ผลของสารสกัดรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต ต่อฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ

THE EFFECT OF EDIBLE BIRD'S NEST PROTEIN HYDROLYSATE EXTRACT ON NITRIC OXIDE INHIBITION IN MACROPHAGE

พิราภรณ์ ทองอ่อน

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2567

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ผลของสารสกัดรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต ต่อฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ

THE EFFECT OF EDIBLE BIRD'S NEST PROTEIN HYDROLYSATE EXTRACT ON NITRIC OXIDE INHIBITION IN MACROPHAGE

พิราภรณ์ ทองอ่อน

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2567

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ผลของสารสกัดรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต ต่อฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ

THE EFFECT OF EDIBLE BIRD'S NEST PROTEIN HYDROLYSATE EXTRACT ON NITRIC OXIDE INHIBITION IN MACROPHAGE

พิราภรณ์ ทองอ่อน

การค้นคว้าอิสระนี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ
2567

คณะกรรมการสอบการค้นคว้าอิสระ

....ประธานกรรมการ
(ดร.อาริญา สาริกะภูติ)

....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ดร.กานต์ วงศ์ศุภสวัสดิ์)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.วงเดือน ปั้นดี)

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความกรุณาของ ดร.กานต์ วงศ์ศุภสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ช่วยให้คำแนะนำในการดำเนินการทำวิจัยในครั้งนี้และ ขอบคุณ ดร.อาริญา สาริกะภูติ และรองศาสตราจารย์ ดร.วงเดือน ปั่นดี กรรมการที่ให้คำแนะนำปรับปรุงการค้นคว้าอิสระนี้ให้สำเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณบริษัท เพียวไบโอเทค ประเทศไทย จำกัด ที่ให้วัตถุดิบสารสกัดรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซทและสนับสนุนทุนการศึกษาเพื่อศึกษาวิจัยในครั้งนี้ และขอบคุณสำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชั้นสูง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และดร.ภูนุช มูหะหมัด สำหรับการทดสอบเซลล์ RAW 264.7

ขอขอบคุณสำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงและเจ้าหน้าที่ ที่ช่วยให้คำแนะนำ ประสานงานให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ จนทำให้การค้นคว้าอิสระนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

พิราภรณ์ ทองอ่อน

ชื่อเรื่องการค้นคว้าอิสระ	ผลของสารสกัดรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต ต่อฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ
ชื่อผู้เขียน	พิราภรณ์ ทองอ่อน
หลักสูตร	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ)
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.กานต์ วงศ์ศุภสวัสดิ์

บทคัดย่อ

รังนกถือเป็นวัตถุดิบที่สร้างมูลค่ามากมายในการส่งออกของประเทศ และรังนกต้มหรือตุ๋นมีการบริโภคตามความเชื่อมายาวนานว่ามีส่วนช่วยเสริมสร้างสุขภาพที่ดีต่อร่างกาย จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้ การนำรังนกที่ผ่านขบวนการสกัดด้วยวิธีไฮโดรไลเซตด้วยน้ำเพื่อให้ได้โมเลกุลโปรตีนที่มีขนาดเล็ก และให้สารสำคัญในกลุ่มไซอะลิกแอซิด จะช่วยเพิ่มคุณค่าและประโยชน์ต่อการบริโภคที่มากขึ้น โดยการศึกษานี้ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต มีค่า IC50 ของสารสกัดรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตอยู่ที่ 2,602 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบโดยดูการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของเซลล์มาโครฟาจ (RAW264.7) เมื่อบ่มด้วยสาร LPS ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า รังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตความเข้มข้น 10, 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของเซลล์มาโครฟาจ (RAW264.7) ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.1$; Mann-Whitney U test) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้รับสารสกัดดังกล่าว โดยที่ความเข้มข้นของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ 10, 20, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ 15.3, 28.0, 52.3 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และมีแนวโน้มของการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ที่สูงขึ้นแปรไปตามขนาดของความเข้มข้นของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต

คำสำคัญ: รังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต, ไซอะลิแอซิด, ไนตริกออกไซด์, การต้านการอักเสบ

Independent Study Title The Effect of Edible Bird's Nest Protein Hydrolysate Extract on Nitric Oxide Inhibition in Macrophage

Author Piraporn Thongon

Degree Master of Science (Anti-Aging and Regenerative Science)

Advisor Karnt Wongsuphasawat, Ph. D.

ABSTRACT

Bird's nest is considered a raw material that creates a lot of value in the country's exports. Boiled or stewed bird's nests have long been consumed according to the belief that they help promote good health for the body. Therefore, it is the origin of this study. Using bird's nest that has been extracted using a hydrolysate method with water to obtain small protein molecules and provides important substances in the sialic acid group It will add value and benefit to increased consumption. This study tested the toxicity of bird's nest protein hydrolysate extract. The IC50 value of bird's nest protein hydrolysate extract was 2,602. micrograms per milliliter. We study the anti-inflammatory effect by inhibition of nitric oxide of macrophage cells (RAW264.7) when incubated with LPS at a concentration of 0.1 micrograms per milliliter. It was found that bird's nest protein hydrolysate at concentrations of 10, 20, and 100 micrograms per milliliter could inhibit the production of nitric oxide by macrophage cells. (RAW264.7) was significantly ($p \leq 0.1$; Mann-Whitney U test) compared to samples that did not receive the extract. where the concentration of bird's nest protein hydrolysate was 10, 20, 100 micrograms per milliliter. The nitric oxide inhibition values were 15.3, 28.0, 52.3 micromolar,

respectively, and the trend of inhibiting nitric oxide production increased depending on the concentration of bird's nest protein hydrolysate.

Keywords: Bird's Nest Protein Hydrolysate, Sialic Acid, Nitric Oxide, Anti-Inflammatory

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	**(3)**
บทคัดย่อภาษาไทย	**(4)**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**(5)**
สารบัญตาราง	**(10)**
สารบัญภาพ	**(11)**
บทที่	
1 บทนำ	**1**
1.1 ภูมิหลัง ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตการศึกษา	3
1.4 คำจำกัดความ	3
1.5 สมมติฐานของการวิจัย	4
1.6 กรอบแนวความคิด	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**5**
2.1 ประวัติความเป็นมาของรังนก	5
2.2 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพและโภชนาการ	5
2.3 ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ความชื้น และไขมันของรังนกบ้าน	6
2.4 ปริมาณกรดอะมิโนของรังนก	6
2.5 ปริมาณโมโนแซ็กคาไรด์ของรังนก	8
2.6 กรดไซอะลิค (Sialic Acid)	8
2.7 การอักเสบ (Inflammation)	9
2.8 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษโดยวิธี MTT Assay	9

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่	
2.9 ประโยชน์ของรังนกสกัด สรุปจากงานวิจัย	10
3 วิธีการดำเนินการวิจัย	**11**
3.1 การเตรียมรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต (Edible Bird’s Nest Protein Hydrolysate)	11
3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT	11
3.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซต (Griess Assay)	13
4 ผลการศึกษา	**16**
4.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตต่อเซลล์ RAW 264.7 ที่ 24 ชั่วโมง	16
4.2 ผลการทดสอบการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์	20
5 สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	**27**
5.1 สรุปผลการทดลอง	27
5.2 อภิปรายผลการทดลอง	28
5.3 ข้อเสนอแนะ	28
รายการอ้างอิง	**29**
ภาคผนวก	**34**
ภาคผนวก บันทึกการส่งตรวจวิเคราะห์	35

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ประวัติผู้เขียน	**37**

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 ค่าโดยประมาณของ EBN ที่เก็บเกี่ยวจากรังนกบ้านในประเทศต่าง ๆ	6
2.2 กรดอะมิโนของ EBN จากมาเลเซีย ไทย และ Johor (รัฐในมาเลเซีย)	7
3.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT	11
3.2 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์	13
4.1 สรุปผลการทดลองความเข้มข้นของรังนกไฮโดรไลเซตที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์	18
4.2 ความเข้มข้นของรังนกไฮโดรไลเซตและร้อยละการมีชีวิตของเซลล์	19
4.3 ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่สร้างโดยเซลล์ RAW 264.7 เมื่อได้รับสาร lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซตความเข้มข้นต่าง ๆ	21
4.4 ร้อยละการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์โดยเซลล์ RAW 264.7 เมื่อได้รับสาร lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซตความเข้มข้นต่าง ๆ	21
4.5 การทดสอบสถิติ BNE 1 μg/ml with LPS 0.1 μg/ml	23
4.6 การทดสอบสถิติ Test Statistics (BNE 1 μg/ml with LPS 0.1 μg/ml)	23
4.7 การทดสอบสถิติ BNE 10 μg/ml with LPS 0.1 μg/ml	24
4.8 การทดสอบสถิติ Test Statistics (BNE 10 μg/ml with LPS 0.1 μg/ml)	24
4.9 การทดสอบทางสถิติ BNE 20 μg/ml with LPS 0.1 μg/ml	24
4.10 ทดสอบทางสถิติ Test Statistics (BNE 20 μg/ml with LPS 0.1 μg/ml)	25
4.11 การทดสอบทางสถิติ BNE 100 μg/ml with LPS 0.1 μg/ml	25
4.12 ทดสอบสถิติ Test Statistics (BNE 100 μg/ml with LPS 0.1 μg/ml)	26

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1.1 กรอบแนวความคิดการศึกษารังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต	4
2.1 โครงสร้าง N-acetylneuraminic acid (NANA)	8
4.1 อัตราการอยู่รอดของเซลล์ต่อความเข้มข้นของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต	16
4.2 อัตราการอยู่รอดของเซลล์ต่อความเข้มข้นของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต	17
4.3 อัตราการอยู่รอดของเซลล์ต่อความเข้มข้นของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต	18
4.4 ความเข้มข้นของรังนกไฮโดรไลเซตและร้อยละการมีชีวิตของเซลล์	19
4.5 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 เมื่อได้รับสาร lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซตความเข้มข้นต่าง ๆ	20
4.6 ปริมาณไนตริกออกไซด์และร้อยละการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์โดยเซลล์ RAW 264.7 เมื่อได้รับสาร lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซตความเข้มข้นต่าง ๆ	22

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ภูมิหลัง ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

Edible bird's nest (EBN) รังนกได้จากสารคัดหลั่งจากต่อมน้ำลาย (salivary glands) ของนกอีแอ่น หรือ นกแอ่นกินรังที่สามารถนำมาบริโภคได้ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Collocalia germani หรือ Aerodramus fuciphagus หรือ Collocalia fuciphaga อยู่ในสกุล Aerodramus หรือสกุล Collocalia [1] เนื่องจากรังนกมีโภชนการทางอาหารที่ดี รังนกจึงถูกนำมาใช้เพื่อการบริโภคในตำรับอาหารและยาของราชวงศ์ชั้นสูงมาตั้งแต่สมัยโบราณ ปัจจุบันรังนกกินได้ มีข้อพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์สมัยใหม่ เปิดเผยถึงกลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านไข้หวัดใหญ่ และประสิทธิภาพการปรับสีผิว รวมไปถึงฤทธิ์การสมานแผล และการปรับปรุงเพิ่มจำนวนของสเต็มเซลล์ [2]

โภชนการของรังนก Edible Bird's Nest (EBN) อุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน แร่ธาตุ และยังอุดมไปด้วยองค์ประกอบหลักคือไกลโคโปรตีนโดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไซอาลิกที่มีความสำคัญในการกำหนดคุณภาพของรังนก โครงสร้างของกรดไซอาลิกถูกพบในรังนกกินได้ประมาณ 9% กรดไซอาลิกประกอบไปด้วยสารมากกว่า 20 ชนิด ที่ได้มาจาก neuraminic acid และ N-acetyl-neuraminic acid (NANA) [3] และเนื่องจาก NANA มีโครงสร้างแบบมีขั้วสูงจึงมีคุณสมบัติการกักเก็บน้ำบนผิวหน้าของเซลล์ และช่วยเพิ่มการดูดซึมของเหลวในเซลล์ อย่างไรก็ตาม NANA มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยการทดลองในแบบจำลอง Caco-2 cells [4] นอกจากนี้นักวิจัยยังพบคุณสมบัติของรังนกกินได้ ต่อ Epidermal growth factor (EGF) ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาส [5] และการศึกษาแบบจำลองเซลล์ผิวหนังมนุษย์พบว่า รังนกกินได้ มีคุณสมบัติการบรรเทาความเสียหายของผิวหนังจากการให้ รังสีอัลตราไวโอเลต B โดยมีฤทธิ์ในการควบคุมเอนไซม์ metrix metalloproteinase-1 (MMPs) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในร่างกายมีบทบาทในการย่อยสลายสารเมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์ พวกคอลลาเจน อิลาสติน และไกลโคสะมิโนไกแคน และรังนกกินได้ยังมีฤทธิ์ในการควบคุมการแสดงของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ procollagen Type I เป็นผลให้เกิดการสังเคราะห์คอลลาเจนเพิ่มขึ้น และรังนกกินได้มีฤทธิ์ลดการสร้างสารสื่อ

อักเสบ TNF α (Tumor necrosis factor alpha), IFN γ (Interferon gamma)ในแบบจำลอง Keratinocytes (HaCaTs) และมีผลต่อการสมานแผล โดยการส่งเสริมการเหนี่ยวนำของ hyaluronan [6] และจากการศึกษารังนกกินได้อาจมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายพบว่ารังนกกินได้มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาว T-lymphocyte และการควบคุมการผลิตสารในกลุ่มไซโตไคน์ interleukin-2 [7] ซึ่งสารในกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันโดยควบคุมการเพิ่มจำนวนและการทำหน้าที่ของ T-cells และเนื่องด้วยรังนกกินได้เป็นอาหารทางความเชื่อของชาวจีนในเรื่องเสริมภูมิต้านทาน จึงได้มีการศึกษารังนกกินได้ต่อระบบภูมิคุ้มกันอีกมากมาย เช่น ศึกษารังนกกินได้ต่อแบบจำลองภูมิคุ้มกันในหนูทดลองพบว่า รังนกกินได้สามารถเพิ่มจำนวนและความว่องไวของ B-cells และมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของ IgE, IgA, IgM และ IgG3 และยังพบว่า รังนกสกัดยังสามารถเพิ่มการหลั่ง SigA ในลำไส้เล็ก โดยแบบจำลองการศึกษาภูมิคุ้มกันในหนูทดลองยังพบว่า รังนกสกัดสามารถปกป้อง B-cells ต่อความเสียหายจากการเหนี่ยวนำของ Cyclophosphamide (CY) ซึ่งเป็นสารกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยงานวิจัยนี้ยังสรุปได้ว่ารังนกกินได้สามารถช่วยลดการบาดเจ็บของระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้จากการเหนี่ยวนำของ CY โดยมีผลเร่งการเจริญและกระตุ้นการทำงานของ B-cells และสนับสนุนแอนติบอดี้หลั่ง B-cells [8]

อย่างไรก็ตามรังนักกินได้ ส่วนใหญ่จะแปรรูปด้วยวิธีการต้มหรือเคี่ยวในน้ำก่อนการบริโภค แต่โปรตีนบางกลุ่มยังคงไม่ละลายน้ำได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งการสกัดรังนกด้วยการต้มจึงได้ปริมาณ 5-12% โปรตีน [9] และโปรตีนที่สกัดด้วยวิธีการต้มจะยังคงเป็นโปรตีนโมเลกุลขนาดใหญ่ ขนาดโมเลกุลมากกว่า 100 กิโลดาลตัน [10-11] จะมีกรด N-Acetylneuraminic (NANA) คิดเป็นประมาณ 10% ของน้ำหนักแห้งรวมของรังนกกินได้ [12] แต่ NANA ส่วนใหญ่อยู่ใน

แบบฟอร์มคอนจูเกต มีความสามารถในการดูดซึมต่ำ จึงได้มีการศึกษาพัฒนาวิธีการสกัดรังนกกินได้ โดยศึกษาการย่อยรังนกกินได้ในระบบทางเดินอาหารจำลอง หลังจาก 48 ชั่วโมงของการย่อย รังนกกินได้ ด้วยของเหลวในกระเพาะอาหารจำลอง ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด NANA ได้รับการปลดปล่อยอย่างเต็มที่ เป็นรูปแบบอิสระ และโปรตีนมีขนาดที่เล็กลง โดยมีการเปรียบเทียบคุณสมบัติของรังนกที่ผ่านการย่อยแล้ว กับผ่านการสกัดด้วยน้ำ พบว่า รังนกที่ย่อยแล้วจะแสดงการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และยับยั้งขบวนการสังเคราะห์เม็ดสี B16 melanogenesis ได้ดีกว่า นอกจากนี้ รังนกที่ย่อยแล้วยังมีการสร้างกระดูกที่แข็งแกร่งขึ้น [13]

จึงเป็นที่มาของการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพรังนกสกัดด้วยวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์แบบไฮโดรไลเซต ซึ่งวิธีนี้สามารถให้คุณค่าทางโภชนาการที่ดีกว่ารังนกพร้อมดื่มทั่ว ๆ ไป ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์สริมอาหาร เครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์รังนกแปรรูปได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต (Edible Bird’s nest Protein hydrolysate ด้วยวิธี MTT assay

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตต่อฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์

1.3 ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาฤทธิ์ของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต (Edible Bird’s nest Protein hydrolysate) ต่อการอยู่รอดของเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay และ ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี Griess assay

1.4 คำจำกัดความ

1.4.1 Edible Bird’s Nest (EBN) Protein Hydrolysate

คือ รังนกกินได้ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

1.4.2 Sialic Acid

คือ เป็นองค์ประกอบของของโมโนแซ็กคาไรด์ และเป็นส่วนประกอบส่วนหนึ่งของไกลโคโปรตีนของรังนกกินได้และเป็นตัวกำหนดคุณภาพที่ดีของรังนก

1.4.3 MTT Assay

คือ การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ หลักการทำงานของ MTT คือเซลล์ซึ่งยังมีชีวิตอยู่มี Enzyme succinate dehydrogenase ซึ่ง จะเปลี่ยน tetrazolium salt ให้เป็น formazan โดยปฏิกริยา reduction และผลึก formazan มีสีม่วง น้ำเงินที่ไม่ละลายในน้ำต้องละลายด้วย DMSO และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของ formazan ซึ่งจะแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต

1.4.4 50% Inhibitory Concentration (IC50)

ซึ่งมีความหมายถึง ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50 %

1.4.5 การอักเสบ (Inflammation)

เป็นปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เมื่อร่างกายมีการอักเสบแบบเฉียบพลัน เช่น มีการติดเชื้อไวรัส ติดเชื้อแบคทีเรีย หรือ มีการบาดเจ็บ จะกระตุ้นให้หลั่งสารชักนำให้เกิดการอักเสบออกมา (inflammatory mediators) ได้แก่ ไนตริกออกไซด์ (NO), โพรสตาแกลนดิน (Prostaglandins) และ โซโตไคน์ (Cytokines) [14]

1.4.6 สารไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide)

เป็นกลุ่มของอนุมูลอิสระที่ผลิตจากกระบวนการเปลี่ยนกรดอะมิโน L-Arginine เป็น L-Citrullineโดยใช้เอนไซม์ Nitric oxide synthase (NOS)

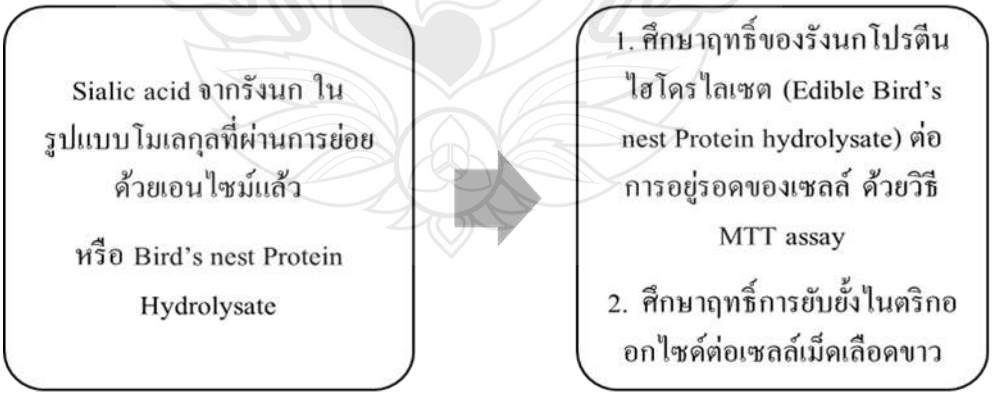
1.4.7 Macrophage (RAW264.7)

เป็นเซลล์มาโคฟาจที่สร้างขึ้นจากเนื้องอกในหนูตัวผู้ที่เกิดจากมะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู Abelson

1.5 สมมติฐานของการวิจัย

รังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตมีผลยับยั้งไนตริกออกไซด์

1.6 กรอบแนวความคิด



ภาพที่ 1.1 กรอบแนวความคิดการศึกษารังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติความเป็นมาของรังนก [15]

รังนก (Edible bird’s nest) เป็นอาหารบำรุงร่างกายชนิดหนึ่งที่ชาวจีนและกลุ่มคนที่มีฐานะดีนิยมรับประทานกันอย่างแพร่หลาย เพราะเป็นของหายากและมีราคาแพง จนถูกขนานนามว่าทองคำขาวแห่งท้องทะเล หรือ คาร์เวียแห่งตะวันออก โดยในอดีตรังนกที่ต้มกับน้ำตาลกรวดได้รับการยกย่องว่าเป็นอาหารบำรุงชั้นยอดของฮ่องเต้ ตลอดจนกลุ่มชนชั้นสูงของจีน วัฒนธรรมการรับประทานรังนกในประเทศต่าง ๆ ทั้งไทย ญี่ปุ่น สิงคโปร์ รวมถึงประเทศอื่น ๆ จึงได้รับการถ่ายทอดวัฒนธรรมนี้มาจากชาวจีนด้วย และยังพบว่า ในราชวงศ์ หมิงตอนปลาย เมื่อแพทย์เขียนใบสั่งยามักจะมีรังนกเป็นส่วนประกอบเสมอ เนื่องจากแพทย์จีนเชื่อว่า รังนกสามารถรักษาโรคทางเดินหายใจ ช่วยบำรุงสุขภาพเด็ก สตรีและคนชรา บำรุงผิวพรรณของสตรีให้มีความนุ่มนวลอ่อนเยาว์ บำรุงปอดและเลือด และบำรุงสุขภาพของผู้ป่วยในระยะพักฟื้น รวมทั้งสตรีหลังคลอดบุตร

2.2 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพและโภชนาการ [16]

สีของรังนกนางแอ่นมีสามสี ได้แก่ สีขาว สีเหลือง (สีทอง) และสีแดง โดยสีของรังนกอาจบ่งชี้ถึงความแตกต่างของแหล่งที่มาของรังนก เช่น รังนกจากถ้ำหรือรังนกจากบ้านรังนก ในผนังถ้ำ รังนกจะมีเส้นคาดทั้งสองข้างติดถ้วยรังไว้ และสีของรังนกใหม่จะมีสีแดงเจือปน แต่สีจะเข้มข้นจนเป็นสีน้ำตาล เมื่อถึงช่วงเวลาเก็บเกี่ยว บางคนเชื่อว่า ที่รังนกกลายเป็นสีแดงเนื่องจากน้ำลายของนกนางแอ่นที่สร้างรักมีเลือดเจือปน บางคนก็มีความเชื่อว่านกนกนางแอ่นกินเมล็ดบัว สาหร่าย หรือหอยที่มีสีแดง จึงทำให้น้ำลายของนกเป็นสีแดง ต่อมามีการศึกษาเกี่ยวกับสีแดงของรังนก จึงพบว่า สีแดงเกิดจากการออกซิเดชันของไนเตรตในมูลของนกนางแอ่น ความแดงของรังนกเกี่ยวข้องกับไนเตรตและไนไตรต์ โดยรังนกจากถ้ำซึ่งอุดมไปด้วยแร่ธาตุ ทำให้รังนกถ้ำมีสีเหลืองเล็กน้อยถึงแดง หรือสีจะเข้มกว่ารังนกที่มาจากบ้าน โซเดียมไนไตรท์ภายในรังนกอาจทำให้ปฏิกิริยากับหมู่ aryl-C-N และ

NO2 ในกรดอะมิโนอะโรมาติกของรังนกสีขาว ซึ่งทำให้รังนกสีขาวเปลี่ยนเป็นสีแดงได้ แต่รังนกจากบ้าน มักจะปรากฏเป็นสีขาว เนื่องจากปริมาณไนเตรทและไนไตรต์ต่ำ

2.3 ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ความชื้น และไขมันของรังนกบ้าน [17]

จากตารางจะแสดงปริมาณโภชนการของรังนกที่เก็บเกี่ยวจากบ้านรังนกในประเทศต่าง ๆ ซึ่งพบว่ามีค่าโปรตีน แตกต่างกันของรังนกบ้านจาก มาเลเซีย อินโดนีเซีย ประเทศไทยและฟิลิปปินส์ อยู่ในช่วง 59.8 ถึง 66.9% ในขณะที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรต อยู่ในช่วง 25.6 ถึง 31.4% ปริมาณความชื้นและไขมันของรังนก ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปริมาณโปรตีนสูงเป็นตัวบ่งชี้ที่แสดงให้เห็นว่านกนางแอ่นอยู่ในสภาพแวดล้อมการให้อาหารที่ดี ณ สถานที่นั้น ค่า Water Activity ของรังนกอยู่ในระดับต่ำ 0.68 ถึง 0.80 ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าทำไมรังจึงไม่ขึ้นราแม้จะถูกทิ้งไว้เป็นเวลานานในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้น ค่าโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ความชื้น และไขมัน มีค่าใกล้เคียงกันระหว่างรังนกที่ได้มาจากถ้ำและรังนกบ้าน

ตารางที่ 2.1 ค่าโดยประมาณของ EBN ที่เก็บเกี่ยวจากรังนกบ้านในประเทศต่าง ๆ

No.	Proximate (%)	Malaysia	Thailand	Philippine	Indonesia
1	Protein	62	62.58	-	65.8
2	Carbohydrate	27.26	29.66	16	10
3	Moisture	7.5	19.82	5.58	10.87
4	Ash	2.1	6.72	1.5	1.5
5	Fat	0.14	0.96	0.05	0.04

2.4 ปริมาณกรดอะมิโนของรังนก [16]

องค์ประกอบของกรดอะมิโนของรังนก จะขึ้นอยู่กับภูมิภาคที่เก็บเกี่ยว ดังแสดงได้จากตารางที่ 2.2 กรดอะมิโนในรังนกจากประเทศไทย พบว่า ไม่มีอาร์จินีน ลิวซีน และทริปโตเฟน ในขณะที่รังนกจากมาเลเซียระบุว่าไม่มีโพรลีน ทริปโตเฟน ซีสเทอีนและซีสตีน บางภูมิภาคในมาเลเซียไม่พบโพรลีนและซิสทีน เมื่อเทียบกับภูมิภาคอื่น เช่น ยะโฮร์

อย่างไรก็ตาม รังนกที่ได้จากแหล่งที่แตกกต่างกัน จะมีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็น ต่ำกว่ากรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น โดย กรดอะมิโนจำเป็นพบในรังนกจากมาเลเซีย (48.4 มก./กรัม) รองลงมาคือ ยะโฮร์ (26.53 มก./กรัม) และประเทศไทย (12.49 มก./กรัม)

การเปรียบเทียบองค์ประกอบกรดอะมิโน ระหว่างรังนกจากถ้ำกับรังนกบ้าน ผลการวิจัยพบว่ากรดอะมิโน methionine พบได้เฉพาะในรังนกสีขาว และปริมาณกลูตาเมตและลิวซีนสามารถเป็นตัวบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างรังนกจากถ้ำและบ้าน นอกจากนี้ รังนกยังไม่มีลักษณะที่แสดงถึงความเป็นคอลลาเจนโดยขาดกรดอะมิโน HLY และ HYP

ตารางที่ 2.2 กรดอะมิโนของ EBN จากมาเลเซีย ไทย และ Johor (รัฐในมาเลเซีย)

No.	Amino acid (mg/g)	Malaysia	Thailand	Johor
1	Aspartic acid	9.5	4.06	4.55
2	Serine	15.4	1.88	6.12
3	Glutamic acid	7	14.56	4.11
4	Glycine	5.9	1.52	2.27
5	Histidine	3.3	0.08	2.2
6	Arginine	5.4	-	4.06
7	Threonine	4.4	1.24	4.47
8	Alanine	4	0.92	1.42
9	Proline	-	0.98	4.15
10	Tyrosine	10.1	0.53	4.37
11	Valine	10.7	1.08	3.68
12	Methionine	0.8	8.35	3.6
13	Lysine	3.5	0.82	1.99
14	Isoleucine	10.1	1.1	1.84
15	Leucine	3	-	4.15
16	Phenylalanine	6.8	0.53	3.9
17	Tryptophan	-	-	0.8
18	Cysteine	-	8.35	-
19	Cystine	-	0.34	2
20	Total EAA	48.3	12.49	26.53
21	Total AA	99.9	46.34	59.68

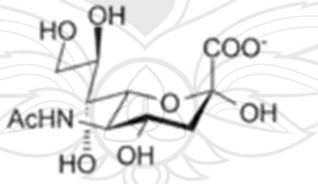
2.5 ปริมาณโมโนแซ็กคาไรด์ของรังนก [16]

องค์ประกอบโมโนแซ็กคาไรด์ของรังนกประกอบด้วย กาแลคโตสสูงและ N-acetylhexosamine งานวิจัย ของ Kathan & Weeks [17] พบว่า องค์ประกอบของรังนกในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต จะพบปริมาณกรดไซอะลิคสูง ประมาณ 8.6% มากกว่าองค์ประกอบอื่น ๆ กรดไซอะลิคในปริมาณสูงมีความสำคัญเพราะเป็นส่วนประกอบของ gangliosides ของสมอง ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบประสาทและพัฒนาการทางสมองของทารก [18]

2.6 กรดไซอะลิค (Sialic Acid) [19]

Sialic Acid เป็นองค์ประกอบของของโมโนแซ็กคาไรด์ และเป็นส่วนประกอบส่วนหนึ่งของไกลโคโปรตีน และ ไกลโคลิปิดของอนุพันธ์ acyl ของ neuraminic acid (5-amino-3, 5-dideoxy D-glycerol-D-galactononurone acid) Sialic acid ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติมีมากกว่า 30 ชนิดและพบว่า กรด N-acetylneuraminic หรือ NANA เป็นกรดไซอะลิคหลักในรังนก (ภาพที่ 2.1) และรังนกจัดว่าเป็นแหล่งอาหารชั้นยอดที่อุดมไปด้วยกรดไซอะลิค

จากข้อมูลงานวิจัย พบว่า กรดไซอะลิค เพิ่มความสามารถในการเรียนรู้ [20] เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน [21] และเสริมป้องกันการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ [22] และมีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนเซลล์ในหลอดทดลอง proliferation of Caco-2 cells [4] ดังนั้น กรดไซอะลิค หรือ NANA จึงอาจเป็นตัวกำหนดคุณภาพที่ดีของรังนกก็เป็นได้



ที่มา [23]

ภาพที่ 2.1 โครงสร้าง N-acetylneuraminic acid (NANA)

2.7 การอักเสบ (Inflammation)

เป็นปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เมื่อร่างกายมีการอักเสบแบบเฉียบพลัน เช่น มีการติดเชื้อไวรัส ติดเชื้อแบคทีเรีย หรือ มีการบาดเจ็บ จะกระตุ้นให้หลั่งสารชักนำให้เกิดการอักเสบออกมา (inflammatory mediators) ได้แก่ ไนตริกออกไซด์ (NO), โพรสตาแกลนดิน (Prostaglandins) และ โซโตไคน์ (Cytokines) [14] ซึ่งสารไนตริกออกไซด์เป็นกลุ่มของอนุมูลอิสระที่ผลิตจากกระบวนการเปลี่ยนกรดอะมิโน L-Arginine เป็น L-Citrullineโดยใช้เอนไซม์ Nitric oxide synthase (NOS)

การวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ที่หลั่งจากในเซลล์ แมคโครฟาจของหนู (RAW 264.7) และเหนี่ยวนำเซลล์ให้เกิดการหลั่งไนตริกออกไซด์ด้วยสารไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide: LPS) ที่ได้จากแบคทีเรียแกรมลบ การหลั่งไนตริกออกไซด์ แปรผันตามการอักเสบที่เกิดขึ้น ดังนั้นการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ในเซลล์ เป็นการประเมิน ประสิทธิภาพส่วนหนึ่งของกระบวนการอักเสบเพื่อศึกษาถึง ฤทธิ์ของตัวอย่างทดสอบ

โดยมีการศึกษาผลของการต้านการอักเสบโดยยับยั้งการเกิด NO จากเซลล์แมคโครฟาจมากมาย เช่น งานวิจัยสารสกัดจากเหง้าเร่มหอม [24]

2.8 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษโดยวิธี MTT Assay [25]

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษโดยวิธี MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium romide test) หลักการทำงานของ MTT คือเซลล์ซึ่งยังมีชีวิตอยู่ มี Enzyme succinate dehydrogenase ซึ่ง จะเปลี่ยน tetrazolium salt ให้เป็น formazan โดยปฏิกริยา reduction และผลึก formazan มีสีม่วง น้ำเงินที่ไม่ละลายในน้ำต้องละลายด้วย DMSO และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของ formazan ซึ่งจะแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต และการศึกษา MTT สามารถหาค่า 50% Inhibitory Concentration (IC50) ซึ่งมีความหมายถึง ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50 %

2.9 ประโยชน์ของรังนกสกัด สรุปจากงานวิจัย

2.9.1 จากการศึกษา Complete digestion of edible bird’s nest releases free N-acetylneuraminic acid and small peptides: An efficient method to improve functional properties พบว่า N-acetylneuraminic acid หรือ Sialic acid ในรังนกที่ยังไม่ผ่านการย่อย จะมีลักษณะแบบฟอร์มคอนจูเกต มีความสามารถในการดูดซึมต่ำ จึงได้มีการศึกษาพัฒนาวิธีการสกัดรังนก กินได้ โดยศึกษาการย่อยรังนกกินได้ในระบบทางเดินอาหารจำลอง หลังจาก 48 ชั่วโมงของการย่อย รังนกกินได้ ด้วยของเหลวในกระเพาะอาหารจำลอง ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด NANA ได้รับการปลดปล่อยอย่างเต็มที่ เป็นรูปแบบอิสระ และโปรตีนมีขนาดที่เล็กลง โดยมีการเปรียบเทียบคุณสมบัติของรังนกที่ผ่านการย่อยแล้ว กับผ่านการสกัดด้วยน้ำ พบว่า รังนกที่ย่อยแล้วจะแสดงการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และยับยั้งขบวนการสังเคราะห์เม็ดสี B16 melanogenesis ได้ดีกว่า นอกจากนี้ รังนกที่ย่อยแล้วยังมีการสร้างกระดูกที่แข็งแกร่งขึ้น

2.9.2 จากการศึกษารังนกกินได้อาจมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายพบว่ารังนกกินได้มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาว T-lymphocyte และการควบคุมการผลิตสารในกลุ่มไซโตไคน์ interleukin-2 โดยการศึกษานี้ทดลองใน vitro และ vivo พบว่ารังนกกินได้มีผลเพิ่มจำนวนของ CD3+ T-cells ในสภาวะมีการใช้ยากดภูมิต้านทาน

2.9.3 การศึกษารังนกกินได้ต่อแบบจำลองภูมิคุ้มกันในหนูทดลองพบว่ารังนกกินได้สามารถเพิ่มจำนวนและความว่องไวของ B-cells และมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของ IgE, IgA, IgM และ IgG3 และยังพบว่า รังนกสกัดยังสามารถเพิ่มการหลั่ง SigA ในลำไส้เล็ก โดยแบบจำลองการศึกษาภูมิคุ้มกันในหนูทดลองยังพบว่ารังนกสกัดสามารถปกป้อง B-cells ต่อความเสียหายจากการเหนี่ยวนำของ Cyclophosphamide (CY) ซึ่งเป็นสารกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยงานวิจัยนี้ยังสรุปได้ว่ารังนกกินได้สามารถช่วยลดการบาดเจ็บของระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้จากการเหนี่ยวนำของ CY โดยมีผลเร่งการเจริญและกระตุ้นการทำงานของ B-cells และสนับสนุนแอนติบอดี้หลั่ง B-cells

2.9.4 จากการศึกษาในประเทศมาเลเซีย พบว่ารังนกกินสีขาวที่ผ่านขบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ต่อการต้านการอักเสบ และศึกษาความเป็นพิษของเซลล์ด้วยวิธี MTS assay ของสถานที่วัตถุดิบรังนกที่เก็บแตกต่างกัน รวมถึงช่วงเวลาที่เก็บแตกต่างกัน และวัดค่า NO ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี the Griess reaction และวัดความเข้มข้นของ TNF-α ด้วย ELISA kit. ผลการศึกษาพบว่า รังนกกินได้สามารถยับยั้ง TNF-α และ NO ด้วยค่าการยับยั้งสูงสุดที่ 58% และ 63% ตามลำดับ โดยผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของวัตถุที่ซื้อจากภาคใต้ ซึ่งการศึกษาสรุปว่ารังนกกินได้อาจจะมีผลต่อการต้านการอักเสบและควรศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต (Edible Bird's Nest Protein Hydrolysate)

วัตถุดิบรังนกนางแอ่น Collocalia germani มาจากภาคใต้ โดยตรวจเช็คปริมาณไซอาลิก แอซิก และทำการแปรรูปรังนกด้วยวิธีการย่อยโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส และคัดแยกโมเลกุลโดยผ่านขั้นตอน Microfiltration และ Ultrafiltration เพื่อคัดแยกโมเลกุลในช่วง 8000 ดาลตัน และผ่านการทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย ออกมาเป็นผงรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต โดยกำหนดค่ามาตรฐาน ของปริมาณ Sialic acid ไม่ต่ำกว่า 1.8%

3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT

3.2.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

ตารางที่ 3.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT

สารเคมี	วัสดุอุปกรณ์
1x DMEM	ถาดหลุมขนาด 96 หลุม
FBS	เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ
Antibiotic-Antimycotic	เครื่องควบคุมการดูดจ่ายสารละลาย
MTT	ตู้ปลอดเชื้อนิรภัยระดับ 2
1x Phosphate Buffered Saline (PBS)	ตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	กล้องจุลทรรศน์หัวกลับชนิด 3 ตา

3.2.2 วิธีการทดลอง

3.2.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

ทดสอบความเป็นพิษโดยใช้เซลล์: RAW 264.7 (ซึ่งเป็นเซลล์ macrophage ที่ได้จากหนู Mus musculus; Abelson murine leukemia virus transformed) โดยมีวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ดังต่อไปนี้

เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ด้วยอาหารที่เตรียมจาก Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ผสม Fetal Bovine Serum (FBS) เข้มข้นร้อยละ 10 และ Antibiotic-Antimycotic เข้มข้นร้อยละ 1 โดยบ่มให้เซลล์เจริญเติบโตในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความชื้นและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนหนาแน่นประมาณร้อยละ 80 จะขูดให้เซลล์หลุดจากภาชนะเพาะเลี้ยง แล้วย้อมเซลล์ด้วย 0.4% trypanblue ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์และนับจานวนเซลล์ที่เลี้ยงได้ โดยจำนวนเซลล์ที่ใช้ต่อหลุม: 50,000 เซลล์ ช่วงความเข้มข้นของสารทดสอบ 0.1 – 2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์เป็นสารทำให้เจือจาง

3.2.2.2 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตและความเป็นพิษต่อเซลล์ของรังนกไฮโดรไลเซตด้วยวิธี MTT

เตรียมสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซตความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อและกรองผ่านหัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร [26]

เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ในถาดหลุมขนาด 96 หลุม หลุมละ 50,000 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความชื้นและปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นบ่มเซลล์กับรังนกไฮโดรไลเซตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมในอาหารที่ไม่มี FBS ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยหลุมที่เป็นกลุ่ม control และ blank จะเปลี่ยนจากรังนกไฮโดรไลเซตเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี FBS ในปริมาณเท่ากัน

เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย 3, [4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย PBS (pH 7.4) หลุมละ 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูดสารละลายในหลุมออกให้หมด และเติม DMSO หลุมละ 100 ไมโครลิตร เขย่าถาดหลุมจนผลึก formazan ละลายเข้ากัน และวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร คำนวณร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) จากค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้เป็นอัตราส่วนการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่รังนกไฮโดรไลเซตต่อค่าการดูดกลืนแสงของหลุม control จากสมการ

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{OD of treated cells} - \text{OD of negative control}}{\text{OD of control cells} - \text{OD of negative control}} \times 100$$

สร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของรังนกและการมีชีวิตของเซลล์ด้วย CalcuSyn™ v2.11 software เพื่อนำมาคำนวณค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ร้อยละ 10 (IC10), IC25, IC50 และ IC90

3.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซต (Griess Assay)

3.3.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

ตารางที่ 3.2 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์

สารเคมี	วัสดุอุปกรณ์
1x DMEM	ถาดหลุมขนาด 96 หลุม
FBS	เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ
Antibiotic-Antimycotic	เครื่องควบคุมการดูดจ่ายสารละลาย
MTT reagent	ตู้ปลอดเชื้อนิรภัยระดับ 2
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	ตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์
Griess reagent	กล้องจุลทรรศน์หัวกลับชนิด 3 ตา
	เครื่องเขย่าไมโครเพลท
	เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท

เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ด้วยอาหารที่เตรียมจาก Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ผสม Fetal Bovine Serum (FBS) เข้มข้นร้อยละ 10 และ Antibiotic-Antimycotic เข้มข้นร้อยละ 1 โดยบ่มให้เซลล์เจริญเติบโตในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความชื้นและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จำนวนเซลล์ที่ใช้ต่อหลุม 50,000 เซลล์ บ่มเซลล์กับสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซตความเข้มข้น1, 10, 20, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่ Lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้ว

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความชื้นและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5

3.3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์

การศึกษานี้เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ด้วยอาหารที่เตรียมจาก DMEM ผสม FBS เข้มข้นร้อยละ 10 และ antibiotic-antimycotic เข้มข้นร้อยละ 1 บ่มเซลล์ดังกล่าวให้เจริญเติบโตในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความชื้นและปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนหนาแน่นประมาณร้อยละ 80 จะขูดให้เซลล์หลุดจากภาชนะเพาะเลี้ยง แล้วย้อมเซลล์ด้วย trypanblue ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์และนับจำนวนเซลล์ที่เลี้ยงได้

3.3.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซต

เตรียมสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซตความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อและกรองผ่านหัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร [26] เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ในถาดหลุมขนาด 96 หลุม หลุมละ 50,000 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความชื้นและปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมออก และใส่สารสกัดรังนกไฮโดรไลเซตซึ่งละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผสม FBS ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุมให้ได้ความเข้มข้น 1, 10, 20, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนหลุมที่ไม่ใส่สารสกัดรังนกไฮโดรไลเซตจะใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผสม FBS ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นบ่มถาดหลุมในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่ม เติม LPS ซึ่งละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุมให้ได้ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนหลุมที่ไม่ใส่ LPS ให้ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารละลายในแต่ละหลุมปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ในถาดหลุมขนาด 96 หลุม ถาดใหม่ตามลำดับเหมือนกับถาดเดิม เติม Griess reagent ลงไปทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าไมโครเพลตเป็นเวลา 3 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของไนตริกออกไซด์โดยเทียบกับแผนภูมิมาตรฐานแสดงความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงของโซเดียมไนไตรท์ ส่วนถาดเดิมที่ยังมีเซลล์อยู่จะนำไปวัดการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

3.3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.3.4.1 MTT Assay เก็บข้อมูลแต่ละตัวอย่างโดยการทดลอง 3 ซ้ำ หาค่า IC 50 และหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์

3.3.4.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ ใช้หลักการประเมินสถิติ Mann-Whitney U test โดยใช้โปรแกรมประเมินSPSS

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตต่อเซลล์ RAW 264.7 ที่ 24 ชั่วโมง

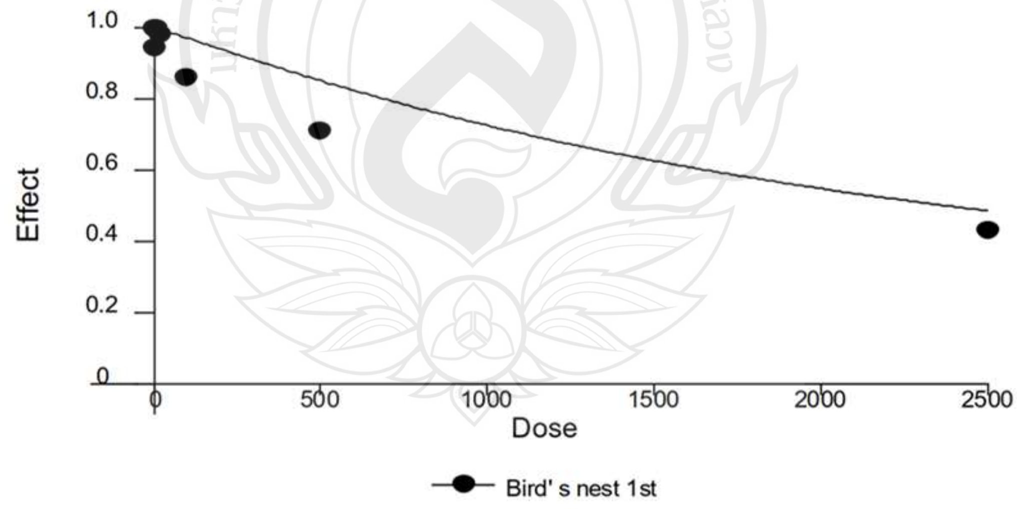
4.1.1 ครั้งที่ 1

โปรแกรมที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ผลการทดสอบ : Calcusyn®

ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (Inhibitory concentration, IC)

IC10 = 338.85 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร IC25 = 901.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

IC50 = 2,397.66 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร IC90 = 16,965.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4.1 อัตราการอยู่รอดของเซลล์ต่อความเข้มข้นของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต

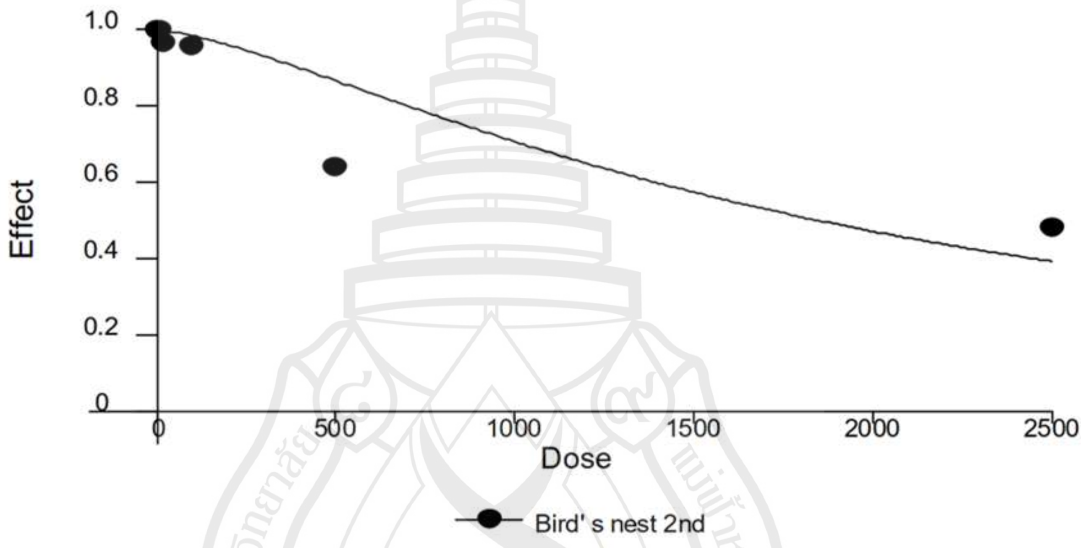
4.1.2 ครั้งที่ 2

โปรแกรมที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ผลการทดสอบ: Calcusyn®

ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (Inhibitory concentration, IC)

IC10 = 399.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร IC25 = 861.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

IC50 = 1,856.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร IC90 = 8,622.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4.2 อัตราการอยู่รอดของเซลล์ต่อความเข้มข้นของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต

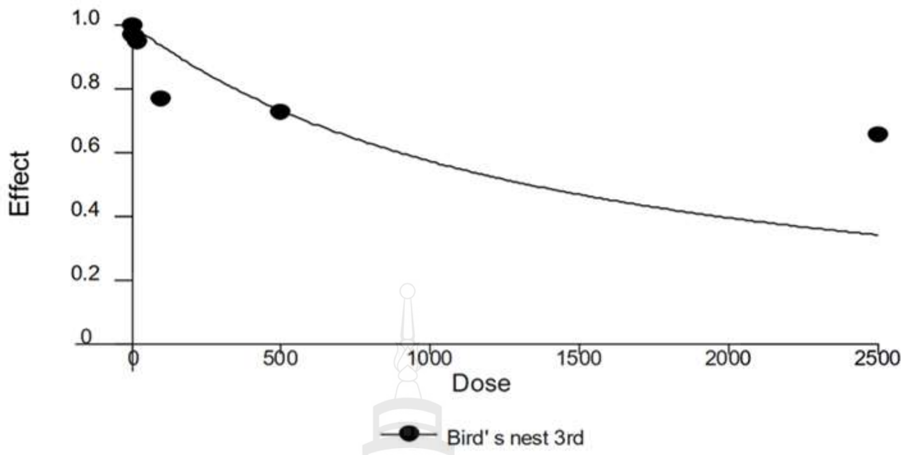
4.1.3 ครั้งที่ 3

โปรแกรมที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ผลการทดสอบ: Calcusyn®

ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์(Inhibitory concentration, IC)

IC10 = 159.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร IC25 = 461.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

IC50 = 1,338.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร IC90 = 11,251.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4.3 อัตราการอยู่รอดของเซลล์ต่อความเข้มข้นของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต

4.1.4 สรุปผลการทดลอง 3 ครั้ง

ตารางที่ 4.1 สรุปผลการทดลองความเข้มข้นของรังนกไฮโดรไลเซตที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์

ผลการทดลอง	ความเข้มข้นของรังนกไฮโดรไลเซตที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (Inhibitory concentration, IC)				
	IC_{10}	IC_{25}	IC_{50}	IC_{90}	
ครั้งที่ 1	338.85	901.36	2,397.66	19,965.00	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ครั้งที่ 2	399.67	861.35	1,856.36	8,622.35	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ครั้งที่ 3	159.21	461.61	1,338.38	11,251.00	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ค่าเฉลี่ย	299.24	741.44	1,864.13	12,279.45	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	125.02	243.16	529.69	4,265.35	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
มัธยฐาน	338.85	861.35	1,856.36	11,251.00	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ค่าต่ำสุด	159.21	461.61	1,338.38	8,622.35	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ค่าสูงสุด	399.67	901.36	2,397.66	16,965.00	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของรังนกไฮโดรไลเซตและร้อยละการมีชีวิตของเซลล์

ความเข้มข้นของรังนกไฮโดรไลเซต (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละ การมีชีวิตของเซลล์	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
0.1	100.0	0.0
1	97.1	2.8
5	100.0	0.0
10	98.8	2.1
20	96.4	1.8
100	86.2	9.2
500	69.3	4.6
2,500	52.4	11.7

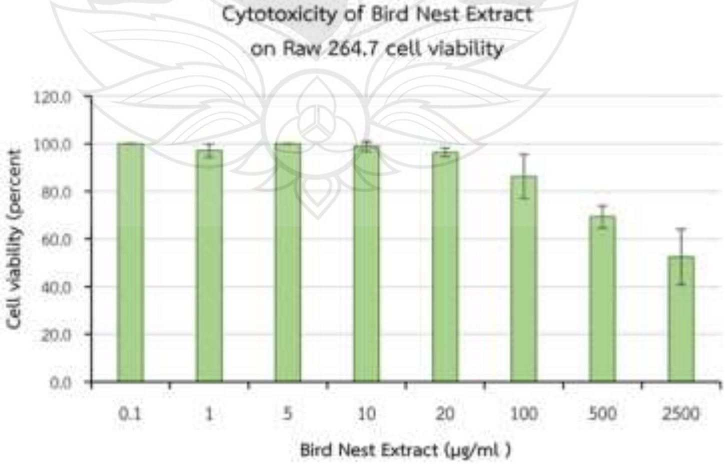
จากตารางความเข้มข้นของรังนกไฮโดรไลเซตและร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ พบว่าปริมาณความเข้มข้นของรังนกไฮโดรไลเซต ที่เหมาสมต่อการศึกษาอยู่ที่

1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ 97.1

10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ 98.8

20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ 96.4

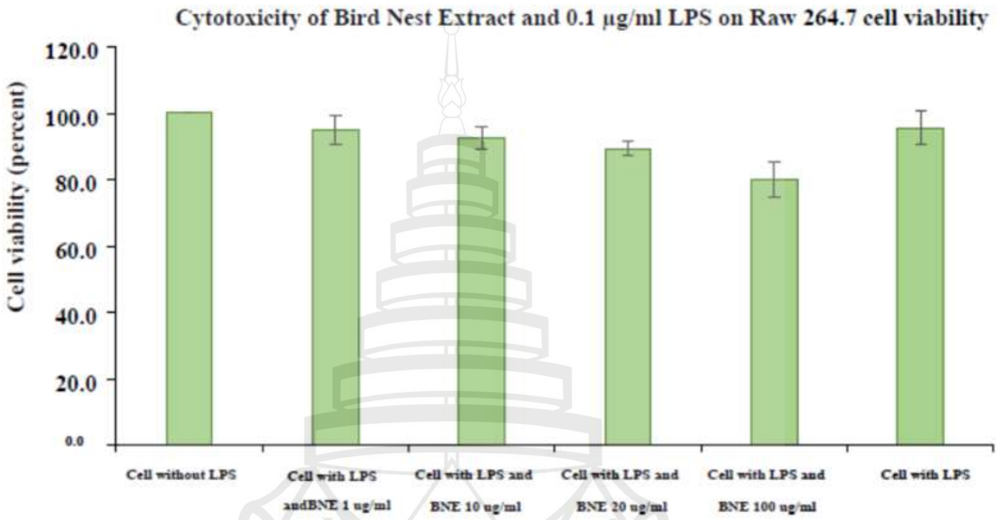
100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ 86.2



ภาพที่ 4.4 ความเข้มข้นของรังนกไฮโดรไลเซตและร้อยละการมีชีวิตของเซลล์

4.2 ผลการทดสอบการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์

4.2.1 การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์



หมายเหตุ *BNE: Bird Nest Extract

ภาพที่ 4.5 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 เมื่อได้รับสาร lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซตความเข้มข้นต่าง ๆ

4.2.2 ผลการทดสอบการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์

ตารางที่ 4.3 ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่สร้างโดยเซลล์ RAW 264.7 เมื่อได้รับสาร lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซต ความเข้มข้นต่าง ๆ

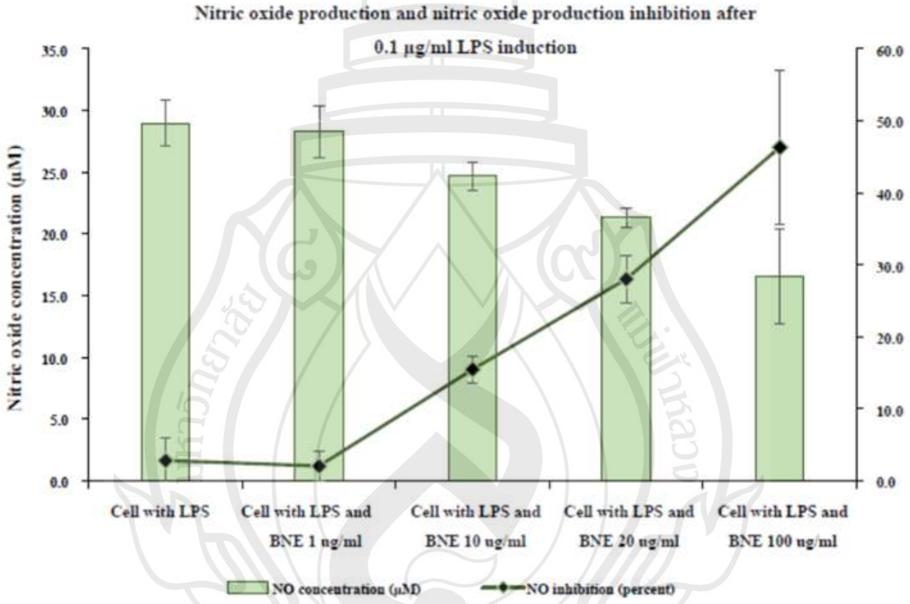
	ปริมาณไนตริกออกไซด์ (ไมโครโมลาร์)				
	Cell with LPS	Cell with LPS and 1 ug/ml BNE	Cell with LPS and 10 ug/ml BNE	Cell with LPS and 20 ug/ml BNE	Cell with LPS and 100 ug/ml BNE
การทดสอบครั้งที่ 1	30.9	30.9	25.5	21.3	18.4
		30.3	26.5	22.5	21.2
	30.2	30.2	25.5	22.3	22.0
การทดสอบครั้งที่ 2	27.4	26.4	23.9	21.3	13.4
		27.4	23.8	20.8	13.3
	27.5	26.3	23.9	20.6	14.1
		26.5	23.4	20.3	13.4
ค่าเฉลี่ย	29.0	28.3	24.7	21.3	16.6
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	1.8	2.1	1.2	0.8	3.9
มัธยฐาน	28.8	27.4	23.9	21.3	14.1
ค่าต่ำสุด	27.4	26.3	23.4	20.3	13.3
ค่าสูงสุด	30.9	30.9	26.5	22.5	22.0

ตารางที่ 4.4 ร้อยละการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์โดยเซลล์ RAW 264.7 เมื่อได้รับสาร lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซตความเข้มข้นต่าง ๆ

	ปริมาณไนตริกออกไซด์ (ไมโครโมลาร์)				
	Cell with LPS	Cell with LPS and 1 ug/ml BNE	Cell with LPS and 10 ug/ml BNE	Cell with LPS and 20 ug/ml BNE	Cell with LPS and 100 ug/ml BNE
การทดสอบครั้งที่ 1	0.0	0.0	18.9	33.9	44.2
		1.8	15.3	29.7	34.1
	0.0	0.1	16.7	28.2	29.3
การทดสอบครั้งที่ 2	5.6	3.9	13.5	23.6	54.5
		0.0	14.0	25.8	54.8
	5.6	4.8	14.1	26.7	52.3
		3.6	15.8	28.0	54.9
ค่าเฉลี่ย	2.8	1.8	15.3	28.0	52.3

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

	ปริมาณไนตริกออกไซด์ (ไมโครโมลาร์)				
	Cell with LPS	Cell with LPS and 1 ug/ml BNE	Cell with LPS and 10 ug/ml BNE	Cell with LPS and 20 ug/ml BNE	Cell with LPS and 100 ug/ml BNE
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	3.2	0.0	13.5	23.6	29.3
มัธยฐาน	2.8	4.8	18.9	33.9	54.9
ค่าต่ำสุด	0.0	1.8	15.3	28.0	52.3
ค่าสูงสุด	5.6	0.0	13.5	23.6	29.3



หมายเหตุ BNE ย่อมาจาก Bird’s Nest Extract ใช้แทนการกล่าวถึงสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซต

ภาพที่ 4.6 ปริมาณไนตริกออกไซด์และร้อยละการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์โดยเซลล์ RAW 264.7 เมื่อได้รับสาร lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซตความเข้มข้นต่าง ๆ

ผลการศึกษาตัวอย่างที่บ่มด้วย LPS ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซตความเข้มข้น 10, 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.1$; Mann-Whitney U test) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้รับสารสกัดดังกล่าว

4.2.3 การทดสอบทางสถิติ ด้วยวิธี Mann-Whitney Test

ตารางที่ 4.5 การทดสอบสถิติ BNE 1 µg/ml with LPS 0.1 µg/ml

label		N	Mean Rank	Sum of Ranks
NO production	Cell with LPS 0.1	4	7.13	28.50
	Cell with BNE1 and LPS 0.1	7	5.36	37.50
	Total	11		
NO production inhibition	Cell with LPS 0.1	4	6.50	26.00
	Cell with BNE1 and LPS 0.1	7	5.71	40.00
	Total	11		

ตารางที่ 4.6 การทดสอบสถิติ Test Statistics (BNE 1 µg/ml with LPS 0.1 µg/ml)

	NO production	NO production inhibition
Mann-Whitney U	9.500	12.000
Wilcoxon W	37.500	40.000
Z	-.856	-.388
Asymp.Sig.(2-tailed)	.392	.698
Exact Sig[2*(1-tailed Sig.)]	.412[a]	.788[a]

หมายเหตุ a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: lable

ตารางที่ 4.7 การทดสอบสถิติ BNE 10 μg/ml with LPS 0.1 μg/ml

label		N	Mean Rank	Sum of Ranks
NO production	Cell with LPS 0.1	4	9.50	38.00
	Cell with BNE10 and LPS 0.1	7	4.00	28.00
	Total	11		
NO production inhibition	Cell with LPS 0.1	4	2.50	10.00
	Cell with BNE10 and LPS 0.1	7	8.00	56.00
	Total	11		

ตารางที่ 4.8 การทดสอบสถิติ Test Statistics (BNE 10 μg/ml with LPS 0.1 μg/ml)

	NO production	NO production inhibition
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	28.000	10.000
Z	-2.658	-2.658
Asymp.Sig.(2-tailed)	.008	.008
Exact Sig[2*(1-tailed Sig.)]	.006[a]	.006[a]

หมายเหตุ c. Not corrected for ties.

d. Grouping Variable: label

ตารางที่ 4.9 การทดสอบทางสถิติ BNE 20 μg/ml with LPS 0.1 μg/ml

label		N	Mean Rank	Sum of Ranks
NO production	Cell with LPS 0.1	4	9.50	38.00
	Cell with BNE20 and LPS 0.1	7	4.00	28.00
	Total	11		

ตารางที่ 4.9 (ต่อ)

label		N	Mean Rank	Sum of Ranks
NO production inhibition	Cell with LPS 0.1	4	2.50	10.00
	Cell with BNE20 and LPS 0.1	7	8.00	56.00
	Total	11		

ตารางที่ 4.10 ทดสอบทางสถิติ Test Statistics (BNE 20 µg/ml with LPS 0.1 µg/ml)

	NO production	NO production inhibition
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	28.000	10.000
Z	-2.658	-2.658
Asymp.Sig.(2-tailed)	.008	.008
Exact Sig[2*(1-tailed Sig.)]	.006[a]	.006[a]

หมายเหตุ a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: label

ตารางที่ 4.11 การทดสอบทางสถิติ BNE 100 µg/ml with LPS 0.1 µg/ml

label		N	Mean Rank	Sum of Ranks
NO production	Cell with LPS 0.1	4	9.50	38.00
	Cell with BNE100 and LPS 0.1	7	4.00	28.00
	Total	11		
NO production inhibition	Cell with LPS 0.1	4	2.50	10.00
	Cell with BNE100 and LPS 0.1	7	8.00	56.00
	Total	11		

ตารางที่ 4.12 ทดสอบสถิติ Test Statistics (BNE 100 µg/ml with LPS 0.1 µg/ml)

	NO production	NO production inhibition
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	28.000	10.000
Z	-2.658	-2.658
Asymp.Sig.(2-tailed)	.008	.008
Exact Sig[2*(1-tailed Sig.)]	.006[a]	.006[a]

หมายเหตุ a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: label

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การศึกษาความเป็นพิษของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW264.7) ด้วยวิธี MTT Assay

เป็นการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตที่จะไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้าง NO

ผลการศึกษาพบว่า ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 5, 10, 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยมีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 100.0, 97.1, 100.0, 98.8, 96.4, 86.2 ตามลำดับ โดยผู้ทดสอบเลือกความเข้มข้นที่อยู่ในช่วง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์(NO) พิจารณาจากความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไม่ต่ำกว่า 75% และค่า IC50 ของสารสกัดรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตอยู่ที่ 2,602 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.1.2 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต

ผลการศึกษาตัวอย่างที่บ่มด้วย LPS ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า รังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตความเข้มข้น 10, 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของเซลล์มาโครฟาจ (RAW264.7) ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.1$; Mann-Whitney U test) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้รับสารสกัดดังกล่าว โดยที่ความเข้มข้นของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ 10, 20, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มีค่าการยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ 15.3, 28.0, 52.3 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และมีแนวโน้มของการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ที่สูงขึ้นแปรไปตามขนาดของความเข้มข้นของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต จากการทดลองจึงสรุปได้ว่า รังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตมีผลต่อการยับยั้งไนตริกออกไซด์ซึ่งอาจจะมีผลต่อการลดการอักเสบของร่างกายได้

5.2 อภิปรายผลการทดลอง

การทดลองฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารสกัดรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตต่อเซลล์มาโครฟาจ (RAW264.7) โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยสารกลุ่ม Lipopolysaccharide ให้เกิดปริมาณไนตริกออกไซด์เพิ่มขึ้น ซึ่งไนตริกออกไซด์จัดเป็นสารสื่ออักเสบ และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ จึงสามารถช่วยยืนยันประสิทธิภาพการต้านการอักเสบของสารสกัดรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตได้เบื้องต้น ดังนั้นการศึกษาต่อของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตมีความน่าสนใจ และมีโอกาสนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อแปรรูปใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในอนาคตได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการอักเสบเบื้องต้น ซึ่งหากจะดูให้มากขึ้นต้องศึกษาการยับยั้งสารสื่ออักเสบที่มากขึ้น นอกจากไนตริกออกไซด์ เช่น ศึกษาเพิ่มเติมในการยับยั้งสารสื่ออักเสบในกลุ่มพรอสตาแกลนดิน และกลุ่มไซโตไคน์ เพิ่มเติม เพื่อชี้ชัดการยับยั้งการอักเสบที่กว้างมากขึ้น และสามารถต่อยอดศึกษาในเซลล์ทดลองผิวหนังมนุษย์เพื่อดูฤทธิ์การตอบสนองต่อการสังเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน เพื่อตอบโจทย์การทำผลิตภัณฑ์รังนกที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป

รายการอ้างอิง

รายการอ้างอิง

[1] Kong, H. K., Chan, Z., Yan, S. W., Lo, P. Y., Wong, W. T., Wong, K. H., . . . Lo, C. L. (2022). Revealing the species-specific genotype of the edible bird's nest-producing swiftlet, Aerodramus fuciphagus and the proteome of edible bird's nest. *Food Research International, 160*, 111670.

[2] Acharya, C., & Satheesh, N. (2023). Edible Bird's Nest (EBN): Production, processing, food and medicinal importance. *AgriCos e-Newsletter, 4*(2), 20-25.

[3] Kathan, R. H., & Weeks, D. I. (1969). Structure studies of collocalia mucoid: I. Carbohydrate and amino acid composition. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 134*(2), 572-576.

[4] Rashed, A. A., & Nazaimoon, W. M. (2010). Effect of Edible Bird's Nest on Caco-2 Cell Proliferation. *Journal of Food Technology, 8*, 126-130.

[5] Kong, Y. C., Keung, W. M., Yip, T. T., Ko, K. M., Tsao, S. W., & Ng, M. H. (1987). Evidence that epidermal growth factor is present in swiftlet's (Collocalia) nest. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry, 87*(2), 221-226.

[6] Hwang, E., Park, S. W., & Yang, J. E. (2020). Anti-aging, anti-inflammatory, and wound-healing activities of edible bird's nest in human skin keratinocytes and fibroblasts. *Pharmacognosy Magazine, 16*(69), 336-342.

[7] Dobutr, T., Kantamala, W., Phimwapi, S., Jangpromma, N., Tippayawat, P., Boonlue, S., . . . Daduang, S. (2022). The effects of edible bird's nest on T-lymphocyte proliferation, secondary lymphoid organs, and interleukin-2 production. *Journal of Functional Foods, 90*, 104977.

[8] Zhao, R., Li, G., Kong, X. J., Huang, X. Y., Li, W., Zeng, Y. Y., . . . Lai, X. P. (2016). The improvement effects of edible bird's nest on proliferation and activation of B lymphocyte and its antagonistic effects on immunosuppression induced by cyclophosphamide. *Drug Design, Development and Therapy, 10*, 371-381.

[9] Daud, N. A., Mohamad Yusop, S., Babji, A. S., Lim, S. J., Sarbini, S. R., & Hui Yan, T. (2021). Edible bird's nest: Physicochemical properties, production, and application of bioactive extracts and glycopeptides. *Food Reviews International, 37*(2), 177-196.

[10] Marcone, M. F. (2005). Characterization of the edible bird's nest the "Caviar of the East". *Food Research International, 38*(10), 1125-1134.

[11] Zhang, S., Lai, X., Liu, X., Li, Y., Li, B., Huang, X., . . . Yang, G. (2012). Competitive enzyme-linked immunoassay for sialoglycoprotein of edible bird's nest in food and cosmetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60*(14), 3580-3585.

[12] Hou, X.-C., Zhu, L. P., Liu, C. S., Wang, B., Wang, L., Han, W. Q., . . . Ke, Z-H. (2013). Determination of sialic acid in edible bird's nest using UPLC-MS/MS. *Modern Food Science and Technology, 29*(7),1706-1709.

[13] Wong, Z. C., Chan, G. K., Wu, K. Q., Poon, K. K., Chen, Y., Dong, T. T., . . . Tsim, K. W. (2018). Complete digestion of edible bird's nest releases free N-acetylneuraminic acid and small peptides: An efficient method to improve functional properties. *Food & Function, 9*(10), 5139-5149.

[14] Hseu, Y. C., Wu, F. Y., Wu, J. J., Chen, J. Y., Chang, W. H., Lu, F. J., . . . Yang, H. L. (2005). Anti-inflammatory potential of Antrodia camphorata through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF-**K**B pathway. *International Immunopharmacology, 5*(13-14), 1914-1925.

[15] จรรยา วัฒนทวีกุล บังอร บุญชู ศรีสุดา หร่มระฤก และพูนทรัพย์ วิชัยพงษ์. (2540). เครื่องดื่มรังนกสำเร็จรูป. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ, 46*, 25-28.

[16] Daud, N. A., Mohamad Yusop, S., Babji, A. S., Lim, S. J., Sarbini, S. R., & Hui Yan, T. (2021). Edible bird's nest: Physicochemical properties, production, and application of bioactive extracts and glycopeptides. *Food Reviews International, 37*(2), 177-196.

[17] Kathan, R. H., & Weeks, D. I. (1969). Structure studies of collocalia mucoid: I. Carbohydrate and amino acid composition. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 134*(2), 572-576.

[18] Colombo, J. P., Garcia-Rodenas, C., Guesry, P. R., & Rey, J. (2003). Potential effects of supplementation with amino acids, choline or sialic acid on cognitive development in young infants. *Acta Paediatr Suppl. 92*(442), 42-46. https://org.doi/10.1111/j.1651-2227.2003.tb00662.x.

[19] Lee, J., & Seno, M. (1949). Sialic acid and its derivatives. *Production Research, 1*(1).

[20] Morgan, B. L., & Winick, M. (1979). A possible relationship between brain N-acetylneuraminic acid content and behavior. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine, 161*(4), 534–537. New York, N.Y.

[21] Bagriaçik, E. U., & Miller, K. S. (1999). Cell surface sialic acid and the regulation of immune cell interactions: The neuraminidase effect reconsidered. *Glycobiology, 9*(3), 267–275.

[22] Biddle, F., Pepper, D. S., & Belyavin, G. (1965). Properties of horse serum gamma inhibitor. *Nature, 207*, 381-3.

[23] *N*-Acetylneuraminic acid. (2024, April 18). In *Wikipedia*. https://en.wikipedia.org/wiki/N-Acetylneuraminic_acid

[24] เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข. (2555). *รายงานการวิจัยเรื่องการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง*. มหาวิทยาลัยบูรพา.

[25] Thophon, S., Waranusantigul, P., Hanphakphoom, S., & Kangwanrangsan, N., Cytotoxicity and apoptosis of cancer cells by the crude extract from Chromolaena odorata (L.) King & Robinson. *Journal of Food Health and Bioenvironmental Science, 9*(2), 1–29.

[26] Vimala, B., Hussain, H., & Nazaimoon, W. W. (2012). Effects of edible bird’s nest on tumour necrosis factor-alpha secretion, nitric oxide production and cell viability of lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages*. Food and Agricultural Immunology, 23*(4), 303-314.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

บันทึกการส่งตรวจวิเคราะห์

ผลการวิเคราะห์การยับยั้งไนตริกออกไซด์

PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY LABORATORY
DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT CENTER
THAMMASAT UNIVERSITY

รายงานการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซท

ข้อมูลการให้บริการ

เลขที่ใบคำขอ: DDD049/66

วันที่รายงานผล: 15 พฤษภาคม พ.ศ. 2566

ชื่อผู้ใช้บริการ: คุณ พิราภรณ์ ทองอ่อน

หน่วยงาน: บริษัท เพียว ไบโอเทค (ประเทศไทย) จำกัด

ลำดับที่การทดสอบ: 4.6 **ชื่อการทดสอบ:** Griess assay

ข้อมูลทั่วไป

ชื่อเซลล์: RAW 264.7

ตัวอย่างทดสอบ: สารสกัดรังนกไฮโดรไลเซท

ลักษณะทางกายภาพ: ผงสีขาว

วิธีเลี้ยงเซลล์: เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ด้วยอาหารที่เตรียมจาก Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ผสม Fetal Bovine Serum (FBS) เข้มข้นร้อยละ 10 และ Antibiotic-Antimycotic เข้มข้นร้อยละ 1 โดยบ่มให้เซลล์เจริญเติบโตในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความชื้นและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

จำนวนเซลล์ที่ใช้ต่อหลุม: 50,000 เซลล์

ช่วงความเข้มข้นของสารทดสอบ: 1, 10, 20, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สภาวะและระยะเวลาการบ่มสารทดสอบกับเซลล์: บ่มเซลล์กับสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซทความเข้มข้น1, 10, 20, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่ Lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความชื้นและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5

วิธีการทดสอบ: Griess assay

สถานที่ทำการทดสอบ: ห้องปฏิบัติการเซลล์เพาะเลี้ยง 213/3

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซท

PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY LABORATORY
DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT CENTER
THAMMASAT UNIVERSITY

รายงานการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซทต่อเซลล์ RAW 264.7 ที่ 24 ชั่วโมง

ข้อมูลการให้บริการ

เลขที่ใบคำขอ: DDD049/66

วันที่รายงานผล: 15 พฤษภาคม พ.ศ. 2566

ชื่อผู้ใช้บริการ: คุณ พิราภรณ์ ทองอ่อน

หน่วยงาน: บริษัท เพียว ไบโอเทค (ประเทศไทย) จำกัด

ลำดับที่การทดสอบ: 4.5 **ชื่อการทดสอบ:** การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT

ข้อมูลทั่วไป

ชื่อเซลล์: RAW 264.7

ตัวอย่างทดสอบ: สารสกัดรังนกไฮโดรไลเซท

ลักษณะทางกายภาพ: ผงสีขาว

วิธีเลี้ยงเซลล์: เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ด้วยอาหารที่เตรียมจาก Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ผสม Fetal Bovine Serum (FBS) เข้มข้นร้อยละ 10 และ Antibiotic-Antimycotic เข้มข้นร้อยละ 1 โดยบ่มให้เซลล์เจริญเติบโตในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความชื้นและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

จำนวนเซลล์ที่ใช้ต่อหลุม: 50,000 เซลล์

สารทำให้เจือจาง: อาหารเลี้ยงเซลล์

ช่วงความเข้มข้นของสารทดสอบ: 0.1 – 2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สภาวะและระยะเวลาการบ่มสารทดสอบกับเซลล์: บ่มเซลล์กับรังนกความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความชื้นและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5

วิธีการทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์: วิธี MTT

สถานที่ทำการทดสอบ: ห้องปฏิบัติการเซลล์เพาะเลี้ยง 213/3

ประวัติผู้เขียน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	พิราภรณ์ ทองอ่อน
ประวัติการศึกษา	
2553	ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ประวัติการทำงาน	
2554 - ปัจจุบัน	ผู้อำนวยการฝ่ายขาย บริษัท เพียวเคมีกัลส์ จำกัด
2553 - 2554	เจ้าหน้าที่พัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมและเครื่องดื่ม บริษัท ด็อกเตอร์ คอสเมด จำกัด