ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246494

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลของสารสกัดพรมมิ และสารสำคัญของพรมมิต่อการเสื่อมของเซลล์ประสาท และการบกพร่องความจำที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์

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

ผศ. ดร. อรระวี คงสมบัติ และคณะ

14 ธันวาคม 2554

b00254552

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246494

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลของสารสกัดพรมมิ และสารสำคัญของพรมมิต่อการเสื่อมของเซลล์ประสาท และการบกพร่องความจำที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์

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

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ผศ. ดร. อรระวี คงสมบัติ และคณะ

14 ธันวาคม 2554

สัญญาเลขที่ R2553B061

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลของสารสกัดพรมมิ และสารสำคัญของพรมมิต่อการเสื่อมของเซลล์ประสาท และการบกพร่องความจำที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. ผศ. ดร. อรระวี คงสมบัติ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. รศ.ดร. สุทิสา ถาน้อย คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
3. รศ.ดร.เสมอ ถาน้อย คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

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

ผศ.ดร. อรระวี คงสมบัติ

บทคัดย่อ

246494

พรมมิคือพืชสมุนไพรของประเทศอินเดียโบราณและได้ถูกนำมาใช้รักษาโรคมานานหลายทศรรษ คุณสมบัติที่สำคัญในการรักษาโรคของพรมมิ ได้แก่การสามารถเพิ่มการเรียนรู้และความจำของมนุษย์และสัตว์ทดลอง การการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดพรมมิต่อการป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์เปปไตด์และเปรียบเทียบกับผลของยาอะริเซพและสารสกัดแปะก๊วย สัตว์ทดลองคือหนูถีบจักรเพศผู้ได้ถูกแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัวดังนี้คือ(1)กลุ่มควบคุม; (2)กลุ่มรับประทานตัวทำละลายพีจี; (3) กลุ่มรับประทานพีจีและฉีดน้ำเกลือเข้าไปที่โพรงสมอง; (4) กลุ่มรับประทานพีจี; (5) กลุ่มรับประทานพรมมิ; (6) กลุ่มรับประทานพรมมิเข้มข้น; (7) กลุ่มรับประทานสารสกัดแปะก๊วยและกลุ่มที(8) กลุ่มรับประทานยาอะริเซพ สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 5 ถึงกลุ่มที่ 8 นั้นได้รับยาหรือสารสกัดของสมุนไพรในขนาด 40 6.67 100 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 4 ถึงกลุ่มที่ 8 ถูกเหนี่ยวนำให้มีการเสื่อมของเซลล์ประสาท โดยการฉีดเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปในโพรงสมอง ผลของสารสกัดพรมมิต่อการเรียนรู้และความจำได้ถูกประเมินด้วยการวัดด้วยวิธีมอริสวอเตอร์เมส และโนเวลออพเจ็คเร็คคอกนิชั่น ผลการวิจัยพบว่า สัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์เปปไตด์นั้นมีความจำที่ลดลง ($p< 0.05$) และเมื่อสัตว์ทดลองได้รับยาหรือสารสกัดสมุนไพรแล้วประกฏว่าสัตว์ทดลองมีการเพิ่มการเรียนรู้และความจำใกล้เคียงกับปกติ ผลของสารสกัดพรมมิต่อการป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาทได้ถูกวัดด้วยวิธีลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นและการย้อมเซลล์ประสาทด้วยฮีมาทอกซิลลินอีโอซิน และอิมมูโนฮีสโตเคมิสตรี โดยใช้ จีเอฟเอพี เดพีพี เอเบต้า แอนติบอดี้ ผลการวิจัยพบว่าสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์เปปไตด์นั้นมีระดับของลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นเพิ่มมากขึ้น รวมถึงมีจำนวนของเซลล์ประสาทที่ถูกทำลายมากขึ้น ($p< 0.05$) และเมื่อสัตว์ทดลองได้รับยาหรือสารสกัดสมุนไพรแล้วประกฏว่าสัตว์ทดลองมีระดับของลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นที่ลดลงและมีจำนวนเซลล์ประสาทที่มากขึ้น ผลการวิจัยครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดพรมมิสามารถป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์เปปไตด์และให้ผลใกล้เคียงกันกับยาอะริเซพและสมุนไพรแปะก๊วย ดังนั้นสารสกัดพรมมิน่าจะถูกนำมาพัฒนาเป็นพืชเสรษฐกิจที่นำมาใช้เป็นอาหารเสริมในการป้องกันและรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการสูญเสียความจำได้

คำสำคัญ: พรหมมิ, การเสื่อมของเซลล์ประสาท

Abstract

246494

Bacopa monnieri (L.) Wettst. (*B. monnieri*; BM), Indian medicinal plant, has been used in the traditional Ayureveda 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 Aβ; (5) BME (40 mg/kg) and Aβ; (6) SEE (6.67 mg/kg) and Aβ; (7) *Ginkgo biloba* (100 mg/kg) and Aβ and (8) Aricept (0.2 mg/kg) and Aβ. 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 (MWMT) and novel object recognition (NOR) were employed for testing learning, memory. The results of MWMT, 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 straining. 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 and cognitive 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/500μm^2) ส่วนของ Hippocampus บริเวณ CA1-3ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry	29
ตารางที่ 3 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte (Cells/500μm^2) ส่วน Hippocampus บริเวณ Dentate gyrus ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry	32
ตารางที่ 4 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท ใน ส่วน Cerebral cortex (Cells/100 μm^2) ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Amyloid precursor protein Immonohistochemistry	35
ตารางที่ 5 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท ใน ส่วน Hippocampus (Cells/50 μm^2) ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Amyloid precursor protein Immonohistochemistry	37
ตารางที่ 6 แสดงผลการวัด Optical density ในพื้นที่ 100 μm^2ใน ส่วน Cerebral cortex ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Beta amyloid Immonohistochemistry	41
ตารางที่ 7 แสดงผลการวัด Optical density ในพื้นที่ 100 μm^2ใน ส่วน Hippocampus ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Beta amyloid Immonohistochemistry	43

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดของการวิจัย	2
ภาพที่ 2 แสดงแผนดำเนินการวิจัย	6
ภาพที่ 3 แสดงการฉีด $A\beta_{25-35}$ เข้าไปใน Lateral ventricle	3
ภาพที่ 4 แสดงการเกาะกลุ่มกันของ เบต้าอะไมลอยด์ ด้วยกำลังขยาย 4x	4
ภาพที่ 5 แสดงกราฟการฝึกสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี MWMT เป็นเวลา 7 วัน	5
ภาพที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของเวลาในการว่ายน้ำหาแท่นใต้น้ำ (mean ± S.E.M) ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี MWMT	12
ภาพที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยของ % preference index (mean ± S.E.M) ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี NOR	14
ภาพที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยของ % recognition index (mean ± S.E.M) ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี NOR	15
ภาพที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยของเวลาที่สัตว์ทดลองเข้าไปใน Open และ Close arm	16
ภาพที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ MDA µmole/mg tissue proteins ในสมองส่วน Cortex	17
ภาพที่ 11 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ MDA µmole/mg tissue proteins ในสมองส่วน Hippocampus	17
ภาพที่ 12 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 ด้วยกำลังขยาย 4x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม	19
ภาพที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± 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 ± S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex บริเวณชั้นที่ 4/5	20
ภาพที่ 16 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 6 ด้วยกำลังขยาย 4x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม	21
ภาพที่ 17 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± 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 ± 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 ± 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 ± S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA3 24

ภาพที่ 24 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ Dentate gyrus ด้วยกำลังขยาย 20x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม 24

ภาพที่ 25 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณDentate gyrus 25

ภาพที่ 26 แสดงผลการย้อม Astrocyte ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry ด้วย กำลังขยาย 40 เท่า 26

ภาพที่ 27 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Cerebral cortex 27

ภาพที่ 28 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของ เซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Cingulum 28

ภาพที่ 29 แสดงผลการย้อม Astrocyte ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry ด้วย กำลังขยาย 20 เท่า 29

ภาพที่ 30 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± 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 ± S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 35

ภาพที่ 33 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 4/5 36

ภาพที่ 34 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 6 36

ภาพที่ 35 แสดงผลการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus 37

ภาพที่ 36 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 38

ภาพที่ 37 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 2 38

ภาพที่ 38 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 3 39

ภาพที่ 39 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ Dentate gyrus 39

ภาพที่ 40 แสดงผลการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ด้วยกำลังขยาย 10 เท่า 40

ภาพที่ 41 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 41

ภาพที่ 42 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 4/5 42

ภาพที่ 43 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 6 42

ภาพ (ต่อ) **หน้า**

ภาพที่ 44 แสดงผลการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 1 43

ภาพที่ 45 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 44

ภาพที่ 46 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA2 44

ภาพที่ 47 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA3 44

ภาพที่ 48 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± 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