อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ:
กลไกการกระตุ้นการทำงานของ natural killer cell ของคน โดยอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซิน

โดย ผศ. ดร. ดวงกมล ขันธเลิศ และคณะ

กันยายน 2557

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 17 มิ.ย. 2558
เลขทะเบียน 1679209
เลขเรียกหนังสือ ว QR
145
ส.ล.ง
ว153ร
2557

สัญญาเลขที่ R2557C020

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ:
กลไกการกระตุ้นการทำงานของ natural killer cell ของคน โดยอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซิน

คณะผู้วิจัย

1. ผศ. ดร. ดวงกมล ขันธเลิศ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. นส. พรพิมล จันทะรักษ์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษากลไกการกระตุ้นการทำงานของ natural killer (NK) cell ของคนโดยอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซิน (sericin-derived oligopeptides; SDO) ผลจาก co-culture experiment ซึ่งทดสอบโดยนำอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินมาเลี้ยงร่วมกับ peripheral blood mononuclear cells (PBMC) แสดงให้เห็นถึงความสามารถของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินในการกระตุ้นการทำงานของ NK cell ได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม เมื่อนำอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินมาเลี้ยงร่วมกับ purified NK cell (จาก PBMC) ซึ่งเป็น pre-treatment ก่อนทดสอบ NK activity พบว่า % NK activity มีค่าใกล้เคียงและไม่แตกต่างเมื่อเทียบกับ control ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ ถึงกระนั้นก็ตาม เมื่อนำ cell-free culture supernatant ที่ได้จาก SDO-treated PBMC มาเติมให้กับ purified NK cells และดูผล NK activity กับ K562 (target cells) พบว่า %NK activity เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ control supernatant ที่ได้จาก untreated PBMC และการทดสอบด้วย ELISA เป็นที่น่าสนใจว่าใน SDO-treated culture supernatant มีปริมาณของไซโตไคน์ชนิด interleukin-2 (IL-2) และ interferon-γ (IFN-γ) ในปริมาณที่สูงมาก ผลจากการศึกษาที่ได้รับแสดงให้เห็นว่า การที่อนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินสามารถกระตุ้นการทำงานของ NK cell ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นนั้น ไม่ได้มาจากการกระตุ้น NK cell โดยตรง แต่น่าจะมาจากการที่สารดังกล่าวไปกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันให้หลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ IFN-γ และไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาก็จะไปมีผลกระตุ้นการทำงานของ NK cell ได้ตามมาในที่สุด

คำสำคัญ: อนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซิน, natural killer cells, interleukin-2, interferon-γ

Abstract

This research study investigated the mechanisms of human natural killer cell activation by sericin-derived oligopeptides. In the co-culture experiment where human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were exposed to the SDO, significant increase in NK activity was observed. However, the pre-treatment experiment in which purified NK cells were incubated with SDO and NK activity was subsequently examined revealed that SDO did not induce activity of purified NK cells. It is particularly to note that ELISA assays to detect cytokine production indicated significant elevation of IL-2 and IFN-γ levels in the SDO-treated supernatant compared to untreated control. Taken together, these results suggest that enhanced NK activity by SDO was not due to direct activation of NK cells, but rather that SDO augmented NK activity indirectly by inducing IL-2 and IFN-γ production, and in turn activating NK activity.

Keywords: sericin-derived oligopeptides, natural killer cells, interleukin-2, interferon-γ

เนื้อหางานวิจัย

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

Natural killer (NK) cell คือเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่มของ bone marrow-derived lymphocyte ที่ไม่แสดงลักษณะของ T และ B lymphocyte เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนี้เป็นองค์ประกอบสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) มีหน้าที่หลักในการลาดตระเวน ตรวจตรา ฆ่า และทำลายเซลล์ที่ผิดปกติ โดยเฉพาะเซลล์มะเร็ง และเซลล์ที่ติดไวรัส เนื่องจากสามารถปฏิบัติหน้าที่ได้โดยไม่จำเป็นต้องเรียนรู้ หรือทำความรู้จักกับสิ่งแปลกปลอมนั้น ๆ มาก่อน NK cell จึงนับเป็น first-line of defense ที่สำคัญยิ่งปราการหนึ่งของร่างกาย หาก NK cell มีการทำงานที่ขาดประสิทธิภาพไป พบว่าจะมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งเพิ่มขึ้น ซึ่งในปัจจุบันมีรายงานอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งที่สูงทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้ว และกำลังพัฒนา ส่งผลกระทบมากมายทั้งด้านสาธารณสุข เศรษฐกิจและสังคม

ด้วยวิถีชีวิตในปัจจุบันที่เป็นสังคมแห่งการเร่งรีบ ประกอบกับปัญหามลภาวะ สิ่งแวดล้อม และการเปลี่ยนแปลงของสภาวะโลก การเสริมสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อให้เกิดความต้านทานต่อสิ่งแปลกปลอม เชื้อก่อโรค รวมถึงมะเร็งต่าง ๆ ถือว่าเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็น การเสริมสร้างภูมิคุ้มกันด้วยสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความปลอดภัยสูง และมีผลข้างเคียง (side effect) น้อย โปรตีนจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติก็เป็นหนึ่งซึ่งได้รับการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวาง โปรตีนไฮโดรไลเสท (protein hydrolysates) ที่ได้จากการนำโปรตีนมาผ่านขบวนการ hydrolysis ด้วยกรด ด่าง หรือเอนไซม์ ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ด้วยเปปไทด์สายสั้นหรือ oligopeptides ที่ผ่านขบวนการ hydrolysis แล้วนี้จะมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี ทั้งยังพบว่าเปปไทด์สายสั้นสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) ได้ดีกว่าเปปไทด์สายยาว และ intact protein (Grimble et al., 1987) และเนื่องจากเปปไทด์ขนาดเล็ก ๆ มีแนวโน้มในการเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในไปสู่รูปร่างที่มีความคงตัวมากขึ้น ทำให้ oligopeptides สามารถเกิดโครงสร้าง และเกิดเป็นโมเลกุลที่มี receptor ที่มีความจำเพาะ ดังนั้น oligopeptides จึงเป็นเปปไทด์ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมโปรตีนอื่น ๆ พบว่าเปปไทด์ขนาดเล็กนี้มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการทำงานของระบบต่าง ๆ ของร่างกาย (Clare and Swaisgood 2000) รวมถึงระบบภูมิคุ้มกัน (Deigin et al., 2006; Kayser and Meisel 1996; Madureira et al., 2007; Morris et al., 2007; Oses-Prieto et al., 2000) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว จึงทำให้ oligopeptide ถูกนำมาใช้ประโยชน์มากมาย โดยเฉพาะที่เกี่ยวกับสุขภาพ

ซิริซินหรือกาวไหมเป็นโปรตีนจากธรรมชาติที่พบได้ในรังไหม ทำหน้าที่เคลือบและห่อหุ้มเส้นใยไหมเพื่อให้คงรูปร่างอยู่เป็นรังไหม ซึ่งซิริซินนี้ทำให้ลักษณะผิวของเส้นใยไหมแข็งกระด้าง ในอุตสาหกรรมการผลิตผ้าไหมในกระบวนการสาวไหมและลอกกาวไหม จะมีการกำจัดซิริซินออก และกลายเป็นของเสีย

เหลือทิ้ง ที่สำคัญยากที่จะกำจัดออกจากน้ำเสีย จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาในน้ำ หากขาดการบำบัดที่ดีจะทำให้เกิดกลิ่นเหม็น ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม หรือหากมีการบำบัดก็มีค่าใช้จ่ายที่สูง (Fabiani et al., 1996) อย่างไรก็ตาม กว่าสิบปีที่ผ่านมา โปรตีนซิริซินได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากผลงานวิจัยมากมายได้ระบุถึงฤทธิ์ที่สำคัญทางเภสัชวิทยา อาทิเช่น การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Kato et al., 1998) การป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลต (Zhaorigetu et al., 2003) การดูดซับความชุ่มชื้น และการยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase (Kato et al., 1998) ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า ซิริซินสามารถลดระดับ cholesterol (Limpeanchob et al., 2010) และช่วยยับยั้งมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Zhaorigetu et al., 2001) ได้ เนื่องจากซิริซินเป็นโปรตีน จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาย่อยสลายได้ด้วยน้ำ (hydrolysis) ผลจากการย่อยสลายซิริซินจะได้เปปไทด์ขนาดเล็กของซิริซิน (sericin derived oligopeptides) จากฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลายของซิริซิน และคุณสมบัติของเปปไทด์สายสั้น โดยเฉพาะในแง่ของการดูดซึมที่ดีกว่าเปปไทด์สายยาว ประกอบกับผลการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินจากรังไหมเหลืองในการส่งเสริมการทำงานของ NK cells ให้สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้ดีขึ้น (Kunthalert et al., Unpublished data) อย่างไรก็ตาม ในการพัฒนาอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินเพื่อใช้ประโยชน์เชิงสุขภาพ และขยายผลในเชิงพาณิชย์ ยังคงมีความจำเป็นต้องทราบถึงกลไกกระตุ้นการทำงานดังกล่าว ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เสนอโครงการนี้ขึ้นเพื่อศึกษากลไกที่อนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินใช้ในการกระตุ้นการทำงานของ NK cell ผลการวิจัยที่ได้รับจะทำให้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยเฉพาะต่อระบบภูมิคุ้มที่สำคัญ และเพิ่มศักยภาพการแข่งขันทางการตลาด รวมถึงเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับไหมเหลืองซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ผลิตได้ภายในประเทศ และถือเป็นแหล่งโปรตีนปลอดสารพิษอีกด้วย

2. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

Natural killer (NK) cell คือเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่มของ bone marrow-derived lymphocyte เป็นลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่ที่มีแกรนูลจำนวนมากอยู่ใน cytoplasm (large granular lymphocyte) เป็นลิมโฟไซต์ที่ไม่แสดงลักษณะของ T และ B cell และมีฟีโนไทป์เป็น CD16+CD56+ และ CD3- เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนี้เป็นองค์ประกอบสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) มีหน้าที่หลักในการรับรู้ ฆ่าและทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส และทำลายเซลล์มะเร็งหลายชนิดได้ โดยไม่จำเป็นว่าเซลล์เป้าหมายนั้นจะแสดงส่วนของแอนติเจนที่ NK cell เคยรู้จักมากก่อน และไม่ต้องการ major histocompatibility complex (MHC) ในการนำเสนอแอนติเจนเหมือน cytotoxic T cell (CTL) การทำลายเซลล์เป้าหมายโดย NK cell จึงเป็นแบบไม่จำเพาะ ที่สามารถควบคุมการติดเชื้อไวรัส และกำจัดเซลล์มะเร็งได้ก่อนการทำงานของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity) บทบาทของ NK cell ในการควบคุมการติดเชื้อไวรัสแสดงให้เห็นจากการศึกษาการติดเชื้อ herper simplex virus, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus และ human immunodeficiency virus (HIV) (Biron et al., 1999; Venema et al., 1994) มีรายงานการทำงานของ NK cell ที่ลดลงในผู้ป่วยที่มีภาวะ

ภูมิคุ้มกันบกพร่องแบบ primary immunodeficiency และผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ระยะสุดท้าย (Rook et al., 1983; Whiteside and Herbermann 1994) กรณีของมะเร็ง นอกจากกำจัด transformed cells แล้ว ยังมีรายงานการศึกษาที่ระบุว่า NK cell สามารถควบคุมการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (tumor metastasis) ได้อีกด้วย (Smyth et al., 1999, 2002) และหาก NK cell มีการทำงานที่ขาดประสิทธิภาพไป จะมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งเพิ่มขึ้น NK cell จึงนับเป็น first-line of defense ที่สำคัญยิ่งปราการหนึ่งของร่างกาย การทำงานของ NK cell ในการทำลายเซลล์เป้าหมายนั้น เกี่ยวข้องกับหลายกลไก ซึ่ง granule exocytosis ถือว่าเป็นกลไกที่สำคัญ ภายหลังการสัมผัสโดยตรงระหว่าง NK cell และเซลล์เป้าหมาย NK cell จะได้รับสัญญาณ และจะหลั่งสารต่าง ๆ ในแกรนูล (degranulation) ที่สำคัญได้แก่ perforin และ granzyme ออกมา สาร perforin จะทำให้เกิดรูรั่วบนผิวของ target cells และทำให้ granzyme สามารถเข้าไปสู่ใน cytoplasm ใน target cell ได้ Granzyme จะทำให้เกิด apoptosis เซลล์ที่เป็น target หรือ infected cells ก็จะแตกสลายไปได้ด้วยขบวนการนี้ NK cell ยังสามารถทำลาย target cell ได้โดยผ่านการจับกันระหว่าง FasL บนผิว NK cell และ Fas (CD95) บน target และชักนำให้เกิด apoptosis ใน target cell (Smyth et al., 2005) นอกจากกลไกที่เกี่ยวข้องกับ NK cell โดยตรงแล้ว การทำลายเซลล์เป้าหมายของ NK cell ยังถูกควบคุมโดยผ่านการทำงานของไซโตไคน์ ซึ่ง IL-2 และ IFN-γ เป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการทำงานของ NK cell ให้เพิ่มฤทธิ์ในการทำลายเซลล์เป้าหมายมากขึ้น (Abbas, Lichtman and Pillai, 2012) นอกจากนี้ IL-2 ยังอาจก่อให้เกิด apoptosis ผ่านทาง Fas pathway อีกด้วย

โปรตีนไฮโดรไลเสท (protein hydrolysates) เป็นสารประกอบโปรตีนขนาดเล็กที่ผ่านกระบวนการย่อยแล้ว ด้วยกรด ด่าง หรือเอนไซม์ มีทั้งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพืช จากสัตว์ และจากยีสต์ เปปไทด์สายสั้นหรือ oligopeptides ที่ผ่านขบวนการ hydrolysis แล้วนี้ จะมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี ทั้งยังพบว่ามีข้อดีในแง่ของการดูดซึม จากรายงานการวิจัยพบว่า เปปไทด์ที่ได้จากการตัดหรือย่อยโปรตีนซึ่งเลียนแบบกระบวนการย่อยโปรตีนของมนุษย์ สามารถถูกดูดซึมได้อย่างรวดเร็ว และมากกว่าที่อยู่ในรูปเปปไทด์สายยาว การวิจัยซึ่งศึกษาเปรียบเทียบโปรตีนที่ไม่ได้ถูกย่อย, โปรตีนไฮโดรไลเสท และกรดอะมิโนที่อยู่ในรูปอิสระ ต่อการเจริญเติบโตในหนู Wistar ผลพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจะถูกดูดซึมได้เร็วกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อย หรือแม้กระทั่งกรดอะมิโนอิสระ (Poullain et al., 1989) ผลการศึกษาวิจัยอีกฉบับก็เป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดย Grimble และคณะ (1987) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนเวย์ (whey protein) ไข่ และ เคซีน (casein) เมื่อนำมาตัดหรือย่อยเป็น ไดเปปไทด์ และ ไตรเปปไทด์ จะถูกดูดซึมได้ดีและเร็วกว่าโปรตีนที่ไม่ได้ถูกย่อย ยิ่งไปกว่านั้น ยังพบว่าเปปไทด์สายสั้นหรือ oligopeptides จะมีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ และคุณสมบัติด้านชีวเคมีที่แตกต่างจากโปรตีนโมเลกุลใหญ่ (polypeptides) โดยเฉพาะเปปไทด์ขนาดเล็ก ๆ ที่มีแนวโน้มในการเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในไปสู่รูปร่างที่มีความคงตัวมากขึ้น ทำให้ oligopeptides สามารถเกิดโครงสร้าง และเกิดเป็นโมเลกุลที่มี receptor ที่มีความจำเพาะ ทำให้ oligopeptides มีบทบาทสำคัญในการควบคุมโปรตีนอื่น ๆ และควบคุมการทำงาน

ของระบบต่าง ๆ ที่สำคัญภายในร่างกาย อาทิเช่น ระบบประสาท ระบบต่อมไร้ท่อ (Clare and Swaisgood 2000) รวมถึงระบบภูมิคุ้มกัน (Kayser and Meisel 1996; Deigin et al. 1999; Oses-Prieto et al. 2000; Gauthier, Pouliot and Saint-Sauveur, 2006; Madureira et al. 2007; Morris et al. 2007) นอกจากนี้งานวิจัยหลายฉบับได้ระบุถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสท เช่นฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ลดความดันโลหิต และฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Theodore et al., 2008; Xie et al., 2008; Praveesh et al., 2011; Meisel, 2007) เป็นต้น ปัจจุบันจึงมีการนำโปรตีนไฮโดรไลเสทมาใช้ประโยชน์เชิงสุขภาพ สำหรับเป็นส่วนประกอบของอาหารทางการแพทย์ หรืออาหารที่เป็นยา (neutraceuticals) มากขึ้น

โปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีฤทธิ์ทางภูมิคุ้มกัน มีรายงานว่ามาจากหลายแหล่ง ทั้งโปรตีนจากสัตว์ พืช ชนิดต่าง ๆ รวมถึงสาหร่าย โปรตีนเวย์ (whey protein) ที่ได้มาจากนมวัว เมื่อนำมาผ่านขบวนการ hydrolysis ด้วยเอนไซม์ให้ได้เป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก พบว่ามีฤทธิ์ทางภูมิคุ้มกันหลายประการ โดยมีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของลิมโฟไซต์ (lymphocyte activation and proliferation) การสร้างไซโตไคน์ (cytokine secretion) และการสร้างแอนติบอดี (antibody production) นอกจากนี้ยังพบว่าไฮโดรไลเสทของโปรตีนเวย์ยังมีผลต่อ phagocytic activity รวมถึงการทำหน้าที่ของ NK cell ในระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดอีกด้วย (Gauthier, Pouliot and Saint-Sauveur, 2006) งานวิจัยอีกฉบับซึ่งนำโปรตีนเวย์ (whey protein isolates; WPI) โปรตีนเวย์ที่ผ่านการย่อยด้วย trypsin:chymotrypsin (enzyme digest; ED) และ peptide fractions ของ ED มาศึกษาฤทธิ์ทางภูมิคุ้มกัน โดยใช้ murine splenocytes ในสภาวะ resting และ concanavalin-A stimulated splenocytes พบว่า ทั้ง WPI, ED และ peptide fractions สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ murine splenocytes ในสภาวะ resting และ concanavalin-A stimulated splenocytes ได้ เมื่อทดสอบการสร้างไซโตไคน์ พบว่า WPI และ ED ไม่มีผลต่อการสร้างไซโตไคน์ชนิด Th1 (IL-2, IFN-γ) และ Th2 (IL-4, IL-10) ในขณะที่ peptide fractions สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-2, IFN-γ ได้ การศึกษาฉบับเดียวกันนี้ยังรายงานว่า WPI มีฤทธิ์ยับยั้ง ConA-induced cytokine secretion ในขณะที่ ED และ peptide fractions ส่งเสริมการสร้าง IFN-γ (Saint-Sauveur et al., 2008) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงความสามารถของเปปไทด์ขนาดเล็กในการกระตุ้นการทำงานของลิมโฟไซต์ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีบทบาทสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ การศึกษาสืบเนื่องอีกฉบับที่นำ WPI และ peptide fractions ได้แก่ neutral fraction (4.5 < pH < 7), acidic fraction (pH < 4.5) และ basic fraction (pH > 7) มาป้อนให้แก่หนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c ทุกวันเป็นเวลานาน 7 วัน พบว่า WPI และ peptide fractions (ทั้ง 3 fractions) สามารถกระตุ้นให้หนูมีการสร้างแอนติบอดีชนิด immunoglobulin A (IgA) ได้เพิ่มขึ้น และเฉพาะ neutral fraction สามารถกระตุ้นการสร้าง IFN-γ ในขณะที่ acidic fraction มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ดังกล่าว (Saint-Sauveur et al., 2009) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงบทบาททางภูมิคุ้มกัน

ที่แตกต่างกันของแต่ละ peptide fraction ที่มาจากโปรตีนเวย์แหล่งเดียวกัน นอกจากโปรตีนเวย์แล้ว ยังมีการศึกษาฤทธิ์ทางภูมิคุ้มกันของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากปลาชนิดต่างๆ อาทิ เช่น จากปลา *Merluccius productus* โดยทำการศึกษาในหนู BALB/c และให้ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากปลาดังกล่าว ในปริมาณ 0.20, 0.25 และ 0.30 mg/ml นาน 2, 5 และ 7 วัน ในขณะที่กลุ่มควบคุมได้รับเฉพาะน้ำกลั่น ผลพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจากปลา *M. productus* เมื่อให้แก่หนูในปริมาณ 0.30 mg/ml สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจับกินสิ่งแปลกปลอมของ macrophage, เพิ่มจำนวนเซลล์ที่สร้าง IgA และเพิ่มปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-4, IL-6 และ IL-10 ได้ (Duarte et al., 2006) จากการศึกษาเปปไทด์ขนาดเล็กที่ได้จากปลา Chum salmon (*Oncorhynchus keta*) ในหนูสายพันธุ์ ICR โดยให้หนูได้รับเปปไทด์ขนาดเล็กที่ได้จากปลาดังกล่าวในปริมาณ 0.22, 0.45, และ 1.35 g/kg/BW ทาง intragastric เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และทดสอบการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ splenic lymphocyte พบว่าลิมโฟไซต์ของหนูกลุ่มที่ได้รับเปปไทด์ขนาดเล็กนี้ มีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนเซลล์ที่สร้างแอนติบอดี ความสามารถในการทำงานของ NK cell และการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2, IFN-γ, IL-5 และ IL- 6 เพิ่มขึ้นในหนูกลุ่มนี้ด้วย (Yang et al., 2009) Wang และคณะ (2010) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ทางภูมิคุ้มกันของโปรตีนจากหอย *Crassostrea gigas* ซึ่งผ่านการ hydrolysis ด้วยเอนไซม์โปรตีเอสในหนูสายพันธุ์ BALB/c โดยการเหนี่ยวนำให้หนูเป็นมะเร็งด้วยการฉีด Sarcoma S-180 ก่อน หลังจากนั้นจึงให้หนูได้รับโปรตีนไฮโดรไลเสท ในปริมาณ 0.25, 0.5 และ 1 mg/g BW ทางปาก ภายหลังจากหนูได้รับโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก *C. gigas* นาน 14 วัน พบว่าก้อนของเซลล์มะเร็งมีขนาดเล็กลง การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันดีขึ้น โดย macrophage ของหนูดังกล่าวมีดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอมเพิ่มมากขึ้น นอกจากนั้นยังพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสทจาก *C. gigas* มีฤทธิ์เสริมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของลิมโฟไซต์ และยังทำให้การทำงานของ NK cell มีประสิทธิภาพมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งแต่ไม่ได้รับสารโปรตีนไฮโดรไลเสทจากหอย *C. gigas*

นอกจากโปรตีนจากสัตว์แล้ว ยังได้มีการศึกษาฤทธิ์ของเปปไทด์จากถั่วเหลืองต่อระบบภูมิคุ้มกันในหนูสายพันธุ์ Fisher โดยทำการศึกษาความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอมของ macrophages พบว่า macrophages จากหนูซึ่งได้รับเปปไทด์จากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน มีความสามารถในการจับกินเม็ดเลือดแดงแกะได้ดีขึ้น (Yamagushi et al., 1993) อีกการศึกษาซึ่งนำโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลืองมาทดสอบความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ splenocyte ก็พบว่าเปปไทด์จากถั่วเหลืองสามารถเพิ่ม proliferation index ได้ (Chen et al., 1995) นอกจากเอนไซม์เปปซิน การศึกษาต่อมาได้มีการนำเอนไซม์อื่น ๆ ได้แก่ alcalase, alcalase+flavourzyme และ papain มาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลือง และทดสอบความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ splenic lymphocyte ของหนูสายพันธุ์ BALB/c ซึ่งก็พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลืองที่ถูกเตรียมด้วยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ส่งเสริมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของลิมโฟไซต์ ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี ConA ทั้งยังพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลืองที่ถูกเตรียมด้วยเอนไซม์ alcalase ทำให้

peritoneal macrophage มีความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอมได้ดีขึ้น (Kong et al., 2008) และเนื่องจากสาหร่ายเป็นแหล่งของโปรตีน จึงได้มีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella vulgaris* และนำมาทดสอบฤทธิ์ทางภูมิคุ้มกันในหนูสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ โดยทำให้หนูอยู่ในภาวะอดอาหารก่อนเป็นเวลา 3 วัน และศึกษาการฟื้นกลับคืนของระบบภูมิคุ้มกันของหนู เมื่อได้รับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากสาหร่าย Chlorella (Cv-PH) พบว่าการที่หนูได้รับ Cv-PH ปริมาณ 500 mg/kg BW เป็นระยะเวลา 8 วัน นอกจากจะมีปริมาณ macrophage ที่เพิ่มขึ้นแล้ว ความสามารถในการทำงานซึ่งวัดจากปริมาณของเอนไซม์ acid phosphatase ใน macrophage ก็เพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่อดอาหารแต่ไม่ได้รับ Cv-PH อีกทั้งโปรตีนไฮโดรไลเสทจากสาหร่ายนี้ก็ยังมีฤทธิ์เพิ่มการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีแบบ T-dependent และทำให้เกิดการตอบสนอง delayed-type hypersensitivity (DTH) ได้อีกด้วย (Morris et al., 2007)

ซิริซินคือโปรตีนส่วนที่เคลือบอยู่บนผิวของเส้นไหมของหนอนไหม ทำหน้าที่เคลือบและห่อหุ้มเส้นใยไหมเพื่อให้คงรูปร่างอยู่เป็นรังไหม ซึ่งซิริซินนี้ทำให้ลักษณะผิวของเส้นใยไหมแข็งกระด้าง โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโนถึง 18 ชนิด ที่พบมากได้แก่ เซอรีน (serine) กรดแอสปาติก (aspartic acid) และไกลซีน (glycine) ซึ่งมีประมาณ 33.4, 16.7 และ 13.5% ตามลำดับ (Zhaorigetu et al., 2001) ในอุตสาหกรรมการผลิตผ้าไหมในกระบวนการสาวไหมและลอกกาวไหม จะมีการกำจัดซิริซินออกและกลายเป็นของเสียเหลือทิ้ง ที่สำคัญยากที่จะกำจัดออกจากน้ำเสีย จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาในน้ำ หากขาดการบำบัดที่ดีจะทำให้เกิดกลิ่นเหม็น ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม หรือหากมีการบำบัดก็มีค่าใช้จ่ายที่สูง (Fabiani et al., 1996) อย่างไรก็ตาม กว่าสิบปีที่ผ่านมา โปรตีนซิริซินได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากผลงานวิจัยมากมายได้ระบุถึงฤทธิ์ที่สำคัญทางเภสัชวิทยา อาทิเช่น การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Kato et al., 1998) การป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลต (Zhaorigetu et al., 2003) การดูดซับความชุ่มชื้น และการยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase (Kato et al., 1998) ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า ซิริซินสามารถลดระดับ cholesterol (Limpeanchob et al., 2010) และช่วยยับยั้งมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Zhaorigetu et al., 2001) เนื่องจากซิริซินเป็นโปรตีนที่สามารถเกิดปฏิกิริยาย่อยสลายได้ด้วยน้ำ (hydrolysis) ได้เป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก จากรายงานการวิจัยเมื่อไม่นานมานี้ ได้มีการนำไฮโดรไลเสทของโปรตีนซิริซินมาทดสอบฤทธิ์ในหนูเบาหวาน C57BL/KsJ-db/db โดยการให้หนูได้รับ silk protein hydrolysate E5K6 ปริมาณ 0.1 และ 0.2 g/kg body weight สำหรับหนูเบาหวานกลุ่มควบคุมได้รับเฉพาะน้ำกลั่น ภายหลัง 4 สัปดาห์ พบว่าระดับ plasma glucose และ blood glycated hemoglobin ในหนูกลุ่มที่ได้รับ E5K6 ทั้งสองกลุ่มลดลง เมื่อเทียบกับหนูเบาหวานกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของ total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol และ atherogenic index ในพลาสมาของหนูกลุ่มที่ได้รับ E5K6 ปริมาณ 0.2 g/kg body weight ลดลงเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม และเมื่อวัดอินซูลินในพลาสมา ก็พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูเบาหวานที่ได้รับ E5K6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Jung et al., 2010) ผลการศึกษานี้ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของ silk protein hydrolysate สำหรับโรคเบาหวานที่เป็นปัญหา

สำคัญในปัจจุบัน ถึงกระนั้นก็ตามการวิจัยไฮโดรไลเสทของโปรตีนซิริซินที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพ ก็ยังมีการรายงานไม่มากนัก และจนถึงปัจจุบันฤทธิ์ทางภูมิคุ้มกันของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินจากรังไหมเหลือง โดยเฉพาะผลต่อ NK cell activity ก็ยังไม่พบการวิจัยตีพิมพ์ใดๆ

3. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษากลไกการกระตุ้นการทำงานของ natural killer cell ของคนโดยอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซิน

4. วิธีการทดลอง

4.1 สารที่ใช้ทดสอบ

สารที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ อนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซิน ขนาดประมาณ ≤ 5 kDa ได้มาจากการย่อยโปรตีนซิริซินด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 Human subjects

ตัวอย่างในการศึกษานี้ จะใช้ส่วนประกอบของเลือดคือ buffy coat (blood leukocytes) ซึ่งแยกได้จากเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีร่างกายสมบูรณ์ จากงานธนาคารเลือด กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลพุทธชินราช พิษณุโลก ซึ่ง buffy coat จากผู้บริจาคโลหิตได้มาจากการปั่นแยกส่วนประกอบของเลือดตามวิธีการของการธนาคารเลือดสากล เป็นส่วนประกอบเลือดที่ทำการแยกเป็นประจำ และมีอยู่แล้ว และไม่ได้นำมาใช้เพื่อรักษาผู้ป่วย

โครงการวิจัยนี้ ได้รับการรับรองการทำวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการพิจารณางานวิจัยในมนุษย์ของมหาวิทยาลัยนเรศวรเป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยมีเลขที่ใบรับรอง COA No. 007/2013 ลงวันที่ 10 เมษายน 2556

4.3 Isolation of peripheral blood mononuclear cells

ตัวอย่าง buffy coat จากข้อ 4.2 จะนำมาทำการแยก peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ด้วยวิธี density-gradient centrifugation โดยใช้ Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, MO, USA) หรือ Lymphoprep™ (Axis-Shield, Oslo, Norway) ตามวิธีที่ระบุจากบริษัทผู้ผลิต PBMC ที่แยกได้จะนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum, 0.01 M HEPES, pH 7.4, 2 mM L-glutamine และ 100 U/ ml penicillin, และ 100 μg/ml streptomycin โดยการเตรียม PBMC นี้ จะทำด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อทุกขั้นตอน ทำการ

วัดความมีชีวิตของ PBMC ที่แยกได้ด้วยวิธี trypan blue dye exclusion Single cell suspension ที่มี viability มากกว่า 95% จะนำมาใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

4.4 Purification of human NK cells

ทำการแยกบริสุทธิ์ NK cell จาก PBMC ด้วยวิธี immunomagnetic cell separation โดยการใช้ anti-human CD56 microbeads และ MACS cell separation system (Milteny Biotec, Germany) โดยทำตามคำแนะนำจากบริษัทผู้ผลิต นับจำนวนและวัดการมีชีวิตของ purified NK cell ด้วยวิธี trypan blue dye exclusion ก่อนทำการศึกษาในขั้นต่อไป

4.5 Cell viability assay

ศึกษาผลอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อการมีชีวิตรอดของ PBMC โดยการนำ hPBMC ที่เตรียมได้ จำนวน $1X10^5$ cells มาเลี้ยงใน 6-well tissue culture plate (Nunc^R) ร่วมกับอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100-500 μg/ml บ่มเซลล์ดังกล่าวที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C ในสภาวะที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวัด cell viability ด้วยวิธี trypan blue dye exclusion โดยใช้ 0.2% trypan blue solution และคำนวณเป็น % viability

4.6 Natural killer cell activity assay

4.6.1 Co-culture experiment

นำ PBMC ที่แยกได้จากข้อ 4.3 มา treat ด้วยอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และเลี้ยงร่วมกับ target cell ซึ่งได้แก่ K562 (ATCC; human NK sensitive cell line) ใน 96-well tissue culture plate ที่อัตราส่วน effector: target ต่าง ๆ กัน หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO_2 เป็นเวลานาน 20 ชั่วโมง จึงทำการวัดการเจริญของ PBMC โดยวิธี MTT assay (Mosmonn 1983) โดยทำการดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก และเติม 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml เลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมงดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด เติมสารละลาย DMSO ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทำการทดสอบข้างต้น 3 หลุม โดยแต่ละครั้งของการทดสอบจะมี control 3 ชนิด ได้แก่ effector cell control, target cell control และ blank control ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่วัดได้ นำมาคำนวณ % NK cell activity ตามสูตรที่เคยมีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Yuan et al., 2009)

4.6.2 Pre-treatment experiment

นอกจาก co-culture experiment ข้างต้น โครงการวิจัยนี้ยังทำการศึกษาแบบ pre-treatment experiment อีกการทดลองหนึ่ง โดยนำ purified NK cells มาทำการ treat ด้วยอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO_2 เป็นเวลานาน 20 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงล้างเซลล์ด้วย sterile phosphate buffer saline, pH 7.4 จากนั้นจึงเติม K562 (target cells) ให้ได้อัตราส่วน E:T ratio ต่าง ๆ ที่ต้องการ และบ่มเพลทอีกครั้งใน 5% CO_2 นาน 20 ชั่วโมง จึงวัดการเจริญของเซลล์ด้วย MTT assay ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้นและคำนวณ % NK activity ตามสูตรที่เคยมีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Yuan et al., 2009)

4.7 Cytokine assay

ศึกษาโดยนำ PBMC ที่เตรียมได้ จำนวน $1X10^5$ cells มาเลี้ยงใน 96-well tissue culture plate ($Nunc^R$) ร่วมกับอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สำหรับหลุมควบคุมใส่เฉพาะ PBMC จำนวน $1X10^5$ cells บ่มเซลล์ดังกล่าวที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จึงเก็บ culture supernatant เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ IFN-γ ด้วยเทคนิค sandwich ELISA จากชุดตรวจสำเร็จรูป โดยทำตามขั้นตอนที่ระบุไว้จากบริษัทผู้ผลิต (BioLegend, San Diego, CA) หาปริมาณไซโตไคน์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน และแสดงผลในหน่วย pg/ml ความไว (sensitivity) ในการตรวจหาปริมาณไซไตน์ชนิด IL-2 และ IFN-γ เท่ากับ 7.8 pg/ml ตามลำดับ

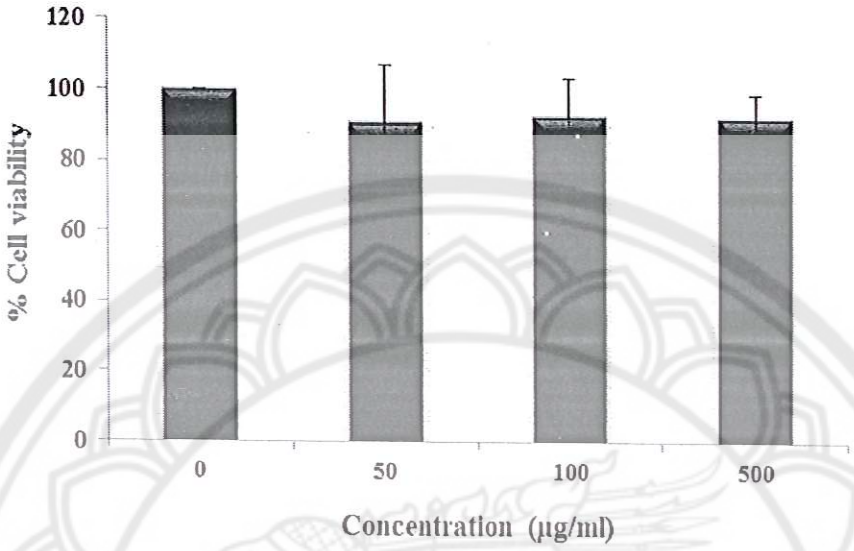
4.8 Statistical analysis

ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง แสดงเป็นค่า mean ± SEM และนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ด้วยโปรแกรม SPSS version 11.5 ค่า P value ที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 ($P < 0.05$) จะถือเป็นค่าที่ยอมรับได้ (statistical significance)

5. ผลการทดลอง

5.1 ผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อการมีชีวิตรอดของ PBMC

ผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อการมีชีวิตรอดของ PBMC แสดงในรูปที่ 1 เมื่อเลี้ยง PBMC ร่วมกับอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100-500 μg/ml เป็นเวลานาน 120 ชั่วโมง พบว่า PBMC ยังคงมีชีวิตอยู่รอด และมี % viability ใกล้เคียงกับ control ที่ไม่ได้เติมอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซิน ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า อนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ PBMC



รูปที่ 1 ผลอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อการมีชีวิตรอดของ PBMC ทดสอบด้วยวิธี trypan blue dye exclusion. ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดสอบ 4 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน.

5.2 ผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อ NK cell activity

5.2.1 Co-culture experiment

ผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อ NK cell activity แสดงในตารางที่ 1 เมื่อเลี้ยง PBMC ร่วมกับอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซิน แบบ co-culture experiment และวัดการทำงานของ NK cell พบว่า อนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินมีผลกระตุ้นการทำงานของ NK cell ให้สูงขึ้น และการกระตุ้นแสดงให้เห็นตามความเข้มข้นของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินที่เพิ่มสูงขึ้น ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml พบว่าอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินสามารถกระตุ้นการทำงานของ NK cell ให้สูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับการไม่ได้รับสารทดสอบ และผลการกระตุ้นดังกล่าวก็แสดงให้เห็นในส่วนใหญ่ของ E:T ratio ที่ใช้ทดสอบ

ตารางที่ 1 NK cell activity of human PBMCs after *in vitro* exposure to varying concentrations of SDO at different effector: target (E:T) ratios[a]

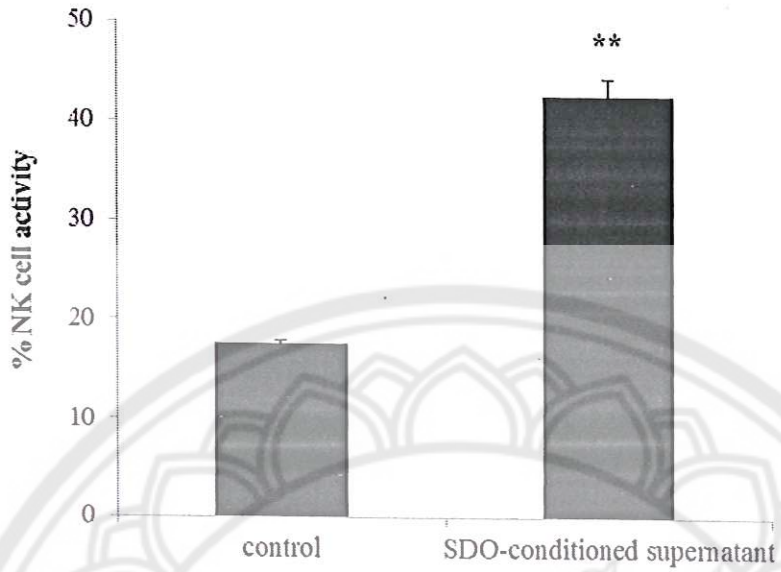
Treatment	Concentration (μg/mL)	% NK cell activity at E:T ratio		
		3.13:1	1.56:1	0.78:1
SDO	0	26.96 ± 0.65	35.61 ± 4.20	33.33 ± 1.52
	50	19.12 ± 3.06	38.18 ± 2.84	38.26 ± 0.98
	100	26.23 ± 4.25	41.52 ± 6.04	36.99 ± 0.61
	500	36.03 ± 2.12*	43.03 ± 4.49	41.21 ± 0.78**
IL-2	100 U/mL	37.82 ± 7.80	39.30 ± 6.59	33.18 ± 6.66
IFN-γ	650 U/mL	39.75 ± 9.70	35.88 ± 5.56	36.35 ± 3.91

[a] Human PBMCs were incubated with SDO at different concentrations and tested for NK cell activity against K562 tumor target cells. Values expressed as mean ± SEM are the representative of four independent experiments with similar results. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ compared to the untreated control.

5.2.2 Pre-treatment experiment

จากการทดสอบข้างต้น (ข้อ 5.2.1) ที่พบว่าอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินมีผลกระตุ้นการทำงานของ NK cell ให้เพิ่มสูงขึ้น โครงการวิจัยนี้จึงทำการศึกษาต่อเพื่อดูว่า การทำงานของ NK cell ที่สูงขึ้นนั้นมีผลมาจากการกระตุ้น NK cell โดยตรง หรือเป็นผลมาจากการกระตุ้น NK cell โดยอ้อม ทำการศึกษาโดยนำ purified NK cells มา treat ด้วยอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินที่ความเข้มข้น 500 μg/ml และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO_2 เป็นเวลานาน 20 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาทดสอบ NK activity กับ K562 (target cells) ผลการศึกษาพบว่า ถึงแม้ว่าจะมีการตรวจพบการทำงานของ NK cell แต่ % NK activity ของ purified NK cell ที่ถูกกระตุ้นด้วยอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินมาก่อนหน้านี้ (pre-treatment) ก็มีค่าใกล้เคียงและไม่แตกต่างจาก purified NK cell ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วยสารทดสอบแต่อย่างใด (results not shown)

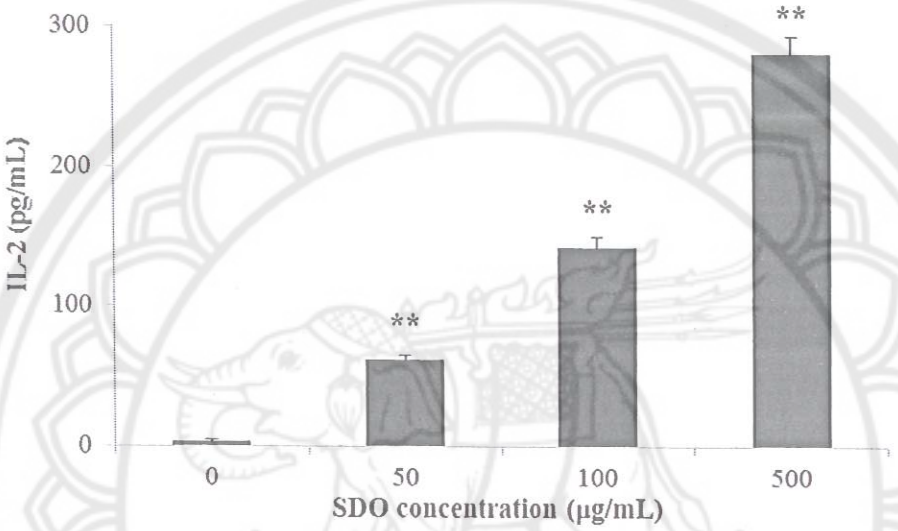
ในอีกการทดสอบ ซึ่งนำ cell-free culture supernatant ที่ได้จาก SDO-treated PBMC มาเติมให้กับ purified NK cells และดูผล NK activity กับ K562 (target cells) หลังจากนั้น พบว่า NK activity เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับ control supernatant ที่ได้จาก untreated PBMC (รูปที่ 2) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ soluble factor ใน culture supernatant ที่ได้จาก SDO-treated PBMC ที่มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของ NK cell



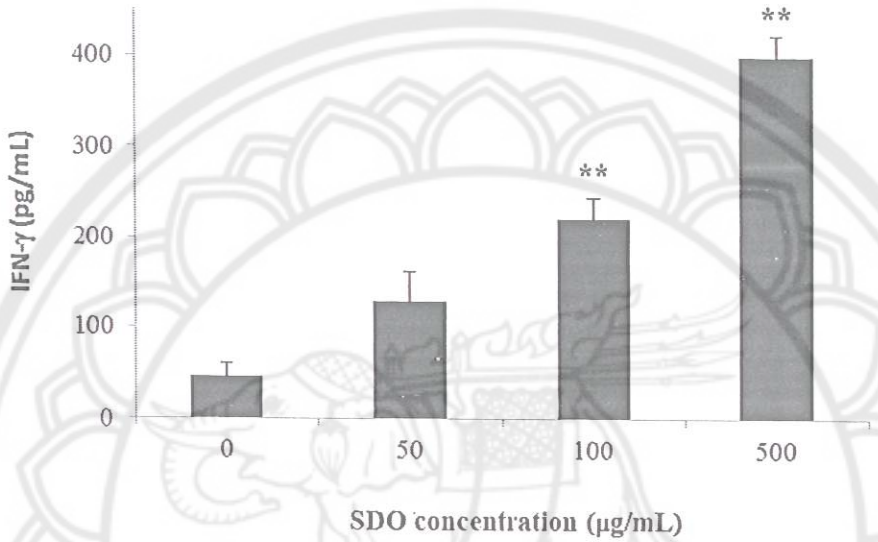
รูปที่ 2 ผลของ SDO-conditioned culture supernatant ที่มีต่อ NK activity. ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดสอบ 2 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน. **, $P < 0.01$ compared to control (supernatant from untreated PBMCs).

5.3 Cytokine production

ผลการศึกษาจากข้อ 5.2.2 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการกระตุ้น NK cell โดยอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินน่าจะ ทำให้มีความสนใจที่จะศึกษา soluble factor ใน culture supernatant ที่ได้จาก SDO-treated PBMC งานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบปริมาณ cytokine ที่สำคัญซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของ NK cell ได้แก่ IL-2 และ IFN-γ ผลการทดสอบแสดงในรูปที่ 3 และรูปที่ 4 ตามลำดับ พบว่า culture supernatant ที่ได้จาก SDO-treated PBMC มี cytokine IL-2 และ IFN-γ ในปริมาณที่สูงมาก เมื่อเทียบกับ control supernatant ที่ได้จาก untreated PBMC



รูปที่ 3 ผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินที่มีต่อ IL-2 production. , ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดสอบ 2 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน. **, $P < 0.01$ compared to control.



รูปที่ 4 ผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินที่มีต่อ IFN-γ production. ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดสอบ 2 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน. **, $P < 0.01$ compared to control.

6. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษากลไกการกระตุ้นการทำงานของ natural killer cell ของคนโดยอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซิน ผลจาก co-culture experiment ซึ่งทดสอบโดยนำอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินมาเลี้ยงร่วมกับ PBMC แสดงให้เห็นถึงความสามารถของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินในการกระตุ้นการทำงานของ NK cell ได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม เมื่อนำอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินมาเลี้ยงร่วมกับ purified NK cell (จาก PBMC) ซึ่งเป็น pre-treatment ก่อนทดสอบ NK activity พบว่า % NK activity ไม่ได้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับ control ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ อย่างไรก็ตาม เมื่อนำ cell-

free culture supernatant ที่ได้จาก SDO-treated PBMC มาเติมให้กับ purified NK cells และดูผล NK activity กับ K562 (target cells) พบว่า %NK activity เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับ control supernatant ที่ได้จาก untreated PBMC ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ soluble factor ใน cell-free culture supernatant ที่ได้จาก SDO-treated PBMC และเมื่อทดสอบหาปริมาณไซโตไคน์ใน SDO-treated culture supernatant ก็พบว่ามีปริมาณของไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ IFN-γ ในปริมาณที่สูงมาก เนื่องจากไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ IFN-γ มีบทบาทสำคัญในแง่ของการเป็น potent NK stimulator ดังนั้น ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การที่อนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินสามารถกระตุ้นการทำงานของ NK cell ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นนั้น ไม่น่าจะมาจากการกระตุ้น NK cell โดยตรง แต่เป็นไปได้สูงว่าน่าจะมาจากการที่สารดังกล่าวไปกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น T-lymphocte และ macrophage ให้หลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ IFN-γ และไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาก็จะไปมีผลกระตุ้นการทำงานของ NK cell ได้ตามมาในที่สุด

7. เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

Abbas A. K., A. H. Lichtman and S. Pillai. Cellular and Molecular Immunology. 7th ed. International edition. Elsevier Saunders Company; 2012.

Aktas, E., U. C. Kucuksezer, S. Bilgic, G. Erten and G. Deniz. 2009. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. Cell Immunol 254(2): 149-54.

Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens and T. P. SalaZar-Mather. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. Ann Rev Immunol 10: 585-94.

Chen, J-R., K. Suetsuna and F. Yamauchi. 1995. Isolation and characterization of immunostimulative peptides from soybean. J Nutr Biochem 6(6): 310-3.

Clare, D. A. and H. E. Swaisgood. 2000. Bioactive milk peptides: a prospective. J Dairy Sci 83: 1187-95.

Deigin, V. I., A. M. Poverenny, O. V. Semina and T. N. Semenets. 1999. Reciprocal effect of optical isomerism of EW-dipeptides on immune response. Immunol Lett 67(1): 41-6.

Dons'koi, B. V., V. P. Chernyshov and D. V. Osypchuk. 2011. Measurement of NK activity in whole blood by the CD69 up-regulation after co-incubation with K562, comparison with NK cytotoxicity assays and CD107a degranulation assay. J Immunol Methods 372: 187-95.

Duarte, J., G. Vinderola, B. Ritz, G. Perdign and C. Matar. 2006. Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. Immunobiol 211(5): 341-50.

Dwyer, J. H., M. Navab, K. M. Dwyer, K. Hassan, P. Sun, A. Shircore, S. Hama-Levy, G. Hough, X. Wang, T. Drake, C. N. B. Merz and A. M. Fogelman. 2001. Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: The Los Angeles Atherosclerosis Study. Circulation 103: 2922-7.

Fabiani, C., M. Pizzichini, M. Spadoni and G. Zeddita. 1996. Treatment of waste water from silk degumming processes for protein recovery and water reuse. Desalination 105(2): 1-9.

Gauthier, S. F., Y. Pouliot and D. Saint-Sauveur. 2006. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. Int Dairy J 16: 1315-23.

Grimble, G. K., R. G. Rees, P. P. Keohane, T. Cartwright, M. Desreumaux, D. B. Silk. 1987. Effect of peptide chain length on absorption of egg protein hydrolysates in the normal human jejunum. Gastroenterol 92: 136-42.

Jung, E. Y., L. Hyun-Sun, H. J. Lee, J-M Kim, K-W Lee and H. J. Suh. 2010. Feeding silk protein hydrolysates to 57BL/KsJ-db/db mice improves blood glucose and lipid profiles. Nutr Res 30: 783-90.

Poullain, M. G., J. P. Cezard, L. Roger and F. Mendy. 1989. Effect of whey proteins, their oligopeptide hydrolysates and free amino acid mixtures on growth and nitrogen retention in fed and starved rats. JPEN J Parenter Enteral Nutr 13: 382-86.

Kato, N., S. Sato, A. Yamanaka, H. Yamada, N. Fuwa and M. Nomura. 1998. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. Biosci Biotech Biochem 62(1): 145-7.

Kayser, H. and H. Meisel. 1996. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. FEBS Lett 383(1-2): 18-20.

Kong, X., M. Guo, Y. Hua, D. Cao and C. Zhang. 2008. Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. Bioresource Technol 99(18): 8873-9.

Limpeanchob, N., K. Trisat, A. Duangjai, W. Tiyaboonchai, S. Pongcharoen and M. Sutheerawattananonda. 2010. Sericin reduces serum cholesterol in rats and cholesterol uptake into Caco-2 Cells. J Agr Food Chem 58(23): 12519–22.

Madureira, A. R., C. I. Pereira, A. M. P. Gomes, M. E. Pintado and F. X. Malcata. 2007. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. Food Res Int 40: 1197-211.

Mares-Perlman, J. A., A. E. Millen, T. L. Ficek and S. E. Hankinson. 2002. The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. overview. J Nutr 132: 518S-24S.

Meisel, H. 2007. Food-derived bioactive proteins and peptides as potential components of neutraceuticals. Curr Pharm Design 13(9): 873-4

Mestas, J. and C. C. W. Hughes. 2004. Of men and mice: Differences between mouse and human immunology. J Immunol 172: 2731-8.

Morris, H. J., O. Carrillob, A. Almaralesc, R. C. Bermúdeza, Y. Lebequea, R. Fontainea, G. Llauradóa and Y. Beltrán. 2007. Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice. Enzyme Microb Tech 40: 456-60.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65(1-2): 55-63.

Oses-Prieto, J. A., N. Lopez-Moratalla, E. Santiago, J. P. Jaffrezou and M. J. Lopez-Zabalza. 2000. Molecular mechanisms of apoptosis induced by an immunomodulating peptide on human monocytes. Arch Biochem Biophys 379(2): 353-62.

Praveesh, V. B., J. Angayarkanni and M. Palaniswamy. 2011. Antihypertensive and anticancer effect of cow milk fermented by Lactobacillus plantarum and Lactobacillus casei. Int J Pharm Pharm Sci 3(Suppl 5): 452-6.

Rook., A. H., H. Masur, H. C. Lane, W. Federick, T. Kasahara, A. M. Macher, J. Y. Djeu, J. F. Manischewitz, I. Jackson, A. S. Fauci and G. V. Quinnan, Jr. 1983. Interleukin-2 enhances the depressed natural killer and cytomegalovirus-specific cytotoxic activities of lymphocytes from patients with the acquired immune deficiency syndrome. J Clin Invest 72: 398-403.

Saint-Sauveur, D., S. F. Gauthier, Y. Boutin and A. Montoni. 2008. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. Int Dairy J 18: 260–70.

Saint-Sauveur, D., S. F. Gauthier a, Y. Boutin, A Montoni, and I. Fliss. 2009. Effect of feeding whey peptide fractions on the immune response in healthy and *Escherichia coli* infected mice. Int Dairy J 19: 537-44.

Smyth, M. J., E. Cretney, J. M. Kelly, J. A. Westwood, S. E. A. Street, H. Yagita and et al. 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. Mol Immunol 42: 501-10.

Smyth, M. J., Y. Hayakawa, K. Takeda and H. Yagita. 2002. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. Nat Rev Cancer 2: 850-61

Smyth, M. J., K. Y. Thia, E. Cretney, J. M. Kelly, M. B. Snook, C. A. Forbes., et al. 1999. Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. J Immunol 162: 6658-62.

Tanaka, T., C. M. Porter, J. A. Horvath-Arcidiacono and E. T. Bloom. 2006. Lipophilic statins suppress cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells through modulation of granule exocytosis. Int Immunol 19(2): 163-73.

Theodore, A. E., S. Raghavan and H. G. Kristinsson. 2008. Antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates. J Agr Food Chem 56(16): 7459-66.

Venema, H., A. P. van den Berg, C. van Zanten, W. J. van Son, M. van der Giessen and T. H. The. 1994. Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. J Med Virol 42: 188-92.

Wang, Y. K., H. L. He, G. F. Wang, H. Wu, B. C. Zhou, X. L. Chen, et al. 2010. Oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates produced on a plant scale have antitumor activity and immunostimulating effects in BALB/c Mice. Mar Drugs 8(2): 255-68.

Whitesude, T. L. and R. B. Herberman. 1994. Role of human natural killer cells in health and disease. Clin Diagn Lab Immunol 1: 125-33.

Xie, Z., J. Huang, X. Xu, and Z. Jin. 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. Food Chem 111(2): 370-6.

Yamauchi, F. and K. Suetsuna. 1993. Immunological effects of dietary peptide derived from soybean protein. J Nutr Biochem 4(8): 450-7.

Yang, R., Z. Zhang, X. Pei, X. Han, J. Wang, L. Wang, et al. (2009). Immunomodulatory effects of marine oligopeptide preparation from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in mice. Food Chem 113(2): 464-70.

Yuan, C., X. Huang, L. Cheng, Y. Bu, G. Liu, F. Yi, et al. 2009. Evaluation of antioxidant and immune activity of *Phellinus ribis* glucan in mice. Food Chem 115(2): 581-4.

Zhaorigetu, S., M. Sasaki, H. Watanabe and N. Kato. 2001. Supplemental silk protein, sericin, suppresses colon tumorigenesis in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice by reducing oxidative stress and cell proliferation. Biosci Biotech Bioch 65: 2181-6.

Zhaorigetu, S., N. Yanaka, M. Sasaki, H. Watanabe and N. Kato. 2003. Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. J Photoch Photobio B 71(1-3): 11-7.

8. Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานตามที่คาดไว้ของโครงการวิจัย

1. ได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับกลไกในระดับเซลล์ต่อการกระตุ้นการทำงานของ natural killer cell ของคนโดยอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซิน

2. ผลงานวิจัยสามารถนำไปเป็นข้อมูลเพื่อขยายผลในเชิงพาณิชย์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่อไป

3. มีการแผยแพร่ผลงานที่ได้ โดยการนำไปตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง และนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ จำนวน 1 เรื่อง (เอกสารแนบ-ภาคผนวก) ดังนี้

<u>นำไปตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง</u>

ชื่อบทความ: Augmentation of natural killer cell activity in vitro and in vivo by sericin-derived oligopeptides

ชื่อวารสาร: Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry

การมีส่วนในผลงาน : ( ) ชื่อแรกของผลงาน (✓) เป็น Corresponding Author

หมายเหตุ: Manuscript นี้ได้ submit ไปที่วารสาร Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry เป็นที่เรียบร้อยแล้ว และขณะนี้อยู่ระหว่างการพิจารณาจาก reviewers

<u>นำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ จำนวน 1 เรื่อง</u>

ชื่อผลงานที่นำเสนอ: Effect of sericin-derived oligopeptides on cytokine production by human leukocytes

นำเสนอในการประชุมระดับ : ( ) ระดับชาติ (✓) นานาชาติ

ชื่อการประชุม/สถานที่/วันที่: Naresuan Research Conference ครั้งที่ 10 มหาวิทยาลัยนเรศวร วันที่ 22-23 กรกฎาคม 2557

รูปแบบการนำเสนอ :
( ) แบบบรรยาย (Oral Presentation)
(✓) แบบรายงาน (Poster Presentation)
( ) Proceedings

การมีส่วนในผลงาน : ( ) ชื่อแรกของผลงาน (✓) เป็น Corresponding Author

ภาคผนวก

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry
29-Jul-2014

Dear Dr. Kunthalert:

Your manuscript entitled "Augmentation of natural killer cell activity in vitro and in vivo by sericin-derived oligopeptides" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.

Your manuscript ID is BBB-140555.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at http://mc.manuscriptcentral.com/bbb and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to http://mc.manuscriptcentral.com/bbb.

Thank you for submitting your manuscript to the Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.

Sincerely,

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry Editorial Office

1.6772209

สำนักหอสมุด
17 มิ.ย. 2558

Augmentation of natural killer cell activity *in vitro* and *in vivo* by sericin-derived oligopeptides

Pornpimon Jantarak,[1] Porkaew Promphet,[1] Manote Sutheerawattananonda,[2] and Duangkamol Kunthalert[1,3, †]

2 QR
185
.8.L9
ด1535
2557

[1] *Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand*

[2] *School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*

[3] *Centre of Excellence in Medical Biotechnology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand*

[†] To whom correspondence should be addressed. Tel: +66 5596 4626; Fax: +66 5596 4770; E-mail: kunthalertd@yahoo.com, kunthalertd@hotmail.com

Abbreviations: BW, body weight; ConA, Concanavalin A; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; GC/MS, gas chromatography/mass spectrometry; IFN-γ, interferon-γ; IL-2, interleukin-2; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NK, natural killer; OD, optical density; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate-buffered saline; SDO, sericin-derived oligopeptides; SEM, standard error of the mean.

Abstract

This study investigated the effects of sericin-derived oligopeptides (SDO) on natural killer (NK) activity. *In vitro* exposure of human peripheral blood mononuclear cells with SDO resulted in an augmentation of NK cell activity against K562 target cells and the effects appeared to be dose-related. Experiments designed to examine whether enhanced NK activity was due to direct or indirect activation of NK cells revealed that SDO did not induce activity of purified NK cells, and that SDO augmented NK activity indirectly by inducing IL-2 and IFN-γ production. In *in vivo* experimentation where mice were orally administered with SDO and splenic mononuclear cells tested against YAC-1 target cells, significant increase in NK activity was obtained compared to control mice. Elevated levels of IL-2 were evident in all SDO-treated groups. Together, these results suggest the potential of SDO and support the possible therapeutic applications of such peptides for functional improvement of NK cells.

Key words: natural killer cells, sericin, oligopeptides, *in vitro*, *in vivo*

Introduction

Natural killer (NK) cells are innate immune effector cells which are phenotypically characterized as $CD3^-$ $CD56^+$ large granular lymphocytes.[1, 2] These cells play a critical role in immune surveillance against virus infections[3, 4] and malignant transformation.[5, 6] Unlike cytotoxic T lymphocytes, NK cells destroy target cells by direct cytotoxicity without requirement for prior sensitization[7, 8], putting them at a forefront of lymphocyte defenses against virus-infected and tumor cells.[2] While fully functional NK cells are advisable for optimal health, cumulative evidence indicate that advancing age, chronic diseases, physical and mental stresses or even unhealthy lifestyles can result in the decrease in NK cell activity.[9-14] The immune impairment states presenting with low NK activity are often associated with malignancies and chronic viral infections.[15-17] More seriously, the declining NK function towards tumors and severe infections was reported to be correlated with death in the elderly subjects.[15, 16] Usually, those cellular stresses that lead to functional impairment in NK cells are difficult to avoid, and such undesired state poses a significant challenge in the clinical field across the world. Supplementation

of the natural host defense with NK-enhancing agents would be a promising means for optimizing the immunological state, or delaying the NK function decline.

Bioactive peptides, defined as specific protein fragments that have regulatory functions in the human system, have demonstrated potential for application as health-promoting agents against numerous chronic diseases and certain physiological conditions, including cancer, cardiovascular diseases and inflammation.[18-20] With low molecular weight, these peptides are easily absorbed into the intestinal tract. Indeed, absorption as short-chain peptides is considered to be more effective than intact protein and free amino acids of equivalent amounts.[21, 22] Since efficient intestinal absorption reflects optimal health benefits, the downstream health effects upon administration of the short-chain peptides would be superior to those of intact protein and free amino acids. Bioactive peptides are mostly derived from dietary proteins of animal or plant origins. Although these peptides can theoretically be released from dietary proteins during gastrointestinal digestion process, the amount of such peptides generated during digestion is probably too low to induce significant effects on the target health system, especially when a therapeutic effect is expected.[23] Instead, bioactive peptide concentrates can be produced using enzymatic hydrolysis and separation technologies. To date, enzyme hydrolysis appears to be the most appropriate method for bioactive peptide production, not only because of their commercially availability and moderate cost, but also because of high quality of the peptide products.[24] As the potential health valuable molecules, the bioactive peptides have increasingly received a great deal of interest and attention, both in scientific and commercial scales.

The silk protein, sericin is the main constituent of cocoon proteins from the silkworm *Bombyx mori*, comprising of 25-30% of the total cocoon weight.[25] Although sericin is considered as an unutilized by-product of the textile industry, scientific studies have shown that sericin possesses various biological activities, including inhibition of tyrosinase and lipid peroxidation,[26, 27] suppression of colon carcinogenesis,[28, 29] reduction of serum lipids,[30] and protection against UV-induced keratinocyte apoptosis[31] and alcohol-mediated liver damage.[32] Generally, sericin preparation from the silk cocoons is heterogeneous, with molecular weight ranging widely from 10 to over 300 kDa.[33] In terms of efficient intestinal absorption and amounts of the truly potent peptides required for inducing significant health effects, a wide molecular weight distribution may limit uses of such sericin preparation. Peptide concentrates of narrow and defined molecular size would be preferential in this regard, providing an alternative to the native sericin.

Oligopeptides derived from enzymatic hydrolysis of the sericin protein have recently been described for their biological actions, including vasorelaxation and blood pressure lowering activities.[34] As the significance of NK immune surveillance, together with the effects of sericin peptides on immune system have not yet been examined, the present study therefore explored the effects of sericin-derived oligopeptides on NK activity. Investigations were conducted both *in vitro* and *in vivo* in order to ascertain their potentials for therapeutic applications.

Materials and Methods

Preparation of sericin-derived oligopeptides

Sericin-derived oligopeptides (SDO) were prepared from cocoons of the silkworm *Bombyx mori* according to a pending patent with international publication number WO 2013/032411 A1. Briefly, silk cocoons cut into small pieces were extracted for sericin protein under high pressure (150 psi) and high temperature (121°C) for 15 min. The resulting sericin solution was then subjected to protease enzymatic hydrolysis (0.01 U/mL protease enzyme in 0.036 M $CaCl_2$ solution at a 1:1 volumetric ratio) at 37 °C for 1 h. Enzymatic activity was inactivated at 90 °C for 15 min and the mixture was cooled to room temperature prior to separating the solid components by centrifugation at 9,500 × g for 15 minutes at 4 °C. Oligopeptides with a molecular weight lower than 5,000 Da were separated from larger oligopeptides by hollow fiber membrane technology using a hollow fiber membrane cartridge with molecular weight cut off (MWCO) of 5,000 Da (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). The obtained oligopeptides of approximately 5,000 Da were kept lyophilized until use. The amino acid composition of SDO analyzed by GC/MS is shown in Table 1.

Tumor target cell lines

The human chronic myelogenous leukemic cell line K562 and the murine Moloney virus-transformed lymphoma cell line YAC-1 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) were used as target cells to assay NK cell activity. These NK-sensitive cell lines were maintained under 5% CO_2 and 37°C in RPMI-1640 medium (PAA, Pasching, Austria) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco, South America), 0.01 M HEPES pH 7.4, 2 mM L-glutamine (PAA), 100 U/mL penicillin and

100 μg/mL streptomycin (PAA). This medium was referred to as complete RPMI medium.

Isolation of human PBMCs and NK cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy coats of healthy blood donors by Lymphoprep™ (Axis-Shield, Oslo, Norway) density gradient centrifugation according to the manufacturer's instructions. The isolated PBMCs were washed three times before resuspending in complete RPMI medium. Human NK cells were isolated from PBMCs by immunomagentic cell separation through CD56 microbeads and MiniMACS cell separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) as specified by the manufacturer. Purity of the isolated NK cells was approximately 90% as determined by flow cytometry. The experimental protocol was reviewed and approved by the Institutional Human Review Board, Naresuan University.

Cell viability

Approximately 1×10^5 PBMCs were cultured in the absence or presence of SDO at concentration ranging from 100 to 500 μg/mL for 120 h at 37°C in a humidified CO_2 incubator. Total, viable and non-viable cell numbers were counted under microscope with the help of a hemocytometer following staining by trypan blue. The percentage of cell viability was calculated using an equation:

$$\% \text{ viability} = (\text{viable cell number/total cell number}) \times 100$$

Animals and treatment

Female BALB/c mice at 7 weeks of age were obtained from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand. The animals were housed in well-ventilated cages at a constant temperature (25±1 °C) under a 12-h dark: light cycle with free access to sterile water and standard mouse diet (CP Company, Thailand). The *in vivo* experiments were performed in compliance with Guidelines in the Care and Use of animals and all procedures were approved by the Animal Research Ethics Committee, Naresuan University. Mice were randomly divided into 4 groups of five each. Treated groups were orally administered with 50, 100 or 500 mg/kg body weight (BW) of SDO once daily for 7 days. Vehicle control received only sterile distilled water. Routine clinical observations and changes in body weights were recorded throughout the study

period. Mice were sacrificed 24 h after the last dose by receiving an overdose of 50 mg/kg BW (intraperitoneal) Thiopental sodium (THIOPENTAL, Bigpharma, Thailand). Vital organs (spleen, thymus, liver, lung and kidney) were removed and weighed immediately and their indices were expressed as 100 × organ weight/ body weight.

Preparation of splenic single cells

The individual mouse spleen removed aseptically was placed in a PCM buffer prepared with sterile phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 containing 7×10^{-4} M $CaCl_2$, 5×10^{-4} M $MgCl_2$, 5% (v/v) fetal bovine serum (Gibco), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (PAA). Single cells were isolated by gently pressing the spleen through a cell strainer (BD Falcon, NJ). Red blood cells were lysed by 0.17 M NH_4Cl, pH 7.65 and the remaining cell suspensions were washed twice with PCM buffer and adjusted to a desired concentration in RPMI-1640 medium (PAA) containing 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco), 0.01 M HEPES pH 7.4, 5×10^{-5} M β-mercaptoethanol (BioRad, Hercules, CA), 2 mM L-glutamine (PAA), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (PAA).

Natural killer cell activity assay

Natural killer (NK) cell activity was assessed based upon the ability of mononuclear cells to lyse tumor target cells. This was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay as described previously[35, 36] with some modifications. Human PBMCs (effectors) were mixed with SDO at final concentrations of 50, 100 and 500 µg/mL and co-cultured with K562 (targets) in 96-well flat-bottom plates (Nunc™, Roskilde, Denmark) for 20 h at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. The effector: target (E:T) ratios were set up to 3.13:1, 1.56:1 and 0.78:1 in a total volume of 200 µL in each well. Recombinant human interleukin-2 (IL-2; Roche) and interferon-γ (IFN-γ; Roche) at the concentration of 100 U/mL and 650 U/mL, respectively were included in the experiment as positive controls.[37, 38] After the incubation, 20 µL of MTT (5 mg/mL; Sigma, St. Louis, MO) was added. The plates were incubated for additional 3 h and subsequently subjected to an MTT assay.[39] Control wells contained either effector or target cells alone, and all tests were performed in triplicates. The optical density (OD) at 540 nm was determined by using a microplate

spectrophotometer (Labsystem iEM Reader MF). The percentage of NK cell cytotoxic activity was calculated using the following equation:

% NK cytotoxic activity =

{1– [(OD test – OD effector cell control)/OD target cell control]} × 100

In a separate experiment, purified NK cells were treated with SDO at a final concentration of 500 μg/mL for 20 h followed by cytotoxicity assay against K562 target cells.

To determine NK activity of mice fed SDO, splenic single cells and YAC-1 cells as effector and target cells, respectively, were cultured together in 96-well flat-bottom plates (Nunc™) at E:T ratios of 100:1 and 50: 1 in a total volume of 200 μL in each well. After 20-h incubation, an MTT assay was performed and % NK activity was calculated as described above.

Cytokine assay

Human PBMCs of approximately 1×10^5 cells were incubated with SDO at final concentrations of 50, 100 and 500 μg/mL. After incubating the cells at 37°C in 5% CO_2 atmosphere for 72 h, the cultured supernatants were collected and assayed for IL-2 and IFN-γ by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using ELISA MAX™ Deluxe sets for human IL-2 and IFN-γ (BioLegend, San Diego, CA), respectively. All assay procedures were performed according to the manufacturers' instructions and the detection limits for both assays were 7.8 pg/mL.

In the animal experiment, a total of 2×10^5 splenic cells were cultured in flat-bottom 96-well plates (Nunc™) in the presence of Concanavalin A (ConA, 0.5 μg/mL; Sigma) and incubated at 37°C in 5% CO_2 atmosphere. After 72-h incubation, culture supernatants were collected and amounts of IL-2 secreted were determined by sandwich ELISA using Ready-Set-Go for mouse IL-2 (eBioscience) as described by the manufacturer. The detection limit was 2 pg/mL.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical significance was analyzed using Student's *t*-test. p values less than 0.05 were considered significant.

Results

Effect of SDO on viability of human PBMCs

Viability of human PBMCs after incubation with SDO is presented in Fig. 1. As determined by trypan blue dye exclusion, the percentage of viable cells treated with SDO was similar to that of untreated cells. The result indicated that SDO at the concentration up to 500 μg/mL was not toxic to human PBMCs.

Effect of SDO on NK cell activity in vitro

The *in vitro* exposure of PBMCs with SDO resulted in an increased NK cell activity and the effect appeared to be dose-related (Table 2). SDO at the concentration of 500 μg/mL significantly enhanced NK cell activity at most of the effector cell-to-target cell ratios tested, as compared to the untreated control. Interestingly, the percentages of NK activity after exposure to SDO (500 μg/mL; E:T ratios 1.56:1 and 0.78:1) were higher than those of recombinant IL-2 and IFN-γ (Table 2).

To examine further whether the increased NK activity obtained above was due to direct or indirect activation of NK cells, purified NK cells prepared from PBMCs were treated with SDO at a final concentration of 500 μg/mL for 20 h prior to the cytotoxicity assay against K562 target cells. Though detected, % cytotoxicity of SDO-treated NK cells was similar to that of untreated cells (results not shown). However, in an additional experiment where cell-free culture supernatant collected from SDO-treated PBMCs was added to the purified NK cells, significant increase ($p < 0.01$) in NK activity was observed compared to the control supernatant from untreated PBMCs (Fig. 2). The activity of NK cells raised up to 2.5-folds upon the exposure to the SDO-conditioned supernatant. These results suggested an important role of soluble factors in the SDO-conditioned supernatant in augmenting the activity of NK cells. It is particularly to note that ELISA assays to detect cytokine production indicated significant elevation ($p < 0.01$) of IL-2 and IFN-γ levels in the SDO-treated supernatant compared to untreated control (Fig. 3).

Effect of SDO on body and organ weights

In animal experimentation, daily oral administration of SDO did not produce any signs of illnesses, and no mortality was observed. There were no significant differences in the

body weights and vital organs indices between the control and treated mice throughout the study period (results not shown).

Effect of SDO on NK cell activity in vivo

To examine the ability of SDO to induce NK activity *in vivo*, mice were orally administered with SDO consecutively for 7 days and their splenic mononuclear cells tested for the ability to lyse YAC-1 target cells. As shown in Fig. 4, the percentage of NK activity of splenic mononuclear cells from mice fed SDO was significantly higher ($p < 0.05$) than that of control mice. The enhanced NK activity was consistently demonstrated in all SDO-treated groups across the E:T ratios evaluated.

Effect of SDO on cytokine production from mice fed SDO

The production of cytokine measured from the supernatants of ConA-stimulated splenic cultures from mice fed SDO is presented in Fig. 5. Elevated levels of IL-2, though not reached statistically significant, were evident in all SDO-treated groups compared to untreated control.

Discussion

This study reported for the first time the effects of oligopeptides derived from sericin protein on NK cell activity. The results obtained herein clearly demonstrated that the sericin-derived oligopeptides efficiently enhanced NK cell activity and the effect was greater than that achieved by recombinant IL-2 and IFN-γ, the known NK stimulators. Significantly, the SDO-enhanced NK activity was consistently observed both in human immune cells, *in vitro* and in mice, *in vivo*. SDO also modulated the immune system by elevating the IL-2 and IFN-γ production, and this effect appeared to be correlated with the augmentation of NK cell activity. Moreover, no signs of harmful effects were detected when SDO were evaluated *in vitro* and *in vivo*, suggesting that such oligopeptides at a range of the studied concentrations would be considered as low toxic.

Up till now, various experimental models and approaches have been used to study immunomodulatory natural health products. While specific effects of the studied product on specific cell types can be seen through *in vitro* studies, systemic effects, however, cannot be taken into consideration by such measurements.[40] The *in vivo* animal models would additionally be required. Nevertheless, in many cases, investigation of the studied

product *in vivo* did not result in the same biological activity as that observed *in vitro*.[23, 41, 42] Undoubtedly, this conflicting result would be a major obstacle for such studied product being developed as potential therapeutics.[43] The fact that significant increases in NK cell activity were noted not only when SDO were added directly to cultures of human PBMCs but also when they were orally administered to the mice, these findings thus indicated the true immunomodulatory potential of such sericin oligopeptides. In this regard, SDO would be unaffected to radical alteration by physiological exposure to gut digestive enzymes in mice. Also, it is likely that SDO were effectively absorbed through the epithelial cells lining the intestinal mucosa, transported to the target immune cells, and ultimately their significant capability of inducing NK activity retained, as that observed *in vitro*. The sericin-based oligopeptides preparation in this study has therefore proven useful and further development as promising therapeutics is warranted.

It should be noted that our results on NK activity were obtained from mixed mononuclear cells, and not from the purified NK cells. The use of a whole mononuclear cell preparation provides a more physiological system where cell-to-cell regulatory mechanisms are intact and several sources of soluble mediators are present.[38] With respect to this, SDO may be activating cells which influence NK activity. Indeed, it is well documented that CD4+ T lymphocytes and macrophages can respectively release IL-2 and IFN-γ, which are potent NK stimulators.[44-46] In our separate experiment, the culture supernatant collected from SDO-treated PBMCs substantially contained IL-2 and IFN-γ cytokines, and the addition of this SDO-conditioned supernatant significantly increased effector function of purified NK cells, suggesting an important role of such cytokines for augmentation of NK activity. Although other soluble mediators and/or additional regulatory mechanisms cannot be excluded, it is conceivable that SDO up-regulated the production of IL-2 and IFN-γ cytokines in CD4+ T cells and macrophages which, in turn, enhanced NK activity. As the increased NK activity and IL-2 production were obviously shown in mice fed SDO, we also believe that the NK increment could be associated with the induction of IL-2 production.

In summary, this study demonstrated, both *in vitro* and *in vivo*, the efficient capability of the sericin-derived oligopeptides in augmenting natural killer cell activity. These findings suggested the potential therapeutic applications of SDO for functional improvement of NK cells, and possibly for treatment of tumor and infectious diseases in which NK activity contributes to host defense.

Acknowledgements

This work was supported by the Agricultural Research Development Agency (Public Organization)[Grant number 10/2551]; the Naresuan University Research Fund [Grant number R2557C020].

References

[1] Trinchieri G. Biology of natural killer cells. Adv. Immunol. 1989; 47: 187-376.

[2] Lotzova E. Definition and function of natural killer cells. Nat. Immunol. 1993; 12: 169-176.

[3] Andoniou CE, Andrews DM, Degli-Esposti MA. Natural killer cells in viral infection: more than just killers. Immunol. Rev. 2006; 214: 239-250.

[4] Andrews DM, Scalzo AA, Yokoyama WM, Smyth MJ, Degli-Esposti MA. Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection. Nat. Immunol. 2003; 4: 175-181.

[5] Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. Adv. Cancer Res. 2003; 90: 127-156.

[6] Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY, Godfrey DI. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. J. Exp. Med. 2000; 191: 661-668.

[7] Groth A, Klöss S, von Strandmann EP, Koehl U, Koch J. Mechanisms of tumor and viral immune escape from natural killer cell-mediated surveillance. J. Innate Immun. 2011; 3: 344-354.

[8] Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol. 2001; 22: 633-640.

[9] Plackett TP, Boehmer ED, Faunce DE, Kovacs EJ. Aging and innate immune cells. J. Leukoc. Biol. 2004; 76: 291-299.

[10] Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T. Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. Semin. Immunol. 2012; 24: 331-341.

[11] Lutz CT, Quinn LS. Sarcopenia, obesity, and natural killer cell immune senescence in aging: altered cytokine levels as a common mechanism. Aging (Albany NY). 2012; 4: 535-546.

[12] Berrou J, Fougeray S, Venot M, Chardiny V, Gautier JF, Dulphy N, Toubert A, Peraldi MN. Natural killer cell function, an important target for infection and tumor protection, is impaired in type 2 diabetes. PLoS One. 2013; 8: e62418.

[13] Chan CJ, Smyth MJ, Martinet L. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. Cell Death Differ. 2014; 21: 5-14.

[14] Imai K, Nakachi K. Personality types, lifestyle, and sensitivity to mental stress in association with NK activity. Int. J. Hyg. Environ. Health. 2001; 204: 67-73.

[15] Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. Lancet. 2000; 356: 1795-1799.

[16] Ogata K, Yokose N, Tamura H, An E, Nakamura K, Dan K, Nomura T. Natural killer cells in the late decades of human life. Clin. Immunol. Immunopathol. 1997; 84: 269-275.

[17] Mysliwska J, Mysliski A, Romanowski P, Bigda J, Sosnowska D, Foerster J. Monocytes are responsible for depressed natural killer (NK) activity in both young and elderly low NK responders. Gerontology. 1992; 38: 41-49.

[18] Udenigwe CC,Aluko RE. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. J. Food Sci. 2012; 77: R11-24.

[19] Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. Curr. Opin. Biotechnol. 2007; 18: 163-169.

[20] Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: production and functionality. Int. Dairy J. 2006; 16: 945-960.

[21] Seimensma AD, Weijer WJ, Bak HJ. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. Trends Food. Technol. 1993; 4: 16-21.

[22] Grimble GK, Rees RG, Keohane PP, Cartwright T, Desreumaux M, Silk DB. Effect of peptide chain length on absorption of egg protein hydrolysates in the normal human jejunum. Gastroenterology. 1987; 92: 136-142.

[23] Gauthier SF, Pouliot Y, Saint-Sauveur D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. Int. Dairy J. 2006; 16: 1315-1323.

[24] Clemente A, Vioque J, Sánchez-Vioque R, Pedroche J, Bautista J, Millán F. Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. Food Chem. 1999; 67: 269-274.

[25] Mondal M, Trivedy K, Kumar SN. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., - a review. Caspian J. Env. Sci. 2007; 5: 63-76.

[26] Kato N, Sato S, Yamanaka A, Yamada H, Fuwa N, Nomura M. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1998; 62: 145-147.

[27] Aramwit P, Damrongsakkul S, Kanokpanont S, Srichana T. Properties and antityrosinase activity of sericin from various extraction methods. Biotechnol. Appl. Biochem. 2010; 55: 91-98.

[28] Sasaki M, Kato N, Watanabe H, Yamada H. Silk protein, sericin, suppresses colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in mice. Oncol. Rep. 2000; 7: 1049-1052.

[29] Zhaorigetu S, Sasaki M, Watanabe H, Kato N. Supplemental silk protein, sericin, suppresses colon tumorigenesis in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice by reducing oxidative stress and cell proliferation. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2001; 65: 2181-2186.

[30] Okazaki Y, Kakehi S, Xu Y, Tsujimoto K, Sasaki M, Ogawa H, Kato N. Consumption of sericin reduces serum lipids, ameliorates glucose tolerance and elevates serum adiponectin in rats fed a high-fat diet. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2010; 74: 1534-1538.

[31] Dash R, Mandal M, Ghosh SK, Kundu SC. Silk sericin protein of tropical tasar silkworm inhibits UVB-induced apoptosis in human skin keratinocytes. Mol. Cell. Biochem. 2008; 311: 111-119.

[32] Li YG, Ji DF, Chen S, Hu GY. Protective effects of sericin protein on alcohol-mediated liver damage in mice. Alcohol Alcohol. 2008; 43: 246-53.

[33] Zhang YQ. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. Biotechnol. Adv. 2002; 20: 91-100.

[34] Onsa-Ard A, Shimbhu D, Tocharus J, Sutheerawattananonda M, Pantan R, Tocharus C. Hypotensive and vasorelaxant effects of sericin-derived oligopeptides in rats. ISRN Pharmacol. 2013; 2013: 717529.

[35] Choi EM, Kim AJ, Kim YO, Hwang JK. Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan *in vitro*. J. Med. Food. 2005; 8: 446-453.

[36] Yuan C, Huang X, Cheng L, Bu Y, Liu G, Yi F, Yang Z, Song F. Evaluation of antioxidant and immune activity of *Phellinus ribis* glucan in mice. Food Chem. 2009; 115: 581-584.

[37] Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. J. Immunol. 1996; 157: 1840-1845.

[38] Masera RG, Bateman A, Muscettola M, Solomon S, Angeli A. Corticostatins/defensins inhibit *in vitro* NK activity and cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. Regul. Pept. 1996; 62: 13-21.

[39] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. . Immunol. Methods. 1983; 65: 55-63.

[40] Haddad PS, Azar GA, Groom S, Boivin M. Natural health products, modulation of immune function and prevention of chronic diseases. eCAM. 2005; 2: 513-520.

[41] Cross ML,Gill HS. Modulation of immune function by a modified bovine whey protein concentrate. Immunol. Cell Biol. 1999; 77: 345-350.

[42] Otani H, Hata I. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine milk caseins and their digests. J. Diary Res. 1995; 62: 339-348.

[43] Eriksen EK, Vegarud GE, Langsrud T, Almaas H, Lea T. Effect of milk proteins and their hydrolysates on *in vitro* immune responses Small Ruminant Res. 2008; 79: 29-37.

[44] Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. Blood. 1990; 76: 2421-2438.

[45] Smyth MJ,Ortaldo JR. Comparison of the effect of IL-2 and IL-6 on the lytic activity of purified human peripheral blood large granular lymphocytes. J. Immunol. 1991; 146: 1380-1384.

[46] Itoh K, Shiiba K, Shimizu Y, Suzuki R, Kumagai K. Generation of activated killer (AK) cells by recombinant interleukin 2 (rIL 2) in collaboration with interferon-gamma (IFN-gamma). J. Immunol. 1985; 134: 3124-3129.

Table 1. Amino acid composition of sericin-derived oligopeptides

Amino acids	Amounts (%)
Alanine	2.54
Arginine	0.007
Aspartic acid	13.42
Cysteine	0.007
Glutamic acid	3.72
Glycine	4.79
Histidine	7.66
Isoleucine	1.34
Leucine	3.01
Lysine	15.93
Methionine	0.007
Phenylalanine	1.57
Proline	0.82
Serine	14.27
Threonine	3.33
Tryptophan	0.007
Tyrosine	23.86
Valine	3.70

Table 2. NK cell activity of human PBMCs after *in vitro* exposure to varying concentrations of SDO at different effector: target (E:T) ratios[a]

Treatment	Concentration (μg/mL)	% NK cell activity at E:T ratio		
		3.13:1	1.56:1	0.78:1
SDO	0	26.96 ± 0.65	35.61 ± 4.20	33.33 ± 1.52
	50	19.12 ± 3.06	38.18 ± 2.84	38.26 ± 0.98
	100	26.23 ± 4.25	41.52 ± 6.04	36.99 ± 0.61
	500	36.03 ± 2.12*	43.03 ± 4.49	41.21 ± 0.78**
IL-2	100 U/mL	37.82 ± 7.80	39.30 ± 6.59	33.18 ± 6.66
IFN-γ	650 U/mL	39.75 ± 9.70	35.88 ± 5.56	36.35 ± 3.91

[a] Human PBMCs were incubated with SDO at different concentrations and tested for NK cell activity against K562 tumor target cells. Values expressed as mean ± SEM are the representative of four independent experiments with similar results. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ compared to the untreated control.

Figure captions

Fig. 1. Effect of SDO on viability of human PBMCs.

Viability of human PBMCs exposed to SDO at concentrations of 100, 300 and 500 μg/mL for 120 h was determined by trypan blue dye exclusion. Values are mean ± SEM, n = 5-8.

Fig. 2. Effect of SDO-conditioned culture supernatant on NK activity.

Purified NK cells were treated with conditioned supernatant collected from SDO-treated PBMCs for 20 h and the cytotoxicity was assayed against K562 target cells. Values are mean ± SEM from two independent experiments. **, $p < 0.01$ compared to control (supernatant from untreated PBMCs).

Fig. 3. Effect of SDO on *in vitro* cytokine production.

Human PBMCs were treated with various concentrations of SDO at 37°C in 5% CO_2 atmosphere. After 72 h, culture supernatants were harvested and measured for IL-2 (A) and IFN-γ (B) by sandwich ELISA. Values are mean ± SEM from two independent experiments. **, $p < 0.01$ compared to control.

Fig. 4. Effect of SDO on NK activity *in vivo*.

Splenic cells were isolated from BALB/c mice fed SDO daily for 7 days and cultured with YAC-1 target cells at E:T ratios of 25:1 (A) and 50: 1 (B). After 20 h in a 37°C and 5% CO_2 incubator, activity of NK cells was determined by MTT assay. SDO50, SDO100 and SDO500, sericin-derived oligopeptides 50, 100 and 500 mg/kg BW treated groups. Values are mean ± SEM, n=5. *, $p < 0.05$ compared to control.

Fig. 5. Effect of SDO on IL-2 production from mice fed SDO.

Splenic cells from mice fed SDO were cultured with ConA at 37°C in 5% CO_2 atmosphere. After 72 h, supernatants were harvested and analyzed by sandwich ELISA. SDO50, SDO100 and SDO500, sericin-derived oligopeptides 50, 100 and 500 mg/kg BW treated groups. Values are mean ± SEM, n=5.

Fig. 1.

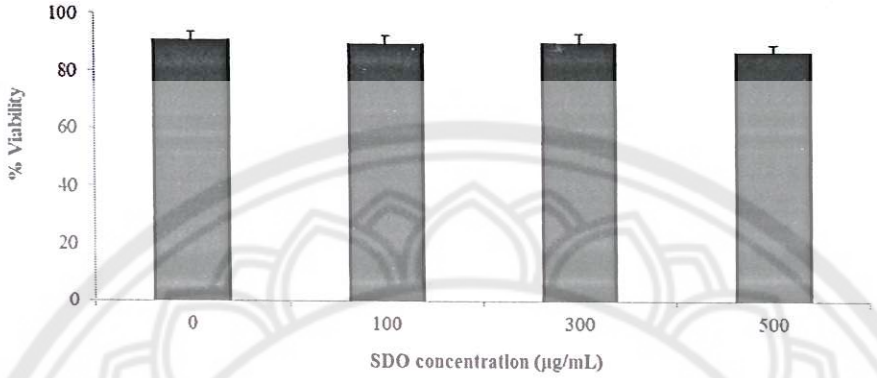

100
80
60
40
20
0
% Viability
0
100
300
500
SDO concentration (µg/mL)

Fig. 2.

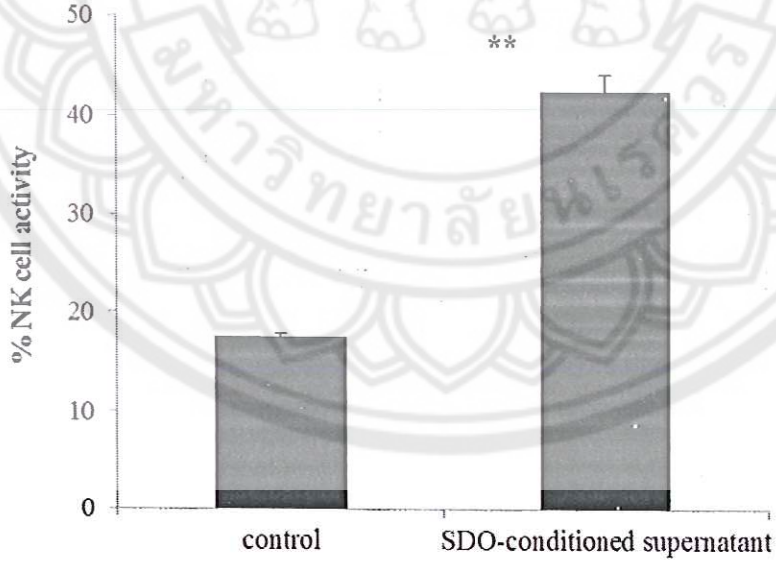

50
40
30
20
10
0
% NK cell activity
**
control
SDO-conditioned supernatant

Fig. 3.

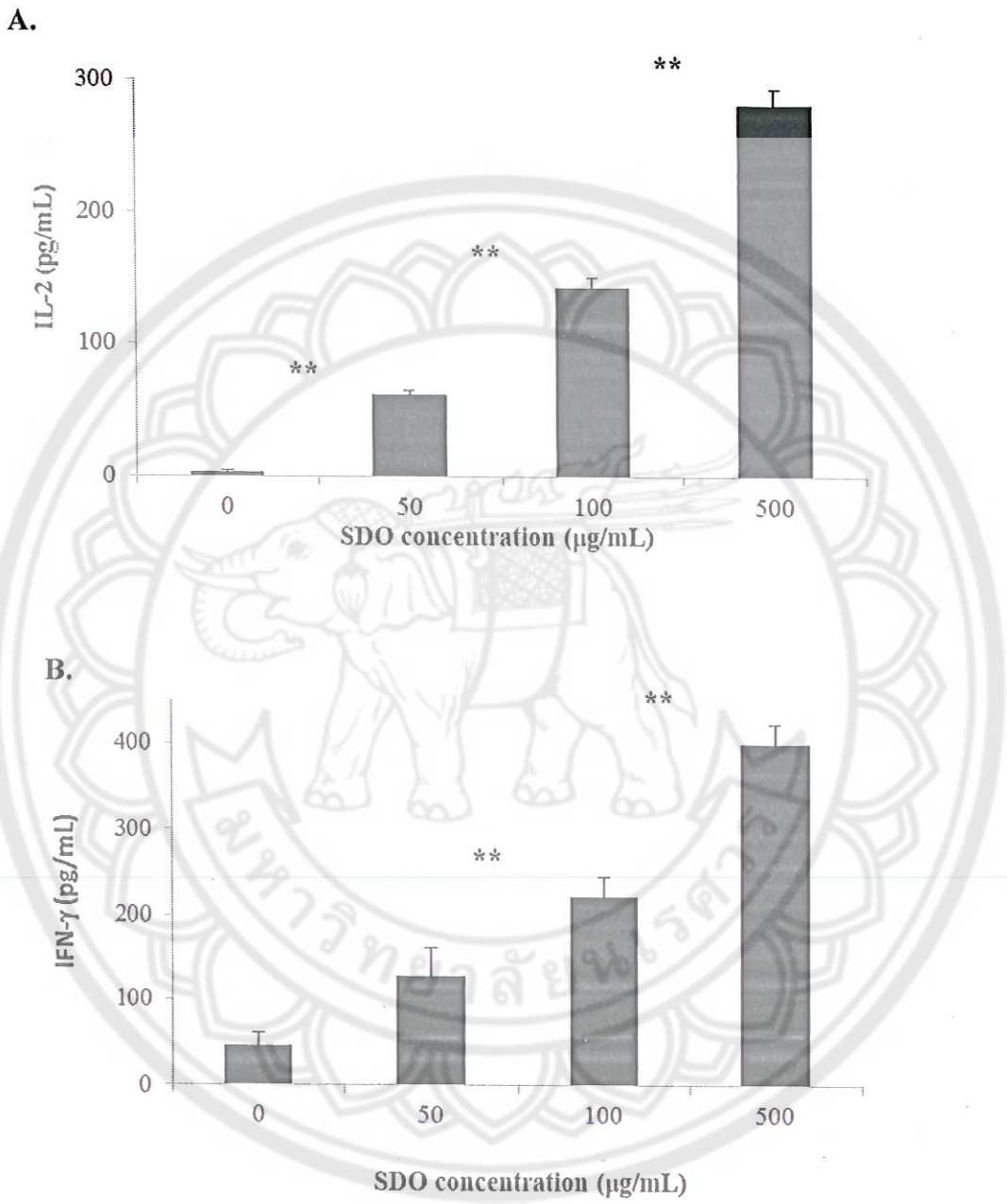
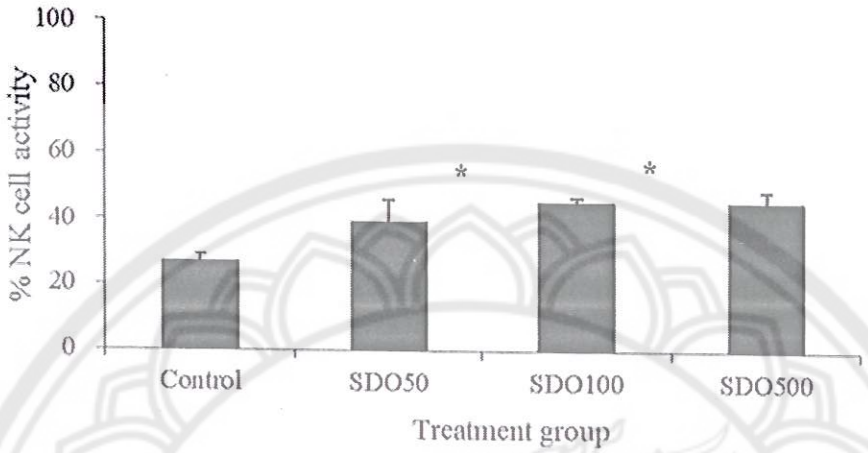

A.
300
200
100
0
IL-2 (pg/mL)
**
**
**
0
50
100
500
SDO concentration (µg/mL)
B.
400
300
200
100
0
IFN-γ (pg/mL)
**
**
0
50
100
500
SDO concentration (µg/mL)

Fig. 4.

A.


100
80
60
40
20
0
% NK cell activity
*
*
Control
SDO50
SDO100
SDO500
Treatment group

B.

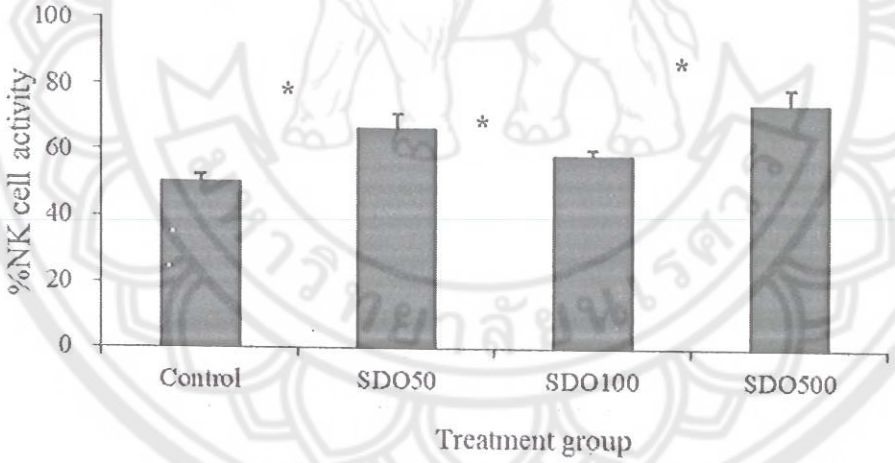
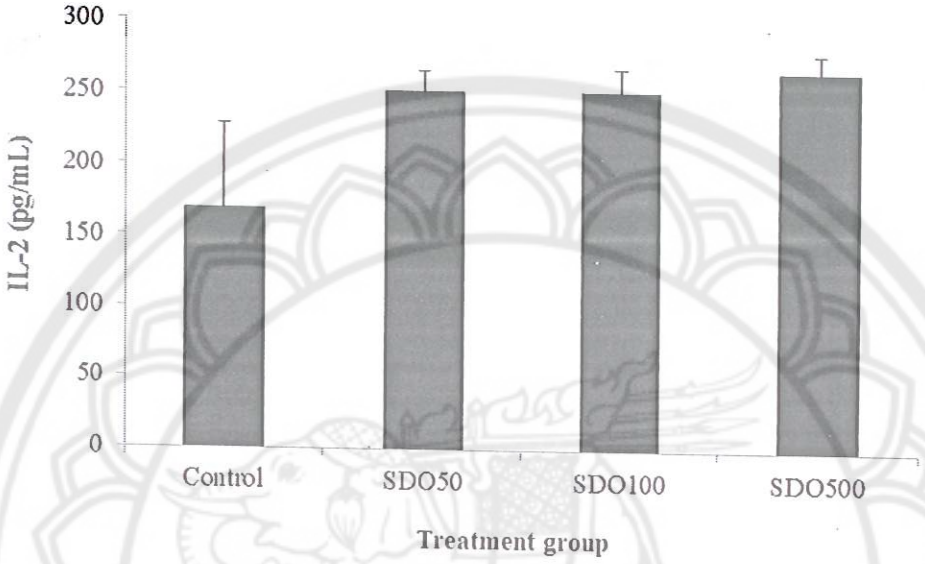

100
80
60
40
20
0
%NK cell activity
*
*
*
Control
SDO50
SDO100
SDO500
Treatment group

Fig. 5. Pornpimon Jantarak



เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ

10th นเรศวรวิจัย

Naresuan University National Research Conference

เครือข่ายวิจัย สร้างความรู้สู่อาเซียน

Research Networking towards ASEAN Knowledge Development

ABSTRACTS

22-23 กรกฎาคม 2557

ณ อาคารเฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษาฯ

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อการสร้างไซโตไคน์โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน

พรพิมล จันทะรักษ์[1] มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์[2] และ ดวงกมล ขันธเลิศ[1*]

Effect of sericin-derived oligopeptides on cytokine production by human leukocytes

Pornpimon Jantarak[1], Manote Sutheerawattananonda[2] and Duangkamol Kunthalert[1*]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000
[2]สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000
[1]Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000
[2]School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000
*Corresponding author. E-mail: kunthalertd@yahoo.com

บทคัดย่อ

ซิริซินเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักของรังไหมที่ได้จากหนอนไหม *Bombyx mori* ซึ่งมักถูกกำจัดเป็นของเสียในกระบวนการผลิตผ้าไหม ถึงแม้ว่าซิริซินจะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ แต่ด้วยขนาดโมเลกุลที่มีความแตกต่างในกันมาก ทำให้โปรตีนซิริซินละลายน้ำได้ไม่ดี และอาจเป็นข้อจำกัดในการนำโปรตีนดังกล่าวนำไปใช้ประโยชน์ ในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อการสร้างไซโคไคน์ในหลอดทดลอง โดยนำ human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ที่แยกได้จากเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดี มาเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มี หรือมีอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 500 µg/ml ภายหลังการบ่มที่ 37°C นาน 72 ชั่วโมงจึงวัดปริมาณไซโตไคน์ชนิด interleuin-2 (IL-2) และ interferon-γ (IFN-γ) โดยวิธี sandwich enzyme-linked immunosorbent assay พบว่าอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบมีผลไปกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-2 และยังพบว่าอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินสามารถกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN-γ ได้เช่นเดียวกัน โดยการกระตุ้นดังกล่าวเป็นไปในลักษณะที่ขึ้นกับปริมาณของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซิน ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์การกระตุ้นทางภูมิคุ้มกันของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซิน คุณสมบัติในการกระตุ้นทางภูมิคุ้มกันดังกล่าว ตลอดจนความเกี่ยวข้องทางคลินิกของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินจึงเป็นสิ่งที่ควรทำการศึกษาในขั้นต่อไป

คำสำคัญ: ซิริซิน อนุพันธ์ขนาดเล็ก การสร้างไซโคไคน์ เซลล์เม็ดเลือดขาวของคน อินเตอร์ลูวคิน-2 อินเตอร์เฟียรอน-แกมมา

Abstract

Sericin is a major protein of silkworm *Bombyx mori* cocoons that is mostly removed as waste in silk processing. Though possesses various pharmacological activities, its broad ranges of molecular mass produce less solubility of the sericin protein, and may subsequently limit uses of such protein. In this study, the effect of oligopeptides derived from the sericin protein on *in vitro* cytokine production was investigated. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from healthy blood donors were cultured in the absence or presence of sericin-derived oligopeptides at concentrations of 50, 100 and 500 µg/ml. Upon the incubation at 37°C for 72 hours, production of interleuin-2 (IL-2) and interferon-γ (IFN-γ) was determined by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. Sericin-derived oligopeptides of all doses significantly stimulated the IL-2 cytokine production in human PBMCs. Similarly, such oligopeptides also induced the production of IFN-γ cytokine. These effects were in dose-dependent manner. The present results provide evidence that the sericin-derived oligopeptides exert immunostimulatory effect. Further investigations are thus warranted to better characterize such effects and to assess its clinical relevance.

Keywords: sericin, oligopeptides, cytokine production, human leukocytes, IL-2, IFN-γ