

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเมล็ดหมามุ่มก้วยแขกต่อเซลล์ L929 และ HepG2

กฤติยา ทิทยากร*, ศรัญญา เหล่าวิทยางค์กูร, พงศธร หลิมศิริวงศ์, ชุติรัตน์ บรรจงลิขิตกุล

ฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

บทคัดย่อ

โรคพาร์กินสัน มีสาเหตุจากการสร้าง และ/หรือการทำหน้าที่ของสารสื่อประสาทโดปามีน (dopamine) ลดลง ทำให้การเคลื่อนไหวของร่างกายผิดปกติ เช่น มีการสั่นของมือ แขน ขา เคลื่อนไหวช้า มีอาการเกร็งของกล้ามเนื้อ จนถึงกลืนลำบาก มีน้ำลายมาก เหงื่อออกมาก ซึ่งความรุนแรงของโรคจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในปัจจุบัน การรักษาโรคนี้ยังเป็นการรักษาตามอาการของโรค โดยใช้ยาในกลุ่มที่ช่วยเพิ่มระดับของสารสื่อประสาทโดปามีน มีการศึกษาพบว่า พืชในตระกูลหมามุ่ม ได้แก่ *Mucuna gigantea* (Willd.) DC. หรือ หมามุ่มก้วยแขก มีสาร L-dopa ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของโดปามีนที่ได้จากธรรมชาติที่น่าสนใจสำหรับนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มระดับของสารสื่อประสาทโดปามีน ในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ในการหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ 2 ชนิดของสารสกัดจากเมล็ดหมามุ่มก้วยแขก โดยใช้วิธี MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) ก่อนที่จะนำมาศึกษาและพัฒนาในขั้นต่อไป ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดเมล็ดหมามุ่มก้วยแขก มีค่า IC_{50} ต่อเซลล์เนื้อเยื่อ L929 (Mouse fibroblast) และ เซลล์เนื้อเยื่อ HepG2 (Human Hepatocellular carcinoma) มากกว่า 5 มก./มล. สรุปได้ว่า สารสกัดเมล็ดหมามุ่มก้วยแขกเป็นสารทดสอบที่จัดอยู่ในกลุ่มของ Potentially non toxic ดังนั้น สารสกัดจากพืชนี้ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลองก่อนนำไปพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ในการบรรเทาอาการของโรคพาร์กินสันต่อไป

คำสำคัญ: ความเป็นพิษต่อเซลล์ หมามุ่มก้วยแขก MTT โรคพาร์กินสัน

*ผู้รับผิดชอบบทความ

ดร. กฤติยา ทิทยากร

ฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

E-mail: krittiya@tistr.or.th

Cytotoxic Evaluation of *Mucuna gigantea* Extract in L929 and HepG2 Cell Lines

Krittiya Thisayakorn*, Sarunya Laovittayangoon, Pongsatorn Limsiriwong, Chuleratana Banjonglikitkul

Pharmaceutical and Natural Product Department, Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR), Pathum Thani (Thailand)

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder which affects movement abilities. The symptoms of PD mostly include bradykinesia, rigidity, tremor, and postural instability. A deficiency of dopamine in the substantia nigra is the main cause of the characteristics in PD. Currently, PD is symptomatic treated using drugs to increase dopamine levels. *Mucuna* species have been used to alleviate PD symptom. *Mucuna gigantea* (Willd.) DC. (*mucuna*) is known to contain natural levodopa (L-DOPA), which is related to the L-DOPA precursor used in elevating dopamine levels for PD treatment. It is interesting to develop a new natural product from this kind of plant in order to relieve PD symptoms. Thus, this study aimed to evaluate cytotoxicity of the seed extract of *mucuna* in mouse fibroblast (L929) and human hepatocellular carcinoma cell lines by MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. The IC₅₀ values of the extract were higher than 5 mg/kg in both cell lines. The result indicates that *mucuna* seed extract was "potentially nontoxic agent". This extract is worth to further assess its toxic effect in animal prior to develop as a nutraceutical product for relieving the symptoms of PD.

Keywords: Cytotoxicity, *Mucuna gigantea*, MTT, Parkinson's disease***Corresponding author**

Dr. Krittiya Thisayakorn

Pharmaceutical and Natural Product Department, Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR), Pathum Thani (Thailand)

E-mail: krittiya@tistr.or.th

บทนำ

โรคพาร์กินสัน ส่วนใหญ่พบในผู้ที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไป แต่ก็พบว่ามิแนวโน้มที่จะเกิดอาการของโรคเร็วขึ้นได้ โรคนี้พบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง และพบได้ทั่วโลก อุบัติการณ์การเกิดของโรคนี้ในต่างประเทศพบประมาณ 1-5% ในผู้ที่มีอายุเกิน 50 ปี สาเหตุของการเกิดโรคพาร์กินสันมีหลายปัจจัย ที่พบได้บ่อยคือ การสร้างและ/หรือการทำหน้าที่ของสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ที่มีชื่อว่าโดปามีน (dopamine) ลดลง ซึ่งโดปามีนนี้เป็นสารที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับความจำ การเรียนรู้ อารมณ์ รวมถึงการควบคุมการเคลื่อนไหว และการทำงานของกล้ามเนื้อ โดยสาเหตุที่ทำให้การสร้างและ/หรือการทำหน้าที่ของสารสื่อประสาทโดปามีนลดลง ได้แก่ ความชราภาพหรือภาวะเสื่อมของสมองในผู้สูงอายุ การใช้ยากดประสาทบางประเภทที่มีฤทธิ์กดการสร้างโดปามีนในผู้ป่วยจิตเวช หลอดเลือดในสมองอุดตัน สารพิษทำลายสมอง เช่น จากสารแมงกานีส คาร์บอนไดออกไซด์ สมองขาดออกซิเจน อุบัติเหตุที่ทำให้ศีรษะถูกกระทบกระเทือน นอกจากนี้พบว่า สภาพแวดล้อมและพันธุกรรมยังเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคได้¹ ผู้ป่วยพาร์กินสันจะแสดงอาการของโรคแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอายุ และภาวะแทรกซ้อนที่ตามมา โดยแบ่งอาการของโรคเป็น 2 ระยะ ระยะแรกจะเกี่ยวข้องกับเคลื่อนไหวของร่างกาย (motor movement) ได้แก่ เคลื่อนไหวช้า มือสั่น มีอาการเกร็งของกล้ามเนื้อแขน ขา ทำให้รู้สึกปวดเมื่อย ทำเดินผิดปกติ คือ จะเดินก้าวสั้น ๆ แบบซอยเท้า แล้วจะก้าวยาวขึ้น และหยุดทันทีไม่ได้ ทำให้เกิดอุบัติเหตุ เดินหลังค่อม ตัวงอ ไม่แกว่งแขน ระยะต่อมาจะกลืนลำบาก มีน้ำลายมาก เหงื่อออกมาก มี

อาการทางจิต เช่น ซึมเศร้า แยกตัว ตอบโต้ช้า ซึ่งความรุนแรงของโรคจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ โรคนี้ยังไม่มียารักษา การรักษาส่วนใหญ่จึงเป็นการรักษาตามอาการของโรค โดยแพทย์จะให้ยาในกลุ่มที่ช่วยเพิ่มระดับสารสื่อประสาทโดปามีน ได้แก่ levodopa (L-dopa), monoamine oxidase inhibitors (MAOIs) และ dopamine agonists

พืชสมุนไพรหลายชนิดมีสารอัลคาลอยด์ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ monoamine oxidase inhibitors ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการทำลายสารสื่อประสาทโดปามีนในเซลล์สมอง ทำให้มีระดับของโดปามีนเพิ่มขึ้น จึงช่วยลดอาการผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเคลื่อนไหว พืชในตระกูลหามมูย หรือ *Mucuna* species เช่น *Mucuna gigantea* (Willd.) DC. หรือหามมูยกล้วยแขกเป็นพืชที่พบว่าลำต้นมีสาร L-dopa 40 มิลลิกรัม/กรัมของน้ำหนักพืช² ซึ่ง L-dopa นี้เป็นสารตั้งต้นของโดปามีน มีส่วนช่วยให้มีการสร้างโดปามีนในสมองเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าในเมล็ดของหามมูยมีสารอัลคาลอยด์ในกลุ่ม β -carbolines และอื่น ๆ เช่น mucunine, mucunadine, mucunidine, pruriendine, glutathione, lecithin และ nicotine และมี levodopa 4-6%³ เมื่อนำสารสกัดจากหามมูย (*Mucuna pruriens*) มาใช้รักษาผู้ป่วยพาร์กินสัน จำนวน 60 คน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าผู้ป่วยพาร์กินสันมีอาการดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสามารถรักษาระดับของ levodopa⁴ ในสมองของหนูที่ถูกทำลายในส่วนที่สร้างสารโดปามีน เป็นผลให้ระดับของ dopamine, norepinephrine และ serotonin ไม่ลดลง จึงให้ผลในการรักษาอาการของโรคพาร์กินสัน⁵ ดังนั้น ก่อนที่จะนำเอาสารสกัดจากเมล็ดหามมูยกล้วยแขก มาพัฒนาเป็น

ผลิตภัณฑ์ในการบรรเทาอาการของโรคพาร์กินสัน จะต้องมีการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจาก เมล็ดหมามุกกล้วยแขกก่อน โดยในการศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์ในการหาค่าความเป็นพิษในระดับ เซลล์ของสารสกัดจากเมล็ดหมามุกกล้วยแขก ด้วย วิธี MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) วิธีการนี้ถูกพัฒนา เพื่อใช้หาปริมาณของเซลล์ที่รอดชีวิต และตรวจวัด ค่าการดูดกลืนแสงที่ประมาณ 550-590 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงจะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต⁶

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

ชนิดของเซลล์และสารเคมี

เซลล์เนื้อเยื่อ L929 CRL-CCL-1 cell line (Mouse fibroblast, ATCC, USA) ใช้เป็นตัวแทน ของเซลล์ทั่วไปในร่างกายและเซลล์เนื้อเยื่อ HepG2 HB-8065 cell line (Hepatocellular carcinoma, human, ATCC, USA) ใช้เป็นเซลล์ที่มีผลเฉพาะต่อการสะสมพิษ

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี MTT ซื้อมาจาก GIBCO, USA ประกอบด้วย Minimum essential media, Horse serum Fetal Bovine serum, Phosphate buffer solution (PBS), Penicillin/Streptomycin, 0.05% Trypsin-versene (Trypsin/EDTA), 0.25% Trypsin-versene (Trypsin/EDTA), Tryphan blue 0.4%, และ 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, USA

เครื่องมือที่ใช้ ประกอบด้วย Laminar airflow hood (SANYO MCV-13BSF, JAPAN) Haemocytometer (BOECO, GERMANY) 96-well

plate (Corning, USA) Microplate reader (TECAN, AUSTRIA)

วิธีเตรียมสารสกัดเมล็ดหมามุกกล้วยแขก

เมล็ดหมามุกกล้วยแขกสับให้ละเอียด แช่ ใน 95% เอทานอล เป็นเวลา 2 วัน จึงไขเก็บ แล้ว ทำซ้ำทั้งสิ้น 6 รอบ หลังจากนั้นนำมาระเหยแห้ง ได้ เป็นสารสกัดเมล็ดหมามุกกล้วยแขกที่ประมาณ 6.5% yield

วิธีเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อ

นำเซลล์เนื้อเยื่อทั้งสองชนิดที่เพาะเลี้ยงไว้ ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดพื้นที่ 75 ลบ.ซม. มา ล้างด้วย PBS เติม Trypsin/EDTA 5 มล. บ่มไว้เป็น เวลา 3 นาที เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์อีก 15 มล. ทำให้ เป็น cell suspension นำไปปั่นที่ 3000 rpm นาน 5 นาที หลังจากนั้นเจือจางเซลล์ให้ได้ 1×10^5 เซลล์/ มล. ประมาณ 20 มล. นำเซลล์เนื้อเยื่อทั้งสองชนิดที่ เจือจางแล้วใส่ใน 96-well plate โดยเว้นแถวที่ 1 และ 12 เพื่อใช้เป็น blank และช่วยรักษาความชื้น แก่เซลล์ใน 96-well plate นำเซลล์เนื้อเยื่อทั้งสอง ไปเพาะเลี้ยงใน CO₂ Incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จนเซลล์เจริญเป็น ชั้นเดี่ยว (monolayer) อย่างน้อยร้อยละ 80 ของ พื้นที่เลี้ยงเซลล์

วิธีการทดสอบ

ภายหลังจากเตรียมเซลล์ จนเซลล์เป็นชั้น เดี่ยวร้อยละ 80 ของพื้นที่เลี้ยงแล้ว จึงดูดอาหาร เลี้ยงเซลล์ออก และล้างด้วย PBS 1 ครั้ง หลังจากนั้น นำสารสกัดเมล็ดหมามุกกล้วยแขกมาละลาย ด้วยเอทานอล และปั่นให้ตกตะกอน นำส่วนใสมา

กรองด้วย syringe filter ขนาด 22 ไมโครโมล และเจือจางสารสกัดด้วย basal medium ให้ได้ความเข้มข้น 0.5-5 มก./มล. และใช้ MEM medium เป็นสารละลายควบคุม เติมนลงไปเซลล์เพาะเลี้ยงหลุมละ 200 ไมโครลิตร และบ่มเซลล์ทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การประเมินผลการทดสอบ

หลังจากปล่อยให้เซลล์สัมผัสกับสารสกัดเมล็ดหมามุ่ยกล้วยแขก ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามระยะเวลาที่กำหนดแล้ว จึงวัดเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตรอดด้วยวิธี MTT assay โดยดูด media เก้าทิ้ง และเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มก./มล. MTT บ่มทิ้งไว้ในตู้บ่มเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ดูดสารละลายทิ้ง ล้างส่วนเกินด้วย PBS และละลายตะกอนด้วย DMSO 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตเทียบกับกลุ่มควบคุม

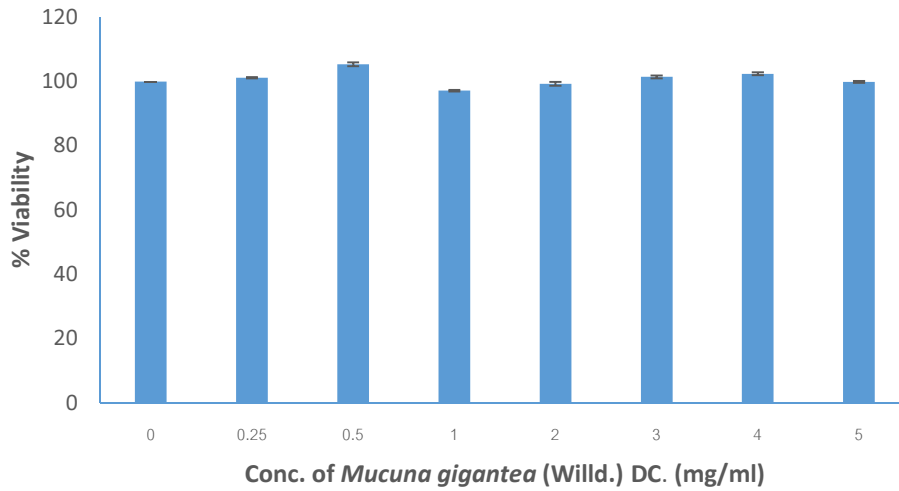
ผลการทดสอบและวิจารณ์

จากการตรวจสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์ของสารสกัดเมล็ดหมามุ่ยกล้วยแขก โดยวิธี MTT assay พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ด

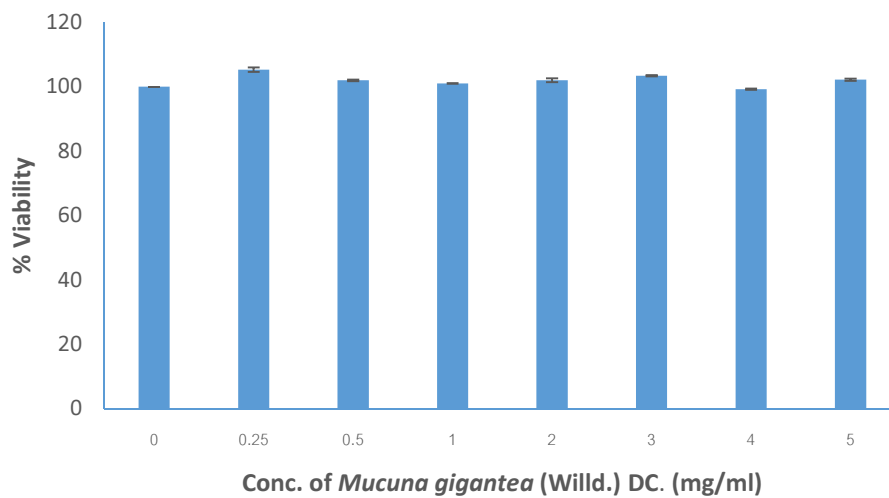
หมามุ่ยกล้วยแขก ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 0-5 มก./มล. นั้นก่อให้เกิด formazan product ซึ่งเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร จะแสดงให้เห็นเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตรอด โดยพบว่าสารสกัดไม่มีผลต่อจำนวนเซลล์ โดยมีอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ > 95% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Blank)

โดยผลจากการคำนวณสรุปได้ว่า ระดับความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดหมามุ่ยกล้วยแขกที่มีผลทำให้ปริมาณเซลล์ตายลงครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม มากกว่า 5 มก./มล. ทั้งเซลล์ L929 (รูปที่ 1) และ HepG2 (รูปที่ 2) โดยมีค่าสรุป ดังแสดงในตารางที่ 1

จากผลการทดสอบดังกล่าว พบว่า สารสกัดเมล็ดหมามุ่ยกล้วยแขก มีค่า IC_{50} มากกว่า 5 มก./มล. ซึ่งหากเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงของ Ballantyne, 1999 พบว่าสารสกัดเมล็ดหมามุ่ยกล้วยแขกจัดอยู่ในกลุ่มของสารทดสอบจากธรรมชาติ ชนิด Potentially non toxic (ตารางที่ 2) ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจและเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดจากเมล็ดหมามุ่ยกล้วยแขก มาศึกษาในส่วนของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เพื่อพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ในการบรรเทาอาการของโรคพาร์กินสันจากพืชสมุนไพรต่อไป



รูปที่ 1 กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ L929 CRL-CCL-1, Mouse fibroblast cell line เมื่อเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดเมล็ดคหามูยกล้วยแขก (*Mucuna gigantea* (Willd.) DC.) ความเข้มข้น 0.25-5 มก./มล. เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 2 กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HepG2 HB-8065, Hepatocellular carcinoma, human cell line เมื่อเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดเมล็ดคหามูยกล้วยแขก (*Mucuna gigantea* (Willd.) DC.) ความเข้มข้น 0.25-5 มก./มล. เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 ความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 และ HepG2 (IC₅₀) เมื่อได้รับสารสกัดเมล็ดหมามุ่ยกลั้วแยก

สารทดสอบ	IC ₅₀ (มก./มล.) ของสารสกัดต่อเซลล์	
	L929	HepG2
สารสกัดเมล็ดหมามุ่ยกลั้วแยก	> 5	> 5

ตารางที่ 2 Classification of the cytotoxicity for natural ingredients (Ballantyne, 1999)

Category	IC ₅₀ (million cells mL ⁻¹)
Potentially very toxic	IC ₅₀ < 10 µg/ml
Potentially toxic	10 µg/ml < IC ₅₀ < 100 µg/ml
Potentially harmful	100 µg/ml < IC ₅₀ < 1000 µg/ml
Potentially non toxic	IC ₅₀ > 1000 µg/ml

เอกสารอ้างอิง

- Doder M, Rabiner EA, Turjanski N, *et al.* Tremor in Parkinson's disease and serotonergic dysfunction. An ¹¹C-WAY 100635 PET study. *Neurology* 2003; 60: 601-5.
- Tse GG, Kim BB, McMurtray AM, *et al.* Case of Levodopa Toxicity from Ingestion of *Mucuna gigantea*. *Hawai'i J of Med& Pub Health* 2013; 72: 157-60.
- Ovallath S, Deepa P. The history of parkinsonism: descriptions in ancient Indian medical literature. *Mov Disord.* 2013; 28: 566-8.
- Parkinson's Disease Study Group. An alternative medicine treatment for Parkinson's disease: results of a multicenter clinical trial. HP-200 in Parkinson's Disease Study Group. *J Altern Complement Med* 1995; 1: 249-55.
- Manyam BV, Dhanasekaran M, Hare TA. Neuroprotective effects of the antiparkinson drug *Mucuna pruriens*. *Phytother Res* 2004; 18: 706-12.
- Plumb JA, Miroy R, Kaye SB. Effect of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by novel tetrazolium nased assay. *Cancer Res* 1989; 49: 4435-40.
- Ballantyne B, Cawley TJ. Toxicology update. *J App Toxicol* 1999; 19: 291-4.