

# ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสจากสมอหมูของพืชสมุนไพรไทยบางชนิด

## Inhibition of Pig (*Sus domesticus*) Brain Monoamine Oxidase Enzymes by Some Thai Herbal Extracts

โสภา นิลเทศ<sup>1</sup> วริษฐา ปุลาสะกา<sup>1</sup> ปณิดา ดวงแก้ว<sup>2</sup> เอกรัฐ ศรีสุข<sup>3</sup> พรพิมล รงคนพรัตน์<sup>4</sup> และ ทรงกลด สารภูษิต<sup>1\*</sup>  
Sopa Ninted<sup>1</sup>, Waridta Pulasaka<sup>1</sup>, Panida Duangkaew<sup>2</sup>, Ekaruth Srisook<sup>3</sup>, Pompimol Rongnoparut  
and Songklod Saraputit<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาชีวเคมี และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

<sup>2</sup>คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากรวิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

<sup>3</sup>ภาควิชาเคมี และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

<sup>4</sup>ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University

<sup>2</sup>Faculty of Animal Sciences and Agricultural Technology, Silpakorn University Petchaburi IT Campus Petchaburi

<sup>3</sup>Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University

<sup>4</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

Received : 11 June 2017

Accepted : 7 July 2017

Published online : 19 July 2017

### บทคัดย่อ

ในปัจจุบันโรคทางระบบประสาท เช่น โรคซึมเศร้า และโรคพาร์กินสันเป็นโรคที่พบมากขึ้น โดยสาเหตุหนึ่งที่สำคัญเกิดจากการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (monoamine oxidase : MAO) ในสมองทั้ง 2 ไอโซฟอร์ม คือ MAO-A และ MAO-B ย่อยสลายสารสื่อประสาทมากเกินไป นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ยังส่งผลให้เกิดกระบวนการลิพิดเปอร์ออกซิเดชันที่ร่วมส่งผลให้เกิดโรคทางสมองดังกล่าวมากขึ้น วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้เพื่อพัฒนาระบบตรวจสอบการยับยั้งเอนไซม์ MAO ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยโดยใช้สารละลายเอนไซม์ MAO จากสมอหมู (*Sus domesticus*) ด้วยวิธี ABTS assay ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากสมอหมูสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้น *p*-tyramine และสารสกัดหยาบโกฐน้ำเต้าออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ดีที่สุดด้วยค่า IC<sub>50</sub> 18.26 µg/ml ส่วนสารสกัดหยาบหม่อนย่อยออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ดีที่สุดด้วยค่า IC<sub>50</sub> 3.53 µg/ml

**คำสำคัญ:** โมโนเอมีนออกซิเดส โมโนเอมีนออกซิเดสเอ โมโนเอมีนออกซิเดสบี การยับยั้ง พืชสมุนไพรไทย

\*Corresponding author. E-mail :songklod@go.buu.ac.th

## Abstract

Nowadays, the number of neurological disease patients, such as depression, attention deficit disorder, and Parkinson's disease has been increasing. Monoamine oxidase (MAO) enzyme, both isoforms; MAO-A and MAO-B, have been reported as important therapeutic targets of these neurological diseases. Excess MAO mediates serotonin and dopamine metabolism leading to decreased levels of these neurotransmitters. In addition, lipid- peroxidation by the metabolic product of this neurotransmitter metabolism, the hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), was proposed as another factor that could facilitate the progression of degenerative brain tissue in patients. This study aims to develop an ABTS assay method to screen the extracts from Thai herbal that can inhibit MAO activity presence in pig (*Sus domesticus*) brain lysate. The results showed that the pig brain homogenate can metabolized *p*-tyramine substrate and the extracts from *Rheum palmatum* L. can inhibited pig brain MAO-B with an  $IC_{50}$  value of 18.26  $\mu\text{g/ml}$ , while those of *Vernonia cinerea* can inhibited pig brain MAO-A with an  $IC_{50}$  value of 3.53  $\mu\text{g/ml}$ .

**Keywords:** monoamine oxidase, monoamine oxidase A, monoamine oxidase B, inhibition, Thai herbal extract

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประชากรไทยมีแนวโน้มที่จะป่วยและเสียชีวิตจากโรคเรื้อรังทางสมอง เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน และมีอุบัติการณ์ของผู้ป่วยโรคทางระบบประสาท เช่น โรคซึมเศร้า โรคสมาธิสั้น โรควิตกกังวล และโรคเครียดจากเหตุการณ์ร้ายแรงมากขึ้น โดยปัจจุบันในประเทศไทยพบว่ามีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นพาร์กินสันกว่า 40,000 คน โดยกระทรวงสาธารณสุขระบุว่าในปี พ.ศ. 2551 มีผู้ป่วยเสียชีวิตจากกลุ่มอาการทางสมองเหล่านี้จำนวน 5,093 คน (ต่อประชากร 100,000 คน) หรืออัตราผู้เสียชีวิตร้อยละ 8.1 ของกลุ่มโรคทั้งหมด และในปี พ.ศ. 2555 พบว่าอัตราดังกล่าวเพิ่มขึ้นเป็นจำนวน 6,207 คน (ต่อประชากร 100,000 คน) หรือร้อยละ 9.7 ของกลุ่มโรคทั้งหมด โดยอุบัติการณ์ร่วมกัน ของการเกิดโรคส่วนหนึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ชื่อโมโนเอมีนออกซิเดส (monoamine oxidase: MAO) ในสมอง ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารสื่อประสาทที่มีหมู่เอมีนหนึ่งหมู่ (monoamine neurotransmitters: MNTs) ได้แก่ สารสื่อประสาทเซโรโทนิน (5-hydroxytryptamine; 5-HT) สารสื่อประสาทโดปามีน (dopamine: DA) และสารสื่อประสาทนอร์เอพิเนฟริน (norepinephrin: NE) ในสมองมากเกินไป ในปัจจุบันจึงมีการใช้ยาในการลดการทำงานของเอนไซม์ MAO ในสมองเพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคทางสมองดังกล่าว เช่น tranylcypromine, selegiline และ moclobemide แต่ยาข้างต้นส่งผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ (Riederer *et al.*, 2004; Saura *et al.*, 1994) ทำให้ยังคงมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องเพื่อค้นหาและประยุกต์ใช้สารเคมีทั้งจากการสังเคราะห์และจากสมุนไพรธรรมชาติ เพื่อใช้ในการลดการทำงานของเอนไซม์ MAO ในสมองที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคโดยปราศจากผลข้างเคียง อีกทั้งชุดตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ MAO ด้วยสาร Fluorescence มีราคาแพง และเนื่องด้วยข้อจำกัดในการศึกษา

เอนไซม์ MAO ที่ใช้เอนไซม์ MAO ที่บริสุทธิ์จากมนุษย์ การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งไปสู่การพัฒนาระบบตรวจสอบการยับยั้งเอนไซม์ MAO ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยโดยใช้สารละลายเอนไซม์จากสมองหมู (*Sus domesticus*) ที่มีรายงานว่า มีกลไกการทำงาน การกระจายตัว และสัดส่วนของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ใกล้เคียงกับมนุษย์คือร้อยละ 25 ต่อร้อยละ 75 ตามลำดับ (Tipton, 1968a; Abell & Kwan, 2001; Bai *et al.*, 2005) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการนำสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ไปใช้ในการลดอัตราการเกิดผลกระทบต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นในการศึกษาครั้งนี้กลุ่มผู้วิจัยจะทำการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ของสมุนไพรไทยที่นิยมรับประทานทั้งหมด 14 ชนิด โดยใช้เอนไซม์ MAO จากสมองหมูเป็นตัวทดสอบ และพัฒนาวิธีการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ MAO โดยวิธี coupling assay ที่มีสาร 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) หรือ ABTS เป็นตัวตรวจสอบ

## วิธีดำเนินการวิจัย

### การเตรียมและการทำบริสุทธิ์ของสารละลายโปรตีนจากไมโทคอนเดรียจากสมองหมู

นำสมองของหมูที่เพิ่งเสียชีวิตจากโรงฆ่าสัตว์และเก็บรักษาไว้ด้วยความเย็น มาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.25 M sucrose pH 7.6 และ 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ปริมาตร 9-10 เท่าของน้ำหนักสมองที่ได้ (w/v) บั่นสมองหมูด้วยเครื่องบั่นเป็นเวลา 1-2 นาทีจากนั้นบั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปบั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีอีกครั้งก่อนนำส่วนใสที่เก็บได้ไปบั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บตะกอนที่ได้และเก็บสารละลายที่เป็นส่วนใสของโปรตีนไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส (Tipton, 1968b; Lin *et al.*, 2003; Kong *et al.*, 2004; Stafford *et al.*, 2007; Jager *et al.*, 2013)

### การเตรียมสมุนไพร

นำพืชสมุนไพรที่ชื่อจากร้านสมุนไพรสี่ทองตั้งอยู่ในจังหวัดชลบุรีมาตากให้แห้งและทำการบดให้ละเอียด จากนั้นนำไปแช่ใน 95%(v/v) เอทานอลที่สัดส่วน 1 กรัมของพืชสมุนไพรต่อ 10 มิลลิลิตร แช่เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำการกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 (ทำการสกัด 3 ครั้ง) นำส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จากนั้นเก็บสารละลายไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการทดลอง พืชสมุนไพรไทยที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 14 ชนิด ได้แก่ แก้วฮวย, รางจืด, กระเจี๊ยบ, มะตูม, ดอกคำฝอย, โกงสุรขเมา, โกงสุรน้ำเต้า, โกงสุรเชียง, ทองพันชั่ง, โกงสุรหัวบัว, โกงสุรกระดุก, หญ้าหอมน้อย, ปอกะบิด และ หญ้าหนวดแมว

### ตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสจากสารสกัดของพืชสมุนไพรไทย

ตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ MAO ด้วยวิธี coupling assay โดยใช้สารละลาย ABTS ในการตรวจสอบโดยบ่มสารละลายสมองหมูใน 50 mM HEPES buffer ร่วมกับ 8  $\mu$ M *p*-tyramine, 10  $\mu$ M ABTS และ 0.05 unit HRP ผสมให้เข้ากัน จากนั้นใส่สารสกัดที่ 10, 50 และ 100  $\mu$ g/ml และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ 405 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับปฏิกิริยาควบคุมที่ไม่ใส่สารละลายสมองหมู และปฏิกิริยาที่ใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์ MAO

### 1. ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดต่อเอนไซม์ MAO-A จากสมองหมู

เตรียมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 50 mM HEPES buffer pH 7.4, 8  $\mu$ M *p*-tyramine, 10  $\mu$ M ABTS และ 0.05 Unit HRP จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายสมองหมู (0.084  $\mu$ g Protein) ที่ป่มร่วมกับ 1  $\mu$ M pargyline เป็นเวลา 5 นาที (เพื่อยับยั้งกิจกรรมการทำงานของ MAO-B) เพื่อเริ่มปฏิกิริยาและทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่ยับยั้ง MAO-A ที่เหลืออยู่

### 2. ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดต่อเอนไซม์ MAO-B จากสมองหมู

เตรียมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 50 mM HEPES buffer pH 7.4, 8  $\mu$ M *p*-tyramine, 10  $\mu$ M ABTS และ 0.05 Unit HRP จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายสมองหมู (0.084  $\mu$ g Protein) ที่ป่มร่วมกับ 0.05 mM clorgyline เป็นเวลา 5 นาที (เพื่อยับยั้งการทำงานของ MAO-A) เพื่อเริ่มปฏิกิริยาและทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่ยับยั้ง MAO-B ที่เหลืออยู่

## วิเคราะห์ผลการทดลอง

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ MAO ลดลงครึ่งหนึ่ง ( $IC_{50}$ ) ด้วยโปรแกรม Graph-Pad Prism 5.0

## ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

เอนไซม์ monoamine oxidase (MAO) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidative deamination ของ neurotransmitters และ biogenic (Davison, 1958) จากคุณสมบัติของเอนไซม์ MAO ในการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายสารสื่อประสาท พบว่าได้สารที่เป็นพิษต่อระบบประสาทคือ สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) และแอมโมเนีย ( $NH_3$ ) โดยเฉพาะสาร  $H_2O_2$  ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระอื่นๆ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และทำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ประสาทได้ (Neuronal apoptosis) (Chung *et al.*, 2015) จากสาเหตุข้างต้นทำให้เกิดการศึกษาค้นคว้าผลผลิตต่างๆ ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO (MAO inhibitor; MAOI) ที่ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ยาข้างต้นมีผลข้างเคียงในผู้ใช้ส่งผลให้เกิดโรค "Cheese effect" คือเกิดอาการความดันโลหิตสูงและเลือดออกในสมอง ในผู้ป่วยที่รับประทานชีส ไวน์ หรืออาหารหมักดอง (Brown *et al.*, 1989; Finberg & Gillman, 2011) จึงมีความพยายามหาสารสกัดจากธรรมชาติที่ปลอดภัยและสามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง MAO ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาค้นคว้าดังกล่าวต้องใช้เอนไซม์ MAO บริสุทธิ์ของมนุษย์และชุดตรวจสอบมาตรฐาน fluorescence ที่มีค่าใช้จ่ายสูง ไม่เหมาะสมกับการนำมาเป็นตัวตรวจสอบเบื้องต้นในการศึกษาเพื่อค้นหาพืชสมุนไพรจากธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ในหลอดทดลอง ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาระบบในการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ MAO ด้วยสมองหมูซึ่งมีรายงานว่าพบเอนไซม์ MAO อยู่ที่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย และมีกลไกการทำงาน การกระจายตัว และสัดส่วนของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ใกล้เคียงกับมนุษย์ คือร้อยละ 25 ต่อร้อยละ 75 ตามลำดับ (Tipton, 1968a; Saura *et al.*, 1994; Abell and Kwan, 2001; Bai *et al.*, 2005) และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B จากสมองมนุษย์และหมู (*Sus scrofa*) มาเปรียบเทียบพบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความใกล้เคียงกัน 88% และ 92% ตามลำดับ

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยทำการเตรียมเอนไซม์ MAO (ดัดแปลงจาก Tipton, 1968b; Lin *et al.*, 2003; Kong, Cheng and Tan, 2004; Stafford *et al.*, 2007; Jager *et al.*, 2013) โดยเตรียมสารละลายส่วนไมโทครอนเดรียของสมองหนูและใช้ *p*-tyramine เป็นสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ MAO (Finberg, 2014) จากนั้นทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ MAO โดยวิธี ABTS assay ที่ตรวจสอบการมีอยู่ของ  $H_2O_2$  โดยใช้สาร ABTS ทำปฏิกิริยากับ  $H_2O_2$  ด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) ได้ผลิตภัณฑ์คือ ABTS radical cation ( $ABTS^+$ ) เมื่อเกิดปฏิกิริยาจาก ABTS เป็น  $ABTS^+$  จะมีสีเขียวและสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร จากนั้นทำการศึกษาหาพืชสมุนไพรไทยที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ในสารละลายสมองหนูโดยใช้สาร clorgyline และ pargyline ที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง MAO-A และ MAO-B แบบไม่ผันกลับเป็นปฏิกิริยาควบคุมเชิงบวก (Fišar *et al.*, 2010) โดยในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ clorgyline และ pargyline 2 เท่าของค่า  $K_i$  เพื่อเป็นการยืนยันว่าสารละลายทั้ง 2 ชนิดนั้นสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ในมนุษย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

### การยับยั้ง MAO-A และ MAO-B

ในการตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งการทำงานของ MAO จากสมองหนูทั้งสองไอโซฟอร์ม สารสกัดจากโสมงูน้ำเต้าออกฤทธิ์ยับยั้งทั้ง MAO-A และ MAO-B ได้ดีที่สุดที่ค่า  $IC_{50}$  18.58  $\mu$ g/ml สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีรองลงมาคือโสมงูเขมา, เก๊กฮวย, ทองพันชั่ง, มะตูม, ปอกะบิด, หน้้าหมอน้อย, รวงจืด, ดอกคำฝอย, โสมงูเชียง, โสมงูหัวบัว, โสมงูกระดูก, หน้้าหนวดแมว และกระเจี๊ยบ ที่ค่า  $IC_{50}$  32.82, 37.89, 38.84, 39.27, 42.97, 50.5, 52.47, 79.37, 85.19, 98.69, 159.60, 300.20 และ 781.90  $\mu$ g/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 3-1A)

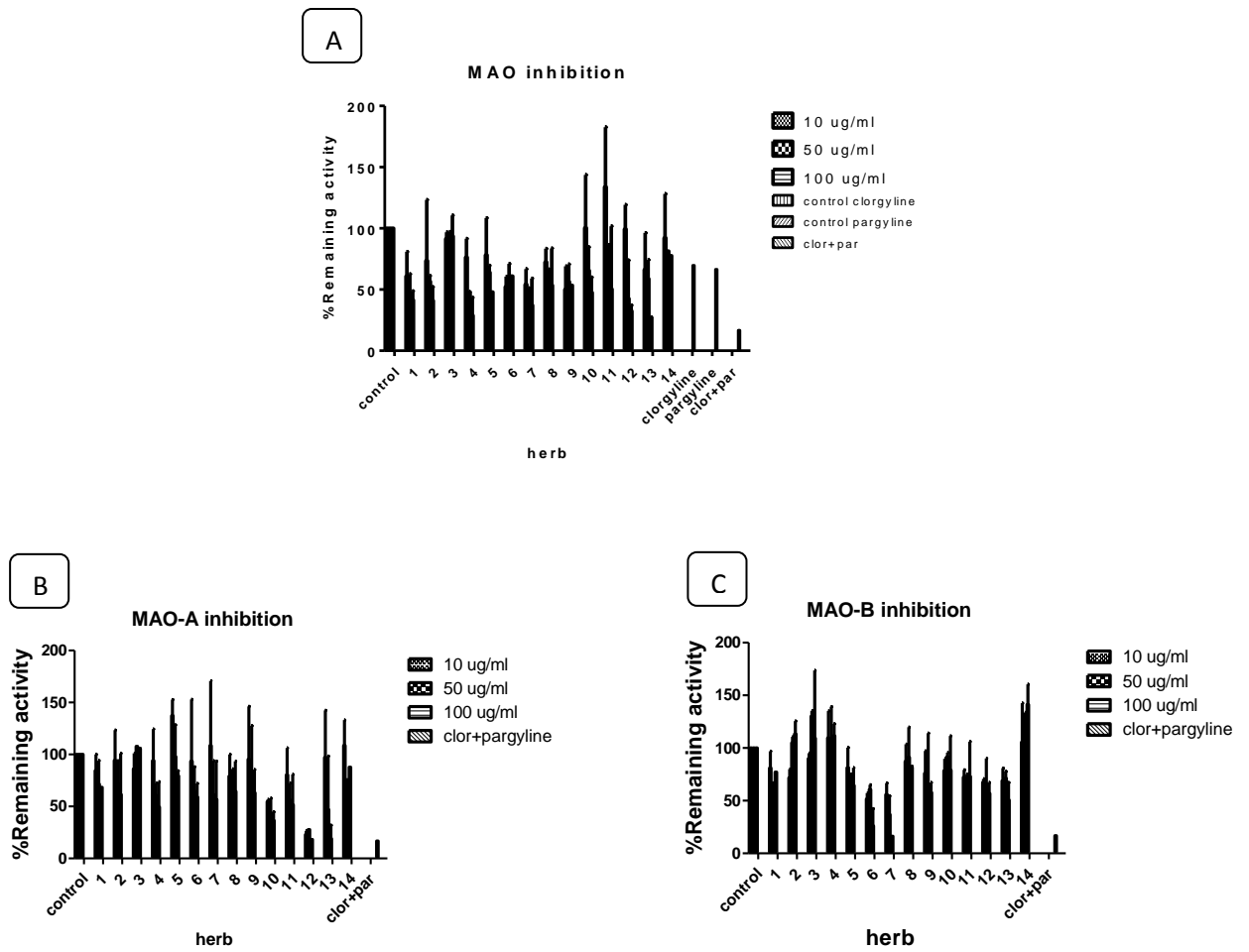
### ยับยั้ง MAO-A

ปมตัวยับยั้งเอนไซม์ MAO-B (pargyline) กับสารละลายเอนไซม์ MAO (หัวข้อ 2.3.1) ตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ในสมองหนู พบว่าสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ได้ดีที่สุด คือหน้้าหมอน้อยที่ค่า  $IC_{50}$  3.53  $\mu$ g/ml สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีรองลงมา คือโสมงูหัวบัว, ปอกะบิด, โสมงูกระดูก, มะตูม, โสมงูเขมา, โสมงูเชียง, โสมงูน้ำเต้า, เก๊กฮวย, รวงจืด, ทองพันชั่ง, หน้้าหนวดแมว และดอกคำฝอย ที่ค่า  $IC_{50}$  35.82, 43.71, 82.67, 88.64, 113.40, 119.20, 123.70, 133.60, 144.00, 198.30, 494.3 และ 720.50  $\mu$ g/ml ตามลำดับ และสารสกัดที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ได้ คือกระเจี๊ยบ (ภาพที่ 3-1B)

### ยับยั้ง MAO-B

ปมตัวยับยั้งเอนไซม์ MAO-A (clorgyline) กับสารละลายเอนไซม์ MAO (หัวข้อ 2.3.2) เพื่อยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ในสมองหนูก่อนตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ในสมองหนู สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ได้ดีที่สุด คือโสมงูน้ำเต้าที่ค่า  $IC_{50}$  18.26  $\mu$ g/ml สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีรองลงมา คือโสมงูเขมา, หน้้าหมอน้อย, ปอกะบิด, ทองพันชั่ง, ดอกคำฝอย, โสมงูกระดูก, เก๊กฮวย, โสมงูหัวบัว และโสมงูเชียงที่ค่า  $IC_{50}$  42.96, 87.6, 94.13, 98.97, 133.00, 151.60, 156.30, 360.90, 425.70  $\mu$ g/ml ตามลำดับ และสารสกัดที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ได้ คือ รวงจืด, กระเจี๊ยบ, มะตูม และหน้้าหนวดแมว (ภาพที่ 3-1C)

เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ MAO ทั้งสองไอโซฟอร์ม จากสารสกัดจากสมุนไพรไทยทั้ง 14 ชนิด โดยปฏิกิริยา co-incubation ซึ่งจะใส่สารละลายที่เตรียมทำปฏิกิริยาทั้งหมดลงในคิวเวตและเริ่มปฏิกิริยาโดยใส่เอนไซม์ MAO จากสมองหมูโดยสารสกัดจากโกฐน้ำเต้าเป็นสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ทั้ง A และ B และ MAO-B ได้ดีที่สุดซึ่งมีสารสำคัญในกลุ่ม anthraquinones ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสาร hydroxyanthracene แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อย (1) free anthraquinones เช่น chrysophanol, emodin, rhein, alo-emodin และ physcion กลุ่มย่อย (2) anthraquinone glycosides เช่น rheinoside A-D, chrysophanein, glucoemodin และ palmatin และกลุ่มย่อย (3) bianthrone เช่น sennoside A-F และ rheidin A-C นอกจากนี้ในโกฐน้ำเต้ายังมีสารกลุ่ม tannins (World Health Organization, 1999) ในขณะที่เห็บหมอน้อยที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง MAO-A ได้ดีที่สุดประกอบด้วยสารเคมีสำคัญหลายชนิดส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่ม sterols, trierpenoid, flavonoids และ saponin (Jeffrey & Harborne, 1999) นอกจากนี้ chlorogenic acid มีประโยชน์เกี่ยวกับ antibacterial, antimutagenic, antitumor, antiviral และ antioxidant สาร succinic acid มีประโยชน์เกี่ยวกับ antibacterial และ anti-inflammatory ส่วนสาร luteolin มีประโยชน์เกี่ยวกับ antitussive, spasmolytic agent, hypocholeretic agent, vasodilator, anti-inflammatory และ antibacterial เป็นต้น แต่ทั้งนี้ยังมีการค้นพบว่ามีสารหลายชนิดอยู่ในเห็บหมอน้อย (Iwalewa *et al.*, 2003) ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีที่มีสารสำคัญในกลุ่มต่างๆ ของสารสกัดจากโกฐน้ำเต้าและเห็บหมอน้อยนั้นอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO ดังผลการทดลองที่ได้ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้าที่พืชสมุนไพรหลายชนิดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ได้ เช่นสารสกัดจากสมุนไพร *Hypericum perforatum* (Butterweck *et al.*, 2002) หรือ *Zanthoxylum schinifolium* (Jo *et al.*, 2002) หรือ *Kaempferia galangal* (Huong *et al.*, 2002) หรือ *Acorus gramineus* (Tao *et al.*, 2005) หรือ  $\beta$ -Carboline จาก *Peganum harmala* (Herraiz *et al.*, 2010) หรือพืชสมุนไพรจากประเทศเดนมาร์ก *Trigonella foenum-graecum*, *Apium graveolens*, *Calluna vulgaris* (Jager *et al.*, 2013) ที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้ง MAO-A ได้ดี ในขณะที่จากพืชสมุนไพรจีนที่ทำการศึกษาค้นคว้า 27 ชนิดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ได้ นั้น สารสกัดจากต้น *Arisaema amurense*, *Lilium brownii* var. *colchesteri*, *Lycium chinense* และ *Uncaria rhynchophylla* ยับยั้งการทำงานของ MAO-B ได้ดีกว่า MAO-A ในหลอดทดลอง (Hou *et al.*, 2005) เช่นเดียวกับ *Gentiana lutea* (Haraguchi *et al.*, 2004) *Ruta graveolens*, *Schotia brachypetala*, *Mentha aquatic* และ *Gasteria croucheri* ซึ่งเป็นพืชประจำถิ่นในทวีปแอฟริกา (Stafford *et al.*, 2007) หรือ *Phellodendron amurense*, *Cyamopsis psoralioides*, *Glycyrrhiza glabra/uralensis*, *Psoralea corylifolia* ที่นิยมใช้ในประเทศอินเดียสามารถยับยั้งการทำงานของ MAO-B ได้ดีกว่า MAO-A ในหลอดทดลอง (Mazzio *et al.*, 2013) และแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของพืชสมุนไพรที่สามารถนำมาใช้พัฒนาในการรักษาโรคต่อไปได้



หมายเลข 1 สารสกัดเก็กฮวย

หมายเลข 4 สารสกัดมะตูม

หมายเลข 7 สารสกัดโกฐน้ำเต้า

หมายเลข 10 สารสกัดโกฐหัวบัว

หมายเลข 13 สารสกัดปอกระบิด

หมายเลข 2 สารสกัดรางจืด

หมายเลข 5 สารสกัดดอกคำฝอย

หมายเลข 8 สารสกัดโกฐเชียง

หมายเลข 11 สารสกัดโกฐกระดูก

หมายเลข 14 สารสกัดหญ้าหนวดแมว

หมายเลข 3 สารสกัดกระเจี๊ยบ

หมายเลข 6 สารสกัดโกฐเขมา

หมายเลข 9 สารสกัดทองพันชั่ง

หมายเลข 12 สารสกัดหญ้าหมอน้อย

**ภาพที่ 3-1** การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B (A), การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A (B) และ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B (C) ที่ทดสอบกับความเข้มข้นของสารสกัด 10, 50 และ 100 µg/ml โดยวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.0



## สรุปผลการวิจัย

จากคุณสมบัติของเอนไซม์ MAO ในการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายสารสื่อประสาท ได้สารที่เป็นพิษต่อระบบประสาท ได้แก่ สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) จึงได้พัฒนาระบบในการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ MAO จากสมองหนูและตรวจสอบการมีอยู่ของ  $H_2O_2$  ในปฏิกิริยาดังกล่าวด้วยวิธีการ ABTS assay และตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวด้วยวิธีการ coupling assay พบว่าสารสกัดที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO-A และ MAO-B ได้แตกต่างกัน โดยสารสกัดที่ยับยั้ง MAO-A ได้ดีที่สุด คือหน้หมอน้อยที่ค่า  $IC_{50}$  3.53  $\mu g/ml$  และสารสกัดที่ยับยั้ง MAO-B ได้ดีที่สุด คือโกฐน้ำเต้าที่ค่า  $IC_{50}$  18.26  $\mu g/ml$  ซึ่งส่วนสารสกัดจากโกฐน้ำเต้านั้นยังออกฤทธิ์ยับยั้งทั้ง MAO-A และ MAO-B ได้ดีที่สุดที่ค่า  $IC_{50}$  18.58  $\mu g/ml$

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 85/2559

## เอกสารอ้างอิง

- Abell, C.W., Kwan, S.W. (2001). Molecular characterization of mono amine oxidase A and B. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 6, 129-156.
- Bai, C., Meng, H., Zhao, W., Pan, Y. (2005). Molecular cloning and characterization of monoamine oxidase A and B genes in pig. *DNA Sequencing*, 16(3), 161-165.
- Brown, C.S., Kent, T.A., Bryant, S.G., Gevedon, R.M., Campbell, J.L., Felthous, A.R., Barratt, E.S., Rose, R.M. (1989). Blood platelet uptake of serotonin in episodic aggression. *Psychiatry Research*, 27, 5-12.
- Butterweck, V., Nahrstedt, A., Evans, J., Hufeisen, S., Rauser, L., Savage, J., Popadak, B., Ernsberger, P., Roth BL. (2002). *In vitro* receptor screening of pure constituents of St. John's Wort reveals novel interactions with a number of GPCRs. *Psychopharmacology Bulletin*, 162, 193-202.
- Chung, J.Y., Lee, J.W., Ryu, C.H., Min, H.K., Yoon, Y.J., Lim, M.J., Park, C.H. (2015). 1-[2-(4-Benzyloxyphenoxy) Ethyl] Imidazole inhibits monoamine oxidase B and protects against neuronal loss and behavioral impairment in rodent models of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 93, 1267-1278.
- Davison, A.N. (1958). Physiological Role of Monoamine Oxidase. *Physiological Review*, 38, 729-747.
- Finberg, J.P.M, Gillman, P.K. (2011). Selective inhibitors of monoamine oxidase Type B and the “cheese effect”. In YoudimMB, Riederer P.(Eds.) *International Review of Neurobiology*, 100, 169-190.
- Finberg, J.P.M. (2014). Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: Focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacology & Therapeutics*, 143, 133-152.
- Fišar, Z., Hroudová, J., Raboch, J. (2010). Inhibition of monoamine oxidase activity by antidepressants and mood stabilizers. *Neuroendocrinology Letters*, 31(5), 645-656.



- Haraguchi, H., Tanaka, Y., Kabbash, A., Fujioka, T., Ishizu, T., Yagi A. (2004). Monoamine oxidase inhibitors from *Gentiana lutea*. *Phytochemistry*, 65, 2255-2260.
- Herraiz, T., González, D., Ancin-Azpilicueta, C., Arán, V.J., Guillén, H. (2010).  $\beta$ -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology*, 48, 839-845.
- Hou, W.C., Lin, R.D., Chen, C.T., Lee, M.H. (2005). Monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition by active principles from *Uncaria rhynchophylla*. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 216–220.
- Huong, D.T.L., Dat, N.T., Minh, C.V., Kang, J.S., Kim, Y.H. (2002). Monoamine oxidase inhibitors from *Aquilaria agallocha*. *Natural Product Sciences*, 8, 30–33.
- Iwalewa, E.O., Iwalewa, O.J., Adeboye, J.O. (2003). Analgesic, pyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extract of *Vernonia cinerea* less leaf. *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 229-34.
- Jager, A.K., Gauguin, B., Andersen, J., Adersen, A., Gudiksen, L. (2013). Screening of plants used in Danish folk medicine to treat depression and anxiety for affinity to the serotonin transporter and inhibition of MAO-A. *Journal of Ethnopharmacology*, 145, 822–825.
- Jeffrey, B., Harborne, F.R. (1999). *Photochemical dictionary*, 2nd ed. UK. Taylor & Francis Ltd.
- Jo, Y.S., Houng, D.T.L., Bae, K., Lee, M.K., Kim, Y.H. (2002). Monoamine oxidase inhibitory coumarin from *Zanthoxylum schinifolium*. *Planta Medica*, 68, 84–85.
- Kong, L.D., Cheng, C.H.K., Tan, R.X. (2004). Inhibition of MAO A and B by some plant-derived alkaloids, phenols and anthraquinones. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(2-3), 351-5.
- Lin, R.D., Hou, W.C., Yen, K.Y., Lee, M.H. (2003). Inhibition of monoamine oxidase B (MAO-B) by Chinese herbal medicines. *Phytomedicine*, 10, 650-656.
- Mazzio, E., Deiab, S., Park, K., Soilman, K.F.A. (2013). High throughput screening to identify natural human monoamine oxidase B inhibitors. *Phytotherapy Research*, 27(6), 818-828.
- Riederer, P., Lachenmayer, L., Laux, G. (2004). Clinical applications of MAO-inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 11, 2033-2043.
- Saura, J., Luque, J.M., Cesura, A.M., Da, P.M., Chan-Palay, V, Huber, G. (1994). Increased monoamine oxidase B activity in plaque-associated astrocytes of Alzheimer brains revealed by quantitative enzyme radioautography. *Neuroscience*, 62, 15–30.
- Stafford, G.I., Pedersen, P.D., Jager, A.K., Staden, J. (2007). Monoamine oxidase inhibition by southern African traditional medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 73, 384-390.
- Tao, G., Irie, Y., Li, D.J., Keung, W.M. (2005). Eugenol and its structural analogs inhibit monoamine oxidase A and exhibit antidepressant-like activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13, 4777–4788.
- Tipton, K.F. (1968a). The reaction pathway of pig brain mitochondrial monoamine oxidase. *European Journal of Biochemistry*, 5, 316-320.

Tipton K.F. (1968b). The purification of pig brain mitochondrial monoamine oxidase. *European Journal Biochemistry*. 4, 103-107.

World Health Organization. (1999). *WHO monograph on selected medicinal plants*, 1, 231-40.