ผลของเอเชียติโคซัยด์ต่อความจำบกพร่องที่ถูกเหนี่ยวนำโดยโปรตีนเบต้าอะมัยลอยด์ในหนูถีบจักร

สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาว อนุช แซ่เล้า

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5758-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I21284360

EFFECTS OF ASIATICOSIDE ON COGNITIVE DEFICITS INDUCED BY β-AMYLOID PROTEIN IN MICE

Miss Anuch Salout

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy in Pharmacology
Department of Pharmacology
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2003
ISBN 974-17-5758-1

461341

Thesis Title	Effects of asiaticoside on cognitive deficits induced by β-amyloid protein in mice
By	Miss Anuch Salout
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

Boonyong Tantisira .... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Pornpen Pramyothin ....Chairman
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

Surachai Unchern ....Thesis Advisor
(Assistant Professor Surachai Unchern, Ph.D.)

Withaya Janthasoot ....Member
(Assistant Professor Withaya Janthasoot, M.Sc.)

Chaiyo Chaichantipyuth ....Member
(Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth, M.Sc. in Pharm)

อนุช แซ่เล้า : ผลของเอเชียติโคซัยด์ต่อความจำบกพร่องที่ถูกเหนี่ยวนำโดยโปรตีนเบต้าอะมัยลอยด์ในหนูถีบจักร (EFFECTS OF ASIATICOSIDE ON COGNITIVE DEFICITS INDUCED BY β-AMYLOID PROTEIN IN MICE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. สุรชัย อัญเชิญ, 74 หน้า. ISBN 974-17-5758-1.

เอเชียติโคซัยด์เป็นสาร triterpene หลักในบัวบกซึ่งรู้จักกันแพร่หลายในแง่ผลสมานแผล แพทย์พื้นบ้านใช้บัวบกมานานในแง่เป็นอาหารบำรุงสมองซึ่งมีผลดีต่อความจำและภาวะสูงอายุ ทั้งที่มีหลักฐานสนับสนุนด้านการวิจัยเชิงวิทยาศาสตร์น้อย ดังนั้นการศึกษานี้จึงทำการทดสอบผลดีที่น่าจะเป็นไปได้ของเอเชียติโคซัยด์ต่อการเรียนรู้และความจำ โดยใช้หนูถีบจักรซึ่งความจำบกพร่องจากการฉีดโปรตีนเบต้าอะมัยลอยด์เข้าสมองเป็นแบบจำลองสำหรับการทดสอบ

หลังจากเริ่มต้นให้เอเชียติโคซัยด์ทางปากติดต่อกันทุกวันในขนาด 5, 10, 25 และ 50 มก./กก./วัน ได้ 1 สัปดาห์ ทำการฉีดโปรตีนเบต้าอะมัยลอยด์ 25-35 ปริมาณ 9 nmoles เข้าช่องว่างในสมองหนูเพื่อทำให้เกิดความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ หลังจากนั้นอีก 7 วัน จึงทำการทดสอบพฤติกรรมด้านสติปัญญาติดต่อกันหลายชุด ได้แก่ การสำรวจช่องทางกลใน Y-maze การค้นหาแท่นพักใน water maze และการหลบเลี่ยงอันตรายใน step-through passive avoidance tasks นอกจากนั้นภายหลังการทดสอบทางพฤติกรรมสิ้นสุดลงยังวัดระดับ lipid peroxidation และปริมาณ glutathione ทั้งหมดในสมองหนูซึ่งเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของ oxidative stress

ผลการทดลองชี้แนะว่าการให้เอเชียติโคซัยด์ทุกวันทางปากในขนาด 5, 10 และ 25 มก./กก./วัน ป้องกันความเสื่อมของความจำระยะสั้นใน Y maze และความเสื่อมของความจำชนิดอ้างอิงระยะยาวใน water maze ซึ่งเกิดจากโปรตีนเบต้าอะมัยลอยด์ 25-35 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับพฤติกรรมการเคลื่อนไหวและการสำรวจ อย่างไรก็ตามการให้เอเชียติโคซัยด์ดังกล่าวไม่แสดงผลดีใดๆ ต่อความจำเฉพาะหน้าใน water maze และการเก็บรักษาความจำใน passive avoidance task นอกจากนั้นการให้เอเชียติโคซัยด์ยังลดระดับ oxidative stress ในสมองของหนูซึ่งได้รับการฉีดโปรตีนเบต้าอะมัยลอยด์ 25-35 ได้อย่างชัดเจนเช่นกัน

โดยสรุป ผลการทดลองทั้งหมดชี้แนะว่าเอเชียติโคซัยด์อาจมีผลเสริมสร้างความจำสำหรับภาวะความเสื่อมของสติปัญญาบางรูปแบบ ผลดีดังกล่าวอาจมีสาเหตุส่วนหนึ่งจากคุณสมบัติต้านออกซิเดชั่นอย่างแรงของเอเชียติโคซัยด์

ภาควิชา เภสัชวิทยา ลายมือชื่อนิสิต..

สาขาวิชา เภสัชวิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..

ปีการศึกษา 2546

4476634033 : MAJOR PHARMACOLOGY
KEY WORDS : ASIATICOSIDE / ANIMAL MODEL / OXIDATIVE STRESS / LEARNING AND MEMORY / β-AMYLOID PROTEIN

ANUCH SALOUT : EFFECTS OF ASIATICOSIDE ON COGNITIVE DEFICITS INDUCED BY β-AMYLOID PROTEIN IN MICE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SURACHAI UNCHERN, Ph.D., 74 pp. ISBN 974-17-5758-1.

Asiaticoside, a main triterpene of *Centella asiatica* which was well known for wound healing effect. In folk medicine, *Centella asiatica* has been used as a brain food beneficial for memory and senility with a little supporting evidence by scientific research. Therefore, in the present study, the potential beneficial effect of asiaticoside on learning and memory was investigated by using β-amyloid protein-induced memory impairment in mice injected as an animal testing model.

After starting daily oral administration of asiaticoside at doses of 5, 10, 25 and 50 mg/kg/day for 1 week, 9 nmoles of β-amyloid protein fragment 25-35 was intracerebro-ventricularly (i.c.v.) injected in mice to impair learning and memory. A series of cognitive function tests including spontaneous alternation behavior in a Y-maze, performance in a water maze, and passive avoidance tasks were performed, starting 7 days after $A\beta_{25\text{-}35}$ injection. Measurements of brain lipid peroxidation and total glutathione content, biomarkers of oxidative stress, were done after finishing behavioral tests.

The experimental results suggest that asiaticoside at doses of 5, 10 and 25 mg/kg/day effectively prevent $A\beta_{25\text{-}35}$ induced short-term memory deficit in a Y-maze task and long-term reference memory deficit in a water maze task without any changes in locomotor and exploratory behaviors. However, asiaticoside administration failed to reveal any beneficial effects on working memory in water maze task and memory retention in a step-through passive avoidance task. Asiaticoside administration also significantly reduced oxidative stress in brains of $A\beta_{25\text{-}35}$ injected mice.

Taken together, these results suggest that asiaticoside may possess a memory enhancing effect for certain forms of cognitive deficit. This beneficial effect may be, at least partly, due to its strong antioxidant property.

Department of Pharmacology — Student's signature....Anuch Salout........

Field of study Pharmacology — Advisor's signature......[signature]......

Academic year 2003

ACKNOWLEDGEMENTS

I am deeply indebted to the following individuals and institutions for their assistance in conducting this thesis.

- Assistant Professor Surachai Unchern
- Associate Professor Pornpen Pramyothin
- Associate Professor Mayuree Tantisira
- Assistant Professor Nattaya Ngamrojanavanich
- The Graduate School of Chulalongkorn University
- The Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University

Furthermore, I am grateful to the committee members, Assistant Professor Withaya Janthasoot and Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth for their valuable advice.

Finally, I would like to express my appreciation to all staff members and students in the Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their technical assistance and encouragement.

CONTENTS

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
III	MATERIALS & METHODS	28
IV	RESULTS	39
V	DISCUSSION & CONCLUSION	50
REFERENCES		54
APPENDICES		64
VITAE		75

LIST OF TABLES

Table 1	Genetic factors associated with Alzheimer's disease..............	12
Table 2	Specifications of asiaticoside (Changzhou Natural Products Development, China)..	28
Table 3	Locomotor activity of mice (count/10 min)...........................	65
Table 4	Percent alternation behavior on Y-maze task of mice...............	65
Table 5	Total number of arm entry in Y-maze task of mice..................	66
Table 6	Escape latency time (sec) in water maze task on day 9 after $A\beta_{25-35}$ injection..	66
Table 7	Escape latency time (sec) in water maze task on day 10 after $A\beta_{25-35}$ injection..	67
Table 8	Escape latency time (sec) in water maze task on day 11 after $A\beta_{25-35}$ injection..	67
Table 9	Escape latency time (sec) in water maze task on day 12 after $A\beta_{25-35}$ injection..	68
Table 10	Escape latency time (sec) in water maze task on day 13 after $A\beta_{25-35}$ injection..	68
Table 11	Prebe test-time spent in the platform quadrant (sec) in water maze task on day 13 after $A\beta_{25-35}$ injection...........................	69
Table 12	Escape latency time (sec) in water maze task on day 14 after $A\beta_{25-35}$ injection..	69
Table 13	Escape latency time (sec) in water maze task on day 15 after $A\beta_{25-35}$ injection..	70
Table 14	Escape latency time (sec) in water maze task on day 16 after $A\beta_{25-35}$ injection..	70
Table 15	Step-through latency time (sec) in passive avoidance task on day 18 after $A\beta_{25-35}$ injection...	71
Table 16	Protein concentration of cerebral cortex by Bradford's reagent assay..	71
Table 17	Malondialdehyde in cerebral cortex of mice........................	72
Table 18	Total glutathione in cerebral cortex of mice..........	72
Table 19	The cerebral cortex weight of control mice........................	73

LIST OF TABLES (CONTINUE)

Table 20 The cerebral cortex weight of $A\beta_{25-35}$-injected mice + asiaticoside 0 mg/kg/day... 73
Table 21 The cerebral cortex weight of $A\beta_{25-35}$-injected mice + asiaticoside 5 mg/kg/day... 73
Table 22 The cerebral cortex weight of $A\beta_{25-35}$-injected mice + asiaticoside 10 mg/kg/day... 73
Table 23 The cerebral cortex weight of $A\beta_{25-35}$-injected mice + asiaticoside 25 mg/kg/day... 74
Table 24 The cerebral cortex weight of $A\beta_{25-35}$-injected mice + asiaticoside 50 mg/kg/day... 74

LIST OF FIGURES

Figure 1	The chemical structure of asiaticoside................................	4
Figure 2	APP proteolysis and Aβ production.................................	14
Figure 3	Aβ fibril formation and potential mechanisms of neurotoxicity...	16
Figure 4	Accumulation of oxidized protein is dependent upon the balance between pro-oxidant, antioxidant, and proteolytic activities......	20
Figure 5	Sources of oxidative stress induced by Aβ and protection by antioxidants (AO)..	21
Figure 6	Effects of asiaticoside on locomotor activity of β-amyloid (25-35) injected mice...	42
Figure 7	Effects of asiaticoside on spontaneous alternation behavior and the number of arm entries during an 8-min session in the Y-maze task of β-amyloid-injected mice..............................	43
Figure 8	Effects of asiaticoside on reference spatial memory in the Morris water maze task..	44
Figure 9	Effects of asiaticoside on working spatial memory in the Morris water maze task..	45
Figure 10	Effects of asiaticoside on the step-though latency in multiple-trial passive avoidance task of β-amyloid injected mice.	46
Figure 11	Effects of asiaticoside on brain protein contents in β-amyloid (25-35) injected mice..	47
Figure 12	Effects of asiaticoside on levels of brain lipid peroxidation in β-amyloid (25-35) injected mice.......................................	48
Figure 13	Effects of asiaticoside on total brain GSH contents in β-amyloid (25-35) injected mice..	49

LIST OF ABBREVIATIONS

% v/v	= percent of volume by volume (ml/100ml)
% w/v	= percent of weight by volume (g/100 ml)
°C	= degree Celsius
e.g.	= exempli gratia (for example)
et al.	= et alii (and other peoples)
etc.	= et cetera (and other similar things)
Fig	= Figure
h	= hour
min	= minute
sec	= second
L	= liter
ml	= milliliter
µl	= microliter
kg	= kilogram
g	= gram
mg	= miligram
mm	= millimeter
cm	= centimeter
M	= molar
mM	= milimolar
mol	= mole
nmol	= nanomole
nm	= nanometer
mA	= miliampare
α	= alpha
β	= beta
γ	= gramma
C. asiatica	= *Centella asiatica*
AS	= asiaticoside
TECA	= titrated extract of centella asiatica
rpm	= round per minitue

LIST OF ABBREVIATIONS (CONTINUE)

TBARS	= thiobarbituric acid reactive substance
GSH	= glutathione
GSH-Px	= glutathione peroxidase
NADPH	= nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
BSA	= bovine serum albumin
i.p.	= intraperitonium
SEM	= standard error of mean
DTNB	= 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid
5-SSA	= 5-sulfosalicylic acid
EDTA	= ethylenediaminetetraacetic acid
SDS	= sodium dodecyl sulfate
MDA	= malondialdehyde
AD	= Alzheimer's disease
APP	= beta-amyloid precursor protein
CNS	= central nervous system
NFTs	= neurofibrillary tangles
Aβ	= beta-amyloid peptide
APOE	= apolipoprotein E
PS	= presenilin
ROS	= reactive oxygen species
OS	= oxidative stress
SOD	= superoxide dismutase
CAT	= catalase
RAGE	= receptor for advanced glycation end products
NF-kB	= nuclear transcription factor kB
i.c.v.	= intracerebroventricular
USA	= The United States of America