

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E47368

EFFECT OF PHYTOCHEMICALS ON HUMAN INTERLEUKIN-1 β , TUMOR
NECROSIS FACTOR- α , AND INTERLEUKIN-2 RELEASE FROM
INFLUENZA TYPE A H1N1 INDUCED PERIPHERAL
BLOOD MONONUCLEAR CELLS

KANDA FANHCHAKSAI

MASTER OF SCIENCE

IN BIOCHEMISTRY

THE GRADUATE SCHOOL

CHIAO MAI UNIVERSITY

AUGUST 2010



E47368

**EFFECT OF PHYTOCHEMICALS ON HUMAN INTERLEUKIN-1 β , TUMOR
NECROSIS FACTOR- α , AND INTERLEUKIN-2 RELEASE FROM
INFLUENZA TYPE A H1N1 INDUCED PERIPHERAL
BLOOD MONONUCLEAR CELLS**

KANDA FANHCHAKSAI

**A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
IN BIOCHEMISTRY**



**THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY**


AUGUST 2010

**EFFECT OF PHYTOCHEMICALS ON HUMAN INTERLEUKIN-1 β , TUMOR
NECROSIS FACTOR- α , AND INTERLEUKIN-2 RELEASE FROM
INFLUENZA TYPE A H1N1 INDUCED PERIPHERAL
BLOOD MONONUCLEAR CELLS**

KANDA FANHCHAKSAI

**THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOCHEMISTRY**

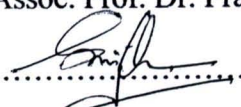
EXAMINING COMMITTEE

.....CHAIRPERSON


Assoc. Prof. Dr. Ampai Panthong

.....MEMBER

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert

.....MEMBER

Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ongchai


.....MEMBER

Dr. Peraphan Pothacharoen

.....MEMBER

Dr. Waraporn Kasekarn

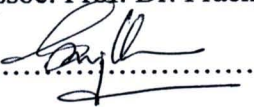
THESIS ADVISORY COMMITTEE

.....ADVISOR

Dr. Peraphan Pothacharoen

.....CO-ADVISOR

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert

.....CO-ADVISOR

Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ongchai

20 AUGUST 2010

© Copyright by Chiang Mai University

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express the graduate and deepest appreciation to Dr. Peraphan Pothacharoen, thesis advisor, Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert and Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ongchai, thesis co-advisor, for their precious guidance, unforgettable support, excellent encouragement and contribution which throughout study are worthy of grateful acknowledge.

I would like to thank Prof. Dr. Yong Poovorawan for provide influenza type A H1N1 and embryonated eggs

I also wish to express my great appreciation to Mr. Kanchanok Kodchakorn, Mr. Chatchai Mangkaew, Mr. Akanit Itthiarbha, Ms. Kanyamas Choocheep, Ms. Tanyaluck Phitak, Mr. Teerawut Chanmee, Ms. Nawarat Viriyakhasek, Ms. Orawan Vanajivin, and all my friends for their excellent training and expertise which helped me so much to make this work possible.

I also would like to acknowledge the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University and Thailand Excellence Center for Tissue Engineering and Stem Cells for facilities of doing research and financial support.

Finally, I would like to thank my parents for their love and the great support throughout my educational life.

Kanda Fanhchaksai

Thesis Title Effect of Phytochemicals on Human Interleukin-1 β , Tumor Necrosis Factor- α 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

E47368

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 β , TNF- α 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 β and TNF- α 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 β , TNF- α 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 β and TNF- α level and increase IL-2 level in dose dependent manner. RNA was extracted, conversed 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 β and TNF- α 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.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ของสารพฤษเคมีต่อการหลั่งของอินเตอร์ลิวคิน-วันบีตา ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา และอินเตอร์ลิวคิน-ทู จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียร์เดี่ยวจากเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สายพันธุ์เอชเอ็นวีเอชวันเอ็นวัน

ผู้เขียน นางสาวกานดา ฝั้นจักสาย

ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร. พิศพรณ โปธาเจริญ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ.ดร. ปรัชญา กงทวีเลิศ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ.ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

E47368

อุบัติการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สายพันธุ์เอชเอ็นวีเอชวันเอ็นวัน เป็นภัยคุกคามต่อสุขภาพเกือบทั่วภูมิภาคของโลก เมื่อเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สายพันธุ์เอชเอ็นวีเอชวันเข้าสู่ร่างกายมนุษย์แล้วสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินหายใจ ส่งผลให้ระบบทางเดินหายใจล้มเหลวจนเสียชีวิตในที่สุด พบว่าขณะที่เชื้อไวรัสแบ่งตัวเพิ่มจำนวนนั้นเป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบมากโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวผลิตสารก่ออักเสบมากเกินไปหรือเรียกว่าพายุไซโตไคน์ โดยเฉพาะอินเตอร์ลิวคิน-วันบีตา (IL-1 β) และทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา (TNF- α) รวมทั้งสารอื่นๆ ที่หลั่งจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้เซลล์ T-lymphocytes ยังสร้างอินเตอร์ลิวคิน-ทู (IL-2) เพื่อส่งสัญญาณไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้พร้อมต่อสู้กับเชื้อไวรัส ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสารพฤษเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งพายุไซโตไคน์ซึ่งสามารถลดระดับ IL-1 β และ TNF- α รวมทั้งมีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยสามารถเพิ่มระดับ IL-2 ที่หลั่งจากการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยเชื้อไวรัสเอชวันเอ็นวัน

E47368

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 β และ TNF- α นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มระดับของ IL-2 โดยแปรผันตรงตามระดับของความเข้มข้น ทำการสกัด RNA จากเซลล์ที่ทดสอบจากนั้นเปลี่ยนเป็น cDNA เพื่อศึกษาการแสดงออกในระดับยีน ผลการศึกษาพบว่าระดับการแสดงออกของยีน IL-1 β และ TNF- α ลดลง และมีการแสดงออกของยีน IL-2 ที่เพิ่มขึ้นแปรผันตรงตามความเข้มข้นของสารสกัดแซนโทนจากมังคุด สารสกัดเซซามินจากงา และสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับสารควบคุม

ผลการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า สารสกัดแซนโทนจากมังคุด สารสกัดเซซามินจากงา และสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร มีผลยับยั้งยับยั้งพายุไซโตไคน์และสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ ดังนั้นสารสกัดดังกล่าวจึงมีประโยชน์ในการนำไปใช้เพื่อป้องกันและรักษาการอักเสบที่มีผลจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

TABLE OF CONTENT

	Page
ACKNOWLEDGEMENT	iii
ENGLISH ABSTRACT	iv
THAI ABSTRACT	vi
LIST OF TABLES	xii
LIST OF FIGURES	xiii
ABBREVIATIONS	xv
CHAPTER I INTRODUCTION	
1.1 Statement of the problem	1
1.2 Literature reviews	2
1.2.1 Influenza type A H1N1 pandemic	2
1.2.2 Biology of influenza virus	4
1.2.3 The mechanism of influenza type A virus	6
1.2.4 Drugs used in treatment of influenza virus	11
1.2.5 Phytochemicals	14
1.2.6 Xanthone	15
1.2.7 Sesamin	17
1.2.8 <i>Andrographis paniculata</i>	20
1.2.9 <i>Moringa oleifera</i>	23
1.2.10 <i>Houttuynia cordata</i>	26
1.2.11 <i>Hericium erinaceus</i>	27

1.2.12	<i>p</i> -hydroxycinnamaldehyde from <i>Alpinia galanga</i> extract	29
1.2.13	Objective	31

CHAPTER II MATERIALS AND METHODS

2.1	Materials	
2.1.1	Reagents used in this study and their sources	32
2.1.2	Xanthone	34
2.1.3	Sesamin	35
2.1.4	<i>Andrographis paniculata</i>	37
2.1.5	<i>Moringa oleifera</i>	38
2.1.6	<i>Houttuynia cordata</i>	39
2.1.7	<i>Hericium erinaceus</i>	40
2.1.8	<i>p</i> -hydroxycinnamaldehyde from <i>Alpinia galanga</i> extract	41
2.2	Method	
2.2.1	PBMC isolation and culture	43
2.2.2	Phytochemicals preparation	43
2.2.3	Influenza type A H1N1 induced PBMC treatment	44
2.3	Analytical methods	
2.3.1	Cell viability by alamarBlue [®] assay	45
2.3.2	A double sandwich based Enzyme-linked immunosorbent assay for cytokine markers	46
2.3.3	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction	47
2.3.4	Real-time quantitative polymerase chain reaction	47

2.3.5	Statical method	48
-------	-----------------	----

CHAPTER III RESULTS

3.1	Characterization of phytochemicals	
3.1.1	Characterization of xanthone	49
3.1.2	Characterization of sesamin	50
3.1.2	Characterization of <i>Andrographis paniculata</i>	51
3.1.2	Characterization of <i>Moringa oleifera</i>	52
3.1.2	Characterization of <i>Houttuynia cordata</i>	54
3.1.2	Characterization of <i>Hericium erinaceus</i>	56
3.1.2	Characterization of acetone extract of <i>Alpinia galanga</i>	57
3.2	Screening phase of the effects of phytochemicals on cytokine markers release from influenza type A H1N1 induced PBMC	
3.2.1	Study on the cytotoxicity of phytochemicals	58
3.2.2	Study on activity of cytokine markers by ELISA	60
3.3	Confirming phase of the effects of phytochemicals on cytokine markers release from influenza type A H1N1 induced PBMC	
3.2.1	Study on activity of cytokine markers by ELISA	63
3.2.2	Study on cytokines marker gene expression by real-time qPCR	65

CHAPTER IV DISCUSSIONS	68
------------------------	----

CONCLUSIONS	72
-------------	----

REFERENCES	73
------------	----

APPENDIX	82
CURRICULUM VITAE	87

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Primers used for real-time qPCR	84
2	Effective dose at IC50 of xanthone, sesamin and <i>Andrographis paniculata</i> extract on IL-1 β , TNF- α and IL-2 mRNA level	85

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	The influenza type A H1N1 cases in 2009 pandemic	3
2	The structure of influenza viruses	5
3	The transcription and replication of influenza type A	7
4	The mechanism of cytokine storm evoked by influenza virus	10
5	The mechanism of antiviral drugs to inhibit influenza virus	13
6	Mangosteen, <i>Garcinia mangostana</i> L.	16
7	The chemical structure of xanthones	16
8	<i>Sesamum indicum</i> L. and sesamine seeds	18
9	The chemical structure of sesamin	18
10	<i>Andrographis paniculata</i> Wall ex. Nees	21
11	The chemical structure of andrographolide, which mainly major active compound found in <i>Andrographis paniculata</i>	21
12	<i>Moringa oleifera</i> Lam leaves	23
13	The structures of phytochemicals from <i>Moringa oleifera</i>	24
14	<i>Houttuynia cordata</i> Thunb	26
15	<i>Hericium erinaceus</i> (Bull. Ex Fr.) Pers (lion's mane)	28
16	<i>Alpinia galanga</i> Linn. (B.L. Burt)	30
17	The chemical structure of <i>p</i> -hydroxycinnamaldehyde 1, 3-(4-hydroxy-phenyl)-propenal, the active compound of the acetone fraction of <i>Alpinia galanga</i>	30

18	HPLC chromatogram of extracted xanthone and standard α -mangostin	49
19	HPLC chromatogram of extracted sesamin and standard sesamin	50
20	HPLC chromatogram of extracted <i>Andrographis paniculata</i>	51
21	HPLC chromatogram of extracted <i>Moringa oleifera</i>	53
22	HPLC chromatogram of extracted <i>Houttuynia cordata</i>	55
23	HPLC chromatogram of extracted <i>Hericium erinaceus</i>	56
24	HPLC chromatogram of acetone extract of <i>Alpinia galanga</i>	57
25	The effects of phytochemicals on the growth of PBMC by the alamarBlue [®] assay	59
26	The effects of phytochemicals which is dissolved in DMSO on screening activity of cytokine markers	61
27	The effects of phytochemicals which is dissolved in deionized water on screening activity of cytokine markers	62
28	The effects of phytochemicals; xanthone, sesamin and <i>Andrographis paniculata</i> compare with oseltamivir (Tamiflu [®]) on activity of cytokine markers	64
29	The effects of phytochemicals; xanthone, sesamin and <i>Andrographis paniculata</i> compare with oseltamivir (Tamiflu [®]) on cytokine markers gene expression	66
30	Optimization of influenza type A H1N1 dilution	86

ABBREVIATIONS

AA	arachidonic acid
bp	base pair
cDNA	complementary deoxyrinonucleic acid
CO ₂	carbon dioxide
COX	cyclooxygenase
DGLA	dihomo- γ -linoleic acid
DMSO	dimethyl sulfoxide
DOCA	deoxycorticosterone acetate
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
g	gram
GAPDH	glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase
HA	hemagglutinin
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
HPLC	high performance liquid chromatography
hr	hours
IFN- α	interferon-alpha

IL-1 β	interleukine-1 beta
IL-2	interleukine-2
IL-6	interleukine-6
IL-8	interleukine-8
JNK	Jun N-terminal kinase
kg	kilogram
kDa	kilodalton
L	liter
LDH	lactate dehydrogenase
M	molar
M2	matrix protein-2
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter
mm	millimeter
MMP-2	matrix metalloproteinase-2
MS	mass spectrometry
MW	molecular weight
NA	neuraminidase
NEP	nuclear export protein
nm	nanometer

NMR	nuclear magnetic resonance
O_2^-	superoxide
PA	polymerase subunit A
PB1	polymerase subunit B1
PB2	polymerase subunit B2
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffer saline
PGE_2	prostaglandin E2
real-time qPCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SD	standard deviation
s-GAG	sulfated glycosaminoglycan
TLC	thin layer chromatography
$TNF-\alpha$	tumor necrosis factor alpha
V	voltage
vRNA	viral ribonucleic acid
vRNP	viral ribonucleoprotein
%	percentage

$^{\circ}\text{C}$	degree Celcius
μg	microgram
μM	micromolar
μl	microliter