

Thesis Title Identification of Phytochemical and Molecular Investigation on Action of Khrueta Khao Khlon (*Dregea volubilis*) Root Extract on Articular Chondrocyte Metabolism

Author Mr. Akanit Itthiarbha

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtaweelert

Advisor

Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ong-chai

Co-advisor

Dr. Peraphan Pothacharoen

Co-advisor

ABSTRACT

Destruction of joint cartilage is the major outcome of arthritic diseases such as osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA). Articular cartilage contains chondrocytes embedded in an avascular matrix which composed of primarily of type II collagen, hyaluronan (HA) and the proteoglycans, aggrecan. Arthritic chondrocytes secrete the proinflammatory cytokine, interleukin-1 β (IL-1 β), which stimulates chondrocytes to secrete the matrix metalloproteinases (MMPs), is a key event in the irreversible breakdown of cartilage matrix via digestion of type II collagen and the consequent release of proteoglycans from the cartilage lead to destructive joint diseases. Compound able to inhibit the effect of IL-1 β on cartilage matrix degradation

may well have therapeutic activity in arthritic disease. *Dregea volubilis*, is a Thai medicinal plant that has been shown to possess a potent anti-inflammatory activity, was investigated the chondroprotective property. *D. volubilis* was extracted into 4 different solvents (hexane, ethyl acetate, acetone and methanol), then each fraction was co-cultured with IL-1 β in porcine cartilage explant, then investigated the release of sulfated-glycosaminoglycan and HA, and uronic acid remaining in cartilage tissue. In the initial results, the ethyl acetate extract showed the highest chondroprotective effects on IL-1 β -induced cartilage degradation compared with the others extracts.

Further study, Polyoxypregnane glycoside (PPG) was identified as the active compound which purified from the ethyl acetate extract of *D. volubilis*. The chondroprotective activity of PPG at the molecular level was then conducted. Human articular chondrocyte was co-treated with IL-1 β in the present and absence of PPG. The expression of anabolic markers (aggrecan, SOX9, type II collagen and TIMPs), catabolic markers (aggrecanase, HASs and MMPs), phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor kappa-B (NF- κ B) signaling pathway were determined by RT-PCR, real time RT-PCR and Western immunoblotting, respectively. PPG at the concentration rang of 6.25–25 μ M was found to significantly suppress IL-1 β -induced expression of catabolic markers, while reversed the effects of IL-1 β -inhibited expression of anabolic markers in dose dependent manner ($p < 0.05$). There were consistant with the protein products of those genes analyzed in the culture media. The mode of action of PPG was likely mediated through inhibiting expression of MMP-1, -3 and -13 via NF- κ B rather than MAPK. PPG decreased phosphorylation of I κ B kinase and I κ B α degradation induced by

IL-1 β . Furthermore, PPG was found to reduce IL-1 β -activated NF- κ B p65 translocation into the nucleus. These revealed the chondroprotective activity of PPG against IL-1 β -induced cartilage degradation by suppression of MMPs synthesis, while elevation the cartilage matrix synthesis. This study shows the beneficial use of PPG as the nutritional supplement for maintaining joint integrity and function.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การระบุสารพิษทุกชนิดและ การตรวจสอบฤทธิ์ระดับโมเลกุลของ สารสกัดจากรากต้นเครือเขาคลอน ที่มีต่อเมแทบอลิซึมของเซลล์ กระจุกอ่อนผิวหนัง

ผู้เขียน นายอัคนิษฐ์ อธิธำภา

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

รศ. ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ดร. พิรพรรณ โปธาเจริญ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การเสื่อมสลายของกระจุกอ่อนผิวหนังเป็นพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยโรคข้อ อาทิ เช่น โรคข้อเสื่อม และ โรคข้อเสื่อมอักเสบ โดยกระจุกอ่อนผิวหนังจัดเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ไม่มีเส้นเลือดมาเลี้ยง และมีเซลล์คอนโดไซต์เพียงชนิดเดียวอยู่ภายใน กระจุกอ่อนผิวหนังประกอบด้วย สารชีวโมเลกุลที่สำคัญคือ คอลลาเจนชนิดที่ 2 ไฮยาลูโรแนน และ โปรตีโอไกลแคน ชนิดแอสเทอโรน เซลล์คอนโดไซต์ในผู้ป่วยโรคข้อจะหลั่งสารไซโตไคน์ คือ อินเตอร์ลิวคิน ชนิดที่ 1 บีต้า ซึ่งกระตุ้นให้เซลล์คอนโดไซต์หลั่งเอนไซม์เมทริกซ์เมทาโรโปรตีนเนส ออกมาทำลาย คอลลาเจน ส่งผลให้มีการสลายโปรตีโอไกลแคนตามมา

จนไม่สามารถซ่อมแซมส่วนของกระดูกอ่อนผิวข้อได้ และเกิดพยาธิสภาพของโรคข้อขึ้น
 ดังนั้นสารที่สามารถไปยับยั้งฤทธิ์ของอินเทอร์ลิวคิน ชนิดที่ 1 บีต้า
 ลดการสลายกระดูกอ่อนผิวข้อได้ ก็น่าจะเป็นทางเลือกที่ดีในการรักษาผู้ป่วยโรคข้อ
 สมุนไพรรไทยที่มีการรายงานฤทธิ์ด้านการอักเสบ
 และสนใจศึกษาคุณสมบัติด้านการเสื่อมสลายของ กระดูกอ่อนผิวข้อในครั้งนี้คือ ต้นเครือเขาคลอน
 โดยนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิดได้แก่ เฮกเซน เอธิลอะซิเตท อะซิโตน และเมธานอล
 จากนั้นนำแต่ละชั้นสกัดไปทดสอบกับ ชิ้นกระดูกอ่อนผิวข้อหมูในหลอดทดลองร่วมกันกับ
 อินเทอร์ลิวคิน ชนิดที่ 1 บีต้า จากผลการ ทดลองเบื้องต้นพบว่า
 ชั้นสกัดเอธิลอะซิเตทสามารถลดการสลายของ กระดูกอ่อนผิวข้อได้ดีที่สุด

เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธีทางเคมีพบสารสำคัญคือ polyoxypregnane glycoside (PPG)
 และเมื่อศึกษาฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของ PPG ต่อ อินเทอร์ลิวคิน ชนิดที่ 1 บีต้า ในเซลล์
 คอนโดไซต์มนุษย์ โดยติดตามการแสดงออกของตัวบ่งชี้ของการสร้าง (aggrecan, SOX9, type II
 collagen and TIMPs) และตัวบ่งชี้ของการสลาย (aggrecanase, HASs and MMPs)
 เนื้อกระดูกอ่อนผิวข้อ การส่งสัญญาณภายในเซลล์ผ่าน mitogen-activated protein kinases
 (MAPKs) และ nuclear factor kappa-B (NF- κ B) ทดสอบด้วยวิธี RT-PCR, real time RT-PCR

และ Western immunoblotting ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของ PPG ระหว่าง
 6.25-25 ไมโครโมลาร์ สามารถลดฤทธิ์ของอินเทอร์ลิวคิน ชนิดที่ 1 บีต้า ที่กระตุ้นให้เซลล์

สร้างตัวบ่งชี้ของการสลายเนื้อกระดูกอ่อนผิวข้อ และผูกพันฤทธิ์ของอินเทอร์ลิวคิน ชนิดที่ 1 บีต้า
 ที่ยับยั้งให้เซลล์หยุดสร้างตัวบ่งชี้ของการสร้างเนื้อกระดูกอ่อนผิวข้อ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 ($p < 0.05$) สัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน และโปรตีนตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ากลไกการ

ออกฤทธิ์ของ PPG ในการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์เมทริกซ์เมทาโรโปรตีนเอส ชนิดที่ 1, 3 และ 13 ผ่านทาง NF-KB มากกว่า MAPK โดย PPG มีผลไปลดการเติมฟอสเฟตให้กับเอนไซม์ IKB kinase ส่งผลให้ลดการสลายของ IKB α เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคิน ชนิดที่ 1 ปีศาจ เพียงอย่างเดียว และยังพบว่า PPG สามารถลดการเข้าสู่นิวเคลียสของ NF-KB p65 ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคิน ชนิดที่ 1 ปีศาจ เพียงอย่างเดียวจากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงข้อดีของ PPG ซึ่งน่าจะสามารถนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เพื่อรักษาและลดอัตราการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อได้