รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

สารต้านอักเสบจากใบเปล้าน้อย

Anti-inflammatory constituents from *Croton stellatopilosus* leaves

โดย

ผศ.ดร.จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประเภททั่วไป ประจำปี 2553

พฤศจิกายน 2554

สัญญาเลขที่ PHA530220S

โครงการ: สารต้านอักเสบจากใบเปล้าน้อย

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้เป็นการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากใบเปล้าน้อยที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบ โดยอาศัยหลักของการแยกโดยใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นแนวทาง ในการศึกษาด้านพฤกษเคมี สารสกัดหยาบถูกเตรียมด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน ใน 2 วิธี กล่าวคือ วิธีที่ 1 สกัดด้วยเอทานอล ที่ให้ความร้อน และสกัดแบบแยกชั้นด้วยเฮกเซน และวิธีที่ 2 สกัดด้วยการหมักด้วยตัวทำละลาย ที่มีขั้วแตกต่างกัน ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ตามลำดับ ส่วนของสารสกัดทั้งหมดถูกนำมาตรวจหาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมคโครฟาจ ชนิด RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วยสารไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ผลการทดลองพบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริก ออกไซด์ ได้แก่ สารสกัดชั้นเอทานอล เฮกเซน (สกัดแบบวิธีที่ 1) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.20 และ 49.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทานอล (สกัดแบบวิธีที่ 2) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.37, <3 และ 5.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวได้นำชั้นเฮกเซน (สกัดแบบวิธีที่ 1) และชั้นไดคลอโรมีเทน (สกัดแบบวิธีที่ 2) มาแยกด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี ได้สารรวม 3 ชนิด คือ **CS-1** มีลักษณะเป็นของเหลวหนืด **CS-2** และ **CS-3** ที่มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปคโตรสโคปี ได้ผลการวิเคราะห์ว่าสาร **CS-1, CS-2** และ **CS-3** คือ เปลาโนทอล เปลาโนไลด์ และเปลานอล อี ตามลำดับ

เมื่อประเมินฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมคโครฟาจของสาร acyclic diterpene (เปลาโนทอล) และสาร furanoditerpenes (เปลาโนไลด์ และเปลานอล อี) พบว่า เปลาโนทอล เปลาโนไลด์ และเปลานอล อี สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.41, 17.09 และ 2.79 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าสารทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ต้านอักเสบ

ในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของสารทั้งสามชนิดต่อเซลล์แมคโครฟาจ โดยวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ได้แก่ ไซโคลออกซิจีเนส-1 (*COX-1*), *COX-2* และอินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ ซินเทส (*iNOS*) ถูกประเมินด้วยวิธี qRT-PCR โดยแสดงในรูปของค่าปริมาณสัมพัทธ์ (Relative Quantitation, RQ) ผลการทดลองพบว่าสารเปลาโนทอลกระตุ้นการแสดงออกของยีน *COX-1* และ *COX-2* แต่กดการแสดงออกของยีน *iNOS* ได้ ในทางตรงกันข้ามสารเปลาโนไลด์สามารถยับยั้งยีนทั้งสามชนิด ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นที่ให้ และสารเปลานอล อี ยับยั้งได้เฉพาะ *COX-2* แต่ไม่มีผลต่อ *COX-1* และ *iNOS* ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเปลาโนทอล เปลาโนไลด์ และเปลานอล อี มีคุณสมบัติต้านอักเสบโดยมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน กล่าวคือ เปลาโนทอลออกฤทธิ์ผ่านระบบอิมมูน ส่วนเปลานอล อี ออกฤทธิ์ผ่านกระบวนการสร้างพรอสตาแกลนดินโดยยับยั้ง *COX-2* อย่างจำเพาะ และสารเปลาโนไลด์ออกฤทธิ์ต้านอักเสบผ่านทั้งกระบวนการสร้างพรอสตาแกลนดิน และระบบอิมมูน ผลจากการศึกษานี้สรุปได้ว่าสารไดเทอร์ปีนในใบเปล้าน้อยนั้นมีฤทธิ์ต้านอักเสบ ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 และมีศักยภาพในการพัฒนาให้เป็นสารต้านอักเสบต่อไปในอนาคต

Project i.d. PHA530220S

Title: Anti-inflammatory constituents from *Croton stellatopilosus* leaves

---

ABSTRACT

In this study, anti-inflammatory constituents from *Croton stellatopilosus* leaves were investigated by bioassay-guided isolation approach. In the phytochemical study, the crude extracts were prepared from 1) reflux with ethanol and partitioned with hexane and 2) maceration with hexane, dichloromethane (CH_2Cl_2) and ethanol, consecutively. All fractions were screened for an inhibitory activity against nitric oxide (NO) production in the lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells by Griess reaction. The results showed that the extracts that possessed the inhibitory activity on NO production were ethanol and hexane fractions (from method 1) with IC_{50} of 7.20 and 49.31 μg/ml; hexane, CH_2CL_2 and ethanol fractions (from method 2) with IC_{50} of 8.37, <3 and 5.94 μg/ml, respectively. Based on these results, the hexane extract (from method 1) and the CH_2Cl_2 extract (from method 2) were further purified by means of column chromatography. An oily liquid substance (**CS-1**) and two amorphous powders (**CS-2** and **CS-3**) were obtained. By using spectroscopic techniques, the **CS-1**, **CS-2** and **CS-3** were elucidated to be plaunotol, plaunolide and plaunol E, respectively.

The acyclic diterpene (plaunotol) and two furanoditerpenes (plaunolide and plaunol E) were assessed for inhibitory activity on NO production. The results indicated that plaunotol, plaunolide and plaunol E exhibited an inhibitory activity on NO production with IC_{50} of 3.41, 17.09 and 2.79 μM, respectively. From these data, it can be concluded that plaunotol, plaunolide and plaunol E have anti-inflammatory activity.

In order to understand the mechanism of anti-inflammatory activity, the RAW264.7 cells were treated with plaunotol, plaunolide and plaunol E. Genes expressions of *COX-1*, *COX-2* and *iNOS* were determined using quantitative real-time (qRT)-polymerase chain reaction (PCR) technique. The level of gene expression was expressed as relative quantitation (RQ) according to the comparative C_T method. The results indicated that plaunotol has stimulated on *COX-1* and *COX-2* expressions but suppressed the *iNOS*

expression significantly. On the other hand, the expressions *COX-1*, *COX-2* and *iNOS* gene were down-regulated by treating cells with plaunolide in concentration dependent manner. Nevertheless, plaunol E could only inhibited the *COX-2* expression but not *COX-1* and *iNOS*. The results suggested that all three compounds possessed the anti-inflammatory activity with different mechanisms of action. Plaunotol suppressed the *iNOS* mRNA expression in the immune system. Plaunol E acted as a *COX-2* inhibitor in prostaglandin biosynthesis. And plaunolide performed anti-inflammatory action via mixed inhibition actions against prostaglandin and NO productions. The present study revealed that the diterpenes plaunotol, plaunolide and plaunol E from *C. stellatopilosus* leaves exhibit anti-inflammatory activity in the murine macrophage RAW264.7 cells, supporting that they could be further developed to be an alternative anti-inflammatory agent.