

Thesis Title Effect of *Boesenbergia pandurata* (Robx.) Extracts and Flavonoid Derivatives on the Levels of Hyaluronan in Oral Fibroblast

Author Ms. Saichon Laokhum

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Siriwan Ong-chai	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Suttichai Krisanaprakornkit	Member
Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert	Member

ABSTRACT

The chronic inflammatory in periodontal disease was found to associate with the increase in hyaluronan by fibroblasts. The aim of this study was to investigate the effect of *B. pandurata* extracts and flavonoid derivatives on the release of HA into culture medium including RNA level of hyaluronan synthase (HAS) in human oral fibroblasts.

Oral fibroblasts were treated with *B. pandurata* extracts (methanol, ethyl acetate, acetone and hexane), flavonoids isolated from *B. pandurata* (pinostrobin and pinocembrin) and commercially available flavonoid derivatives in with or without of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) at dose 100 ng/ml or IL-1 β (10 ng/ml) for 24 hour. The flavonoid derivatives tested the inhibitory activities on HA production in oral fibroblasts including β -naphthoxyflavone, 2'-methoxyflavone, 5-methoxyflavone, 3-hydroxy-6-methoxyflavone, 3-hydroxy-7-methoxyflavone, flavone, 5-hydroxyflavone, and 7-hydroxyflavone. Hyaluronan in the culture medium and mRNA level of hyaluronan synthase in oral fibroblasts were analyzed by the ELISA-based assay and RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), respectively. Cytotoxicity was also determined for quantification of cell death by MTT assay and the measurement cytoplasmic LDH enzyme activity released by damaged cells in culture medium.

TPA and IL-1 β dramatically increased HA level in the culture medium when compared with control. All extracts from *B. pandurata* significantly reduced HA level induced by TPA from 10 μ g/ml. Pinocembrin and pinostrobin, flavonoid compounds isolated from *B. pandurata* significantly inhibited the induction effect of TPA or IL-1 β in dose response manner at range of concentration 3-10 μ g/ml. Pinocembrin was found to have higher inhibitory activity than pinostrobin. These were agreed with the results of RNA level of hyaluronan synthase (HAS) investigated by RT-PCR. When compared between flavonoids isolated from *B. pandurata* and commercial flavonoid derivatives at the same concentration (10 μ g/ml), it was found that 5-methoxyflavone, 2'-methoxyflavone, 5-hydroxyflavone, flavone, and β -naphthoxyflavone significantly reduced HA level. Pinocembrin showed the highest inhibitory effects on the reduction of HA release, which was stimulated by TPA (55.72 %) or IL-1 β (65.1%), in comparison with those of commercial flavonoids. According to the investigation of HAS mRNA expression, it was found that all flavonoids, which decreased the release of hyaluronan, could be complimentary to the decreasing of HAS mRNA expression induced by TPA and IL-1 β .

This study indicated the inhibitory activity of flavonoids isolated from *B. pandurata* including some commercial flavonoid derivatives on HA production in oral fibroblasts induced by TPA and IL-1 β . These results may suggest that these flavonoids have ability to reduce tissue hydration and inflammation during wound healing. The findings from this *in vitro* study will be able to further develop for a new drug in the management of inflammatory oral diseases.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของสารสกัดจากกระชาย (*Boesenbergia pandurata* Robx.) และอนุพันธ์
 ฟลาโวนอยด์ต่อระดับไฮยาลูโรแนนในเซลล์สร้างเส้นใยจากช่องปาก

ผู้เขียน สายชล เหลาคำ

ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. ศิริวรรณ องค์กรไชย	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ	กรรมการ
รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	กรรมการ

บทคัดย่อ

การอักเสบเรื้อรังที่เกิดขึ้นในโรคปริทันต์ มีความสัมพันธ์กับการหลั่งสารไฮยาลูโรแนนที่เพิ่มมากขึ้นโดยเซลล์จากเนื้อเยื่อในช่องปาก วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากกระชายและสารอนุพันธ์ฟลาโวนอยด์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่ได้จากเนื้อเยื่อของช่องปากในการหลั่งสารไฮยาลูโรแนนออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ รวมถึงปริมาณอาร์เอ็นเอของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สร้างสารไฮยาลูโรแนน (hyaluronan synthase; HAS)

เซลล์สร้างเส้นใยที่ได้จากเนื้อเยื่อของช่องปากถูกนำมาเลี้ยงในภาวะปกติและภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย 100 ng/ml TPA (12-O-เตตระเดคะโนอิลฟอบบอล-13-เอซีเตต) หรือ 10 ng/ml IL-1 β (อินเทอลิวคิน-1เบต้า) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ร่วมกับการทดสอบสารต่าง ๆ ที่สนใจคือ สกัดจากกระชายซึ่งสกัดได้จากเมทานอล แอซีโทน เอทิลเอซีเตต และ เฮกเซน รวมทั้งสารฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากกระชายคือ ฟิโนสโทรบิน และฟิโนเซมบริน และสารอนุพันธ์ฟลาโวนอยด์ที่ซื้อมาอีก 8 ชนิดคือ เบต้าแนพทอกซีฟลาโวน (β -naphthoxyflavone), 2'-เมทอกซีฟลาโวน (2'-methoxyflavone), 5-เมทอกซีฟลาโวน (5-methoxyflavone), 3-ไฮดรอกซี-6-เมทอกซี ฟลาโวน (3-hydroxy-6-methoxyflavone), 3-ไฮดรอกซี-7-เมทอกซีฟลาโวน (3-hydroxy-7-methoxyflavone), ฟลาโวน (flavone), 5-ไฮดรอกซีฟลาโวน (5-hydroxyflavone) และ 7-ไฮดรอกซีฟลาโวน (7-hydroxyflavone) จากนั้นวัดระดับไฮยาลูโรแนนในน้ำเลี้ยงเซลล์ และปริมาณอาร์เอ็นเอของเอนไซม์ hyaluronan synthase โดยวิธี ELISA-based assay และ RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) ตามลำดับ รวมทั้งวัดหาความเป็นพิษต่อ

เซลล์ของสารทั้งหมดโดยวิธี MTT assay และการหาปริมาณเอนไซม์เลคเตคตินไฮโดรจีเนสในน้ำเลี้ยงเซลล์

เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย TPA และ IL-1 β พบว่าเซลล์จะหลั่งสารไฮยาลูโรแนนออกมาในน้ำเลี้ยงเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อเติมสารสกัดจากกระชาย พบว่าสามารถลดระดับไฮยาลูโรแนนที่ถูกกระตุ้นด้วย TPA ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ พิโนเซมบรินและพิโนสโทรบิน ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากกระชาย สามารถลดฤทธิ์ของ TPA และ IL-1 β ทำให้ระดับไฮยาลูโรแนนลดลงอย่างมีนัยสำคัญตามเข้มข้นของสาร (3-30 $\mu\text{g/ml}$) โดย พิโนเซมบรินมีผลในการลดระดับไฮยาลูโรแนนมากกว่าพิโนสโทรบิน และเมื่อทำการวัดหาปริมาณอาร์เอ็นเอของเอนไซม์ hyaluronan synthase พบว่าให้ผลเป็นไปในทางเดียวกัน ในการเปรียบเทียบฤทธิ์ของพิโนเซมบรินและพิโนสโทรบินกับสารอนุพันธ์ฟลาโวนอยด์ที่ชื่อมา 8 ชนิดที่ความเข้มข้นเดียวกัน (10 $\mu\text{g/ml}$) พบว่าสารอนุพันธ์ ฟลาโวนอยด์ 5 ชนิดคือ 5-เมทอกซีฟลาโวน 2'-เมทอกซีฟลาโวน 5-ไฮดรอกซีฟลาโวน ฟลาโวน และเบต้าแนพทอกซีฟลาโวน สามารถลดระดับ HA ได้อย่างมีนัยสำคัญ พิโนเซมบรินสามารถลดระดับไฮยาลูโรแนนได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับสารฟลาโวนอยด์ชนิดอื่น โดยสามารถลดได้ร้อยละ 55.72 และ 65.10 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TPA และ IL-1 β ตามลำดับ เมื่อทำการวัดหาปริมาณอาร์เอ็นเอของเอนไซม์ hyaluronan synthase พบว่าให้ผลเป็นไปในทางเดียวกันกับระดับไฮยาลูโรแนนคือ สารฟลาโวนอยด์ทุกตัวที่สามารถลดระดับไฮยาลูโรแนนให้ผลในการลดปริมาณอาร์เอ็นเอเช่นกัน

ในการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่า สารสกัดกระชาย สารพิโนเซมบริน สารพิโนสโทรบินและสารอนุพันธ์ฟลาโวนอยด์บางชนิดสามารถยับยั้งไฮยาลูโรแนนที่ถูกกระตุ้นด้วย TPA และ IL-1 β ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการลดผลของการบวมและการอักเสบของเนื้อเยื่อเมื่อเกิดบาดแผลได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะได้มีการพัฒนาสารดังกล่าวเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคในช่องปากได้ต่อไปในอนาคต