

**IMMUNOMODULATORY EVALUATIONS OF  
*THUNBERGIA LAURIFOLIA* CRUDE WATER EXTRACT  
ON HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS**



**THANAPOL ACHARAKUL**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE (BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2015**

Copyright by Mahidol University

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

IMMUNOMODULATORY EVALUATIONS OF *THUNBERGIA LAURIFOLIA*  
CRUDE WATER EXTRACT ON HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR  
CELLS

THANAPOL ACHARAKUL 5537873 PYBS/M

M.Sc. (BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)

THESIS ADVISORY COMMITTEE : PRIMCHANIEN MOONGKARNDI, Dr.rer.nat.,  
KOVIT PATTANAPANYASAT, Ph.D., SUPACHOKE MANGMOOL, Ph.D.

ABSTRACT

The immune system has been developed to defend the host against invading pathogens and/or tumor cells. Immune responses are the results of an efficient cooperation between innate and adaptive components of the immune system. To ensure immune homeostasis, immune system needs a delicate control of the balance of immune reactions through the production of a network of immunomodulators. Currently, there are only a few actual immunomodulators used in clinics and most of these did not originate from the plants. Various plants have been reported on concerning immune response. Therefore, investigation of plant-derived immunomodulators have become of great interest. *Thunbergia laurifolia* Lindl. (Acanthaceae) has been used in Thai traditional medicine as an antidote for poisons. Several constituents in *T. laurifolia* water extract (TLL) have been reported to display immunomodulatory activities. Nevertheless, there are no previous studies focusing on the effects of TLL on its immunomodulatory potential. Therefore, promising properties of TLL encourage us to evaluate its immunomodulatory activities.

In the present study, we evaluated the *in vitro* immunomodulatory effects of TLL at various concentrations (0-100 µg/ml) on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Our study on immunotoxicity measurement by MTT assay suggested that TLL up to 250 µg/ml was not toxic to PBMCs compared to untreated cells. TLL did not show any modulations on T, B or NK cells distribution and expression of T cell subsets (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) evaluating by immunophenotyping following by flow cytometry. Furthermore, TLL did not promote NK cells-mediated cytotoxicity against SK-N-SH among all evaluated effector:target (E:T) ratios. In contrast, our study showed that T cells proliferative capacity interfered with the suppressive effects of TLL as a dose dependent tendency, especially at 50 and 100 µg/ml ( $p < 0.01$ ). In addition, the cytokine profiles exploited the fact that TLL extract selectively induced Th1-mediated responses by insignificant enhancing the production of IL-2, a Th1-type cytokine, in a proportional manner to the concentrations of TLL. In contrary, IL-10, a Th2 cytokine, was significantly reduced the release at dose 100 µg/ml ( $p < 0.05$ ). Collectively, these results showed that TLL acted as an immunosuppressive agent and may directly polarize Th cells into Th1 sub-lineages and may provide benefit as immunosuppressant used in Th2 mediated pathologies in immunological related diseases like asthma and allergy.

KEY WORDS: *THUNBERGIA LAURIFOLIA* / IMMUNOMODULATION / FLOW  
CYTOMETRY / CFSE / HELPER T CELL

121 pages

การประเมินฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของสารสกัดชั้นน้ำของรากพืชที่มีต่อเซลล์โมโนนิวเคลียส

IMMUNOMODULATORY EVALUATIONS OF *THUNBERGIA LAURIFOLIA* CRUDE WATER EXTRACT  
ON HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

ธนพล อัครากุล 5537873 PYBS/M

วท.ม. (เภสัชศาสตร์ชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ปรีมเจนีชน มุ่งการดี, Dr. rer. nat. (IMMUNOLOGY), โกวิท พัฒนาปัญญาศาสตร์,  
Ph.D. (IRON METABOLISM), ศุภโชค มั่งมุล, Ph.D. (PHARMACEUTICAL SCIENCES)

บทคัดย่อ

ระบบภูมิคุ้มกันได้พัฒนาขึ้นมาเพื่อป้องกันร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมและเซลล์มะเร็งโดยอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างระบบภูมิคุ้มกันชนิด innate และ adaptive ระบบภูมิคุ้มกันรักษาสมดุลโดยอาศัยการควบคุมสมดุลของปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน ด้วยการสร้าง immunomodulator ปัจจุบันมี immunomodulator ที่ใช้ในทางคลินิกไม่มากนัก และเกือบทั้งหมดไม่ได้มีแหล่งที่มาจากรากพืช อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าพืชหลายชนิดออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นการค้นหาสาร immunomodulator จากรากพืชจึงได้รับความสนใจมาก

การแพทย์พื้นบ้านของไทยนำรากพืช (*Thunbergia laurifolia* Lindl. (Acanthaceae)) มาใช้เป็นยาต้านพิษ สารสำคัญบางชนิดที่พบในสารสกัดชั้นน้ำของรากพืช (TLL) เคยมีรายงานว่ามีการปรับภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory activities) แต่ยังไม่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของรากพืชโดยตรง การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงต้องการตรวจสอบฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของสารสกัดชั้นน้ำของรากพืช การศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) เพื่อประเมินฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันพบว่าสารสกัดชั้นน้ำของรากพืชที่ความเข้มข้น 0-100 มก./มล. โดยใช้เซลล์โมโนนิวเคลียส (peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)) พบว่าสารสกัดชั้นน้ำของรากพืชจนถึงความเข้มข้น 250 มก./มล. ไม่เป็นพิษต่อ PBMCs เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเมื่อวัดด้วยการใช้ MTT assay จากการทดลองยังพบว่าสารสกัดชั้นน้ำของรากพืชไม่ส่งผลให้เกิดเปลี่ยนแปลงการกระจายประชากรของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที บี และ NK และไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของประชากรย่อยของทีลิมโฟไซต์ชนิด CD4<sup>+</sup> และ CD8<sup>+</sup> เมื่อวัดด้วยวิธี immunophenotyping และ flow cytometry รวมทั้งไม่มีผลต่อการทำลายเซลล์มะเร็ง SK-N-SH ของเซลล์ NK ในทุกอัตราส่วนของ Effector : target cells ที่ทดสอบ อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดชั้นน้ำของรากพืชยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ทีลิมโฟไซต์ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มก./มล. ( $p < 0.01$ ) และเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองแบบ Th1 โดยกระตุ้นให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-2 อย่างไม่มีนัยสำคัญและยับยั้งการสร้าง IL-10 ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่ 100 มก./มล. รากพืชยับยั้ง IL-10 อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ดังนั้นสารสกัดชั้นน้ำของรากพืชอาจมีฤทธิ์เป็นยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันและอาจมีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิด Th1 ซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของภูมิคุ้มกันชนิด Th2 เช่นภูมิแพ้และหอบหืด