

---

# การศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด มะกอกน้ำต่อการตายของเซลล์จากไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์และกลูตาเมตในเซลล์ประสาท เพาะเลี้ยง Mouse Neuroblastoma

---

สดุที รัตนจรัสโรจน์ วารุณี จิรวัดนาพงศ์ ณัฐตรา จันทรสุนัขชัย ยุวดี เมตตาเมธา  
และศักดิ์วิชัย อ่อนทอง

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

**บทคัดย่อ** พืชสมุนไพรมะกอกน้ำประกอบด้วยสารกลุ่มโพลีฟีนอล มีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน (oxidation) และอาจใช้ในการบรรเทาภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่ทำให้เกิดกระบวนการเสื่อมของเซลล์ประสาทได้ การศึกษานี้เพื่อทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้น (EHB) และเนื้อไม้ (EHW) ของมะกอกน้ำต่อความเป็นพิษจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมตในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma N1E-115 พบว่า การสัมผัสร่วม (co-exposure) ระหว่างสารสกัด EHB หรือ EHW และ glutamate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อาจมีผลปกป้องการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 จากกลูตาเมต ขณะที่สารสกัดทั้ง 2 ชนิดไม่แสดงผลปกป้องการตายของเซลล์จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การศึกษานี้ยังแสดงกลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดมะกอกน้ำว่าไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับวิถี Mitogen-activated protein kinase (MAPK) และวิถี Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) ดังนั้น กลไกที่แน่นอนในการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดมะกอกน้ำยังไม่เป็นที่แน่ชัด จึงควรศึกษาวิจัยเพื่อขยายผลต่อไป

## บทนำ

มะกอกน้ำ หรือสารภีน้ำ (*Elaeocarpus hygrophyllus* Kurz.) เป็นพืชในวงศ์ Elaeocarpaceae มักขึ้นริมน้ำ เป็นไม้ต้นขนาดใหญ่ ทรงพุ่มกลมค่อนข้างทึบ เปลือกลำต้นสีน้ำตาลแดง ใบเป็นใบเดี่ยว ก้านใบมีสีแดง ดอกออกเป็นช่อตรงซอกใบ ผลเล็กรีรสเปรี้ยวฝาด เป็นผลไม้พื้นบ้านของไทย สามารถนำมาใช้เป็นอาหาร<sup>(1)</sup> (ภาพที่ 1) สารที่พบในพืชสกุลนี้ คือ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซึ่งเป็นสารประกอบ polyphenolic มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง ประโยชน์ที่สำคัญของสารประกอบกลุ่มนี้ คือ การเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant)<sup>(2-3)</sup> จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องในการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง พบว่า สารประกอบบางชนิดที่แยกได้จากพืชในสกุล *Elaeocarpus* เช่น cucurbitacin F มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง ได้แก่ human oral epidermoid carcinoma KB cells และ mouse leukemia P-388 cells โดยมีค่า median effective dose ( $ED_{50}$ ) คือขนาดหรือความเข้มข้นสารที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจำนวนร้อยละ 50 เป็น 0.074 และ 0.04 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ<sup>(4)</sup> และมีรายงานที่พบว่า สารประกอบ cucurbitacin D และ cucurbitacin F ที่แยกได้จากพืชในสกุลนี้ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงของคน ได้แก่ human lung cancer, human colon cancer, human oral epidermoid carcinoma, hormone-dependent human prostate cancer, human telomerase reverse transcriptase-retinal pigment epithelial cells และ human umbilical vein endothelial cells โดยสารประกอบทั้ง 2 ชนิด มีค่า  $ED_{50}$  น้อยกว่า 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร<sup>(5)</sup> นอกจากนี้มีรายงานว่า สารประกอบบางชนิดที่เป็นอนุพันธ์ของ ellagic acid ที่แยกได้จากพืชในสกุล *Elaeocarpus* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Babesia gibsoni* ซึ่งเป็นพาราสิตที่พบในสุนัข<sup>(6)</sup> และยังพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากใบของพืชในสกุลนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย<sup>(7)</sup>



ภาพที่ 1 มะกอกน้ำ (*Elaeocarpus hygrophyllus* Kurz.)

ภาวะเครียดจากการเกิดออกซิเดชัน (oxidative stress) หมายถึงภาวะที่มีความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระ (free radicals) หรือ reactive oxygen species (ROS) กับสาร antioxidants ซึ่งส่งผลให้เกิดการทำลายชีวโมเลกุลภายในร่างกาย เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมัน (oxidative damage) ภาวะ oxidative stress มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเกิดโรคเกี่ยวกับความเสื่อมของประสาท (Neurodegenerative disease) โดยปริมาณของ free radical หรือ ROS มาก ทำให้สาร antioxidant มีปริมาณไม่เพียงพอจึงทำให้เซลล์ประสาทถูกทำลายหรือบาดเจ็บ เกิดการตายของเซลล์ประสาท และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ<sup>(8)</sup> เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease), โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease), Huntington's disease, Amyotrophic lateral sclerosis และ Neuroinflammatory disorder เป็นต้น ปัจจุบันประชาชนได้รับความทุกข์ทรมานจาก neurodegenerative disease ต่าง ๆ ทั้ง Alzheimer's disease และ Parkinson's disease เพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา<sup>(9-10)</sup> โรคเรื้อรังเหล่านี้ส่งผลทำให้การทำงาน

ของสมองด้อยลงจากเดิมจนมีผลกระทบต่อการทำงาน และการใช้ชีวิตประจำวันทำให้คุณภาพชีวิตของประชากรสูงอายุลดลง

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) เป็นตัวตั้งต้น (precursor) ของอนุมูลออกซิเจน (oxygen radical) ที่อยู่ในเซลล์ hydrogen peroxide ก่อให้เกิดภาวะ oxidative stress และเกิด oxidative damage ตามมา ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ของไขมันอิ่มตัวจึงเกิดการตายของเซลล์<sup>(11)</sup> ส่วนกลูตาเมต (glutamate) เป็นกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น (excitatory amino acid) หรือสารสื่อประสาทที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น (excitatory neurotransmitter) ที่สำคัญในระบบประสาทส่วนกลาง โดยมีบทบาทสำคัญใน neurotransmission, neuronal development และ synaptic plasticity ผ่านการกระตุ้นตัวรับของ glutamate (glutamate receptor)<sup>(12-13)</sup> การกระตุ้น glutamate receptor มากเกินไปโดยเฉพาะ N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor เป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเซลล์<sup>(14)</sup> กลไกของกลูตาเมตในการทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาทนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด จากรายงานการวิจัยพบว่า glutamate อาจก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาทได้โดยการกระตุ้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับแคลเซียม<sup>(15)</sup> การกระตุ้น nitric oxide synthase<sup>(16)</sup> และการสร้าง ROS จากไมโทคอนเดรีย<sup>(17)</sup> ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นเครือข่ายควบคุมการทำงานของเซลล์ในหน้าที่หลักต่างๆ ได้แก่ การเจริญเติบโตของเซลล์ (cell growth) การเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) การเปลี่ยนสภาพของเซลล์ (differentiation) และการตายของเซลล์ (cell death)<sup>(18-19)</sup> เอนไซม์กลุ่มนี้ทำงานโดยปรับความสามารถในการทำงานของโปรตีนเป้าหมายที่จำเพาะภายในเซลล์ โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตเข้าไปยังโปรตีนเป้าหมาย ณ ตำแหน่งกรดอะมิโน Serine หรือ Threonine ที่จำเพาะ<sup>(20)</sup> MAPK จึงจัดเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เรียกว่า Serine/Threonine kinase การส่งสัญญาณในวิถี MAPK ได้แก่ MAPK และ PI3K signaling pathway มีความจำเป็นต่อการมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์

เนื่องจากมีหลักฐานสนับสนุนว่า สาร antioxidant อาจจะช่วยป้องกันการเกิดพยาธิสภาพจากการเสื่อมของเซลล์ประสาทอันเป็นผลมาจาก free radical ได้ และสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพรมะกอกน้ำ ซึ่งเป็นแหล่งของสารประกอบที่มีฤทธิ์เป็น antioxidant<sup>(2)</sup> อาจสามารถป้องกันหรือลดการเกิดพยาธิสภาพนี้ได้ ทำให้ลดการตายของเซลล์ประสาท รวมทั้งอาจมีศักยภาพที่จะนำมาวิจัยและพัฒนาต่อไปเพื่อใช้ป้องกันหรือชะลอกระบวนการเสื่อมของเซลล์ประสาทอันเกิดจากภาวะ oxidative stress ซึ่งยังไม่มีข้อมูลหรือหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สนับสนุน ดังนั้น การวิจัยจึงได้ศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดมะกอกน้ำ โดยการประเมินผลของสารสกัดมะกอกน้ำต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงปกติ และเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บหรือตายจาก hydrogen peroxide และ glutamate ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma cells นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดมะกอกน้ำ โดยการเติมสารยับยั้งเฉพาะต่อการส่งสัญญาณในวิถี MAPK และวิถี PI3K ใน mouse neuroblastoma cells ด้วย

## วัสดุและวิธีการ

### 1. ตัวอย่างวัตถุดิบสมุนไพร

เก็บรวบรวมตัวอย่างมะกอกน้ำสำหรับจัดทำตัวอย่างพืช และตรวจระบุชนิดพร้อมทั้งส่วนของลำต้นเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการศึกษาวิจัยจากพื้นที่จังหวัดปทุมธานี ผลการตรวจระบุชนิดตามหลักอนุกรมวิธานพืช โดยอาศัยเอกสารวิชาการที่เกี่ยวข้อง<sup>(21-22)</sup> พบว่า มะกอกน้ำมีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Elaeocarpus hygrophilus* Kurz. วงศ์ Elaeocarpaceae (ได้จัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิง (voucher specimen) คือ N. Chansuvanich, W. Jirawattanapong and S. Ontong 3369 และเก็บรักษาไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืชกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (DMSC) โดยมีหมายเลขพรรณไม้ของพิพิธภัณฑ์พืชกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ คือ DMSC 5173)

## 2. วิธีการทดลอง

### 2.1 การเตรียมสมุนไพร

นำส่วนที่ใช้ คือ ลำต้น มาแยกเนื้อไม้และเปลือกต้นออกจากกัน แยกหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บดเป็นผงหยาบและเก็บไว้ในภาชนะปิดสนิท

### 2.2 การเตรียมสารสกัด

นำผงสมุนไพรแห้งของแต่ละส่วนที่ใช้ตั้งต้นปริมาณ 100 กรัม มาเตรียมเป็นสารสกัดโดยการหมักในเอทานอล 95% จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 3 วัน กรอง และนำไปประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่อง rotary evaporator (Rotary vacuum evaporator, Büchi, Japan) ได้สารสกัดส่วนเนื้อไม้ (EHW) และส่วนเปลือกต้น (EHB) โดยมีปริมาณสารที่สกัดได้ (% yield, wt/wt) เป็น 2.16 % และ 4.27 % ตามลำดับ นำสารสกัดที่ได้มาละลายด้วยเอทานอลบริสุทธิ์แล้วเจือจางด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการควบคุมคุณภาพทางเคมีของสารสกัดโดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีด้วยวิธี TLC fingerprint

### 2.3 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษา คือ mouse neuroblastoma cells, N1E-115 (American Type Culture Collection (ATCC), USA, Cat.No. CRL-2263) passage number 23-30 นำเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ชนิดควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ CO<sub>2</sub> 5% ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM-high glucose; Sigma-Aldrich, USA, Cat.No. D1152) ที่มี sodium bicarbonate 3.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, fetal bovine serum 10% (FBS; Hyclone, USA) และยาปฏิชีวนะ penicillin G sodium (100 ยูนิต/มิลลิลิตร) และ streptomycin (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นาน 5 - 7 วัน หลังจากนั้นย่อยเซลล์ด้วย trypsin-EDTA 0.25% ให้ได้ cell suspension แล้วนำไปปั่นโดยใช้เครื่องปั่นชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Sorval RT7, USA) ด้วยความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำ cell pellet มาเติม DMEM ที่มี FBS 10% และทำเป็น cell suspension นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วย hemocytometer โดยวิธี trypan blue exclusion และนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อเนื่อง (passage) โดยการแบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 - 3 วัน และทำการเพาะเลี้ยงขยายดังที่กล่าว สัปดาห์ละ 1 ครั้ง หรือเมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนประมาณ 80 - 90% ของพื้นที่ขวด

### 2.4. การเตรียมเซลล์สำหรับการทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาท

ใช้แบบจำลองที่ทำให้เซลล์ประสาทบาดเจ็บหรือตายจำนวน 2 แบบ คือ การบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ที่เกิดจากความเป็นพิษของ hydrogen peroxide หรือ glutamate

**2.4.1 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับการทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาทจาก hydrogen peroxide:** เลี้ยงเซลล์ N1E-115 ใน 48 well plate โดยความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $3 \times 10^4$  เซลล์/ตารางเซนติเมตร ภายใต้สภาวะ CO<sub>2</sub> 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นแบบไม่มีซีรัม ซึ่งประกอบด้วย DMEM-high glucose (Sigma-Aldrich, USA, Cat.No. D1152) ที่มี sodium bicarbonate 3.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยาปฏิชีวนะ และ N2 supplement ได้แก่ sodium selenite (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) 30 นาโนโมลาร์, human transferrin 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, bovine insulin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, progesterone 20 นาโนโมลาร์ และ putrescine 100 ไมโครโมลาร์ นำเซลล์เพาะเลี้ยงนี้ไปใช้ในการทดลองหลังจากอายุได้ 48 ชั่วโมง

**2.4.2 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับการทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาทจาก glutamate:** เลี้ยงเซลล์ N1E-115 ใน 48 well plate ที่เคลือบด้วยสาร poly-D-lysine 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $4 \times 10^4$  เซลล์/ตารางเซนติเมตร ภายใต้สภาวะ CO<sub>2</sub> 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น

เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น DMEM-high glucose (Sigma-Aldrich, USA, Cat.No. D1152) ที่มี sodium bicarbonate 3.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, FBS 0.5% และยาปฏิชีวนะ แล้วเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) 1.5% ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีกจนครบ 96 ชั่วโมง จึงนำเซลล์ไปใช้ในการทดลองได้ (เซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 สามารถเปลี่ยนสภาพ (differentiation) ได้ภายใต้สภาวะที่มีซีรัมต่ำและมี DMSO<sup>(23-24)</sup>)

## 2.5 วิธีการทดสอบ

### 2.5.1 การทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาทจาก hydrogen peroxide

1) การหาความเข้มข้นของ hydrogen peroxide ที่เหมาะสมต่อการทดสอบเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

เจือจางสารละลาย hydrogen peroxide 30% (เทียบเท่ากับ 9.794 โมลาร์) ด้วย Phosphate Buffered Saline (DPBS; Sigma-Aldrich, USA) ที่มี  $MgCl_2$  0.100 กรัม/ลิตร (DPBS ประกอบด้วย KCl 0.200 กรัม/ลิตร, NaCl 8.000 กรัม/ลิตร,  $KH_2PO_4$  0.200 กรัม/ลิตร และ  $Na_2HPO_4$  (anhydrous) 1.150 กรัม/ลิตร) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการ นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 ( $3 \times 10^4$  เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 48 ชั่วโมง มาเติมสารละลาย hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครโมลาร์ ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละหลุมแล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมให้เติม PBS ในปริมาณเท่ากัน หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction

2) การทดสอบผลของสารสกัด EHB และ EHW ของมะกอกน้ำต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงปกติ

ละลายสารสกัด EHB และ EHW ของมะกอกน้ำในเอทานอลบริสุทธิ์ และเจือจางด้วย sterile distilled water เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการ (ความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอลไม่เกิน 0.1%) นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 ( $3 \times 10^4$  เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 48 ชั่วโมง มาเติม EHB หรือ EHW ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละหลุมแล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติมเอทานอล 2.5% ในปริมาณเท่ากัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอลไม่เกิน 0.1%) ในเซลล์กลุ่มควบคุม หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction

3) การทดสอบผลของสารสกัด EHB และ EHW ของมะกอกน้ำต่อการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก hydrogen peroxide

นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 ( $3 \times 10^4$  เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 48 ชั่วโมง มาเติมสารสกัด EHB หรือ EHW ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับเติม hydrogen peroxide 200 ไมโครโมลาร์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละหลุมและเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อีกกลุ่มการทดสอบให้เติมสารสกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเติม hydrogen peroxide 200 ไมโครโมลาร์ แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม PBS ในปริมาณเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction

### 2.5.2 การทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาทจาก glutamate

1) การหาความเข้มข้นของ glutamate ที่เหมาะสมต่อการทดสอบเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

ละลาย glutamate และ glycine ใน sterile PBS (DPBS ที่ปราศจาก  $MgCl_2$ ) แล้วเจือจางด้วย PBS เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการ นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 ( $4 \times 10^4$  เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 96 ชั่วโมง แต่ละหลุมมาเติม glutamate ที่ความเข้มข้น 1, 10, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ พร้อมกับเติม glycine ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม PBS ในปริมาณเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction

## 2) การทดสอบผลของสารสกัด EHB และ EHW ของมะกอกน้ำต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงปกติ

นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 ( $4 \times 10^4$  เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 96 ชั่วโมง แต่ละหลุมมาเติมสารสกัด EHB หรือ EHW ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติมเอทานอล 2.5% ในปริมาตรเท่ากัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอลไม่เกิน 0.1%) ในเซลล์กลุ่มควบคุม หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction

## 3) การทดสอบผลของสารสกัด EHB และ EHW ของมะกอกน้ำต่อการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก glutamate

นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 ( $4 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>) อายุ 96 ชั่วโมง แต่ละหลุมมาเติมสารสกัด EHB หรือ EHW ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับเติม glutamate 50 มิลลิโมลาร์ และ glycine 2 มิลลิโมลาร์ แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อีกกลุ่มการทดสอบให้เติมสารสกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเติม glutamate และ glycine แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม PBS ในปริมาตรเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction

## 4) การทดสอบผลของสารยับยั้งเฉพาะ MEK inhibitor (PD 98059) หรือ PI3K inhibitor (LY 294002) ต่อฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด EHB และ EHW ของมะกอกน้ำต่อการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก glutamate

ละลาย PD 98059 และ LY 294002 ใน DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เก็บเป็น stock solutions ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเจือจางด้วย DMSO เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 ( $4 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>) อายุ 96 ชั่วโมง มาแบ่งเป็น 7 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม เติม DMSO 2.5% (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1%) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วเติม DMSO 2.5% ในปริมาตรเท่าเดิม

กลุ่มที่ 2 และ 3 เติมสาร PD 98059 30 ไมโครโมลาร์ และ LY 294002 40 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วเติมสาร PD 98059 และ LY 294002 ที่ความเข้มข้นเท่าเดิม ตามลำดับ

กลุ่มที่ 4 เติม DMSO 2.5% (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1%) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วเติม glutamate 50 มิลลิโมลาร์ และ glycine 2 มิลลิโมลาร์

กลุ่มที่ 5 เติม DMSO 2.5 % (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1%) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วเติมสารสกัด EHB หรือ EHW ที่ความเข้มข้นที่ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับเติม glutamate 50 มิลลิโมลาร์ และ glycine 2 มิลลิโมลาร์

กลุ่มที่ 6 เติมสาร PD 98059 30 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วเติมสารสกัด EHB หรือ EHW ที่ความเข้มข้นที่ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับเติม glutamate 50 มิลลิโมลาร์ และ glycine 2 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับเติมสาร PD 98059 30 ไมโครโมลาร์

กลุ่มที่ 7 เติมสาร LY 294002 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วเติมสารสกัด EHB หรือ EHW ที่ความเข้มข้นที่ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับเติม glutamate 50 มิลลิโมลาร์ และ glycine 2 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับเติมสาร LY 294002 40 ไมโครโมลาร์

หลังจากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction

### 3. การประเมินคุณภาพและความอยู่รอดของเซลล์

#### 3.1 การประเมิน cell morphology

ติดตามการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphology) ของเซลล์เพาะเลี้ยง โดยส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope, Axiovert 200, Zeiss, Germany)

#### 3.2 การวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธี MTT reduction

ตรวจวัดเซลล์ MTT reduction ด้วยวิธี colorimetric โดยดัดแปลงจากวิธีของ Mosmann (1983)<sup>(25)</sup> ดังนี้ เติมสารละลาย MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 10 ไมโครลิตร (5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรใน PBS) ลงในเซลล์ของแต่ละหลุม (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แล้วนำเซลล์เพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และเติม DMSO 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ดูดสารละลายของแต่ละหลุมใส่ใน 96 well plate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Multi-detection microplate reader (Synergy<sup>TM</sup> HT, Biotex, USA) ที่ความยาวคลื่น 570/620 นาโนเมตร ค่า MTT reduction แสดงในรูปของร้อยละเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่ได้รับสารหรือสมุนไพร  $\times 100$ ) / ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

### 4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทุกค่านำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย (mean) + ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error, SEM) โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 ตัวอย่าง ( $n = 6$ ) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยมากกว่า 2 กลุ่ม ใช้ Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบข้อมูลที่แตกต่างกัน กรณีความแปรปรวนของทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกันใช้ Scheffe multiple comparisons และกรณีความแปรปรวนของทั้ง 2 กลุ่มแตกต่างกันใช้ Tamhane's T2 multiple comparisons ค่า  $p$  ที่น้อยกว่า 0.05 หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

## ผล

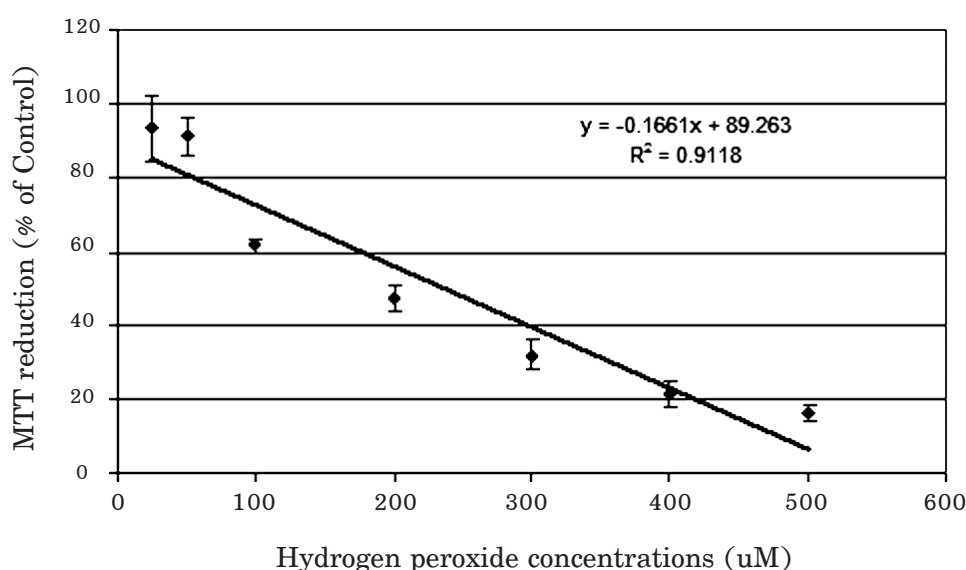
ในการศึกษานี้ได้ประเมินความอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) โดยการตรวจวัด MTT reduction ซึ่งเป็นดัชนีชี้วัดของ mitochondrial viability/ activity โดยเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ในเซลล์ที่มีชีวิต และ mitochondria ที่ยังทำงานอยู่สามารถเปลี่ยนสาร MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (สารสีเหลือง) ไปเป็น formazan (สารสีม่วง) ที่ไม่ละลายน้ำ หลังจากนั้น ละลาย formazan ด้วย DMSO ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยค่าที่เพิ่มขึ้นนี้บ่งบอกถึงการเพิ่ม total metabolic activity คือ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตหรือการเพิ่ม MTT reduction

### 1. การทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาทจาก hydrogen peroxide

#### 1.1 การหาความเข้มข้นของ hydrogen peroxide ที่เหมาะสมต่อการทดสอบเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

เซลล์ประสาท N1E-115 สัมผัสกับ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 25 - 500 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วประเมิน cell viability โดยวัดด้วยวิธี MTT reduction พบว่า hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครโมลาร์ มีค่า MTT reduction ของเซลล์ประสาทเป็น 93.39, 91.38, 61.85, 47.28, 31.81, 21.32 และ 16.19% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า hydrogen peroxide ลด cell viability

เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ hydrogen peroxide โดยมีค่า  $IC_{50}$  (Inhibition concentration at 50%) ซึ่งคือ ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้ง cell viability ได้ร้อยละ 50 เท่ากับ 236.38 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 2) และจากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เซลล์ประสาทมีรูปร่างผิดปกติ โดยมีลักษณะบวม/หดตัว/ฝ่อเป็นซากเศษเซลล์ที่ตายแล้วอยู่ปะปนกับเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ และความยาวของ neurite สั้นลงและไม่มีความต่อเนื่อง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ความผิดปกติดังกล่าวเกิดขึ้นพร้อมกันกับการลดลงของ cell viability เนื่องจากเซลล์ประสาทสัมผัสกับ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทำให้เซลล์ตายประมาณร้อยละ 50 - 60 ( $IC_{50} = 236.38$  และ  $IC_{60} = 176.18$ ) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการทำให้เกิดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ประสาทในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 2 ผลของ Hydrogen peroxide ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse Neuroblastoma, N1E-115 เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง N1E-115 อายุ 48 ชั่วโมงสัมผัสกับ Hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 25-500 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 ตัวอย่าง ( $n = 6$ ) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ จากกราฟค่า  $IC_{50} = 236.38$  ไมโครโมลาร์ และ  $IC_{60} = 176.18$  ไมโครโมลาร์

### 1.2 ผลของสารสกัดมะกอกน้ำต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงปกติ

เซลล์ประสาท N1E-115 สัมผัสกับสารสกัด EHB ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า MTT reduction ของเซลล์ประสาทเป็น 108.70, 102.36, 102.53, 99.32 และ 88.50% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (100%) เมื่อเซลล์ประสาทสัมผัสกับสารสกัด EHW ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า MTT reduction ของเซลล์ประสาทเป็น 106.19, 100.48, 102.35, 103.32 และ 104.91% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (100%) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดมะกอกน้ำทั้ง 2 สารสกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงปกติ

### 1.3 ผลของสารสกัดมะกอกน้ำต่อการป้องกันการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก hydrogen peroxide

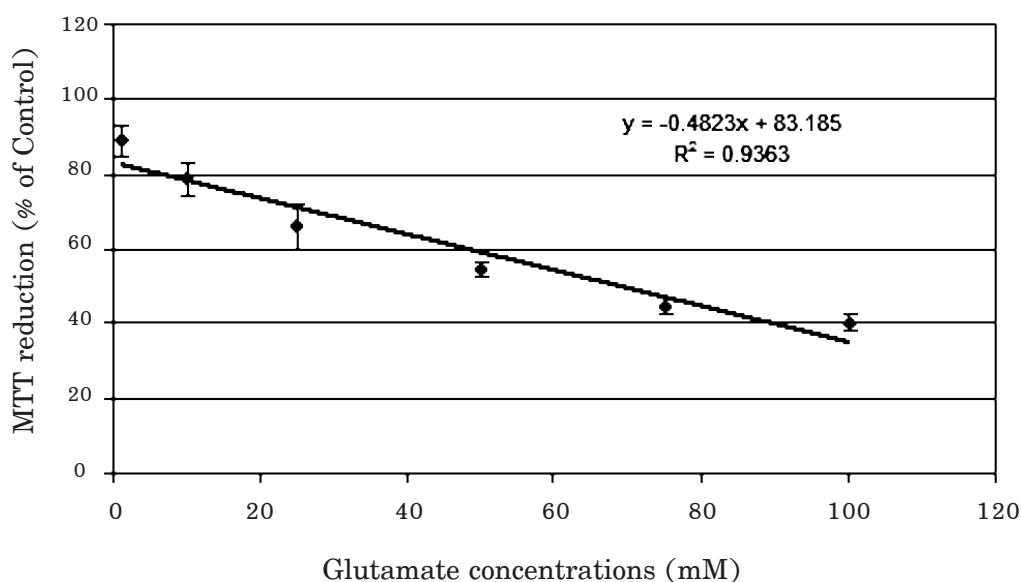
เมื่อให้เซลล์ประสาท N1E-115 สัมผัสกับสารสกัด EHB หรือ EHW ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือ

ให้เซลล์ประสาท N1E-115 สัมผัสกับสารสกัด EHB หรือ EHW ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการให้ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบผลเช่นเดียวกัน คือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง MTT reduction เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่า สารสกัด EHB และ EHW ของมะกอกน้ำไม่สามารถลดการบาดเจ็บหรือการตายที่เกิดจาก hydrogen peroxide ได้

## 2. การทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาทจาก glutamate

### 2.1 การหาความเข้มข้นของ glutamate ที่เหมาะสมต่อการทดสอบเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

จากการนำเซลล์ประสาท N1E-115 ที่ทำให้เปลี่ยนสภาพแล้วด้วย DMSO มาสัมผัสกับ glutamate ที่ความเข้มข้น 1 - 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และประเมิน cell viability โดยวัดด้วยวิธี MTT reduction พบว่า glutamate ที่ความเข้มข้น 1, 10, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ มีค่า MTT reduction ของเซลล์ประสาท เป็น 88.94, 78.83, 66.27, 54.39, 44.56 และ 40.24% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า glutamate ลด cell viability เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ glutamate โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 68.81 มิลลิโมลาร์ และ  $IC_{60}$  เท่ากับ 48.07 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 3) และจากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ความหนาแน่นของเซลล์ประสาทลดลง เซลล์ประสาทมีรูปร่างผิดปกติ และความยาวของ neurite สั้นลงและไม่มีความต่อเนื่อง และมี cell viability ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้น การทดลองต่อไปจึงเลือกใช้การสัมผัสกับ glutamate ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง



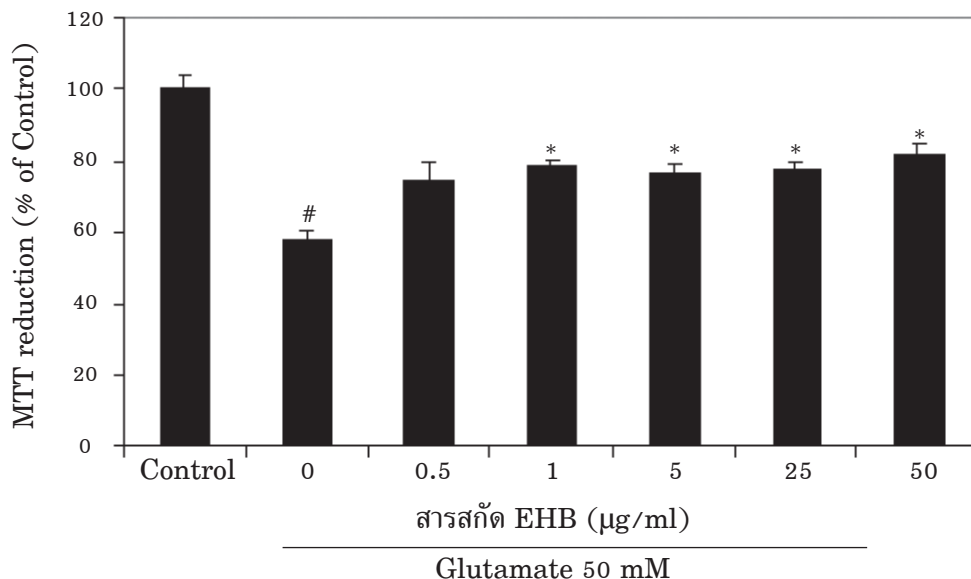
ภาพที่ 3 ผลของ Glutamate ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง N1E-115 อายุ 96 ชั่วโมงสัมผัสกับ Glutamate ที่ความเข้มข้น 1 - 100 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 ตัวอย่าง ( $n = 6$ ) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ จากกราฟ ค่า  $IC_{50} = 68.81$  มิลลิโมลาร์ และ  $IC_{60} = 48.07$  มิลลิโมลาร์

## 2.2 ผลของสารสกัดมะกอกน้ำต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงปกติ

เมื่อให้เซลล์ประสาท N1E-115 ที่ทำให้เปลี่ยนสภาพแล้วด้วย DMSO มาสัมผัสกับสารสกัด EHB ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า cell viability ของเซลล์ประสาท เป็น 106.52, 103.26, 106.22, 104.92 และ 102.54% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (100%) ในขณะที่เมื่อสัมผัสกับสารสกัด EHW ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า cell viability ของเซลล์ประสาท เป็น 104.93, 98.07, 103.12, 107.10 และ 105.99% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (100%) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดมะกอกน้ำทั้ง 2 สารสกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงปกติ

## 2.3 ผลของสารสกัดมะกอกน้ำต่อการปกป้องการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก glutamate

เมื่อให้เซลล์ประสาท N1E-115 ที่ทำให้เปลี่ยนสภาพแล้วด้วย DMSO มาสัมผัสกับสารสกัด EHB ที่ความเข้มข้น 0.5 – 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับ glutamate ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า MTT reduction ของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังการสัมผัสกับ glutamate เป็น 57.98% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อให้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงสัมผัสกับสารสกัด EHB ที่ความเข้มข้น 0.5 – 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับ glutamate ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พบว่า สารสกัด EHB ที่ความเข้มข้น 1, 5, 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่ม cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยเพิ่มขึ้น 19.98, 18.34, 19.76 และ 24.19% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ glutamate อย่างเดียว (ภาพที่ 4) แสดงให้เห็นว่า สารสกัด EHB ของมะกอกน้ำ ที่ความเข้มข้น 1 – 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท โดยสามารถลดการบาดเจ็บหรือการตายที่เกิดจาก glutamate ได้



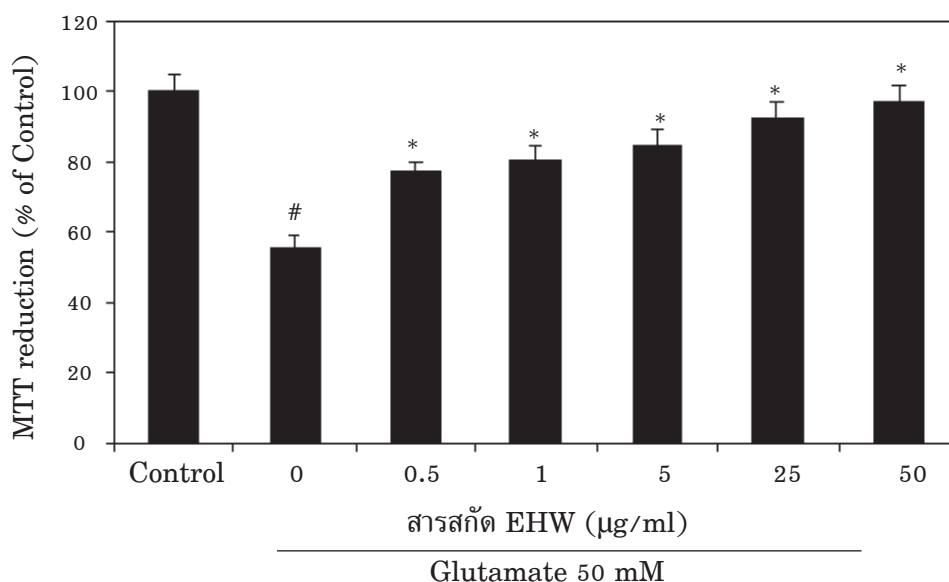
ภาพที่ 4 ผลการสัมผัสของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง N1E-115 กับสารสกัด EHB ต่อการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากพิษของ glutamate เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง N1E-115 อายุ 96 ชั่วโมงสัมผัสกับสารสกัด EHB ที่ความเข้มข้น 0.5 – 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับ glutamate ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 ตัวอย่าง ( $n = 6$ ) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ

# แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่สัมผัสกับ glutamate

ส่วนการสัมผัสของเซลล์ประสาท N1E-115 ที่ทำให้เปลี่ยนสภาพแล้วด้วย DMSO กับสารสกัด EHW ที่ความเข้มข้น 0.5 - 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับ glutamate ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า MTT reduction ของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังการสัมผัส glutamate เป็น 55.43% และเมื่อให้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงสัมผัสกับสารสกัด EHW ที่ความเข้มข้น 0.5 - 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับ glutamate ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พบว่า สารสกัด EHW ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่ม cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยเพิ่มขึ้น 22.03, 25.02, 28.85, 36.48 และ 41.85% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ glutamate อย่างเดียว ซึ่งการออกฤทธิ์ของสารสกัดนี้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัด (dose-dependent) คือ การออกฤทธิ์ของสารสกัดเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด (ภาพที่ 5) แสดงให้เห็นว่า สารสกัด EHW ของมะกอกน้ำที่ความเข้มข้น 0.5 - 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท โดยสามารถลดการบาดเจ็บหรือการตายที่เกิดจาก glutamate ได้

เมื่อเปรียบเทียบความแรงในการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดมะกอกน้ำทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่า สารสกัด EHW ของมะกอกน้ำแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้ดีกว่า และเป็นการออกฤทธิ์โดยขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด ในทางตรงกันข้าม การสัมผัสของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงกับสารสกัด EHB หรือ EHW ของมะกอกน้ำที่ความเข้มข้น 0.5 - 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ก่อนการสัมผัสกับ glutamate ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการลดการบาดเจ็บหรือการตายที่เกิดจากพิษของ glutamate



ภาพที่ 5 ผลการสัมผัสของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง N1E-115 กับสารสกัด EHW ต่อการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากพิษของ glutamate เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง N1E-115 อายุ 96 ชั่วโมงสัมผัสกับสารสกัด EHW ที่ความเข้มข้น 0.5 - 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับ glutamate ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 ตัวอย่าง ( $n = 6$ ) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ

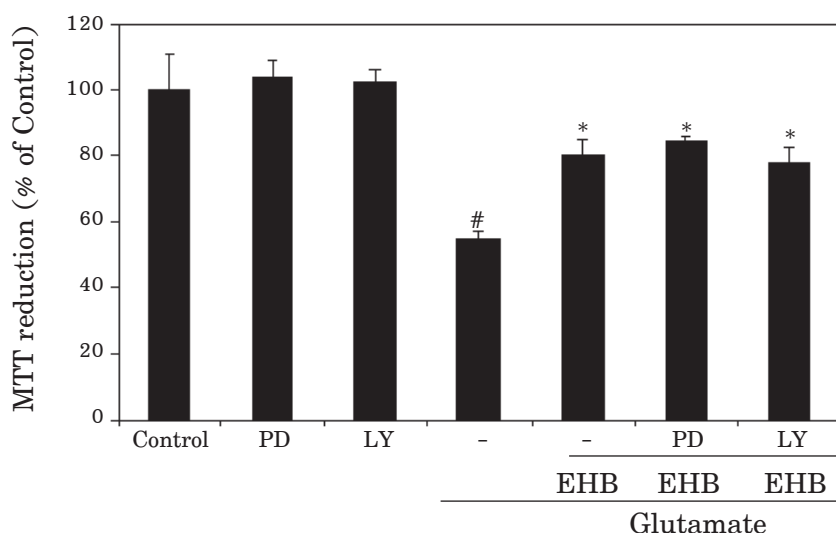
# แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่สัมผัสกับ glutamate

จากผลการทดลองในเบื้องต้น พบว่า สารสกัด EHB (1 – 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และสารสกัด EHW (0.5 – 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจาก glutamate โดยการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดนี้เป็นแบบ dose-dependent ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือก สารสกัด EHB และสารสกัด EHW ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

#### 2.4 ผลของ MEK inhibitor (PD 98059) หรือ PI3K inhibitor (LY 294002) ต่อฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด EHB และ EHW ของมะกอกน้ำต่อการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก glutamate

ในการทดสอบว่ากลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด EHB และ EHW เกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณผ่านวิถี Mitogen-activated protein kinases (MAPK) หรือวิถี phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway หรือไม่ โดยเติมหรือไม่เติมสารยับยั้งเฉพาะ ได้แก่ MEK inhibitor (PD 98059) หรือ PI3K inhibitor (LY 294002) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการสัมผัสร่วมและหลังจากนั้นเติมสารยับยั้งเฉพาะพร้อมกับการสัมผัสร่วมระหว่างสารสกัด EHB หรือ EHW และ glutamate ในเซลล์เพาะเลี้ยง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบผลดังนี้



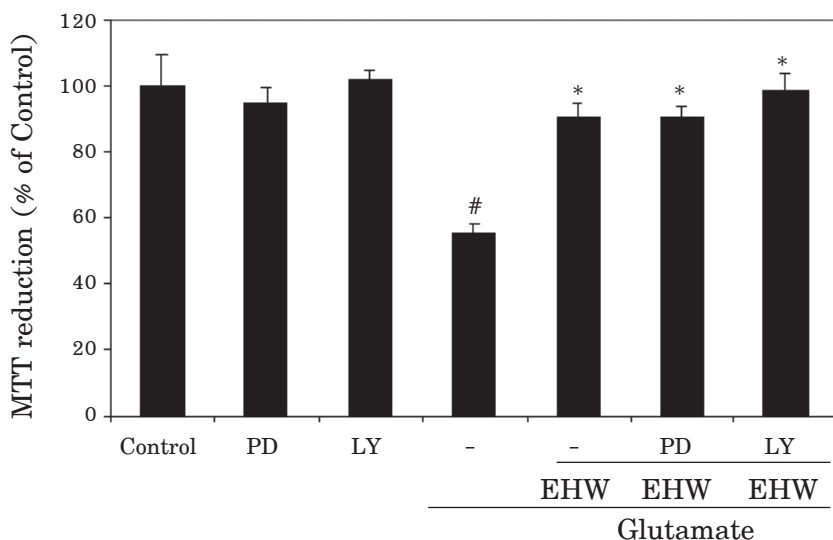
ภาพที่ 6 ผลของ MEK inhibitor (PD 98059) และ PI3K inhibitor (LY 294002) ต่อฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด EHB จากการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากพิษของ glutamate เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง N1E-115 อายุ 96 ชั่วโมง สัมผัสกับสารยับยั้งเฉพาะ PD 98059 (PD) ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ หรือ LY 294002 (LY) ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ หรือสัมผัสกับ glutamate ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ หรือสัมผัสร่วมระหว่างสารสกัด EHB ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ glutamate 50 มิลลิโมลาร์ หรือสัมผัสกับสารยับยั้งเฉพาะ PD หรือ LY ก่อนสัมผัสร่วมระหว่างสารสกัด EHB ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ glutamate 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 ตัวอย่าง ( $n = 6$ ) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ

# แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่สัมผัสกับ glutamate

การให้เซลล์ประสาท N1E-115 ที่ทำให้เปลี่ยนสภาพด้วย DMSO มาสัมผัสกับ PD 98059 หรือ LY 294002 พบว่า PD 98059 30 ไมโครโมลาร์ และ LY 294002 40 ไมโครโมลาร์ไม่มีผลต่อ MTT reduction เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ขณะที่ MTT reduction ของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังการสัมผัสกับ glutamate 50 มิลลิโมลาร์ เป็น 54.54% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การสัมผัสร่วมของสารสกัด EHB 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับ glutamate 50 มิลลิโมลาร์ พบว่า สารสกัด EHB ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่ม cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยเพิ่มขึ้น 25.60% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ glutamate อย่างเดียว เมื่อให้ PD 98059 หรือ LY 294002 ก่อนการสัมผัสร่วม หลังจากนั้นให้ PD 98059 หรือ LY 294002 พร้อมกับการสัมผัสร่วมของสารสกัด EHB กับ glutamate พบว่า สารสกัด EHB ที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถเพิ่ม cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยเพิ่มขึ้น 29.52% หรือ 22.88% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ glutamate อย่างเดียว (ภาพที่ 6) แสดงให้เห็นว่า PD 98059 30 มิลลิโมลาร์ และ LY 294002 40 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อ cell viability และไม่มีผลต่อฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด EHB

การให้เซลล์ประสาท N1E-115 ที่ทำให้เปลี่ยนสภาพด้วย DMSO มาสัมผัสกับ PD 98059 หรือ LY 294002 พบว่า PD 98059 30 ไมโครโมลาร์ และ LY 294002 40 ไมโครโมลาร์ไม่มีผลต่อ MTT reduction เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ขณะที่ MTT reduction ของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังการสัมผัสกับ glutamate 50 มิลลิโมลาร์ เป็น 55.05% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การสัมผัสร่วมของสารสกัด EHW 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับ glutamate 50 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 7 ผลของ MEK inhibitor (PD 98059) และ PI3K inhibitor (LY 294002) ต่อฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด EHW จากการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากพิษของ glutamate เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง N1E-115 อายุ 96 ชั่วโมง สัมผัสกับสารยับยั้งเฉพาะ PD 98059 (PD) ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ หรือ LY 294002 (LY) ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ หรือสัมผัสกับ glutamate ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ หรือสัมผัสร่วมระหว่างสารสกัด EHW ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ glutamate 50 มิลลิโมลาร์ หรือสัมผัสกับสารยับยั้งเฉพาะ PD หรือ LY ก่อนสัมผัสร่วมระหว่างสารสกัด EHW ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ glutamate 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 ตัวอย่าง ( $n = 6$ ) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ

# แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่สัมผัสกับ glutamate

พบว่า สารสกัด EHW ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่ม cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยเพิ่มขึ้น 34.79% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ glutamate อย่างเดียว เมื่อให้ PD 98059 หรือ LY 294002 ก่อนการสัมผัสร่วมหลังจากนั้นให้ PD 98059 หรือ LY 294002 พร้อมกับการสัมผัสร่วมของสารสกัด EHW กับ glutamate พบว่าสารสกัด EHW ที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถเพิ่ม cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยเพิ่มขึ้น 34.80% หรือ 43.48% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ glutamate อย่างเดียว (ภาพที่ 7) แสดงให้เห็นว่า PD 98059 30 มิลลิโมลาร์ และ LY 294002 40 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อ cell viability และไม่มีผลต่อฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด EHW

## วิจารณ์

การศึกษานี้ ผู้วิจัยได้ทดสอบผลของสารสกัดมะกอกน้ำต่อการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma N1E-115 โดยใช้แบบจำลองระดับเซลล์ของการเสื่อมของเซลล์ประสาท 2 แบบ คือการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ที่เกิดจาก hydrogen peroxide และ glutamate ซึ่งการเสื่อมของเซลล์ประสาททั้งสองแบบนี้เป็นผลเนื่องมาจาก oxidative stress

ภาวะ Oxidative stress ทำให้เกิดการทำลายเซลล์และมีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติต่าง ๆ ทางระบบประสาท เช่น Alzheimer's disease, Parkinson's disease และ stroke เป็นต้น ซึ่งความผิดปกตินี้เกิดขึ้นผ่าน free radicals หรือ ROS ได้แก่ hydrogen peroxide, superoxide และ hydroxyl radicals ปริมาณของ ROS ที่มากเกินไปนี้อาจจะทำให้เกิดการทำให้ดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมัน ซึ่ง hydrogen peroxide เป็น ROS หลักที่ใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress ในหลอดทดลอง

ในการศึกษานี้พบว่า hydrogen peroxide แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง N1E-115 เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่มีผู้วิจัยมาแล้ว<sup>(26-27)</sup> เนื่องจากการสัมผัสกับสารสกัด EHB หรือ EHW 0.5 - 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงไม่มีผลต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงปกติ จึงเลือกความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงมาใช้ในการทดลอง และเมื่อให้สารสกัด EHB หรือ EHW พร้อมหรือก่อนให้ hydrogen peroxide ไม่สามารถลดการบาดเจ็บหรือการตายที่เกิดจาก hydrogen peroxide ได้ แสดงให้เห็นว่า สารสกัดมะกอกน้ำไม่แสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจาก oxidative stress ที่เป็นผลมาจากพิษของ hydrogen peroxide

ส่วนการใช้ glutamate เป็นแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทและการเติม glycine พร้อมกับการเติม glutamate ในทุกการทดลองนั้นเพื่อกระตุ้นให้ glutamate จับกับตัวรับ (NMDA receptor) ได้ดีขึ้น<sup>(28-29)</sup> ซึ่งการกระตุ้นตัวรับที่มากเกินไปนี้เป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเซลล์<sup>(14)</sup> ในการศึกษานี้พบว่า glutamate มีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท N1E-115 เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นซึ่งความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทของ glutamate นี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยอื่น ๆ<sup>(30-32)</sup> และการศึกษานี้ glutamate มีค่า  $IC_{50}$  ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ โดยเริ่มแสดงความเป็นพิษที่ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า glutamate เริ่มแสดงความเป็นพิษที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง N1E-115<sup>(30)</sup>, hNT (human Ntera/D1)<sup>(33)</sup> และเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง hippocampal dentate gyrus ที่แยกจากสมองของหนูขาว<sup>(34)</sup> และที่ความเข้มข้นระหว่าง 1 - 100 มิลลิโมลาร์ ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง cortical ที่แยกจากสมองของหนูขาว<sup>(35)</sup> ความแตกต่างนี้อาจเป็นผลมาจากความหนาแน่นที่แตกต่างกันของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง ระยะเวลาที่เซลล์ประสาทสัมผัสกับ glutamate และยังขึ้นกับชนิดของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดลอง ด้วยเหตุนี้จึงมีผลทำให้เซลล์ประสาทมีความไวต่อการเกิดพิษจาก glutamate แตกต่างกัน

จากการศึกษานี้ได้ประเมิน cell viability จากการตรวจวัด MTT reduction พบว่า การสัมผัสกับสารสกัด EHB หรือ EHW ของมะกอกน้ำ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงปกติที่เกิด differentiation แล้ว จึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่พบนี้ในการทดลอง โดยเมื่อเซลล์ประสาท N1E-115 สัมผัสกับสารสกัด EHB 1 - 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือ EHW 0.5 - 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับ glutamate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถลดการบาดเจ็บหรือการตายที่เกิดจาก glutamate ได้ โดยเพิ่ม MTT reduction ซึ่งเป็นดัชนีชี้วัดของ mitochondrial viability/activity แสดงให้เห็นว่า สารสกัด EHB และ EHW ของมะกอกน้ำแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของ glutamate ซึ่งยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน

จากการสัมผัสร่วมระหว่างสารสกัดมะกอกน้ำพร้อมกับ glutamate เป็นผลให้เกิดการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่เกิดจากพิษของ glutamate ในขณะที่การสัมผัสกับสารสกัดมะกอกน้ำก่อน glutamate ไม่มีผลต่อการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่เกิดจากพิษของ glutamate ได้ อาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดมะกอกน้ำเกิดจากการออกฤทธิ์โดยตรงในการลดความเป็นพิษของ glutamate ขณะการสัมผัสร่วมทำให้ลดการตายของเซลล์ประสาท แต่อาจจะไม่มีผลต่อเซลล์ประสาทเมื่อสารสกัดมะกอกน้ำเข้าสู่เซลล์แล้วก่อนการเติม glutamate ลงในการเพาะเลี้ยงตามหลัง

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้พิสูจน์ว่า ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด EHB และ EHW ในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจาก glutamate มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านกระบวนการส่งสัญญาณในวิถี MAPK และวิถี PI3K หรือไม่ โดยเติมสารยับยั้งเฉพาะ คือ MEK inhibitor (PD 98059) และ PI3K inhibitor (LY294002) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการส่งสัญญาณในวิถีดังกล่าว ตามลำดับ ผลพบว่า สารสกัด EHB และ EHW ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากพิษของ glutamate ซึ่งผลที่ได้สนับสนุนกับผลการทดลองครั้งก่อนในการศึกษานี้ที่พบว่า สารสกัดมะกอกน้ำป้องกันการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก glutamate กลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่สัมผัสกับสารยับยั้งเฉพาะ PD 98059 หรือ LY 294002 ก่อน แล้วตามด้วยการสัมผัสร่วมระหว่างสารสกัด EHB และ glutamate พร้อมกับเติมสารยับยั้งเฉพาะดังกล่าวมีค่า cell viability ไม่แตกต่างจากกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ให้เฉพาะการสัมผัสร่วมระหว่างสารสกัด EHB และ glutamate พบผลเช่นเดียวกันกับเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงอีกกลุ่มที่สัมผัสกับสารยับยั้งเฉพาะ PD 98059 หรือ LY 294002 ก่อน แล้วตามด้วยการสัมผัสร่วมระหว่างสารสกัด EHW และ glutamate พร้อมกับเติมสารยับยั้งเฉพาะดังกล่าวมีค่า cell viability ไม่แตกต่างจากกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ให้เฉพาะการสัมผัสร่วมระหว่างสารสกัด EHW และ glutamate และ cell viability ของทั้ง 2 กลุ่มนี้มีค่าสูงกว่า cell viability ของกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่สัมผัสกับ glutamate อย่างเดียว แสดงว่าการเติมหรือไม่เติมสารยับยั้งเฉพาะ MEK inhibitor (PD 98059) หรือ PI3K inhibitor (LY 294002) ก่อน แล้วตามด้วยการสัมผัสร่วมระหว่างสารสกัด EHB หรือ EHW และ glutamate ไม่มีผลต่อฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด EHB หรือ EHW การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า การยับยั้งที่วิถี MAPK ด้วย MEK inhibitor หรือวิถี PI3K ด้วย PI3K inhibitor ไม่มีผลต่อการแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด EHB และ EHW ดังนั้น กลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจาก glutamate ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับวิถี MAPK และวิถี PI3K

จากรายงานการเกิดพิษจาก glutamate พบว่า การกระตุ้น glutamate receptor มากเกินไป และอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะที่ NMDA receptor ทำให้ความเข้มข้นของแคลเซียมภายในเซลล์ (intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )) เพิ่มขึ้น มีผลทำให้เกิดการเสื่อมสลายและการตายของเซลล์ประสาทจากพิษของ glutamate ผ่าน excitotoxic pathway ที่เรียกว่า glutamate neurotoxicity หรือ excitotoxicity<sup>(36)</sup> ซึ่งจะไปกระตุ้นเอนไซม์หลายชนิดที่มีความเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ประสาทโดยทำให้เกิด protein breakdown มีการสร้าง free radical หรือการสะสม ROS ที่เกิดจากไมโทคอนเดรีย และเกิด lipid peroxidation<sup>(37)</sup> เป็นเหตุให้เซลล์ประสาทสูญเสียหน้าที่และตายในที่สุด

นอกจากนี้ ความเป็นพิษของ glutamate ยังเกิดขึ้นผ่าน oxidative pathway โดยมีการสร้าง malondialdehyde ระหว่างการเกิด lipid peroxidation ผลทำให้เกิด oxidative damage และเซลล์ประสาทตาย<sup>(35)</sup> จากผลการทดลอง สารสกัด EHB และ EHW สามารถปกป้องการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจาก glutamate แต่ไม่แสดงผลปกป้องการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจาก hydrogen peroxide อาจเป็นไปได้ว่า กลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดมะกอกน้ำไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของสารสกัดมะกอกน้ำ แต่อาจจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการกระตุ้นที่ glutamate receptor เป็นผลให้ลดการตายของเซลล์ประสาทจากการเกิดพิษของ glutamate อย่างไรก็ตาม กลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดมะกอกน้ำโดยละเอียดยังไม่เป็นที่เข้าใจ ดังนั้นควรศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อขยายความต่อไป

## สรุป

การศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดมะกอกน้ำในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma N1E-115 โดยใช้แบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์จาก hydrogen peroxide หรือ glutamate พบว่า ทั้ง hydrogen peroxide และ glutamate มีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท N1E-115 โดยลด cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้น

ในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจาก hydrogen peroxide พบว่า สารสกัด EHB หรือ EHW เมื่อให้พร้อมกับหรือก่อนให้ hydrogen peroxide ไม่สามารถป้องกันการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากความเป็นพิษของ hydrogen peroxide ได้ ส่วนในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจาก glutamate พบว่า เมื่อเซลล์ประสาท N1E-115 สัมผัสกับสารสกัด EHB หรือ EHW พร้อมกับ glutamate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัด EHB (1 – 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ EHW (0.5 – 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สามารถป้องกันการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากความเป็นพิษของ glutamate ได้ และการเติมสารยับยั้งเฉพาะที่ MAPK หรือ PI3K signaling pathway ไม่มีผลต่อการแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด EHB และ EHW จากพิษของ glutamate แสดงว่าฤทธิ์ดังกล่าวไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับทั้งคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของสารสกัดมะกอกน้ำ และการส่งสัญญาณผ่านวิถี Mitogen-activated protein kinase (MAPK) และวิถี Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)

## เอกสารอ้างอิง

1. สุนทรี สิงหนุตตรา, บรรณาธิการ. สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์; 2536.
2. Ruangchakpet A, Sajjaanantakul T. Effect of spanish plum (*Elaeocarpus hygrophilus* Kurz.) maturity on total phenolics, flavonoids and antioxidant activity. *Agricultural Sci J* 2007; 5(Suppl.): 127-30.
3. Piao MJ, Kang KA, Zhang R, Ko DO, Wang ZH, Lee KH, et al. Antioxidant properties of 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose from *Elaeocarpus sylvestris* var. *Ellipticus*. *Food Chem* 2009; 115: 412-8.
4. Fang X, Phoebe CH Jr, Pezzuto JM, Fong HHS, Farnsworth NR, Yellin B, et al. Plant anticancer agents, XXXIV. Cucurbitacins from *Elaeocarpus dolichostylus*. *J Nat Prod* 1984; 47(6): 988-93.
5. Ito A, Chai H-B, Lee D, Kardono LB, Riswan S, Farnsworth NR, et al. Ellagic acid derivatives and cytotoxic cucurbitacins from *Elaeocarpus mastersii*. *Phytochemistry* 2002; 61(2): 171-4.
6. Elkhateeb A, Subeki, Takahashi K, Matsuura H, Yamasaki M, Yamato O, et al. Anti-babesial ellagic acid rhamnosides from the bark of *Elaeocarpus parvifolius*. *Phytochemistry* 2005; 66(21): 2577-80.

7. Nguyen-Pouplin J, Tran H, Tran H, Phan TA, Dolecek C, Farrar J, et al. Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Vietnam. *J Ethnopharmacol* 2007; 109(3): 417-27.
8. Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2008; 21: 172-88.
9. Khandhar SM, Marks WJ. Epidemiology of Parkinson's disease. *Dis Mon* 2007; 53(4): 200-5.
10. Sanders S, Morano C. Alzheimer's disease and related dementias. *J Gerontol Soc Work* 2008; 50 (Suppl. 1): 191-214.
11. Teepker M, Anthes N, Fischer S, Krieg JC, Vedder H. Effects of oxidative challenge and calcium on ATP-levels in neuronal cells. *Neurotoxicology* 2007; 28: 19-26.
12. Conn PJ. Physiological roles and therapeutic potential of metabotropic glutamate receptors. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1003: 12-21.
13. Bleich S, Romer K, Wiltfang J, Kornhuber J. Glutamate and the glutamate receptor system: a target for drug action. *Int J Geriatr Psychiatry* 2003; 18 (Suppl. 1): S33-40.
14. Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 1990; 13: 171-82.
15. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Orrenius S, Nicotera P. Calcineurin and mitochondrial function in glutamate-induced neuronal cell death. *FEBS Lett* 1996; 394(3): 321-4.
16. Dawson VL, Kizushi VM, Huang PL, Snyder SH, Dawson TM. Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J Neurosci* 1996; 16(8): 2479-87.
17. Urushitani M, Nakamizo T, Inoue R, Sawada H, Kihara T, Honda K, et al. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated mitochondrial  $\text{Ca}^{(2+)}$  overload in acute excitotoxic motor neuron death: a mechanism distinct from chronic neurotoxicity after  $\text{Ca}^{(2+)}$  influx. *J Neurosci Res* 2001; 63(5): 377-87.
18. Junttila MR, Li SP, Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J* 2008; 22(4): 954-65.
19. Gerits N, Kostenko S, Shiryaev A, Johannessen M, Moens U. Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: comradeship and hostility. *Cell Signal* 2008; 20(9): 1592-607.
20. Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22(2): 153-83.
21. Backer CA, Bakhuizen van den Brink Jr RC. *Flora of Java*. Vol. 1. Groningen, The Netherlands: N.V.P. Noordhoff; 1968. p. 648.
22. Phengklai C. *Elaeocarpaceae*. In: *Flora of Thailand*. Vol. 2 Part 4. Bangkok: The Tistr Press Co. Ltd.; 1981. p. 405-38.
23. Amano T, Richelson E, Nirenberg M. Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69: 258-63.
24. Kimhi Y, Palfrey C, Spector I, Barak Y, Littauer UZ. Maturation of neuroblastoma cells in the presence of dimethylsulfoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73(2): 462-6.
25. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
26. Kong PJ, Kim YM, Lee HJ, Kim SS, Yoo ES, Chun WJ. Neuroprotective effects of methanol extracts of Jeju native plants on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 2007; 11: 171-4.

27. Zhang J, Melton LD, Adaim A, Skinner MA. Cytoprotective effects of polyphenolics on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in SH-SY5Y cells in relation to their antioxidant activities. *Eur Food Res Technol* 2008; 228: 123-31.
28. Johnson JW, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 1987; 325: 529-31.
29. Danysz W, Parsons CG. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol Rev* 1998; 50(4): 597-664.
30. Schelman WR, Andres RD, Sipe KJ, Kang E, Weyhenmeyer JA. Glutamate mediates cell death and increases the Bax to Bcl-2 ratio in a differentiated neuronal cell line. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; 128(2): 160-9.
31. Zhang YM, Bhavnani BR. Glutamate-induced apoptosis in primary cortical neurons is inhibited by equine estrogens via down-regulation of caspase-3 and prevention of mitochondrial cytochrome c release. *BMC Neurosci* 2005; 6:13-35.
32. Kogo J, Takeba Y, Kumai T, Kitaoka Y, Matsumoto N, Ueno S, et al. Involvement of TNF- $\alpha$  in glutamate-induced apoptosis in a differentiated neuronal cell line. *Brain Res* 2006; 1122: 201-8.
33. Perovic S, Pialoglou P, Schroder HC, Pergande G, Muller WE. Flupirtine increases the levels of glutathione and Bcl-2 in hNT (human Ntera/D1) neurons: mode of action of the drug-mediated anti-apoptotic effect. *Eur J Pharmacol* 1996; 317: 157-64.
34. Figiel I, Kaczmarek L. Cellular and molecular correlates of glutamate-evoked neuronal programmed cell death in the *in vitro* cultures of rat hippocampal dentate gyrus. *Neurochem Int* 1997; 31(2): 229-40.
35. Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 1989; 2(6): 1547-58.
36. Nicholls DG, Ward MW. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci* 2000; 23(4): 166-74.
37. Mark LP, Prost RW, Ulmer JL, Smith MM, Daniels DL, Strottmann JM, et al. Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001; 22(10): 1813-24.

---

# The Study of Neuroprotective Effects of Makok-nam (*Elaeocarpus* sp.) Extracts on Hydrogen Peroxide and Glutamate-induced Neurotoxicity in Mouse Neuroblastoma Cells

---

Sadudee Rattanajarasroj Warunee Jirawattanapong Nuchattrra Chansuvanich  
Yuwadee Mettametha and Sakwichai Ontong

Medicinal Plant Research Institute Department of Medical Sciences Tiwanond Road, Nonthaburi 11000  
Thailand.

**ABSTRACT** Makok-nam contains polyphenols which are marked antioxidant and may suggest its potential to alleviate oxidative stress-induced neurodegenerative process. The present study was to investigate the neuroprotective activities of ethanol extracts of Makok-nam bark (EHB) and Makok-nam wood (EHW) on hydrogen peroxide and glutamate-induced neurotoxicity in mouse neuroblastoma N1E-115 cell line cultures. It was found that co-exposure of cultured neurons to glutamate with EHB or EHW for 24 hours may be protective against cell injury from glutamate in N1E-115 cultures, while both extracts did not show this beneficial effect in hydrogen peroxide-induced cell death. Moreover, we also proved that the underlying neuroprotective mechanisms of Makok-nam extracts may not involve in the mitogen-activated protein kinase (MAPK) or phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway, and yet, certain neuroprotection mechanisms of these extracts are still unclear and warrant further investigation.

**Key words :** Makok-nam, *Elaeocarpus* sp., hydrogen peroxide-induced cell death, glutamate-induced cell death, mouse neuroblastoma cells, N1E-115 cells