

Thesis Title *In vitro* Chondroprotective Activities of Flavonoids Isolated from *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr. and Flavonoid Derivatives

Author Saichit Thaeopattha

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory

Asst. Prof. Dr. Siriwan Ongchai	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert	Member

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a disorder of articular cartilage that results from an imbalance between the destructive and reparative or synthetic processes of the articular cartilage. Elevated pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β) are prominent stimuli for inducing cartilage catabolism. The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) has been the major approach taken in the treatment of the symptoms of this disease even though these drugs has undesired side effects. Currently, the search for alternative therapies that might influence the disease process has focused on anti-inflammatory compounds isolated from herbs. *B. pandurata* contains flavonoids such as pinostrobin and pinocembrin that have anti-inflammation activity. This study was aimed to evaluate whether these flavonoids and their derivatives are able to protect cartilage degradation induced by IL-1 β .

Porcine cartilage from Metacarpophalangeal joint was cut to pieces and cultured in serum-free DMEM containing IL-1 β (25 ng/ml) with or without *B. pandurata* extracts (50 μ g/ml) namely hexane, ethylacetate, methanol and acetone extract. In addition, some IL-1 β treated cartilage explants were co-incubated with flavonoids from *Boesenbergia pandurata* such as pinostrobin and pinocembrin (0.1-50 μ g/ml) or commercially available flavonoid derivatives (10 μ g/ml). The flavonoid derivatives tested included β -naphthoxyflavone, 2'-methoxyflavone, 5-methoxyflavone, 3-hydroxy-6-methoxyflavone, 3-hydroxy-7-methoxyflavone, flavone, 5-hydroxyflavone, and 7-hydroxyflavone. The culture medium was measured for the release of

extracellular matrix biomolecules of cartilage such as sulfated-glycosaminoglycan (S-GAG) and hyaluroan (HA). Cartilage tissues were analyzed for the uronic acid and collagen contents.

It was found that all extracts from *B. pandurata* significantly reduced cartilage degradation induced by IL-1 β even though their activities were not statistically different ($p < 0.05$). Pinostrobin and pinocembrin, the major components isolated from *B. pandurata* showed a significant chondroprotective activities on the cartilage explant ($p < 0.05$), in a dose dependent manner (5-50 $\mu\text{g/ml}$). At the same concentration (10 $\mu\text{g/ml}$), all flavonoid isolated from *B. pandurata* and the flavonoid derivatives significantly reduced cartilage degradation stimulated by IL-1 β . When compared chondroprotective activities between flavonoids isolated from *B. pandurata* (pinostrobin and pinocembrin) and each commercially available flavonoid derivatives, it was found that flavonoids isolated from *B. pandurata* contained activities as high as 5-methoxyflavone, 2'-methoxyflavone and β -naphthoxyflavone which were higher than 3-hydroxy-6-methoxyflavone, 3-hydroxy-7-methoxyflavone, flavone, 5-hydroxyflavone, and 7-hydroxyflavone.

These results indicated that pinostrobin and pinocembrin, the flavonoids isolated from *B. pandurata*, and some flavonoid derivatives possesses a potent chondroprotective activities using the cartilage explant model stimulated by IL-1 β . They are valuable to be explored and developed as a new pharmacological agent for the management of degenerative joint diseases.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของสารสกัดฟลาโวนอยด์จากกระชายและสารอนุพันธ์ฟลาโวนอยด์ต่อการป้องกันการสลายกระดูกอ่อนในหลอดทดลอง

ผู้เขียน สายจิตร แถวปัดดา

ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร. ศิริวรรณ องค์กรไชย

ประธานกรรมการ

รศ.ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ

กรรมการ

บทคัดย่อ

โรคข้อเสื่อมเป็นโรคข้อที่ร่างกายจะมีการกระตุ้นการสังเคราะห์สาร pro-inflammatory cytokine เช่น อินเทอลิวคิน-1เบต้า (IL-1 β) ส่งผลให้อัตราการสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนสูงมากกว่าการสังเคราะห์ เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจึงถูกทำลายบางลงเรื่อย ๆ ยาที่นิยมใช้รักษาโรคข้อในปัจจุบันคือ ยาด้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) แต่พบว่ายาเหล่านี้ยังมีผลข้างเคียงที่เป็นอันตราย ปัจจุบันจึงมุ่งเน้นหาสมุนไพรเพื่อเป็นทางเลือกในการรักษาโรคข้อเสื่อม โดยเฉพาะสมุนไพรที่มีสารต้านฤทธิ์การอักเสบ กระชายเป็นสมุนไพรที่มีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านฤทธิ์การอักเสบ จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดฟลาโวนอยด์จากกระชาย และสารอนุพันธ์ฟลาโวนอยด์บางชนิดน่าจะมีฤทธิ์สามารถต้านการสลายกระดูกอ่อนในโรคข้อเสื่อมได้ ดังนั้นในงานวิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดฟลาโวนอยด์จากกระชายและอนุพันธ์ฟลาโวนอยด์บางชนิดในการต้านฤทธิ์การเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสลายของสารชีวโมเลกุลในกระดูกอ่อนข้อต่อ โดยอินเทอลิวคิน-1เบต้า

การทดลองทำโดยนำกระดูกอ่อนส่วนข้อเท้า (metacarpophalangeal) ของสุกรมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ เลี้ยงในอาหาร serum-free DMEM ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนด้วยอินเทอลิวคิน-1เบต้า (25 ng/ml) ร่วมกับการใช้สารสกัดกระชาย ซึ่งได้จากการสกัดด้วยเฮกเซน, เอทิลเอซีเทต, แอซีโตนและเมทานอล (50 μ g/ml) ส่วนสารฟลาโวนอยด์ที่ใช้ศึกษาฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของข้อซึ่งเหนี่ยวนำโดยอินเทอลิวคิน-1เบต้าในครั้งนี้ (ความเข้มข้น 0.1-50 μ g/ml) ได้ใช้สารฟลาโวนอยด์สองชนิดที่แยกได้จากกระชายคือ โพนอสโตรบิน (pinostrobin) และ โพนอเซมบริน (pinocembrin) และสารอนุพันธ์ฟลาโวนอยด์ที่ชื่อมาอีก 8 ชนิด คือ

β -naphthoxyflavone, 2'-methoxyflavone, 5-methoxyflavone, 3-hydroxy-6-methoxyflavone, 3-hydroxy-7-methoxyflavone, flavone, 5-hydroxyflavone, และ 7-hydroxyflavone จากนั้นจึงตรวจวัดสารที่เป็นองค์ประกอบเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่สลายออกมาในน้ำเลี้ยง เช่น ไกลโคซามิโนไกลแคน (GAG) และไฮยาลูโรแนน (HA) รวมทั้งการวิเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายกระดูกอ่อน และหาปริมาณยูโรนิกและคอลลาเจน ที่เหลืออยู่ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

พบว่าสารสกัดกระชาย ในชั้นสกัดต่าง ๆ คือ เฮกเซน, เอทิลเอซีเทต, แอซีโทน และเมทานอลสามารถต้านฤทธิ์เหนี่ยวนำการสลายกระดูกอ่อน โดยอินเตอลิวคิน-1 เบต้าได้ใกล้เคียงกัน ส่วนสารฟลาโวนอยด์จากกระชายคือ ไพโนสโตรบิน และไพโนแซมบริน สามารถลดการสลายกระดูกอ่อนได้ดีใกล้เคียงกันตามความเข้มข้นของสารที่ใช้ (dose-dependent manner) และมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่ความเข้มข้น 5-50 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

ที่ความเข้มข้นสารฟลาโวนอยด์เท่ากัน (10 $\mu\text{g/ml}$) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ด้านการสลายกระดูกอ่อนระหว่างสารฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ ทั้งที่ได้จากกระชาย และที่ซื้อ พบว่าสารฟลาโวนอยด์ทุกชนิดสามารถลดการสลายของกระดูกอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่สารฟลาโวนอยด์ที่ได้จากกระชายคือ ไพโนสโตรบิน และไพโนแซมบริน และอนุพันธ์ฟลาโวนอยด์อีกสามชนิดคือ 5-methoxyflavone, 2'-methoxyflavone และ β -naphthoxyflavone มีฤทธิ์สามารถต้านการสลายกระดูกอ่อนได้ดีใกล้เคียงกัน และมีแนวโน้มที่จะมีฤทธิ์สูงกว่าอนุพันธ์ฟลาโวนอยด์อีกห้าชนิดที่ใช้ทดลองในครั้งนี้ คือ 3-hydroxy-6-methoxyflavone, 3-hydroxy-7-methoxyflavone, flavone, 5-hydroxyflavone, และ 7-hydroxyflavone จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สารสกัดฟลาโวนอยด์จากกระชายและอนุพันธ์ฟลาโวนอยด์บางชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสลายกระดูกอ่อนที่เหนี่ยวนำด้วยอินเตอลิวคิน-1 เบต้า จึงมีความเป็นไปได้ที่จะได้มีการพัฒนาสารดังกล่าวเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคข้อเสื่อมได้ต่อไปในอนาคต