

ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกายของสารสกัดจากผลพุททะเลลาย



นางสาวปิยะรัตน์ ศรีदारณพ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN: 974-53-1866-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IMMUNOSTIMULATING ACTIVITY OF THE EXTRACT FROM
SCAPHIUM SCAPHIGERUM FRUITS

Miss Piyarat Sridaranop

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology (Inter-Department)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2005
ISBN 974-53-1866-3

481981

Thesis Title Immunostimulating activity of the extract from *Scaphium*
scaphigerum fruits

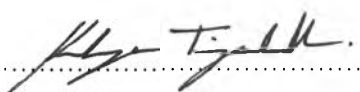
By Miss Piyarat Sridaranop

Field of study Pharmacology

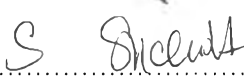
Thesis advisor Assistant Professor Wacharee Limpanasitthikul, Ph.D.

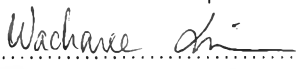
Thesis Co-advisor Assistant Professor Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D.

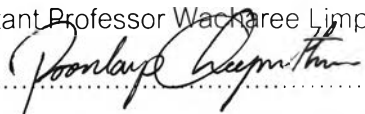
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

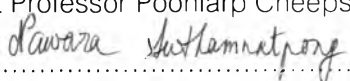
 Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

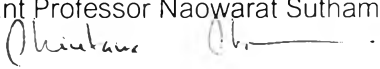
THESIS COMMITTEE

 Chairman
(Association Professor Supatra Srichairat, Ph.D.)

 (Thesis Advisor)
(Assistant Professor Wacharee Limpanasitthikul, Ph.D.)

 (Thesis Co-Advisor)
(Assistant Professor Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D.)

 Member
(Assistant Professor Naowarat Suthamnatpong, Ph.D.)

 Member
(Assistant Professor Chintana Chirathaworn, Ph.D.)

ปิยะรัตน์ ศรีदारณพ: ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกายของสารสกัดจากผลพุททะเลาย

IMMUNOSTIMULATING ACTIVITY OF THE EXTRACT FROM SCAPHIUM SCAPHIGERUM

FRUITS. อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. วชิร ลิ้มปณิธิทิกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.ดร. พูลลามา ชีพ

สุนทร, 61 หน้า. ISBN: 974-53-1866-3

ผลพุททะเลายเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณแก้เจ็บคอและบรรเทาอาการตาอักเสบ นอกจากนี้ยังนำมาผลิตเป็นเครื่องดื่มแก้กระหายน้ำอีกด้วย มีรายงานพบว่าสารสกัดน้ำจากผลพุททะเลายมีโพลีแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบ จากการที่ในปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ต่อภูมิคุ้มกันร่างกายของโพลีแซคคาไรด์จากพืชกันอย่างกว้างขวางและจากการศึกษาเบื้องต้นที่พบว่าสารสกัดน้ำจากผลมีฤทธิ์กระตุ้นเมตาบอลิซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนเมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต่อภูมิคุ้มกันร่างกายของสารสกัดดังกล่าว

ผลจากการทดสอบสารสกัดน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดสามารถกระตุ้นเมตาบอลิซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้ โดยมีค่าความเข้มข้นที่กระตุ้นได้ร้อยละ 50 เป็น 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ได้แบบขึ้นกับความเข้มข้นเช่นเดียวกันเมื่อทดสอบด้วยวิธี ^3H -thymidine incorporation อย่างไรก็ตามฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์นี้ต่ำกว่าฤทธิ์ของสาร phytohemagglutinin (PHA) ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรมาก นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการทำงานของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกายทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์กระตุ้น T cells ได้เพียงเล็กน้อยจากการทดสอบการแสดงออกของโมเลกุล CD69 ที่เป็นตัวบ่งชี้ถึงสภาวะการกระตุ้น T cells โดยการใช้อntibodies ต่อโมเลกุล CD3 และ CD69 และวัดผลด้วยวิธี fluorescence activated cell sorter (FACS) ในทางตรงกันข้ามสารสกัดสามารถกระตุ้นการจับกิน zymogen ของเซลล์แมคโครเฟจ J774A.1 ได้อย่างชัดเจนและมีนัยสำคัญทางสถิติ พร้อมทั้งกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์นี้ได้อีกด้วย เมื่อตรวจวัดโดยวิธี Griess reaction

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำจากผลพุททะเลายอาจมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ อย่างไรก็ตามฤทธิ์กระตุ้นนี้ไม่ได้แรงเท่าสารกระตุ้นมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย คือ PHA และ lipopolysaccharide (LPS) ข้อมูลจากการศึกษานี้ อาจใช้เป็นประโยชน์เพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ชนิดต่างๆในระบบภูมิคุ้มกันร่างกายทั้งในร่างกายและในหลอดทดลองต่อไปและอาจเป็นประโยชน์ต่อการนำผลพุททะเลายไปใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคและการนำมาใช้ทางการค้าอีกด้วย

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สนสาขาวิชาเภสัชวิทยา)

ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ปิยะรัตน์ ศรีदारณพ.

วชิร ลิ้มปณิธิทิกุล

พูลลามา ชีพสุนทร

4689111420: MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD: *Scaphium scaphigerum*, IMMUNE RESPONSE, IMMUNOSTIMULATION

PIYARAT SRIDARANOP: IMMUNOSTIMULATING ACTIVITY OF THE EXTRACT FROM SCAPHIUM SCAPHIGERUM FRUITS. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. WACHAREE LIMPANASITTHIKUL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. POONLARP CHEEPSUNTHORN, Ph.D., 61 pages. ISBN: 974-53-1866-3

The fruits of *Scaphium scaphigerum* have been used not only as traditional medicine for relieving cough and conjunctivitis but also as refreshing beverage. It was previously reported that polysaccharide was one of the constituents in the water extract of these fruits. Since polysaccharides from natural sources are extensively investigated for immunomodulating activities, and a preliminary study demonstrated that the water extract of these fruits could metabolically activate human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by MTT assay, immunomodulating activities of the water extract of *S. scaphigerum* fruits were investigated in this study.

By using MTT assay and testing the water extract at various concentrations (10-500 $\mu\text{g/ml}$), the extract metabolically activated human PBMCs in a concentration-dependent manner with the 50% stimulation concentration at 150 $\mu\text{g/ml}$. It could stimulate human PBMC proliferation, by ^3H -thymidine incorporation assay, in a concentration-dependent fashion as well. However, this stimulation effect of the extract is much less potent than the effect of 10 $\mu\text{g/ml}$ phytohemagglutinin (PHA). The potential immunostimulatory activity of the extract was evaluated further on specific and nonspecific immune cells activation. The extract slightly stimulated T cell activation that was determined by the expression of CD69, a marker of activated T cells, on CD3+ T cells using antibodies against CD69 and anti-CD3 and detecting by fluorescence activated cell sorter (FACS) analysis. On the other hand, the extract significantly enhanced zymosan phagocytosis of macrophage cells J774A.1. Nitric oxide production from these macrophages was also increased by the extract that detected by Griess reaction assay. This study reveals that the water extract of *S. scaphigerum* fruits may possess immunostimulatory activities, especially on innate immunity. The potency on immunostimulation of the extract was not as potent as immunogens used in this study, PHA and lipopolysaccharide (LPS). The immunostimulatory effect of the water extract from this study should provide beneficial information for further study on other immune cells both *in vivo* and *in vitro* and for the use of *S. scaphigerum* fruits both in traditional medicine and commercial.

Field of Study Pharmacology
(Inter-Department of Pharmacology)
Academic Year 2005

Student's Signature.....*Piyarat Sridaranop.*
Advisor's Signature.....*Wacharee Limpanasitthikul.*
Co-Advisor's Signature.....*Poonlarp Cheepsunthorn.*

ACKNOWLEDGMENTS

For the success of this thesis, I would like to express my deepest gratitude appreciate to my thesis advisor Asst. Prof. Dr. Wacharee Limpanasitthikul, Department of Pharmacology and my co-advisor Asst. Prof. Dr. Poonlarp Cheepsunthorn, Department of Anatomy, Faculty of Medicine. I can say, without a doubt, that were it not for their encouragement, this work would not exist and completed. They gave invaluable advice, precious guidance and support me.

I am also express my sincere appreciate to committee members of this thesis examination; Assoc. Prof. Dr. Supatra Srichairat and Asst. Prof. Dr. Naowarat Suthamnatpong, Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Science and Asst. Prof. Dr. Chintana Chirathaworn, Department of Microbiology, Faculty of Medicine for their constructive comment and advice.

I am grateful to Thailand Institute of Scientific and Technological research and the National Blood Bank Thai Red Cross Society for their help and allowing me to use facilities.

I would like to give my special thanks for persons involving Faculty of Medicine especially Assoc. Prof. Dr. Kiat Ruxrungtham, Dr. Sunee Sirivichayakul and Ms. Supranee Buranapraditkun, Division of Allergy and Clinical Immunology, Mrs. Ruchada Inwattana, Immunology unit, Division of Microbiology, Mrs. Nongnuch Thaworn, Division of Pharmacology, Ms. Nootchanat Nairuae and members of Alzheimer Research laboratory for their technical assistance, valuable advice, sympathy and wonderful friendships. Many thanks also go to Ms. Chompoonuch Boonarkart, Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Science for her suggests, friendship and valuable help.

I wish to thank all staff members of Department of Pharmacology, Faculty of Medicine for their help.

This study was party supported by the Graduate Research Funds from the Ministry of University Affairs and the Graduate School, Chulalongkorn University.

Finally, I would like to eternally thank all the success to my dear parents, brother, sister and friends for their love, understanding and continuous encouragement throughout my life.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (Thai).....	iv
ABSTRACT (English).....	v
ACKNOWLEDGMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF ABBREVIATIONS	xi
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
1.1 Background and rationale.....	1
1.2 Objective	3
1.3 Hypothesis.....	4
1.4 Study design and process.....	4
1.5 Anticipated benefits from the study.....	4
II LITERATURE REVIEW.....	5
2.1 <i>Scaphium scaphigerum</i>	5
2.2 Immune function.....	7
2.3 Immunostimulation	11
2.3.1 Lymphocyte stimulation.....	12
2.3.1.1 Lymphocyte activation and proliferation	11
2.3.2 Macrophage activation.....	14
2.3.2.1 Phagocytosis.....	15
2.3.2.2 Nitric oxide synthesis and function	18

III	MATERIALS AND METHODS.....	21
	3.1 Materials.....	21
	3.1.1. <i>Scaphium scaphigerum</i> (G.Don) Schott & Endl	21
	3.1.2 Cell culture.....	21
	3.1.3 Instruments.....	21
	3.1.4 Reagents.....	22
	3.2 Methods.....	23
	3.2.1 Preparation of <i>Scaphium scaphigerum</i> fruit extract.....	23
	3.2.2 Preparation of human peripheral blood mononuclear cells.....	23
	3.2.3 Mitogenic activity assay.....	25
	3.2.4 T cell activation assay.....	26
	3.2.5 Macrophage function assay.....	27
	3.2.6 Data analysis.....	30
IV	RESULTS.....	31
	4.1 Mitogenic of <i>S. scaphigerum</i> fruit extract on human PBMCs	31
	4.2 Effect of <i>S. scaphigerum</i> fruit extract on T cell activation.....	32
	4.3 Effect of <i>S. scaphigerum</i> fruit extract on phagocytosis.....	38
	4.4 Effect of <i>S. scaphigerum</i> fruit extract on nitric oxide production.....	38
V	DISCUSSION AND CONCLUSION.....	42
	REFERENCES.....	45
	APPENDICES.....	52
	APPENDIX A.....	53
	APPENDIX B.....	54
	APPENDIX C.....	58
	BIOGRAPHY.....	61

LIST OF TABLES

TABLE	Page
<u>Table 2.1</u> Mediators of antimicrobial and cytotoxic activity of macrophage.....	18

LIST OF FIGURES

FIGURE	Page
<u>Figure 2.1</u> <i>S. scaphigerum</i>	6
<u>Figure 2.2</u> Non specific (Innate) immunity and Specific (Adaptive) immunity	9
<u>Figure 2.3</u> Summary of the immune response involving B and T cells.....	10
<u>Figure 2.4</u> Phagocytosis and processing of exogenous antigen by macrophages.....	17
<u>Figure 4.1</u> Mitogenic activity of PHA on human PBMCs.....	33
<u>Figure 4.2</u> Immunostimulation of <i>S. Scaphigerum</i> fruit extract on human PBMCs.....	34
<u>Figure 4.3</u> Effect of <i>S. scaphigerum</i> fruit extract on human PBMCs proliferation.....	35
<u>Figure 4.4</u> Effect of <i>S. scaphigerum</i> fruit extract on CD69 expression on CD3 ⁺ T cells..	36
<u>Figure 4.5</u> Representative fluorescence cytograms demonstrating CD69 expression by gated CD3 cells.....	37
<u>Figure 4.6</u> Effect of <i>S. scaphigerum</i> fruit extract on phagocytotic activity of J774A.1 cells.....	39
<u>Figure 4.7</u> Effect of LPS on nitric oxide production from J774A.1 cells.....	40
<u>Figure 4.8</u> Effect of <i>S. scaphigerum</i> fruit extract on nitric oxide production from J774A.1 cells.....	41

LIST OF ABBREVIATIONS

CO ₂	carbondioxide
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
FBS	fetal bovine serum
HCl	hydrochloric acid
Ig	immunoglobulin
KOH	potassium hydroxide
LPS	lipopolysaccharide
mg	milligram(s)
MHC	major histocompatibility complex
ml	milliliter(s)
M	molar (mole per liter)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NaCl	sodium chloride
NBT	nitro blue tetrazolium
NO	nitric oxide
OD	optical density
PBS	phosphate buffer saline solution
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
pH	the negative logarithm of hydrogen ion concentration
PHA	phytohemagglutinin
r.p.m	revolution per minute
S.E.M.	standard error of mean
° C	degree celsius
µg	microgram (s)
nm	nanometer