รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การพัฒนาสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายเพื่อใช้ในการส่งเสริมการสร้างความจำ และป้องกันรักษาภาวะความจำเสื่อม

The development of Celastrus paniculatus extraction for memory enhancement and prevention of memory loss

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 23469
เลขที่สัญญา 16/2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การพัฒนาสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายเพื่อใช้ในการส่งเสริมการสร้างความจำ และป้องกันรักษาภาวะความจำเสื่อม

The development of Celastrus paniculatus extraction for memory enhancement and prevention of memory loss

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน
รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 16/2562

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 16/2562)

บทคัดย่อ

มีงานวิจัยรายงานว่าเมล็ดกระทงลาย (Celastrus paniculatus) มีสรรพคุณทางยาหลากหลายที่สำคัญคือ มีฤทธิ์ต่อระบบประสาท ได้แก่ การเพิ่มประสิทธิภาพของความจำและการเรียนรู้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาทจากความเป็นพิษ โดยเฉพาะพิษของสาร MPP+ ซึ่งเป็นสารสำคัญที่เหนี่ยวนำให้เกิดเป็นโรคพาร์กินสัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายต่อการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทชนิด dopaminergic SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร MPP+ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยวิธี MTT assay และศึกษาการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ การมีชีวิตของเซลล์ที่สำคัญ คือ Bcl2 และ mTOR โดยวิธี Western blot ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่ความเข้มข้น 10 และ 25 ug/ml ยับยั้งการตายของเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วย MPP^+ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายยังเพิ่มการแสดงออกของ Bcl2 และลดการแสดงออกของ mTOR ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม บ่งชี้ว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย MPP^+ ในแบบจำลองโรคพาร์กินสันผ่านการยับยั้งการเกิด apoptosis ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

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

Abstract

Several study reported that Celastrus paniculatus show a lot of drug activity especially on nervous system such as increasing of learning and memory. However, there are no studies in neuroprotective effect including MPP+-induced toxicity as a Parkinson's disease model. Therefore, the present study aim to demonstrate the effect of Celastrus paniculatus seed extract on inhibition of MPP+—induced neuronal SH-SY5Y cell death for 3 h, by using MTT assay. Moreover, this study also demonstrated the expression of Bcl2 and mTOR by using Western blot. The result showed that 10 and 25 ug/ml Celastrus paniculatus seed extract significantly increased viability of cell on MPP+-induced toxicity. Moreover, Celastrus paniculatus seed extract significantly increased the expression of Bcl2 and significantly decreased expression of mTOR compared to control. This study indicated that Celastrus paniculatus seed extract protect SH-SY5Y cell from MPP-induced toxicity as indicated in Parkinson's disease model.

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

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
การทบทวนวรรณกรรม	4
วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	7
ผลการวิจัย (Results)	11
อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion) ผลการทดลอง/ผลการวิจัย ที่ได้ทั้งหมด	16
สรุป	17
ผลผลิต (Output)	18
รายงานการเงิน	19
ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด	20
เอกสารอ้างอิง	22

สารบัญภาพ (List of illustrations)

หน้า

รูปที่ 1 แสดงเครื่อง rotary vacuum evaporator ที่ใช้ในการสกัดเมล็ดกระทงลาย 8

รูปที่ 2 แสดงรูปร่างของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงในภาวะต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสง 11

รูปที่ 3 แสดงร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย หลังจากเหนี่ยวนำด้วยสาร MPP+ 12

รูปที่ 5 แสดงการแสดงออกของโปรตีน Bcl2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายหลังจากเหนี่ยวนำด้วยสาร MPP+ 13

รูปที่ 6 แสดงการแสดงออกของโปรตีน mTOR ในเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายหลังจากเหนี่ยวนำด้วยสาร MPP+ 14

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

AMPA	**α-**amino**-**3**-**hydroxy**-**5**-**methylisoxazole**-**4**-**propionic acid
ANOVA	one-way analysis of variance
APP	amyloid precursor protein
Arc	Activity-regulated cytoskeleton associated protein
A**β**	amyloid beta
CG-MS	Gas chromatography–mass spectrometry
Ca^{2+}	Calcium
CP	Celastrus paniculatus
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Goat Anti-Mouse
LTP	long-term potentiation
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MPP+	1-methyl-4-phenylpyridinium
NMDA	N-methyl-D-aspartate
Na+	sodium
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

บทนำ (introduction)

<u>ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย</u>

ภาวะความจำเสื่อมที่พบในผู้สูงอายุมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในปัจจุบันคิดเป็นร้อยละ 20 ของประชากรที่อายุ 65-75 ปี และ ร้อยละ 40 ของประชากรอายุ 85 ปี ขึ้นไป (1,4,5) ความจำเสื่อม เกิดจากความเสื่อมถอยของกระบวนการสร้างความจำในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus) ซึ่งใช้กลูตาเมทเป็นสารสื่อประสาท และมีตัวรับ (receptors) ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ **α-**amino**-**3**-**hydroxy**-**5**-**methylisoxazole**-**4**-**propionic acid (AMPA) และ N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor (18,19) ซึ่งในภาวะปรกติของการสร้างความจำเริ่มต้นจาก AMPA receptor เปิดออกและยอมให้โซเดียม (Na^+) ผ่านเข้าสู่ postsynaptic neuron ในขณะที่ NMDA receptor ถูกปิดกั้นด้วยแมกนีเซียมไอออนจึงไม่ยอมให้ประจุใด ๆ ไหลผ่าน แต่เมื่อ Na^+ ไหลผ่านเข้าเซลล์มากจนกระทั่งเพิ่มศักย์ไฟฟ้าของ postsynaptic membrane ส่งผลให้แมกนีเซียมไอออนในช่องของ NMDA receptor หลุดออก การเปิดช่องของตัวรับชนิดนี้ ไม่เพียงแต่ยอมให้ Na^+ ไหลผ่านได้ แต่ยังยอมให้ Ca^{2+} ผ่านเข้าสู่ postsynaptic neuron ได้อีกด้วย (28) โดยการเข้ามาของ Ca^{2+} เป็นสาเหตุสำคัญที่กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เรียกว่า long-term potentiation (LTP) ของ hippocampus และถือเป็น basic cellular mechanisms ของการเรียนรู้และการสร้างความจำที่มีการศึกษากันมากที่สุดอีกด้วย (25-27) งานวิจัยจำนวนมากรายงานว่า AMPA receptor มีความสัมพันธ์โดยตรงต่อการเกิด LTP โดยเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการแสดงให้เห็นว่า หากมีการกระตุ้นกระบวนการ exocytosis ของ AMPA receptor จะเหนี่ยวนำให้เกิด LTP ด้วย ในทางกลับกันหากยับยั้ง exocytosis ของ AMPA receptor จะยับยั้งการเกิด LTP ถึงแม้ว่าจะถูกกระตุ้นด้วยศักย์ไฟฟ้าความถี่สูงก็ตาม (26) ใน hippocampus พบ AMPA receptor 4 subunits คือ GluA1–4 (19) โดย GluA1 มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการเกิด LTP และ synaptic plasticity หากมีการทำลายยีน GluA1 (GluA1 knockout) จะสูญเสีย LTP ใน hippocampus บ่งชี้ว่า GluA1 เป็นกลไกสำคัญในการเกิด LTP และการสร้างความจำ (21) ในระหว่างกระบวนการ exocytosis ของ AMPA receptor ต้องการการเติมหมู่ phosphate บน GluA1 ในตำแหน่ง Ser831 ดังนั้นหากพบว่ามีการแสดงออกของ phos-Ser831 สามารถบ่งชี้ได้ว่า มีการเกิด exocytosis ของ AMPA receptor ซึ่งนำไปสู่การเกิด LTP ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใต้กลไกการเรียนรู้และการสร้างความจำ

การศึกษาทางระบาดวิทยารายงานว่า ภาวะความจำเสื่อมพบในผู้สูงอายุเพศหญิงมากกว่าเพศชายถึง 1.5 เท่า (12,45) และยังพบว่าในเพศหญิงจะมีภาวะความจำเสื่อมเร็วกว่าเพศชายด้วย (12) โดยในปัจจุบันทราบกันดีว่าเป็นผลมาจากฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ซึ่งปกติมีหน้าที่ส่งเสริมกระบวนการสร้างความจำในสมอง ผ่านการเพิ่มขนาดของค่าศักย์ไฟฟ้าชนิด LTP (46) กระตุ้นกระบวนการ synaptic plasticity ผ่านการแสดงออดของ synaptic proteins (13-16) และ glutamate receptors (46) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาดของ synapse และยังมีฤทธิ์ปกป้องและชะลอการเสื่อมของเซลล์ประสาทอีกด้วย ดังนั้นเมื่อเข้าสู่วัยชราของเพศหญิงซึ่งอยู่ในภาวะขาด estrogen จึงส่งผลให้เกิดการหลงลืมจนกระทั้งสูญเสียความจำใน

ที่สุด และเป็นที่มาของการให้ estrogen ทดแทนในผู้ป่วยที่มีการสูญเสียความจำจากความชรา อย่างไรก็ตาม การให้ estrogen มีความเสี่ยงของโรคมะเร็งเต้านมและมะเร็งรังไข่ (16) จึงมีข้อจำกัดในการนำ estrogen หรือแม้แต่สารที่ออกฤทธิ์คล้ายคลึงมาประยุกต์ใช้ นำไปสู่โจทย์วิจัยใหม่ที่มุ่งเน้นการหาผลิตภัณฑ์ ที่ใช้รักษาภาวะความจำเสื่อมได้โดยไม่มีผลข้างเคียงต่อไป

กระทงลาย (Celastrus paniculata) เป็นไม้เถาเนื้อแข็งขนาดใหญ่มีความสูงของต้นประมาณ 3-10 เมตร เปลือกลำต้นเป็นสีน้ำตาลปนสีเทา เมล็ดแก่มีสีน้ำตาลแดง มีรสขม (2-3) มีสรรพคุณทางยาหลากหลาย กล่าวคือ มีการนำไปใช้รักษาโรคทางระบบประสาทและกล้ามเนื้อ ได้แก่ rheumatism โรคเก๊าท์ อัมพาต arthritis และการอักเสบของผิวหนัง เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของความทรงจำ (10,36) โดยมีงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าการให้สารสกัดเมล็ดกระทงลายในหนูทดลอง เพิ่มการเรียนรู้และความจำได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยทำการทดสอบความจำด้วยวิธี elevated plus maze และ passive avoidance test (36) อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบความจำดังกล่าวเป็นการทดสอบการเรียนรู้และความจำได้แบบทั่วไป ไม่ใช่ความจำที่เฉพาะเจาะจงต่อการทำงานของสมองส่วน hippocampus (6-7,11) นอกจากนี้การทดลองดังกล่าวยังแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกระทงลายมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งมีบทบาทสลาย acetylcholine ส่งผลให้มีปริมาณ acetylcholine ในสมองต่ำ ซึ่งเชื่อกันว่าเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การเรียนรู้และความจำเสื่อมถอย แต่ไม่ใช่สาเหตุและกลไกหลักของการสูญเสียความจำ (24) ต่อมาในปี 2005 มีงานวิจัยเปิดเผยว่าการให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายในหนูแรท ด้วยการฉีดเข้าทางช่องท้องที่ความเข้มข้น 400 และ 600 mg/kg เป็นเวลา 14 วัน หลังจากการเหนี่ยวนำให้อยู่ในภาวะเครียดเรื้อรังด้วยการขัง ลดการสูญเสียความจำได้จากการทดสอบด้วยวิธี elevated plus maze (9) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้ยังไม่มีการศึกษาถึงผลของกระทงลายต่อ LTP และ synaptic plasticity ซึ่งถือเป็น basic cellular mechanisms ของการเรียนรู้และการสร้างความจำที่สำคัญ จึงไม่สามารถอธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระทงลายต่อกลไกการสร้างความจำใน hippocampus ได้ เนื่องจากคุณสมบัติและฤทธิ์ทางยาของกระทงลาย จึงเป็นที่สนใจในปัจจุบันเป็นอย่างยิ่ง และนำไปสู่การวิเคราะห์หาองค์ประกอบสำคัญเชิงเคมีในสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายด้วยวิธี Gas chromatography–mass spectrometry (CG-MS) พบสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ได้แก่ dihydro-β-agarofuran, palmitic acid, phytol, euric acid, trans-beta copaene, และ linalool (8) โดยมีการรายงานว่า dihydro-β-agarofuran คือสารที่มีปริมาณมากที่สุดจากการสกัดเมล็ดกระทงลาย (48) แต่ยังไม่มีการศึกษาผลต่อการสร้างความจำ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาผลและกลไกการทำงานระดับเซลล์ของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายและสารออกฤทธิ์ได้แก่ dihydro-β-agarofuran, palmitic acid, phytol, euric acid, และ trans-beta copaene ต่อการยับยั้งภาวะความจำเสื่อม ผ่านการแสดงออกของ GluA1, synaptic protein, ตลอดจนโปรตีนที่คาดว่าจะเป็น signaling cascade (PI-3K-Akt) ในหนูแรทเพศเมียชรา

วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากกระทงลายต่อเซลล์ประสาท
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากกระทงลายต่อการมีชีวิตของเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วยสารพิษ MPP+ และ Aβ
3. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากกระทงลายต่อกลไกการมีชีวิตของเซลล์ประสาท

ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษาทั้งหมดในโครงการวิจัยนี้ครอบคลุมการศึกษา ฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาทสารสกัดกระทงลายต่อความเป็นพิษของสารพิษ ซึ่งเป็นพื้นฐานที่สำคัญของกลไกการสร้างความจำ และภาวะความจำเสื่อม ในแบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยง

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

สารสกัดกระทงลายมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท ส่งเสริมความจำ โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ synaptic plasticity และการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้อง โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้จะเพิ่มองค์ความรู้ด้านประสามวิทยาศาสตร์ของการสร้างความจำในสมองทั้งในภาวะปกติและภาวะที่เป็นโรคความจำเสื่อม อันได้แก่โรคอัลไซด์เมอร์ ซึ่งจะเป็นข้อมูลสำคัญต่อการศึกษาต่อยอดเพื่อการพัฒนาวิธีการป้องกัน และรักษาภาวะความจำเสื่อมได้ในที่สุด

2. ผู้วิจัยมีแผนที่จะให้นิสิตระดับบัญฑิตศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การแพทย์) และปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การแพทย์) ที่ผู้วิจัยเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมทำการวิจัยภายใต้การควบคุมของผู้วิจัย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการสร้างนักวิจัยหน้าใหม่ในสาขาประสาทวิทยาศาสตร์

3. ผลการวิจัยจากโครงการวิจัยนี้คาดว่าจะตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิจัยระดับนานาชาติคือ Phytochemistry ในหัวข้อเรื่อง Long-term administration of Celastrus paniculatus extract on synaptic plasticity-dependent memory formation

4. ผลงานวิจัยจากโครงการวิจัยนี้ที่ได้รับการเผยแพร่ในวารสารวิชาการนานาชาติจะถูกนำไปเป็นหัวข้อเรียนของนิสิตระดับบัญฑิตศึกษาในรายวิชาการวิเคราะห์บทความวิจัยทางวิทยาศาสตร์ และรายวิชาหัวข้อเลือกสรรค์ทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

5. ผลการทดลองจากโครงการวิจัยนี้ จะนำไปสู่การพัฒนาสารสกัดจากสมุนไพรเพื่อการรักษาโรค aged-related memory impairment

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

1. กระทงลาย (Celastrus paniculatus)

ชื่อสมุนไพร : กระทงลาย

ชื่อเรียกอื่นๆ : มะแตก, มะแตกเครือ, มักแตก (ภาคเหนือ, ภาคอีสาน), กระทงลาย, กระทุงลาย, โชด (ภาคกลาง) หรือ หมากแตก

ชื่อวิทยาศาสตร์ : Celastrus paniculata Wild.

ชื่อสามัญ : Black Ipecac, Black Oil Plant, Black Oil Tree, Celastrus Dependens, Climbing Staff Plant, Climbing Staff Tree และ Intellect Tree

วงศ์ : CELASTRACEAE

กระทงลาย จัดเป็นไม้เถาเนื้อแข็งขนาดใหญ่ มีความสูงของต้นประมาณ 3-10 เมตร หรือ 5 เมตร โดยเฉลี่ย หรือขึ้นพาดพันต้นไม้อื่นไปได้ไกลถึง 10 เมตร เปลือกลำต้นเป็นสีน้ำตาลปนสีเทา ผิวขรุขระเล็กน้อย ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการใช้เมล็ด ขึ้นได้ในดินทุกชนิด ชอบแสงแดด สามารถพบต้นกระทงลายได้ทั่วไป โดยมักขึ้นตามป่าเบญจพรรณ ป่าโปร่ง ป่าดงดิบ ป่าผลัดใบ ป่าละเมาะ หรือตามพื้นที่โล่ง และจะพบได้มากทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยในปัจจุบันมีการสนับสนุนให้เกษตรกรปลูกต้นกระทงลายในหลายพื้นที่ ได้แก่ จังหวัดมหาสารคาม ผ่านโครงการวิจัยใน สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวชวิจัยของอาจารย์ในมหาวิทยาลัยมหาสารคาม และจังหวัดเชียงใหม่ในศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ เนื่องจากกระทงลายเป็นพืชที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งต้น โดยมีสรรพคุณทางยาหลากหลาย ได้แก่ ใบมีฤทธิ์ลดอาการท้องเดิน ช่วยรักษาโรคบิด เมล็ด ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในด้านความจำ (1)โดยการเพิ่มประสิทธิภาพด้านความจำ ชาวบ้านใช้วิธีการนำเมล็ดมาต้มกับน้ำ ดื่มรับประทาน และให้ผลตอบสนองเป็นที่พึงพอใจแก่ผู้ใช้ (2) ต่อมาในปี 2010 มีการศึกษาในประเทศอินเดียและตีพิมพ์เผยแพร่ลงในวารสารระดับนานาชาติ ถึงผลของสารสกัดเมล็ดกระทงลายเพิ่มการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองโดยทำการทดสอบความจำด้วยวิธี elevated plus maze และ passive avoidance test โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายทางปากเพิ่มการเรียนรู้และความจำได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกลุ่มควบคุม และเปรียบเทียบกับยามาตรฐานไพราซีแตม (Piracetam) ซึ่งเป็นยาที่มีคุณสมบัติเสริมสร้างกระบวนการรับรู้ของสมองซึ่งในทางคลินิกนำยานี้มาใช้บำบัดอาการความจำเสื่อม (7) อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบความจำดังกล่าวเป็นการทดสอบการเรียนรู้และความจำได้แบบทั่วไป ไม่ใช่ความจำที่เฉพาะเจาะจงต่อการทำงานของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (17, 19-20) นอกจากนี้การทดลองดังกล่าวยังแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกระทงลายออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งมีบทบาทสลาย acetylcholine ส่งผลให้มีปริมาณ acetylcholineในสมองต่ำ ซึ่งเชื่อกันว่าเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การเรียนรู้และความจำเสื่อมถอย (7)

2. ความจำและกลไกการสร้างความจำ

ความจำ หมายถึงความสามารถของสมองในการเก็บข้อมูลและระลึกถึงสิ่งเหล่านั้นได้ ซึ่งจำเป็นต่อการเรียนรู้และการดำรงชีวิต โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดตามระยะเวลา ได้แก่ sensory memory ความจำระยะสั้น และความจำระยะยาว โดยการเปลี่ยนความจำระยะสั้นให้กลายเป็นความจำระยะยาวเกิดขึ้นที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัส ความจำได้มีความจำเป็นตลอดชีวิตดังนั้นการสูญเสียความจำ หรือมีความผิดปกติเกี่ยวกับการสร้างความจำจึงเป็นปัญหาสำคัญที่จะกระทบต่อการดำรงชีวิตของผู้ป่วยและบุคคลรอบข้าง การสร้างความจำระยะยาวอาศัยการทำงานของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส โดยมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสโดยเฉพาะบริเวณไซแนปส์ (จุดประสานระหว่างเซลล์ประสาทก่อนไซแนปส์กับเซลล์ประสาทหลังไซแนปส์) กล่าวคือมีการเพิ่มขนาด เพิ่มจำนวน และเพิ่มความแข็งแรงของไซแนปส์อย่างถาวร เรียกการเปลี่ยนแปลงนี้ว่า synaptic plasticity โดยส่วนของ synapse ทีมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างดังกล่าวจะเกิดขึ้นเฉพาะส่วนของ post synapse ที่ยื่นออกจาก dendrite เรียกบริเวณนี้ว่า dendritic spine ซึ่งกระบวนการนี้ต้องการการสังเคราะห์ยีนและโปรตีนใหม่ตลอดจนการจัดเรียงตัวใหม่ของโปรตีนโครงสร้างเดิม เพื่อส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอย่างถาวรของ synapse โดยโปรตีนต้องการสังเคราะห์ใหม่ที่สำคัญในกระบวนการนี้ ได้แก่ โปรตีนในกลุ่ม immediate early genes เช่น Activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc) (5-7) ซึ่งหากยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนเหล่านี้จะทำให้สูญเสียความสามารถในการสร้างความจำ [8] ดังนั้นโปรตีนเหล่านี้จึงถือเป็นโปรตีนบ่งชี้ของกระบวนการ synaptic plasticity นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของโปรตีนที่มียู่เดิมก็มีความสำคัญต่อกระบวนการ synaptic plasticity เช่นกัน ได้แก่ การต่อสายของ actin (actin polymerization) บริเวณ dendritic spine กล่าวคือการมีการยับยั้ง actin polymerization จะยับยั้งการยื่นออกของ dendritic spine และ สูญเสียการคงสภาพของ dendritic spine ตลอดจนมีผลรบกวนความจำและการเรียนรู้ของสัตว์ทดลองอีกด้วย ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า dendritic spine คือบริเวณที่มีการสร้างความจำ (site of memory formation) ในสมอง จึงเป็นที่มาของงานวิจัยจำนวนมากในปัจจุบันที่ประเมินระดับของการจำได้จากจำนวนของ dendritic spine ในสมองโดยเฉพาะสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

3.1. โครงสร้างและองค์ประกอบของ dendritic spine

Dendritic spine คือ ส่วนที่ยื่นนูนออกมาจากแขนงหลักของ dendrite ของเซลล์ประสาทและเป็นส่วนของ postsynaptic neuronซึ่งการปรับเปลี่ยนรูปร่างของ dendritic spine มีความสัมพันธ์โดยตรงต่อการทำงานของ synapse (10) โรคทางระบบประสาทจำนวนมาก ได้แก่ Alzheimer’s disease และ schizophrenia พบว่ามีความผิดปรกติของ ขนาด รูปร่าง และ จำนวนของ dendritic spine (21) โปรตีนโครงสร้างที่เป็นองค์ประกอบหลักภายใน dendritic spine คือpost-synaptic density-95 (PSD-95) และแอกทิน (actin) โดยพบว่ามี actin ที่ dendritic spine มากกว่าส่วนแกนหลักของ dendrite ถึง 6 เท่า (13) สายแอกทิน (F-actin) เกิดจากการต่อกันของหน่วยย่อย (G-actin) เรียกการต่อสายยาวนี้ว่า actin polymerization ในภาวะปรกติสายของแอกทินจะมีการเปลี่ยนแปลงของ G-actin ผ่านกระบวนการ polarization และ depolarization อย่างคงที่ตลอดเวลาทำให้เกิดสมดุลของสายแอกทิน เรียกกระบวนการนี้ว่า treadmilling (14) การเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวตัวของแอกทินสามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ

dendritic spine ผ่านการเพิ่มความยาวของสายแอกทินนั้นต้องการการทำงานของโปรตีนในกลุ่ม actinbindingprotein ได้แก่ cofilin ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการ depolarization สายแอกทินด้าน minus-end ทำให้ได้ G-actin หลุดออกมา จากนั้นG-actin จะถูกนำไปต่อเข้าในด้าน plus-end ของสายแอกทิน โดยอาศัยการทำงานของ profilin (14) Rust และคณะวิจัย (2010) แสดงให้เห็นว่า cofilin มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการ long-term potentiation ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญอย่างหนึ่งของการเรียนรู้และการสร้างความจำของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส (31) นอกจาก actin แล้ว PSD-95 ก็มีบทบาทอย่างมากต่อกลไกการสร้างความจำและการเรียนรู้ กล่าวคือ PSD-95 เป็นโปรตีนโครงสร้างที่เป็น binding site ของตัวรับสารสื่อประสาท (neurotransmitter receptor) โดยเฉพาะ NR1 receptor และ GluR1 receptor ที่พบมาที่ post-synaptic neuron ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสจากงานวิจัยจำนวนมากพบความสัมพันธ์ของตัวรับทั้งสองต่อกระบวนการ synaptic plasticity และการสร้างความจำระยะยาว

4. ภาวะสมองชรา

ประเทศไทยก้าวเข้าสู่การเป็น "สังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์" [1] ปัญหาสุขภาพ คือสิ่งที่ต้องเผชิญอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ปัญหาที่พบได้บ่อยและมีความสำคัญต่อคุณภาพชีวิตของผู้สูงอายุอย่างหนึ่ง คือ ภาวะความจำเสื่อม (2, 3) ซึ่งเกิดจากการทำงานผิดปกติของเซลล์ประสาทที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างความจำได้แก่ บริเวณฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ (4) ก่อนหน้านี้เชื่อกันว่าภาวะหมดประจำเดือน (menopause) เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดความจำเสื่อมในผู้สูงอายุ เนื่องจากการลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากต่อมเพศ (อันฑะ และ รังไข่)ในภาวะปกติเอสโตรเจนทำหน้าที่ส่งเสริมและสนับสนุนการทำงานของเซลล์ประสาท [14] ช่วยปกป้องเซลล์ประสาทจากสารพิษ และสารอนุมูลอิสระ (23) และส่งเสริมกลไกการสร้างความจำของเซลล์ประสาท อาทิเช่น การเพิ่มศักย์ไฟฟ้าบริเวณ postsynaptic membrane การเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของไซแนปส์ และการสร้างไซแนปส์ใหม่ของเซลล์ประสาท (6, 13) ดังนั้นหากไม่มีเอสโตรเจนจากต่อมเพศจึงนำไปสู่ความผิดปกติของกระบวนการสร้างความจำและทำให้เกิดภาวะความจำเสื่อมในที่สุดจากข้อมูลงานวิจัยเหล่านี้จึงนำไปสู่การให้เอสโตรเจนทดแทน (estrogen replacement therapy) เพื่อรักษาภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุ แต่วิธีการดังกล่าวก็มีข้อจำกัดที่สำคัญคือ กล่าวคือเป็นปัจจัยเสี่ยงของ มะเร็งเต้านม และมะเร็งปากมดลูก (14, 23, 26) ดังนั้นหากสามารถหาสมุนไพรที่สามารถการรักษาและป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนแต่ไม่มีผลให้เกิดความเสี่ยงของโรคมะเร็งก็จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสังคมเป็นอย่างมาก

4.1. โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer’s disease)

โรคอัลไซเมอร์ เป็นหนึ่งในโรคสมองเสื่อมที่พบได้บ่อยที่สุดผู้ป่วยโรคนี้ จะมีอาการสำคัญคือความจำเสื่อมหลงลืมมีพฤติกรรมและนิสัยเปลี่ยนไปอาการจะดำเนินไปอย่างช้า ๆ แต่ค่อย ๆ รุนแรงขึ้นเรื่อยๆจนในที่สุดจะช่วยเหลือตัวเองไม่ได้และเสียชีวิตในที่สุดในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาให้หายได้ (27-28) โรคอัลไซเมอร์จะพบในผู้สูงอายุยิ่งอายุมากขึ้นก็จะพบอัตราการเป็นโรคมากขึ้นโดยในช่วงอายุ 65-69 ปีพบอุบัติการณ์การเกิดผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 3 คนต่อพันคนต่อปีแต่หากเป็นช่วงอายุ 85-89 ปีจะพบสูงถึง 40 คนต่อพันคน

ต่อปีพบได้ในทุกเชื้อชาติเพศหญิงพบมากกว่าเพศชายเล็กน้อยอาจเนื่องจากเพศหญิงมีอายุยืนยาวกว่าในประเทศไทยมีผู้ป่วยโรคนี้ร้อยละ 2-4 โดยประมาณ ของผู้ที่มีอายุมากกว่า 60 ปีและจะพบเพิ่มขึ้น 2 เท่าทุก 5 ปีหลังอายุ 60 ปี (26) โดยมีกลไกที่สำคัญคือมีการสะสมของneurofibrillary tangle และผลึก amyloid betaภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ประสาทตามลำดับ (5, 30-35) การเกิด amyloid plaque เกิดจากชิ้นส่วนของโปรตีนซึ่งร่างกายสามารถผลิตได้ตามปกติคือBeta amyloid เป็นชิ้นส่วนของโปรตีนซึ่งหลุดออกมาจากamyloid precursor protein (APP) ซึ่งโดยทั่วไปสมองที่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ดีจะพบว่าสารโปรตีนชนิดนี้ (APP) จะเกิดการแตกตัวเป็นชิ้นส่วนเล็กแล้วถูกกำจัดออกจากกายไปแต่ในคนที่เป็นโรคอัลไซเมอร์ Beta amyloidsจะจับตัวเป็นผลึกแข็งไม่ละลายในน้ำและรวมตัวในเนื้อสมองระหว่างเซลล์ประสาท (neurons) และมีผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ประสาทส่งผลให้เซลล์ประสาทเสื่อมและตายในที่สุด (21) neurofibrillary tangles เป็นไยที่รวมตัวภายในเซลล์ประสาทโดยเริ่มต้นพบว่าเส้นใยกลุ่มนี้เกิดจากการที่โปรตีนTau ถูกเติมหมู่ phosphate มาเกินไปส่งผลให้โปรตีน tau สูญเสียหน้าที่ในการยึดสายของ microtubule ไว้ด้วยกันจึงเกิดการแตกออกของสาย microtubule ทำให้โครงร่างของ microtubule เปลี่ยนแปลงไปและไม่สามารถทำหน้าทีสำคัญได้อีกต่อไปส่งผลให้เซลล์เสื่อมและตายในที่สุด (17-20)

เนื้อเรื่อง (main body)

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. การสกัดเมล็ดกระทงลาย

เมล็ดกระทงลายที่ใช้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ นำไปตากให้แห้งและอบจนแห้งด้วยอุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันจากนั้นนำไปบดด้วยโกร่งบดยา จนละเอียด แล้วนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ แช่ตัวอย่างพืชในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% อัตราส่วน กระทงลาย: เอทิลแอลกอฮอล์ = 1:2 (w/v) ทิ้งไว้ 3 วันจากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนเหวี่ยง (rotary vacuum evaporator) (รูปที่ 1) เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในขวดแก้วสีชา จากนั้นส่งให้ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ทำการสกัดเมล็ดกระทงลายแบบ crude extract แบบ purify โดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัย 3 ชนิด คือ hexane, ethyl acetate, และ น้ำ ซึ่งควบคุมดูแลโดยอาจารย์ผู้เชี่ยวชาญในด้านการสกัดสมุนไพร (อาจารย์ ดร. อนันต์ อธิพรชัย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา)

รูปที่ 1 แสดงเครื่อง rotary vacuum evaporator ที่ใช้ในการสกัดเมล็ดกระทงลาย

2. เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SH-SY5Y

เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษา คือ SH-SY5Y cell ซึ่งเป็น neuroblastoma cells line (ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ) passage number 14 ทำการเพาะเลี้ยงอยู่ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร (Corning, USA) และเลี้ยงไว้ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ชนิดควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะ 5% CO2 ความชื้นร้อยละ 95-99 (CO2 incubator Thermo scientific, USA) และเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum Essential Medium Eagle with Nutrient Mixture F12 Ham; MEM/F12 1:1 Mixture (HIMEDIA) USA) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA) และยาปฏิชีวนะ (1% Antibiotic) นาน 5 - 7 วัน หลังจากนั้นย่อยเซลล์ด้วย 0.25% trypsin-EDTA ให้ได้ cell suspension แล้วนาไปปั่นโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (ZENTRIFUGEN EBA 200, USA) ที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำ cell pellet มาเติม MEM/F12 ที่มี 10% FBS และนา cell suspension มานับจานวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วย hemocytometer โดยวิธี trypan blue exclusion และนาเซลล์ ไปเพาะเลี้ยงต่อเนื่อง (passage) โดยการแบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร เพื่อเพิ่มจานวนเซลล์ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 - 3 วัน และทาการเพาะเลี้ยงขยายดังที่กล่าว สัปดาห์ละ 1 ครั้ง หรือเมื่อเซลล์เพิ่มจานวนประมาณ 80 - 90% ของพื้นที่ขวด

3. การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท SH-SY5Y ใน 96-well plates (Costar®, USA) โดยให้ปริมาณความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ $4x10^4$ cell/well ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM/F12 (HIMEDIA, USA) 10% FBS (Gibco, USA) และนาไปเก็บไว้ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ชนิดควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะ 5% CO2 ความชื้นร้อยละ 95-99 (CO_2 incubator Thermo scientific, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์มาทาการเหนี่ยวนำให้เกิการตายด้วย MPP+ ที่ความเข้มข้น 50 และ 250 μM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกับสารสกัดจากเมล็ดของกระทงลาย ที่ความเข้มข้น 10 และ 25

μg/mL ที่ละลายใน MEM/F12 (HIMEDIA, USA) หลุมละ 80 μL โดยเป็นแบ่งการทดสอบออกเป็น Control cell (Untreated), 10% DMSO, MPP+ สารสกัดสมุนไพร และสารสกัดสมุนไพรในเซลล์ที่ถูกพิษ แล้วนาไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO2 ที่ความชื้นร้อยละ 95-99 (CO2 incubator Thermo scientific, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานามาใส่นำยา MTT reagent (MTT cell viability assay kit, (Abnova) Taiwan) หลุมละ 15 μL และทาการบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการละลายตะกอนด้วย Solubilization Buffer (MTT cell viability assay kit, (Abnova) Taiwan) หลุมละ 100 μL แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์หาอัตราการมีชีวิตของเซลล์

4. การสกัดโปรตีน

นำ 6-well plates ที่มีเซลล์ที่ทำการทดสอบด้วยสารสกัดจากเมล็ดของกระทงลายแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทาการดูดอาการเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และล้างด้วย 0.01 M PBS 3 ครั้ง โดยให้ 6-well plates วางอยู่บนน้าแข็ง จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใส่ RIPA buffer (โดย ผสมกับ protease cocktail inhibitor อัตรา 1:100) ปริมาตร 100 μl/well นาไป เขย่าบนเครื่อง shacker (Thermo scientific, USA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วใช้ scraper ขูดเซลล์ใน 6 well plate ให้ทั่วทั้ง well จากนั้น นาไป เขย่าบนเครื่อง shacker (Thermo scientific, USA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใช้ scraper ขูดเซลล์ใน 6 well plate อีกครั้งเพื่อทาการเก็บ lysed cell ปริมาตร 100 μL ลงใน Sterile microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL จากนั้นนาไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge แบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที อุณหภมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วทาการเก็บ Supernatant ในแต่ละกลุ่มการทดลองลงใน Sterile microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL แล้วนาไปเก็บที่อุณหภมิ -20 °C

5. การวัดปริมาณโปรตีน

นำ supernatant ที่ได้มา วัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้เทคนิค Bradford protein assay โดยการเตรียม Bradford solution (Dye reagent concentrate, BIO-RAD) และน้า ในอัตรส่วน 1:4 (blank 1 + ตัวอย่าง 4) ผสมน้า ปริมาณ 4,000 μL กับ Bradford solution ปริมาณ 1,000 μL ลงใน conical tube ขนาด 15 mL (ที่ห่อฟอยด์แล้ว) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูด Bradford solution ปริมาณ 1000 μL ลงใน cuvette และใส่โปรตีนตัวอย่าง ปริมาณ 3 μL ลงใน cuvette บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนาไปวัดความเข้มข้นของโปรตีน ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (ThermoScientific™GENESYS™10SUV-Vis Spectrophotometer with, USA)

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

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวและดูความบริสุทธิ์ของโปรตีน โดยการเชื่อมต่อของ

acrylamide monomer จนเป็นสายโซ่ยาวประกอบกันเป็นแผ่นเจล โดยมี TEMED เป็น catalyte และมี ammonium persulfate เป็น initiator โปรตีนอยู่ในบัฟเฟอร์ที่เป็นด่างประกอบด้วย Sodium dodecyl sulfate (SDS) เป็น anionic detergent โดย SDS จับกับโพลีเปปไทด์ โดยมี mercaptoethanol หรือ dithiotreothol เป็น reducing agent เพื่อทาลายพันธะ disulfide โปรตีนที่จับกับ SDS จะมีประจุลบ เมื่อให้กระแสไฟ โมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่เข้าขั้วบวกซึ่งอัตราการการเคลื่อนที่ของโปรตีนจะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับขนาดน้าหนักโมเลกุลและขนาดของรูพรุนของเจล โดยขนาดของรูพรุนสามารถปรับได้ตามความเข้มข้นของ acrylamide ความเข้มข้นของ acrylamideเพิ่มขึ้น ขนาดของรูพรุนจะเล็กลง เตรียม 12.5% gel SDS-PAGE จากนั้นใส่เจลใน running setup แล้วดึง comb ออก เติม Running buffer จนเต็ม tank และใส่ในแต่ละ well ด้วยเพื่อเป็นการล้างเศษเจล ผสมโปรตีนใน RIPA buffer โดยใช้ความเข้มข้น 80 µg/well ในปริมาตร 32 µl รวมกับ 6x loading dye 8 µl จะได้ปริมาตรรวมเป็น 40 µl ซึ่งเป็นปริมาตรที่ต้องการโหลดใน 1 well หลังจากผสมโปรตีนเข้ากับสารอื่นๆ ในอัตราส่วนที่คำนวณได้แล้ว นำโปรตีนไปต้มภายใต้อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อ denature โปรตีน แล้วทำการ load โปรตีน โดย load protein marker ไว้เป็น well แรกเสมอ ปริมาตร 5 µl จากนั้น set เครื่อง power supply ศักย์ไฟฟ้า 100 V เป็นเวลา 90 นาที และคอยสังเกต front dye ไม่ให้เกินหรือหลุดออกจากขอบกระจกด้านล่าง

7. การย้ายลงบน Nitrocellulose membrane

ก่อนครบเวลาในการทำ SDS-PAGE ให้เตรียมอุปกรณ์สาหรับ transfer โปรตีน โดยการแช่ ฟองน้า 4 ชิ้น กระดาษกรอง 4 ชิ้น nitrocellulose membrane 1 ชิ้น ลงใน transfer buffer เป็นเวลา 15-20 นาที เมื่อ front dye ถึงขอบกระจกกด pause และ stop จากนั้นทาการ transfer โปรตีน โดยวาง ฟองน้า, กระดาษกรอง, gel, nitrocellulose membrane, ฟองน้า บน cassette เรียงจากสีดาไปยังสีใส แล้วนา cassette ใส่ลงใน setup หันด้านสีดาให้สัมผัสกับสีดา ใส่ ice box ลงด้านข้าง แล้วเติม transfer buffer ให้เติม tank ปิดฝา แล้ววาง tank ให้อยู่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้น set เครื่อง power supply ศักย์ไฟฟ้า 100 V เป็นเวลา 105 นาที เมื่อครบเวลานา membrane ออกมาใส่กล่องแล้วย้อมด้วยสี Poceau’S จะเห็นแถบโปรตีน จากนั้นล้างสีด้วย TBS-T ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง หรือจนกว่าสีจะหมด โดยเขย่าบน shaker ทาการ Block non-specific binding ด้วยการแช่ membrane ใน 5% non-fat milk เป็นเวลา overnight ที่ 4 0C จากนั้นล้าง membrane ด้วย TBS-T ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง โดยเขย่าบน shaker (Thermo scientific, USA) ใส่ Primary antibody ที่ผสมกับ TBS-T ในอัตราส่วน 1:1000 (Anti-Bcl2, Anti-mTOR, Anti-phospho-mTOR และ Actin) ลงบน membrane เป็นเวลา overnight ที่ 4°C จากนั้นล้าง membrane ด้วย TBS-T ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง โดยเขย่า บน shaker ใส่ Secondary antibody ที่ผสมกับ TBS-T ในอัตรส่วน 1:5000 (Goat Anti-Mouse (IgG), Goat Anti-Rabbit (IgG)) ลงบน membrane เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้าง membrane ด้วย TBS-T ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง โดยเขย่า บน shaker แล้วนา membrane ไป Expose flim ในห้องมืด โดยดูด LuminataTM Classico Western HRP Substrate ใส่บนแผ่น nitrocellulose membrane แล้วปิดด้วยแผ่นฟิล์มใส (x-ray film)เป็นเวลา 5 นาที (โดยพิจารณาจากความเข้มของการเรืองแสง) เมื่อครบเวลานำไปจุ่มใน developer น้ำสะอาด และหยุด

ปฏิกิริยาฟิล์มด้วย fixer ตามลำดับ จากนั้นนำแผ่นฟิล์มใสไปตากให้แห้ง นำฟิล์มที่ผึ่งไว้จนแห้ง ทำการ scan ฟิล์มที่ได้ แล้วนำไปวิเคราะห์ความเข้มของแถบโปรตีนโดยใชโปรแกรม Image J

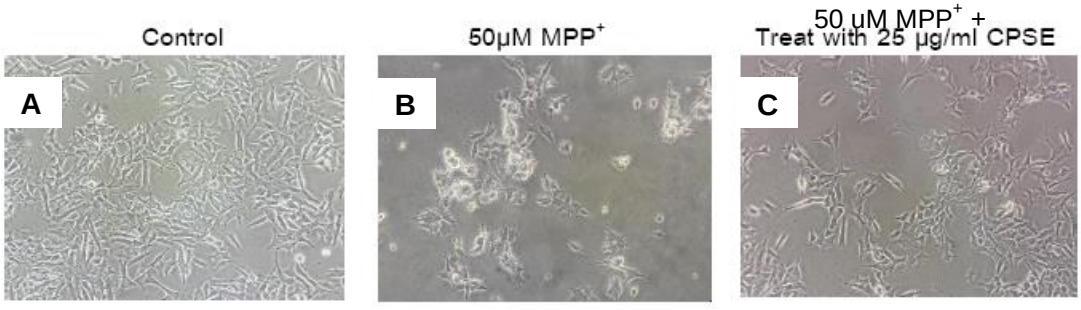
8. วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำเสนอเป็นค่า means ± SE ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลสองชุดจะทดสอบโดย unpaired Student's t-test ความแตกต่างทางด้านสถิติของข้อมูลมากกว่าสองชุดจะถูกทดสอบด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey multiple comparison test ความแตกต่างทางด้านสถิติของทุกการทดสอบต้องมีค่า $P \leq 0.05$ ประเมินผลข้อมูลโดย Graph-Pad Prism 5.0

ผลการวิจัย (Results)

1. ผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายต่อการเปลี่ยงแปลงรูปร่างของเซลล์ประสาท SH-SY5Y cell

ศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์หลังจากถูกเหนี่ยวนำด้วยสารพิษ MPP+ โดยศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงใน 6 well plate (รูปที่ 2) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ SH-SY5Y มีจำนวนลดลงและมีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากมีการเหนี่ยวนำด้วยสารพิษ MPP+ ที่ความเข้มข้น 50 uM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กล่าวคือ พบว่ามีการแตกของนิวเคลียสภายในเซลล์ เซลล์มีรูปร่างที่ผิดปกติไม่เป็นกระสวย ไม่มีการแตกแขนงของเซลล์ที่เป็นลักษณะของเซลล์ประสาท เช่นที่พบในกลุ่มควบคุม (A) จำนวนแขนงประสาทน้อยลง และมีการหลุดลอยของเซลล์เพิ่มขึ้นโดยสังเกตุได้จากมีการเรืองแสงรอบเซลล์ (B) บ่งชี้ว่าเซลล์ตายหลักจากได้รับ MPP+ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แต่เมื่อให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายด้วยความเข้มข้น 25 µg/ml หลังจากให้ MPP+ มาแล้วเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงกลับมามีรูปร่างคล้ายเซลล์ประสาทอีกครั้ง คือ มีการแตกแขนงประสาทเพิ่มมากขึ้น และมีการหลุดลอยน้อยลง (C) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่ความเข้มข้น 25 µg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด SH-SY5Y จากการเหนี่ยวนำด้วยสารพิษ MPP+ ซึ่งสนับสนุนว่า สารสกัดจาดเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท (neuroprotective effect)

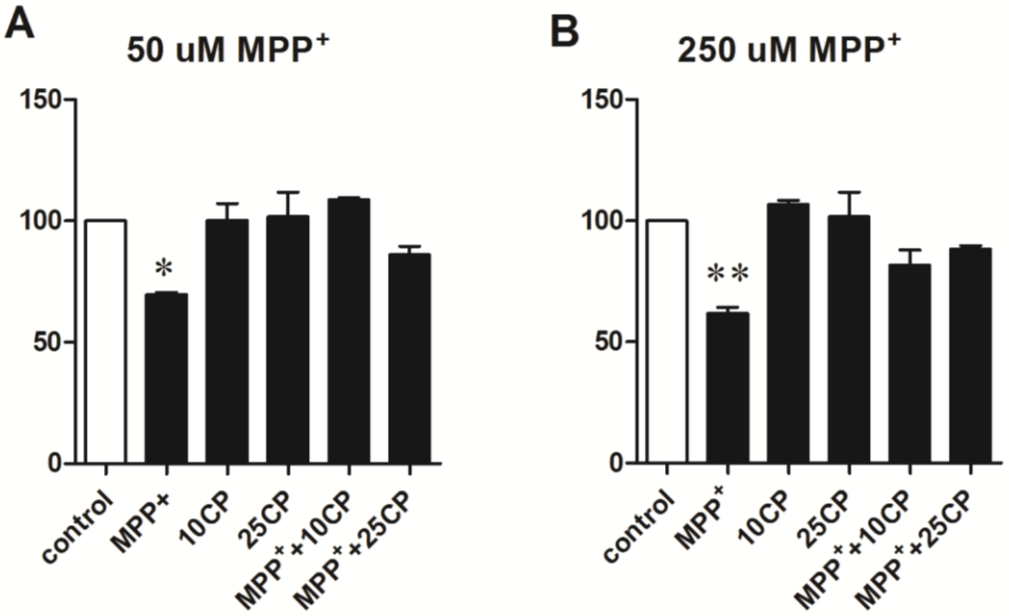


รูปที่ 2 ภาพแสดงรูปร่างของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงในภาวะต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสง

ในภาวะปกติ (A) ภาวะที่บ่มด้วย MPP+ ที่ความเข้มข้น 50 uM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (B) และเมื่อให้ MPP+ ร่วมกับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย 25 ug/ml (C), กำลังขยาย 40x ถ่ายถาพโดยการสุ่ม

2. สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย MPP+

จากการศึกษาการมีชีวิครอดของซลล์ด้วยวิธี MTT assay ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้ MPP+ ที่ความเข้มข้น 50 uM (A) และ 250 uM (B) เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมงทำให้อัตราการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย (CP) ที่ความเข้มข้น 10 และ 25 μg/mL โดยค่าการมีชีวิตกลับมาใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายสามารถยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่ถูกเนี่ยวนำด้วยสารพิษ MPP+ ซึ่งจัดเป็นสารพิษหลักที่นิยมใช้ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ประสาทอยู่ในแบบจำลองโรคพาร์กินสัน



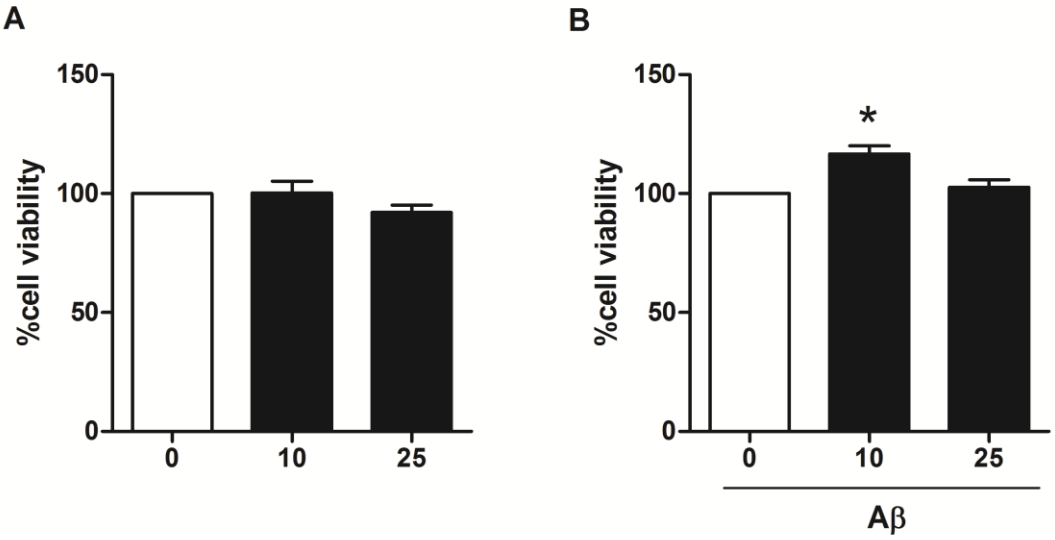
รูปที่ 3 แสดงร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายหลังจากเหนี่ยวนำด้วยสาร MPP+

ทำการศึกษาโดยให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่ความเข้มข้น 50 uM (A) และ 250 uM (B) ร่วมกับการให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่ความเข้มข้น 10 และ 25 μg/mL ด้วยวิธี MTT assay โดยวัดที่ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

$p < 0.05$, n=6, * เทียบกับกลุ่มควบคุม (control)

3. สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย Aβ

จากการทดสอบผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่ความเข้มข้น 10 และ 25 μg/mL ต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด SH-SY5Y พบว่าทั้งสองความเข้มข้นไม่มีผลต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์กล่าวคือมีความใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายร่วมกับการให้ 100 μM **Aβ** เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งถือเป็นความเข้มข้นต่ำที่มีประสิทธิภาพในการก่อโรค พบว่า การให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่ความเข้มข้น 10 μg/mL เพิ่มอัตราการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงได้เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 100 μM **Aβ** อย่างเดียว อย่างไรก็ตามสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่ความเข้มข้น 25 μg/mL ไม่มีผลเพิ่มอัตราการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่ความเข้มข้น 10 μg/mL มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วยสารพิษชนิด **Aβ** ซึ่งเป็นสารพิษหลักที่ของการดำเนินของโรคอัลไซเมอร์ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายอาจมีฤทธิ์ยับยังโรคอัลไซเมอร์ได้ ซึ่งต้องมีการศึกษาโดยละเอียดต่อไป

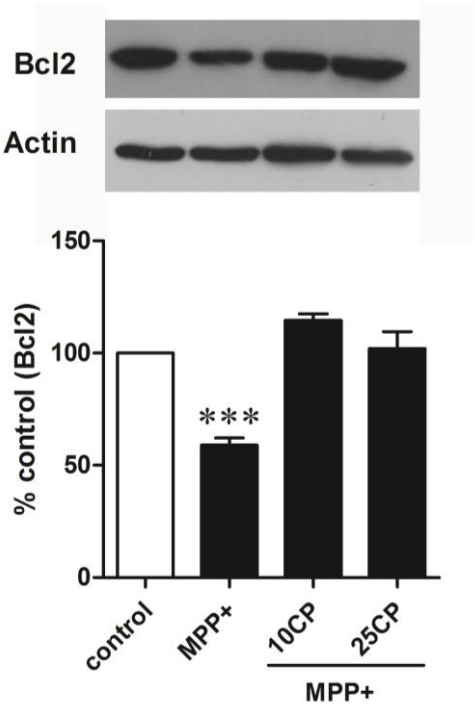


รูปที่ 4 แสดงร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายหลังจากเหนี่ยวนำด้วยสาร Aβ

ทำการศึกษาโดยเปรียบเทียบระหว่างการให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายอย่างเดียว (A) และให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายร่วมกับ **Aβ** (B) โดยให้ **Aβ** ที่ความเข้มข้น 100 uM เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่ความเข้มข้น 10 และ 25 μg/mL โดยวัดที่ค่าดูดกลืนแสง 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ($p < 0.05$, n=6, * เทียบกับกลุ่มควบคุม (0))

4. สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Bcl2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย MPP+

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้ MPP+ ที่ความเข้มข้น 50 uM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ลดการแสดงออกของ Bcl2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลับมีปริมาณการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมเมื่อได้รับสารสกัดจาดเมล็ดกระทงลาย (CP) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 10 และ 25 μg/mL แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่ถูกเนี่ยวนำด้วยสาร MPP+ ผ่านการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนยับยั้งการเกิด apoptosis ชนิด Bcl2

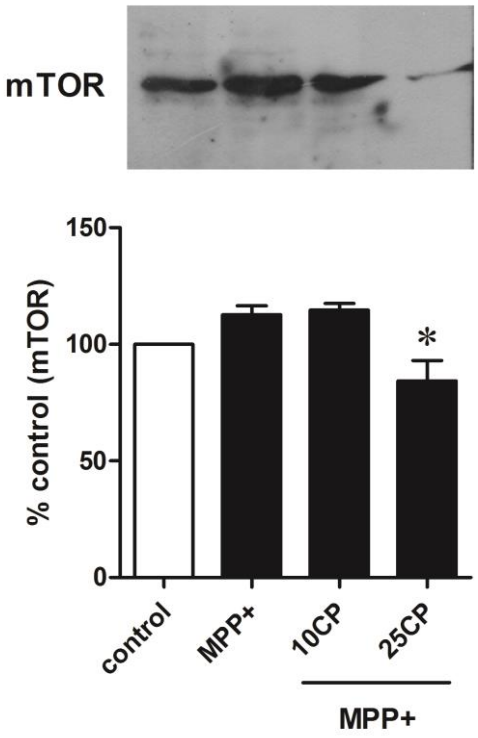


รูปที่ 5 แสดงการแสดงออกของโปรตีน Bcl2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายหลังจากเหนี่ยวนำด้วยสาร MPP+

ภาพ (A) แสดงแถบความเข้มของโปรตีน Bcl2 จากการทำ Western blot และนำมา expose ลงบนแผ่นฟิล์ม x-ray (B) กราฟแสดงความเข้มของแถบแบนของ Bcl2 ของเซลล์ SH-SY5Y จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image J และนำวิเคราะห์ค่าทางสถิติ (*** $p < 0.001$, $n = 4$)

5. สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน mTOR ในเซลล์เพราะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย MPP+

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้ MPP+ ที่ความเข้มข้น 50 uM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพิ่มการแสดงออกของ mTOR ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย (CP) ที่ความเข้มข้น 10 และ 25 μg/mL ทำให้ mTOR กลับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ MPP+ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทโดปามีที่ถูกเนี่ยวนำด้วยสาร MPP+ ผ่านกลไก mTOR



รูปที่ 6 แสดงการแสดงออกของโปรตีน mTOR ในเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายหลังจากเหนี่ยวนำด้วยสาร MPP+

ภาพแสดงแถบโปรตีน mTOR ของ SH-SY5Y cell (A) จากการทำ Western blot และนำมา expose ลงบนแผ่นฟิล์ม x-ray (B) กราฟแสดงความเข้มของแถบแบนของ mTOR ของเซลล์ SH-SY5Y จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image J และนำวิเคราะห์ค่าทางสถิติ (B) (* $p < 0.05$, $n = 4$)

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion) ผลการทดลอง

การตายของเซลล์ประสาทเป็นพยาธิสภาพที่สาคัญของโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท หรือ neurodegenerative disease โดยมีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากการส่งสัญญาณของวิถี mTOR ในการควบคุมการแบ่งตัวและการตายของเซลล์ ที่เกิดจากการได้รับสารพิษ เป็นเหตุให้มีการตายของเซลล์ประสาทเป็นจานวนมาก ดังนั้นการลดการแสดงออกของ mTOR ในเซลล์ประสาทจึงเป็นหนึ่งในเป้าหมายหลักที่น่าสนใจในการป้องกันและรักษาโรค neurodegenerative disease

ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดของกระทงลาย (สารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย) ที่ความเข้มข้น 25 μg/mL ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ ช่วยฟื้นฟูการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาท นอกจากนี้ยังช่วยลดอัตราการตายของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนาให้มีภาวะ oxidative stress จากพิษของ MPP+ ที่สามารถผ่าน blood–brain barrier เข้าไปทาลายเซลล์ประสาทโดปามีน ที่ทาให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทได้โดยตรง ซึ่ง สารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย สามารถช่วยลดการแสดงออกของ Bcl2 ได้ โดยปกติ Bcl2 เป็นโปรตีนในกลุ่มควบคุมการยับยั้งการเกิด apoptosis แต่เมื่ออยู่ในรูปที่มีการเติมฟอสเฟต จะทาหน้าที่เป็นตัวยับยั้งโปรตีนในกลุ่มควบคุมการยับยั้งการเกิด apoptosis อีกที ดังนั้น สารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย จึงมีผลไปลดการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยยับยั้งการแสดงแสดงออกของ Bcl2 ในระบบที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟต อีกทั้งยังมีผลไปลดการแสดงออกของ phospho-mTOR และ total mTOR เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ MPP+ และกลุ่มที่ได้รับ 10 μg/mL สารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย ซึ่งโดยปกติ mTOR เป็นวิถีที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ แต่เมื่ออยู่ในรูปของ phospho-mTOR จะทาหน้าที่เป็นตัวควบคุมการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ ดังนั้นการที่เซลล์มีการแสดงออกของ total mTOR น้อยลง แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ได้รับ 25 μg/mL สารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย มีการแบ่งตัวได้น้อย แต่เมื่ออยู่ในรูปของ mTOR ที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟต (phospho-mTOR) เซลล์ที่ได้รับ 25 μg/mL สารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย มีการยับยั้งการแบ่งตัวได้น้อยลง ซึ่งหมายถึงเซลล์สามารถแบ่งตัวเพิ่มจานวนได้มากขึ้น จากรายงานการวิจัยพบว่าการยับยั้งการส่งสัญญาณในวิถี mTOR ช่วยให้เซลล์มะเร็งมีการแบ่งตัวได้น้อยลง (19) และจากหลักฐานทางงานวิจัยอื่นๆ ยังพบอีกว่าการยับยั้งวิถี mTOR ส่งผลให้ลดการส่งสัญญาณใน mTORC1 เป็นการเพิ่มกระบวนการ Autophagy ของเซลล์ให้เพิ่มการย่อยสลายโครงสร้างภายในเซลล์ที่เสื่อมสภาพ เพื่อนาสารต่างๆ กลับมาใช้ใหม่ ทาให้เซลล์มีอัตราการตายน้อยลง (24) และจากการเพิ่มขึ้นของ autophagy ทาให้เกิดการเหนี่ยวนาการย่อยสลายออร์แกเนลล์ที่ผิดปกติซึ่งสะสมอยู่ภายในเซลล์ แทนที่การตายแบบ apoptosis ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ 25 μg/mL สารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย ต่อการแสดงออกของ Bcl2, mTOR และphospho- mTOR เมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ MPP+ และกลุ่ม10 μg/mL สารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย แสดงให้เห็นว่า 25 μg/mL สารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม ที่สามารถยับยั้งการส่งสัญญาณผ่านวิถี mTOR โดยเพิ่มกระบวนการ Autophagy แทนการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ประสาทได้ ในขณะที่ความเข้มข้น 10 μg/mL สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายไม่มีผลต่อการลดการแสดงออกของ Bcl 2, mTOR และ phosphor- mTOR

จากหลักฐานงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า กระทงลาย (Celastrus paniculatus) ช่วยป้องกันการเกิด Cytotoxicity ที่เกิดจาก t-BHP และ LDH โดยช่วยลดความเสียหายของ Mitochondrial จากการสูญเสีย mitochondrial membrane potential ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ลดการปล่อย Cytochrom-c และ HSP-70 จึงช่วยลดการเกิด apoptosis และยังช่วยฟื้นฟูสารต้านอนุมูลอิสระ Superoxide dismutase (SOD) และ Catalase (CAT) (12) และยังมีการทดสอบในหนูทดลองถึงประสิทธผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย ต่อความจาในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนาให้มี ภาวะ Oxidative stress ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H2O2) พบว่าหนูที่รักษาด้วยสารสกัดจากเมล็ดของกระทงลาย มีพฤติกรรมการเรียนรู้และความจาที่ดีขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา (19)

จากผลการทดลองสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะ Oxidative stress ที่เกิดจากพิษของ MPP+ ในเซลล์ประสาท SH-SY5Y พบว่ามีผลช่วยป้องกันการตายของเซลล์ได้ ซึ่งมีหลักฐานทางงานวิจัยที่แสดงถึงการใช้ เซลล์ประสาท SH-SY5Y เป็นแบบจาลองในการศึกษาการตายของเซลล์ประสาทโดปามีน ที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคพาร์กินสัน เนื่อง จาก SH-SY5Y cell line มีคุณสมบัติคล้ายคลึงเซลล์ประสาท และสามารถเปลี่ยนสภาพไปเป็นDopaminergic neurons และ Serotonergic neurons ได้เมื่อถูกเหนี่ยวนาด้วย Retinoic acid (29,31) และมีการศึกษาพบว่า MPTP เป็น neurotoxins ที่เชื่อมโยงกับรูปแบบของโรคพาร์กินสันในสัตว์ทดลองและมนุษย์อย่างชัดเจน และเป็นรูปแบบที่ใช้ศึกษากันมากที่สุด (34) ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้ สารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย มีผลช่วยป้องกันการตายของเซลล์ประสาทโดปามีน จากพิษของ MPP+ ที่อาจก่อให้เกิดโรคพาร์กินสันได้

นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย สามารถยับยั้งการทางานของวิถี mTOR ได้ ซึ่งมีการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้เกี่ยวกับ mTOR pathway ต่อการส่งสัญญาณในระบบประสาท เนื่องจากการส่งสัญญาณ mTORC1 ได้รับการยอมรับว่าเป็นตัวควบคุมที่สาคัญที่สุดของ autophagy ที่เกี่ยวข้องกับโรค neurodegenerative โดยการยับยั้งการทางานของ mTORC1 จะไปเพิ่ม กระบวนการ autophagy ในระบบประสาท ซึ่งมีความสาคัญมากเนื่องจากเซลล์ประสาทไม่มีการแบ่งเซลล์มาทดแทนเซลล์เดิมที่อายุมากขึ้น จึงมีโครงสร้างของเซลล์ที่เสียหายมากขึ้นประกอบกับประสิทธิภาพของ autophagy ที่ลดลงตามอายุ ทาให้เกิดการสะสมโปรตีนที่ผิดปกติมากขึ้นเรื่อยๆ และเกิดการตายของเซลล์ประสาท (32) ซึ่งมีข้อมูลสนับสนุนว่าการทางานของ autophagy มีการลดลงในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางระบบ ประสาทในกลุ่ม neurodegenerative disease เช่น โรค Alzheimer และโรค Parkinson ที่มีการตายของเซลล์ประสาท ซึ่งเป็นลักษณะเด่นที่พบในคนสูงอายุ (34) ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายสามารถช่วยลดความเสี่ยงที่อาจก่อให้เกิดโรคพาร์กินสัน จากการยับยั้งการส่งสัญญาณในวิถี mTOR ได้

สรุป

จากการทำงานวิจัยในครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากเมล็ดของกระทงลาย ช่วยลดการแสดงออกของ Bcl2 ในระบบที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟต ช่วยลดการแสดงออกของ phospho-mTOR และ total mTOR ในขณะที่ความเข้มข้น 10 μg/ml ไม่มีผลต่ออัตราการมีชีวตของเซลล์ และการแสดงออกโปรตีนในวิถี mTOR แสดงให้

เห็นว่า 25 μg/ml เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการใช้ยับยั้งและป้องกัน ภาวะความเป็นพิษจากการได้รับ MPP+ ในแบบจำลองโรคพาร์กินสัน

ผลผลิต (Output)

- องค์ความรู้ด้านประสาทวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดของกระทงลายในภาวะที่ได้รับสารพิษ
- Oral present: สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายปกป้องเซลล์ประสาทจากความเป็นพิษของ MPP+ ในแบบจำลองโรคพาร์กินสัน งานประชุม ประชุมวิชาการระดับชาติเครือข่ายวิจัยสถาบันอุดมศึกษาทั่วประเทศ ครั้งที่ 13 โรงแรมเชียงใหม่แกรนด์วิว 20-22 พฤศจิกายน 2562
- ตีพิมพ์วารสาร พัฒนาชุมชนและคุณภาพชีวิตที่ดี (TCI) เรื่อง “สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายปกป้องเซลล์ประสาทจากความเป็นพิษของ MPP+ ในแบบจำลองโรคพาร์กินสัน”

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย(NRMS)... 23469..... สัญญาเลขที่.....16/2562.....
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. .....2562..... มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ.....การพัฒนาสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายเพื่อใช้ในการส่งเสริมการสร้างความจำ และป้องกันรักษาภาวะความจำเสื่อม.....

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน (~~อ./ดร./ผศ./~~รศ.~~/ศ.~~).....ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์.....

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี).....๑ ตุลาคม 2561.....ถึงวันที่ (วัน/เดือน/ปี).....30 ก.ย. 2562....

ระยะเวลาดำเนินการ.....1.....ปี ..... เดือน ตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี).....๑ ตุลาคม 2561.....

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) .....235,750..... บาท เมื่อวัน เดือน ปี.....10 ม.ค. 2562.....

งวดที่ 2 (40%) .....188,600..... บาท เมื่อวัน เดือน ปี.....20 ก.ค. 2562.....

งวดที่ 3 (10%) .....-..... บาท เมื่อวัน เดือน ปี.....-.....

รวม .....424,350.....

<u>รายจ่าย</u>

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	40,000	40,000	0
2. ค่าจ้าง	-	-	-
3. ค่าวัสดุ	284,350	300,350	-16,000
4. ค่าใช้สอย	100,000	84,000	16,000
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ (โปรดระบุเป็นข้อย่อย) -ค่าสาธารณูปโภค	47,150	47,150	0
รวม	471,500	471,500	0

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด

1. ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) .....นางสาวศิริพร จำเนียรสวัสดิ์.....

ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss. Siriporn Chamniansawat.....

2. หน่วยงานที่สังกัด .....คณะสหเวชศาสตร์.....

ตำแหน่งวิชาการ.....รองศาสตราจารย์ (ประสาทวิทยาศาสตร์).....

สถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก คณะ.....สหเวชศาสตร์.....

โทรศัพท์ (ที่ทางาน).....038-103166.....โทรสาร .....038-393497.....

Email:.....Siripornc@buu.ac.th.....

3.ประวัติการศึกษา

วุฒิ	ปี พ.ศ. ที่สำเร็จ	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ
ปร.ด. (กายวิภาคศาสตร์ และชีววิทยาโครงสร้าง)	2552	มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย
วท.ม. (กายวิภาคศาสตร์)	2549	มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย
วท.บ. (วิทยาศาสตร์การแพทย์)	2547	มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศไทย

4. ผลงานวิจัย

1. Sawatdiyaphanon C, Thongon N, Chamniansawat S. (2019). Age-related decrease in aromatase and estrogen receptor (ERalpha, ERbeta, GPR30) expression on female rat hippocampus: protective effect of memory impairment during aging. Bioscience Research. 2019 (16), 2889-2896
2. Thongon N, Chamniansawat S. (2018). The inhibitory role of purinergic P2Y receptor on Mg2+ transport across intestinal epithelium-like Caco-2 monolayer. J Physiol Sci. Jul 21. doi: 10.1007/s12576-018-0628-2.
3. Chamniansawat, S. & Sawatdiyaphanon, C. (2018). Age-Related Memory Impairment Associated With Decreased Endogenous Estradiol in the Hippocampus of Female Rats. International Journal of Toxicology, 37(3), 207-215.
4. Chamniansawat, S. and Chongthammakun, S. (2014). Inhibition of hippocampal estrogen synthesis by reactive microglia leads to down-regulation of synaptic protein expression. Neurotoxicology. 46, 25-34.
5. Chamniansawat, S. & Chongthammakun, S. (2012). A priming role of local estrogen on exogenous estrogen-mediated synaptic plasticity and neuroprotection. Exp Mol Med, 44(6), 403-411.

6. Chamniansawat, S. & Chongthammakun, S. (2010). Genomic and non-genomic actions of estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cells. Neurosci. Lett., 470(1), 49-54.
7. Chamniansawat, S. & Chongthammakun, S. (2009). Estrogen stimulates activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc) expression via the MAPK- and PI-3K-dependent pathways in SH-SY5Y cells. Neurosci. Lett., 452(2), 130-135.

Full Proceedings

1. Chamniansawat S. The Effect of Okadaic acid on the synthesis of estrogen in hippocampal neurons. Proceedings of the Anatomy Association of Thailand 2014; 37: 132-133.
2. Chamniansawat S and Chongthammakun S. Prolong and high level of cortisol exposure activates microglial HAPI-cells. Proceedings of the Anatomy Association of Thailand 2010; 33: 131-132.
3. Chamniansawat S and Chongthammakun S. Nongenomic effect of estrogen via ERbeta and MAPK signaling pathway on activity-regulated cytoskeleton associated protein expression in SH-SY5Y cells. Proceedings of the Anatomy Association of Thailand 2009; 32: 29-30.
4. Chamniansawat S. and Chongthammakun S. (2010). Modulation of microglia in response to prolonged exposure to high glucocorticoid level, implication from an in vitro model of chronic depression. J. Neurochem. 115 (Suppl1), 19.

Conference abstracts

1. Siriporn Chamniansawat. The effect of endogenous estradiol on memory impairment in female rats. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว ครั้งที่ 18. โรงแรมเดอะรีเจ้นท์ ชะอำบีช รีสอร์ท หัวหิน ชะอำ เพชรบุรี. วันที่ 9-11 มกราคม 2562
2. Chattraporn Sawatdiyaphanon, Thiphakorn Poom-am, Maneedao Kulchumpoo, Yuparat Budcha, Narongrit Thongon, Siriporn Chamniansawat. Sex Steroid Hormone Receptors Expression in Aging Female Rat Brain. The 41th Annual Conference of Anatomy Association of Thailand. Dusit Thani Hua Hin, Cha-am, Phetchaburi, Thailand .May 23-25, 2018 (2561).
3. Siriporn Chamniansawat. Steroidogenesis and synaptic plasticity in aged hippocampus. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 15. โรงแรมเดอะรีเจ้นท์

ชะอำบีช รีสอร์ท หัวหิน ชะอำ เพชรบุรี. วันที่ 6-8 มกราคม 2559. (ได้รางวัลนำเสนองานวิจัยดีเยี่ยม)

4. Peerachai Seemuang and Siriporn Chamniansawat. The biosynthesis of estrogen in aged hippocampus. The 38th Annual Conference of Anatomy Association of Thailand, A-ONE the Royal Cruise Hotel, Pattaya, Thailand. June 24-26, 2015 (2558).
5. Nasisorn Suksridechacin and Siriporn Chamniansawat. The expression of steroid acute regulatory protein in aged rat brain. The 38th Annual Conference of Anatomy Association of Thailand, A-ONE the Royal Cruise Hotel, Pattaya, Thailand. June 24-26, 2015 (2558).
6. ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์. ผลของพิษท้องร่วงจากอาหารทะเลต่อกระบวนการสร้างความจำ. การประชุมใหญ่โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาครั้งที่ 3. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช จังหวัดนครศรีธรรมราช. 9-11 มีนาคม 2558.
7. Siriporn Chamniansawat. Microglia activation inhibits local hippocampal estrogen-mediated memory formation. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 10. โรงแรมเดอะรีเจ้นท์ ชะอำบีช รีสอร์ท หัวหิน ชะอำ เพชรบุรี. 16-18 ตุลาคม 2556.
8. Prateep Amonruttanapun, Siriporn Chamniansawat, and Sukumal Chongthammakun. Effect of high cortisol on microglial cell morphology and phagocytosis in vitro. The 36th Annual Conference of Anatomy Association of Thailand, Chiang Mai Grandview Hotel, Chiang Mai, Thailand. December 6-8, 2012.
9. Siriporn Chamniansawat and Sukumal Chongthammakun. Prolonged High Dose Cortisol Exposure Increases COX-2 and iNOS Expression in HAPI Microglial Cells. Mahidol - Kyoto Universities International Symposium, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Thailand. April 22-23, 2010.
10. Siriporn Chamniansawat and Sukumal Chongthammakun. The effects of genistein on okadaic acid-induced hyperphosphorylated tau protein in SH-SY5Y cells in vitro. The 13th TNS Conference, Phisanilok, Thailand. July 28-29, 2007 (ได้รางวัลนำเสนองานวิจัยดีเยี่ยม)
11. Siriporn Chamniansawat and Sukumal Chongthammakun. Nongenomic effect of estrogen via ERbeta and MAPK signaling pathway on activity-regulated cytoskeleton associated protein expression in SH-SY5Y cells. The 32th Annual Conference of Anatomy Association of Thailand, Novotel Rim Pae, Rayong, Thailand, April 29 - May 1, 2009 (ได้รางวัลนำเสนองานวิจัยดีเยี่ยม)

บทความวิชาการ

Chamniansawat, S. (2013). The role of hippocampal estrogen and gonadal estrogen on hippocampal neuronal function. Burapha Science Journal. 18, 234-239.

เอกสารอ้างอิง

1. คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่องบัญชียาจากสมุนไพร แนบท้ายประกาศบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2559. ประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 133 ตอนพิเศษ 86 ง, ลงวันที่ 12 เมษายน, หน้า 11 2559.
2. สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. พรรณไม้พื้นบ้านอีสาน เล่ม 1. มหาสารคาม: มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. หน้า 83. 2544.
3. Arendt T. (2009). Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. 118(1): 167-179.
4. Aroma N, Pandey-Rai S. (2014). GC-MS analysis of the essential oil of Celastrus paniculatus Willd: Seeds and antioxidant, anti-inflammatory study of its various solvent extracts. Industrial Crops and Products 61, 345-351.
5. Bhagya V, Christofer T, Shankaranarayana Rao BS. (2016). Neuroprotective effect of Celastrus paniculatus on chronic stress-induced cognitive impairment. Indian J Pharmacol. 48(6): 687-693.
6. Bhanumathy M, Harish MS, Shivaprasad HN, Sushma G. (2010) Nootropic activity of Celastrus paniculatus seed. Pharmaceutical Biology 48 (3): 324–327.
7. Burke SN and Barnes CA. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. Nat Rev Neurosci.7, 30-40.
8. Chamniansawat S, Chongthammakun S. (2010). Genomic and non-genomic actions of estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cell. Neurosci Lett. 470: 49–54.
9. Chen K, Lu Y, Liu C, Zhang L, Fang Z, Yu G. (2018) Morroniside prevents H2O2 or Aβ1-42-induced apoptosis via attenuating JNK and p38 MAPK phosphorylation. Eur J Pharmacol. 5; 834: 295-304.

10. Dong W, Cheng S, Huang F, Fan W, Chen Y, Shi H, He H. (2012) Mitochondrial dysfunction in long-term neuronal cultures mimics changes with aging. Neurotox Res. 22(3): 231-248.

11. Geng YQ, Guan JT, Xu XH, Fu YC. (2010) Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons.BiochemBiophys Res Commun. 11;396(4): 866-869.

12. Grimm MO, Mett J, Stahlmann CP, Grösgen S, Haupenthal VJ, Blümel T, Hundsdörfer B, Zimmer VC, Mylonas NT, Tanila H, Müller U, Grimm HS, Hartmann T. (2015) APP intracellular domain derived from amyloidogenic β- and γ-secretase cleavage regulates neprilysin expression. Front Aging Neurosci. 7: 77.

13. Hasselmo ME. (2006) The Role of Acetylcholine in Learning and Memory. Curr Opin Neurobiol. 16 (6): 710–715.

14. Hiester BG, Becker MI, Bowen AB, Schwartz SL, Kennedy MJ (2018). Mechanisms and Role of Dendritic Membrane Trafficking for Long-Term Potentiation. Front Cell Neurosci. 30;12: 391.

15. Honkura N, Matsuzaki M, Noguchi J, Ellis-Davies GC, Kasai H. (2008) The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. Neuron 57, 719–729.

16. Kandel ER, Schwartz JH. (1982) Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. Science. 218: 433–443.

17. Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. Trends Neurosci. 33: 121–129.

18. Kim MJ, Oh SJ, Park SH, Kang HJ, Won MH, Kang TC, Park JB, Kim JI, Kim J, Lee JY. (2007) Neuronal loss in primary long-term cortical culture involves neurodegeneration-like cell death via calpain and p35 processing, but not developmental apoptosis or aging. Exp Mol Med. 39(1): 14-26.

19. Korobova F, Svitkina T. (2010). Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. MolBiol Cell. 21: 165-176.

20. Kulkarni YA, Agarwa S, and Garud MS. (2015) Effect of Jyotishmati (Celastruspaniculatus) seeds in animal models of pain and inflammation. J Ayurveda Integr Med. 6(2): 82–88.

21. Kumar KH, Venuprasad MP, Jayashree GV, Rachitha P, Krupashree K, Pal A, Khanum F. (2015) Celastrus paniculatus Willd. mitigates t-BHP induced oxidative and apoptotic damage in C2C12 murine muscle cells. Cytotechnology 67: 955–967.

22. Lamprecht R, LeDoux J. (2004). Structural plasticity and memory. Nat Rev Neurosci. 5(1): 45–54.

23. Nalini K, Karanth KS, Rao A, Aroor AR. (1995) Effects of Celastrus paniculatus on passive avoidance performance and biogenic amine turnover in albino rats. J Ethnopharmacol. 47(2): 101-108.

24. Nicholson DA, Yoshida R, Berry RW, Gallagher M, and Geinisman Y. (2004) Reduction in size of perforated postsynaptic densities in hippocampal axospinous synapses and age-related spatial learning impairments. J Neurosci. 24: 7648-7653.

25. Nunomura A, Moreira PI, Castellani RJ, Lee HG, Zhu X, Smith MA, Perry G. (2011) Oxidative damage to RNA in aging and neurodegenerative disorders. Med Sci Monit. 17(4): BR91-96.

26. Penzes P, Cahill M E, Jones KA, Vanleeuwen JE, Woolfrey KM (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. Nat. Neurosci. 14: 285–293.

27. Rapp PR, Deroche PS, Mao Y, and Burwell RD. (2002) Neuron number in the parahippocampal region is preserved in aged rats with spatial learning deficits. Cereb Cortex. 12: 1171-1199.

28. Rasmussen T, Schliemann T, Sorensen JC, Zimmer J and West MJ. (1996) Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons. Neurobiol. Aging 17: 143–147.

29. Rust MB, Gurniak CB, Renner M, Vara H, Morando L, Gorlich A, et al. (2010) Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. EMBO J. 29: 1889–1902.

30. Salazar SV, Cox TO, Lee S, Brody AH, Chyung AS, Haas LT, Strittmatter SM. (2019) Alzheimer's Disease Risk Factor Pyk2 Mediates Amyloid-β-Induced Synaptic Dysfunction and Loss. J Neurosci. 39(4): 758-772.

31. Seshadri M, Mazi-Kotwal N, Aguis M. (2013) Reversible mild cognitive impairment--a case report.PsychiatrDanub. 25 Suppl 2: S358-361.

32. Steward O, Worley P. (2002) Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: role in synaptic plasticity and memory consolidation? Neurobiol Learn Mem. 78(3): 508–527.

33. Susikumar P, Sharathna P. (2018) Dihydro-β- agarofuran sesquiterpenoids from the seeds of Celastrus paniculatus Willd. and their α-glucosidase inhibitory activity. Phytochemistry Letters. 26: 1-8.

34. Wang L, Zhang Z, Hou L, Wang Y, Zuo J, Xue M, Li X, Liu Y, Song J, Pan F, Pu T (2019). Phytic acid attenuates upregulation of GSK-3β and disturbance of synaptic vesicle recycling in MPTP-induced Parkinson's disease models. Neurochem Int. 129: 104507.