ฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของสิ่งสกัดจากชะเอมเหนือ

นางสาว ทัศนีย์ วงศ์นาม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552

5087140020

INHIBITORY EFFECT ON LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED MACROPHAGE ACTIVATION OF AN EXTRACT FROM *DERRIS RETICULATA*

MISS THASSANEE VONGNAM

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

522338

Thesis Title	INHIBITORY EFFECT ON LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED MACROPHAGE ACTIVATION OF AN EXTRACT FROM *DERRIS RETICULATA*
By	Miss Thassanee Vongnam
Field of Study	Pharmacology
Thesis Advisor	Associate Professor Supeecha Wittayalertpanya
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi, 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
(Associate Professor Pornpote Piumsomboon, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Assistant Professor Wacharee Limpanasithikul, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Supeecha Wittayalertpanya)

..... Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi, Ph.D.)

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

..... External Examiner
(Assistant Professor Pathama Leewanich, Ph.D.)

ทัศนีย์ วงศ์นาม : ฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของสิ่งสกัดจากชะเอมเหนือ (INHIBITORY EFFECT ON LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED MACROPHAGE ACTIVATION OF AN EXTRACT FROM *DERRIS RETICULATA*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. สุพีชา วิทยเลิศปัญญา, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ดร. นิจศิริ เรืองรังษี, 73 หน้า.

Derris reticulata Craib เป็นสมุนไพรไทยอยู่ในวงศ์ Leguminosae ที่มีสรรพคุณช่วยแก้กระหายน้ำและขับเสมหะ เป็นพืชที่มีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกับพืชชนิดอื่นในสกุล *Derris* ซึ่งสารฟลาโวนอยด์หลายตัวพบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกัดเอทานอลจากลำต้น *D. reticulata* ต่อเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) โดยใช้เซลล์แมคโครฟาจ J774A.1 จากหนู เมื่อเซลล์ได้รับสิ่งสกัดที่ความเข้มข้น 6.25-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 24 ชม.ตามด้วยการกระตุ้นด้วย LPS นาน 24 ชม. พบว่าสิ่งสกัดเอทานอลจากลำต้น *D. reticulata* ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ J774A.1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ตามความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ใช้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 62.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สิ่งสกัดที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยับยั้งความสามารถของเซลล์ J774A.1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในการจับกิน zymosan ได้ตามความเข้มข้นของสาร สิ่งสกัดยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA ของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ที่ทำหน้าที่สร้างไนตริกออกไซด์และยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA ของเอนไซม์ cyclo-oxygenase 2 (COX-2) ที่จำเป็นในการสร้างสารโพรสตาแกลนดินในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้น สิ่งสกัดยังยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA ของไซโตคายน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้แก่ TNF-α, IL-1β and IL-6 ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้น

การศึกษานี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่า สิ่งสกัดเอทานอลจากลำต้น *D. reticulata* มีแนวโน้มว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ สิ่งสกัดยับยั้งการสร้างสารหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบที่หลั่งจากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้น ข้อมูลจากการศึกษานี้อาจเป็นประโยชน์ในการพัฒนาพืชชนิดนี้หรือสารที่ได้จากพืชนี้ไปพัฒนาเพื่อรักษาการอักเสบได้ในอนาคต

สาขาวิชา เภสัชวิทยา ลายมือชื่อนิสิต ทัศนีย์ วงศ์นาม

ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5087140020 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS : MACROPHAGE/ ANTI-INFLAMMATION/ *DERRIS RETICULATA*

THASSANEE VONGNAM: INHIBITORY EFFECT ON LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED MACROPHAGE ACTIVATION OF AN EXTRACT FROM *DERRIS RETICULATA*. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF. SUPEECHA WITTAYALERPANYA., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC.PROF. NIJSIRI RAUNGRUNGSIR,Ph.D., 73 pp.

Derris reticulata Craib is a Thai medicinal plant in the Leguminosae family. This plant has been used as expectorant and thirst relief. It has flavonoids as major active compounds similar to other plants in genus *Derris*. Several flavonoids have been identified to have anti-inflammatory activities. This study intended to investigate the effect of ethanolic extract from stem of *D. reticulata* on LPS-induced macrophage activation. Murine macrophage, J774A.1 cells, were treated with 6.25-100 µg/ml the extract for 24 h and then stimulated with 100 ng/ml lipopolysaccharide (LPS) for 24 h. The extract inhibited nitric oxide production in LPS-activated J774A.1 cells in concentration-dependent manner with IC_{50} 62.5 µg/ml. The effect of this extract on phagocytosis activity of LPS-activated J774A.1 cells was also investigated. The extract at the concentrations of 50 and 100 µg/ml significantly inhibited zymosan phagocytosis of LPS-activated cells in a concentration dependent manner. It decreased the mRNA expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) which plays role in NO production and the cyclo-oxygenase 2 (COX-2) which is responsible for prostaglandins (PGs) production in LPS-activated J774A.1 cells. This extract also inhibited the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines, TNF-α, IL-1β and IL-6 in the LPS-activated J774A.1 cells.

The results in this study reveal for the first time that the ethanolic extract of *D. reticulata stem* has potential anti-inflammatory activity. It inhibited production of several known inflammatory mediators in LPS-activated macrophages. These findings may be a useful information for developing this plant or it constituents to treat inflammation in the future.

Field of Study : Pharmacology Student's Signature Thassanee Vongnam

Academic Year : 2009 Advisor's Signature Supeecha Wittayalerpanya

Co-Advisor's Signature Nijsiri Raungrungsir

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Supeecha Wittayalertpanya, Department of pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her encouraging guidance, valuable advices, helpfulness, understanding, suggestions, support and kindness.

I would like to express my appreciation and grateful thanks to my co-advisor, Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi, Ph.D. Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his valuable suggestions and providing the fraction of *Derris reticulata* extract.

I would also express my sincere appreciation to the committee of this thesis examination Assistant Professor Wacharee Limpanasithikul, Ph.D., Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. Assistant Professor Dr. Naowarat Suthamnatpong, Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Science Chulalongkorn University and Assistant Professor Pathama Leewanich, Ph.D, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakarinwirot University for their constructive comments and suggestions.

I would like to give the special thanks to Assistant Professor Wacharee Limpanasithikul, Ph.D., whose suggestions and openmindeness to discuss anything during the working process, which enable me to accomplish this thesis.

I would like to thank Miss Pathama Somsil and Miss Suchintana Chumseng for their always help and also thank to all members of the Department of Pharmacology, Faculty of medicine, Chulalongkorn University for their help.

Special thanks are extended to the support and grants from the Graduate School, Chulalongkorn University.

Finally, I would like to eternally thank to my family for their encouragement, love and caring which make everything possible.

CONTENTS

Page

Abstract (Thai)..... iv

Abstract (English)..... v

Acknowledgements..... vi

Contents..... vii

List of Tables..... ix

List of Figures..... x

List of Abbreviations..... xii

Chapter

I Introduction..... 1

Background and Rationale..... 1

Objective..... 3

Hypothesis..... 3

Keywords..... 3

II Literature Reviews..... 4

Macrophages..... 4

Recognition of microbe by macrophages..... 5

Macrophage activation..... 7

LPS-activated macrophages..... 8

Phagocytosis..... 9

Pro-inflammatory cytokine..... 13

Nitric oxide..... 15

Prostaglandins..... 16

Inflammation..... 17

Anti-Inflammatory drugs..... 18

Chapter Page

Derris reticulata Craib..... 21

III Materials and Methods..... 23

Materials..... 23

Plant extract..... 23

Cell culture..... 23

Equipments and Instruments..... 23

Chemicals and reagents..... 24

Methods..... 24

Determination of nitric oxide production..... 24

Determination of cell viability activity..... 25

Determination of phagocytic activity 25

Determination of mRNA expression of cytokine, iNOS and COX-2..... 26

Statistical analysis..... 28

IV Results..... 29

V Discussion and Conclusion..... 43

References..... 47

Appendices..... 54

Appendix A..... 54

Appendix B..... 57

Biography..... 73

LIST OF TABLES

Table Page

1. Systemic and local side effect of steroids..... 20
2. Data of standard calibration curve of nitrite by Griess reaction..... 57
3. Data of nitrite concentrations in experiment of..... 59
4. Data of the effect on phagocytosis activity of the ethanol extract..... 60
5. Data of the effect on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokine..... 67
6. Data of the effect on the mRNA expression of iNOS and COX-2..... 72

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Maturation of mononuclear phagocyte..... 5
2. Receptor for recognition of macrophages..... 6
3. Structure of *Escherichia coli* cell envelope..... 9
4. Receptor and signaling interactions during phagocytosis of microbe..... 10
5. The process of phagocytosis and internalization of microbe..... 11
6. Overproduction of IL-6..... 14
7. Effect of nitric produced 16
8. Anti-inflammatory mechanism of steroids and NSAIDs drugs..... 19
9. *D. reticulata* Craib..... 22
10. The inhibitory effect of *D. reticulata* extract on NO production..... 30
11. Determination of the IC_{50} value 31
12. The effect of the ethanol extract on J774A.1 cell viability..... 32
13. Effect of the ethanol extract on phagocytic activity 34
14. Effect of *D. reticulata* ethanol extract on the mRNA expression of..... 36
    TNF-α.....
15. Effect of *D. reticulata* ethanol extract on the mRNA expression of..... 37
    IL-1.....
16. Effect of *D. reticulata* ethanol extract on the mRNA expression of..... 38
    IL-6.....
17. Effect of *D. reticulata* ethanol extract on the mRNA expression of..... 40
    iNOS.....
18. Effect of *D. reticulata* ethanol extract on the mRNA expression of..... 42
    COX-2.....
19. Two-dimensional thin layer chromatogram in..... 54
    Toluene-Acetone-dichloromethane.....

Figure Page

20. Two-dimensional thin layer chromatrogram in 55
Chloroform-Acetone and Toluene-ethyl acetate.....
21. Two-dimensional thin layer chromatrogram in 56
n-Hexane-Ethyl acetate and Petroleum Ethyl acetate.....
22. Standard nitrite calibration curve by Griess reaction..... 58
23. Effect of *D. reticulata* ethanol extract on the mRNA expression..... 61
of TNF-α.....(N1,N2).....
24. Effect of *D. reticulata* ethanol extract on the mRNA expression..... 62
of TNF-α.....(N3).....
25. Effect of *D. reticulata* ethanol extract on the mRNA expression..... 63
of IL-1.....(N1,N2).....
26. Effect of *D. reticulata* ethanol extract on the mRNA expression..... 64
of IL-1.....(N3).....
27. Effect of *D. reticulata* ethanol extract on the mRNA expression..... 65
of IL-6.....(N1,N2).....
28. Effect of *D. reticulata* ethanol extract on the mRNA expression..... 66
of IL-6.....(N3).....
29. Effect of *D. reticulata* ethanol extract on the mRNA expression..... 68
of iNOS.....(N1,N2).....
30. Effect of *D. reticulata* ethanol extract on the mRNA expression..... 69
of iNOS.....(N3).....
31. Effect of *D. reticulata* ethanol extract on the mRNA expression..... 70
of COX-2.....(N1,N2).....
32. Effect of *D. reticulata* ethanol extract on the mRNA expression..... 71
of COX-2.....(N3).....

LIST OF ABBREVIATIONS

CO_2	carbondioxide
^{o}C	Degree Celsius
DEX	Dexamethasone
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMSO	Dimethylsulfoxide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS	fetal bovine serum
h	hour
IL	interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IC_{50}	the half maximal inhibitory concentration
KOH	potassium hydroxide
LPS	lipopolysaccharide
MHC	major histocompalibity complex
MeOH	methanol
ml	milliliter
min	minute
mRNA	messenger ribonucleic acid
NO	nitric oxide
NBT	nitroblue tetrazolium
OD	optical density
pH	the negative logarithm of hydrogen ion concentration
PBS	phosphate buffered saline
S.E.	standard error
SPSS	statistical package for social science
TNF-α	tumor necrosis factor-alpha

µg/ml	microgram per milliliter
µl	microliter
µM	micromolar
CO_2	carbondioxide