รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

ฤทธิ์ต้านอักเสบของระบบประสาทและกลไกระดับโมเลกุล

ของส่วนสกัดจากใบขลู่ในเซลล์ไมโครเกลีย

Anti-neuroinflammatory activity of *Pluchea indica* leaf extract

and molecular mechanism underlying its effect

in microglia cells

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย

บทคัดย่อ

การอักเสบของระบบประสาท เป็นสาเหตุที่สำคัญอย่างหนึ่งของโรคเสื่อมของสมองหรือระบบประสาท เช่น โรคอัลไซเมอร์ และ โรคพาร์กินสัน การกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียที่เป็นแมคโครฟาจที่อยู่ในระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้เกิดการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบในปริมาณมากและมีบทบาทสำคัญในการเกิดการอักเสบของระบบประสาท ดังนั้นการยับยั้งการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบที่มากเกินไปของเซลล์ไมโครเกลียอาจจะเป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของระบบประสาท ใบขลู่เป็นพืชที่มีการใช้เป็นสมุนไพรและเป็นอาหาร และมีการรายงานว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ รวมทั้งฤทธิ์ต้านการอักเสบ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานผลของใบขลู่ต่อการอักเสบของระบบประสาท ดังนั้นจุดมุ่งหมายของงานนี้เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของว่านสกัดจากใบขลู่ในเซลล์ไมโครเกลีย BV2 ที่ถูกกระตุ้นโดยไลโพพอลิแซกคาไรด์ (LPS) และศึกษากลไกการต้านอักเสบที่เกิดขึ้น ทำการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของส่วนสกัดจากใบขลู่โดยวิธี MTT ทำการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ที่เป็นดัชนีของไนตริกออกไซด์โดยปฏิกิริยา Griess และวิเคราะห์ระดับของพรอสตาแกลนดิน E_2 (PGE_2) และทูเมอร์เนคโครซีสแฟกเตอร์-α (TNF-α) โดยเทคนิค ELISA ตรวจสอบการแสดงออกของสารสื่อกลางการอักเสบโดยเทคนิค quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) ทำการวิเคราะห์ระดับโปรตีน inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) รวมทั้งโปรตีนหลักของวิถี mitogen-activated protein kinases (MAPKs) และวิถี nuclear factor-kappa B (NF-κB) โดยเทคนิค Western blot analysis. ส่วนสกัดเอทานอลและส่วนสกัดน้ำจากใบขลู่ (PIE และ PIW ตามลำดับ) ที่ความเข้มข้น 12.5-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นโดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้ PIE ยังยับยั้งการผลิต PGE_2 และ TNF-α ในเซลล์ BV2 ที่ถูกกระตุ้นโดย LPS ผลการยับยั้งนี้สัมพันธ์กับการลดการแสดงออกของ iNOS, COX-2 และ TNF-α ส่วนสกัด PIE ยับยั้งการกระตุ้นวิถีสัญญาณ NF-κB โดยลดการฟอสโฟรีเลชันของโปรตีน IκB และการเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสของ NF-κB p65 ส่วนสกัด PIE ยังยับยั้งการฟอสโฟรีเลชันของเอนไซม์ p38 MAPKs นอกจากนี้ทำการวิเคราะห์ thin layer chromatography (TLC) ของส่วนสกัด PIE และ PIW ด้วยระบบตัวทำละลายที่ขั้วต่างกัน โดยเทียบกับเควอซิตินที่เป็นสารพฤษเคมีหลักของใบขลู่ ทำการวิเคราะห์ส่วนสกัดจากใบขลู่โดยใช้เทคนิค HPLC quercetin พบปริมาณของสารออกฤทธิ์เควอซิตินในปริมาณ 11.51±0.34 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของส่วนสกัด ผลการศึกษาที่ได้ทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านอักเสบของว่านสกัดจากใบขลู่ในเซลล์ไมโครเกลีย BV2 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยการลดการผลิตและการแสดงออกของสารสื่อกลางการอักเสบโดยการยับยั้งวิถีสัญญาณ

NF-**κ**B และ MAPKs ผลที่ได้แสดงให้เห็นศักยภาพของใบขลู่ในการป้องกันและรักษาโรคจากการอักเสบของระบบประสาทที่มีการกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลีย

คำสำคัญ: ขลู่ การอักเสบของระบบประสาท เซลล์ไมโครเกลีย NF-**κ**B MAPKs

กองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย
Thai Traditional Medical Knowledge Fund

Abstract

Neuroinflammation is one of the major causes of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. The activation of microglial cells, resident macrophages in the central nervous system (CNS), is known to play a significant role in neuroinflammation through the excessive production of inflammatory mediators. Therefore, suppression of microglia-induced overproduction of inflammatory mediators may have valuable therapeutic potential for treating in flammation-related CNS diseases. *Pluchea indica* leaves, widely consumed as herbal medicine and culinary vegetable, have been reported to possess a variety of biological activities including anti-inflammatory effects. However, the effect of *P. indica* leaves on neuroinflammation has never been shown. Thus, the aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory effects of *P. indica* leaf extract on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated BV2 microglial cells and its underlying mechanisms. Cytotoxicity of *P. indica* leaf extract was examined by MTT assay. Amount of nitrite, an index of nitric oxide (NO) was measured by the Griess reaction, and the levels of prostaglandin E_2 (PGE_2) and tumor-necrosis factor-α (TNF- α) were measured by ELISA technique. The expression of inflammatory mediators was detected by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). The protein levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) and major proteins in mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor-kappa B (NF-κB) signaling pathways were detected by Western blot analysis. Both ethanol and water extracts from *P. indica* leaves (PIE and PIW, respectively) at concentrations of 12.5-50 μg/mL significantly reduced NO production in activated microglial cells without significant cytotoxicity. In addition, PIE also inhibited LPS-induced production of PGE_2 and TNF- α in LPS-induced BV2 cells. These inhibitory effects were correlated with the reduction of iNOS, COX-2 and TNF-α expressions. Mechanistically, PIE suppressed the activation of NF-κB signaling by decreasing phosphorylation of IκB and nuclear translocation of NF-κB p65. PIE also inhibited phosphorylation of p38 MAPKs. the Moreover, the present study was carried out thin layer chromatography (TLC) profiling of PIE and PIW using a various solvent system of varying polarity with a major phytochemical, quercetin. high-performance

liquid chromatography (HPLC) anlysis revealed the amounts of quercetin found in *P. indica* leaves extracted with ethanol was 11.51±0.34 mg/g dried weight. Taken together, these findings demonstrated the anti-inflammatory effect of *P. indica* leaf extract by suppressing the production and expression of inflammatory mediators through inactivation of NF-ΚB and MAPKs signaling pathways in LPS-stimulated BV2 microglial cells. The obtained data suggest a therapeutic potential of *P. indica* leaves for preventing and treating neuroinflammatory diseases accompanied by microglial activation.

Keywords: *Pluchea indica,* Neuroinflammation, microglial cells, NF-ΚB, MAPKs

กองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย
Thai Traditional Medical Knowledge Fund