

การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 2

The 2nd STOU Graduate Research Conference

สารออกฤทธิ์จากขิงมีศักยภาพปกป้องการสลายกระดูกอ่อนที่ถูกเหนี่ยวนำโดยไซโตไคน์

Active Component of Ginger Has Potent Chondroprotective Activity Against Cytokine-Induced Cartilage Degradation

ปิยะพร บุตรพรหม (Piyaporn Budprom) * ศิริวรรณ องค์กรไชย (Siriwan Ongchai)**

เจษฎา เรืองสุริยะ (Jetsada Ruangsuriya)***

บทคัดย่อ

ขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ระงับอาการปวดในโรคข้อเสื่อมและข้ออักเสบมานาน จากอดีตจนถึงปัจจุบัน แต่ยังไม่มียารักษาโรคข้ออักเสบที่ป้องกันการสลายกระดูกอ่อนซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคข้อเสื่อม การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารซิงเจอโรน (Zingerone) ซึ่งเป็นหนึ่งในสารสำคัญจากขิง ต่อการปกป้องกระดูกอ่อนที่ถูกเร่งให้เสื่อมสลายด้วยไซโตไคน์ชนิดที่เป็นสาเหตุหลักของการสลายกระดูกอ่อนในโรคข้อเสื่อม คืออินเตอร์ลิวคิน-1บีตา (IL-1 β) โดยใช้ Cartilage Explant Model

เตรียมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน จากกระดูกอ่อนของฝ่าเท้าหมู เพื่อนำมาเลี้ยงในภาวะที่มีหรือไม่มี IL-1 β (10 ng/ml) ร่วมกับสารซิงเจอโรนที่ความเข้มข้น 0-40 μ M โดยมี diacerein ซึ่งเป็นยารักษาโรคข้อเสื่อมเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก เมื่อครบกำหนด 5 หรือ 30 วัน น้ำเลี้ยงกระดูกอ่อนจะถูกนำมาวิเคราะห์หาสารบ่งชี้การเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนที่สลายมาในน้ำเลี้ยง คือ กลัยโคซามิโนไกลแคน (s-GAGs) และกรดไฮยาลูโรนิก (HA) โดยวัดจากปฏิกิริยาสีที่จำเพาะกับโปรตีน (dye-binding assay) และ ELISA รวมทั้งได้วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนื้อกระดูกอ่อนของโรคข้อเสื่อมได้แก่ เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-2 (MMP-2) โดยวิธีเจลาตินไซโมกราฟี ส่วนชิ้นกระดูกอ่อนจะถูกนำมาย่อยและตรวจวัดปริมาณสารสำคัญที่คงเหลืออยู่ในชิ้นเนื้อได้แก่คอลลาเจนและกรดยูโรนิกโดยวิธีการวัดสี (colorimetric assay)

ผลการศึกษาพบว่า กระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β จะมีการสลายสารสำคัญของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนออกมาในน้ำเลี้ยงสูงมากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ s-GAGs และ HA สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนและกรดยูโรนิกที่มีปริมาณคงเหลือน้อยลงในเนื้อกระดูกอ่อน แต่กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β ร่วมกับสารซิงเจอโรน พบว่า ปริมาณ s-GAGs และ HA รวมทั้งการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในน้ำเลี้ยงลดลงตามความเข้มข้นของสารซิงเจอโรน สอดคล้องกับคอลลาเจนและกรดยูโรนิกที่มีปริมาณคงเหลือสูงมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีเฉพาะ IL-1 β พบว่า สารซิงเจอโรนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 40 μ M สามารถป้องกันการสลายเนื้อเยื่อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลการทดลองครั้งนี้ ถือเป็นครั้งแรกในการเปิดเผยให้เห็นศักยภาพของซิงเจอโรนจากขิงที่สามารถป้องกันการสลายกระดูกอ่อนซึ่งจำลองจากสภาวะที่เกิดขึ้นในโรคข้อเสื่อม กลไกการปกป้องนี้ น่าจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งฤทธิ์ IL-1 β ในระดับโมเลกุลซึ่งกระตุ้นการสังเคราะห์และปลดปล่อยเอนไซม์ MMP-2 ซึ่งเป็นหนึ่งในเอนไซม์สำคัญของการสลายกระดูกอ่อนในโรคข้อเสื่อม

คำสำคัญ: ซิงเจอโรน, อินเตอร์ลิวคิน-1บีตา, เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส, เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน, การปกป้องกระดูกอ่อน

* วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ piyaporn.bu@gmail.com

** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมีและศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ siriwan.ongchai@gmail.com

*** อาจารย์มหาวิทยาลัย ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ jetsada.ruang@cmu.ac.th

Abstract

Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) has long been used to relieve pain in both degenerative and inflammatory joint diseases. Nevertheless, there has been no report of ginger to protect against cartilage degradation which leads to degenerative joint diseases. This study aimed to investigate chondroprotective effect of Zingerone, one of the active components isolated from dried ginger, on cartilage degradation induced by the most important cytokine which causes degenerative joint diseases, IL-1b, using Cartilage Explant Model.

Articular cartilage explants were prepared from porcine metacarpophalangeal joints. They were cultured in the presence or absence of IL-1b, (10 ng/ml) and Zingerone at the concentration range of 0-40 mM. The anti-arthritis drug, diacerein, was performed as a positive control. After 5 or 30 days of incubation, the culture medium was harvested for analysis of cartilage degradation markers as sulfated glycosaminoglycans (s-GAGs) and hyaluronic acid (HA) by Dye binding assay and ELISA technique. Activity of matrix metalloproteinase enzyme-2 (MMP-2) which involved in cartilage degradation of degenerative joint diseases was analysed by gelatin zymography. The remaining of collagen and uronic acid in the cartilage explants were analyzed by colorimetric assays.

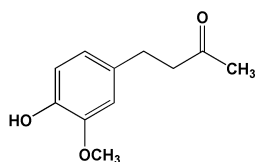
It was found that IL-1b treatments caused the dramatic increase in the release of cartilage biomolecules into the culture media as s-GAGs and HA, constantly with the great reduction of collagen and uronic acids contents which remained in cartilage explants. In co-treatment of IL-1b and Zingerone, results from the media analysis showed the significant reduction of s-GAGs and HA, including MMP-2 activity, in dose-response manners. These were concomitant with the higher contents of collagen and uronic acids in the explants compared to the IL-1b treated group. Zingerone from 40 μ M was found to significantly protect cartilage degradation ($p<0.05$). These results were the first to reveal chondroprotective activity of ginger in condition which simulated the pathology of degenerative joint diseases. The mechanism of protection may involve in the molecular suppression of IL-1b-induced synthesis and release of MMP-2, one of cartilage degrading enzymes of degenerative joint diseases.

Keywords: Zingerone, IL-1b, MMPs, Cartilage explants, Chondroprotection

บทนำ

กระดูกอ่อนเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำหน้าที่รองรับแรงกดกระแทกระหว่างกระดูกของข้อต่อ โครงสร้างประกอบด้วยโครงข่ายเส้นใยคอลลาเจนซึ่งสำคัญต่อการทำหน้าที่ทางชีวภาพของกระดูกอ่อน เป็นที่ยึดให้กับโมเลกุลเชิงซ้อนของกรดไฮยาลูโรนิก-โปรตีโอไกลิแคน (Hyaluronic acid; HA-proteoglycans) ซึ่งโปรตีโอไกลิแคนนี้มีชื่อเรียกเฉพาะว่า แอกรีแคน (aggrecan) ประกอบไปด้วยส่วนคาร์โบไฮเดรตที่เรียกว่ากลัยโคซามิโนไกลิแคน (glycosaminoglycans; GAGs) ที่เป็นหน่วยซ้ำของน้ำตาลกรด (กรดยูโรนิก, uronic acid) กับน้ำตาลอะมิโนต่อกันเป็นสายยาว จับอยู่กับโปรตีนแกนกลาง การสูญเสีย s-GAGs เป็นสาเหตุหลักสำคัญที่นำไปสู่การเกิดโรคข้อต่อเสื่อม (degenerative joint diseases) ได้ เช่น โรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis, OA) และข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis; RA) (Svetlana et al., 2007) ทำให้เกิดการเจ็บปวดและเคลื่อนไหวข้อได้ลำบากในคนสูงอายุ พบว่า อินเตอร์ลิวคิน-1บีตา (IL-1 β) เป็นหนึ่งในไซโตไคน์ก่อนการอักเสบที่สำคัญต่อการทำลายของกระดูกอ่อน (Mark et al., 2005) โดยเหนี่ยวนำการสร้างและการหลั่งเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส (matrix metalloproteinases; MMPs) (Tetlow et al., 2001; Phitak et al., 2009) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทหลักต่อการย่อยสลายสารชีวโมเลกุลในเมทริกซ์ โดยเฉพาะพวกโปรตีโอไกลิแคนและคอลลาเจน ส่งผลให้เกิดการการสูญเสียเมทริกซ์ของกระดูกอ่อนและคุณสมบัติเชิงกลอย่างถาวรในคนเป็นโรคข้อเสื่อม พบว่าในน้ำหล่อข้อของคนไข้ OA มีปริมาณ MMP-2 (gelatinase) เพิ่มขึ้น (Volk et al., 2003; Zrimšek et al., 2007) และหากยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ MMP-2 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β จะทำให้มีการสลายสารชีวโมเลกุลในเมทริกซ์ของกระดูกอ่อนลดลง (Mark et al., 2005) ยาที่ใช้รักษาโรคข้อเสื่อมในปัจจุบันได้แก่ diacerein มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและการเสื่อมของข้อ สามารถยับยั้งฤทธิ์ IL-1 β ในการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบและการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนได้โดยลดการแสดงออกของยีนในกระบวนการแคแทบอลิซึม รวมถึงยีน MMPs ด้วย (Tamura and Ohmori, 2001; Boileau et al., 2008) พืชสมุนไพรเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษา มีหลายการวิจัยยืนยันว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบและด้านการเสื่อมของข้อได้ดี เช่น ข่า (*Alpinia galangal*) (Phitak et al., 2009) และ *Phyllanthus emblica* (Sumantran et al., 2008)

ขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่นิยมใช้รักษาโรคปวดข้อ ข้ออักเสบ ผลการศึกษาพบสารเคมีตัวหนึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีคือ ชิกจิงเจอร์อล (6-gingerol) สกัดได้จากขิงสด แต่สารนี้ไม่เสถียร เมื่อโดนความร้อนจะสลายตัวไปเป็นซิงเจอโรน (Zingerone หรือ Vanillylacetone; VA) ซึ่งเป็นสารฟีโนลิกอัลคาโนที่มีหมู่น้ำตาลอยู่ ในโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารซิงเจอโรน

(Zingerone) (Rao et al., 2010)

สารซิงเจอโรน นอกจากจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว (Kabuto et al., 2005; Shin et al., 2005; Nageshwa et al., 2010) สารนี้ยังมีฤทธิ์ต่อต้านการอักเสบได้ดี โดยกดการกระตุ้น NF-KB/MAPK ทำให้สามารถลดการแสดงออกของเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบรวมทั้งเอนไซม์ MMPs ส่งผลให้การย่อยสลายเมทริกซ์ของเนื้อเยื่อนอกเซลล์ลดลง (Kim et al., 2010) ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่สารนี้จะสามารถยับยั้งกลไกการเสื่อมสลายกระดูกอ่อนที่ผิดปกติในโรคข้อเสื่อมซึ่งเกิดจาก MMPs ได้ งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาถึงผลเบื้องต้นของสารซิงเจอโรน ต่อการปกป้องกระดูกอ่อนเพาะเลี้ยงที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะการเสื่อมสลายด้วย IL-1 β โดยใช้ Cartilage Explant model ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ศึกษาเบื้องต้น

เกี่ยวกับกระบวนการเมแทบอลิซึมและคุณสมบัติการปกป้องของกระดูกอ่อนของสารหรือยาที่สนใจ (Mark et al., 2005; Chan et al., 2006; Sumantran et al., 2008; Macrory et al., 2009; Phitak et al., 2009; Harlan et al., 2011)

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารซิงเจอโรน ในการป้องกันการสลายกระดูกอ่อนข้อต่อที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IL-1 β โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (cartilage explant model)

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

Dulbecco's Modified Eagle Medium ตั้งชื่อจาก Gibco® (USA) สาร Acrylamide, Ammonium persulphate, Coomassie Brilliant Blue G250, Glycine, TEMED, Sodium dodecyl sulphate และ Tris-base ตั้งชื่อจาก Bio-Rad Laboratorie (CA) สาร Dimethyl sulfoxide, HEPES, Methanol, Sodium chloride, Sodium hydrogen carbonate ตั้งชื่อจาก BDH AnalaR® (England) สาร Penicillin/Streptomycin ตั้งชื่อจาก Hyclone® (USA) สารซิงเจอโรน, Acetic acid, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Bovine casein, Brij-35 solution และ Gelatin type B ตั้งชื่อจาก Sigma-Aldrich (USA) สาร glycerol และ Triton X-100 ตั้งชื่อจาก USB Corporation (OH USA)

การตรวจวิเคราะห์ความปลอดภัยของสารซิงเจอโรนต่อเซลล์กระดูกอ่อน

นำเซลล์กระดูกอ่อนข้อต่อ (human articular cartilage) มาเลี้ยงใน DMEM ที่มีสารซิงเจอโรนความเข้มข้น 0-1000 μ M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์การมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

วิธีการเก็บตัวอย่างและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนข้อต่อ

เก็บตัวอย่างกระดูกอ่อนข้อต่อจากฝ่าเท้าหมูที่ซื้อจากโรงฆ่าสัตว์ (ตายไม่เกิน 6 ชั่วโมง) ตัดให้เหลือเฉพาะส่วนที่เป็นข้อต่อ ล้างทำความสะอาดและเลาะชั้นผิวหนังออก แช่น้ำยาฆ่าเชื้อ 30 นาที นำเข้าสู่ปลอดเชื้อ ฝ่าเปิดข้อต่อและทำการตัดเลาะกระดูกอ่อนข้อต่อบริเวณหน้าตัดที่ใสรับน้ำหนักให้มีขนาด 3x3 มิลลิเมตร เลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (serum-free-DMEM) ที่มีเพนนิซิลิน 200 U/ml และมีสเตรปโตมัยซิน 200 μ g/ml เลี้ยงในตู้บ่มที่มีความชื้น และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ณ อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก และเลี้ยงต่อ 1 คืน เก็บน้ำเลี้ยงกระดูกอ่อน (day 0) มาวิเคราะห์หา s-GAGs และ HA การเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อ จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงใหม่ที่มีสารซิงเจอโรน ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 μ M (เลือกใช้ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายไม่เกิน 20%, IC₂₀) ร่วมกับ IL-1 β ลงไปเลี้ยงไว้ 5 วัน โดยทำการทดลองคู่ขนานโดยใช้โคอะเซอร์วีนซึ่งเป็นยารักษาข้อเสื่อม เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) เก็บน้ำเลี้ยงมาวิเคราะห์สารที่สลายจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (s-GAGs และ HA) และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ส่วนกระดูกอ่อนที่เลี้ยง 30 วัน ให้เปลี่ยนน้ำเลี้ยงทุก ๆ 7 วัน เมื่อครบกำหนด นำเนื้อเยื่อมาวิเคราะห์ปริมาณกรดยูโรนิกและคอลลาเจนที่คงเหลืออยู่ในเนื้อเยื่อ

การตรวจวิเคราะห์การเสื่อมสลายของสารซีโมแลกุลในเนื้อกระดูกอ่อน

การวิเคราะห์การเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนในวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองนั้น ใช้วิธีการวิเคราะห์ตามรายงานของ Ong-Chai et al. (Ong-Chai et al., 2008) โดยนำน้ำเลี้ยงกระดูกอ่อนมาวิเคราะห์หาการสลาย s-GAGs และ HA ด้วยวิธี dimethylmethylene blue dye binding assay และ competitive inhibition-base-ELISA ตามลำดับ ส่วนชิ้นกระดูกอ่อนนั้น นำมาบดด้วยเอนไซม์ปาเปน แล้วนำไปตรวจวัดหาปริมาณกรดยูโรนิกและคอลลาเจนในเนื้อ

กระดูอ่อนด้วยวิธี colorimetric และ hydroxyproline assay ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในกระดูอ่อน
คำนวณจากสูตร

$$\% \text{ Change of S-GAGs and HA release} = \{100X (\text{Day3 medium}-\text{Day0 medium})/\text{Day0 medium}\}$$

$$\text{Collagen or Uronic acid content (\% of control)} = \{100X (\text{Day3 treated sample})/(\text{Day3 control})\}$$

การตรวจวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงกระดูอ่อน

ตรวจวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ MMP-2 โดยวิธี electrophoresis gelatin zymography ดังที่ได้อธิบายไว้ในรายงานของ Phitak et al. (Phitak et al., 2009)

การตรวจวิเคราะห์ความปลอดภัยของสารชิงเจอโรนต่อเนื้อเยื่อกระดูอ่อน

ตรวจวิเคราะห์ได้ด้วย colorimetric assay โดยวัดการทำงานของเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) ที่ถูกหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยง (Chotjumlong et al., 2010) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมสารทดสอบ วิธีการทำตามคู่มือของผู้ผลิต ใช้ H_2O_2 เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control)

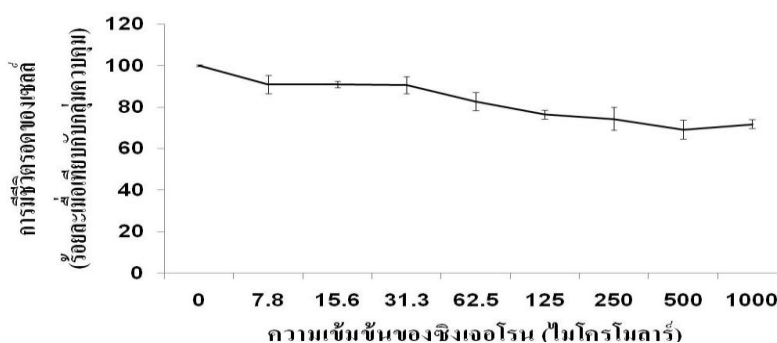
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS ด้วยวิธี ANOVA เลือกระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$) หากค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของ s-GAGs, HA, collagen content, uronic acid content และ MMP-2 activity จากผลการทดลอง 3 ครั้ง โดยในแต่ละการทดลองมีการทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างกลุ่มที่ให้สารกระตุ้นการเสื่อมสลายของกระดูอ่อน และกลุ่มที่ให้สารกระตุ้นการเสื่อมสลายของกระดูอ่อนร่วมกับสารชิงเจอโรนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ผลการวิจัย

ผลทดสอบความปลอดภัยของสารชิงเจอโรนต่อเซลล์กระดูอ่อน (Human articular cartilage)

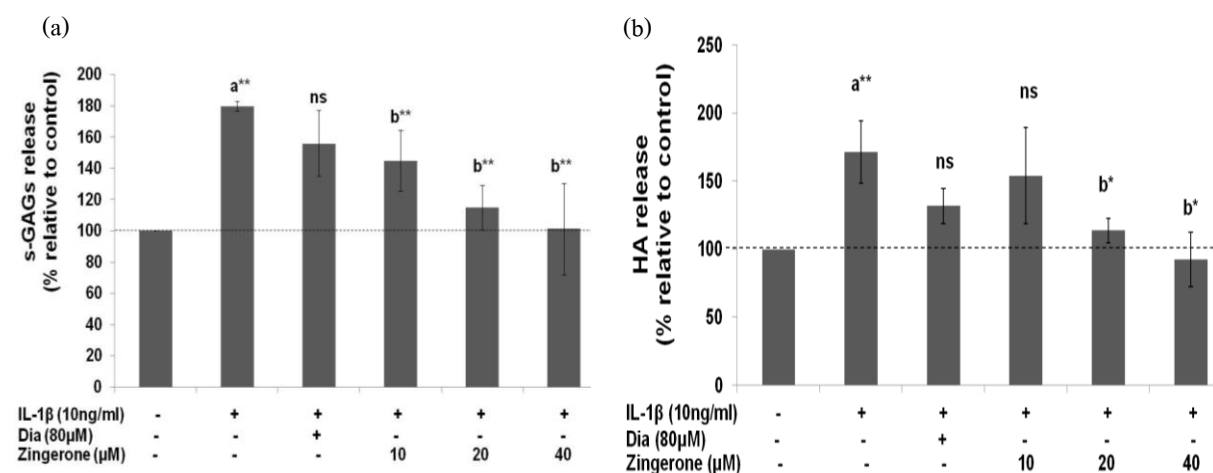
การศึกษาผลของสารต่างๆ โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูอ่อนในหลอดทดลองนั้น ต้องเลือกใช้สารในความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อเซลล์กระดูอ่อน จึงทำการวิเคราะห์โดยวิธี MTT assay จากผลการทดลองพบว่า สารชิงเจอโรนที่มีความเข้มข้นไม่เกิน $125 \mu\text{M}$ มีความปลอดภัยต่อเซลล์กระดูอ่อน เพราะยังคงมีเซลล์เหลืออยู่มากกว่าร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เติมสารชิงเจอโรน (รูปที่ 2) ดังนั้น จึงเลือกใช้สารชิงเจอโรนที่มีความเข้มข้น $10-40 \mu\text{M}$ ในการทำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตลอดการทดลอง



รูปที่ 2. ผลความปลอดภัยของสารซิงเจอโรนต่อเซลล์กระดูกอ่อน (human articular chondrocytes) เพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนในสภาวะที่มีสารซิงเจอโรนความเข้มข้น 0-1000 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์การมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay เปรียบเทียบค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของตัวควบคุมที่ไม่ได้เติมสารซิงเจอโรน ข้อมูลที่ได้แสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ครั้ง

ผลของสารซิงเจอโรนต่อการยับยั้งการสลาย s-GAGs และ HA

แอกเกรแคนเป็นโปรตีนหลักในกระดูกอ่อน ประกอบด้วย s-GAGs จำนวนมากมายเกาะอยู่กับโปรตีนแกนกลาง จากนั้นรวมตัวกับ HA กลายเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนขนาดใหญ่ ถูกยึดโยงอยู่ภายในโครงข่ายเส้นใยคอลลาเจนในแมทริกซ์ของกระดูกอ่อน หากเกิดการสลายของเนื้อกระดูก จะมีการสลายและปลดปล่อยสารชีวโมเลกุลเหล่านี้ออกมา ทำให้ตรวจพบสารเหล่านี้ได้ในน้ำเลี้ยง ในการตรวจหาฤทธิ์ของสารซิงเจอโรนต่อการสลาย s-GAGs และ HA นั้น ทำได้โดยนำเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมาเลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มี IL-1 β ในสภาวะที่มีหรือไม่มีสารซิงเจอโรน เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นจึงเก็บน้ำเลี้ยงมาวิเคราะห์ต่อไป ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการให้สาร IL-1 β ลงไปเพื่อกระตุ้นการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนพบว่ามีการสลาย s-GAGs และ HA (รูปที่ 3) ออกมาสู่น้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อมากขึ้นถึง 1.8 เท่าและ 1.7 เท่า ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อเติมสารซิงเจอโรนในระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงไปร่วมกับ IL-1 β พบว่าสารนี้มีฤทธิ์ทำให้การสลาย s-GAGs และ HA ลดลงอย่างเป็นลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เติมสาร IL-1 β เพียงอย่างเดียว โดยกลุ่มที่ให้สารซิงเจอโรนความเข้มข้น 10, 20 และ 40 μM มีการสลายของ s-GAGs ต่ำกว่ากลุ่ม IL-1 β อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) (รูปที่ 3a) โดยลดลงคิดเป็นร้อยละ 20, 36 และ 44 ตามลำดับ ส่วนผลต่อ HA (รูปที่ 3b) นั้นพบว่า กลุ่มที่ให้สารซิงเจอโรนความเข้มข้น 20 และ 40 μM มีการสลาย HA ต่ำกว่ากลุ่ม IL-1 β อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยลดลงคิดเป็นร้อยละ 34 และ 46 ตามลำดับ และยังคงต่ำกว่ากลุ่มที่ให้ยารักษาข้อเสื่อมไดอะเซวรินด้วย

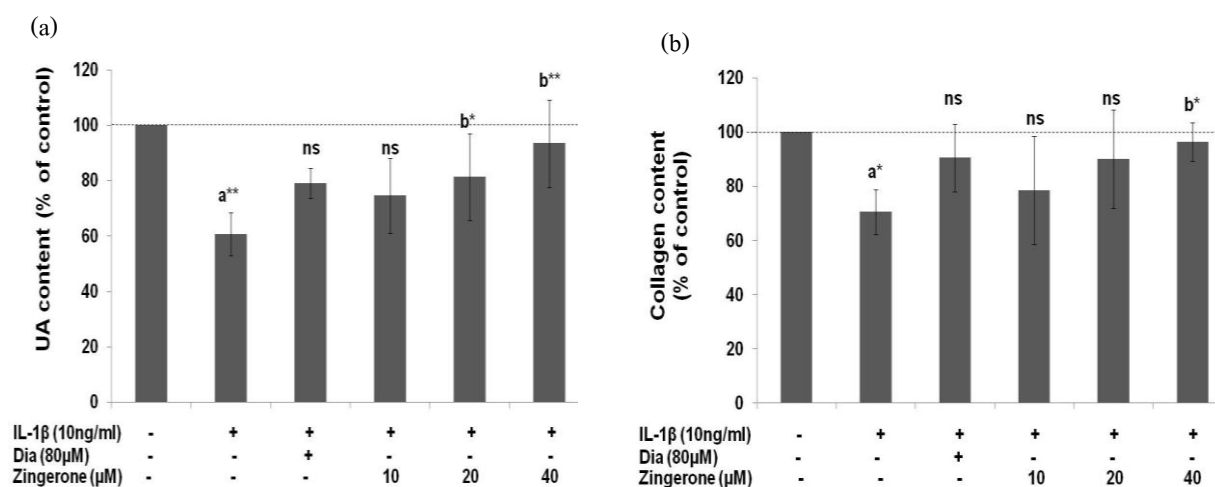


รูปที่ 3. ผลของสารซิงเจอโรนต่อการสลาย s-GAGs (a) และ HA (b) จากกระดูกอ่อนเพาะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IL-1 β เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนข้อต่อในสภาวะที่มีหรือไม่มีตัวกระตุ้น (10 ng/ml IL-1 β) ร่วมกับสภาวะที่มีหรือไม่มีสารซิงเจอโรน (0-40 μM) และยารักษาข้อเสื่อมไดอะเซวริน (80 μM) หลังจากเพาะเลี้ยงไว้ 5 วัน เก็บน้ำเลี้ยงกระดูกอ่อนมาวิเคราะห์หาการสลาย s-GAGs และ HAออกจากชิ้นกระดูกโดยวิธี dimethyl methyl blue assay และ Competitive inhibition-base ELISA ตามลำดับ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม one-way ANOVA และเลือกระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$; *) และที่ 99% ($p < 0.01$; **) เปรียบเทียบค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของตัวควบคุมที่ไม่ได้เติมทั้งสารทดสอบและตัวกระตุ้น แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ครั้ง (a,b = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่

กระตุ้นด้วย IL-1 β ตามลำดับ , ns = ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย IL-1 β , + = มีการเติมสาร, - = ไม่มีการเติมสาร)

ผลของสารซิงเจอโรนต่อการยับยั้งการสูญเสียคอลลาเจนและกรดยูโรนิกออกจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

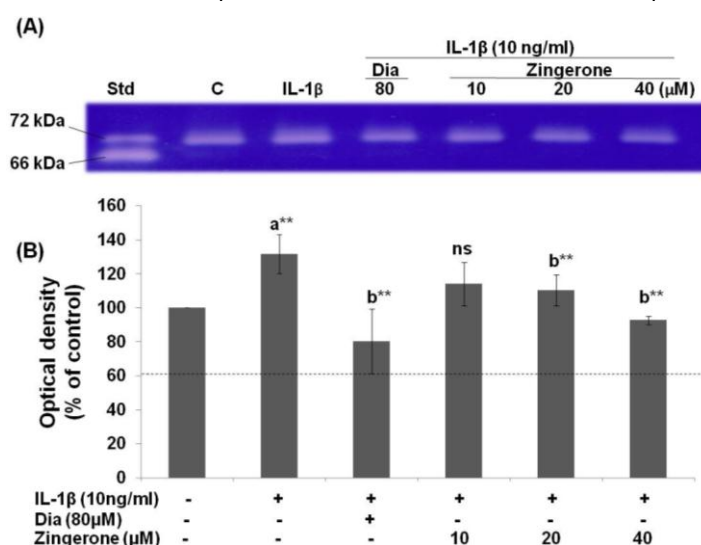
งานวิจัยครั้งนี้มีการวิเคราะห์การสูญเสียเนื้อกระดูกอ่อนเนื่องมาจากฤทธิ์ IL-1 β โดยการตรวจวัดปริมาณกรดยูโรนิก ซึ่งเป็นน้ำตาลอนุพันธ์สำคัญในโครงสร้างของ s-GAGs และคอลลาเจนที่คงเหลืออยู่ในเนื้อกระดูก โดยเอาชิ้นกระดูกหลังจากเติมสารทดสอบแล้ว 30 วัน มาย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หากรดยูโรนิกและคอลลาเจน นำค่าที่ได้มาปรับมาตรฐานด้วยน้ำหนักแห้งของชิ้นกระดูก จากผลการทดลองพบว่าเมื่อให้สาร IL-1 β ลงไปกระตุ้นการเสื่อมสลายมีผลให้มีปริมาณกรดยูโรนิกและคอลลาเจนในเนื้อกระดูกอ่อนลดลง โดยเหลืออยู่เพียง 0.6 และ 0.7 เท่า ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4) แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดยูโรนิกระหว่างกลุ่มที่เติม IL-1 β อย่างเดียว (รูปที่ 4a) กับกลุ่มที่ให้สารซิงเจอโรน (0-40 μ M) ร่วมด้วย พบว่ามีปริมาณกรดยูโรนิกคงเหลืออยู่ในเนื้อกระดูกอ่อนเพิ่มขึ้นอย่างเป็นลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เติมสาร IL-1 β เพียงอย่างเดียว โดยกลุ่มที่ให้สารซิงเจอโรนความเข้มข้น 20 และ 40 μ M มีปริมาณกรดยูโรนิกสูงกว่ากลุ่ม IL-1 β อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) คิดเป็นร้อยละ 34 และ 54 ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนในเนื้อกระดูกอ่อน พบว่ากลุ่มที่ให้สารซิงเจอโรนความเข้มข้น 40 μ M มีปริมาณคอลลาเจนสูงกว่ากลุ่ม IL-1 β อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) คิดเป็นร้อยละ 37 (รูปที่ 4b) นอกจากนี้ยังพบว่าสารซิงเจอโรนมีผลยับยั้งการสลายของเนื้อกระดูกได้ดีกว่ายารักษาข้อเสื่อมไดอะเซอริน โดยมีปริมาณกรดยูโรนิกและคอลลาเจนเหลือในเนื้อกระดูกมากกว่า



รูปที่ 4. ผลของซิงเจอโรนต่อปริมาณกรดยูโรนิก (a) และคอลลาเจน (b) ในกระดูกอ่อนเพาะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IL-1 β เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนข้อต่อในสภาวะที่มีหรือไม่มีตัวกระตุ้น (10 ng/ml IL-1 β) ร่วมกับสภาวะที่มีหรือไม่มีสารซิงเจอโรน (0-40 μ M) และยารักษาข้อเสื่อมไดอะเซอริน (80 μ M) หลังจากเพาะเลี้ยงไว้ 30 วัน นำชิ้นกระดูกอ่อนมาย่อยและนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดยูโรนิก และปริมาณคอลลาเจน โดยวิธี colorimetric assay วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม one-way ANOVA และเลือกระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$;) และที่ 99% ($p < 0.01$;) เปรียบเทียบค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของตัวควบคุมที่ไม่ได้เติมทั้งสารทดสอบและตัวกระตุ้น ข้อมูลที่ได้แสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองทั้งสิ้น 3 ครั้ง (a,b = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่กระตุ้นด้วย IL-1 β ตามลำดับ , ns = ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย IL-1 β , + = มีการเติมสาร, - = ไม่มีการเติมสาร)

สารซิงเจอโรนยับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ MMP-2 ในน้ำเลี้ยงกระดูกอ่อน

การวิเคราะห์ผลของสารซิงเจอโรนต่อการหลั่งเอนไซม์ MMPs ออกจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนสุนัขน้ำเลี้ยง ทำได้โดยตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในน้ำเลี้ยง โดยวิธี gelatin zymography ผลการศึกษาพบว่า เมื่อให้สาร IL-1 β ลงไป เอนไซม์ MMP-2 มีการทำงานเพิ่มขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมถึง 0.7 เท่า (รูปที่ 5) แต่เมื่อเติมสารซิงเจอโรนในระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงไปร่วมกับ IL-1 β พบว่าสารนี้มีแนวโน้มลดการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ลงได้อย่างเป็นลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เติมสาร IL-1 β เพียงอย่างเดียว โดยกลุ่มที่ให้สารซิงเจอโรนความเข้มข้น 20 และ 40 μ M มีการทำงานของเอนไซม์ต่ำกว่ากลุ่ม IL-1 β อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดยลดลงคิดเป็นร้อยละ 16 และ 30 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าไดอะเซอรินยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีที่สุด โดยมีการทำงานของเอนไซม์ลดลงต่ำกว่ากลุ่ม IL-1 β ถึง 36 เปอร์เซ็นต์

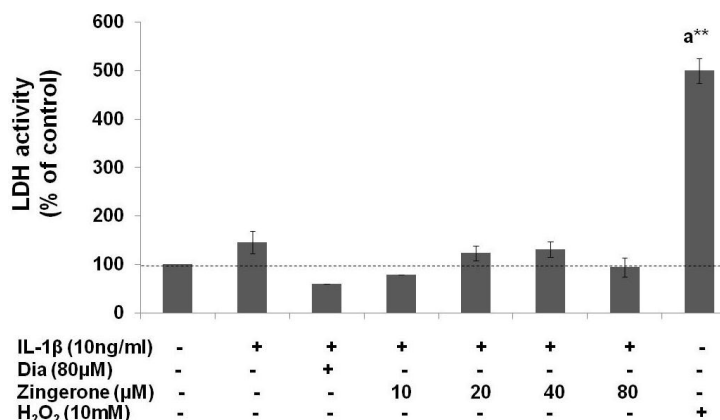
รูปที่ 5. ผลของสารซิงเจอโรนต่อการหลั่งเอนไซม์ MMP-2 จากกระดูกอ่อนเพาะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IL-1 β

เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนข้อต่อในสภาวะที่มีหรือไม่มีตัวกระตุ้น (10 ng/ml IL-1 β) ร่วมกับสภาวะที่มีหรือไม่มีสารซิงเจอโรน (0-40 μ M) และยารักษาข้อเสื่อม ไดอะเซอริน (80 μ M) หลังจากเพาะเลี้ยงไว้ 5 วัน เก็บน้ำเลี้ยงกระดูกอ่อนมาวิเคราะห์หาการหลั่งเอนไซม์ MMP-2 โดยวิธี gelatin zymography สังเกตแถบสีบนแผ่นเจลซึ่งเป็นบริเวณที่มีการทำงานของเอนไซม์ (A) กราฟแท่งที่ได้แสดงในรูป (B) เป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน คำนวณจากความเข้มของแถบสี จากการทดลอง 3 ครั้ง วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม one-way ANOVA และเลือกระดับความเชื่อมั่นที่ 99% ($p < 0.01$; **) เปรียบเทียบค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของตัวควบคุมที่ไม่ได้เติมทั้งสารทดสอบและตัวกระตุ้น (a, b = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่กระตุ้นด้วย IL-1 β ตามลำดับ, ns = ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย IL-1 β , + = มีการเติมสาร, - = ไม่มีการเติมสาร)

ผลความปลอดภัยของสารซิงเจอโรนต่อเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเพาะเลี้ยง

ความเป็นพิษของสารที่ใช้ทดสอบในระบบ cartilage explant model อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารที่ปลดปล่อยมาในน้ำเลี้ยง ส่งผลให้ข้อมูลการวิเคราะห์ฤทธิ์ปกป้องกระดูกอ่อนของสารที่สนใจคลาดเคลื่อน การตรวจวัดทำได้โดยวัดการทำงานของเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) ที่ถูกหลั่งออกมาสู่ น้ำเลี้ยง โดยวิธี colorimetric assay ปกติแล้ว LDH เป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ แต่สามารถตรวจพบนอกเซลล์หากเซลล์ตายหรือเชื้อหุ้มเซลล์ถูกทำลายเพราะความเป็นพิษของสาร จากผลการทดลองพบว่า ทุกกลุ่มการทดลองทั้งในกลุ่มที่ให้ IL-1 β เพียงอย่างเดียว, กลุ่มที่ให้ IL-1 β ร่วมกับ

ยาโคอะเซอร์ริน หรือกลุ่มที่ให้ IL-1 β ร่วมกับสารเชิงเจอโรนในความเข้มข้นต่างๆ มีความปลอดภัยต่อเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน จึงไม่พบการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ LDH activity เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมทั้งสารกระตุ้นและสารทดสอบ (รูปที่ 6)



รูปที่ 6. ผลทดสอบความปลอดภัยต่อเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของสารที่ใช้ศึกษาในระบบ cartilage explant culture

ทำโดยเพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนข้อต่อในสภาวะที่มีหรือไม่มีตัวกระตุ้น (10 ng/ml IL-1 β) ร่วมกับสภาวะที่มีหรือไม่มีสารเชิงเจอโรน (0-80 μ M) และยารักษาข้อเสื่อมโคอะเซอร์ริน (80 μ M) หลังจากเพาะเลี้ยงไว้ 5 วัน เก็บน้ำเลี้ยงกระดูกอ่อนมาวิเคราะห์หาความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อโดยวิธี lactate dehydrogenase (LDH) assay วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม one-way ANOVA และเลือกระดับความเชื่อมั่นที่ 99% ($p < 0.01$; **) เปรียบเทียบค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของตัวควบคุมที่ไม่ได้เติมทั้งสารทดสอบและตัวกระตุ้น ข้อมูลที่ได้แสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองทั้งสิ้น 3 ครั้ง (a = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, + = มีการเติมสาร, - = ไม่มีการเติมสาร)

อภิปรายผลการวิจัย

IL-1 β เป็นไซโตไคน์สำคัญที่กระตุ้นให้เกิดการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน โดยเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนในกระบวนการแคแทบอลิซึม รวมถึงเอนไซม์ต่างๆ ทำให้เกิดการดำเนินไปของโรคข้อเสื่อม (Daheshia and Yao, 2008) มีรายงานพบว่า IL-1 β กระตุ้นการสลายและยับยั้งการสร้างซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคนในแมทริกซ์ของกระดูกอ่อน ส่งผลให้กระดูกอ่อนเพาะเลี้ยงมีปริมาณซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคนลดลง (Stabellini et al., 2003) IL-1 β กระตุ้นเซลล์กระดูกอ่อนให้สร้างและหลั่งเอนไซม์ MMPs ออกมามากขึ้น ทั้งชนิดที่ 1, 2, 3, 9 และ 13 (Tetlow et al., 2001; Phitak et al., 2009) เกิดการย่อยสลายคอลลาเจนและโปรตีโอไกลัยแคนออกจากเนื้อกระดูก แล้วปลดปล่อย s-GAGs และ HA ออกสู่น้ำเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น (Stabellini et al., 2003; Phitak et al., 2009) จากผลวิจัยครั้งนี้พบว่า น้ำเลี้ยงของกระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β มีการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 เพิ่มขึ้น สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของการปลดปล่อย s-GAGs และ HA ออกสู่น้ำเลี้ยง และการลดลงของปริมาณคอลลาเจนและกรดยูโรนิกในชิ้นกระดูกอ่อน ซึ่งให้เห็นว่าการเติม IL-1 β ลงในชิ้นกระดูกอ่อนเพาะเลี้ยงสามารถกระตุ้นการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนได้จริง และเมื่อให้ยารักษาข้อเสื่อมโคอะเซอร์ริน (positive control) พบว่ายาสามารถยับยั้งฤทธิ์ IL-1 β ที่กระตุ้นการเสื่อมสลายของกระดูกได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Domagala (Domagala et al., 2006) ที่พบว่าโคอะเซอร์รินยับยั้งฤทธิ์ของ IL-1 β ในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ MMPs ผ่าน NF-KB แสดงให้เห็นว่าการทำ cartilage explant model ครั้งนี้มีประสิทธิภาพดี มีผลการวิจัยที่เชื่อถือได้

จากผลการทดลองพบว่าสารซิงเจอโรนสามารถต้านฤทธิ์กระตุ้นการเสื่อมสลายของ IL-1 β ได้ ทำให้สารบ่งชี้การเสื่อมสลายในน้ำเลี้ยงลดลงคล้ายคลึงกับยาไดอะเซอริน โดยสารนี้น่าจะมีฤทธิ์ที่ดีกว่า เนื่องจากขนาดที่ใช้เพียงครึ่งหนึ่งของยาไดอะเซอรินก็สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ IL-1 β ได้ แต่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมให้รอบด้านมากขึ้น ส่วนปริมาณ MMP-2 ที่ลดลงในน้ำเลี้ยงของกลุ่มที่ให้สารซิงเจอโรน น่าจะบ่งชี้ได้ว่าสารนี้น่าจะมีผลต่อการลดการสังเคราะห์และปลดปล่อยเอนไซม์นี้จากเซลล์ของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Kim (Kim et al., 2010) ที่พบว่าสารซิงเจอโรนลดการอักเสบและการสังเคราะห์เอนไซม์สลายเมทริกซ์ในไตของหนูสูงอายุและเซลล์สร้างหลอดเลือด โดยยับยั้งผ่านสัญญาณ NF- κ B/MAPK ทำให้เชื่อได้ว่ากลไกการออกฤทธิ์ของสารซิงเจอโรน น่าจะเกี่ยวข้องในระดับโมเลกุลผ่านการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ MMPs ที่ถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นโดย IL-1 β เช่น NF- κ B หรือ MAPK โดยอาจจับกับ Vanilloid receptor-1 บนผิวเซลล์ ซึ่งเป็นตัวรับจำเพาะของสารซิงเจอโรน ดังในรายงานของ Vadim (Vadim et al., 2002) และ Megumi (Megumi et al., 2012) ซึ่งขณะนี้ทีมผู้วิจัยกำลังดำเนินการวิจัยอยู่ รวมทั้งการศึกษาผลของสารซิงเจอโรนต่อการสังเคราะห์ PGE2 ด้วย โดยที่หากพบว่าการยับยั้ง MMPs ของสารไม่ผ่าน PGE2 แสดงว่าสารนี้น่าจะเป็นสารที่มีศักยภาพสูงที่จะพัฒนาเป็นยาในกลุ่ม symptomatic slow acting drug for OA treatment เช่นเดียวกับยาไดอะเซอริน เนื่องจากสามารถยับยั้งการอักเสบ แต่ไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงคือ แผลในกระเพาะอาหารเหมือนยาในกลุ่ม NSAID และยังมีฤทธิ์ป้องกันการสลายกระดูกอ่อนได้อย่างดีอีกด้วย

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการทดลองแบบให้สารร่วมกัน (co-treatment) ซึ่งมีนัยสำคัญในเรื่องของการรักษา แต่ยังไม่มีการศึกษาการต้านฤทธิ์แบบการป้องกัน (pre-treatment) ซึ่งจะต้องได้รับการศึกษาต่อไป นอกจากนี้ผลของสารซิงเจอโรนต่อการเพิ่มการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลในกระดูกอ่อนยังคงต้องศึกษาเพิ่มเติมเช่นกัน เพราะยารักษาโรคข้อเสื่อมที่ดี นอกจากจะป้องกันการสลายของกระดูกอ่อนแล้ว ยังควรมีฤทธิ์เพิ่มการซ่อมแซมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ได้เสื่อมสลายไปแล้วจากการเกิดโรคข้อเสื่อมด้วย

ผลการศึกษาครั้งนี้ถือว่าเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์สำคัญซึ่งสนับสนุนการแพทย์ทางเลือกที่ใช้ในการรักษาโรคข้อเสื่อมและข้ออักเสบ ซึ่งที่ผ่านมานอกจากจะมีรายงานถึงฤทธิ์ลดการปวด และอักเสบแล้ว ครั้งนี้ถือเป็นการรายงานครั้งแรกถึงผลของสารจากพืชที่สามารถป้องกันการสลายกระดูกอ่อนในโรคข้อเสื่อมที่กระตุ้นโดย IL-1 β ได้อีกด้วย

Acknowledgement

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

- Boileau C, Tat SK, Pelletier JP, Cheng S, Martel-Pelletier J (2008) "Diacerein inhibits the synthesis of resorptive enzymes and reduces osteoclastic differentiation/survival in osteoarthritic subchondral bone: a possible mechanism for a protective effect against subchondral bone remodelling" *Arthritis Res. Ther.* 10: R71.
- Chan PS, Caron JP, Orth MW (2006) "Short-term gene expression changes in cartilage explants stimulated with interleukin beta plus glucosamine and chondroitin sulfate" *J. Rheumatol.* 33: 1329-1340.
- Chotjumlong P, Khongkhunthian S, Ongchai S, Reutrakul V, Krisanaprakornkit S (2010) "Human-defensin-3 up-regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ synthesis in human gingival fibroblasts" *J. Periodont. Res.* 45: 464-470.
- Domagala F, Martin G, Bogdanowicz P, et al.(2006) "Inhibition of interleukin-1beta-induced activation of MEK/ERK pathway and DNA binding of NF-kappaB and AP-1: Potential mechanism for Diacerein effects in osteoarthritis" *Biorheology* 43,3-4:577-87

The 2nd STOU Graduate Research Conference

- Haghighi M, Khalvat A, Toliati T, Jallaei S (2005) "Comparing the effects of ginger (*Zingiber officinale*) extract and ibuprofen on patients with osteoarthritis" *Arch. Iranian Med.* 8: 267-271.
- Harlan RS, Haut RC, Orth MW (2011) "The effect of glucosamine and chondroitin on stressed equine cartilage explants" *J. Equine Vet. Sci.* 32: 12-14.
- Kabuto H, Nishizawa M, Tada M, Higashio C, Shishibori T, Kohno M (2005) "Zingerone [4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone] Prevents 6-Hydroxydopamine-induced Dopamine Depression in Mouse Striatum and Increases Superoxide Scavenging Activity in Serum". *Neurochemical Research* 30,3:325-32.
- Kim MK, Chung SW, Kim DH, Kim JM, Lee EK, Kim JY, et al (2010) "Modulation of age-related NF-kB activation by dietary zingerone via MAPK pathway" *Experimental Gerontology* 45,6:419-26.
- Macrory L, Vaughan-Thomas A, Clegg PD, Innes JF (2009) "An exploration of the ability of tepoxalin to ameliorate the degradation of articular cartilage in a canine in vitro model" *BMC. Vet. Res.* 5: 25.
- Mark AP, John FM, Kurt RG, James RB (2005) "Collagen and aggrecan degradation is blocked in Interleukin-1-treated cartilage explants by an inhibitor of IκB kinase through suppression of metalloproteinase expression" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315: 382-388.
- Megumi Kobayashi, Kenta Watanabe, Satoshi Yokoyama, et al. (2012) "Capsaicin, a TRPV1 Ligand, Suppresses Bone Resorption by Inhibiting the Prostaglandin E Production of Osteoblasts, and Attenuates the Inflammatory Bone Loss Induced by Lipopolysaccharide" *ISRN Pharmacology* 2012, Article ID 439860 doi:10.5402/2012/439860
- Nageshwar Rao B, Satish Rao BS (2010) "Antagonistic effects of Zingerone, a phenolic alkanone against radiation-induced cytotoxicity, genotoxicity, apoptosis and oxidative stress in Chinese hamster lung fibroblast cells growing in vitro" *Mutagenesis* 25,6:577-87
- Netzel-Arnett S, Mallya SK, Nagase H, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE (1991) "Continuously recording fluorescent assays optimized for five human matrix metalloproteinases" *Anal. Biochem.* 195: 86-92.
- Ong-Chai S, Chaiwongsa R, Viriyakhasem N, Pompimon W, Tangyuenyong S (2008) "Effect of Active compounds from *Andrographis paniculata* (Nees) on protection of equine articular cartilage degradation *In Vitro*" *KKU. Vet. J.* 18,2: 81-96.
- Phitak T, Choocheep K, Pothacharoen P, Pompimon W, Premanode B, Kongtawelert P (2009) "The effects of p-hydroxycinnamaldehyde from *Alpinia galanga* extracts on human chondrocytes" *Phytochemistry* 70: 237-243.
- Shin S-G, Kim JY, Chung HY, Jeong J-C (2005) "Zingerone as an Antioxidant against Peroxynitrite" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53,19:7617-22
- Sumantran VN, Kulkarni A, Chandwaskar R, Harsulkar A, Patwardhan B, Chopra A, Wagh UV (2008) "Chondroprotective Potential of Fruit Extracts of *Phyllanthus emblica* in Osteoarthritis. Evid. Based Complement" *Alternat. Med.* 5: 329-335.
- Svetlana K, Jonathan S, Steven BA (2007). "Osteoarthritis 2007". *Bull. NYU. Hosp. Jt. Dis.* 65,3: 222-228.
- Tamura T, Ohmori K (2001) "Rhein, an active metabolite of diacerein, suppresses the interleukin-1α-induced proteoglycan degradation in cultured rabbit articular chondrocytes" *Jpn. J. Pharmacol.* 85: 101-104.
- Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE (2001) "Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes" *Arthritis Rheum.* 44: 585-594.
- Vadim N Dedov, Van H Tran, Colin C Duke, Mark Connor, MacDonald J Christie, Sravan Mandadi, Basil D Roufogalis (2002) "Gigneroles: a novel class of vanilloid receptor 1 (VR1) agonists" *British journal of Pharmacology* 137,6:793-798.
- Volk SW, Kapatkin AS, Haskins ME, Walton RM, D'Angelo M (2003) "Gelatinase activity in synovial fluid and synovium obtained from healthy and osteoarthritic joints of dogs" *Am. J. Vet. Res.* 64: 1225-1233.
- Zrimšek P, Kadunc KV, Mrkun J, Kosec M (2007) "Diagnostic value of MMP-2 and MMP-9 in synovial fluid for identifying osteoarthritis in the distal interphalangeal joint in horses" *Acta. Vet. Brno.* 76: 87-89.