

รายงานความก้าวหน้า รอบ 36 เดือน

เรื่อง

การเพาะเลี้ยงเซลล์คอนโดรซัยต์มนุษย์ และการประยุกต์ใช้
ในการวินิจฉัย และค้นหาต้านข้อเสื่อม

เสนอ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

“งานวิจัยนี้ยังไม่เสร็จสมบูรณ์ โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิง”

สัญญาเลขที่ BRG4780018

โครงการ “การเพาะเลี้ยงเซลล์คอนโดรซัยต์มนุษย์ และการประยุกต์ใช้
ในการวินิจฉัย และค้นหาต้านข้อเสื่อม”
รายงานสรุปความก้าวหน้าของโครงการในรอบ 36 เดือน

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 มีนาคม 2550 ถึงวันที่ 30 สิงหาคม 2550

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน : รองศาสตราจารย์ ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ

หน่วยงาน : ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50200

1. การดำเนินงาน : ได้ดำเนินงานตามแผนงานที่ได้วางไว้ทุกประการ

ได้เปลี่ยนแปลงแผนงานที่ได้วางไว้ดังนี้คือ

1. การศึกษาคุณสมบัติและคุณสมบัติของ monoclonal antibodies ต่อ chondrocyte surface antigens
2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ human chondrocyte บน scaffold (3D)
3. การทดสอบฤทธิ์ของยา และสมุนไพรต่อเซลล์ human chondrocyte ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะการอักเสบโดย IL-1

2. สรุปผลการดำเนินงาน

ได้ดำเนินการทำการศึกษาวิจัยเป็นไปตามแผนการที่กำหนดไว้ ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

- 2.1. ได้ทำการแยกบริสุทธิ์ Monoclonal antibody ต่อเซลล์ chondrocyte จำนวน 3 clones คือ 2A4, 4H2, 11A4 โดยการทำให้ limiting dilution และศึกษาคุณสมบัติและคุณสมบัติของ mAb ดังกล่าว พบว่า mAb ทั้งสาม clone เป็น immunoglobulin ชนิด IgG1 เมื่อทำการศึกษาคุณสมบัติต่อการเป็น antibody ต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์ chondrocyte โดยเทคนิค immunoprecipitation พบว่า mAb ทั้งสาม clone ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับโมเลกุลบนผิวเซลล์ chondrocyte ได้ โดยโมเลกุลดังกล่าวมี molecular weight ประมาณ MW ตามลำดับ ในส่วนของการศึกษาเพิ่มเติม จะทำการผลิต ascetic fluid ให้ได้ปริมาณมากพอที่จะศึกษาคุณสมบัติของ mAb ทั้งสามชนิดนี้ ต่อไป
- 2.2 ทำการศึกษาการเลี้ยงเซลล์ chondrocyte บน scaffold ที่ทำมาจาก gelatin โดยดูผลของการใช้ HA (hyaluronan) เพื่อเพิ่มการยึดจับของเซลล์ โดยทำการวัดปริมาณของสาร extracellular matrix คือ glycosaminoglycans, HA และ การเจริญเติบโตของเซลล์ chondrocyte
- 2.3 ในส่วนของผลงานวิจัย
 - 2.3.1 ขณะนี้ได้ทำการจดสิทธิบัตร สารสกัดที่มีผลต่อการยับยั้งการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนภายในประเทศ

3. ท่านได้พบอุปสรรคในการดำเนินการหรือไม่ ถ้าพบกรุณาระบุว่ามีอะไรบ้าง และได้แก้ไขอย่างไรบ้าง ?
ผลงานวิจัยจนถึงปัจจุบันยังไม่ประสบปัญหาใด ๆ

4. ข้อคิดเห็นและข้อเสนออื่น ๆ ต่อ สกว.
ไม่มี

ลงนาม

(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

วันที่ 31 สิงหาคม 2550

ภาคผนวก

Paper I

Effect of *Alpinia galanga* extract on cartilage degradation and on gene expression in human chondrocyte and synovial fibroblast metabolism

Peraphan Pothacharoen¹, Kanyamas Choocheep¹, Tanyaluck Pitak¹,
Wilart Pompimon², Bhusana Premanode³, Timothy E. Hardingham⁴,
Prachya Kongtawelert^{1*}

¹ Thailand Excellence Center for Tissue Engineering, Department of Biochemistry,
Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

² Faculty of Science, Lampang Rajabhat University,
Lampang 52100, Thailand

³ Institute of Biomedical Engineering, Imperial College,
London, SW7 2AZ, United Kingdom

⁴ UK Centre for Tissue Engineering, Faculty of Life Sciences,
University of Manchester, Manchester M13 9PT, United Kingdom

Received 11 April 2006; accepted 8 August 2006

Abstract: We investigated the effects of *A. galanga* extract on metabolism and gene expression involved in the interleukin-1 β (IL-1 β) response of human chondrocyte and synovial fibroblast. *A. galanga* extract inhibited IL-1 β enhanced matrix breakdown of the cartilage explants in a dose-dependent manner. It suppressed uronic acid loss from the tissue and decreased the release of sulfated GAG and hyaluronan into the medium. MMP-2 and MMP-9 activity in the culture medium of chondrosarcomas and synovial fibroblasts were significantly reduced in the presence of *A. galanga* extract, which also suppressed the production of MMP-1, -3 and -13. The *A. galanga* extract also significantly increased type II collagen, SOX9 and aggrecan gene expression, suggesting an ability to enhance anabolic activity. At a high dose of *A. galanga* extract there was a down-regulation of aggrecan gene expression. Comparison with Diacerein[®] showed its general anti-inflammatory potential to be similar. The *A. galanga* extract was shown to inhibit IL-1 β -stimulated cartilage matrix degradation in both systems. Additionally, the extract showed the potential to up-regulate certain chondrocyte anabolic genes. It may, therefore, offer some cartilage protective and anti-inflammatory properties as a therapeutic agent in arthritis.

© Versita Warsaw and Springer-Verlag Berlin Heidelberg. All rights reserved.

Keywords: *Alpinia galanga*, chondrocyte, synovial fibroblast, gene expression, cartilage degradation

* E-mail: pkongtaw@mail.med.cmu.ac.th

Abbreviations

BSA, bovine serum albumin; CS, chondroitin sulfate; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMMB, dimethylmethylen blue; ECM, extracellular matrix; FCS, fetal calf serum; GAG, glycosaminoglycan; IL, interleukin; MMP, matrix metalloproteinase; PG, proteoglycan; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; OA, osteoarthritis; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; RT, Reverse transcriptase; s-GAG, sulfated glycosaminoglycan; SOX, SRY-type HMG box.

1 Introduction

Osteoarthritis (OA) is a degenerative process of the joints, which is characterized by the progressive destruction and erosion of cartilage often associated with an osteophytic response. This destruction results from a homeostatic imbalance between the matrix synthesis and degradation in the cartilage. Pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β) and other mediators produced by cytokine action on chondrocyte and synovial fibroblasts may contribute to the process and cause an imbalance in extracellular matrix (ECM) turnover, accelerate the degradation of cartilage matrix, and also increase the incidence of chondrocyte apoptosis [1, 2]. IL-1 β (and TNF α) have been shown to provide a driving force for inducing and sustaining cartilage damage in arthritis by suppressing the synthesis of specific ECM molecules and by promoting excessive cartilage destruction, thereby preventing the cartilage repair process [3, 4]. Numerous studies have demonstrated that matrix metalloproteinases (MMPs) are key enzymes involved in the destruction of articular cartilage in arthritic diseases [5]. MMP-1/collagenase 1, MMP-3/stromelysin 1, MMP-9/gelatinase B and MMP-13/ collagenase 3 have been detected in synovium, synovial fluid, and cartilage samples in both RA and OA and have been directly implicated in the pathologic loss of articular cartilage [6–10]. Furthermore, pro-inflammatory cytokines, produced locally in the joint by monocytes/macrophages, synovial fibroblasts, or chondrocytes [11], induce and/or augment the production of proMMPs [12–14]. This compromises the function of the chondrocytes, the highly differentiated cells of cartilage, which are responsible for maintaining a homeostatic balance between biosynthesis and degradation of cartilage ECM [15, 16]. The metabolic status of the chondrocyte thus plays a central role in our understanding of the initiation and progression of joint degeneration such as in OA [17]. In experimental OA models it has been shown that there is an initial anabolic response of chondrocyte with up-regulation of mRNA levels for the major structural components type II collagen and aggrecan and increases in the synthesis of the corresponding protein [18, 19]. The Sox9 transcription factor SOX9 (SRY-type HMG box proteins) has emerged as an important determinant of chondrocyte differentiation, including the regulation of type II collagen (Col2) and aggrecan gene expression [20, 21]. Degradation of the ECM is also elevated in these early stages in OA and, as the disease progresses, the chondrocyte anabolic response becomes insufficient. This results in depletion of the ECM, which occurs during the later stages

of OA. Loss of key matrix organization results in a compromised tissue function and, eventually, cartilage loss down to the sub-chondral bone.

The Thai herb, *Alpinia galanga* (B.L. Burtt) has been used in traditional medicine for its carminative, stomachic, anti-rheumatic, anti-flatulent, and anti-itching therapeutic qualities. It also contains anti-microbial agents [22, 23]. The rhizomes of this plant are extensively used as a spice in Southeast Asian countries. The potential anti-inflammatory actions are attributed to suppressing prostaglandin synthesis through the inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 [24]. In addition, the aqueous acetone extract from the rhizomes has been reported to have inhibitory effects on lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production [25]. In order to evaluate the potential of *A. galanga* extract for chondroprotective effects in arthritis, we investigated its effect on IL-1 β induced cartilage degradation and on catabolic and anabolic processes in a human chondrosarcoma, cell-lined SW1353 and in human synovial fibroblasts.

2 Experimental procedures

2.1 Preparation of *Alpinia galanga* hexane extract

The Galanga powder (from fresh rhizomes of *A. galanga* L.) was obtained from The Communo Life of Love and Unity of the Mountain People Foundation (CLUMP). Dried powder of *A. galanga* was extracted with hexane and, to ensure complete extraction, 5 kg powder was extracted with 17 L of hexane. This process was repeated 4 times. The filtrates from the extractions were mixed and dried in a rotary evaporator under reduced pressure at 40°C. The yield was determined and the dried residue was weighed and stored at -20°C.

2.2 Explants preparation and treatment

Porcine articular cartilage, freshly dissected from a metacarpophalangeal joint of a 20-24 week old animal was incubated in serum-free-DMEM containing 200 units/ml penicillin and 200 μ g/ml streptomycin. The explants were maintained in culture in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C.

Explants at day 2 were maintained in media without serum for 24 hours (day 0 media) prior to the three days of treatment. Conditioned media were collected on day 3 of culture and stored at -20°C until analyzed. Recombinant human interleukin-1 β (25 ng/ml) was added to induce cartilage degradation and the effects of the *A. galanga* extract was tested at concentrations ranging from 6.25 – 10 μ g/ml. As an independent control Diacerein[®], (0.0625 – 1 μ M) a commercial anti-osteoarthritis drug (TRB Chemedica, Switzerland), was added to parallel cultures as a standard agent. Each experiment contained a control in which no IL-1 β was added to the medium. Treatments were performed in triplicate using tissue from one animal donor.

The release of extracellular matrix (ECM) biomolecules from cartilage induced by

IL-1 β was estimated by the calculation:

$$\% \text{ change} = \{(\text{Day3 medium} - \text{Day 0 medium}) / \text{Day 0 medium}\} \times 100$$

$$\text{UA content \% of control} = \{\text{UA}(\text{Day3 treated}) - \text{UA}(\text{Day 3 control})\} \times 100$$

2.3 Human chondrosarcoma cells (SW1353), human synovial fibroblasts and treatments

The human chondrosarcoma cell line, SW1353 was obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cells were grown to confluence in 25 cm² culture flasks, washed with PBS and kept in serum free DMEM for 24 h prior to co-treatment with various concentrations of *A. galanga* (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μ g/ml) together with 10 ng/ml human recombinant IL-1 β for 24 h. Non-inflammatory human synovium was obtained with fully informed patient consent from the arthroscopic diagnosis of a flat pad syndrome patient at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, (Department of Orthopedic, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand). Synovial fibroblasts were released by overnight trypsin at 4°C and 3 h digestion with collagenase (Sigma type IA) at 37°C. The cells were washed with PBS and grown in DMEM containing 10% FCS as high density primary monolayer cultures until confluency. The synovial fibroblasts at passage 4 were maintained in serum-free medium and treated as described for SW1353 cells.

2.4 Cytotoxicity detection

Quantification of cell death and cell lysis was determined by a colorimetric assay, based on the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity in culture medium [26]. The analysis was conducted according to the manufacturer's instruction by comparing the amount of LDH in the samples with the positive control: cells treated with 0.5 mM H₂O₂ for 24 h.

2.5 Measurement of glycosaminoglycan levels

The level of glycosaminoglycan appearing in the medium of explants, cell cultures, and papain-digested cells was determined using the dimethylmethylene blue (DMMB) assay for sulfated glycosaminoglycan [27], using chondroitin sulfate C (shark cartilage extract; Sigma-Aldrich, USA) as standard. The DMMB solution was added to the diluted sample and standards and appropriate blank solution prior to absorbance reading at 525 nm in a microplate reader spectrophotometer. The release of sGAG was estimated by the calculation:

$$\% \text{ sGAG release} = [\text{sGAG in medium} / (\text{sGAG in medium} + \text{sGAG in cell layer})] \times 100$$

2.6 Determination of uronic acid

Glucuronic acid (GlcUA) concentrations in the papain digested explants were determined with the colorimetric assay using *m*-hydroxydiphenyl [28] with D-glucuronic acid lactone as the standard.

2.7 Measurement of hyaluronan levels

HA in medium and cell layer was measured using a competitive inhibition-based-ELISA as previously described, with modifications [29]. Briefly, culture media or papain-digested samples containing unknown amounts of HA (175 μ l), as well as a standard containing known concentrations of a highly purified HA preparation (Healon[®], Pharmacia AB, Sweden), were placed in small polypropylene tubes with appropriate concentrations of biotinylated-HA binding proteins (B-HABP) (175 μ l) and incubated at room temperature (25°C) for 1 hour. Aliquots (100 μ l) of this reaction mixture were applied to umbilical cord HA-coated and BSA-blocked micro-plates and incubated at 25°C for 1 h. The wells were then washed with phosphate-buffered saline solution containing 0.05% Tween-20. The appropriate dilution (1:2000 in PBS) of anti-biotin peroxidase conjugate (Zymed Lab Inc., San Francisco, CA, USA) was then added to each well, incubated at 25°C for 1 hour and washed, after which peroxidase substrate (OPD, *o*-phenylenediamine) was added. After incubation at 25°C for 20 min, the reaction was stopped by the addition of 50 μ l 4 M H₂SO₄. The absorbance ratio at 492/690 nm was measured using a Titertek Multiskan M340 microplate reader. HA concentration in the culture media samples was calculated relative to a standard curve generated from the purified HA preparation.

The release of HA was estimated by the calculation:

$$\% \text{ HA release} = [\text{HA in medium} / \text{HA in medium} + \text{HA in cell layer}] \times 100$$

2.8 Gene expression analysis

RNA was extracted from monolayer cells using an Aurum total RNA purification kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) according to the manufacture's guidelines. Total RNA (500ng) of each sample was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) using RevertAidTM First Strand cDNA synthesis kit (MBI Fermentas, Germany). Primers and probe sets were designed using Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to meet Taqman[®] requirements and were designed to bind to separate exons to avoid false positive results arising from amplification of contaminating genomic DNA. The primer nucleotide sequences are shown in Table 1.

The amplified products were electrophoresed on 2% (w/v) agarose gels, stained with ethidium bromide, and then imaged using a Bio-Rad Gel-Doc fluorescent image analyzer. The integrated densities were then calculated using Scion image analysis software and normalized to the house-keeping gene GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) to permit semi-quantitative comparisons in mRNA levels as previously described [30, 31].

Gene	Annealing temperature (°C)	Product size (base pairs)	Sequences (5'to 3')	GenBank accession number
Aggrecan	62	110	Forward: ACTTCCGCTGGTCAGATGGA Reverse: TCTCGTGCCAGATCATCACC	NM_013227
Collagen II	65	106	Forward: CAACACTGCCAACGTCCAGAT Reverse: CTGCTTCGTCCAGATAGGCAAT	NM_000393
SOX9	68	101	Forward: ACACACAGCTCACTCGACCTTG Reverse: GGAATTCTGGTTGGTCCTCTCTT	NM_000346
MMP1	68	84	Forward: CTGTTTCAGGGACAGAATGTGCT Reverse: TCGATATGCTTCACAGTTCTAGGG	NM_002421
MMP3	65	138	Forward: TTTTGGCCATCTCTTCCTTCA Reverse: TGTGGATGCCTCTTGGGTATC	NM_002422
MMP13	65	96	Forward: TCCTCTTCTTGAGCTGGACTCATT Reverse: CGCTCTGCAAACTGGAGGTC	NM_002427
GAPDH	60	225	Forward: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC Reverse: GAAGATGGTGTATGGGATTTC	NM_002046

Table 1 Primers used for semi-quantitative RT-PCR.

2.9 Gelatin zymography

Pro-MMP-2 and MMP-9 in the conditioned medium were detected by gelatin zymography as previously described [32]. The samples were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using a 10% acrylamide gel containing 0.1 mg/ml of gelatin (Sigma-Aldrich, USA) under non-reducing conditions at 4°C. After electrophoresis, SDS in the gel was removed by rinsing with 2.5% Triton-X 100 pH 7.5. The gel was then incubated at 37°C in the incubating buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, 0.02% NaN₃) for 18 h. After incubation, the gel was stained with 0.1% Coomassie brilliant blue R250 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) in 50% methanol /10% acetic acid, and destained with 10% acetic acid /50% methanol. The gelatinolytic activity was analyzed using Scion image software (Scion Corporation, USA).

3 Results

3.1 *A. galanga* extract inhibited IL-1β-induced degradation of extracellular matrix in porcine cartilage explants

To investigate the effects of *A. galanga* extract on extracellular matrix degradation, porcine cartilage explants were incubated with pro-inflammatory cytokine, IL-1β (at 25 ng/ml) with a range of doses of *A. galanga* extract. After 3 days of treatments the cartilage tissue was analyzed for uronic content and the culture media were analyzed for s-GAG and HA release. The results showed that the IL-1β caused a 20% decrease in

the uronic acid content of the cartilage over 3 days (data not shown) and the release of extracellular matrix (ECM) components, s-GAG and HA into the culture medium was increased 50% and 60%, respectively (Fig. 1A). The *A. galanga* extract at 25–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dose-dependently inhibited the loss of uronic acid from cartilage (data not shown) and decreased the release of s-GAG and HA to the medium (Fig. 1A). The effect of the *A. galanga* extract was found to be comparable to the inhibitory effects detected in the same test system with the positive control, Diacerein[®] (0.0625–1 μM) (Fig. 1B).

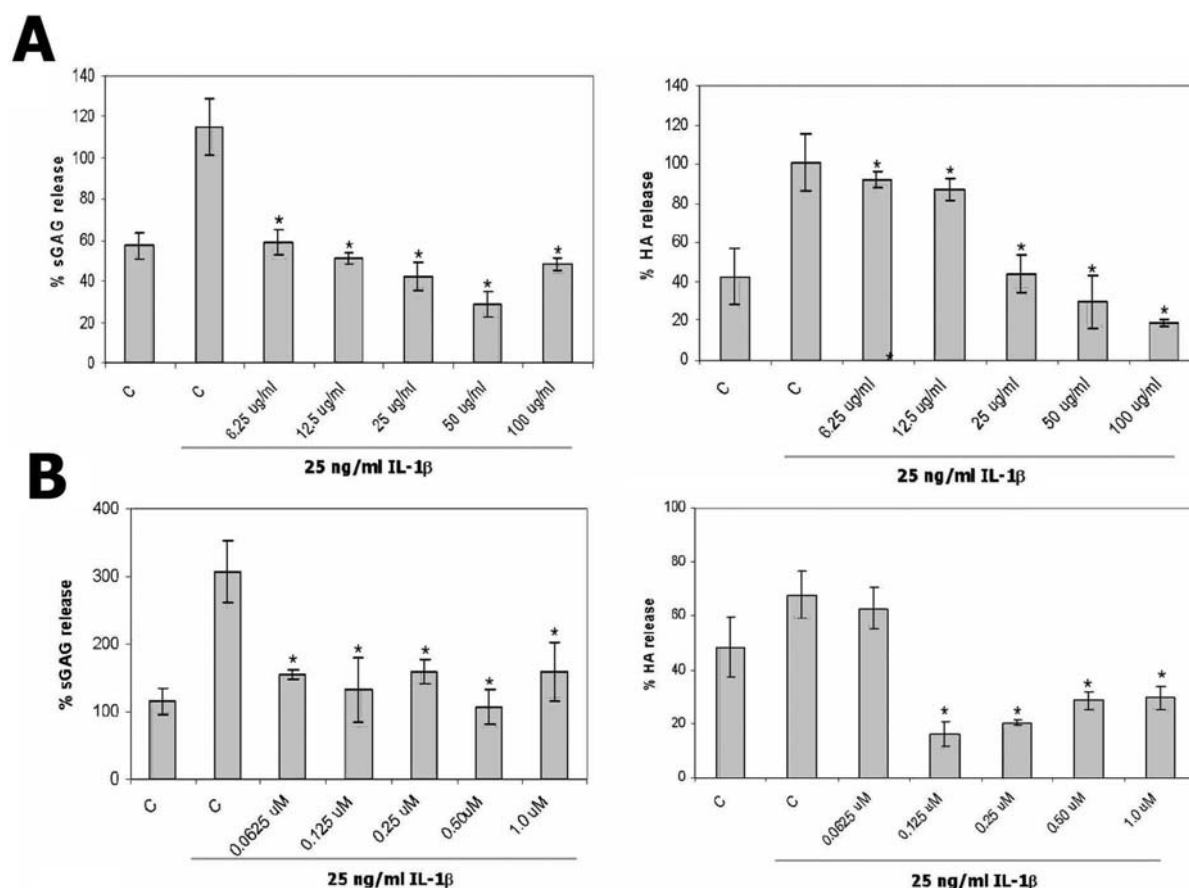


Fig. 1 Effect of *A. galanga* extract (A) and Diacerein[®] (B) on the release of s-GAG and HA to media from porcine cartilage explants.

Porcine cartilage explants were cultured with IL-1 β (25 ng/ml) in the presence and absence of the *A. galanga* hexane extract (at concentration 6.25 – 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or Diacerein[®] (at concentration 0.0625–1 μM) for 3 days.

* Denoted value that was significant different ($p < 0.05$) from the IL-1 β treated control.

3.2 Effect of *A. galanga* extract on the s-GAG production/release in SW1353 cells and in human synovial fibroblasts

Having obtained evidence that *A. galanga* extract was able to inhibit cartilage degradation driven by IL-1 β using the cartilage explant culture model, additional experiments were carried out with a human chondrocyte-like cell line SW1353, and with cultured primary human synovial fibroblasts to explore further its mode of action. The cells were investigated at confluency when they had accumulated some pericellular matrix from this cell layer. It was found that the untreated SW1353 cells and synovial fibroblasts released $2.8 \pm 0.5\%$ and $5.0 \pm 0.6\%$ of s-GAG, respectively into the culture medium (Fig. 2A, 3A). When the samples were treated with IL-1 β (10 ng/ml), a significant increase was observed in the basal s-GAG release up to $10.8 \pm 0.2\%$ (SW1353) and $14.0 \pm 0.4\%$ (synovial fibroblasts). The *A. galanga* extract treatment of SW 1353 increased the sGAG release relative to total sGAG (% sGAG release). With the synovial fibroblasts the *A. galanga* extract inhibited the small IL-1 β increase and further suppressed release below the control untreated value. Diacerein[®] in these cell systems showed no inhibition of IL-1 β stimulated release and at high dose (~ 2.5 – $5 \mu\text{M}$) it appeared to enhance the production of s-GAG in both SW1353 cells and synovial fibroblasts (Fig. 2B, 3B) causing even greater release into the culture medium.

3.3 Effect of *A. galanga* extract on the Hyaluronan production/release in SW1353 cells and in human synovial fibroblasts

In the same cell systems there was also significant release of hyaluronan (HA) into the culture medium and SW1353 cells with IL-1 β showed a significant increase ($\sim 50\%$). The *A. galanga* extract was shown to inhibit this IL-1 β -stimulated release of HA (Fig. 2A). With synovial fibroblasts the control release of HA was small but significant and IL-1 β (10 ng/ml) slightly stimulated the HA release (Fig 3A). Diacerein[®] at the high dose (~ 2.5 – $5 \mu\text{M}$) was also effective in inhibiting the HA release from SW1353 and synovial fibroblast cultures (Fig. 2B, 3B).

3.4 Effect of *A. galanga* extract on the IL-1 β -induced pro-MMP-2 production and expression of MMP-1, -3 and -13 mRNA

As metalloproteinases have an important role in the regulation of extracellular matrix turnover and are typically highly expressed in tissues in joint disease we investigated the expression of some selected metalloproteinases to understand if *A. galanga* extract may have activity in suppressing their expression. To assess the gelatinases (MMP-2 and MMP-9), gelatin zymography experiments have been performed and it was indicated that chondrosarcomas (SW1353 cells) and synovial fibroblasts in culture produced small amounts of pro-MMP2 and pro-MMP-9 (Fig 4). When confluent SW1353 cells and synovial fibroblasts were treated with IL-1 β (10ng/ml) for 24 h, the level of proMMP-2

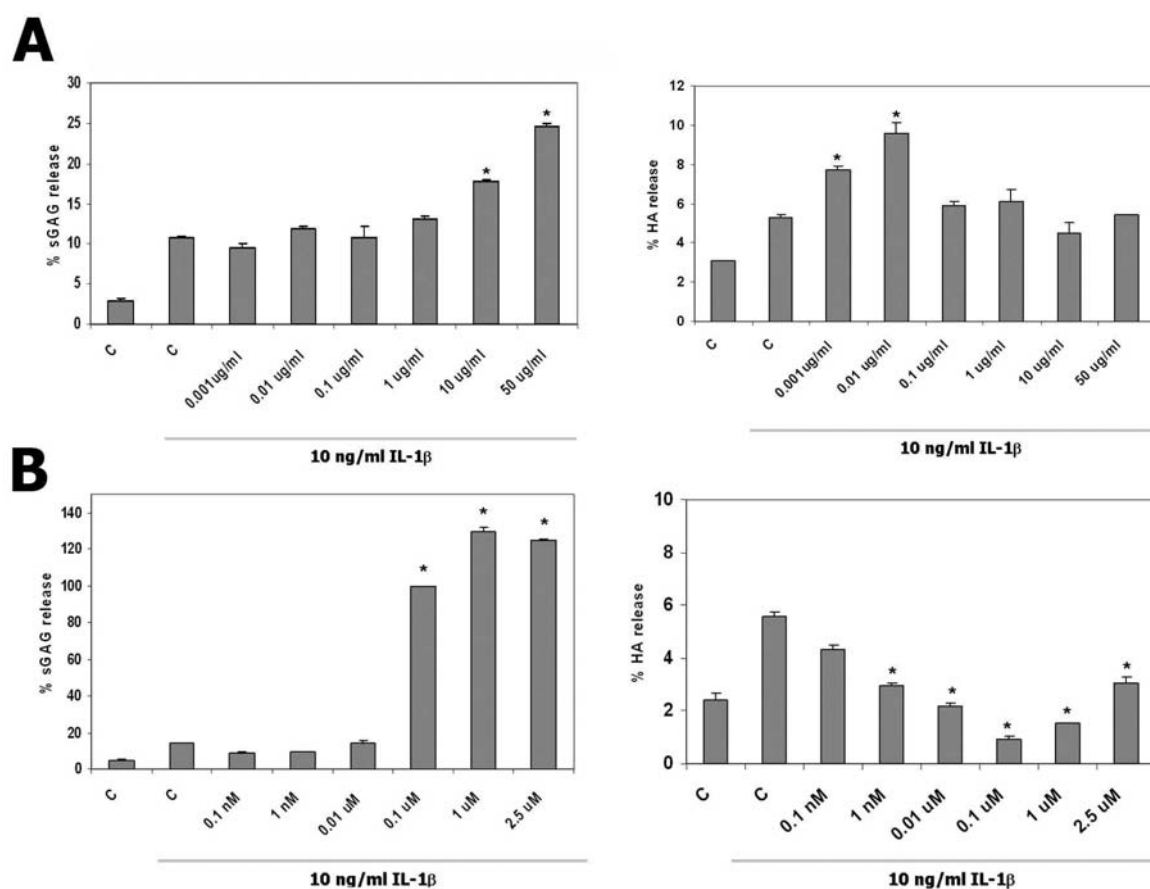


Fig. 2 Effect of *A. galanga* extract (A) and Diacerein[®] (B) on the release of s-GAG and HA to media from chondrosarcomas (SW1353).

Confluent chondrosarcomas (SW1353) were cultured with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence and absence of the *A. galanga* hexane extract (at concentration 0.001 – 50 μ g/ml) or Diacerein[®] (at concentration 0.1 nM -2.5 μ M) for 24 h.

* Denoted value that was significant different ($p < 0.05$) from the IL-1 β treated control.

and -9 in the conditioned medium of SW1353 and human synovial fibroblasts showed a small increase (about 1.6 and 1.8 fold, respectively), compared with the untreated control cells (Fig. 4). The *A. galanga* extract (1-50 μ g/ml) suppressed the IL-1 β -induced pro-MMP-2 production in a dose-dependent manner with a maximal inhibition at 50 μ g/ml of 73.5% and 68.7%, in SW1353 cells and synovial fibroblasts, respectively. Diacerein[®] (0.001-2.5 μ M) also effectively suppressed the production of proMMP-2 and -9.

To assess other important metalloproteinases, we investigated the expression of MMP-1,-3 and -13 genes by semi-quantitative RT-PCR. The expression of MMP-1,-3, and -13 were strongly increased in confluent SW1353 cells treated with IL-1 β (10 ng/ml) for 24 h (Fig. 5). The effects of *A. galanga* extract showed strong inhibition (74%) of MMP-1 expression, but only a small inhibition of MMP-3 (17%) and MMP-13 (12%). Diacerein[®] only showed inhibition of their expression (44.4, 37.3 and 53.6% reduction, respectively) at the highest dose (2.5 μ M) (Fig. 6). The synovial fibroblast cultures also showed

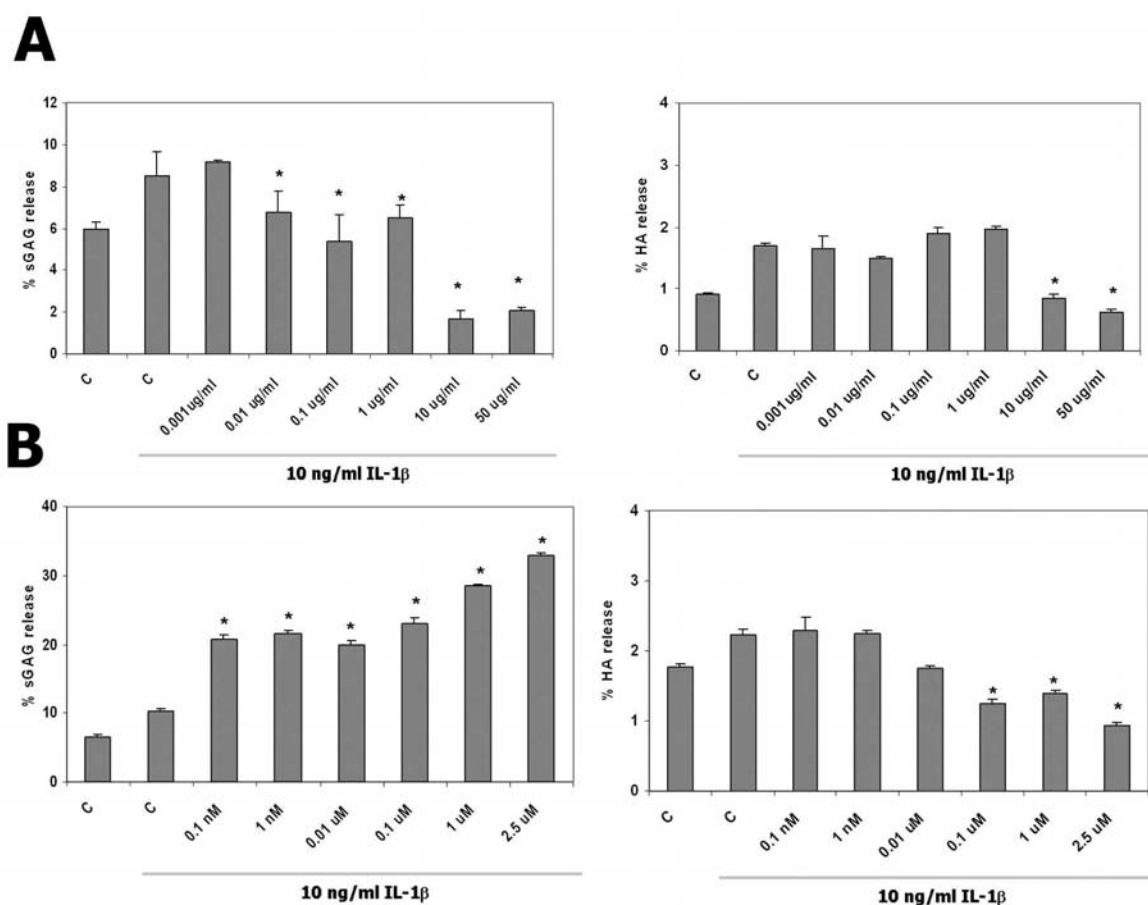


Fig. 3 Effect of *A. galanga* extract (A) and Diacerein[®] (B) on the release of s-GAG and HA to media from human synovial fibroblasts.

Confluent human synovial fibroblasts were cultured with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence and absence of the *A. galanga* hexane extract (at concentration 0.001 – 50 μ g/ml) or Diacerein[®] (at concentration 0.1 nM – 2.5 μ M) for 24 h.

* Denoted value that was significant different ($p < 0.05$) from the IL-1 β treated control.

increased expression of the MMP when treated with IL-1 β (Fig. 7). The *A. galanga* extract was more effective at reducing their expression in the synovial fibroblasts than in the SW1353 cells and at high dose (10 μ g/ml) it reduced the MMPs expression by 77%, 62% and 65% for MMP-1, -3 and -13, respectively (Fig. 7). Diacerein[®] also down-regulated the expression of MMP-1, -3, and -13 mRNAs (Fig. 8) in a dose-dependent manner (0.1 – 2.5 μ M) and gave maximum reduction at 2.5 μ M (81%, 89% and 75%, respectively).

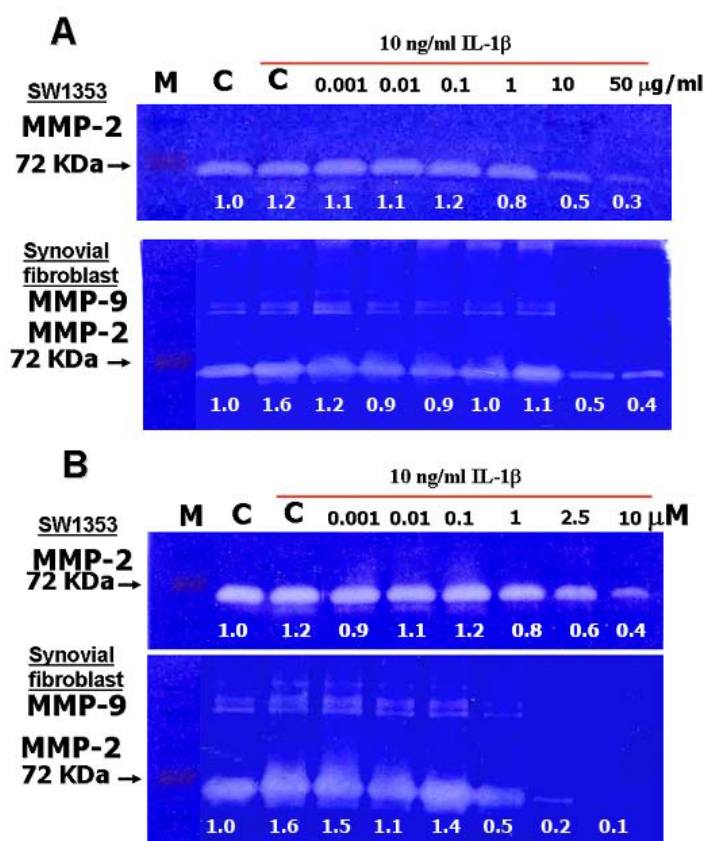


Fig. 4 Effect of (A) *A. galanga* extract, (B) Diacerein[®] on the production of gelatinases, MMP-2, and MMP-9.

Confluent SW1353 cells or synovial fibroblasts were treated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence and absence of *A. galanga* extract or Diacerein[®] for 24 h. and then the conditioned culture medium was analyzed by gelatin zymography as described in methods. Three independent experiments using cells of different origin gave reproducible results and typical data are shown. M, protein marker; C, control. The numbers denoted the quantify density value based on Scion image software.

3.5 Effect of *A. galanga* extract on the IL-1 β effects on the expression of aggrecan, collagen type II, and SOX9 expression

Since the maintenance of cartilage matrix is a balance between biosynthesis and degradation an important factor in addition to degradation is the continued biosynthetic activity of the cells. The effects of the *A. galanga* extract were thus assessed on the gene expression in the SW1353 cells of the cartilage macromolecules such as aggrecan, collagen and the key chondrocyte transcription factor SOX9. In response to 10 ng/ml of IL-1 β , collagen type II and SOX9 expression at 24 h decreased by (12% and 56%, respectively) compared to the untreated control culture, (Fig. 5). In the presence of the *A. galanga* extract collagen type II gene expression with IL-1 β was further increased. For SOX9

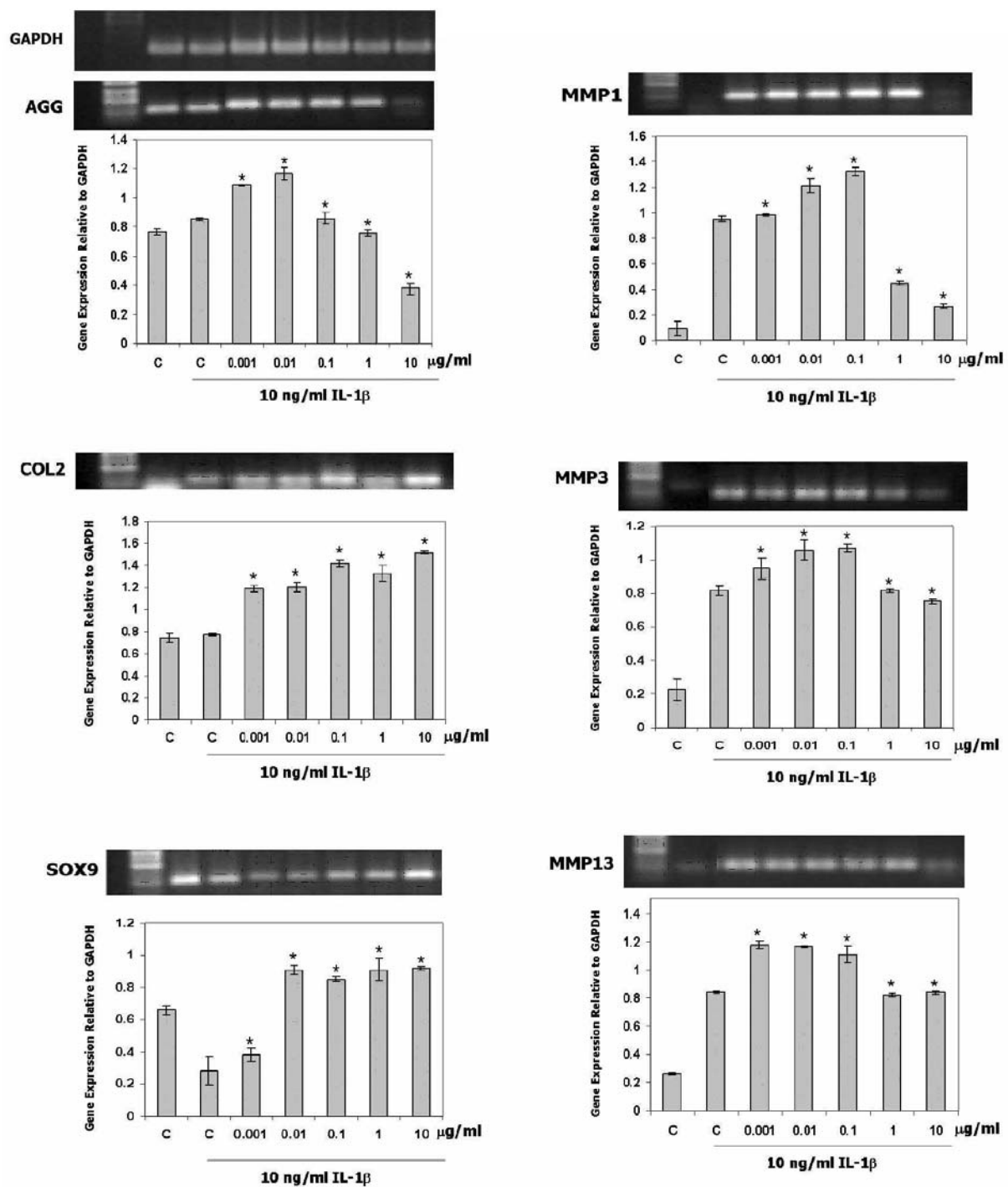


Fig. 5 Effect of *A. galanga* extract on the mRNA expression of cartilage genes (AGG, COL2 and SOX9) and proteinases (MMP-1, -3, -13).

Confluent SW1353 cells were cultured with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence and absence of the *A. galanga* extract for 24 h.

* Denoted value that was significantly different ($p < 0.05$) from the IL-1 β treated control.

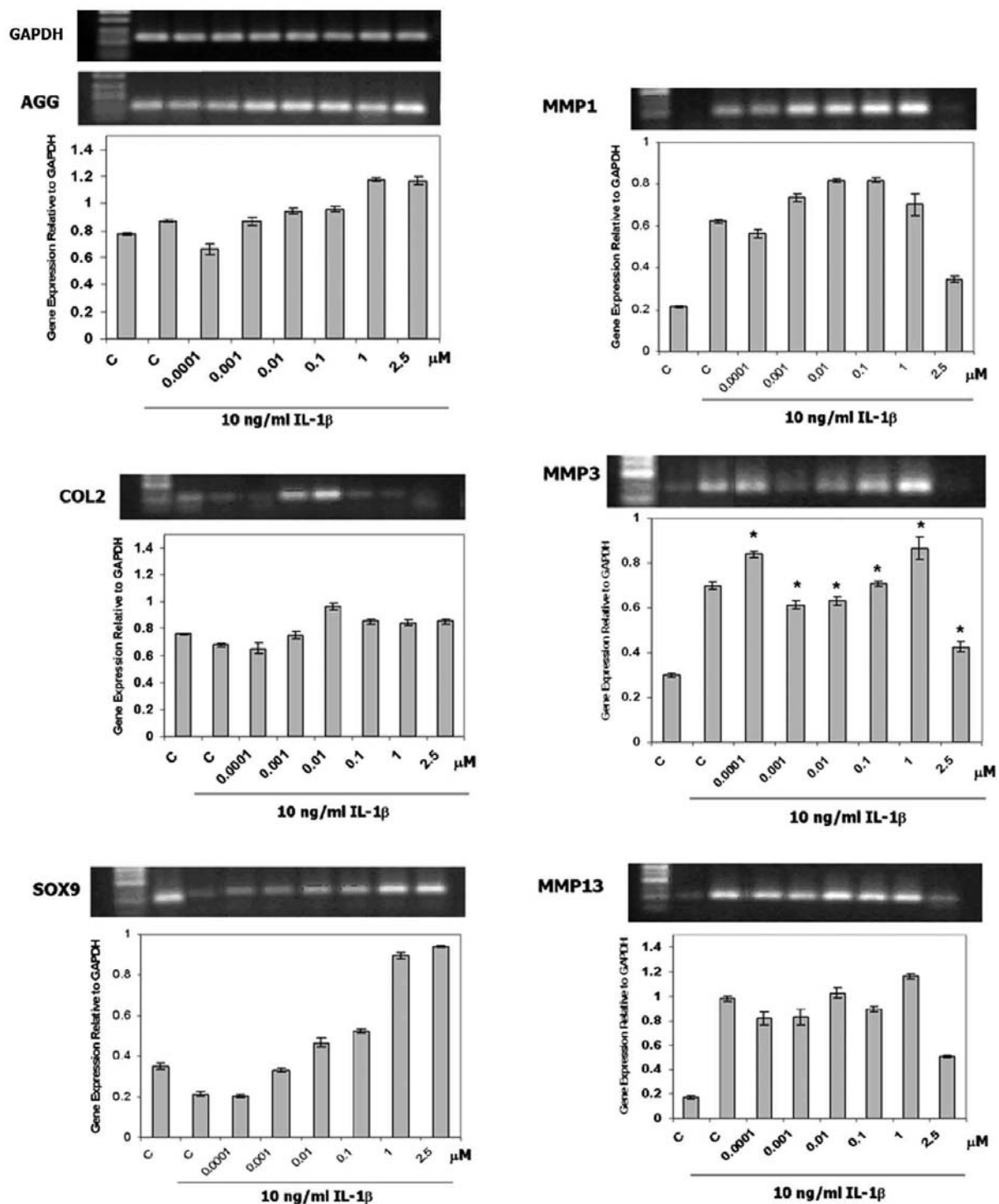


Fig. 6 Effect of Diacerein® on the mRNA expression of cartilage genes (AGG, COL2 and SOX9) and proteinases (MMP-1, -3, -13).

Confluent SW1353 cells were cultured with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence and absence of the Diacerein® for 24 h. AGG, aggrecan; COL2, collagen type II; SOX, SRY-type HMG box; MMP, matrix metalloproteinase.

* Denoted value that was significant different ($p < 0.05$) from the IL-1 β treated control.

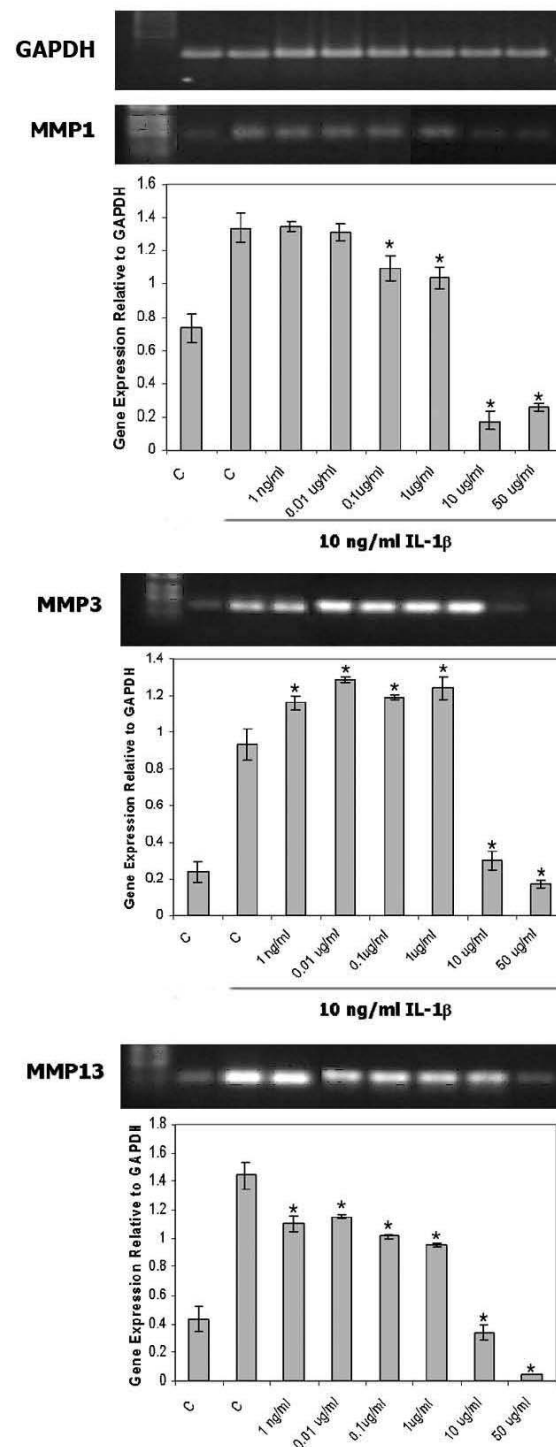


Fig. 7 Effect of *A. galanga* extract on the mRNA expression of proteinases (MMP-1, -3, -13).

Confluent human synovial fibroblasts in the 25-cm³ flasks were cultured with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence and absence of the *A. galanga* extract for 24 h.

* Denoted value that was significant different ($p < 0.05$) from the IL-1 β treated control.

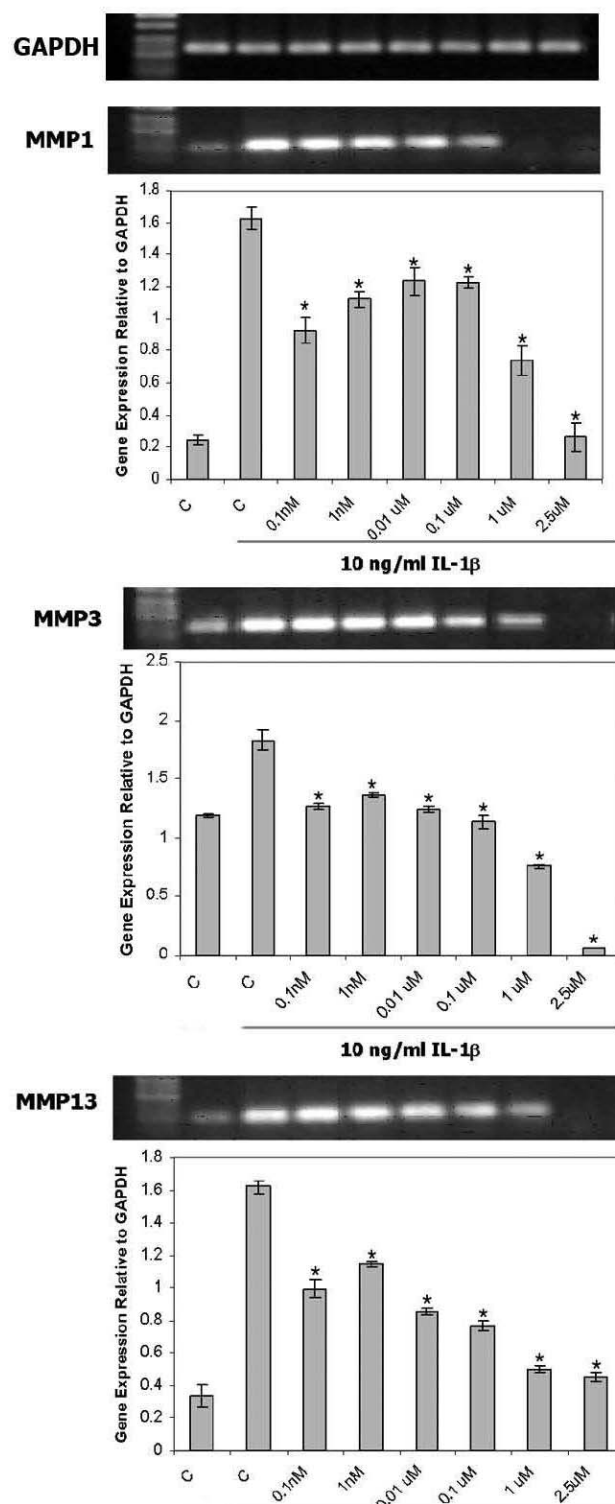


Fig. 8 Effect of Diacerein[®] on the mRNA expression of proteinases (MMP-1, -3, -13). Confluent human synovial fibroblasts were cultured with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence and absence of the Diacerein[®] for 24 h.

* Denoted value that was significant different ($p < 0.05$) from the IL-1 β treated control.

the *A. galanga* extract reversed the IL-1 β inhibition in dose-dependent way (1 ng/ml – 10 μ g/ml) and at high dose it exceeded the non- IL-1 β control level (Fig. 5). Aggrecan gene expression slightly increased (11%) with IL-1 β treatment compared to the untreated control. *A. galanga* extract at a low dose (1 ng/ml – 0.1 μ g/ml) enhanced aggrecan gene expression but, in contrast, at a high dose (0.1–10 μ g/ml), there was inhibition of gene expression to down to a level below that which was observed as the control value. Diacerein[®] (0.01 – 2.5 μ M) also showed some stimulation at higher doses for aggrecan and SOX9 gene expression in the presence of IL-1 β , whereas there was only a slight effect on collagen type II gene expression (Fig. 6).

4 Discussion

Arthritis is a major debilitating disease and affects millions of people all over the world. Part of the process that leads to pain and disability is the degeneration and eventual loss of articular cartilage. This involves a range of growth factor and cytokine responses that lead to matrix degradation driven by matrix proteinases such as MMPs and aggrecanases. The inflammatory cytokine IL-1 β is involved in a variety of pathological processes, such as the response to infection, activated lymphocyte products, microbial toxins, and other stimuli [33]. It has particularly damaging effects on articular cartilage as it induces matrix MMPs and inhibits ECM synthesis by chondrocytes and suppresses chondrocyte proliferation [34].

Diacerein[®] (4,5-diacetoxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracene-2-carboxylic acid) has been used in the long-term treatment of OA [35–37] and it is currently under evaluation as a disease-modifying OA drug in randomized placebo-controlled clinical trials of patients with OA of the hip and knee. The efficacy of Diacerein[®] has been well documented in animal models including the post-contusive rabbit model and the accelerated canine model of OA [38, 39]. It has been shown to inhibit pro-inflammatory cytokine synthesis and activity, particularly for IL-1 β [39] and *in vitro* experiments showed it was able to inhibit IL-1 β induced collagen synthesis [40]. In OA animal models, this drug has shown to suppress cartilage matrix degradation. In the present study the results showed that Diacerein[®] could significantly inhibit the release of cartilage matrix proteoglycans and pro-MMP-2 and -9, when cartilage explants were stimulated with IL-1 β . Moreover, it was also shown to down-regulate the expression of the MMP-1, -3 and, -13 genes, which is in complete agreement with the previous study [41].

The present study was carried out to evaluate the effect of the hexane extract of the rhizomes of *A. galanga* on some activities relevant to joint degeneration. The initial experiments established that the *A. galanga* extract was able to inhibit proteoglycan and HA loss from articular cartilage explants stimulated with IL-1 β for 3 days. It thus contained an activity of potential benefit in reducing matrix degradation. Furthermore in subsequent work it showed no cytotoxic effects on cells, which might otherwise contribute to the inhibition of matrix damage. In order to assess further the possible mode of action of the *A. galanga* extract its activity was investigated in two cell systems (SW1353 cells

and synovial fibroblasts) looking at proteoglycan and HA release from cell layer and on gelatinase activity and other MMP and chondrocyte gene expression. The proteoglycan and HA release is likely to be a combined effect of degradative release from the cell layer and changes in rates of synthesis and secretion from the cell into the cell layer and into the medium. The effects of the *A. galanga* extract thus appear to be either by inhibiting IL-1 β stimulated cell layer release or by inhibiting IL-1 β stimulated increase in synthesis. Both chondrosarcomas and synovial fibroblasts are relevant models for assessing ECM molecule release as a synthetic process. However, this process might be via multiple mechanisms and must be tested in the future. As it also appeared to have (1) some inhibitory actions in SW1353 cells on pro-gelatinase expression (MMP-2, MMP-9), (2) some inhibitory effect on MMP-1 and MMP-3 and, (3) some small effect on MMP-13, it appears that at least some of its action in suppressing cytokine-stimulated matrix degradation may be to decrease extracellular proteinase activity. Inhibition of mRNA for the matrix-degrading enzymes, MMP-1, -3 and -13, in synovial fibroblasts suggests that *A. galanga* extract may also suppress proteinase action in adjacent synovial tissue, thus affording additional protection to articular cartilage. It will require further studies to establish if *A. galanga* extract can reduce arthritis-associated inflammation in synovial membranes and MMPs production from this tissue.

The effects of *A. galanga* extract on key cartilage genes include some up-regulation of type II collagen, aggrecan and SOX9 expression, potentially indicating enhanced reparative activity, although there was some inhibition of aggrecan expression at high dose. To substantiate these effects more detailed studies are necessary in cartilage chondrocytes rather than SW1353 cells. It will also be necessary to evaluate signaling pathways and the environmental effects of fibroblast and chondrocytes, such as the release of proinflammatory cytokines in comparison with Diacerein®. To assess possible cytotoxicity of *A. galanga*, we determined LDH levels released from explants and cell cultures, which showed there was no evidence of increased cell death. These interesting *in vitro* effects of *A. galanga* extract indicate potential modes of action that might be similar to the commercially available drug, Diacerein®, suggesting that it is a good candidate for further *in vivo* evaluation as a chondroprotective agent and it may in the future find use as an adjunct to other anti-arthritic and anti-inflammatory treatments.

Acknowledgment

The Thailand Research Fund (TRF Advanced Research Scholar, Grant No. BRG 4780018 (to P.K.), the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, Grant No. PHD/0121/2544, the graduate school, Chiang Mai University (to P.P.) and the National Research Council of Thailand (Research Program of Drug, Chemical, Medical Material and Equipment) jointly funded this work.

References

- [1] P.M. van der Kraan and W.B. van den Berg: “Anabolic and destructive mediators in osteoarthritis”, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, Vol. 3, (2000), pp. 205–211.
- [2] F.J. Blanco, Y. Geng and M. Lotz: “Differentiation-dependent effects of IL-1 and TGF-beta on human articular chondrocyte proliferation are related to inducible nitric oxide synthase expression”, *J. Immunol.*, Vol. 154, (1995), pp. 4018–4026.
- [3] A.R. Shikhman, K. Kuhn, N. Alaaeddine and M. Lotz: “N-acetylglucosamine prevents IL-1 beta-mediated activation of human chondrocytes”, *J. Immunol.*, Vol. 166, (2001), pp. 5155–5160.
- [4] A.M. Badger, M.N. Cook, B.A. Swift, T.M. Newman-Tarr, M. Gowen and M. Lark: “Inhibition of interleukin-1-induced proteoglycan degradation and nitric oxide production in bovine articular cartilage/chondrocyte cultures by the natural product, hymenialdisine”, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Vol. 290, (1999), pp. 587–593.
- [5] M.P. Vincenti, I.M. Clark and C.E. Brinckerhoff: “Using inhibitors of metalloproteinases to treat arthritis. Easier said than done?”, *Arthritis Rheum.*, Vol. 37, (1994), pp. 1115–1126.
- [6] P.G. Mitchell, H.A. Magna, L.M. Reeves, L.L. Lopresti-Morrow, S.A. Yocum, P.J. Rosner, K.F. Geoghegan and J.E. Hambor: “Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage”, *J. Clin. Invest.*, Vol. 97, (1996), pp. 761–768.
- [7] P. Reboul, J.P. Pelletier, G. Tardif, J.M. Cloutier and J. Martel-Pelletier: “The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis”, *J. Clin. Invest.*, Vol. 97, (1996), pp. 2011–2019.
- [8] Y. Okada, M. Shinmei, O. Tanaka, K. Naka, A. Kimura, I. Nakanishi, M.T. Bayliss, K. Iwata and H. Nagase: “Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium”, *Lab. Invest.*, Vol. 66, (1992), pp. 680–690.
- [9] G. Murphy, M.I. Cockett, P.E. Stephens, B.J. Smith and A.J. Docherty: “Stromelysin is an activator of procollagenase”, A study with natural and recombinant enzymes”, *Biochem. J.*, Vol. 248, (1987), pp. 265–268.
- [10] R.M. Hembry, M.R. Bagga, J.J. Reynolds and D.L. Hamblen: “Immunolocalisation studies on six matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMP-1 and TIMP-2, in synovia from patients with osteo- and rheumatoid arthritis”, *Ann. Rheum. Dis.*, Vol. 54, (1995), pp. 25–32.
- [11] F. Ollivierre, U. Gubler, C.A. Towle, C. Laurencin and B.V. Treadwell: “Expression of IL-1 genes in human and bovine chondrocytes: a mechanism for autocrine control of cartilage matrix degradation”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 141, (1986), pp. 904–911.
- [12] W.P. Arend and J.M. Dayer: “Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis”, *Arthritis. Rheum.*, Vol. 33, (1990), pp. 305–315.

- [13] M. Shinmei, K. Masuda, T. Kikuchi and Y. Shimomura: “The role of cytokines in chondrocyte mediated cartilage degradation”, *J. Rheumatol. Suppl.*, Vol. 18, (1989), pp. 32–34.
- [14] J.P. Pelletier, R. McCollum, J.M. Cloutier and J. Martel-Pelletier: “Synthesis of metalloproteases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process”, *J. Rheumatol. Suppl.*, Vol. 43, (1995), pp. 109–114.
- [15] H. Muir: “The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules”, *Bioessays.*, Vol. 17, (1995), pp. 1039–1048.
- [16] J.P. Urban: “The chondrocyte: a cell under pressure”, *Br. J. Rheumatol.* Vol. 33, (1994), pp. 901–908.
- [17] D. Eyre: “Collagen of articular cartilage”, *Arthritis. Res.*, Vol. 4, (2002), pp. 30–35.
- [18] G. Rizkalla, A. Reiner, E. Bogoch and A.R. Poole: “Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease”, *J. Clin. Invest.*, Vol. 90, (1992), pp. 2268–2277.
- [19] J.R. Matyas, M.E. Adams, D. Huang and L.J. Sandell: “Discoordinate gene expression of aggrecan and type II collagen in experimental osteoarthritis”, *Arthritis. Rheum.*, Vol. 38, (1995), pp. 420–425.
- [20] C.B. de Crombrughe, V. Lefebvre and K. Nakashima: “Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation”, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, Vol. 13, (2001), pp. 721–727.
- [21] Y. Li, S.R. Tew, A.M. Russell, K.R. Gonzalez, T.E. Hardingham and R.E. Hawkins: “Transduction of passaged human articular chondrocytes with adenoviral, retroviral, and lentiviral vectors and the effects of enhanced expression of SOX9”, *Tissue. Eng.* Vol. 10, (2004), pp. 575–584.
- [22] H. Matsuda, Y. Pongpiriyadacha, T. Morikawa, M. Ochi and M. Yoshikawa: “Gastro-protective effects of phenylpropanoids from the rhizomes of *Alpinia galanga* in rats: structural requirements and mode of action”, *Eur. J. Pharmacol.* Vol. 471, (2003), pp. 59–67.
- [23] H. Matsuda, T. Morikawa, H. Managi and M. Yoshikawa: “Antiallergic principles from *Alpinia galanga*: structural requirements of phenylpropanoids for inhibition of degranulation and release of TNF- α and IL-4 in RBL-2H3 cells”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Vol. 13, (2003), pp. 3197–3202.
- [24] R. Grzanna, L. Lindmark and C.G. Frondoza: “Ginger—an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions”, *J. Med. Food.*, Vol. 8, (2005), pp. 125–132.
- [25] T. Morikawa, S. Ando, H. Matsuda, S. Kataoka, O. Muraoka and M. Yoshikawa: “Inhibitors of nitric oxide production from the rhizomes of *Alpinia galanga*: structures of new 8-9’ linked neolignans and sesqueneolignan”, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. Vol. 53, (2005), pp. 625–630.

- [26] T. Decker and M.L. Lohmann-Matthes: “A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity”, *J. Immunol. Methods*. Vol. 115, (1988), pp. 61–69.
- [27] R.W. Farndale, D.J. Buttle and A.J. Barrett: “Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue”, *Biochim. Biophys. Acta.*, Vol. 883, (1986), pp. 173–177.
- [28] N. Blumenkrantz and G. Sboe-Hansen: “New method for quantitative determination of uronic acids”, *Anal. Biochem.*, Vol. 54, (1973), pp. 484–489.
- [29] P. Kongtawelert and P. Ghosh: “A method for the quantitation of hyaluronan (hyaluronic acid) in biological fluids using a labeled avidin-biotin technique”, *Anal. Biochem.*, Vol. 185, (1990), pp. 313–318.
- [30] L. Marchuk, P. Sciore, C. Reno, C.B. Frank and D.A. Hart: “Postmortem stability of total RNA isolated from rabbit ligament, tendon and cartilage”, *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 1379, (1998), pp. 171–177.
- [31] R. Boykiw, P. Sciore, C. Reno, L. Marchuk, C.B. Frank and D.A. Hart: “Altered levels of extracellular matrix molecule mRNA in healing rabbit ligaments”, *Matrix Biol.*, Vol. 17, (1998), pp. 371–378.
- [32] A. Ito, T. Nose, S. Takahashi and Y. Mori: “Cyclooxygenase inhibitors augment the production of pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) in rabbit articular chondrocytes”, *FEBS Lett.*, Vol. 360, (1995), pp. 75–79.
- [33] D.D. Taub and J.J. Oppenheim: “Chemokines, inflammation and the immune system”, *Ther. Immunol.*, Vol. 1, (1994), pp. 229–246.
- [34] J.A. Mengshol, M.P. Vincenti, C.I. Coon, A. Barchowsky and C.E. Brinckerhoff: “Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3”, *Arthritis. Rheum.*, Vol. 43, (2000), pp. 801–811.
- [35] M. Lingetti, P.L. D’ambrosio, F. Grezia, P. Sorentino and E. Lingetti: “A controlled study in the treatment of osteoarthritis with diacerein (Artrodar)”, *Curr. Therp. Res.*, Vol. 31, (1982), pp. 408–412.
- [36] R. Marcolonge, A. Fioravanti, S. Adami, E. Tozzi, M. Mian and A. Zampieri: “Efficacy and tolerability of diacerein in the treatment of osteoarthritis”, *Curr. Therp. Res.*, Vol. 37, (1988), pp. 529–536.
- [37] M. Nguyen, M. Dougados, L. Berdah and B. Amor: “Diacerein in the treatment of osteoarthritis of the hip”, *Arthritis. Rheum.*, Vol. 37, (1994), pp. 529–536.
- [38] B. Mazieres and L. Berda: “Effect of diacerein (ART 50) on an experimental post-contusive model of OA”, *Osteoarthritis Cart.*, Vol. 1, (1993), p. 47.
- [39] K.D. Brandt, G. Smith, S.Y. Kang, S. Mayer, B. O’Corner and M. Albrecht: “Effects of diacerein in an accelerated canine model of osteoarthritis”, *Osteoarthritis Cart.*, Vol. 5, (1997), pp. 438–439.

- [40] G.N. Smith, Jr., S.L. Myers, K.D. Brandt, E.A. Mickler and M.E. Albrecht: “Diacerein treatment reduces the severity of osteoarthritis in the canine cruciate-deficiency model of osteoarthritis”, *Arthritis Rheum.*, Vol. 42, (1999), pp. 545–554.
- [41] T. Tamura, N. Kosaka, J. Ishiwa, T. Sato, H. Nagase and A. Ito: “Rhein, an active metabolite of diacerein, down-regulates the production of pro-matrix metalloproteinases-1, -3, -9 and -13 and up-regulates the production of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in cultured rabbit articular chondrocytes”, *Osteoarthritis. Cartilage.*, Vol. 9, (2001), pp. 257–263.

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

สารสกัดจากข่าไทย (*Alpinia galanga*) และฤทธิ์ทางชีวภาพทางด้านลดการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน
สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

- 5 ชีวเคมีในส่วนที่เกี่ยวข้องกับผลของสารสกัดข่า (*Alpinia galanga*) ต่อด้านการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน
ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

พืชในตระกูล Zingiberaceae โดยเฉพาะข่า *Alpinia galanga*

เป็นพืชที่มีการเพาะปลูกอย่างแพร่หลายโดยได้มีการนำมาใช้เป็นเครื่องปรุงในอาหารและใช้เป็นยาต้านการอักเสบ
แต่ฤทธิ์ที่แท้จริงของสารสกัดข่า ในแง่ของการต้านโรคข้อเสื่อมยังไม่เป็นที่เข้าใจและมีการศึกษากันมากนัก
10 ในการวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการศึกษา

ถึงผลของสารสกัดข่าต่อการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ:
อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (IL-1 β) โดยได้ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน
ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง และการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน ในเซลล์กระดูกอ่อนและเซลล์เยื่อข้อ
โดยมีวิธีการศึกษา คือการนำเอา กระดูกอ่อนผิวข้อจากสุกร

- 15 มาทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อ ด้วย อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า
ในภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดข่า และไดอะซอลีน (ยาด้านโรคข้อเสื่อม: positive control) เป็นเวลา 3 วัน
จากนั้นทำการศึกษาการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อโดยการวัดปริมาณ เอ็นไซม์ MMP-2 และ MMP-9
ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่ทำลายกระดูกอ่อน ตลอดจนสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบภายนอกเซลล์
ที่สลายออกมา ในน้ำเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ โกลโคซามิโนไกลแคน และ ไฮยาลูโรแนน
20 รวมทั้งวัดปริมาณกรดยูโรนิก ที่เหลืออยู่ในกระดูกอ่อนผิวข้อ

ในส่วนของเซลล์ ได้ทำการเพาะเลี้ยง เซลล์คอนโดรซาโคมาส์ (chondrosarcoma: SW1353)
และเซลล์เยื่อข้อ (synovial fibroblast) ในภาวะที่มีอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ร่วมกับสารสกัดข่า (hexane
extract) และไดอะซอลีน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณ สารโกลโคซามิโนไกลแคน,
ไฮยาลูโรแนน และเอ็นไซม์ MMP-2, MMP-9 ในน้ำเลี้ยงเซลล์ และสกัดอาร์เอ็นเอ จากเซลล์
25 มาทำการศึกษาการแสดงออก ของยีนโดยวิธี semi-quantitative RT-PCR.

จากการศึกษากัมมันตภาพของเอ็นไซม์ MMP-2 และ MMP-9

ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากคอนโดรซาโคมาส์ และเซลล์เยื่อข้อที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการอักเสบ
ในภาวะที่มีสารสกัดข่า 10 mg/ml ทำให้เอ็นไซม์ทั้งสองชนิดนี้ มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนั้น
ยังลดการแสดงออกของยีน MMP-1, MMP-3 และ MMP-13

- 30 ในส่วนของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สาระสำคัญในกระดูกอ่อนพบว่า สารสกัดข่าความเข้มข้น 10 mg/ml
นี้มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีน คอลลาเจน ชนิดที่ 2 และ SOX9 ในส่วนของยีน aggrecan พบว่าสารสกัดข่า

ที่ความเข้มข้นต่ำ มีผลในการเพิ่มการแสดงออกของยีน (0.001- 0.1 ug/ml) แต่ในความเข้มข้นสูง (0.1-10 ug/ml) นั้นมีผลในการลดการแสดงออกของยีน เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดข่า (hexane extract) มีฤทธิ์ในการลดการแสดงออกของยีนและ โปรตีน pro-MMPs และการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างสารชีวโมเลกุลที่สำคัญของกระดูกอ่อน

- 5 ดังนั้นจากผลการป้องกันการถูกทำลายของกระดูกอ่อน และการต้านการอักเสบ ของสารสกัดข่า (A. galanga , hexane extract) จึงน่าจะนำมาทำการศึกษาวิเคราะห์แยกสารสำคัญและพัฒนาเป็นยารักษาโรค โดยเฉพาะโรคข้อเสื่อมต่อไป

ภูมิหลังของศิลปวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

- โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis) เป็นโรคที่มีการเปลี่ยนแปลงของกระดูก
- 10 เมื่อเป็นเวลานานมากขึ้นกระดูก subchondral หนามากขึ้นและเจริญมากปรากฏให้เห็นเป็น osteophyte บริเวณปลายกระดูก และมักพบการทำลายของกระดูกอ่อนผิวข้อ
- ในปัจจุบันยังไม่มีทฤษฎีที่จำเพาะกับโรคข้อเสื่อมในระยะเริ่มแรกของโรค
- แม้จะสามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงได้จากภาพถ่ายรังสี แต่มักจะพบเมื่อมีการทำลายไปมากแล้ว
- การตรวจหาชิ้นส่วนของโปรตีโอไกลิแคน (proteoglycan) ภายในกระดูกอ่อนที่ถูกทำลายโดยเอนไซม์
- 15 รวมถึงชิ้น ส่วนที่มี กลัยโคซามิโนไกลิแคน (glycosaminoglycan) ติดอยู่ ผลของกระบวนการนี้จะทำให้เกิดการไม่สมดุล ของการสร้างและการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน สารกระตุ้นการอักเสบ เช่น
- อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และ toxic mediator ชนิดอื่นๆ ที่กระตุ้นเซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์เยื่อข้อ
- จะมีผลให้เกิดการเสียสมดุลของการสร้าง และ การทำลายของสารชีวโมเลกุลในกระดูกอ่อน
- โดยจะทำให้มีการเสื่อมสลายเพิ่มมากขึ้น และกระตุ้นให้มีการเกิด สภาวะ apoptosis ในเซลล์กระดูกอ่อน
- 20 (1;2) อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่เหนี่ยวนำ ให้มีการอักเสบ และการทำลายของกระดูกอ่อนในโรคข้อเสื่อม โดยจะ กดการสร้างเนื้อฟืนที่เป็นองค์ประกอบ
- สำคัญของกระดูกอ่อน และเพิ่มการเสียสภาวะสมดุล โดยทำให้มีการเกิดการทำลายเนื้อกระดูก (3;4)
- มีการศึกษาพบว่า เอนไซม์ matrix metalloproteinases (MMPs) จัดเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีผลต่อการ
- ทำลายของกระดูกอ่อนผิวข้อในโรคข้อ (5;6). MMP-1/collagenase 1, MMP-3/stromelysin 1, MMP-9/
- 25 gelatinase B and MMP-13/ collagenase 3 ถูกตรวจพบ ในเนื้อเยื่อข้อ (synovium) , น้ำเลี้ยงข้อ (synovial fluid) และในกระดูกอ่อนผิวข้อ ที่แยกได้จากข้อของ ผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ และโรคข้อเสื่อม
- และยังพบการ เกี่ยวโยงอย่างใกล้ชิดกับการเสื่อมสลายของกระดูก อ่อนผิวข้อในโรคดังกล่าวด้วย (7-11)
- นอกจากนั้น สารเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ ที่สร้างมาจาก monocytes/macrophages, เซลล์เยื่อข้อ
- หรือเซลล์กระดูกอ่อนที่เป็นโรค ข้อยังสามารถที่จะกระตุ้นให้มีการ สร้างเอนไซม์ในกลุ่ม proMMPs
- 30 ได้อีกด้วย (13-15) เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) เป็นเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงในกระดูกอ่อน

- และรับผิดชอบในการรักษาภาวะที่สมดุลย์ของการสร้าง และการเสื่อมสลายของสารชีวโมเลกุล ที่ทำหน้าที่เป็นเนื้อพื้ในกระดูกอ่อน (16-17) ภาวะการณ์ทำงานในด้านเมตาบอลิส์ ของเซลล์กระดูกอ่อน นี้เองจัดเป็นบทบาทสำคัญ ที่ทำให้เรามีความเข้าใจในภาวะการณ์ เกิดและการดำเนินไปของโรคข้อเสื่อม (18). โดยในภาวะการตอบสนองต่อโรคข้อเสื่อมในระยะเริ่มต้นนั้น
- 5 จะมีการเพิ่มขึ้นของยีนที่ควบคุมการสร้างสารชีวโมเลกุลที่สำคัญในกระดูกอ่อน ได้แก่ คอลลาเจน ชนิดที่ 2 และ aggrecan รวมถึงการสร้าง เป็น โมเลกุลพร้อมที่จะหลั่งออกมาจาก เซลล์กระดูกอ่อนสู่ภายนอกเซลล์อีกด้วย (19;20) สารชีวโมเลกุลชนิดโปรตีนที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง คือ SOX (SRV-type HMG box) ชนิด Sox9 เป็นสารที่จับได้กับสาย DNA ทำหน้าที่เป็น transcription factor ที่สำคัญในกระบวนการ chondrocyte differentiation
- 10 โดยทำหน้าที่ควบคุมยีนที่ควบคุมการสร้างการแสดงออกของ คอลลาเจน ชนิดที่ 2 , (Col2) และ aggrecan (21;22) การเสื่อมสลายของสารเนื้อพื้กระดูกอ่อนพบในระยะเริ่มของการเป็นโรคข้อเสื่อม ถึงแม้เซลล์กระดูกอ่อนเองจะพยายามปรับตัวให้มีการสร้างสารชีวโมเลกุลเพิ่มมากขึ้นเพื่อทดแทนส่วนที่ถูกทำลาย แต่ผลโดยรวมแล้ว การทำลายก็จะมากกว่าการถูกสร้างขึ้นใหม่ในระยะที่มีการดำเนินไปของโรคในระยะถัดมา
- 15 การสูญเสียสารชีวโมเลกุลที่ทำหน้าที่ ที่สำคัญ ประกอบกับ โครงสร้างที่เสียหาย จะทำให้เกิดการสูญเสียการทำ หน้าที่ของเนื้อเยื่อ การตายของเซลล์ และการสูญเสียเนื้อกระดูกได้ผิวข้อ ติดตามมา สมุนไพรไทย ที่ชื่อว่า ข่า, *Alpinia galanga* (B.L. Burtt) เป็นพืชล้มลุกที่มีลำต้นเป็นกอ มีเหง้าอยู่ใต้ดิน เหง้ามีสีน้ำตาลอมแดง มีเส้นแบ่งข้อเป็นช่วงสั้นๆ เนื้อในเหง้ามีสีขาวรสขมเผ็ดร้อน แต่ไม่เผ็ดเหมือนกับขิง มีกลิ่นหอมฉุน ข่าเป็นพืชใบเดี่ยว ใบยาวปลายใบมน ขอบใบเรียบ
- 20 ก้านใบยาวเป็นกาบหุ้มซ้อนกัน ดอกเป็นช่อสีขาวนวล ผลกลมสีแดงส้ม มีรสเผ็ดร้อน มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา มากมาย เช่น ใช้เป็นยาลดการบีบตัวของลำไส้, รักษาโรคผิวหนัง, แก้การอักเสบ และใช้อย่างแพร่หลาย ในการแพทย์แผนไทย (23;24) ส่วนที่เป็นเหง้า หรือ rhizomes ของพืชชนิดนี้ ถูกนำมาใช้ในการประกอบอาหาร ในแถบเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้
- ฤทธิ์ในการเป็นยารักษาโรคข้อ พบว่าสามารถที่จะไปกุดการสร้างสาร prostaglandin
- 25 และมีผลในการยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 (25) นอกจากนั้น สารสกัดในชั้น acetone ของเหง้าข่า ยังสามารถยับยั้งฤทธิ์ของ lipopolysaccharide (LPS) ที่จะเหนี่ยวนำให้มีการสาร oxidant ที่สำคัญคือ nitric oxide (NO) ได้ (26) ในการศึกษาครั้งนี้ ต้องการที่จะพิสูจน์ถึงฤทธิ์ของ สารสกัดสำคัญตัวใหม่ เพื่อใช้ในการหยุดยั้งกระบวนการถูกทำลายของกระดูกอ่อน
- เนื่องมาจากการเหนี่ยวนำของ proinflammatory cytokines ซึ่งในที่นี้ เราเลือกใช้ อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า
- 30 เป็นสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดมีการอักเสบ และศึกษาถึงผลของสารสกัดข่า ที่ออกฤทธิ์ในแง่ของ การเป็นสารที่ใช้ป้องกันการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน chondroprotective effects

โดยจะศึกษาถึงผลในแง่ของการสร้างสารสำคัญในกระดูกอ่อน (ได้แก่ aggrecan, คอลลาเจน ชนิดที่ 2 และ SOX9) และศึกษาถึงผลต่อสารที่ทำหน้าที่ทำลายกระดูกอ่อน ได้แก่ เอ็นไซม์, pro-MMPs (ได้แก่ proMMPs-1, -3, -13) ในเซลล์คอนโดรซาโคม่า, เซลล์เยื่อผิวข้อ เพื่อพยายามที่จะศึกษาในเชิงลึกเกี่ยวกับกระบวนการการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุล และการนำสารสกัดนี้ไปใช้ในการรักษาต่อไป

5 คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 แสดงผลของสารสกัดข่า (Alpinia galanga) (A) และ Diacerein? (B) ต่อการหลั่ง s-GAG และ HA สู่อหารเลี้ยงเซลล์จากชิ้นกระดูกอ่อนสุกร

รูปที่ 2 แสดงผลของสารสกัดข่า (Alpinia galanga) (A) และ Diacerein? (B) ต่อการหลั่ง s-GAG และ HA สู่อหารเลี้ยงเซลล์จาก chondrosarcoma

10 รูปที่ 3 ผลของสารสกัดข่า A. alpinia (A), และ Diacerein? (B) ต่อการสร้าง gelatinase, MMP-2 และ MMP-9

รูปที่ 4 ผลของสารสกัดข่า A. galanga ต่อการแสดงออกของยีน Aggrecan, Collagen II, SOX9 และ MMP-1,-3, -13 ในเซลล์ chondrosarcoma

15 รูปที่ 5 ผลของ Diacerein? ต่อการแสดงออกของยีน Aggrecan, Collagen II, SOX9 และ MMP-1,-3, -13 ในเซลล์ chondrosarcoma

รูปที่ 6 ผลของสารสกัดข่า A. galanga ต่อการแสดงออกของยีน MMP-1, -3, -13 ในเซลล์ synovial fibroblast

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

วัสดุและวิธีการทดลอง

20 การเตรียม cartilage explants และการกระตุ้น

เลี้ยงชิ้นกระดูกอ่อนขนาด 3x3mm. ที่เตรียมได้จากกระดูกอ่อน metacarpophalangeal joint ของหนูอายุ 20-24 สัปดาห์ ใน serum-free-DMEM ที่มี 200 units/ml penicillin and 200 ug/ml streptomycin โดยเลี้ยงในสภาวะที่มี 5% CO₂ ที่ 37°C. เก็บน้ำเลี้ยง ชิ้นกระดูก ที่เวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการกระตุ้น (โดยนับให้เป็น day 0) แล้วเริ่มทำการกระตุ้น

25 โดยเลี้ยงชิ้นกระดูกในน้ำเลี้ยงที่มีสารกระตุ้นเป็นเวลา 3 วัน และเก็บน้ำเลี้ยง และชิ้นกระดูก มาวิเคราะห์ (โดยนับเป็น day 3) น้ำเลี้ยง day 0 และ 3 จะเก็บไว้ใน -20°C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ การกระตุ้น

สถานะการอักเสบ กระตุ้นโดย Recombinant human interleukin-1 beta (25 ng/ml)

เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายของกระดูก สารสกัดข่าความเข้มข้นต่างๆ

ที่ใช้กระตุ้นร่วมกับอินเตอร์ลิวคิน ใช้ที่ความเข้มข้น 6.25 – 10 mg/ml หรือ ยาไดอะซีรีนที่ใช้เป็น

30 positive control กระตุ้นที่ความเข้มข้น 0.0625- 1 mM การทดลองแต่ละครั้งจะมี การทดลองควบคุมคือ

ชิ้นกระดูกที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่ไม่มี อินเทอร์เน็ตวีนในมีเดีย การทดลองทำ 3 ซ้ำโดยใช้ชิ้นกระดูกจากหนูตัวเดียวกัน

การเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน HUMAN CONDROSARCOMA (SW1353) และเซลล์เยื่อข้อ HUMAN SYNOVIAL FIBROBLAST และการกระตุ้น

- 5 ทำการกระตุ้น Human chondrosarcoma cell line ชนิด SW1353 ที่ซื้อมาจาก American Type Culture Collection (Manassas, VA) ด้วยสารสกัดฆ่า ความเข้มข้นต่างๆ (0.001,0.01,0.1,1,10 mg/ml) ร่วมกับการกระตุ้น ให้มีภาวะการอักเสบด้วย 10 mg/ml human recombinant IL-1 β เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเซลล์เยื่อข้อนั้น แยกมา ได้จากเนื้อเยื่อข้อ โดยเลือกใช้ที่ passage 4 ที่เพาะเลี้ยงใน serum-free medium และทำการกระตุ้นเหมือนกับในเซลล์กระดูกอ่อน

10 **การวิเคราะห์ระดับไกลโคซามิโนไกลแคน**

การวิเคราะห์ระดับไกลโคซามิโนไกลแคนในมีเดียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นกระดูกและเซลล์ทำได้โดยใช้

dimethylmethylene blue (DMB) assay เพื่อการตรวจวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ sulfated glycosaminoglycans ในวิธีการวิเคราะห์นี้จะใช้ chondroitin sulfate C

- 15 (ที่ได้มาจากสารสกัดกระดูกอ่อนปลาฉลาม shark cartilage extract; Sigma-Aldrich, USA) เป็นสารมาตรฐาน โดยหลังจากเติมสารละลาย DMB ลงไปผสมกับสารมาตรฐาน หรือสารตัวอย่างแล้ว จะทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ 525 nm โดย micro-plate reader spectrophotometer.

การตรวจวัดระดับไฮยาลูโรแนน

- ระดับของไฮยาลูโรแนนที่มีอยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์จะทำการวิเคราะห์โดยวิธี competitive inhibition-based-ELISA ตามที่ได้มีการอธิบายไว้ก่อนหน้านี้ (27). การทดลองโดยย่อ ทำโดย
- 20 นำน้ำเลี้ยงเซลล์ตัวอย่าง ที่ต้องการตรวจหา ปริมาณไฮยาลูโรแนน หรือ สารตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นของไฮยาลูโรแนน ปริมาตร 175ml ที่ให้ทำปฏิกิริยาจับกัน ได้อย่างจำเพาะกับ of biotinylated-HA binding proteins (B-HABP) ปริมาตร 175 μ l โดยทำการ incubate น้ำเลี้ยงและสารมาตรฐานกับ B-HABPs เป็นเวลา 1 ชั่วโมงใน 1.5 ml tube ก่อน เติมลงไปบนแผ่น
- 25 polypropylene ที่ถูกเคลือบไว้ด้วยไฮยาลูโรแนน (HA from umbilical cord) และ block non-specific binding ด้วย 1% BSA in PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนแล้ว โดยเติมลงไปปริมาตร 100 μ L/well โดยหลังจากเติม mixture ลงไปแล้วทำการ incubate ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้เคาะสารละลายในเพลตออกและล้างเพลตสามครั้งด้วย phosphate buffered saline solution (0.05% Tween-20) จากนั้นทำการเติม anti-biotin peroxidase conjugate (Zymed Lab Inc, San Francisco, CA, USA) ที่ถูกเจือจางแล้วที่ความเข้มข้น 1:2000 ลงไปในเพลต ปริมาตร 100 μ L/well ทำการ incubate
- 30 ที่ 25°C for 1 hour ครบเวลาแล้วจึงล้าง จากนั้นทำการเติม peroxidase substrate ลงไปในทุก well (100 μ L/well) โดยหลังจาก incubate ที่ 25°C เป็นเวลา 20 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 50 μ l ของ 4 M H₂SO₄

ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492/690 ด้วย Titertek Multiskan M340 microplate reader.

ระดับของไฮยาลูโรแนนในน้ำเลี้ยงจะถูกคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

ทำการสกัด RNA monolayer cells โดยใช้ชุดสกัด Aurum total RNA purification kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) จากนั้นนำเอา RNA ปริมาณ 500 ng มาเปลี่ยนให้เป็น cDNA โดยใช้ RevertAid™ First Strand cDNA synthesis kit (MBI Fermentas, Germany) ทำการออกแบบ primers และ probe สำหรับยีนแต่ละชนิดโดยใช้โปรแกรม PrimerExpress 2.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) โดย primer nucleotide sequences ที่ออกแบบได้แสดงในตารางที่ 1

Amplified products ที่ได้จากการทำ PCR จะถูกนำมา electrophoresed บน 2% (w/v) agarose gels และย้อมสีด้วย ethidium bromide ทำการถ่ายรูป amplified band โดย Bio-Rad Gel-Doc fluorescent image analyzer การคำนวณถึงค่าความเข้มของแต่ละ band ทำได้โดยการใช้โปรแกรม Scion image analysis software ยีนที่ต้องการวิเคราะห์จะทำการ normalized โดยใช้ house-keeping gene GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) เพื่อให้เป็นการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนแบบ semi-quantitative comparisons ในระดับของ mRNA ดังที่ได้มีการอธิบายมาก่อนหน้านี้ (28;29).

15 GELATIN ZYMOGRAPHY

กัมมันตภาพของ Pro-MMP-2 and MMP-9 ที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์มาอยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ จะทำการวิเคราะห์โดยวิธีการ gelatin zymography (30). โดยการนำน้ำเลี้ยงเซลล์มา electrophoresis ผ่าน sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ที่ความเข้มข้นของ acrylamide 10% และ 0.1 mg/ml of gelatin (Sigma-Aldrich) ในสภาวะที่เป็น non-reducing conditions ที่ 4°C หลังจาก electrophoresis, ทำการขจัด SDS ใน gel โดยการ rinse ด้วย 50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, 1 uM ZnCl₂, 0.02% NaN₃, and 2.5% Triton-X 100 (pH 7.5) จากนั้น ทำการ incubate เจลที่ 37°C ใน incubating buffer เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วย 0.1% Coomassie brilliant blue R250 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) ที่ละลายใน 50% methanol /10% acetic acid และ destained ด้วย 10% acetic acid /50% methanol คำนวณหา gelatinolytic activity โดยใช้ Scion image software.

25 ผลการทดลอง

สารสกัดข่าชั้น hexane (*A. galanga* hexane extract) สามารถยับยั้งการเสื่อมสลายของ extracellular matrix ในชิ้นกระดูกอ่อน ที่ถูกกระตุ้นโดย

ในการที่จะตรวจสอบถึงฤทธิ์ของสารสกัดข่าในการยับยั้งการเสื่อมสลาย extracellular matrix ของกระดูกอ่อน ในการทดลองนี้จึงได้ทำการ เลี้ยงชิ้นกระดูกอ่อนที่ได้มาจากหมู (cartilage explants) ในน้ำเลี้ยงที่มีสารสกัดข่า ที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะการอักเสบ (อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า) ที่ความเข้มข้น 25 mg/ml เป็นเวลา 3 วัน แล้วทำการตรวจหา กรดยูโรนิกที่หลั่งในชิ้นกระดูก ร่วมกับการตรวจหา สารประกอบไกลโคซามิโนไกลแคน (s-GAG)

- และ ไฮยาโลโรแนน ที่ถูกปล่อยออกมาจากชั้นกระดูกยังน้ำเลี้ยงเซลล์ ซึ่งผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่า เมื่อเลี้ยงชั้นกระดูกในภาวะที่มีการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ปริมาณกรดยูโรนิก ที่มีเหลืออยู่ในชั้นกระดูกลดลง และการหลั่งของ
- สารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของ matrix (ECM) ซึ่งได้แก่ s-GAG และ HA
- 5 จากชั้นกระดูกออกมาสู่น้ำเลี้ยงเพิ่มขึ้น 50% และ 60% เมื่อเทียบกับ control ตามลำดับ แต่ชั้นกระดูกถูกเลี้ยง ในสภาวะที่มี ทั้ง อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ร่วมกับสารสกัดจากที่ความเข้มข้นต่างๆ (ที่ 25-100 ug/ml) พบมีการเพิ่มขึ้นของ ปริมาณกรดยูโรนิกที่เหลืออยู่ในชั้นกระดูก และพบการลดลงของการหลั่งของ s-GAG และ HA ออกมาสู่น้ำเลี้ยงเซลล์ เมื่อเทียบกับ control (รูปที่ 1a). และผลยับยั้งการเสื่อมสลาย ของกระดูกอ่อนในลักษณะเดียวกันก็พบได้ใน
- 10 กลุ่มของชั้นกระดูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบร่วมกับ ยาต้านโรคข้อ Diacerein (ที่ความเข้มข้น 0.0625-1 uM) ด้วยเช่นกัน (รูปที่ 1b).

อภิปรายผลการทดลอง

- โรคข้อ เป็นกลุ่มโรคที่เกิดขึ้นบริเวณโครงสร้างของข้อ โดยอาการเจ็บ ปวด ตามข้อ ข้อบวมหรือแดงร้อน การอักเสบของเอ็น พังผืด อาการฝืด ตึง ชัด ในการเคลื่อนไหวของข้อ
- 15 การสูญเสียการทำงานของข้อ การผิดรูปร่าง ของข้อ และอาการเจ็บปวดกล้ามเนื้อ เป็นอาการเจ็บปวดที่ผู้ป่วยต้องทนทาน และถ้าอาการถึงขั้นอักเสบ และ กำเริบมากขึ้นถึงขนาดเรื้อรัง อาจถึงขั้นพิการได้ ผู้ป่วยต้องทนทุกข์ทรมานจากโรคนี้นานมาทั่วโลก ในเมืองไทย พบผู้ป่วยโรคข้อ อยู่ในกลุ่มคนอายุ 40-60 ปี โดยเฉพาะกลุ่มอายุตั้งแต่ 60 ปีขึ้นไป มีสถิติป่วยด้วยโรคข้อเสื่อมถึง 50% และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี ความเจ็บปวดที่มีผลเนื่องมาจากโรคข้อ เกิดขึ้นเนื่องจากถูกกระตุ้นโดย pro-
- 20 inflammatory cytokine เป็นผลให้มีการทำลายกระดูกอ่อน โดยเอ็นไซม์ MMPs และ aggrecanases. อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า เป็น pro-inflammatory cytokine ตัวหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรค เช่น ก่อให้เกิดการตอบ สนองต่อการติดเชื้อ , กระตุ้นให้มีการสร้างสารจากเซลล์เม็ดเลือดขาว, ที่ออกจากรูขี้นโรค และการกระตุ้น ชนิดอื่น (30) นอกจากนั้นยังมีรายงานเพิ่มเติมอีกว่า อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าและสารกระตุ้นภาวะการอักเสบ ตัวอื่นสามารถกระตุ้นเอ็นไซม์ matrix metalloproteinases
- 25 ตลอดจนยับยั้งการสร้างสารชีวโมเลกุล ที่เป็นองค์ ประกอบเนื้อฟืนของกระดูกอ่อน และการเจริญของเซลล์กระดูกอ่อน (31)
- ไดอะซาลิน (4,5-diacetoxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracene-2-carboxylic acid) ได้รับการพิสูจน์ว่าเป็น ยาที่ออกฤทธิ์ได้ดีสำหรับการรักษาโรคข้อ และใช้รักษาในระยะยาวสำหรับโรคข้อเสื่อม (32-34) การศึกษาถึงขั้น
- 30 ตอนการออกฤทธิ์และการทำงานของยาชนิดนี้ยังอยู่ในขั้นตอนของการศึกษา โดยมีการศึกษาเทียบกันกับ placebo ผู้ป่วยที่เป็นโรคข้อในบริเวณสะโพกและหัวเข่า ส่วนการศึกษาถึงฤทธิ์ในสัตว์ทดลองนั้น

ได้มีหลักฐาน เป็นลายลักษณ์อักษรออกมาแล้ว ซึ่งได้มีการศึกษาในกระต่าย

และในสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม (35;36) ยานี้เป็นสาร

ที่สามารถยับยั้งการสร้างและฤทธิ์ของสารที่เหนี่ยวนำให้มีการอักเสบ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อินทรีย์ลิควิน-1

เบต้า (36) และในการศึกษาในหลอดทดลอง ยังพบว่า ไดอะซาลีน

- 5 สามารถที่จะยับยั้งฤทธิ์ของอินทรีย์ลิควิน-1 เบต้า ในการ กระตุ้นให้มีการสร้างคอลลาเจน (37)

ในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็น โรคข้อเสื่อม ยานี้สามารถที่จะ

ทำหน้าที่รักษาไม่ให้มีการทำลายของเนื้อเยื่อของกระดูกอ่อนได้ (38)

ซึ่งจากรายงานชิ้นนี้ได้แสดงให้เห็นอีกว่า

ยานี้สามารถที่จะยับยั้งการหลั่งของสารชีวโมเลกุลในกระดูกอ่อน และ MMP-2 และ -9

- 10 จากชิ้นกระดูกอ่อน (cartilage explant) ที่ถูกกระตุ้นด้วยอินทรีย์ลิควิน-1 เบต้า

รวมถึงสามารถลดการแสดงออก ของยีนที่ควบคุมการสร้าง MMP-1, -3 และ -13 ได้อีกด้วย (39).

สารสกัดจากสมุนไพร ข่า *A. galanga* สามารถที่จะลดการทำงานของเอ็นไซม์ MMPs

ที่ถูกเหนี่ยวนำ ให้ทำงานในภาวะที่มีการอักเสบได้ในเซลล์กระดูกอ่อน โดยจากการศึกษาพบว่า

การกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ MMP ในเซลล์คอนโดรซาโตมาส์ SW1353 , เซลล์เยื่อข้อ

- 15 รวมถึงชิ้นกระดูก ถูกทำให้ลดลงด้วยสารสกัดนี้ ในส่วนของการ ยับยั้งการแสดงออกของยีน พบว่า

สารสกัดนี้ ลดการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง เอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่ทำลายกระดูกอ่อน ซึ่งได้แก่

MMP-1, -3 and -13 ในเซลล์เยื่อข้อ ซึ่งแสดงถึงฤทธิ์ของสาร

สกัดในการที่จะยับยั้งการถูกทำลายของกระดูกอ่อน โดยการออกฤทธิ์ต่อ เนื้อเยื่อข้อ

ที่มักจะเกิดการอักเสบ ขึ้นก่อนและลุกลามมาถึงกระดูกอ่อน ดังนั้น สารสกัดข่า

- 20 สามารถที่จะออกฤทธิ์ในการลดการอักเสบที่ เหนี่ยวนำให้เกิดโรคข้อ ได้ในเนื้อเยื่อข้อ

โดยสามารถลดการสร้างเอ็นไซม์ MMPs ในเนื้อเยื่อชนิดนี้

และเมื่อพิจารณาถึงฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างสารชีวโมเลกุลที่สำคัญในกระดูกอ่อน พบว่า

สารสกัดข่า นี้สามารถที่จะเหนี่ยวนำให้มีการสร้างยีนที่ควบคุมการสร้าง คอลลาเจน ชนิดที่ 2, SOX9 และ

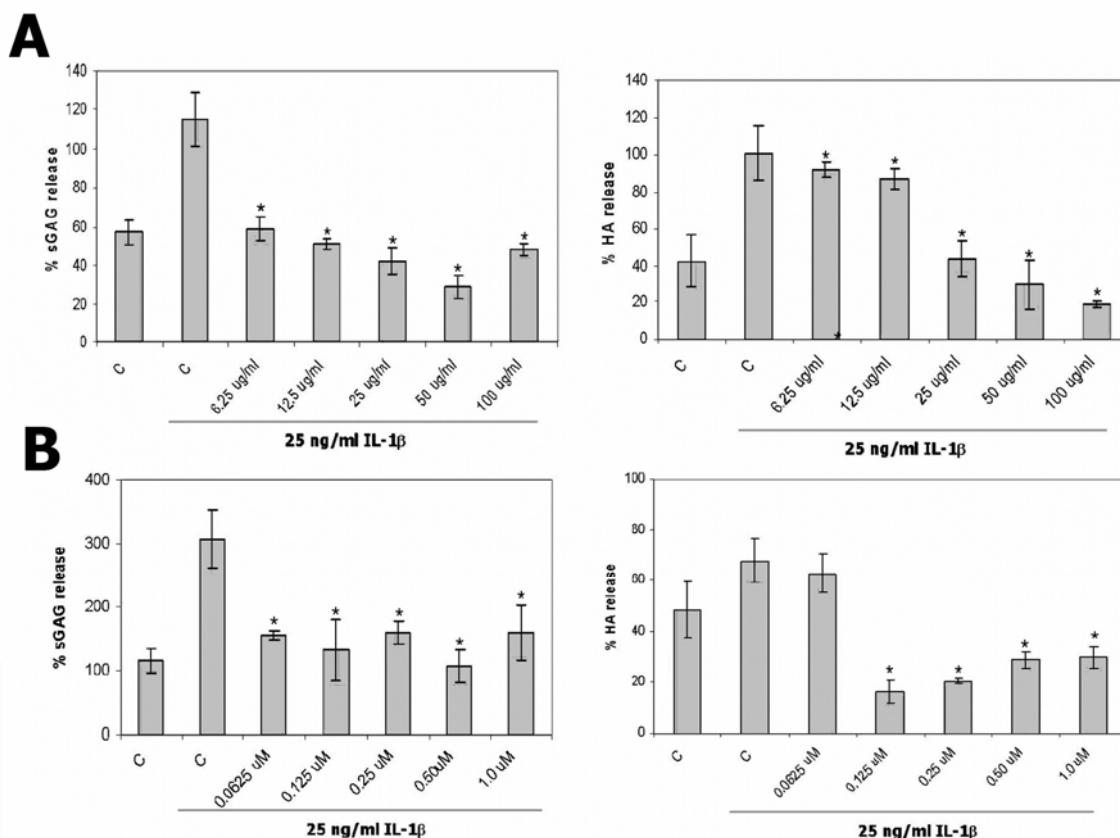
aggrecan จากฤทธิ์ของสารสกัดข่าที่ได้กล่าวมาข้างต้น

- 25 จึงสามารถที่จะศึกษาถึงฤทธิ์ของสารสกัดข่าในด้านอื่นๆ

เพื่อได้มีการพัฒนาสารดังกล่าวเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคข้อเสื่อมต่อไป

วิธีการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เหมือนกับที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์



รูปที่ 1 แสดงผลของสารสกัดข่า (*Alpinia galanga*) (A) และ Diacerein? (B) ต่อการหลั่ง s-GAG และ HA สู่อาหารเลี้ยงเซลล์จากชั้นกระดูกอ่อนสุกร

โดยที่ชั้นกระดูกอ่อนสุกรถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี IL-1 β ขนาด 25 ng/ml

โดยมีและไม่มีสารที่ต้องการทดสอบคือ สารสกัด *A. galanga* ความเข้มข้น 6.25 – 100 ug/ml หรือ

- 5 Diacerein? ที่ระดับ 0.0625 – 1 uM เป็นระยะเวลา 3 วัน (ค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญมีค่า $p < 0.05$ จากกลุ่มทดลองที่มีเฉพาะ IL-1 β เท่านั้น)

ผลของสารสกัดข่า ต่อการสังเคราะห์ s-GAG ในเซลล์คอนโดรซาโคมาส์ SW1353 และเซลล์เยื่อข้อ

ในการทดลองนี้จึงได้ทำการตรวจวัดความเข้มข้นของ s-GAG ในน้ำเลี้ยงเซลล์

คอนโดรซาโคมาส์ และเยื่อข้อ โดยใช้เทคนิค quantitative spectrophotometry จากการทดลองพบว่า

- 10 เซลล์คอนโดรซาโคมาส์และเซลล์เยื่อข้อ กลุ่มควบคุม

(เซลล์ที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงปกติที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสารใด) มีการหลั่งของ s-GAG ออกมา และวัดได้ความเข้มข้น 1.96 ± 0.51 และ 2.35 ± 0.12 mg/ml ตามลำดับ (รูปที่ 1)

และเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ก็จะพบการเพิ่มขึ้นของการหลั่ง s-GAG

ออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยวัดได้ความเข้มข้น 4.45 ± 0.47 , 3.27 ± 0.33 mg/ml

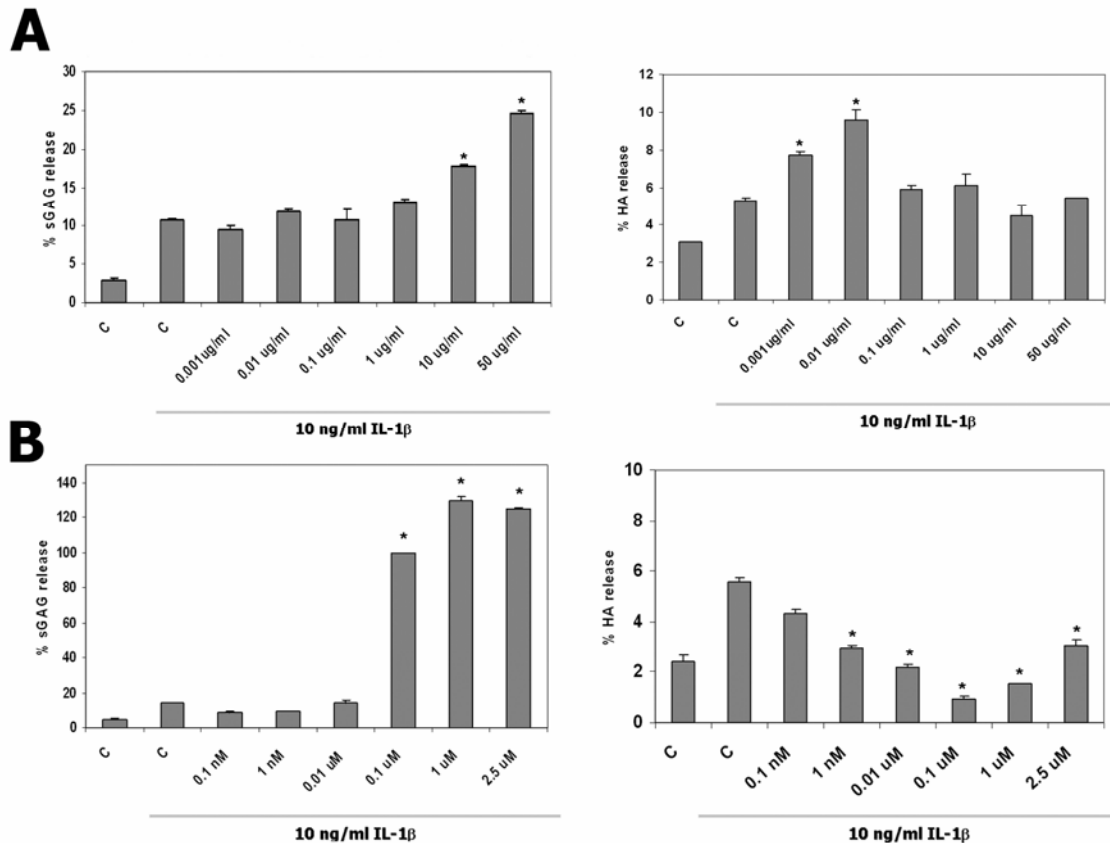
- 15 ในน้ำเลี้ยงเซลล์คอนโดรซาโคมาส์และเซลล์เยื่อข้อ ตามลำดับ แต่เนื่องจากความเข้มข้นของ s-GAG

หน้า 2 ของจำนวน 9 หน้า

ที่ตรวจวัดโดยวิธีดังกล่าว มีความเข้มข้นต่ำ ในการทดลองที่เลี้ยงเซลล์ในภาวะที่มีอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ร่วมกับสารสกัดจากความเข้มข้นต่างๆ จึงเห็นการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในภาวะที่มีอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า เพียงอย่างเดียวในเซลล์ทั้งสองชนิด

ในส่วนของการยับยั้งการอักเสบของข้อ ไดอะเซรีน ที่ความเข้มข้นสูง (ที่ 2.5- 5 mM)

- 5 พบว่าสามารถกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ s-GAG เพิ่มขึ้น (รูปที่ 2).



รูปที่ 2 แสดงผลของสารสกัดจาก (Alpinia galanga) (A) และ Diacerein? (B) ต่อการหลั่ง s-GAG และ HA สู่อหารเลี้ยงเซลล์จาก chondrosarcoma โดยที่ chondrosarcoma

ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี IL-1 β ขนาด 25 ng/ml โดยมีและไม่มีสารที่ต้องการทดสอบคือ

สารสกัด A. galanga ความเข้มข้น 0.001 - 50 μ g/ml หรือ Diacerein? ที่ระดับ 0.1 nM – 2.5 μ M

- 10 เป็นระยะเวลา 24 ชม. (ค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญมีค่า $p < 0.05$ จากกลุ่มทดลองที่มีเฉพาะ IL-1 β เท่านั้น)

ผลของสารสกัดจาก ต่อการสังเคราะห์ ไฮยาลูโรแนนในเซลล์คอนโดรซาโคมาต์ SW1353

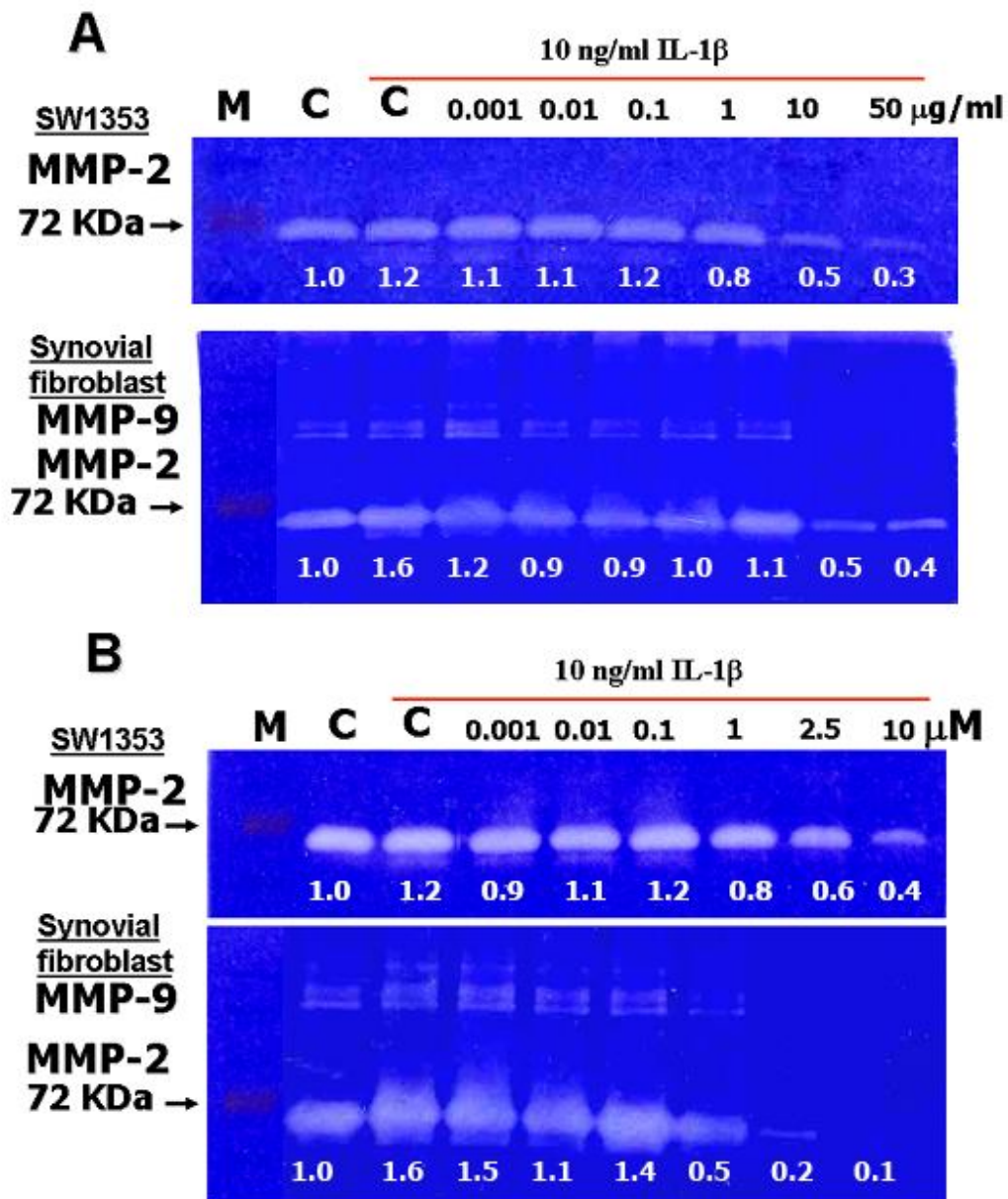
และเซลล์เยื่อข้อ

- 15 จากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 1 พบว่า สารเหนี่ยวนำการอักเสบ อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (10 ng/ml) สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์และการหลั่งของไฮยาลูโรแนน

หน้า 3 ของจำนวน 9 หน้า

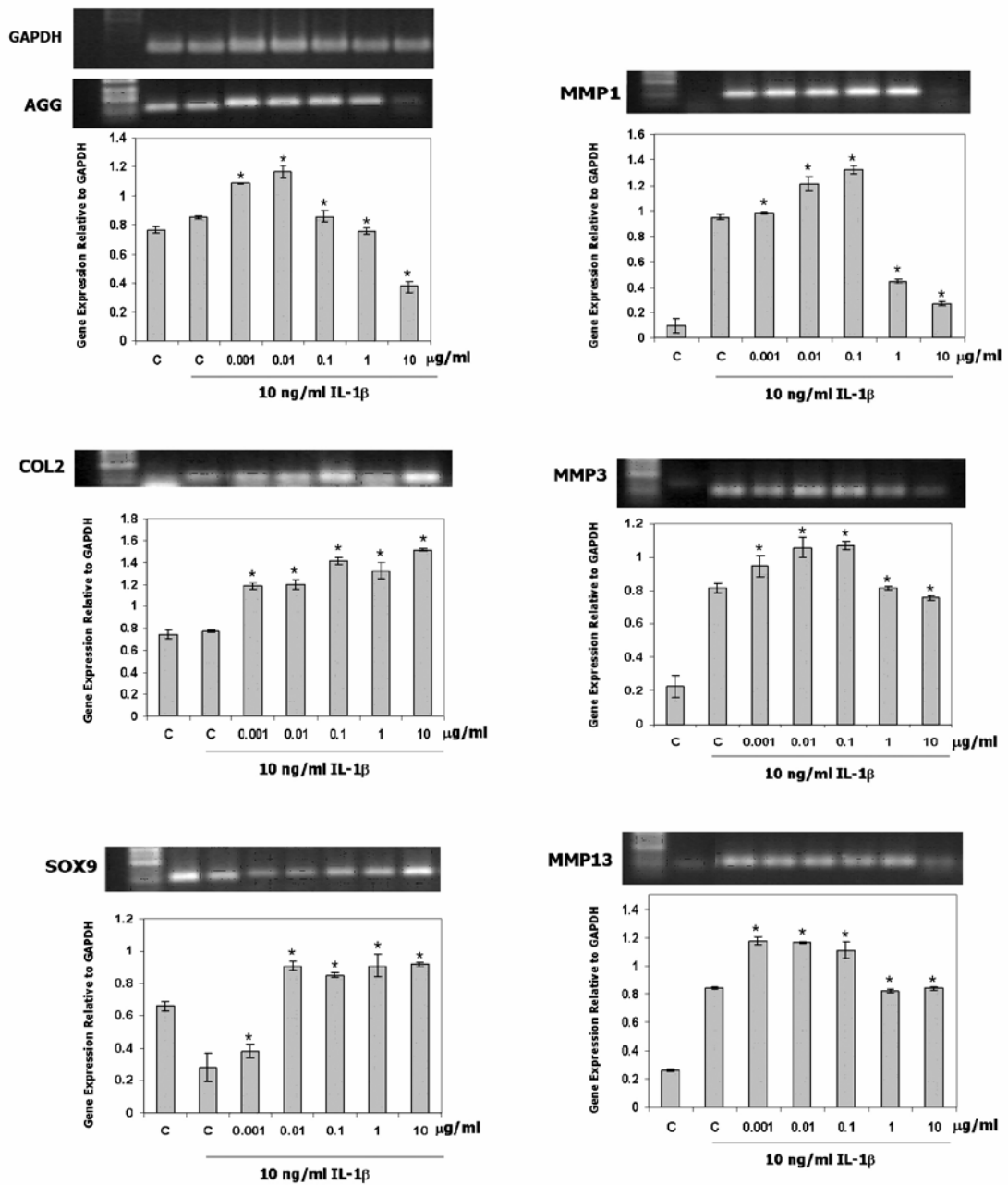
- 5 ในเซลล์เยื่อบุข้อเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ ($p < 0.05$) และในเซลล์คอนโดรซาโกมาส์ ก็พบมีการเพิ่มขึ้น (ประมาณ 1.5 เท่า) สารสกัดค่า ความ 10 ug/ml มีฤทธิ์ในการลดการสังเคราะห์ไฮยาลูโรแนน ในสภาวะที่เลี้ยงเซลล์ร่วมกับอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า โดยพบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์เยื่อบุข้อ และพบการลดลงเล็กน้อยในเซลล์คอนโดรซาโกมาส์ ในส่วนของยา ไดอะเซลิน ในความเข้มข้นสูง (~2.5-5 mM) พบว่ามีการลดลงของการสร้างไฮยาลูโรแนน จากการเหนี่ยวนำของอินเตอร์ลิวคิน ในเซลล์ทั้งสอง (รูปที่ 2)

- ผลของสารสกัดข่า ต่อการสังเคราะห์ pro-MMP-2 และ การแสดงออกของยีน MMP-1, -3 และ -13 จากการเหนี่ยวนำของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ในเซลล์คอนโดรซาโกมาส์ SW1353 และเซลล์เยื่อบุข้อ
- 10 จากผลการทดลอง Gelatin zymography ที่ทดสอบกับมันตาภาพของ MMP-2 ในน้ำเลี้ยงชิ้นกระดูกหมู , เซลล์คอนโดรซาโกมาส์ และ จากเซลล์เยื่อบุข้อ ในสภาวะปกติ พบว่ามีการสร้าง pro-MMP-2 เพียงเล็กน้อยใน การเลี้ยงทั้ง 3 แบบ แต่เมื่อทำการกระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (10ng/ml) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ระดับของ pro-MMP-2 และ MMP-9 ใน เซลล์คอนโดรซาโกมาส์ เพิ่มขึ้น 1.6 and 1.8 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในภาวะปกติ (รูปที่ 3) สารสกัดข่าที่ความเข้มข้น 50 mg/ml สามารถ
- 15 กดฤทธิ์ของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ที่กระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ pro-MMP-2 ได้มากที่สุด โดยสามารถลดกัมมิตภาพของเอ็นไซม์ pro-MMP-2 ได้ 73.5 % และ 68.7 % ในเซลล์ คอนโดรซาโกมาส์และในเซลล์เยื่อบุข้อ ตามลำดับ ในขณะที่ไดอะเซลิน ความเข้มข้นที่ 2.5 mM สามารถกดการสังเคราะห์ pro-MMP-2 และ -9 ได้

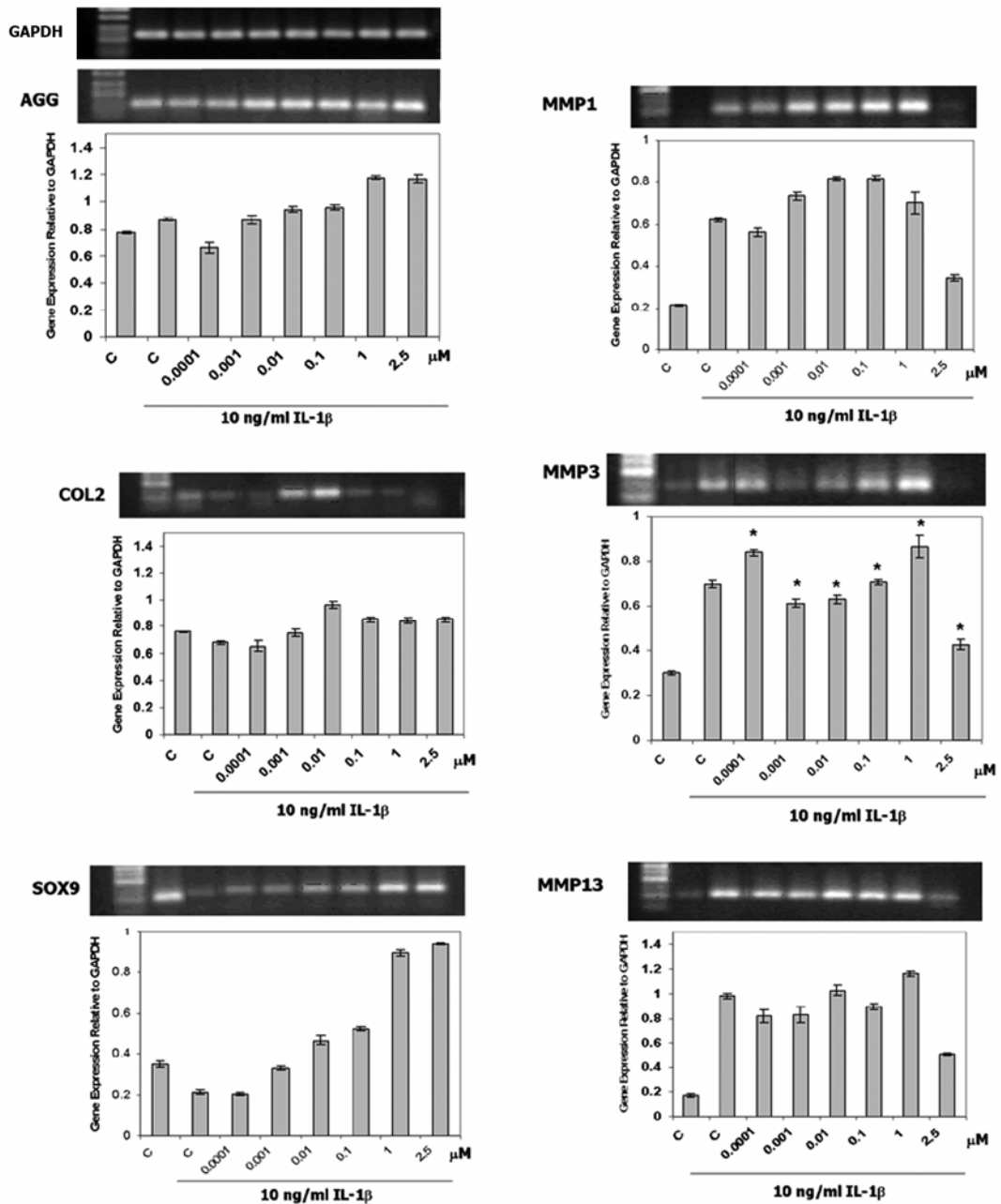


รูปที่ 3 ผลของสารสกัดข่า *A. alpinia* (A), และ Diacerein? (B) ต่อการสร้าง gelatinase, MMP-2 และ MMP-9

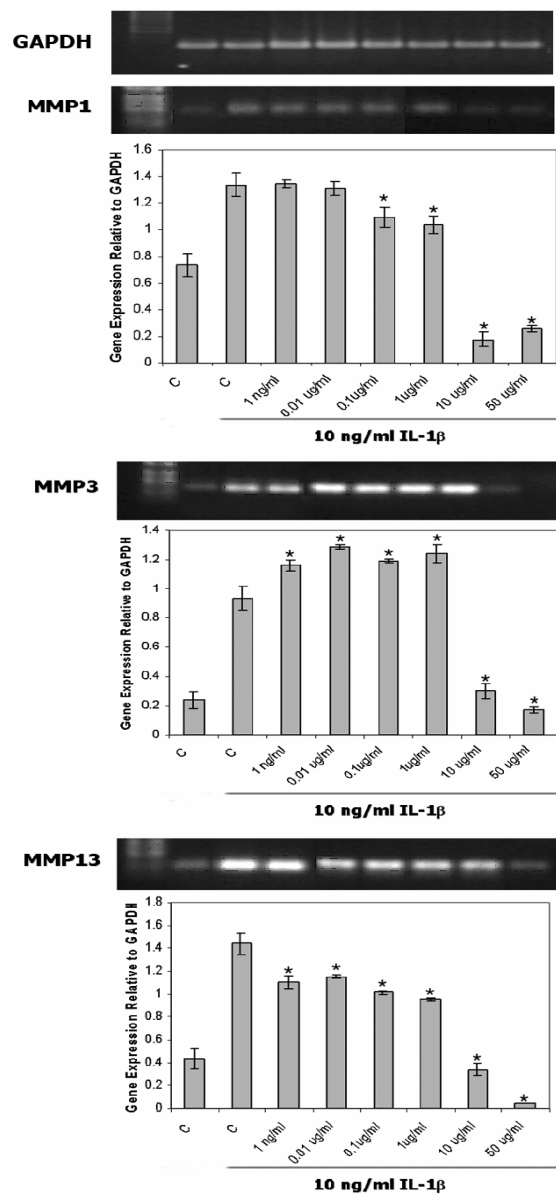
- ในส่วนของการศึกษาการสังเคราะห์ pro-MMP-1, -3 และ -13 อันเป็นผลมาจากอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ซึ่งตรวจสอบโดยวิธีการ semi-quantitative RT-PCR นั้นพบว่า เมื่อกระตุ้นคอนโคโรซาโคมาส์ด้วยอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า เป็นเวลา 24 ชม. จะมีแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง pro-MMP-1, -3 และ -13 เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด
- 5 แต่ในภาวะที่มีสารสกัดจาก ความเข้มข้น 10 mg/ml ร่วมกับอินเตอร์ลิวคิน-1 เบตานั้น การแสดงออกของยีน MMPs เหล่านี้ลดลง โดยสามารถลดการแสดงออกของ MMP-1, -3 and 13 mRNA ได้ 73.8, 17.4 and 11.8 % ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4 และในเซลล์เยื่อบุผิวข้อ สารสกัดจากที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ (10 ug/ml) ก็ให้ผลเช่นเดียวกันกับในคอนโคโรซาโคมาส์ โดยลดการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง ของ MMP-1, -3 and 13 ได้ 76.9, 62 and 64.8 % ตามลำดับ โดยได้แสดงไว้ในรูปที่ 5
- 10 ไดอะซาบีน ก็เช่นเดียวกัน สามารถลดการแสดงออกของยีน MMP-1, -3, -13 ได้ เป็นแบบ dose-dependent manner (ที่ความเข้มข้น 0.1-2.5 uM) และ ที่ความเข้มข้น 2.5 uM เป็นความเข้มข้นสูงที่สุดที่ลดการแสดงออกของยีน ได้ 81.3, 88.9 and 75% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 4 ผลของสารสกัดข่า *A. galanga* ต่อการแสดงออกของยีน Aggrecan, Collagen II, SOX9 และ MMP-1, -3, -13 ในเซลล์ chondrosarcoma



รูปที่ 5 ผลของ Diacerein? ต่อการแสดงออกของยีน Aggrecan, Collagen II, SOX9 และ MMP-1, -3, -13 ในเซลล์ chondrosarcoma



รูปที่ 6 ผลของสารสกัดข่า *A. galanga* ต่อการแสดงออกของยีน MMP-1, -3, -13 ในเซลล์ synovial fibroblast

หน้า 9 ของจำนวน 9 หน้า

- ผลของสารสกัดขา ต่อการ ฤทธิ์ของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าที่ก่อกการแสดงออกของ collagen type II และ SOX9 เนื่องจากการทำลายและการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลที่สำคัญในกระดูกออกในภาวะปกติ นั้นจะมีความสมดุลกันในการทดลองนี้จึงต้องการที่จะศึกษาถึงฤทธิ์ของสารสกัดขาในการที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างสารชีวโมเลกุลที่สำคัญในกระดูกอ่อน ซึ่งได้แก่ aggrecan, collagen และ SOX9
- 5 การทดลอง ในเซลล์ คอนโดรซาโทมาส์พบว่า เมื่อเลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มีอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ความเข้มข้น 10 ng/ml การแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง collagen type II และ SOX9 นั้นลดลง 12 and 56% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยง ในภาวะที่ไม่มีอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่มีอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ร่วมกับสารสกัดขา พบว่า สารสกัดขาสามารถที่จะยับยั้งฤทธิ์ของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ได้แบบ dose-dependent สำหรับ collagen type II มีความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์คือ (1 ng/ml -10 ug/ml) และสำหรับ SOX-9 ออกฤทธิ์ที่ความเข้มข้น 10 0.01-10 ug/ml ดังแสดงในภาพที่ 4 สำหรับยีนที่ควบคุมการสร้าง Aggrecan นั้นพบว่า อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าเพียงอย่างเดียว เพิ่มการแสดงออกของยีนได้เล็กน้อย คือเพิ่มได้ประมาณ 11 %
- เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงปกติ และเมื่อเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่มีอินเตอร์ลิวคินและสารสกัดขา พบว่า สารสกัดขาที่ความเข้มข้นน้อย คือที่ (1ng/ml – 0.1 ug/ml)
- 15 สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง aggrecan แต่ที่ความเข้มข้นสูง คือที่ 0.1-10 ug/ml สารสกัดขา กลับไปลดการแสดงออกของยีนดังกล่าว สำหรับยาไดอะซาลีน ที่ความเข้มข้น 0.01 – 2.5 uM สามารถต้านฤทธิ์ของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า โดยที่ผลเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง aggrecan และ SOX9 และมีผลเล็กน้อยในการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง collagen type II

หน้า 1 ของจำนวน 1 หน้า

ข้อถ้อยสิทธิในงานประดิษฐ์

1. สารสกัด เป็นสารสกัดจากพืชสมุนไพรตระกูล *Alpinia galanga* หรือข่า
2. พืชในข้อ 1. อาจจะทำการเพาะปลูกที่ใด ๆ ก็ได้ รวมทั้งการเพาะปลูกที่เกิดหรือทำจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือการเพาะเลี้ยงชนิดพิเศษอื่น ๆ ที่ให้ได้มาซึ่งพืชชนิดนี้
- 5 3. การสกัดในข้อที่ 1 รวมทั้งการสกัดที่ใช้สารละลายทุกชนิด
4. การสกัดในข้อถ้อยสิทธิที่ 3 รวมทั้งการสกัดแบบธรรมชาติ ที่ใช้การคน กวน หรือวิธีทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้เครื่องมือแยกสกัด ภายใต้อุณหภูมิที่ต่างกันต่าง ๆ
รวมทั้งเครื่องมือที่ใช้ไฟฟ้า ความร้อน
5. สารสกัดในงานประดิษฐ์นี้มีผลต่อการยับยั้งการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะในคน และสัตว์
- 10 6. กลไกของการลดการเสื่อมสลายรวมทั้งการยับยั้งคุณสมบัติของเอ็นไซม์และการยับยั้งการแสดงออกของยีนและการกระตุ้นการแสดงออกของยีนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการสลายของกระดูกอ่อนและการเสริมสร้างกระดูกอ่อนตามลำดับ
7. ข้อถ้อยสิทธินี้รวมถึงผลิตภัณฑ์ทุกชนิดที่สร้างขึ้นจากการใช้ส่วนผสมที่มีสารที่ได้จากสมุนไพรชนิดนี้ หรือนำเอาส่วนของสารสกัดนี้ไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีโดยการสังเคราะห์เพิ่มเติม
8. ผลิตภัณฑ์ในข้อถ้อยสิทธิที่ 7 รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในคน สัตว์ **หลอดทดลอง**
15 **และการเลี้ยงเนื้อเยื่อ** และเพื่อการทดลองและวิจัยพัฒนา ทั้งหมด และอาหารเสริมต่าง
9. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากข้อ 8 รวมถึงที่ใช้และออกฤทธิ์ทั้งภายใน และภายนอกร่างกาย
10. ผลิตภัณฑ์ในข้อถ้อยสิทธิที่ 9 รวมถึงที่ใช้รับประทาน **ฉีดเข้าร่างกาย หรือพ่น** หรือทาบริเวณต่าง ๆ ของร่างกายด้วย

บทสรุปการประดษฐ์

5

การประดษฐ์นี้เป็นการสกัดเอาสารสำคัญจากข่าไทย (Alpinia galanga) ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน (cartilage) ซึ่งยังไม่มีรายงานมาก่อน โดยการประดษฐ์ได้แสดงให้เห็นถึงวิธีการสกัดสารสำคัญจากข่า และการทดสอบที่แสดงว่ามีฤทธิ์ต่อการยับยั้งการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนโดยวิธีการเลี้ยงกระดูกอ่อน และการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน นอกจากนั้นยังแสดงถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดสำคัญ ระดับการแสดงออกของยีน โดยไปยับยั้งการแสดงออกของยีนบางชนิดที่มีผลต่อการทำลายกระดูกอ่อน และกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่มีผลต่อการเสริมสร้างกระดูกอ่อน

เอกสารอ้างอิง

- (1) van der Kraan PM, van den Berg WB. Anabolic and destructive mediators in osteoarthritis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000 May;3(3):205-11.
- (2) Blanco FJ, Geng Y, Lotz M. Differentiation-dependent effects of IL-1 and TGF-beta on human
5 articular chondrocyte proliferation are related to inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol* 1995 Apr 15;154(8):4018-26.
- (3) Shikhman AR, Kuhn K, Alaaeddine N, Lotz M. N-acetylglucosamine prevents IL-1 beta-mediated activation of human chondrocytes. *J Immunol* 2001 Apr 15;166(8):5155-60.
- (4) Badger AM, Cook MN, Swift BA, Newman-Tarr TM, Gowen M, Lark M. Inhibition of
10 interleukin-1-induced proteoglycan degradation and nitric oxide production in bovine articular cartilage/chondrocyte cultures by the natural product, hyaluronidase. *J Pharmacol Exp Ther* 1999 Aug;290(2):587-93.
- (5) Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4(2):197-250.
- (6) Vincenti MP, Clark IM, Brinckerhoff CE. Using inhibitors of metalloproteinases to treat arthritis.
15 Easier said than done? *Arthritis Rheum* 1994 Aug;37(8):1115-26.
- (7) Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, et al. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1996 Feb 1;97(3):761-8.
- (8) Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. The new collagenase,
20 collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* 1996 May 1;97(9):2011-9.
- (9) Okada Y, Shinmei M, Tanaka O, Naka K, Kimura A, Nakanishi I, et al. Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. *Lab Invest* 1992
25 Jun;66(6):680-90.

- (10) Murphy G, Cockett MI, Stephens PE, Smith BJ, Docherty AJ. Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem J* 1987 Nov 15;248(1):265-8.
- 5 (11) Hembry RM, Bagga MR, Reynolds JJ, Hamblen DL. Immunolocalisation studies on six matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMP-1 and TIMP-2, in synovia from patients with osteo- and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1995 Jan;54(1):25-32.
- (12) Ollivierre F, Gubler U, Towle CA, Laurencin C, Treadwell BV. Expression of IL-1 genes in human and bovine chondrocytes: a mechanism for autocrine control of cartilage matrix degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 1986 Dec 30;141(3):904-11.
- 10 (13) Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990 Mar;33(3):305-15.
- (14) Shinmei M, Masuda K, Kikuchi T, Shimomura Y. The role of cytokines in chondrocyte mediated cartilage degradation. *J Rheumatol Suppl* 1989 Aug;18:32-4.
- (15) Pelletier JP, McCollum R, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Synthesis of metalloproteinases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process. *J Rheumatol Suppl* 1995 Feb;43:109-14.
- 15 (16) Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. Bioessays* 1995 Dec;17(12):1039-48.
- (17) Urban JP. The chondrocyte: a cell under pressure. *Br J Rheumatol* 1994 Oct;33(10):901-8.
- 20 (18) Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 2002;4(1):30-5.
- (19) Rizkalla G, Reiner A, Bogoch E, Poole AR. Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease. *J Clin Invest* 1992 Dec;90(6):2268-77.
- 25 (20) Matyas JR, Adams ME, Huang D, Sandell LJ. Discoordinate gene expression of aggrecan and type II collagen in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1995 Mar;38(3):420-5.

- (21) de CB, Lefebvre V, Nakashima K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol* 2001 Dec;13(6):721-7.
- (22) Li Y, Tew SR, Russell AM, Gonzalez KR, Hardingham TE, Hawkins RE. Transduction of
5 passaged human articular chondrocytes with adenoviral, retroviral, and lentiviral vectors and the effects of enhanced expression of SOX9. *Tissue Eng* 2004 Mar;10(3-4):575-84.
- (23) Matsuda H, Pongpiriyadacha Y, Morikawa T, Ochi M, Yoshikawa M. Gastroprotective effects of phenylpropanoids from the rhizomes of *Alpinia galanga* in rats: structural requirements and mode of action. *Eur J Pharmacol* 2003 Jun 13;471(1):59-67.
- (24) Matsuda H, Morikawa T, Managi H, Yoshikawa M. Antiallergic principles from *Alpinia galanga*:
10 structural requirements of phenylpropanoids for inhibition of degranulation and release of TNF-alpha and IL-4 in RBL-2H3 cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2003 Oct 6;13(19):3197-202.
- (25) Grzanna R, Lindmark L, Frondoza CG. Ginger--an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. *J Med Food* 2005;8(2):125-32.
- (26) Morikawa T, Ando S, Matsuda H, Kataoka S, Muraoka O, Yoshikawa M. Inhibitors of nitric
15 oxide production from the rhizomes of *Alpinia galanga*: structures of new 8-9' linked neolignans and sesqueneolignan. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2005 Jun;53(6):625-30.
- (27) Kongtawelert P, Ghosh P. A method for the quantitation of hyaluronan (hyaluronic acid) in biological fluids using a labeled avidin-biotin technique. *Anal Biochem* 1990 Mar;185(2):313-8.
- (28) Marchuk L, Sciore P, Reno C, Frank CB, Hart DA. Postmortem stability of total RNA isolated
20 from rabbit ligament, tendon and cartilage. *Biochim Biophys Acta* 1998 Feb 2;1379(2):171-7.
- (29) Boykiw R, Sciore P, Reno C, Marchuk L, Frank CB, Hart DA. Altered levels of extracellular matrix molecule mRNA in healing rabbit ligaments. *Matrix Biol* 1998 Oct;17(5):371-8.
- (30) Ito A, Nose T, Takahashi S, Mori Y. Cyclooxygenase inhibitors augment the production of pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) in rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett* 1995
25 Feb 20;360(1):75-9.
- (31) Taub DD, Oppenheim JJ. Chemokines, inflammation and the immune system. *Ther Immunol* 1994 Aug;1(4):229-46.

- (32) Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* 2000 Apr;43(4):801-11.
- 5 (33) Lingetti M, D'ambrosio PL, Grezia F, Sorentino P, Lingetti E. A controlled study in the treatment of osteoarthritis with diacerein (Artrodar). *Curr Therp Res* 1982;31:408-12.
- (34) Marcolonge R, Fioravanti A, Adami S, Tozzi E, Mian M, Zampieri A. Efficacy and tolerability of diacerein in the treatment of osteoarthrosis. *Curr Therp Res* 1988;37:529-36.
- 10 (35) Nguyen M, Dougados M, Berdah L, Amor B. Diacerhein in the treatment of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 1994 Apr;37(4):529-36.
- (36) Mazieres B, Berda L. Effect of diacerein (ART 50) on an experimental post-contusive model of OA. *Osteoarthritis Cart* 1993;1:47.
- (37) Brandt KD, Smith G, Kang SY, Mayer S, O'Corner B, Albrecht M. Effects of diacerhein in an accelerated canine model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cart* 1997;5:438-9.
- 15 (38) Smith GN, Jr., Myers SL, Brandt KD, Mickler EA, Albrecht ME. Diacerhein treatment reduces the severity of osteoarthritis in the canine cruciate-deficiency model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1999 Mar;42(3):545-54.
- (39) Tamura T, Kosaka N, Ishiwa J, Sato T, Nagase H, Ito A. Rhein, an active metabolite of diacerein, down-regulates the production of pro-matrix metalloproteinases-1, -3, -9 and -13 and up-regulates the production of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in cultured rabbit articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2001 Apr;9(3):257-63.
- 20