ผลของเอเซียติโคไซด์ต่อการบาดเจ็บจากไนตริกออกไซด์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

นางสาวปิติพร เจวินทุลักษณ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-3866-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 2519852X

EFFECTS OF ASIATICOSIDE ON NITRIC OXIDE-INDUCED INJURIES IN NEURONAL CELL LINE CULTURES

Miss Pitiporn Chevintulak

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacology
Department of Pharmacology
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2005
ISBN 974-14-3866-4

431850

Thesis Title	EFFECTS OF ASIATICOSIDE ON NITRIC OXIDE-INDUCED INJURIES IN NEURONAL CELL LINE CULTURES
By	Miss Pitiporn Chevintulak
Field of Study	Pharmacology
Thesis Advisor	Assistant Professor Surachai Unchern, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Pornpen Pramyothin..... Dean of the Faculty of

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.) Pharmaceutical Sciences

THESIS COMMITTEE

.....Pol Lt. Col Somsong Lawanprasert.....Chairman

(Associate Professor Pol. Lt. Col. Somsong Lawanprasert, Ph.D.)

.....Surachai Unchern.....Thesis Advisor

(Assistant Professor Surachai Unchern, Ph.D.)

.....Vimolmas Lipipun.....Member

(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

.....Mayuree Tantisira.....Member

(Associate Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.)

ปิติพร เจวินทุลักษณ์ : ผลของเอเซียติโคไซด์ต่อการบาดเจ็บจากไนตริกออกไซด์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง. (EFFECTS OF ASIATICOSIDE ON NITRIC OXIDE-INDUCED INJURIES IN NEURONAL CELL LINE CULTURES) อ.ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. สุรชัย อัญเชิญ, 78 หน้า. ISBN 974-14-3866-4

เอเซียติโคไซด์เป็นสารไตรเทอร์ปีนสำคัญในบัวบก *(Centella asiatica)* ซึ่งรู้จักแพร่หลายในแง่ผลสมานแผล ทางด้านแพทย์แผนโบราณมีการใช้บัวบกเพื่อบำบัดรักษาความผิดปกติต่างๆ ของระบบประสาทส่วนกลาง รวมถึงโรคระบบประสาทเสื่อมและความจำบกพร่อง การวิจัยนี้ออกแบบเพื่อศึกษาสมรรถนะที่น่าจะเป็นของเอเซียติโคไซด์และสารสกัดบัวบกในการป้องกันหรือบรรเทากระบวนการเสื่อมของระบบประสาท โดยใช้การบาดเจ็บของเซลล์เพาะเลี้ยง neuroblastoma N1E-115 อันเกิดจากไนตริกออกไซด์เป็นแบบทดสอบนอกร่างกาย ตัวชี้วัดผลที่ใช้ได้แก่ การอยู่รอดของเซลล์ (วัดโดย MTT reduction และ LDH release) ระดับของไลปิดเปอร์ออกซิเดชัน และปริมาณกลูตาไธโอน การเลี้ยงเซลล์ N1E-115 ในเอเซียติโคไซด์ความเข้มข้น 1-100 ไมโครโมลาร์ หรือสารสกัดบัวบกความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 หรือ 48 ชั่วโมง ไม่ปรากฏผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ ขณะที่การเลี้ยงเซลล์ในเอเซียติโคไซด์ความเข้มข้น 200-500 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะเงื่อนไขเดียวกันแสดงผลพิษต่อเซลล์ การเลี้ยงเซลล์ใน SNAP ซึ่งเป็นสารให้กำเนิดไนตริกออกไซด์เหนี่ยวนำการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ประสาทในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้ โดยทำให้เซลล์ประมาณ 50% บาดเจ็บเมื่อใช้ SNAP ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การเลี้ยงล่วงหน้าในเอเซียติโคไซด์หรือสารสกัดบัวบกก่อนสัมผัสกับ SNAP และการเลี้ยงร่วมในเอเซียติโคไซด์พร้อมกับ SNAP ไม่มีผลปกป้องเซลล์ต่อพิษของ SNAP ที่เกิดกับเซลล์ประสาท อย่างไรก็ตามการเลี้ยงร่วมในสารสกัดบัวบกความเข้มข้น 25-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พร้อมกับ SNAP ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลดการกดสมรรถนะเมตาบอลิสมของไมโตคอนเดรียอันเกิดจาก SNAP และการตายของเซลล์ที่ตามมา โดยที่ไม่มีผลที่เห็นได้ต่อการสะสมไนไตรท์อันเกิดจาก SNAP นอกจากนั้นสารสกัดบัวบกความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทำให้ปริมาณกลูตาไธโอนทั้งหมดที่ลดลงจากผลของ SNAP กลับเพิ่มขึ้น ขณะที่มีผลไม่ชัดเจนต่อระดับของไลปิดเปอร์ออกซิเดชัน

โดยสรุป การศึกษานี้ชี้แนะว่าสารสกัดบัวบกอาจมีคุณสมบัติปกป้องเซลล์นอกร่างกายต่อการเสื่อมของเซลล์ประสาทอันเกิดจากไนตริกออกไซด์ สมรรถนะต้านออกซิเดชันของสารสกัดบัวบกอาจไม่ใช่สาเหตุโดยตรงของผลอันเป็นคุณประโยชน์นี้ อย่างไรก็ตามกลไกการทำงานโดยละเอียดยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างถ่องแท้และรอการวิจัยขยายความต่อไป

ภาควิชา..... เภสัชวิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....ปิติพร เจวินทุลักษณ์.....

สาขาวิชา.....เภสัชวิทยา.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2548.....

4576579233 MAJOR : PHARMACOLOGY
KEY WORDS : ASIATICOSIDE / NEUROBLASTOMA CELL LINE / NITRIC OXIDE

PITIPORN CHEVINTULAK : EFFECTS OF ASIATICOSIDE ON NITRIC OXIDE-INDUCED INJURIES IN NEURONAL CELL LINE CULTURES. THESIS ADVISOR: ASST.PROF. SURACHAI UNCHERN, Ph.D. 78 pp. ISBN 974-14-3866-4

Asiaticoside, a main triterpene of *Centalla asiatica*, was well known for wound healing effect. In traditional medicine, *Centella asiatica* have been used in the management of central nervous system disorders including neurodegenerative diseases and memory deficit. The present research was designed to investigate the potential ability of asiaticoside and *Centella asiatica* extract to prevent or attenuate the process of neurodegeneration in the *in vitro* model of nitric oxide-induced injuries in cultured neuroblastoma N1E-115 cells. Cell viability (assessed by MTT reduction and LDH release), levels of lipid peroxidation, and glutathione content, were used as the measuring endpoints. Treatment of cultured N1E-115 cells with 1-100 μM of asiaticoside or 1-100 μg/ml of *Centella asiatica* extract for 24 or 48 hr had no apparent effect on cell viability whereas treatment with 200-500 μM of asiaticoside under the same condition revealed cytotoxic effects. SNAP, a NO donor, induced neuronal injury and death in a concentration-dependent manner with approximately 50% cell injury occurred after an exposure to 1 mM SNAP for 24 hr. Pre-treatment with asiaticoside or *Centella asiatica* extract, and co-treatment with asiaticoside, had no protective effect against SNAP-induced neurotoxicity. However, co-treatment of 25-100 μg/ml *Centella asiatica* extract with 1 mM SNAP for 24 hr attenuated SNAP-induced suppression of mitochondrial metabolic activity and successive cell death in spite of no apparent effects on SNAP-induced nitrite accumulation. In addition, at a concentration of 100 μg/ml, *Centella asiatica* extract elevated SNAP-induced decrease of total glutathione content while exerted ambiguous effects on levels of lipid peroxidation.

In conclusion, the present study suggested that *Centella asiatica* extract, but not asiaticoside, may possess the marginal *in vitro* cytoprotective property against NO-induced neuronal damages. Antioxidant activity of *Centella asiatica* extract may not be directly responsible for this beneficial effect. However, the detailed mechanisms are not fully understood and remain to be further elucidated.

Department of Pharmacology Student's signature Pitiporn Chevintulak

Field of study Pharmacology Advisor's signature

Academic year 2005

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude and appreciation to my advisor, Assistant Professor Dr. Surachai Unchern for this valuable guidance and kind concern throughout my research study which enable me to accomplish this thesis.

I also would like to express my sincere gratitude to the committee members: Associate Professor Pol. Lt. Col. Somsong Lawanprasert, Ph.D., Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D., and Associate Professor Mayuree Tantisira, Ph.D. for their worthy comments and suggestions.

I would like to thank all staff members and everyone in the Department of Pharmacology. Special thanks are also extended to everyone in the Unit Cell of Pharmaceutical Biotechnology, Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their help, friendly relationship and providing laboratory facilities.

This study was supported partly by the Graduate School, Chulalongkorn University.

Finally, I would like to express my deepest appreciation to my family and my friends for their helps, encouragement, and morale that have made me complete this work.

CONTENTS

		Page
ABSTRACT (THAI)		iv
ABSTRACT (ENGLISH)		v
ACKNOWLEDGEMENTS		vi
CONTENTS		vii
LIST OF TABLES		viii
LIST OF FIGURES		x
LIST OF ABBREVIATIONS		xi
CHAPTER		
I	INTRODUCTION	1
II	LITERATURE REVIEW	4
	Centella asiatica	4
	Nitric Oxide	13
	Nitric Oxide and neurodegenerative diseases	14
	Neurodegenerative diseases and oxidative stress	17
	The biology of oxidative stress	19
	Lipid peroxidation	20
	Glutathione	21
	Cell culture	23
III	MATERIALS AND METHODS	25
IV	RESULTS	35
V	DISCUSSION AND CONCLUSION	47
REFERRENCES		53
APPENDICES		67
VITAE		78

LIST OF TABLES

TABLE Page

1 Effects of Asiaticoside on MTT reduction in N1E-11
1.1 24 hr of incubation..... 68
1.2 48 hr of incubation..... 68
2 Effects of *C. asiatica* extract on MTT reduction in N1E-115
2.1 24 hr of incubation..... 69
2.2 48 hr of incubation..... 69
3 Effects of SNAP on MTT reduction in N1E-115
3.1 6 hr of incubation..... 70
3.2 12 hr of incubation..... 70
3.3 24 hr of incubation..... 71
4 Effects of co-treatment with *C. asiatica* extract in SNAP-exposed N1E-115
4.1 MTT reduction assay..... 72
4.2 LDH release assay..... 72
5 Effects of co-treatment with Asiaticoside in SNAP-exposed N1E-115 on MTT reduction assay..... 73
6 Effects of pre-treatment with Asiaticoside in SNAP-exposed N1E-115
6.1 MTT reduction assay (24 hr incubation)..... 74
6.2 MTT reduction assay (48 hr incubation)..... 74
7 Effects of pre-treatment with *C. asiatica* extract in SNAP-exposed N1E-115
7.1 MTT reduction assay (24 hr incubation)..... 75
7.2 MTT reduction assay (48 hr incubation)..... 75
8 Effects of co-treatment with *C. asiatica* extract on the release of nitrite from SNAP-exposed N1E-115 (Griess reagent assay)..... 76
9 Effects of co-treatment with *C. asiatica* extract on the malondialdehyde formation from SNAP-exposed N1E-115..... 77
10 Effects of co-treatment with *C. asiatica* extract on the glutathione level in SNAP-exposed N1E-115..... 77

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Chemical structures of active components in *Centella asiatica*	5
2.	Nitric oxide metabolism and lipid peroxidation	16
3.	Overview of GSH function and metabolism	22
4.	Chemical structure of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine	23
5.	Subculture method	29
6.	Inhibitory effects of SNAP on mitochondrial activity of cultured N1E-115 cell line	35
7.	Effects of asiaticoside on mitiochondrial activity of cultured N1E-115 cell line	36
8.	Effects of *C. asiatica* extract on mitiochondrial activity of cultured N1E-115 cell line	37
9.	Effects of pre-treatment with asiaticoside on mitochodrial activity of cultured N1E-115 cell line exposed to SNAP	38
10.	Effects of pre-treatment with *C. asiatica* extract on mitochodrial activity of cultured N1E-115 cell line exposed to SNAP	39
11.	Effects of co-treatment with asiaticoside on mitochodrial activity of cultured N1E-115 cell line exposed to SNAP	40
12.	Effects of co-treatment with *C. asiatica* extract on mitochondrial activity of cultured N1E-115 cell line exposed to SNAP	42
13.	Effects of co-treatment with *C. asiatica* extract on cell viability of cultured N1E-115 cell line exposed to SNAP	43
14.	Effects of co-treatment with *C. asiatica* extract on nitrite accumulation in cultured N1E-115 cell line exposed to SNAP	44
15.	Effects of co-treatment with *C. asiatica* extract on glutathione levels of cultured N1E-115 cell line exposed to SNAP	45
16.	Effects of co-treatment with *C. asiatica* extract on level of lipid peroxidation in cultured N1E-115 cell line exposed to SNAP	46

LIST OF ABBREVIATIONS

%	=	percent
% v/v	=	percent of volume by volume (ml/100ml)
% w/v	=	percent of weight by volume (g/100ml)
^{o}C	=	degree Celcius
e.g.	=	exaempli gratia (for example)
et al.	=	et alii (and other peoples)
etc.	=	et cetera (and other similar things0
Fig.	=	Figure
hr	=	hour
min	=	minute
sec	=	second
L	=	liter
ml	=	milliliter
µl	=	microliter
g	=	gram
mg	=	milligram
µg	=	microgram
M	=	molar (mole/liter)
mM	=	millimolar
µm	=	micromolar
mol	=	mole
nm	=	nanometer
α	=	alpha
β	=	beta
γ	=	gamma
C. asiatica	=	*Centella asiatica*
C.E.	=	*Centella asiatica* extract
AS	=	asiaticoside
TECA	=	titrated extract of *Centella asiatica*
rpm	=	round per minute
CNS	=	central nervous system

DMEM	=	Dulbecco's modified Eagle's medium
PBS	=	phosphate buffered saline
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
TBARS	=	thiobarbituric acid reactive substance
GSH	=	glutathione
GSSG	=	glutathione disulfide
GRx	=	glutathione reductase
GPx	=	glutathione peroxidase
NADH	=	nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
FBS	=	Fetal bovine serum
SEM	=	standard error of mean
DTNB	=	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
MDA	=	malondialdehyde
ROS	=	reactive oxygen species
OS	=	oxidative stress
SOD	=	superoxide dismutase
CAT	=	catalase
USA	=	The United States of America
LDH	=	Lactate dehydrogenase
MTT	=	3-[4,5-dimethiazol-2-yl]-2,5,diphenyltetrazolium bromide
NMDA	=	N-methyl-D-aspartate
NO	=	Nitric oxide
O_2^-	=	superoxide anion
$ONOO^-$	=	peroxynitrite
pH	=	potential of hydrogen
SNAP	=	S-nitoso-N-Acetylpenicillamine
vs.	=	versus