สัญญาเลขที่ MRG5980259

**รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์**

**โครงการ ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและกดภูมิคุ้มกันของกรดวานิลลิคและการพัฒนาตำรับที่เหมาะสมสำหรับส่งผ่านทางผิวหนัง**

|  |  |
| --- | --- |
| คณะผู้วิจัย | สังกัด |
| 1. อ.ดร.ภญ.เปรมฤทัย ธิติเลิศเดชา | คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล  มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 2. นส.วรางคณา ตันติถาวร | คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล  มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 3. นายพูนสิน พวงไพโรจน์ | คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล  มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 4. รศ.ดร.ณัฐวัฒน์ อ่อนลมูล | คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล  มหาวิทยาลัยมหิดล |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยมหิดล

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

**บทคัดย่อ**

ฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค เป็นสารสำคัญที่ได้จากพืชสมุนไพรซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิคที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและฤทธิ์ในการกดภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตามยังไม่พบการศึกษาทดลองใดที่ทดสอบฤทธิ์ในการกดภูมิคุ้มกันในแง่การยับยั้งการกระตุ้นและผลต่อกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์จากมนุษย์โดยสารทั้ง 3 ชนิดนี้มาก่อน ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์และยืนยันผลทางเภสัชวิทยาและความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ของฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดของอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 12 ราย มาแยกเก็บเซลล์ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ด้วยวิธี Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation จากนั้นเซลล์ PBMCs ที่ได้จะถูกกระตุ้นด้วย anti-CD3/28 coated beads แล้วจึงเติมสารที่ต้องการทดสอบลงไปที่ความเข้มข้นต่างๆ (50-200 µM) และใช้เวลาในการกระตุ้นนาน 24 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้จะนำไปย้อมกับแอนตี้บอดี้ต่อโมเลกุลต่างๆ เพื่อดูผลการกระตุ้นและการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์โดยทำการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี จากการศึกษาพบว่าฮิสพิดูลิน และเนเพตินที่ความเข้มข้นสูงสุด (200 µM) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4 และ CD8 ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล CD25 และ CD69 อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อลดความเข้มข้นลงเหลือ 100 µM พบว่าความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดยฮิสพิดูลินยังคงเดิม ยกเว้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4 ที่มีโมเลกุล CD69 ในขณะที่เนเพตินสามารถลดการเพิ่มขึ้นได้เฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD8 ที่มีโมเลกุล CD25 และ CD69 จากนั้นเมื่อทำการลดความเข้มข้นลงเหลือ 50 µM ไม่พบการยับยั้งการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ในกลุ่มของฮิสพิดูลิน แต่พบการลดลงของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD8 ที่มีโมเลกุล CD69 ในกลุ่มของเนเพติน สำหรับกลุ่มของกรดวานิลลิคนั้นพบว่า ไม่ว่าที่ความเข้มข้นใดก็ตามจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้นมีการเพิ่มขึ้น ทั้งนี้สารทุกตัวในทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองไม่พบว่าเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าฮิสพิดูลิน และเนเพติน เป็นสารที่มีศักยภาพในการกดภูมิคุ้มกันสำหรับการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยฤทธิ์ในการยับยั้งการกระตุ้นของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ของสารนั้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณที่ใช้ และยังไม่พบว่ามีการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์เพิ่มขึ้น ส่วนกรดวานิลลิคนั้นพบว่าเป็นสารที่มีศักยภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมากกว่า

**คำสำคัญ:** ฮิสพิดูลิน, เนเพติน, กรดวานิลลิค, การกดภูมิคุ้มกัน, การกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์

**ABSTRACT**

Hispidulin, nepetin and vanillic acid are naturally-occurring phenolic compounds which potentially possess anti-inflammatory and immunosuppressive properties. Nevertheless, there is no information concerning human T-cell activation and apoptosis. This study, therefore, aims to evaluate pharmacological effect and cytotoxicity of hispidulin, nepetin and vanillic acid on T-lymphocyte activation. Blood samples were obtained from ten healthy volunteers and separated to obtain peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. PBMCs were stimulated with anti-CD3/28 coated beads, treated with hispidulin, nepetin or vanillic acid at different concentrations (50-200 µM) and incubated for 24 hours. The samples were then stained with fluorochrome conjugated monoclonal antibodiesand reagents for activation and apoptosis assays before analyzed by LSRFortessa flow cytometer. Results showed that the expression frequencies of CD25 and CD69 in CD4+ and CD8+ T lymphocytes were markedly decreased by hispidulin and nepetin at the highest concentration (200 µM). When lowering the concentration to 100 µM, hispidulin still significantly inhibited the expression of activation markers except CD69 in CD4+ T cells while nepetin remained suppressing the expression of CD25 and CD69 in CD8+ T cells. No change was observed for hispidulin at the lowest concentration of 50 µM, whereas nepetin inhibited the expression of CD69 in CD8+ T cells. However, the activation markers were increased when using vanillic acid at all concentrations. None of these compounds disturbed total apoptotic cells in CD4+ and CD8+ populations compared to the stimulated control. It is then suggested that hispidulin and nepetin are feasible immunosuppressive agents for inflammation-related diseases through the inhibitory activity of early activation in T cells in dose-dependent manner without inducing cell death. Vanillic acid, on the other hand, has no effect on immunosuppression but shows more potential on immunostimulation.

**Keywords:** Hispidulin, nepetin, vanillic acid, immunosuppression, T-cell activation.

**บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)**

โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมีหลากหลาย อาทิเช่น โรคผื่นแพ้สัมผัส (allergic contact dermatitis, ACD) โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) โรคปลอกประสาทเสื่อมแข็ง (multiple sclerosis) และปฏิกิริยาร่างกายต่อต้านอวัยวะใหม่ (allograft rejection) ล้วนแล้วแต่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ หลักการสำคัญของการรักษาโรคเหล่านี้คือการให้ยากดภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ยากลุ่มกลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoid) และยากลุ่มซัยโคลฟอสฟาไมด์ (cyclophosphamide) ที่จะทำหน้าที่ยับยั้งและป้องกันการทำงานแบบไม่จำเพาะเจาะจงต่อระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งการใช้ยาพวกนี้เป็นระยะเวลานานจะทำให้เกิดอาการข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ เช่น กระดูกพรุน แผลในกระเพาะอาหาร เม็ดเลือดขาวต่ำ และเกิดความเป็นพิษต่อไต ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาค้นคว้ายาใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการกดภูมิคุ้มกันโดยที่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงน้อยที่สุด สารประกอบที่ได้จากธรรมชาติจึงเป็นแหล่งทางเลือกสำหรับการค้นหายาใหม่นั้น

ฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติและพบได้ในพืชสมุนไพรไทย “เท้ายายม่อม” (*Clerodendrum petasites* S. Moore) เนื่องจากสารทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นสารในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกจึงมีศักยภาพที่จะเป็นสารต้านการอักเสบ และกดภูมิคุ้มกัน ซึ่งได้มีรายงานการศึกษาจำนวนหนึ่งยืนยันถึงฤทธิ์ดังกล่าว แต่รายงานเหล่านั้นโดยส่วนมากเป็นการศึกษาในสัตว์ทดลองและเป็นการศึกษาที่ใช้สารสกัดสมุนไพรแทนที่จะใช้สารสกัดบริสุทธิ์ หรือสารมาตรฐาน ทำให้ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและกดภูมิคุ้มกันยังไม่สามารถได้ข้อสรุปที่ชัดเจน นอกจากนี้สารทั้ง 3 ชนิดนี้มีรายงานว่ามีคุณสมบัติในการซึมผ่านผิวหนังได้ดี ทำให้เหมาะสมที่จะนำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นยาทดแทนยากดภูมิคุ้มกันชนิดทาที่มีอยู่ในท้องตลาดเพิ่มขึ้นไปจากการให้แบบรับประทาน

โครงการวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ของฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค รวมถึงศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยดูผลของสารต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ โดยใช้ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครสุขภาพดี เพื่อยืนยันฤทธิ์ในการกดภูมิคุ้มกันและความปลอดภัยในการใช้สารดังกล่าว ตัวอย่างเลือดที่ได้จะถูกนำมาแยกเก็บเซลล์ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) และกระตุ้นด้วย anti-CD3/28 coated beads ก่อนเติมสารที่ต้องการทดสอบลงไปที่ความเข้มข้นต่างๆ (50-200 µM) ตัวอย่างที่ได้จะนำไปย้อมกับแอนตี้บอดี้ต่อโมเลกุลต่างๆ เพื่อดูผลการกระตุ้นและการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4 และ CD8 โดยทำการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี

จากการศึกษาพบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการกระตุ้นของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ของฮิสพิดูลิน และเนเพตินจะขึ้นอยู่กับปริมาณของสารที่ใช้ โดยที่ความเข้มข้นสูงสุด (200 µM) สามารถลดจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นได้ทุกชนิด (CD4+CD25+, CD4+CD69+, CD8+CD25+, CD8+CD69+) ในขณะที่เมื่อลดความเข้มข้นลง ฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ถูกกระตุ้นของสารทั้ง 2 ชนิดจะมีความแตกต่างและจำเพาะมากขึ้น คือที่ความเข้มข้น 100 µM ฮิสพิดูลินสามารถลดจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4+CD25+, CD8+CD25+, CD8+CD69+ ในขณะที่ฤทธิ์ของเนเพตินจะจำเพาะต่อเซลล์แม็ดเลือดขาวชนิด CD8+ เท่านั้น (CD8+CD25+, CD8+CD69+) และเมื่อลดความเข้มข้นลงจนเหลือที่ 50 µM พบว่าฮิสพิดูลินไม่สามารถยับยั้งการกระตุ้นของเซลล์ใดได้เลย แต่เนเพตินยังสามารถลดจำนวนเซลล์แม็ดเลือดขาวชนิด CD8+CD69+ ได้อยู่ ส่วนกรดวานิลลิคนั้นไม่พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่ามีฤทธิ์ในการเพิ่มจำนวนเซลล์แทน ทั้งนี้ยังพบว่าทุกความเข้มข้นของสารที่ใช้ทั้งหมดไม่ได้กระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่อย่างใด

ดังนั้นฮิสพิดูลิน และเนเพติน จึงเป็นสารที่มีศักยภาพในการกดภูมิคุ้มกัน และมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำไปพัฒนาศึกษาต่อเพื่อใช้เป็นยาใหม่สำหรับการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยฤทธิ์และความจำเพาะในการยับยั้งการกระตุ้นของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ของสารนั้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณของสารที่ใช้ และมีความปลอดภัยในการนำไปใช้ในระดับหนึ่ง เนื่องจากไม่พบว่ามีการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์เพิ่มขึ้น ในขณะที่กรดวานิลลิคนั้นเป็นสารที่มีศักยภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมากกว่าที่จะออกฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน ซึ่งจะมีประโยชน์ในการศึกษาต่อยอดสำหรับนำมาใช้เป็นยารักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันบกพร่องได้

**เนื้อหางานวิจัย**

**1. ที่มาของโครงการวิจัย**

โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมีหลากหลาย อาทิเช่น โรคผื่นแพ้สัมผัส (allergic contact dermatitis, ACD) โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) โรคปลอกประสาทเสื่อมแข็ง (multiple sclerosis) และปฏิกิริยาร่างกายต่อต้านอวัยวะใหม่ (allograft rejection) ล้วนแล้วแต่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ หลักการสำคัญของการรักษาโรคเหล่านี้คือการให้ยากดภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ยากลุ่มกลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoid) และยากลุ่มซัยโคลฟอสฟาไมด์ (cyclophosphamide) ที่จะทำหน้าที่ยับยั้งและป้องกันการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งการใช้ยาพวกนี้เป็นระยะเวลานานจะทำให้เกิดอาการข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ [1,2] เช่น กระดูกพรุน แผลในกระเพาะอาหาร เม็ดเลือดขาวต่ำ และเกิดความเป็นพิษต่อไต ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาค้นคว้ายาใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการกดภูมิคุ้มกันโดยที่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงน้อยที่สุด สารประกอบที่ได้จากธรรมชาติจึงเป็นแหล่งทางเลือกสำหรับการค้นหายาใหม่ สารประกอบที่มีศักยภาพทางการรักษาสำหรับการใช้เป็นยาใหม่สามารถเป็นได้จากตัวของสารประกอบจากธรรมชาติเอง หรือได้จากอนุพันธ์/สังเคราะห์เพิ่มเติมจากสารประกอบจากธรรมชาตินั้น

ฮิสพิดูลิน (hispidulin, 4´,5,7-trihydroxy-6-methoxyflavone) เนเพติน (nepetin, 3´,4´,5,7-tetrahydroxy-6-methoxyflavone) และกรดวานิลลิค (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid) จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก และพบได้มากในพืชสมุนไพรไทย “เท้ายายม่อม” (*Clerodendrum petasites* S. Moore) [3] สารทั้ง 3 ชนิดนี้ถูกรายงานว่ามีคุณสมบัติในการซึมผ่านผิวหนังได้ดี [4] ทำให้เหมาะสมที่จะนำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นยาทดแทนยากดภูมิคุ้มกันชนิดทาที่มีอยู่ในท้องตลาดเพิ่มขึ้นไปจากการให้แบบรับประทานอีกด้วย นอกเหนือไปจากพืชสมุนไพรเท้ายายม่อม ฮิสพิดูลินและเนเพตินยังพบในพืชสมุนไพรอื่นๆ ได้แก่ *Clerodendrum inerme* (L.) [5], *Clerodendrum indicum* (L) Gaertn [6], *Salvia plebeian* R. Br. (SP) [7], *Eupatorium arnottianum* Griseb. [8], *Santolina insularis* (Genn. Ex Fiori) [9], และ *Artermisia vestita* [10] ส่วนกรดวานิลลิคยังพบได้ในพืชสมุนไพรอีกหลายชนิดเช่นกัน เช่น *Solanum melongena* [11], *Armillaria mellea* [12], *Allium sativum* L. [13], และ *Phyllanthus emblica* [14] นอกจากนี้สารประกอบฟลาโวนอยด์ (ฮิสพิดูลิน และเนเพติน) และสารประกอบกรดฟีนอลิก (กรดวานิลลิค) ยังเป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางในแง่ของการมีคุณสมบัติเป็นสารต้านการอักเสบและกดภูมิคุ้มกัน ทำให้มีการสนใจศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาดังกล่าวของสารทั้ง 3 ชนิดนี้

มีรายงานวิจัยบางส่วนเกี่ยวกับฮิสพิดูลินพบว่า ฮิสพิดูลินสามารถลดการบวมของหูหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการบวมด้วย 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) [6] และยังสามารถลดการเกิดผิวหนังอักเสบของหูหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยน้ำมันสลอด (croton oil) ในภายหลังจึงได้มีการอธิบายถึงกลไกของฤทธิ์ในการยับยั้งเหล่านั้นว่าเกิดขึ้นผ่านทาง nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase (HO) -1 signaling [7] และไม่ได้เกี่ยวข้องกับกระบวนการเหนี่ยวนำของ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) [8] ฮิสพิดูลินยังสามารถยับยั้งกระบวนการผลิตกรดไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) และโพรสตาแกลนดิน E2 (prostaglandin E2, PGE2) ผ่านทางการขัดขวางกระบวนการทำงานของ NF-κB deoxyribonucleic acid (DNA)-binding activity และ c-Jun N-terminal kinases (JNK) pathway ส่งผลให้เกิดการกดการแสดงออกของ nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase (COX)-2 [5] นอกจากนี้ฮิสพิดูลินสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์แมคโครฟาจ (macropharges) ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ในการศึกษาโดยใช้สัตว์ทดลอง [10]

ฤทธิ์ของเนเพตินในการต้านการอักเสบส่วนมากจะคล้ายกับของฮิสพิดูลินคือ สามารถลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์แมคโครฟาจ ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และลดการบวมของหูหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย TPA ผ่านทาง Nrf2/HO-1 signaling [7] อย่างไรก็ตามเนเพตินยังถูกพบว่าสามารถลดการบวมของหูหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย TPA ผ่านทาง NF-κB deactivation [8]

สำหรับกรดวานิลลิคพบว่าสามารถกดการแสดงออกของ COX-2 และการแปลรหัส (transcription) ของ NF-κB p65 ส่งผลให้เกิดการลดลงของการกระบวนการสร้าง interleukin (IL)-6 [15] กรดวานิลลิคยังสามารถยับยั้งการผลิต PGE2 และ NO รวมไปถึงยับยั้งกระบวนการ receptor-interacting protein (RIP)-2/caspase-1 pathway [16] อย่างไรก็ตามได้มีรายงานการศึกษาที่คัดค้านฤทธิ์การกดภูมิคุ้มกันของกรดวานิลลิค โดยระบุว่ากรดวานิลลิคสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาว และการหลั่ง interferon (IFN)-γ [17] ในขณะที่อีกรายงานหนึ่งระบุว่ากรดวานิลลิคไม่ได้ส่งผลต่อกระดับของ IFN-γ, IL-2 และ IL-4 แต่อย่างใด [18]

แม้ว่าจะมีการศึกษาวิจัยค้นคว้าฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและกดภูมิคุ้มกันของฮิสพิดูลินและเนเพตินตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่ข้อมูลที่ได้ยังไม่สมบูรณ์และยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจน เนื่องจากผลการศึกษาเหล่านั้นมาจากการศึกษาในสัตว์ทดลอง และใช้สารทดสอบที่เป็นสารสกัดจากพืชสมุนไพรแทนที่จะใช้สารมาตรฐานบริสุทธิ์ ในขณะที่ผลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกรดวานิลลิคได้มาจากการศึกษาที่ใช้สารมาตรฐานบริสุทธิ์นั้นน่าเชื่อถือกว่า แต่ผลที่ได้จากหลายการศึกษายังมีข้อขัดแย้งกันอยู่ว่าสามารถกดภูมิกันได้จริงหรือไม่ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงทำการวิเคราะห์เพื่อยืนยันผลทางเภสัชวิทยาและความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ของฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค

**2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ของฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค

2.2 เพื่อศึกษาผลของฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิคต่อกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์

**3. กระบวนการทดลอง**

3.1 การรับอาสาสมัครเข้าโครงการวิจัยและการเก็บตัวอย่างเลือด

อาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 12 รายได้ถูกชักชวนให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ โดยได้มีการอ่านรายละเอียดของโครงการจากคำชี้แจงข้อมูลแก่อาสาสมัคร และได้ลงชื่อยินยอมในแบบฟอร์มยินยอมเข้าร่วมโครงการก่อนทำการเก็บตัวอย่างเลือดทุกครั้ง โครงการวิจัยนี้ได้รับอนุมัติให้ดำเนินการภายใต้คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล โดยผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 20 มิลลิลิตรจากอาสาสมัครแต่ละรายลงในหลอดทดลองที่มีส่วนประกอบของโซเดียมเฮพาริน เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดก่อนนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

3.2 การแยกเก็บเซลล์ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

ตัวอย่างเลือดที่ได้จะถูกนำมาแยกเก็บเซลล์ PBMC ด้วยวิธี density gradient centrifugation โดยใช้ Ficoll-Paque จากนั้นจึงเติมสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, และ 1% penicillin/streptomycin จำนวนเซลล์ PBMC ที่แยกเก็บได้จะถูกนำมานับด้วยวิธีการ trypan blue exclusion

3.3 การเตรียมสารที่ใช้ในการทดสอบ

นำฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค มาเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (stock solution) ที่ 500 µM โดยละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นจึงนำมาทำให้เจือจางลงจนเหลือความเข้มข้นที่ 50, 100 และ 200 µM สำหรับใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและผลต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์

3.4 การกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์และการทดสอบสาร

นำเซลล์ PBMC ที่ความเข้มข้น 2x106 เซลล์/มิลลิลิตร มากระตุ้นด้วย anti-CD3/28 monoclonal antibodies immobilized on magnetic beads ด้วยอัตราส่วนเม็ดบีดต่อเซลล์ 1:1 ในเพลทเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม จากนั้นจึงใส่สารที่ต้องการทดสอบ (ฮิสพิดูลิน เนเพติน หรือกรดวานิลลิค) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (50, 100 และ 200 µM) และใส่ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ที่ความเข้มข้น 2 mM สำหรับเป็นตัวควบคุมแบบบวก (positive control) และไม่ใส่สารอะไรเลยสำหรับตัวควบคุมการกระตุ้น (stimulated control) นำเซลล์ตัวอย่างเหล่านี้ไปบ่มเพาะในตู้ควบคุมปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5% และอุณหภูมิที่ 37ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนดจึงทำการนำเม็ดบีดออกจากเซลล์ตัวอย่างและปั่นล้างด้วย phosphate buffered saline (PBS) ที่มีส่วนประกอบ 2% FBS ก่อนที่จะนำไปย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์

3.5 การย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางโฟลไซโตเมทรี

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการกระตุ้นเซลล์ ตัวอย่างเซลล์ที่ถูกกระตุ้นจะถูกนำมาย้อมด้วยแอนตีบอดีต่อ CD3 A700, CD4 PerCP, CD8 FITC, CD19/CD56 APC-Cy7, CD25 APC และ CD69 PE และทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปปั่นล้างด้วย PBS

สำหรับการทดสอบผลต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ ตัวอย่างเซลล์ที่ถูกกระตุ้นจะถูกนำมาย้อมด้วยแอนตีบอดีต่อ CD3 A700, CD4 BV605, CD8 BV510 และCD19/CD56 APC-Cy7 และทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงนำไปปั่นล้างด้วย annexin V-binding buffer ก่อนนำไปย้อมด้วย FITC conjugated annexin V และ propidium idodide (PI)

ตัวอย่างเซลล์ที่ถูกย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences, USA) และ FlowJo® software (Tree Star, San Carlos, CA)

3.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ผลการทดลองที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วย GraphPad Prism® software version 7.02 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) ซึ่งแสดงผลในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ข้อมูลระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมจะถูกนำมาเปรียบเทียบด้วยวิธี paired t-test และความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของข้อมูลจะยอมรับเมื่อค่า P-values < 0.05

**4. ผลการทดลอง**

4.1 การวิเคราะห์จำแนกประเภทของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ และ CD8+ หลังถูกกระตุ้นด้วย anti-CD3/28 coated beads

กระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นมากเกินไปมักเกิดจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ ซึ่งทำหน้าที่หลักในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟต์นั้นจะถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนของแอนติเจนที่ถูกนำเสนอโดยโมเลกุล major histocompatibility complex (MHC) และลิแกนด์ของ co-stimulating molecules ที่อยู่บนผิวเซลล์ของเซลล์ชนิด antigen presenting cells (APCs) หรือเซลล์ที่ติดเชื้อ โครงการวิจัยนี้ได้ใช้ anti-CD3/28 coated beads เป็นตัวกระตุ้นเซลล์ เนื่องจากตัวกระตุ้นนี้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย และทำการกระตุ้นเซลล์โดยจำลองรูปแบบการกระตุ้นของเซลล์ตามธรรมชาติทั้งที่เป็น T-cell receptor complex และ co-stimulating molecules

สำหรับการจำแนกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ออกเป็นเซลล์ชนิด CD4+ และ CD8+ นั้น ทางผู้วิจัยได้ใช้วิธีการจำแนกแบบ conventional gating strategy ดังแสดงในรูปที่ 1 อันดับแรกคือตัวอย่างเซลล์ที่ได้จะถูกคัดเลือกด้วยวิธี doublet discrimination ทำให้เหลือเฉพาะเซลล์เดี่ยว แล้วจึงนำมาแยกเอาเฉพาะเซลล์ที่ยังมีชีวิต (FSC-A vs SSC-A) ต่อมาจึงเลือกเอาเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ (CD3+) ที่ไม่มีการแสดงออกของโมเลกุล CD19 และ CD56 ทำให้แยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซต์และเซลล์ชนิดเอ็นเค (natural killer, NK) ออกไปได้ จากนั้นจึงจำแนกเซลล์ชนิด CD4+ และ CD8+ ออกจากกันโดยใช้ two-dimensional dot plot ระหว่าง CD4 และ CD8 ผลการศึกษาพบว่ามีการลดลงของการแสดงออกของ CD3+ T cells เมื่อใส่สารทดสอบฮิสพิดูลิน และเนเพติน ในทุกช่วงความเข้มข้นของสารที่ใช้ (50-200 µM) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



**รูปที่ 1** แสดงวิธีการจำแนกเซลล์ชนิด anti-CD3/28 activated CD4+ T cells และ anti-CD3/28 activated CD8+ T cells เมื่อทดสอบด้วยฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค ที่ความเข้มข้น 200 µM และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (stimulated control)

4.2 ผลของฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้น

เซลล์ที่ถูกกระตุ้นจะมีการแสดงออกของโมเลกุลที่หลากหลายที่ผิวเซลล์เพื่อแสดงว่าอยู่ในภาวะถูกกระตุ้น (activation markers) โดยที่ CD69 เป็นโมเลกุลที่แสดงออกมาอย่างรวดเร็วหลังจากถูกกระตุ้น โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์และการทำงานต่างๆ ในฐานะตัวรับส่งสัญญาณ (signal-transmitting receptor) ของเซลล์เม็ดเลือดขาว ในขณะที่ CD25 จะเป็นโมเลกุลที่แสดงออกมาในภายหลัง และทำหน้าที่เป็นตัวรับส่งสัญญาณของ interleukin-2 (IL-2) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการกระตุ้นเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ต่อไป ดังนั้น CD69 และ CD25 จึงนิยมใช้สำหรับการดูผลการกระตุ้นเซลล์ในระยะต้น นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้เลือกใช้ EDTA ที่ความเข้มข้น 2 mM เป็นตัวควบคุมแบบบวก (positive control) สำหรับยืนยันผลในการยับยั้งการกระตุ้นของฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค เนื่องจากมีรายงานว่า EDTA สามารถยับยั้งการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ได้อย่างสมบูรณ์ [19]

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย anti-CD3/28 coated beads แล้วใส่สารที่ต้องการทดสอบ (ฮิสพิดูลิน เนเพติน หรือกรดวานิลลิค) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (50, 100 และ 200 µM) จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางโฟลไซโตเมทรีเพื่อแสดงให้เห็นลักษณะการแสดงออกของโมลกุลที่ถูกกระตุ้นในระยะต้น (CD69+ และ CD25+) ของ activated CD4+ T cells และ activated CD8+ T cells ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 2 ซึ่งจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ที่มีการแสดงออกของ CD69+ และ CD25+ จะถูกแสดงผลในตารางที่ 1



**รูปที่ 2** แสดงลักษณะการแสดงออกของโมลกุลที่ถูกกระตุ้นในระยะต้น (CD69+ และ CD25+) ของ anti-CD3/28 stimulated CD4+ T cells และ anti-CD3/28 stimulated CD8+ T cells เมื่อทดสอบด้วยฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค ที่ความเข้มข้น 200 µM และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (stimulated control)

ผลการศึกษาพบว่าเมื่อใส่ฮิสพิดูลินและเนเพตินที่ความเข้มข้น 200 µM เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ และ CD8+ ที่มีการแสดงออกของ CD69 และ CD25 มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และการลดลงดังกล่าวเกือบเทียบเท่ากับฤทธิ์ในการยับยั้งของตัวควบคุมแบบบวกที่ใช้ EDTA โดยเมื่อลดความเข้มข้นที่ใช้ลงเหลือ 100 µM ฮิสพิดูลินยับยั้งการแสดงออกของโมเลกุล CD25 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 2 ชนิด ในขณะที่เนเพตินสามารถลดการแสดงออกของโมเลกุล CD69 และ CD25 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD8 เท่านั้น และเมื่อลดความเข้มข้นของสารลง (50 µM) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ หลังจากใส่ฮิสพิดูลิน แต่พบว่าเนเพตินยังสามารถลดการแสดงออกของโมเลกุล CD69 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD8 ได้ สำหรับกรดวานิลลิคนั้นไม่พบว่าสามารถยับยั้งการกระตุ้นเซลล์ได้เลย แต่กลับได้ผลในทางตรงกันข้ามคือสามารถเพิ่มการแสดงออกของโมเลกุล CD69 และ CD25 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 2 ชนิดแทน

**ตารางที่ 1** แสดงจำนวนเซลล์ (%) ของ anti-CD3/28 stimulated CD4+ T cells และ anti-CD3/28 stimulated CD8+ T cells ที่มีการแสดงออกของโมลกุลที่ถูกกระตุ้นในระยะต้น (CD69+ และ CD25+) เมื่อทดสอบด้วย EDTA ฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 5)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **กลุ่มทดลอง** | **ความเข้มข้น**  **(µM)** | **จำนวนเซลล์ (%)** | | | |
| **CD4+** | | **CD8+** | |
| **CD69+** | **CD25+** | **CD69+** | **CD25+** |
| กลุ่มควบคุม  (Stimulated control) | - | 73.8 ± 4.6 | 57.9 ± 9.9 | 68.7 ± 6.4 | 42.2 ± 13.0 |
| EDTA  (Positive control) | 2000 | 29.5 ± 19.4\*\* | 2.9 ± 2.6\*\*\*\* | 18.1 ± 15.0\*\*\* | 1.0 ± 1.1\*\* |
| ฮิสพิดูลิน | 50 | 81.3 ± 3.8 | 62.2 ± 11.4 | 54.0 ± 21.0 | 28.8 ± 3.5 |
|  | 100 | 63.1 ± 10.4 | 30.7 ± 3.5\*\* | 32.5 ± 24.1\* | 8.7 ± 3.2\*\* |
|  | 200 | 28.1 ± 19.6\*\* | 2.2 ± 1.1\*\*\* | 15.2 ± 15.3\*\*\* | 1.0 ± 0.5\*\* |
| เนเพติน | 50 | 72.0 ± 6.8 | 73.2 ± 9.3 | 46.0 ± 19.9\* | 33.7 ± 6.1 |
|  | 100 | 58.3 ± 13.3 | 57.1 ± 18.1 | 29.9 ± 20.9\*\* | 27.3 ± 12.7\* |
|  | 200 | 39.5 ± 14.7\*\* | 9.5 ± 8.4\*\*\* | 19.7 ± 15.4\*\*\* | 2.0 ± 1.3\*\* |
| กรดวานิลลิค | 50 | 82.9 ± 4.7\*\*\* | 71.5 ± 8.2\*\* | 76.6 ± 8.1\*\* | 55.7 ± 8.7\* |
|  | 100 | 84.1 ± 4.0\*\* | 71.6 ± 10.2\*\*\* | 78.2 ± 7.7\*\* | 54.5 ± 14.4\* |
|  | 200 | 81.5 ± 3.9\* | 70.3 ± 10.3\*\*\* | 75.2 ± 5.9\* | 51.9 ± 13.7\*\* |

\*P-value < 0.05, \*\*P-value < 0.01, \*\*\*P-value < 0.001, \*\*\*\*P-value < 0.0001.

4.3 ผลของฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์

การยืนยันฤทธิ์ในการยับยั้งการกดภูมิคุ้มกันของสารประกอบจำเป็นต้องให้มั่นใจได้ว่าเป็นผลจากสารประกอบนั้นแทนที่จะเป็นผลความเป็นพิษต่อเซลล์จากสารที่ใช้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำเทคนิคโฟลไซโตเมทรีร่วมกับการย้อมเซลล์ด้วย annexin V และ propidium iodide (PI) มาวิเคราะห์และจำแนกเซลล์ที่ยังมีชีวิตและเซลล์ตายที่ระยะต่างๆ ได้แก่การตายแบบอะพอพโทซิสระยะต้น (early apoptosis) การตายแบบอะพอพโทซิสระยะปลาย (late apoptosis) และการตายแบบนิโครซิส (necrosis)

สำหรับการศึกษาผลของสารประกอบต่อการตายแบบอะพอพโทซิสนั้น เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์จะถูกกระตุ้นและเติมสารฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค เช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการกระตุ้นของเซลล์ เพียงแต่ขั้นตอนของการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์จะต่างออกไป โดยในที่นี้จะทำการย้อมด้วย annexin V และ PI จากนั้นเซลล์ที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางโฟลไซโตเมทรีเพื่อแสดงให้เห็นลักษณะการตายที่ระยะต่างๆ ของ CD4+ T cells และ CD8+ T cells ภายหลังการกระตุ้นดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 3 ซึ่งจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ และ CD8+ ที่ตายในระยะต่างๆ จะถูกแสดงผลในตารางที่ 2



**รูปที่ 3** แสดงลักษณะการตายของ anti-CD3/28 stimulated CD4+ T cells และ anti-CD3/28 stimulated CD8+ T cells เมื่อทดสอบด้วยฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค ที่ความเข้มข้น 200 µM และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (stimulated control)

ผลการศึกษาไม่พบการเพิ่มขึ้นของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ และ CD8+ ที่ตายแบบอะพอพโทซิสระยะต้นหลังจากเติมสารฮิสพิดูลิน เนเพติน ที่ความเข้มข้นใดๆ (50-200 µM) แต่มีการพบแนวโน้มการตายแบบอะพอพโทซิสระยะปลายของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 200 µM ฮิสพิดูลินเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสระยะปลายเพิ่มขึ้น 10 เท่าในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ นอกจากนี้เนเพตินยังเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสระยะปลายเพิ่มขึ้น 16.8 เท่า ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ และ 7.5 เท่า ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD8+ อย่างไรก็ตามเมื่อดูผลรวมการตายแบบอะพอพโทซิสทั้ง 2 ระยะพบว่าทั้งฮิสพิดูลิน และเนเพตินไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 2 ชนิด (CD4+ และ CD8+) อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับกรดวานิลลิคนั้น ที่ทุกความเข้มข้นไม่พบว่าทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการตายแบบอะพอพโทซิสที่ระยะต่างๆ แต่อย่างใด

**ตารางที่ 2** แสดงจำนวนเซลล์ (%) ของ anti-CD3/28 stimulated CD4+ T cells และ anti-CD3/28 stimulated CD8+ T cells ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิสระยะต้น ระยะปลาย และผลรวมการตายแบบอะพอพ เมื่อทดสอบด้วย EDTA ฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 5)

| **กลุ่มทดลอง** | **ความเข้มข้น**  **(µM)** | **จำนวนเซลล์ (%)** | | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **การตายแบบอะพอพโทซิส**  **ระยะต้น** | | **การตายแบบอะพอพโทซิส**  **ระยะปลาย** | | **ผลรวมการตายแบบ**  **อะพอพโทซิสa** | |
| **CD4+** | **CD8+** | **CD4+** | **CD8+** | **CD4+** | **CD8+** |
| กลุ่มควบคุม  (Stimulated control) | - | 35.5 ± 14.6 | 41.6 ± 19.4 | 3.0 ± 1.8 | 6.5 ± 7.2 | 38.5 ± 16.2 | 48.1 ± 26.0 |
| EDTA  (Positive control) | 2000 | 16.7 ± 2.9 | 33.4 ± 5.9 | 4.8 ± 1.8 | 13.1 ± 2.7 | 21.5 ± 4.3 | 46.5 ± 6.6 |
| ฮิสพิดูลิน | 50 | 17.9 ± 5.0 | 29.8 ± 17.7 | 1.3 ± 0.4 | 2.9 ± 2.7 | 19.2 ± 5.3 | 32.7 ± 20.4 |
|  | 100 | 23.7 ± 5.2 | 29.0 ± 13.1 | 2.4 ± 0.8 | 3.8 ± 2.0 | 26.1 ± 5.8 | 32.8 ± 15.0 |
|  | 200 | 21.4 ± 3.8 | 31.5 ± 14.6 | 30.0 ± 6.7\*\* | 14.8 ± 4.5 | 51.5 ± 8.3 | 46.3 ± 17.2 |
| เนเพติน | 50 | 21.2 ± 2.3 | 32.7 ± 13.4 | 2.1 ± 0.3 | 3.6 ± 2.5 | 23.3 ± 2.2 | 36.3 ± 15.7 |
|  | 100 | 21.4 ± 6.5 | 30.8 ± 13.8 | 15.4 ± 29.0 | 14.7 ± 20.7 | 36.8 ± 27.9 | 45.5 ± 25.5 |
|  | 200 | 19.8 ± 8.5 | 23.0 ± 8.8 | 50.5 ± 32.6\* | 48.6 ± 32.0\* | 70.3 ± 31.3 | 71.6 ± 31.9 |
| กรดวานิลลิค | 50 | 37.6 ± 10.8 | 45.6 ± 13.5 | 4.3 ± 1.7 | 7.9 ± 6.6 | 41.9 ± 12.5 | 53.5 ± 20.0 |
|  | 100 | 37.4 ± 10.4 | 46.0 ± 13.3 | 4.1 ± 1.7 | 7.8 ± 7.0 | 41.5 ± 12.1 | 53.8 ± 20.2 |
|  | 200 | 35.4 ± 11.0 | 44.3 ± 15.5 | 3.9 ± 1.6 | 7.2 ± 7.2 | 39.3 ± 12.4 | 51.5 ± 22.3 |

aผลรวมการตายแบบอะพอพโทซิสได้มาจากผลรวมของการตายแบบอะพอพโทซิสระยะต้นและระยะปลาย,

\*P-value < 0.05, \*\*P-value < 0.01.

**5. การวิเคราะห์ผลการทดลอง**

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามีรายงานการศึกษาผลของฮิสพิดูลินต่อการเพิ่มจำนวน (proliferation) และการกระตุ้น (activation) ของเซลล์ เพื่อดูฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและกดภูมิคุ้มกันเพียงแค่เรื่องเดียว [10] ในขณะที่ไม่พบรายงานใดที่ศึกษาผลของเนเพตินต่อฤทธิ์ดังกล่าว รายงานการศึกษานั้นได้ระบุว่าเมื่อใช้ฮิสพิดูลินที่ถูกแยกสกัดออกมาจากพืชสมุนไพร *Artemisia vestita* ด้วยความบริสุทธิ์ 99.3% ที่ความเข้มข้น 10 µM สามารถยับยั้งการแสดงออกของโมเลกุล CD25 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ที่ได้จากม้ามหนูหลังจากถูกกระตุ้นด้วย concanavalin A (Con A) โดยความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ยับยั้งดังกล่าวได้ถูกนำมาทดสอบว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay [10] อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการศึกษาของโครงการวิจัยนี้พบว่าเมื่อใช้เซลล์ PBMC ที่ได้จากอาสาสมัครและใส่สารมาตรฐานฮิสพิดูลิน (ความบริสุทธิ์ >98%) ที่ความเข้มข้น 10 µM ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของโมเลกุล CD69+ และ CD25+ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ และ CD8+ แต่อย่างใดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงได้ทำการเพิ่มความเข้มข้นขึ้นจนถึง 200 µM และผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ยับยั้งของสารอยู่ที่ 100 และ 200 µM การที่ผลวิจัยที่ได้ของโครงการนี้แตกต่างจากที่มีรายงานในวรรณกรรมอาจเป็นเพราะเซลล์ที่ใช้ในการทดลองต่างกัน เนื่องจากเซลล์ที่ใช้ในโครงการนี้ได้มาจากเลือดของอาสาสมัครมนุษย์ ในขณะที่ในวรรณกรรมเป็นเซลล์ของสัตว์ทดลอง ตลอดจนวิธีการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์และเทคนิคในการวิเคราะห์ด้วยโฟลไซโตเมทรีที่แตกต่างกัน ยิ่งไปกว่านั้นรายงานในวรรณกรรมวัดผลของฮิสพิดูลินเฉพาะการแสดงออกของโมเลกุล CD25 เท่านั้น ซึ่งเป็นไปได้ว่าผลการแสดองออกของโมเลกุลที่ได้อาจเกิดจากกระตุ้นของแอนติเจนหรือไมโตเจนอื่นก่อนหน้าที่จะนำมาทำการทดสอบ ทำให้ผลการทดลองมีค่าความเบี่ยงเบนได้สูง

โครงการวิจัยนี้ยังพบว่าฮิสพิดูลินและเนเพตินมีฤทธิ์และความจำเพาะในการยับยั้งการกระตุ้นของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารที่ใช้ โดยที่ความเข้มข้น 200 µM ทั้งฮิสพิดูลินและเนเพตินสามารถยับยั้งการแสดงออกของโมเลกุลที่บอกถึงการกระตุ้นระยะต้น (CD69 และ CD25) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ และ CD8+ ซึ่งให้ฤทธิ์ในการยับยั้งใกล้เคียงกับการใช้ EDTA (ตัวควบคุมแบบบวก) แต่ในความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ชนิดที่ใช้นั้นน้อยกว่า 10 เท่า จึงสามารถบอกได้ว่าสารทั้ง 2 ชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงกว่า EDTA เมื่อลดความเข้มข้นลงที่ 100 µM ฮิสพิดูลินยังคงสามารถลดการแสดงออกของโมเลกุล CD69 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ ได้ ในขณะที่เนเพตินสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบบจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD8+ และเมื่อลดความเข้นข้นลงต่ำที่ 50 µM เฉพาะเนเพตินที่ยังสามารถลดการแสดงออกเฉพาะของโมเลกุล CD69 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD8+ ได้ ผลการทดลองที่ได้นี้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปศึกษาต่อเพื่อใช้ในการรักษาโรคหรือศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องเมื่อต้องการให้เกิดการยับยั้งการกดภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์

แม้ว่าฮิสพิดูลินและเนเพตินที่ความเข้มข้นสูงถึง 200 µM ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ยังสามารถเห็นแนวโน้มของการตายที่สูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ใช้ ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ใช้จะพบว่าการตายแบบอะพอพโทซิสระยะต้นของเซลล์ลดลงและการตายแบบอะพอพโทซิสระยะปลายของเซลล์สูงขึ้น จึงสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าฮิสพิดูลินและเนเพตินสามารถเร่งกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์จากระยะต้นเข้าสู่ระยะปลาย ดังนั้นความเข้มข้นที่แนะนำสำหรับการกดภูมิคุ้มกันของสารทั้ง 2 ชนิดคือ 100 µM โดยที่คำนึงถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการกระตุ้นของเซลล์ร่วมกับความปลอดภัยในการใช้ นอกจากนี้ยังมีผลจากฮิสพิดูลินและเนเพตินที่ลดการแสดงออกของโมเลกุล CD3 ซึ่งยังไม่มีการศึกษาใดระบุถึงสาเหตุหรือกลไกในการลดลงนี้ ดังนั้นจึงยังเป็นเรื่องที่ท้าทายสำหรับการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารทั้ง 2 ชนิดนี้ต่อไป

สำหรับกรดวานิลลิคนั้นพบว่ามีการศึกษามากมายที่รายงานถึงฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันแต่ยังคงไม่ได้ข้อสรุปที่ชัดเจน [15-18] มีรายงานว่ากรดวานิลลิคสามารถลดการแสดงออกของ COX-2 และการกระตุ้นของ NF-κB ส่งผลให้ระดับของ TNF-α และ IL-2 ลดลงเมื่อให้หนูรับประทานสารที่ขนาด 200 mg/kg [15] ซึ่งมีการยืนยันผลดังกล่าวนี้เมื่อได้มีการทดลองใส่กรดวานิลลิคที่ความเข้มข้น 10 และ 100 µM ในเซลล์แมคโครฟาจจากหนู และยังพบว่าช่วยลดระดับ NO และเกิด caspase-1 deactivation ในแบบที่สัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณความเข้มข้นของสารที่ใช้ [16] อย่างไรก็ตามในโครงการวิจัยนี้ไม่ได้แสดงให้เห็นว่ากรดวานิลลิคมีฤทธิ์ในการกดภูมิคุ้มกันแม้ว่ามีการทดสอบที่ความเข้มข้นสูงถึง 200 µM ความแตกต่างของผลที่ได้นี้อาจมาจากเซลล์ที่ใช้ในการทดลองต่างกัน ระหว่างเซลล์ที่ได้มาจากเลือดของอาสาสมัครมนุษย์ และเซลล์ที่ได้จากสัตว์ทดลอง รวมไปถึงการศึกษากลไกการกดภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกัน ผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานอีกฉบับที่ระบุว่ากรดวานิลลิคไม่ได้มีฤทธิ์ในการกดภูมิคุ้มกัน เนื่องจากไม่ได้มีผลต่อการผลิตไซโตไคน์ชนิด IFN-γ, IL-2 และ IL-4 เมื่อทดลองให้สารที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 ถึง 100 µM ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย concanavalin A (Con-A) [18] จึงเห็นได้ว่าแม้ว่าตัวกระตุ้นเซลล์ที่ใช้จะแตกต่างกัน (ระหว่าง anti-CD3/28 coated beads และ Con-A) ก็ไม่ได้ส่งผลให้ได้ข้อสรุปที่แตกต่างกันออกไป

ผลการทดลองที่ใช้กรดวานิลลิคนั้นพบว่าตลอดช่วงของความเข้มข้นที่ใช้สามารถเพิ่มจำนวนการแสดงออกของโมเลกุล CD25 และ CD69 ทั้งในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4 และ CD8 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้าที่ระบุว่ากรดวานิลลิคที่ความเข้มข้นระหว่าง 5 µg/mL (~30 µM) และ 40 µg/mL (~238 µM) สามารถเพิ่มจำนวนการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์จากเลือดอาสาสมัครและเพิ่มการหลั่ง IFN-γ [17] โดยความเข้มข้นที่ใช้มีใกล้เคียงกับที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ (50-200 µM) ดังนั้นจึงสามารถระบุได้เบื้องต้นว่ากรดวานิลลิคมีศักยภาพในการออกฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันมากกว่าฤทธิ์ในการกดภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ยังมีการพบว่าแม้ว่าสารประกอบกรดวานิลลิคเองไม่มีฤทธิ์ในการกดภูมิคุ้มกัน แต่สารอนุพันธ์ของกรดวานิลลิคนั้นสามารถกดภูมิคุ้มกันได้ มีรายงานแสดงให้เห็นว่า 1,3,4-oxadiazole derivatives ของกรดวานิลลิคสามารถยับยั้งการปล่อยไซโตไคน์ IL-1, IL-6 และ IL-10 ในเซลล์ที่ได้จากต่อมน้ำเหลืองจากหนู [20] ซึ่งน่าสนใจสำหรับการศึกษาต่อไปในอนาคต

**6. สรุปผลการทดลอง**

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาแรกที่รายงานฤทธิ์ในการกดภูมิคุ้มกันของฮิสพิดูลินและเนเพติน ผ่านทางกระบวนการยับยั้งการกระตุ้นของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์เมื่อใช้ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร ฤทธิ์และความจำเพาะในการยับยั้งการกระตุ้นของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ของฮิสพิดูลิน และเนเพตินจะขึ้นอยู่กับปริมาณของสารที่ใช้ โดยไม่พบว่ามีการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงมีความปลอดภัยสำหรับใช้และสามารถนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ในขณะที่กรดวานิลลิคนั้นพบว่ามีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมากกว่าที่จะออกฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน ซึ่งจะมีประโยชน์ในการศึกษาต่อยอดสำหรับนำมาใช้เป็นยารักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันบกพร่องต่อไป

**7. กิติกรรมประกาศ**

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ตามโครงการความร่วมมือระหว่างสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษากับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (MRG5980259)

**8. เอกสารอ้างอิง**

[1] Bond WS. Toxic reactions and side effects of glucocorticoids in man. Am J Hosp Pharm. 1977;34(5):479-485.

[2] Sitzia J, Huggins L. Side effects of cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil (CMF) chemotherapy for breast cancer. Cancer Pract. 1998;6(1):13-21.

[3] Thitilertdecha P, Guy RH, Rowan MG. Characterisation of polyphenolic compounds in *Clerodendrum petasites* S. Moore and their potential for topical delivery through the skin. J Ethnopharmacol. 2014;154(2):400-407.

[4] Thitilertdecha P, Rowan MG, Guy RH. Topical formulation and dermal delivery of active phenolic compounds in the Thai medicinal plant - *Clerodendrum petasites* S. Moore. Int J Pharm. 2015;478(1):39-45.

[5] Srisook K, Srisook E, Nachaiyo W*, et al.* Bioassay-guided isolation and mechanistic action of anti-inflammatory agents from *Clerodendrum inerme* leaves. J Ethnopharmacol. 2015;165:94-102.

[6] Gil B, Sanz MJ, Terencio MC*, et al.* Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipases A2 and inflammatory responses in mice. Life Sci. 1994;54(20):PL333-338.

[7] Akram M, Syed AS, Kim KA*, et al.* Heme oxygenase 1-mediated novel anti-inflammatory activities of *Salvia plebeia* and its active components. J Ethnopharmacol. 2015;174:322-330.

[8] Clavin M, Gorzalczany S, Macho A*, et al.* Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. J Ethnopharmacol. 2007;112(3):585-589.

[9] Cottiglia F, Casu L, Bonsignore L*, et al.* Topical anti-inflammatory activity of flavonoids and a new xanthone from *Santolina insularis*. Z Naturforsch C. 2005;60(1-2):63-66.

[10] Yin Y, Gong FY, Wu XX*, et al.* Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. J Ethnopharmacol. 2008;120(1):1-6.

[11] Sun J, Huo HX, Huang Z, Zhang J, Li J, Tu PF. A new gamma-alkylated-gamma-butyrolactone from the roots of *Solanum melongena*. Chin J Nat Med. 2015;13(9):699-703.

[12] Geng Y, Zhu S, Cheng P*, et al.* Bioassay-guided fractionation of ethyl acetate extract from *Armillaria mellea* attenuates inflammatory response in lipopolysaccharide (LPS) stimulated BV-2 microglia. Phytomedicine. 2017;26:55-61.

[13] Moutia M, Seghrouchni F, Abouelazz O*, et al.* *Allium sativum* L. regulates in vitro IL-17 gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. BMC Complement Altern Med. 2016;16(1):377.

[14] Sripanidkulchai B, Junlatat J. Bioactivities of alcohol based extracts of *Phyllanthus emblica* branches: antioxidation, antimelanogenesis and anti-inflammation. J Nat Med. 2014;68(3):615-622.

[15] Kim SJ, Kim MC, Um JY, Hong SH. The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis. Molecules. 2010;15(10):7208-7217.

[16] Kim MC, Kim SJ, Kim DS*, et al.* Vanillic acid inhibits inflammatory mediators by suppressing NF-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2011;33(3):525-532.

[17] Chiang LC, Ng LT, Chiang W, Chang MY, Lin CC. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of Plantago species. Planta Med. 2003;69(7):600-604.

[18] Miles EA, Zoubouli P, Calder PC. Effects of polyphenols on human Th1 and Th2 cytokine production. Clin Nutr. 2005;24(5):780-784.

[19] Aucher A, Magdeleine E, Joly E, Hudrisier D. Capture of plasma membrane fragments from target cells by trogocytosis requires signaling in T cells but not in B cells. Blood. 2008;111(12):5621-5628.

[20] Tang JF, Lv XH, Wang XL*, et al.* Design, synthesis, biological evaluation and molecular modeling of novel 1,3,4-oxadiazole derivatives based on vanillic acid as potential immunosuppressive agents. Bioorg Med Chem. 2012;20(14):4226-4236.

**ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ**

1. Manuscript สำหรับตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง

**Thitilertdecha P**, Tantithavorn V, Poungpairoj P, Onlamoon N. Determination of immunosuppressive effect of hispidulin, nepetin and vanillic acid on human T-cell activation. (in submission to Journal of International Journal of Immunology and Pharmacology, impact factor 2.347)

2. นำเสนอผลงานรูปแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ

**Thitilertdecha P**, Tantithavorn V, Poungpairoj P, Onlamoon N. Effect of hispidulin, nepetin, and vanillic acid on human T-cell immunity. TRF-OHEC Annual Congress 2018 (TOAC 2018), Phechaburi, Thailand (poster presentation, 10-12 January 2018).

**ภาคผนวก ก -** Manuscript สำหรับตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

**Thitilertdecha P**, Tantithavorn V, Poungpairoj P, Onlamoon N. Determination of immunosuppressive effect of hispidulin, nepetin and vanillic acid on human T-cell activation. (in submission to Journal of International Journal of Immunology and Pharmacology, impact factor 2.347)





****

****

****

****

****

****

****

****

****

****

****

****

****

****

**ภาคผนวก ข -** โปสเตอร์นำเสนอในงานประชุมวิชาการระดับชาติ

**Thitilertdecha P**, Tantithavorn V, Poungpairoj P, Onlamoon N. Effect of hispidulin, nepetin, and vanillic acid on human T-cell immunity. TRF-OHEC Annual Congress 2018 (TOAC 2018), Phechaburi, Thailand (poster presentation, 10-12 January 2018).

