



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลของสารสกัดพรมมิ และสารสำคัญของพรมมิต่อการเสื่อมของเซลล์
ประสาท และการบกพร่องความจำที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์

The protective effects of *Bacopa Monniera* and its instituent against
neurodegeneration and cognitive deficits mediated by beta amyloid peptide

ผศ. ดร. อรรระวี คงสมบัติ และคณะ

14 ธันวาคม 2554

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลของสารสกัดพรมมิ และสารสำคัญของพรมมิต่อการเสื่อมของเซลล์
ประสาท และการบกพร่องความจำที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. ผศ. ดร. อรรระวี คงสมบัติ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. รศ.ดร. สุทิสรา ถาน้อย คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
3. รศ.ดร.เสมอ ถาน้อย คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร งบประมาณแผ่นดินประจำปี งบประมาณ 2553 ในการดำเนินการวิจัย คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร สำหรับสถานที่ และเครื่องมือสำหรับการวิจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อ.ประธาน วงตาหล้า และนิสิตห้องปฏิบัติการ Molecular neurobiology ทุกๆ คน

ผศ.ดร.อรระวี คงสมบัติ และคณะ

บทคัดย่อ

พรมมีคือพืชสมุนไพรของประเทศอินเดียโบราณและได้ถูกนำมาใช้รักษาโรคมานานหลายทศวรรษ คุณสมบัติที่สำคัญในการรักษาโรคของพรมมี ได้แก่ความสามารถเพิ่มการเรียนรู้และความจำของมนุษย์และสัตว์ทดลอง การการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดพรมมีต่อการป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์และเปรียบเทียบกับผลของยาอะริเซพและสารสกัดแปะก๊วย สัตว์ทดลองคือหนูถีบจักรเพศผู้ได้ถูกแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัวดังนี้คือ(1)กลุ่มควบคุม; (2)กลุ่มรับประทานตัวทำละลายพีจี; (3) กลุ่มรับประทานพีจีและฉีดน้ำเกลือเข้าไปที่โพรงสมอง; (4) กลุ่มรับประทานพีจี; (5) กลุ่มรับประทานพรมมี; (6) กลุ่มรับประทานพรมมีเข้มข้น; (7) กลุ่มรับประทานสารสกัดแปะก๊วยและกลุ่มที่(8) กลุ่มรับประทานยาอะริเซพ สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 5 ถึงกลุ่มที่ 8 นั้นได้รับยาหรือสารสกัดของสมุนไพรในขนาด 40 6.67 100 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 4 ถึงกลุ่มที่ 8 ถูกเหนี่ยวนำให้มีการเสื่อมของเซลล์ประสาท โดยการฉีดเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปในโพรงสมอง ผลของสารสกัดพรมมีต่อการเรียนรู้และความจำได้ถูกประเมินด้วยการวัดด้วยวิธีมอร์ริสวอเตอร์เมซ และโนเวลออปเจ็คเรคคอกนิชั่น ผลการวิจัยพบว่า สัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์นั้นมีความจำที่ลดลง ($p < 0.05$) และเมื่อสัตว์ทดลองได้รับยาหรือสารสกัดสมุนไพรแล้วพบว่าสัตว์ทดลองมีการเพิ่มการเรียนรู้และความจำใกล้เคียงกับปกติ ผลของสารสกัดพรมมีต่อการป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาทได้ถูกวัดด้วยวิธีลิปิดเปอร์ออกซิเดชันและการย้อมเซลล์ประสาทด้วยฮีมาทอกซิลินอีโอซิน และอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ โดยใช้ จีเอฟเอพี เดฟพี เอเบต้า แอนติบอดี ผลการวิจัยพบว่าสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์นั้นมีระดับของลิปิดเปอร์ออกซิเดชันเพิ่มมากขึ้น รวมถึงมีจำนวนของเซลล์ประสาทที่ถูกทำลายมากขึ้น ($p < 0.05$) และเมื่อสัตว์ทดลองได้รับยาหรือสารสกัดสมุนไพรแล้วพบว่าสัตว์ทดลองมีระดับของลิปิดเปอร์ออกซิเดชันที่ลดลงและมีจำนวนเซลล์ประสาทที่มากขึ้น ผลการวิจัยครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดพรมมีสามารถป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์และให้ผลใกล้เคียงกันกับยาอะริเซพและสมุนไพรแปะก๊วย ดังนั้นสารสกัดพรมมีน่าจะถูกนำมาพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจที่นำมาใช้เป็นอาหารเสริมในการป้องกันและรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการสูญเสียความจำได้

คำสำคัญ: พรมมี, การเสื่อมของเซลล์ประสาท การสูญเสียความจำ

Abstract

Bacopa monnieri (L.) Wettst. (*B. monnieri*; BM), Indian medicinal plant, has been used in the traditional Ayurveda for centuries. It has been suggested that an alcoholic extract of *B. monnieri* (BME) can improve learning and memory and protect cell death of cortical cell culture induced by amyloid toxicity. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the improvement of BME on learning and memory in amnesia mice induced by beta amyloid ($A\beta_{25-35}$) peptide. Male ICR mice were divided into 8 groups (n= 7) such as (1) control; (2) propylene glycol (PG); (3) PG and normal saline (NSS); (4) PG and $A\beta$; (5) BME (40 mg/kg) and $A\beta$; (6) SEE (6.67 mg/kg) and $A\beta$; (7) *Ginkgo biloba* (100 mg/kg) and $A\beta$ and (8) Aricept (0.2 mg/kg) and $A\beta$. Animals were orally given either extracts or drugs for a period of 2 weeks before and 1 week after intraventricular injection (i.c.v) of NSS or $A\beta_{25-35}$ peptides. The Morris water maze test (MWM) and novel object recognition (NOR) were employed for testing learning, memory. The results of MWM, the $A\beta_{25-35}$ injected group showed significantly longer escape latency than that of the NSS injected group ($p < 0.05$) while the mice received BME, SEE, *Ginkgo biloba* or Aricept showed significantly shorter escape latency than the $A\beta_{25-35}$ injected group ($p < 0.05$). For NOR test, the mice received BME, SEE, *Ginkgo biloba*, and Aricept showed significantly higher percentage of recognition index when compare to the $A\beta_{25-35}$ injected group ($p < 0.05$). Furthermore, the protective effects of BME against neurodegeneration were evaluated by using lipid peroxidation and Immunohistochemistry techniques such as GFAP APP A-beta and H&E staining. The results reveal that lipid peroxidation levels of the $A\beta_{25-35}$ injected group showed significantly higher than that of the NSS injected group ($p < 0.05$) while the mice received BME, SEE, *Ginkgo biloba* or Aricept showed significantly lower levels than the $A\beta_{25-35}$ injected group ($p < 0.05$). For the H&E results showed neuronal loss in the $A\beta_{25-35}$ injected group whereas the mice received BME, SEE, *Ginkgo biloba* or Aricept showed significantly higher neuronal density than the $A\beta_{25-35}$ injected group ($p < 0.05$). Conclusion, the administration of BME could improve the learning and memory in amnesia mice induced by $A\beta_{25-35}$ peptides as well as *Ginkgo biloba* and Aricept. Therefore, BM could be one of nootropic supplements for those elderly people suffering from dementia such as the Alzheimer's disease.

Key words: *Bacopa monnieri*; Brahmi, neurodegeneration, memory deficits

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
บทนำ (Introduction)	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	2
วัตถุประสงค์	
เนื้อเรื่อง (Main body)	5
วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)	5
ผลการวิจัย และการอภิปรายผลการวิจัย (Results and Discussion)	11
บรรณานุกรม (Bibliography)	48

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ในส่วน Cerebral cortex (Cells/1000 μm^2) ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry	26
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte (Cells/500 μm^2) ส่วนของ Hippocampus บริเวณ CA1-3ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry	29
ตารางที่ 3 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte (Cells/500 μm^2) ส่วน Hippocampus บริเวณ Dentate gyrus ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry	32
ตารางที่ 4 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท ใน ส่วน Cerebral cortex (Cells/100 μm^2) ของ สัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Amyloid precursor protein Immonohistochemistry	35
ตารางที่ 5 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท ใน ส่วน Hippocampus (Cells/50 μm^2) ของ สัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Amyloid precursor protein Immonohistochemistry	37
ตารางที่ 6 แสดงผลการวัด Optical density ในพื้นที่ 100 μm^2 ใน ส่วน Cerebral cortex ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Beta amyloid Immonohistochemistry	41
ตารางที่ 7 แสดงผลการวัด Optical density ในพื้นที่ 100 μm^2 ใน ส่วน Hippocampus ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Beta amyloid Immonohistochemistry	43

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดของการวิจัย	2
ภาพที่ 2 แสดงแผนดำเนินการวิจัย	6
ภาพที่ 3 แสดงการฉีด AB_{25-35} เข้าไปใน Lateral ventricle	3
ภาพที่ 4 แสดงการเกาะกลุ่มกันของ เบต้าอะไมลอยด์ ด้วยกำลังขยาย 4x	4
ภาพที่ 5 แสดงกราฟการฝึกสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี MWM เป็นเวลา 7 วัน	5
ภาพที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของเวลาในการว่ายน้ำหาแท่นได้น้ำ (mean $\pm$ S.E.M) ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี MWM	12
ภาพที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยของ % preference index (mean $\pm$ S.E.M) ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี NOR	14
ภาพที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยของ % recognition index (mean $\pm$ S.E.M) ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี NOR	15
ภาพที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยของเวลาที่สัตว์ทดลองเข้าไปใน Open และ Close arm	16
ภาพที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ MDA μ mole/mg tissue proteins ในสมองส่วน Cortex	17
ภาพที่ 11 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ MDA μ mole/mg tissue proteins ในสมองส่วน Hippocampus	17
ภาพที่ 12 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 ด้วยกำลังขยาย 4x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม	19
ภาพที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex บริเวณชั้นที่ 4/5	19
ภาพที่ 14 เซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 4/5 ด้วยกำลังขยาย 4x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม	20
ภาพที่ 15 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex บริเวณชั้นที่ 4/5	20
ภาพที่ 16 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 6 ด้วยกำลังขยาย 4x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม	21
ภาพที่ 17 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex บริเวณชั้นที่ 6	21

ภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 18 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 1 ด้วย กำลังขยาย 20x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม	21
ภาพที่ 19 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1	22
ภาพที่ 20 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 2 ด้วย กำลังขยาย 20x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม	22
ภาพที่ 21 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA2	23
ภาพที่ 22 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 3 ด้วย กำลังขยาย 20x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม	23
ภาพที่ 23 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA3	24
ภาพที่ 24 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ Dentate gyrus ด้วยกำลังขยาย 20x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม	24
ภาพที่ 25 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณDentate gyrus	25
ภาพที่ 26 แสดงผลการย้อม Astrocyte ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry ด้วย กำลังขยาย 40 เท่า	26
ภาพที่ 27 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Cerebral cortex	27
ภาพที่ 28 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของ เซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Cingulum	28
ภาพที่ 29 แสดงผลการย้อม Astrocyte ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry ด้วย กำลังขยาย 20 เท่า	29
ภาพที่ 30 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของ เซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus	30
ภาพที่ 31 แสดงผลการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ด้วยกล้องกำลังขยาย 10 เท่า	34

ภาพ (ต่อ)	หน้า
ภาพที่ 32 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3	35
ภาพที่ 33 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 4/5	36
ภาพที่ 34 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 6	36
ภาพที่ 35 แสดงผลการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus	37
ภาพที่ 36 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1	38
ภาพที่ 37 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 2	38
ภาพที่ 38 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 3	39
ภาพที่ 39 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ Dentate gyrus	39
ภาพที่ 40 แสดงผลการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ด้วยกำลังขยาย 10 เท่า	40
ภาพที่ 41 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3	41
ภาพที่ 42 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 4/5	42
ภาพที่ 43 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 6	42

ภาพ (ต่อ)	หน้า
ภาพที่ 44 แสดงผลการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมอง ส่วน Hippocampus บริเวณ CA 1	43
ภาพที่ 45 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1	44
ภาพที่ 46 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA2	44
ภาพที่ 47 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA3	44
ภาพที่ 48 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ Dentate gyrus	45
ภาพที่ 49 แสดงผลการย้อม Lipofuscin ด้วย Sudan Black B ของสมองส่วน Cortex	46
ภาพที่ 50 แสดงผลการย้อม Lipofuscin ด้วย Sudan Black B ของสมองส่วน Hippocampus	47