



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของสารสกัดจากบวบขม cucurbitacin B ต่อเซลล์ human lymphocyte

Immunological activity of cucurbitacin B on human lymphocyte.

ผู้วิจัย

รศ.พญ.ธนวรรณ กุ่มมาลือ และคณะ

24 กันยายน 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของสารสกัดจากบวบขม cucurbitacin B ต่อเซลล์ human lymphocyt

Immunological activity of cucurbitacin B on human lymphocyte.

คณะผู้วิจัย

- | | |
|--------------------------------|----------------|
| 1. รศ.พญ. ธนวรรณ กุมมาลือ* | หัวหน้าโครงการ |
| 2. นางเยาวลักษณ์ อยู่ปรีชา** | ผู้ร่วมวิจัย |
| 3. รศ.ดร. วิภา จิรัจฉิยากุล*** | ผู้ร่วมวิจัย |

สังกัด

*ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

**สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

***ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

คำขอบคุณ

โครงการ “ผลของสารสกัดจากบวบขม cucurbitacin B ต่อเซลล์ human lymphocyte” ได้รับทุนสนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สัญญาเลขที่ 122/2551(EC2)

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศ.นพ. วันชัย วะชีวนาวิน หัวหน้า สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ในการอำนวยความสะดวกเรื่องสถานที่ห้องปฏิบัติการในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ศ.นพ. สุรพล อิศโรกรศีล สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ในการอำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือและสถานที่ห้องปฏิบัติการในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ศ.นพ. ประเสริฐ เอื้อวรากุล ภาควิชาไวรัสวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ในการให้การสนับสนุนโดยแนะนำแหล่งเงินทุนวิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร. สาทิต พิษณุางกูร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ทหาร ที่ให้คำปรึกษาแนะนำให้งานวิจัยบรรลุผลสำเร็จ

ขอขอบพระคุณ รศ.นพ. เสถียร สุขพานิชนันท์ หัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อำนวยความสะดวกในการจัดทำโครงการวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวอุษณีย์พร เหลืองอมรนารา สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความร่วมมือในการทำวิจัยจนเป็นผลสำเร็จ และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้บรรลุผลสำเร็จตามเป้าหมาย

เยาวลักษณ์ อยู่ปรัชญา
สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล
24 กันยายน 2552

Abstract

Project Code: 122/2551(EC2)

Project Title: Immunological activity of cucurbitacin B on human lymphocyte.

Investigators: Tanawan Kummalue

Department of Clinical Pathology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital,
Mahidol University, Thailand.

E-mail address : sitkm@mahidol.ac.th

Project Period: 26 March, 2008-26 March, 2009

Abstract

We have investigated the role of immunological activities of cucurbitacin B on human lymphocyte. The mononuclear cells (MNC) were isolated from peripheral blood of 15 healthy volunteers. The cells were treated with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of cucurbitacin B, 45 $\mu\text{g/ml}$ PHA or 25 ng/ml PMA plus 1 $\mu\text{g/ml}$ ionomycin for 4-72 hours. The percentage of total cytolytic activity after 24, 48 and 72 hours of incubation with cucurbitacin B was significantly decreased when compared to control or PHA. The mean $\pm$ SEM of total cytolytic activity after 48 hours of incubation with cucurbitacin B compared to control or PHA were 11.891 $\pm$ 2.206 VS 45.436 $\pm$ 7.648, $P=0.0015$ or 11.891 $\pm$ 2.206 VS 80.728 $\pm$ 6.078, $P<0.000$, respectively. The expression of CD69⁺ cells were significantly higher than control (27.89 $\pm$ 3.60 vs 13.80 $\pm$ 1.75, $P=0.0005$) but CD3+CD69⁺ was no significant difference from negative control. CD8⁺ cell was significantly decreased from control (26.21 $\pm$ 2.22 VS 30.86 $\pm$ 2.65, $P=0.0175$ or PHA 26.21 $\pm$ 2.22 VS 31.98 $\pm$ 2.89, $P=0.0084$). The intracellular cytokine was not different from negative control. TNF- α was decreased after stimulation with PHA in the presence of cucurbitacin B for 72 hours. In conclusion, cucurbitacin B, natural product isolated from *Trichosanthes cucumerima* L., showed significant immunological inhibition in lymphocytic cells especially in NK cells when compared with the controls. This study revealed the propensity of using this active compound in some ways for immunomodulating in special group of patients.

Keywords: cucurbitacin B, CTL assay, NK function, cytokine

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: 122/2551(EC2)

ชื่อโครงการ: ผลของสารสกัดจากบวบขม cucurbitacin B ต่อเซลล์ human lymphocyte

ชื่อนักวิจัย: ธนวรรณ กุ่มมาลือ

ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail address : sitkm@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 26 มีนาคม 2551-26 มีนาคม 2552

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาฤทธิ์ของ cucurbitacin B ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากบวบขมต่อ human lymphocyte โดยศึกษาจากเลือดอาสาสมัครปกติจำนวน 15 ราย นำมา ปั่นแยกให้ได้ mononuclear cell นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี cucurbitacin B 0.5 $\mu\text{g/ml}$ นาน 4-72 ชั่วโมง เทียบกับ negative control ซึ่งไม่มีสารกระตุ้นและ positive control PMA 25 ng/ml ร่วมกับ Ionomycin 1 $\mu\text{g/ml}$ หรือ PHA 45 $\mu\text{g/ml}$ ตรวจวิเคราะห์ cytotoxic lymphocyte (CTL) function พบว่า cucurbitacin B ทำให้ total cytotoxic activity ลดลงเมื่อเทียบกับ normal control หรือ PHA (ทั้ง 24, 48 และ 72 ชั่วโมง) ที่ 48 ชั่วโมงพบค่า total cytotoxic activity ของ cucurbitacin B เทียบกับ normal control หรือ PHA มีค่าเท่ากับ 11.89 ± 2.20 VS 45.43 ± 7.65 , $P=0.0015$ หรือ 11.89 ± 2.21 VS 80.73 ± 6.08 , $P<0.000$, ตามลำดับ ตรวจวิเคราะห์ lymphocyte surface marker พบค่า CD8+ มีปริมาณต่ำกว่า control และ PHA (26.21 ± 2.22 VS 30.86 ± 2.65 , $P=0.0175$ และ 26.21 ± 2.22 VS 31.98 ± 2.89 , $P=0.0084$ ตามลำดับ) และ CD69+ มีค่าสูงกว่า normal control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (27.89 ± 3.60 VS 13.80 ± 1.75 , $P=0.0005$) แต่ค่า CD3+CD69+ ไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ไม่พบความแตกต่างของการสร้าง intracellular cytokine เมื่อกระตุ้นด้วย cucurbitacin B แต่พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ cucurbitacin B ในอาหารที่มี PHA จะทำให้การหลั่งของ TNF- α ลดลง โดยสรุปพบว่าสาร cucurbitacin B เป็นสารที่สกัดจากบวบขม *Trichosanthes cucumerima* L., ซึ่งมีอยู่ในธรรมชาติ มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะการทำงานของ NK cell ซึ่งอาจมีประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน

รหัสคำ: cucurbitacin B, CTL assay, NK function, cytokine

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
สารบัญ	iii
รายชื่อตาราง	iv
รายชื่อรูปภาพ	v
Executive summary	1
วัตถุประสงค์	2
วิธีทดลอง	2
การสกัดสุมุนไพรร	2
การเก็บตัวอย่างเลือด	2
การเตรียม mononuclear cell (MNC)	2
ศึกษา activity ของ NK cell โดยใช้เทคนิค Flow cytometric	3
cytotoxicity assay (FC assay).	
ศึกษา lymphocyte surface marker โดยใช้ Flow cytometry	3
ศึกษาปริมาณของ cytokine ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ (intracellular cytokine)	4
โดยวิธี Flow cytometric	
การตรวจหาปริมาณ TNF- α ด้วยวิธี ELISA	4
การคำนวณ	5
ผลการทดลอง	
NK cell cytotoxic activity	5
Immune activation status	12
ปริมาณของ cytokine ภายในเซลล์	18
ปริมาณ TNF- α ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์	22
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	23
เอกสารอ้างอิง	24
Output	26
ภาคผนวก	27

รายชื่อตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงNK cell total cytolytic activity test	6
2. แสดงผลการวิเคราะห์ CD69+ ด้วยเครื่อง FACSCalibur	14
3. แสดงผล CD3+CD69+ ของ MNC ที่ถูกกระตุ้นด้วย Cucurbitacin B	17
4. แสดงผล MNC ที่ถูกกระตุ้น Cucurbitacin B, PHA เทียบกับ control	18
5. แสดงปริมาณ intracellular cytokine ที่กระตุ้นด้วยสาร cucurbitacin B	19

รูปภาพที่	รายชื่อรูปภาพ	หน้า
1.	แสดง dot plot analysis จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSCalibur NK cell total cytolytic activity test	7
2.	กราฟแสดง NK cell total cytolytic activity test	8
3.	แสดง NK cell cytolytic activity กระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพรนาน 24 ชั่วโมง	9
4.	แสดง NK cell cytolytic activity ที่ 48 ชั่วโมง	10
5.	แสดง NK cell cytolytic activity ที่ 72 ชั่วโมง	11
6.	แสดง dot plot analysis ของ CD69+	13
7.	แสดง MNC ที่ถูกกระตุ้นด้วย Cucurbitacin B และ PHA เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง	15
8.	แสดงผล CD3+CD69+ ของ MNC ที่ถูกกระตุ้น เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง	16
9.	แสดงปริมาณ cytokine ภายในเซลล์ที่ตรวจพบจาก MNC	20
10.	แสดงปริมาณ TNF- α ภายในเซลล์ CD4+ และ CD8+	21
11.	แสดงปริมาณ TNF- α ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA	22

Executive Summary

ในประเทศไทยบวบขมเป็นพืชที่มีในธรรมชาติจำนวนมากและถูกนำมาใช้เป็นยาหรือเป็นส่วนประกอบของยาแผนโบราณเพื่อนำใช้ในการรักษาโรคมานานแล้ว

บวบขมมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Trichosanthes cucumerina* L. เป็นไม้เถาในตระกูล Cucurbitaceae^{1,2} มีสรรพคุณโดยผลสดแก้คัน รังแค ฆ่าเหา ผลแห้งแก้ริดสีดวงจมูก เมล็ดเป็นยาขับเสมหะ เป็นยาลดไข้ ขับระดู ขับพยาธิ รากใช้เป็นยาถ่ายอย่างแรง น้ำต้มกินเป็นยาลดไข้และระบายแก้ปวดหัว หลอดลมอักเสบ ต้น น้ำคั้นต้นกินเป็นยาทำให้อาเจียน น้ำต้มต้นเป็นยาลดไข้ ระบาย บำรุงหัวใจ บำรุงร่างกาย³⁻⁵ องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญได้แก่ cucurbitacin B, dihydrocucurbitacin B

คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาพบว่าสารสกัดจากบวบขมมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง โดย cucurbitacin B มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม SK-BR3 และมีค่า ED50 เท่ากับ 0.05 ไมโครกรัม/มล ส่วน Hydrocucurbitacin B มีค่า ED50 เท่ากับ 0.40 ไมโครกรัม/มล และสารผสมของทั้งสองสารมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม SK-BR3 โดยมีค่า ED50 เท่ากับ 0.48 ไมโครกรัม/มล ในขณะที่สารผสมของทั้งสองสารมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปากโดยมีค่า ED50 เท่ากับ 3 ไมโครกรัม/มล^{6,7} นอกจากนี้สารสกัดบวบขมยังส่งเสริมให้หนูเกิดการตั้งครรภ์ได้⁸

มีรายงานว่า cucurbitacin สามารถออกฤทธิ์เป็น inhibitor ของ STAT3 ซึ่งเป็น signal transducer และเป็น transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นเซลล์ด้วย growth factors และ cytokines ต่างๆ โดยเฉพาะในส่วนของระบบภูมิคุ้มกันแล้ว STAT3 อยู่ใน pathway ของการกระตุ้นเซลล์ด้วย Interleukin-6 (IL-6) ซึ่งเป็น cytokine สำคัญที่สร้างจาก T cell และ macrophage และทำหน้าที่ใน B cell differentiation และใน acute phase response โดยเป็น proinflammatory cytokine ที่สำคัญชนิดหนึ่งที่กระตุ้นให้มีการสร้าง c-reactive protein, ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ, และกระตุ้นการทำงานของ NK cell มีรายงานว่า IL-6 อาจมีบทบาทในการก่อโรค inflammatory bowel disease¹⁰ นอกจากนี้ STAT3 ยังเกี่ยวข้องกับการ differentiation¹¹ และ STAT3 ยังอาจเกี่ยวข้องกับการหลบหนีจากระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์มะเร็ง ดังนั้น STAT3 จึงเป็นที่สนใจในฐานะเป็น target ของการพัฒนาการรักษาใหม่ๆ ในโรคหลายชนิด เนื่องจาก cucurbitacin ออกฤทธิ์ต่อ STAT3 จึงน่าจะออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน และมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นยาที่ออกฤทธิ์เป็น immune modulator อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาผลของ cucurbitacin จากสารสกัดสมุนไพรต่อระบบภูมิคุ้มกัน จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรจากบวบขมต่อระบบภูมิคุ้มกัน
2. ค้นหากลไกที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ของสารสกัดจากบวบขมต่อระบบภูมิคุ้มกัน

วิธีการทดลอง

1 การสกัดสมุนไพร

สารสกัดจากบวบขม ได้มาจากการเตรียมและสกัดโดย รศ.ดร.วีณา จิระจรรย์ยากุล ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ทำการสกัดโดยใช้ ethanol แล้วแยกสาร cucurbitacin B ด้วยวิธี Chromatography ทำการควบคุมคุณภาพด้วยวิธี HPLC ได้สารบริสุทธิ์ซึ่งเทียบสารมาตรฐาน พบว่าเป็นสาร cucurbitacin B

2 การเก็บตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดปริมาตร 50-60 มิลลิลิตร ใส่สารกันเลือดแข็ง heparin ได้มาจากอาสาสมัครสุขภาพดีหลังจากได้รับการยินยอมให้ทำการศึกษาแล้ว

2.1 การเตรียม mononuclear cell (MNC)

นำเลือดมาแยก MNC ด้วยวิธี Ficoll- Hypaque centrifugation gradient โดยใช้ น้ำยา IsoPrep (Robbins Scientific, Norway) หลังจากได้ MNC แล้วทำการเลี้ยงใน RPMI 1640 media (Gibco™ Invitrogen, UK) ที่ supplement ด้วย 10% fetal bovine serum (FBS) (Lonza/Cambrex Bio Science Walkersville, USA) และนำไปใช้ในการทดลองภายในเวลา 24 ชั่วโมง

3 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร cucurbitacin B ในด้านการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

นำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ที่สกัดแยกจากเลือดของอาสาสมัครหรือ whole blood ทำการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวในสารอาหารเลี้ยงเซลล์ complete medium (RPMI supplemented ด้วย 10% FBS) เติมสารสกัดสมุนไพร cucurbitacin B ทำให้มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารPHA ความเข้มข้น 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ สาร PMA 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ Ionomycin 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่างๆ กัน ตั้งแต่ 4 – 72 ชั่วโมง และทำการศึกษาดังต่อไปนี้

3.1 ศึกษา activity ของ NK cell โดยใช้เทคนิค Flow cytometric cytotoxicity assay (FC assay).¹²⁻¹⁵

3.1.1 เตรียม target cell (K562) โดยติดฉลากด้วยสารเรืองแสง carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)¹²

เพาะเลี้ยง K562 ใน complete medium นำ K562 จำนวน 2×10^6 เซลล์ ปั่นล้าง ด้วย PBS 1 ครั้ง เติม PBS 0.5 มิลลิลิตร และเติม 0.5 มิลลิลิตรของ CFSE (Sigma, St Louis, Missouri USA) 1 ไมโครโมลาร์ ผสมด้วยเครื่อง vortex mixer นำไปอุ่นที่ 37°C นาน 10 นาที (เขย่าตลอดเวลา) เมื่อครบเวลาปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย cold complete medium เก็บไว้ที่ 4°C จนกว่าจะใช้ทดสอบ

3.1.2 การเตรียม effector cells

นำ MNC ที่เตรียมได้จากอาสาสมัครสุขภาพดี (effector cell) มาเพาะเลี้ยงใน complete medium ที่มีสารสกัดสมุนไพร cucurbitacin B ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร positive control ใช้ PHA ความเข้มข้น 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน negative control เพาะเลี้ยงใน complete medium เท่านั้น เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากครบเวลา นำ effector cell มาปั่นล้าง 1 ครั้งด้วย complete medium

3.1.3 การทดสอบ NK cell cytolytic activity¹³⁻¹⁵

นำ Effector cell และ target cell ที่เตรียมไว้แล้วจำนวน 1×10^6 และ 2×10^4 cells ตามลำดับมาเพาะเลี้ยงใน complete medium ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ที่ 37°C 5% CO_2 นาน 4 ชั่วโมง ปั่นล้าง 2 ครั้งด้วย cold PBS เติมด้วย 0.2 มิลลิลิตรของ 1x binding buffer (Apoptosis kit, BD Bioscience, USA) นำ 100 ไมโครลิตร ของเซลล์เติมลงใน หลอดที่มี Annexin V-PE และ 7AAD-PerCP (Apoptosis kit, BD Bioscience, USA) อย่างละ 7 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSCalibur ภายในเวลา 1 ชั่วโมง

3.2 ศึกษา lymphocyte surface marker โดยใช้ Flow cytometry¹⁶

เพื่อดูผลของสารสกัดต่อ activation status ของเซลล์โดยตรง นำ MNC 1×10^6 เซลล์มาเพาะเลี้ยงใน complete medium ที่มีสารสกัดสมุนไพร cucurbitacin B ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05, 0.25 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร positive control ใช้ PHA ความเข้มข้น 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ PMA (Sigma, St Louis, Missouri USA) 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ Ionomycin (Sigma, St Louis, Missouri USA) 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน negative control เพาะเลี้ยงใน complete medium อย่างเดียว เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง หรือ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเซลล์ที่ได้มาย้อมด้วยแอนติบอดี CD25-FITC, HLA-DR-PE, CD69-PerCP, CD4-FITC, CD8-PerCP, CD14-FITC, CD56-PerCP และ

CD3-APC (Biolegend, USA) ชนิดละ 7 ไมโครลิตร นาน 20 นาทีที่ 4 °C และมิด ล้าง 2 ครั้งๆ ละ 5 นาทีด้วย PBS เติม 1 % paraformaldehyde in PBS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSCalibur โดยใช้ CellQuest software

3.3 ศึกษาปริมาณของ cytokine ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ (intracellular cytokine) โดยวิธี flow-cytometry¹⁷⁻²¹

นำเลือดปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหาร RPMI 1640 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร supplement ด้วย 10% FBS และสารสกัดสมุนไพร cucurbitacin B ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1X protein transport inhibitor, brefeldin A (Biolegend, USA) Positive control เติมสาร PMA (Sigma, St Louis, Missouri USA) 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ Ionomycin (Sigma, St Louis, Missouri USA) 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน negative control เพาะเลี้ยงใน complete medium อย่างเดียวเพาะเลี้ยงในตู้บ 37 °C, 5% คาร์บอนไดออกไซด์ นาน 4 ชั่วโมง เติม 1X BD FACS™ Lysing solution (BD Pharmingen™, USA) ครบ 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ปั่นล้าง 1 ครั้งด้วย wash buffer (PBS ที่มี 2% FBS) เติม wash buffer 1.25 มิลลิลิตร ตูต 50 ไมโครลิตรของเซลล์ใส่ลงในหลอดที่มี 5 ไมโครลิตรของแอนติบอดีแต่ละชนิดดังนี้ IgG1-FITC/ IgG1-PerCP, CD4-FITC/CD8-PerCP, CD14-FITC/CD56-PerCP (Biolegend, USA), ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที 4 °C ในที่มืด (ในกรณีที่ย้อมเฉพาะ intracellular cytokine เพียงอย่างเดียวไม่ต้องเติม surface antibodies ในช่วงนี้) ปั่นล้าง 1 ครั้งด้วย wash buffer เติม 0.5 มิลลิลิตรของ Fixation buffer (4 % paraformaldehyde in PBS) ตั้งทิ้งไว้ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้องและเก็บในที่มืด ปั่นที่ 350 g นาน 5 นาที เท supernatant ทิ้ง เติม 1X Permeabilization Wash Buffer (Biolegend, USA) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ปั่นที่ 350 g นาน 5 นาที แล้วเติม 5 ไมโครลิตรของ cytokine antibodies: IgG1-PE, IFN γ -PE, IL1- α -PE, IL4-PE, IL6-PE, TNF α -PE (Biolegend, USA) ลงในแต่ละหลอด ตั้งทิ้งไว้ นาน 20 นาทีที่อุณหภูมิห้องและมิด ล้าง 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที ด้วย Wash Buffer แล้ว resuspend ด้วย 0.5 มิลลิลิตรของ 1 % paraformaldehyde in PBS นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSCalibur โดยใช้ CellQuest software

3.4 การตรวจหาปริมาณ TNF- α ด้วย ELISA

ทำการเพาะเลี้ยง MNC ของคนปกติ 1 ราย โดยใช้ MNC จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อ หลุมเพาะเลี้ยงใน 96 well plate ในอาหารที่มี PHA 45 μ g/ml อย่างเดียวหรือร่วมกับสาร cucurbitacin B ในปริมาณ 0.05, 0.25 และ 0.5 μ g/ml ตามลำดับ เป็นเวลา 24, 48 และ

72 ชั่วโมง ทำการทดสอบสามซ้ำ เมื่อครบเวลาดูส่วนของอาหารปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ TNF- α ด้วยวิธี ELISA ตามวิธีในชุดน้ำยาตรวจสำเร็จรูป Quantikine^R Immunoassay R&D System, USA

4. การคำนวณ

4.1 คำนวณค่า Total cytolytic activity ของ NK cell ต่อ การทำลายเซลล์ K562 โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{Total cell death} = \text{Apoptosis (early death)} + \text{Late death} + \text{Necrosis}$$

$$\text{Apoptosis ได้จากค่า K562 ที่ติดสี Annexin V}^+/\text{7AAD}^-$$

$$\text{Late death ได้จากค่า K562 ที่ติดสี Annexin V}^+/\text{7AAD}^+$$

$$\text{Necrosis ได้จากค่า K562 ที่ติดสี Annexin V}^-/\text{7AAD}^+$$

$$\% \text{ cytolytic activity} = \text{Total cells death} \times 100 / \text{total cells (living cells + death cells)}$$

4.2 วิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Paired T-test โดยใช้โปรแกรม StatView

ผลการทดลอง

1. NK cell cytolytic activity

รูปที่ 1 แสดง dot plot analysis จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSCalibur เป็นตัวแทนของ 1 ใน 10 ของอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรงที่ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน แสดงความสามารถของ MNC ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพรชนิดต่างๆ เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ทำปฏิกิริยากับเซลล์ K562 แล้วทำให้เซลล์ K562 เกิด apoptosis และ cell death column A แสดงเซลล์ K562 ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงสีเขียว CFSE+ column B แสดง K562 ที่ติด CFSE+ เมื่อถูกย้อมด้วย Annexin V-PE และ 7AAD-PerCP แบ่งเซลล์เป็น 3 ประเภทคือ Necrosis (Annexin V⁻/7AAD⁺), Apoptosis (early death) (Annexin V⁺/7AAD⁻) และ Late death (Annexin V⁺/7AAD⁺) 1A-3A แสดง K562 ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงสีเขียว CFSE ทั้งหมด 2A และ 2B กระตุ้นด้วย PHA, 3A และ 3B กระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร Curcubitacin B พบว่าสาร Curcubitacin B ทำให้เซลล์ K562 ตายน้อยกว่า control และ สาร PHA (% Total cytolytic activity ของ Curcubitacin B, control และ PHA เท่ากับ 4.78%, 20.97% และ 61.46% ตามลำดับ)

ตารางที่ 1 และรูปที่ 2 แสดง NK cell total cytolytic activity test ที่ได้จากการทดสอบ MNC ของคนปกติจำนวน 10 ราย ด้วยสารสกัดสมุนไพร cucurbitacin B และ

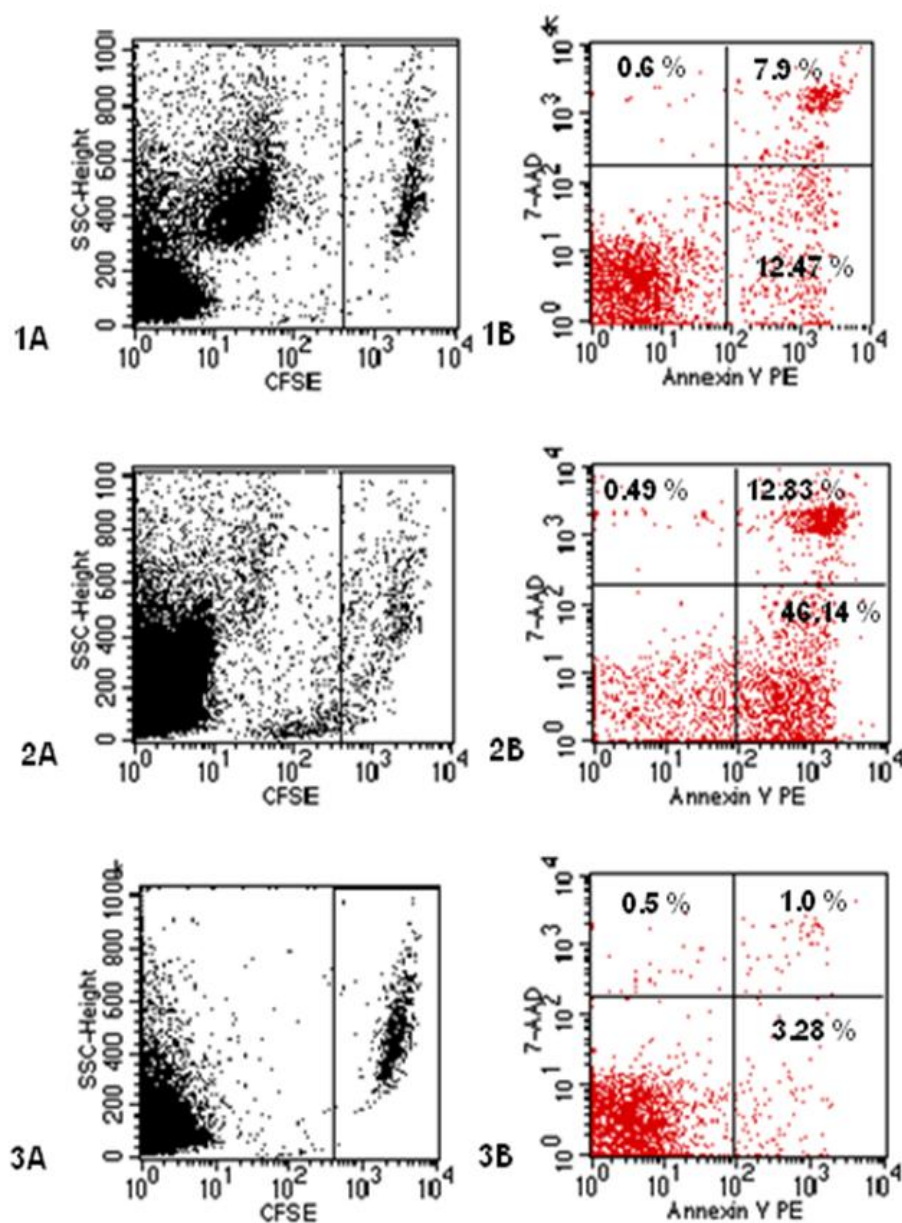
PHA เทียบกับ control ที่เวลาต่างๆ 24 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นเซลล์ K562 ถูกทำลายมากขึ้นตามลำดับยกเว้นเมื่อกระตุ้นด้วยสาร PHA ที่ 72 ชั่วโมงจะลดลงเล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จากตารางที่ 1 พบว่า cucurbitacin B มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด cytolytic activity ของ MNC ต่อ K562 เมื่อเทียบกับ % cytolytic activity ของ cucurbitacin B และ control ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงเท่ากับ 9.829 ± 2.676 VS 35.432 ± 8.297 , $P=0.0087$, และ 11.891 ± 2.206 VS 52.487 ± 7.648 , $P=0.0015$ ตามลำดับ ที่ 72 ชั่วโมงพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่าง control หรือกระตุ้นด้วยสาร PHA แต่เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยสาร cucurbitacin B จะทำให้ NK cell total cytolytic activity น้อยกว่า control อย่างมีนัยสำคัญ

รูปที่ 3-5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบระหว่างการใช้สารสกัดสมุนไพรกระตุ้นก่อนทำการศึกษา NK cell cytolytic activity test เป็นเวลา 24 (รูปที่ 3), 48 (รูปที่ 4) และ 72 (รูปที่ 5) ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยสาร PHA จะทำให้ NK cell total cytolytic activity มากกว่า control อย่างมีนัยสำคัญ

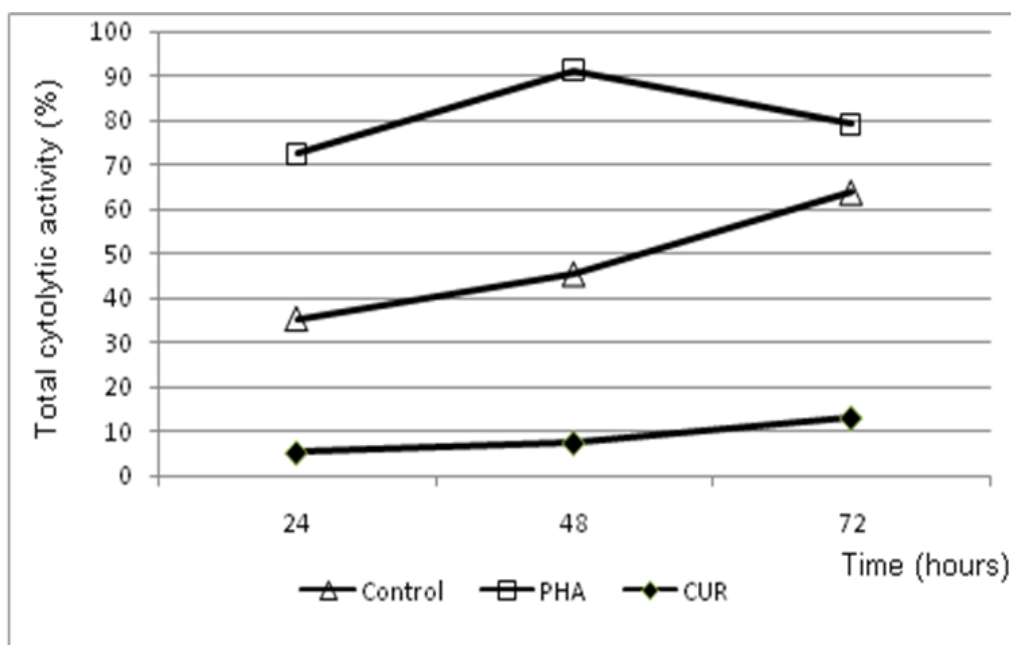
ตารางที่ 1 แสดง NK cell total cytolytic activity test ที่ได้จากการนำ MNC จากอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 10 รายมากระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร Cucurbitacin B หรือสาร PHA เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ก่อนจะนำมาทำปฏิกิริยากับ K562 เพื่อทดสอบ NK cell activity

Herbs	% total cell cytolytic activity at various time (n=10)					
	24 hours		48 hours		72 hours	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
Control	35.432	8.297	45.436	7.648	64.582	11.226
PHA	70.090	9.477	80.728	6.078	79.793	6.004
CUR	9.829	2.676	11.891	2.206	14.753	2.137

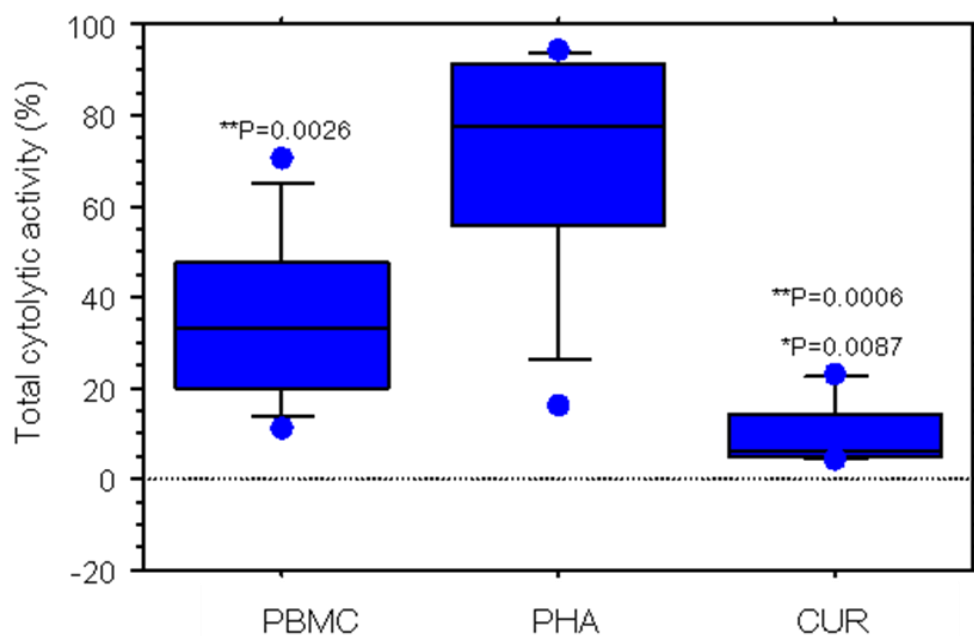
CUR= cucurbitacin B



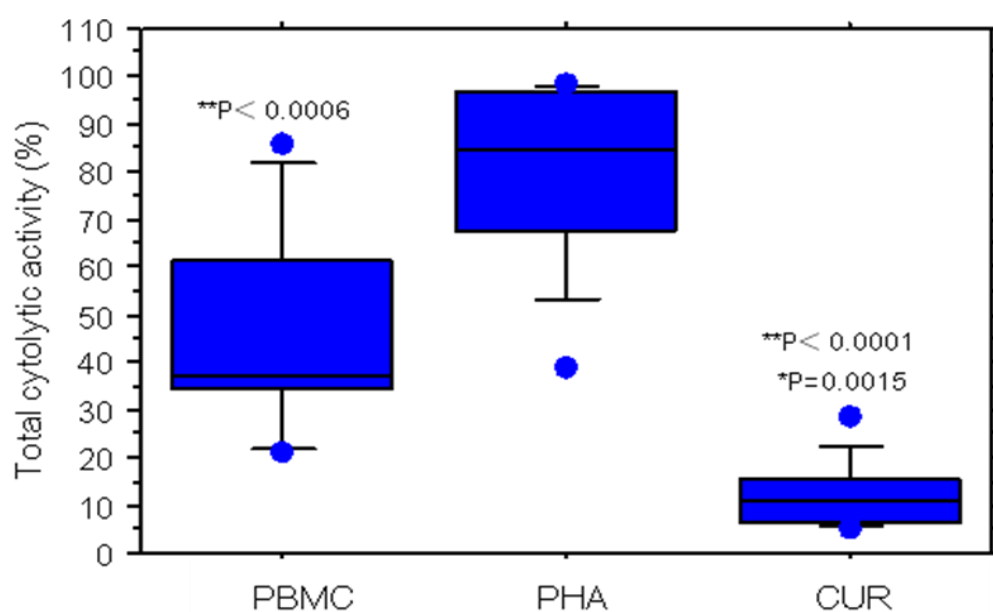
รูปที่ 1 แสดง dot plot analysis จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSCalibur เป็นตัวแทนของ 1 ใน 10 ของอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรงที่ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน แสดงความสามารถของ MNC ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพรชนิดต่างๆ เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ทำปฏิกิริยากับเซลล์ K562 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง 1A-3A แสดง K562 ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงสีเขียว CFSE 2A และ 2B กระตุ้นด้วย PHA, 3A และ 3B กระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร Cucurbitacin B พบว่าสาร Cucurbitacin B ทำให้เซลล์ K562 ตายน้อยกว่า control และ สาร PHA อย่างมีนัยสำคัญ



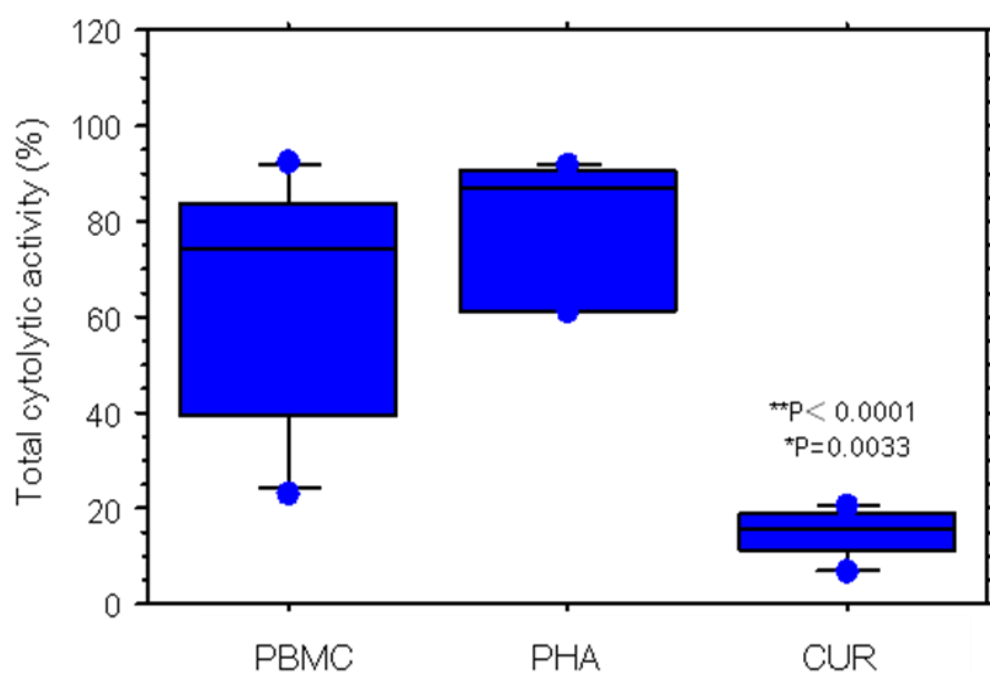
รูปที่ 2. กราฟแสดง NK cell total cytolytic activity test เปรียบเทียบการกระตุ้นด้วยสารต่างๆ เป็นเวลา 24, 48 and 72 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นเซลล์ K562 ถูกทำลายมากขึ้นตามลำดับยกเว้นเมื่อกระตุ้นด้วยสาร PHA ที่ 72 ชั่วโมงจะลดลงเล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 3 แสดง NK cell cytolytic activity ต่อ K562 โดยการนำ MNC จากอาสาสมัครสุขภาพดีมากระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า Total cytolytic activity ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย cucurbitacin B น้อยกว่า control และ PHA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* เปรียบเทียบกับ control, $P = 0.0087$ และ ** เปรียบเทียบกับ PHA $P < 0.0006$ ตามลำดับ



รูปที่ 4 แสดง NK cell cytolytic activity ที่ 48 ชั่วโมง พบว่า Total cytolytic activity ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย cucurbitacin B น้อยกว่า control และ PHA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.0005$, $P < 0.0001$, $P = 0.0120$ ตามลำดับ) (* เปรียบเทียบกับ control, ** เปรียบเทียบกับ PHA, เปรียบเทียบกับ G1b)



รูปที่ 5 แสดง NK cell cytolytic activity ต่อ ที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่า Total cytolytic activity ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย cucurbitacin B น้อยกว่า control และ PHA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* เปรียบเทียบกับ control, $P = 0.0002$ และ ** เปรียบเทียบกับ PHA, $P < 0.000$ ตามลำดับ)

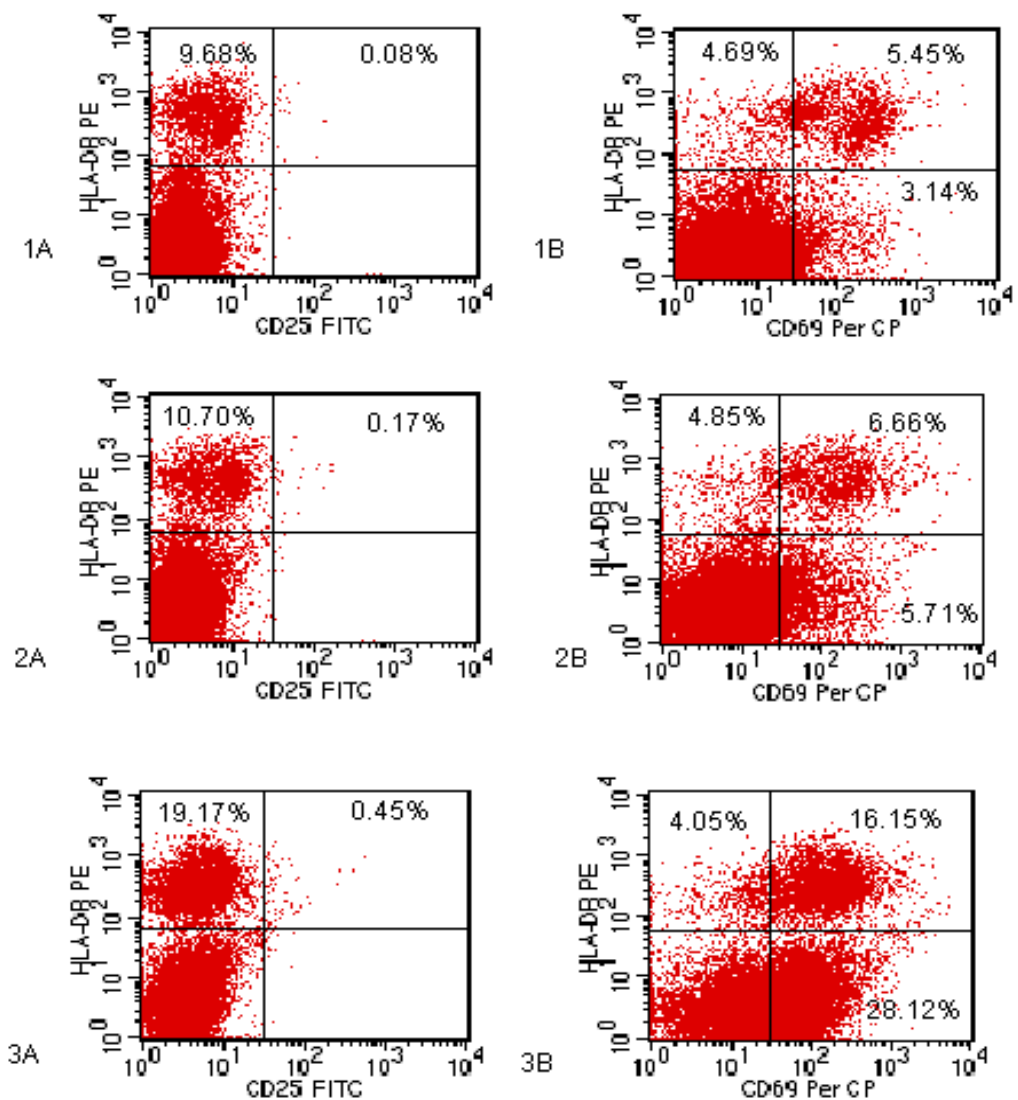
2. Immune activation status

รูปที่ 6 แสดง dot plot analysis จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSCalibur เป็นตัวแทนของ 1 ใน 15 ของอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรงที่ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน MNC ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพรชนิดต่างๆ เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนบนผิวเซลล์ 1A-1B normal control 2A และ 2B กระตุ้นด้วย PHA, และ 3A และ 3B กระตุ้นด้วย Cucurbitacin B พบว่าสาร Cucurbitacin B กระตุ้นทำให้ MNC ของคนปกติสร้าง CD69+ (44.37%) ได้มากกว่า control (8.59%), และ PHA (12.37%)

ตารางที่ 2 และรูปที่ 7 แสดงผล MNC ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร Cucurbitacin B, และ PHA เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง เทียบกับ control พบว่าสาร Cucurbitacin B กระตุ้นทำให้ MNC ของคนปกติสร้าง CD69+ ได้มากกว่า control ค่า $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ของ CD69+ ระหว่าง Cucurbitacin B VS control เท่ากับ 27.89 ± 3.60 VS 13.80 ± 1.75 , $P=0.0005$

รูปที่ 8 และตารางที่ 3 แสดงผล MNC ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร Cucurbitacin B, และ PHA เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เทียบกับ control พบว่าสาร Cucurbitacin B ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้ MNC ของคนปกติสร้าง CD69+ ได้มากกว่า control (16.252 ± 1.712 และ 15.103 ± 1.641 VS 10.345 ± 1.517 , $P<0.0001$, $P=0.0001$ ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่าง 3+CD69+ และ CD3+CD25+ ระหว่าง control และ cucurbitacin B ซึ่งแตกต่างจาก PHA และ PMA ซึ่งเป็น positive control

ตารางที่ 4 แสดงผล MNC ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร Cucurbitacin B, และ PHA เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง เทียบกับ control พบว่าสาร Cucurbitacin B ทำให้ MNC ของคนปกติสร้าง CD8+ ได้น้อยกว่า control ($P=0.0175$) และ PHA ($P=0.0084$) อย่างมีนัยสำคัญ

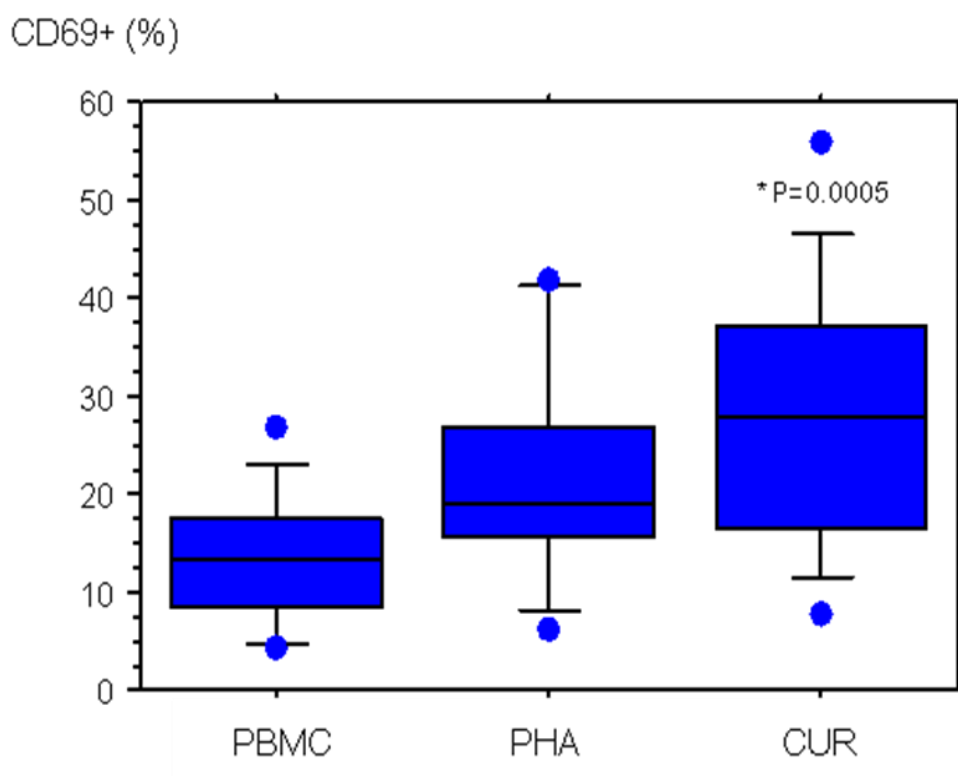


รูปที่ 6 แสดง dot plot analysis จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSCalibur เป็นตัวแทนของ 1 ใน 15 ของอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรงที่ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน MNC ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพรเป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนบนผิวเซลล์ 1A-1B normal control 2A และ 2B กระตุ้นด้วย PHA, 3A และ 3B กระตุ้นด้วย Cucurbitacin B, พบว่าสาร Cucurbitacin B กระตุ้นทำให้ MNC ของคนปกติสร้าง CD69+ ได้มากกว่า control, PHA

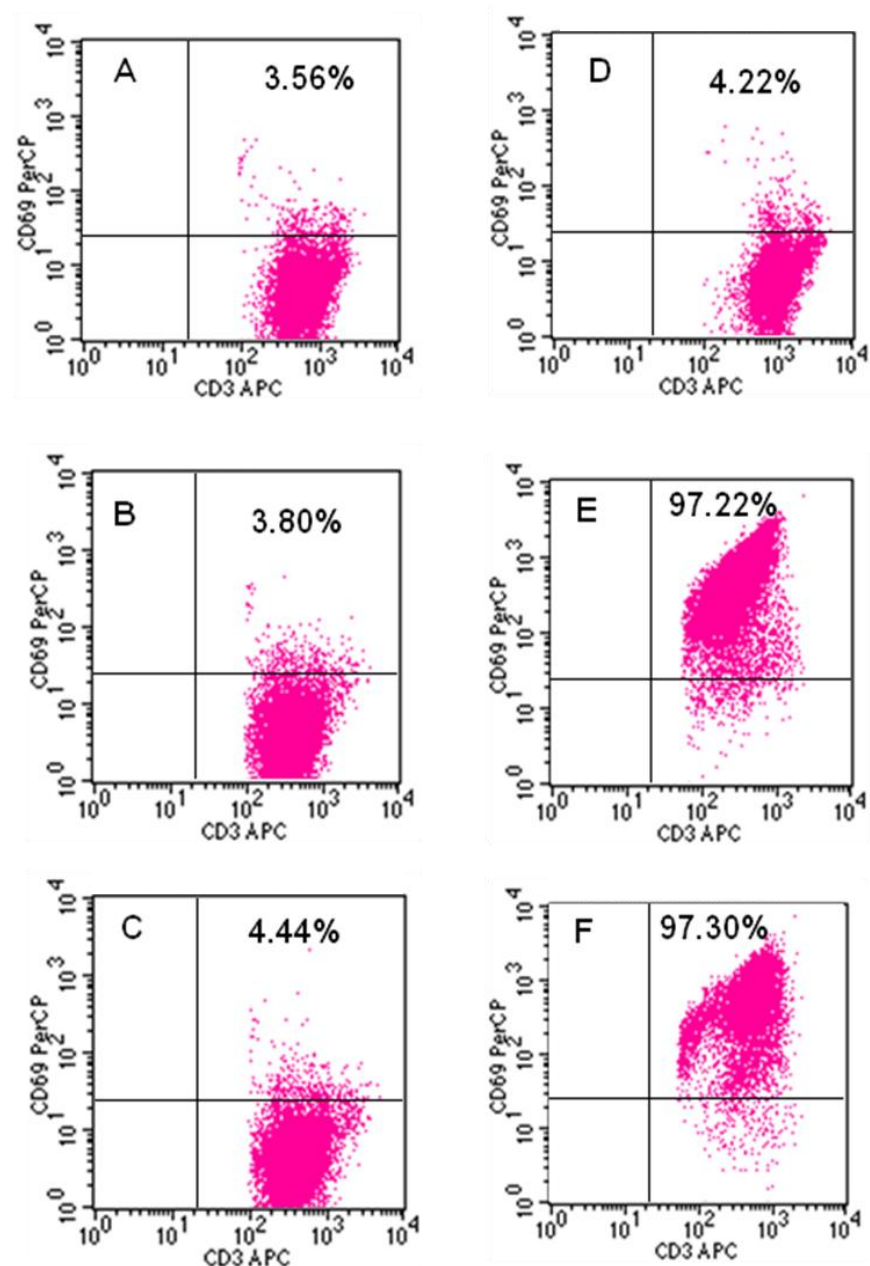
ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ CD69+ ด้วยเครื่อง FACSCalibur ของอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรงจำนวน 15 ราย โดยใช้ MNC ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร Cucurbitacin B และ PHA เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง เทียบกับ control พบว่าสาร Cucurbitacin B กระตุ้นทำให้ MNC ของคนปกติสร้าง CD69+ ได้มากกว่า control อย่างมีนัยสำคัญ

Herb	Percentage of CD69+ cell detection after 4 hours of incubation (Mean $\pm$ SEM)		
	Total CD69+ (n=15)	Total HLA-DR+ (n=10)	CD25+ (n=10)
Control	13.80 $\pm$ 1.75	17.44 $\pm$ 1.60	0.22 $\pm$ 0.07
PHA	21.23 $\pm$ 2.73	15.18 $\pm$ 1.69	0.21 $\pm$ 0.07
CUR	27.89 $\pm$ 3.60 ^a	21.54 $\pm$ 1.85 ^b	0.47 $\pm$ 0.18

^a เทียบกับ control (P=0.0005) และ ^b เทียบกับ PHA (P=0.0205). CUR = cucurbitacin B



รูปที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSCalibur ของอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรง จำนวน 15 รายโดยใช้ MNC ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพรร Cucurbitacin B และ PHA เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง เทียบกับ control พบว่าสาร Cucurbitacin B กระตุ้นทำให้ MNC ของคนปกติสร้าง CD69+ ได้มากกว่า control อย่างมีนัยสำคัญ (*P=0.0005)



รูปที่ 8 แสดง dot plot analysis จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSCalibur เป็นตัวแทนของ 1 ใน 3 ของอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรงที่ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน MNC ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร cucurbitacin B 0.05 (A), 0.25 (B), 0.5 (C) $\mu\text{g/ml}$ และ positive control (PMA+Ionomycin, E), สาร PHA (F) และ negative control (D) เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจวิเคราะห์เซลล์ CD3⁺CD69⁺ พบว่า cucurbitacin B ทั้งสามความเข้มข้น (A-C) ให้ผลไม่แตกต่างจาก normal control (D) ส่วน control positive PMA (E) และสาร PHA (F) ให้ผล CD3⁺CD69⁺ มากกว่า ร้อยละ 95

ตารางที่ 3 แสดงผล CD3+CD69+ ของ MNC จากคนปกติ 3 ราย ที่ถูกกระตุ้นด้วย สารสกัดสมุนไพร Cucurbitacin B ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.25 และ 0.5 $\mu\text{g/ml}$, PHA และ PMA เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เทียบกับ control พบว่า CD3+CD69+ และ CD3+CD25+ ไม่มีความแตกต่างเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย Cucurbitacin B เทียบกับ control แต่เมื่อกระตุ้น ด้วย PHA หรือ PMA จะพบเซลล์ทั้งสองชนิดในปริมาณสูง อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ cucurbitacin B หรือ control ($P<0.0001$ เมื่อเทียบกับ PHA หรือ PMA) และ Cucurbitacin B 0.25 และ 0.5 กระตุ้นให้ MNC ของคนปกติสร้าง CD69+ ได้มากกว่า control $P<0.0001$, $P=0.0001$ ตามลำดับ

	Mean PBMC treated with herbs for 24 hours (n=3)					
	Cur 0.05	Cur0.25	Cur0.5	control	PHA	PMA
CD3+CD69+	5.825	6.272	6.013	6.888	92.297	96.206
SEM	0.796	1.370	1.066	1.152	2.593	0.725
CD3+CD25+	2.415	2.227	2.267	2.690	70.320	78.712
SEM	0.261	0.135	0.123	0.255	7.478	2.416
Total CD69+	11.125	16.252*	15.103**	10.345	74.418	95.738
SEM	1.292	1.712	1.641	1.517	3.036	0.798

* $P<0.0001$, ** $P=0.0001$ เมื่อเทียบกับ control, CUR = cucurbitacin B

ตารางที่ 4 แสดงผล MNC จากคนปกติ 10 ราย ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร Cucurbitacin B, และ PHA เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง เทียบกับ control พบว่าสาร Cucurbitacin B ทำให้ MNC ของคนปกติสร้าง CD8+ ได้น้อยกว่า control ($P=0.0175$) และ PHA ($P=0.0084$) อย่างมีนัยสำคัญ

Herb	Percentage of surface marker after 4 hours of incubation (Mean $\pm$ SEM).				
	CD4+	CD8+	CD14+	CD56+	CD4+/CD8+
Control	39.41 $\pm$ 2.96	30.86 $\pm$ 2.65	8.25 $\pm$ 1.85	29.06 $\pm$ 2.14	1.40 $\pm$ 0.18
PHA	36.56 $\pm$ 3.12	31.98 $\pm$ 2.89	6.18 $\pm$ 1.56	25.00 $\pm$ 3.67	1.37 $\pm$ 0.23
Cur	36.05 $\pm$ 2.17	26.21 $\pm$ 2.22*	10.20 $\pm$ 1.99	34.06 $\pm$ 4.03	1.39 $\pm$ 0.22

*น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ Control ($P=0.0175$) และ PHA ($P=0.0084$)

CUR=cucurbitacin B

3.3 ปริมาณของ cytokine ภายในเซลล์

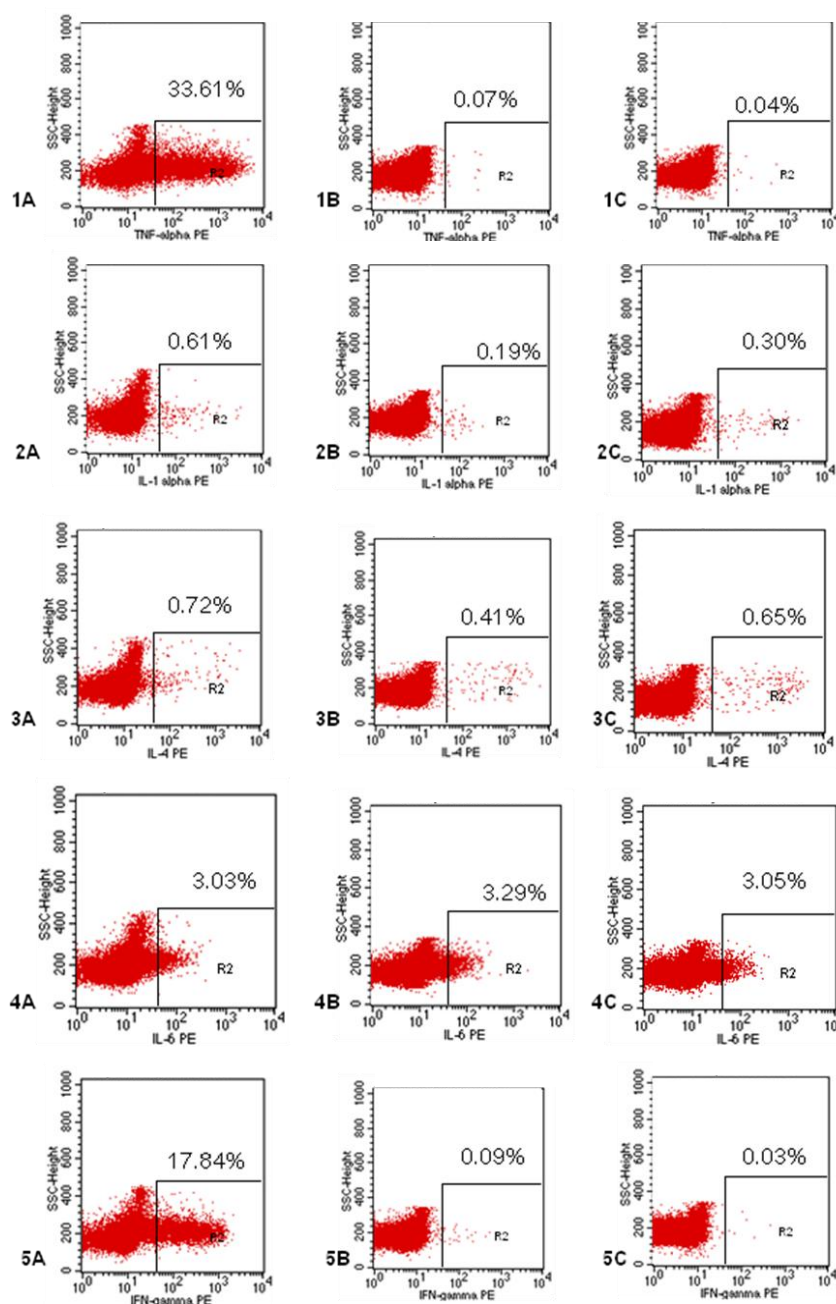
ตารางที่ 5 แสดงปริมาณ intracellular cytokine ที่วัดได้จากเซลล์คนปกติ 10 ราย ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสาร Cucurbitacin B 0.5 μ g/ml เทียบกับ control negative และ control positive (PMA 25 ng/ml ร่วมกับสาร Ionomycin 1 μ g/ml) พบว่าสาร cucurbitacin B ไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ human lymphocyte สร้างสาร cytokine ภายใน 4 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับ positive control

รูปที่ 9-10 แสดง dot plot analysis จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSCalibur เป็นตัวแทนของ 1 ใน 10 ของอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรงที่ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน แสดงความสามารถของ MNC ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร cucurbitacin B เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง เทียบกับ control positive และ negative และทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ cytokine ภายในเซลล์ พบว่า control positive PMA สามารถกระตุ้นการสร้าง cytokine TNF- α และ IFN- γ ภายในเซลล์ได้ในเวลา 4 ชั่วโมงแต่ cucurbitacin B ไม่มีการสร้าง cytokine ดังกล่าว

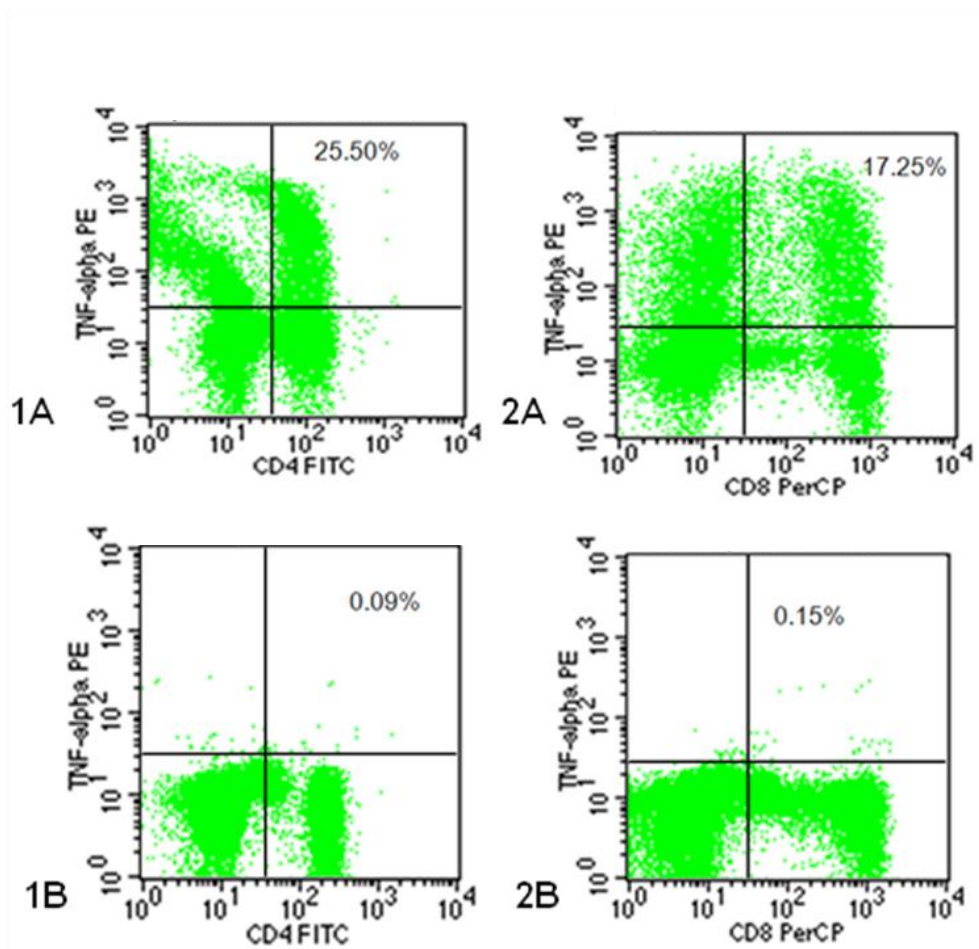
ตารางที่ 5 แสดงปริมาณ intracellular cytokine ที่วัดได้จากเซลล์คนปกติ 10 ราย ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสาร cucurbitacin B 0.5 $\mu\text{g/ml}$ เทียบกับ control negative และ control positive (PMA 25 ng/ml ร่วมกับสาร ionomycin 1 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสาร cucurbitacin B ไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ human lymphocyte สร้างสาร cytokine ภายใน 4 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับ positive control

Herb	Intracellular cytokine production (Mean $\pm$ SEM).				
	TNF- α	IL-1 α	IL-4	IL-6	IFN- γ
PMA	16.48 $\pm$ 4.00	0.32 $\pm$ 0.14	1.15 $\pm$ 0.20	1.54 $\pm$ 1.11	13.98 $\pm$ 3.16
PBMC	0.32 $\pm$ 0.12	0.39 $\pm$ 0.29	1.18 $\pm$ 0.29	1.15 $\pm$ 0.61	0.37 $\pm$ 0.12
CUR	0.20 $\pm$ 0.07	0.52 $\pm$ 0.24	0.64 $\pm$ 0.23	1.14 $\pm$ 0.68	0.31 $\pm$ 0.11

CUR=cucurbitacin B



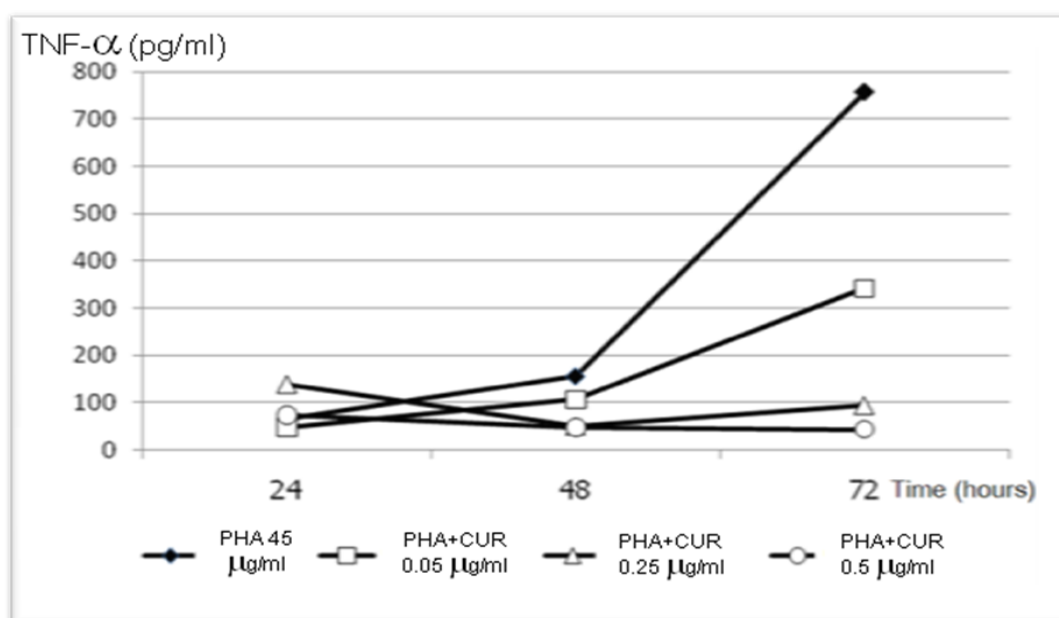
รูปที่ 9 แสดงปริมาณ cytokine ภายในเซลล์ที่ตรวจพบจาก MNC ของคนปกติ 1 รายจาก 10 รายที่มีผลไปในทิศทางเดียวกัน เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดบวม Cucurbitacin B เทียบกับ control negative และ positive (PMA+ Ionomycin) พบว่า Cucurbitacin B ไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ human lymphocyte สร้าง cytokine ขึ้นภายในเซลล์ในระยะเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับ control positive (1A-5A คือ control positive, PMA, 1B-5B คือ Cucurbitacin B และ 1C-5C คือ control negative, 1(A-C)=TNF- α , 2(A-C)=IL-1 α , 3(A-C)= IL-4, 4(A-C)= IL-6 และ 5(A-C)= IFN- γ)



รูปที่ 10 แสดงปริมาณ TNF- α ภายในเซลล์ CD4⁺ และ CD8⁺ ของคนปกติ 1 ใน 10 ราย ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดบวบขม Cucurbitacin B เทียบกับ control positive (PMA+ Ionomycin) พบว่า Cucurbitacin B ไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ CD4⁺ หรือ CD8⁺ สร้าง cytokine ขึ้นภายในเซลล์ในระยะเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับ control positive PMA (1A และ 1B แสดงปริมาณ TNF- α ภายในเซลล์ CD4⁺ และ CD8⁺ ภายหลังกระตุ้นด้วย PMA, 2A และ 2B แสดงปริมาณ TNF- α ภายในเซลล์ CD4⁺ และ CD8⁺ ภายหลังกระตุ้นด้วย Cucurbitacin B)

3.4 ผลปริมาณ TNF- α ในอาหารเลี้ยงเซลล์

ปริมาณ TNF- α ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA เมื่อเพาะเลี้ยง MNC ของคนปกติ 1 ราย ในอาหารที่มี PHA 45 $\mu\text{g/ml}$ อย่างเดียวหรือร่วมกับสาร Cucurbitacin B ในปริมาณ 0.05, 0.25 และ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง สาร Cucurbitacin B สามารถทำให้ปริมาณการหลั่ง TNF- α ลดลงตามปริมาณ Cucurbitacin B ที่เพิ่มขึ้น แสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 แสดงปริมาณ TNF- α ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA เมื่อเพาะเลี้ยง MNC ของคนปกติ 1 ราย ในอาหารที่มี PHA 45 $\mu\text{g/ml}$ อย่างเดียวหรือร่วมกับสาร Cucurbitacin B ในปริมาณ 0.05, 0.25 และ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง สาร Cucurbitacin B สามารถทำให้ปริมาณการหลั่ง TNF- α ลดลงตามปริมาณ Cucurbitacin B ที่เพิ่มขึ้น

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษานี้พบว่า CD3+CD69+ และการสร้าง intracellular cytokine ได้แก่ TNF- α , IL1- α , IL-4, IL-6 และ IFN- γ ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการกระตุ้นด้วย Cucurbitacin B และ control negative แสดงว่า Cucurbitacin B ไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ lymphocyte สร้าง TNF- α , IL1- α , IL-4, IL-6 และ IFN- γ เพิ่มขึ้นภายในเซลล์ แต่พบว่า Cucurbitacin B มีผลทำให้ปริมาณ CD69+ และ CD8+ เซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่า Cucurbitacin B สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ PHA ที่กระทำต่อเซลล์ lymphocyte จึงทำให้เซลล์ lymphocyte หลัง TNF- α ได้ลดลงเมื่อเทียบกับการกระตุ้นด้วย PHA เพียงอย่างเดียว และเมื่อเพิ่มปริมาณ Cucurbitacin B จะทำให้การหลัง TNF- α ลดลงตามปริมาณ Cucurbitacin B ที่เพิ่มขึ้นด้วย กลไกการยับยั้งการการหลัง TNF- α ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าการทำ CTL function assay โดยการวัดว่าเซลล์ lymphocyte ของคนปกติสามารถฆ่าเซลล์ K562 แล้วทำให้เกิด cytolytic ซึ่งสามารถวัดเป็น % apoptosis ของเซลล์ K562 ที่เกิดขึ้นด้วย Flow-cytometry นั้นเป็นการวัดการทำงานของเซลล์ cytotoxic T cell หรือ NK cell ตัวใดตัวหนึ่งหรือทั้งสองเซลล์ จากผลการทดลองพบว่าสาร Cucurbitacin B สามารถทำให้ lymphocyte ของคนปกติมี CTL function ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว หรือ control positive ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร PHA แสดงว่า Cucurbitacin B สามารถยับยั้งการทำงานของเซลล์ cytotoxic T cell หรือ NK cell ตัวใดตัวหนึ่งหรือทั้งสองเซลล์ มีรายงานว่า cucurbitacin สามารถออกฤทธิ์เป็น inhibitor ของ STAT3 ซึ่งเป็น signal transducer และเป็น transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นเซลล์ด้วย growth factors และ cytokines ต่างๆ⁹ โดยเฉพาะในส่วนของระบบภูมิคุ้มกันแล้ว STAT3 อยู่ใน pathway ของการกระตุ้นเซลล์ด้วย Interleukin-6 (IL-6) ซึ่งเป็น cytokine สำคัญที่สร้างจาก T cell และ macrophage และทำหน้าที่ใน B cell differentiation และใน acute phase response โดยเป็น proinflammatory cytokine ที่สำคัญชนิดหนึ่งที่กระตุ้นให้มีการสร้าง c-reactive protein, ทำให้เกิดกระบวนการการอักเสบ, และกระตุ้นการทำงานของ NK cell นอกจากนี้ IL-6 อาจมีบทบาทในการก่อโรค inflammatory bowel disease¹⁰ ดังนั้นสาร Cucurbitacin B ซึ่งจัดเป็นสารตัวหนึ่งในกลุ่มของ Cucurbitacin^{22,23} อาจจะออกฤทธิ์เป็น inhibitor ของ STAT3 ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ NK cell จึงทำให้มี CTL function ลดลง ซึ่งการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ Cucurbitacin B ต่อ STAT3 ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

โดยสรุปพบว่าสาร cucurbitacin B เป็นสารที่สกัดจากบวมขม *Trichosanthes cucumerina* L., ซึ่งมีอยู่ในธรรมชาติ สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ PHA ต่อการหลั่ง TNF- α ของ lymphocyte และมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะการทำงานของ NK cell จึงมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นยาที่ออกฤทธิ์เป็น immune modulator ซึ่งอาจมีประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน

References:

1. เต็ม สมิตินันท์ ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ: บริษัทประชาชน จำกัด 2544 หน้า 533
2. วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุลและคณะ สมุนไพรพื้นบ้านล้านนา ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ม.มหิดล
3. เสี่ยม พงษ์บุรอรอด ไม้เทศเมืองไทย กรุงเทพฯ: เกษมบรรณกิจ 2522
4. Jiratchariyakul W, Frahm AW. Cucurbitacin B and Dihydrocucurbitacin B from *Trichosanthes cucumerina* L. J Pharm Sci Mahidol Univ.Vol. 19 Jan-Dec 1992.
5. McMakin PD. A field guide to the flowering plants of Thailand. White Lotus Co.Ltd., Bangkok, Thailand:1988
6. Jiratchariyakul W, Moongkarndi P, Theppland K, et al. Cytotoxic principles from *Trichosanthes cucumerina* L. Thai J Phytopharm 1999;Vol6(2).
7. Tiangda C, Silpa-Archa W, Wiwat C, Picha P. Chemical composition, acute toxicity and pharmacological screening of *Trichosanthes cucumerina* L. Asian J Pharm Suppl 6(8)1986.
8. Khananthai W, Buddhasak D, Smitasiri Y. Effects of some medicinal plant leaves extracts on reproductive system and the reproduction of mice. In:Proceeding of the 30th conference organized by Kasetsart University Bangkok, 29 Jan-1 Feb: 1992,565.
9. Aggarwal BB, Sethi G, Ahn KS, Sandur SK, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Ichikawa H. Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution. Ann N Y Acad Sci. 2006;1091:151-69.
10. Mitsuyama K, Sata M, Rose-John S. Interleukin-6 trans-signaling in inflammatory bowel disease. Cytokine Growth Factor Rev. 2006 ;17(6): 451-61.

11. Nefedova Y, Nagaraj S, Rosenbauer A, Muro-Cacho C, Sebt SM, Gabrilovich DI. Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic- selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res.* 2005 ;65(20): 9525-35.
12. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994; 171: 131-137.
13. Marim L, Minguela A, Torio A, Moya-Quiles MR, Muro M, Montes-Ares O, et al. Flow cytometry quantificatio of apoptosis and proliferation in Mixed lymphocyte culture. *Cytometry* 2003; Part A 51A: 107-118.
14. Kasatori N, Ishikawa F, Ueyama M, et al. A differential assay of NK-cell-mediated cytotoxicity in K562 cells revealing three sequential membrane impairment steps using three-color flow-cytometry. *J Immunol Methods* 2005;307:41-53.
15. Derby E, Reddy V, Kopp W, et al. Three color flow cytometric assay for the study of the mechanisms of cell mediated cytotoxicity. *Immunolo Lett* 2001;78:35-9.
16. Pattanapanyasat K, Kyle ED, Tongtawe P, Yongvanitchit K, Fucharoen S. Flow cytometric immunophenotyping of lymphocyte subsets in sample that contain a high proportion of non-lymphoid cells. *Cytometry* 1994; 18: 1-10.
17. Baran J, Kowalczyk, Ozog M, Zembala. Three color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 303-313.
18. Sewell WAC, North ME, Webster ADB, Farrant J. Determination of intracellular cytokines by flow-cytometry following whole-blood culture. *J Immunol Methods.* 1997;209: 67.
19. Schuerwegh AJ, Sevens WJ, Bridts CH, Clerck LSD. Evaluation of monensin and brefeldin A for flow determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in monocyte. *Cytometry* 200; 46: 172.
20. Onlamoon N, Pattanapanyasat K, Ansari A. Imparoed IFN- γ production by viral immunodominant peptide-specific tetramer+ CD8+ T cells in HIV-1

infected patients is not secondary to HAART. Clinical Developmental Immunology, 2004; 11: 287-298.

21. McNerlan SE, Rea IM, Alexander HD. A whole blood method for measurement of intracellular TNF- α , IFN- γ and IL-2 expression in stimulated CD3⁺ lymphocytes: differences between young and elderly subjects. Experimental Gerontology 2002; 37: 227-234.
22. Kongtun S, Jiratchariyakul W, Kummalue T, Tan-ariya P, Kunnachak S, Frahm AW. Cytotoxic properties of root extract and fruit juice of *Trichosanthes cucumerina*. Planta Med. 2009 Jun;75(8):839-42. Epub 2009 Mar 13.
23. Wakimoto N, Yin D, O'Kelly J, Haritunian T, Karlan B, Said J, Xing H and Koeffler HP. Cucurbitacin B has a potent antiproliferative effect on breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Cancer Sci 2008; 99: 1793–1797.

Output

Poster presentation

1. Yaowalak U-pratya¹, Lueangamornnara U¹, Weena Jiratchariyakul², Tanawan Kummalue³. Immunological activity of cucurbitacin B on human lymphocyte. งานประชุมวิชาการร่วมระหว่าง คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลและคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2552 ในระหว่างวันที่ 22-24 มิถุนายน 2552 ณ โรงแรม เซ็นทารา แกรนด์ แอนด์ บางกอก คอนเวนชัน เซ็นเตอร์

ภาคผนวก

รายชื่อผู้ร่วมวิจัย

1. รศ.พญ. ธนวรรณ กุมมาลือ
ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล
2. นางเยาวลักษณ์ อยู่ปรีชา
สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราช
พยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
3. รศ.ดร. วิณา จิรัจฉิยากุล
ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล