

สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายปกป้องเซลล์ประสาทจากความเป็นพิษของ MPP⁺
ในแบบจำลองโรคพาร์กินสัน

Celastrus Paniculatus Seed Extract Protects Neuron Against MPP⁺-
Induced Toxicity in Parkinson's Disease Model

ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์* พิชชาภา โปรยขุนทด และ ณรงค์ฤทธิ์ ทองอ่อน

Siriporn Chamniansawat*, Phitchapha Proyhkunthod and Narongrit Thongon

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี 20131

Faculty of Allied Health Science, Burapha University, Mueang District, Chonburi 20131

*Corresponding author: Siripornc@buu.ac.th

(Received: September 19, 2019; Accepted: December 18, 2019)

Abstract: Previous studies reported that *Celastrus paniculatus* had various cellular functions including enhancement of learning and memory. However, there are no reports on neuroprotective effect especially on MPP⁺-induced toxicity, a model of Parkinson's disease. The present study aims to demonstrate the effect of *C. paniculatus* seed extract on inhibition of MPP⁺-induced SH-SY5Y cells. Cell viability was measured by an MTT assay. Furthermore, the expression of marker proteins of apoptosis, Bcl2 and mTOR, were detected using Western blot. The results showed that 10 and 25 ug/ml *C. paniculatus* seed extract increased cell viability on incubated with MPP⁺ for 3 hours. Moreover, *C. paniculatus* seed extract increased the expression of Bcl2 and decreased the expression of mTOR in compare to control. This study suggested that *C. paniculatus* seed extract prevented the effect of MPP⁺-induced SH-SY5Y cells, *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease

Keywords: Parkinson's disease, *Celastrus paniculatus* seed extract, Bcl2, mTOR, MPP⁺

บทคัดย่อ: มีการรายงานก่อนหน้านี้ว่าเมล็ดกระทงลาย (*Celastrus paniculatus*) มีบทบาทต่อการทำงานของเซลล์หลากหลาย ที่สำคัญคือ มีฤทธิ์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของความทรงจำและการเรียนรู้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาทจากความเป็นพิษ โดยเฉพาะพิษจากการได้รับสาร MPP⁺ ซึ่งเป็นสารสำคัญที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคพาร์กินสัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายต่อการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทชนิด SH-SY5Y ที่ได้รับสาร MPP⁺ โดยวิธี MTT assay และศึกษาการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ การมีชีวิตของเซลล์ที่สำคัญ คือ Bcl2 และ mTOR โดยวิธี Western blot ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย ที่ความเข้มข้น 10 และ 25 ug/ml ยับยั้งการตายของเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วย MPP⁺ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังเพิ่มการแสดงออกของ Bcl2 และลดการแสดงออกของ mTOR ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม บ่งชี้ว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย MPP⁺ ในแบบจำลองโรคพาร์กินสันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: โรคพาร์กินสัน, เมล็ดกระทงลาย, Bcl2, mTOR, MPP⁺

คำนำ

โรคพาร์กินสัน เป็นโรคในกลุ่มเซลล์ประสาทเสื่อมที่พบเป็นอันดับสองรองจากโรคอัลไซเมอร์ มีการเสื่อมและการตายของเซลล์ประสาทที่สังเคราะห์สารสื่อประสาทชนิดโดปามีนในสมองส่วน substantia nigra par compacta ภาวะการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาททำให้มีระดับของสารสื่อประสาทโดปามีนลดลง ก่อให้เกิดการทำงานที่ไม่สมดุลระหว่าง direct และ indirect pathway ของระบบการเคลื่อนไหว ส่งผลให้ผู้ป่วยมีความผิดปกติของการเคลื่อนไหวในรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ อาการสั่น ชะงัก เคลื่อนไหวช้า กล้ามเนื้อแข็งเกร็ง และทรงตัวได้ไม่ดี นอกจากนี้ยังมีความผิดปกติอื่นนอกเหนือจากการเคลื่อนไหว ได้แก่ ภาวะจิตเสื่อม ความจำเสื่อม และอาการซึมเศร้า ร่วมด้วย ปัจจุบันนี้ยังไม่ทราบสาเหตุการเกิดโรคพาร์กินสันที่แท้จริง

แต่จากข้อมูลที่ผ่านมาบ่งชี้ว่ากลไกหลักที่ทำให้เซลล์ประสาทเสื่อมและตายคือภาวะ mitochondrial dysfunction และการสร้างอนุมูลอิสระ นำไปสู่การตายของเซลล์แบบ apoptosis (Dong *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2019)

MPP⁺ (neurotoxin1 - methyl-4 - phenylpyridinium) อนุพันธ์ของ MPTP มีฤทธิ์เป็น dopaminergic neurotoxin สามารถกระตุ้นให้เกิดอาการพาร์กินสันได้ทั้งในมนุษย์ หนูทดลอง และเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง ชนิด dopaminergic neuron ที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายได้แก่ human neuroblastoma cell line SH-SY5Y มีการรายงานว่ MPP⁺ มีความจำเพาะต่อการยับยั้งการทำงานของ mitochondrial complex I ลดปริมาณของ ATP เพิ่ม mitochondrial damage เพิ่มการผลิต reactive oxygen species (ROS) และทำให้เกิด apoptosis ในที่สุด ดังนั้นการให้ MPP⁺

แก่เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SH-SY5Y จึงถือเป็นแบบจำลองที่ได้รับความนิยม และมีความน่าเชื่อถือสูงสุด ของการศึกษาโรคพาร์กินสันในหลอดทดลอง (Kim *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2019)

กระทงลาย (*Celastrus paniculatus*) เป็นไม้เถาเนื้อแข็งขนาดใหญ่มีความสูงของต้นประมาณ 3-10 เมตร เปลือกลำต้นเป็นสีน้ำตาลปนสีเทา เมล็ดแก่มีสีน้ำตาลแดง มีรสขมมีสรรพคุณทางยาหลากหลาย กล่าวคือ มีการนำไปใช้รักษาโรคทางระบบประสาทและกล้ามเนื้อ ได้แก่ rheumatism โรคเก๊าท์ อัมพาต arthritis และการอักเสบของผิวหนัง เป็นต้น (Arora and Pandel-Rai, 2014; Bhagya *et al.*, 2016; Nalini *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์ต่อระบบประสาท คือ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการทำงานของหัวใจ โดยมีงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าการให้สารสกัดเมล็ดกระทงลายในหนูทดลอง เพิ่มการเรียนรู้และความจำได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Bhanumathy *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ผ่านมา ยังไม่มีการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการตายของเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์ประสาท (neuroprotective effect) ตลอดจนบทบาทในการรักษาโรคเซลล์ประสาทเสื่อม ที่สำคัญ คือ โรคพาร์กินสัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย ต่อการยับยั้งโรคพาร์กินสัน ผ่านการยับยั้งการตายของเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วย MPP⁺ เพื่อสร้างเป็นแบบจำลองโรคพาร์กินสัน

นอกจากนี้ยังศึกษากลไกระดับโมเลกุลผ่านการแสดงออกของ Bcl2 และ mTOR ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญในการบวนการ apoptosis ในแบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญก่อนที่จะนำสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายไปใช้ประโยชน์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ระยะเวลาในการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ใช้เวลา 1 ปี โดยครอบคลุมการศึกษาค้นคว้าของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายต่อการยับยั้งการเกิดโรคเซลล์ประสาทเสื่อม ชนิด โรคพาร์กินสัน โดยศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายต่อการตายของเซลล์ประสาทที่สร้างสารสื่อประสาทชนิดโดปามีน ผ่านกลไกการตายของเซลล์แบบ apoptosis ซึ่งสัมพันธ์กับภาวะ mitochondrial dysfunction ในแบบจำลองของโรคพาร์กินสันจากการเหนี่ยวนำด้วย MPP⁺

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้ใช้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด human neuroblastoma SH-SY5Y cell ซึ่งเป็นเซลล์ชนิด dopaminergic โดยทำการเพาะเลี้ยงใน T-flask ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร เลี้ยงในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะ 5% CO₂ ความชื้น 95% และเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด minimum essential medium (MEM) ผสมกับ F12 HAM ในอัตราส่วน 1:1 ที่มี 10% fetal bovine

serum และยาปฏิชีวนะ 1% โดยดำเนินการตามการทดลองก่อนหน้าที่เคยทำมาแล้ว (Chamniansawat and Chongthammakun, 2010) หลังจากนั้นแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม สำหรับการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ ดังนี้

1. กลุ่มควบคุม
2. กลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 50 uM หรือ 250 uM
3. กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ที่ความเข้มข้น 10 ug/ml
4. กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ที่ความเข้มข้น 25 ug/ml
5. กลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ (50 uM หรือ 250 uM) ร่วมกับ สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ที่ความเข้มข้น 10 ug/ml
6. กลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ (50 uM หรือ 250 uM) ร่วมกับ สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ที่ความเข้มข้น 25 ug/ml

หรือ แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มสำหรับศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Bcl2 และ mTOR ด้วยวิธี Western blot

1. กลุ่มควบคุม
2. กลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 50 uM
3. กลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ ร่วมกับ สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายที่ความเข้มข้น 15 ug/ml
4. กลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ ร่วมกับ สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายที่ความเข้มข้น 25 ug/ml

โดยทั้งสองกลุ่มการทดลองทำการเหนี่ยวนำเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยการให้สาร MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 50 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายที่ความเข้มข้น 10 และ 25 ug/ml บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษา คือ SH-SY5Y cell ซึ่งเป็น neuroblastoma cells line (ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) passage number 14 ทำการเพาะเลี้ยงอยู่ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร (Corning, USA) และเลี้ยงไว้ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ชนิดควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะ 5% CO₂ ความชื้นร้อยละ 95 (CO₂ incubator Thermo scientific, USA) และเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum Essential Medium Eagle with Nutrient Mixture F12 Ham; MEM/F12 1:1 Mixture (HIMEDIA) USA) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA) และ 1% ยาปฏิชีวนะ เป็นเวลา 5 - 7 วัน หลังจากนั้นย่อยเซลล์ด้วย 0.25% trypsin-EDTA ให้ได้ cell suspension แล้วนำไปปั่นโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำ cell pellet มาเติม MEM/F12 ที่มี 10% FBS และนำ cell suspension มานับจำนวนเซลล์ที่มี

ชีวิตด้วย hemocytometer โดยวิธี trypan blue exclusion และนำเซลล์ ไปเพาะเลี้ยงต่อเนื่อง (passage) โดยการแบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 - 3 วัน และทำการเพาะเลี้ยงขยายดังที่กล่าว สัปดาห์ละ 1 ครั้ง หรือเมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนประมาณ 80-90% ของพื้นที่ขวด

2. การสกัดกระทงลาย

เมล็ดกระทงลายที่ใช้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ นำเมล็ดตากให้แห้งและอบจนแห้งด้วยอุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันจากนั้นนำไปบดด้วยโกร่งบดยา จนละเอียด แล้วนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ แช่เมล็ดในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% อัตราส่วน เมล็ดกระทงลาย: เอทิลแอลกอฮอล์ = 1:2 (w/v) ทิ้งไว้ 3 วันจากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนเหวี่ยง (rotary vacuum evaporator) เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในขวดแก้วสีชา จากนั้นนำส่งให้ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ทำการสกัดเมล็ดกระทงลายแบบ crude extract แบบ purify

3. การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (MTT assay)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท SH-SY5Y ลงบน 96-well plates (Costar®, USA) โดยให้

ปริมาณความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 4×10^4 cell/well ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM/F12 (HIMEDIA, USA) 10% FBS (Gibco, USA) และนำไปเก็บไว้ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ชนิดควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะ 5% CO₂ ความชื้นร้อยละ 95 (CO₂ incubator Thermo scientific, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์มาทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายด้วย MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 50 และ 250 μ M เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกับสารสกัดจากเมล็ดของกระทงลาย ที่ความเข้มข้น 10 และ 25 μ g/mL ที่ละลายใน MEM/F12 (HIMEDIA, USA) หลุมละ 80 μ L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาใส่น้ำยา MTT reagent (MTT cell viability assay kit, (Abnova) Taiwan) หลุมละ 15 μ L และทำการบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการละลายตะกอนด้วย solubilization buffer หลุมละ 100 μ L แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์หาอัตราการมีชีวิตของเซลล์

4. การสกัดโปรตีน

หลังจากทำการทดสอบด้วยสารสกัดจากเมล็ดของกระทงลายแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ 6 well plate มาทำการดูดเอาการเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และล้างด้วย 0.01 M PBS 3 ครั้ง โดยให้ 6-well plates

วางอยู่บนน้ำแข็ง จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใช้ RIPA buffer (โดย ผสมกับ protease cocktail inhibitor อัตรา 1:100) ปริมาตร 100 µl/well นำไป เขย่าบน เครื่อง shaker (Thermo scientific, USA) ที่ อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วใช้ scraper ขูดเซลล์ใน 6 well plate ให้ทั่วทั้ง well จากนั้น นำไปเขย่าบนเครื่อง shaker (Thermo scientific, USA) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วใช้ scraper ขูดเซลล์ใน 6 well plate อีกครั้งหนึ่งเพื่อ ทำ การ เก็บ lysed cell ลง ใน sterile microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge แบบควบคุม อุณหภูมิ ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการเก็บ supernatant ใน แต่ละ กลุ่ม การ ทด ลอง ลง ใน sterile microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL แล้วนำไป เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

5. การวัดปริมาณโปรตีน

นำ supernatant ที่ได้มา วัดปริมาณความ เข้มข้นของโปรตีนโดยใช้เทคนิค Bradford protein assay โดยการเตรียม Bradford solution (dye reagent concentrate, BIO-RAD) ผสมกับ น้ำ ในอัตราส่วน 1:4 จากนั้นดูดลงใน cuvette ปริมาตร 1 ml และใส่โปรตีนตัวอย่าง 3 µL ลงใน cuvette บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น นำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีน ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

(ThermoScientific™GENESYST™10SUV-Vis Spectrophotometer with, USA)

6. การแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลด้วย กระแสไฟฟ้าโดยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล ของโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวและดูความบริสุทธิ์ของ โปรตีน โดยการเชื่อมต่อของ acrylamide monomer จนเป็นสายโซ่ยาวประกอบกันเป็นแผ่น เจล โดยมี TEMED เป็น catalyte และมี ammonium persulfate เป็น initiator โปรตีนอยู่ในบัฟเฟอร์ที่เป็นต่างประกอบด้วย Sodium dodecyl sulfate (SDS) เป็น anionic detergent โดย SDS จับ กับ โพลี เปปไทด์ โดยมี mercaptoethanol หรือ dithiothreitol เป็น reducing agent เพื่อทำลายพันธะ disulfide โปรตีนที่จับกับ SDS จะมีประจุลบ เมื่อให้กระแสไฟ โมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่เข้าขั้วบวกซึ่งอัตราการ การเคลื่อนที่ของโปรตีนจะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับ ขนาดน้ำหนักโมเลกุลและขนาดของรูพรุนของเจล โดยขนาดของรูพรุนสามารถปรับได้ตามความเข้มข้น ของ acrylamide ความเข้มข้นของ acrylamide เพิ่มขึ้น ขนาดของรูพรุนจะเล็กลง เตรียม 12.5% gel SDS-PAGE จากนั้นใส่เจลใน running setup แล้ว

ding comb ออก เติม Running buffer จนเต็ม tank และใส่ในแต่ละ well ด้วยเพื่อเป็นการล้างเศษเจล ผสมโปรตีนใน RIPA buffer โดยใช้ความเข้มข้น 80 µg/well ในปริมาตร 32 µl รวมกับ 6x loading dye 8 µl จะได้ปริมาตรรวมเป็น 40 µl ซึ่งเป็น ปริมาตรที่ต้องการโหลดใน 1 well หลังจากผสม โปรตีนเข้ากับสารอื่นๆ ในอัตราส่วนที่คำนวณได้แล้ว นำโปรตีนไปต้มภายใต้อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อ denature โปรตีน แล้วทำการ load โปรตีน โดย load protein marker ไว้เป็น well แรกเสมอ ปริมาตร 5 µl จากนั้น set เครื่อง power supply ศักย์ไฟฟ้า 100 V เป็นเวลา 90 นาที และ คอยสังเกต front dye ไม่ให้เกินหรือหลุดออกจาก ขอบกระจกด้านล่าง

7. การย้ายลงบน Nitrocellulose membrane

ก่อนครบเวลาในการทำ SDS-PAGE ให้ เตรียมอุปกรณ์สำหรับ transfer โปรตีน โดยการแช่ ฟองน้ำ 4 ชิ้น กระดาษกรอง 4 ชิ้น nitrocellulose membrane 1 ชิ้น ลงใน transfer buffer เป็นเวลา 15-20 นาที เมื่อ front dye ถึงขอบกระจกกด pause และ stop จากนั้นทำการ transfer โปรตีน โดยวาง ฟองน้ำ กระดาษกรอง gel, nitrocellulose membrane, ฟองน้ำ บน cassette เรียงจากสีดำไป ยังสีใส แล้วนำ cassette ใส่ลงใน setup หันด้านสีดำให้สัมผัสกับสีดำ ใส่ ice box ลงด้านข้าง แล้วเติม transfer buffer ให้เต็ม tank ปิดฝา แล้ววาง tank

ให้อยู่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้น set เครื่อง power supply ศักย์ไฟฟ้า 100 V เป็นเวลา 105 นาที เมื่อครบเวลานานา membrane ออกมาใส่กล่อง แล้วย้อมด้วยสี Poceau'S จะเห็นแถบโปรตีน จากนั้นล้างสีด้วย TBS-T ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง หรือ จนกว่าสีจะหมด โดยเขย่าบน shaker ทำการ block non-specific binding ด้วยการแช่ membrane ใน 5% non-fat milk เป็นเวลา overnight ที่ 4 °C จากนั้นล้าง membrane ด้วย TBS-T ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง โดยเขย่าบน shaker (Thermo scientific, USA) ใส่ Primary antibody ที่ผสมกับ TBS-T ใน อัตราส่วน 1:1000 (anti-Bcl 2, anti-mTOR, และ actin) ลงบน membrane เป็นเวลา overnight ที่ 4°C จากนั้นล้าง membrane ด้วย TBS-T ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง โดยเขย่า บน shaker ใส่ Secondary antibody ที่ผสมกับ TBS-T ในอัตราส่วน 1:5000 (goat Anti-Mouse (IgG), goat anti-rabbit (IgG)) ลงบน membrane เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิห้อง ล้าง membrane ด้วย TBS-T ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง โดยเขย่า บน shaker แล้วนำ membrane ไป expose ลงบน film ในห้องมืด โดย ดู ด LuminataTM Classico Western HRP Substrate ใส่บนแผ่น nitrocellulose membrane แล้วปิดด้วยแผ่นฟิล์มใส (x-ray film) เป็นเวลา 5 นาที (โดยพิจารณาจากความเข้มของการเรืองแสง) เมื่อครบเวลานำไปจุ่มใน developer น้ำสะอาด และหยุดปฏิกิริยาฟิล์มด้วย fixer ตามลำดับ จากนั้น

นำแผ่นฟิล์มใส่ไปตากให้แห้ง นำฟิล์มที่ฝังไว้จนแห้ง
ทำการ scan ฟิล์มที่ได้ แล้วนำไปวิเคราะห์ความเข้ม
ของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Image J

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำเสนอเป็นค่า
means $\pm$ SE ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลสอง
ชุดจะทดสอบโดย unpaired Student's t-test
ความแตกต่างทางด้านสถิติของข้อมูลมากกว่าสองชุด
จะถูกทดสอบด้วย one-way analysis of variance
(ANOVA) with Turkey multiple comparison
test ความแตกต่างทางด้านสถิติของการทดสอบ
ต้องมีค่า $P \leq 0.05$ ประเมินผลข้อมูลโดย Graph-
Pad Prism 5.0

ผลการศึกษา

1. สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายยับยั้งการตายของ เซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย MPP⁺

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้ MPP⁺
ที่ความเข้มข้น 50 uM (Figure 1 A) และ 250 uM
(Figure 1 B) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้อัตราการมีชีวิต
ของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ
กลุ่มควบคุม และอัตราการรอดชีวิตกลับเพิ่มสูงขึ้นใน
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย (CP) ที่ความ
เข้มข้น 10 และ 25 μ g/mL แสดงให้เห็นว่าสารสกัด
จากเมล็ดกระถางลายมีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์
ประสาท SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร MPP⁺ ใน
หลอดทดลอง

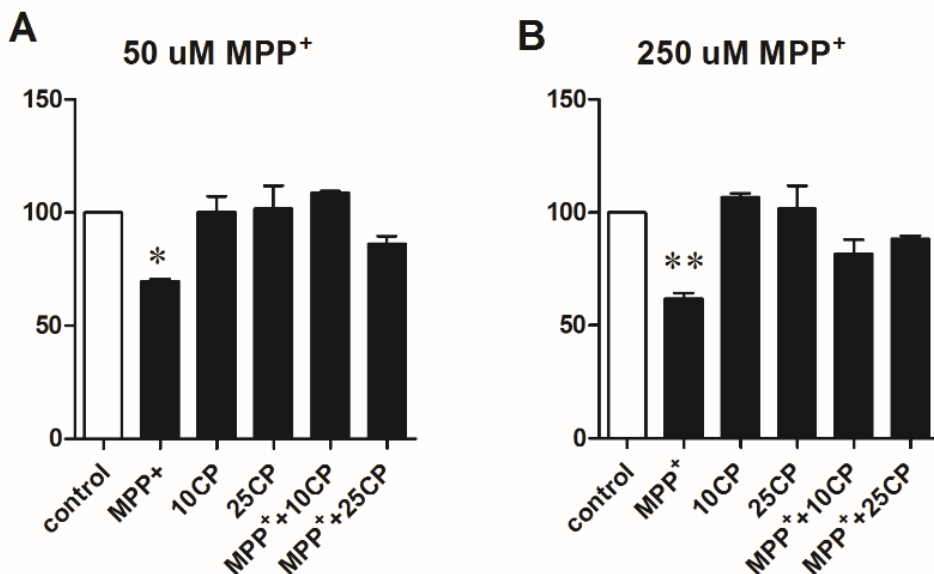


Figure 1. CP seed extract increased cell viability of MPP⁺-treated SH-SY5Y cell. 50 uM MPP⁺ (A), 250 uM MPP⁺ (B), ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control, $n = 3$.

2. สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Bcl2 ในเซลล์เพราะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย MPP⁺

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้ MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 50 μ M เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ลดการแสดงออกของโปรตีน Bcl2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Figure 2) และปริมาณการแสดงออกของ Bcl2 กลับเพิ่มสูงขึ้นใกล้เคียงกับ

กลุ่มควบคุมเมื่อได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย (CP) ที่ความเข้มข้น 10 และ 25 μ g/mL แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายมีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์ประสาท SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร MPP⁺ ผ่านการเพิ่มการแสดงออกของ Bcl2 ซึ่งเป็น anti-apoptotic protein ที่สำคัญของกระบวนการตายแบบ apoptosis

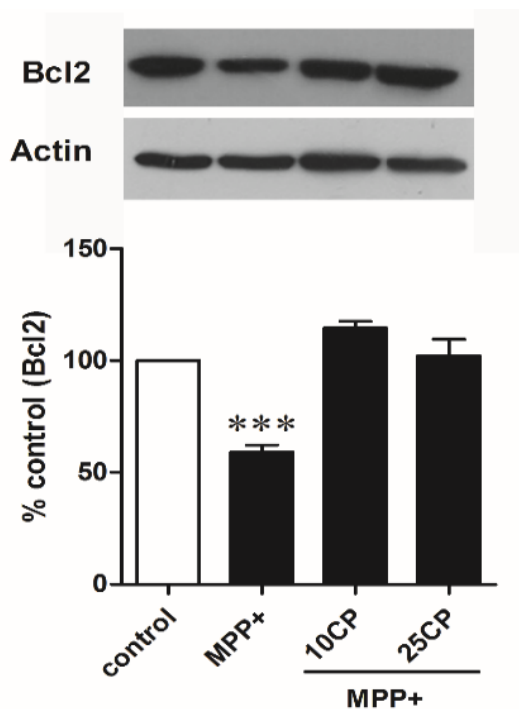


Figure 2. CP seed extract abolished the decrease of Bcl2 expression in MPP⁺-treated SH-SY5Y cell.

***P<0.001 vs control, n=3.

3. สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน mTOR ในเซลล์เพราะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย MPP⁺

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้ MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 50 uM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน mTOR ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Figure 3) และในกลุ่ม

ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย (CP) ที่ความเข้มข้น 25 µg/mL ทำให้ mTOR กลับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายมีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทโดปามีนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร MPP⁺ ผ่านวิถี mTOR

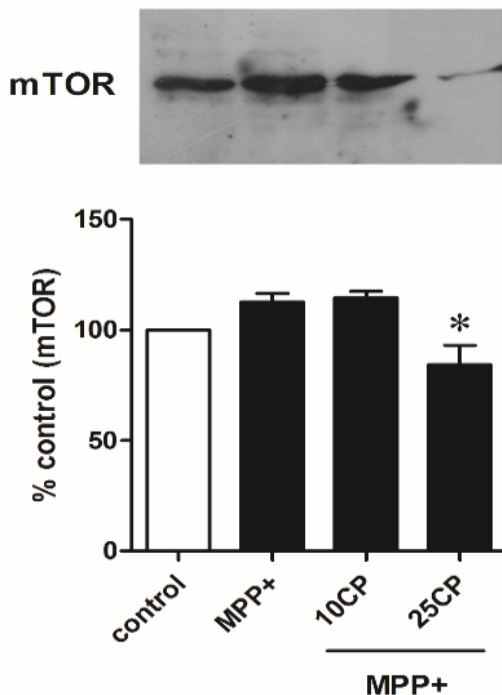


Figure 3. CP seed extract abolished the increase of mTOR expression in MPP⁺-treated SH-SY5Y cell.

* $P < 0.05$ vs MPP⁺, $n = 3$.

วิจารณ์

การตายของเซลล์ประสาทเป็นพยาธิสภาพที่สำคัญของโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท หรือ neurodegenerative disease โดยมีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากการส่งสัญญาณของวิถี mTOR ในการควบคุมการแบ่งตัวและการตายของเซลล์ ที่เกิดจากการได้รับสารพิษ เป็นเหตุให้มีการตายของเซลล์ประสาทเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการลดการแสดงออกของ mTOR ในเซลล์ประสาทจึงเป็นหนึ่งในเป้าหมายหลักที่น่าสนใจในการป้องกันและรักษาโรค neurodegenerative disease (Kumar *et al.*, 2015)

ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดของกระถางลาย ที่ความเข้มข้น 25 µg/mL ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ ช่วยฟื้นฟูการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาท นอกจากนี้ยังช่วยลดอัตราการตายของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะ oxidative stress จากพิษของ MPP⁺ ที่สามารถผ่าน blood-brain barrier เข้าไปทำลายเซลล์ประสาทโดปามีน ที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทได้โดยตรง ซึ่งสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายสามารถช่วยเพิ่มการแสดงออกของ Bcl2 ได้ โดยปกติ Bcl2 เป็นโปรตีนในกลุ่มควบคุมการยับยั้งการเกิด apoptosis ดังนั้น สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายจึงมีผลไปลดการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยเพิ่มการแสดงออกของ Bcl2 ในระบบที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟต อีกทั้งยังมีผลไปลดการแสดงออกของ

mTOR เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ และกลุ่มที่ได้รับ 10 µg/mL สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ซึ่งโดยปกติ mTOR เป็นวิถีที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ ดังนั้นการที่เซลล์มีการแสดงออกของ total mTOR น้อยลง แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ได้รับ 25 µg/mL สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย มีการแบ่งตัวได้น้อย จากรายงานการวิจัยพบว่าการยับยั้งการส่งสัญญาณในวิถี mTOR ช่วยให้เซลล์มะเร็งมีการแบ่งตัวได้น้อยลง และจากหลักฐานทางงานวิจัยอื่น ๆ ยังพบอีกว่าการยับยั้งวิถี mTOR ส่งผลให้ลดการส่งสัญญาณใน mTORC1 เป็นการเพิ่มกระบวนการ autophagy ของเซลล์ให้เพิ่มการย่อยสลายโครงสร้างภายในเซลล์ที่เสื่อมสภาพ เพื่อนำสารต่าง ๆ กลับมาใช้ใหม่ ทำให้เซลล์มีอัตราการตายน้อยลง (Kim *et al.*, 2007) และจากการเพิ่มขึ้นของ autophagy ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำการย่อยสลายออร์แกเนลล์ที่ผิดปกติซึ่งสะสมอยู่ภายในเซลล์ แทนที่การตายแบบ apoptosis ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ 25 µg/mL สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ต่อการแสดงออกของ Bcl2, mTOR และphospho- mTOR เมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ และกลุ่ม 10 µg/mL สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย แสดงให้เห็นว่า 25 µg/mL สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม ที่สามารถยับยั้งการส่งสัญญาณผ่านวิถี mTOR โดยเพิ่ม

กระบวนการ autophagy แทนการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ประสาทได้ ในขณะที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$ สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ไม่ มีผลต่อการลดการแสดงออกของ Bcl2, mTOR และ mTOR

จากหลักฐานงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า กระถางลายช่วยป้องกันการเกิด cytotoxicity ที่เกิดจาก t-BHP และ LDH โดยช่วยลดความเสียหายของ mitochondrial จากการสูญเสีย mitochondrial membrane potential ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ลดการปล่อย cytochrome-c และ HSP-70 จึงช่วยลดการเกิด apoptosis และยังช่วยฟื้นฟูสารต้านอนุมูลอิสระ superoxide dismutase (SOD) และ catalase (CAT) (Kulkarni *et al.*, 2015) และยังมีการทดสอบในหนูทดลองถึงประสิทธิผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ต่อความจำในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะ oxidative stress ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) พบว่าหนูที่รักษาด้วยสารสกัดจากเมล็ดของกระถางลาย มีพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำที่ดีขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา (Arora and Pandey-Rai, 2014)

จากผลการทดลองสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะ oxidative stress ที่เกิดจากพิษของ MPP^+ ในเซลล์ประสาท SH-SY5Y พบว่ามีผลช่วยป้องกันการตายของเซลล์ได้ ซึ่งมีหลักฐานทางงานวิจัยที่แสดงถึงการใช้ เซลล์

ประสาท SH-SY5Y เป็นแบบจำลองในการศึกษาการตายของเซลล์ประสาทโดปามีน ที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคพาร์กินสัน เนื่อง จาก SH-SY5Y cell line มีคุณสมบัติคล้ายคลึงเซลล์ประสาท และสามารถเปลี่ยนสภาพไปเป็น dopaminergic neurons และ Serotonergic neurons ได้เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย Retinoic acid (Chamniansawat and Chongthammakun, 2010) และมีการศึกษาพบว่า MPTP เป็น neurotoxins ที่เชื่อมโยงกับรูปแบบของโรคพาร์กินสันในสัตว์ทดลองและมนุษย์อย่างชัดเจน และเป็นรูปแบบที่ใช้ศึกษากันมากที่สุด (Wang *et al.*, 2019) ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้ สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย มีผลช่วยป้องกันการตายของเซลล์ประสาทโดปามีน จากพิษของ MPP^+ ที่อาจก่อให้เกิดโรคพาร์กินสันได้

นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย สามารถยับยั้งการทำงานของวิถี mTOR ได้ ซึ่งมีการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้เกี่ยวกับ mTOR pathway ต่อการส่งสัญญาณในระบบประสาท เนื่องจากการส่งสัญญาณ mTORC1 ได้รับการยอมรับว่าเป็นตัวควบคุมที่สำคัญที่สุดของ autophagy ที่เกี่ยวข้องกับโรค neurodegenerative โดยการยับยั้งการทำงานของ mTORC1 จะไปเพิ่ม กระบวนการ autophagy ในระบบประสาท ซึ่งมีความสำคัญมากเนื่องจากเซลล์ประสาทไม่มีการแบ่งเซลล์มาทดแทนเซลล์เดิมที่อายุมากขึ้น จึงมีโครงสร้างของเซลล์ที่เสียหายมากขึ้น

ประกอบกับประสิทธิภาพของ autophagy ที่ลดลงตามอายุ ทำให้เกิดการสะสมโปรตีนที่ผิดปกติมากขึ้นเรื่อย ๆ และเกิดการตายของเซลล์ประสาท (Kumar *et al.*, 2015) ซึ่งมีข้อมูลสนับสนุนว่าการทำงานของ autophagy มีการลดลงในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางระบบประสาทในกลุ่ม neurodegenerative disease เช่น โรค Alzheimer และโรค Parkinson ที่มีการตายของเซลล์ประสาท ซึ่งเป็นลักษณะเด่นที่พบในคนสูงอายุ (Nicholson *et al.*, 2004) ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย สามารถช่วยลดความเสี่ยงที่อาจก่อให้เกิดโรคพาร์กินสัน จากการยับยั้งการส่งสัญญาณในวิถี mTOR ได้

สรุป

งานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดจากเมล็ดของกระถางลายมีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วยสาร MPP⁺ ซึ่งเป็นสารที่ใช้สร้างเป็นแบบจำลองโรคพาร์กินสัน โดยมีกลไกไปเพิ่มการแสดงออกของ Bcl2 และลดการแสดงออกของ mTOR ซึ่งอาจจะเป็นแนวทางในการใช้ยับยั้งและป้องกัน ภาวะความเป็นพิษจากการได้รับ MPP⁺ ในแบบจำลองโรคพาร์กินสัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2562 มหาวิทยาลัยบูรพา

ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 16/2562 และ งบประมาณสนับสนุนจากคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เลขที่สัญญา AHS11/2562

เอกสารอ้างอิง

- Arora, N. and S. Pandey-Rai. 2014. GC-MS analysis of the essential oil of *Celastrus paniculatus* Willd. seeds and antioxidant, anti-inflammatory study of its various solvent extracts. *Industrial Crops and Products* 61: 345-351.
- Bhagya, V., T. Christofer and B.S. Shankaranarayana Rao. 2016. Neuroprotective effect of *Celastrus paniculatus* on chronic stress-induced cognitive impairment. *Indian Journal of Pharmacology* 48(6): 687-693.
- Bhanumathy, M., M.S. Harish, H.N. Shivaprasad and G. Sushma. 2010. Nootropic activity of *Celastrus paniculatus* seed. *Pharmaceutical Biology* 48(3): 324-327.

- Chamniansawat, S. and S. Chongthammakun. 2010. Genomic and non-genomic actions of estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cell. Neuroscience Letters 470: 49–54.
- Dong, W., S. Cheng, F. Huang, W. Fan, Y. Chen, H. Shi and H. He. 2011. Mitochondrial dysfunction in long-term neuronal cultures mimics changes with aging. Neurotoxicity Research 22(3): 231-248.
- Kim, M.J., S.J. Oh, S.H. Park, H.J. Kang, M.H. Won, T.C. Kang, J.B. Park, J.I. Kim, J. Kim and J.Y. Lee. 2007. Neuronal loss in primary long-term cortical culture involves neurodegeneration-like cell death via calpain and p35 processing, but not developmental apoptosis or aging. Experimental and Molecular Medicine 39(1): 14-26.
- Kulkarni, Y.A., S. Agarwa, and M.S. Garud. 2015. Effect of Jyotishmati (*Celastrus paniculatus*) seeds in animal models of pain and inflammation. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine 6(2): 82–88.
- Kumar, K.H., M.P. Venuprasad, G.V. Jayashree, P. Rachitha, K. Krupashree, A. Pal and F. Khanum. 2015. *Celastrus paniculatus* Willd. mitigates t-BHP induced oxidative and apoptotic damage in C2C12 murine muscle cells. Cytotechnology 67(6): 955–967.
- Nalini, K., K.S. Karanth, A. Rao and A.R. Aroor. 1995. Effects of *Celastrus paniculatus* on passive avoidance performance and biogenic amine turnover in albino rats. Journal of Ethnopharmacology 47(2): 101-108.
- Nicholson, D.A., R. Yoshida, R.W. Berry, M. Gallagher and Y. Geinisman. 2004. Reduction in size of perforated postsynaptic densities in hippocampal axospinous synapses and age-related spatial learning impairments. Journal of Neuroscience 24(35): 7648-7653.
- Wang, L., Z. Zhang, L. Hou, Y. Wang, J. Zuo, M. Xue, X. Li, Y. Liu, J. Song, F. Pan and T. Pu. 2019. Phytic acid attenuates upregulation of GSK-3 β and disturbance of synaptic vesicle recycling in MPTP-induced Parkinson's

disease models. Neurochemistry

International 129: 104507.
