



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ปรับสมดุลภูมิคุ้มกันของสารที่แยกได้จากแก่นแกลแล  
Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of natural compounds  
isolated from the heartwood of *Maclura cochinchinensis*

คณะนักวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. วรางคณา จุ่งลก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธัญญรัศม์ อุทัยพันธ์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย

ประจำปีงบประมาณ 2564

มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

## บทคัดย่อ

อาการไข้เป็นหนึ่งในอาการที่เกิดจากการที่ร่างกายมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อการติดเชื้อ หรือเป็นกลุ่มอาการตอบสนองต่อการอักเสบทั่วร่างกาย อาจนำไปสู่ภาวะช็อกและเสียชีวิตได้ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ไม่สามารถควบคุมได้ส่งผลให้เกิดการสร้างสารชักนำการอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มากจนเกินไปจนนำไปสู่การทำลายเนื้อเยื่อของร่างกาย จากข้อมูลภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทย พืชสมุนไพรไทยแก่แล หรือ *Maclura cochinchinensis* (Lour.) Corner ใช้เป็นยาแก้ไข้รากสาด แก้ไข้พิษ ไล่ไข้ และช่วยบำรุงน้ำเหลืองให้เป็นปกติ ทางผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าสารสกัดและสารที่แยกได้จากแก่แลอาจมีผลต่อการควบคุมการสร้างสารชักนำการอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาว ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบเอทานอลจากแก่นแก่แลและสารสำคัญ (สาร 1-10) ที่แยกได้จากแก่นแก่แลต่อการยับยั้งสารชักนำการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) และเซลล์ลิมโฟซัยต์ (Jurkat) และตรวจสอบกลไกในการควบคุมการสร้างสารชักนำการอักเสบ ในการศึกษาผู้วิจัยประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ ระดับไนตริกออกไซด์ (NO) ระดับพลอสตาแกรนดิน ( $PGE_2$ ) และไซโตไคน์ และการแสดงออกของโปรตีน iNOS COX-2 และ PI3K/Akt ด้วย MTT assay Greiss assay ELISA และ Western blot analysis ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าสารที่ 1-5 เป็นสารในกลุ่มแซนโทน ส่วนสารที่ 6-10 เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยมีสารที่ 9 ซึ่งมีชื่อว่า มอริน เป็นสารสำคัญตัวหลักที่ใช้เป็นดัชนีทางชีวภาพของแก่นแก่แล ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) พบว่าสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดระดับ NO  $PGE_2$  และไซโตไคน์ชักนำการอักเสบ (TNF- $\alpha$  IL-6 และ IL-1 $\beta$ ) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารที่ 1 และ 2 เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 10-40 ไมโครโมลาร์ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบดีที่สุด โดยมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับยาต้านอักเสบ dexamethasone ที่ 10 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่สารที่ 9 มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในระดับต่ำ กลไกการต้านอักเสบของสารที่ 1 เกิดจากการลดการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 ผ่านการยับยั้งกระบวนการฟอสโฟรีเลชันของโปรตีน Akt ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กลไกการต้านอักเสบของสารสกัดหยาบแก่นแก่แล สารที่ 2 และสารที่ 9 เกิดจากการลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS แต่ไม่ได้เกิดจากการลดการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2 ส่วนผลการศึกษาในเซลล์ Jurkat พบว่าสารสกัดหยาบและสารที่ 1 2 และ 9 สามารถลดการสร้างไซโตไคน์ชักนำการอักเสบในกลุ่ม Th1 cytokine (IL-6 และ IFN $\gamma$ ) ได้ และมีแนวโน้มการเพิ่มไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่ลดการอักเสบ Th2 cytokine IL-4 การศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสำคัญจากแก่นแก่แลมีสรรพคุณในการต้านอักเสบและปรับสมดุลการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งสอดคล้องกับสรรพคุณตามภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทย

**คำสำคัญ** แก่แล แมคโครฟาจ ลิมโฟซัยต์ สารชักนำการอักเสบ แซนโทน ฟลาโวนอยด์

## Abstract

Fever is one of the symptoms of an infection or a group of inflammatory responses throughout the body that can result in shock and death. The pathological process is associated with a failure to regulate the process of white blood cell overproduction of inflammatory mediators, which can lead to tissue destruction. According to traditional medical use in Thailand, Kaelae or *Maclura cochinchinensis* (Lour.) Corner is a Thai medicinal plant that has reportedly been used as a typhus treatment, febrifuge, antipyretic, and to support a normal lymphatic system. Therefore, we surmised that Kaelae extract might have an impact on regulating the inflammatory mediators that are produced by white blood cells. This study aims to examine the impact of Kaelae crude ethanol extract and its active component (compound 1-10) isolated from Kaelae extract on the production of inflammatory mediators in macrophages (RAW264.7) and lymphocytes (Jurkat), as well as to investigate mechanisms for controlling the production of inflammatory mediators. The cytotoxicity, nitric oxide (NO), prostaglandin (PGE<sub>2</sub>) and inflammatory cytokines, and expression of iNOS, COX-2, and PI3K/Akt proteins were assessed by MTT assay, Greiss assay, ELISA, and Western blot analysis, respectively. Compounds 1–5 were identified as xanthenes, whereas compounds 6–10 were identified as flavonoids. Compound 9, Morin, is the major compound employed as a biological index of the Kaelae. In LPS-activated RAW264.7 macrophage, crude extract at a concentration of 160 g/ml significantly reduced levels of NO, PGE<sub>2</sub>, and inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ ). Compounds 1 and 2 (10–40  $\mu$ M) are the most potent anti-inflammatory agents, with equal efficacy to the anti-inflammatory medication dexamethasone at 10  $\mu$ M, while compound 9 has minimal anti-inflammatory action. The anti-inflammatory mechanism of compound 1 was mediated by a significant decrease in the production of iNOS and COX-2 via reduced Akt phosphorylation. The anti-inflammatory mechanism of Kaelae extract, compound 2, and compound 9 was attributed to decreased iNOS expression but not to decreased COX-2 expression. According to the findings of research in Jurkat cells, crude extracts and all three compounds (1, 2, and 9) were able to inhibit the production of inflammatory Th1 cytokines (IL-6 and IFN- $\alpha$ ) while increasing the anti-inflammatory Th2 cytokine IL-4. Isolated compounds from Kaelae show anti-inflammatory and immunomodulatory effects, which correspond to traditional Thai medicinal qualities.

**Keywords:** *Maclura cochinchinensis*, macrophages, lymphocytes, proinflammatory mediators, xanthone, flavonoid