

**Thesis Title** Effect of Phytochemicals on Human Interleukin-1 $\beta$ , Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-2 Release from Influenza Type A H1N1 Induced Peripheral Blood Mononuclear Cells

**Author** Miss Kanda Fanhchaksai

**Degree** Master of Science (Biochemistry)

**Thesis Advisory Committee**

Dr. Peraphan Pothacharoen Advisor

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert Co-advisor

Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ongchai Co-advisor

## ABSTRACT

The emergence of highly contagious influenza type A H1N1 represents a serious threat to global human health. In human, influenza A virus replicates throughout the respiratory tract that result in respiratory failure. The excessive inflammation is due to over production of proinflammatory cytokines known as cytokine storm. As the result, many types of cytokines, especially IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and other immune mediators from monocytes are produced for against the virus. In addition, T-lymphocytes produce IL-2 beneficial cytokine, which sends signals to white blood cells to be ready to against virus. We efforts to inhibit cytokine storm focus on the effect of phytochemicals, which reduced IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  whereas increased IL-2 release from H1N1 induced PBMCs.

H1N1 induced human PBMCs were co-cultured with various concentrations (0.5-10.0 µg/ml) of phytochemicals, which are xanthone from mangosteen, sesamin from sesame seed, *Andrographis paniculata* extract, *Moringa oleifera* extract, *Houttuynia cordata* extract, *Hericium erinaceus* extract, and *p*-hydroxycinnamaldehyde from *Alpinia galanga*. After 24 hours, the conditional media was analyzed for cytokines level by ELISA and the cells were determined for gene expression using real-time qPCR. Screening activities of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-2 showed that xanthone from mangosteen (1.0, 5.0, 10.0 µg/ml), sesamin from sesame seed (0.5, 1.0, 5.0 µg/ml) and *Andrographis paniculata* extract (0.5, 1.0, 5.0 µg/ml) could reduce IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  level and increase IL-2 level in dose dependent manner. RNA was extracted, converted to cDNA and analyzes the gene expression. It was found that xanthone from mangosteen, sesamin from sesame seeds and *Andrographis paniculata* extract can reduced IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNA level ( $p < 0.01$ ) whereas increased IL-2 mRNA level ( $p < 0.01$ ) when compared with the control.

These results indicated that xanthone from mangosteen, sesamin from sesame seed and *Andrographis paniculata* extract can inhibit the cytokine storm and induced immune cells. This information might be useful for prevention and treatment of immune induced inflammatory disorders.

<b>ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์</b>	ฤทธิ์ของสารพฤษเคมีต่อการหลั่งของอินเตอร์ลิวคิน-วันบีตา ทูเมอร์เน โครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา และอินเตอร์ลิวคิน-ทู จากเซลล์เม็ดเลือดขาว ชนิดนิวเคลียร์เดี่ยวจากเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สายพันธุ์เอชชนิดเอชวันเอ็นวัน	
<b>ผู้เขียน</b>	นางสาวกานดา ฝั้นจักสาย	
<b>ปริญญา</b>	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)	
<b>คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์</b>	ดร. พิรพรรณ โปธาเจริญ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ.ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	รศ.ดร. ศิริวรรณ องค์กรไชย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

### บทคัดย่อ

อุบัติการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สายพันธุ์เอชชนิดเอชวันเอ็นวัน เป็นภัยคุกคามต่อสุขภาพเกือบทั่วภูมิภาคของโลก เมื่อเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สายพันธุ์เอชเข้าสู่ร่างกายมนุษย์แล้วสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินหายใจ ส่งผลให้ระบบทางเดินหายใจล้มเหลวจนเสียชีวิตในที่สุด พบว่าขณะที่เชื้อไวรัสแบ่งตัวเพิ่มจำนวนนั้นเป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบมากโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวผลิตสารก่ออักเสบมากเกินไปหรือเรียกว่าพายุไซโตไคน์ โดยเฉพาะอินเตอร์ลิวคิน-วันบีตา (IL-1 $\beta$ ) และทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา (TNF- $\alpha$ ) รวมทั้งสารอื่นๆ ที่หลั่งจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้เซลล์ T-lymphocytes ยังสร้างอินเตอร์ลิวคิน-ทู (IL-2) เพื่อส่งสัญญาณไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้พร้อมต่อสู้กับเชื้อไวรัส ดังนั้นการศึกษารั้วนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสารพฤษเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งพายุไซโตไคน์ซึ่งสามารถลดระดับ IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  รวมทั้งมีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยสามารถเพิ่มระดับ IL-2 ที่หลั่งจากการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยเชื้อไวรัสเอชวันเอ็นวัน

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียร์เดี่ยวจากเลือด (PBMCs) ถูกเหนี่ยวนำด้วยเชื้อไวรัสเอชวันเอ็นวันร่วมกับสารพิษเคมี ได้แก่ สารสกัดแซนโทนจากมังคุด สารสกัดเซซามินจากงา สารสกัดจากฟ้าทะลายโจร สารสกัดจากมะรุม สารสกัดจากผักคาวตอง สารสกัดจากเห็ดหัวสิงโต และสารสกัด *p*-hydroxycinnamaldehyde จากข่า ที่ความเข้มข้น 0.5-10.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ไปวัดระดับของไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาโดยวิธี ELISA ส่วนของเซลล์นำไปสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อศึกษาการแสดงออกในระดับยีนของไซโตไคน์โดยวิธี real-time qPCR ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดแซนโทนจากมังคุด(ความเข้มข้น 1.0, 5.0, 10.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สารสกัดเซซามินจากงา (ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร (ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สามารถลดระดับของ IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มระดับของ IL-2 โดยแปรผันตรงตามระดับของความเข้มข้น ทำการสกัด RNA จากเซลล์ที่ทดสอบจากนั้นเปลี่ยนเป็น cDNA เพื่อศึกษาการแสดงออกในระดับยีน ผลการศึกษาพบว่าระดับการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  ลดลง และมีการแสดงออกของยีน IL-2 ที่เพิ่มขึ้นแปรผันตรงตามความเข้มข้นของสารสกัดแซนโทนจากมังคุด สารสกัดเซซามินจากงา และสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.01$ ) เมื่อเทียบกับสารควบคุม

ผลการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า สารสกัดแซนโทนจากมังคุด สารสกัดเซซามินจากงา และสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร มีผลยับยั้งยับยั้งพายุไซโตไคน์และสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ ดังนั้นสารสกัดดังกล่าวจึงมีประโยชน์ในการนำไปใช้เพื่อป้องกันและรักษาการอักเสบที่มีผลจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน