

Thesis Title	Immunomodulating Activity Study of Thai Medicinal Plants	
Author	Miss Aurasorn Saraphanchotiwitthaya	
Degree	Doctor of Philosophy (Biotechnology)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Aranya Manosroi	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Jiradej Manosroi	Member
	Lect. Pennapha Supcharoen	Member

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the immunomodulating activity of Thai medicinal plants that have been traditional used in Thai folklore medicines. Wood of *Clausena excavata* Burm. f., stem bark of *Pouteria cambodiana* (Pierre ex Dubard) Baehni and tuberous root of *Peuraria mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) were extracted with water, ethanol and acetone by hot and cold process. The wood of *C. excavata* was also prepared by the Thai folklore extraction. These extracts were studied for *in vitro* immunomodulatory activities (phagocytic activity of Balb/C mice macrophages and proliferation of lymphocytes) and *in vivo* immunomodulatory activities (the delayed type hypersensitivity and haemagglutinating antibody production). The results showed that the hot folklore extract (CEHF) with lipopolysaccharide (LPS) gave the highest stimulation (156% of the control), relating to humoral mediated immunity, mainly through T cell independent B cell proliferation. This was supported by the highest enhancement of haemagglutinating antibody (HA) production in mice induced by both oral and intraperitoneal administration of the extract. However, fractions eluted by column chromatography of CEHF gave less splenocyte proliferation activity (40% of the control) than the crude extract. This suggested synergistic effect of various constituents in CEHF. *In vivo* study in mice on delayed type hypersensitivity (DTH) of the hot aqueous extract of *C. excavata* (CEHW) showed the highest activity of 28% of the control, indicating immunomodulating activity related to cell mediated immunity (CMI). Its eluted fractions with pokeweed mitogen (PWM) improved splenocyte

proliferation activity of 87% of the control which was higher than its crude extract, indicating immunomodulating activity related to humoral mediated immunity via T cell dependent B cell proliferation pathway. Fractionation of CEHW crude extract might get rid of some immunosuppressing compounds. Immunomodulating compounds in wood of *C. excavata* may have activity relating to both HMI (Thai folklore extract) and CMI (hot aqueous extract). This may partly explain the immunomodulating activity of *C. excavata* wood extract which have been claimed for the treatment of cancer and HIV by people in the eastern part of Thailand. The highest oxidative burst reduction on phagocytosis and DTH response of the hot acetone extract of *P. cambodiana* (PCHAc) illustrated CMI relating response. PCHAc together with LPS gave the highest activity on bone marrow proliferation (170% of the control) similar to its hot aqueous extract (PCHW). This indicated the stimulation of B cell proliferation through T cell independent pathway. The methanolic extract of *P. cambodiana* showed phagocytic activity on NBT dye reduction the same as lysosomal enzyme activity (80% of the control) and enhanced splenocyte proliferation (177% of the control) with dose response. PCCMe also indicated DPPH free radical scavenging activity (IC_{50} 0.24 μ g/ml) 30% less than ascorbic acid (IC_{50} 0.08 μ g/ml) and gave lipid peroxidation activity (7% of the control) less than BHT (47% of the control). The eluted fractions of PCHW and the isolated phenolic and sterol compounds from PCCMe showed splenocyte proliferation less than their crude extracts. Moreover, PCCMe and its purified compounds at the tested concentrations had no antioxidant activity, therefore, the crude extract was preferred. These results may support the folklore remedies of *P. cambodiana*. Its crude extract might be used to improve the immune system together with the induction of milk production in breast feeding mothers. In the preliminary study of extracts from *P. mirifica*, the suppression of immunomodulating activity both *in vitro* and *in vivo* in Balb/C mice was observed. Therefore, *P. mirifica* extracts were not further studied. Although, the results from this study of *C. excavata* and *P. cambodiana* extracts which were investigated in mouse immune system could not be directly represented to the human immune system, the information from this study can be used to explain the folklore application of these Thai medicinal plants, especially the aqueous extract from *Clausena excavata* wood and *Pouteria cambodiana* bark, in the treatment of diseases and symptoms relating to immunodeficiency.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของสมุนไพรไทย	
ผู้เขียน	นางสาวอรสร สารพันธ์โชติวิทยา	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. อรัญญา มโนสร้อย	ประธานกรรมการ
	รศ. ดร. จีระเดช มโนสร้อย	กรรมการ
	อ. เพ็ญนภา ททรัพย์เจริญ	กรรมการ

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของสมุนไพรไทยที่มีการใช้เป็นยาแผนโบราณ ในการทดลองได้สกัดสารสกัดหยาบจากเนื้อไม้ของต้นสนโตก เปลือกแห้งจากต้นนมนางและหัวกวาวเครือขาวซึ่งสกัดด้วยน้ำ เอทิลแอลกอฮอล์ และอะซีโตน โดยสกัดแบบใช้ความร้อนและไม่ใช้ความร้อนรวมทั้งสารสกัดที่เตรียมขึ้นตามแบบการสกัดยาสมุนไพรจากเนื้อไม้สนโตกตามตำรายาพื้นบ้าน นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง การศึกษาในหลอดทดลองได้แก่การศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นการจับกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของแมคโครฟาจและการกระตุ้นการแบ่งเซลล์สปลีโนไซต์จากม้ามและเซลล์ไขกระดูกของหนูถีบจักรสายพันธุ์ Balb/C การศึกษาในสัตว์ทดลองได้แก่การศึกษาฤทธิ์ระงับการอักเสบผ่านการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไวเกินและการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนูถีบจักรสายพันธุ์ Balb/C จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดแบบตำรายาพื้นบ้านจากเนื้อไม้สนโตก (CEHF) ร่วมกับ lipopolysaccharide กระตุ้นการแบ่งตัวของสปลีโนไซต์ได้มากที่สุด (156% ของกลุ่มควบคุม) สอดคล้องกับผลการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนูถีบจักรทั้งแบบป้อนและฉีดสารละลายเข้าช่องท้อง แสดงว่าสารสกัดมีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral mediated immunity) ผ่านการกระตุ้นการแบ่งตัวของ B cell แบบไม่พึ่ง T cell แพร่คั้งจากการแยกสกัด CEHF โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟีมีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของสปลีโนไซต์น้อยกว่าสารสกัดหยาบ (40% ของกลุ่มควบคุม) แสดงว่าฤทธิ์การกระตุ้นภูมิคุ้มกันน่าจะเกิดจากการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารประกอบต่างๆ การแยกเป็นแฟรคชันจึงทำให้ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันลดลง สารสกัดน้ำจากสนโตกแบบใช้ความร้อน (CEHW) สามารถระงับการอักเสบในหนูได้ 28% ของกลุ่มควบคุม สารสกัดดังกล่าวจึงน่าจะมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ (cell mediated immunity) นอกจากนี้แฟรคชันของสารสกัดดังกล่าวร่วมกับ pokeweed mitogen สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของสปลีโนไซต์ (87% ของกลุ่มควบคุม) ได้มากกว่าสารสกัดหยาบ แสดงว่า CEHW มีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำด้วย ซึ่งเป็นการกระตุ้นการแบ่งตัวของ B cell โดยอาศัย T cell การแยกแฟรคชันน่าจะมีส่วนในการแยกหรือลดปริมาณสารที่อาจกด

ภูมิคุ้มกันในสารสกัดหยาบ จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถอธิบายความเป็นไปได้ที่ชาวบ้านทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยได้นำสัสนโคกมาใช้เพื่อรักษาหมีแดงตามตำรายาพื้นบ้านซึ่งน่าจะเลือกใช้สารสกัดหยาบมากกว่าแฟรคชัน สารสกัดอะซีโตนจากเปลือกต้นนมนางแบบใช้ความร้อน (PCHAc) สามารถกระตุ้นการจับกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของแมคโครฟาจได้ดีโดยเฉพาะการกระตุ้นการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยการทดสอบผ่านการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสี nitroblue tetrazolium (NBT) ซึ่งแสดงปริมาณสารประกอบซูเปอร์ออกไซด์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์และสามารถยับยั้งการอักเสบในหนู แสดงว่า PCHAc สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ได้ นอกจากนี้ PCHAc ยังมีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเม็ดเลือดขาวที่เตรียมจากไขกระดูก (170% ของกลุ่มควบคุม) ใกล้เคียงกับสารสกัดน้ำจากเปลือกนมนางแบบใช้ความร้อน (PCHW) นอกจากนี้สารสกัดหยาบ PCHW ยังมีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งสปลีโนไซต์มากกว่าแฟรคชันที่แยกได้ แสดงว่ามีการเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของสารประกอบต่างๆ ในสารสกัดหยาบ การแยกเป็นแฟรคชันจึงทำให้ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันลดลง สารสกัดเมธานอลจากเปลือกนมนางแบบไม่ใช้ความร้อน (PCCMe) มีฤทธิ์กระตุ้น (80% ของกลุ่มควบคุม) การจับกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของแมคโครฟาจจากการทดสอบการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสี NBT โดยวัดปริมาณสารประกอบซูเปอร์ออกไซด์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ และ lysosomal enzyme ในแมคโครฟาจ และมีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของสปลีโนไซต์แปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัด (177% ของกลุ่มควบคุม) เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ PCCMe ด้วยวิธี DPPH free radical scavenging พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50} 0.24 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) น้อยกว่าวิตามินซี (IC_{50} 0.08 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 30% น้อยกว่าBHT (IC_{50} 0.10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และวิตามินอี (IC_{50} 0.11 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 5% และเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี lipid peroxidation พบว่า PCCMe (7% ของกลุ่มควบคุม) มีฤทธิ์น้อยกว่า BHT (47% ของกลุ่มควบคุม) นอกจากนี้สารสกัดในกลุ่มฟีนอลิกและสเตอรอลที่แยกได้จาก PCCMe ไม่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันและไม่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ การทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเปลือกนมนางนำจะมีสารประกอบที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันระบบเซลล์ซึ่งสามารถสนับสนุนการใช้ตามตำรายาพื้นบ้านได้ โดยอาจใช้สารสกัดหยาบเสริมภูมิคุ้มกันร่วมกับฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำนมสำหรับมารดาที่ให้นมบุตร ส่วนการศึกษาเบื้องต้นในหลอดทดลองและในหนูถีบจักรสายพันธุ์ Balb/C ของสารสกัดหยาบที่ได้จากกวาวเครือขาว พบว่ามีแนวโน้มในการกดภูมิคุ้มกันจึงไม่ได้ทำการศึกษาต่อ แม้ว่าการศึกษานี้อาจไม่สามารถแสดงผลของสารสกัดจากเนื้อไม้สัสนโคกและเปลือกต้นนมนางต่อระบบภูมิคุ้มกันในมนุษย์ได้โดยตรงเนื่องจากทดลองในหนู แต่ได้ข้อมูลที่ใช้ในการอธิบายการนำสมุนไพรมูลานี่ที่ได้มีการใช้ในการรักษาโรคหรืออาการที่เกี่ยวข้องกับความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันในอดีตโดยเฉพาะอย่างยิ่งนำสกัดจากเนื้อไม้สัสนโคกและเปลือกต้นนมนาง