

บทคัดย่อ

พยาธิวิทยาของโรคอัลไซเมอร์ มีความเกี่ยวข้องกับการสะสมของ beta-amyloid ($A\beta$) ซึ่งมาจากการตัดสาย amyloid precursor protein (APP) ด้วยเอนไซม์ β - และ γ -secretase ส่วนการทำงานของ α -secretase จะตัดสาย APP ที่ตำแหน่งใน $A\beta$ ทำให้เกิด $sAPP\alpha$ ที่ละลายน้ำได้และหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งกระบวนการนี้ ไม่ทำให้เกิดการสร้างและสะสมของ $A\beta$ การควบคุมของ 2 กระบวนการนี้จึงมีความสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ มีรายงานการวิจัยพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักมะละกอ (fermented papaya preparation, FPP) มีผลดีต่อการทำงานของเซลล์ประสาท แต่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงผลของมะละกอที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการแปรรูปต่อการทำงานของระบบประสาท ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะทดสอบฤทธิ์ป้องกันเซลล์ประสาทของสารสกัดน้ำจากมะละกอ โดยทำการศึกษาฤทธิ์ของมะละกอสุก 2 สายพันธุ์ คือ แขกดำและฮอลแลนด์ต่อการหลั่งของ $sAPP$ จาก differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells นอกจากนี้ยังทำการทดสอบสารสกัดจากมะละกอดิบด้วย เนื่องจากการใช้มะละกอดิบกันมากในการปรุงอาหารไทย การวิเคราะห์ $sAPP$ ทำได้โดยการใช้เทคนิค western blotting ด้วยการใช้ antibody 3 ชนิด ที่จับกับ N-terminal APP, $A\beta(1-16)$ และ $A\beta(36-42)$ เพื่อเป็นการบ่งบอกถึง $sAPP$, $sAPP\alpha$ and $sAPP\beta$ ตามลำดับ เนื่องจากการควบคุมการหลั่ง $sAPP$ มีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของ acetylcholine receptor จึงทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะละกอทั้ง 3 ชนิดในการยับยั้งการทำงานของ acetylcholine esterase (AChE) ด้วย ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากมะละกอสุกทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE ได้ดีโดยขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้ ส่วนสารสกัดมะละกอดิบยับยั้งได้เฉพาะที่ความเข้มข้นสูง (5 mg/ml) หลังจากที่ได้เลี้ยง SH-SY5Y cells ด้วยสารสกัดจากมะละกอแต่ละชนิด พบว่ามะละกอสุกพันธุ์แขกดำสามารถยับยั้งการหลั่งของ $sAPP$ ได้ดีมาก ส่วนมะละกอดิบพันธุ์แขกดำและมะละกอสุกพันธุ์ฮอลแลนด์ให้ผลพอกกัน ส่วนการหลั่งของ $sAPP\beta$ จากการเลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดมะละกอทุกชนิดไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมมากนัก การลดลงของการหลั่ง $sAPP$ นี้ คาดว่าเป็นผลมาจากการที่เซลล์มีชีวิตเพิ่มขึ้นและเยื่อหุ้มเซลล์มีความคงทนขึ้น จากผลการทดลองนี้ มีความเป็นไปได้ที่สารสกัดมะละกอมีฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ประสาทได้ โดยทำให้เซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ประสาทมีความแข็งแรงขึ้น จึงมีผลยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงของ APP และส่งผลให้มีการสร้าง $A\beta$ peptide ลดลงได้

Abstract

The pathogenesis of Alzheimer disease is associated with the accumulation of beta-amyloid peptide ($A\beta$) derived from amyloid precursor protein (APP) by cleavages at β - and γ -secretase sites. Alpha-secretase cleavage within the $A\beta$ peptide domain of APP generates non-amyloidogenic soluble $APP\alpha$ ($sAPP\alpha$) which then is released into the extracellular compartment. The regulation of these two pathways is critical for pathogenesis of Alzheimer disease. Fermented papaya preparation (FPP) was previously showed to have beneficial effect to neuronal cells but there is no report on the effect of non-processing papaya. The present study was therefore focused on investigating the neuroprotective effect of papaya water extract. Two types of ripe papaya, Kakdum and Holland, were selected to test their activity on the release of $sAPP$ into the culture medium of differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells. Raw Kakdum extract was also tested since raw papaya has been widely used in Thai cooking. Soluble APP was determined by western blotting using monoclonal antibodies against N-terminal APP, $A\beta(1-16)$ and $A\beta(36-42)$ to detect $sAPP$, $sAPP\alpha$ and $sAPP\beta$, respectively. The effect of these three extracts on intracellular acetylcholine esterase (AChE) activity was also measured since the regulation of $sAPP$ release was involved with ACh receptor. The result showed that the activity of AChE in SH-SY5Y cells was inhibited by both ripe papaya extracts in a dose dependent manner. Raw papaya extract could inhibit intracellular AChE activity only at high concentration (5 mg/ml). After incubating SH-SY5Y cells with each papaya extract, the release of $sAPP$ and $sAPP\alpha$ was reduced comparing to un-treated cells. Ripe Kakdum extract dramatically inhibited $sAPP$ release while raw Kakdum and ripe Holland showed the similar result. The $sAPP\beta$ release induced by papaya extracts did not much different from control in this study. The reduction of $sAPP$ release into culture medium was partially due to the increase in cell viability and the improvement of plasma membrane stability. These data indicate that papaya extract seem to have neuroprotective effect by strengthening neuronal cell membrane and consequently reducing APP processing which then could reduce chances of $A\beta$ peptide formation.