

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของ piperine ที่มีต่ออารมณ์ซึมเศร้าและ
ปริมาณของสารสื่อประสาทและโปรตีนที่เกี่ยวข้อง
กับการเจริญของเซลล์ประสาท
ในสมองของหนูขาวเล็ก

(Effects of piperine on depression and
neurotransmitters and neurotrophic
proteins in mouse brains)

โดย ดร.ธนศักดิ์ เทียกทอง และคณะ

พฤษภาคม 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของ piperine ที่มีต่ออารมณ์ซึมเศร้าและปริมาณของ
สารสื่อประสาทและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของ
เซลล์ประสาทในสมองของหนูขาวเล็ก

โดย

ดร.ธนศักดิ์ เทียกทอง¹

รศ.ดร.นันทกา โกรธนา²

¹ ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

² ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้บริหาร คณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และผู้ช่วยวิจัยทุกท่าน ทั้งจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวร และคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่มีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยนี้ดำเนินไปอย่างราบรื่นและสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พุทธศักราช 2554 จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

บทคัดย่อ

ภาวะซึมเศร้าเป็นความผิดปกติทางอารมณ์ที่พบมากโดยมีอาการสำคัญ ได้แก่ การแสดงอารมณ์ลดลง ซึมเศร้า และนอนไม่หลับ ในปัจจุบันมียาที่ใช้รักษาทั้งยารักษาอารมณ์ซึมเศร้าซึ่งเป็นยาแผนปัจจุบันและยาสมุนไพร piperine เป็นสาร alkaloid ที่พบในพืชตระกูลพริกไทย และจากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า piperine มีฤทธิ์ลดอารมณ์ซึมเศร้า วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการลดอารมณ์ซึมเศร้าของ piperine ในหนูขนาดเล็ก รวมทั้งค้นหากลไกที่เป็นไปได้ซึ่งสัมพันธ์กับการลดอารมณ์ซึมเศร้า reserpine ขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ถูกใช้เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดอารมณ์ซึมเศร้าในการศึกษานี้ หนูขนาดเล็กได้รับ fluoxetine ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ piperine ขนาด 5, 10 และ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากได้รับ piperine การหาปริมาณของ cyclic AMP response element binding protein (CREB) และ phosphor CREB ในสมองหนูขนาดเล็ก ทำโดยวิธี Western blot ส่วนการหาระดับของ dopamine ทำโดยใช้ high performance liquid chromatography (HPLC) ผลการศึกษาพบว่า piperine ลดเวลาในการไม่เคลื่อนไหวของหนูขนาดเล็กเช่นเดียวกับ fluoxetine ซึ่งผลดังกล่าวของ piperine ไม่สัมพันธ์กับขนาดที่หนูขนาดเล็กได้รับ ในการหาปริมาณ CREB and phosphor CREB ปรากฏว่าไม่พบการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวในหนูขนาดเล็กทุกกลุ่ม ซึ่งผลที่เกิดขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากความผิดพลาดในกระบวนการศึกษาโดยวิธี Western blot อย่างไรก็ตามพบว่า reserpine, fluoxetine และ piperine ทุกขนาดที่ใช้สามารถลดระดับของ dopamine ในสมองของหนูขนาดเล็กอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาทั้งหมดชี้ให้เห็นว่า piperine มีฤทธิ์ลดอารมณ์ซึมเศร้าและกลไกที่เกี่ยวข้องอาจสัมพันธ์กับ dopamine เช่นเดียวกับ fluoxetine การศึกษาต่อไปควรทำการศึกษากลไกอื่นๆที่เป็นไปได้ในการลดอารมณ์ซึมเศร้าของ piperine

คำสำคัญ : piperine, dopamine, อารมณ์ซึมเศร้า, forced swimming test, CREB, phosphor CREB

Abstract

Depression is the most common mental disorder which has characteristics of low mood, sadness and insomnia. Many medicines have been used for treatment of depression including antidepressant drugs and medicinal plants. Piperine is an alkaloid in the fruits of black pepper, long pepper and other piper species and previous studies showed that piperine exhibited antidepressant effect. The aim of this study was to investigate antidepressant-like effects of piperine in mice and its possible mechanism. Reserpine (0.1 mg/kg) was used as depressive inducer and mice were given fluoxetine (10 mg/kg) or piperine intraperitoneally at various doses ranging from 5, 10 and 20 mg/kg after piperine administration for 2 weeks. Mice were forced to swim for 6 minutes before study commencing and after 2-week of piperine administration. Cyclic AMP response element binding protein (CREB) and phosphor CREB protein expression and dopamine level in the mouse brains were determined by Western blot technique and high performance liquid chromatography (HPLC), respectively. The result showed that piperine reduced immobility time as well as fluoxetine and this effect of piperine was dose-independence. Unfortunately, CREB and phosphor CREB protein expression was not exhibited in all groups of mice. This error might be involved with failures in the process of Western blot technique. However, reserpine, fluoxetine and all doses of piperine significant decreased dopamine level in the mouse brains. The results suggested that piperine showed antidepressant effect and the effect might be involved with a mechanism which is related to dopamine as fluoxetine does. Further study will need to investigate other possible mechanisms of piperine which lead to antidepressant-like effect.

Keywords : piperine, dopamine, depression, forced swimming test, CREB, phosphor CREB

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	III
บทคัดย่อ	IV
Abstract	V
สารบัญ	VI
Executive Summary	1
บทนำ	4
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	6
ผลการศึกษา	9
อภิปรายและสรุปผลการศึกษา	12
เอกสารอ้างอิง	14

Executive Summary

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ความผิดปกติของอารมณ์ซึมเศร้า (major depressive disorder) เป็นความผิดปกติทางอารมณ์ที่เกิดขึ้นได้มากและเป็นความผิดปกติทางจิตเวชที่พบได้เป็นอันดับต้นๆในประเทศไทย จากการสำรวจความชุกของโรคจิตเวชระดับชาติ ในปี พ.ศ.2546 พบว่าคนไทยถึง 1.3 ล้านคน มีอาการของความผิดปกติของอารมณ์ซึมเศร้า และผู้หญิงมีความเสี่ยงต่อการเกิดความผิดปกติมากกว่าผู้ชาย (สถาบันวิจัยประชากรและสังคม มหาวิทยาลัยมหิดล, 2550) และจากรายงานของกรมสุขภาพจิตเกี่ยวกับจำนวนผู้ป่วยทางสุขภาพจิตของประเทศไทยในปี พ.ศ.2550 พบว่าผู้ป่วยอารมณ์ซึมเศร้ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ปี พ.ศ.2540 และมีจำนวนมากเป็นอันดับต้นจากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด โดยอัตราต่อแสนประชากรผู้ป่วยทางสุขภาพจิตในปี พ.ศ.2550 เท่ากับ 196.51 (กองแผนงาน กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข, 2550) ความบกพร่องทางร่างกายและทางสังคมที่เกิดจากความผิดปกติของอารมณ์ซึมเศร้าจะเกิดขึ้นอย่างมาก ความผิดปกติของอารมณ์ซึมเศร้าก่อให้เกิดปัญหาต่อตัวผู้ป่วยเองและต่อสังคม นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายและภาระในการดูแลผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของอารมณ์ซึมเศร่ายังคงอยู่ในระดับสูง (Saarni et al., 2007)

ในปัจจุบันมียาที่ใช้ในการรักษาอารมณ์ซึมเศร้าอยู่หลายกลุ่มด้วยกัน ได้แก่ ยารักษาอารมณ์ซึมเศร้าในกลุ่ม tricyclic antidepressants, ยาในกลุ่ม monoamine oxidase inhibitors, ยาในกลุ่ม selective serotonin reuptake inhibitors, ยารักษาอารมณ์ซึมเศร้าชนิดใหม่ (atypical antidepressants) และยาในกลุ่ม serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors ยาเหล่านี้แม้จะให้ประสิทธิภาพในการรักษาอารมณ์ซึมเศร้า แต่การตอบสนองของผู้ป่วยมักไม่แน่นอน อีกทั้งยาหลายตัวทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ เช่น หัวใจเต้นผิดจังหวะ น้ำหนักเพิ่ม นอนไม่หลับ ความดันโลหิตสูง และสมรรถภาพทางเพศบกพร่อง เป็นต้น (Anderson et al., 2008; Mann, 2005) ทำให้ยังคงมีการพัฒนายารักษาอารมณ์ซึมเศร้าที่มีประสิทธิภาพและเกิดอาการไม่พึงประสงค์ต่อไป

สมุนไพรเป็นแหล่งหนึ่งในการศึกษาและทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพื่อพัฒนาเป็นยาในการรักษาโรคและความผิดปกติต่างๆ ในการรักษาอารมณ์ซึมเศร่าก็เช่นเดียวกัน มีรายงานการศึกษาถึงผลในการรักษาอารมณ์ซึมเศร้าในพืชสมุนไพรหลายชนิด เช่น St. John's wort, พรหมมี, ขมิ้นชัน และหมาก ซึ่งฤทธิ์ในการรักษาอารมณ์ซึมเศร้าของพืชสมุนไพรเหล่านี้ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด แต่จากการศึกษาคาดว่าอาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสารสื่อประสาทในสมองและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Zhang, 2004)

พริกไทยเป็นพืชที่พบได้มากในประเทศไทยและนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อเป็นเครื่องเทศในการปรุงอาหาร จากการศึกษาพบว่าพริกไทยมีฤทธิ์รักษาอารมณ์ซึมเศร้า โดยสารภายในพริกไทยที่มีฤทธิ์ดังกล่าว ได้แก่ piperine ซึ่งเป็นสารจำพวก alkaloid (Bhutani et al., 2009; Wattanathorn et al., 2008) อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ในการรักษาอารมณ์ซึมเศร้าของ piperine ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจจะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการทำงานของสารสื่อประสาท เช่น norepinephrine และ serotonin (Lee et al., 2005)

เนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์ของยารักษาอารมณ์ซึมเศร้าเกี่ยวข้องกับการเพิ่มสารสื่อประสาทต่างๆ รวมทั้งเพิ่มปริมาณของโปรตีนต่างๆในสมอง (Belmaker et al., 2008) งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ piperine ในการรักษาอารมณ์ซึมเศร้าที่เกี่ยวข้องกับปริมาณของสารสื่อประสาทและโปรตีนเหล่านี้

วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของ piperine ที่มีต่ออารมณ์ซึมเศร้าในสัตว์ทดลอง
2. เพื่อศึกษาผลของ piperine ที่มีต่อปริมาณของ dopamine ในสมองสัตว์ทดลองที่มีอารมณ์ซึมเศร้า
3. เพื่อศึกษาผลของ piperine ที่มีต่อปริมาณของ cyclic AMP response element binding protein (CREB) และ phosphor CREB ในสมองสัตว์ทดลองที่มีอารมณ์ซึมเศร้า
4. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ที่เป็นไปได้ของ piperine ในการรักษาความผิดปกติของอารมณ์ซึมเศร้า

ทฤษฎี กรอบแนวคิด และแนวทางในการดำเนินการของแผนงานวิจัย

ความผิดปกติของอารมณ์ซึมเศร้าเป็นความผิดปกติทางอารมณ์ที่เกิดขึ้นได้มากในผู้ป่วยจิตเวช จากรายงานขององค์การอนามัยโลกระบุว่าความผิดปกติของอารมณ์ซึมเศร้าเป็นความผิดปกติทางจิตเวชที่อยู่ในอันดับต้นของความผิดปกติทางจิตเวชทั้งหมด (World Health Organization, 2001) และมักเป็นความผิดปกติที่เกิดขึ้นเรื้อรัง (Kessler et al., 2003) การเกิดความผิดปกติของอารมณ์ซึมเศร้าส่งผลกระทบในหลายๆด้าน ทั้งต่อสุขภาพโดยรวมและคุณภาพชีวิตของตัวผู้ป่วยเองและบุคคลแวดล้อม รวมทั้งส่งผลต่อเศรษฐกิจในด้านค่ารักษาพยาบาลซึ่งต้องสูญเสียเป็นจำนวนมาก (Mauskopf et al., 2009) แม้ว่าในปัจจุบันการรักษาอารมณ์ซึมเศร้าจะมีหลายวิธี ทั้งการรักษาที่ไม่ใช้ยา เช่น พฤติกรรมบำบัดและการบำบัดทางจิตสังคม และการรักษาโดยใช้ยาในกลุ่มต่างๆ แต่ประสิทธิภาพในการรักษาด้วยวิธีต่างๆ เหล่านี้ยังไม่มีความแน่นอน อีกทั้งผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของอารมณ์ซึมเศร้ามักมีอาการกลับเป็นซ้ำและต้องต่อการรักษาเป็นจำนวนมาก (Little, 2009; Paykel, 2008) ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องมาจากอารมณ์ซึมเศร้าเกิดผ่านหลากหลายกลไก ทำให้การออกฤทธิ์ของยาและการบำบัดโดยวิธีอื่นไม่ได้ผลเท่าที่ควรและไม่สามารถครอบคลุมได้ทั้งหมด (Millan, 2009) นอกจากนี้การใชยามักทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ได้มากและทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการรักษาค่อนข้างสูง (Gartlehner et al., 2008) จากสาเหตุดังกล่าวจึงมีความพยายามค้นหาสารหรือยาใหม่ๆที่มีประสิทธิภาพในการรักษาอารมณ์ซึมเศร้า สมุนไพรเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการนำมาใช้ในการรักษาอารมณ์ซึมเศร้า เนื่องจากสมุนไพรเป็นทรัพยากรที่มีอยู่มากมายในประเทศไทย และการนำสมุนไพรมาใช้ในการสนับสนุนภูมิปัญญาไทยที่มีอยู่แต่โบราณให้เกิดประโยชน์ที่คุ้มค่า

สมุนไพรที่มีการศึกษาและพบว่ามีฤทธิ์รักษาอารมณ์ซึมเศร้า ได้แก่ St. John's wort, พรมมิ, ขมิ้นชัน และหมาก (Zhang, 2004) พริกไทย เป็นสมุนไพรที่พบได้มากในประเทศไทยและเป็นสมุนไพรอีกชนิดที่มีรายงานจำนวนมากว่ามีฤทธิ์รักษาอารมณ์ซึมเศร้า สารในพริกไทยที่มีการศึกษาและพบว่ามีฤทธิ์ดังกล่าว ได้แก่ piperine ซึ่งเป็นสารจำพวก alkaloid จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า piperine ลดการเกิดอารมณ์ซึมเศร้าในสัตว์ทดลองได้ดี (Bhutani et al., 2009; Wattanathorn et al., 2008) แต่ยังไม่สามารถสรุปแน่ชัดว่า piperine สามารถลดอารมณ์ซึมเศร้าได้อย่างไร (Lee et al., 2005; Li et al., 2007) อย่างไรก็ตามกลไกการเกิดอารมณ์ซึมเศร้าเกี่ยวข้องกับการลดลงของสารสื่อประสาทในสมอง ได้แก่ norepinephrine, serotonin และ dopamine รวมทั้งมีการลดลงของโปรตีนที่ช่วยส่งเสริมการเจริญและการทำงานของสมอง ได้แก่ cyclic AMP response element binding protein (CREB) และ brain derived neurotrophic factor (BDNF) (Belmaker et al., 2008) การใช้ยารักษาอารมณ์ซึมเศร้ามักมีผลให้สารสื่อประสาทและโปรตีนเหล่านี้มีระดับที่เพิ่มขึ้น (Racagni & Popoli, 2008) ดังนั้นการศึกษากลไก

การออกฤทธิ์ของ piperine ที่มีต่อปริมาณของสารสื่อประสาทและโปรตีนในสมองของสัตว์ทดลอง จึงน่าจะทำให้สามารถอธิบายถึงฤทธิ์ในการรักษาอารมณ์ซึมเศร้าในคนได้ในระดับหนึ่ง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผลของ piperine ที่มีต่อปริมาณของสารสื่อประสาทและโปรตีนในสมองสัตว์ทดลองที่มีสถานะเสมือนเกิดอารมณ์ซึมเศร้า
2. กลไกการออกฤทธิ์ที่เป็นไปได้ของ piperine ในการรักษาอารมณ์ซึมเศร้าในสัตว์ทดลองและสามารถประยุกต์ใช้ในการอธิบายผลของยาในการรักษาอารมณ์ซึมเศร้าในคน
3. ส่งเสริมนโยบายของรัฐบาลในการส่งเสริมสุขภาพกายและสุขภาพจิตของประเทศ
4. การเผยแพร่ผลงานวิจัยต่อประชาชน หน่วยงานทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุข
5. การนำสมุนไพรพื้นบ้านซึ่งเป็นทรัพยากรที่มีอยู่ตามธรรมชาติและภูมิปัญญาไทยที่มีอยู่นำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อประชาชนและช่วยลดค่าใช้จ่ายทางยาและค่าใช้จ่ายด้านสุขภาพโดยรวมของประเทศ

บทนำ

ความผิดปกติของอารมณ์ซึมเศร้าเป็นความผิดปกติทางอารมณ์ที่ส่งผลให้เกิดความเสียหายในหลายๆด้าน ทั้งในด้านของภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นกับตัวผู้ป่วย เช่น การเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ (Glassman, 2008) และการเสียชีวิต (Mykletun et al., 2009) ในด้านของบุคคลอื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น ภาวะเครียดและอารมณ์ที่เปลี่ยนแปลงของผู้ดูแลผู้ป่วย และในด้านเศรษฐกิจ เช่น การเสียโอกาสในการทำงาน (Birnbbaum et al., 2009) และการสูญเสียค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมากในการรักษาพยาบาลผู้ป่วย (Welch et al., 2009) จากสถิติทั่วโลกในปี ค.ศ. 2000 พบว่าความผิดปกติของอารมณ์ซึมเศร้าเป็นสาเหตุอันดับสี่ในการก่อให้เกิดภาระในการดูแลสุขภาพผู้ป่วย (disease burden) (Ustün et al., 2004; World Health Organization, 2001) นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายในการรักษาความผิดปกติของอารมณ์ซึมเศร้ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อันเนื่องมาจากประสิทธิภาพในการรักษาของยารักษาอารมณ์ซึมเศร้าจะเกิดขึ้นเมื่อใช้ยาอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ทำให้การรักษาความผิดปกติของอารมณ์ซึมเศร้าในปัจจุบันต้องอาศัยความร่วมมือจากทั้งตัวผู้ป่วย ผู้ดูแลผู้ป่วย และบุคลากรทางการแพทย์ เพื่อให้ประสิทธิภาพในการรักษาความผิดปกติของอารมณ์ซึมเศร้าเกิดขึ้นอย่างเต็มที่

สาเหตุของการเกิดอารมณ์ซึมเศร่ายังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด แต่เชื่อกันว่าเกิดจากการลดลงของสารสื่อประสาทในสมอง ได้แก่ norepinephrine, serotonin และ dopamine นอกจากนี้ยังพบว่าในสมองของผู้ป่วยอารมณ์ซึมเศร้ามีระดับของ cyclic AMP response element binding protein (CREB) และ brain derived neurotrophic factor (BDNF) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการส่งเสริมการเจริญและการทำงานของเซลล์ประสาท (Belmaker et al., 2008) ยารักษาอารมณ์ซึมเศร้าที่มีใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ ยาในกลุ่ม tricyclic antidepressants, ยาในกลุ่ม monoamine oxidase inhibitors (MAOIs), ยาในกลุ่ม selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), ยารักษาอารมณ์ซึมเศร้าชนิดใหม่ (atypical antidepressants) และยาในกลุ่ม serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) แม้จะมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน แต่ทำให้เกิดผลเหมือนกันคือ เพิ่มระดับของสารสื่อประสาท norepinephrine, serotonin และ dopamine ในสมอง (López-Muñoz et al., 2009) รวมทั้งการใช้ยาดังกล่าวเป็นเวลานานจะเพิ่มปริมาณของ CREB และ BDNF มีผลให้อารมณ์ซึมเศร้าของผู้ป่วยลดลง และผู้ป่วยกลับมาดำรงชีวิตได้ตามปกติ (Racagni & Popoli, 2008)

แม้ว่ายารักษาอารมณ์ซึมเศร้าในปัจจุบันจะมีให้เลือกใช้หลายกลุ่ม แต่ยาเหล่านี้ให้ประสิทธิภาพไม่ต่างกัน การเลือกใช้อาจขึ้นกับการตอบสนองของผู้ป่วยเป็นหลัก อย่างไรก็ตามการตอบสนองของผู้ป่วยต่อยามักไม่แน่นอน จึงเป็นสาเหตุให้ต้องมีการปรับเปลี่ยนขนาดยาและชนิดของยาในผู้ป่วยเป็นจำนวนมาก อีกทั้งการใช้ยาหลายชนิดทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ที่ทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถทนได้ เช่น หัวใจเต้นผิดจังหวะ ชัก นอนไม่หลับ และสมรรถภาพทางเพศลดลง (Gartlehner et al., 2008) นอกจากนี้การใช้ยารักษาอารมณ์ซึมเศร้าจำเป็นต้องใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานเพื่อป้องกันไม่ให้อาการซึมเศร้ากำเริบซ้ำ (Howell et al., 2008) ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้อัตราการหายจากอารมณ์ซึมเศร้าจากการใช้ยาในการรักษาอารมณ์ซึมเศร้าไม่สูงเท่าที่ควร จึงมีความพยายามในการคิดค้นยาชนิดใหม่ขึ้นมาเพื่อหวังผลในการรักษาอารมณ์ซึมเศร้าที่มีประสิทธิภาพดีขึ้นและลดอาการไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ยา

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติ และมีการนำสมุนไพรชนิดต่างๆมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆเป็นเวลานาน สมุนไพรที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ในการรักษาอารมณ์ซึมเศร่ามีอยู่

หลายชนิด (Zhang, 2004) หนึ่งในสมุนไพรเหล่านั้น ได้แก่ พริกไทย ซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า จากการศึกษาถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพริกไทย พบว่าสารสกัดจากพริกไทยมีฤทธิ์ต่างๆ ได้แก่ ฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ (Naseri & Yahyavi, 2008) ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Chaudhry & Tariq, 2006) และฤทธิ์ลดไขมันในเลือด (Vijayakumar & Nalini, 2006) ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวเป็นผลจากการศึกษาในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง โดยกลไกการออกฤทธิ์ที่จะนำมาใช้อธิบายผลที่เกิดขึ้นยังไม่สามารถสรุปได้แน่นอน ในส่วนของฤทธิ์รักษาอาการซึมเศร้าพบว่าสารสกัดจากพริกไทยและสาร piperine ซึ่งเป็นสารจำพวก alkaloid ที่พบในพริกไทยให้ผลดีในการลดอาการซึมเศร้าที่เกิดขึ้นในสัตว์ทดลอง (Bhutani et al., 2009; Lee et al., 2005; Li et al., 2007; Wattanathorn et al., 2008) และการได้รับ piperine มีผลเพิ่มระดับของ serotonin ในสมองของสัตว์ทดลองและอาจสัมพันธ์กับฤทธิ์ลดอาการซึมเศร้า (Li et al., 2007) และจากการศึกษาพิษของ piperine ที่ผ่านมาพบว่าการได้รับ piperine ในสัตว์ทดลองในขนาดต่ำกว่า 33.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เกิดความเป็นพิษได้น้อย (Piyachaturawat et al., 1983) ด้วยเหตุที่พริกไทยเป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการดำรงชีวิตของคนไทยโดยเฉพาะนำมาใช้เป็นเครื่องเทศในการประกอบอาหารอยู่เป็นประจำ และสาร piperine ที่มีอยู่ในพริกไทยมีแนวโน้มของศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเป็นยารักษาอาการซึมเศร้าต่อไป จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะนำ piperine มาศึกษากลไกในการออกฤทธิ์รักษาอาการซึมเศร้าโดยเฉพาะกลไกที่เกี่ยวข้องกับปริมาณของสารสื่อประสาท รวมทั้งโปรตีนในสมอง เพื่อนำไปพัฒนาเป็นยารักษาอาการซึมเศร้าในอนาคต

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมและการให้สารต่างๆแก่สัตว์ทดลอง

หลังจากจับหนูขาวเล็ก (ICR mice) มาจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม หนูขาวเล็กทั้งหมดถูกนำมาพักที่สถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร เป็นเวลาอย่างน้อย 7 วันก่อนทำการทดลอง โดยได้รับอาหารและน้ำไม่จำกัด จากนั้นหนูขาวเล็กถูกแบ่งออกเป็น 10 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนูขาวเล็กได้รับน้ำเกลือ 0.9% โดยการฉีดเข้าช่องท้อง เป็นเวลา 14 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดๆ

กลุ่มที่ 2 หนูขาวเล็กได้รับ reserpine ในน้ำเกลือ ขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยการฉีดเข้าช่องท้อง เป็นเวลา 14 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มควบคุมที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอารมณ์ซึมเศร้าจาก reserpine

กลุ่มที่ 3 หนูขาวเล็กที่ได้รับ fluoxetine ในน้ำเกลือ ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ผ่านเข็มป้อนสาร เป็นเวลา 14 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับยารักษาอารมณ์ซึมเศร้า

กลุ่มที่ 4 หนูขาวเล็กได้รับ fluoxetine ในน้ำเกลือ ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับได้รับ reserpine ในน้ำเกลือ ขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยการฉีดเข้าช่องท้อง เป็นเวลา 14 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอารมณ์ซึมเศร้าจาก reserpine และได้รับยารักษาอารมณ์ซึมเศร้า

กลุ่มที่ 5 หนูขาวเล็กได้รับสารแขวนตะกอน piperine ในน้ำเกลือ ขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยการฉีดเข้าช่องท้อง เป็นเวลา 14 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 1

กลุ่มที่ 6 หนูขาวเล็กได้รับสารแขวนตะกอน piperine ในน้ำเกลือ ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยการฉีดเข้าช่องท้อง เป็นเวลา 14 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 2

กลุ่มที่ 7 หนูขาวเล็กได้รับสารแขวนตะกอน piperine ในน้ำเกลือ ขนาด 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยการฉีดเข้าช่องท้อง เป็นเวลา 14 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 3

กลุ่มที่ 8 หนูขาวเล็กได้รับสารแขวนตะกอน piperine ในน้ำเกลือ ขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับได้รับ reserpine ในน้ำเกลือ ขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยการฉีดเข้าช่องท้อง เป็นเวลา 14 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 4

กลุ่มที่ 9 หนูขาวเล็กได้รับสารแขวนตะกอน piperine ในน้ำเกลือ ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับได้รับ reserpine ในน้ำเกลือ ขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยการฉีดเข้าช่องท้อง เป็นเวลา 14 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 5

กลุ่มที่ 10 หนูขาวเล็กได้รับสารแขวนตะกอน piperine ในน้ำเกลือ ขนาด 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับได้รับ reserpine ในน้ำเกลือ ขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยการฉีดเข้าช่องท้อง เป็นเวลา 14 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 6

ทั้งนี้เมื่อเสร็จสิ้นการได้รับสารแล้ว หนูขาวเล็กทั้ง 6 กลุ่ม ถูกนำไปทดสอบเกี่ยวกับอารมณ์ซึมเศร้า โดยใช้ forced swimming test

การศึกษาผลของ piperine ในการรักษาอารมณ์ซึมเศร้าโดยใช้ forced swimming test (ดัดแปลงวิธีการศึกษาจาก Dang et al., 2009 และ Wattanathorn et al., 2008)

ก่อนทำการให้สารต่างๆกับหนูขาวเล็ก 1 วัน หนูขาวเล็กถูกปล่อยให้ว่ายน้ำเป็นเวลา 6 นาที ในโหลแก้วใสทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 20 เซนติเมตร สูงประมาณ 40 เซนติเมตร โดยระดับน้ำจะสูงจากก้นโหลประมาณ 20 เซนติเมตร และอุณหภูมิของน้ำประมาณ 25°C จากนั้นจะทำการบันทึกผลเป็นระยะเวลาที่หนูขาวเล็กไม่เคลื่อนไหวในช่วง 4 นาทีสุดท้าย โดยการที่หนูขาวเล็กไม่เคลื่อนไหวหมายถึง การที่หนูขาวเล็กลอยน้ำโดยไม่ใช้ขาตะกุกน้ำและมีการเคลื่อนไหวเพียงเล็กน้อยเพื่อให้หัวลอยอยู่เหนือน้ำ หลังจากนั้นหนูขาวเล็กจะถูกนำขึ้นจากน้ำ และเช็ดให้แห้ง จากนั้นจึงนำกลับไปเลี้ยงในกรงเพื่อให้สารต่างๆ ต่อมาหลังจากที่หนูขาวเล็กได้รับยาและ piperine ครบตามระยะเวลาที่กำหนด หนูขาวเล็กถูกนำไปว่ายน้ำที่อยู่ในโหลแก้วใสที่มีลักษณะเช่นเดิม (โหลแก้วทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 20 เซนติเมตร สูงประมาณ 40 เซนติเมตร โดยระดับน้ำจะสูงจากก้นโหลประมาณ 20 เซนติเมตร อุณหภูมิของน้ำประมาณ 25°C) โดยหนูขาวเล็กถูกปล่อยให้ว่ายน้ำเป็นเวลา 6 นาที และทำการบันทึกผลเป็นระยะเวลาที่หนูขาวเล็กไม่เคลื่อนไหวในช่วง 4 นาทีสุดท้าย

การศึกษาปริมาณของ cyclic AMP response element binding protein (CREB) และ phospho CREB โดยวิธี immunoblotting

การหาปริมาณโปรตีน

สมองส่วนของหนูขาวกลุ่มทดลองต่างๆ ที่ผ่านการปั่น (homogenation) ถูกผสมในบัฟเฟอร์สำหรับแยกโปรตีน (Tris buffer ประกอบด้วย 50 mM Tris HCl, pH 8, 150 mM NaCl 1% v/v Tween 20, 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 10% v/v protease inhibitor cocktail) อุณหภูมิ 4°C แล้วนำมาปั่นแยกที่ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำของเหลวส่วนบนซึ่งประกอบด้วย membrane fraction เป็นหลักนำมาทำให้เจือจางในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976) (Micro BCA protein assay, Pierce, Illinois USA) โดยนำสารละลายดังกล่าวไปอ่านค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (microplate spectrophotometer) แล้วคำนวณหาปริมาณโปรตีนใช้ standard curve จากโปรตีนมาตรฐานอัลบูมิน Western blot (immunoblotting)

การแยกโปรตีนด้วย 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ immunoblotting ด้วยแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงกับตัวรับ โดยนำ samples ในบัฟเฟอร์สำหรับแยกโปรตีนไปผสมกับ electrophoresis marker และนำตัวอย่างไปต้มให้เดือดเพื่อสลายโครงสร้างโปรตีน จากนั้นนำตัวอย่างที่พร้อมแล้วไปทำการแยกโปรตีนโมเลกุลด้วย 12% SDS-PAGE และส่งโปรตีนที่ถูกแยกตามน้ำหนักโมเลกุลไว้บนแผ่น polyvinylidene fluoride (PVDF) นำแผ่น PVDF ที่ได้ไปแช่ในสารละลาย 5% albumin เพื่อกัน non-specific binding แล้วนำไปทดสอบในบัฟเฟอร์ที่มี polyclonal antibody ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับ CREB protein อัตราส่วน 1:1,000 หรือ phospho CREB protein อัตราส่วน 1:1,000 ที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำคืน จากนั้นนำ PVDF ไปล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับล้างเป็นเวลา 3 ครั้ง และนำไปแช่ใน horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies อัตราส่วน 1:5,000 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างอีก 3 ครั้ง แสดงผลระดับโปรตีนด้วยสาร SuperSignal® West Pico Chemiluminescence Substrate (Bio-Rad Laboratories, Inc. California, USA) และบันทึกแถบ

โปรตีนที่ได้บนแผ่นฟิล์ม ปริมาณโปรตีนจากแถบที่ปรากฏในแผ่นฟิล์มถูกวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Image Lab™ software (Bio-Rad Laboratories, Inc. California, USA)

การวัดปริมาณของสารสื่อประสาท dopamine ในสมองของสัตว์ทดลอง โดยใช้ high performance liquid chromatography (HPLC)

หลังจากเสร็จสิ้นการทดสอบ forced swimming test หนูขาวเล็กถูกทำให้เสียชีวิตด้วยการดิ่งคอ (neck dislocation) จากนั้นสมองของหนูขาวเล็ก 3 ตัวถูกนำไปทำการปั่น (homogenize) ร่วมกับ 0.2 M perchloric acid (HClO_4) ที่เย็น โดยใช้ homogenizer สิ่งที่ได้จากการปั่นหรือ homogenate ถูกนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วน supernatant ไปกรองผ่าน PVDF membranes ขนาด 0.22 ไมครอน เพื่อนำไปวัดปริมาณของสารสื่อประสาท dopamine โดยใช้ high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) [Verticep™ BDS C18 reversed phase column (250 mm x 4.6 mm I.D. 5 μm) with pre-column (20 x 4.6 mm I.D.)] สำหรับ mobile phase ของ HPLC ได้แก่ phosphate buffer ที่ประกอบด้วย 50 mM NaH_2PO_4 และ 0.2 mM Na_2EDTA (97%) และ 3% methanol โดยมี pH ประมาณ 4.0 อัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที ปริมาตรของ supernatant ของสมองที่ใช้ประมาณ 20 ไมโครลิตร ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจหา dopamine คือ 280 nm และปริมาณ dopamine ในสมองของสัตว์ทดลองคำนวณจาก calibration curve ของสารละลาย dopamine มาตรฐาน

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ผลการทดลองจะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ยมาตรฐาน (standard error of mean; SEM) ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดจะถูกวิเคราะห์โดยใช้สถิติ ANOVA เพื่อหาความแตกต่างระหว่างกลุ่ม และหากค่า $p < 0.05$ จะถือว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

ผลของ piperine ในการรักษาอารมณ์ซึมเศร้าโดยใช้ forced swimming test

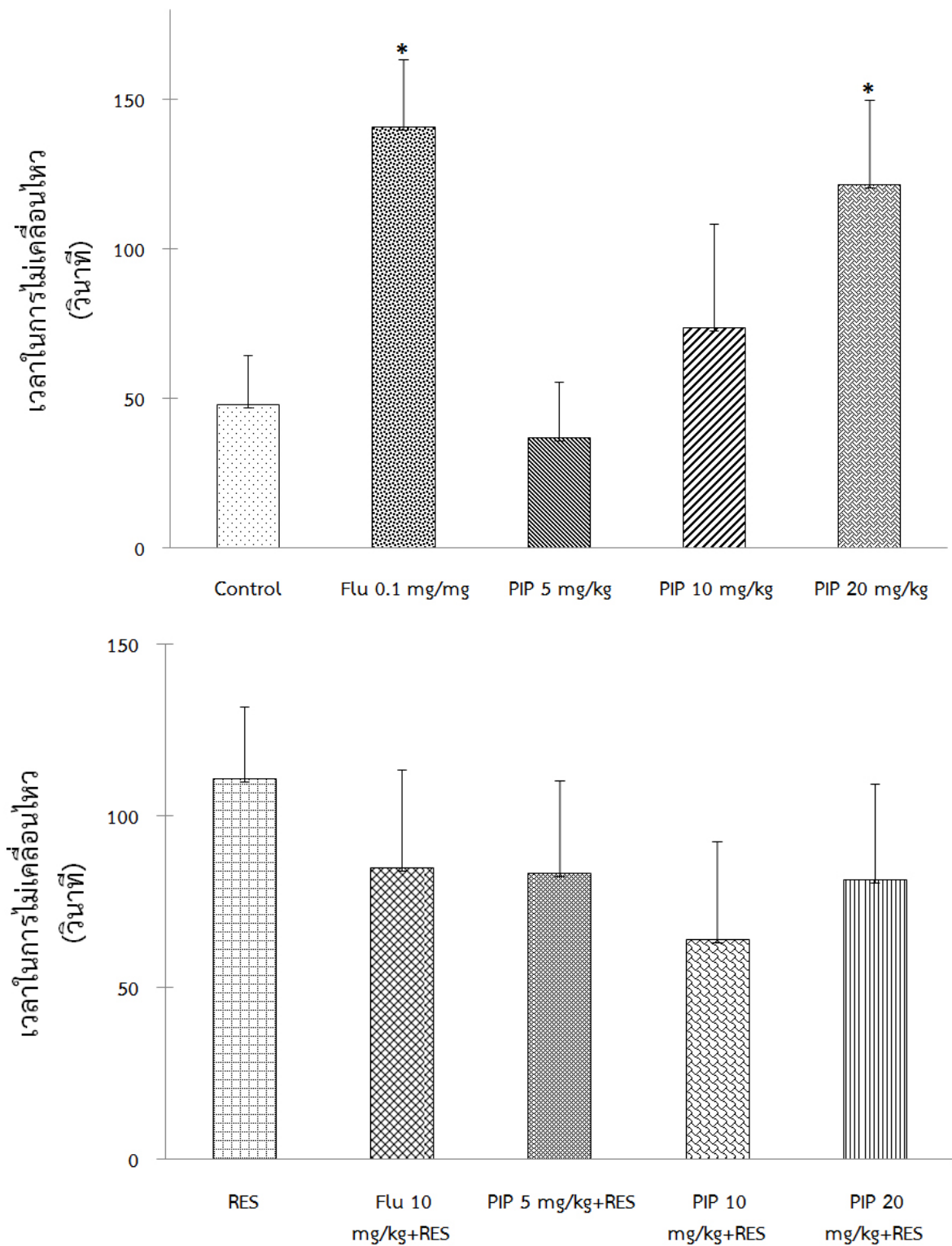
ในหนูขาวเล็กกลุ่มได้รับ reserpine ซึ่งเป็นสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดอารมณ์ซึมเศร้า พบว่าหนูขาวเล็กที่ได้รับ fluoxetine ร่วมด้วยจะใช้เวลาในการไม่เคลื่อนไหวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูขาวเล็กที่ได้รับ reserpine เพียงอย่างเดียว ผลในการลดลงของเวลาในการไม่เคลื่อนไหวของหนูขาวเล็กพบได้เช่นกันเมื่อหนูขาวเล็กได้รับ piperine ร่วมกับ reserpine แต่การลดลงดังกล่าวไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของ piperine (รูปที่ 1) อย่างไรก็ตามในหนูขาวเล็กที่ไม่ได้รับ piperine มาก่อน การได้รับ fluoxetine มีผลเพิ่มเวลาในการไม่เคลื่อนไหวของหนูขาวเล็กอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้การได้รับ piperine มีผลทำให้เวลาในการไม่เคลื่อนไหวของหนูขาวเล็กเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน fluoxetine โดยเฉพาะ piperine ในขนาด 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งเพิ่มเวลาในการไม่เคลื่อนไหวของหนูขาวเล็กอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 1)

ผลของ piperine ต่อปริมาณของ CREB และ phospho CREB ในสมองของหนูขาวเล็ก

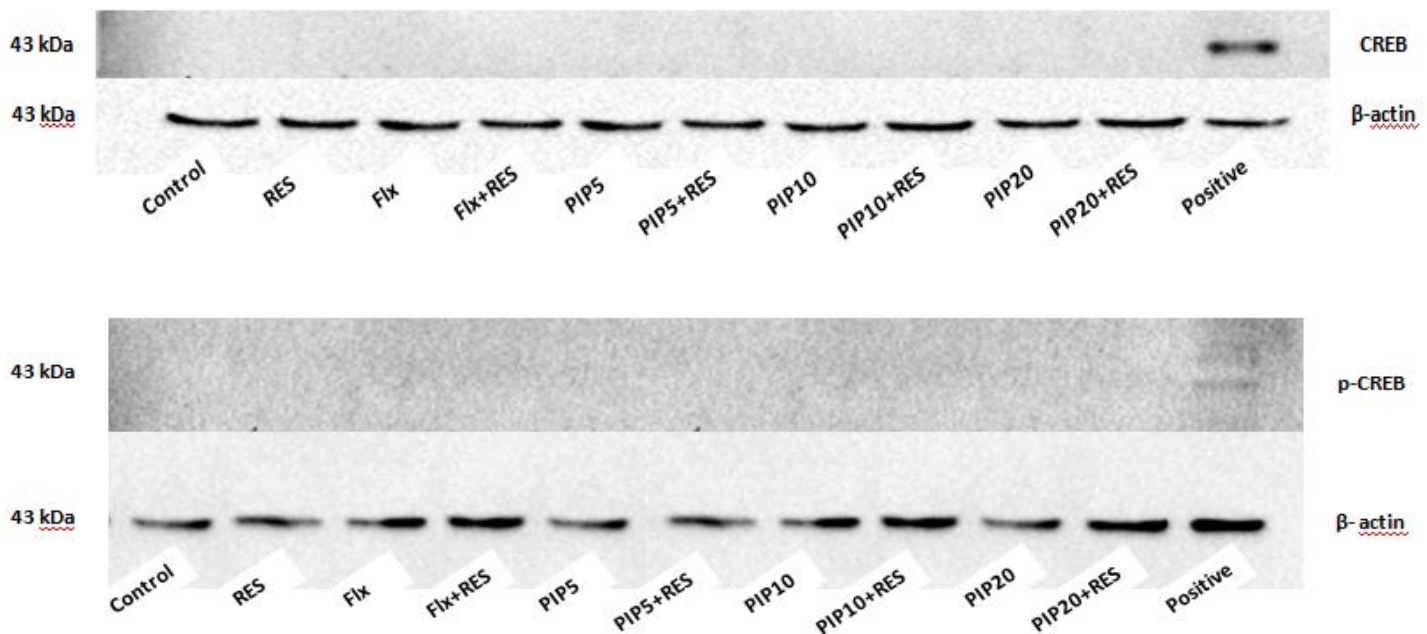
ระดับของ CREB และ phospho CREB ที่แสดงออกในสมองของหนูขาวเล็ก แสดงเป็นแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 43 กิโลดัลตัน (kDa) (รูปที่ 2) จากผลการศึกษาไม่พบระดับของ CREB และ phospho CREB ในสมองหนูขาวเล็กทั้งในกลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ได้รับ fluoxetine อย่างเดียว, กลุ่มที่ได้รับ reserpine อย่างเดียว, กลุ่มที่ได้รับ fluoxetine ร่วมกับ reserpine และกลุ่มที่ได้รับ piperine ร่วมกับ reserpine

ผลของ piperine ต่อระดับของสารสื่อประสาท dopamine ในสมองของหนูขาวเล็ก

การได้รับ reserpine มีผลลดระดับ dopamine ในสมองของหนูขาวเล็กอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม fluoxetine มีผลทำให้ระดับ dopamine ในสมองของหนูขาวเล็กลดลงเช่นกัน การลดลงของระดับ dopamine ในสมองของหนูขาวเล็กเกิดขึ้นหลังจากได้รับ piperine โดยผลดังกล่าวไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของ piperine สำหรับหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ reserpine ร่วมกับ fluoxetine หรือ piperine พบว่าระดับ dopamine ในสมองของหนูขาวเล็กลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน



รูปที่ 1 เวลาในการไม่เคลื่อนไหวของหนูขาวเล็กโดยใช้ forced swimming test หลังจากได้รับสารต่างๆ. Flu = Fluoxetine, PIP = Piperine, Res = Reserpine, * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control



รูปที่ 2 แถบโปรตีนระดับ CREB และ phospho CREB (p-CREB) ที่น้ำหนักโมเลกุล 43 kDa จากสมองหนูขาวเล็กโดยวิธี immunoblotting. Res คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ reserpine, Flx คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ fluoxetine, Flx+Res คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ fluoxetine ร่วมกับ reserpine, PIP5 คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ piperine 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, PIP5+Res คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ piperine 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ reserpine, PIP10 คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ piperine 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, PIP10+Res คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ piperine 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ reserpine, PIP20 คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ piperine 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, PIP20+Res คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ piperine 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ reserpine

ตารางที่ 1 ระดับของ dopamine ในสมองหนูขาวเล็ก จากการศึกษโดยใช้ high performance liquid chromatography (HPLC) (N = 3)

หนูขาวเล็ก	ระดับของ dopamine (ไมโครกรัม/กรัมของสมอง)
กลุ่มควบคุม	$0.74 \pm 0.13^*$
กลุ่มที่ได้รับ reserpine	$0.32 \pm 0.06^*$
กลุ่มที่ได้รับ fluoxetine	$0.19 \pm 0.02^*$
กลุ่มที่ได้รับ fluoxetine ร่วมกับ reserpine	$0.24 \pm 0.04^*$
กลุ่มที่ได้รับ piperine 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม	$0.26 \pm 0.00^*$
กลุ่มที่ได้รับ piperine 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ reserpine	$0.31 \pm 0.08^*$
กลุ่มที่ได้รับ piperine 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม	$0.41 \pm 0.11^*$
กลุ่มที่ได้รับ piperine 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ reserpine	$0.23 \pm 0.20^*$
กลุ่มที่ได้รับ piperine 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม	$0.3 \pm 0.07^*$
กลุ่มที่ได้รับ piperine 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ reserpine	$0.27 \pm 0.07^*$

หมายเหตุ ผลการศึกษาแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, $*p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงผลของ piperine ที่มีต่อการลดอารมณ์ซึมเศร้าในหนูขาวเล็กและกลไกที่อาจเกี่ยวข้องกับผลดังกล่าว จากผลการศึกษาการลดอารมณ์ซึมเศร้าโดยใช้ forced swimming test พบว่า reserpine มีผลทำให้เวลาในการไม่เคลื่อนไหวของหนูขาวเล็กเพิ่มขึ้น นั่นคือ reserpine มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดอารมณ์ซึมเศร้าในหนูขาวเล็กได้ การเกิดอารมณ์ซึมเศร้าจากการได้รับ reserpine นี้มีรายงานยืนยันในหลายการศึกษา (Bolandghamat et al., 2011; Dhingra and Valecha, 2007; Dhir et al., 2011) สำหรับการได้รับ fluoxetine ซึ่งเป็นยารักษาอารมณ์ซึมเศร้าที่ใช้อย่างแพร่หลายพร้อมกับ reserpine ส่งผลลดเวลาในการไม่เคลื่อนไหวของหนูขาวเล็กนั้น อธิบายได้ว่า fluoxetine มีฤทธิ์ลดการเกิดอารมณ์ซึมเศร้าจาก reserpine โดยฤทธิ์ของ fluoxetine ในการลดอารมณ์ซึมเศร้าแสดงให้เห็นในหลายการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลองที่ได้รับ reserpine (Wang et al., 2013) หรือไม่ได้ reserpine มาก่อน (Machado et al., 2012; Mutlu et al., 2012;) ผลในการลดการเกิดอารมณ์ซึมเศร้าที่เหนี่ยวนำโดย reserpine เกิดขึ้นกับการได้รับ piperine เช่นกัน แม้จะมีการศึกษาที่รายงานผลของการลดอารมณ์ซึมเศร้าของ piperine ก่อนหน้านี้ (Li et al., 2007; Wattanathorn et al., 2008) แต่ผลการศึกษาดังกล่าวเกิดขึ้นในสัตว์ทดลองที่ไม่ได้รับ reserpine ในการเหนี่ยวนำให้เกิดอารมณ์ซึมเศร้ามาก่อน การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่แสดงผลของ piperine ในการลดอารมณ์ซึมเศร้าจาก reserpine ซึ่งประสิทธิภาพในการลดอารมณ์ซึมเศร้าของ piperine ใกล้เคียงกับ fluoxetine โดยเฉพาะขนาดสูง

อารมณ์ซึมเศร้าเกิดขึ้นจากสาเหตุหลายประการ หนึ่งในสาเหตุดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการลดลงของโปรตีน CREB ในสมอง ในผู้ป่วยที่มีอารมณ์ซึมเศร้าพบว่ามีความระดับของ CREB ลดลง (Ren et al., 2011; Yuan et al., 2010) นอกจากนี้ในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอารมณ์ซึมเศร้า CREB ในสมองมีระดับลดลงเช่นกัน (Lipina et al., 2013; Qi et al., 2009) ดังนั้นเป้าหมายหนึ่งในการรักษาอารมณ์ซึมเศร้าจึงมุ่งไปที่การเพิ่มระดับ CREB ซึ่งการเพิ่มระดับของ CREB และ phospho CREB ในสมองเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการรักษาของยาอารมณ์ซึมเศร้าที่มีใช้ในปัจจุบัน โดยมีการรายงานถึงผลของการเพิ่มโปรตีนดังกล่าวหลังจากได้รับ fluoxetine ในเซลล์สมองชนิดต่างๆ (Choi et al., 2012; Zusso et al., 2008) รวมไปถึงในสัตว์ทดลองที่ได้รับความเครียดจนเกิดอารมณ์ซึมเศร้า (Qi et al., 2008; Wang et al., 2006) สำหรับการศึกษานี้พบว่าไม่ทำให้เกิดการแสดงออกของ CREB และ phospho CREB ในสมองของสัตว์ทดลองทุกกลุ่มแม้ในกลุ่มควบคุม จึงเป็นไปได้ว่าเกิดความผิดพลาดในกระบวนการศึกษาโดยวิธี immunoblotting หรือ antibody ที่ใช้ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้

ระดับของ dopamine ในสมองมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดอารมณ์ซึมเศร้า โดยการลดลงของ dopamine พบในสัตว์ทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดอารมณ์ซึมเศร้า (Dremencov et al., 2005; Yadid et al., 2001) การที่สัตว์ทดลองได้รับ reserpine ในการศึกษาครั้งนี้มีผลลดระดับของ dopamine ในสมอง ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับหลายการศึกษาที่รายงานว่า reserpine ซึ่งเป็นสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดอารมณ์ซึมเศร้า สามารถลดระดับของ dopamine ในเซลล์ประสาท (Beskid et al., 1992; Ofori et al., 1986) อย่างไรก็ตามการที่สัตว์ทดลองในการศึกษานี้ทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดอารมณ์ซึมเศร้าโดย reserpine ได้รับ fluoxetine ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้ง serotonin transporter ทำให้ระดับ dopamine ลดลงเช่นกัน การลดลงในลักษณะดังกล่าวเกิดขึ้นเช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานว่า การยับยั้ง serotonin transporter มีผลลดระดับ dopamine ในสมองส่วน striatum ของสัตว์ทดลอง (Morelli et al., 2011) และการยับยั้ง serotonin transporter มีผลทำให้เกิด downregulation ของ

dopaminergic neuron ในสมองส่วน substantia nigra ของสัตว์ทดลอง (MacGillivray et al., 2011) ในการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่า piperine ทำให้เกิดผลใกล้เคียงกับ fluoxetine ในการลดอารมณ์ซึมเศร้าของสัตว์ทดลองจากการทดสอบโดยใช้ forced swimming test และลดระดับของ dopamine ในสมองทั้งสัตว์ทดลองที่ได้รับและไม่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดอารมณ์ซึมเศร้าโดย reserpine จึงอาจเป็นไปได้ว่ากลไกหนึ่งสำหรับ piperine ในการลดอารมณ์ซึมเศร้าคือการทำให้ dopamine ในสมองลดลงเช่นเดียวกับ fluoxetine

เอกสารอ้างอิง

- กองแผนงาน กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข. ตารางแสดงจำนวนและอัตราผู้ป่วยสุขภาพจิตต่อประชากร 100,000 คน ปี พ.ศ. 2540-2550 หน่วยนับ:คน. [11 worksheets]. Available from URL: <http://www.plan.dmh.go.th/download/ict/8disease.xls>
- สถาบันวิจัยประชากรและสังคม มหาวิทยาลัยมหิดล. สุขภาพคนไทย 2550. นครปฐม: สถาบันวิจัยประชากรและสังคม มหาวิทยาลัยมหิดล, 2550
- Anderson IM, Ferrier IN, Baldwin RC, Cowen PJ, Howard L, Lewis G, et al. Evidence-based guidelines for treating depressive disorders with antidepressants: a revision of the 2000 British Association for Psychopharmacology guidelines. *J Psychopharmacol* 2008 Jun;22(4):343-96.
- Beskid M, Finkiewicz-Murawiejska L. Quinolinic acid: effects on brain catecholamine and c-AMP content during L-dopa and reserpine administration. *Exp Toxicol Pathol* 1992 Apr;44(2):66-9.
- Belmaker RH, Agam G. Major depressive disorder. *N Engl J Med* 2008 Jan 3;358(1):55-68.
- Bhutani MK, Bishnoi M, Kulkarni SK. Anti-depressant like effect of curcumin and its combination with piperine in unpredictable chronic stress-induced behavioral, biochemical and neurochemical changes. *Pharmacol Biochem Behav* 2009 Mar;92(1):39-43.
- Birnbaum HG, Kessler RC, Kelley D, Ben-Hamadi R, Joish VN, Greenberg PE. Employer burden of mild, moderate, and severe major depressive disorder: mental health services utilization and costs, and work performance. *Depress Anxiety* 2009 Jun 30.
- Bolandghamat S, Moghimi A, Iranshahi M. Effects of ethanolic extract of pine needles (*Pinus eldarica* Medw.) on reserpine-induced depression-like behavior in male Wistar rats. *Pharmacogn Mag*. 2011 Jul;7(27):248-53
- Chapman DP, Perry GS, Strine TW. The vital link between chronic disease and depressive disorders. *Prev Chronic Dis* 2005 Jan;2(1):A14.
- Chaudhry NM, Tariq P. Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates. *Pak J Pharm Sci* 2006 Jul;19(3):214-8.
- Choi MR, Oh DH, Kim SH, Jung KH, Das ND, Chai YG. Fluoxetine increases the expression of NCAM140 and pCREB in rat C6 glioma cells. *Psychiatry Investig* 2012 Jun;9(2):180-6.
- Dang H, Chen Y, Liu X, Wang Q, Wang L, Jia W, et al. Antidepressant effects of ginseng total saponins in the forced swimming test and chronic mild stress models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009 Nov 13;33(8):1417-24.
- Dhingra D, Valecha R. Evaluation of antidepressant-like activity of aqueous and ethanolic extracts of *Terminalia bellirica* Roxb. fruits in mice. *Indian J Exp Biol* 2007 Jul;45(7):610-6.

- Dhir A, Malik S, Kessar SV, Singh KN, Kulkarni SK. Evaluation of antidepressant activity of 1-(7-methoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-4-yl)-cyclohexanol, a β -substituted phenylethylamine in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2011 Sep;21(9):705-14.
- Dremencov E, Newman ME, Kinor N, Blatman-Jan G, Schindler CJ, Overstreet DH, Yadid G. Hyperfunctionality of serotonin-2C receptor-mediated inhibition of accumbal dopamine release in an animal model of depression is reversed by antidepressant treatment. *Neuropharmacology* 2005 Jan;48(1):34-42.
- Gartlehner G, Gaynes BN, Hansen RA, Thieda P, DeVaugh-Geiss A, Krebs EE, et al. Comparative benefits and harms of second-generation antidepressants: background paper for the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2008 Nov 18;149(10):734-50.
- Glassman A. Depression and cardiovascular disease. *Pharmacopsychiatry* 2008 Nov;41(6):221-5.
- Howell C, Marshall C, Opolski M, Newbury W. Management of recurrent depression. *Aust Fam Physician* 2008 Sep;37(9):704-8.
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 2003 Jun 18;289(23):3095-105.
- Lee SA, Hong SS, Han XH, Hwang JS, Oh GJ, Lee KS, et al. Piperine from the fruits of *Piper longum* with inhibitory effect on monoamine oxidase and antidepressant-like activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2005 Jul;53(7):832-5.
- Li S, Wang C, Li W, Koike K, Nikaido T, Wang MW. Antidepressant-like effects of piperine and its derivative, antiepilepsirine. *J Asian Nat Prod Res* 2007 Jul-Aug;9(5):421-30.
- Li S, Wang C, Wang M, Li W, Matsumoto K, Tang Y. Antidepressant like effects of piperine in chronic mild stress treated mice and its possible mechanisms. *Life Sci* 2007 Mar 20;80(15):1373-81.
- Lipina TV, Fletcher PJ, Lee FH, Wong AH, Roder JC. Disrupted-in-schizophrenia-1 Gln31Leu polymorphism results in social anhedonia associated with monoaminergic imbalance and reduction of CREB and β -arrestin-1,2 in the nucleus accumbens in a mouse model of depression. *Neuropsychopharmacology* 2013 Feb;38(3):423-36.
- Little A. Treatment-resistant depression. *Am Fam Physician* 2009 Jul 15;80(2):167-72.
- López-Muñoz F, Alamo C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. *Curr Pharm Des* 2009;15(14):1563-86.
- MacGillivray L, Reynolds KB, Sickand M, Rosebush PI, Mazurek MF. Inhibition of the serotonin transporter induces microglial activation and downregulation of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Synapse* 2011 Nov;65(11):1166-72.
- Machado DG, Cunha MP, Neis VB, Balen GO, Colla AR, Grando J, et al. *Rosmarinus officinalis* L. hydroalcoholic extract, similar to fluoxetine, reverses depressive-like behavior

- without altering learning deficit in olfactory bulbectomized mice. *J Ethnopharmacol* 2012 Aug 30;143(1):158-69.
- Mann JJ. The medical management of depression. *N Engl J Med*. 2005 Oct 27;353(17):1819-34.
- Mauskopf JA, Simon GE, Kalsekar A, Nimsch C, Dunayevich E, Cameron A. Nonresponse, partial response, and failure to achieve remission: humanistic and cost burden in major depressive disorder. *Depress Anxiety* 2009;26(1):83-97.
- Millan MJ. Dual- and triple-acting agents for treating core and co-morbid symptoms of major depression: novel concepts, new drugs. *Neurotherapeutics* 2009 Jan;6(1):53-77.
- Morelli E, Moore H, Rebello TJ, Gray N, Steele K, Esposito E, Gingrich JA, Ansorge MS. Chronic 5-HT transporter blockade reduces DA signaling to elicit basal ganglia dysfunction. *J Neurosci* 2011 Nov 2;31(44):15742-50.
- Mutlu O, Gumuslu E, Ulak G, Celikyurt IK, Kekturk S, Kir HM, et al. Effects of fluoxetine, tianeptine and olanzapine on unpredictable chronic mild stress-induced depression-like behavior in mice. *Life Sci*. 2012 Dec 17;91(25-26):1252-62.
- Mykletun A, Bjerkeset O, Overland S, Prince M, Dewey M, Stewart R. Levels of anxiety and depression as predictors of mortality: the HUNT study. *Br J Psychiatry* 2009 Aug;195(2):118-25
- Naseri MK, Yahyavi H. Antispasmodic effect of Piper nigrum fruit hot water extract on rat ileum. *Pak J Biol Sci* 2008 Jun 1;11(11):1492-6.
- Ofori S, Bretton C, Hof P, Schorderet M. Investigation of dopamine content, synthesis, and release in the rabbit retina in vitro: I. Effects of dopamine precursors, reserpine, amphetamine, and L-DOPA decarboxylase and monoamine oxidase inhibitors. *J Neurochem* 1986 Oct;47(4):1199-206.
- Paykel ES. Partial remission, residual symptoms, and relapse in depression. *Dialogues Clin Neurosci* 2008;10(4):431-7.
- Piyachaturawat P, Glinsukon T, Toskulkao C. Acute and subacute toxicity of piperine in mice, rats and hamsters. *Toxicol Lett* 1983 May;16(3-4):351-9.
- Qi X, Lin W, Li J, Li H, Wang W, Wang D, et al. Fluoxetine increases the activity of the ERK-CREB signal system and alleviates the depressive-like behavior in rats exposed to chronic forced swim stress. *Neurobiol Dis* 2008 Aug;31(2):278-85.
- Qi X, Lin W, Wang D, Pan Y, Wang W, Sun M. A role for the extracellular signal-regulated kinase signal pathway in depressive-like behavior. *Behav Brain Res* 2009 May 16;199(2):203-9.
- Racagni G, Popoli M. Cellular and molecular mechanisms in the long-term action of antidepressants. *Dialogues Clin Neurosci* 2008;10(4):385-400.
- Ren X, Dwivedi Y, Mondal AC, Pandey GN. Cyclic-AMP response element binding protein (CREB) in the neutrophils of depressed patients. *Psychiatry Res* 2011 Jan 30;185(1-2):108-12

- Saarni SI, Suvisaari J, Sintonen H, Pirkola S, Koskinen S, Aromaa A, et al. Impact of psychiatric disorders on health-related quality of life: general population survey. *Br J Psychiatry* 2007 Apr;190:326-32.
- Ustün TB, Ayuso-Mateos JL, Chatterji S, Mathers C, Murray CJ. Global burden of depressive disorders in the year 2000. *Br J Psychiatry* 2004 May;184:386-92.
- Vijayakumar RS, Nalini N. Piperine, an active principle from *Piper nigrum*, modulates hormonal and apo lipoprotein profiles in hyperlipidemic rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2006;17(2):71-86.
- Wang QS, Ding SL, Mao HP, Cui YL, Qi XJ. Antidepressant-like effect of ethanol extract from Zuojin Pill, containing two herbal drugs of *Rhizoma Coptidis* and *Fructus Evodiae*, is explained by modulating the monoaminergic neurotransmitter system in mice. *J Ethnopharmacol* 2013 (In Press).
- Wang Z, Hu SY, Lei DL, Song WX. Effect of chronic stress on PKA and P-CREB expression in hippocampus of rats and the antagonism of antidepressors. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2006 Oct;31(5):767-71.
- Wattanathorn J, Chonpathompikunlert P, Muchimapura S, Priprem A, Tankamnerdthai O. Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders. *Food Chem Toxicol* 2008 Sep;46(9):3106-10.
- Welch CA, Czerwinski D, Ghimire B, Bertsimas D. Depression and costs of health care. *Psychosomatics* 2009 Jul-Aug;50(4):392-401.
- World Health Organization. The World health report : 2001 : Mental health : new understanding, new hope. World Health Organization, 2001
- Yadid G, Overstreet DH, Zangen A. Limbic dopaminergic adaptation to a stressful stimulus in a rat model of depression. *Brain Res.* 2001 Mar 30;896(1-2):43-7.
- Yuan P, Zhou R, Wang Y, Li X, Li J, Chen G, et al. Altered levels of extracellular signal-regulated kinase signaling proteins in postmortem frontal cortex of individuals with mood disorders and schizophrenia. *J Affect Disord* 2010 Jul;124(1-2):164-9.
- Zhang ZJ. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sci* 2004 Aug 20;75(14):1659-99.
- Zusso M, Debetto P, Guidolin D, Barbierato M, Manev H, Giusti P. Fluoxetine-induced proliferation and differentiation of neural progenitor cells isolated from rat postnatal cerebellum. *Biochem Pharmacol* 2008 Aug 1;76(3):391-403.

ภาคผนวก

ตัวชี้วัดเพื่อการประเมินผลสำเร็จ
ของโครงการ

การประชุมวิชาการสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35



PROCEEDINGS

of the 35th Pharmacological and
Therapeutic Society of Thailand Meeting

20-22 March 2013

"Pharmacology for Better Life"

ห้องประชุมคอนเวนชัน 2 โรงแรมทีโอเพลานด์ จังหวัดพิษณุโลก

A35

Antidepressant-Like Effects of Piperine in Mouse

Narttaya Chaiwiang*, Thanasak Teaktong

Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

E-mail: chaiwiang.nart@gmail.com

Depression is the most common mental disorder which has characteristics of low mood, sadness and insomnia. The World Health Organization ranks depression at the top of the list in terms of disease burden in 2030. Many medicines have been used for treatment of depression including antidepressant drugs and medicinal plants. Piperine is an alkaloid in the fruits of black pepper, long pepper and other piper species and previous studies showed that piperine exhibited antidepressant effect. The aim of this study was to investigate antidepressant-like effects of piperine in mice using forced swim test and western blot. Reserpine (0.1 mg/kg body weight) was used as depressive inducer and mice were given piperine intraperitoneally at various doses ranging from 5, 10 and 20 mg/kg body weight after piperine administration for 2 weeks. Mice were forced to swim for 6 min before study commencing and after 2-week of piperine administration. Expression of cAMP response element binding (CREB) protein, a transcription factor involved with neurogenesis, in the mouse brains was determined by Western blot technique. The result showed that piperine reduced immobility time in dose-dependent manner and the highest dose (20 mg/kg) produced antidepressive effect as well as fluoxetine. In reserpine-induced depression mice, all dose of piperine exhibited the same effect as fluoxetine in mobility time. Piperine produced increases of CREB protein expression in brains of treated and untreated piperine mice. The results suggested that piperine showed antidepressant effect and the effect might be involved with upregulation of CREB protein. Further study will need to investigate other possible mechanisms of piperine which lead to antidepressant-like effect.

Keywords: Depression, Piperine, Forced swimming test, Western blot

A36

In Vivo Evaluation of the Analgesic Activity of Standardized *Rhinacanthus nasutus* Leaf Extract and Rhinacanthin-C

Nirajan Bhusal¹, Pharkphoom Panichayupakaranant², Wantana Reanmongkol^{1*}

¹Department of Clinical Pharmacy; ²Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand

E-mail: wantana.r@psu.ac.th

The *in vitro* anti-inflammatory, antioxidant and anti-allergic activities of standardized *Rhinacanthus nasutus* leaf extract (SRLE) have been reported but the *in vivo* analgesic activities of SRLE and its main active constituent, rhinacanthin-C (Rn-C) have not been investigated. Based on our previous study, SRLE was prepared and the total rhinacanthins content was standardized to not less than 70% w/w. Rn-C was also purified from the SRLE. The aim of the present study is to evaluate the analgesic activities of SRLE and Rn-C in three pain models as follows: acetic acid-induced writhing, hot plate and formalin tests. Oral administration of SRLE (20, 40 and 80 mg/kg) dose dependently suppressed the writhing response induced by acetic acid in mice. Rn-C at the same doses produced a similar effect. However, neither SRLE nor Rn-C had a significant effect on the hot plate test in mice. In the formalin test, both SRLE and Rn-C at the dose of 40 mg/kg significantly reduced the licking activity in the late phase but not in the early phase. At the higher dose of 80 mg/kg, SRLE and Rn-C decreased the licking activity in both the early and the late phase. These results suggested that SRLE and Rn-C possess favorable peripherally analgesic activity.

Keywords: Experimental animals, Pain models, Rhinacanthin-C, *Rhinacanthus nasutus*