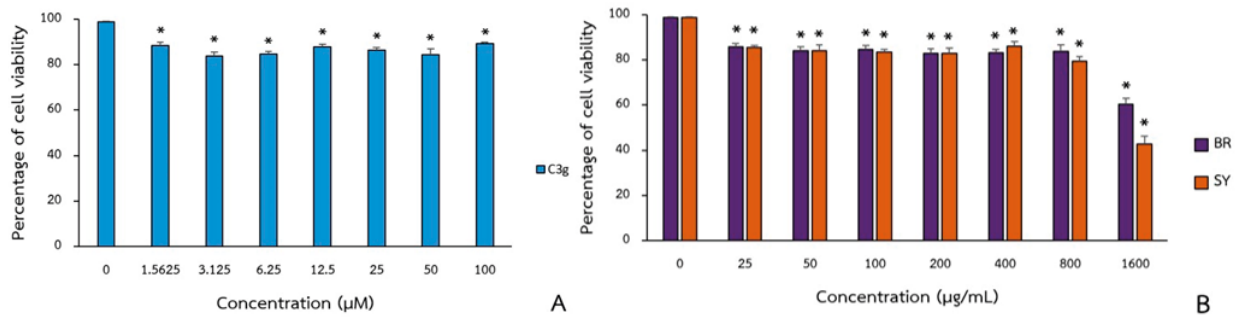


Figure 2 (A) The percentage of cell viability in the positive control group (C3g) at the concentration of 0-100 µM. (B) The percentage of cell viability in the Black glutinous rice extract (BR) and Sung-Yod glutinous rice extract (SY) treated groups at the concentration of 0-1,600 µg/mL, respectively (n=3/group). An asterisk (*) indicated a statistically significant difference at $p < 0.05$ compared to the negative control (0 µg/mL).

จากภาพเซลล์ท่อไตส่วนปลาย MDCK มีลักษณะเป็น Monolayer epithelial cells ซึ่งเป็นส่วนของ distal collecting duct เป็นบริเวณที่เกิดการตกผลึกนิ่วภายในท่อไตของมนุษย์ เมื่อนำมาบ่มร่วมกับสาร C3g และสารสกัดข้าวทั้งสองชนิดในสภาวะที่มีผลึก COM หลังล้างด้วยบัฟเฟอร์ทำการนับจำนวนผลึก COM ที่ยังคงเกาะจับกับเซลล์อยู่ ซึ่งจะเห็นลักษณะของผลึก COM หกเหลี่ยม หรือปลายเป็นแฉกทั้งสองข้าง ดังแสดงในภาพที่ 3A (Figure 3A) ผลการนับจำนวนผลึก COM ที่ยึดเกาะกับเซลล์พบว่า กลุ่มที่บ่มกับแอนโทไซยานิน C3g ทุกความเข้มข้นมีจำนวนผลึกลดลง แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่มีสารสกัด ดังแสดงในภาพที่ 3B (Figure 3B) ในขณะที่ กลุ่มที่ได้รับสารสกัด BR ที่ความเข้มข้น 200 และ 400 µg/mL มีจำนวนผลึกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) และมีร้อยละการยับยั้งการเกาะจับระหว่างผลึก COM กับเซลล์ MDCK คิดเป็น 27.06 และ 23.46 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3C (Figure 3C) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัด SY ที่ความเข้มข้น 100 และ 400 µg/mL มีจำนวนผลึกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ดังแสดงในภาพที่ 3C (Figure 3C) และมีร้อยละของการยับยั้งการเกาะจับระหว่างผลึกกับเซลล์คิดเป็น 30.10 และ 24.20 ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่า สารสกัดข้าวทั้งสองชนิดสามารถที่จะยับยั้งการเกาะจับระหว่างผลึก COM กับเซลล์ MDCK ซึ่งจัดเป็นขั้นตอนวิกฤติของการเกิดนิ่วในไตได้

อภิปรายผล

กลไกการเกิดนิ่วในไต เริ่มจากการอิมิตัวอย่างยวดยิ่งของแคลเซียม และออกซาเลตไอออนในท่อไตส่วนปลายทำให้เกิดการตกผลึก ผลึกมีขนาดเติบโตขึ้น เกิดการเกาะเกี่ยวกันของผลึก และผลึกยึดเกาะกับผิวเซลล์ท่อไตส่วนปลาย⁽²⁾ ทั้งนี้การตกผลึก CaOx ในปัสสาวะนั้นเกิดได้จากหลายสาเหตุ ได้แก่ ความเข้มข้นของแคลเซียม และออกซาเลตไอออน ความเป็นกรด-ด่างของ

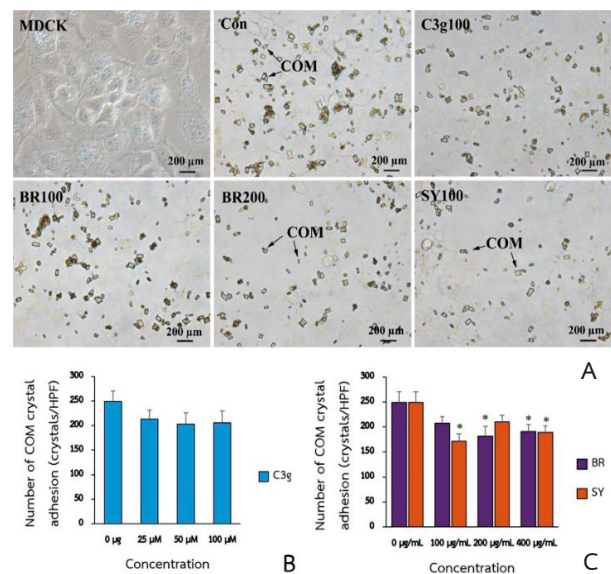


Figure 3 (A) The photograph showing the COM crystal-MDCK cell adhesion in the negative control group (Con), the positive control group (C3g) at the concentration of 100 µM, the Black glutinous rice extract (BR) treated groups at the concentration of 100 and 200 µg/mL, respectively and the Sung-Yod glutinous rice extract (SY) treated groups at the concentration of 200 µg/mL. (B) and (C) The number of COM crystal-MDCK cell adhesion (n = 3/group, Mean $\pm$ SE). Asterisk (*) indicated a statistically significant difference at p -value < 0.05 compared to the negative control (0 µg/mL).

ปัสสาวะ อัตราการไหลของปัสสาวะ⁽¹¹⁾ และปริมาณของสารป้องกันการเกิดนิ่ว (stone inhibitors) ในปัสสาวะ เช่น osteopontin และ citrate เป็นต้น โมเลกุลเหล่านี้จะลดการเกิดผลึกทำให้ลักษณะพื้นผิวของผลึกเปลี่ยนไปและลดอัตราเร็วในการเกิดผลึก CaOx ในปัสสาวะ⁽¹²⁾ สารสกัดข้าวเหนียวดำ และข้าวเหนียวสังข์หยดในการทดลองครั้งนี้สามารถยับยั้งการตกผลึก และการเกาะเกี่ยวกันของผลึก CaOx ได้ดีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะสารสกัดข้าวเหนียวดำซึ่งให้ผลดีกว่าสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยด ผลสอดคล้องกับรายงานของสารสกัดรำข้าวเหนียวดำ และสารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการก่อตัวและการเกาะเกี่ยวของผลึก CaOx แบบ dose-dependent⁽⁶⁻⁷⁾ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณและชนิดของสารพฤกษเคมี และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด มีรายงานพบว่าในข้าวที่มีสีจะมีแอนโทไซยานินซึ่งเป็นรงควัตถุ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่คือ Cyanidin 3-glucoside และ peonidin 3-glucoside โดยข้าวที่มีสีจะมีระดับแอนโทไซยานินสูงกว่าข้าวสีแดง ในข้าวสีดามีกรดฟีนอลิกอิสระที่พบมากคือ protocatechuic acid, vanillic acid และ ferulic acid ตามลำดับ ในขณะที่ข้าวสีแดงพบ ferulic acid, protocatechuic acid และ vanillic acid ตามลำดับ⁽¹³⁾ จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดผลึกนิวแคลเซียมออกซาลเลตสูงกว่าสารโพแทสเซียมซิเตรท ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาการยับยั้งการเกิดผลึก CaOx ในสัตว์ทดลอง⁽¹⁴⁾ หรือการใช้น้ำมะนาวซึ่งมี citric acid สูง ให้ผู้ป่วยรับประทานเป็นประจำทุกวันสามารถเพิ่มระดับ citrate และลดระดับของแคลเซียมไอออนภายในปัสสาวะได้ใกล้เคียงกับการให้ potassium citrate⁽¹⁵⁾ ส่งผลให้มีการก่อตัวของผลึกนิวแคลเซียมออกซาลเลตลดลง และนำไปสู่การป้องกันการเป็นซ้ำของนิ่วในไตได้อย่างมีนัยสำคัญ⁽¹⁶⁾

จากการนำสารสกัดข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดบ่มกับเซลล์ MDCK พบว่าสารสกัดทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นไม่เกิน 800 µg/mL จะไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งมีร้อยละการมีชีวิตรอดมากกว่า 80 แต่เซลล์จะมีชีวิตรอดลดลงที่ความเข้มข้น 1600 µg/mL แอนโทไซยานิน C3g ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากในข้าวที่มีสี ที่ความเข้มข้น 1.56-100 µM ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เช่นกัน ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงเลือกใช้สารสกัดข้าวที่ความเข้มข้น 100-400 µg/mL และใช้ C3g ที่ความเข้มข้น 25-100 µM

การเกิดผลึกนิวแคลเซียมออกซาลเลตในท่อไตจะส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพของไต โดยเฉพาะผลึก COM จะไปยึดเกาะกับเยื่อหุ้มท่อไต แล้วกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ endocytosis นำผลึกนิวแคลเซียมออกซาลเลตเข้าสู่เซลล์ เยื่อหุ้มท่อไตก่อนจะส่งไปยังส่วนเยื่อรองรับฐานของเยื่อหุ้มนอกจากนี้ ผลึกนิวแคลเซียมออกซาลเลตจะถูกจับกินด้วยเซลล์ dendritic ที่อยู่ในเนื้อเยื่อไต ส่งผลให้มีการหลั่งอนุมูลอิสระและสารกระตุ้น

การอักเสบเพิ่มมากขึ้น นำไปสู่การอักเสบและการเกิดพังผืดของเนื้อเยื่อไตได้ในที่สุด⁽¹⁷⁾ ดังนั้นการยับยั้งการเกาะจับของผลึกนิวแคลเซียมออกซาลเลตกับเซลล์ MDCK ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อาจเป็นผลมาจากสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดที่พบในสารสกัดข้าวอาจมีผลกำจัดสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ MDCK ส่งผลลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารชีวโมเลกุลที่ใช้ในการยึดเกาะกับผลึกนิวแคลเซียมออกซาลเลต ส่งผลให้เซลล์ MDCK ถูกทำลายลดลง พยาธิสภาพของเซลล์ MDCK จึงลดลง มีการศึกษาสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิกและแอนโทไซยานินในสารสกัดจากข้าวไรซ์เบอร์รี่มีผลลดการเกิดและการรวมกลุ่มของผลึกนิวแคลเซียมออกซาลเลตในหลอดทดลอง⁽⁷⁾ รายงานการศึกษาสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยดสามารถลดการเกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไตของหนูแรท ที่เกิดจากการกระตุ้นให้เกิดผลึก CaOx ด้วย ethylene glycol ได้ โดยลดการแสดงออกของอนุมูลอิสระ และเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ catalase และ superoxide dismutase ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อไต⁽¹⁸⁾ โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในสารสกัดอาจทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ที่สามารถจับกับแคลเซียมไอออนที่มีอยู่ในสภาพแวดล้อม แคลเซียมไอออนจึงไม่สามารถจับกับออกซาลเลตไอออนและก่อตัวเป็นผลึกนิวแคลเซียมออกซาลเลตได้ การเกิดนิ่วจึงลดลง⁽⁷⁾ มีรายงานการศึกษาสารสำคัญในพืชชนิดต่างๆ ที่มีผลลดหรือยับยั้งในกระบวนการต่างๆ ของการเกิดโรคไตในไตเช่น สารกลุ่มฟลาโวนอยด์จำพวก apigenin catechin epicatechin rutin และ quercetin สารกลุ่มกรดฟีนอลิกจำพวก caffeic acid ferulic acid gallic acid rosmarinic acid และสารกลุ่ม terpenoid furanochrome carotenoid alkaloid วิตามินอี กรดไขมัน⁽¹⁹⁾ รวมถึงแอนโทไซยานิน⁽⁷⁾ นอกจากนี้มีการศึกษาผลของสารสำคัญชนิดอื่น ๆ เช่น สาร trigonelline tea polysaccharide และ *Porphyra yezoensis* polysaccharides สามารถลดความสามารถในการจับกันระหว่างเซลล์ท่อไตกับผลึกนิวแคลเซียมออกซาลเลต และสามารถลดพยาธิสภาพของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ⁽²⁰⁻²²⁾ การศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า สารสกัดข้าวเหนียวดำมีผลยับยั้งการเกิด การเกาะเกี่ยวกันของผลึกนิวแคลเซียมออกซาลเลตกับเซลล์ MDCK กับผลึกนิวแคลเซียมออกซาลเลตได้ดีกว่าสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยดโดยอาจมีสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลิกและแอนโทไซยานินที่ทำหน้าที่ในการออกฤทธิ์ดังกล่าว อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาโครงสร้างของสารสำคัญและกลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรคไตในไตต่อไป

ข้อเสนอแนะ

โรคไตในไตเป็นโรคที่มีกลไกกลับมาเป็นซ้ำได้ภายใน 5-10 ปี ดังนั้นการหาวิธีป้องกันด้วยการปรับพฤติกรรมและรับประทานอาหารเป็นยากี่จะช่วยลดจำนวนการกลับมาเป็นซ้ำของผู้ป่วยได้

และมีความปลอดภัย ลดผลข้างเคียงจากการใช้ยา อีกทั้งควรเผยแพร่ความรู้ให้กับเกษตรกร เพื่อให้เกษตรกรได้เห็นคุณประโยชน์ของข้าวที่มีสี ส่งเสริมให้มีการเพาะปลูกมากขึ้น หรือแปรรูปผลิตภัณฑ์ซึ่งจะช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับข้าวที่มีสี

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

- 1) ควรมีการศึกษาสารสกัดข้าวเหนียวดำในการป้องกันโรคในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นนิ่วในไต
- 2) ควรมีการศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องเชิงลึกเพื่อนำไปสู่การเข้าใจกลไกการป้องกันการเกิดโรคนิ่วในไตของสารสกัดข้าวเหนียวดำ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ปีงบประมาณ พ.ศ. 2567

เอกสารอ้างอิง

1. Liu Y, Chen Y, Liao B, Luo D, Wang K, Li H, Zeng G. Epidemiology of urolithiasis in Asia. Asian journal of urology 2018; 5(4): 205-214.
2. Khan SR, Pearle MS, Robertson WG, Gambaro G, Canales BK, Doizi S, Traxer O, Tiselius HG. Kidney stones. Nat Rev Dis Primers 2016; 25(2) 16008.
3. Fontenelle LF, Sarti TD. Kidney Stones: Treatment and Prevention. Am Fam Physician 2019; 99(8): 490-496.
4. Nirumand MC, Hajialyani M, Rahimi R, Farzaei MH, Zingue S, Nabavi SM, Bishayee A. Dietary Plants for the Prevention and Management of Kidney Stones: Preclinical and Clinical Evidence and Molecular Mechanisms. International Journal of Molecular Sciences 2018; 19(3): 765.
5. Walter M, Marchesan E, Massoni PF, da Silva LP, Sartori GM, Ferreira RB. Antioxidant properties of rice grains with light brown, red and black pericarp colors and the effect of processing. Food research international 2013; 50(2): 698-703.
6. Khawsuk W, Semangoen T, Nuurai, P. Effects of the local purple sticky rice bran extract on antioxidant activity and calcium oxalate crystal formation and aggregation in vitro. J Health Sci Altern Med 2022; 4(2): 1-7.
7. Khawsuk W, Semangoen T, Nuurai P, Mepan W, Wingworn K. Antioxidant activity of unpolished riceberry rice (*Oryza sativa*) and the inhibition of calcium oxalate crystal growth and aggregation. Chula Med J 2018; 62(3): 419-434.
8. Ali MM, Hashim N. Exploring nutritional compositions, volatile compounds, health benefits, emerging processing technologies, and potential food products of glutinous rice: A review. Rice Science 2024; 31(3): 251-268.
9. Ly HT, Nguyen MT, Pham TH, Nguyen HD, Nguyen MK. Anti-urolithic, anti-inflammatory and antibacterial properties of various extracts from *Musa balbisiana* Colla fruits. Pharmaceutical Sciences Asia 2021; 48(4): 388-401.
10. Semangoen T, Sinchaikul S, Chen ST, Thongboonkerd, V. Proteomic analysis of altered proteins in distal renal tubular cells in response to calcium oxalate monohydrate crystal adhesion: Implications for kidney stone disease. Prot. Clin. Appl., 2008; 2: 1099-1109.
11. Thongboonkerd V, Semangoen T, Chutipongtanate S. Factors determining types and morphologies of calcium oxalate crystals: molar concentrations, buffering, pH, stirring and temperature. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 2006; 367(1-2): 120-131.
12. Qiu SR, Wierzbicki A, Orme CA, Cody AM, Hoyer JR, Nancollas GH, Zepeda S, De Yoreo JJ. Molecular modulation of calcium oxalate crystallization by osteopontin and citrate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004; 101(7): 1811-1815.
13. 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 Chemistry 2011; 124(1): 132-140.
14. Wang S, Li X, Bao J, Chen S. Protective potential of *Angelica sinensis* polysaccharide extract against ethylene glycol-induced calcium oxalate urolithiasis. Renal failure 2018; 40(1): 618-627.
15. Aras B, Kalfazade N, Tuğcu V, Kemahli E, Ozbay B, Polat H, Taşçi Al. Can lemon juice be an alternative

- to potassium citrate in the treatment of urinary calcium stones in patients with hypocitraturia? A prospective randomized study. *Urological research* 2008; 36(6): 313–317.
16. Ruggerenti P, Caruso MR, Cortinovis M, Perna A, Peracchi T, Giuliano GA, Rota S, Brambilla P, Invernici G, Villa D, Diadei O, Trillini M, Natali G, Remuzzi G. Fresh lemon juice supplementation for the prevention of recurrent stones in calcium oxalate nephrolithiasis: A pragmatic, prospective, randomised, open, blinded endpoint (*PROBE*) trial. *EClinicalMedicine* 2021; 43: 101227.
 17. Mulay SR, Evan A, Anders HJ. Molecular mechanisms of crystal-related kidney inflammation and injury. Implications for cholesterol embolism, crystalline nephropathies and kidney stone disease. *Nephrology, dialysis, transplantation* : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association 2014; 29(3): 507–514.
 18. Semangoen T, Khawsuk W, Simanon N, Soiphet T, Homjai W, Boonchaleaw B, Seanchan P, Nuurai P. Antioxidant effects of unpolished Sung-Yod sticky rice on prevention of ethylene glycol-induced renal pathology in rats. *Chula Med J* 2018; 62(3): 451-457.
 19. El Menyiy, N, Khouchlaa A, El Omari N, Zengin G, Gallo M, Montesano D, Bouyahya A. Litholytic activities of natural bioactive compounds and their mechanism insights. *Applied Sciences* 2021; 11(18), 8702.
 20. Peerapen P, Boonmark W, Thongboonkerd V. Trigonelline prevents kidney stone formation processes by inhibiting calcium oxalate crystallization, growth and crystal-cell adhesion, and downregulating crystal receptors. *Biomedicine & pharmacotherapy* 2022; 149: 112876.
 21. Zhao YW, Liu L, Li CY, Zhang H, Sun XY, Ouyang JM. Preprotection of Tea Polysaccharides with Different Molecular Weights Can Reduce the Adhesion between Renal Epithelial Cells and Nano-Calcium Oxalate Crystals. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2020; 2020.
 22. Sun XY, Zhang H, Deng JW, Yu BX, Zhang YH, Ouyang JM. Regulatory Effects of Damaged Renal Epithelial Cells After Repair by *Porphyra yezoensis* Polysaccharides with Different Sulfation Degree on the Calcium Oxalate Crystal-Cell Interaction. *International journal of nanomedicine* 2021; 16: 8087–8102.