

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปกป้องเซลล์ประสาทของ สารสกัดจากเปลือกต้นเพกาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

สุดดี รัตนจรัสโรจน์ วารุณี จิรวัดนาพงศ์ ณัฐพร พลแสน นิธิตา พลโคตร ยุวดี เมตตาเมธา ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง และประถม ทองศรีรักษ์

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ภาวะเครียดจากการเกิดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคความเสื่อมของระบบประสาท เปลือกต้นเพกาประกอบด้วยสารกลุ่มโพลีฟีนอลซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และอาจใช้บรรเทาภาวะ oxidative stress ได้ จึงได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดด้วยน้ำ (OI-W) และสารสกัดด้วยเอทานอล (OI-E) จากเปลือกต้นเพกาต่อความเป็นพิษจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมตในเซลล์ประสาท N1E-115 ผลการดักจับอนุมูลไฮดรอกซิลและซูเปอร์ออกไซด์ พบว่าสารสกัด OI-W และ OI-E สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ การสัมผัสร่วมระหว่างสารสกัด OI-W หรือ OI-E และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถป้องกันการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ N1E-115 จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ขณะที่ทั้ง 2 สารสกัดไม่แสดงผลป้องกันการตายของเซลล์จากพิษของกลูตาเมต การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกต้นเพกามีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยกลไกการออกฤทธิ์อย่างน้อยอาจเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน ควรมีการศึกษาต่อไปในเซลล์ที่เฉพาะเจาะจงต่อพยาธิสภาพ หรือทดสอบในสัตว์ทดลองเพื่อตรวจสอบฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องให้ชัดเจน ก่อนนำไปพัฒนาเป็นยาสมุนไพรสำหรับรักษาโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท

คำสำคัญ: เพกา, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

Corresponding author E-mail: sadudee.r@dmsc.mail.go.th

Received: 20 November 2019

Revised: 25 August 2020

Accepted: 16 September 2020

บทนำ

อนุมูลอิสระ (free radicals) ที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical) จัดเป็นอนุมูลที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก ความเสียหายที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระหรือสารออกซิไดส์แรงสูง (reactive oxygen species, ROS) และสารต้านออกซิเดชัน (antioxidants) ในร่างกาย ทำให้เกิดภาวะเครียดจากการเกิดออกซิเดชัน (oxidative stress) ส่งผลให้เกิดการทำลายแบบออกซิเดชัน (oxidative damage) ต่อชีวโมเลกุลภายในร่างกาย เช่น การทำลายดีเอ็นเอ (DNA damage) การทำลายสภาพโปรตีน (protein denaturation) การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (lipid peroxidation) ทำให้ชีวโมเลกุลเหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเสียหายที่การทำงาน⁽¹⁾ เป็นต้น

ภาวะ oxidative stress เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคทางระบบประสาท และโรคอื่น ๆ รวมทั้งกระบวนการชรา⁽¹⁾ นอกจากนี้ภาวะ oxidative stress ยังมีความเกี่ยวข้องกับโรคความเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative diseases) เช่น Alzheimer's disease, Parkinson's disease การสะสม ROS ในเซลล์ประสาทส่วนใหญ่นั้นเป็นซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ส่งผลให้เกิด lipid peroxidation มีการทำลายดีเอ็นเอและโปรตีน เกิดการตายของเซลล์ประสาทและก่อให้เกิดโรคทางระบบประสาท^(2,3) จากรายงานวิจัยพบว่าสาร antioxidants สามารถยับยั้งการเกิด ROS และอาจป้องกันการเกิดพยาธิสภาพจากการเสื่อมของเซลล์ประสาทอันเป็นผลมาจาก oxidative stress ได้⁽⁴⁾ ดังนั้นนักวิจัยจึงพยายามที่จะค้นหาสารที่สามารถป้องกันและยับยั้งอนุมูลอิสระเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท

เพกา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oroxylum indicum* (L.) Kurz จัดอยู่ในวงศ์ Bignoniaceae เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง เนื้อไม้อ่อน แตกกิ่งก้านน้อย ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก 3-4 ชั้น เรียงตรงกันข้าม ใบย่อยรูปไข่หรือรูปไข่แกมวงรี ปลายใบแหลม ดอกเป็นช่อแบบกระจาย ออกที่ปลายยอด ดอกย่อยมีขนาดใหญ่ มีสีม่วงแดง ผลเป็นฝักรูปดาบแบน ขนาดใหญ่ สีน้ำตาล เมื่อแก่จะแตกตามยาว ภายในมีเมล็ดแบนสีขาว มีปีกบาง เพกาเป็นต้นไม้ที่มีการกระจายพันธุ์กว้าง พบตั้งแต่ภูมิภาคเอเชียใต้ จีนตอนใต้จนถึงภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย โดยพบขึ้นอยู่ตามธรรมชาติในป่าดิบชื้นและพื้นที่โล่งทั่วไป (ภาพที่ 1)^(5,6)



ภาพที่ 1 ต้นและเปลือกต้นเพกา (*Oroxylum indicum* (L.) Kurz)

ส่วนต่าง ๆ ของเพกาสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน มีสรรพคุณใช้รักษาและป้องกันการเกิดโรคได้ ตามตำรายาไทยพบว่าเปลือกต้นเพกา มีรสฝาด ขม เย็น ช่วยสมานแผล ดับพิษกาฬ แก้อ่อนใน แก้อ่อนใน ทำให้น้ำเหลือง เป็นปกติ ดับพิษโลหิต บำรุงโลหิต แก้เสมหะจุกคอ ขับเสมหะ แก้บิด แก้อาการจุกเสียด แก้ไข้รอกสาธ แก้ฝี รักษาเมะเร็งเพลิง ขับเหงื่อ แก้ไขข้ออักเสบชนิดเฉียบพลัน ช่วยเจริญอาหาร⁽⁷⁾ จากบัญชียาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ ใช้เปลือก เพกา ร่วมกับสมุนไพรอื่นในตำรับ ได้แก่ ตำรับ “ยาเหลืองปิดสมุทร” มีสรรพคุณบรรเทาอาการท้องเสียชนิดที่ไม่เกิด จากการติดเชื้อ เช่น อุจจาระไม่เป็นมูกหรือมีเลือดปน และท้องเสียชนิดที่ไม่มีไข้ และตำรับ “ยาเล็องดาม” มีสรรพคุณ บรรเทาอาการปวดประจำเดือน ช่วยให้ประจำเดือนมาเป็นปกติ แก้มูกิด⁽⁸⁾ มีรายงานว่าสารเคมีที่พบในเปลือก ต้นเพกา คือ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เช่น oroxylin A, baicalein, chrysin, scutellarein^(9,10) เป็นต้น และการศึกษาทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัด จากเปลือกต้นเพกา มีฤทธิ์ต่างๆ ได้แก่ ต้านอักเสบ^(11,12,13,14) ต้านอาการปวด^(11,15) ปกป้องเซลล์ตับ^(16,17) ต้านเชื้อ จุลชีพ^(13,18,19,20) ต้านท้องเสีย^(13,15,20,21) ต้านการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์⁽²²⁾ ยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็ง⁽²³⁾ ลดไขมัน⁽²⁴⁾ ยับยั้งการสร้างเซลล์ไขมัน⁽²⁵⁾ ต้านเบาหวาน⁽²⁶⁾ เร่งการหายของแผล⁽²⁷⁾ และต้านอนุมูลอิสระ^(12,24,26,27,28)

เปลือกต้นเพกาเป็นแหล่งของสารประกอบโพลีฟีนอลิก (polyphenolic) ที่มีคุณสมบัติต้าน ออกซิเดชัน^(24,26,27,28) และมีหลักฐานสนับสนุนว่าสาร antioxidants อาจป้องกันการเกิดพยาธิสภาพจากการเสื่อม ของเซลล์ประสาทอันเป็นผลมาจาก oxidative stress ได้⁽⁴⁾ ดังนั้นการลดภาวะ oxidative stress ในเซลล์ประสาท จึงเป็นเป้าหมายหลักที่น่าสนใจในการป้องกันและรักษา neurodegenerative diseases สารสกัดที่ได้จากเปลือกต้น เพกาอาจสามารถป้องกันหรือลดการเกิดพยาธิสภาพจากการเสื่อมของเซลล์ประสาท ทำให้ลดการตายของเซลล์ประสาท ได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานฤทธิ์ของสารสกัดเพกาในการปกป้องเซลล์ประสาท จึงได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ สารสกัดจากเปลือกต้นเพกาโดยประเมินการดักจับ (scavenge) อนุมูลไฮดรอกซิลและซูเปอร์ออกไซด์ และศึกษาฤทธิ์ ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress จำนวน 2 โมเดล โดยการเหนี่ยวนำให้เซลล์บาดเจ็บหรือตายจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมต ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma cells แล้วประเมินความอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) ด้วยการตรวจวัด 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction และการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane damage) หรือการตายของเซลล์ (cell death) ด้วยการตรวจวัด lactate dehydrogenase (LDH) release

วัสดุและวิธีการ

วัตถุดิบ

เก็บรวบรวมตัวอย่างเพกาจากพื้นที่จังหวัดจันทบุรี เพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการศึกษา และตรวจ ระบุชนิดพร้อมส่วนของเปลือกต้นตามหลักอนุกรมวิธานพืช^(5,6) เพื่อจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิง (voucher specimen) เก็บรักษาไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืช กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (DMSC Herbarium) โดยมีหมายเลข พรรณไม้ของพิพิธภัณฑ์พืช กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ คือ DMSC 5188

การเตรียมสารสกัดเปลือกเพกา

แยกชิ้นเปลือกต้นเป็นชิ้นเล็ก ๆ อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นบดเป็นผงหยาบ และเก็บไว้ในภาชนะปิดสนิทก่อนนำไปเตรียมสารสกัด

การเตรียมสารสกัดด้วยน้ำ

นำผงสมุนไพรแห้งของเปลือกต้นของเพกาตั้งต้นปริมาณ 100 กรัม มาเตรียมเป็นสารสกัดโดยการต้มกลั่นในน้ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง กรอง และนำไปทำให้เข้มข้นภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่อง rotary evaporator (Rotary vacuum evaporator, Büchi, Japan) จากนั้นทำให้แห้งโดยใช้ lyophilizer ได้สารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นของเพกา (OI-W) โดยมีร้อยละของปริมาณสารที่สกัดได้เท่ากับ 24 (%yield, wt/wt)

การเตรียมสารสกัดด้วยเอทานอล

นำผงสมุนไพรแห้งของเปลือกต้นของเพกาตั้งต้นปริมาณ 100 กรัม มาต้มกลั่นในเอทานอล 95% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง กรอง และนำไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นของเพกา (OI-E) โดยมี %yield, wt/wt เท่ากับ 25

การควบคุมคุณภาพสารสกัด

การควบคุมคุณภาพทางเคมีของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดผิบบาง (Thin layer chromatography; TLC) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน baicalein, chrysin ตรวจสอบลักษณะของโครมาโทแกรม (chromatogram) ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และทำปฏิกิริยากับสารละลาย NP-Polyethylene glycol (NP-PEG) แล้วตรวจสอบภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี hydroxyl radical scavenging assay

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล โดยดัดแปลงจากวิธีของ Halliwell และคณะ⁽²⁹⁾ ดังนี้ reaction mixture ประกอบด้วย deoxyribose (1 มิลลิโมลาร์) 100 ไมโครลิตร สารละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 ไมโครโมลาร์) 10 ไมโครลิตร H_2O_2 (100 ไมโครโมลาร์) 10 ไมโครลิตร ascorbic acid (Sigma-aldrich, USA) (100 ไมโครโมลาร์) 100 ไมโครลิตร และสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 20-400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือสารมาตรฐาน trolox (Sigma-aldrich, USA) 40-400 ไมโครโมลาร์ ผสมสารให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย butylate hydroxytoluene (100 มิลลิโมลาร์) 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาทำ Thiobarbituric acid reactive substances assay (TBARS assay) โดยเติม trichloroacetic acid (2.8%) 0.5 มิลลิลิตร และ thiobarbituric acid (1%) 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Multi-detection microplate reader (Synergy™ HT, Biotex, USA) ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 2 ครั้ง (duplicate)

ผลการทดลองที่ได้นำไปคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน (ร้อยละการเกิด TBARS) โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพรหรือสารมาตรฐาน การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระจะพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรหรือสารมาตรฐานที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 (Inhibitory concentration at 50%, IC_{50}) และค่า Trolox equivalent antioxidant activity (TEAC) ซึ่งเป็นค่าที่บอกความแรงของสารสกัดสมุนไพรในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นจำนวนเท่าเมื่อเทียบกับอนุพันธ์วิตามินอี (trolox) ต่อกรัมของตัวอย่างสารสกัด โดยสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ตี้นั้นจะมีค่า IC_{50} ในระดับต่ำ และค่า TEAC ในระดับสูง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี *superoxide radical scavenging assay*

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดักจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Nishikimi และคณะ⁽³⁰⁾ ดังนี้ reaction mixture ประกอบด้วย nitroblue tetrazolium (Sigma-aldrich, USA) 258 ไมโครโมลาร์ nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) 996 ไมโครโมลาร์ และ phenazine methosulfate (PMS) 16.2 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 50 ไมโครลิตร และสารสกัดสมุนไพรหรือสารมาตรฐาน gallic acid (Sigma-aldrich, USA) ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 50, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเตรียมสารทุกตัวใน phosphate buffer (10 mM, pH 7.4) ซึ่งประกอบด้วย disodium phosphate และ monosodium phosphate ผสมสารให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Multi-detection microplate reader (SynergyTM HT, Biotex, USA) ที่ 562 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (triplicate) ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าร้อยละของ activity เทียบกับกลุ่มที่เกิดปฏิกิริยา 100% (full oxidation) คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์เป็นร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) แล้วนำมา plot กราฟเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารทดสอบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

การทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

นำเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma cells, N1E-115 (Cat. No. CRL-2263) (American Type Culture Collection (ATCC), USA) passage number 24-34 ซึ่งเป็นเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ชนิดควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ CO_2 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 และเพาะเลี้ยงขยายดังที่กล่าว สัปดาห์ละ 1 ครั้ง หรือเมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนประมาณ 80-90% ของพื้นที่ขวด

การเตรียมเซลล์สำหรับการทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาท

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับการทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์: เลี้ยงเซลล์ N1E-115 ใน 48 well plate (flat-shape) โดยความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 3×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร ภายใต้สภาวะ CO_2 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นแบบไม่มีซีรัม ซึ่งประกอบด้วย DMEM-high glucose (Sigma-Aldrich, USA, Cat. No. D1152) ที่มี sodium bicarbonate 3.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยาปฏิชีวนะ และ N_2 supplement ได้แก่ sodium selenite (Na_2SeO_3) 30 นาโนโมลาร์ human transferrin 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร bovine insulin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร progesterone 20 นาโนโมลาร์ และ putrescin 100 ไมโครโมลาร์ นำเซลล์เพาะเลี้ยงนี้ไปใช้ในการทดลองหลังจากอายุได้ 48 ชั่วโมง

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับการทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากกลูตาเมต: เลี้ยงเซลล์ N1E-115 ใน 48 well plate (flat-shape) ที่เคลือบด้วยสาร poly-D-lysine 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 4×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร ภายใต้สภาวะ CO_2 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 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 เพื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงเปลี่ยนสภาพ (differentiation) ได้ภายใต้สภาวะที่มีซีรัมต่ำ และมี DMSO^(31,32) เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีกจนครบ 96 ชั่วโมง จึงนำเซลล์ไปใช้ในการทดลองได้

การทดสอบในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

เจือจางสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 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 (3×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 48 ชั่วโมง มาเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครโมลาร์ ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละหลุมแล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมให้เติม PBS ในปริมาณเท่ากัน หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction

การทดสอบผลของสารสกัด OI-W และ OI-E ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงปกติ

ละลายสารสกัด OI-W ใน sterile distilled water และละลายสารสกัด OI-E ใน DMSO บริสุทธิ์ แล้วเจือจางด้วย sterile distilled water เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการ (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1%) นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 (3×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 48 ชั่วโมง มาเติม OI-W หรือ OI-E ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละหลุมแล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมให้เติม sterile distilled water ในปริมาณเท่ากันในการทดสอบผลของสารสกัด OI-W หรือเติม DMSO 2.5% ในปริมาณเท่ากัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1%) ในการทดสอบผลของสารสกัด OI-E หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction

การทดสอบผลของสารสกัด OI-W และ OI-E ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 (3×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 48 ชั่วโมง มาเติมสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมให้เติม sterile distilled water ในปริมาณเท่ากันในการทดสอบผลของสารสกัด OI-W หรือเติม DMSO 2.5% ในปริมาณเท่ากัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1%) ในการทดสอบผลของสารสกัด OI-E พร้อมกับเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 200 ไมโครโมลาร์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละหลุม และเติม PBS ในปริมาณเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อีกกลุ่มการทดสอบให้เติมสารสกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 200 ไมโครโมลาร์ และเติม PBS ในปริมาณเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction assay หากพบว่าสารสกัดสามารถปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะประเมินการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรวจวัดด้วยวิธี LDH release assay

การทดสอบในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากกลูตาเมต

การทดสอบความเป็นพิษของกลูตาเมตต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

ละลายกลูตาเมตและไกลซีนใน sterile PBS (DPBS ที่ปราศจาก $MgCl_2$) แล้วเจือจางด้วย PBS เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการ นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 (4×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 96 ชั่วโมง แต่ละหลุมมาเติมกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 1, 10, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ พร้อมกับเติมไกลซีนที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม PBS ในปริมาณเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction

การทดสอบผลของสารสกัด OI-W และ OI-E ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงปกติ

นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 (4×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 96 ชั่วโมง แต่ละหลุมมาเติมสารสกัด OI-W หรือ OI-E ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมให้เติม sterile distilled water ในปริมาณเท่ากันในการทดสอบผลของสารสกัด OI-W หรือเติม DMSO 2.5% ในปริมาณเท่ากัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1%) ในการทดสอบผลของสารสกัด OI-E หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction

การทดสอบผลของสารสกัด OI-W และ OI-E ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทที่เกิดจากกลูตาเมต

นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 (4×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 96 ชั่วโมง แต่ละหลุมมาเติมสารสกัด OI-W หรือ OI-E ที่ความเข้มข้น 1, 5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมให้เติม sterile distilled water ในปริมาณเท่ากันในการทดสอบผลของสารสกัด OI-W หรือเติม DMSO 2.5% ในปริมาณเท่ากัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1%) ในการทดสอบผลของสารสกัด OI-E พร้อมกับเติมกลูตาเมต 50 มิลลิโมลาร์ และไกลซีน 2 มิลลิโมลาร์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละหลุม และเติม PBS ในปริมาณเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อีกกลุ่มการทดสอบให้เติมสารสกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ก่อนเติมกลูตาเมตและไกลซีน และเติม PBS ในปริมาณเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction กรณีที่พบว่าสารสกัดสามารถปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของกลูตาเมตจะประเมินการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ โดยตรวจวัดด้วยวิธี LDH release assay

การประเมินคุณภาพ และการตรวจวัดความอยู่รอดและการตายของเซลล์

การประเมิน cell morphology

ตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphology) ของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope, Axiovert 200, Zeiss, Germany) โดยใช้เทคนิค Phase Contrast

การตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี MTT reduction assay

ตรวจวัด MTT reduction ซึ่งบ่งบอกความอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) ด้วยวิธี colorimetric โดยดัดแปลงจากวิธีของ Mosmann (1983)⁽³³⁾ ดังนี้ เติมสารละลาย MTT 10 ไมโครลิตร (5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน PBS) ลงในเซลล์ของแต่ละหลุม (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แล้วนำเซลล์เพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้บเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และเติม DMSO 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ดูดสารละลายของแต่ละหลุมใส่ใน 96 well plate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย

Multi-detection microplate reader (Synergy™ HT, Biotex, USA) ที่ความยาวคลื่น 570/620 นาโนเมตร ค่า MTT reduction แสดงในรูปของร้อยละเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมสารทดสอบ (untreated control) ซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่ได้รับสารหรือสมุนไพร $\times 100$) / ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

การตรวจวัดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยวิธี LDH release assay

ตรวจวัดปริมาณ LDH ที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ (LDH release) เป็นการประเมินการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งบ่งบอกการตายของเซลล์ (cell death) ด้วยวิธี colorimetric โดยใช้ *In vitro* Toxicology Assay Kit Lactate dehydrogenase based (Sigma, USA) เป็นการวัดปริมาณเอนไซม์ LDH ทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ ดังนี้ ดูด medium 100 ไมโครลิตร จากแต่ละหลุมใส่ใน 96 well plate เพื่อวัดปริมาณ LDH ภายนอกเซลล์ และดูด medium ที่เหลือทิ้ง แล้วเติม Triton X-100 (0.5%) 500 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ทิ้งไว้ 15 นาที หลังจากนั้นดูด aliquots 100 ไมโครลิตร จากแต่ละหลุมใส่ใน 96 well plate เพื่อวัดปริมาณ LDH ภายในเซลล์ ปฏิบัติการเริ่มโดยการเติม assay mixture (ประกอบด้วยสารตั้งต้น สารทำให้เกิดสีและเอนไซม์) 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม แล้วหุ้ม plate ด้วย aluminium foil และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม HCl (0.5N) 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Multi-detection microplate reader (Synergy™ HT, Biotex, USA) ที่ความยาวคลื่น 490/690 นาโนเมตร ค่า LDH release ของแต่ละหลุมแสดงในรูปของร้อยละซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของ LDH ภายนอกเซลล์ $\times 100$) / (ค่าการดูดกลืนแสงของ LDH ภายนอกเซลล์ + ค่าการดูดกลืนแสงของ LDH ภายในเซลล์) และนำค่า LDH release ในรูปของร้อยละเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (untreated control) ซึ่งคำนวณจาก LDH release ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร $\times 100$ / LDH release ของกลุ่มควบคุม

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทุกค่านำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error of the mean, SEM) โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 3 การทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน (N = 3) การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน ใช้ unpair t-test ค่า p ที่น้อยกว่า 0.05 หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

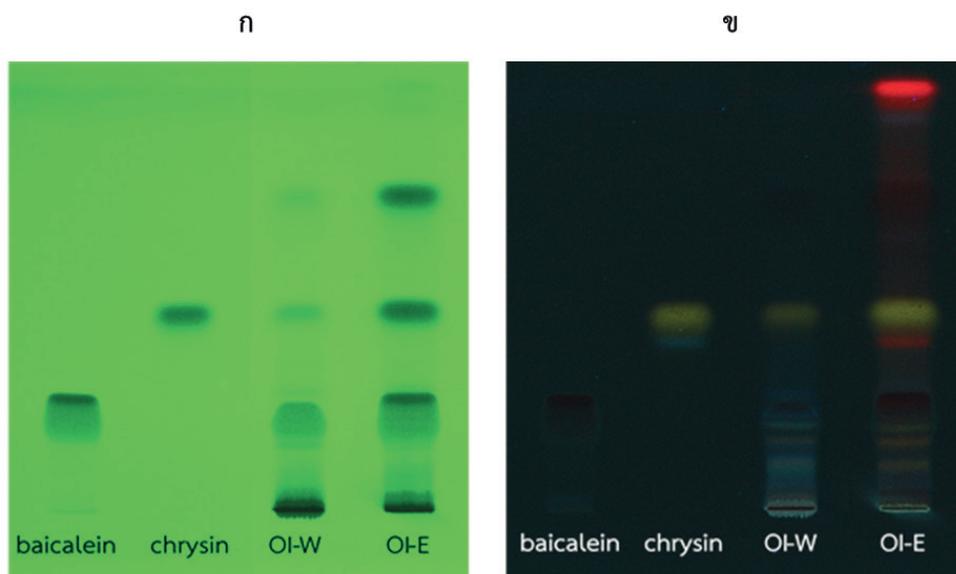
การวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

ข้อมูลทุกค่านำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error, SEM) โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลในแต่ละวิธีของการทดสอบมาจาก 6 การทดลอง (n = 6) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ โดยแต่ละการทดลองทำภายใต้เงื่อนไขเดียวกัน แล้วนำผลที่ได้จากการทดลองในแต่ละวันมารวมกัน จนครบ 6 การทดลอง ซึ่งผลการทดลองที่ได้ในแต่ละวันที่ทำการทดสอบไม่มีความแตกต่างกัน การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยมากกว่า 2 กลุ่ม ใช้ Analysis of variance (ANOVA) และการเปรียบเทียบข้อมูลที่แตกต่างกันกรณีความแปรปรวนของทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกันใช้ Scheffe multiple comparisons และกรณีความแปรปรวนของทั้ง 2 กลุ่มแตกต่างกันใช้ Tamhane's T2 multiple comparisons ค่า p ที่น้อยกว่า 0.05 หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผล

การควบคุมคุณภาพสารสกัด

ผลการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาโดยวิธี TLC พบแถบสีดำของสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา (OI-W) และสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา (OI-E) ตรงกับแถบของสารละลายมาตรฐาน baicalein และพบแถบสีเหลืองของสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา (OI-W) และสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา (OI-E) ตรงกับแถบของสารละลายมาตรฐาน chrysin ซึ่งจาก chromatogram พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา (OI-E) มีความเข้มของแถบมากกว่าสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา (OI-W) (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา มีปริมาณสาร baicalein และ chrysin มากกว่าสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา



ภาพที่ 2 ที่แอลซีโครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา (OI-W) และสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา (OI-E) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน baicalein และ chrysin

ก. ตรวจสอบภายใต้แสง UV ที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

ข. ฟันด้วยสารละลาย NP-PEG และตรวจสอบภายใต้แสง UV ที่มีความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัด OI-W และสารสกัด OI-E มีฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิลตามความเข้มข้น (concentration dependent manner) ที่ใช้ทดสอบ โดยสารสกัด OI-W มีค่า IC_{50} เท่ากับ 121.17 ± 5.07 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัด OI-E มีค่า IC_{50} เท่ากับ 61.72 ± 4.44 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารมาตรฐาน trolox มีค่า IC_{50} เท่ากับ 136.99 ± 5.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1 ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-E ต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้มากกว่าสารสกัด OI-W และสารสกัดทั้งสองชนิดต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้ดีกว่า trolox โดยสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วยเอทานอลมีความแรงในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (TEAC) เป็น 1.13 และ 2.23 เท่า เมื่อเทียบกับ trolox หรืออนุพันธ์วิตามินอีต่อกรัมของตัวอย่างสารสกัด

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์พบว่าสารสกัด OI-W และสารสกัด OI-E มีฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แบบ concentration dependent manner โดยสารสกัด OI-W มีค่า IC_{50} เท่ากับ 85.62 ± 3.30

ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัด OI-E มีค่า IC_{50} เท่ากับ 86.78 ± 9.45 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารมาตรฐาน gallic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.14 ± 0.79 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2 ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-W และสารสกัด OI-E สามารถต้านอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน แต่ต้านได้ปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับ gallic acid

ตารางที่ 1 ค่า IC_{50} ของ hydroxyl radical scavenging activity ของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

สารสกัด/สารมาตรฐาน	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	TEAC/Trolox equivalence
สารสกัดด้วยน้ำ (OI-W)	121.17 ± 5.07	1.13
สารสกัดด้วยเอทานอล (OI-E)	61.72 ± 4.44	2.23
Trolox	136.99 ± 5.25	

IC_{50} = ค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรหรือสารมาตรฐานที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 3 การทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน ($n = 3$) และแต่ละตัวอย่างทำ 2 ซ้ำ

TEAC = ค่าบอกความแรงของสารสกัดสมุนไพรในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นจำนวนเท่า เมื่อเทียบกับอนุพันธ์วิตามินอี (Trolox/ α -tocopherol equivalent antioxidant capacity) ต่อกรัมของตัวอย่างสารสกัด

ตารางที่ 2 ค่า IC_{50} ของ superoxide radical scavenging activity ของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

สารสกัด/สารมาตรฐาน	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
สารสกัดด้วยน้ำ (OI-W)	85.62 ± 3.30
สารสกัดด้วยเอทานอล (OI-E)	86.78 ± 9.45
Gallic acid	16.14 ± 0.79

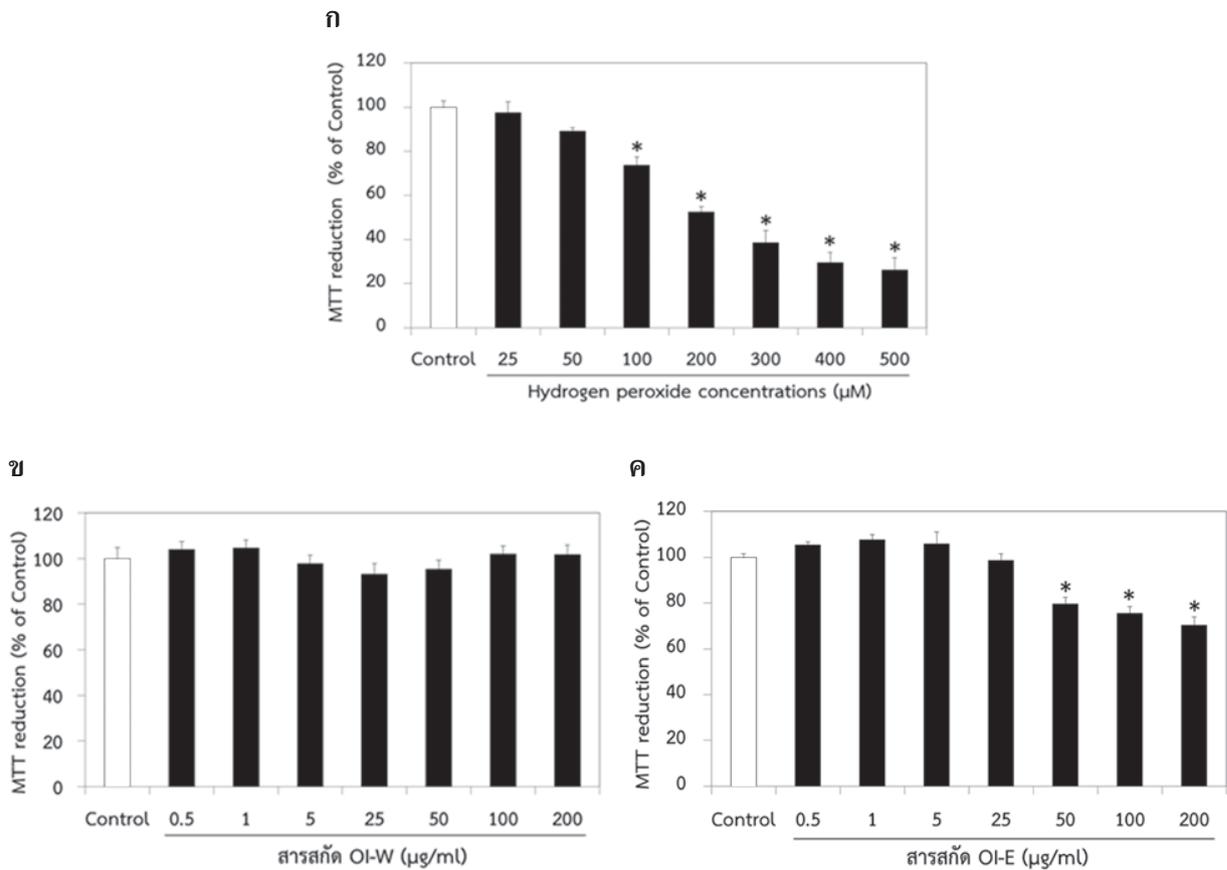
IC_{50} = ค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรหรือสารมาตรฐานที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจากการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน ($n = 3$) และแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ

การทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

การทดสอบผลของสารสกัด OI-W และ OI-E ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

จากการทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ประสาท N1E-115 พบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ concentration dependent manner โดย cell viability ของกลุ่มที่สัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นในช่วง 100-500 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 3 ก) และจากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ประสาทมีรูปร่างผิดปกติ โดยมีลักษณะบวม/หดตัว/ฝ่อเป็นซากเศษเซลล์ที่ตายแล้วอยู่ปะปนกับเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ และ

neurites มีความยาวสั้นลงและไม่มีความต่อเนื่อง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4) ความผิดปกตินี้เกิดขึ้นพร้อมกันกับการลดลงของ cell viability เนื่องจากเซลล์ประสาทสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เซลล์ตายประมาณร้อยละ 50 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง จึงเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการเหนี่ยวนำให้เกิดการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ประสาทในการทดลองต่อไป



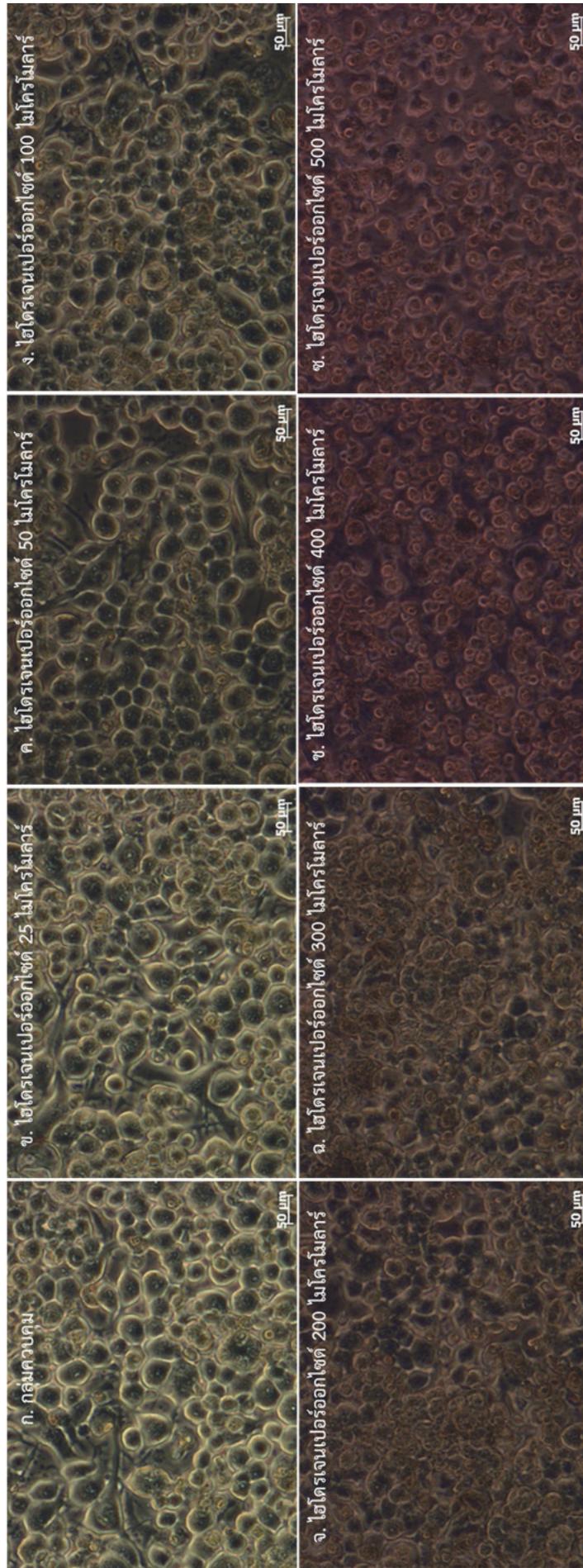
ภาพที่ 3 ผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา (OI-W) และสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา (OI-E) ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma, N1E-115

(ก) ผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ N1E-115 อายุ 48 ชั่วโมง สัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 25-500 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(ข) ผลของสารสกัด OI-W ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ N1E-115 อายุ 48 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 0.5-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(ค) ผลของสารสกัด OI-E ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ N1E-115 อายุ 48 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 0.5-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 การทดลอง (n = 6) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 4 ความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง N1E-115 อายุ 48 ชั่วโมง สัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 25-500 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับโดยใช้เทคนิค Phase Contrast (ก) กลุ่มควบคุม (ข) - (ซ) กลุ่มสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 25-500 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

เมื่อเซลล์ประสาท N1E-115 สัมผัสกับสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า MTT reduction ของเซลล์ประสาทเป็นร้อยละ 103.93, 104.53, 97.78, 93.19, 95.35, 102.21 และ 101.66 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (100%) (ภาพที่ 3 ข) เมื่อเซลล์ประสาทสัมผัสกับสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า MTT reduction ของเซลล์ประสาทเป็นร้อยละ 105.40, 107.74, 105.93, 98.76, 79.72, 75.60 และ 70.39 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (100%) (ภาพที่ 3 ค) แสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-W (0.5-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ไม่มีผลต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง ในขณะที่สารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีผลลด cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยลดลงร้อยละ 20.28, 24.40 และ 29.61 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 3 ข และภาพที่ 3 ค)

การทดสอบสารสกัด OI-W ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่า MTT reduction ของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังการสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นร้อยละ 46.40 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อให้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงสัมผัสกับสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่ม cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเพิ่มขึ้นร้อยละ 14.38, 25.20 30.27 และ 33.51 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว (ภาพที่ 5 ก)

จากการประเมินการตายของเซลล์ พบว่า LDH release ของเซลล์เพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นหลังการสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเพิ่มขึ้นร้อยละ 184.89 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลด LDH release อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยลดลงร้อยละ 95.51, 120.60, 144.42 และ 154.31 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว (ภาพที่ 5 ข) แสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 25-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถป้องกันการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเพิ่ม cell viability และลด plasma membrane damage ที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อย่างไรก็ตามเมื่อให้เซลล์ประสาท N1E-115 สัมผัสกับสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียวยังที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัด OI-W ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง MTT reduction เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้ก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่สามารถลดการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ (ภาพที่ 5 ค)

ขณะที่เมื่อทดสอบด้วยสารสกัด OI-E พบว่า MTT reduction ของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังการสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นร้อยละ 47.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อให้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงสัมผัสกับสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 0.05-25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่ม cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเพิ่มขึ้นร้อยละ 21.41 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว (ภาพที่ 6 ก)

จากการประเมินการตายของเซลล์ พบว่า LDH release ของเซลล์เพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นหลังการสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเพิ่มขึ้นร้อยละ 196.44% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลด LDH release อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยลดลงร้อยละ 124.49 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว (ภาพที่ 6 ข) แสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-E จากเปลือก

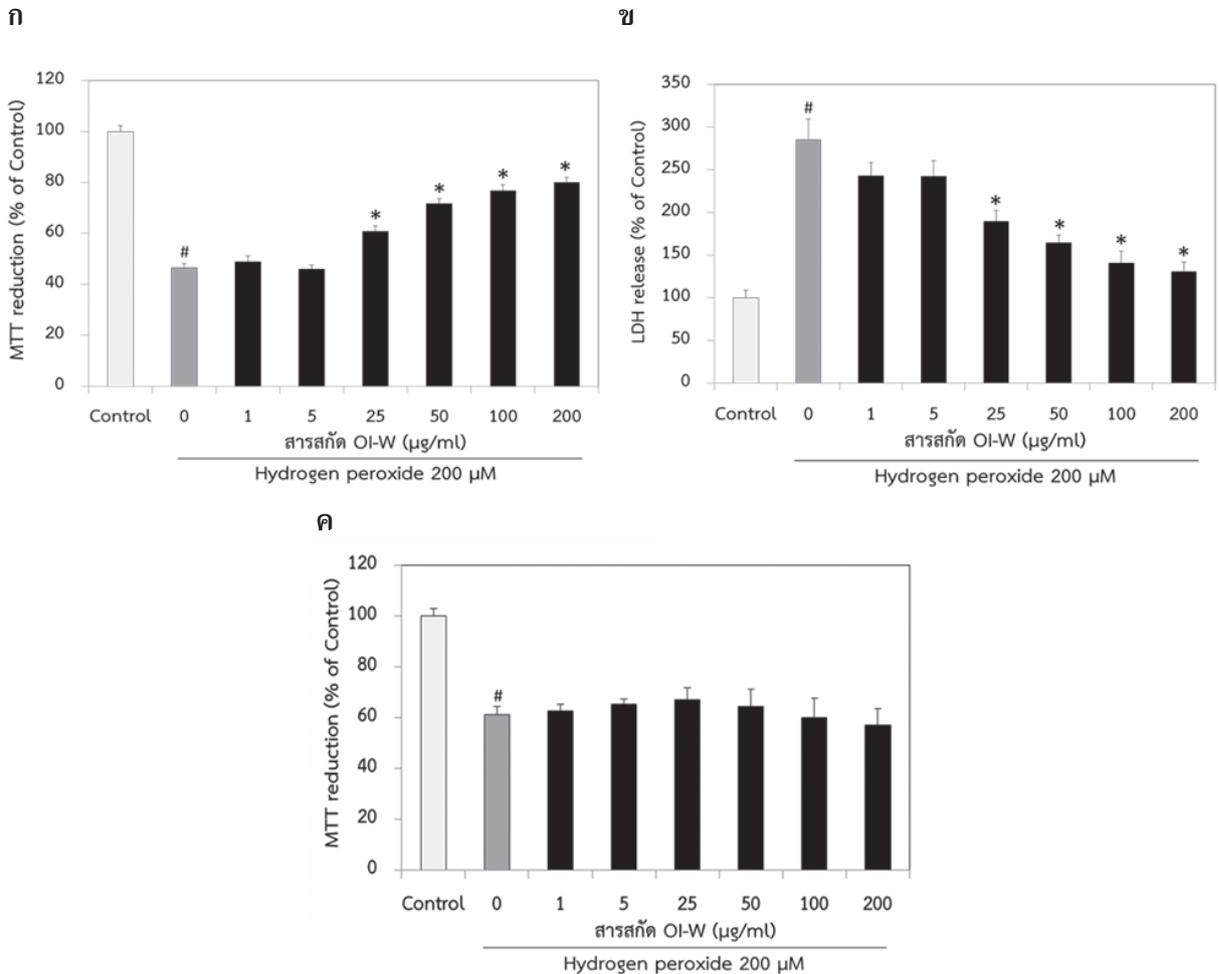
ต้นเพกา ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถป้องกันการบาดเจ็บหรือตายของเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยเพิ่ม cell viability และลด plasma membrane damage ที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อย่างไรก็ตามเมื่อให้เซลล์ประสาท N1E-115 สัมผัสกับสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 0.05-25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการให้สัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียวก่อนที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัด OI-E ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง MTT reduction เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 0.05-25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้ก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่สามารถลดการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ (ภาพที่ 6 ค)

การทดสอบผลของสารสกัด OI-W และ OI-E ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทที่เกิดจากกลูตาเมต

จากการทดสอบความเป็นพิษของกลูตาเมตต่อเซลล์ประสาท N1E-115 ที่ทำให้เปลี่ยนสภาพแล้วด้วย DMSO (differentiated N1E-115) พบว่ากลูตาเมตเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ concentration dependent manner โดย cell viability ของกลุ่มที่สัมผัสกับกลูตาเมตที่ความเข้มข้นในช่วง 25-100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 7 ก) และจากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าความหนาแน่นของเซลล์ประสาทลดลง เซลล์ประสาทมีรูปร่างผิดปกติ และ neurites มีความยาวสั้นลงและไม่มี ความต่อเนื่อง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 8) ความผิดปกตินี้เกิดขึ้นพร้อมกันกับการลดลงของ cell viability เนื่องจากเซลล์ประสาทสัมผัสกับกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เซลล์ตายประมาณร้อยละ 50 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง จึงเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการเหนี่ยวนำให้เกิดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงในการทดลองต่อไป

เมื่อให้เซลล์ประสาท differentiated N1E-115 สัมผัสกับสารสกัด OI-W หรือ OI-E ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า MTT reduction ของเซลล์ประสาทไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (100%) แสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-W และ OI-E ที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 7 ข และภาพที่ 7 ค)

เมื่อทำให้เซลล์ประสาท differentiated N1E-115 สัมผัสกับสารสกัด OI-W หรือ OI-E ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 9 ก และภาพที่ 9 ข) หรือสัมผัสกับสารสกัด OI-W หรือ OI-E ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการให้กลูตาเมตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วประเมิน cell viability ด้วยการวัด MTT reduction พบผลเช่นเดียวกัน คือ ทั้งสารสกัด OI-W และ OI-E ไม่มีผลต่อ MTT reduction เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 9 ค และภาพที่ 9 ง) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-W และ OI-E ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถลดการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากกลูตาเมตได้



ภาพที่ 5 ผลของสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา (OI-W) ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma, N1E-115 ที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

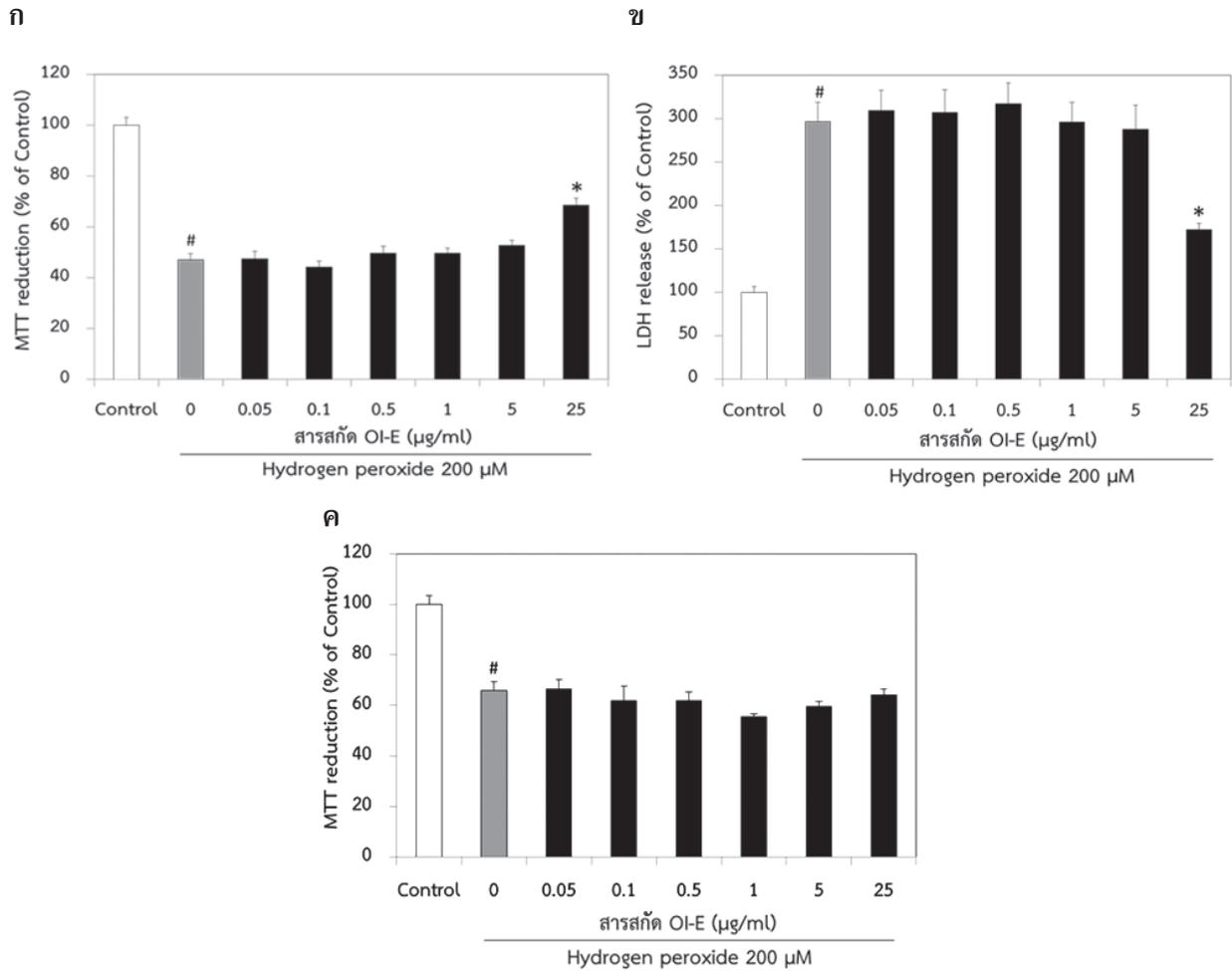
(ก) ผลการสัมผัสร่วมของสารสกัด OI-W พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง และ (ข) ผลการสัมผัสร่วมของสารสกัด OI-W พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อ cell death ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ N1E-115 อายุ 48 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay และ cell death ด้วยวิธี LDH release assay

(ค) ผลการสัมผัสสารสกัด OI-W ก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ N1E-115 อายุ 48 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ก่อนสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay

ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 การทดลอง (n = 6) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ

แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่สัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์



ภาพที่ 6 ผลของสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา (OI-E) ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma, N1E-115 ที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

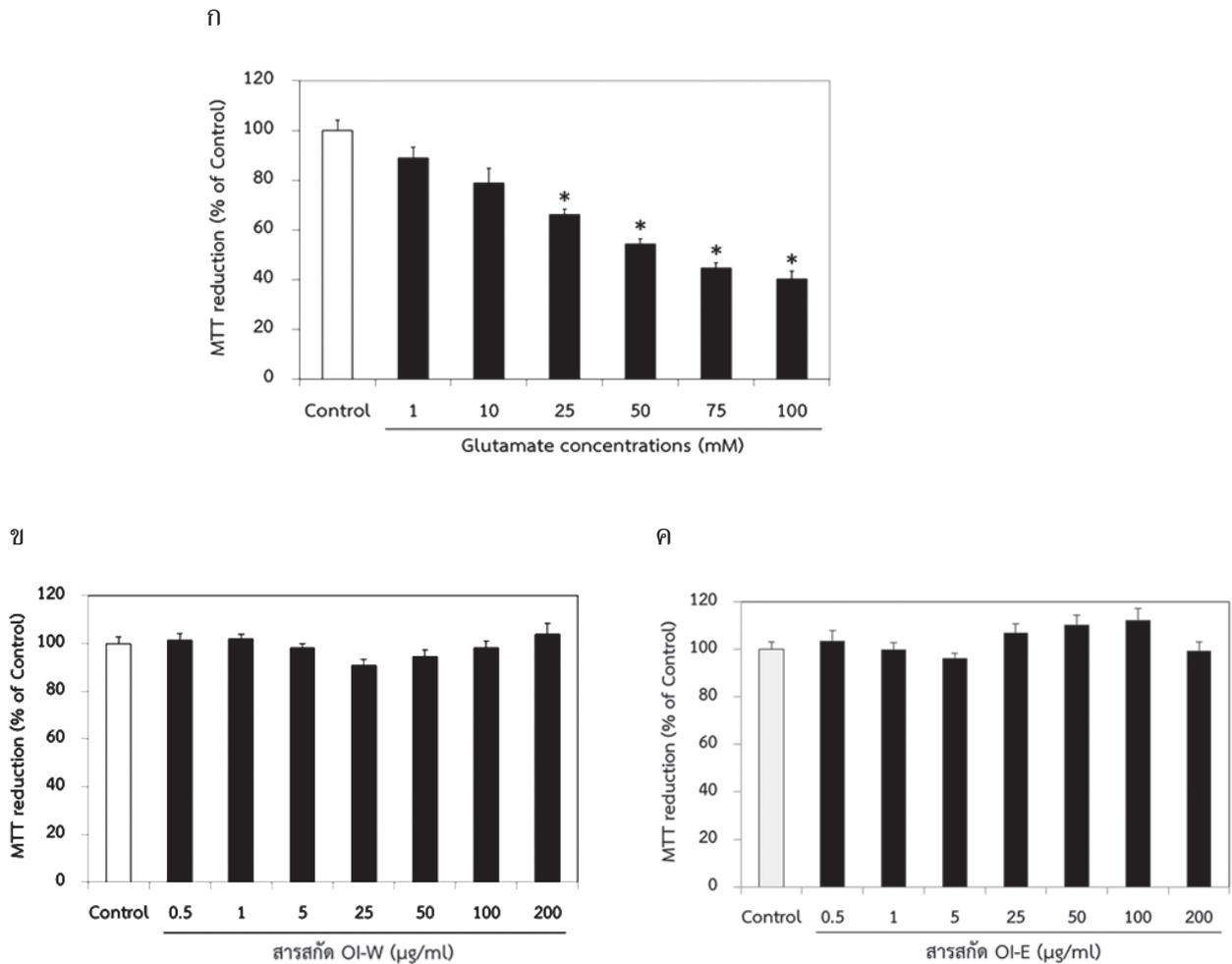
(ก) ผลการสัมผัสร่วมของสารสกัด OI-E พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง และ (ข) ผลการสัมผัสร่วมของสารสกัด OI-E พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อ cell death ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ N1E-115 อายุ 48 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 0.05-25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay และ cell death ด้วยวิธี LDH release assay

(ค) ผลการสัมผัสสารสกัด OI-E ก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ N1E-115 อายุ 48 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 0.05-25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ก่อนสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay

ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 การทดลอง (n = 6) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ

แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่สัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

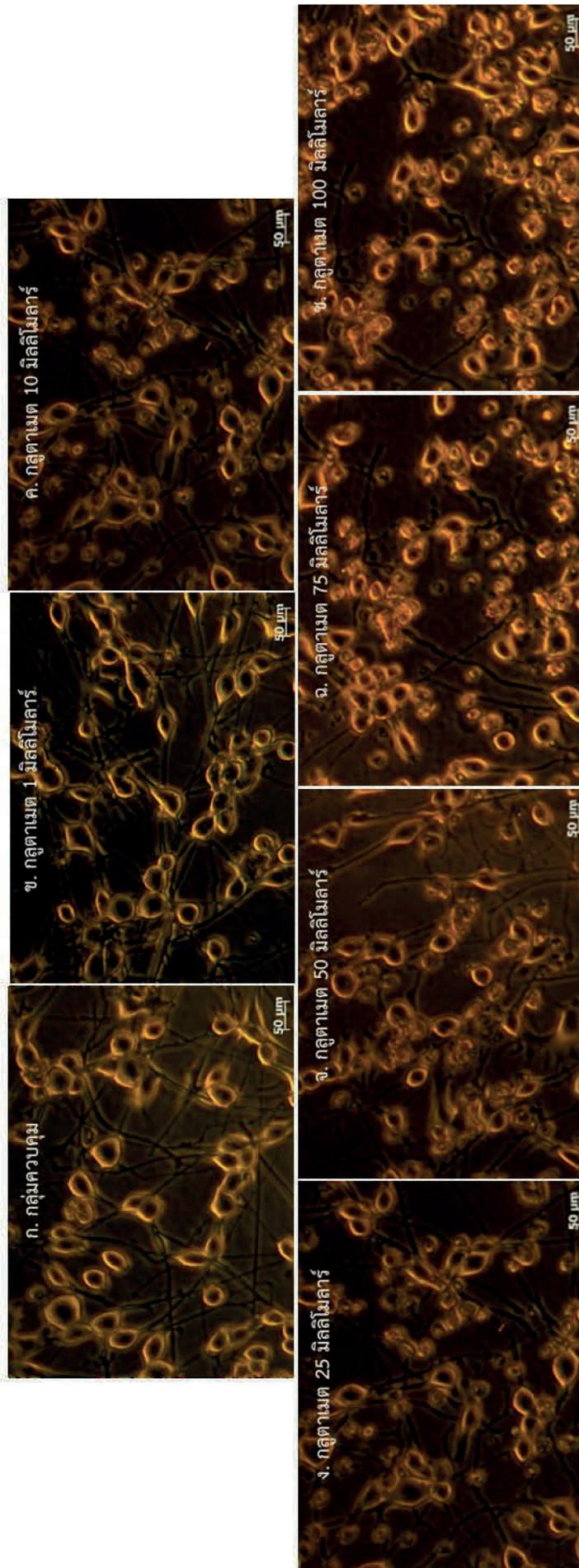


ภาพที่ 7 ผลของกลูตาเมต สารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา (OI-W) และสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา (OI-E) ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma, N1E-115

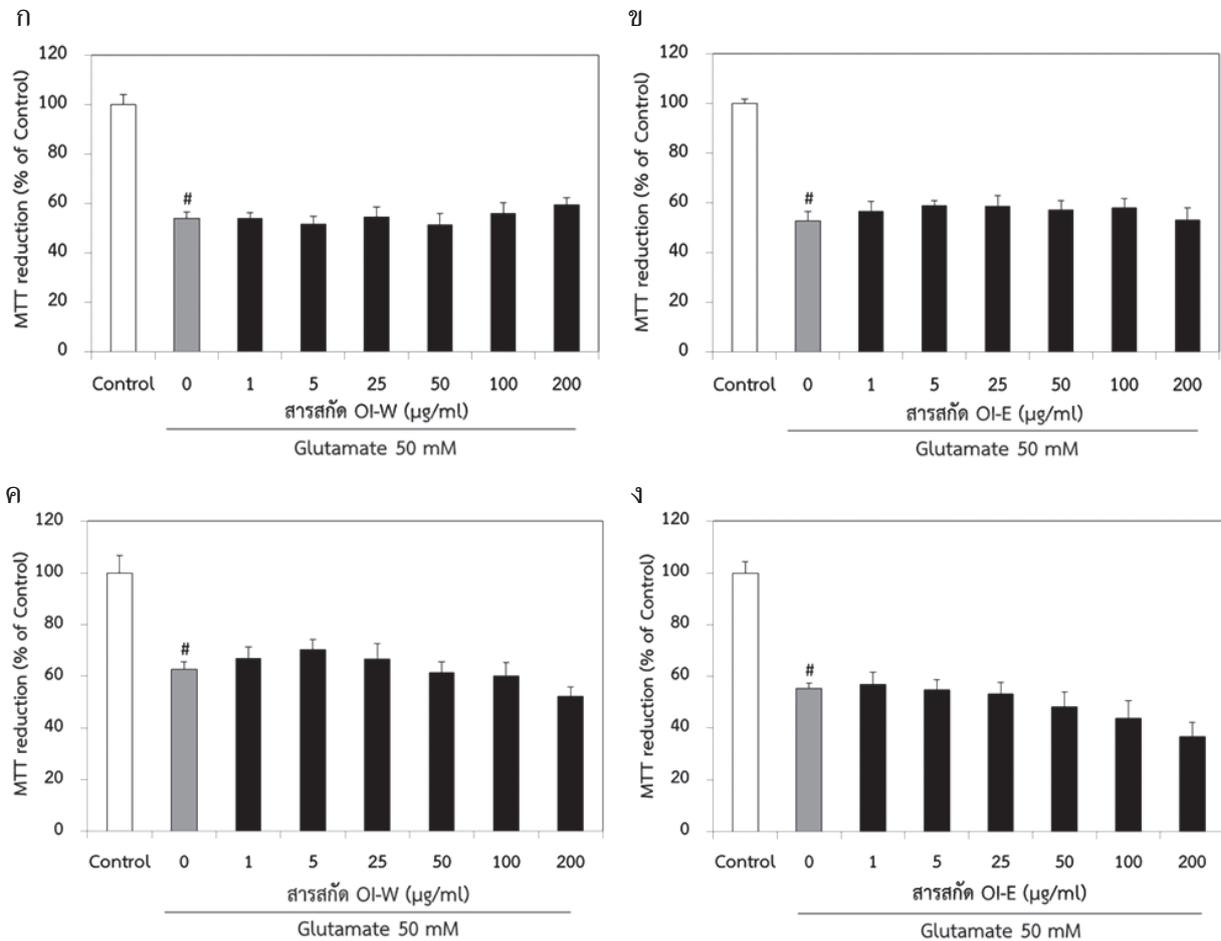
- (ก) ผลของกลูตาเมตต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ differentiated N1E-115 อายุ 96 ชั่วโมง สัมผัสกับกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 1-100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- (ข) ผลของสารสกัด OI-W ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ differentiated N1E-115 อายุ 96 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 0.5-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- (ค) ผลของสารสกัด OI-E ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ differentiated N1E-115 อายุ 96 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 0.5-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 การทดลอง (n = 6) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 8 ความเป็นพิษของกลูตามेटต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง differentiated N1E-115 อายุ 96 ชั่วโมง สัมผัสกับกลูตามेटที่ความเข้มข้น 1-100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับโดยใช้เทคนิค Phase Contrast (ก) กลุ่มควบคุม (ข) - (จ) กลุ่มสัมผัสกับกลูตามेट 1-100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ



ภาพที่ 9 ผลของสารสกัดด้วยน้ำ (OI-W) และสารสกัดด้วยเอทานอล (OI-E) จากเปลือกต้นเพกาต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma, N1E-115 ที่เกิดจากกลูตาเมต

(ก) ผลการสัมผัสร่วมของสารสกัด OI-W ร่วมกับกลูตาเมต (ข) ผลการสัมผัสสารสกัด OI-E ร่วมกับกลูตาเมตต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ differentiated N1E-115 อายุ 96 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-W หรือสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(ค) ผลการสัมผัสสารสกัด OI-W ก่อนกับกลูตาเมต (ง) ผลการสัมผัสสารสกัด OI-E ก่อนกับกลูตาเมตต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ differentiated N1E-115 อายุ 96 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-W หรือสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนสัมผัสกับกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay

ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 การทดลอง (n = 6) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ

แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

วิจารณ์

อนุมูลอิสระมีบทบาทในการทำลายเนื้อเยื่อและมีผลต่อความเสื่อมของเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิด neurodegenerative diseases และทั้งไฮดรอกซิลและซูเปอร์ออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญทางชีวภาพ และไวต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาโดยใช้แบบจำลองที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ trolox และ gallic acid

จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาสามารถต้านอนุมูลไฮดรอกซิลและซูเปอร์ออกไซด์ได้โดยสารสกัด OI-E ต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้แรงกว่าสารสกัด OI-W และสารสกัด OI-W และ OI-E ต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้ดีกว่า trolox ในขณะที่สารสกัดทั้งสองชนิดสามารถต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับ gallic acid การแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา สอดคล้องกับรายงานที่มีผู้วิจัยมาแล้ว^(26,28) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีอื่นที่ต่างกัน จากรายงานของ Singh และ Kakkar⁽²⁶⁾ พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่แรงในหนูที่เหนียวทำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin โดยศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-azinobis 3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate (ABTS) และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay และ Saha และคณะ⁽²⁸⁾ รายงานว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกเพกา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี โดยทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, FRAP assay, hydrogen peroxide scavenging activity และ thiobarbituric acid assay

ข้อมูลเบื้องต้นจากการควบคุมคุณภาพทางเคมีของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง (TLC) และใช้ baicalein และ chrysin เป็นสารเปรียบเทียบ (reference substances) นั้น พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีสาร baicalein, chrysin ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และเป็นสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอล ผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานวิจัยอื่นที่พบองค์ประกอบทางเคมีในเปลือกต้นเพกาเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น oroxylin A, baicalein, chrysin, scutellarein^(9,10) ดังนั้นการแสดงผลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา นี้ อาจเป็นผลเนื่องมาจากคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดดังกล่าว และสารสกัด OI-E ต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้แรงกว่าสารสกัด OI-W สอดคล้องกับผลการศึกษากลไกเชิงเคมีของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาโดยวิธี TLC ที่พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา มีปริมาณสาร baicalein และ chrysin มากกว่าสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา (ภาพที่ 2) หรืออาจมีสารอื่นในกลุ่มฟลาโวนอยด์หรือสารกลุ่มโพลีฟีนอลตัวอื่นเป็นส่วนประกอบด้วยจึงเสริมฤทธิ์กัน ทำให้สารสกัดด้วยเอทานอลแสดงต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า และมีหลักฐานสนับสนุนว่าสาร antioxidants อาจจะช่วยป้องกันการเกิดพยาธิสภาพจากการเสื่อมของเซลล์ประสาทอันเป็นผลมาจากภาวะ oxidative stress ได้⁽⁴⁾ ดังนั้นการที่สารสกัดจากเปลือกต้นเพกาแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้น กลไกการออกฤทธิ์อย่างน้อยส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในเปลือกต้นเพกาทำให้สามารถลดการเกิดพยาธิสภาพจากการเสื่อมของเซลล์ประสาท ทำให้ลดการตายของเซลล์ประสาทได้ หากมีการหาปริมาณของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์หรือโพลีฟีนอลในสารสกัดเพการ่วมด้วยจะทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความแรงในการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดสมุนไพร

จากการสัมผัสร่วมระหว่างสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาพร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นผลให้เกิดการปกป้องการตายของเซลล์ประสาทเฉพาะเลี้ยงที่เกิดจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเพิ่ม cell viability และลด LDH release ในขณะที่การสัมผัสกับสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา ก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่มีผลต่อการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทเฉพาะเลี้ยงที่เกิดจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ อาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ปกป้องเซลล์

ประสาทของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาเกิดจากการออกฤทธิ์โดยตรงในการดักจับอนุมูลไฮดรอกซิลที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงลดความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เมื่อให้พร้อมกัน ทำให้ลดการตายของเซลล์ประสาท เป็นการแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทด้วยการไปยับยั้ง/ลดความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่ไม่มีผลต่อเซลล์ประสาทในแง่ของการป้องกันการเกิดพิษเมื่อให้สารสกัดจากเปลือกต้นเพกาเข้าสู่เซลล์ก่อนแล้วจึงเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงภายหลัง ดังแสดงในภาพที่ 5 ค และภาพที่ 6 ค

การสัมผัสของเซลล์ประสาท differentiated N1E-115 กับสารสกัด OI-W หรือสารสกัด OI-E พร้อมกับหรือก่อนการสัมผัสกับกลูตาเมต ไม่มีผลต่อการบาดเจ็บหรือการตายที่เกิดจากพิษของกลูตาเมต แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาไม่มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress ที่เป็นผลมาจากพิษของกลูตาเมต แม้จะเป็นที่ทราบว่าการบาดเจ็บของเซลล์ประสาทโดยเกี่ยวข้องกับ oxidative stress ในทำนองเดียวกับที่เกิดในสภาวะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก็ตาม แต่กลไกการเกิดพิษของกลูตาเมตต่อเซลล์ประสาทมีความแตกต่างจากการเกิดพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยพิษของกลูตาเมตเกิดจากการกระตุ้นตัวรับกลูตาเมตมากเกินไปโดยเฉพาะ N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาทจากการกระตุ้น glutamate (glutamate excitotoxicity) ทั้งในแบบ *in vitro* และ *in vivo*⁽³⁴⁾ เป็นผลให้แคลเซียมไหลเข้าเซลล์จำนวนมาก (calcium overload) เกิดการเสียสมดุลของแคลเซียม มีการสร้างและสะสมสารที่มีความสามารถในการ oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกาย (ROS) ในปริมาณมากนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ของไมโทคอนเดรีย เกิด mitochondrial dysfunction และ mitochondrial damage ตามมา ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาทและกระตุ้นวิธีการตายของเซลล์⁽³⁵⁾ การที่สารสกัดจากเปลือกต้นเพกาไม่สามารถปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของกลูตาเมตได้เนื่องจากกลูตาเมตทำให้เซลล์ตายโดยมีกลไกอื่นนอกเหนือจากการชักนำให้เกิด oxidative stress ร่วมอยู่ด้วย ทำให้ฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดเพกาไม่เพียงพอที่จะลดการตายของเซลล์ประสาทจากพิษของกลูตาเมตได้ อย่างไรก็ตามข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการศึกษานี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสมุนไพรวัดจากในรูปของสารสกัดหยาบเท่านั้น หากมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยเตรียมสารสกัดเพกาให้บริสุทธิ์ขึ้นเป็นสารสกัดเพกาแยกส่วน (subfraction extract) และศึกษาผลสารสกัดเพกาแยกส่วนต่อ markers ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการออกฤทธิ์ เช่น การวัดปริมาณ glutathione, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, lipid peroxidation, ROS เป็นต้น จะทำให้ทราบถึงสารสำคัญที่เป็นตัวออกฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดเพกาที่ชัดเจนขึ้น

จากผลการศึกษานี้อาจกล่าวได้ว่าเป็นรายงานครั้งแรกของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาในการปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เมื่อให้พร้อมกัน โดยกลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทอาจเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา ซึ่งการต้านอนุมูลไฮดรอกซิลเป็นแนวทางหนึ่งที่ป้องกันไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตาย และสารสกัดนี้อาจมีศักยภาพในการปกป้องเซลล์ประสาทจากโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ประสาทได้ อย่างไรก็ตามควรศึกษากลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาเพิ่มเติมในเซลล์ที่เฉพาะเจาะจงต่อพยาธิสภาพหรือทดสอบในสัตว์ทดลองก่อนนำไปพัฒนาเป็นยาสมุนไพรรักษาต่อไป

สรุป

สารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกาสามารถดักจับอนุมูลไฮดรอกซิลและซูเปอร์ออกไซด์ได้ โดยต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้ดีกว่าอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ การสัมผัสร่วมระหว่างสารสกัดด้วยน้ำหรือสารสกัดด้วยเอทานอลและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาที่มีฤทธิ์ปกป้องการตายของเซลล์ประสาท N1E-115 สารสกัดจากเปลือกต้นเพกาจึงอาจมีศักยภาพในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทหรือบรรเทาการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress ที่เกิดจากไฮโดรเจน

เปอร์ออกไซด์ ผลการศึกษานี้ยังเป็นประโยชน์สำหรับนำไปใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยและพัฒนาพืชสมุนไพร เพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์สำหรับยับยั้งหรือบรรเทาโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการ เกล็ดชเวท สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ภาพสมุนไพรเพกา

เอกสารอ้างอิง

1. Mao X, Gu C, Chen D, Yu B, He J. Oxidative stress-induced diseases and tea polyphenols. *Oncotarget* 2017; 8(46): 81649-61.
2. Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Exp Neurobiol* 2015; 24(4): 325-40.
3. Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, et al. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* 2016; 53(6): 4094-125.
4. Chang KH, Cheng ML, Chiang MC, Chen CM. Lipophilic antioxidants in neurodegenerative diseases. *Clin Chim Acta* 2018; 485: 79-87.
5. Gardner S, Sidisunthorn P, Chayamarit K. Forest trees of Southern Thailand volume 1: acanthaceae to escalloniaceae. Bangkok, Thailand: Kobfai Publishing Project; 2015. p. 242-247.
6. Santisuk T. Bignoniaceae. In: Smitinand T, Larsen K, editors. Flora of Thailand volume 5, part 1. Bangkok, Thailand: Forest Herbarium, Department of National Parks; 1987. p. 32-37.
7. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. เพกา. [ออนไลน์]. [สืบค้น 19 พ.ย. 2562]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้จาก URL: <http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=94>.
8. ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2562. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 136 ตอนพิเศษ 95 ง (วันที่ 17 เมษายน 2562). หน้า 8.
9. Sankara S, Nair AGR. Flavonoids of the stem bark of *Oroxylum indicum*. *Curr Sci* 1972; 41: 62-3.
10. Majumdar S, Mohanta BC, Chowdhury DR, Banik R, Dinda B, Basak A. Proprotein convertase inhibitory activities of flavonoids isolated from *Oroxylum indicum*. *Curr Med Chem* 2010; 17(19): 2049-58.
11. Lalrinzuali K, Vabeiryureilai M, Jagetia GC. Investigation of the anti-inflammatory and analgesic activities of ethanol extract of stem bark of Sonapatha *Oroxylum indicum in vivo*. *Int J Inflamm* 2016; 2016: 8247014. (8 pages).
12. Siritwatanametanon N, Fiebich BL, Efferth T, Prieto JM, Heinrich M. Traditional used Thai medicinal plants: *in vitro* anti-inflammatory, anticancer and antioxidant activities. *J Ethnopharmacol* 2010; 130(2): 196-207.
13. Ali RM, Houghton PJ, Raman A, Hoult JRS. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of extracts and constituents of *Oroxylum indicum* (L.) Vent. *Phytomedicine* 1998; 5(5): 375-81.

14. Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JRS, Itharat A. An evaluation of the activity related to inflammation of four plants used in Thailand to treat arthritis. *J Ethnopharmacol* 2003; 85(2-3): 207-15.
15. Asaduzzaman M, Nasrin N, Muhit A, Raihan SZ, Apu AS, Akbar A. Antidiarrheal, analgesic and cytotoxic activities of crude extract of *Oroxylum indicum* (L.) stem bark. *J Pharm Res* 2011; 4(11): 4296-8.
16. Tripathy BN, Panda SK, Sahoo S, Mishra SK, Nayak L. Phytochemical analysis and hepatoprotective effect of stem bark of *Oroxylum indicum* (L.) Vent. on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rat. *Int J Pharm Biol Arch* 2011; 2(6): 1714-7.
17. Bharali MK, Konya H, Chetry LB. Protective effect of *Oroxylum indicum* on acetaminophen induced liver injury in rat. *Int Curr Pharm J* 2014; 3(2): 223-7.
18. Radhika LG, Meena CV, Peter S, Rajesh KS, Rosamma MP. Phytochemical and antimicrobial study of *Oroxylum indicum*. *Anc Sci Life* 2011; 30(4): 114-20.
19. Das S, Choudhury MD. Antimicrobial activity of stem bark extracts from the plant *Oroxylum indicum* Vent. *Assam Univ J Sci Technol* 2010; 5(1): 95-9.
20. Chusri S, Sinvaraphan N, Chaipak P, Luxsananuwong A, Voravuthikunchai SP. Evaluation of antibacterial activity, phytochemical constituents and cytotoxicity effects of Thai household ancient remedies. *J Altern Complement Med* 2014; 20(12): 909-18.
21. Sireeratawong S, Khonsung P, Nanna U, Vannasiri S, Lertprasertsuke N, Singhalak T, et al. Anti-diarrheal activity and toxicity of Learng Pid Samud recipe. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2012; 9(4): 519-29.
22. Chetry LB, Bharali MK. Antiproliferative effect of aqueous bark extract of *Oroxylum indicum* (L.) on *Vignaradiata* L (Green gram) seedlings. *J Phytomedicine* 2018; 7(2): 175-9.
23. Kumar DRN, George VC, Suresh PK, Kumar RA. Cytotoxicity, apoptosis induction and anti-metastatic potential of *Oroxylum indicum* in human breast cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(6): 2729-34.
24. Shetgiri PP, Dargi KK, D'Mello PM. Evaluation of antioxidant and antihyperlipidemic activity of extracts rich in polyphenols. *Int J Phytomed* 2010; 2(3): 267-76.
25. Mangal P, Khare P, Jagtap S, Bishnoi M, Kondepudi KK, Bhutani KK. Screening of six Ayurvedic medicinal plants for anti-obesity potential: an investigation on bioactive constituents from *Oroxylum indicum* (L.) Kurz bark. *J Ethnopharmacol* 2017; 197: 138-46.
26. Singh J, Kakkar P. Modulation of liver function, antioxidant responses, insulin resistance and glucose transport by *Oroxylum indicum* stem bark in STZ induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2013; 62: 722-31.
27. Lalrinzuali K, Vabeiryureilai M, Jagetia GC. Topical application of stem bark ethanol extract of Sonapatha, *Oroxylum indicum* (L.) Kurz accelerates healing of deep dermal excision wound in Swiss albino mice. *J Ethnopharmacol* 2018; 227: 290-9.

28. Saha P, Choudhury PR, Das S, Talukdar AD, Choudhury MD. *In vitro* antioxidant activity of bark extracts of *Oroxylum indicum* (L.) vent. *Asian J Pharm Clin Res* 2017; 10(8): 263-6.
29. Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple "test tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987; 165(1): 215-9.
30. Nishikimi M, Rao NA, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 46(2): 849-54.
31. Amano T, Richelson E, Nirenberg M. Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. *Proc Nat Acad Sci USA* 1972; 69(1): 258-63.
32. Kimhi Y, Palfrey C, Spector I, Barak Y, Littauer UZ. Maturation of neuroblastoma cells in the presence of dimethylsulfoxide. *Proc Nat Acad Sci USA* 1976; 73(2): 462-6.
33. 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.
34. Lewerenz J, Maher P. Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases--what is the evidence? *Front Neurosci* 2015; 9: 469. (20 pages).
35. Prentice H, Modi JP, Wu JY. Mechanisms of neuronal protection against excitotoxicity, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial dysfunction in stroke and neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 964518. (7 pages).

Antioxidative and Neuroprotective Activities of *Oroxylum indicum* Stem Bark Extracts in Mouse Neuroblastoma Cells

Sadudee Rattanajarasroj Warunee Jirawattanapong Nattaporn Polsan

Nithida Phonkot Yuwadee Mettametha Sakwichai Ontong and Pratom Tongsrirak

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

ABSTRACT Oxidative stress is a major risk factor for neurodegenerative diseases. It has been reported that antioxidants could relieve symptoms of neurodegenerative diseases. Pa-ka (*Oroxylum indicum* (L.) Kurz) stem bark contains polyphenols with antioxidant activities and may be used to alleviate oxidative stress-induced neurodegenerative process. This study aimed to investigate the antioxidative and neuroprotective activities of water extract (OI-W) and ethanol extract (OI-E) from Pa-ka stem bark on hydrogen peroxide and glutamate-induced neurotoxicity in N1E-115 cell cultures. For free radical scavenging capacity using hydroxyl and superoxide scavenging assay, OI-W and OI-E exhibited antioxidant activity. It was found that co-exposure of cultured neurons to hydrogen peroxide with OI-W or OI-E extract for 24 hours could protect against cell injury or cell death from hydrogen peroxide in N1E-115 cultures, while both extracts did not prevent glutamate-induced neurotoxicity. These findings indicated that *O. indicum* stem bark showed the neuroprotective effect on hydrogen peroxide-induced neurotoxicity, at least, its mechanism might partly involve the antioxidant activity. Further studies in *in vitro* models with specific pathology as well as in animals are required to clarify its activity and underlying mechanisms prior to develop as herbal medicine for the treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords: *Oroxylum indicum*, antioxidative activity, neuroprotective activity