

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท N1E-115 ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด

สดุดี รัตนจรัสโรจน์*, วารุณี จิรวัดนาพงศ์, ณัฐพร พลแสน, นิธิดา พลโคตร, ยุวดี เมตตาเมธา, แสงตะวัน ศรีโบราณ, ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ อำเภอเมืองนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี 11000

* ผู้รับผิดชอบบทความ: sadudee.r@dmsc.mail.go.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ภาวะเครียดออกซิเดชันมีบทบาทสำคัญต่อพยาธิสรีรวิทยาของโรคความเสื่อมของประสาท เปลือกมังคุดอุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มแซนโทนซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงอาจใช้บรรเทาหรือชะลอการเสื่อมของเซลล์ประสาทได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของเปลือกมังคุดต่อความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมตในเซลล์ N1E-115

วิธีการศึกษา: นำสารสกัดด้วยน้ำ (GM-W) และสารสกัดด้วยเอทานอล (GM-E) จากเปลือกมังคุดมาทดสอบฤทธิ์ดักจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์และทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท N1E-115 ที่เหนี่ยวนำให้บาดเจ็บด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมต แล้วประเมินความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT reduction assay และตรวจสอบกลไกการออกฤทธิ์ผ่านวิธีการส่งสัญญาณของเซลล์ mitogen activated protein kinase (MAPK) และ phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) โดยใช้สารยับยั้งจำเพาะ PD98059 และ LY294002

ผลการศึกษา: สารสกัด GM-W และ GM-E แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีมาก โดยมีค่า $IC_{50} = 29.11 \pm 3.88$ และ $14.49 \pm 1.66 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ พบว่าการสัมผัสสารสกัด GM-E ทั้งแบบพร้อมกัน (co-exposure) และแบบก่อนการเหนี่ยวนำให้บาดเจ็บ (pre-exposure) สามารถลดการตายของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่สารสกัด GM-W ไม่แสดงผลปกป้องเซลล์ สำหรับความเป็นพิษจากกลูตาเมต พบว่าเฉพาะการสัมผัสร่วมกับสารสกัด GM-E เท่านั้นที่แสดงผลปกป้องเซลล์ นอกจากนี้ พบว่าการเติมสารยับยั้งวิถี MAPK (PD98059) และ PI3K (LY294002) สามารถต้านฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัด GM-E จากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมตได้

อภิปรายผล: สารสกัด GM-E จากเปลือกมังคุดแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท N1E-115 จากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมต โดยกลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทอย่างน้อยอาจมีความเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน และการส่งสัญญาณผ่านวิถี MAPK และ PI3K ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติมีประสิทธิผลในการลดความเสียหายของเซลล์ที่เหนี่ยวนำด้วยอนุมูลอิสระ จึงเป็นทางเลือกที่มีศักยภาพในการป้องกันและชะลอการเสื่อมของเซลล์ประสาท

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: การศึกษานี้สนับสนุนศักยภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดในการปกป้องเซลล์จากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมต ซึ่งอาจนำไปใช้เพื่อป้องกันหรือชะลอการเกิดโรคความเสื่อมของระบบประสาทได้ ควรมีการศึกษาสารสกัดจากเปลือกมังคุดและอนุพันธ์ xanthones ต่อไปโมเดลความเสื่อมของเซลล์ที่เฉพาะเจาะจงต่อพยาธิสภาพหรือทดสอบในสัตว์ทดลองเพื่อหาสารออกฤทธิ์ พร้อมตรวจสอบฤทธิ์และกลไกระดับโมเลกุลให้ชัดเจน รวมทั้งการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อสุขภาพโดยใช้นาโนเทคโนโลยี

คำสำคัญ: มังคุด, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน, ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, กลูตาเมต

Antioxidant Activity and Neuroprotective Effect of *Garcinia mangostana* Pericarp Extracts on N1E–115 Cells

Sadudee Rattanajarasroj*, Warunee Jirawattanapong, Nattaporn Polsan, Nithida Phonkot, Yuwadee Mettametha, Sangtawan Sriboran, Sakwichai Ontong

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Tiwanon Road, Muang Nonthaburi District, Nonthaburi 11000, Thailand

*Corresponding author: sadudee.r@dmsc.mail.go.th

Abstract

Introduction and Objective: Oxidative stress plays a vital role in the pathophysiology of neurodegenerative diseases. Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) pericarp is rich in phenolic compounds, particularly xanthones, which possess potent antioxidant activities and may alleviate or delay neuronal degeneration. This study aimed to investigate the antioxidant and neuroprotective activities of *G. mangostana* pericarp extracts against hydrogen peroxide (H_2O_2)– and glutamate–induced neurotoxicity in N1E–115 cells.

Methods: *G. mangostana* pericarp water extract (GM–W) and ethanol extract (GM–E), were evaluated for their antioxidant activity using a superoxide scavenging assay. Neuroprotective effects against H_2O_2 – and glutamate–induced injury were assessed using the 3–[4,5–dimethylthiazol–2–yl]–2,5–diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. Furthermore, the underlying neuroprotective mechanisms were investigated by using specific inhibitors of the mitogen–activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3–kinase (PI3K) signaling pathways.

Results: GM–W and GM–E showed strong antioxidant activities with IC_{50} 29.11 ± 3.88 and 14.49 ± 1.66 μ g/mL, respectively. Co–exposure or pre–exposure to GM–E significantly reduced H_2O_2 –induced cell death, whereas GM–W showed no protective effect. For glutamate toxicity, only co–exposure with GM–E demonstrated neuroprotection. Additionally, the presence of MAPK and PI3K inhibitors significantly antagonized the neuroprotective effects of GM–E against both H_2O_2 – and glutamate–induced neurotoxicity.

Discussion: GM–E protected neuronal cells from H_2O_2 – and glutamate–induced toxicity. This neuroprotection is likely mediated through both direct antioxidant properties and the modulation of MAPK and PI3K signaling pathways. Study results indicate that natural antioxidants effectively reduce free radical–induced cellular damage, making them a promising alternative for preventing and delaying neurodegeneration.

Conclusion and Recommendation: These findings support the potential of mangosteen pericarp extract in protecting against H_2O_2 – and glutamate–induced neurotoxicity, suggesting their therapeutic role in preventing or delaying the progression of neurodegenerative diseases. Further studies in *in vitro* degenerative models with specific pathology and animal models on bioactive compound from mangosteen pericarp extracts and xanthone derivatives are required to clarify its activity and molecular mechanisms, as well as herbal product development into herbal medicinal products or herbal health products using nanotechnology.

Key words: *Garcinia mangostana* L., antioxidant activity, neuroprotective activity, hydrogen peroxide, glutamate

บทนำและวัตถุประสงค์

อนุมูลอิสระ (free radical) ประกอบด้วยสารออกซิไดส์แรงสูง (reactive oxygen species; ROS) เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรอย่างมาก มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย หากร่างกายเสียสมดุลระหว่างการสร้างอนุมูลอิสระและการกำจัดด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ จะนำไปสู่ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress)^[1] ซึ่งสร้างความเสียหายต่อโปรตีน ไขมันเยื่อหุ้มเซลล์ และดีเอ็นเอ นำไปสู่การอักเสบและการเสื่อมสภาพของเซลล์ เป็นสาเหตุของโรคเรื้อรัง เช่น โรคหัวใจ มะเร็ง เบาหวาน ข้ออักเสบ เป็นต้น

ในระบบประสาท ROS ที่มากเกินไปจะกระตุ้นการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) เกิดการทำลายแบบออกซิเดชัน (oxidative damage) ของโปรตีน ไขมันและกรดนิวคลีอิก และเหนี่ยวนำให้เกิดโปรตีนผิดปกติ การกลายพันธุ์ของยีน Huntington และเอนไซม์ superoxide dismutase 1 เป็นผลให้เกิดความเสื่อมของเซลล์ประสาท เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease), โรคพาร์กินสัน (Parkinson's

disease), โรคฮันติงตัน (Huntington's disease), โรคกล้ามเนื้ออ่อนแรง (amyotrophic lateral sclerosis)^[1-2] เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาโรคเหล่านี้ให้หายขาดได้ มีงานวิจัยสนับสนุนการใช้สารต้านอนุมูลอิสระยับยั้งการเกิด ROS เพื่อช่วยปกป้องหรือยับยั้งความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากอนุมูลอิสระและอาจป้องกันหรือชะลอการเกิดโรคความเสื่อมของระบบประสาทจากภาวะเครียดออกซิเดชันได้^[2-3]

มังคุด (mangosteen) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Garcinia mangostana* L. จัดอยู่ในวงศ์ Clusiaceae เป็นพืชเขตร้อนมีการปลูกในบริเวณทวีปเอเชียใต้จนถึงทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยมีการปลูกมากในภาคกลาง ภาคตะวันออกและภาคใต้ (Figure 1)^[4-5] เป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมและได้รับการขนานนามว่า “ราชินีแห่งผลไม้” มีรสชาติหวานอมเปรี้ยว ส่วนเปลือกมีการนำมาสกัดและพัฒนาเป็น “ยาเปลือกมังคุด” สำหรับกลุ่มอาการทางระบบผิวหนัง ในบัญชียาหลักแห่งชาติด้านสมุนไพร ในรูปแบบยาน้ำ มีสรรพคุณช่วยสมานแผล ใช้ภายนอกสำหรับทาแผลสดและแผลเรื้อรัง^[6]



Figure 1 The flowers and fruit of *Garcinia mangostana* L.

จากรายงานวิจัยพบว่าสารหลักของมังคุดที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ อนุพันธ์แซนโทน (xanthones)^[7] ซึ่งเป็นสารธรรมชาติที่สามารถพบได้ในผักและผลไม้ โดยเฉพาะในเปลือกมังคุด เป็นสารต้านออกซิเดชันที่อยู่ในกลุ่มฟีนอลอยด์ มีส่วนช่วยในการปรับสมดุลการทำงานของเซลล์ให้ทำงานปกติ และยังมีประโยชน์ต่อร่างกายมากมาย สารแซนโทนที่พบปริมาณมากในเปลือกมังคุด คือ α -mangostin^[8] จากการศึกษาวิจัยทางเภสัชวิทยา พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย^[9-10] เช่น ต้านอนุมูลอิสระ ต้านอักเสบ ต้านมะเร็ง ต้านเบาหวาน ลดไขมันในเลือด ต้านความอ้วน ลดอาการปวด ต้านภูมิแพ้ ต้านเชื้อจุลินทรีย์ สมานแผล ปกป้องตับ ปกป้องไต ต้านซึมเศร้า

นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าสารสกัดเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทและเสริมความจำหลายรายงาน เช่น Weecharangsarn และคณะ^[11] พบว่าสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอล 50% แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่แรงและปกป้องเซลล์ NG108-15 จากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ส่วนการศึกษาอื่นพบว่าส่วนที่ละลายน้ำได้ของสารสกัดด้วยเมทานอลปกป้องเซลล์ SK-N-SH จากพิษของ beta-amyloid₁₋₄₂ ($A\beta_{1-42}$)^[12] สารสกัดด้วยน้ำและส่วนสกัดด้วยบิวทานอลของสารสกัดด้วยเมทานอลลดพิษจาก N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) และ $A\beta_{25-35}$ ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากสมองส่วน cortical ของหนูแรด^[13-14] สารสกัดด้วยน้ำต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE)^[14] เป็นผลให้ปริมาณ acetylcholine ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่สำคัญต่อการเรียนรู้และความจำเพิ่มขึ้น Sattayasai และคณะ^[15] พบว่าส่วนที่ละลายน้ำของสารสกัดด้วยเอทานอลป้องกันการตายของเซลล์ SK-N-SH จากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ

ยังต้านความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำในหนูไม่ซ้จากการเหนี่ยวนำด้วยสาร scopolamine และพบว่าทำให้สารสกัดด้วยเอทานอล 50% ก่อนฉีด streptozotocin ทำให้ลดเอนไซม์ AChE ในสมองหนูไม่ซ้ และยังเพิ่มพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ^[16] Murugaiyah และคณะ^[17] รายงานว่าสารสกัดมังคุดส่วนสกัดที่มีแซนโทนสูง และสารแทนนินที่แยกจากมังคุดแสดงผลปกป้องเซลล์ SH-SY5Y จากพิษของกลูตาเมตและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

งานวิจัยข้างต้นชี้ว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ช่วยยับยั้ง ROS ลดความเสียหายของเซลล์ และอาจช่วยป้องกันหรือชะลอความเสื่อมของระบบประสาทได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกมังคุด โดยประเมินการดักจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์และฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดเปลือกมังคุดต่อความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมตในเซลล์ประสาท N1E-115 โดยประเมินความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ด้วยวิธี 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ผ่านวิธีการส่งสัญญาณ mitogen activated protein kinase (MAPK) และ phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) โดยใช้สารยับยั้งจำเพาะ

ระเบียบวิธีศึกษา

วัสดุ

1. **วัตถุดิบสมุนไพร:** เก็บรวบรวมตัวอย่างเปลือกมังคุดจากพื้นที่จังหวัดจันทบุรีเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการศึกษา ตรวจสอบตัวอย่าง

เพื่อระบุชนิดตามหลักอนุกรมวิธานพืช^[18] โดยนักพฤกษศาสตร์สถาบันวิจัยสมุนไพรวิทยาศาสตร์การแพทย์จัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิง และเก็บรักษาไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืช กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (DMSC) หมายเลข voucher specimen DMSC 5203

2. การเตรียมวัตถุดิบสมุนไพร: นำเปลือกมังคุดมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำ แยกเฉพาะส่วนเปลือกมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C จากนั้นบดเป็นผงหยาบ เก็บไว้ในภาชนะปิดสนิทก่อนนำไปสกัด

3. การเตรียมสารสกัด:

1) การเตรียมสารสกัดด้วยน้ำ: นำผงเปลือกมังคุด 100 กรัม ต้มกลั่นในน้ำ (reflux) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง กรอง และนำไปทำให้เข้มข้นภายใต้สุญญากาศ แล้วทำให้แห้งโดยใช้ lyophilizer ได้สารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกมังคุด (GM-W) ร้อยละ 10.48 โดยน้ำหนัก

2) การเตรียมสารสกัดด้วยเอทานอล: นำผงเปลือกมังคุด 100 กรัม ต้มกลั่นในเอทานอล 95% (reflux) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง กรอง และนำไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ จากนั้นทำให้แห้งโดยใช้ lyophilizer ได้สารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกมังคุด (GM-E) ร้อยละ 10.17 โดยน้ำหนัก

วิธีการศึกษา

1. การวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารสกัด GM-W และ GM-E: ใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีชั้นผิวบาง (thin layer chromatography; TLC) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน α -mangostin ตรวจสอบลักษณะของโครมาโทแกรม (chromatogram) ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm และทำ

ปฏิกิริยากับสารละลาย sulfuric acid ที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วตรวจสอบลักษณะของ chromatogram ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน: การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (super-oxide radical scavenging assay) ดัดแปลงจากวิธีของ Nishikimi และคณะ^[19] โดยผสมสารสกัดหรือสารมาตรฐาน gallic acid (1-100 $\mu\text{g/mL}$) กับ reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย nitroblue tetrazolium 258 μM , nicotinamide adenine dinucleotide 996 μM และ phenazine methosulfate 16.2 μM ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (10 mM, pH 7.4) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ 562 nm นำผลที่ได้มาคำนวณร้อยละการยับยั้งและหาค่า IC_{50} เทียบกับสารมาตรฐาน

3. การทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

1) การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง: เลี้ยงเซลล์ประสาท mouse neuroblastoma, N1E-115 (ATCC, CRL-2263; passage 28-39) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM-high glucose) ที่มี sodium bicarbonate 3.7 mg/mL, fetal bovine serum 10% และยาปฏิชีวนะ (penicillin G/streptomycin) ภายใต้สภาวะ CO_2 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C

2) การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับการทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์: เลี้ยงเซลล์ N1E-115 ใน 48 well plate โดยความหนาแน่นของเซลล์ 3×10^4 cells/cm² ภายใต้สภาวะ CO_2 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นแบบไม่มีซีรัม (DMEM-high glucose ที่มี sodium bicarbonate

3.7 mg/mL ยาปฏิชีวนะ และ N2 supplement: sodium selenite 30 nM, human transferrin 30 μ g/mL, bovine insulin 10 μ g/mL, progesterone 20 nM และ putrescin 100 μ M) แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3) การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับการทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากกลูตาเมต: เลี้ยงเซลล์ N1E-115 ใน 48 well plate ที่เคลือบด้วยสาร poly-D-lysine 100 μ g/mL โดยความหนาแน่นของเซลล์ 4×10^4 cells/cm² ภายใต้สภาวะ CO₂ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนสภาพ (differentiation) โดยเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีซีรัมต่ำ (0.5% FBS) และมี DMSO (1.5% DMSO)^[20-21] แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 96 ชั่วโมง จึงนำเซลล์ที่เปลี่ยนสภาพแล้ว (differentiated cell) ไปใช้ในการทดลอง

4) การทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมตต่อเซลล์ประสาท

การเตรียมสารทดสอบ: เตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (30%; 9.794 M) โดยเจือจางด้วย Phosphate Buffered Saline (PBS) ที่มี MgCl₂ (0.100 g/L) ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามกำหนด ส่วนกลูตาเมตและไกลซีนละลายใน sterile PBS (ที่ปราศจาก MgCl₂) แล้วเจือจางด้วย PBS จนได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามต้องการ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: บ่มเซลล์ N1E-115 (3×10^4 cells/cm²) อายุ 48 ชั่วโมง ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 25-500 μ M และอีกกลุ่มการทดสอบให้บ่มเซลล์ differentiated N1E-115 (4×10^4 cells/cm²) อายุ 96 ชั่วโมง ด้วยกลูตาเมตที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1-100 mM ร่วมกับไกลซีน (2 mM) เป็น

เวลา 24 ชั่วโมง และใช้ PBS ในปริมาณที่เท่ากันเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นวัด cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมตสำหรับการใช้ในการทดลองต่อไป

5) การทดสอบผลของสารสกัด GM-W และ GM-E ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

การเตรียมสารสกัด: เตรียมสารสกัด GM-W โดยละลายใน sterile water และสารสกัด GM-E โดยละลายใน DMSO บริสุทธิ์ แล้วเจือจางด้วย sterile water ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามต้องการ (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1%)

การทดสอบผลของสารสกัด GM-W และ GM-E ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: บ่มเซลล์ N1E-115 (3×10^4 cells/cm²) อายุ 48 ชั่วโมง และ differentiated N1E-115 (4×10^4 cells/cm²) อายุ 96 ชั่วโมง ด้วยสารสกัด GM-W หรือ GM-E ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5-200 μ g/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกลุ่มควบคุมให้เติม sterile water (สำหรับ GM-W) และ DMSO (ความเข้มข้นสุดท้ายไม่เกิน 0.1%) (สำหรับ GM-E) ในปริมาณเท่ากัน จากนั้นตรวจวัด cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay

6) การทดสอบผลของสารสกัด GM-W และ GM-E ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมต: แบ่งการทดลองเป็น 2 รูปแบบ คือ การให้สารสกัดพร้อมสารพิษ (co-treatment) และการให้สารสกัดก่อนสารพิษ (pre-treatment)

6.1) การทดสอบผลของสารสกัด GM-W และ GM-E ต่อความเป็นพิษจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์: ทดสอบในเซลล์ N1E-115 (3×10^4 cells/

cm²) อายุ 48 ชั่วโมง ดังนี้ (1) co-treatment โดยเติมสารสกัด GM-W หรือ GM-E ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1-50 µg/mL ส่วนกลุ่มควบคุมเติม sterile water (สำหรับ GM-W) หรือเติม DMSO (ความเข้มข้นสุดท้ายไม่เกิน 0.1%) (สำหรับ GM-E) ในปริมาณเท่ากัน พร้อมกับเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 200 µM (ความเข้มข้นสุดท้าย) และ เติมน้ำ PBS ในปริมาณเท่ากันในกลุ่มควบคุม แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ (2) pre-treatment โดยเติมสารสกัด GM-W หรือ GM-E ที่ความเข้มข้นดังกล่าว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ แล้วจึงเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 200 µM (ความเข้มข้นสุดท้าย) และเติมน้ำ PBS ในปริมาณเท่ากันในกลุ่มควบคุม แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัด cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay หากสารสกัดมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจะศึกษาผลของสารยับยั้งจำเพาะต่อฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทในลำดับถัดไป

6.2) ผลของสารสกัด GM-W และ GM-E

ต่อความเป็นพิษจากกลูตาเมต: ทดสอบในเซลล์ differentiated N1E-115 (4×10^4 cells/cm²) อายุ 96 ชั่วโมง ดังนี้ (1) co-treatment โดยเติมสารสกัด GM-W หรือ GM-E ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1-50 µg/mL ส่วนกลุ่มควบคุมให้เติมน้ำ sterile water (สำหรับ GM-W) หรือเติมน้ำ DMSO (ความเข้มข้นสุดท้ายไม่เกิน 0.1%) ในปริมาณเท่ากัน (สำหรับ GM-E) พร้อมกับเติมกลูตาเมต 50 mM และไกลซีน 2 mM (ความเข้มข้นสุดท้าย) และเติมน้ำ PBS ในปริมาณเท่ากันในกลุ่มควบคุม แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ (2) pre-treatment ให้เติมสารสกัด GM-W หรือ GM-E ที่ความเข้มข้นดังกล่าว เป็นเวลา

24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่แล้วจึงเติมกลูตาเมตและไกลซีน และเติมน้ำ PBS ในปริมาณเท่ากันในกลุ่มควบคุม แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัด cell viability ด้วยวิธี MTT reduction หากสารสกัดมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจะศึกษาผลของสารยับยั้งจำเพาะต่อฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทในลำดับถัดไป

7) การทดสอบผลของสารยับยั้งจำเพาะต่อฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด GM-E

การเตรียมสารยับยั้ง: เตรียม PD98059 และ LY294002 โดยละลายใน DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 50 mM เก็บเป็น stock solutions ที่อุณหภูมิ -20 °C และก่อนนำมาใช้เจือจางด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ

7.1) การทดสอบผลของสารยับยั้งจำเพาะ

MEK inhibitor (PD98059) หรือ PI3K inhibitor (LY294002) ต่อฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด GM-E จากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์:

ทดสอบในเซลล์ N1E-115 (3×10^4 cells/cm²) อายุ 48 ชั่วโมง โดยบ่มกับสาร PD98059 (30 µM) หรือ LY294002 (40 µM) หรือ vehicle เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ก่อนเริ่มการทดสอบ 2 รูปแบบ ดังนี้ (1) co-treatment โดยเติมสารสกัด GM-E ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50 µg/mL พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 200 µM และเติมน้ำ สารยับยั้งหรือ vehicle ลงไปพร้อมกัน แล้วบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ (2) pre-treatment โดยช่วงที่ 1 เติมน้ำ สารสกัด GM-E ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50 µg/mL ร่วมกับสารยับยั้งหรือ vehicle บ่มทิ้งไว้ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และช่วงที่ 2 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วเติมน้ำ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 200 µM

ร่วมกับสารยับยั้งหรือ vehicle แล้วบ่มเซลล์ต่อ 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัด cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay

7.2) การทดสอบผลของสารยับยั้งเฉพาะ MEK inhibitor (PD98059) หรือ PI3K inhibitor (LY294002) ต่อฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด GM-E จากพิษของของกลูตาเมต: การทดสอบในเซลล์ differentiated N1E-115 (4×10^4 cells/cm²) อายุ 96 ชั่วโมง โดยบ่มกับสาร PD98059 (30 μ M) หรือ LY294002 (40 μ M) หรือ vehicle เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ ก่อนเริ่มการทดลองแบบ co-treatment โดยเติมสารสกัด GM-E ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL พร้อมกับเติมกลูตาเมต 50 mM ร่วมกับไกลซีน 2 mM และเติมสารยับยั้ง หรือ vehicle ลงไปพร้อมกัน แล้วบ่มเซลล์ต่อ 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัด cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay

4. การประเมินคุณภาพ และการตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์

1) การประเมินรูปร่างของเซลล์ (cell morphology): ตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับโดยใช้เทคนิค phase contrast

2) การตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability): วิเคราะห์ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยดัดแปลงจากวิธีของ Mosmann (1983)^[22] ดังนี้ เติมน้ำตาลละลาย MTT (5 mg/mL ใน PBS) ลงในเซลล์ของแต่ละหลุม (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 μ g/mL) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและเติม DMSO 200 μ L ลงในแต่ละหลุมเพื่อละลายผลึก formazan แล้ว

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570/620 nm ค่า MTT reduction แสดงในรูปของร้อยละเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมน้ำตาลทดสอบ ซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่ได้รับสารหรือสมุนไพร $\times 100$) / ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1) การวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

ข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทุกค่านำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error of the mean, SEM) จากการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ชุด ($n = 3$) การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลอง 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน ใช้ independent *t*-test ค่า *p* ที่น้อยกว่า 0.05 หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2) การวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

ข้อมูลทุกค่านำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error, SEM) จากกลุ่มตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกันจำนวน 6 ชุด ($n = 6$) ซึ่งแต่ละชุดทำการทดสอบสามซ้ำ (triplicate) การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยมากกว่า 2 กลุ่ม ใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) และการเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่กรณีความแปรปรวนเท่ากันใช้ Scheffe's test และการณีความแปรปรวนไม่เท่ากันใช้ Tamhane's T2 test ค่า *p* ที่น้อยกว่า 0.05 หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

1. ผลการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารสกัด

การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีของเปลือกมังคุด โดยวิธี TLC จาก chromatogram พบแถบสีของ

สารสกัด GM-E ตรงกับแถบสีของสารมาตรฐาน α -mangostin ขณะที่ไม่พบแถบสีของสารสกัด GM-W (Figure 2) แสดงว่าสารสกัดด้วยเอทานอล มี α -mangostin เป็นองค์ประกอบ แต่สารสกัดด้วยน้ำไม่พบสารนี้

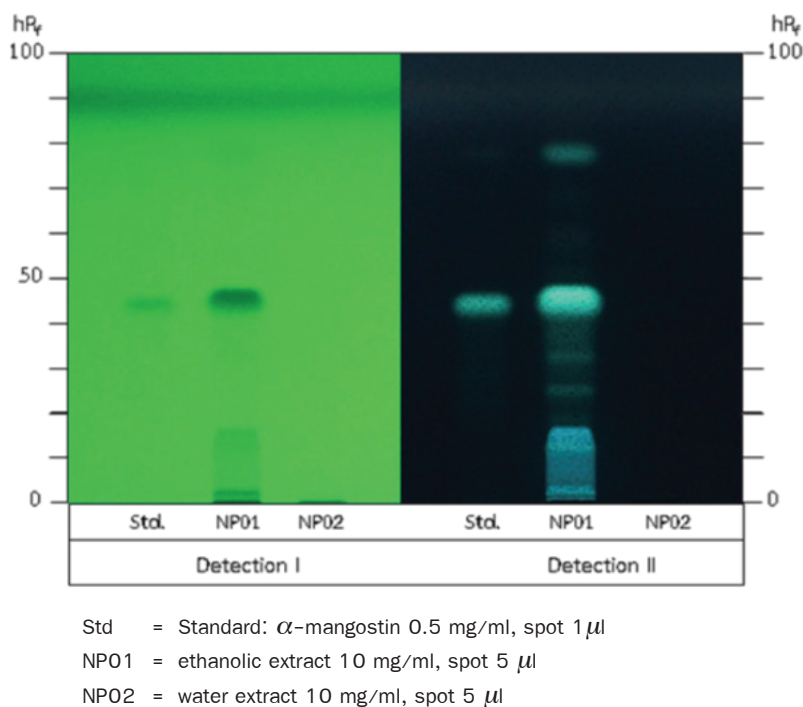


Figure 2 TLC chromatogram of water extract and ethanolic extract from *Garcinia mangostana* pericarp compared with α -mangostin as standard

(A) detected under UV at 254 nm (Detection I)

(B) sprayed with 10% sulfuric acid and heat at 110 °C for 5 min, detection under UV light 366 nm (Detection II)

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

ผลพบว่าสารสกัด GM-W และ GM-E มีฤทธิ์ต้านอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ตามความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 29.11 ± 3.88 และ 14.49 ± 1.66 μ g/mL ตามลำดับ ส่วนสารมาตรฐาน gallic

acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.23 ± 0.12 μ g/mL (Table 1) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดสามารถต้านอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ได้ดีมาก โดยสารสกัด GM-E มีฤทธิ์ต้านอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ได้ดีใกล้เคียงกับ gallic acid และสูงกว่าสารสกัด GM-W

Table 1 Superoxide radical scavenging activity of water extract and ethanolic extract from *Garcinia mangostana* pericarp compared with gallic acid as standard

GM pericarp extracts/Standard	IC ₅₀ (ug/mL)
water extract (GM-W)	29.11 ± 3.88
ethanolic extract (GM-E)	14.49 ± 1.66
gallic acid	13.23 ± 0.12

The IC₅₀ (half-maximal inhibitory concentration) value is the concentration of the extract or standard required to scavenge 50% of superoxide radicals. Data are expressed as mean ± SEM of three independent samples, each performed in triplicate.

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

3.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมตต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

ผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: พบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทแบบแปรผันตามความเข้มข้น โดยความเข้มข้นในช่วง 100-500 μ M นาน 24 ชั่วโมง ส่งผลให้ cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับลักษณะสัญญาณที่ผิดปกติ ได้แก่ เซลล์มีลักษณะบวม หดตัว หรือฝ่อสลายเป็นเศษเซลล์ รวมถึงแขนงประสาท (neurites) มีความยาวลดลงและขาดความต่อเนื่องเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เนื่องจากความเข้มข้น 200 μ M ทำให้เซลล์ตายประมาณร้อยละ 50 จึงเลือกความเข้มข้นดังกล่าวเพื่อเหนี่ยวนำการตายของเซลล์ในการทดสอบต่อไป

ผลของกลูตาเมตต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: พบว่ากลูตาเมตเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทแบบแปรผันตามความเข้มข้น โดยความเข้มข้น 25-100 mM นาน 24 ชั่วโมง ส่งผลให้ cell

viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับสัญญาณเซลล์ที่ผิดปกติ ทั้งความหนาแน่นที่ลดลง และแขนงประสาทที่สั้นลงขาดความต่อเนื่องเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เนื่องจากความเข้มข้น 50 mM ทำให้เซลล์ตายประมาณร้อยละ 50 จึงเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าวเพื่อเหนี่ยวนำการตายของเซลล์ในการทดสอบต่อไป

3.2 ผลการทดสอบสารสกัด GM-W และ GM-E ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ N1E-115 โดยให้เซลล์สัมผัสสารสกัด GM-W หรือ GM-E ที่ความเข้มข้น 0.5-200 μ g/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัด GM-W และ GM-E ที่ความเข้มข้นสูง (100 และ 200 μ g/mL) ลด cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารสกัด GM-W ลดลงร้อยละ 23.48 และ 56.30 ตามลำดับ ส่วนสารสกัด GM-E ลดลงร้อยละ 36.70 และ 61.61 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นในช่วง 0.5-50 μ g/mL ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นไม่เกิน 50 μ g/mL ในการศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจน

เปอร์ออกไซด์

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ differentiated N1E-115 โดยให้เซลล์สัมผัสกับสารสกัด GM-W หรือ GM-E ที่ความเข้มข้น 0.5-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัด GM-W และ GM-E ที่ความเข้มข้นสูง (100 และ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ลด cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารสกัด GM-W ลดลงร้อยละ 32.30 และ 58.28 ตามลำดับ ส่วนสารสกัด GM-E ลดลงร้อยละ 35.74 และ 55.56 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นในช่วง 0.5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นไม่เกิน 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ในการศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของกลูตาเมต

3.3 ผลของสารสกัด GM-W และ GM-E ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมต

การให้เซลล์ N1E-115 สัมผัสสารสกัดพร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (co-treatment) พบว่าสารสกัด GM-W ที่ความเข้มข้น 0.01-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง MTT reduction เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว (Figure 3A) ในขณะที่สารสกัด GM-E ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถเพิ่ม cell viability ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเพิ่มขึ้นร้อยละ 16.50 และ 23.45 ตามลำดับ (Figure 3B) แสดงให้เห็นว่าสารสกัด GM-E (25-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) เมื่อให้พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถลดการตายของเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจน

เปอร์ออกไซด์ได้

การให้เซลล์ N1E-115 สัมผัสสารสกัดก่อนได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (pre-treatment) พบว่าสารสกัด GM-W ที่ความเข้มข้น 0.01-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง MTT reduction เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว (Figure 3C) ในขณะที่สารสกัด GM-E ที่ความเข้มข้น 5, 25 และ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถเพิ่ม cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเพิ่มขึ้นร้อยละ 18.01, 30.64 และ 39.15 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว (Figure 3D) แสดงให้เห็นว่าสารสกัด GM-E (5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) เมื่อให้ก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถลดการตายของเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้

การให้เซลล์ differentiated N1E-115 สัมผัสสารสกัดพร้อมกับกลูตาเมต (co-treatment) พบว่าสารสกัด GM-W ที่ความเข้มข้น 0.01-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง MTT reduction เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับกลูตาเมตอย่างเดียว (Figure 4A) ในขณะที่สารสกัด GM-E ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถเพิ่ม cell viability ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเพิ่มขึ้นร้อยละ 17.16 และ 21.82 ตามลำดับ (Figure 4B) แสดงให้เห็นว่าสารสกัด GM-E (25-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) เมื่อให้พร้อมกับกลูตาเมต สามารถลดการตายของเซลล์ประสาทจากพิษของกลูตาเมตได้ แสดงว่าสารสกัด GM-E ในความเข้มข้นดังกล่าวมีฤทธิ์ลดการตายของเซลล์ประสาทที่เหนี่ยวนำด้วยกลูตาเมตได้

การให้เซลล์ differentiated N1E-115 สัมผัส สารสกัดก่อนได้รับกลูตาเมต (pre-treatment) พบว่าทั้งสารสกัด GM-W และ GM-E (0.01-50 $\mu\text{g/mL}$) ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า MTT reduction

เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับกลูตาเมตอย่างเดียว (Figure 4C และ 4D) บ่งชี้ว่าสารสกัดทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทหากให้ก่อนได้รับกลูตาเมต

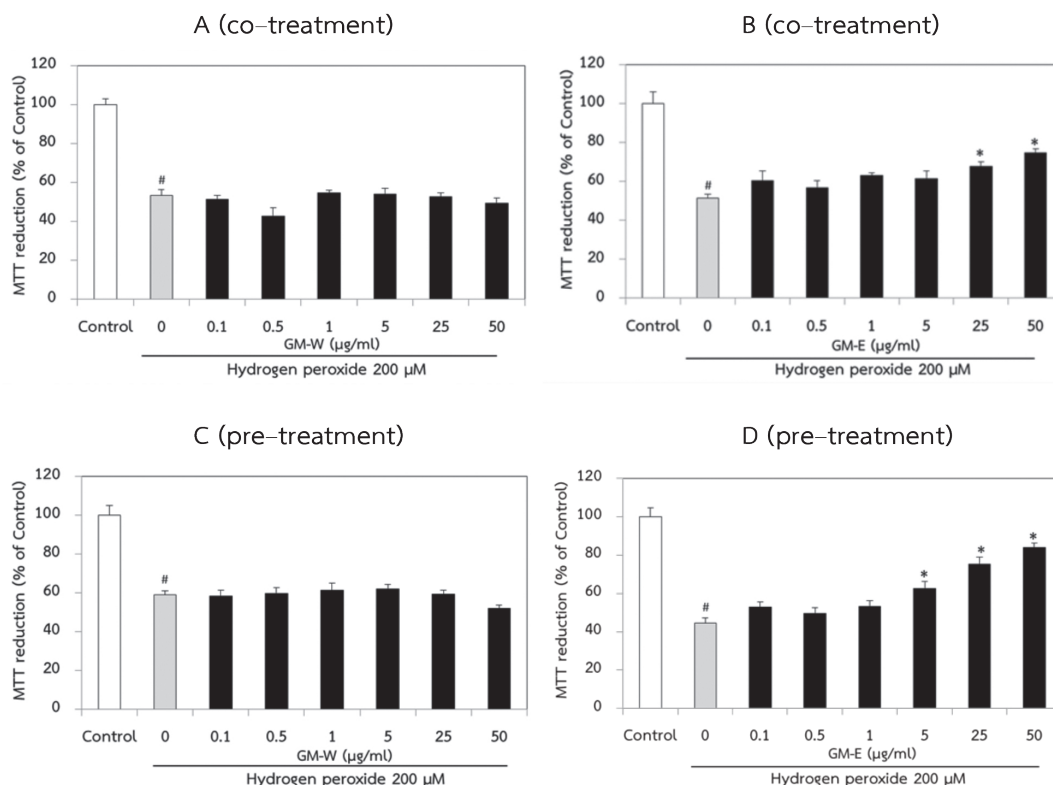


Figure 3 Effect of water extract (GM-W) and ethanolic extract (GM-E) of *Garcinia mangostana* pericarp on hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in N1E-115 cell cultures

N1E-115 cells were cultured for 48 hours and then co-exposed with GM-W (0.1–50 $\mu\text{g/mL}$) (A) or GM-E (0.1–50 $\mu\text{g/mL}$) (B) and hydrogen peroxide (200 μM) for 24 hours. N1E-115 cells were cultured for 48 hours and then pretreated with GM-W (0.1–50 $\mu\text{g/mL}$) (C) or GM-E (0.1–50 $\mu\text{g/mL}$) (D) for 24 hours and further incubated with hydrogen peroxide (200 μM) for 24 hours. After incubation, cell viability was evaluated by MTT reduction assay. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of six samples ($n=6$) from independent experiments, each performed in triplicate.

statistically significant difference from control cultures ($p < 0.05$)

* statistically significant difference from hydrogen peroxide-treated cultures ($p < 0.05$)

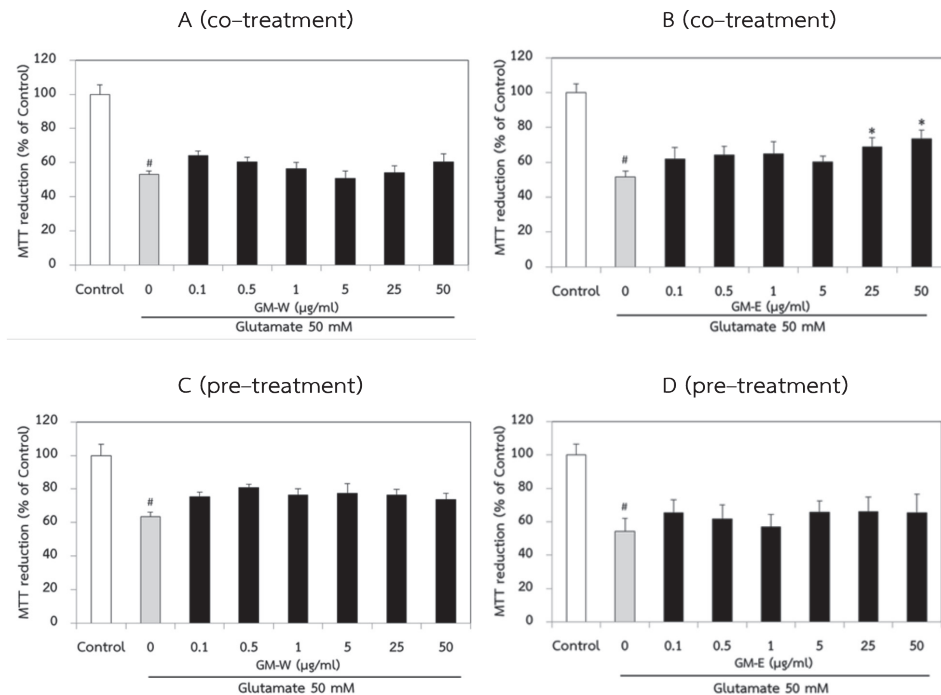


Figure 4 Effect of water extract (GM-W) and ethanolic extract (GM-E) of *Garcinia mangostana* pericarp on glutamate-induced neurotoxicity in differentiated N1E-115 cell cultures

Differentiated N1E-115 cells were cultured for 96 hours and then co-exposed with GM-W (0.1–50 $\mu\text{g/mL}$) (A) or GM-E (0.1–50 $\mu\text{g/mL}$) (B) and glutamate (50 μM) for 24 hours. Differentiated N1E-115 cells were cultured for 96 hours and then pretreated with GM-W (0.1–50 $\mu\text{g/mL}$) (C) or GM-E (0.1–50 $\mu\text{g/mL}$) (D) for 24 hours and further incubated with glutamate (50 μM) for 24 hours. After incubation, cell viability was evaluated by MTT reduction assay. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of six samples ($n=6$) from independent experiments, each performed in triplicate.

statistically significant difference from control cultures ($p < 0.05$)

* statistically significant difference from glutamate-treated cultures ($p < 0.05$)

4. ผลของสารยับยั้งเฉพาะต่อฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด GM-E จากพืชของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมต

จากการทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด GM-E ว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณผ่านวิถี MAPK หรือวิถี PI3K หรือไม่ โดยเติมสารยับยั้งจำเพาะ คือ MEK inhibitor (PD98059) หรือ PI3K inhibitor (LY294002) นั้น พบว่าการให้เซลล์ N1E-115 สัมผัสสารยับยั้ง PD98059 หรือ LY294002 เพียงอย่างเดียวไม่มีผล

ต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า MTT reduction เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สารสกัด GM-E (50 $\mu\text{g/mL}$) สามารถเพิ่ม cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว ในขณะที่ PD98059 (30 μM) และ LY294002 (40 μM) มีผลลดฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด GM-E เมื่อให้สารสกัด GM-E พร้อมกับหรือก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Figure 5A และ Figure 5B) แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งทั้งสองชนิด (PD98059 และ LY294002) สามารถลด

ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด GM-E ทั้งในสภาวะ co-treatment และ pre-treatment

ทำนองเดียวกันการให้เซลล์ differentiated N1E-115 สัมผัสสารยับยั้ง PD98059 หรือ LY294002 เพียงอย่างเดียวไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า MTT reduction เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สารสกัด GM-E (50 $\mu\text{g/mL}$) สามารถเพิ่ม cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้

รับกลูตาเมตอย่างเดียวน ในขณะที่ PD98059 (30 μM) และ LY294002 (40 μM) มีผลลดฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด GM-E เมื่อให้สารสกัด GM-E พร้อมกับกลูตาเมต (Figure 5C) แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งเฉพาะทั้งสองชนิด (PD98059 และ LY294002) สามารถลดฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด GM-E ในสภาวะ co-treatment

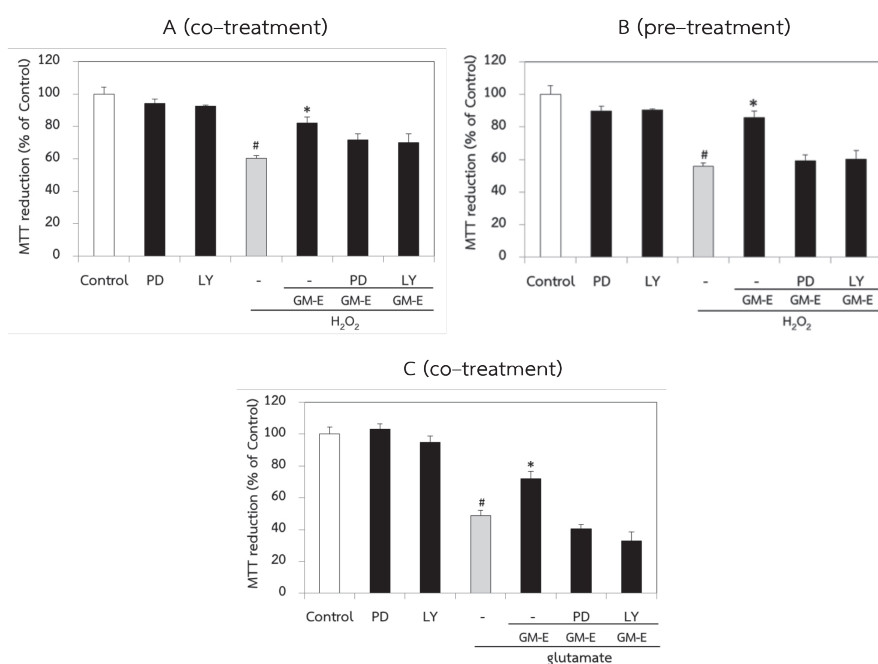


Figure 5 Effect of MEK inhibitor (PD98059) or PI3K inhibitor (LY294002) on neuroprotectivity of ethanol extract (GM-E) of *Garcinia mangostana* pericarp against hydrogen peroxide- and glutamate-induced neurotoxicity in N1E-115 cell cultures

N1E-115 cells were cultured for 48 hours and then pretreated with PD98059 (30 μM) or LY294002 (40 μM) for 2 hours. For co-exposure, GM-E (50 $\mu\text{g/mL}$) and hydrogen peroxide (200 μM) were added to the culture medium simultaneously for 24 hours in the presence of the inhibitor (A). For pre-exposure, cells were treated with GM-E (50 $\mu\text{g/mL}$) for 24 hours, followed by incubation with hydrogen peroxide (200 μM) for an additional 24 hours, all in the presence of the inhibitor (B). Differentiated N1E-115 cells were cultured for 96 hours and then pretreated with PD98059 (30 μM) or LY294002 (40 μM) for 2 hours. For co-exposure, GM-E (50 $\mu\text{g/mL}$) and glutamate (50 μM) were added to the culture medium simultaneously for 24 hours in the presence of the inhibitor (C). Then, cell viability was measured by MTT reduction assay. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of six samples ($n=6$) from independent experiments, each performed in triplicate.

[#] statistically significant difference from control cultures ($p < 0.05$)

^{*} statistically significant difference from hydrogen peroxide- or glutamate-treated cultures ($p < 0.05$)

อภิปรายผล

ซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical, $\bullet\text{O}_2$) เป็นอนุมูลอิสระตัวการสำคัญในระบบชีวภาพที่มีความว่องไวสูงในการทำปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลในร่างกาย ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างเซลล์ได้อย่างรุนแรง การศึกษานี้พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ดีมาก สอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ระบุว่าเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แม้จะใช้วิธีการตรวจสอบที่แตกต่างกัน^[9-10,23]

จากการวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยใช้เทคนิค TLC โดยใช้ α -mangostin เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัด GM-E ปรากฏแถบสีที่ตรงกับสารมาตรฐานอย่างชัดเจน ขณะที่สารสกัด GM-W ไม่พบแถบสีดังกล่าว และการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ดีมาก โดยสารสกัด GM-E แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ใกล้เคียงกับ gallic acid และสูงกว่าสารสกัด GM-W ประมาณสองเท่า แสดงให้เห็นว่า α -mangostin ซึ่งเป็นสารแทนนินหลักในเปลือกมังคุด^[8] ที่ละลายได้ดีในเอทานอลแต่ไม่ละลายในน้ำจึงพบในสารสกัด GM-E แต่ไม่พบในสารสกัด GM-W เป็นสารสำคัญหลักในสารสกัด GM-E รวมทั้งสารกลุ่มแทนนินอื่นที่ละลายในเอทานอล เป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัด GM-W น่าจะเกิดจากสารสำคัญอื่นที่ละลายได้ในน้ำ^[24] เช่น สารกลุ่มแทนนิน แอนโทไซยานิน กรดฟีนอลิก อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้วัดปริมาณสารต้านออกซิเดชันกลุ่มต่าง ๆ จึงไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง

ความแรงในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในเปลือกมังคุดได้

หลักฐานทางวิชาการสนับสนุนว่าสารต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและลดภาวะเครียดออกซิเดชันอาจป้องกันหรือชะลอการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่ได้^[2-3] การศึกษานี้จึงทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท N1E-115 ของสารสกัดเปลือกมังคุดในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากภาวะเครียดออกซิเดชันใน 2 โมเดล โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมต ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน และเป็นตัวการสำคัญทำให้เซลล์ตายและมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับกลุ่มโรคความเสื่อมของระบบประสาท^[3] ในขณะที่กลูตาเมตก่อพิษผ่านสองกลไก ได้แก่ (1) oxidative glutamate toxicity ในเซลล์ N1E-115 โดยยับยั้งการขนส่ง cystine ทำให้เซลล์สร้าง glutathione (GSH) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหลักไม่ได้ ส่งผลให้ระดับ GSH ลดลง เกิดการสะสม ROS และแคลเซียมไหลเข้าสู่เซลล์ปริมาณมาก (calcium overload) จนเซลล์ตาย และ (2) excitotoxicity ในเซลล์ประสาททั่วไป เกิดพิษจากการกระตุ้นตัวรับกลูตาเมตมากเกินไป โดยเฉพาะชนิด NMDA ทำให้น้ำไปสู่สภาวะ calcium overload และไม่โตคอนเดรียเสียหายแล้วกระตุ้นวิถีการตายของเซลล์^[25]

จากผลการศึกษาที่พบว่าเฉพาะสารสกัด GM-E เท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมต กลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทนอกเหนือจากคุณสมบัติต้านออกซิเดชันที่ตีความของสารกลุ่มแทนนิน เช่น

α -mangostin ที่พบแต่ในสารสกัด GM-E แล้ว ส่วนหนึ่งอาจเนื่องจากคุณสมบัติในการละลายได้ดีในไขมัน (lipophilicity) ของ α -mangostin และสารกลุ่มแซนโทนอื่นที่อาจพบในสารสกัด GM-E ที่น่าจะช่วยให้สารสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ประสาทซึ่งมีสภาพเป็น lipid bilayer ได้ดี จึงช่วยป้องกัน lipid peroxidation ของเยื่อหุ้มเซลล์และภาวะเครียดออกซิเดชันภายในเซลล์ได้ดีกว่าสารสกัด GM-W

จากผลการทดสอบที่พบว่าสารสกัด GM-E ที่ความเข้มข้น 25-50 หรือ 5-50 $\mu\text{g/mL}$ สามารถลดการตายของเซลล์ N1E-115 จากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทั้งในรูปแบบการให้สารพร้อมกันหรือการให้สารก่อนสารพิษ กรณีการให้สารพร้อมกันฤทธิ์ปกป้องเซลล์อาจเกิดจากการที่สารสกัดเข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยไปดักจับอนุมูลอิสระหรือเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ระหว่างกัน ส่งผลให้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลดลงก่อนที่จะเข้าทำลายเซลล์ ส่วนการให้สารก่อนสารพิษ ฤทธิ์ปกป้องเซลล์น่าจะเป็นผลจากกลไกในเชิงป้องกัน โดยสารกลุ่มแซนโทนในสารสกัด GM-E ที่มีความชอบไขมันสูงสามารถแทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ประสาทได้ง่ายกว่า จึงสามารถยับยั้งการเกิดพิษจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้อย่างจำเพาะเจาะจง เช่น ดักจับอนุมูลอิสระก่อนที่จะเกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึงปกป้องไมโทคอนเดรียซึ่งเป็นแหล่งพลังงานหลักของเซลล์เพื่อยับยั้งการส่งสัญญาณการตายแบบ apoptosis

ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของสารสกัด GM-E นี้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Weecharangsan และคณะที่พบว่า

สารสกัดด้วยน้ำและเอทานอล (50-100 $\mu\text{g/mL}$) สามารถปกป้องเซลล์ NG108-15 ได้ทั้งในสภาวะการให้สารพร้อมกันและการให้สารก่อนสารพิษ^[11] และรายงานของ Sattayasai และคณะว่าการให้สารสกัดก่อนที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$ ช่วยลดการตายของเซลล์ SK-N-SH ผ่านกลไกการลดการสร้าง ROS และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-3^[15] และ Murugaiyah และคณะที่รายงานว่าสารสกัดมังคุด ส่วนสกัดที่มีสารกลุ่ม xanthones และ tannins สูง แสดงผลปกป้องเซลล์ SH-SY5Y จากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์^[17]

ส่วนฤทธิ์ของสารสกัด GM-E (25-50 $\mu\text{g/mL}$) ในการปกป้องเซลล์ differentiated N1E-115 จากพิษของกลูตาเมต สอดคล้องกับการศึกษาของ Murugaiyah และคณะที่พบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ SH-SY5Y จากพิษของกลูตาเมตในสารสกัดมังคุด ส่วนสกัดที่มีสารกลุ่ม xanthones และ tannins สูง^[17] การที่ฤทธิ์ของ GM-E พบได้เฉพาะในรูปแบบการให้สารพร้อมกันเท่านั้น บ่งชี้ว่ากลไกการปกป้องเซลล์ประสาทเป็นผลโดยตรงจากคุณสมบัติต้านออกซิเดชันเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นทันที หรืออาจเกิดจากการขัดขวาง (antagonize) การจับของกลูตาเมตกับตัวรับบนผิวเซลล์จึงช่วยลดการเกิดพิษจากกลูตาเมตได้ เนื่องจากการให้สารก่อนสารพิษไม่ส่งผลในการปกป้องเซลล์ จึงอาจสรุปได้ว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดในสภาวะการทดลองนี้ไม่ได้ออกฤทธิ์ในเชิงป้องกันผ่านการปรับเปลี่ยนกลไกภายในเซลล์ล่วงหน้าก่อนการได้รับสิ่งเร้า

ในระบบประสาทส่วนกลาง วิธีการส่งสัญญาณ MAPK และ PI3K มีบทบาทสำคัญทั้งในภาวะปกติ

และพยาธิสภาพของโรค^[26-27] โดยลำดับการส่งสัญญาณเหล่านี้ทำหน้าที่ควบคุมการอยู่รอด การเจริญเติบโต และการแบ่งตัวของเซลล์ รวมทั้งมีส่วนช่วยในการปกป้องเซลล์ประสาท จึงถือเป็นวิถีส่งสัญญาณในการปกป้องเซลล์ประสาท^[28-29] ผลการทดลองที่พบว่าทั้งสารยับยั้งจำเพาะต่อการส่งสัญญาณผ่านวิถี MAPK (PD98059) และ PI3K (LY294002) ทำให้ประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ของสารสกัด GM-E ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่ากลไกการปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด GM-E จากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมตนั้นน่าจะออกฤทธิ์ผ่านวิถีการส่งสัญญาณ MAPK และ PI3K อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ไม่ได้ศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ระดับเซลล์ว่าผ่านการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในวิถีดังกล่าว เช่น Erk (extracellular signal-regulated kinases หรือ Akt (Protein kinase B) หรือไม่ อย่างไร ในอนาคตควรมีการศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดจากเปลือกมังคุดและอนุพันธ์ xanthones เพิ่มเติมถึงผลต่อ markers ที่เกี่ยวข้องกับ oxidative stress และ/หรือพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ รวมทั้งโปรตีนที่เกี่ยวข้องในวิถี MAPK และ PI3K จะทำให้ทราบถึงสารสำคัญที่ออกฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์เพิ่มเติมในระดับโมเลกุลที่ชัดเจนขึ้น

แม้ว่าคุณสมบัติการละลายในไขมันของ α -mangostin จะช่วยในการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้ แต่การดูดซึมผ่านทางเดินอาหารได้น้อยยังเป็นปัญหาที่ต้องแก้ไขในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกมังคุด เนื่องจากมีรายงานการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ในอาสาสมัครพบว่า แม้จะตรวจพบสาร α -mangostin ในกระแส

เลือดจากการดื่มน้ำมังคุด แต่ระดับสารในเลือดต่ำมาก (ระดับ ng/mL) เนื่องจากข้อจำกัดด้านการละลายน้ำ ทำให้ถูกดูดซึมในลำไส้ได้จำกัด และถูกทำลายที่ตับอย่างรวดเร็วเพื่อขับออกจากร่างกาย ส่งผลให้ระดับสารในกระแสเลือดต่ำและมีระยะเวลาออกฤทธิ์สั้น^[30] ดังนั้น จึงจำเป็นที่จะต้องนำนาโนเทคโนโลยีมาใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกมังคุดเพื่อใช้เป็นสารป้องกันความเสื่อมของเซลล์ประสาท (neuroprotective agent) ให้ดูดซึมได้ดีในทางเดินอาหาร และผ่าน blood brain barrier ได้

ข้อสรุป

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดเปลือกมังคุดต่อความเป็นพิษจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมตพบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีมาก สารสกัด GM-W และ GM-E สามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยการดักจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ดีมาก โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 29.11 ± 3.88 และ $14.49 \pm 1.66 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ การให้เซลล์ N1E-115 สัมผัสสารสกัด GM-E ที่ความเข้มข้น 25-50 หรือ 5-50 $\mu\text{g/mL}$ พร้อมกับหรือก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ตามลำดับ และเซลล์ differentiated N1E-115 สัมผัสสารสกัด GM-E ที่ความเข้มข้น 25-50 $\mu\text{g/mL}$ พร้อมกับกลูตาเมตสามารถป้องกันการตายของเซลล์จากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมตได้ นอกจากนี้ สารยับยั้งจำเพาะที่วิถี MAPK และ PI3K มีผลต้านฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด GM-E จากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมต กลไก

การออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดจากเปลือกมังคุดอย่างน้อยอาจเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน คุณสมบัติในการละลายในไขมันได้ดี และกระบวนการส่งสัญญาณในวิถี MAPK และ PI3K ดังนั้น สารสกัดจากเปลือกมังคุดอาจมีศักยภาพในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมต ควรมีการศึกษาสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกมังคุดหรืออนุพันธ์ xanthones เพิ่มเติมในโมเดลความเสื่อมของเซลล์ที่เฉพาะเจาะจงต่อพยาธิสภาพ หรือทดสอบในสัตว์ทดลองเพื่อหาสารออกฤทธิ์พร้อมตรวจสอบฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลให้ชัดเจน รวมทั้งการใช้นาโนเทคโนโลยีเพื่อช่วยในการพัฒนาเป็นยาจากสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อสุขภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017:8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>.
- Rudrapal M, Khairnar SJ, Khan J, Dukhyil AB, Ansari MA, Alomary MN, Alshabrmi FM, Palai S, Deb PK, Devi R. Dietary polyphenols and their role in oxidative stress-induced human diseases: Insights into protective effects, antioxidant potentials and mechanism(s) of action. *Front Pharmacol*. 2022;13:806470. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.806470>.
- Feng J, Zheng Y, Guo M, Ares I, Martínez M, Lopez-Torres B, Martínez-Larrañaga MR, Wang X, Anadón A, Martínez MA. Oxidative stress, the blood-brain barrier and neurodegenerative diseases: The critical beneficial role of dietary antioxidants. *Acta Pharm Sin B*. 2023;13(10):3988-4024.
- Forest Botany Division, Forest and Plant Conservation Research Office, Department of National Parks, Wildlife and Plant. Thai Plant Names. [Internet]. 2557 [cited 2024 May 30]. Available from: <https://www.dnp.go.th/Botany/mplant/index.html>.
- Plants of the World Online, Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. [Internet]. [cited 2024 May 30]. Available from: <https://www.plantsoftheworldonline.org/>.
- National List of Essential Medicines (No. 2) B.E. 2555 (2012). Published in Government Gazette on 21 August B.E. 2555 (2012). (in Thai).
- Alam M, Summya Rashid S, Fatima K, Adnan M, Shafie A, Akhtar MS, Ganie AH, Sayed M. Eldin SM, Islam A, Khan I, Hassan MI. Biochemical features and therapeutic potential of α -mangostin: Mechanism of action, medicinal values, and health benefits. *Biomed Pharmacother*. 2023;163:114710. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114710>.
- Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Baghdadi A, Tayebi-Meigooni A. Alpha-mangostin-rich extracts from mangosteen pericarp: Optimization of green extraction protocol and evaluation of biological activity. *Molecules*. 2018;23(8):1852. <https://doi.org/10.3390/molecules23081852>.
- Zonouz AM, Rahbardar MG, Hosseinzadeh H. Antidotal and protective effects of mangosteen (*Garcinia mangostana*) against natural and chemical toxicities: A review. *Iran J Basic Med Sci*. 2023;26:492-503. <https://dx.doi.org/10.22038/IJBMS.2023.66900.14674>.
- Ansori ANM, Fadholly A, Hayaza S, Susilo RJK, Inayatillah B, Winarni D, Husen SA. A review on medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Res J Pharm Technol*. 2020;13(2):974-82.
- Weecharangsan W, Opanasopit P, Sukma M, Ngawhirunpat T, Sotanaphun U, Siripong P. Antioxidative and neuroprotective activities of extracts from the fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.). *Med Princ Pract*. 2006;15:281-7.
- Moongkarndi P, Srisawat C, Saetun P, Jantaravinid J, Peerapittayamongkol C, Soi-ampornkul R, Junnu S, Sinchaikul S, Chen ST, Charoensilp P, Thongboonkerd V, Neungton N. Protective effect of mangosteen extract against beta-amyloid-induced cytotoxicity, oxidative stress and altered proteome in SK-N-SH cells. *J Proteome*

- Res. 2010;9:2076-86. (in Thai)
13. Lee Y, Kim S, Kim Y, Chin Y, Cho J. Inhibition of excitotoxic and A β (25-35)-induced neuronal damage by fractions prepared from mangosteen pericarp in primary cultured rat cortical cells. Proceedings of the 2012 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea, Seoul, Korea; 2012 Oct 23-24; Seoul, Korea.
 14. Cho J, Chin Y-W. Neuroprotective and memory-enhancing effects of the water extract from pericarp of mangosteen. Fruit Clin Ther. 2016;38(10S):e31. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.07.163>.
 15. Sattayasai J, Chaonapan P, Arkaravichie T, Soi-ampornkul R, Junnu S, Charoensilp P, Samer J, Jantaravinid J, Masaratana P, Suktipat B, Manissorn J, Thongboonkerd V, Neungton N, Moongkarndi P. Protective effects of mangosteen extract on H₂O₂-induced cytotoxicity in SK-N-SH cells and scopolamine-induced memory impairment in mice. PLoS One. 2013;8(12):e85053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085053>. (in Thai)
 16. Avinash P, Reddy A, Begum N, Bakshi V. Neuroprotective effect of *Garcinia mangostana* on streptozotocin induced sporadic type Alzheimer's disease in mice. Int J Appl Pharm Sci Res. 2016;1:8-15.
 17. Murugaiyah V, Jayadhisana M, Majid ASA, Majid AMSA. Neuroprotective effect of *Garcinia mangostana* extract, xanthone-enriched fraction and α -mangostin on amyloid β , hydrogen peroxide, ischemia, hypoxia and glutamate-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. Front cell Neurosci. 2016;10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.36.00100>.
 18. eFloras (2008). Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO & Harvard University Herbaria, Cambridge, MA. [Internet]. [cited 2024 May 30]. Available from: <http://www.efloras.org>
 19. Nishikimi M, Appaji N, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochem Biophys Res Commun. 1972;46(2):849-54.
 20. Amano T, Richelson E, Nirenberg M. Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. Proc Natl Acad Sci USA. 1972;69:258-63.
 21. Kimhi Y, Parfrey C, Spector I, Barak Y, Littauer UZ. Maturation of neuroblastoma cells in the presence of dimethylsulfoxide. Biochemistry. 1976;73:462-6.
 22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65(1-2):55-63.
 23. Rizaldy D, Ramadhita NK, Nadhifa T, Fidrianny I. Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.): Evaluation of *in vitro* antioxidant activities. Pharmacogn J. 2022;14(3):633-40.
 24. Suttirak W, Manurakchinakorn S. *In vitro* antioxidant properties of mangosteen peel extract. J Food Sci Technol. 2014;51(12):3546-58.
 25. Lewerenz J, Maher P. Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases-What is the evidence? Front Neurosci. 2015;9:469. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00469>.
 26. Walker CL, Liu NK, Xu XM. PTEN/PI3K and MAPK signaling in protection and pathology following CNS injuries. Front Biol (Beijing). 2013;8(4). <https://doi.org/10.1007/s11515-013-1255-1>.
 27. Rai SN, Dilnashin H, Birla H, Singh SS, Zahra W, Rathore AS, Singh BK, Singh SP. The role of PI3K/Akt and ERK in neurodegenerative disorders. Neurotox Res. 2019;35:775-95.
 28. Long HZ, Cheng Y, Zhou ZW, Luo HY, Dan-Dan Wen DD, Li-Chen Gao LC. PI3K/AKT signal pathway: A target of natural products in the prevention and treatment of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Front Pharmacol. 2021;12:648636. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.648636>.
 29. Li Q, Rubin L, Silva M, Li S, Yang C, Lazarovici P, Zheng W. Current progress on neuroprotection induced by artemisia, ginseng, astragalus, and ginkgo traditional chinese medicines for the therapy of alzheimer's disease. Oxid Med Cell Longev. 2022;2022:3777021. 21 pages <https://doi.org/10.1155/2022/3777021>.
 30. Kondo M, Zhang L, Ji H, Kou Y, Ou B. Bioavailability and antioxidant effects of a xanthone-rich mangosteen (*Garcinia mangostana*) product in humans. J Agric Food Chem. 2009;57(19):8788-92. <https://doi.org/10.1021/jf901012>