

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E41071

ACTIVITY OF THE EXTRACTS FROM *GLYCOSMIS PARVA* CRAIB
IN MACROPHAGE CELL J774A.1

MISS SUCHINTANA CHUMSENG

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

600255551

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



ACTIVITY OF THE EXTRACTS FROM *GLYCOSMIS PARVA* CRAIB
IN MACROPHAGE CELL J774A.1



Miss Suchintana Chumseng

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



ฤทธิ์ของสิ่งสกัดจาก *Glycosmis parva* ต่อการทำงานของ
macrophage cell J774A.1

นางสาวสุจินตนา ชุ่มแสง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title ACTIVITY OF THE EXTRACTS FROM *GLYCOSMIS*
PARVA CRAIB IN MACROPHAGE CELL J774A.1
By Suchintana Chumseng
Field of Study Pharmacology
Thesis Advisor Associate Professor Chandhanee Itthipanichpong
Thesis Co-Advisor Associate Professor Nijsiri Ruangrunsi, Ph.D.

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

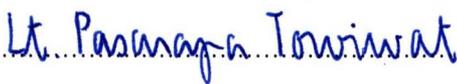
.....  Dean of the Faculty of Graduate school
(Associate Professor Pornpote Piumsomboon, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

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

.....  Thesis Advisor
(Associate Professor Chandhanee Itthipanichpong)

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

.....  Examiner
(Assistant Professor Lt. Pasarapa Towiwat, Ph.D.)

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

สุจินตนา ชุมแสง : ฤทธิ์ของสิ่งสกัดจาก *Glycosmis parva* ต่อการทำงานของ macrophage cell J774A.1 (ACTIVITY OF GLYCOSMIS PARVA CRAIB IN MACROPHAGE CELL J774A.1.) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.จันทน์ อธิพานิชพงศ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.ดร. นิจิตริ เรืองรังษี, 98 หน้า.

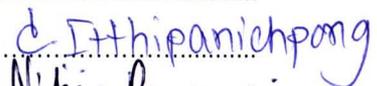
E41071

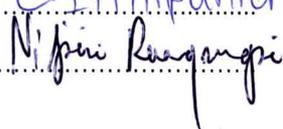
การทดสอบสิ่งสกัดจาก *G. parva* ต่อแมคโครฟาจ J774A.1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ในการศึกษาพบว่าสิ่งสกัดจากกิ่งและใบของ *G. parva* ด้วย hexane และ ethyl acetate (G1, G2, G5 และ G6) ในความเข้มข้นที่นำมาศึกษาสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกซออกไซด์และไม่เป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ ผลการศึกษาพบว่าค่า IC_{50} ของการสร้างไนตริกซออกไซด์ อยู่ระหว่าง 11.12 – 44.70 $\mu\text{g/ml}$ และเมื่อศึกษาการแสดงออกของ mRNA โดยวิธี RT-PCR พบว่าสิ่งสกัดจาก *G. parva* สามารถยับยั้งการแสดงออกของ TNF- α , IL-1 β และ IL-6 mRNA ได้แตกต่างกันโดยพบว่า สิ่งสกัดจากกิ่งด้วย hexane และ ethyl acetate (G5 และ G6) ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการแสดงออกของ TNF- α ได้อย่างเด่นชัดโดยมีฤทธิ์ยับยั้งได้ 94.2% และ 95% ตามลำดับเมื่อพิจารณาการแสดงออกของ IL-1 β พบว่า G2 ที่ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งการแสดงออกของ IL-1 β ได้สูงสุดคือ 69.8% สำหรับ IL-6 พบว่า G2 และ G5 ไม่มีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของ IL-6 นอกจากนี้ยังพบว่าสิ่งสกัดจาก *G. parva* (G1, G2, G5 และ G6) สามารถยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 และ iNOS ได้โดยพบว่า G6 ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ได้สูงสุด 82.5% และยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 ได้สูงสุด 93% ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสิ่งสกัดจาก *G. parva* สามารถควบคุมการทำงานของ pro-inflammatory cytokines และเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้ ดังนั้นสิ่งสกัดจาก *G. parva* จึงน่าจะมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้

สาขาวิชา เภสัชวิทยา

ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อ นิสิต..... 

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... 

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..... 

508 72119 20 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS : MACROPHAGE/ ANTI-INFLAMMATORY / *GLYCOSMIS PARVA* CRAIB

SUCHINTANA CHUMSENG : ACTIVITY OF *GLYCOSMIS PARVA* CRAIB IN
MACROPHAGE CELL J774A.1. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF
CHANDHANE E ITTHIPANICHPONG, THESIS COADVISOR : ASSOC.PROF.
NIJSIRI RUANGRUNGSI ,Ph.D., 98 pp

E41071

The activity of *Glycosmis parva* extracts were investigated in LPS-treated macrophage J77A.1 cell. It was found that the fractions of branches and leaves obtained from hexane, ethyl acetate (G1, G2, G5 and G6) suppressed nitric oxide production without cytotoxicity in the study dose. Their IC₅₀ for NO production varied from 11.12 – 44.70 µg/ml. The RT-PCR showed that *G. parva* fractions significantly inhibited pro-inflammatory expression of cytokines, TNF-α, IL-1β and IL-6 in different manner. The prominent effect on TNF-α generation were found in ethyl acetate and hexane extract from leaves (G5 and G6) which caused about 94.2% and 95% at the concentration of 25 µg/ml. For IL-1β expression, G2 at the concentration of 20 µg/ml demonstrated highest inhibition effect (69.8%). However, inhibition effect on IL-6 expression were not evidenced in G2 and G5 from this present study. Moreover the expression of COX-2 and iNOS mRNA were also prohibited by *G. parva* extract (G1, G2, G5 and G6). The greatest inhibition of iNOS expression was seen in G6 at 25 µg/ml concentration (82.5%). The expression of COX-2 was pronounced inhibited by G6 at 25 µg/ml concentration (93%). The results obtained from this study indicated the potential of *G. parva* in down regulation of pro-inflammatory cytokines and enzymes production which may consider them as the leading compounds for anti-inflammatory action.

Field of study: Pharmacology.....

Academic year: 2009.....

Student's Signature.....

Advisor's Signature.....

Co-advisor's Signature.....

AL

C. Itthipanichpong

Nij Siri Ruangrungsi

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my advisor Associate Professor Chandhanee Itthipanichpong for her guidance, valuable advices, helpfulness, understanding, suggestion, support and kindness.

I would like to express my appreciation and grateful thanks to my co-adviser Associate Professor Nijsiri Reungrungsi, Ph.D, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University for his valuable suggestion and providing the fraction of *Glycosmis parva* extract for this study.

I would like to express my sincere gratitude to Assistant Professor Wacharee Limpanasithikul, Ph.D. the chairman of my thesis examination committee for her valuable suggestion and spending quite a long time with me in the laboratory.

I would to give the special thanks to Assistant Professor Lt.Pasarapa Towiwat, Ph.D.and Assistant Professor Pathama Leewanich, Ph.D. for spending their valuable time in reviewing my thesis and give me a very useful comments.

Special thanks are extened to the support and grants from the department of Pharmacology, Faculty of Medicine, the Graduate School, Chulalongkorn University. I would like to thank Mr. Chaisak Chansrinियom for his assistance in preparation and identification of *Glycosmis parva* extract. I also thank Miss Wipasiri Soonthornchai for her suggestion in RNA extraction and PCR method.

Finally, I would not forget to give special thanks to my parents and every members in my family for support me during my graduate study and they make me feel happy and comfortable every time when I come home.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI)	iv
ABSTRACT (ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	viii
LIST OF FIGURES	ix
ABBREVIATIONS	xii
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II LITERATURE REVIEW	3
Inflammation	3
Macrophages	10
Cytokines	11
Nitric oxide	15
Prostaglandins	18
Steroid	19
NSAIDs	21
<i>Glycosmis parva craib</i>	23
III MATERIALS AND METHODS	26
IV RESULTS	31
V DISCUSSION CONCLUSION AND SUGGESTION	57
REFERENCES	61
APPENDICES	65
BIOGRAPHY	98

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Function of NO in immune system.....	17
2	Inflammatory Actions of Eicosanoids.....	19

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1	Recruitment of the cells to the sites of infection.....5
2	Receptors of neutrophils and macrophages recognize different stimuli.....8
3	Phagocytosis of a particle by macrophages9
4	Differentiation of macrophage.....10
5	Biologic actions of TNF.....13
6	Major effect of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis- factor (TNF) in inflammation.....14
7	Functions of nitric oxide (NO) in blood vessels and macrophages.....16
8	Mechanism of action of steroid.....20
9A	Inhibition effect of the extracts from <i>Glycosmis parva</i> on NO production.....32
9B	Cytotoxic effect of the extracts from <i>Glycosmis parva</i> in LPS stimulated-macrophage J774A.1.....32
10A	Inhibition effect of G1 on NO production in LPS stimulated-macrophage J774A.1.....33
10B	IC ₅₀ of G1.....33
10C	Cytotoxic effect of G1 in LPS stimulated-macrophage J774A.1.....34
11A	Inhibition effect of G2 on NO production in LPS stimulated-macrophage J774A.1.....35
11B	IC ₅₀ of G2.....35
11C	Cytotoxic effect of G2 in LPS stimulated-macrophage J774A.1.....36

12A	Inhibition effect of G5 on NO production in LPS stimulated-macrophage.....	37
12B	IC ₅₀ of G5.....	37
12C	Cytotoxic effect of G5 in LPS stimulated-macrophage J774A.1.....	38
13A	Inhibition effect of G6 on NO production in LPS stimulated-macrophage.....	39
13B	IC ₅₀ of G6.....	39
13C	Cytotoxic effect of G6 in LPS stimulated-macrophage J774A.1.....	40
14	Effect of branches extracted with hexane (G1) from <i>Glycosmis parva</i> on mRNA expressions of cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) in LPS stimulated-macrophage J774A.1 cells.....	43
15	Effect of branches extracted with ethyl acetate (G2) from <i>Glycosmis parva</i> on mRNA expressions of cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6) in LPS stimulated-macrophage J774A.1 cells.....	44
16	Effect of leaves extracted with hexane (G5) from <i>Glycosmis parva</i> on mRNA expressions of cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) in LPS stimulated-macrophage J774A.1 cells.....	45
17	Effect of leaves extracted with ethyl acetate (G6) from <i>Glycosmis parva</i> on mRNA expressions of cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) in LPS stimulated-macrophage J774A.1 cells.....	46
18	Effect of branches extracted with hexane (G1) from <i>Glycosmis parva</i> on mRNA expressions of iNOS in LPS stimulated-macrophage J774A.1 cells.....	48

19	Effect of branches extracted with ethyl acetate (G2) from <i>Glycosmis parva</i> on mRNA expressions of iNOS in LPS stimulated-macrophage J774A.1 cells	49
20	Effect of leaves extracted with hexane (G5) from <i>Glycosmis parva</i> on mRNA expressions of iNOS in LPS stimulated-macrophage J774A.1 cells	50
21	Effect of leaves extracted with ethyl acetate (G6) from <i>Glycosmis parva</i> on mRNA expressions of iNOS in LPS stimulated-macrophage J774A.1 cells.....	51
22	Effect of branches extracted with hexane (G1) from <i>Glycosmis parva</i> on mRNA expressions of COX-2 in LPS stimulated- macrophage J774A.1 cells.....	53
23	Effect of branches extracted with ethyl acetate (G2) from <i>Glycosmis parva</i> on mRNA expressions of COX-2 in LPS stimulated-macrophage J774A.1 cells.....	54
24	Effect of leaves extracted with hexane (G5) from <i>Glycosmis parva</i> on mRNA expressions of COX-2 in LPS stimulated-macrophage J774A.1 cells.....	55
25	Effect of leaves extracted with ethyl acetate (G6) from <i>Glycosmis parva</i> on mRNA expressions of COX-2 in LPS stimulated-macrophage J774A.1 cells.....	56

ABBREVIATIONS

Ca ²⁺	Calcium
CBG	Corticosteroid-binding globulin
cDNA	Complementary DNA
CNS	Central nervous system
CO ₂	Carbon dioxide
Dexa	Dexamethazone
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
GDP	Guanosine diphosphate
GM-CFU	Granulocyte/macrophage colony-forming unit
GR	Glucocorticoid receptor
GRE	Glucocorticoid response element
FBS	Fetal bovine serum
HSC	Haematopoietic stem cell
HPA	Hypothalamic-pituitary –adrenal
IC ₅₀	Inhibition concentration 50%
IgG	Immunoglobulin G
M-CFU	Macrophage colony-forming unit
mg	Milligram (s)
ml	Milliliter(s)
NK	Natural killer
TLRs	Toll-like receptors
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molarities (mole per liter)
MBL	Mannose-binding lectin
NO	Nitric oxide
NSAIDs	Non steroidal anti-inflammatory drugs

O ₂	Oxygen
OD	Optical density
P	Probability
S.D.	Standard deviation
°C	Degree Celsius
µg	Microgram (s)
µl	Microliter (s)
µM	Micromolar
ng	Nanogram (s)
%	Percent
<	Less than
/	Per