

## RESEARCH ARTICLE

# Effect of Active Compounds from *Andrographis paniculata* (Nees) on Protection of Equine Articular Cartilage Degradation *In Vitro*

Siriwan Ong-Chai<sup>1</sup>, Rujirek Chaiwongsa<sup>1</sup>, Nawarat Viriyakhasem<sup>1</sup>, Wilart Pompimon<sup>2</sup>,  
Siriwan Tangyuenyong<sup>3\*</sup>

## Abstract

**Objective** — To determine the effects of active compounds from *Andrographis paniculata* (Nees) on protection of equine articular cartilage degradation *in vitro*.

**Materials and Methods** — Equine articular cartilages were dissected from horse joints. The cartilages were then incubated in culture medium containing antibiotics in a humidified incubator (5% CO<sub>2</sub> at 37 °C for 3–21 days) with the absence or presence of cartilage degradation induced by 25 ng/ml of IL-1 $\beta$  or with IL-1 $\beta$  plus andrographolide at concentrations ranging from 5–100  $\mu$ M. Conditioned media were collected to measure quantity of sulfated glycosaminoglycan (s-GAG) and hyaluronan (HA), matrix metalloproteinases (MMPs) activity, and remaining of collagen and uronic acid content in cartilage tissue by colorimetric dye binding assay, competitive inhibition-based-ELISA, gelatin zymography, hydroxyproline and uronic acid assay, respectively.

**Results** — Andrographolide at 10–50  $\mu$ M significantly lowered s-GAG and HA releases by 56% and 71% respectively compared with IL-1 $\beta$  treated control ( $p < 0.05$ ). On the other hand, uronic acid content in cartilage increased up to 64%. In addition, MMP-2 activity of 10–100  $\mu$ M andrographolide were lower than that of IL-1 $\beta$  treated control significantly ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion** — This study indicated that andrographolide had ability to protect the articular cartilage degradation (chondroprotective properties). Therefore, it is possible that andrographolide can be developed and used as a therapeutic drug for osteoarthritis in a human and an animal.

KKU Vet J. 2008;18(2):81–96

<http://vet.kku.ac.th/journal/>

**Keywords:** Horse; Andrographolide; Articular cartilage degradation; IL-1 $\beta$

<sup>1</sup> Thailand Excellent Center for Tissue Engineering, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai, Thailand, 50200.

<sup>2</sup> Faculty of Science, Lampang Rajabhat University, Muang, Lampang, Thailand, 52100.

<sup>3</sup> Equine Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai, Thailand, 50100.

\* **Corresponding author:** Tel. 053 - 948066; Fax. 053 - 274710; E-mail makhaboocha@hotmail.com

# ผลของสารออกฤทธิ์จากฟ้าทะลายโจรต่อการป้องกันการเสื่อมของกระดูกอ่อนข้อต่อม้าในหลอดทดลอง

ศิริวรรณ องค์กรไชย<sup>1</sup>, รุจิเรข ไชยวงษา<sup>1</sup>, นวรัตน์ วิริยะเชษม<sup>1</sup>, วิลาศ พุ่มพิมล<sup>2</sup>, ศิริวรรณ ตั้งยืนยง<sup>3\*</sup>

## บทคัดย่อ

**วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาผลของสารออกฤทธิ์จากฟ้าทะลายโจรต่อการป้องกันการเสื่อมของกระดูกอ่อนข้อต่อม้าในหลอดทดลอง

**วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ** ทำการเก็บตัวอย่างกระดูกอ่อนข้อต่อจากข้อต่อของม้า นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มียาปฏิชีวนะภายในตู้บ่มที่มีความชื้น และมี 5% CO<sub>2</sub> ณ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ถึง 21 วัน ในภาวะที่ไม่มีและมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมของกระดูกอ่อนด้วย IL-1 $\beta$  25 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และภาวะที่มี IL-1 $\beta$  ร่วมกับสารออกฤทธิ์จากฟ้าทะลายโจร (แอนโดรกราฟีโฟไลด์; andrographolide) ที่ความเข้มข้น 5-100 ไมโครโมลาร์ แล้วเก็บน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อไปตรวจวัดปริมาณซัลเฟตกลัยโคซามิโนกลัยแคน และไฮยาลูโรแนน วัดการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มแมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส รวมทั้งวัดปริมาณคอลลาเจน และกรดยูโรนิกที่คงเหลืออยู่ในเนื้อกระดูกอ่อนด้วยวิธี Colorimetric dye binding assay, Competitive inhibition-based-ELISA, Gelatin zymography, Hydroxyproline และ Uronic acid assay ตามลำดับ

**ผลการศึกษา** พบว่า กลุ่มที่ให้สารออกฤทธิ์จากฟ้าทะลายโจร 10-50 ไมโครโมลาร์ มีการสลายของซัลเฟตกลัยโคซามิโนกลัยแคน และไฮยาลูโรแนน ลดต่ำกว่ากลุ่มที่ให้ IL-1 $\beta$  อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยลดลงมากกว่าร้อยละ 56 และ 71 ตามลำดับ และมีปริมาณกรดยูโรนิกเหลืออยู่ในกระดูกอ่อนเพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 64 และพบว่า การทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในกลุ่มที่ให้สารออกฤทธิ์จากฟ้าทะลายโจร 10-100 ไมโครโมลาร์ ต่ำกว่ากลุ่ม IL-1 $\beta$  อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

**ข้อสรุป** สารออกฤทธิ์จากฟ้าทะลายโจรมีคุณสมบัติในการป้องกันการเสื่อมของกระดูกอ่อนข้อต่อจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารออกฤทธิ์จากฟ้าทะลายโจร ไปพัฒนาทำเป็นยาเพื่อใช้รักษาโรคข้อเสื่อมในมนุษย์และสัตว์ได้ในอนาคต

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2551;18(2):81-96

<http://vet.kku.ac.th/journal/>

**คำสำคัญ:** ม้า สารออกฤทธิ์จากฟ้าทะลายโจร การเสื่อมกระดูกอ่อนข้อต่อ IL-1 $\beta$

<sup>1</sup> หน่วยวิจัยที่มีความเป็นเลิศทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อแห่งประเทศไทย ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50200

<sup>2</sup> คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง อ. เมือง จ. ลำปาง 52100

<sup>3</sup> สาขาวิชาคลินิกม้า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50100

\*ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ: โทรศัพท์ 053 - 948066 โทรสาร 053 - 274710 E-mail: makhaboocha@hotmail.com

## บทนำ

โรคข้อต่อ เป็นโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาสำคัญทางด้านสุขภาพทั้งในมนุษย์และสัตว์ โดยเฉพาะโรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis) และโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) ซึ่งพบว่าเป็นสาเหตุทำให้ผู้ป่วยหลายล้านคนทั่วโลก รวมถึงในสัตว์หลายชนิด เช่น สุนัขและม้า ต้องทนทุกข์ทรมานกับการเจ็บปวดตามบริเวณข้อต่อ หรือการยึด การแข็งเกร็งของข้อต่อนั้น ทำให้ประสบกับความยากลำบากของการเคลื่อนไหวข้อต่อในหลายส่วนของร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในม้าซึ่งเป็นสัตว์ที่จำเป็นต้องใช้การเคลื่อนไหวของขาและข้อต่ออย่างมาก ทั้งเพื่อการดำรงชีวิต และการถูกใช้งานโดยมนุษย์ จากการศึกษาในม้าก็พบว่า โรคข้อเสื่อมเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ม้าเสียชีวิตหรือถูกตัดทิ้งถึงร้อยละ 44.8 [1] เมื่อข้อต่อและเนื้อเยื่อบริเวณใกล้เคียงได้รับบาดเจ็บจากแรงกระทบกระแทกในการใช้งานจะส่งผลให้ภายในข้อต่อมีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้น โดยเซลล์เยื่อข้อต่อจะหลั่งสารสื่ออักเสบ ไซโตไคน์ และเอนไซม์ต่างๆ เข้าสู่ข้อ อันเป็นผลให้กระดูกอ่อนข้อต่อ (articular cartilage) ที่หุ้มบริเวณผิวหน้าของข้อต่อนั้นถูกทำลายจนเกิดภาวะข้อเสื่อมในที่สุด [2]

ในประเทศไทย การตรวจวินิจฉัยและการรักษาโรคข้อต่อในม้าสามารถทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปการตรวจวินิจฉัยจะอาศัยการตรวจร่างกายทางกายภาพร่วมกับการถ่ายภาพทางรังสี ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก สำหรับวิธีการรักษามักจะใช้การรักษาทางกายภาพ เช่น การประคบเย็น - ร้อน และการให้ยาเพื่อลดการอักเสบบรรเทาความเจ็บปวด เช่น ยาแก้อักเสบชนิดที่ไม่ใช่สารสเตียรอยด์ร่วมกับหยุดการใช้งาน ในบางกรณีอาจมีการฉีดยาคอร์ติโคสเตียรอยด์เข้าข้อต่อหรือให้สารอื่น เช่น ไฮยาลูโรนิก แอซิด (hyaluronic acid; HA) ซัลเฟตกลัยโคซามิโนกลัยแคน (sulfated glycosaminoglycan; s-GAG) เพื่อเสริมความแข็งแรงของข้อต่อ หรือในกรณีที่มีกระดูกแตกเป็นชิ้นอยู่ภายในข้อต่อ มักจะทำการรักษาด้วยวิธีการผ่าตัด (arthroscopic surgery) ร่วมกับการให้ยาแก้อักเสบ ปัจจุบันเริ่มมีการนำสมุนไพรมาสกัดทำเป็นยาใช้ในการรักษาหรือบรรเทาอาการของโรคต่างๆ รวมทั้งโรคข้อต่อเพื่อลดปัญหาผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายจากการใช้ยาแผนปัจจุบัน และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการรักษาในอนาคต ในประเทศอินเดีย จีน และไทยมีการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคมานับแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน สำหรับประเทศไทยเริ่มมีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสมุนไพรและการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคมากขึ้น อาทิ เช่น ไพล ฟ้าทะลายโจร ชิง และกระชาย เป็นต้น ฟ้าทะลายโจรเป็นสมุนไพรไทยอีกชนิดหนึ่งที่มีความนิยมในการนำมาทำเป็นยาเพื่อบรรเทาอาการและรักษาโรค เช่น แก้กษัยคอบ แก้กษัยเสี่ย แก้กษัย หรือเป็นยาขมเจริญอาหาร [3] และได้รับการคัดเลือกบรรจุลงในบัญชียาหลักแห่งชาติในรายการยาที่ทำจากสมุนไพรที่ได้มีการพัฒนาขึ้น [4]

ฟ้าทะลายโจร มีสารสำคัญเป็นองค์ประกอบหลัก คือ แอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Diterpenoid lactone นอกจากนี้ยังพบอนุพันธ์อื่นๆ ของแอนโดรกราโฟไลด์ เช่น 14 - deoxyandrographolide และ neoandrographolide เป็นต้น [5] จากผลการศึกษาในหลายงานวิจัยทั้งในมนุษย์ สัตว์ และในหลอดทดลองถึงฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรในด้านต่างๆ กลไกการออกฤทธิ์

พิษวิทยา รวมทั้งการใช้ประโยชน์ทางยาของฟ้าทะลายโจร และการเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับยาทางแผนปัจจุบันโดยการทดลองทางคลินิกทั้งในต่างประเทศและในประเทศไทย พบว่า ฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายด้าน เช่น ฤทธิ์ในการรักษาอาการเจ็บคอ [6] ลดอาการไข้ [7] ฤทธิ์ป้องกันและบรรเทาอาการหวัด [8] ฤทธิ์ในการฆ่าหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงป้องกันและรักษาโรคท้องเสีย อุจจาระร่วง [9-10] ฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสัตว์ [11] ฤทธิ์ลดความดันโลหิต [12] และลดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด [13] รวมทั้งฤทธิ์ที่สำคัญอีกประการ คือ ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ [14-15] ซึ่งจากผลความสำเร็จในการศึกษาถึงฤทธิ์ต้านการอักเสบของฟ้าทะลายโจร ปัจจุบันมียาสมุนไพรที่ประกอบด้วยฟ้าทะลายโจร 20-80% ได้รับการจดสิทธิบัตรเพื่อนำมาใช้เป็นยาแก้อักเสบในมนุษย์ [16]

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์สำคัญจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรคือ แอนโดรกราฟโฟไลด์ ต่อการป้องกันการเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจากข้อต่อของม้าในหลอดทดลอง โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (cartilage explant culture) ร่วมกับการใช้สารกระตุ้นเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนข้อต่อ และใช้การตรวจวิเคราะห์หาสารชีวโมเลกุลซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่พัฒนาขึ้นจาก หน่วยวิจัยที่มีความเป็นเลิศทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อแห่งประเทศไทย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

## วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

### ตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างกระดูกอ่อนข้อต่อจากซากม้าที่เสียชีวิตไม่เกิน 6 ชั่วโมง ไม่จำกัดพันธุ์ เพศและอายุ โดยเก็บจากข้อต่อในหลายส่วนของขาหน้าและขาหลัง ได้แก่ ข้อเข่า (carpal joints) ข้อน่องแหลม (hock joints) และข้อตาคุ่ม (fetlock joints)

### วิธีการเก็บตัวอย่างและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนข้อต่อ

นำซากม้ามาตัดให้เหลือเฉพาะส่วนที่เป็นข้อต่อ ล้างทำความสะอาดภายนอกและเลาะชั้นผิวหนังออก จากนั้นทำความสะอาดอีกครั้งแล้วนำไปแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อเจือจางเป็นเวลา 30 นาที จึงทำการเก็บตัวอย่างกระดูกอ่อนข้อต่อภายในตู้ปลอดเชื้อ โดยผ่าเปิดข้อต่อและทำการตัดเลาะกระดูกอ่อนข้อต่อบริเวณหน้าตัดที่รับน้ำหนักออกเป็นชิ้น (cartilage disc) ให้มีขนาด 3 x 3 มิลลิเมตร โดยประมาณ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle's Medium (serum-free-DMEM) ที่มียาเพนนิซิลิน 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ สเตรปโตมัยซิน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการล้างชิ้นกระดูกอ่อนข้อต่อด้วยอาหารและยาปฏิชีวนะข้างต้นซ้ำ 1 ครั้ง แล้วนำไปเลี้ยงภายในตู้บ่มที่มีความชื้น และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ณ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ทำการซั่งน้ำหนัก และนำชิ้นกระดูกอ่อนไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 1 คืน แล้วจึงเก็บน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนข้อต่อ (day 0) ไว้ จากนั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ภายในตู้บ่มที่มีความชื้นและคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C ต่อไปเป็นเวลา 3-21 วัน ทั้งในสภาวะที่ไม่มีสารกระตุ้นให้เกิดการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (Untreated control) สภาวะที่มีสารกระตุ้นเพียงอย่างเดียว (IL-1 $\beta$  group) โดยการใช้อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ปริมาณ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสภาวะที่มีสารกระตุ้นร่วมกับสารออกฤทธิ์จากฟ้าทะลายโจรที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ (Andrographolide 98%, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, USA) แล้วเก็บน้ำเลี้ยงและเนื้อเยื่อไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อวิเคราะห์การเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องต่อไป

### การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง

ตรวจวิเคราะห์หาการเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน โดยการวัดปริมาณสารชีวโมเลกุลซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ถูกสลายออกมาในน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น ซัลเฟตกลัยโคซามิโนกลัยแคน (s-GAG) ด้วยวิธี Colorimetric dye binding assay ตามวิธีของ Farndale et al. [17] และไฮยาลูโรแนน (HA) ด้วยวิธี Competitive inhibition-based-ELISA ตามวิธีของ Pothacharoen et al. [18] รวมทั้งตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน กลุ่มแมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส (MMP, Gelatinase activity) ด้วยวิธี Gelatin zymography ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Ito et al. [19] และคำนวณหาความหนา (density) ของแถบเจลที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ ยังตรวจวัดปริมาณสารสำคัญที่คงเหลืออยู่ในชั้นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน คือ คอลลาเจน (collagen content) ด้วยวิธี Hydroxyproline assay ตามวิธีของ Hoemann et al. [20] และกรดยูโรนิก (uronic acid content) ตามวิธีของ Pothacharoen et al. [18]

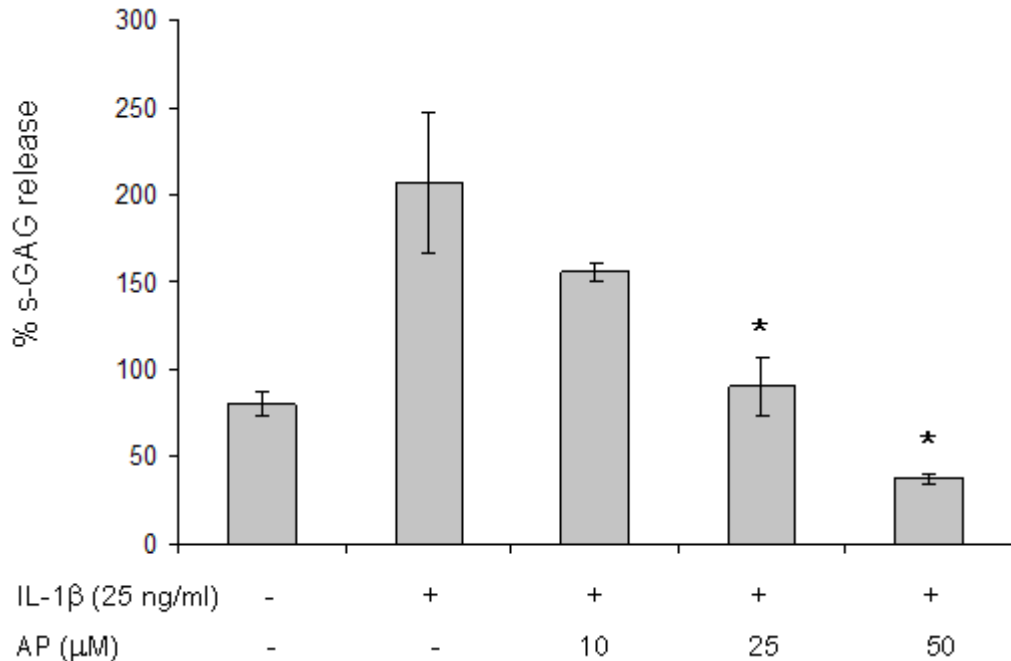
### การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม STATA<sup>®</sup> version 9.2 และเลือกระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ( $p < 0.05$ ) หาค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของ s-GAG, HA, collagen content, uronic acid content และ MMP activity จากผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งสิ้น 3 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งทำการตรวจซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นเฉลี่ยดังกล่าว ระหว่างกลุ่มที่ให้สารกระตุ้นการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน และกลุ่มที่ให้สารกระตุ้นการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนร่วมกับสารออกฤทธิ์จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี ANOVA

## ผลการศึกษา

จากการให้สารกระตุ้นการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนในกลุ่ม IL-1 $\beta$  พบว่า มีการสลายของ s-GAG และ HA ออกมาสู่น้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นถึง 2.6 และ 3.9 เท่า ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อวัดปริมาณ s-GAG และ HA ในน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของกลุ่มที่ให้ IL-1 $\beta$  เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้ IL-1 $\beta$  ร่วมกับแอนโดรกราฟีโฟไลด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

พบว่า กลุ่มที่ให้แอนโดรกราฟีโพลีไคด์มีแนวโน้มการสลายของ s-GAG และ HA ลดลงอย่างเป็นลำดับ โดยกลุ่มที่ให้แอนโดรกราฟีโพลีไคด์ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ มีการสลายของ s-GAG ต่ำกว่ากลุ่ม IL-1 $\beta$  อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) คิดเป็นร้อยละ 56 และ 82 ตามลำดับ และกลุ่มที่ให้แอนโดรกราฟีโพลีไคด์ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การสลายของ s-GAG ต่ำกว่ากลุ่ม 10 ไมโครโมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (Figure 1)

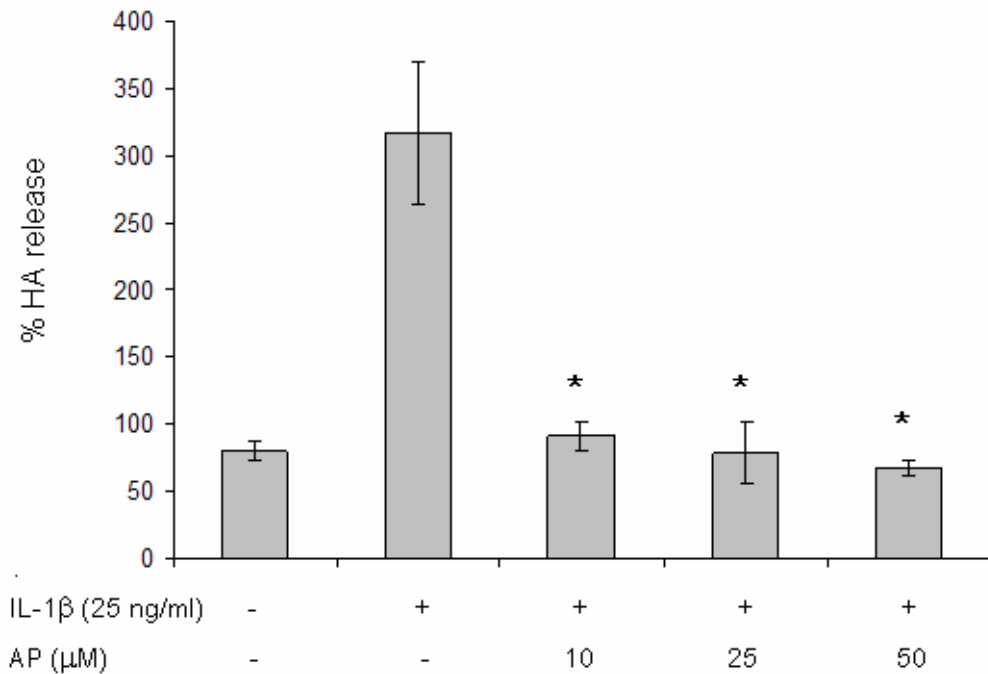


**Figure 1.** Effect of andrographolide (AP) on the release of s-GAG to culture medium from equine articular cartilage explants. Equine articular cartilage explants were treated with IL-1 $\beta$  (25 ng/ml) in the absence and presence of the andrographolide at concentration 10 - 50  $\mu$ M for 3 days. The culture medium was harvested to analyze for s-GAG concentration. \*An asterisk indicates values significantly different ( $p < 0.05$ ) from the IL-1 $\beta$  treated control.

The release of s-GAG was estimated by the calculation:

$$\% \text{ s-GAG release} = \left( \frac{\text{s-GAG of Day 3 treated} - \text{s-GAG of Day 0 IL-1}\beta}{\text{s-GAG of Day 0 IL-1}\beta} \right) \times 100$$

กลุ่มที่ให้แอนโดรกราฟีโฟไลด์ที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ มีการสลายของ HA ต่ำกว่ากลุ่ม IL-1 $\beta$  อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยการสลายที่ลดลงนั้นคิดเป็นร้อยละ 71, 75 และ 79 ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างภายในกลุ่มที่ให้แอนโดรกราฟีโฟไลด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (Figure 2)

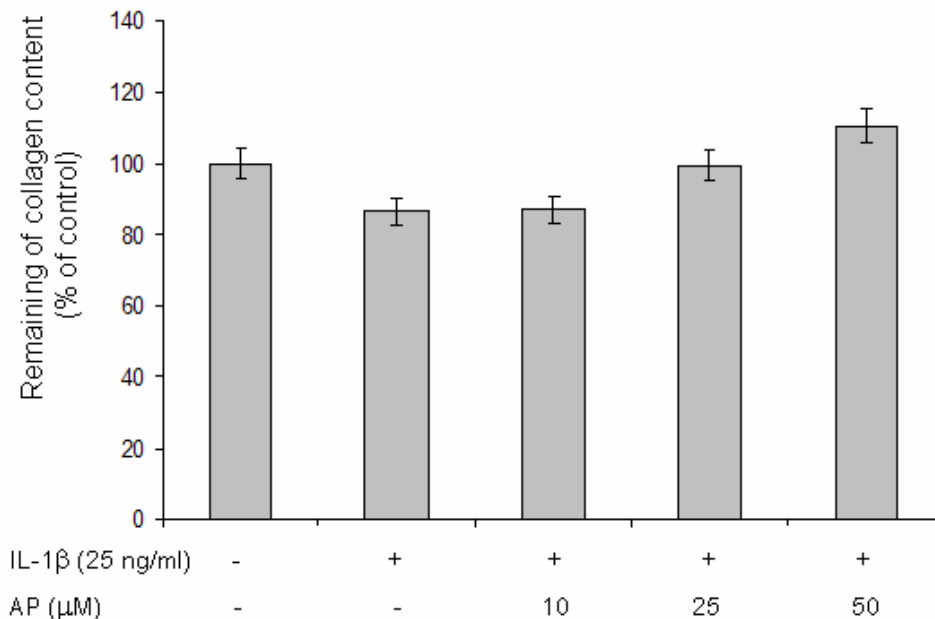


**Figure 2.** Effect of andrographolide (AP) on the release of HA to culture medium from equine articular cartilage explants. Equine articular cartilage explants were treated with IL-1 $\beta$  (25 ng/ml) in the absence and presence of the andrographolide at concentration 10 - 50  $\mu$ M for 15 days. The culture medium was harvested to analyze for HA concentration. \*An asterisk indicates values significantly different ( $p < 0.01$ ) from the IL-1 $\beta$  treated control.

The release of HA was estimated by the calculation:

$$\% \text{ HA release} = \left( \frac{(\text{HA of Day 15 treated} - \text{HA of Day 0 IL-1}\beta)}{\text{HA of Day 0 IL-1}\beta} \right) \times 100$$

สำหรับการวัด collagen และ uronic acid content ที่เหลืออยู่ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน พบว่า กลุ่มที่กระตุ้นการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนด้วย IL-1 $\beta$  มีปริมาณ collagen และ uronic acid content ลดลงเป็น 0.9 และ 0.5 เท่าของกลุ่มควบคุมตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณ collagen content ระหว่างกลุ่มที่ให้ IL-1 $\beta$  อย่างเดียว กับ กลุ่มที่ให้แอนโดรกราฟโฟไลด์ 10-50 ไมโครโมลาร์ ร่วมด้วย แม้ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p>0.05$ ) แต่มีแนวโน้มของปริมาณ collagen content เพิ่มขึ้นอย่างเป็นลำดับ (**Figure 3**) ส่วนการวิเคราะห์ uronic acid content ในเนื้อกระดูกอ่อน พบว่า กลุ่มที่ให้แอนโดรกราฟโฟไลด์ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์ของ uronic acid content เหลืออยู่ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนสูงกว่ากลุ่ม IL-1 $\beta$  (เพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 64) และสูงกว่า กลุ่มที่ให้แอนโดรกราฟโฟไลด์ 10 ไมโครโมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญ ( $p<0.05$ ) ตามลำดับ (**Figure 4**)



**Figure 3.** Effect of andrographolide (AP) on the remaining of collagen content in equine articular cartilage explants. Equine articular cartilage explants were treated with IL-1 $\beta$  (25 ng/ml) in the absence and presence of the andrographolide at concentration 10 - 50  $\mu$ M for 21 days. The cartilage tissues were analyzed for collagen content. There was not significantly different between each concentration of andrographolide and the IL-1 $\beta$  treated control ( $p>0.05$ ).

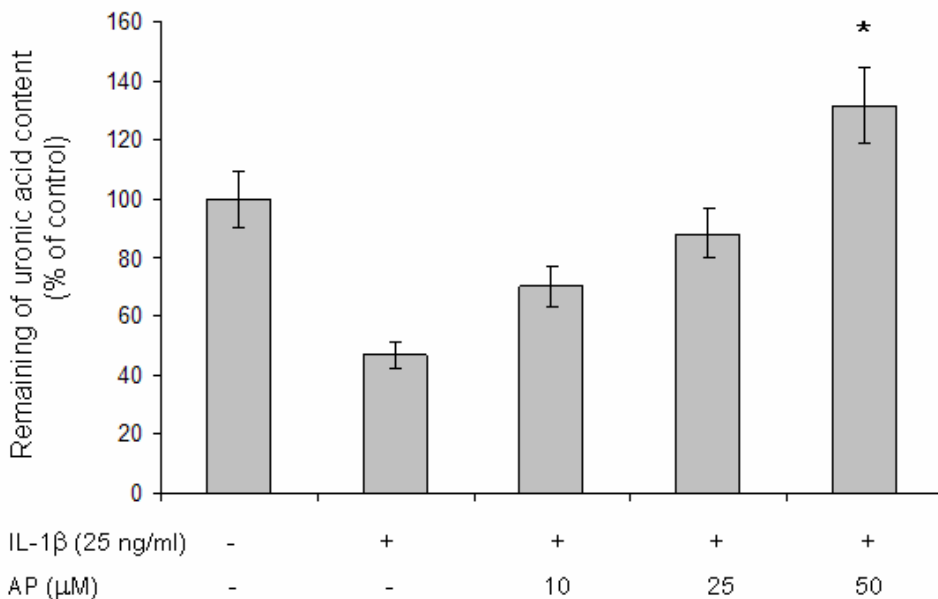
The remaining of collagen content was estimated by the calculation:

$$\text{Remaining of collagen content (\% of control)} = \left( \frac{\text{Collagen content of Day 21 treated}}{\text{Collagen content of Day 21 control}} \right) \times 100$$



ผลการศึกษางานของเอนไซม์ในกลุ่มแมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส พบว่า การทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในกลุ่มที่ให้ IL-1 $\beta$  มีระดับเพิ่มสูงขึ้นเป็น 5 เท่าของกลุ่มควบคุม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ให้ IL-1 $\beta$  ร่วมกับแอนโดรกราฟีโฟไลด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มที่ให้ IL-1 $\beta$  เพียงอย่างเดียว พบว่ากลุ่มที่ให้แอนโดรกราฟีโฟไลด์ความเข้มข้น 5-100 ไมโครโมลาร์ มีแนวโน้มลดการทำงานของ MMP-2 ลงอย่างเป็นลำดับ โดยแอนโดรกราฟีโฟไลด์ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ มีการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวต่ำกว่ากลุ่มที่ให้ IL-1 $\beta$  อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ทั้งยังพบว่าการทำงานของ MMP-2 ในกลุ่มที่ให้แอนโดรกราฟีโฟไลด์ 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ต่ำกว่ากลุ่ม 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ และที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ มีการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวต่ำกว่ากลุ่ม 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

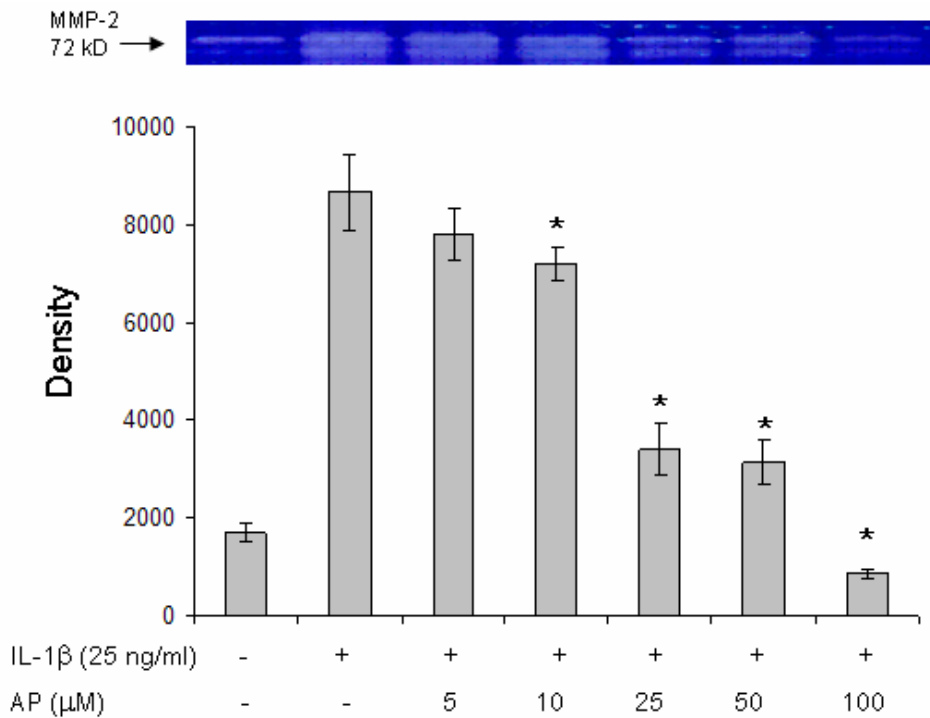
(Figure 5)



**Figure 4.** Effect of andrographolide (AP) on the remaining of uronic acid content in equine articular cartilage explants. Equine articular cartilage explants were treated with IL-1 $\beta$  (25 ng/ml) in the absence and presence of the andrographolide at concentration 10 - 50  $\mu$ M for 3 days. The cartilage tissues were analyzed for uronic acid content. \*An asterisk indicates values significantly different ( $p < 0.01$ ) from the IL-1 $\beta$  treated control.

The remaining of uronic acid content was estimated by the calculation:

$$\text{Remaining of uronic acid content (\% of control)} = \left( \frac{\text{uronic acid content of Day 3 treated}}{\text{uronic acid content of Day 3 control}} \right) \times 100$$



**Figure 5.** Effect of andrographolide (AP) on activity of gelatinase, MMP-2. Equine articular cartilage explants were treated with IL-1 $\beta$  (25 ng/ml) in the absence and presence of the andrographolide at concentration 5 - 100  $\mu$ M for 3 days. The culture medium was analyzed for gelatinolytic activity of MMP-2. Density of the clear bands represent activity enzyme gelatinase. \*An asterisk indicates values significantly different ( $p < 0.01$ ) from the IL-1 $\beta$  treated control.

## วิจารณ์

โรคข้ออักเสบและข้อเสื่อมเป็นโรคเรื้อรังที่พบได้บ่อยทั้งในมนุษย์และสัตว์หลายชนิด ซึ่งมักก่อให้เกิดความเจ็บปวด ทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานลดต่ำลง และยังส่งผลต่อการดำเนินชีวิตในระยะยาว อันมีสาเหตุมาจากกระบวนการสร้างและการสลายของกระดูกอ่อนภายในข้อต่อเสียภาวะสมดุลไป โดยเกิดการสลายมากกว่าการสร้าง ซึ่งกระบวนการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนดังกล่าวจะอาศัยการทำงานของสารสื่ออักเสบ (destructive inflammatory mediators) ไซโตไคน์ และเอนไซม์ต่างๆ ในการทำลายกระดูกอ่อนที่หุ้มผิวบริเวณข้อต่อ เป็นผลให้สารชีวโมเลกุลซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนื้อกระดูกอ่อน เช่น ซัลเฟตกลัยโคซามิโนกลัยแคน ไฮยาลูโรแนน คอลลาเจน และกรดยูโรนิก สลายออกมาอยู่ในน้ำไขข้อและถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดต่อไป หลายสิบปีที่ผ่านมา มีการศึกษาถึงไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนอย่างกว้างขวาง IL-1 $\beta$

เป็น pro-inflammatory cytokine ที่สำคัญมากชนิดหนึ่งซึ่งสร้างจากเซลล์เยื่อบุข้อต่อและเซลล์กระดูกอ่อน โดยมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองต่อการติดเชื้อ การสร้างเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ [21] และยังเป็นตัวการสำคัญในกระบวนการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน โดย IL-1 $\beta$  จะไปกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่มแมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส [22-23] ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างคอลลาเจน [24-25] และโปรตีโอกลัยแคน [26-27] รวมทั้งลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์กระดูกอ่อนด้วย [28]

การศึกษาในครั้งนี้ เป็นการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์การป้องกันการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในสัตว์ตระกูลม้า ซึ่งถือเป็นครั้งแรกในโลกและครั้งแรกสำหรับประเทศไทย โดยในการศึกษานี้มีการใช้ IL-1 ( เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนข้อต่อ ซึ่งเป็นการจำลองภาวะการอักเสบเสมือนจริงกับที่เกิดขึ้นภายในข้อต่อของโรคข้ออักเสบและข้อเสื่อม จากผลการศึกษาที่พบว่า กลุ่มที่ให้แอนโดรกราฟีโฟไลด์ 10-50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IL-1 $\beta$  มีเปอร์เซ็นต์การสลายของ s-GAG และ HA ในน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนต่ำกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  เพียงอย่างเดียว โดยเปอร์เซ็นต์การสลายดังกล่าวจะลดลงตามความเข้มข้นของสารแอนโดรกราฟีโฟไลด์ที่สูงขึ้นอย่างเป็นลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารแอนโดรกราฟีโฟไลด์สามารถลดการสลาย s-GAG และ HA จากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนออกมาในน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ โดยที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการสลาย s-GAG และ HA ได้มากที่สุด การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของ collagen และ uronic acid content ที่เหลืออยู่ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของกลุ่มที่กระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  เพียงอย่างเดียวกับกลุ่มที่ให้แอนโดรกราฟีโฟไลด์ร่วมด้วย พบว่ากลุ่มที่ให้สารแอนโดรกราฟีโฟไลด์ 10-50 ไมโครโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์ของ collagen และ uronic acid content เหลืออยู่ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนสูงกว่า และเปอร์เซ็นต์ดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารแอนโดรกราฟีโฟไลด์ที่สูงขึ้น ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าสารแอนโดรกราฟีโฟไลด์มีฤทธิ์ลดการสลาย collagen และ uronic acid ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  ได้ โดยที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการสลาย collagen และ uronic acid ได้มากที่สุด จากการที่พบปริมาณ uronic acid content เหลือในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมากขึ้น แสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องกับการพบปริมาณของ s-GAG และ HA ที่ลดน้อยลงในน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อมีสารแอนโดรกราฟีโฟไลด์ร่วมกับ IL-1 $\beta$  เพราะทั้ง s-GAG และ HA นั้นมี uronic acid เป็นองค์ประกอบที่สำคัญอยู่ในโมเลกุล [29]

สำหรับผลการศึกษางานของเอนไซม์ในกลุ่มแมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส ซึ่งพบว่ากลุ่มที่ให้สารแอนโดรกราฟีโฟไลด์ 10-100 ไมโครโมลาร์ มีการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ต่ำกว่ากลุ่ม IL-1 $\beta$  โดยการทำงานของเอนไซม์จะลดลงตามความเข้มข้นของแอนโดรกราฟีโฟไลด์ที่สูงขึ้น แสดงให้เห็นว่าแอนโดรกราฟีโฟไลด์สามารถยับยั้งการทำงานของ MMP-2 ได้โดยที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ จะยับยั้งการทำงานของ MMP-2 ได้มากที่สุด ในภาวะปกติ กระดูกอ่อนที่หุ้มบริเวณผิวหน้าของข้อต่อจะมีการสลายและปล่อยสารชีวโมเลกุล ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนออกสู่น้ำไขข้ออยู่แล้วในปริมาณหนึ่ง โดยการทำงานของเอนไซม์กลุ่มแมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส เมื่อเลี้ยงกระดูกอ่อนในภาวะที่มี IL-1 $\beta$  ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในกลุ่มแมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส [22-23] เป็นผลทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อ

กระดูกอ่อนข้อต่อเพิ่มมากขึ้น จึงพบการสลายของสารซัลเฟตกลัยโคซามิโนกลัยแคน ไฮยาลูโรแนน คอลลาเจน และกรดยูโรนิกออกจากเนื้อกระดูกอ่อนสูงขึ้นคล้ายกับภาวะที่เกิดขึ้นในโรคข้อเสื่อม [29] แต่เมื่อเติมแอนโดรกราฟโฟไลด์เข้าไป พบว่าทำให้สารสำคัญของเนื้อกระดูกอ่อนสลายออกมาลดน้อยลง รวมทั้งการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนก็ลดลงด้วย ดังนั้น จากผลการศึกษาในครั้งนี้จึงมีความน่าจะเป็นไปได้ว่า สารแอนโดรกราฟโฟไลด์อาจยับยั้งฤทธิ์กระตุ้นการสลายกระดูกอ่อนของ IL-1 $\beta$  ในระดับยีน โดยอาจลดการแสดงออกของเอนไซม์กลุ่มแมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสที่เกี่ยวข้องกับการสลายกระดูกอ่อนในโรคข้อเสื่อม ซึ่งรวมถึง MMP-2 ด้วย ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้ในน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีสารกระตุ้น IL-1 $\beta$  ร่วมกับแอนโดรกราฟโฟไลด์ถูกตรวจพบว่าลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่มี IL-1 $\beta$  เพียงอย่างเดียว ดังนั้น อัตราการสลายสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของกระดูกอ่อน เช่น ซัลเฟตกลัยโคซามิโนกลัยแคน ไฮยาลูโรแนน คอลลาเจน และกรดยูโรนิกจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจึงลดลง หรือกล่าวได้อีกนัยหนึ่งว่า สารแอนโดรกราฟโฟไลด์มีฤทธิ์ป้องกันการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนข้อต่อที่เกิดจากการถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาสารสกัดฟ้าทะลายโจรในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยการฉีด carrageenan โดยพบว่าสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ น้ำ และคลอโรฟอร์มของฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ลดการอักเสบ [30-31] และสารสกัดแอลกอฮอล์และน้ำของฟ้าทะลายโจรขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ออกฤทธิ์ใกล้เคียงกับยา prednisolone และ indomethacin ขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และคล้ายกับ ibuprofen ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ [32] และยังสอดคล้องกับในหลายงานวิจัยที่ศึกษาถึงฤทธิ์ลดการอักเสบของฟ้าทะลายโจรที่เกี่ยวข้องกับไซโตไคน์ หรือสารที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบอื่นๆ ซึ่งพบว่า สารแอนโดรกราฟโฟไลด์และนีโอแอนโดรกราฟโฟไลด์ (neoandrographolide) สามารถลดการอักเสบได้ โดยออกฤทธิ์ยับยั้ง tumor necrosis factor [33] platelet activating factor [34] nitric oxide [35-36] cyclooxygenase-2 [37] และ nuclear factor kappa B [15]

นอกจากนี้ ในประเทศไทยเคยมีผู้ทำการศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์กระดูกอ่อนของสมุนไพรชนิดอื่นในสุกร เช่น ไพล และข่า เป็นต้น ซึ่งผลการศึกษาฤทธิ์ของไพลในการต้านการสลายกระดูกอ่อนจากข้อต่อสุกร ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนด้วยอนุพันธ์ของวิตามินเอ และ IL-1 $\beta$  พบว่า สารสกัดไพลจากเฮกเซนและเอทานอลมีคุณสมบัติในการยับยั้งการสลายกระดูกอ่อน และลดการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มแมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสอย่างมีนัยสำคัญ [38] และผลการศึกษาในข่าพบว่า สารสกัดข่าสามารถยับยั้งฤทธิ์ของ IL-1 $\beta$  ในขบวนการสลายของกระดูกอ่อนลดการสูญเสียกรดยูโรนิก กลัยโคซามิโนกลัยแคน และ ไฮยาลูโรแนนจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ลดการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มแมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส และลดการอักเสบได้ รวมทั้งยังสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนคอลลาเจน (type II collagen) และ aggrecan ของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า นอกจากสารสกัดข่าจะมีฤทธิ์ต้านการสลายของกระดูกอ่อนข้อต่อแล้วยังมีความสามารถในการส่งเสริมขบวนการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของข้อต่อได้อีกด้วย [18]

จากผลการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์การปกป้องเซลล์กระดูกอ่อนในหลายงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น ร่วมกับความสำเร็จของผลการศึกษาถึงฤทธิ์การป้องกันการเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในครั้งนี้ ซึ่งให้เห็นสารแอนโดรกราฟีโพลีโอดีมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่น่าจะนำไปพัฒนาในการทำเป็นยาจากสมุนไพรไทย และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษา และบรรเทาอาการของโรคข้อในม้าและมนุษย์ได้ในอนาคต จึงควรมีการศึกษาต่อไปถึงกลไกในระดับยีนของสารแอนโดรกราฟีโพลีโอดีในการปกป้องเซลล์กระดูกอ่อนจากข้อต่อของม้า โดยเฉพาะการส่งสัญญาณระดับเซลล์ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในกลุ่มแมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส นอกจากนี้ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงรูปแบบของยาขนาดที่ใช้ และความเป็นพิษในระดับเซลล์ของสารแอนโดรกราฟีโพลีโอดี รวมถึงการศึกษาในเรื่องของการนำไปทดลองใช้ในสัตว์ หรือ มนุษย์ เพื่อเพิ่มพูนความรู้ ความเข้าใจ และสามารถพัฒนาสู่การนำไปใช้ได้จริง อันจะเป็นประโยชน์ต่อวงการแพทย์ เภสัชกรรม เพราะเป็นการเพิ่มทางเลือกในการใช้ยา รักษาโรคข้อเสื่อม ทดแทนการใช้ยาราคาแพงจากต่างประเทศ และสามารถยกระดับคุณภาพชีวิตของสัตว์และมนุษย์ให้สูงขึ้นได้ในอนาคต

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจาก ทู่นพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โครงการยา เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์การแพทย์ สภาวิจัยแห่งชาติ และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ขอขอบพระคุณ ผศ.น.สพ.ดร. ภาวิน ผดุงทศ เป็นอย่างสูงที่ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูล และการสนับสนุนจาก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้สถานที่และอุปกรณ์ รวมทั้งเจ้าของม้าทุกท่านและม้าทุกตัวที่ทำให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

1. Wallin L, Strandberg E, Philipsson J, Dalin G. Estimates of longevity and causes of culling and death in Swedish warmblood and coldblood horses. *Livestock Product Sci.* 2000;63(3):275-289.
2. McIlwraith CW. Traumatic joint injuries and disease: Intraarticular fractures amenable to treatment and in which the horse can be returned to athletic activity. In: Stashak TS, Hendrickson DA, McIlwraith CW, Trotter GW, Baxter GM, eds. *Lameness in The Horse: An In - Depth Short Course for The Horseman.* Colorado: Equine Sciences of Colorado State University; 1997. p. 39-42.
3. พร้อมจิต ศรีลัมพ์, วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล, สมภพ ประธานธรรารักษ์. สารานุกรมสมุนไพรเล่ม 1:สมุนไพรสวนสิริรุกษชาติ. ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล: อมรินทร์พริ้นติ้งกรุ๊ป; กรุงเทพฯ. 2543.
4. คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2542 (บัญชียาจากสมุนไพร). กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด; 2543.

5. Matsuda T, Kuroyanagi M, Sugiyama S, Umehara K, Ueno A, Nishi K. Cell differentiation - inducing diterpenes from *Andrographis paniculata* Nees. *Chem Pharm Bull.* 1994;42(6):1216-1225.
6. Thamlikitkul V, Dechatiwongs T, Chaipong S, Boonroj P, Chaipong S. Efficacy of *Andrographis paniculata* Nees for Pharyngotonsillitis in adults. *J Med Assoc Thai.* 1991;74(10):437-442.
7. Madav S, Tripathi HC, Tandan MSK. Analgesic, antipyretic and antiulcerogenic effects of andrographolide. *Indian J Pharm Sci.* 1995;57(3):121-125.
8. Caceres DD, Hancke JL, Burgos RA, Sandberg F, Wikman GK. Use of visual analogue scale measurements (VAS) to assess the effectiveness of standardized *Andrographis paniculata* extract SHA-10 in reducing the symptoms of common cold. A randomized double blind-placebo study. *Phytomedicine.* 1999;6(4):217-223.
9. Aromdee C, Khunkitti W, Chitropas P, Boonsang I. Autography evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Acanthaceae family. *Thai J Pharm Sci.* 2003;27(suppl):61.
10. Gupta S, Yadava JNS, Tandon JS. Antisecretory (antidiarrhoeal) activity of Indian medicinal plants against *Escherichia coli* enterotoxin-induced secretion in rabbit and guinea pig ileal loop models. *Int J Pharmacog.* 1993;31(3):198-204.
11. Puri A, Saxena R, Saxena RP, Saxena KC. Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *J Nat Prod.* 1993;56(7):995-999.
12. Zhang CY, Kuroyangi M, Tan BK. Cardiovascular activity of 14-deoxy-11, 12-Didehydroandrographolide in the anesthetized rat and isolated right atria. *Pharmacol Res.* 1998;38(6):413-417.
13. Amroyan E, Gabrielian E, Panossian A, Wikman G, Wagner H. Inhibitory effect of andrographolide from *Andrographis paniculata* on PAF-induced platelet aggregation. *Phytomedicine.* 1999;6(1):27-31.
14. Sheeja K, Shihab PK, Kuttan G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of the Plant *Andrographis Paniculata* Nees. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2006;28(1):129-140.
15. Xia YF, Ye BQ, Li YD, Wang JG, He XJ, Lin X, et al. Andrographolide attenuates inflammation by inhibition of NF- $\kappa$ B activation through covalent modification of reduced Cysteine 62 of p50. *J Immunol.* 2004;173(6):4207-4217.
16. Li Y, Jiang Y. Preparation of compound *Picrasma quassioides* anti-inflammatory capsules. Patent: Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu. 2005; p. 5.
17. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta.* 1986;883(2):173-177.
18. Pothacharoen P, Choocheep K, Pitak T, Pompimon W, Premanode B, Hardingham T, et al. Effect of *Alpinia galanga* extract on cartilage degradation and on gene expression in human chondrocyte and synovial fibroblast metabolism. *Cent Eur J Biol.* 2006;1(3):430-450.
19. 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;360(1):75-79.
20. Hoemann CD, Sun J, Chrzanowski V, Buschmann MD. A multivalent assay to detect glycosaminoglycan, protein, collagen, RNA, and DNA content in milligram samples of cartilage or hydrogel-based repair cartilage. *Anal Biochem.* 2002;300(1):1-10.

21. Taub DD, Oppenheim JJ. Chemokines, inflammation and the immune system. *The Immunol.* 1994;1(4):229-246.
22. 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 B: Differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum.* 2000;43(4):801-811.
23. Richardson DW, Dodge GR. Effects of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondrocytes. *Am J Vet Res.* 2000;61(6):624-630.
24. Tyler JA, Bird JLE, Giller T. Interleukin-1 inhibits the production of types II, IX, and XI procollagen mRNA in cartilage. *Ann NY Acad Sci.* 1990;580(1):512-517.
25. Cook JL, Anderson CC, Kreeger JM, Tomlinson JL. Effects of human recombinant interleukin-1 beta on canine articular chondrocytes in three-dimensional culture. *Am J Vet Res.* 2000;61(7):766-770.
26. Takafuji VA, McIlwraith CW, Howard RD. Effects of equine recombinant interleukin-1alpha and interleukin-1beta on proteoglycan metabolism and prostaglandin E2 synthesis in equine articular cartilage explants. *Am J Vet Res.* 2002;63(4):551-558.
27. Gregg AJ, Fortier LA, Mohammed HO, Mayr KG, Miller BJ, Haupt JL. Assessment of the catabolic effects of interleukin-1 $\beta$  on proteoglycan metabolism in equine cartilage cocultured with synoviocytes. *Am J Vet Res.* 2006;67(6):957-962.
28. Frazer A, Bunning RA, Russe RG. Effects of transforming growth factor beta and interleukin-1 beta on [3H] thymidine incorporation by human articular chondrocytes in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1226(2):193-200.
29. Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 1992;6:861-870.
30. Chantasutra V, Limpapanichkul S. Acute antiinflammatory activity of *Andrographis paniculata* Nees in rats. The eight Conference, Faculty of Pharmacy, Chulalongkorn University. 1989.
31. Sawasdimongkol K, Permpipat U, Kiatyingungsulee N. Pharmacological study of *Andrographis paniculata* Nee. Symposium on *Andrographis paniculata*, National Institute of Health, Bangkok, Thailand. 1990.
32. เสาวภา ลิ้มปี่พานิชกุล. การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในหนูขาว [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชวิทยา]. บัณฑิตวิทยาลัย:จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2532.
33. Thamaree S, Rugruntham K, Ruangrunsi N, Thaworn N, Kemsri W. The inhibitory effects of andrographolide and extracts of some herbal medicines on the production of pro-inflammatory cytokines by LPS-stimulated human blood cells. *Chula Med J.* 2001;45(8):661-670.
34. Johansson S, Goransson U, Luijendijk T, Backlund A, Claeson P, Bohlin L. A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. *J Nat Prod.* 2002;65(1):32-41.
35. Chiou WF, Chen CF, Lin JJ. Mechanisms of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells by andrographolide. *Br J Pharmacol.* 2000;129(8):1553-1560.
36. Batkhuu J, Hattori IK, Takano F, Fushiya S, Oshoman K, Fujimiya Y. Suppression of NO production in activated macrophages in vitro and ex vivo by neoandrographolide isolated from *Andrographis paniculata*. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(9):1169-1174.

37. Hidalgo MA, Romero A, Figueroa J, Cortés P, Concha II, Hancke JL, Burgos RA. Andrographolide interferes with binding of nuclear factor- $\kappa$ B to DNA in HL-60-derived neutrophilic cells. *Br J Pharmacol.* 2005;144(5):680-686.
38. Chaiwongsa R. Effect of Plai (Zingiber cassumunar Roxb.) extract on hyaluronan and proteoglycan degradation in cartilage explant [dissertation]. Graduate school. Chiang Mai: Chiang Mai University; 2004.

