



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีและเนื้อเยื่อที่ใช้ตรวจกิจกรรมของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ตรวจกิจกรรมของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส

1. Phosphate buffer saline (PBS; 1 M)

| | | |
|------------------------------------|------|-----------|
| - NaCl | 8 | กรัม |
| - KCl | 200 | มิลลิกรัม |
| - Na ₂ HPO ₄ | 1.44 | กรัม |
| - KH ₂ PO ₄ | 240 | มิลลิกรัม |
| - เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร | | |

ถ้าต้องการปรับค่า pH ให้ใช้ NaOH หรือ HCl 0.1 N

2. DTNB (5, 5' – Dithiobis (2- nitrobenzoic acid) 0.2 mM ใน 0.1 M PBS

- 5, 5' – Dithiobis (2- nitrobenzoic acid) 0.0079 กรัม
- PBS 100 ml

* เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง
ควรเตรียมใหม่ทุกๆ 30 วัน

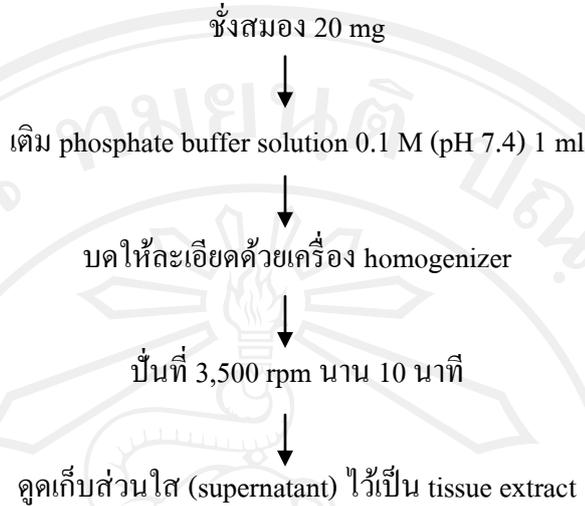
3. Acetylthiocholine Iodide (ATChI) หรือ Butyrylthiocholine chloride (BuTChCl) 0.75 mM

- ATChI หรือ BuTChCl 0.0225 กรัม
- น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร

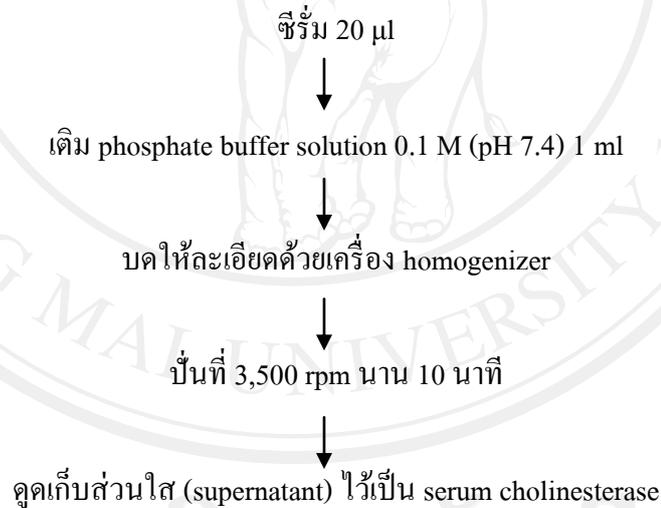
* เก็บไว้ในหลอด eppendorf 1.5 ml ที่ -200C
ควรเตรียมใหม่ทุกๆ 2 สัปดาห์

การเตรียมเนื้อเยื่อสมอง ซีรัมและเม็ดเลือดแดงสำหรับตรวจกิจกรรมของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส

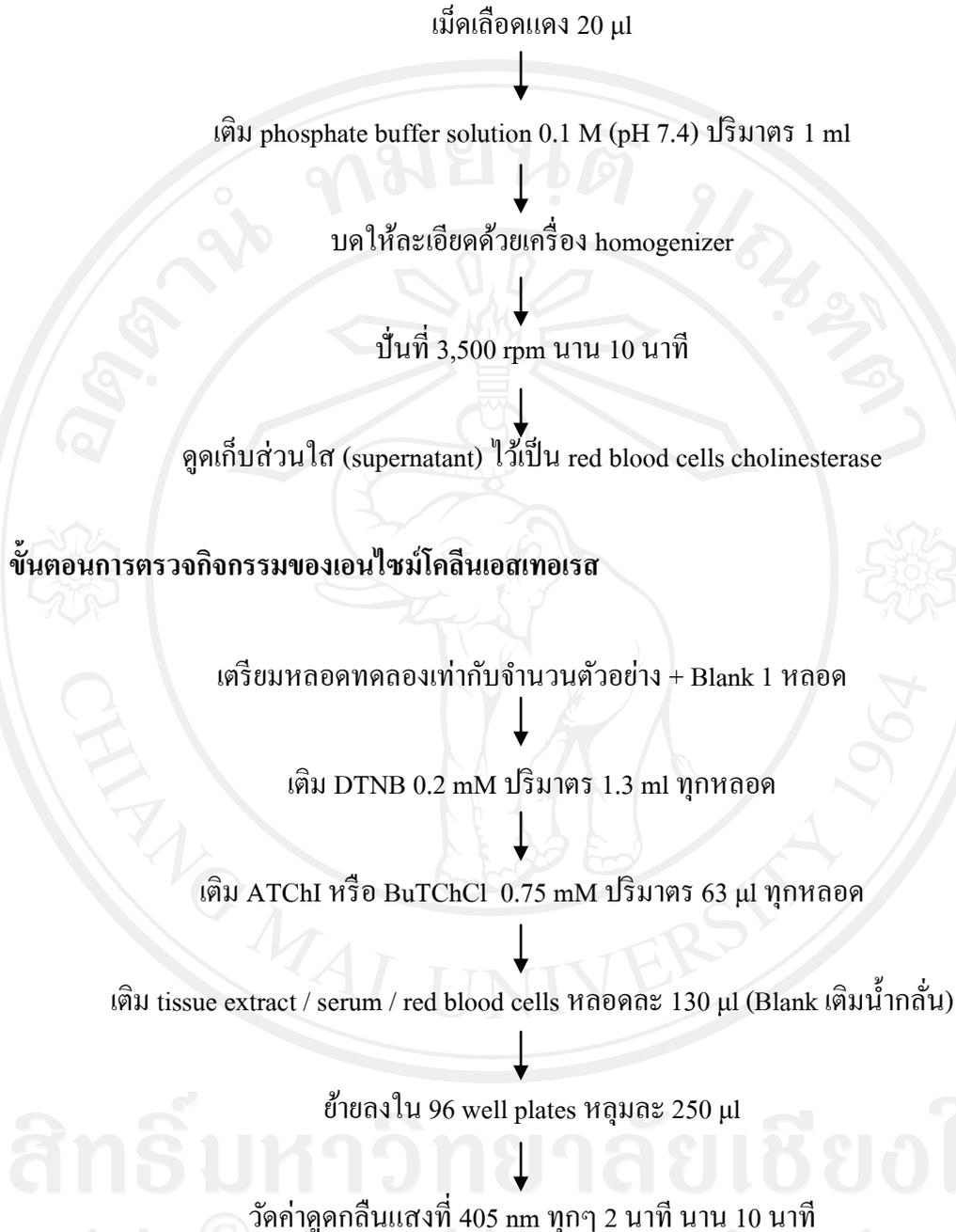
1. การเตรียมเนื้อเยื่อสมอง



2. การเตรียมซีรัม

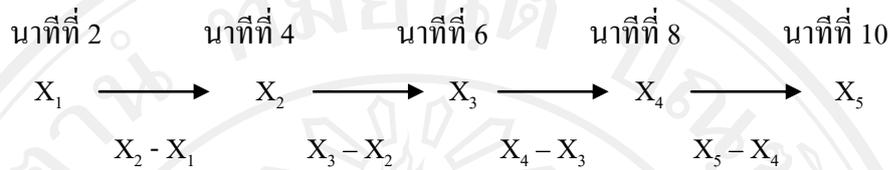


3. การเตรียมเม็ดเลือดแดง



การคำนวณการเปลี่ยนแปลงค่าดูดกลืนแสง

คำนวณค่าเฉลี่ยที่ลดลงของกิจกรรมของ ChE/นาที



$$\text{ค่าเฉลี่ยของกิจกรรม ChE/2 นาที} = \frac{(X_2 - X_1) + (X_3 - X_2) + (X_4 - X_3) + (X_5 - X_4)}{4}$$

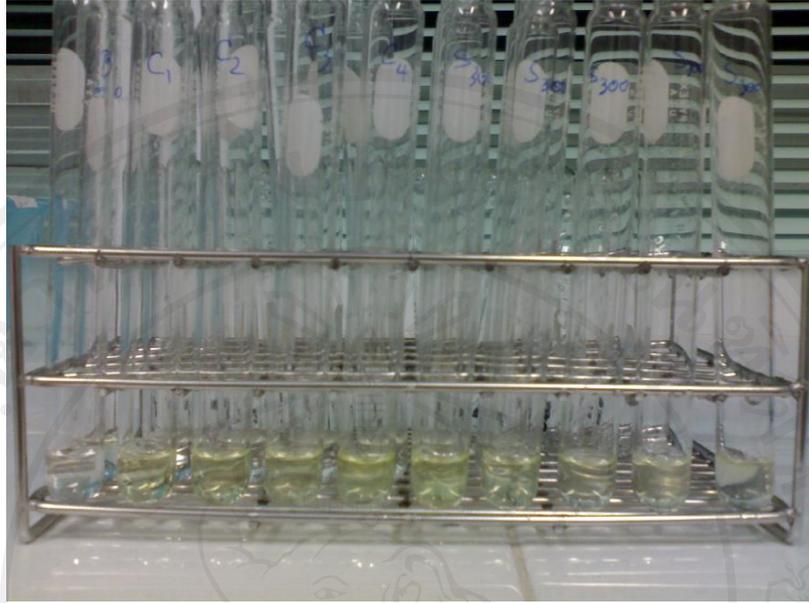
$$\text{ค่าเฉลี่ยของกิจกรรม ChE/นาที} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยที่ลดลงของกิจกรรม/2 นาที}}{2}$$

การคำนวณค่ากิจกรรมของ ChE

$$\text{อัตราการเกิดปฏิกิริยา (R)} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของกิจกรรม ChE/นาที}}{1.36 \times 10^4} \times \frac{1}{20(130/1,300+130+63)}$$

| | | |
|--------------------|-----|---|
| เมื่อ 20 | คือ | น้ำหนักสมอง 20 mg (serum 20 μ l) |
| 130 | คือ | Tissue extract /serum/ red blood cell ChE 130 μ l |
| 1300 | คือ | PBS 1300 μ l |
| 63 | คือ | ATChI หรือ BuTChCl 63 μ l |
| 1.36×10^4 | คือ | ค่าคงที่ |

และ R คือ อัตราการเกิดปฏิกิริยาซึ่งมีหน่วยเป็น mole substrate hydrolyzed/min/mg tissue หรือ μ l serum



ภาพ 30 แสดงการเกิดปฏิกิริยาจากการทดสอบกิจกรรมของ ChE

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

การทำสไลด์เนื้อเยื่อตับ ไต และสมอง

การเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อตับ ไต และสมอง

ตัวอย่างเนื้อเยื่อตับ ไต และสมอง ที่ล้างด้วย NaCl 0.85%

↓
แช่ใน Bouin's fixative นาน 24 ชม

↓
แช่ใน alcohol 70, 85, 95% และ absolute alcohol ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง
(แต่ละครั้งแช่ไว้นาน 2 ชม)

↓
แช่ใน absolute alcohol : xylene ความเข้มข้น 2:1, 1:1 และ 1: 2 ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง
(แต่ละครั้งแช่ไว้นาน 2 ชม)

↓
แช่ใน xylene นาน 2 ชม (2 ครั้ง)

↓
แช่ใน xylene : paraffin ความเข้มข้น 2:1, 1:1 และ 1: 2 แต่ละความเข้มข้นแช่ไว้นาน 2 ชม

↓
แช่ใน paraffin บริสุทธิ์ 3 ครั้งๆ ละ 2 ชม

↓
ฝังเนื้อเยื่อตัวอย่างไว้ใน paraffin บริสุทธิ์ ปล่อยให้แข็งตัว

↓
นำ paraffin block เนื้อเยื่อตัวอย่าง มาเหลาและตัดด้วยเครื่อง rotary microtome หน้า 6 µm

↓
วาง tissue section ลงบนกระจกสไลด์ ตากให้แห้ง เก็บใส่กล่องรอการย้อมสี

การเตรียมสีย้อม

1. การเตรียมสี Harris's Hematoxyline

| | | |
|---------------------------|-------|------|
| Hematoxylin crystals | 5 | กรัม |
| Absolute alcohol | 50 | มล |
| Ammonium / Potassium alum | 100 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มล |
| Mercuric oxide red | 2.5 | กรัม |

ละลาย hematoxyline ใน absolute alcohol จากนั้นละลาย alum ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนช่วย จากนั้นนำสารละลายทั้งสองมาผสมกัน นำไปต้มใหม่โดยคนตลอดเวลา ยกออกจากความร้อนแล้วค่อยๆ เติม mercuric oxide ลงไป แล้วยกกลับไปให้ความร้อนใหม่ เคี่ยวจนเดือดหรือได้สีของสารละลายเป็นสีม่วงเข้ม หยุดให้ความร้อนแล้วรีบทำให้เย็นโดยแช่ลงในอ่างน้ำ ทิ้งไว้ให้เย็น เก็บใส่ขวดแก้วสีชา ก่อนใช้เติม acetic acid เข้มข้น 2-4 มล ต่อสี 100 มล (ก่อนนำไปย้อมต้องกรองก่อน)

2. การเตรียมสี Eosin

2.1 เตรียม 1% Stock Alcoholic Eosin

| | | |
|----------|----|------|
| Eosin Y | 1 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 20 | มล |

ละลาย Eosin Y กับน้ำกลั่นแล้วเติม

| | | |
|-------------|----|----|
| Alcohol 95% | 80 | มล |
|-------------|----|----|

2.2 เตรียม Eosin Working Solution

| | | |
|--------------------------------|---|------|
| ละลาย 1% Stock Alcoholic Eosin | 1 | ส่วน |
| Alcohol 80% | 3 | ส่วน |

ก่อนใช้เติม conc. acetic acid 1-1.5 มล ต่อสี 100 มล

การย้อมสีเนื้อเยื่อ

1. Rehydration

นำสไลด์เนื้อเยื่อจุ่มลงใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที



จุ่มลงใน absolute alcohol, alcohol 95%, alcohol 85% และ alcohol 70%

ความเข้มข้นละ 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที



จุ่มลงในน้ำกลั่น 5 นาที

2. Staining

ย้อมเนื้อเยื่อที่ล้างด้วยน้ำกลั่นในสี hematoxyline นาน 5-10 นาที



ล้างด้วยน้ำประปาไหลนาน 5-10 นาที



จุ่มลงใน alcohol 70% นาน 5 นาที



ย้อมด้วยสี Eosin นาน 3-5 นาที

3. Dehydration

นำสไลด์ที่ย้อมสีแล้วจุ่มลงใน alcohol 70, 80 และ 95 % อย่างรวดเร็ว



จุ่มลงใน absolute alcohol 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

4. Clearing and Mounting

นำสไลด์ที่ได้จากข้อ 3. จุ่มลงใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที



Mount ด้วย Permount



ตากสไลด์ให้แห้ง แล้วเก็บใส่กล่องเก็บสไลด์

ภาคผนวก ค

การทดสอบทางสถิติของค่าชีวเคมีในเลือด

ค่าเคมีคลินิก

ตาราง 6 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของค่า AST ในซีรัมหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรากหนอน ตายหากชนิด *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ขนาด 300 และ 500 mg/kg BW เป็นเวลา 45 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น

ANOVA

| AST | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|------|------|
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | 1274.056 | 4 | 318.514 | .272 | .893 |
| Within Groups | 22273.902 | 19 | 1172.311 | | |
| Total | 23547.957 | 23 | | | |

ค่า Sig. มากกว่า 0.05 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตาราง 7 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของค่า ALT ในซีรัมหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรากหนอน ตายหยากชนิด *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ขนาด 300 และ 500 mg/kg BW เป็นเวลา 45 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น

| ANOVA | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| ALP | | | | | |
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | 115.292 | 4 | 28.823 | 2.427 | .084 |
| Within Groups | 225.667 | 19 | 11.877 | | |
| Total | 340.958 | 23 | | | |

ค่า Sig. มากกว่า 0.05 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตาราง 8 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของค่า ALP ในซีรัมหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรากหนอน ตายหยากชนิด *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ขนาด 300 และ 500 mg/kg BW เป็นเวลา 45 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น

| ANOVA | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| ALP | | | | | |
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | 1020.017 | 4 | 255.004 | 1.782 | .172 |
| Within Groups | 2861.983 | 20 | 143.099 | | |
| Total | 3882.000 | 24 | | | |

ค่า Sig. มากกว่า 0.05 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตาราง 9 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของค่า BUN ในซีรัมหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ขนาด 300 และ 500 mg/kg BW เป็นเวลา 45 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น

| ANOVA | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| BUN | | | | | |
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | 49.102 | 4 | 12.276 | 1.110 | .379 |
| Within Groups | 221.220 | 20 | 11.061 | | |
| Total | 270.322 | 24 | | | |

ค่า Sig. มากกว่า 0.05 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตาราง 10 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของค่า creatinine ในซีรัมหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ขนาด 300 และ 500 mg/kg BW เป็นเวลา 45 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น

| ANOVA | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Creatinine | | | | | |
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | .015 | 4 | .004 | 2.091 | .118 |
| Within Groups | .037 | 21 | .002 | | |
| Total | .052 | 25 | | | |

ค่า Sig. มากกว่า 0.05 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ChE

1. กิจกรรมของ AChE

ตาราง 11 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของค่า AChE ใน cerebral cortex ของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ขนาด 300 และ 500 mg/kg BW เป็นเวลา 45 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น

| Activity | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | .534 | 4 | .133 | 5.386 | .005 |
| Within Groups | .471 | 19 | .025 | | |
| Total | 1.004 | 23 | | | |

ค่า Sig. น้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ

ตาราง 12 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของค่า AChE ใน hippocampus ของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ขนาด 300 และ 500 mg/kg BW เป็นเวลา 45 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น

| Activity | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | .442 | 4 | .111 | 3.799 | .025 |
| Within Groups | .437 | 15 | .029 | | |
| Total | .879 | 19 | | | |

ค่า Sig. น้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ

ตาราง 13 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของค่า AChE ในเม็ดเลือดแดงของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ขนาด 300 และ 500 mg/kg BW เป็นเวลา 45 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น

| ANOVA | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Activity | | | | | |
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | .040 | 4 | .010 | 10.444 | .000 |
| Within Groups | .015 | 16 | .001 | | |
| Total | .055 | 20 | | | |

ค่า Sig. น้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ

ตาราง 14 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของค่า AChE ในซีรัมของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ขนาด 300 และ 500 mg/kg BW เป็นเวลา 45 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น

| ANOVA | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|------|------|
| Activity | | | | | |
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | .004 | 4 | .001 | .981 | .438 |
| Within Groups | .023 | 22 | .001 | | |
| Total | .027 | 26 | | | |

ค่า Sig. มากกว่า 0.05 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

2. กิจกรรมของ BuChE

ตาราง 15 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของค่า BuChE ใน cerebral cortex ของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ขนาด 300 และ 500 mg/kg BW เป็นเวลา 45 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น

| Activity | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | .002 | 4 | .000 | 6.247 | .002 |
| Within Groups | .001 | 21 | .000 | | |
| Total | .003 | 25 | | | |

ค่า Sig. น้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ

ตาราง 16 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของค่า BuChE ใน hippocampus ของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ขนาด 300 และ 500 mg/kgBW เป็นเวลา 45 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น

| Activity | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | .002 | 4 | .001 | 6.035 | .005 |
| Within Groups | .001 | 14 | .000 | | |
| Total | .003 | 18 | | | |

ค่า Sig. น้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ

ตาราง 17 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของค่า BuChE ในเม็ดเลือดแดงของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ขนาด 300 และ 500 mg/kgBW เป็นเวลา 45 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น

ANOVA

| Activity | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | .007 | 2 | .004 | 12.956 | .001 |
| Within Groups | .003 | 12 | .000 | | |
| Total | .010 | 14 | | | |

ค่า Sig. น้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ

ตาราง 18 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของค่า BuChE ในซีรัมของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ขนาด 300 และ 500 mg/kg BW เป็นเวลา 45 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น

ANOVA

| Activity | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | .000 | 2 | .000 | 1.328 | .304 |
| Within Groups | .002 | 11 | .000 | | |
| Total | .002 | 13 | | | |

ค่า Sig. มากกว่า 0.05 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ประวัติผู้เขียน

| | |
|-------------------|---|
| ชื่อ-สกุล | นางสาววรรัตน์ บุญเจริญ |
| วัน เดือน ปี เกิด | วันที่ 16 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2529 |
| ประวัติการศึกษา | |
| ปีการศึกษา 2541 | สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาจากโรงเรียนอนุบาลเวียงชัย |
| ปีการศึกษา 2544 | สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นจากโรงเรียนคำรณราษฎร์ สงเคราะห์ จังหวัดเชียงราย |
| ปีการศึกษา 2547 | สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนสามัคคีวิทยาคม จังหวัดเชียงราย |
| ปีการศึกษา 2551 | สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สัตววิทยา) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |

Acetylcholinesterase Inhibitory Effect of *Pseuderanthemum palatiferum* in Albino Rats

Wararut Buncharoen, Supap Saenphet, Kanokporn Saenphet*

Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University,
Muang, Chiang Mai, 50200 Thailand

Abstract

Alzheimer's disease is commonly treated by Acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) drug therapy. Because of the varying side effects of Alzheimer's drugs, interest in the exploitation of medicinal plants as an alternative to AChEIs has greatly increased in recent years. This study aimed to determine whether the aqueous extract from the medicinal plant, *Pseuderanthemum palatiferum*, could inhibit AChE in normal rats. Male albino rats were given an oral extract at the doses of 0.3, 0.7 and 1.0 g/kg BW for 30 days. These were compared to controls which received only distilled water. AChE activity was then evaluated from the brains, serum, and red blood cells of the rats. The results showed that only AChE activity in the hippocampus was significantly inhibited by the extract at the doses of 0.7 and 1.0 g/kg BW ($p < 0.05$). However, AChE activity in the serum and red blood cells of treated rats showed no significant differences from that of controls. These results suggest that the extract could reduce the synthesis of AChE in the rat's brain. The marked inhibitory effect of aqueous extract from *P. palatiferum* against AChE indicates the potential of this plant in the treatment of Alzheimer's disease.

Key words : Acetylcholinesterase, Inhibition, *Pseuderanthemum palatiferum*, Rat, Brain, Blood

Introduction

Acetylcholine (ACh) is an important neurotransmitter of the brain cholinergic system involved in memory formation. ACh is hydrolyzed by acetylcholinesterase (AChE) enzyme at the central and peripheral cholinergic synapses into its two component parts, acetic acid and choline [3,19]. Loss of ACh activity in the brain correlates with the severity of Alzheimer's disease (AD), the common cause of dementia in elderly people worldwide [13]. AChE inhibitor drugs have been designed to inhibit the breakdown of ACh in the brain and thus to increase cholinergic neurotransmitter activity in AD patients. Due to the high costs and the varying side effects of the synthetic drugs, interest in the exploitation of medicinal plants as an alternative AChE inhibitor has greatly increased in the recent years. A number of researches have been conducted to evaluate the AChE inhibitory activity of various plant species, for instance, *Tabernaemontana divaricata*, Green tea, *Fumaria* sp., *Vaccinium angustifolium*, *Corydalis* spp., *Lavandula pedunculata*, *Mentha suaveolens* and *Hypericum*

undulatum [1,8,11,16,20-21]. Nevertheless, until now no plant species has scored full marks for its potential to replace the AD drugs. In the study reported here we were interested in determining the AChE inhibitory effect of *Pseuderanthemum palatiferum*, a native Vietnam plant which is popularly used in Thailand for curing various ailments. The reputed medicinal properties of *P. palatiferum* includes wound healing, and the treatment of trauma, stomachache, colitis, high blood pressure, nephritis and diarrhea [9]. In view of its broad spectrum of reported therapeutic properties, but with only limited scientific reports on the effective activity of this plant, we aimed to determine whether or not the extract from *P. palatiferum* could inhibit AChE activity in albino rats. The results obtained from our study might facilitate the development of a new herbal medicine for AD treatment.

Materials and Methods

Plant materials and extraction

Fresh leaves of *P. palatiferum* were collected from Chiang Mai Province, Chiang Mai, Thailand, during the summer of 2009. They were cut into small pieces

* E-mail: k_saenphet@yahoo.com

and extracted with distilled water to yield concentrations of 50, 100 and 150 mg/ml, respectively. The aqueous extracts were filtered before being used.

Animals

Male albino rats (*Rattus Norvegicus*), 4-5 weeks of age, with weights between 130 - 150 g, were purchased from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Salaya campus, Thailand. The animals were kept in cages with five animals per group. They had access to water and a standard diet (C.P. 082). The room temperature was controlled at 24 - 26 °C in a 12 hour light/dark cycle. All procedures involving the animals were conducted with strict adherence to guidelines and procedures reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Biology Department, Faculty of Sciences, Chiang Mai University, permission number Re 004/09.

Animal treatments

The rats were divided into 4 groups (n = 5). The animals in each group were orally given the extracts of *P. palatiferum* at concentrations of 50, 100 and 150 mg/ml/day which were comparable to doses of 0.3, 0.7 and 1.0 g/kg.BW, respectively. Control rats received only distilled water. After the 30 days of the treatment period, the animals were sacrificed and blood samples were collected by cardiac puncture technique. The brain was immediately removed and

the hippocampus was dissected and stored in a normal saline solution. All processes were conducted at -4 °C.

Serum and tissue preparation

Blood samples were centrifuged at 3,000 rpm for 10 min at room temperature. Sera and red blood cells (RBC) were separately stored at - 40°C until further use for AChE assay.

Homogenated samples of hippocampus or RBC and serum were mixed in a 0.1 M phosphate buffer solution (~20 w/v or v/v), pH 8.0 at - 4°C and centrifuged at 3,500 rpm for 10 min. The clear supernatant was stored at - 40°C for the examination of AChE activity within 24 hours.

Acetylcholinesterase assay

The AChE activity was measured by following the increase of yellow color produced by the reaction between the substrate (acetylthiocholine) and 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic) acid (DTNB). The method for determining AChE activity was modified from [9]. Briefly, 20 µl of samples were mixed with 1,300 µl of 0.2 mM DTNB and 63 µl of 0.75 mM acetylthiocholine iodide. 250 µl of the mixed solutions were added to 96 well plates and a kinetic reaction of the mixture was measured by ELISA reader (GDV, DV 990BV4, Italy) at 405 nm for 10 min with readouts taken every 2 min. The rate of AChE activity was calculated using the following formula:

$$R = \frac{\text{changed in absorbance/min}}{1.36 \times 10^4} \times \frac{1}{20(130/1300+130+63)}$$

where R is the rate of AChE activity in moles of substrate hydrolyzed/minute/g of tissue or ml serum, 1.36 x 10⁴ is constant of activity, 20 is the weight of samples and 130, 1300 and 63 are the values of tissue extracts, DTNB and ATChI, respectively. AChE inhibitory effect was expressed as a percentage of AChE activity in comparison to control values.

Statistical analysis

For statistical analysis, data were analyzed by one - way ANOVA by SPSS statistical software version 16 for windows. In all the tests, a level of p value less than 0.05 was considered of statistical significance.

Results

The results of AChE activity in hippocampus, serum and RBC of male albino rats treated with *P. palatiferum* extract at the doses of 0.3, 0.7 and 1.0 g/kg BW for 30 days are presented in Fig. 1, 2 and 3. The values of AChE activity significantly decreased at the doses of 0.7 and 1.0 g/kg BW (p ≤ 0.05) only in the hippocampus. Nevertheless, in serum and RBC, there were no significant differences between the extracts treated groups and the control group.

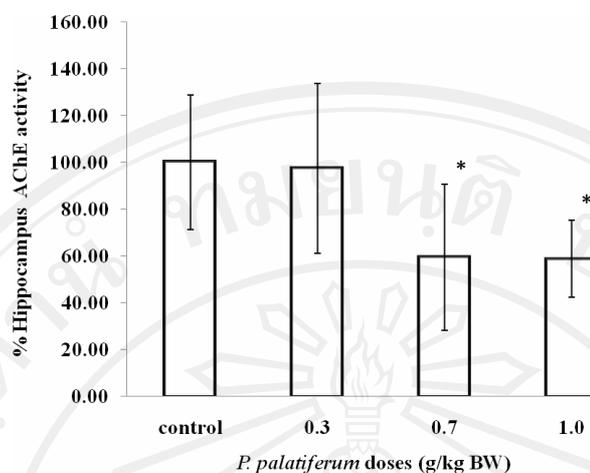


Figure 1. Hippocampus acetylcholinesterase activity of rats treated with *P. palatiferum* extract at doses of 0.3, 0.7 and 1.0 g/kg BW for 30 days as compared to the control group.

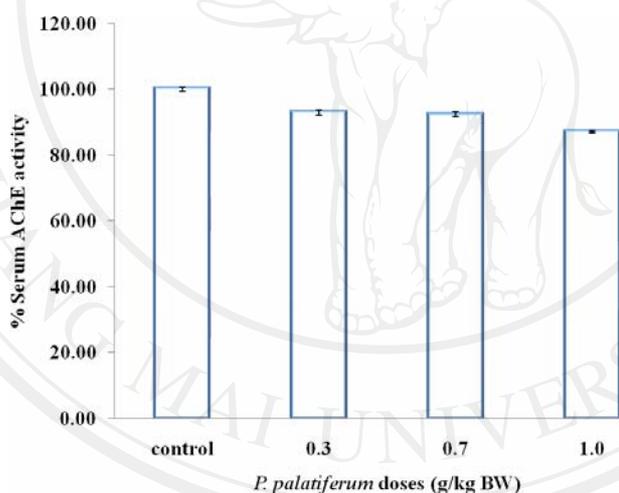


Figure 2. Serum acetylcholinesterase activity of rats treated with *P. palatiferum* extract at doses of 0.3, 0.7 and 1.0 g/kg BW for 30 days as compared to the control group.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright © by Chiang Mai University
 All rights reserved

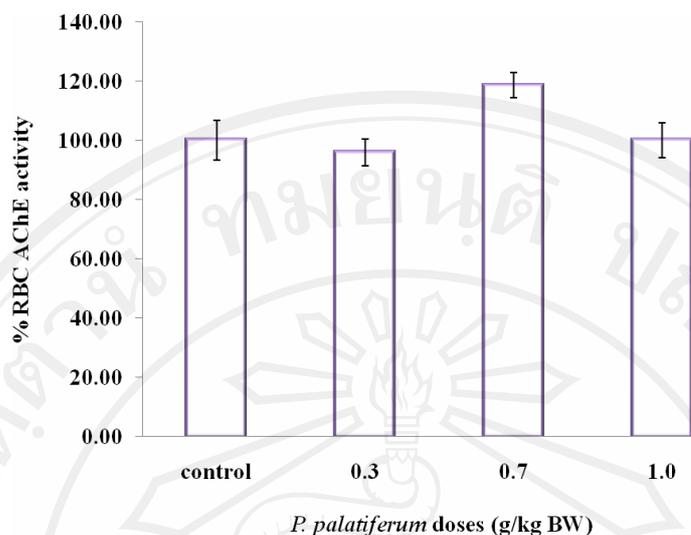


Figure 3. Acetylcholinesterase activity of red blood cells in rats treated with *P. palatiferum* extract at doses of 0.3, 0.7 and 1.0 g/kg BW for 30 days as compared to the control group.

Discussion

The ability of *P. palatiferum* extracts to inhibit AChE activity in rats hippocampus, serum and RBC was assessed. It was found that oral administration of the extract at doses of 0.7 and 1.0 g/kg BW for 30 days could inhibit AChE activity in the hippocampus (Fig. 1). The AChE enzyme, which resembles a globular subunit is responsible for hydrolyzing ACh at the cholinergic synaptic clefts [2]. AChE was found in brain tissue, muscle, plasma and RBC [4,6]. Previously reported research reported on AD patients has shown that the reduction of neurons in the hippocampus and cerebral cortex resulted in a low level of ACh [14], while AChE levels remained constant. The inhibition of AChE activity, thus, helped to slow down the destruction rate of ACh, and this concept was used to develop of the drugs for AD patients [18]. The AChE inhibitory effect of *P. palatiferum* extracts found in the hippocampus, the important site for memory and recognition, of rats may indicate the usefulness of this plant as an alternative AD drug.

The AChE activity in the serum and RBC of treated rat with *P. palatiferum* extract were not different from the control group (Fig 2,3). This indifference might be explained by the following 3 reasons; 1). The level of AChE in RBC might be less than that in the brain

tissue where AChE actively breakdown ACh, an essential neurotransmitter in cholinergic system [13,21]. The method employed in this study was highly specific for AChE activity. Nevertheless, the main type of cholinesterase (ChE) in serum is in the form of butyrylcholinesterase (BuChE) [2,5,22]. It was reported that average adult human plasma contains 3300 ng of BuChE/ml and 8 ng of AChE/ml [5]. The low activity of AChE detected in serum, thus, was not surprising., 3). *P. palatiferum* extract may inhibit only the certain type of AChE. The study of [7] and [15] revealed that AChE type found in the brain was G1 AChE-S, while that found in RBC was G1 AChE-E. The results of our study demonstrated that the extract inhibited only G1 AChE-S in the hippocampus, but not G1 AChE-E in RBC. The low activity of AChE in the hippocampus indicated that the *P. palatiferum* extract specifically inhibit the synthesis of AChE in the brain.

In recent years, the study of medicinal plants as an alternative AChE inhibitor has greatly increased. The ability of *P. palatiferum* extracts to inhibit AChE activity in the brain may come from the chemical elements contained in the leaves of this plant. It is currently reported that several plants species contained flavonoids, such as tiliroside, 3-methoxy quercetin, quercitrin and quercetin and those flavonoids exhibited AChE inhibitory activity [16]. The results

of our study may shed new light on alternative herbal products for AD treatment. Further investigation on the chemical composition of *P. palatiferum* involved in AChE inhibition is needed.

Conclusion

P. palatiferum extracts can inhibit AChE activity in the hippocampus, but not in serum and RBCs. Considering its potent AChE inhibitory effect, this plant species may be of great interest for future studies in the treatment of Alzheimer's Disease.

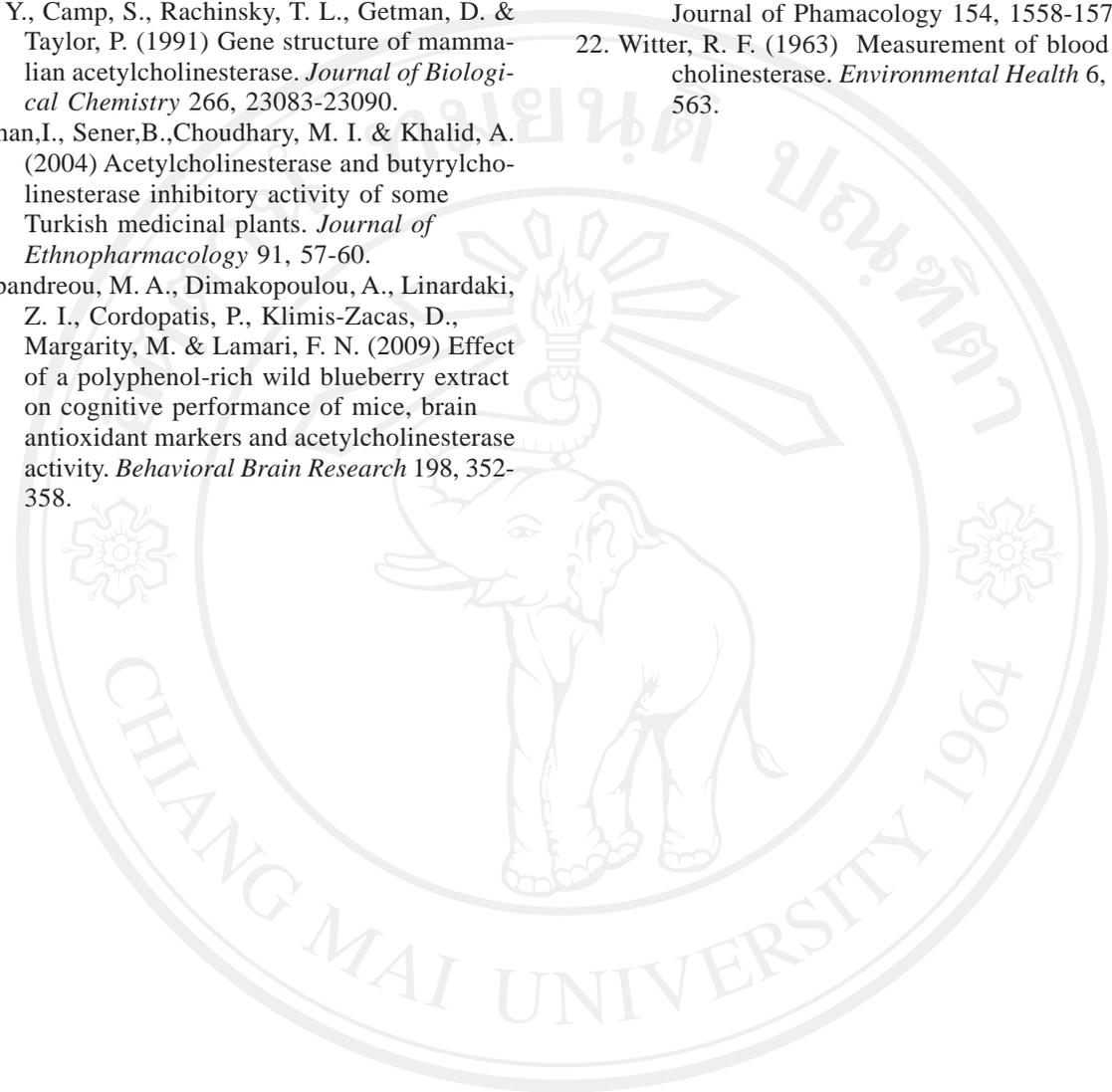
Acknowledgements

The authors wish to thank Mr. Suluk Wutteerapol for his assistance through the consultation in laboratory techniques. Our sincere thanks is also extended to the Graduate School, Chiang Mai University for its financial support.

References

1. Adersen, A., Gauguin, B., Gudiksen, L. & Jäger, A. K. (2006) Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 104, 418-422.
2. Ballard, C. (2008) *Importance of Pharmacology & Pharmacogenetics in clinical management of dementias*. The 45th Annual Meeting of The Neurological Society of Thailand and Novartis [Online], Available: <http://www.medicthai.com/picture/news/153006A4novatis.pdf>. [2009, November 13]
3. Block, J. H. & Beale, J. M. (2004) *Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry II*. In: *Cholinergic Drug and Related Agents*. Cocolas, G. H. & Cuter, S. J. United state, LippincottWilliams & Wilkins.
4. Brimijoin, S. (1983) Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics. *Progress in Neurobiology* 21, 291-322.
5. Chatonnet, A. & Lockridge, O. (1989) Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemical Journal* 260, 625-634.
6. Chattipakorn, S., Pongpanparadorn, A., Pratchayasakul, W., Pongchidacha, A., Ingkaninan, K. & Chattipakorn, N. (2007) *Tabernaemontana divaricata* extract inhibits neuronal acetylcholinesterase activity in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 61-68.
7. Darreh-Shori, T., Hellström-Lindahl, E., Flores-Flores, C., Guan, Z. Z., Soreq, H. & Nordberg, A. (2004) Long-lasting acetylcholinesterase splice variations in anticholinesterase-treated Alzheimer's disease patients. *Journal of Neurochemistry* 88, 1102-1113.
8. Dieu, H. K., Loc, C. B., Yamasaki, S. & Hirata, Y. (2005) The Ethnobotanical and Botanical study on *Pseuderanthemum palatiferum* as a new medicinal plant in the Mekong Delta of Vietnam. *Japan Agricultural Research Quarterly* 39, 191-196.
9. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. & Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.
10. Ferrerira, A., Proenc, C., Serralheiro, M. L. M. & Arajo, M. E. M. (2006) The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology* 108, 31-37.
11. Fleming, W. J. (1981) Recovery of brain and plasma cholinesterase activities in ducklings exposed to organophosphorus pesticides. *Environmental and Toxicology* 10, 215-229.
12. Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M. & Wilcock, G.K. (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 66, 137-147.
13. Hyde, T.M. (2001) Cholinergic systems and schizophrenia: primary pathology or epiphenomena? *Journal of Chemical Neuroanatomy* 22, 53-63.
14. Jung, M. & Park, M. (2007) Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules* 12, 2130-2139.
15. Kaufer, D., Friedman, A., Seidman, S. & Soreq, H. (1998) Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature* 393, 373-377.
16. Kaur, T., Pathak, C. M., Pandhi, P. & Khanduja, K. L. (2008) Effect of green tea extract on learning, memory, behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats. *Brain and Cognition* 67, 25-30.
17. Lanctôt, K. L., Herrmann, N., Yau, K. K., Khan, L. R., Liu, B. A., LouLou, M. M. & Einarson, T. R. (2003) Efficacy and safety of cholinest-

- erase inhibitors in Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Canadian Medical Association Journal* 169, 557-564.
18. Li, Y., Camp, S., Rachinsky, T. L., Getman, D. & Taylor, P. (1991) Gene structure of mammalian acetylcholinesterase. *Journal of Biological Chemistry* 266, 23083-23090.
19. Orhan, I., Sener, B., Choudhary, M. I. & Khalid, A. (2004) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 91, 57-60.
20. Papandreou, M. A., Dimakopoulou, A., Linardaki, Z. I., Cordopatis, P., Klimis-Zacas, D., Margariti, M. & Lamari, F. N. (2009) Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. *Behavioral Brain Research* 198, 352-358.
21. Wessler, I. & Kirkpatrick, C. J. (2008) Acetylcholinesterase beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British Journal of Pharmacology* 154, 1558-1571.
22. Witter, R. F. (1963) Measurement of blood cholinesterase. *Environmental Health* 6, 537-563.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กิจกรรมของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสและเนื้อเยื่อวิทยาสมองของหนูขาวที่ได้รับสารสกัด
เอทานอลจากรากหนอนตายหยาก (*Stemona aphylla* Craib.)

**Cholinesterase Activity and Brain Histology of Rats Treated with Ethanolic Extract
from the Root of *Stemona aphylla* Craib.**

วรารัตน์ บุญเจริญ, กนกพร แสนเพชร, สุภาพ แสนเพชร

Wararut Buncharoen, Kanokporn Saenphet, Supap Saenphet

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Muang Chiang Mai, Chiang Mai 50200

E-mail: p.paleel@hotmail.com

บทคัดย่อ

สารกำจัดแมลงสังเคราะห์ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางทั่วโลก และเนื่องจากสารเหล่านี้ก่อให้เกิดปัญหาที่รุนแรงต่อสิ่งแวดล้อม สารกำจัดแมลงจากพืชจึงเป็นทางเลือกในการกำจัดแมลงแทนสารเคมีกำจัดแมลง ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจสอบผลของสารสกัดเอทานอลจากรากหนอนตายหยาก (*Stemona aphylla* Craib.) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสและเนื้อเยื่อวิทยาของสมองหนูขาว โดยทำการป้อนสารสกัดหนอนตายหยากขนาด 300 และ 500 มล/กก น้ำหนักตัว แก่หนูขาวเพศผู้เป็นเวลา 45 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับเพียงน้ำกลั่น เมื่อครบกำหนดทำการตรวจสอบกิจกรรมโคลีนเอสเทอเรสและเนื้อเยื่อวิทยาของสมอง ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าหนูที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 มล/กก น้ำหนักตัว มีกิจกรรมของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและนิวโรโทรฟินโคลีนเอสเทอเรสในสมองส่วนซีรีบรัม คอร์เทกซ์ และฮิปโปแคมปัสที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม กิจกรรมของโคลีนเอสเทอเรสในสมองเกือบทุกส่วนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ยกเว้นกิจกรรมของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในฮิปโปแคมปัสซึ่งเพิ่มสูงขึ้นแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในทางตรงกันข้าม กิจกรรมของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและนิวโรโทรฟินโคลีนเอสเทอเรสในเม็ดเลือดแดงของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญกว่ากลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของกิจกรรมโคลีนเอสเทอเรสในซีรัมระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ส่วนเนื้อเยื่อสมองส่วนซีรีบรัม คอร์เทกซ์และฮิปโปแคมปัสมีลักษณะที่ปกติเหมือนที่สังเกตพบในสมองของหนูกลุ่มควบคุม

คำสำคัญ: กิจกรรมของโคลีนเอสเทอเรส, หนอนตายหยาก, ฮิปโปแคมปัส, ซีรีบรัม คอร์เทกซ์

Abstract

Synthetic insecticides are widely used around the world. Since they caused serious problems to environment and human health, the plant-based insecticides have been proposed as the alternatives to chemical insecticides. In this study, we have examined the effects of ethanolic extract from the root of *Stemona aphylla* Craib. on cholinesterase activity and brain histology of albino rats. Male albino rats were orally administrated with *S. aphylla* extract at the doses of 300 and 500 mg/kg BW for 45 days. These were compared to controls which received only distilled water. Cholinesterase activity and brain histology were then investigated. Our results demonstrated that rats treated the extract at the dose of 500 mg/kgBW had higher AChE and BuChE activities in cerebral cortex and hippocampus than that of control rats. ChE activities in nearly all parts of the brain exhibited the significant difference from that of controls ($p < 0.05$), except AChE in the hippocampus that increase with the non-significantly different value. On the contrary, AChE and BuChE activities in RBC of treated rats in all groups significantly lower than those of controls ($p < 0.05$). However, no significant differences in serum ChE were observed between treated and control groups. Histologically, hippocampus and cerebral cortex of treated rats showed normal features as observed in control group.

Keywords: cholinesterase activity, *Stemona aphylla* Craib., hippocampus, cerebral cortex

1. Introduction

Synthetic insecticides are extensively used in agriculture, industry and household, mainly in developing countries^[1]. Although insecticides are effective against target species, they also have serious consequences on both environment and human health^[2-3]. Most insecticides act by poisoning the nervous system of insects, the link of nervous-system disorders in humans and insecticide exposure is, thus, possible. Histological damages of the brain and abnormal neuro-enzyme activity have been reported in laboratory animals treated with various types of insecticides such as endosulfan^[4], parathion, lindane^[5] and methomyl^[6]. In order to minimize chemical insecticide use and toxicity, significant research effort has been directed to exploring the potential of plant-derived products as bioinsecticide. Many plant species such as *Eupatorium odoratum* L., *Nicotiana tabacum* L.^[7], *Azadirachta indica* A. Juss.^[8], *Derris elliptica* Benth.^[9] and *Acorus Calamus*^[10] have been reported to have insecticidal properties. In Thailand, the root of *Stemona aphylla* Craib. (Stemonaceae), known in Thai as Non tai yak has long been used as a natural insecticide and its efficiency in killing pest insects has been scientifically proven^[11]. The insecticidal effect of *S. aphylla* is probably due to its the alkaloids constituents such as stemofuran, (2'S)-hydroxystemofoline and stilbostemin F^[12-13]. As natural products become increasingly being used by people worldwide, the development of product from *S. aphylla* as a natural insecticide alternative is of interest. Nevertheless, the safety evaluation of plant material is one of the key steps for the production of herbal products. This study, therefore, aimed to investigate the toxicity of the extract from the roots of *S. aphylla* on the central nervous system of rats by focusing on the alterations of cholinesterase activity and brain histology.

2. Objectives

To investigate the effect of ethanolic extract from the root of *Stemona aphylla* Craib. on cholinesterase activity and brain histology in albino rats.

3. Materials and Methods

3.1 Plant materials

Roots of *S. aphylla* were collected from Lampang Province, Thailand. The plant material was identified and authenticated by Mr. James F. Maxwell. A voucher specimen (number 09-111) was kept at CMU herbarium, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

3.2 Plant extraction

Roots of *S. aphylla* were washed with tap water, cut and dried in an oven (50 °C) to a constant weight. The dried roots were immersed in 95% ethanol for 3 days. The extract was then filtered to remove the residue and evaporated by vacuum rotary evaporator to obtain the crude ethanolic extract. The crude extract was then weighed to calculate the actual percentage yield. Finally, the ethanolic extract was suspended in distilled water as the required concentrations and used to for further experiments.

3.3 Animals

Male albino rats (*Rattus norvegicus*), 4-5 weeks of age, weighing between 100 - 120 g, were purchased from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Salaya campus, Thailand. The animals were housed in cages and had access to tap water and a standard diet (C. P. 082). The room temperature was controlled at 24 -26 °C in a 12 hour light/dark cycle. All procedures involving the animals were conducted with strict adherence to guidelines and procedures reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Biology Department, Faculty of Sciences, Chiang Mai University, permission number Re. 001/10.

3.4 Animal treatments

The rats were randomly divided into 3 groups (n = 8). The animals in each group were orally given the root extracts of *S. aphylla* at the doses of 300 and 500 mg/kg BW daily (1 ml/day), respectively. Control rats received only distilled water. The selected doses in this study were based on the used doses in chronic toxicity test of this plant which have been reported in previous study^[14]. After the 45 days of the treatment period, the animals were anaesthetized with ether and blood samples were collected by cardiac puncture technique. The brain was immediately removed and placed in cold normal saline solution. The cerebral cortex and hippocampus were divided into 2 parts,

the anterior part was stored at -4°C for the investigation of ChE activity while the posterior part was fixed in bouin's solution for histopathological examination.

3.5 Serum and tissue preparation

Blood samples were centrifuged at 3,000 rpm for 10 min at room temperature. Sera and red blood cells (RBC) were separately stored at -40°C until further use for ChE investigation. Homogenated samples of hippocampus, cerebral cortex, RBC and serum were mixed in a 0.1 M phosphate buffer solution (~ 20 w/v or v/v), pH 8.0 at -4°C and centrifuged at 3,500 rpm for 10 min. The clear supernatant was stored at -40°C for the examination of ChE activity within 24 hours.

3.6 Examination of cholinesterase activity

AChE and BuChE activities were measured by following the increase of yellow color produced by the reaction between the substrate (acetylthiocholine iodide or butyrylthiocholine chloride) and 5, 5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic) acid (DTNB). The method for determining ChE activity was modified from Ellman *et al.* (1961)^[15]. Briefly, 20 μl of samples were mixed with 1,300 μl of 0.2 mM DTNB and 63 μl of 0.75 mM acetylthiocholine iodide or butyrylthiocholine chloride. 250 μl of the mixed solutions were added to 96 well plates and a kinetic reaction of the mixture was measured by ELISA reader (GDV, DV 990BV4, Italy) at 405 nm for 10 min with readouts taken every 2 min. The rate of ChE activity was calculated using the following formula:

$$R = \frac{\text{changed in absorbance./minute}}{1.36 \times 10^4} \times \frac{1}{20\left(\frac{130}{1300} + 130+63\right)}$$

where R is the rate of ChE activity in micromoles of substrate hydrolyzed per minute and per milligram of tissue or milliliter of serum, 1.36×10^4 is constant of activity, 20 is the weight of samples and 130, 1300 and 63 are the values of tissue extracts, DTNB and thiocholine, respectively. ChE activity was expressed as mean and standard error in comparison to control values.

3.7 Histopathological examination

The fixed brains of rats were dehydrated with progressively increasing concentrations of ethanol. They were cleared in xylene and infiltrated in molten paraffin wax at 55°C . After that, they were embedded as a wax block. Paraffin sections

of 6 μm thickness were cut with the rotary microtome and placed on glass slides. Finally, the sections were stained with hematoxylin and eosin. The stained slides were examined using the light microscope where the photomicrographs of the tissue samples were recorded.

3.8 Statistical analysis

For statistical analysis, data were analyzed by one – way analysis of variance (ANOVA) using SPSS statistical software version 16 for windows. The results were expressed as mean \pm standard error. A level of *p* value less than 0.05 was considered to be significant.

4. Results

4.1 Cholinesterase activity

The percentage yield of ethanolic extract obtained from *S. aphylla* was 7.92 % (w/w). The results of cholinesterase activity in cerebral cortex, hippocampus, serum and RBC of rats treated with *S. aphylla* roots extract at the doses of 300 and 500 mg/kg BW for 45 days were shown in table 1 and 2. The values of AChE activity significantly increased in cerebral cortex of rats treated with the extract at the dose of 500 mg/kg BW while those in RBC significantly decreased in all tested groups ($p < 0.05$). Nevertheless, in hippocampus and serum, there were no significant differences between the treated and the control groups. BuChE activity significantly increased in cerebral cortex and hippocampus of rats treated with the extract at the dose of 500 mg/kg BW. In contrast, BuChE activities in RBC were significantly decreased in all treated groups. However, no significant differences in serum BuChE were observed between treated and control groups.

Table 1. AChE activity in rats treated with 300 and 500 mg/kg BW *S. aphylla* roots extract for 45 days as compared to control group.

| Organs | AChE activity ($\mu\text{mole}/\text{substrate hydrolyzed}/\text{min}/\text{mg}$ or ml of tissue) | | |
|-----------------|---|----------------------|-------------------|
| | Control | 300 mg/kg BW | 500 mg/kg BW |
| Cerebral Cortex | 0.62 ± 0.10^a | 0.71 ± 0.00^{ab} | 1.02 ± 0.30^b |
| Hippocampus | 0.68 ± 0.24^a | 0.82 ± 0.21^a | 1.15 ± 0.20^a |
| Serum | 0.23 ± 0.02^a | 0.22 ± 0.04^a | 0.22 ± 0.03^a |
| RBC | 0.18 ± 0.04^a | 0.06 ± 0.00^b | 0.08 ± 0.02^b |

Values are expressed as mean \pm SD.

Superscript letters (a, b and c) indicate statistically significant difference ($p < 0.05$) from one another in the same rows.

Table 2. BuChE activity in rats treated with 300 and 500 mg/kg BW *S. aphylla* roots extract for 45 days as compared to control group.

| Organs | BuChE activity (μ mole/substrate hydrolyzed/ min/mg or ml of tissue) | | |
|-----------------|--|-------------------------------|------------------------------|
| | Control | 300 mg/kg BW | 500 mg/kg BW |
| Cerebral Cortex | 0.05 \pm 0.01 ^a | 0.06 \pm 0.01 ^{ab} | 0.07 \pm 0.01 ^b |
| Hippocampus | 0.04 \pm 0.01 ^a | 0.06 \pm 0.01 ^{ab} | 0.07 \pm 0.01 ^b |
| Serum | 0.09 \pm 0.01 ^a | 0.09 \pm 0.01 ^a | 0.08 \pm 0.01 ^a |
| RBC | 0.11 \pm 0.02 ^a | 0.05 \pm 0.02 ^b | 0.07 \pm 0.02 ^b |

Values are expressed as mean \pm SD.

Superscript letters (a, b and c) indicate statistically significant difference ($p < 0.05$) from one another in the same rows.

4.2 Histopathological examination

The results of brain histological examination of rat treated with 300 and 500 mg/kg BW *S. aphylla* roots extract for 45 days were shown in Fig. 1 and 2. Hippocampus and cerebral cortex of treated groups showed no significant changes of histological features when compared to control group. The hematoxylin and eosin stained sections of brain in all groups revealed the normal pattern of cell body layers within Ammon's horn and dentate gyrus of hippocampus. The cell body layer consists of healthy pyramidal cells without degenerative cells (Fig. 1). Sections of cerebral cortex in all groups composed of regular arrangement of neurons. The neurons were found to be normal and were characterized by dark stained nucleus and cleared cytoplasm. Normal neurons and neuroglia were seen throughout the area of cortex, which were best observed at a high power (Fig. 2).

5. Discussion

Acetylcholine (ACh) is the neurotransmitter in both the peripheral and central nervous system. ACh was rapidly hydrolyzed by ChE into the inactive metabolites choline and acetate^[16]. The enzyme ChE is abundant in the synaptic cleft and

terminated nerve impulse transmission at the cholinergic synapses. Thus, the duration of the action of ACh in synaptic cleft is dependent on ChE activity^[17]. In vertebrates, two important ChE enzymes are known as AChE and BuChE. AChE was found in brain tissue, muscle, plasma and RBC^[18-19], while BuChE is found in serum^[20]. Certain chemical compounds work by inhibiting ChE and leading to accumulation of acetylcholine inside neurosynapses, consequently causing the paralysis of cholinergic neurotransmission in the central nervous system, sympathetic ganglia and neuromuscular junction^[21-22]. Activity of ChE is considered as an important marker of toxic chemicals in central nervous system. In the present study, oral administration of ethanolic extract from the root of *S. aphylla* at the doses of 300 and 500 mg/kg BW showed a significant decrease of ChE activity in rat's RBC (Table 1 and 2). A decrease of ChE activity in RBC may be due to, the inhibition or alteration of enzyme synthesis by bioactive compounds in this plant. Previously, the root of *S. aphylla* has been reported to contain alkaloid, a biological active compound^[23]. Many alkaloids such as stemofoline, (2' S)-hydroxystemofoline, and (11Z)-1', 2'-didehydrostemofoline have been reported to have the potential to inhibit AChE activity^[24]. Choudhary *et al.* (2003)^[25] reported that the triterpenoid alkaloids isolated from *Buxus hyrcana* could inhibit both AChE and BuChE.

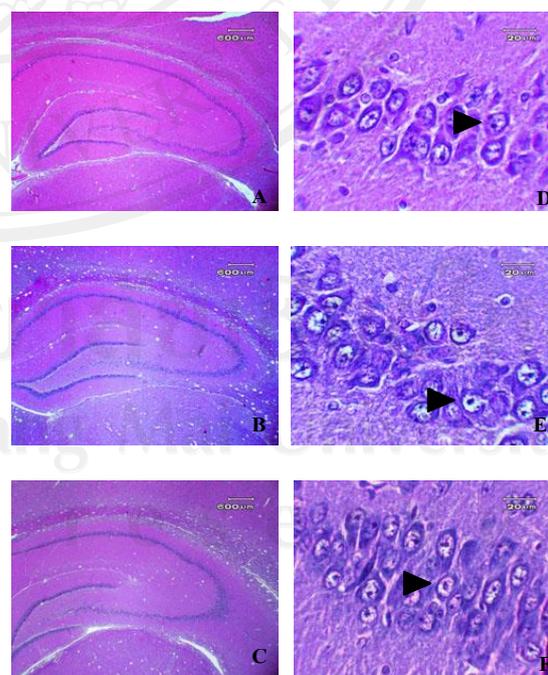


Fig. 1 Photomicrographs of the hippocampus sections of the rats

treated with 300 (B and E), 500 (C and F) mg/kg BW *S. aphylla* roots extract for 45 days and control group (A and D) showed normal features. The hematoxylin and eosin stained sections (D, E and F) revealed normal pyramidal neurons (arrowhead).

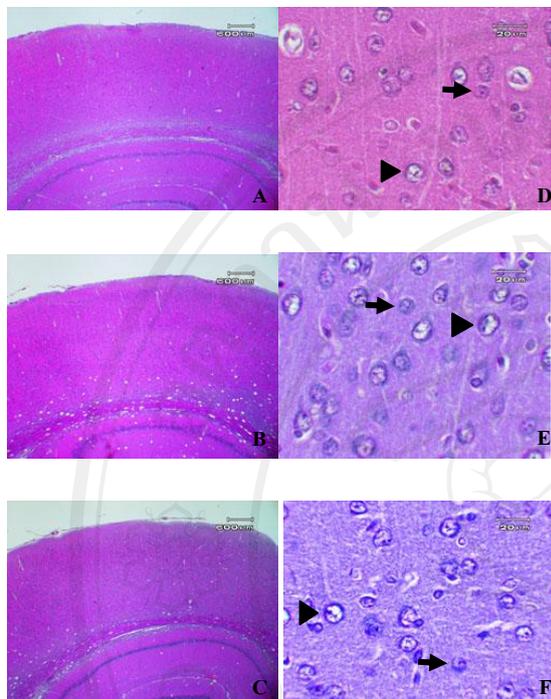


Fig. 2 Photomicrographs (magnification: 2x and 20x) of the cerebral cortex sections of the rats treated with 300 (B and E), 500 (C and F) mg/kg BW *S. aphylla* roots extract for 45 days and control group (A and D) showed normal features. The hematoxylin and eosin stained sections (D, E and F) revealed normal neurons (arrowhead) and neuroglia (arrow).

Moreover, Cardoso-Lopes *et al.* (2010)^[26] reported that alkaloids isolated from plant, *Esenbeckia leiocarpa* Engl. such as leiokinine A, leptomerine, kokusagine, skimmianine, maculine and flindersiamine displayed *in vitro* cholinesterase inhibitory activity. Interestingly, a significant increase in both AChE and BuChE activities was observed in the brain of rats treated with the extract at the dose of 500 mg/kg BW ($p < 0.05$). Although AChE activity in rat's hippocampus was not significantly different from that of controls, the tentative of dose-dependent increase was obviously observed (Table 1 and 2). These results corresponded to the toxic effect of synthetic insecticides on ChE activity in the central nervous system as reported in cypermethrin^[27-28] and deltamethrin^[29]. Furthermore, the increase in AChE

activity in the striatum and hippocampus of rats administrated with the extract from Kava (*Piper methysticum*) was also reported^[30].

Pathological examination of the nervous system is an important component of neurotoxicology. Previously, Pineda *et al.* (2005)^[31] reported the damaged neurons in rats intracerebroventricularly injected with crude extracts of lupin quinolizidine alkaloids from seeds of the plants, *L. exaltatus* and *L. montanus*. The most frequent abnormalities observed in this brain tissue were red neurons with shrunken eosinophilic cytoplasm, strongly stained pyknotic nuclei, neuronal swelling, spongiform neuropil, ghost cells (hypochromasia), and abundant neuronophagic figures in numerous brain areas. In the present data, histological examination of brain tissue did not reveal significant changes in cerebral cortex and hippocampus. The cerebral cortex of rats in treated and control groups showed normal features which composed of normal arrangement of neurons. A regular six layers of the cortex consisted of molecular layer, external granular layer, external pyramidal layer, internal granular layer, internal pyramidal layer and multiform layer. Normal neurocytes such as neuron and neuroglia were characterized by dark stained nucleus and clear cytoplasm. Hippocampus of all rats also showed the normal pattern of cell body layers within Cornu Ammonis (Ammon's horn) and dentate gyrus. The cell body layer consists of normal pyramidal cells without degenerative cells. Since the distribution of drugs or any substance to brain tissue is restricted because the brain's permeability characteristics differ from those of other tissues^[32], the unaltered neural tissues found in this study might be due to the low capacity or incapacity of the crude extract to pass the blood brain barrier. Nevertheless, abnormal ChE activity in rats treated with *S. aphylla* extract at high dose reflects a disturbance in the cholinergic system. Further research is, therefore, needed on this matter in order to correctly assess risks of human exposure to toxic bioinsecticide derived from this plant species.

6. Conclusion

The present study provided new insights on the neurotoxicity of *S. aphylla* root extract. Although histological damage of rat's brain could not be detected, the marked alteration of ChE activity could lead to neurological disorders and neuromuscular problems.



7. Acknowledgements

The authors wish to thank Mr. Suluk Wutteerapol for his assistance through the consultation in laboratory techniques. My sincere thank also extends to the graduated school, Chiang Mai University.

8. References

- [1] Tolosana, S., Rother, H. A. and London, L. 2009. Child's play: Exposure to household pesticide use among children in rural, urban and informal areas of South Africa. *S. Afri. Med. J.* 99(3): 180-184.
- [2] Alavanja, M. C. R., Hoppin, J. A. and Kamel, F. 2004. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu. Rev.* 25: 155-97.
- [3] Maurano, F., Guida, M., Melluso, G. and Sansone, G. 1997. Accumulation of pesticide residues in fishes and sediments in the river sele (South Italy). *J. Prev. Med. Hyg.* 38: 3-4.
- [4] Mor, F. and Ozmen, O. 2010. Effect of vitamin C in reducing the toxicity of endosulfan in liver in rabbits. *Exp. Toxicol. Pathol.* 62(1): 75-80.
- [5] Dikshith, T., Tandon, S., Datta, K., Gupta, P. and Behari, J. 1978. Comparative response of male rats to parathion and lindane: Histopathological and biochemical studies. *Envi. Res.* 17(1): 1-9.
- [6] Patil, J. A., Patil, A. J., Sontakke, A. V. and Govindwar, S. P. 2008. Effect of methomyl on hepatic mixed function oxidase in rats. *Indian. J. Pharmacol.* 4(4): 158-63.
- [7] Delobel, A. and Malonga, P. 1987. Insecticidal properties of six plant materials against *Caryedon Serratus* (OL.) (Coleoptera: Bruchidae). *J. stored Prod. Res.* 23(3): 173-176.
- [8] Siddiqui, B. S., Rasheed, M., Ilyas, F., Gulzar, T., Tariq, R. M. and Nauvi, S. N. 2004. Analysis of insecticidal *Azadirachta indica* A. Juss. fractions. *Z. Naturf.* 59c: 104-112.
- [9] Wongthong, P. and Pimsamarn, S. 2007. Toxicity of *Derris elliptica* Benth. Extracts on *Tetranychus truncates* Ehara. *Agril Sci. J.* 38(6): 75-78.
- [10] Hossain, S., Zaman, S., Haque, H., Bhuiyan, M. P. I., Khondkar, P. and Islam, R. 2008. Chemical and pesticidal studies on *Acorus Calamus* rhizomes. *J. Appl. Sci. Res.* 4(10): 1261-1266.
- [11] Tang, C. P., Chen, T., Velten, R., Jeschke, P., Ebbinghaus-Kintscher, U., Geibel, S. and Ye, Y. 2008. Alkaloids from stems and leaves of *Stemona japonica* and their insecticidal activity. *J. Nat. Prod.* 71: 112-116.
- [12] Sastraruji, T., Chaiyong, S., Jatisatienr, A., Pyne, S. G., Ung, A. T. and Lie, W. 2011. Phytochemical studies on *Stemona aphylla*: isolation of a new stemofoline alkaloid and six new stemofurans. *J. Nat. Prod.* 74: 60-64.
- [13] Brem, B., Seger, C., Pacher, T., Hofer, O., Vajrodaya, S. and Greger, H. 2002. Feeding Deterence and Contact Toxicity of *Stemona* Alkloids- A Source of Potent Natural Insecticides. *J. Agric. Chem.* 50: 6383-6388.
- [14] Pandee, S., Sangiun, N. and Jatisatienr, A. 2003. An acute toxicity testing of *Stemona curtisii* Hkf. Proceeding on The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare. 3-7 Feb, 2003. Pang Suan Kaew Hotel, Chiang Mai, Thailand.
- [15] Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. and Featherstone, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
- [16] Mukherjee, P. M., Kumar, V., Mal, M. and Houghton, P. J. 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomed.* 14: 289-300.
- [17] Cooper, J. R., Bloom, F. E. and Roth, R. H. 2003. Acetylcholine, the biochemical basis of neuropharmacology. Oxford University Press, New York, pp. 151-170.
- [18] Brimijoin, S. (1983) Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics. *Prog. Neurobiol.* 21, 291-322.
- [19] Chatonnet, A. & Lockridge, O. (1989) Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 260, 625-634.
- [20] Giacobini, E. 2002. Long-term stabilizing effect of cholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer' disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* 62: 181-7.
- [21] Vishwanathan, R., Srinivasan, V., 1964. Treatment of OP compound poisoning. *J. Indian Med. Assoc.* 43, 494-497.





- [22] Balali-Mood, M. and Balali-Mood, K. 2008. Neurotoxic disorders of organophosphorus compounds and their managements. *Arch. Iranian. Med.* 11(1): 65-89.
- [23] Sastraruji, T., Chaiyong, S., Jatisatienr, A., Pyne, S. G., Ung, A. T. and Lie, W. 2011. Phystochemical studies on *Stemona aphylla*: isolation of a new stemofoline alkaloid and six new stemofurans. *J. Nat. Prod.* 74: 60-64.
- [24] Mungkornasawakul, P., Chaiyong, S., Sastraruji, T., Jatisatienr, A., Jatisatienr, C., Pyne, S. G., Ung, A. T., Korth, J. and Lie, W. 2009. Alkaloids from the roots of *Stemona aphylla*. *J. Nat. Prod.* 72: 848-851.
- [25] Choudhary, M. I., Shahnaz, S., Parveen, S., Khalid, A., Ayatollahi, S. A. M., Atta-ur-Rahman and Parvez, M. 2003. New triterpenoid alkaloid cholinesterase inhibitors from *Buxus hyrcana*. *J. Nat. Prod.* 66(6): 739-742.
- [26] Cardoso-Lopes, E. M., Maier, J. A., Rogério da Silva, M., Regasini, L. O., Simote, S. Y., Lopes, N. P., Pirani, J. R., Bolzani, V. S. and Young, M. C. M. 2010. Alkaloids from stem of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as potential treatment for alzheimer's disease. *Molecules.* 15: 9205-9213.
- [27] Husain, R., Husain, R., Adhami, V. M. and Seth, P. K. 1996. Behavioral, neurochemical, and neuromorphological effects of deltamethrin in adult rats. *J. Toxicol. Environ. Health.* 48: 515-526.
- [28] Sayim, F., Yavaşoğlu, N. Ü. K., Uyanıkgil, Y., Aktuğ, H., Yavaşoğlu, A. and Turgut, M. 2005. Neurotoxic effects of cypermethrin in Wistar Rats: a haematological, biochemical and histopathological study. *J. Health Sci.* 51(3): 300-307.
- [29] Aziz, M. H., Agrawal, A. K., Adhami, V. M., Shukla, Y. and Seth, P. K. 2001. Neurodevelopmental consequences of gestational exposure (GD14-GD20) to low dose deltamethrin in rats. *Neurosci. Lett.* 300(161-165).
- [30] Noor, N. A. Anxiolytic action and safety of Kava: Effect on rat brain acetylcholinesterase activity and some serum biochemical parameters. *Afri. J. Phar. Pharmacol.* 4(11): 823-828.
- [31] Pineda, J. B., Rodríguez, G. N., Monteon, J. A., López, P. M. G., Lopez, M. A. R. and Estrada, J. G. 2005. Histological evaluation of brain damage caused by crude quinolizidine alkaloid extracts from lupines. *Histol. Histopathol.* 20: 1147-1153.
- [32] Stegelmeier, B. L., Hall, J. O., Gardner, D. R. and Panter, K. E. 2003. The toxicity and kinetics of larkspur alkaloid, methyllycaconitine, in mice. *J. Anim. Sci.* 81: 1237-1241.

