



## รายงานฉบับสมบูรณ์

การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของตำรับยาทาพระเส้น

Study of the mechanism of anti-inflammatory activities of  
Yataprasen remedy



โดย ผศ.ดร.ภญ.ณัฐินี อนันตโชค สังกัดคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  
วันที่ 7 มีนาคม 2565

## บทคัดย่อ

ตำรับยาทาพระเส้นเป็นยาใช้ภายนอกชนิดหนึ่งในการแพทย์แผนไทย มีสรรพคุณแก้เส้นผดผกติ แก้ปวดและคลายกล้ามเนื้อ และสมุนไพรมันที่เป็นองค์ประกอบหลักในตำรับได้แก่ ใบมะค่าไก่ ใบตองแตก ใบมะขาม ใบเหลียง ใบขี้เหล็ก และตะไคร้หอม และสมุนไพรรื่นอื่น ๆ ได้แก่ พริกไทย ข่า กระชาย หอมแดง กระเทียม ยาดำ มหาหิงค์ ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหากลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบของตำรับยาทาพระเส้น และสมุนไพรมันที่เป็นองค์ประกอบหลักในตำรับ ได้แก่ ใบมะค่าไก่ ใบขี้เหล็ก ใบตองแตก ใบมะขาม และใบเหลียง และหาสารสำคัญที่จะใช้เป็นสารเทียบในใบมะค่าไก่ โดยศึกษาผลต่อการยับยั้งการหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบ prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) การสร้างสารประกอบพวกไนตริกออกไซด์ และการแสดงออกของ mRNA ของสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ได้แก่ TNF- $\alpha$ , COX-2, IL-6, iNOS และ NF- $\kappa$ B ในเซลล์ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) ผลการทดสอบพบว่าสารสกัด 40% เอทานอล และ 95% เอทานอลของตำรับยาทาพระเส้น และสารสกัด 95% เอทานอลของใบมะค่าไก่ ใบเหลียง ใบตองแตก และใบมะขาม มีผลยับยั้งการหลั่ง PGE<sub>2</sub> และการสร้างไนตริกออกไซด์ ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด และผลของสารสกัดที่ความเข้มข้น 50  $\mu$ g/mL ต่อการแสดงออกของ mRNA ของสารสื่อกลางการอักเสบชนิดต่าง ๆ พบว่าสารสกัด 40% และ 95% เอทานอลของตำรับยาทาพระเส้นสามารถยับยั้งการสร้าง mRNA ของ TNF- $\alpha$ , COX-2, iNOS, และ NF- $\kappa$ B ในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ได้ สารสกัด 95% เอทานอลของใบมะค่าไก่ ใบตองแตก และใบมะขามมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง mRNA ของ TNF- $\alpha$  และ iNOS ในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ได้ สารสกัดใบมะค่าไก่ และใบมะขามยังสามารถยับยั้งการสร้าง mRNA ของ COX-2 ได้ โดยสารสกัดของใบมะค่าไถ่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง mRNA ของ TNF- $\alpha$  และ iNOS ได้สูงสุด ขณะที่สารสกัดของใบมะขาม มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง mRNA ของ COX-2 ได้สูงที่สุด และสารสกัดใบมะขามเพียงชนิดเดียวที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง mRNA ของ NF- $\kappa$ B ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ได้อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่สารสกัด 95% เอทานอลของใบเหลียงแสดงฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง mRNA ของ iNOS เท่านั้น ขณะที่สารสกัดของใบขี้เหล็กไม่มีผลในการยับยั้งการแสดงออกของ mRNA ของสารสื่อกลางการอักเสบทุกชนิดที่ทดสอบ อย่างไรก็ตามสารสกัดจากสมุนไพรรื่นทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 50  $\mu$ g/mL ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง mRNA ของ IL-6 ในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ได้ การแยกหาสารสำคัญเพื่อใช้เป็นสารเทียบจากสารสกัด 95% เอทานอลของใบมะค่าไก่ ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในตำรับยาทาพระเส้น โดยวิธีทางโครมาโทกราฟี พบว่าสามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้ 3 คือ putraflavone, podocarpusflavone A และ amentoflavone จึงนำสารทั้งสามชนิดใช้เป็นสารเทียบในการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญและจัดทำ chemical profile ของสารสกัดยาทาพระเส้นด้วยวิธี HPLC นอกจากนี้การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10  $\mu$ M พบว่า podocarpusflavone A และ amentoflavone มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการหลั่งของสารสื่อกลางในการอักเสบ PGE<sub>2</sub> และการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสาร putraflavone (10  $\mu$ M) มีฤทธิ์ต่ำกว่า นอกจากนี้พบว่าสาร amentoflavone มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง mRNA ของ TNF- $\alpha$ , COX-2, และ iNOS ได้ดีกว่าสาร podocarpusflavone A และ putraflavone ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารทั้ง 3 ชนิดไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง mRNA ของ IL-6 และ NF- $\kappa$ B ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ได้ ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกับฤทธิ์ของสารสกัด 95% เอทานอลของใบมะค่าไก่

## Abstract

Yataprasen remedy is one of external use herbal drug in Thai traditional medicine for muscle relaxant and treatment of tendinitis, myositis and muscle pain. The leaves of *Putranjiva roxburghii* Wall., *Senna siamea* (Lam.) Irwin&Barneby., *Baliospermum solanifolium* (Burm.) Suresh, *Tamarindus indica* L., *Melia azedarach* L., and *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle are the major components. Moreover, the remedy is also composed of *Piper nigrum* L., *Alpinia galanga* (L.) Willd., *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf., *Allium ascalonicum* L., *Allium sativum* L., *Aloe vera* (L.) Burm., *Ferula assa-foetida* L.

This study aims to investigate the mechanism of anti-inflammatory activities of Yataprasen remedy and the major ingredients, including the leaves of *P. roxburghii*, *S. siamea*, *B. solanifolium*, *T. indica*, and *M. azedarach*. Furthermore, the active constituents found in *P. roxburghii* leaves were isolated in order to use as chemical markers. The effect on LPS-induced PGE<sub>2</sub> secretion, nitrate production, and mRNA expression of TNF- $\alpha$ , COX-2, IL-6, iNOS, and NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 of ethanolic extracts of Yataprasen remedy and the major ingredients were evaluated. The results showed that the 40% and 95% ethanol extracts of Yataprasen remedy and 95% ethanol extracts of *P. roxburghii*, *B. solanifolium*, *M. azedarach*, and *T. indica* could inhibit PGE<sub>2</sub> secretion and nitric oxide production in a dose-dependent manner. The 40% and 95% ethanol extracts of Yataprasen remedy at concentration of 50  $\mu$ g/mL could inhibit the mRNA expression of TNF- $\alpha$ , COX-2, iNOS, and NF- $\kappa$ B in LPS-induced cells. The 95% ethanol leaf extracts of *P. roxburghii*, *B. solanifolium*, and *T. indica* could decrease the mRNA of TNF- $\alpha$  and iNOS in LPS-induced cells. Moreover, the leaf extracts of *P. roxburghii* and *T. indica* could also inhibit the increase of mRNA level of COX-2. The 95% ethanol leaf extracts of *P. roxburghii* had more potent on mRNA suppression of TNF- $\alpha$  and iNOS than the other extracts. Whereas, *T. indica* leaf extract showed the highest activity on mRNA suppression of COX-2 and could also inhibit the mRNA expression of NF- $\kappa$ B. The 95% ethanol extract of *M. azedarach* leaves exhibited only the mRNA suppression of iNOS. Whereas, the extract of *S. siamea* had no effect on mRNA expression of all tested inflammatory mediators. There is no tested extract that effect of mRNA expression of IL-6 in LPS-induced cells. The separation of *P. roxburghii* leaf extract resulted in 3 isolated compounds, including putraflavone, podocarpusflavone A, and amentoflavone. These compounds were used as chemical markers for preparation of chemical profile of Yataprasen remedy vis HPLC chromatogram. The anti-inflammatory effects of the isolated compounds at dose of 10  $\mu$ M showed that podocarpusflavone A and amentoflavone had more inhibitory effect on PGE<sub>2</sub> secretion and nitric oxide production than putraflavone. Moreover, amentoflavone could inhibit mRNA expression of TNF- $\alpha$ , COX-2, and iNOS better than podocarpusflavone A and putraflavone, respectively. However, all of the isolated compounds did not show inhibitory effects on mRNA expression of IL-6 and NF- $\kappa$ B which are related to the effect of *P. roxburghii* leaf extract.