อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ RX-AR-035/2551

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ป้องกันเซลล์สมองเพาะเลี้ยงของสมุนไพรไทย จากพิษของอนุมูลอิสระ

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน -5 JUL 2011
เลขทะเบียน 15862619
เลขเรียกหนังสือ ว RS 164 W131S 2551

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร.นันทีทิพ ลิ้มเพียรชอบ คณะเภสัชศาสตร์
2. รศ.ดร.กรกนก อิงคนินันท์ คณะเภสัชศาสตร์

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

ภาวะ oxidative stress เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเกิดโรคความเสื่อมของระบบประสาทหลายชนิด การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรไทย 7 ชนิด ซึ่งเป็นสมุนไพรที่มีการนำไปใช้เป็นยาอายุวัฒนะและบำรุงประสาท โดยคาดหวังว่าสมุนไพรบางชนิดอาจมีศักยภาพในการป้องกันเซลล์ประสาทได้จริงในร่างกายมนุษย์ต่อไป โดยเป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองด้วยการวัด ferric reducing activity และ lipid peroxidation inhibitory activity และในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยการวัดระดับของ reactive oxygen species (ROS) ภายในเซลล์ neuroblastoma cell line ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากสมอพิเภกและทิ้งถ่อนมีฤทธิ์เป็น reducing agents ที่ดี ส่วนคูนและบอระเพ็ดพุงช้างสามารถยับยั้ง lipid peroxidation ได้ดี ฤทธิ์ reducing activity ของสารสกัดสมุนไพรมีแนวโน้มที่จะเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการยับยั้ง lipid peroxidation เนื่องจากทั้งสองฤทธิ์มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน นอกจากนี้ สารสกัดสมุนไพรยังมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง ROS ภายในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง ไม่ว่าจะเติมสารสกัดสมุนไพรก่อนหรือระหว่างการเกิดปฏิกิริยา oxidation จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดจากสมุนไพรส่วนใหญ่ที่นำมาศึกษานี้ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการเป็น reducing agent และยับยั้ง lipid peroxidation รวมทั้งยังยับยั้งการเกิด ROS ภายในเซลล์ประสาท ซึ่งแสดงให้เห็นศักยภาพของสมุนไพรไทยในการที่จะพัฒนาเป็นสารที่ป้องกันเซลล์ประสาท (neuroprotective agent) ซึ่งอาจจะสามารถนำไปใช้ในการป้องกันหรือชะลอการเกิดโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาทได้ต่อไปในอนาคต

Abstract

Oxidative stress is considered as an important causative factor in several neurodegenerative diseases. The study was aimed to determine the antioxidant properties of seven neurotonic Thai plants, possibly influencing their neuroprotective effect in human being. Antioxidant power was evaluated by ferric reduction and lipid peroxidation inhibition and cellular reactive oxygen species (ROS) suppression. The ability to suppress cellular oxidative stress was demonstrsted in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells in which the intracellular ROS was detected by fluorescence dye. Whereas *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. and *Albizia procera* (Roxb.) Benth. acted as the good ferric reducing agents, *Cassia fistula* L. and *Stephania suberosa* Forman seemed to be the potent inhibitors of lipid peroxidation. Ferric reduction was expected to be responsible for lipid peroxidation inhibition because the linear correlation of these two activities. These plant extracts could also effectively suppress the formation of intracellular ROS in neuroblastoma SH-SY5Y cells, regardless of the extracts were added before or during the oxidative process. It could be conclude that most of the selected plants demonstrated strong antioxidant activity by acting as metal reducing agents, lipid peroxidation inhibitors, and/or intracellular ROS suppressants. This study provides the potential mechanisms as neuroprotective agents of Thai neurotonic plants which could be beneficial to prevent or delay neurodegenerative processes.

บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

ในปัจจุบัน การรับประทานสมุนไพรได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ไม่ว่าจะจุดประสงค์เพื่อบำรุงสุขภาพหรือเพื่อเป็นยารักษาโรค ในประเทศไทย มีสมุนไพรมากมายหลากหลายชนิด บางชนิดได้มีการนำมาศึกษาทางวิทยาศาสตร์และได้รับการยอมรับในการนำมาใช้เป็นยารักษาโรค แต่ก็มีสมุนไพรอีกจำนวนมากที่ยังไม่ได้รับการศึกษาอย่างจริงจัง ซึ่งสมุนไพรเหล่านี้ อาจมีประสิทธิภาพในการป้องกันหรือรักษาโรคได้ดีและสามารถนำมาพัฒนาให้เป็นยาที่ได้รับการยอมรับต่อไป คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ของกลุ่มพืชสมุนไพร ที่มีการใช้เป็นยาอายุวัฒนะบำรุงประสาท ในปัจจุบัน ประชากรโลกมีแนวโน้มที่จะมีชีวิตยืนยาวขึ้น จำนวนประชากรผู้สูงอายุและอัตราการพบโรคที่เกิดขึ้นกับผู้สูงอายุจึงเพิ่มขึ้นตามลำดับ เช่น ความดันโลหิตสูง เบาหวาน และไขมันในเลือดสูง เป็นต้น ซึ่งภาวะของโรคเหล่านี้สามารถควบคุมได้ด้วยยาหลายชนิด นอกจากภาวะโรคดังกล่าวแล้ว โรคทางระบบประสาทและสมอง เช่น ความจำเสื่อม โรคอัลไซเมอร์ และเส้นเลือดในสมองแตก ก็มีความสำคัญอย่างมากต่อผู้สูงอายุ ซึ่งโรคทางระบบประสาทเหล่านี้ ในปัจจุบันยังไม่มียาที่ยาที่ใช้ในการรักษาให้หายขาด ยาที่ใช้ในปัจจุบันจึงเป็นเพียงการบรรเทาอาการและความรุนแรงของโรค จึงมีงานวิจัยจำนวนมากพยายามศึกษาค้นคว้าหายาใหม่ทั้งจากสมุนไพรจากธรรมชาติและสารสังเคราะห์ เพื่อใช้ในการรักษาหรือป้องกันภาวะของโรคดังกล่าว

สมองเป็นอวัยวะที่มีโอกาสได้รับอันตรายจากอนุมูลอิสระได้ง่าย โดยเฉพาะอนุมูลอิสระที่เกิดจากโมเลกุลของออกซิเจน (reactive oxygen species) เนื่องจากสมองมีอัตราการใช้ออกซิเจนสูงและประกอบไปด้วยไขมันในปริมาณสูง รวมทั้งมีเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับอวัยวะอื่นๆ (Coyle and Puttfarcken, 1993) ภาวะ oxidative stress หรือการเพิ่มขึ้นของระดับของอนุมูลอิสระนั้นจึงมีส่วนเกี่ยวข้องกับ กระบวนการการเกิดโรคหรือภาวะเสื่อมของระบบประสาทและสมอง (neuro-degenerative disorders) หลายชนิด เช่น ความจำเสื่อม (dementia) โรคอัลไซม์เมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์คินสัน (Parkinson's disease) และเส้นเลือดสมองตีบ (cerebral ischemia) เนื่องจากพยาธิสภาพของโรคหรือภาวะเสื่อมของระบบประสาทและสมอง มักเกี่ยวข้องกับการมีภาวะ oxidative stress หรือมีปริมาณอนุมูลอิสระ (free radicals) มากเกินในสมอง ดังนั้น กลุ่มของสารหรือยาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) จึงได้รับความสนใจในการนำมาทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์สมองจากอันตรายของอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้เป็นยารักษาหรือบรรเทาอาการของโรคเสื่อมของระบบประสาทและสมองได้

สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบได้จากแหล่งธรรมชาติ เช่น อาหารประเภท ผักและผลไม้ การทดลองในสัตว์ทดลอง พบว่า การให้อาหารเสริมด้วยผักและผลไม้ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้น มีผลดีต่อการเรียนรู้และความจำในหนูขาวสูงอายุ (Joseph et al., 1999) สารต้านอนุมูลอิสระยังพบได้จากแหล่งธรรมชาติอื่นๆ อีก เช่น เครื่องดื่มประเภทไวน์ ชาเขียว และพืชสมุนไพรต่างๆ (Esposito et al., 2002) ตัวอย่างสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีการนำมาศึกษาฤทธิ์ป้องกันเซลล์สมอง (neuroprotective effect) เช่น สารสกัดจากแป๊ะก๊วย (Ginkgo biloba) หรือ Egb 761 ซึ่งมีการนำมาศึกษาเพื่อลดอาการที่เกิดจากความจำที่เสื่อมถอยลง (Le Bars et al., 1997) และพบว่ามีฤทธิ์ป้องกันเซลล์สมองโดยมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูล

อิสระในงานวิจัยต่างๆ (Bastianetto et al., 2000; Bastianetto and Quirion, 2002) การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากขมิ้นชัน curcumin พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีประสิทธิภาพในการป้องกันเซลล์สมองจากภาวะ oxidative stress ต่างๆ ได้เช่นกัน (Thiyagarajan and Sharma, 2004; Wang et al., 2005) นอกจากนี้ ยังมีสมุนไพรอื่นๆ ที่พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดจากพืชสมุนไพรจึงเป็นแหล่งสำคัญในการศึกษาค้นคว้าหายาหรือสารใหม่ๆ ที่มีผลในการป้องกันเซลล์สมองจากภาวะของโรคต่างๆ หรือจากการเสื่อมลงเนื่องจากความชรา

โครงงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรไทย โดยคัดเลือกศึกษาสมุนไพรบำรุงสมองและระบบประสาท ได้แก่ สมอพิเภก ทิ้งถ่อน แห้วหมู กวาวเครือแดง ดูน และ บอระเพ็ดพุงช้าง โดยพิจารณาจากผลการศึกษาเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองของสมุนไพรเหล่านี้ตามตารางที่ 1 และอีก 1 ชนิด คือ พุดจีบ ซึ่งเป็นสมุนไพรที่คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาศักยภาพในการป้องกันเซลล์ประสาทมาช่วงเวลาหนึ่ง ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงทำการทดสอบสมุนไพรทั้งหมด 7 ชนิด

ตารางที่ 1 Free radical scavenging activity ของสารสกัดพืชสมุนไพรที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml และ 1.0 mg/ml

สารสกัด	ความเข้มข้น 0.1 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml	
	% free radical scavenging	SD	% free radical scavenging	SD
สมอพิเภก	95.88	1.02	96.17	0.35
ทิ้งถ่อน	95.18	0.67	95.90	0.44
แห้วหมู	95.06	0.26	93.81	0.63
กวาวเครือแดง	94.22	0.06	86.59	1.16
ดูน	93.42	0.93	92.84	0.44
บอระเพ็ดพุงช้าง	80.28	2.69	93.35	0.69

โครงการวิจัยนี้ เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์สมองเพาะเลี้ยง โดยใช้สารก่ออนุมูลอิสระ AAPH ซึ่งเป็นสารก่ออนุมูลอิสระในเซลล์ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) เช่น ภายใน cytoplasm อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำอันตรายต่อเซลล์ ระดับของ oxidative stress ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์โดยการวัดระดับของ intracellular ROS ที่เกิดขึ้นภายใน neuroblastoma cell ด้วย fluorescence dye นอกจากนี้ยังทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการวัด ferric reducing activity และการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ด้วยวิธี thiobarbituric acid reactive substances (TBARs)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ของสารสกัดสมุนไพรในเซลล์สมองเพาะเลี้ยง
2. เพื่อประเมินเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรชนิดต่างๆในการป้องกันเซลล์สมองเพาะเลี้ยงจากอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ
3. เพื่อศึกษาหาพิษของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อเซลล์สมองเพาะเลี้ยง เพื่อประเมินความปลอดภัยของการใช้สารสกัดสมุนไพรนั้นๆ

ขอบเขตการวิจัย

จากการศึกษาของ รศ.ดร. กรกนก อิงคนินันท์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย ที่มีประวัติการใช้เป็นยาอายุวัฒนะบำรุงประสาทจำนวนมากกว่า 20 ชนิด พบว่ามีพืชสมุนไพรหลายชนิด ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง ผลการทดลองเบื้องต้นนี้ เป็นการคัดกรองเพื่อที่จะคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ไปทดสอบในระดับลึกต่อไป เช่น ในสัตว์ทดลอง อย่างไรก็ตาม ข้อมูลการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองนั้นยังไม่เพียงพอต่อการพิจารณาเลือกใช้สมุนไพร จึงต้องมีการศึกษาคัดเลือกในระดับสูงขึ้นต่อไป เช่น การทดสอบฤทธิ์ในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยโครงการวิจัยนี้ ได้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและทดสอบฤทธิ์ป้องกันเซลล์สมอง (neuroprotective effect) ของสารสกัดจากสมุนไพรในเซลล์สมองเพาะเลี้ยง

ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ใช้เซลล์เพาะเลี้ยง human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) จาก ATCC (American Type Culture Collection) เนื่องจากขั้นตอนการเตรียม primary cortical cell culture มีความยุ่งยากและได้จำนวนเซลล์จำกัด ไม่เพียงพอต่อการทดสอบ จึงได้มีการปรับไปทดลองใช้ SH-SY5Y cell ซึ่งสามารถเลี้ยงได้ง่าย เหมาะกับการทดสอบเบื้องต้น และยังเป็นการลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลอง และใช้สารก่ออนุมูลอิสระเพียง 1 ชนิด คือ AAPH เนื่องจากไม่สามารถสั่งซื้อ AMNV ได้เนื่องจากเป็นสารที่ไม่อนุญาตให้นำเข้าประเทศได้

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย (Materials & Methods)

วิธีการทดลอง

1. การคัดเลือกพืช

รวบรวมพืชสมุนไพรทั้ง 7 ชนิด ทำตัวอย่างพืชแห้ง (voucher specimen) เพื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ เพื่อใช้อ้างอิง

2. การเตรียมสารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ

นำส่วนของพืชที่ต้องการสกัดมาบด แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 °C การสกัดจะใช้การหมักสมุนไพรแห้งด้วย methanol เป็นเวลา 3 วัน และผ่านกระบวนการกรอง จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาระเหยให้แห้งภายใต้ความดันต่ำ ส่วนพืชสมุนไพรที่เหลือจากการกรองครั้งแรกสามารถนำมาหมักซ้ำอีกด้วย methanol แล้วทำซ้ำเช่นเดียวกับการสกัดครั้งแรก นำสารที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งมารวมกัน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์ SH-SY5Y

เซลล์ Human neuroblastoma SH-SY5Y ได้มาจาก American Type Culture Collection (ATCC) เลี้ยงเซลล์ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F-12 ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) และ 1% penicillin–streptomycin เลี้ยงเซลล์ในตู้ CO_2 incubator ด้วย 5% CO_2 ทำการ subculture เซลล์ทุกๆ 2-3 วัน ก่อนทำการทดสอบเลี้ยงเซลล์ใน 96-well plates เมื่อเซลล์อายุ 24 ชม. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเป็น DMEM/F-12 ที่มี 1% FBS และ 10 μM retinoic acid นาน 6 วัน เพื่อกระตุ้นการ differentiation เป็นเซลล์ประสาท

4. การรอดชีวิตของเซลล์ (Cell viability test)

การรอดชีวิตของเซลล์สามารถวัดได้โดยใช้ MTT assay [3-(3,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide)] โดยนำเซลล์จำนวน 5 x 10^4 เซลล์ เพาะเลี้ยงใน 96 well microplate มา incubate กับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ จากนั้น 2 ชั่วโมงก่อนสิ้นสุด treatment ใส่ 20 μl ของ MTT

(5 mg/ml ใน PBS) เมื่อสิ้นสุด treatment นำอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วใส่ 200 μl DMSO:EtOH (1:1) และ incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วย ELISA reader

5. การทดสอบการยับยั้ง Lipid peroxidation

ปฏิกิริยา lipid peroxidation จะวัดโดย thiobarbituric acid reactive substance (TBARs assay) โดยใช้ brain homogenate เป็นแหล่งไขมัน ก่อนใช้นำไปวัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA assay kit (Pierce®) ใช้ brain homogenate 4 mg protein/ml incubate กับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 37 °C นาน 30 นาที แล้วกระตุ้นการเกิด oxidation ด้วย 0.4 mM ferrous sulfate และ 0.2 mM ascorbic acid จากนั้น

เติม TBARs reagent (10% trichloroacetic acid, 1% thiobarbituric acid, 5%HCl และ 1% SDS) แล้ว incubate ที่ 90 ^{o}C เป็นเวลา 1 ชม หลังจากทิ้งให้เย็นนำไปปั่นที่ 5000 rpm 5 นาที และนำส่วนใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 532 nm (ใช้ trolox เป็น positive control)

6. การทดสอบ Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay)

Working solution ประกอบด้วย 300 mM acetate buffer pH 3.6, 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) in 40 mM HCl, 20 mM $FeCl_3$ (10:1:1) โดยเตรียมก่อนทำการทดลอง (freshly prepare) ผสมสารสกัดสมุนไพรตามความเข้มข้นที่ต้องการกับ working solution แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. และวัดความสามารถในการเปลี่ยน ferric ไปเป็น ferrous โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 539 nm โดยใช้ ascorbic acid เป็น positive control และใช้สารละลาย ferrous sulfate ในการเตรียม standard curve

7. การวัด intracellular reactive oxygen species (ROS)

เลี้ยง Differentiated SH-SY5Y cells ด้วย 1 mM AAPH เป็นระยะเวลาต่างๆ ปริมาณ ROS สามารถวัดโดยใช้สารเรืองแสง 10 μM ของ 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) ซึ่งสามารถผ่านเยื่อบุเซลล์ได้ จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DCFH-DA ส่วนเกินออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ DCFH-DA จะถูก hydrolyzed โดย esterases ภายในเซลล์อย่างรวดเร็วเปลี่ยนเป็นสารไม่เรืองแสง 2',7'-dichlorofluorescin จากนั้นจะถูก oxidized อย่างรวดเร็วโดย intracellular ROS เปลี่ยนเป็น 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) ซึ่งเป็นสารที่มีความเรืองแสงสูง ค่าความเรืองแสงของ DCF จะเป็นสัดส่วนกับปริมาณของ ROS ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์

8. วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล

การทดลองทั้งหมดจะทำซ้ำ 4-5 ครั้ง ในเซลล์เพาะเลี้ยงต่างชุดกัน (independent culture preparations) การ วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ จะมีการเปรียบเทียบกลุ่ม treatment และกลุ่มควบคุม และใช้ค่าทางสถิติ ในการประเมิน ความ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ระหว่างทั้งสองกลุ่มนี้

บทที่ 3

ผลการทดลอง (Results)

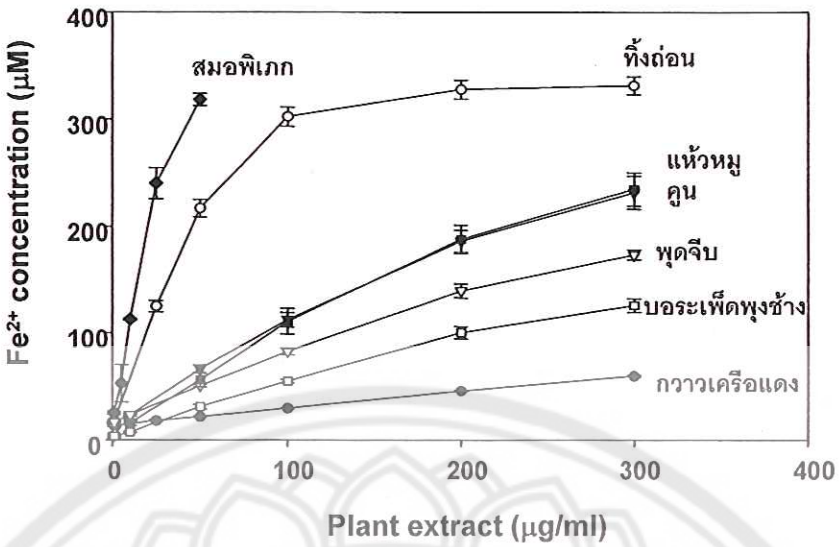
โครงการวิจัยนี้ เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของสารสกัดสมุนไพร 7 ชนิด ได้แก่ สมอพิเภก คูน แห้วหมู บอระเพ็ดพุงช้าง ทิ้งถ่อน กวาวเครือแดง และพุดจีบ (ตารางที่ 2) โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถทดสอบในหลอดทดลอง (in vitro assay) โดยวัดความสามารถในการเป็น reducing agent และความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation

ตารางที่ 2. สมุนไพรบำรุงประสาทที่ใช้ในโครงการวิจัย

Plant	ชื่อไทย	Part
Cyperus rotundus L.	แห้วหมู	Rhizome
Cassia fistula L.	คูน	Root
Tabernaemontana divaricata (L.) R. Br. ex Roem. & Schult.	พุดจีบ	Root
Butea superba Roxb.	กวาวเครือแดง	Tuber
Albizia procera (Roxb.) Benth.	ทิ้งถ่อน	Stem bark
Stephania suberosa Forman	บอระเพ็ดพุงช้าง	Tuber
Terminalia bellirica (Gaertn.) Roxb.	สมอพิเภก	fruit

ฤทธิ์ reducing activity ของสารสกัดสมุนไพร

การทดสอบ reducing activity ของสารสกัดสมุนไพร ในโครงการวิจัยนี้ สามารถวัดได้โดยวัดความสามารถในการเปลี่ยนหรือ reduce ferric (Fe^{3+}) ion ไปเป็น ferrous (Fe^{2+}) ion และจากผลการทดลองพบว่า Fe^{3+} ion จะเปลี่ยนไปเป็น Fe^{2+} ion เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (รูปที่ 1) ซึ่งมีลักษณะเป็น dose-dependence โดยสารสกัดจากสมอพิเภกแสดงฤทธิ์ reducing activity ดีที่สุด ตามด้วย ทิ้งถ่อน แห้วหมู คูน พุดจีบ บอระเพ็ดพุงช้าง และกวาวเครือแดง ตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสมุนไพรไทยที่มีสรรพคุณบำรุงประสาท (neurotonic agents) เหล่านี้มีฤทธิ์ reducing activity ซึ่งเป็นฤทธิ์ในการต้านปฏิกิริยา oxidation ที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้



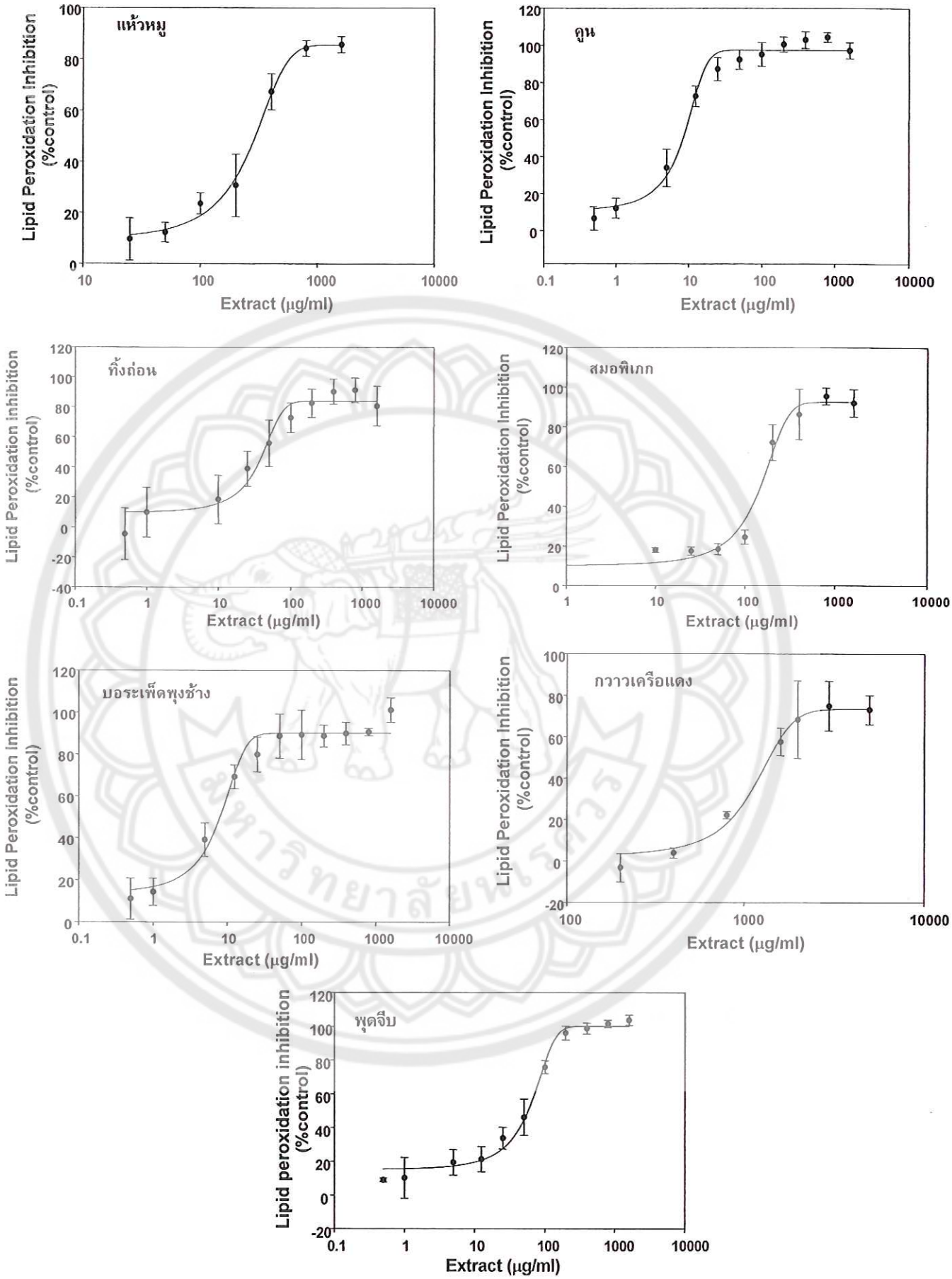
รูปที่ 1 ฤทธิ์ Ferric reducing activity ของสารสกัดสมุนไพร บ่มสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ Fe^{3+} ions เป็นเวลา 60 นาที ปริมาณ Fe^{2+} ions ที่เกิดขึ้นจะวัดได้โดย FRAP assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean±sem จาก 3 การทดลอง โดยแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplication)

ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยา lipid peroxidation ของสารสกัดสมุนไพร

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร ยังสามารถวัดได้โดยวัดความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation ของ brain homogenate ด้วยวิธี TBAR assay จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดสมุนไพรทุกชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยมีลักษณะเป็น dose-dependence (รูปที่ 2) เมื่อคำนวณค่า IC_{50} ได้ผลดังตารางที่ 3 โดยสารสกัดจากบอระเพ็ดพุงช้างและคูนแสดงค่า IC_{50} ในระดับ microgram/ml ได้แก่ 5.93 และ 6.47 μg/ml ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้มีความแรง (potency) ในการยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation สูง

ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ reducing activity และ lipid peroxidation inhibitory activity

ในโครงการวิจัยนี้ เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร พบว่าสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดแสดงความแรงที่แตกต่างกันในการเป็น reducing agent และในการยับยั้ง lipid peroxidation ซึ่งความสามารถในการ reduce โลหะหนัก เป็นกลไกหนึ่งของการต้านการเกิด oxidation จากอนุมูลอิสระ อาจเป็นปัจจัยหนึ่งในการทำให้เกิดการยับยั้ง lipid peroxidation หรือการ oxidation ของไขมัน ดังนั้น จึงได้ทำการหาความสัมพันธ์ correlation ระหว่างความสามารถในการเปลี่ยน Fe^{3+} ion เป็น Fe^{2+} ion และในการยับยั้ง lipid peroxidation ดังแสดงในรูปที่ 3 สารสกัดจาก พุดจีบ ทิ้งถ่อน แห้วหมู และสมอพิเภก แสดงค่า linear correlation ระหว่าง reducing และ lipid peroxidation inhibitory activities (รูปที่ 3A) ส่วนสารสกัดคูนและบอระเพ็ดพุงช้างไม่พบความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงเหมือนสมุนไพรอื่นๆ (รูปที่ 3B) ซึ่งสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้ เป็นสมุนไพรที่มีความแรงในการยับยั้ง lipid peroxidation สูง ขณะที่มีความสามารถปานกลางในการเป็น reducing agents จึงอาจเป็นไปได้ว่านอกเหนือจาก metal ion reducing activity ยังมีกลไกอื่นอีกที่มีผลต่อการยับยั้ง lipid peroxidation จึงทำให้สมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้มีความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation ดี



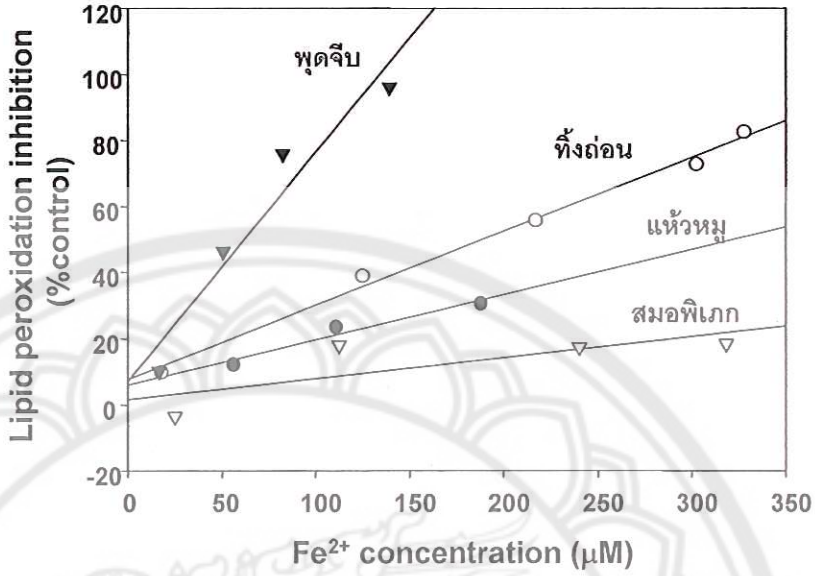
รูปที่ 2 Dose-response curve ของสารสกัดสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้ง lipid peroxidation

ตารางที่ 3 Lipid peroxidation inhibition of plant extracts

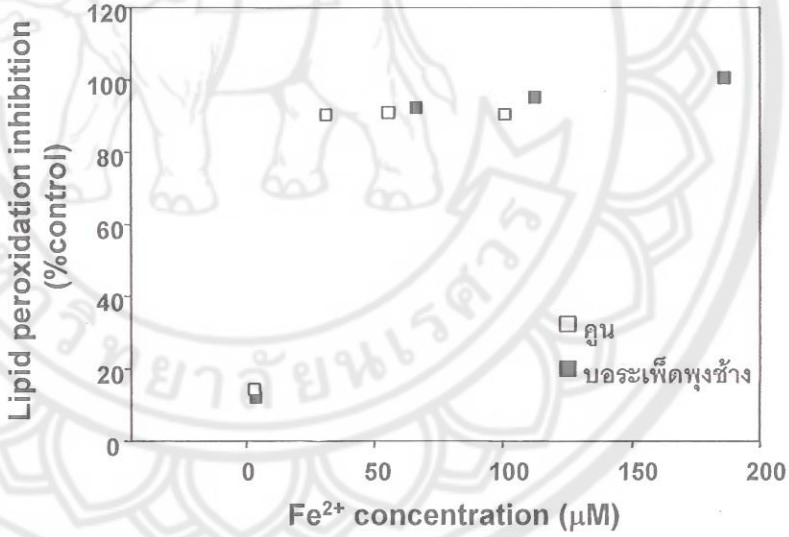
Plant extract	IC_{50} (μg/ml)	95% confidence interval (CI)
S. suberosa	5.93	3.50-8.32
C. fistula	6.47	4.15-10.09
A. procera	29.32	16.23-52.98
T. divaricata	63.86	41.37-98.57
T. bellirica	161.7	61.27-426.9
C. rotundus	329.5	84.51-1285
B. superba	902.9	173.2-4707

ค่า IC_{50} คำนวณด้วย Prism program และแสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่า 95% confident interval (CI) จากการทดลอง 3 การทดลองโดยแต่ละการทดลองทำซ้ำ 2 ครั้ง (duplication)

A



B

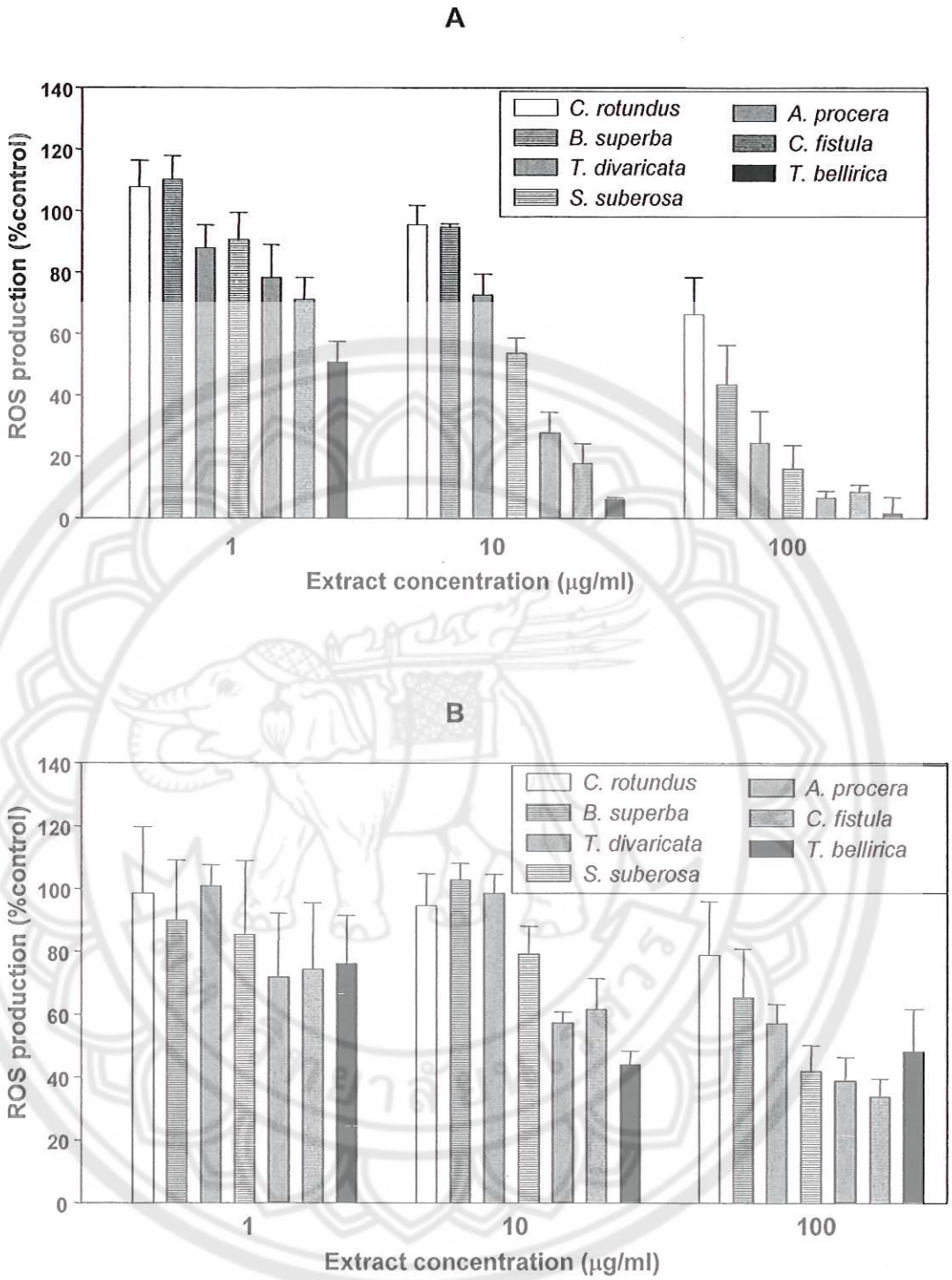


รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่าง ferric reducing และ lipid peroxidation inhibitory activities แต่ละจุดบนรูปกราฟแสดงค่าของสมุนไพรที่ความเข้มข้นหนึ่งๆ ใน ferric reduction และในการยับยั้ง lipid peroxidation สารสกัดพุดจีบ ทิ้งถ่อน แห้วหมูและสมอพิเภก แสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (3A) ส่วนสารสกัดคูนและบอระเพ็ดพุงช้างแสดงความสัมพันธ์ไม่เป็นเส้นตรง (3B)

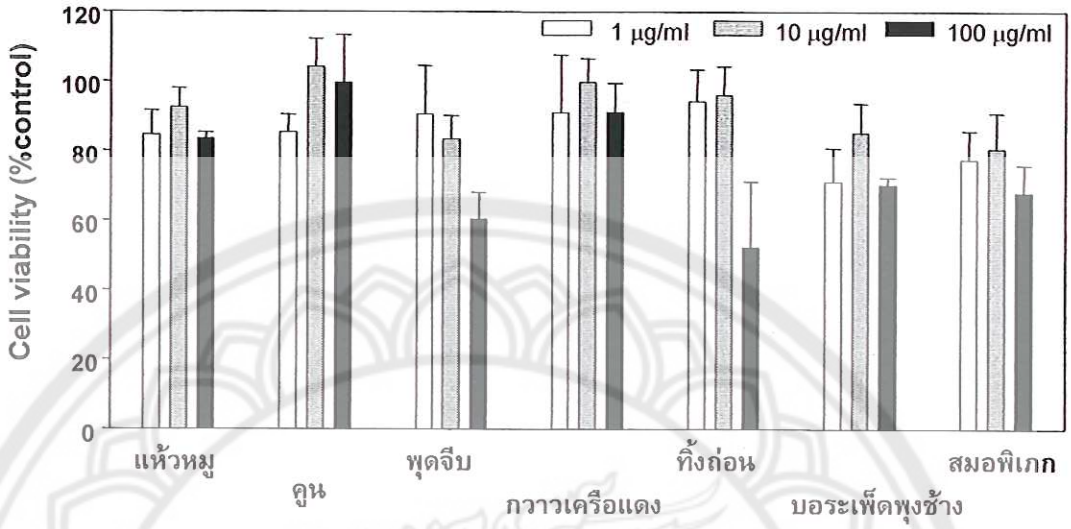
ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการสร้าง ROS ภายในเซลล์

จากผลการทดลองที่ผ่านมา สมุนไพรทั้ง 7 ชนิด แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง การทดลองต่อไปจึงเป็นการทดลองเพื่อทดสอบว่าฤทธิ์อนุมูลอิสระนี้จะเห็นผลในเซลล์ประสาท โดยได้ทำการทดสอบกับ SH-SY5Y neuroblastoma cell line ซึ่งเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมจะสามารถ differentiate ไปเป็นเซลล์ประสาทได้ โดยทำการทดสอบเลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดจากสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ (1, 10 and 100 μg/ml) ก่อนกระตุ้นให้เกิดการ oxidation ด้วย AAPH ซึ่งเป็น free radical generator จากนั้นทำการวัดปริมาณของ reactive oxygen species (ROS) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ด้วยสารเรืองแสง DCF โดยก่อนการ oxidation ทำการ load เซลล์ด้วย DCFH-DA ซึ่งสามารถผ่าน cell membrane เข้าไปในเซลล์ได้ จากนั้นนำ DCFH-DA ส่วนเกินที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เมื่อทำการ oxidation ด้วย AAPH สาร DCFH-DA ภายในเซลล์จะทำปฏิกิริยากับ ROS ที่เกิดขึ้น จะได้เป็นสารเรืองแสง DCF ผลการทดลองดังแสดงดังรูปที่ 4A ซึ่งพบว่า สารสกัดสมุนไพรชนิดต่างๆ สามารถยับยั้งการสร้าง ROS ภายในเซลล์ได้ โดยมีลักษณะเป็น dose-dependence เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้ง สามารถเรียงลำดับได้ ดังนี้ สมอพิเภก > คูน > ทิ้งถ่อน > บอระเพ็ดพุงช้าง > พุดจีบ > กวาวเครือแดง > แห้วหมู ซึ่งระดับของ ROS ที่ลดลงนี้ ไม่ได้เป็นผลมาจากการลดลงของจำนวนเซลล์ เนื่องจากได้ทำการทดสอบในเบื้องต้น พบว่าสารสกัดเกือบทุกชนิดในความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ ไม่มีผลต่อการการเจริญเติบโตของเซลล์ (รูปที่ 5) แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากพุดจีบและทิ้งถ่อนที่ 100 μg/ml มีผลต่อ cell viability ประมาณ 30-40% ซึ่งค่า cell viability หรือการลดลงของเซลล์นี้ ไม่ได้มีสอดคล้องกับความสามารถในการยับยั้งการสร้าง intracellular ROS ของสารสกัดสมุนไพร จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดสมุนไพรบำรุงประสาทกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเซลล์ได้

ผลการทดลองข้างต้น เป็นการศึกษาผลของสารสกัดในเชิงการป้องกันเซลล์ประสาท เนื่องจากเป็นการเลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดสมุนไพรก่อนการกระตุ้นให้เกิดการ oxidation การทดลองต่อไป จึงเป็นการทดลองเพื่อศึกษาว่าสารสกัดสมุนไพรจะสามารถยับยั้งหรือชะลอการสร้างอนุมูลอิสระได้หรือไม่ เมื่อกระบวนการ oxidation หรือเกิดขึ้นแล้ว จึงทำการกระตุ้นการ oxidation ของเซลล์ โดยเติม AAPH ก่อนการเติมสารสกัดสมุนไพร ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4B ซึ่งพบว่า สารสกัดสมุนไพรสามารถยับยั้งการสร้าง ROS ภายในเซลล์ประสาทได้ แม้ว่าความสามารถในการยับยั้งจะไม่ดีเท่ากับเมื่อเซลล์ถูกเลี้ยงด้วยสารสกัดก่อนการ oxidation (รูปที่ 4A) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดสมุนไพรทั้ง 7 ชนิด นอกจากจะมีฤทธิ์ในการป้องกัน ยังสามารถชะลอหรือบรรเทาการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ประสาทได้



รูปที่ 4 ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการสร้าง ROS ภายในเซลล์ประสาท ทำการวัด ROS หลังจากเลี้ยงเซลล์ differentiated SH-SY5Y ด้วยสารสกัดสมุนไพรก่อนการเติม AAPH หรือการกระตุ้นการ oxidation (A) หรือวัด ROS หลังจากเติมสารสกัดสมุนไพรลงในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังการเติม AAPH (B) โดยทั้ง 2 การทดลอง ROS จะถูกวัดหลังจากเติม AAPH แล้ว 1 ชม. สารสกัดสมุนไพรละลายใน DMSO โดยความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ค่าที่แสดงเป็นค่า mean±sem จาก 3 การทดลอง โดยแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplication)



รูปที่ 5 ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาท ทำการวัด cell vilability ด้วย MTT assay หลังจากเลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม. สารสกัดสมุนไพรละลายใน DMSO โดยความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ค่าที่แสดงเป็นค่า mean±sem จาก 3 การทดลอง โดยแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplication)

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง (Conclusion & Discussion)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของสารใดๆ สามารถทำการทดสอบได้ด้วยหลายวิธีการ ขึ้นกับกลไกในการออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น ฤทธิ์ในการจับกับอนุมูลอิสระ (free radical scavenger), ฤทธิ์ในการจับกับโลหะหนัก (metal chelator), ฤทธิ์ในการยับยั้ง lipid peroxidation และฤทธิ์ในการเป็น reducing agent ในโครงการวิจัยนี้ ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชสมุนไพรมีการใช้เพื่อเป็นยาบำรุงประสาท (neurotonic agent) ด้วยการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง lipid peroxidation และฤทธิ์ในการเป็น reducing agent

จากการศึกษาพบว่า สารสกัดจาก สมอพิเภกและทิ้งถ่อน มีฤทธิ์เป็น reducing agent ที่ดีมีความแรงสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสมุนไพรชนิดอื่นๆที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งความสามารถในการเปลี่ยน Fe^{3+} ให้เป็น Fe^{2+} นั้น อาจเป็นกลไกหนึ่งในการยับยั้งการเกิด oxidative stress ที่เกิดขึ้นในร่างกายของคนเราได้ ถึงแม้ว่า Fe^{2+} ion นั้น มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด Fenton reaction ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^-$) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ส่งผลให้มีการสร้าง hydroxyl radical (${}^{\bullet}OH$) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีความแรงและเป็นอันตรายสูง (Liochev and Fridovich, 1994) การเพิ่มขึ้นของ Fe^{2+} ion นั้นไม่จำเป็นที่จะก่อให้เกิดผลเสียต่อร่างกายตามทฤษฎีของ Fenton reaction เนื่องจากบทบาทของ Fe^{2+} ion ในร่างกายคนเรานั้นยังไม่มีความชัดเจนนัก ส่วนหนึ่งเป็นเพราะว่าร่างกายสามารถจับ Fe^{2+} ion ได้ด้วย binding proteins (Kakhlon and Cabantchik, 2002) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาพบว่า Fe^{2+} ion ที่อยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular) สามารถป้องกันเซลล์และป้องกันส่วนประกอบภายในเซลล์จากอันตรายของ H_2O_2 โดยการกระตุ้นให้เกิด Fenton reaction ภายนอกเซลล์ก่อนที่ H_2O_2 จะเข้าเซลล์และก่อให้เกิดการ oxidation ภายในเซลล์ได้ (Hempel et al., 1996). และถึงแม้ว่า ${}^{\bullet}OH$ จะเป็นอนุมูลอิสระที่มีความแรงมาก แต่อายุของ ${}^{\bullet}OH$ สั้นมากจึงมักจะก่อให้เกิดปฏิกิริยาได้เฉพาะในบริเวณใกล้เคียงกับบริเวณที่ ${}^{\bullet}OH$ ถูกสร้างขึ้น(Pastor et al., 2000) ดังนั้น ${}^{\bullet}OH$ ที่ถูกสร้างขึ้นภายนอกเซลล์จึงมักจะทำปฏิกิริยากับสารที่เป็น noncellular จึงเป็นการป้องกันเซลล์และส่วนประกอบภายในเซลล์จากอันตรายของการเกิด oxidation ได้ นอกจากนี้ มีการศึกษาพบว่าการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนระหว่าง Fe^{3+} และ Fe^{2+} (Fe^{3+}/Fe^{2+} ratio) ในกระแสเลือด มีความเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ของธาตุเหล็กในผู้ป่วยบางกลุ่ม (Selvi et al., 2007) จากข้อมูลที่กล่าวมา สมุนไพรบำรุงประสาทเหล่านี้ อาจมีผลป้องกันเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress โดยการกระตุ้นการเปลี่ยน Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} หรือการลดสัดส่วนระหว่าง Fe^{3+} และ Fe^{2+} ในร่างกาย

เป็นที่ทราบกันดีว่า metal ions มีส่วนในการเร่งปฏิกิริยาการ oxidation และเพิ่มการสร้าง ROS ซึ่งจะไปมีผลทำลายโมเลกุลของ DNA โปรตีนหรือกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (Valko et al., 2007) การ oxidation ของกรดไขมันเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิด peroxyl radical (${ROO}^{\bullet}$) และนำไปสู่การเกิด lipid peroxidation และได้ malondialdehyde (MDA) เป็นผลิตผลของปฏิกิริยา (Marnett, 1999; Wang et al., 1996) โดยเราสามารถวัดระดับของ MDA ได้ด้วยวิธี TBARs assay จากผลการทดสอบสารสกัดสมุนไพรทั้ง 7 ชนิด พบว่า สารสกัดจากบอระเพ็ดพุงช้างและคูน มีความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation ได้ดีใกล้เคียง

กัน เมื่อทำการทดสอบหาความสัมพันธ์ correlation ระหว่าง Fe^{3+} reducing activity และ lipid peroxidation inhibition ของสารสกัดสมุนไพรทุกชนิด พบว่าทั้งสองฤทธิ์มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน (linear correlation) ซึ่งความสามารถในการเกิด metal reduction ของสมุนไพร คาดว่าจะเป็นสาเหตุให้ lipid peroxidation ไม่สามารถเกิดได้ เนื่องจาก metal ions มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิด oxidation อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้ ไม่เกิดขึ้นกับสารสกัดจากบอระเพ็ดพุงช้างและคูน ซึ่งเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์แรงในการยับยั้ง lipid peroxidation สูง สำหรับสมุนไพร 2 ชนิดนี้ จึงน่าจะมีกลไกอื่นๆเพิ่มเติมนอกเหนือจาก metal reduction ในการช่วยยับยั้งการเกิด lipid peroxidation เช่น การจับอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) หรือ chain-breaking activity จึงส่งผลให้บอระเพ็ดพุงช้างและคูนสามารถยับยั้ง lipid peroxidation ได้ดี

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ของสมุนไพรทั้ง 7 ชนิด พบว่าสมุนไพรมีความสามารถที่แตกต่างกันและบางชนิดมีฤทธิ์ดี แต่อย่างไรก็ตาม การทดลองข้างต้นเป็นการศึกษาในหลอดทดลอง การวิจัยต่อมาจึงได้ทำการทดลองในระดับที่ลึกขึ้น คือ ศึกษาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง โดยโครงการวิจัยนี้ ได้ทำการทดลองในเซลล์ SH-SY5Y neuroblastoma cell line โดยกระตุ้นให้เกิดการ oxidation ด้วย AAPH ผลการทดลองพบว่า การเลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดจากสมอพิเภกก่อนการกระตุ้นการ oxidation สามารถยับยั้งการสร้าง ROS ภายในเซลล์ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสมุนไพรชนิดอื่นๆ ซึ่งการทดลองก่อนหน้าได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมอพิเภกมีฤทธิ์ reducing activity ดีที่สุด จึงเป็นไปได้ที่ความสามารถในการเป็น reducing agent ของสมอพิเภกจะเป็นปัจจัยในการยับยั้งการสร้าง intracellular ROS แต่ย่างไรก็ตาม metal reducing activity ดูเหมือนจะไม่ใช่ปัจจัยเดียวในการลดการสร้าง ROS ภายในเซลล์ เนื่องจากสารสกัดจากแห้วหมูและคูน ซึ่งมีฤทธิ์ดีพอๆกันในการเป็น reducing agent แต่สารสกัดคูนมีผลในการยับยั้งการเกิด intracellular ROS ได้ต่ำสุด ขณะที่สารสกัดแห้วหมูมีฤทธิ์ลดการสร้าง ROS ภายในเซลล์ได้ดี ซึ่งความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation ของคูนอาจเป็นส่วนที่ทำให้การสร้าง ROS ภายในเซลล์ลดลงได้ นอกจากนี้ ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ยังอาจขึ้นกับคุณสมบัติในการแพร่ผ่าน cell membrane ของสารประกอบในสารสกัดเพื่อเข้าไปทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระต่างๆ ภายในเซลล์ คุณสมบัตินี้ จึงอาจทำให้สารสกัดสมุนไพรมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเซลล์ประสาทได้แตกต่างกัน

ผลการทดลองจากโครงการวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นว่า สมุนไพรไทยที่มีการใช้เพื่อบำรุงประสาทเหล่านี้ สามารถยับยั้งการเกิดการ oxidation ของเซลล์ประสาทได้แม้ว่ากระบวนการ oxidation ได้เกิดขึ้นแล้ว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสมุนไพรเหล่านี้ นอกจากจะช่วยป้องกันการเกิดโรคที่เป็นผลมาจาก oxidative stress ยังสามารถใช้ในการชะลอหรือบรรเทาภาวะของโรคที่เกิดจากการมี oxidative stress มากเกินไปได้

ในปัจจุบัน การศึกษาฤทธิ์หรือศักยภาพของสมุนไพรกลุ่มนี้ เพื่อการนำมาใช้ในการป้องกันระบบประสาท (neuroprotective effect) ยังมีจำกัด การศึกษาก่อนหน้าได้รายงานฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ของสารสกัดจากพุดจีบ บอระเพ็ดพุงช้าง กวางเครือแดง และคูน (Chattipakorn et al., 2007; Ingkaninan et al., 2003) ร่วมกับข้อมูลในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการสร้าง ROS ของเซลล์ประสาทจากการวิจัยนี้ สมุนไพรเหล่านี้บางชนิดจึงน่าจะเป็นสมุนไพรที่มีแนวโน้มที่จะสามารถพัฒนา

ต่อไป เพื่อใช้ในการรักษาหรือบรรเทาโรคเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative diseases) บางชนิดได้ แต่ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น การศึกษาเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ (active compound) ในสารสกัด หรือการทดลองในสัตว์ทดลอง

บรรณานุกรม (Bibliography)

Bastianetto, S., Quirio, R., 2002. Natural extracts as possible protective agents of brain aging. Neurobiology of Aging 23, 891-897.

Bastianetto, S., Ramassamy, C., Dore, S., Christen, Y., Poirier, J., Quirion, R., 2000. The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid. The European Journal of Neuroscience 12, 1882-1890.

Chattipakorn, S., Pongpanparadorn, A., Pratchayasakul, W., Pongchaidacha, A., Ingkaninan, K., Chattipakorn, N., 2007. Tabernaemontana divaricata extract inhibits neuronal acetylcholinesterase activity in rats. Journal of Ethnopharmacology 110, 61-68.

Coyle, J.T., Puttfarcken, P., 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. Science 262, 689-695.

Esposito, E., Rotilio, D., Di Matteo, V., Di Giulio, C., Cacchio, M., Algeri, S., 2002. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. Neurobiology of Aging 23, 719-735.

Hempel, S.L., Buettner, G.R., Wessels, D.A., Galvan, G.M., O'Malley, Y.Q., 1996. Extracellular iron (II) can protect cells from hydrogen peroxide. Archives of Biochemistry and Biophysics 330, 401-408.

Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., Thongnoi, W., 2003. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. Journal of Ethnopharmacology 89, 261-264.

Joseph, J.A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N.A., Bielinski, D., Martin, A., McEwen, J.J., Bickford, P.C., 1999. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. Journal of Neuroscience 19, 8114-8121.

Kakhlon, O., Cabantchik, Z.I., 2002. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. Free Radical Biology & Medicine 33, 1037-1046.

Le Bars, P.L., Katz, M.M., Berman, N., Itil, T.M., Freedman, A.M., Schatzberg, A.F., 1997. A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of Ginkgo biloba for dementia. North American EGb Study Group. JAMA : the Journal of the American Medical Association 278, 1327-1332.

Liochev, S.I., Fridovich, I., 1994. The role of O2.- in the production of HO.: in vitro and in vivo. Free Radical Biology & Medicine 16, 29-33.

Marnett, L.J., 1999. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. IARC Scientific Publications, 17-27.

Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., Brenowitz, M., 2000. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. Journal of Molecular Biology 304, 55-68.

Selvi, R., Angayarkanni, N., Bharathselvi, M., Sivaramakrishna, R., Anisha, T., Jyotirmoy, B., Vasanthi, B., 2007. Increase in Fe3+/Fe2+ ratio and iron-induced oxidative stress in Eales disease and presence of ferrous iron in circulating transferrin. Current Eye Research 32, 677-683.

Thiyagarajan, M., Sharma, S.S., 2004. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. Life Sciences 74, 969-985.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39, 44-84.

Wang, M., Dhingra, K., Hittelman, W.N., Liehr, J.G., de Andrade, M., Li, D., 1996. Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 5, 705-710.

Wang, Q., Sun, A.Y., Simonyi, A., Jensen, M.D., Shelat, P.B., Rottinghaus, G.E., MacDonald, R.S., Miller, D.K., Lubahn, D.E., Weisman, G.A., Sun, G.Y., 2005. Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits. Journal of Neuroscience Research 82, 138-148.

ภาคผนวก (Index)

Manuscript (Draft)

Neurotonic Thai plants reduce reactive oxygen species production in SH-SY5Y neuroblastoma cell line

Nanteetip Limpeanchob[a,*], Asusara Inneum[a], Kornkanok Ingkaninan[b]

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

[b] Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

* Corresponding author;

Name	Nanteetip Limpeanchob
Address	*Faculty of Pharmaceutical Sciences*
	Naresuan University
	Phitsanulok 65000, Thailand
Tel	+66-81-554-3013
Fax	+66-55-261-057
Email	nanteetipl@yahoo.com, nanteetipl@nu.ac.th

ABSTRACT

Aim of study: Oxidative stress is considered as an important causative factor in several neurodegenerative diseases. The study was aimed to determine the antioxidant properties of seven neurotonic Thai plants, possibly influencing their neuroprotective effect in human being.

Material and Methods: Antioxidant power was evaluated by ferric reduction and lipid peroxidation inhibition and cellular reactive oxygen species (ROS) suppression. The ability to suppress cellular oxidative stress was demonstrated in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells in which the intracellular ROS was detected by fluorescence dye.

Results: Whereas *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. and *Albizia procera* (Roxb.) Benth. acted as the ferric reducing agents, *Cassia fistula* L. and *Stephania suberosa* Forman seemed to be the potent inhibitors of lipid peroxidation. Ferric reduction was expected to be responsible for lipid peroxidation inhibition because the linear correlation of these two activities. These plant extracts could also effectively suppress the formation of intracellular ROS in neuroblastoma SH-SY5Y cells, regardless of the extracts were added before or during the oxidative process.

Conclusions: Most of the selected plants demonstrated strong antioxidant activity by acting as metal reducing agents, lipid peroxidation inhibitors, and/or intracellular ROS suppressants. This study provides the potential mechanisms as neuroprotective agents of Thai neurotonic plants which could be beneficial to prevent or delay neurodegenerative processes.

Keywords: antioxidant, reactive oxygen species, neuroprotection, neurodegenerative disease, Thai plant, herbal medicine

1. Introduction

Oxygen free radicals or reactive oxygen species (ROS) are products of normal cellular metabolism. Overproduction of ROS is termed oxidative stress lead to harmful effect resulting from biological damage to cellular lipid, protein and DNA (Valko et al., 2007). Oxidative stress has been implicated in various pathological conditions such as cardiovascular diseases, cancer, and neurological disorders (Valko et al., 2007).

The brain consumes large amount of oxygen and is particularly vulnerable to oxidative damage. There is substantial evidence showing the relationships of ROS production, induction of cell death (apoptosis or necrosis) and pathogenesis of neurological disorders including Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Esposito et al., 2002; Valko et al., 2007). Thus, there are large numbers of experiments showing the neuroprotective effect of antioxidants including vitamins and natural substances in in vitro and in animal models of neurodegeneration (Esposito et al., 2002). Although the efficacy of these antioxidants for treatment of neurodegenerative disorders is still unclear, their potentials as alternative therapy or nutritional supplement to slow down the progression of those neuronal diseases have much received much attention. Therefore there is increasing number of studies investigating the neuroprotective effects of neutritional antioxidants as well as natural compounds (Acharya et al., 2008; De Ruvo et al., 2000; Steele et al., 2007).

In Thailand, there are a number of herbal medicines that are believed to have rejuvenating and neurotonic effects. In the present study, selected neurotonic plants including *Cyperus rotundus* L., *Cassia fistula* L., *Tabernaemontana divaricata* (L.) R. Br. ex Roem. & Schult., *Butea superba* Roxb., *Albizia procera* (Roxb.) Benth., *Stephania suberosa* Forman, and *Terminalia bellerica* (Gaertn.) Roxb, were evaluated for the antioxidant properties potentially accounting for their neuroprotection. Some of these plants were previously demonstrated their beneficial effect for AD by inhibiting

acetylcholinesterase (AChE) activity (Ingkaninan et al., 2003). Some of them such as *C. rotundus*, *C. fistula*, and *T. divaricata* exhibited antioxidant activity in in vitro assays (Kilani et al., 2008; Luximon-Ramma et al., 2002; Thind et al., 2008; Yazdanparast and Ardestani, 2007). This study was aimed to test the ability of these plant extracts to suppress the oxidative stress in test tube and cell culture models. Our results indicated that some of the selected plant extracts demonstrated strong antioxidant activity by acting as metal reducing agents and lipid peroxidation inhibitors. Interestingly, these plants extracts could reduce the formation of intracellular ROS in neurobalstoma SH-SY5Y cell line.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

(MTT), 2,4,6-tripyridyl-s-trizine (TPTZ), 5,5'-dithio(bis)nitrobenzoic acid (DTNB), aprotinin, leupeptin, pepstatin A, phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), acetylthiocholine iodide, trichloroacetic acid, thiobarbituric acid, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), Retinoic acid, 2,2'-azobis(2-amidinopropane)hydrochloride (AAPH), and all the materials for cell culture were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Fetal bovine serum was purchased from Gibco.

2.2. Preparation of plant extracts

Plants were collected from Phetburi province, Thailand. It was identified by Assoc. Prof. Dr. Wongsatit Chuakul, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Thailand. The voucher specimen was kept at the PBM Herbarium, Mahidol University, Thailand. The aerial part was collected, cut into small pieces and dried in a hot-air oven at 50°C for 12 h. The dried plant material was coarsely powdered. The dried plant material was soaked in water. After 24 h, the water was mechanically squeezed out of the plant material. The plant material was percolated with 95% ethanol for 8 h. The residue was extracted again

twice using the same procedure. The combined extract was filtrated and dried under reduced pressure.

สำนักหอสมุด
- 5 JUL 2011

2.3. Cell culture preparation

Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F-12 containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin–streptomycin. Cells were maintained at 37 °C in CO_2 incubator in a saturated humidity atmosphere containing 95% air and 5% CO_2. All cell lines were propagated in culture flasks and subsequently plated in 96-well plates for treatments. The medium was then changed to DMEM supplemented 1% FBS and 10 μM retinoic acid and the cells allowed to differentiate for 6 days.

2.4. Cell viability test

Cultured cell survival was quantified by MTT assay. MTT assay is based on the ability of a mitochondria dehydrogenase enzyme from viable cells to cleave the tetrazolium rings of the pale yellow MTT and form dark blue formazan crystals. Two hours before the end of cell treatments, 20 μl of MTT (5 mg/ml in phosphate buffer saline, PBS) were added to each well. At the end of treatment, the medium was remove, 200 μl of DMSO:ethanol (1:1) were added to each well to dissolve crystals. The color was quantified using ELISA reader at 550 nm.

2.5. Lipid peroxidation determination

To initiate lipid peroxidation, rat brain homogenates were incubated with 400 μM $FeCl_2$ and 200 μM ascorbic acid at 37 °C for 1 h. Each plant extract was added to the brain

homogenate before lipid peroxidation induction. At the end of the incubation period, TBAR solution (10% trichloroacetic acid, 7% thiobarbituric acid, and 4% HCl final) was added to the mixtures, heated at 95°C for 1 h, cooled to room temperature, and spun at 3000×g for 5 min to pellet precipitated protein. The clarified supernatant was read on a plate reader at 532 nm. Lipid peroxidation was calculated and converted to percentage of untreated controls.

2.6. Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay)

The FRAP assay was used to determine the reducing ability of tested plant extracts. The method was previously described (Benzie and Strain, 1996). Briefly, FRAP reagent was freshly prepared by mixing 3 mM acetate buffer, pH 3.6, 10 mM TPTZ in 40 mM HCl, 20 mM $FeCl_3$ (10:1:1). Tested plant extract (50 μl) was added to 150 μl of FRAP reagent. The absorbance was read at 593 nM. The results were expressed in μM of Fe^{2+} ions.

2.7. Determination reactive oxygen species (ROS)

Differentiated SH-SY5Y cells were treated with 1 mM AAPH for indicated period. ROS determination was performed by using a fluorescent probe DCFH-DA. 10 μM of DCFH-DA in methanol were added to medium and incubated at 37°C for 30 min. Cells were washed twice with PBS to remove the excess of DCFH-DA. To test protective effect of plant extract, differentiated SH-SY5Y cells were incubated with the extract 30 min either before or after adding free radical generator APPH. Intracellular ROS generated in the cells causes oxidation of DCFH-DA, yielding the fluorescent product 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). The fluorescence was monitored by spectrofluorometer at excitation 485 nm and emission 530 nM.

2.8. Statistical analysis

Results are expressed as the mean±SEM of n experiments. The data were analyzed by repeated measurements of one-way analysis of variance (ANOVA). Differences were considered to be significance when $p < 0.05$. 50% inhibitory concentration (IC50) values were calculated using the Prism program (GraphPad Software Inc).

3. Results

3.1. Reducing activity of plant extracts

In this study, the FRAP assay was used to test the reducing activity of plant extracts. The ability to reduce ferric (Fe^{3+}) to ferrous (Fe^{2+}) was determined. Our result showed the increasing amount of Fe^{2+} ion in the presence of increasing concentrations of all plant extracts in the dose-dependent manner (figure 1). The extract from *T. bellirica* exhibited the highest reducing activity followed by *A. procera*, *C. rotundus*, *C. fistula*, *T. divaricata*, *S. suberosa*, and *B. superba*. This result indicated that all selected neurotonic plant extracts had ability to reduce ferric ions and their reducing powers were clearly concentration dependent.

3.2. Lipid peroxidation inhibition

Our results also showed that all selected neurotonic plant extracts inhibited the lipid peroxidation reaction of brain homogenate in a dose-dependent manner. The example dose-response curve of *T. divaricata* of lipid peroxidation inhibition was showed in figure 2. The IC_{50} of lipid peroxidation inhibitory activity of all plant extracts were calculated and demonstrated in table 2. The extract from *S. suberosa* and *C. fistula* demonstrated the IC_{50} in the micromolar level, 5.93 and 6.47 μg/ml, respectively, indicating as potent inhibitors of lipid peroxidation.

3.3. Correlation of reducing and lipid peroxidation inhibitory activities

From this study, all tested extracts exhibited different antioxidant power. Although difference in strength, they have both reducing and lipid peroxidation inhibitory activities. The ability to reduce metal ions of any compounds in the extracts may be responsible for the suppression of lipid peroxidation reaction. Thus, the correlations of the two antioxidant activities were performed as shown in figure 3. The extracts from *T. divaricata*, *A. procera*, *C. rotundus* and *T. bellirica* demonstrated the linear correlations between their reducing and lipid peroxidation inhibitory activities (figure 3A). Interestingly, the correlation of these two activities was non-linear for the extracts from *C. fistula* and *S. suberosa* (figure 3B). These two plants were previously indicated as strong inhibitors against lipid peroxidation, whereas their reducing activity was moderate. This information suggested additional antioxidant mechanisms participating in lipid peroxidation inhibition besides metal reduction.

3.4. Suppressive effect of neurotonic plant extracts on intracellular ROS formation

To determine whether the antioxidant power of the extracts could be occurred in neuronal cells, the level of ROS in neuroblastoma cell line SH-SY5Y was measured. Differentiated SH-SY5Y cells were pre-treated with individual plant extract (1, 10 and 100 μg/ml) prior to generating oxidative stress with AAPH, the free radical generator (figure 4A). These cells were pre-loaded with DCFH-DA which could react with intracellular ROS to form fluorescent DCF. The result demonstrated that the production of ROS inside SH-SY5Y cells was decreased after incubating with tested plant extracts in the dose-dependent manner (figure 4). The intracellular ROS formation was diminished by the extracts of *T. bellirica* > *C. fistula* > *A. procera* > *S. suberosa* > *T. divaricata* > *B. supera* > *C. rotundus*, respectively. The decrease in ROS level was not the result of the decrease

in cultured cell numbers because the extracts at all tested concentrations did not have effect on SH-SY5Y cell viability (data not shown). However, the extracts from *T. divaricata* and *A. procera* at 100 μg/ml showed slightly decrease in cell viability, approximately 20%. This result suggests that this group of Thai neurotonic plants could suppress cellular oxidative stress by lowering intracellular ROS level.

This suppression was observed when cells were exposed to the extract prior to the free radicals was added, suggesting the oxidation preventive effect. The later experiments were conducted to test whether these plant extracts would be effective to inhibit ROS production if free radicals or oxidative stress already occurred. The result showed that all extracts could also suppress intracellular ROS level when the extracts were added after oxidation happened in the similar pattern as previous experiments (figure 4B). However, the inhibitory effect in this case was not as effective as the ability to prevent cellular oxidation. In addition to preventive effect, this study suggests the ability of the extracts to slow down the propagation process of neuronal oxidation reaction.

4. Discussions

Antioxidant power of any substances can be determined by several different methods according to their mechanism of actions including free radical scavenger, metal chelator, lipid peroxidation inhibition, and reducing activity. In this study, the extracts of selected neurotonic plants were tested for their ability to suppress the in vitro oxidative stress by monitoring the ferric ion reduction and lipid peroxidation inhibitory activity.

From this study, the extracts from *T. bellirica* and *A. procera* acted as potent reducing agents. The reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} by these extracts could possibly counteract with an oxidation reaction generally occurred in living organisms. Although Fe^{2+} ion participates in the Fenton reaction, generating highly reactive hydroxyl radical ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^-$) (Liochev and Fridovich, 1994), the significance of free iron

under physiological condition is not clear due to the sequestration by various metal-binding proteins (Kakhlon and Cabantchik, 2002). Interestingly, the extracellular Fe^{2+} was found to protect the intracellular space from H_2O_2 probably by initiating the Fenton reaction outside the cell (Hempel et al., 1996). Despite $^{\bullet}OH$ is a highly reactive oxygen radical, it has a very short half-life and reacts nearby it site of formation (Pastor et al., 2000). Thus $^{\bullet}OH$ generated from H_2O_2 in extracellular space might react with noncellular components, thereby protecting the intracellular elements. In addition, the increase in the Fe^{3+}/Fe^{2+} ratio was demonstrated in iron-induced oxidative stress in the blood sample of patients compared to healthy controls (Selvi et al., 2007). Taken together these neurotonic plants could potentially prevent neuronal cells from the extracellular oxidative stress by suppressing the Fe^{3+}/Fe^{2+} ratio.

It is known that metal-induced generation of ROS resulting in the attack of DNA, protein and lipid, particularly polyunsaturated fatty acid (Valko et al., 2007). The oxidation of fatty acid initiates peroxyl radical ($ROO^{\bullet}$) and consequently leads to the propagation of lipid peroxidation process generating malondialdehyde (MDA) final product (Marnett, 1999; Wang et al., 1996). MDA lipid peroxidation product can be detected by TBARs assay. Besides Fe^{3+} reducing activity, all extracts used in this study were tested for their lipid peroxidation inhibition. Our result demonstrated that the extracts from *S. suberosa* and *C. fistula* were very effective to inhibit lipid peroxidation. Interestingly, lipid peroxidation inhibitory effect of most extracts was proportional corresponding to their metal reducing activity. Metal reduction occurred in aqueous compartment might consequently lead to the oxidation suppression of cellular lipid components. However, this correlation was not observed in the extracts from *S. suberosa* and *C. fistula*. In addition to metal reduction, additional mechanisms such as free radical scavenging or chain-breaking abilities were probably accounted for their lipid peroxidation inhibition causing them strong inhibitors of lipid oxidation.

Since some of tested extracts showed high antioxidant activities, we further investigated whether they could suppress the oxidative stress in neuronal cells. The production of ROS inside SH-SY5Y neuroblastoma cells was monitored following oxidative stress induction by AAPH. When cells were incubated with plant extracts before initiation of free radical in the medium, the extract from *T. bellirica* showed the best suppression of intracellular ROS formation. In this study, *T. bellirica* extract also showed the best ferric reducing activity which might consequently lead to effectively lowering ROS level inside cells. However, metal-reduction ability did not seem to be the only mechanism of action of cellular ROS suppression. The extracts from *C. rotundus* and *C. fistula* showed the very similar ferric reducing activity but the former expressed the least ROS suppression whereas the later could suppress ROS formation effectively. The lipid peroxidation inhibitory effect of *C. fistula* was perhaps involved with the intracellular ROS decrement. In addition, the ability of active constituents in the extract to pass through plasma membrane either to directly scavenge free radical or interrupt the oxidation process in cell interior, might be one of the significant factors directing differences in inhibiting cellular oxidative stress.

The result here also demonstrates that this group of neurotonic plants could suppress the cellular oxidative stress even though they were applied in the midst of ongoing oxidation reaction. This effect is likely to be beneficial for slowing down the progression of neurodegeneration resulted from overproduction of oxidative substances.

At this point, there is still limited number of studies demonstrating the potential of this group of plants as the neuroprotective agents. Previous study reported the acetylcholinesterase inhibitory activity of *T. divaricata*, *S. suberosa*, *B. superba* and *C. fistula* (Chattipakorn et al., 2007; Ingkaninan et al., 2003). Together with their antioxidant properties and neuronal ROS suppression, some of them possibly could be effectively used as an alternative therapy or supplement in neurodegenerative disorders. However, further

intensive experiments are required to provide adequate information such as identification of their active constituents as well as in vivo study.

5. Conclusions

The present study demonstrates the antioxidant properties of some neurotonic Thai plants in terms of metal reduction, lipid peroxidation inhibition and cellular ROS suppression. For some plant extracts, ferric reducing ability was likely to be responsible for inhibition of lipid peroxidation since these two antioxidant mechanisms display proportional relationships. Beside metal reduction, extra antioxidant mechanisms seem to be involved in lipid peroxidation inhibition for *C. fistula* and *S. suberosa*. Interestingly, several of the selected plants could effectively suppress the production of intracellular ROS in SH-SY5Y neuroblastoma cells. Taken together, some of these selected neurotonic Thai plants exhibit strong antioxidant activities which could be beneficial as neuroprotective agents in patients with certain neurodegenerative disorders or as supplement to prevent naturally degeneration of neuronal cells in risk group people.

Acknowledgements

The authors would like to thank Prof. Hans E. Junginger for his suggestions in preparing the manuscript. This study was financial supported by Naresuan University Research Fund (Grant number: RX-AR-035/2551).

References

Acharya, M.M., Hattiangady, B., Shetty, A.K., 2008. Progress in neuroprotective strategies for preventing epilepsy. Progress in Neurobiology 84, 363-404.

Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry 239, 70-76.

Chattipakorn, S., Pongpanparadorn, A., Pratchayasakul, W., Pongchaidacha, A., Ingkaninan, K., Chattipakorn, N., 2007. Tabernaemontana divaricata extract inhibits neuronal acetylcholinesterase activity in rats. Journal of Ethnopharmacology 110, 61-68.

De Ruvo, C., Amodio, R., Algeri, S., Martelli, N., Intilangelo, A., D'Ancona, G.M., Esposito, E., 2000. Nutritional antioxidants as antidegenerative agents. International Journal of Developmental Neuroscience 18, 359-366.

Esposito, E., Rotilio, D., Di Matteo, V., Di Giulio, C., Cacchio, M., Algeri, S., 2002. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. Neurobiology of Aging 23, 719-735.

Hempel, S.L., Buettner, G.R., Wessels, D.A., Galvan, G.M., O'Malley, Y.Q., 1996. Extracellular iron (II) can protect cells from hydrogen peroxide. Archives of Biochemistry and Biophysics 330, 401-408.

Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., Thongnoi, W., 2003. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. Journal of Ethnopharmacology 89, 261-264.

Kakhlon, O., Cabantchik, Z.I., 2002. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. Free Radical Biology & Medicine 33, 1037-1046.

Kilani, S., Ben Sghaier, M., Limem, I., Bouhlel, I., Boubaker, J., Bhouri, W., Skandrani, I., Neffatti, A., Ben Ammar, R., Dijoux-Franca, M.G., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., 2008. In vitro evaluation of antibacterial, antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of the tubers infusion and extracts of Cyperus rotundus. Bioresource Technology 99, 9004-9008.

Liochev, S.I., Fridovich, I., 1994. The role of O2.- in the production of HO.: in vitro and in vivo. Free Radical Biology & Medicine 16, 29-33.

Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M.A., Aruoma, O.I., 2002. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of Cassia fistula. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 5042-5047.

Marnett, L.J., 1999. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. IARC Scientific Publications, 17-27.

Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., Brenowitz, M., 2000. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. Journal of Molecular Biology 304, 55-68.

Selvi, R., Angayarkanni, N., Bharathselvi, M., Sivaramakrishna, R., Anisha, T., Jyotirmoy, B., Vasanthi, B., 2007. Increase in Fe3+/Fe2+ ratio and iron-induced oxidative stress in Eales disease and presence of ferrous iron in circulating transferrin. Current Eye Research 32, 677-683.

Steele, M., Stuchbury, G., Münch, G., 2007. The molecular basis of the prevention of Alzheimer's disease through healthy nutrition. Experimental Gerontology 42, 28-36.

Thind, T.S., Agrawal, S.K., Saxena, A.K., Arora, S., 2008. Studies on cytotoxic, hydroxyl radical scavenging and topoisomerase inhibitory activities of extracts of Tabernaemontana divaricata (L.) R.Br. ex Roem. and Schult. Food and Chemical Toxicology 46, 2922-2927.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39, 44-84.

Wang, M., Dhingra, K., Hittelman, W.N., Liehr, J.G., de Andrade, M., Li, D., 1996. Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 5, 705-710.

Yazdanparast, R., Ardestani, A., 2007. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of Cyperus rotundus. Journal of Medicinal Food 10, 667-674.

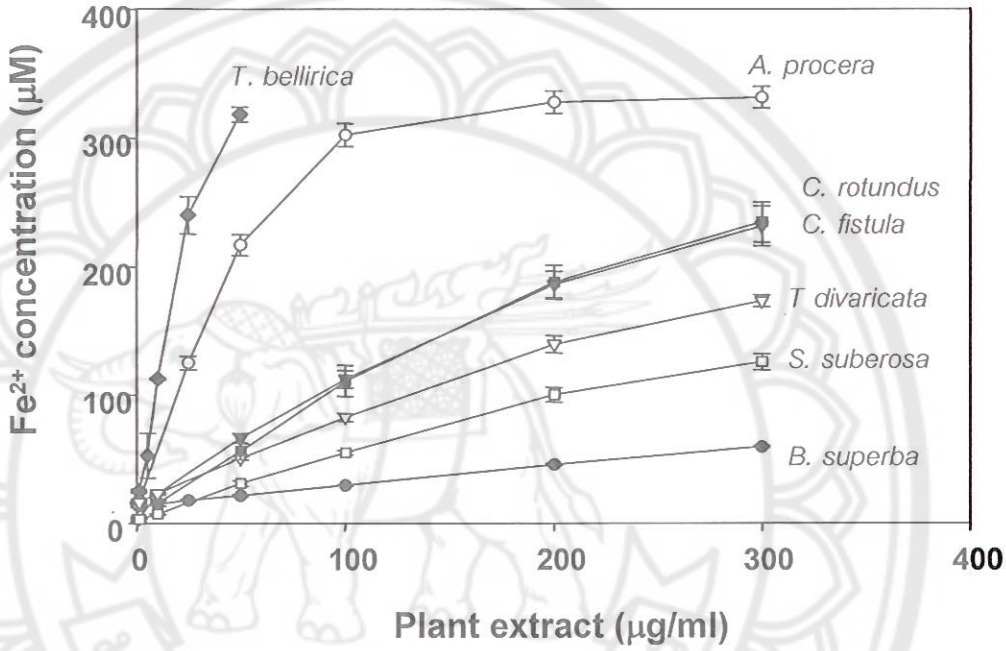


Figure 1. Ferric ion reducing activity of plant extracts. Various concentrations of selected plant extracts were incubated with Fe^{3+} ions for 60 min. The amount of Fe^{2+} ions generated from Fe^{3+} ions were then measured by FRAP assay. The results are mean±SEM from 3 experiments performing in triplicates.

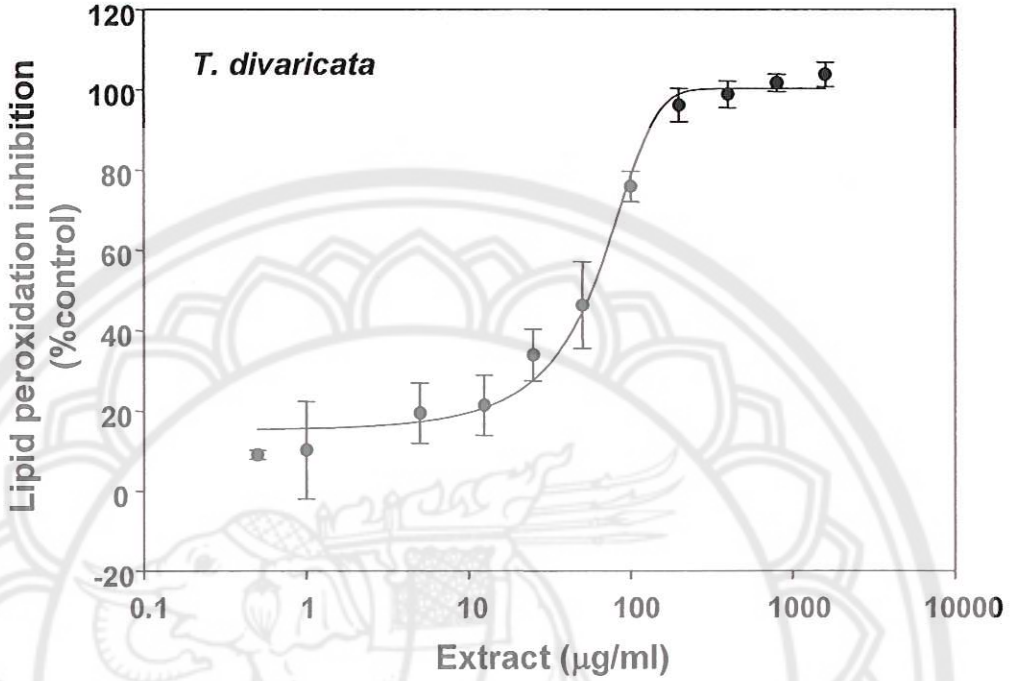


Figure 2. Dose-response curve of lipid peroxidation inhibitory activity of *T. divaricata* extract. Lipid peroxidation reactions were generated in the presence of various concentrations of *T. divaricata* extracts and were measured by the TBARs assay. Degrees of inhibitory activity were calculated as % of control in which lipid peroxidation was conducted in the absence of *T. divaricata* extract. The results are mean±SEM from 3 experiments performing in duplicates.

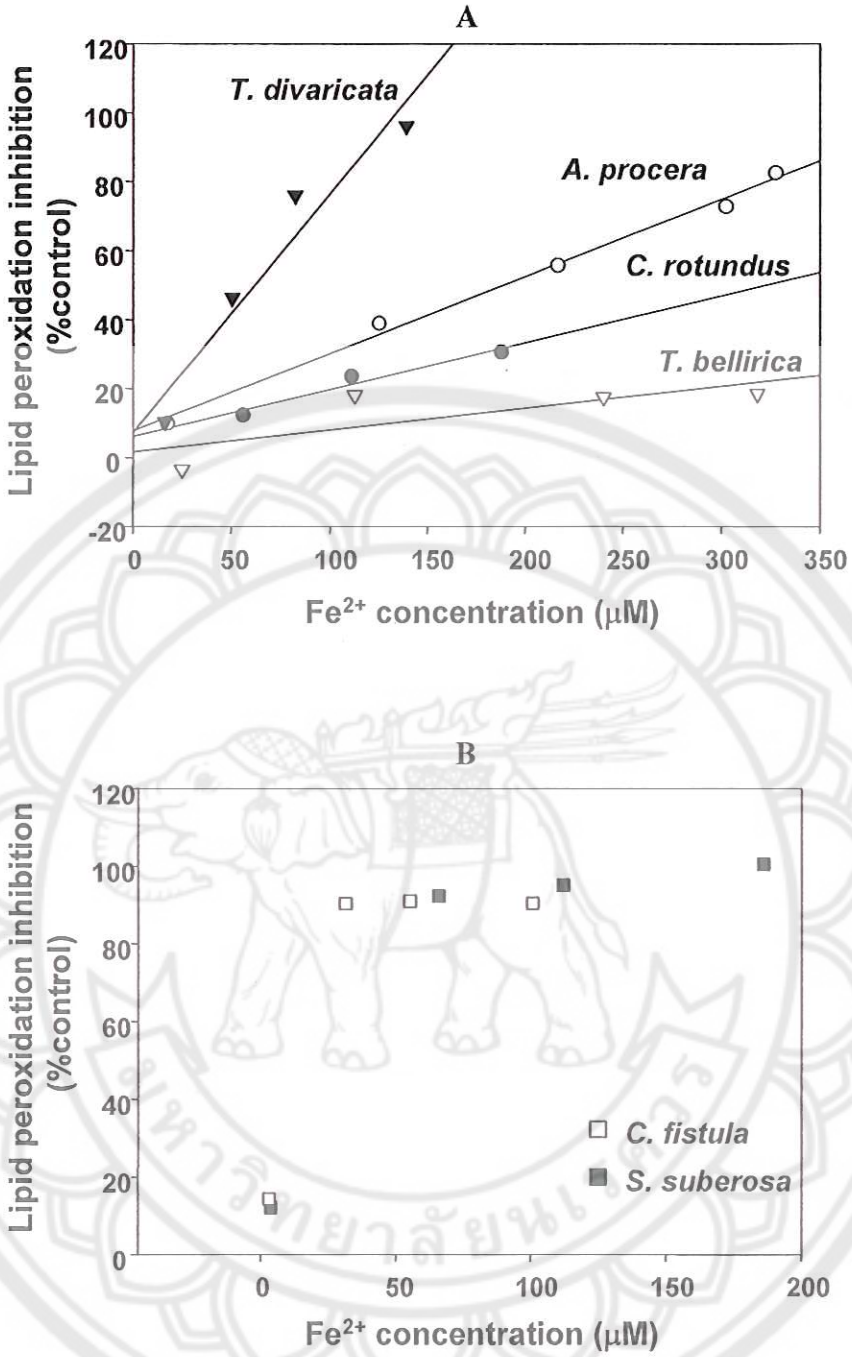


Figure 3. Correlation between ferric reducing and lipid peroxidation inhibitory activities. Each point on the graph represents ferric ion reduction and lipid peroxidation inhibition of each plant extract at the same concentration. The extracts from *T. divaricata*, *A. procera*, *C. rotundus* and *T. bellirica* show linear correlation (3A) whereas these of *C. fistula* and *S. suberosa* display non-linear pattern (3B).

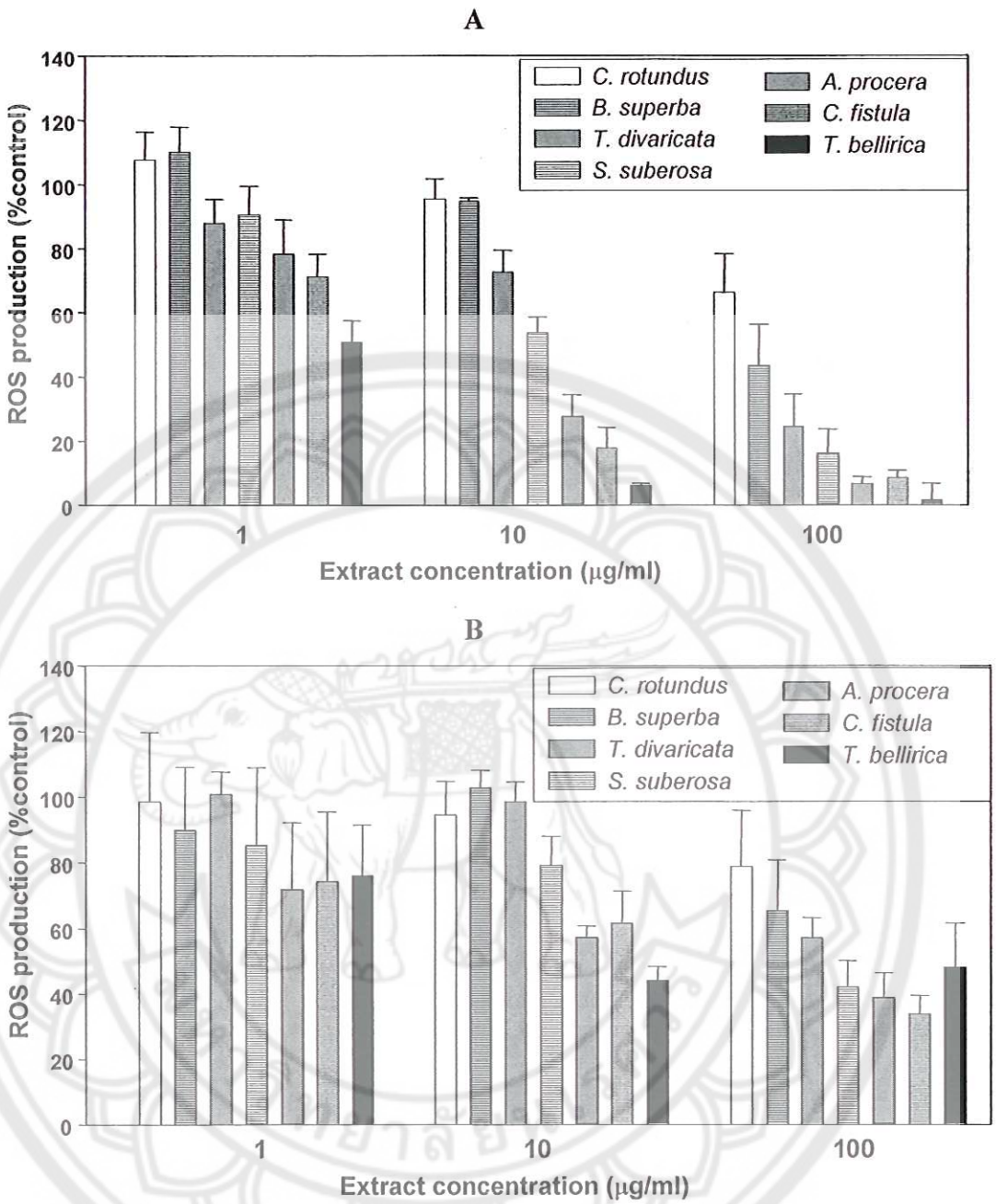


Figure 4. Effect of plant extracts on intracellular ROS production. Differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells were pre-treated with the selected plant extracts before AAPH (A) or the extracts were added into the medium after free radical AAPH (B). All plant extracts were dissolved in DMSO provided non-toxic 0.1% final concentration in culture medium. The levels of ROS inside cells were measure by DFC fluorescence. The results are mean±SEM from 3 experiments performing in triplicates.

Table 1. The selected neurotonic plant extracts used in this study

Plant	Part
Cyperus rotundus L.	Rhizome
Cassia fistula L.	Root
Tabernaemontana divaricata (L.) R. Br. ex Roem. & Schult.	Root
Butea superba Roxb.	Tuber
Albizia procera (Roxb.) Benth.	Stem bark
Stephania suberosa Forman	Tuber
Terminalia bellirica (Gaertn.) Roxb.	Fruit

Table 2 Lipid peroxidation inhibition of plant extracts

Plant extract	IC_{50} (μg/ml)	95% confidence interval (CI)
S. suberosa	5.93	3.50-8.32
C. fistula	6.47	4.15-10.09
A. procera	29.32	16.23-52.98
T. divaricata	63.86	41.37-98.57
T. bellirica	161.7	61.27-426.9
C. rotundus	329.5	84.51-1285
B. superba	902.9	173.2-4707

Lipid peroxidation inhibition was tested in the presence of various concentrations of plant extracts. The IC_{50} was calculated using Prism program and represented as average and 95% CI of 3 experiments performing in duplicates.