สัญญาเลขที่ MRG5980259

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและกดภูมิคุ้มกันของกรดวานิลลิค และการพัฒนาตำรับที่เหมาะสมสำหรับส่งผ่านทางผิวหนัง

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 สำหรับกลุ่มของกรดวานิลลิคนั้นพบว่าไม่ว่าที่ความเข้มข้นใดก็ตามจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-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) ตัวอย่างที่ได้จะนำไปย้อมกับแอนติ้บอดี้ต่อโมเลกุลต่างๆ 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 ($CD8^+CD25^+$, $CD8^+CD69^+$) และเมื่อลดความเข้มข้น

ลงจนเหลือที่ 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) จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกและพบได้มากในพืชสมุนไพรไทย “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) และ

โพรสตาแกลนดิน 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 $2x10^6$ 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 37°C 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 ตัวอย่างเซลล์ที่ถูกกระตุ้นจะถูกนำมาย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ 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

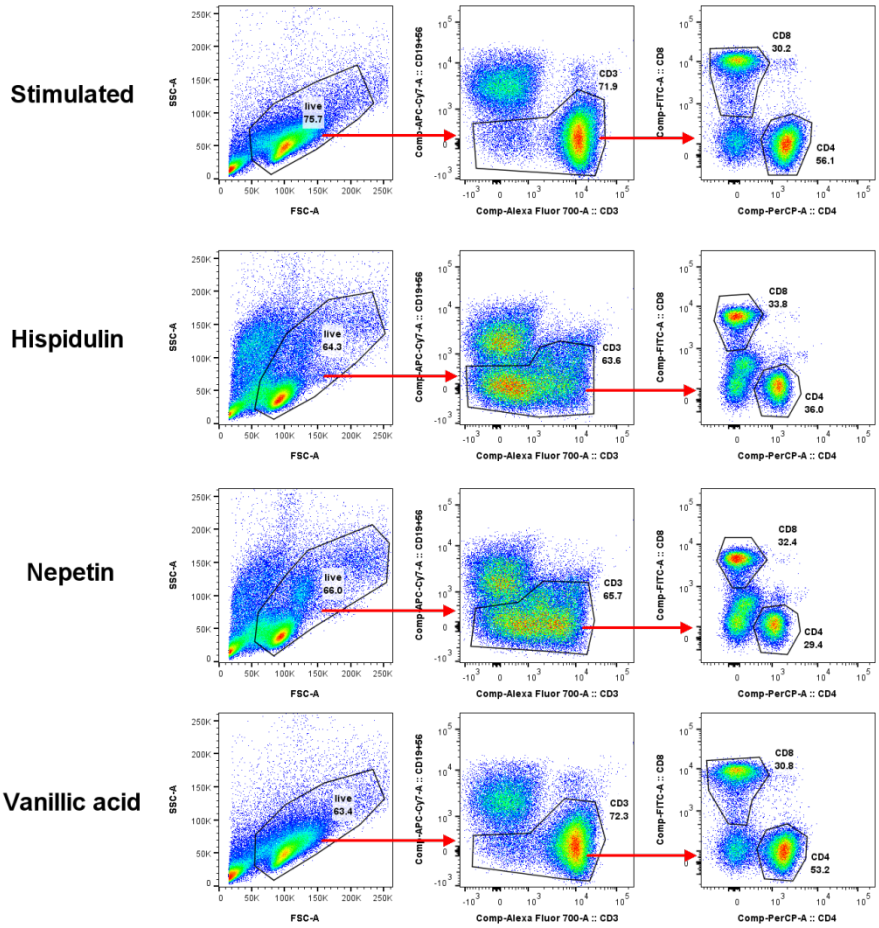
4. ผลการทดลอง

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



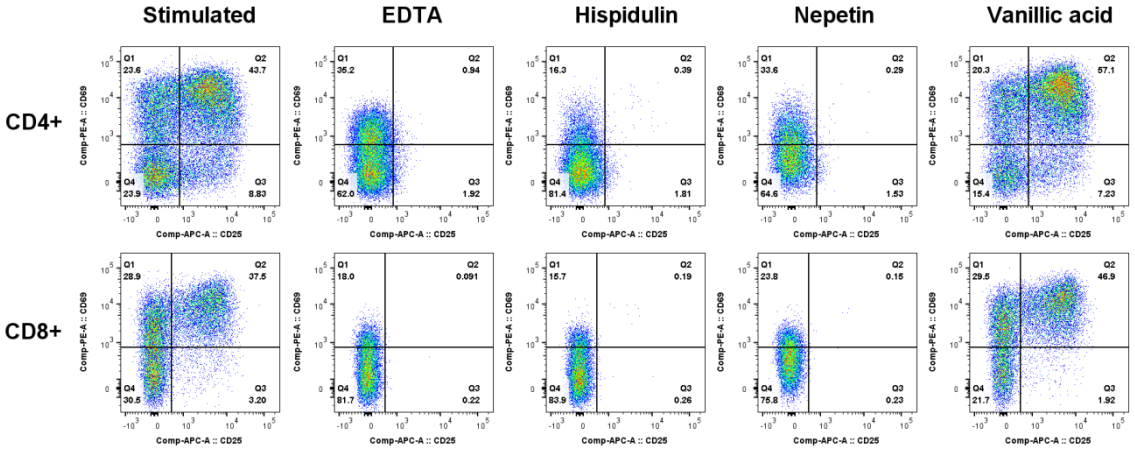
รูปที่ 1 แสดงวิธีการจำแนกเซลล์ชนิด anti-CD3/28 activated CD4+ T cells และ anti-CD3/28 activated CD8+ T cells เมื่อทดสอบด้วยฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค ที่ความเข้มข้น 200 μM และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (stimulated control)

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) สำหรับ

ยืนยันผลในการยับยั้งการกระตุ้นของฮิสพิดูลิน 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**

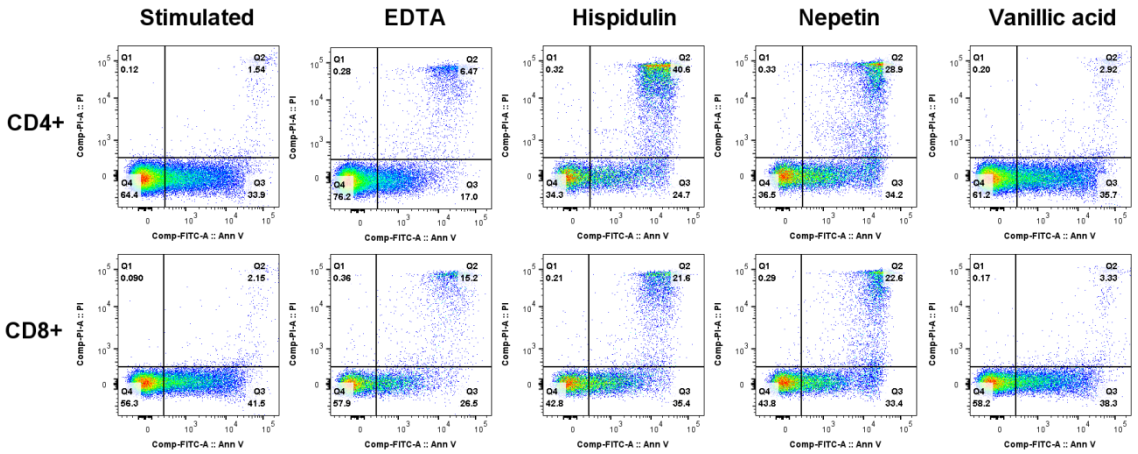
*P-value < 0.05, **P-value < 0.01, ***P-value < 0.001, ****P-value < 0.0001.

4.3 ผลของฮิสพิดูลิน เนเพติน และกรดวานิลลิค ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์

การยืนยันฤทธิ์ในการยับยั้งการกดภูมิคุ้มกันของสารประกอบจำเป็นต้องให้มั่นใจได้ว่าเป็นผลจากสารประกอบนั้นแทนที่จะเป็นผลความเป็นพิษต่อเซลล์จากสารที่ใช้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำเทคนิคโฟลไซโตเมทรีร่วมกับการย้อมเซลล์ด้วย annexin V และ propidium iodide (PI) มาวิเคราะห์และจำแนกเซลล์ที่ยังมีชีวิตและเซลล์ตายที่

ระยะต่างๆ 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 (%)**					
		การตายแบบอะพอพโทซิสระยะต้น		**การตายแบบอะพอพโทซิสระยะปลาย**		**ผลรวมการตายแบบอะพอพโทซิส[a]**	
		$CD4^+$	**$CD8^+$**	**$CD4^+$**	**$CD8^+$**	**$CD4^+$**	**$CD8^+$**
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

[a]ผลรวมการตายแบบอะพอพโทซิสได้มาจากผลรวมของการตายแบบอะพอพโทซิสระยะต้นและระยะปลาย, *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] อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากการศึกษาของโครงการวิจัยนี้พบว่าเมื่อใช้เซลล์ 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 ชนิด คือ 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 A_2 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)

DETERMINATION OF IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECT OF HISPIDULIN, NEPETIN AND VANILLIC ACID ON HUMAN T-CELL ACTIVATION

Premrutai Thitilertdecha[1], Varangkana Tantithavorn[1], Poonsin Poungpairoj[1], Nattawat Onlamoon[1*]

[1]Siriraj Research Group in Immunobiology and Therapeutic Sciences, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

*Corresponding author: Nattawat Onlamoon

Address: Siriraj Research Group in Immunobiology and Therapeutic Sciences, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, 2 Wanglang Road, Bangkoknoi, Bangkok, 10700, Thailand.

Phone: (66)2419-2797, Fax: (66)2411-0175.

E-mail: nattawat.onl@mahidol.ac.th

1

ABSTRACT

Background: Hispidulin, nepetin and vanillic acid are naturally-occurring phenolic compounds which potentially possess anti-inflammatory and immunosuppressive properties. Nevertheless, there is no information concerning T-cell activation and apoptosis using human blood cells.

Purpose: To evaluate pharmacological effect and cytotoxicity of hispidulin, nepetin and vanillic acid on T-lymphocyte activation.

Materials and methods: 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 antibodies against CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD56 and CD69 for the activation assay, and against CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, annexin V and propidium idodide (PI) for the apoptosis assay before analyzed by LSRFortessa flow cytometer.

Results: At the highest concentration (200 μM), the expression frequencies of CD25 and CD69 in $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes were markedly decreased by hispidulin and nepetin. When lowering the concentration to 100 μM, hispidulin still significantly inhibited the expression 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.

Conclusion: Hispidulin and nepetin exhibit dose-dependent inhibitory activity of early activation in T cells without inducing cell death, considering feasible immunosuppressive agents for inflammation-related diseases. 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.

52 **INTRODUCTION**

53 Various immune-related diseases, such as contact hypersensitivity, rheumatoid arthritis,
54 multiple sclerosis and allograft rejection, are related to T cell-mediated immune reaction and
55 require immunosuppressive drugs for treatment. However, these immunosuppressants (e.g.,
56 glucocorticoids and cyclophosphamide) inhibit or prevent the immune activities in non-
57 selective fashion resulting in severe side effects [1, 2]. Therefore, novel active species with high
58 efficacy as well as low toxicity for immunosuppression remain challenge. Naturally-
59 occurring active compounds are considered to be an important part in drug discovery as either
60 final drugs themselves or sources of novel structures.

61 Hispidulin (4′,5,7-trihydroxy-6-methoxyflavone), nepetin (3′,4′,5,7-tetrahydroxy-6-
62 methoxyflavone) and vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid) are phenolic
63 compounds and abundantly found in the Thai medicinal plant called *Clerodendrum petasites*
64 S. Moore [3]. Moreover, the three compounds were reported to be good candidates for skin
65 penetration [4], providing not only oral but also topical routes of drug administration for
66 allergic contact dermatitis. Hispidulin and nepetin are also found in other plant species
67 including *Clerodendrum inerme* (L.) [5], *Clerodendrum indicum* (L) Gaertn [6], *Salvia plebeian*
68 R. Br. (SP) [7], *Eupatorium arnottianum* Griseb. [8], *Santolina insularis* (Genn. Ex Fiori) [9], and
69 *Artermisia vestita* [10]. Vanillic acid is found in several other plants as well, such as *Solanum*
70 *melongena* [11], *Armillaria mellea* [12], *Allium sativum* L. [13], and *Phyllanthus emblica* [14]. Because
71 of flavonoids (i.e., hispidulin and nepetin), and phenolic acid (i.e., vanillic acid) are well-
72 known for anti-inflammatory and immunosuppressive potentials, they have been then
73 interested and recently investigated for these activities.

74 Gil *et al.* (1994) reported that hispidulin was able to inhibit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-
75 acetate (TPA)-induced ear edema in mouse model [6] and reduce croton oil-induced dermatitis
76 in mouse ear [9]. This inhibitory effect was later discovered that the process was mediated
77 through nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase (HO) -1 signaling [7]
78 and not through nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB)
79 induction [8]. Hispidulin also inhibited nitric oxide (NO) and prostaglandin E_2 (PGE_2)
80 production via the blockade of NF-κB deoxyribonucleic acid (DNA)-binding activity and c-
81 Jun N-terminal kinases (JNK) pathway, leading to suppression of inducible nitric oxide
82 synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX)-2 expressions [5]. Moreover, hispidulin was

83 reported to inhibit lipopolysaccharide (LPS)-activated murine macrophages [7] as well as T-cell
84 activation and proliferation in mouse model [10].

85 Likewise hispidulin, nepetin reduced inflammatory processes in both LPS-activated murine
86 macrophages and TPA-induced mouse ear edema models through Nrf2/HO-1 signaling [7]
87 besides diminished croton oil-induced dermatitis in mouse ear [9]. Nevertheless, unlike
88 hispidulin, nepetin was able to inhibit TPA-induced mouse ear edema through NF-κB
89 deactivation [8].

90 For vanillic acid, Kim *et al.* (2010) reported that it was able to suppress the expression of
91 COX-2 and the activation of transcription NF-κB p65, consequently reducing interleukin
92 (IL)-6 production [15]. These were confirmed by another study with further supporting that
93 vanillic acid also inhibited the production of PGE_2 and NO as well as the receptor-interacting
94 protein (RIP)-2/caspase-1 pathway [16]. In contrary to the compound's immunosuppressive
95 ability, vanillic acid was demonstrated to enhance the activity of lymphocyte activation and
96 secretion of interferon (IFN)-γ [17]. However, another report showed there was no disturbance
97 of vanillic acid on the levels of IFN-γ, IL-2 and IL-4 [18].

98 Although anti-inflammatory and immunosuppressive properties of hispidulin and nepetin
99 have been explained by those studies, the information is still not completed as those findings
100 were resulted from experiments in animal models and using isolated compounds from natural
101 plants instead of standard compounds. In this case, the biological properties of the
102 compounds themselves and how they really function in human remain uncertain. On the other
103 hand, the experiments of vanillic acid were performed by using a standard compound
104 providing more reliable data for the compound's pharmacological action; however, its
105 immunomodulatory property still remains ambiguous and controversial from those reports.

106 Our study thus investigated effects of hispidulin, nepetin and vanillic acid on human T-cell
107 stimulation via the expression of activation markers and cytotoxicity via apoptosis assays by
108 using human blood cells in order to pinpoint their immunosuppressive potentials.

109 MATERIALS AND METHODS

110 *Study subjects and sample collection*

111 Ten healthy volunteers were recruited and gave written informed consents prior to
112 participation in this study. The study was ethical approved by the Institutional Review Board
113 of the Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand. Twenty
114 milliliters of blood from individual donor were collected in sodium heparin contained
115 vacutainer tubes (BD Biosciences, USA).

116 *Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) separation*

117 Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were freshly isolated from the collected blood
118 samples by density gradient centrifugation over Ficoll-Paque (Histopaque 1077, Sigma-
119 Aldrich, USA) and then re-suspended in complete medium (RPMI 1640, Gibco, USA)
120 containing 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA), 1% L-glutamine (Gibco, USA), and
121 1% penicillin/streptomycin (Gibco, USA). Numbers of isolated PBMCs were determined by
122 a trypan blue exclusion method.

123 *Standard preparation*

124 Stock solutions (500 μM) of hispidulin (TOCRIS Bioscience Inc., USA), nepetin
125 (Extrasynthase Inc., France) and vanillic acid (Sigma-Aldrich, USA) were prepared in
126 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, USA) before dilution into different
127 concentrations of 50, 100, and 200 μM for activation and apoptosis assays.

128 *Cell stimulation and treated conditions*

129 PBMCs at a concentration of $2x10^6$ cells/mL were stimulated with anti-CD3/28 monoclonal
130 antibodies immobilized on magnetic beads (Dynabeads CD3/28 T-cell expander, Gibco,
131 USA) at a 1:1 bead to cell ratio in a 24-well culture plate and treated with hispidulin, nepetin
132 or vanillic acid at concentrations of 50, 100, and 200 μM (treated samples). Control samples
133 were treated with 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Cellgro, Mediatech Inc.,
134 USA, a positive control) or left untreated (a stimulated control). The samples were then
135 incubated in a CO_2 incubator at 37°C and 5% CO_2 for 24 hours. After that, the beads were
136 removed and the samples were washed with 2% FBS (Gibco, USA) in phosphate buffered
137 saline (PBS, Gibco, USA) prior to immunofluorescence staining for activation and apoptosis
138 assays.

139 *Immunofluorescence staining and analysis*

140 For an activation assay, the anti-CD3/28 stimulated cells from each sample group were
141 stained with a combination of fluorochrome conjugated monoclonal antibodies to identify
142 activated T cells including CD4 PerCP, CD8 FITC, CD25 APC, CD69 PE (BD Biosciences,
143 USA), CD3 A700 and CD19/CD56 APC-Cy7 (BioLegend, USA) for 15 minutes before
144 washed and re-suspended in PBS (Gibco, USA).

145 With respect to an apoptosis assay, the activated cells from individual condition were stained
146 with a combination of fluorochrome conjugated monoclonal antibodies to identify T cells and
147 their apoptotic cells comprising CD3 A700, CD4 BV605, CD8 BV510, and CD19/CD56
148 APC-Cy7 (BioLegend, USA) for 15 minutes. The stained samples were washed and re-
149 suspended in annexin V-binding buffer before stained with FITC conjugated annexin V, and
150 propidium idodide (PI, BD Biosciences, USA) following the manufacturer's instruction.

151 All stained samples were analyzed by LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences, USA)
152 and FlowJo® software (Tree Star, San Carlos, CA).

153 *Data analysis*

154 Statistical analysis was performed using GraphPad Prism® software version 7.02 (GraphPad
155 Software, Inc., La Jolla, CA). Data was expressed as mean ± standard deviation (SD). A
156 paired t-test was used to determine the statistical differences of the mean values between
157 treated groups and an untreated group. P-values < 0.05 were considered as a statistical
158 significance.

159 **RESULTS**

160 *Determination of anti-CD3/28 activated $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes*

161 A key event in excessive inflammation is activation of T lymphocytes which plays a major
162 role in the induction phase of immune responses. T cells are generally activated by specific
163 pieces of antigen presenting on a major histocompatibility complex (MHC) molecules and
164 ligands of co-stimulating molecules. These molecules are presented on infected cells or
165 antigen presenting cells (APCs). In this study, we used anti-CD3/28 coated beads which are
166 most preferable for cell stimulation because of their physiological relevance of cell
167 stimulation to both T-cell receptor complex and co-stimulating molecules.

168 To identify $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell populations, a conventional gating strategy was commonly
169 employed (Fig. 1). Cells were first gated for doublet discrimination (data not shown) and then
170 for live lymphocytes (FSC-A vs SSC-A). A cell population without CD19 and CD56 was
171 gated to eliminate B cells and NK cells before characterization of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells by
172 using a two-dimensional dot plot of CD4 versus CD8. It was observed that $CD3^+$ T cell
173 population was downregulated when treated with hispidulin and nepetin, except vanillic acid,
174 at all concentrations (50-200 μM) when compared with the stimulated control.

175 [insert Fig. 1]

176 *Effects of hispidulin, nepetin and vanillic acid on T-cell activation*

177 Once the cells have been activated, a variety of activation antigens are expressed on their cell
178 surface. CD69 is the earliest expressed antigen on stimulated cells and involves in
179 proliferation and functions as a signal-transmitting receptor in lymphocytes. CD25 is, on the
180 other hand, expressed at the later phase of activation and acts as a signal-transmitting receptor
181 of interleukin-2 (IL-2) for further T-cell stimulation. CD69 and CD25 are thus used as early
182 activation markers. In order to assess the inhibitory effects of hispidulin, nepetin, and vanillic
183 acid at different concentrations on T-cell activation, it is also necessary to have a positive
184 control for comparison. 2 mM EDTA was then chosen as a T-cell activation inhibitor due to
185 its complete inhibition in the formation of conjugates between T cells and their target cells [19].

186 The representative flow cytometric profiles of CD69 and CD25 expressions on stimulated T
187 cells when treated with hispidulin, nepetin and vanillic acid at the concentration of 200 μM
188 are presented in Fig. 2. After the cells were stimulated with anti-CD3/28 coated beads, the
189 stimulated T-cells were treated with different concentrations (50 - 200 μM) of hispidulin,
190 nepetin and vanillic acid. Changes of CD25 and CD69 expression in $CD4^+$ and $CD8^+$ T
191 lymphocytes were then observed (Table 1). At the highest concentration (200 μM) of
192 hispidulin and nepetin, all CD25 and CD69 in $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes were markedly
193 decreased comparing to untreated cells (a stimulated control). It is noted that these decreases
194 from the two compounds were almost similar to those from EDTA (a positive control). When
195 the concentration was lower to 100 μM, hispidulin significantly inhibited CD25 expression in
196 both $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells as well as CD69 in $CD8^+$ T cells, whereas nepetin suppressed
197 CD25 and CD69 markers in $CD8^+$ T lymphocytes. For their lowest concentration of 50 μM,
198 no change of any T-cell activation markers was found when treated with hispidulin but CD69

199 expression in CD8+ T cells were decreased when treated with nepetin. Only vanillic acid at
200 all concentrations did not suppress any marker expression in both T cell subsets, however,
201 vanillic acid increased frequencies of both CD25 and CD69 markers in $CD4^+$ and $CD8^+$ T
202 cells.

203 [insert Fig. 2]

204 **Table 1** Percentages (mean ± SD) of early activation markers ($CD69^+$ and $CD25^+$) in $CD4^+$
205 and $CD8^+$ T cell populations when treated with EDTA (a positive control), and hispidulin,
206 nepetin and vanillic acid at different concentrations compared to a stimulated control (n = 5).

Treated condition	Conc. (μM)	Frequencies (%)			
		$CD4^+$		$CD8^+$	
		$CD69^+$	$CD25^+$	$CD69^+$	$CD25^+$
Untreated (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**
Hispidulin	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**
Nepetin	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**
Vanillic acid	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**

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

208 *Apoptotic induction by hispidulin, nepetin and vanillic acid*

209 When the compounds show immunosuppressive activity, it is essential to ensure whether the
210 results are a direct effect from the compound or a bystander effect. A bystander outcome can
211 occur from the compounds' toxicity causing cell damage. With the flow cytometric technique
212 along with a combination of annexin V and propidium iodide (PI) staining, discrimination of
213 living cells and different stages of damaged cells (death cells) including early apoptotic, late
214 apoptotic, and necrotic cells can be evaluated.

215 T lymphocytes were stimulated and treated with hispidulin, nepetin and vanillic acid under
216 the same conditions as activation experiments before staining with annexin V and PI. The
217 representative flow cytometric profiles of death cell profiling in activated $CD4^+$ and $CD8^+$ T

218 lymphocytes when treated with hispidulin, nepetin and vanillic acid at the concentration of
219 200 μM are also shown in Fig. 3.The changes in percentages of early, late, and total apoptotic
220 cells (a sum of early and late apoptotic cells) in both $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes were
221 then measured (Table 2). Results showed that early apoptotic cells were not increased after
222 treated with hispidulin and nepetin at all concentration, while the tendency of late apoptotic
223 was raised following an increase of the two compounds' concentration. In particular at the
224 concentration of 200 μM, hispidulin considerably induced late apoptotic cells of $CD4^+$ T cells
225 by 10-fold and nepetin induced late apoptotic cells of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells by 16.8- and
226 7.5-folds, respectively. However, when considering the total apoptotic cells, both hispidulin
227 and nepetin did not significantly influent $CD4^+$ and $CD8^+$ populations when compared to the
228 stimulated control. For vanillic acid, the compound not only possibly possesses the
229 immunostimulating effect, but also did not cause cell death in either early or late apoptotic
230 phases.

231 [insert Fig. 3]

232 **Table 2** Percentages (mean ± SD) of early, late and total apoptotic cells in $CD4^+$ and $CD8^+$
233 populations when treated with EDTA (a positive control), and hispidulin, nepetin and vanillic
234 acid at different concentrations compared to a stimulated control (n = 5).

Treated condition	Conc. (μM)	Frequencies (%)					
		Early apoptosis		Late apoptosis		Total apoptosis*	
		$CD4^+$	$CD8^+$	$CD4^+$	$CD8^+$	$CD4^+$	$CD8^+$
Untreated (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
Hispidulin	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
Nepetin	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
Vanillic acid	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

235 *Total apoptotic cells is a sum of early and late apoptotic cells, *P-value < 0.05, **P-value < 0.01.

236

237 **DISCUSSION**

238 There is only one preliminary T-cell proliferation and activation study determined anti-
239 inflammatory and immunosuppressive properties of hispidulin [10], whilst none of nepetin was
240 investigated. The report showed that isolated hispidulin with purity of 99.3% from *Artemisia*
241 *vestita* at the concentration of 10 μM was able to inhibit $CD25^+$ expression in concanavalin A
242 (Con A)-induced T-cell activation using murine spleen cells. This inhibitory concentration
243 was also confirmed by MTT assay for no cytotoxicity [10]. However, when we treated human
244 PMBCs with 10 μM hispidulin (standard compound with purity ≥98%), both early activation
245 markers ($CD69^+$ and $CD25^+$) on CD4+ and CD8+ T cell subsets as identified by using
246 polychromatic flow cytometry remained the same when compared to the stimulated control
247 (data not shown). We then elevated the concentration up to 200 μM and results showed that
248 the effective doses were 100 and 200 μM. These different outcomes might be caused from
249 different types of cells used in the experiments, interspecies variation, or different staining
250 assays and flow cytometry analyses. Moreover, the published report detected the effect of
251 hispidulin on only $CD25^+$ expression of T cells which was possible to be previously induced
252 by other antigens or mitogens, resulting in variation in outcomes.

253 Our study also found that hispidulin and nepetin behave in the same dose-dependent manner.
254 At the concentration of 200 μM, they were able to suppress all early activation markers in
255 both $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells and showed similar inhibitory effect to EDTA (a positive
256 control). However, the two compounds were used 10 times smaller concentration than
257 EDTA, suggesting their higher potency. Hispidulin at the lower concentration (100 μM) still
258 inhibited the expression of activation markers except $CD69^+$ in $CD4^+$ T cells, whereas
259 nepetin had more specific actions by fully suppressing only $CD8^+$ T cells. When lowering the
260 concentration of nepetin to 50 μM, the inhibition was even more specific to CD69 activation
261 marker in $CD8^+$ T cells. This can be useful for some treatments or mechanisms requiring
262 specific T-cell inhibition.

263 Although hispidulin and nepetin at the concentration up to 200 μM did not significantly
264 disturb a number of total apoptotic cells when compared to the stimulated control, the trend
265 of cell death was increasing according to the higher concentration of compounds.
266 Furthermore, early apoptotic cells seemed to be decreased while late apoptotic cells were
267 dramatically increased when compared to the stimulated control, assuming that hispidulin and
268 nepetin could accelerate the programmed cell death from early to late phases. The suggested

269 inhibitory dose, therefore, is 100 μM with promising efficacy and safety. It is worth noting
270 that hispidulin and nepetin at all concentrations also downregulated CD3 expression. To our
271 knowledge, there is no explanation for this event available and it still remains challenge for
272 further exploration in mechanism of actions of the two compounds.

273 With respect to vanillic acid, several studies for its immunomodulatory property were
274 performed with controversial results [15-18]. Vanillic acid was able to reduce COX-2 expression
275 and NF-κB activation, consequently resulting in decreases of TNF-α and IL-2 levels, when
276 orally administrating at 200 mg/kg into mice [15] . The compound also showed these
277 suppressions, NO reduction, and caspase-1 deactivation in a dose-dependent manner when
278 treating with the concentrations of 10 and 100 μM in murine peritoneal macrophages [16].
279 Unfortunately, our results show that vanillic acid at the higher concentrations up to 200 μM
280 had no inhibitory effect on human T-lymphocyte activation and did not causing cell death.
281 These differences might cause from inter-species variation between using mice and human
282 blood samples, and different immune mechanisms of interest. In fact, our T-cell activation
283 data supports the previous report indicating that vanillic acid did not possess the
284 immunosuppressive activity by not affecting cytokine production of IFN-γ, IL-2 and IL-4
285 levels when treating with the concentrations of 0.1 to 100 μM in concanavalin A (Con-A)
286 stimulated human T cells [18]. It is not surprising that the results fall into the same conclusion
287 although different types of T-cell stimulators were chosen (i.e., anti-CD3/28 coated beads vs
288 Con-A).

289 Interestingly, we found that vanillic acid at all concentrations significantly increased
290 expressions of $CD25^+$ and $CD69^+$ in both $CD4^+$ and $CD8^+$ populations. Our results then
291 support the previous investigation exhibiting that vanillic acid at the concentrations between
292 5 μg/mL (~30 μM) and 40 μg/mL (~238 μM) strongly enhanced human lymphocyte
293 proliferation and IFN-γ secretion [17]. The concentrations of vanillic acid used in this study
294 were also similar to those used in our study (50-200 μM). We, therefore, suggest that vanillic
295 acid tentatively possesses immunostimulating property rather than immunosuppression.
296 Although vanillic acid itself is not a good immunosuppressant, its derivatives might be more
297 potent. There was an experiment showing that 1,3,4-oxadiazole derivatives based on vanillic
298 acid exhibited potent inhibitory cytokine releases of IL-1, IL-6 and IL-10 in ConA-stimulated
299 mouse lymph node cells [20]. This is then still required for confirmation in the future.

CONCLUSIONS

This study is the first time to report immunosuppressive property of hispidulin and nepetin on T-cell activation by using human blood. Both compounds show dose-dependent activity for suppression of early activation markers in T lymphocytes without inducing cell death, whereas vanillic acid potentially possesses immunostimulating activity. Hence, our results affirm the potentials of hispidulin and nepetin as the new compounds or sources of novel structure for inflammatory diseases.

ACKNOWLEDGEMENT

This research project was supported by The Thailand Research Fund, Grant Number MRG5980259. PT and NO are also supported by Chalermphrakiat Grant from the same faculty.

The authors also certify that there is no conflict of interests with any financial organizations regarding the material discussed in this study.

REFERENCES

1. Bond WS. Toxic reactions and side effects of glucocorticoids in man. *Am J Hosp Pharm* 1977; 34: 479-485.
2. Sitzia J and Huggins L. Side effects of cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil (CMF) chemotherapy for breast cancer. *Cancer Pract* 1998; 6: 13-21.
3. Thitilertdecha P, Guy RH and Rowan MG. Characterisation of polyphenolic compounds in *Clerodendrum petasites* S. Moore and their potential for topical delivery through the skin. *J Ethnopharmacol* 2014; 154: 400-407.
4. Thitilertdecha P, Rowan MG and 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: 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.

327 6. Gil B, Sanz MJ, Terencio MC, et al. Effects of flavonoids on *Naja naja* and human
328 recombinant synovial phospholipases A_2 and inflammatory responses in mice. *Life Sci*
329 1994; 54: PL333-338.
330 7. Akram M, Syed AS, Kim KA, et al. Heme oxygenase 1-mediated novel anti-
331 inflammatory activities of *Salvia plebeia* and its active components. *J*
332 *Ethnopharmacol* 2015; 174: 322-330.
333 8. Clavin M, Gorzalczany S, Macho A, et al. Anti-inflammatory activity of flavonoids
334 from *Eupatorium arnottianum*. *J Ethnopharmacol* 2007; 112: 585-589.
335 9. Cottiglia F, Casu L, Bonsignore L, et al. Topical anti-inflammatory activity of
336 flavonoids and a new xanthone from *Santolina insularis*. *Z Naturforsch C* 2005; 60:
337 63-66.
338 10. Yin Y, Gong FY, Wu XX, et al. Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of
339 flavones isolated from *Artemisia vestita*. *J Ethnopharmacol* 2008; 120: 1-6.
340 11. Sun J, Huo HX, Huang Z, et al. A new gamma-alkylated-gamma-butyrolactone from
341 the roots of *Solanum melongena*. *Chin J Nat Med* 2015; 13: 699-703.
342 12. Geng Y, Zhu S, Cheng P, et al. Bioassay-guided fractionation of ethyl acetate extract
343 from *Armillaria mellea* attenuates inflammatory response in lipopolysaccharide (LPS)
344 stimulated BV-2 microglia. *Phytomedicine* 2017; 26: 55-61.
345 13. Moutia M, Seghrouchni F, Abouelazz O, et al. *Allium sativum* L. regulates in vitro IL-
346 17 gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *BMC Complement*
347 *Altern Med* 2016; 16: 377.
348 14. Sripanidkulchai B and Junlatat J. Bioactivities of alcohol based extracts of
349 *Phyllanthus emblica* branches: antioxidation, antimelanogenesis and anti-
350 inflammation. *J Nat Med* 2014; 68: 615-622.
351 15. Kim SJ, Kim MC, Um JY, et al. The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative
352 colitis. *Molecules* 2010; 15: 7208-7217.
353 16. Kim MC, Kim SJ, Kim DS, et al. Vanillic acid inhibits inflammatory mediators by
354 suppressing NF-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal
355 macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2011; 33: 525-532.
356 17. Chiang LC, Ng LT, Chiang W, et al. Immunomodulatory activities of flavonoids,
357 monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of
358 Plantago species. *Planta Med* 2003; 69: 600-604.
359 18. Miles EA, Zoubouli P and Calder PC. Effects of polyphenols on human Th1 and Th2
360 cytokine production. *Clin Nutr* 2005; 24: 780-784.

361 19. Aucher A, Magdeleine E, Joly E, et al. Capture of plasma membrane fragments from
362 target cells by trogocytosis requires signaling in T cells but not in B cells. *Blood* 2008;
363 111: 5621-5628.
364 20. Tang JF, Lv XH, Wang XL, et al. Design, synthesis, biological evaluation and
365 molecular modeling of novel 1,3,4-oxadiazole derivatives based on vanillic acid as
366 potential immunosuppressive agents. *Bioorg Med Chem* 2012; 20: 4226-4236.
367

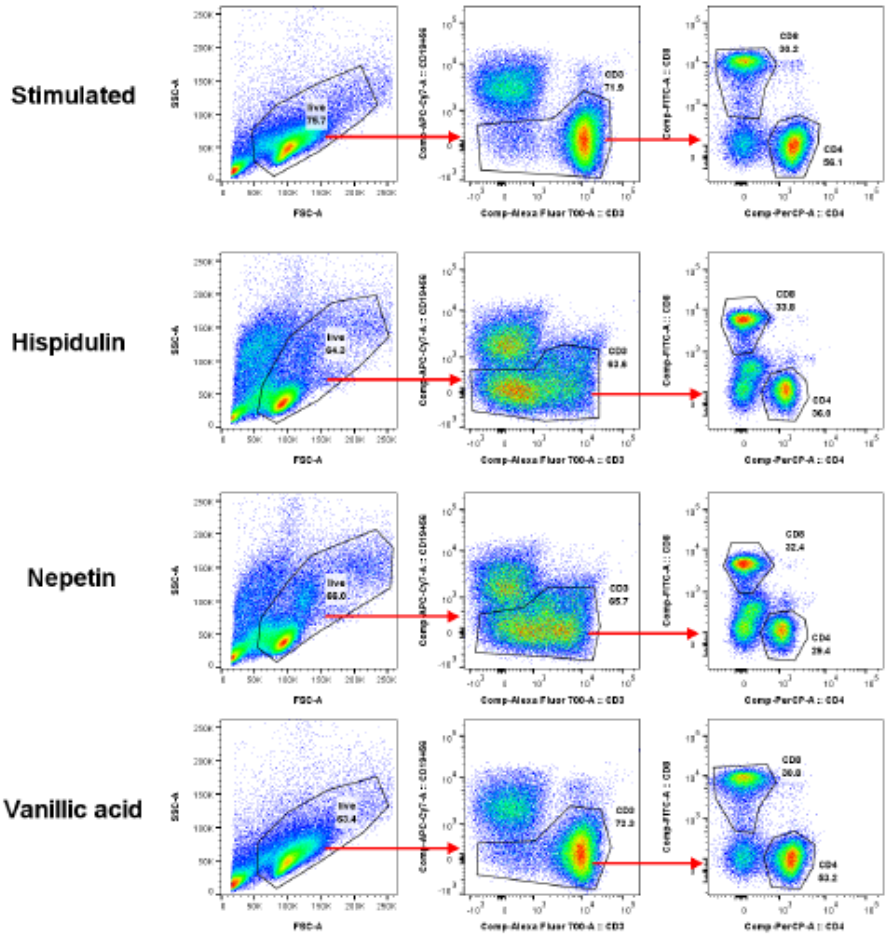


Fig. 1 Phenotypic characterization of anti-CD3/28 activated $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes when treated with hispidulin, nepetin and vanillic acid at the concentration of 200 µM compared to a stimulated control.

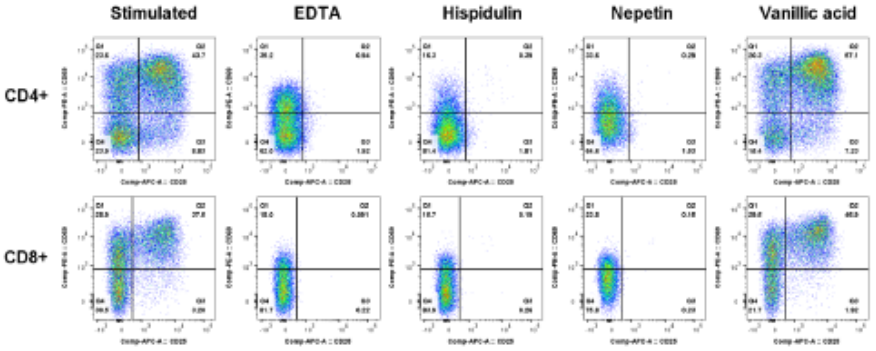


Fig. 2 Representative expression of early activation markers ($CD69^+$ and $CD25^+$) of anti-CD3/28 stimulated $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes when treated with hispidulin, nepetin and vanillic acid at the concentration of 200 μM compared to stimulated and positive controls.

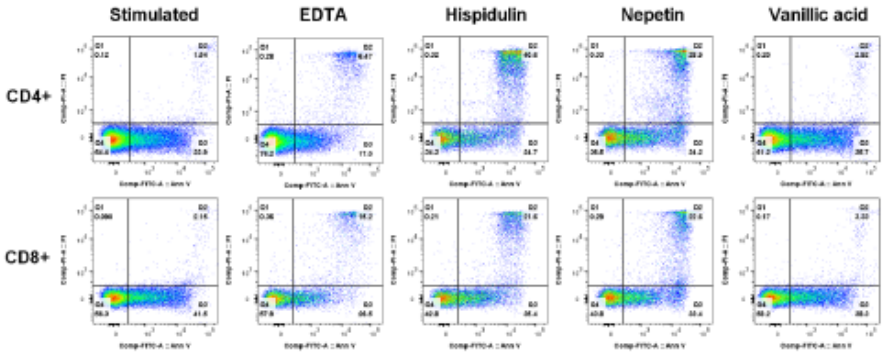


Fig. 3 Representative death cell profiling in anti-CD3/28 stimulated $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes when treated with EDTA (20 mM), hispidulin, nepetin and vanillic acid at the concentration of 200 µM compared to a stimulated control.

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).

EFFECT OF HISPIDULIN, NEPETIN, AND VANILLIC ACID ON HUMAN T-CELL IMMUNITY

Premrutai Thitilertdecha[1,2,*], Varangkana Tantithavorn[1,2], Poonsin Poungpairoj[1,2], Nattawat Onlamoon[1,2]

[1]Siriraj Research Group in Immunobiology and Therapeutic Sciences, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

[2]Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

*Email: premrutai.thi@mahidol.ac.th

INTRODUCTION

Fig. 1
C. petasites.

Hispidulin, nepetin and vanillic acid are natural phenolic compounds and predominantly found in Thai medicinal plant, *Clerodendrum petasites* S. Moore. A few studies of these compounds have been investigated for anti-inflammatory and immunosuppressive properties, nevertheless, there is no information concerning T-cell activation and apoptosis using human blood cells to confirm the biological activities of the compounds.

MATERIALS & METHODS

- Blood samples were taken from 10 healthy volunteers.
- PBMCs were obtained from blood samples by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation.
- PBMCs were stimulated with anti-CD3/28 coated beads and then treated with hispidulin, nepetin, and vanillic acid (50-200 µM) or 2mM EDTA (a positive control) or left untreated (a stimulated control) prior to a 24-h incubation.
- The samples were stained with fluorochrome conjugated monoclonal antibodies against CD3, CD4, CD8, CD25, and CD69 for the activation assay, and against CD3, CD4, CD8, annexin V and propidium idodide (PI) for the apoptosis assay before analyzing by LSRFortessa flow cytometer.

RESULTS

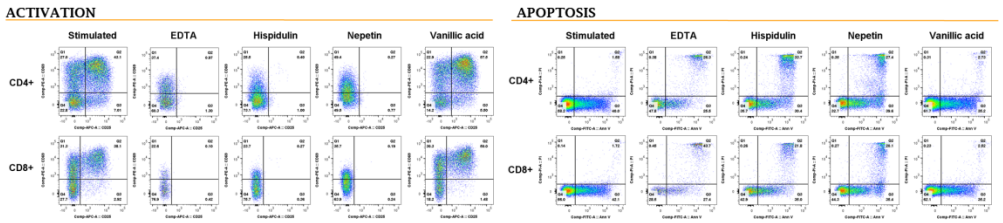


Fig. 2 Representative expression of activated CD4+ and CD8+ T cells when treated with hispidulin, nepetin and vanillic acid at the concentration of 200 µM and compared to stimulated controls for activation and apoptosis.

Activation property

- At the highest concentration (200 µM) of both hispidulin and nepetin, all CD25 and CD69 in CD4+ and CD8+ T lymphocytes were markedly decreased.
- When the concentration was lower to 100 µM, hispidulin significantly inhibited CD25 expression in both activated CD4+ and CD8+ T cells, whereas nepetin suppressed only CD69 marker in CD8+ T cells.
- For the lowest concentration of 50 µM, no change of T cell activation markers (CD25 and CD69) in CD4+ and CD8+ T cells was found from both compounds.
- The effective concentrations for hispidulin and nepetin are thus 100 and 200 µM.
- Vanillic acid at all concentrations had no effect on T-cell activation.

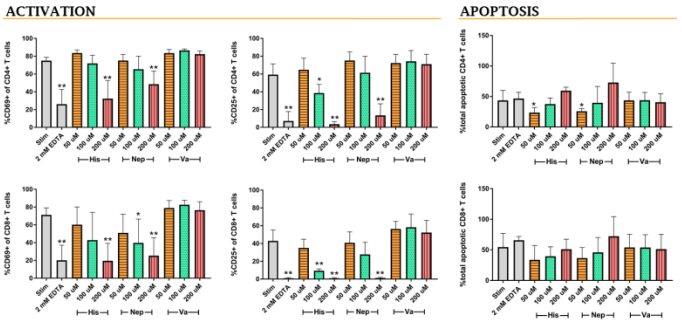


Fig. 3 Percentages of CD69+, CD25+, and total apoptotic cells of CD4+ and CD8+ T cells when treated with hispidulin, nepetin and vanillic acid at different concentrations (50, 100, 200 µM) and compared to stimulated and positive controls (mean ± SD, n = 5).

Apoptosis property

- Each concentration of every compounds did not disturb total apoptotic cells (a sum of early and late apoptotic cells) in both CD4+ and CD8+ populations compared to the stimulated control.

CONCLUSION

Hispidulin and nepetin show dose-dependent activity for suppression of early and late activation markers in T-cell mediated immune responses without inducing cell death, considering potential immunosuppressive agents to treat inflammation. On the other hand, vanillic acid does not possess this property.

ACKNOWLEDGMENT

This project is financially supported by The Thailand Research Fund (MRG5980259).