



รายงานการวิจัย/รายงานการวิจัยชุดโครงการวิจัย เรื่อง

ฤทธิ์และกลไกการป้องกันเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงของสารสกัดจากลำพู

Neuroprotective activity and mechanism of the extractions from *Sonneratia caseolaris*

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัทมวรรณ เผือกผ่อง

Assistant Professor Dr. Patamawan Phuagphong

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

สถาบัน วิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2555

คำนำ

ลำพูเป็นพืชที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์เป็นเวลานานแล้ว เช่น การห้ามเลือด จึงนับเป็นพืชที่มีประโยชน์ งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับลำพูมักจะถูกดำเนินการในประเทศแถบเอเชียซึ่งรวมถึงประเทศไทยด้วย โดยเป็นการศึกษาเพื่อหาสารสำคัญในลำพู จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่าสารสำคัญในลำพูน่าจะมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดี

งานวิจัยเรื่องนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากลำพูในทางชีวภาพ รวมทั้งทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดทั้งในระดับเซลล์ คณะผู้วิจัยคาดหวังว่าความรู้ที่ได้รับจากงานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นพื้นฐานสำหรับการทำวิจัยเกี่ยวกับลำพูในระดับที่สูงขึ้น

ผู้วิจัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำวิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ซึ่งให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยนี้ และขอขอบคุณคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ในความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ สำหรับการวิจัย

ชื่อโครงการ	ฤทธิ์และกลไกการป้องกันเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงของสารสกัดจาก ลำพู
ชื่อผู้วิจัย	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัทมวรรณ เพื่อกผ่อง
หน่วยงานที่สังกัด	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย	สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีที่เสร็จ	พ.ศ. 2555

บทคัดย่อ

ลำพู (*Sonneratia caseolaris* L.) เป็นพืชสมุนไพรไทยชนิดหนึ่งมีการนำมาใช้ทางการแพทย์ตั้งแต่สมัยโบราณ แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีการรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาน้อย รายงานจำนวนหนึ่งระบุว่าลำพูมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่การศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนต่างๆ ของลำพูในการปกป้องเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำให้บาดเจ็บด้วย 2 วิธี คือ Ca^{2+} -reperfusion และ oxygen-glucose deprivation (OGD) ผลการทดลองพบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนหน่อลำพู ผลลำพู และกลีบดอกลำพูมีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำให้บาดเจ็บด้วย Ca^{2+} -reperfusion อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งนี้ในส่วนเมล็ดลำพู เกสรลำพู ใบลำพู และกลีบผลลำพู นอกจากนี้สารสกัดจากเนื้อผล รากอากาศ และที่หุ้มดอก สามารถลด reactive oxygen species ที่เป็นผลจากการเหนี่ยวนำเซลล์ให้บาดเจ็บด้วย Ca^{2+} -reperfusion อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเกิด depolarization ของ mitochondrial membrane อย่างมีนัยสำคัญด้วย สำหรับการเหนี่ยวนำเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ให้บาดเจ็บด้วยวิธี OGD พบว่า เฉพาะสารสกัดด้วยน้ำของเกสรลำพูเท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าว ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนต่างๆ ของลำพูนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ด้วยวิธี Ca^{2+} -reperfusion และ OGD โดยส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกในการยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย

คำสำคัญ: ลำพู, Ca^{2+} -reperfusion injury, oxygen-glucose deprivation, แอสโตรไซต์, ปกป้องเซลล์ประสาท

Research Title	Neuroprotective activity and mechanism of the extractions from <i>Sonneratia caseolaris</i>
Researcher	Assistant Professor Dr.Patamawan Phuagphong
Office	Faculty of Pharmacy, Silpakorn University
Research Grants	Research and Development Institute, Silpakorn University
Year	2011

Abstract

Sonneratia caseolaris L., traditional Thai herbal medicine, has previously been used in ancient time. However there was a few investigation reported about its pharmacological activities. Therefore, this research work concentrated to study the activity and mechanism whether water extraction of different parts of *S. caseolaris* could protect astrocytes from Ca^{2+} -reperfusion induced cell injury model and oxygen-glucose deprivation (OGD) induced cell injury model. In Ca^{2+} -reperfusion induced cell injury model, the results showed that water extraction of *S. caseolaris* from meat of fruit, pneumatophore and flower calyx significantly inhibited astrocytic cell death while the other parts of *S. caseolaris*, including seed, stamen, leaf and fruit calyx did not show protective effect. Moreover, meat of fruit, pneumatophore and flower calyx also significantly decreased reactive oxygen species associated with Ca^{2+} -reperfusion-induced injury. Simultaneously these parts significantly inhibit mitochondrial membrane potential depolarization. In OGD model, only the results showed that water extraction of *S. caseolaris* from stamen significantly inhibited astrocytic cell death. This present results indicate that water extraction of different parts of *S. caseolaris* protect astrocytes from Ca^{2+} -reperfusion induced cell injury and OGD induced cell injury, at least, by attenuating mitochondrial dysfunction.

Key words: *Sonneratia caseolaris*, Ca^{2+} -reperfusion injury, oxygen-glucose deprivation, astrocyte, neuroprotection

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญรูป	vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	vii
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	7
ผลการวิจัยและวิจารณ์	11
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	21
บรรณานุกรม	23
ภาคผนวก	27
ประวัติผู้ทำวิจัย	28

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 กระบวนการสร้าง ROS จากไมโทคอนเดรีย	4
รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรียในภาวะ ischemia reperfusion	4
รูปที่ 3 กระบวนการเกิดการตายแบบ apoptosis	5
รูปที่ 4 ลักษณะของเซลล์ astrocyte ในภาวะปกติ	6
รูปที่ 5 ผลของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่ถูกสกัดโดยผ่านการต้มและ spray drying ความเข้มข้น 1–100 µg/ml ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ในสภาวะปกติ	12
รูปที่ 6 ผลของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่ถูกสกัดโดยผ่านการต้มและ spray drying ความเข้มข้น 0.0001–0.1 µg/ml ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ในสภาวะปกติ	13
รูปที่ 7 ผลของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่ถูกสกัดโดยผ่านการต้มและ spray drying ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย OGD model 24 ชั่วโมง	15
รูปที่ 8 ผลของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่ถูกสกัดโดยผ่านการต้มและ spray drying ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย OGD model 4 ชั่วโมง	16
รูปที่ 9 ผลของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพู ที่ถูกสกัดโดยผ่านการต้มและ spray drying ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย OGD model 6 ชั่วโมง	17
รูปที่ 10 ผลของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่ถูกสกัดโดยผ่านการต้มและ spray drying ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Ca^{2+} -reperfusion model	19
รูปที่ 11 ผลของสารสกัดที่เตรียมจากการต้มและ spray drying จากส่วนผลลำพู หน่อลำพู และกลีบดอกลำพูความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อปริมาณ reactive oxygen species ในเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Ca^{2+} -reperfusion model	20
รูปที่ 12 ผลของสารสกัดที่เตรียมจากการต้มและ spray drying จากส่วนผลลำพู หน่อลำพู และกลีบดอกลำพูความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อ mitochondrial membrane potential ในเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Ca^{2+} -reperfusion model	20
รูปที่ 13 ใบรับรองการอนุญาตให้เลี้ยงและใช้สัตว์ที่มีชีวิตเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ที่มหาวิทยาลัยศิลปากร	27

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

DMSO	=	dimethyl sulfoxide
FBS	=	fetal bovine serum
MEM	=	modified eagle medium
DMEM	=	Dulbecco's modified eagle medium
PBS	=	phosphate buffer saline
MTT	=	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
Rh123	=	rhodamine 123
DCF	=	2',7'-dichlorofluorescein
OGD	=	oxygen-glucose deprivation
ROS	=	reactive oxygen species
nm	=	nanometer
H ₂ O ₂	=	hydrogen peroxide
ml	=	milliliter
mg	=	milligram
µg	=	microgram
SD	=	standard deviation