นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของเลือดจระเข้ต่อการงอกใยประสาทของเซลล์ PC12 และการสร้างโปรตีน MEK–1

พิมลวรรณ อัคคภิญญา*, สุวรพร แซ่ลิ้ม**, วนัสยา สุอังคะวาทิน**, วิน เชยชมศรี***, อรุณพร อิฐรัตน์*

บทคัดย่อ

บทนำ: เลือดจระเข้เป็นสมุนไพรจากสัตว์ใช้เป็นยาเดี่ยวหรือเป็นตัวยาในตำรับยาเพื่อบำรุงร่างกาย หรือรักษาโรคเรื้อรัง ในเลือดจระเข้มีสารสำคัญได้แก่ insulin-like growth factor -1 (IGF-1) สารนี้มีผลปกป้องเซลล์ประสาทจากการตายในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยงไม่สมบูรณ์ นอกจากการปกป้องเซลล์ประสาทแล้ว การงอกใยประสาทเพิ่มขึ้นเป็นอีกกลไกหนึ่งในการวิจัยยาบำรุงประสาทและช่วยเพิ่มความจำ แต่ยังไม่ปรากฏรายงานวิจัยเกี่ยวกับผลของเลือดจระเข้ต่อการงอกใยประสาท ซึ่งสามารถตรวจนับเซลล์ที่งอกใยประสาทและวัดปริมาณโปรตีน mitogen-activated protein kinase (MAPK หรือ MEK-1) ที่เซลล์สร้างขึ้นในกระบวนการเปลี่ยนรูปร่างเซลล์และการงอกใยประสาท ดังนั้นวัตถุประสงค์การศึกษานี้ เพื่อดูผลของซีรัมจากเลือดจระเข้ต่อการงอกใยประสาทในเซลล์เพาะเลี้ยง PC12 และหาปริมาณโปรตีน MEK-1

วิธีการศึกษา: ใช้ซีรัมจากเลือดจระเข้ ๑๐ ตัว เพศผู้ ๕ ตัว เพศเมีย ๕ ตัว ทำแห้งด้วยวิธี freeze drying เพาะเลี้ยงเซลล์ PC12 ศึกษาความเป็นพิษจากซีรัมเลือดจระเข้ และขนาดซีรัมที่มีผลต่อการงอกใยประสาทโดยนับจำนวนเซลล์ที่มีใยประสาทงอกเป็นร้อยละของเซลล์ที่นับทั้งหมด และวัดปริมาณโปรตีน MEK-1 โดยวิธี enzyme immunoassay

ผลการศึกษา: ซีรัมแห้งเลือดจระเข้ขนาดความเข้มข้นที่มีผลให้เซลล์ตายร้อยละ ๕๐ (IC_{50}) เป็น ๒๕.๒๖ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซีรัมแห้งขนาดความเข้มข้น ๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เสริมด้วย NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร มีผลเพิ่มปริมาณเซลล์มากขึ้น และทำให้เซลล์งอกใยประสาทได้ร้อยละ ๙.๐๔ ± ๓.๔๒ ซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ให้ nerve growth factor (NGF) ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร แต่น้อยกว่ากลุ่มที่ให้ NGF ๕๐ นาโนกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมีการงอกใยประสาทร้อยละ ๓.๐๕ ± ๑.๓๒ และ ๑๔.๘๑ ± ๓.๗๙ ตามลำดับ ($p < 0.05$) กลุ่มทดลองที่เซลล์งอกใยประสาทและกลุ่มที่ให้ NGF ๕๐ นาโนกรัม/มิลลิลิตร มีการสร้างโปรตีน MEK-1 เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมเป็นร้อยละ ๒๐๔.๘๓ ± ๒๘.๙๑ และ ๒๕๓.๒๖ ± ๓๔.๒ ($p < 0.05$) ตามลำดับ ส่วนซีรัมเลือดจระเข้ขนาด ๒ และ ๐.๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เสริมด้วย NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการงอกใยประสาท

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา: การใช้ซีรัมเลือดจระเข้เข้มข้นสัมผัสเซลล์โดยตรงมีผลให้เซลล์ PC12 ตายโดยมีค่า IC_{50} เป็น ๒๕.๒๖ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แต่เมื่อเจือจางซีรัมในขนาดความเข้มข้น ๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีผลให้เซลล์แบ่งตัวได้เพิ่มขึ้นและงอกใยประสาทได้ ซึ่งน่าจะเป็นผลจากสาร IGF-1 ในซีรัมร่วมกับสารสำคัญชนิดอื่น ดังนั้นในการใช้ซีรัมเลือดจระเข้เป็นยาบำรุงต้องใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานจึงควรใช้ขนาดต่ำ และควรศึกษาเพิ่มเติมเรื่องความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังหรือติดตามผลการใช้ในคนปรกติตามขั้นตอนการวิจัยขั้นคลินิก

คำสำคัญ: ซีรัมเลือดจระเข้, การงอกของใยประสาท, การสร้าง MEK-1

วันที่รับบทความ: ๑๗ มิถุนายน ๒๕๕๖ **วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์:** ๑๑ กันยายน ๒๕๕๖

* ศูนย์การแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
** หน่วยวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ๔๕ หมู่ ๘ ถนนพหลโยธิน คลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ๑๒๑๒๐
*** ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ๕๐ ถนนพหลโยธิน จตุจักร กรุงเทพมหานคร ๑๐๙๐๐

บทนำ

ในปี พ.ศ. ๒๕๕๕ ประเทศไทยมีอัตราการเพิ่มประชากรผู้สูงอายุร้อยละ ๑๒.๖ ซึ่งมากที่สุดในประเทศอาเซียน และในปี พ.ศ. ๒๕๖๔ จะมีประชากรผู้สูงอายุที่อายุมากกว่า ๖๕ ปีมากกว่าร้อยละ ๑๐[๑] อุบัติการณ์ของภาวะโรคสมองเสื่อมจะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มของประชากรผู้สูงอายุ การดูแลตนเองและผู้สูงอายุให้มีสุขภาพกายดีหรือการดูแลผู้ป่วยโรคเรื้อรังด้วยยาบำรุงหรืออาหารเสริมที่มีสรรพคุณบำรุงร่างกายและระบบประสาทความจำจึงเป็นการดูแลสุขภาพในเบื้องต้น การวิจัยค้นคว้ายาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อรักษาภาวะหรือชะลอการเกิดโรคสมองเสื่อมจึงมีความสำคัญไม่เพียงแต่เพื่อรักษาผู้ป่วยเท่านั้น แต่เป็นการส่งเสริมให้คนปรกติสามารถคงสภาวะปรกติหรือชะลอการเกิดโรคหรือเพิ่มความจำได้

เป็นที่ทราบกันว่า กลไกการรักษาโรคสมองเสื่อมที่สำคัญคือ ปกป้องเซลล์ประสาทจากการถูกทำลายด้วย amyloid plaque[๒] ส่วนกลไกอื่นที่มีการวิจัย ได้แก่ การฤทธิ์ต้านแคลเซียม (Ca^{2+}- blocking), ต้าน cholinesterase และ NMDA[๓] ต้านอนุมูลอิสระ[๔] ลด mitochondria membrane potential (MMP)[๕] และเพิ่มการงอกของใยประสาท

ปัจจัยที่มีผลเพิ่มการงอกใยประสาทที่มีการวิจัยได้แก่ สาร nitric oxide[๖, ๗] การกระตุ้นผ่าน protein kinase C และ extracellular signal-related kinase (ERK)[๘] สาร nerve growth factor (NGF) และ สาร insulin-like growth factor-1 (IGF-1) ซึ่งนอกจากมีผลให้เซลล์ประสาทงอกแล้วยังเพิ่ม cells differentiation และเพิ่มอายุเซลล์หรือ cell viability ด้วย[๕] การวิจัยเกี่ยวกับการงอกใยประสาทสามารถวัดผลจากความยาวของใยประสาทที่งอกโดยตรง[๙๐] นับจำนวนเซลล์ที่มีการงอกเพิ่มขึ้น นับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต วัด cell proliferation วัดความหนาแน่นของใยประสาท[๙๑] วัดปริมาณสารโปรตีน เช่น protein kinase โดยมีรายงานวิจัยพบว่า การเติม NGF ขนาด ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร มีผลให้เซลล์เพาะเลี้ยง PC12 เปลี่ยนรูปร่าง งอกใยประสาท ซึ่งปรากฏให้เห็นได้ใน ๔๘ ชั่วโมง ทั้งนี้มีกลไกเกี่ยวข้องกับโปรตีน mitogen-activated protein kinase (MAPK หรือ MEK-1)[๙๒] ทั้งวิถีทางตรงและทางอ้อม[๙๓] วิถีสัญญาณ MARK (MAPK signaling pathway) มีความเกี่ยวข้องกับความยืดหยุ่น (plasticity) ของเซลล์ เช่น การเปลี่ยนรูปร่างเซลล์ การแบ่งเซลล์ และการตายแบบ apoptosis[๑๔, ๑๕, ๑๖] การกระตุ้นวิถี MAPK/ERK (extracellular signal regulated kinase) และ Akt หรือ PKB (protein kinase B) มีผลปกป้องเซลล์ประสาทได้ อีกทั้งพบว่า ในผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมชนิดอัลไซเมอร์มี ERK และ TrkA (tyrosine kinase A) มากกว่าคนปรกติ[๙๗] มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับผลของสาร IGF-1 ต่อการงอกใยประสาทพบว่า เซลล์ PC12 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดซีรัมมีผลให้เซลล์ตายร้อยละ ๒๐ – ๒๗ ในเวลา ๒๔ – ๔๘ ชั่วโมง แต่เมื่อให้สาร IGF-1 ขนาด ๐.๕ – ๒.๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ด้วยจะมีผลยับยั้งการตายได้[๕]

ดังกล่าวแล้วว่า สาร NGF มีบทบาทสำคัญต่อการมีชีวิตและการเจริญของเซลล์ประสาท[๙๘] แต่สาร NGF นี้ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรคระบบประสาทและสมองได้เนื่องจากมีค่าครึ่งชีวิตสั้นและไม่สามารถผ่าน blood brain barrier ได้ จึงมีความจำเป็นต้องหาสารอื่นๆ ที่มีผลดังกล่าวเพื่อพัฒนาเป็นยาต่อไป

ตามกรรมวิธีทางการแพทย์แผนไทย เลือดจระเข้จัดเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งจากสัตว์ที่นำมาใช้เป็นยาเดี่ยวหรือเป็นตัวยาในตำรับยา มีสรรพคุณเกี่ยวกับการเพิ่มภูมิต้านทานและบำรุงร่างกาย ตำรับยาที่มีรายงานการใช้รักษา เช่น ตำรับยามะเร็ง ตำรับยาบำรุงร่างกาย[๙๙] ส่วนสรรพคุณทางวิทยาศาสตร์ยังไม่มีงานวิจัยเป็นที่เด่นชัด จากการแยกส่วนประกอบจากเลือดจระเข้พบว่า มีสาร IGF-1 อยู่ในส่วนพลาสมาของเลือดจระเข้เพศเมียในช่วงอายุที่ไม่มีการผสมพันธุ์[๒๐, ๒๑] สำหรับจระเข้พันธุ์ไทยพบว่า ในซีรัมสดของจระเข้อายุ ๒ – ๕ ปี มีปริมาณ IGF-1 ในเพศผู้ เท่ากับ ๖๔.๕๑ ± ๕.๔๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร และเพศเมียเท่ากับ ๗๐.๙๒ ± ๔.๑๘ นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในซีรัมแห้ง (freeze-dried serum) มีปริมาณสาร IGF-1 ในเพศผู้มี ๖๑.๘๐ นาโนกรัม/มิลลิลิตร และในเพศเมียเป็น ๗๖.๓๐ นาโนกรัม/มิลลิลิตร[๒๒] ดังได้กล่าวแล้วว่า สาร IGF-1 นี้มีผลโดยตรงต่อการงอกของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของซีรัมจากเลือดจระเข้ต่อการงอกใยประสาท ซึ่งตรวจวัดโดยการนับจำนวนเซลล์ที่มีการงอกใยประสาทยาวขึ้นและตรวจวัดปริมาณโปรตีน MEK-1

วิธีการศึกษา

เซลล์และสารเคมี

Cell line PC12 cells สั่งซื้อจาก American type culture collection (USA) นำเข้าโดยบริษัท ANH Scientific marketing จำกัด 96-well-plate และ 24-well-plate ใช้ชนิดเคลือบผิวด้วยสาร collagen (poly D- lysine หรือ collagen type I) ซื้อจากบริษัท ANH Scientific marketing จำกัด อาหารเลี้ยงเซลล์สั่งซื้อจากบริษัทกิบไทย จำกัดประกอบด้วย Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (high glucose formula),

heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), heat-inactivated horse serum (HS) และ 1% penicillin-streptomycin สารอื่นๆ ได้แก่ MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, DMSO, tocopherol, bovine serum albumin (BSA), phosphate-buffered saline (PBS), nerve growth factor (NGF) ของ Sigma Aldrich สั่งซื้อจากบริษัท SM Chemical จำกัด ชุดตรวจวัดโปรตีน MEK-1 ของ Enzo life sciences สั่งซื้อจากบริษัท SM Chemical จำกัด

การดำเนินการ

๑. การเตรียมซีรัมจากเลือดจระเข้ ใช้จระเข้ *(Crocodylus siamensis)* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง อายุ ๒ – ๕ ปี จำนวน ๑๐ ตัว (เพศผู้ ๕ ตัว เพศเมีย ๕ ตัว) วิธีเก็บตัวอย่างเลือดทำโดยวิธีปลอดเชื้อ ใช้เข็มเบอร์ ๑๘ ความยาว ๑.๕ นิ้ว เจาะเลือดที่บริเวณแอ่งเลือดดำหลังกะโหลก (anterior dorsal sinus) เก็บในหลอด activated clot tube ปล่อยให้เลือดแข็งตัว แล้วปั่นแยกซีรัมเก็บใส่ลงในหลอดๆ ละ ๑ มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -๘๐ องศาเซลเซียส จากนั้นระเหิดแห้งด้วยวิธีแบบเยือกแข็ง (freeze drying) โดยใช้เครื่อง freeze dryer (Lyomaster, USA) ซีรัมสด ๑ มิลลิลิตร ทำซีรัมแห้งได้น้ำหนักเฉลี่ยเป็น ๘๐ มิลลิกรัม

๒. การเพาะเลี้ยงเซลล์ PC12 ตามวิธีการของ Kim[๑๐] และ Liu[๑๒] ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ PC12 ในถาดหลุมที่เคลือบผิวด้วยสาร collagen ใช้อาหารเพาะเลี้ยง proliferative media (DMEM + 5% FBS + 10% HS + 1% penicillin-streptomycin) บ่มที่ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๔๘ ชั่วโมงจนเซลล์เจริญได้ร้อยละ ๗๐

๒.๑ ศึกษาความเป็นพิษของซีรัมแห้งเลือดจระเข้ต่อเซลล์ PC12 หาขนาดสารที่เหมาะสมที่ใช้ทดลองโดย MTT assay[๒๓] มีหลักการคือ สาร MTT หรือ tetrazolium salt ถูกเปลี่ยนเป็นสาร formozan โดยปฏิกิริยาเอนไซม์ succinate dehydrogenase ในกระบวนการหายใจที่เกิดขึ้นในไมโตคอนเดรียของเซลล์มีชีวิต ซึ่งสามารถตรวจวัดสาร formozan ได้ด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการโดยย่อคือหลังจากบ่มสารละลาย MTT ความเข้มข้น ๐.๕ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นาน ๒ ชั่วโมง กับเซลล์เพาะเลี้ยง จะเกิดผลึกสีน้ำเงินเข้มของ formozan ภายในเซลล์ซึ่งละลายออกมาได้ด้วย DMSO จากนั้นนำไปตรวจวัดปริมาณสารสีโดยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ๕๗๐ นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ยี่ห้อ Biotek รุ่น PowerWave XS ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ PC12 จำนวน ๕ x ๑๐^{๕} เซลล์/หลุม ในถาด ๙๖ หลุม นาน ๔๘ ชั่วโมง ใส่ซีรัมแห้งจากเลือดจระเข้ ในความเข้มข้นสุดท้าย ๔๐, ๒๐, ๔, ๒, ๐.๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในอาหาร (ซีรัมแห้ง ๘๐ มิลลิกรัม ในกรณีไม่เจือจางเมื่อใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น ๔๐ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) บ่มเซลล์ต่อ ๔๘ ชั่วโมง และวัดผลเซลล์มีชีวิตโดยวิธี MTT assay คำนวณหาขนาดสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพื่อใช้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

๒.๒ ศึกษาผลต่อการงอกใยประสาท เพาะเลี้ยงเซลล์ PC12 ใน proliferative media จำนวน ๘ x ๑๐^{๕} เซลล์/หลุม ในถาด ๒๔ หลุม นาน ๔๘ ชั่วโมง ถ่ายภาพเซลล์รูปกระสวย จากนั้นเปลี่ยนอาหารเป็น differentiated media (DMEM + 1% FBS + 5% HS + 1% penicillin-streptomycin) ที่มี NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร และใส่ซีรัมจระเข้แต่ละตัวๆ ละ ๒ หลุม/ถาด ขนาดความเข้มข้นสุดท้ายของซีรัมเป็น ๔๐, ๔, ๐.๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบผลค่าเฉลี่ยของจระเข้ ๑๐ ตัว กับกลุ่มควบคุมที่ใส่ differentiated media เสริมด้วย NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร และกลุ่ม positive control คือ differentiated media เสริมด้วย NGF ๕๐ นาโนกรัม/มิลลิลิตร บ่มเพาะเลี้ยงต่อ ๔๘ ชั่วโมงแล้วจึงวัดผลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ inverted microscope ยี่ห้อ NIKON รุ่น ECLIPSE TS 100-F ทำการบันทึกภาพด้วยโปรแกรม Nikon ACT -1C for DXM 1200 C จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่มีใยประสาทงอกยาวกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ (neurite-bearing cell) ต่อจำนวนเซลล์นับทั้งหมด ๑๐๐ เซลล์ ในพื้นที่สุ่ม ๓ แห่ง/หลุม ๓ หลุม/ถาด ๓ ถาด/การทดลอง แสดงผลเป็นร้อยละของ neurite- bearing cell ต่อจำนวนเซลล์นับ ๑๐๐ เซลล์[๖, ๒๔] ซีรัมแห้งจากจระเข้แต่ละตัวทำการทดลอง ๓ ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ยเป็นผลของซีรัมจระเข้แต่ละตัว

๒.๓ ศึกษากลไกการออกฤทธิ์โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน MEK-1 หลังจากนับเซลล์ที่งอกใยประสาทแล้ว ทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์เพื่อตรวจหาปริมาณโปรตีน MEK-1 ด้วยวิธี enzyme immunoassay วิธีการโดยย่อคือ scraped cells โดยใช้เอนไซม์ trypsin 0.25% ปั่นล้าง scraped cells ด้วย media โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 800 rpm นาน ๕ นาที เทส่วนใสทิ้ง ปั่นล้างอีกครั้งด้วย PBS นับปริมาณเซลล์ แล้วใส่ fresh lysis buffer ในปริมาณเซลล์ที่กำหนดตาม MEK-1 EIA kit คือใช้ lysis buffer ๑๒๕ มิลลิลิตร สำหรับ ๑๐^{๖}- ๑๐^{๗} เซลล์/มิลลิลิตร นำไป sonicate บนน้ำแข็ง จากนั้นปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 xg อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส นาน ๓๐ นาที เก็บส่วน supernatant ที่ –๘๐ องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการตรวจหา total MEK-1 ตามวิธีการหา MEK-1 EIA kit catalog no. ADI-900-122A

การคำนวณผลสถิติ ทดลองจระเข้ ๑๐ ตัว (N = ๑๐) ทำการทดลอง ๓ independent experiment คำนวณสถิติด้วยวิธี Analysis of variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย Posthoc test วิธี Duncan test ที่นัยสำคัญ $p < ๐.๐๕$ นำเสนอเป็นค่า means ± SD.

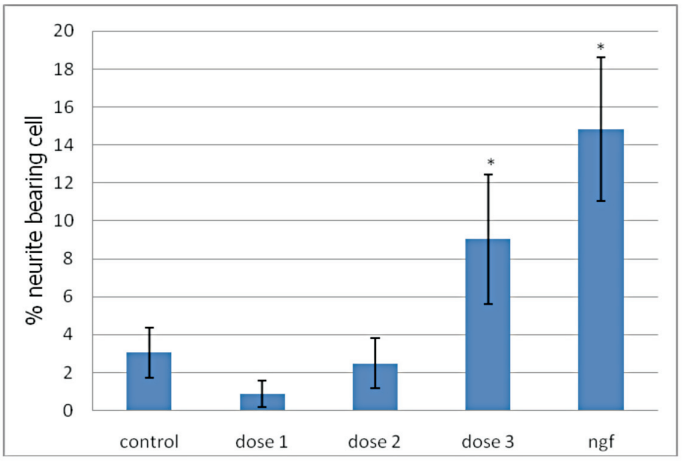
ผลการศึกษา

๑. ศึกษาผลความเป็นพิษต่อเซลล์ PC12

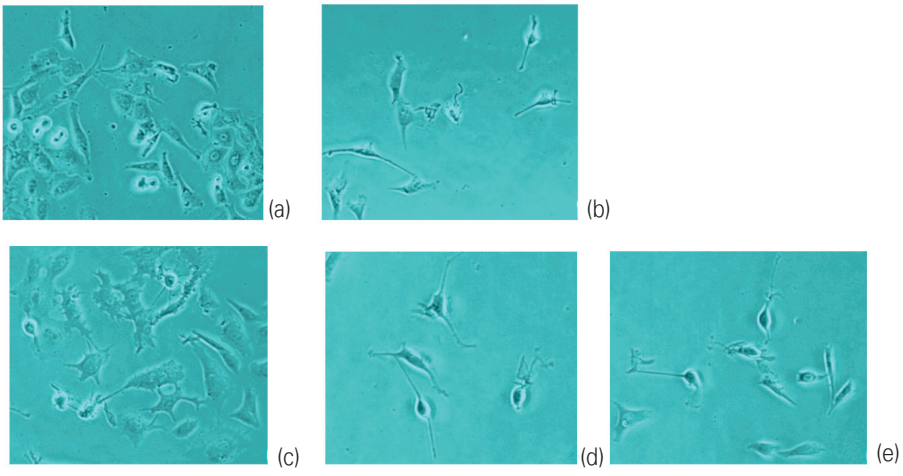
ซีรัมแห้งจากเลือดจระเข้ที่ความเข้มข้น ๑๐๐% (ไม่เจือจาง) หรือความเข้มข้นสุดท้าย ๔๐ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีผลให้เซลล์ PC12 ตายโดยมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตร้อยละ ๓๔.๖ ของกลุ่มควบคุม เมื่อเจือจางซีรัมแห้งตามสัดส่วน เป็นร้อยละ ๐.๑, ๑, ๑๐ หรือเทียบเป็นความเข้มข้นสุดท้ายได้ ๐.๐๔, ๐.๔, ๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีผลให้เซลล์ตาย แต่มีการแบ่งเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น โดยมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตคิดเป็นร้อยละของกลุ่มควบคุมเป็น ๑๔๖.๗, ๑๔๙.๗, ๑๒๖.๑ ตามลำดับ มีความแตกต่างจากกลุ่มความเข้มข้นสูงสุดที่นัยสำคัญ $p < ๐.๐๕$ คำนวณด้วยโปรแกรมปริซึมได้ค่าความเข้มข้นซีรัมแห้งที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ ๕๐ (IC_{50}) เป็น ๒๕.๒๖ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

๒. ศึกษาผลการงอกของเซลล์ประสาท

ซีรัมเลือดจระเข้ มีผลให้เซลล์ PC12 งอกใยประสาทได้ตามตารางที่ ๑, รูปที่ ๑ และ ๒



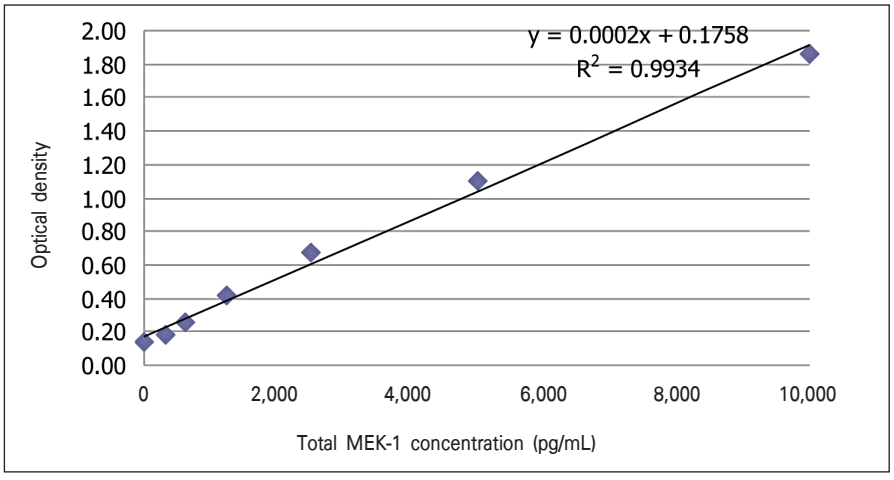
รูปที่ ๑ แสดงผลร้อยละจำนวนเซลล์ PC12 ที่งอกใยประสาท เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารทดลองต่างกันกราฟแท่ง ๑ (control) = กลุ่มควบคุม differentiated media + NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร ; กราฟแท่ง ๒ (dose 1), ๓ (dose 2) และ ๔ (dose 3) = ซีรัมเลือดจระเข้ขนาดความเข้มข้น ๐.๔, ๒ และ ๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ + differentiated media + NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร; กราฟแท่ง ๕ (ngf) = differentiated media + NGF ๕๐ นาโนกรัม/มิลลิลิตร * = $p < ๐.๐๕$



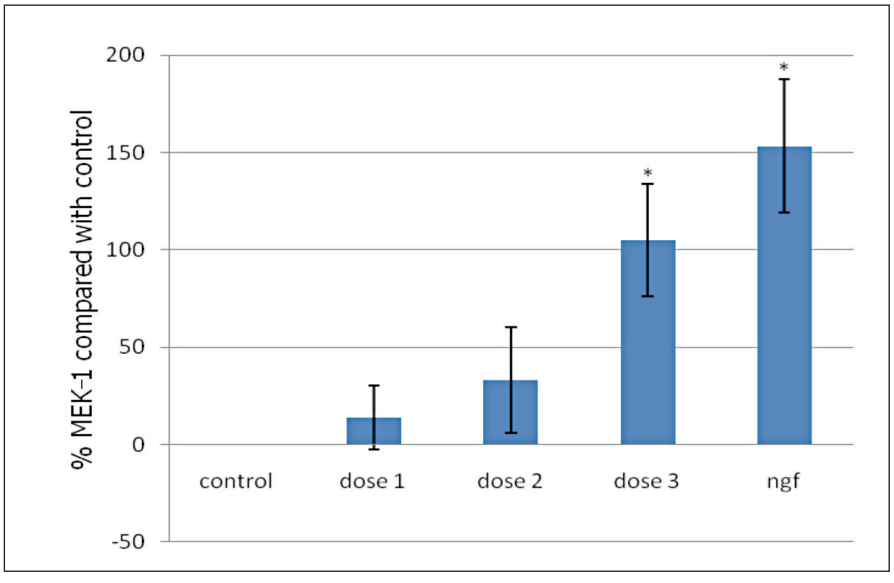
รูปที่ ๒ แสดงการงอกใยประสาทของเซลล์ PC12 เลี้ยงใน differentiative media ใส่ (a) NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร; (b) NGF ๕๐ นาโนกรัม/มิลลิลิตร; (c) ซีรัม ๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร, (a, b, c) เพาะเลี้ยงนาน ๒ วัน; (d) ใส่ NGF ๕๐ นาโนกรัม/มิลลิลิตร; (e) ซีรัม ๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร, (d, e) เพาะเลี้ยงนาน ๔ วัน

๓. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์การกระตุ้น neurite growth ด้วยการสร้างโปรตีน MEK-1

ซีรัมเลือดจระเข้มีผลให้เซลล์ PC12 สร้างโปรตีน MEK-1 ตามตารางที่ ๑ และรูปที่ ๓ – ๔



รูปที่ ๓ แสดง Standard curve ของการวิเคราะห์ โปรตีน MEK-1 ด้วยวิธี immunoassay



รูปที่ ๔ แสดงผลปริมาณโปรตีน MEK-1 เป็นร้อยละเทียบกับกลุ่มควบคุม เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารทดลองต่างกัน กราฟแท่ง ๑ (control) = กลุ่มควบคุมใช้ DMEM + NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร; กราฟแท่ง ๒ (dose 1), ๓ (dose 2) และ ๔ (dose 3) = ใช้ซีรัมเลือดจระเข้ขนาดความเข้มข้น ๐.๔, ๒ และ ๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ + differentiated media + NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร; กราฟแท่ง ๕ (ngf) = ใช้ differentiated media + NGF ๕๐ นาโนกรัม/มิลลิลิตร * = $p < ๐.๐๕$

ตารางที่ ๑ จำนวนเซลล์ PC12 ที่งอกใยประสาท/จำนวนนับ ๑๐๐ เซลล์ และร้อยละโปรตีน MEK-1 เทียบกับกลุ่มควบคุม เพาะเลี้ยงเซลล์ใน differentiated media นาน ๒ วัน

กลุ่มทดลอง	จำนวนเซลล์ที่งอกใยประสาท/๑๐๐ เซลล์	ร้อยละ MEK-1 เทียบกับกลุ่มควบคุม
ซีรัมจระเข้ ๐.๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร	๐.๘๘ ± ๐.๖๘	๑๑๓.๘ ± ๑๖.๓๑
ซีรัมจระเข้ ๒ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร	๒.๔๙ ± ๑.๓๓	๑๓๓.๗๙ ± ๒๗.๐๘
ซีรัมจระเข้ ๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร	๙.๐๔ ± ๓.๔๒*	๒๐๔.๘๓ ± ๒๘.๙๑*
NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร (กลุ่มควบคุม)	๓.๐๕ ± ๑.๓๒	๑๐๐
NGF ๕๐ นาโนกรัม/มิลลิลิตร	๑๔.๘๑ ± ๓.๗๙*	๒๕๓.๒๖ ± ๓๔.๒*

แตกต่างจากกลุ่มควบคุม NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร ที่นัยสำคัญสถิติ $p < 0.05$ *

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

ซีรัมแห้งเลือดจระเข้ ขนาดความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ ๕๐ (IC_{50}) เป็น ๒๕.๒๖ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนความเข้มข้น ๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง PC12 แต่มีผลให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่ม มีผลต่อการงอกใยประสาทเพิ่มขึ้นต่างจากกลุ่มควบคุม ในการทดลองนี้ใช้ซีรัมสดจากเลือดจระเข้ ๑ มิลลิลิตร ทำแห้งได้หนักเฉลี่ย ๘๐ มิลลิกรัม และจากซีรัมแห้งจระเข้เพศผู้และเมียมีสาร IGF-1 โดยเฉลี่ย ๗๐ นาโนกรัม/มิลลิลิตร[๒๒] ดังนั้น ซีรัมแห้งความเข้มข้น ๔, ๐.๔ และ ๐.๐๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จึงมีสาร IGF-1 เทียบเท่ากับ ๓.๕, ๑.๗๕ และ ๐.๓๕ นาโนกรัม/มิลลิลิตร จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า สาร IGF-1 ขนาด ๐.๕ - ๒ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีผลต่อการรอดชีวิตเซลล์เพาะเลี้ยง PC12 ในอาหาร differentiated media ได้[๙] จึงอธิบายได้ว่าซีรัมแห้งเลือดจระเข้ขนาด ๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีผลให้เซลล์งอกใยประสาทได้เพราะมีสาร IGF-1 ในปริมาณหนึ่งและอาจมีสารอื่นที่ออกฤทธิ์เสริมได้เช่นกัน อนึ่งทั้งสาร NGF และ IGF-1 ออกฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์จาก programmed cell dead โดยกลไกจับที่ receptor เดียวกัน และถูกยับยั้งด้วย inhibitor เดียวกัน[๒๔] ดังนั้นในกลุ่มการทดลองที่ได้รับ NGF ๕๐ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จึงได้ผลต่างจากกลุ่มควบคุมเช่นกัน เกี่ยวกับความสำคัญของ IGF-1 ได้มีการศึกษาปริมาณของ IGF-1 ในคนทั้งในเพศหญิงและชายพบว่า ปริมาณ IGF-1 จะค่อยๆ ลดลงเมื่ออายุเพิ่มมาก[๒๕] ดังนั้น ซีรัมเลือดจระเข้จึงช่วยเพิ่มปริมาณ IGF-1 และมีผลบำรุงเซลล์ประสาทด้วย

ผลของซีรัมแห้งจากเลือดจระเข้ต่อการสร้างโปรตีน MEK-1 พบว่า ที่ความเข้มข้น ๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีผลให้เซลล์ PC12 สร้าง MEK-1 เพิ่มขึ้นต่างจากกลุ่มควบคุม แต่ไม่มากเท่ากับกลุ่มที่เสริมด้วย NGF ๕๐ นาโนกรัม/มิลลิลิตร ($p < 0.05$) สาร MEK-1 นี้สื่อถึงกระบวนการมีชีวิตของเซลล์ในการเปลี่ยนรูปร่างและการแบ่งเซลล์ เมื่อกระตุ้นเซลล์ PC12 ด้วยสาร NGF จะมีการสร้างโปรตีน MAPK ขึ้นอย่างรวดเร็วในเวลา ๕ นาที และมีผลอยู่นาน[๑๔] ในการทดลองนี้ วัดผลการงอกใยประสาทและตรวจวิเคราะห์โปรตีน MEK-1 ในวันที่ ๒ หลังจากให้สารทดลองแล้ว ทั้งนี้เพราะได้มีงานวิจัยว่า การเติม NGF มีผลให้เซลล์เปลี่ยนรูปร่างเห็นได้ใน ๔๘ ชั่วโมง[๑๒] และภายหลังจาก ๔๘ ชั่วโมงเซลล์ในบางกลุ่มทดลองจะตายทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์โปรตีน MEK-1 ได้ครบทุกการทดลอง อีกทั้งในการทดลองได้เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงจาก complete media เป็น differentiated media เพื่อให้เซลล์งอกใยประสาท ในอาหารมีส่วนประกอบที่ต่างกันโดยลดปริมาณ fetal bovine serum 5% เป็น 1% และ horse serum 10% เป็น 5% ซึ่งไม่เพียงพอกับการอยู่รอดของเซลล์ได้เกิน ๒ วัน[๑๑] แต่อย่างไรก็ตามได้ทดลองติดตามผลต่ออีก ๔ วันในกลุ่มที่ให้ NGF ๕๐ นาโนกรัม/มิลลิลิตร และกลุ่มซีรัมจระเข้ ๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร+ NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร พบว่า มีเส้นใยประสาทยาวมากขึ้นดังรูปที่ ๒ (d, e) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Teng KK และคณะ เกี่ยวกับการติดตามผลของ NGF ต่อความยาวใยประสาทเป็นเวลา ๑๔ วันพบว่า จำนวนเซลล์งอกใยประสาทเพิ่มร้อยละ ๒๐ ในวันที่ ๔ และเห็นใยประสาทยาวชัดเจนในวันที่ ๗[๑๑]

ดังจะเห็นได้ว่า ร้อยละจำนวนเซลล์ที่งอกใยประสาทและปริมาณโปรตีน MEK-1 ในกลุ่มการทดลองชีรัมจากเลือดจระเข้ขนาดความเข้มข้น ๔ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร ให้ผลแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (NGF ๒ นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ถึงแม้จะไม่ให้มากเท่ากับการให้ NGF ๕๐ นาโนกรัม/มิลลิลิตร ก็ตาม ได้มีงานวิจัยที่ทำการกระตุ้นเซลล์ PC12 ซ้ำโดยให้ NGF ๕๐ นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในเวลา ๐, ๑๒ ชั่วโมง พบว่า ในเวลา ๑ ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้นครั้งแรก ก็เพียงพอให้เซลล์งอกใยประสาทได้ และเมื่อกระตุ้นซ้ำครั้งที่ ๒ มีผลให้ใยประสาทงอกยาวขึ้นอีก[๒๖] แสดงว่าการงอกใยประสาทเมื่อได้รับสารกระตุ้นซ้ำจะได้ผลดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการใช้ยาบำรุงในการแพทย์แผนไทยซึ่งต้องใช้ต่อเนื่องระยะเวลาหนึ่ง

โดยสรุปชีรัมแห้งจากเลือดจระเข้น่าจะพิจารณานำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อบำรุงเซลล์ประสาทได้เพราะมีผลให้เซลล์ PC12 งอกใยประสาทเพิ่มขึ้น มีการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนรูปร่างเซลล์เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เพราะมีสาร IGF-1 เป็นส่วนประกอบในชีรัมแห้งดังกล่าว อาจทำการทดลองเพิ่มเติมโดยสกัดสาร IGF-1 จากชีรัมจระเข้และนำมาทดสอบซึ่งน่าจะเห็นผลต่อเซลล์ประสาทได้ชัดเจนมากขึ้น อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีการใช้เลือดจระเข้มานานตามตำรายา แต่การนำมาใช้ในลักษณะเป็นยาเดี่ยวและมีการเปลี่ยนแปลงโดยทำแห้ง จึงน่าจะมีการทดสอบความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังหรือติดตามผลการใช้ตามขั้นตอนการทดสอบยาขั้นคลินิกในคนปรกติและผู้ป่วยจำนวนน้อยด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปี ๒๕๕๔

เอกสารอ้างอิง

๑. ศุทธิดา ชวนวัน. ประชากรสูงวัยในอาเซียน. จดหมายข่าวประชากรและการพัฒนา ISSN ๐๑๒๕-๕๗๕๔ สถาบันวิจัยประชากรและสังคม มหาวิทยาลัยมหิดล, ๒๕ ธันวาคม ๒๕๕๕. http://www.ipsr.mahidol.ac.th/newsletter/index.php/component/content/article/89-cat-vol33-no4/120-vol33-no4-11.

๒. จุฑามณี สุทธิสีสังข์. ความก้าวหน้าทางเภสัชวิทยา. นงลักษณ์ สุขวาณิชย์ศิลป์ บรรณาธิการ, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ๒๕๔๖:๑๒๘-๓๒.

๓. Bachurin S, Bukatina E, Lermontova N, Tkachenko S, Afanasiev A, Grigoriev V, et al. Antihistamine agent Dimebon as a novel neuroprotector and a cognition enhancer. Ann N Y Acad Sci 2001;939:425-35.

๔. Vornov JJ, Park J, Thomas AG. Regional vulnerability to endogenous and exogenous oxidative stress in organotypic hippocampal culture. Exp Neurol 1998;149:109-22.

๕. Shin YH, Wu SL, Chiou WF, Ku HH, Ko TL, Fu YS. Protective effects of tetramethylpyrazine on kainate-induced excitotoxicity in hippocampal culture. Neuroreport 2002;13:515-9.

๖. Yamazaki M, Chiba K, Mohri T. Fundamental role of nitric oxide in neuritogenesis of PC12h cells. Br J Pharmacol 2005;146:662-9.

๗. Yamazaki M, Chiba K, Mohri T. Differences in neuritogenic response to nitric oxide in PC12 and PC12h cells. Neurosci Lett 2006;93:222-5.

๘. Hawes JJ, Narasimhaiah R, Picciotto MR. Galanin and galanin-like peptide modulate neurite outgrowth via protein kinase C-mediated activation of extracellular signal-related kinase. Eur J Neurosci 2006;23:2937-46.

๙. Gil-Ad I, Shtaif B, Luria D, Karp L, Fridman Y, Weizman A. Insulin-like-growth-factor-I (IGF-I) antagonizes apoptosis induced by serum deficiency and doxorubicin in neuronal cell culture. Growth Horm IGF Res 1999;9:458-64.

๑๐. Kim JH, Ha HC, Lee MS, Kang JI, Kim HS, Lee SY, et al. Effect of *Tremella fuciformis* on the neurite outgrowth of PC12h cells and the improvement of memory in rats. Biol Pharm Bull 2007;30:708-14.

๑๑. Teng KK, Georgieff IS, Aletta JM, Nunez J, Shelanski ML, Greene La. Characterization of a PC12 cell sub-clone (PC12-C41) with enhanced neutrite outgrowth capacity: implications for a modulatory role of high molecular weight tau in neuritogenesis. Jour Cell Sci 1993;106:611-26.

๑๒. Liu JH, Bao YM, Song J, An L. *Cadonopsis pilosula* (French) Nannj total alkaloids potentiate neurite outgrowth induced by nerve growth factoring PC12h cells. Acta Pharmacol Sin 2003;24:913-7.

๑๓. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. FASEB J 1995;9:726-35.

๑๔. Ebrahimi A, Schluesener H. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls. Ageing Research Reviews 2012;11:329–45.

๑๕. Miranda MB, McGuire TF, Johnson DE. Importance of MEK-1/-2 signaling in monocytic and granulocytic differentiation of myeloid cell lines. Leukemia 2002; 16:683-92.

๑๖. Lin CC, Shyr MH, Chien CS, Wang CC, Chiu CT, Hsiao LD, et al. Thrombin-stimulated cell proliferation mediated through activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway in canine cultured tracheal smooth muscle cells. Cell Signal 2002;14:265-75.

๑๗. Hwang SL, Shih PH, Yen GC. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. J Agric Food Chem 2012;60:877-85.

๑๘. Deshmukh M, Johnson EM. Programmed cell death in neuron: focus on the pathway of nerve growth factor deprivation-induced death of sympathetic neurons. Mol Pharmacol 1997;51:897-906.

๑๙. กองการประกอบโรคศิลปะ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข ๒๕๔๕. ตำรับยาแผนโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรมไทย โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์แห่งประเทศไทย.

๒๐. Crain DA, Gross TS, Cox MC, Guillette LJ. Insulin-like growth factor-I in the plasma of two reptiles: assay development and validations. Gen Comp Endocrinol 1995;98:26-34.

๒๑. Guillette LJ Jr, Cox MC, Crain DA. Plasma insulin-like growth factor-I concentration during the reproductive cycle of the American alligator *(Alligator mississippiensis)*. Gen Comp Endocrinol 1996;104:116-22.

๒๒. จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ, วิน เชยชมศรี , สิทธิธนา อาดำ. การตรวจหาไอจีเอฟ-วัน (Insulin like growth factor-1, IGF-1) ในซีรัมจระเข้เพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ. วารสารวิจัยและนวัตกรรมเพื่ออุตสาหกรรมไทย ๒๕๕๓; ๑:๑๒-๕.

๒๓. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. An improved MTT assay. J Immuno Methods 1993; 157:203-7.

๒๔. Das KP, Freudenrich TM, Mundy WR. Assessment of PC 12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. Neurotoxicol Teratol 2004;26:397-406.

๒๕. Plengpanich W, Mangkala J, Buranasukaiorn P, Boonruang K, Sunthornyothin S, Suwanwalaikorn S, et al. Normal reference range of serum insulin-like growth factor (IGF)-I in healthy Thai adults. J Med Assoc Thai 2008;91:1681-4.

๒๖. Chung J, Kubota H, Ozaki Yi, Uda S, Kuroda S. Timing-dependent actions of NGF required for cell differentiation. PLoS ONE 2010;5:e901.

Abstract

Effect of crocodile serum on neurite outgrowth and MEK-1 synthesis in PC12 culture

Pimolvan Akkapinya*, Suvaraporn Sae-lim**, Vanussaya Su-angkavathin**, Win Chaeychomsri***, Arunporn Itharat*

* Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University

** Research Center, Faculty of medicine, Thammasat University, Rangsit campus, Khlong Luang, Pathumthani, 12120, Thailand

*** Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkaen, Bangkok, 10220, Thailand

Introduction: Crocodile blood was used as single drug or as combined recipe in traditional medicine as nootropic drug and chronic disease therapy. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), found in crocodile serum, was reported to protect neuronal cell dead when cultured in serum-free medium. The assessments of neurite outgrowth and mitogen activated protein kinase (MAPK) or MEK-1, producing while cell proliferated and differentiated, are striking mechanisms in nootropic drugs research. The aim of this study was to verify the effect of crocodile serum on neurite outgrowth and MEK-1 synthesis in PC12 culture.

Method: PC12 was cultured with freeze-dried serum obtained from 10 crocodiles. The percentage of neurite outgrowth bearing cell was counted and the amount of MEK-1 was assessed by enzyme immunoassay.

Result: The IC_{50} of crocodile serum was 25.26 mg/ml. Serum at concentration of 4 mg/ml with NGF 2 ng/ml group potentiated proliferation and neurite outgrowth (9.04 ± 3.42%) more than the negative control group with NGF 2 ng/ml (3.05 ± 1.32%) but lesser than the positive control group with NGF 50 ng/ml (14.81 ± 3.79%) ($p < 0.05$). The amount of MEK-1 was also increase in the treatment of 4 mg/ml group as 204.83 ± 28.91% and the positive control group as 253.26 ± 34.2% ($p < 0.05$). The diluted serum of 2 and 0.4 mg/ml with NGF 2 ng/ml had no effect on neurite outgrowth and MEK-1 synthesis.

Discussion and conclusion: This effect might due to the IGF-1 and other active substances contained in crocodile blood. As the therapeutic window of the crocodile serum was rather narrow, so for nootropic use, the repeated small doses of the serum should be suggested.

Key words: Crocodile serum, Neuritogenesis, MEK-1 synthesis