



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ปีที่ 1

เรื่อง

“ฤทธิ์ต้านการติดเชื้อ HPV16 pseudovirus และการกระตุ้นแสดงออกของจีน toll like receptor
ของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรและพญายอ”

“Anti-HPV16 pseudovirus infection and induction of toll like receptor gene expression
of Andrographis paniculata and Clinacanthus nutans compounds”

คณะผู้วิจัย

รศ.ดร.ฉันทนา อารมย์ดี	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ดร.สุภาวดี สืบศาสนา	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
รศ.ดร. บุญเกิด คงยิ่งยศ	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.ดร.พญ. แจ่มใส เพียรทอง	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.พญ. ทิพย์ยา เอกลักษณ์นันท์	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โครงการนี้เป็นหนึ่งโครงการย่อยของชุดโครงการ “การพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาและนาโน
เทคโนโลยีเพื่อการป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูก”

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้เป็นหนึ่งโครงการย่อยของชุดโครงการ “การพัฒนาเทคนิคทางอนุชีววิทยา และนาโนเทคโนโลยีเพื่อการป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูก” ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยประเภท อุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะผู้วิจัย ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นเป็นอย่างสูง ที่ให้การสนับสนุนทำให้การทำวิจัยสำเร็จได้ตาม วัตถุประสงค์

รศ.ฉันทนา อารมย์ดี
(หัวหน้าโครงการวิจัย)

บทคัดย่อ

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับสองของผู้หญิงทั่วโลก มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ human papillomavirus (HPV) ทางการมีเพศสัมพันธ์ และพบว่าการติดเชื้อ HPV16 บ่อยที่สุดปัจจัยที่ทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อ HPV พัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก มีทั้งปัจจัยจากผู้ติดเชื้อ เช่น อายุ และ ภูมิคุ้มกัน และจากตัวเชื้อ HPV เอง

ปัจจุบันมียาที่ใช้รักษาการติดเชื้อ HPV น้อยมาก และมีราคาแพง เนื่องจากไม่สามารถเพาะเลี้ยงไวรัสได้ จึงมีข้อจำกัดในการศึกษาพัฒนาการรักษาโรค ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงให้ความสนใจในการค้นคว้าหาสารสกัดจากสมุนไพรไทย เพื่อนำมาพัฒนาตัวยาใหม่ที่จะสามารถรักษาและ/หรือป้องกันการติดเชื้อ HPV รวมทั้งเพื่อเป็นพัฒนางานทางด้านพิษสมุนไพร หรือสารในกลุ่ม natural product ต่างๆ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและพญายอ ต่อการป้องกันการติดเชื้อ HPV รวมถึงศึกษาผลการกระตุ้น innate immunity โดยดูการเพิ่มการแสดงออกของยีน TLR แต่เนื่องจากยังไม่สามารถเพาะเลี้ยง HPV ในห้องปฏิบัติการได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยในปีที่ 1 จึงต้องการผลิต HPV16 pseudovirus เพื่อใช้เป็นต้นแบบไวรัสในการศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสของสารสกัดสมุนไพร เตรียมสารสกัดสมุนไพร และหาความเข้มข้นของสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์

HPV16 pseudovirus ถูกสร้างขึ้นใน 293FT cell line ที่ถูก transfect ด้วยพลาสมิด p16sheLL ซึ่งสามารถสร้าง viral protein L1 และ L2 สำหรับประกอบเป็น capsid ของ HPV16 pseudovirus และ พลาสมิด pfwB ซึ่งสามารถสร้าง green fluorescent protein ได้ HPV16 pseudovirus ถูกประกอบขึ้นโดย พลาสมิด pfwB ถูกห่อหุ้มด้วยโปรตีน HPV16 L1 และ L2 ส่วนความเข้มข้นของสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบใน 293FT cell line

ผลการทดลองสามารถเตรียมสารสกัดสมุนไพรจากฟ้าทะลายโจรและพญายอได้สารบริสุทธิ์สำหรับการวิจัยนี้ จากฟ้าทะลายโจร 3 ชนิดคือ Andrographolide (SS1), 14-deoxy-11,12-didehydro-andrographolide (SS2) และ 3, 19- isopropylidene andrographolide (SS3) และสารบริสุทธิ์จากพญายอ 3 ชนิดคือ $C_{55}H_{74}N_4O_5$ (136B), $C_{55}H_{72}N_4O_7$ (136C) และ $C_{53}H_{70}N_4O_5$ (136D) แต่ละชนิดมีความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 293FT cell line เท่ากับ 4.73, 1.13, 11.29, 3.79, 7.60 และ 19.41 ug/mL ตามลำดับ และสามารถผลิต HPV16 pseudovirus ได้ titer 4.6×10^6 transducing units/mL

การดำเนินโครงการวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์คือสามารถเตรียมสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและพญายอ และสามารถผลิต HPV16 pseudovirus สำหรับใช้ในโครงการวิจัยต่อไป

สารบัญ

	หน้า
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์	2
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	2
วิธีดำเนินการวิจัย	7
ผลการวิจัย	12
อภิปรายผล/วิจารณ์	15
สรุปผลการวิจัย/ข้อเสนอแนะ	16
บรรณานุกรม	17

1. บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ human papillomavirus (HPV) ทางทางเพศสัมพันธ์ จัดเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับสองของผู้หญิงทั่วโลก ส่วนใหญ่มักจะพบในประเทศที่กำลังพัฒนา และยังพบว่าเป็นสาเหตุที่สำคัญในการเสียชีวิตของผู้หญิงอีกด้วย ในประเทศไทยพบว่ามะเร็งปากมดลูกพบได้เป็นอันดับหนึ่งของมะเร็งทุกชนิดในสตรี จากการตรวจชิ้นเนื้อปากมดลูกที่มีความผิดปกติพบว่าการติดเชื้อ HPV16 ซึ่งเป็นกลุ่ม high risk (HR) HPV บ่อยที่สุด โดยตรวจพบในชิ้นเนื้อปากมดลูกที่ผิดปกติในระดับ CIN I, CIN II-III และ CA ร้อยละ 8, 12 และ 63 ตามลำดับ

ในการติดเชื้อ HPV ทั้งกลุ่ม high risk และ low risk (LR) จะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่บริเวณปากมดลูก เนื่องจากการติดเชื้อแบบยืดเยื้อ (persistent infection) แต่การติดเชื้อในกลุ่ม HR-HPV จะทำเซลล์บริเวณนั้นพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก นอกจากนี้แล้วยังขึ้นกับปัจจัยอื่นด้วย ทั้งจากผู้ติดเชื้อ เช่น อายุ และ ภูมิคุ้มกัน และจากตัวเชื้อเอง พบว่าเชื้อในกลุ่ม HR-HPV มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูกเนื่องจากการแสดงออกของ oncoprotein ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์

ปัจจุบันมียาที่ใช้รักษาการติดเชื้อ HPV น้อยมาก เนื่องจากไม่สามารถเพาะเลี้ยงไวรัสได้ จึงมีข้อจำกัดในการศึกษาพัฒนาการรักษาโรค ปัจจุบันยาที่มีประสิทธิผลในการรักษาคือ imiquimod ซึ่งยาดังกล่าวค่อนข้างมีราคาแพง ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงให้ความสนใจในการค้นคว้าหาสารสกัดจากสมุนไพรไทยเพื่อนำมาพัฒนาตัวยาใหม่ที่จะสามารถรักษาและ/หรือป้องกันการติดเชื้อ HPV รวมทั้งเพื่อเป็นพัฒนางานทางด้านพืชสมุนไพร หรือสารในกลุ่ม natural product ต่างๆ

การศึกษาที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัยพบว่าสารสกัดจากสมุนไพรพญาเสือ และฟ้าทะลายโจร มีฤทธิ์ในการยับยั้ง herpes simplex virus (HSV) ซึ่งเป็นเชื้อที่ติดต่อทางเพศสัมพันธ์เช่นเดียวกับ HPV จึงคิดว่าควรจะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดดังกล่าวต่อ HPV โดยอาศัยความรู้จากกลไกในการติดเชื้อ HPV16 โดยเฉพาะในขั้นตอนแรกๆ ของการติดเชื้อ จึงได้ทำการศึกษาคูณสมบัติของสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและพญาเสือ เพื่อหาฤทธิ์ในการป้องกันการติดเชื้อ โดยใช้ pseudovirus เป็นต้นแบบไวรัสในการศึกษา รวมถึงศึกษาผลการกระตุ้น innate immunity โดยดูการเพิ่มการแสดงออกของจีน TLR เมื่อมีสารสมุนไพร ซึ่งการเพิ่มขึ้นของการตอบสนองด้าน innate immunity ที่เกิดขึ้นจะมีบทบาทสำคัญในการกำจัดเซลล์ติดเชื้อ ผลที่ได้จากการศึกษาดังกล่าวนี้น่าจะนำมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาการรักษาและป้องกันการติดเชื้อ HPV เพื่อลดอัตราการติดเชื้อ HPV แบบ persistent infection ซึ่งจะเป็นการป้องกันการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1. สร้าง HPV16 pseudovirus เพื่อใช้เป็น model ในการทดสอบเกี่ยวกับการติดเชื้อของไวรัส
2. ศึกษาฤทธิ์ด้านการติดเชื้อ HPV16 pseudovirus ของสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร และพญายอ
3. ศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและพญายอต่อการกระตุ้นการ แสดงออกของจีน TLR ในระบบ innate immunity

วัตถุประสงค์โครงการวิจัยปีที่ 1

เพื่อสร้าง HPV16 pseudovirus เพื่อใช้เป็น model ในการทดสอบเกี่ยวกับการติดเชื้อของไวรัส ซึ่งจะนำไปใช้ศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและพญายอในปีต่อไป

2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review literature)

ผู้ที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยว่ามีภาวะติดเชื้อที่เซลล์ปากมดลูกยังไม่มีแนวทางการรักษาที่ชัดเจน ส่วนในผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยวิธี colposcope และมี cervical lesion เป็น CIN3 ปัจจุบันจะได้รับการรักษาได้หลายรูปแบบเช่น Loop electrosurgical excision procedure (LEEP) หรือ Large loop excision of the transformation zone (LLETZ) ซึ่งการรักษาภาวะผิดปกติด้วยวิธีดังกล่าวอาจจะมีทั้ง ข้อดีที่เป็นการกำจัด lesion ที่เกิดขึ้นออกไปโดยพบความสำเร็จของการรักษาได้ร้อยละ 90-95% แต่ อาจจะมีข้อเสียถ้ากำจัด lesion ไม่หมด (excision margin) การรักษาภาวะดังกล่าวจึงขึ้นกับ ขนาดของ lesion[1] และหลังการรักษาต้องติดตามการตรวจคัดกรองอย่างต่อเนื่อง

ในกรณีการติดเชื้อและพบ cervical lesion เป็น CIN1 หรือ low grade abnormal lesion จากการตรวจ colposcopy ซึ่งการตรวจวินิจฉัยในระยะนี้อาจมีความผิดพลาดได้โดยพบร้อยละ 70 ของ CIN2/3 ที่อ่านผลเป็น LSIL/CIN1 เมื่อติดตามการรักษา 2 ปี [2, 3] ความผิดพลาดที่เกิดขึ้นจะทำให้มีการ รักษาผู้ที่ติดเชื้อและมีภาวะเนื้อเยื่อที่ผิดปกติเหล่านี้ได้

ตามแนวทาง (guideline) ของการรักษาในผู้ที่มีการติดเชื้อ HPV หรือไม่พบ HPV แต่มี cervical lesion LSIL/CIN1 จะต้องได้รับการตรวจ cytology ซ้ำทุก 6 เดือนสองครั้งติดกัน ถ้าไม่พบการติดเชื้อ HR-HPV ก็สามารถติดตามการตรวจคัดกรองในภาวะปกติได้เนื่องจากในระยะนี้ ร้อยละ 70 ของการติดเชื้อจะ regress ไปได้ [4] หรือในประเทศกำลังพัฒนาการนำวิธี cryosurgery มาใช้ก็อาจจะสามารถลดความ กังวลของผู้ป่วยได้แต่จากการศึกษาโดยกลุ่มวิจัยนี้ไม่พบความแตกต่างระหว่างให้การรักษา โดย cryosurgery และในกลุ่มเฝ้าติดตาม โดยพบอัตรา HPV clearance และ HPV persistent ไม่ต่างกัน [5]

จึงเห็นว่าการตรวจภาวะการติดเชื้อ HPV ด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งจะมีความสำคัญในการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกในปัจจุบัน

ในปัจจุบันได้มีวัคซีน 2 ชนิด ที่ผลิตขึ้นมาเพื่อป้องกันการติดเชื้อ HPV เช่น HPV vaccine, Gardasil มีประสิทธิภาพร้อยละ 100 ป้องกันการติดเชื้อ HPV16 และ 18 ได้[6] และ quadrivalent HPV 6/11/16/18 ผลิตโดย Merck แต่วัคซีนนี้ไม่สามารถกำจัดกลุ่มประชากรอีกร้อยล้านคนทั่วโลกที่ติดเชื้อ HPV ถึงแม้กลุ่มประชากรนี้จะมี spontaneous HPV regression ไปได้ พบว่าร้อยละ 15 ของการติดเชื้อ HR-HPV จะหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันและ persistent infection ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่จะก่อเกิดมะเร็งได้ [7] นอกจากนี้วัคซีนก็อาจจะไม่สามารถใช้ได้ในทุกส่วนต่างๆในโลกและไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อที่เป็นสาเหตุของมะเร็งปากมดลูกได้ทุกชนิด สารสนุนไพรบริสุทธิ ที่มีผลป้องกันการติดเชื้อไวรัสได้โดยมีผลขัดขวางการเกาะจับของไวรัสกับ host cell receptor น่าจะถูกนำมาศึกษาเพื่อนำมาใช้ในการป้องกันการติดเชื้อร่วมกับการพัฒนา prophylactic vaccine ที่มีในปัจจุบัน เนื่องจากมีรายงานพบว่า sulfated polysaccharides เช่น heparin, cellulose sulfate, and dextran sulfate, สามารถขัดขวางการติดเชื้อ HPV ได้[8] การศึกษาหาสารที่มีฤทธิ์ในการป้องกันและรักษาการติดเชื้อ HPV ได้แก่

(1) lactoferrin ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการ binding และ uptake เชื้อ HPV ใน *in vitro* และยังพบอีกว่า lactoferricin ซึ่งเป็นส่วนปลาย N-terminal ของ lactoferrin มีฤทธิ์ anti-viral เนื่องจากสามารถยับยั้งการ infection ของ HPV5 และ HPV16 pseudoviruses [9]

(2) Carrageenan เป็นสารสกัดจากสาหร่ายสีแดงมีฤทธิ์ในการป้องกันการติดเชื้อ HPV ได้ [10]

(3) cidofovir ซึ่งเป็น acyclic nucleoside phosphonate (ANP) มีฤทธิ์เป็น antiviral [11]และพบว่าสารนี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ของ HPV positive cells [12] (4) GSK983 เป็นสารตัวใหม่ กลุ่ม tetrahydrocarbazole ที่มีฤทธิ์ antiviral ต่อเชื้อไวรัสหลายชนิด ได้แก่ adenovirus: Ad-5, polyoma virus: SV-40, HPV และ EBV [13]

ยังมีสารสกัดจากพืชที่ถูกนำมาศึกษาในการเป็น antiviral ต่อเชื้อ HPV และ anticancer ที่เกิดจากการติดเชื้อ HPV ได้แก่ -(1) APS-1d เป็น polysaccharide ที่แยกได้จาก *Angelica sinensis* (Oliv.) พันธุ์ไม้ขนาดใหญ่ในตระกูลแครอท มีชื่อเรียกอีกชื่อว่า โสมสตรี จากรายงานการวิจัยพบว่าสารนี้มีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ของ cervical cancer cell ชนิด HeLa cells [14]

-(2) การ treat ด้วย carboplatin สามารถลดกิจกรรมของ NF- κ B โดยป้องกันการจับกันของ NF- κ B กับ Bcl-2 promoter ทำให้เกิดการ downregulate ของ Bcl-2 (antiapoptosis) [15] ยาอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงมากมาย

-(3) สารประกอบในชาเขียวช่วยยับยั้งอัตราการเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ เนื่องจากมีสารแคทีชินและโพลิฟีนอล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง EGCG [(-)-epigallocatechin-3-gallate] เป็น polyphenol มีฤทธิ์เป็น antitumor. EGCG สามารถยับยั้งการเจริญของ CaSki (HPV16 positive) and HeLa (HPV18 positive) cells โดยขึ้นกับเวลาและความเข้มข้นของสาร [16]

-(4) p-hydroxymethoxybenzobijuglone (HMBBJ) เป็น quinone compound ตัวใหม่ แยกได้จากต้น *juglans mandshurica* มีฤทธิ์ที่เป็นพิษต่อ HeLa (HPV18 positive) cell line [17]

ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. Ex Nees, อยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น เช่น หญ้าก้านงู (สงขลา) เมฆทะลาย (ยะลา) ฟ้าสะท้าน (พัทลุง) และ สามสิบดี (ร้อยเอ็ด) เป็นต้น ฟ้าทะลายโจรเป็นไม้ล้มลุก มีความสูงประมาณ 30 - 70 เซนติเมตร ลำต้นเป็นสี่เหลี่ยม แตกกิ่งจำนวนมาก ใบเรียวยาว ปลายใบแหลม ดอกมีขนาดเล็กสีขาว มีรอยกระสีม่วงแดง ลักษณะเป็นหลอด ฝักคล้ายฝักต้อยติ่ง เมล็ดสีน้ำตาลอ่อน โดยสมุนไพรฟ้าทะลายโจรมีสรรพคุณทางยา เช่น แก้ไข้ ระวังอาการอักเสบ แก้ติดเชื้อ พวกทำให้ปวดท้อง ท้องเสีย บิด แก้กระเพาะลำไส้อักเสบ และเป็นยาเจริญอาหาร การศึกษาสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรพบว่าในสารสกัดประกอบไปด้วยสารสำคัญชนิดต่างๆ เช่น สารในกลุ่ม diterpenes, flavonoids และ stigmasterols และจากการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรพบว่ามีฤทธิ์ต่างๆ มากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) [18], ฤทธิ์ต้านการเกิดเนื้องอก (anti-tumor) [19], ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (anti-malarial) [20], ฤทธิ์การต้านการแข็งตัวของหลอดเลือด (antithrombotic) [21], ฤทธิ์ต้านการเกิดพิษต่อตับ (antihepatotoxic) [22-24], ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ เช่น เชื้อ herpes simplex virus type 1 (HSV-1) [25], human immunodeficiency virus (HIV) [26] ซึ่งก็ได้มีการศึกษาการออกฤทธิ์ต่างๆ ของสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรรวมถึงฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ดังนี้

Rajagopal S และคณะ [27] ศึกษาโดยใช้ andrographolide ซึ่งเป็นสารสำคัญของสมุนไพร *A. paniculata* มีผลในการยับยั้ง cell proliferation ใน tumor cell line ชนิดต่างๆ เกิด cell-cycle arrest ที่ระยะ G0/G1 phase โดยการเหนี่ยวนำ cell-cycle inhibitory protein p27 และการลดระดับการแสดงออกของ cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) นอกจากนี้ยังพบว่า andrographolide ยังมีฤทธิ์เป็น immunostimulatory activity ในการกระตุ้นให้เกิด cell proliferation ของ lymphocytes และกระตุ้นการสร้าง interleukin 2 และมีฤทธิ์ anticancer ใน *in vivo* ศึกษาใน model B16F0 melanoma syngenic และ HT-29 xenograft models ซึ่งผลจากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบว่า สาร andrographolide น่าจะนำมาศึกษาและพัฒนาเป็น new anticancer drug ต่อไป

Kumar และคณะ [28] ทำการศึกษาลักษณะการต้านการเกิดมะเร็ง (anticancer) และฤทธิ์การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulatory activity) ของ compound ที่สกัดแยกได้จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata* compound) โดยสกัดสารด้วยตัวทำละลายเมทานอล (methanolic extract) จากนั้นทำการแยกส่วน fraction เพื่อให้ได้เป็น compounds ชนิดต่างๆ ด้วยตัวทำละลาย dichloromethane, petroleum ether และ น้ำ โดยศึกษาฤทธิ์ของ compounds ที่แยกได้ในแต่ละตัวทำละลาย ซึ่งพบว่าสารที่แยกด้วย dichloromethane มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่น โดยที่ระดับความเข้มข้นต่ำของสารสกัดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์ HT-29 (colon cell line) ได้ดีและยังสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ human peripheral blood lymphocytes (HPBLs) ได้ดี และพบว่าสารที่สามารถแยกได้จากตัวทำละลายดังกล่าว ประกอบด้วยสาร 3 ชนิด คือ andrographolide, 14-deoxyandrographolide และ 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide จากการนำ สารทั้ง 3 ชนิดมาทดสอบพบว่า andrographolide compound มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้ดีกว่าสารชนิดอื่นๆ โดยผลการยับยั้งให้ผลดีแตกต่างกันในเซลล์ทดสอบแต่ละชนิดและยังสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ lymphocyte และระดับ interleukin-2 (IL-2) ที่เซลล์ HPBLs สร้างขึ้นด้วย

Cheung HY และคณะ [29] ทำการศึกษาใน *in vitro* เพื่อดูผล cytotoxicities ของ ethanol extract ของ *Andrographis paniculata* (APE) และสารสำคัญในกลุ่ม diterpenoid ในเซลล์มะเร็ง โดยพบว่า APE สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ human acute myeloid leukemic HL-60 หลังจาก treat สารไป 24 ชั่วโมง พบว่าค่า IC_{50} value เท่ากับ 14.01 $\mu\text{g/ml}$ และสารในกลุ่ม diterpenoid ทั้ง 3 ชนิด พบว่า andrographolide มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สาร deoxyandrographolide ในขณะที่สาร neoandrographolide ให้ผลน้อยที่สุด จากการศึกษาการเกิด apoptosis โดยวิธี Laser confocal microscopy และ gel electrophoresis พบว่ามีการเกิด DNA fragmentations และเมื่อทำการศึกษา cell cycle arrest พบว่าเซลล์ที่ treat ด้วย andrographolide นาน 36 ชั่วโมง สามารถเพิ่มระยะ G_0/G_1 phase ซึ่งการที่ cell cycle เกิดการ arrest ที่ระยะ G_0/G_1 phase จะทำให้เซลล์เกิด apoptosis เกิดขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับการไม่สามารถตรวจพบ mitochondrial cytochrome c และ Bax มีการ expression เพิ่มขึ้นในขณะที่ Bcl-2 proteins expression ลดลง จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่าสาร APE และ andrographolide สามารถเหนี่ยวนำการเกิด cell cycle arrest และการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ HL-60 ได้

Sheeja K และ Kuttan G [30] ทำการศึกษา antiangiogenic activity ของ *Andrographis paniculata* extract (APE) and andrographolide (ANDLE) ใน *in vitro* และ *in vivo* models จากการศึกษาใน C57BL/6 mice พบว่าการฉีด APE และ ANDLE เข้าที่ช่องท้องนั้นสามารถยับยั้งการสร้างหลอดเลือดฝอยในเซลล์ B16F-10 melanoma cell line ได้ และเมื่อทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของ cytokine ในซีรัม พบว่าสารเหล่านี้ทำให้ระดับของ proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, TNF- α and GM-CSF และ angiogenic factor VEGF ลดลง ซึ่งสารเหล่านี้จะพบมากในสัตว์ที่เหนี่ยวนำให้เกิด angiogenesis นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ VEGF mRNA ใน B16F-10 cell line พบว่าสารมีผลในการลดระดับการแสดงออกของ VEGF mRNA ได้เมื่อเทียบกับกลุ่ม control

Zhao F และคณะ [19] ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเนื้องอก (anti-tumor) ของ andrographolide ต่อเซลล์มะเร็ง ศึกษาใน *in vitro* จากการศึกษาพบว่าสารนี้มีผลในการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์

prostate cancer (PC-3) ผ่านการกระตุ้น caspase 3, up-regulation ของ bax และ down-regulation ของ bcl-2 นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาโดยวิธี ELISA พบว่าสารนี้สามารถยับยั้ง vascular endothelial growth factor ได้อีกด้วย

ในปัจจุบันได้มียาที่ผลิตออกจำหน่ายและใช้รักษาภาวะติดเชื้อ HPV (warts) เช่น Imiquimod, an immune response modifier ซึ่งกระตุ้นภูมิคุ้มกันผ่าน a Toll-like receptor (TLR) [31] โดยสามารถกระตุ้นได้ทั้ง local innate immunity (non-specific) และมีผลกระตุ้น adaptive immune response (e.g., specific T-cell effectors) และมีผลต่อการทำลายเซลล์มะเร็งได้ (anti tumoural effect) ยาที่กำลังถูกนำมาใช้ทดสอบร่วมกับ HPV therapeutic vaccine [32]

พญาขอ (*Clinacanthus nutans* Lindau.) ได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ HSV พญาขอเป็นพืชสมุนไพรไทยที่อยู่ในวงศ์ *Acanthaceae* มีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น คือ ผักมันไก่ ผักลิ้นเขียด (เชียงใหม่) พญาปล้องคำ (ลำปาง) เสลดพังพอนตัวเมีย พญาปล้องทอง พญาปล้องคำ (กลาง) ลิ้นมังกร โพไซจาง (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) เป็นไม้พุ่มเลื้อยสูง 1-3 เมตร ลำต้นและกิ่งก้านสีเขียว ใบเป็นใบเดี่ยวออกตรงข้ามกัน รูปรีแคบ ขอบขนาน ใบกว้าง 0.5-1.5 ซม. ยาว 2.5-13 ซม. ปลายและโคนใบแหลม ริมใบเรียบ ดอกเป็นช่อ ออกเป็นกระจุกที่ปลายกิ่ง มี 5 ดอกย่อยขึ้นไป กลีบดอกสีแดงส้ม โคนกลีบสีเขียวติดกันเป็นหลอด ปลายแยกเป็น 2 ส่วน ผลเป็นผลแห้ง แตกได้ พบได้ทั่วไปตามป่าประเทศไทย หรือปลูกกันตามบ้าน ส่วนที่ใช้ในการนำมาทำเป็นยารักษาโรค มักนิยมใช้ส่วนของใบ ซึ่งพืชดังกล่าวมีสรรพคุณทางยา ดังนี้ (1) มีฤทธิ์ลดการอักเสบ สารที่สำคัญในการออกฤทธิ์ลดการอักเสบ คือ เฟลโวนอยด์ (2) มีฤทธิ์ลดความเจ็บปวด (3) มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส ได้แก่ HSV-1 และ Varicella zoster virus

ในประเทศไทยพืชสมุนไพรพญาขอ ได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ HSV มากขึ้นเนื่องได้รับการพิสูจน์ทางคลินิกมากพอสมควร เช่นในรายงานการวิจัยของ Sangkitporn S และคณะ [33] ได้ทำการศึกษาโดยใช้สารสกัด *C. nutans* มา treat ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ varicella-zoster virus และเทียบกับกลุ่ม control โดย treat วันละ 5 ครั้ง เป็นเวลา 7-14 วัน จนกระทั่ง lesions หายไป พบว่าจำนวนผู้ป่วยที่แผลตกสะเก็ดภายใน 1-3 วัน และ lesions หายภายใน 7-10 วัน ในกลุ่มที่ได้รับการ treat ด้วยสารสกัดจาก *C. nutans* ซึ่งดีกว่ากลุ่ม control และอาการปวดก็ลดลงเร็วกว่า นอกจากนี้แล้วในการศึกษานี้สารนี้ไม่มี side effect

การศึกษานี้ต้องการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*) และสมุนไพรพญาขอ (*C. nutans*) ในการต้านเชื้อ HPV ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาฤทธิ์ด้านการเกิดมะเร็งของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรแล้ว แต่ยังไม่มียารายงานฤทธิ์ด้านการติดเชื้อ HPV หรือการเกิดมะเร็งปากมดลูก โดยมีความสนใจว่าสมุนไพรฟ้าทะลายโจร น่าจะมีผลยับยั้งเชื้อ HPV ได้ ส่วนพืชสมุนไพรพญาขอ (*C. nutans*) ยังไม่มีรายงานที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์การต้านมะเร็งแต่ก็เป็นพืชที่น่าสนใจในการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรในด้านนี้ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ซึ่งถ้าหากพืชทั้ง 2 ชนิดที่นำมาทำการศึกษานี้สามารถให้ผลในการยับยั้งเชื้อ HPV ได้จะทำให้ได้ความรู้ใหม่เพิ่มเติมในการศึกษางานทางด้านสมุนไพรและสามารถนำมาประยุกต์ใช้

งานทางด้านสาธารณสุขในการผลิตยาชนิดใหม่ในการใช้รักษามะเร็งและโรคติดเชื้อ HPV ได้ ซึ่งจะเป็นการช่วยสนับสนุนการนำพืชสมุนไพรที่ได้ทั่วไปในประเทศมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรค ทำให้สามารถพึ่งพาตนเองได้อย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

3. วิธีดำเนินการวิจัย (Method)

3.1 การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและพญาเสือ

เตรียมสารสกัดบริสุทธิ์จากพืชสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและพืชสมุนไพรพญาเสือ ซึ่งเป็นวิธีการสกัดที่เป็นมาตรฐานและได้เผยแพร่มาก่อนหน้านี้ในกลุ่มการวิจัยนี้ [34] โดยนำสารบริสุทธิ์อย่างน้อย 3 ชนิด ที่เตรียมได้จากพืชสมุนไพรแต่ละชนิดและเป็นชนิดที่เคยรายงานว่ามียาต้านการติดเชื้อไวรัส เช่น herpes simplex virus มาก่อน [34] นำสารมาละลายใน DMSO และเจือจางด้วย DMEM ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น 2 mg/ml ทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ filter membrane ขนาด 0.2 μ m. เก็บสารสกัดที่ได้ ที่ 4°C สำหรับใช้ในการทดสอบหาระดับความไม่เป็นพิษต่อเซลล์และเป็นระดับความเข้มข้นที่จะนำไปใช้ทดสอบหาผลต้านการติดเชื้อ HPV 16 pseudovirus

3.2 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด 293FT cell line (Invitrogen) ซึ่งเป็น human embryonic kidney cells ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด D-MEM (Gibco/Life Technologies) ที่เติม 10% fetal bovine serum (FBS), 0.1 mM MEM non-essential amino acids, 6 mM L-glutamine และ 500 μ g/mL geneticin ที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5 % CO₂ incubator

3.3 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารบริสุทธิ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและพญาเสือ [35]

นำ 293FT cell line มาเลี้ยงใน 96-well tissue culture plate ให้มีลักษณะเป็น monolayer จากนั้นเติมสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นต่างกัน ส่วนชุดควบคุมจะไม่ทำการเติมสารสกัด และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ นาน 72 ชั่วโมง เติม methyldiazolium tetrazolium (MTT) 20 μ L/well และ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ นาน 4 ชั่วโมง จากนั้น ดูด media ออก แล้วละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO 100 μ L/well และเขย่า plate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm คำนวณค่า percentage of cell viability เทียบกับ untreated cell (ODเฉลี่ย ของ untreated cell มีค่าเท่ากับ 100%) การทดลองนี้จะทำให้ทราบค่า CC₅₀ และระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.4 การเตรียม HPV 16 pseudovirus

3.4.1 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง [36, 37]

293FT cells เป็นเซลล์ที่มีการ express SV40 large T (LT) antigen จะถูกเลี้ยงในอาหารชนิด Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่มี 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% Glutamax และ non-essential amino acids

3.4.2 การเตรียม Plasmid

ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. John T Schillier (National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA) Reporter plasmid ที่ใช้คือ pYSEAP หรือ pfwB เป็น pseudogenome ที่มี SV40 ori Expression plasmid ที่ใช้คือ p16L1h (HPV16 L1 genes), p16L2h (HPV16 L2 genes) และ p16SheLL (HPV L1 and L2 gene)

ทำการเพิ่มปริมาณพลาสมิดสำหรับการเตรียม HPV 16 pseudovirus ดังนี้

การเตรียม competent cells (*E. coli* DH5 α)

1. นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* DH5 α มาเลี้ยงใน LB broth ปริมาตร 250 ml. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3-4 ชั่วโมง (OD₆₀₀ ~ 0.5-0.6).
2. แบ่ง suspension และ เติมลงใน centrifuge tubes (10 ml/tube). บ่ม on ice นาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,400 rpm. 4°C นาน 20 นาที
3. Resuspend pellets ด้วย 50 mM CaCl₂ 3 ml/tube . บ่ม on ice นาน 15 นาที และ 2,400 rpm. 4°C นาน 20 นาที และ Resuspend pellets ด้วย 50 mM CaCl₂ supplement with 15% glycerol 200 μ l/tube.
4. เก็บ competent cells ที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

การ transform พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5 α

1. ผสม plasmid ปริมาณ 50 ng กับ competent cells ปริมาตร 100 μ l.
2. บ่ม on ice นาน 20 นาที
3. Heat shock ที่อุณหภูมิ 42°C ใน water bath 30 วินาที
4. บ่ม on ice นาน 5 นาที
5. เติม SOC media ปริมาตร 900 μ l.
6. บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C, 250 rpm, 60 นาที
7. Spread 100 μ l. ของ transformed competent cells บน LB agar ที่มีการเติม 100 μ g/ml ampicillin สำหรับคัดเลือก transformed ที่มี p16L1h, p16L2h และ p16SheLL หรือ 75 μ g/ml blasticidin สำหรับ transformed ที่มี pYSEAP and pfwB.
8. บ่ม over night ที่อุณหภูมิ 37°C, นาน 19-20 ชั่วโมง

การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* DH5 α

1. นำโคโลนีเดี่ยวที่ขึ้นบน LB agar plate ที่มียา antibiotic (ampicilin or blasticidin) ใส่ลงใน LB broth ที่มียา antibiotic นำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C, 250 rpm, นาน 20-21 ชั่วโมง
2. แบ่ง suspension ใส่ใน eppendorf tube (1.5 ml/tube) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm, 5 min.
3. เทส่วน supernatants ทิ้ง
4. เติม solution I 100 μ l/tube และ mix ด้วยการ vortex
5. เติม solution II 200 μ l/tube และ mix ด้วยการกลับ tube ไปมาประมาณ 5 นาที
6. เติม solution III 150 μ l/tube.
7. บ่ม on ice นาน 5 นาที
8. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm, นาน 10 นาที
9. เตรียม isopropanol 450 μ l. ใน eppendorf tube จากนั้นเติม supernatants เติมลงไป ใน tube และบ่มที่อุณหภูมิ -70°C , นาน 1 ชั่วโมง
10. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm, นาน 30 นาที และทิ้งส่วน
11. เติม 300 μ l. ของ 70% ethanol, mix และ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm, นาน 10 นาที
12. เทส่วน supernatants ทิ้ง และ ปล่อยให้ DNA แห้ง ประมาณ 1 ชั่วโมง
13. เติม 50 μ l. ของ Rnase A TE, mix และ ที่อุณหภูมิ 55°C ใน heat box นาน 15 นาที
14. ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดโดยการทำให้ gel electrophoresis (0.7% agarose gel)

3.4.3 การเตรียมและเพิ่มปริมาณ pseudoviruses โดยวิธี transfection

1. เตรียม 293FT cells จำนวน 2×10^7 cells ใน flask ขนาด 162 cm² เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง
2. ใช้ lipofectanine 2000 ในการ transfection ด้วย pfwB และ p16sheLL อย่างละ 19 μ g หลังจากนั้น 4-6 ชั่วโมง
3. เปลี่ยน media และแยกเซลล์มาใส่ใน flask ขนาด 225 cm² จำนวน 2 flasks 20-24 ชั่วโมง และหลังจาก posttransfection 40-48 ชั่วโมง จึงเก็บเกี่ยวเซลล์
4. นำเซลล์มา trypsinize และปั่นล้างด้วย Dulbecco's (D) PBS นำตะกอนเซลล์มาละลายใน DPBS + 9.5 mM MgCl₂ ให้ได้ปริมาณ 5×10^7 cell/ml. จากนั้นเติม Brij 58 และ Benzonase ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5%, Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase 0.2%

5. นำไปปั่นที่ 37 °C เป็นเวลา 45 นาที เติม 850 mM NaCl ที่ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 1,500 x g เป็นเวลา 10 นาที นำ supernatants มาแบ่งใส่ใน siliconized microcentrifuge tubes

3.4.4 การทำ HPV16 pseudovirus ให้บริสุทธิ์

ใช้วิธี Cation exchange chromatography ดังนี้

1. นำ supernatants มา dialyze ด้วย binding buffer (2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, 0.5 M NaCl, pH 7.2 + 0.01% Tween 80) เป็นเวลา 3 h ที่ 4°C.
2. เตรียม P-11 phosphocellulose cation-exchange resin และ packed ใน Poly-Prep column ขนาด 8 cm x 4cm.
3. เติม supernatants ลงใน column ล้าง column ด้วย binding buffer จะนวน 5 ครั้ง และเติม elution buffer ที่มีความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 0.6, 0.7, 0.8, และ 1 M
4. เลือก fractions ที่มี HPV 16 pseudovirus และ dialyzed อีกครั้งด้วย binding buffer สำหรับ heparin chromatography
5. ตรวจสอบความบริสุทธิ์โดย SDS-PAGE หรือ western blot

3.4.5 การหาจำนวนไวรัส (viral titer)

HPV16 PsV ที่ encode GFP protein (pFwB and p16SheLL) ดังนี้

1. เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง 293TT cells จำนวน 1×10^5 cells ใน 24 well plate ปริมาตร 500 μ l/well นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง
2. เติม HPV 16 pseudovirus ปริมาตร 1 μ l. ลงไปในเซลล์ที่เตรียมไว้
3. นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ นาน 44 -52 ชั่วโมง
4. Trypsinize เซลล์และ resuspend ใน DPBS ด้วย 1% FCS
5. วิเคราะห์ผลโดยใช้ FACS
6. คำนวณ titer (transducing units/ml.) ดังนี้

Transducing units/ml. =

$(2 \times 10^5 \text{ cells}) \times (1,000 \mu\text{l/ml.}) \times (\text{dilution factor}) \times (\text{fraction ของเซลล์ที่ express GFP})$

HPV16 PsV ที่ encode alkaline phosphatase (pYSEAP, p16L1h and p16L2h) ดังนี้

1. เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง (SiHa cells) ให้ได้ความหนาแน่นประมาณ 80% ใน flask ขนาด 75 cm² โดยใช้ DMEM-10
2. Trypsinize เซลล์ และ resuspend ใน neutralization/growth media.

3. นับจำนวนเซลล์และ preplate ใน flak ขนาด 75 cm^2 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 นาน 2-5 ชั่วโมง
4. เจือจางเซลล์ให้ได้จำนวน 3×10^6 cells/ml in neutralization/growth media.
5. เติมน้ำ cell suspension ปริมาตร $100\mu\text{l}$ /well ใน 96-well plate. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C
6. ทำการเจือจาง HPV 16 pseudovirus ให้ได้ความเข้มข้นที่พอเหมาะ และเติมแต่ละความเข้มข้น ของ HPV-16 Pseudovirus ($80\mu\text{l}$ /well) ส่วนชุดควบคุมจะเติมเฉพาะ neutralization/growth media
7. เจือจาง positive neutralization antibody และเติม $20\mu\text{l}$. ของ diluted antibody ลงใน wells ที่มี of diluted HPV-16 PsV ปริมาตร $80\mu\text{l}$. บ่ม on ice เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
8. เติมน้ำ mixture ของ diluted antibody กับ HPV 16 pseudovirus ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 นาน 72 ชั่วโมง
9. หลังจากบ่มเสร็จแล้ว นำ plate ไปเขย่าและนำ supernatants ปริมาตร $50\mu\text{l}$. ใส่ลงใน 96-well polystyrene plate
10. เขย่า plate ที่ความเร็ว $1,000 \times \text{g}$ เป็นเวลา 5 นาที
11. เติมน้ำ 1x Dilution buffer ปริมาตร $45\mu\text{l}$. ลงใน wells ของ white optiplate-96 assay plate
12. เติมน้ำ supernatants $15\mu\text{l}$. ลงใน plate, ห่อด้วย plastic coverfoil และนำไปบ่ม on ice เป็นเวลา 5 นาที
13. เติมน้ำ 1x Assay buffer ปริมาตร $60\mu\text{l}$. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
14. เจือจาง chemiluminescence substrate และเติมลงในแต่ละ wells ปริมาตร $60\mu\text{l}$ /wells
15. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที
16. อ่านผลโดยใช้ Microplate Luminometer

4. ผลการวิจัย (Result)

1. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

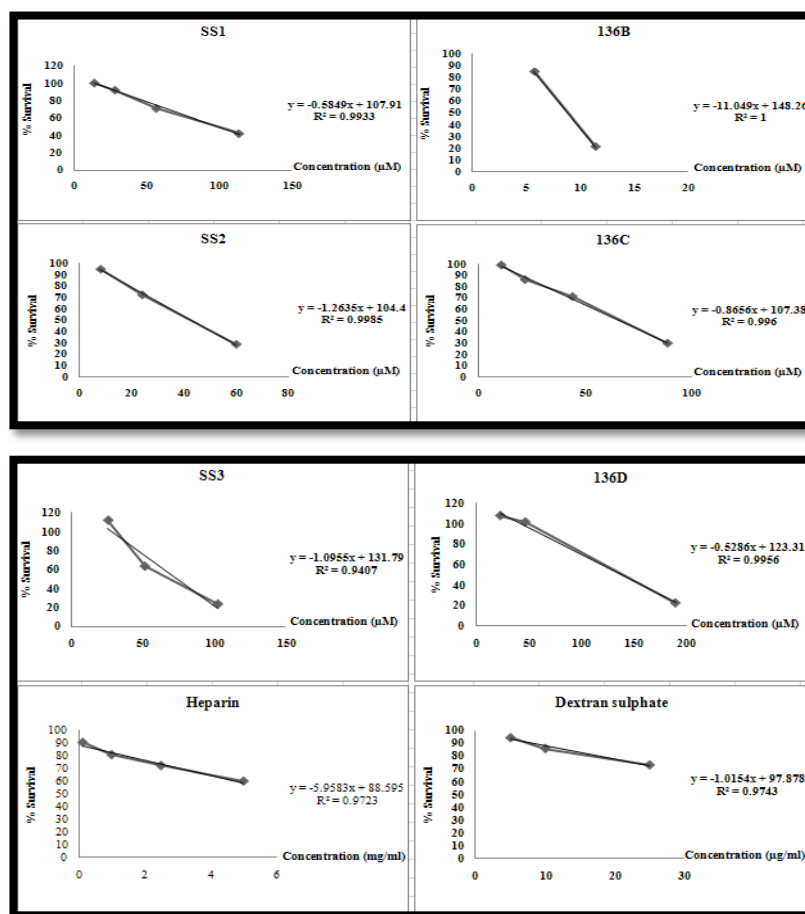
สารสกัดที่เตรียมได้ ดังนี้

1. สารสกัดจากพืชสมุนไพรฟ้าทะลายโจร 3 ชนิด ได้แก่ Andrographolide (SS1), 14-deoxy-11,12-didehydro-andrographolide (SS2) และ 3, 19- isopropylidene andrographolide (SS3)
2. สารสกัดจากพืชสมุนไพรพญายอ 3 ชนิด ได้แก่ $C_{55}H_{74}N_4O_5$ (136B), $C_{55}H_{72}N_4O_7$ (136C) และ $C_{53}H_{70}N_4O_5$ (136D)

สารสกัดทั้ง 6 ชนิดจะมีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2 mg/ml และจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

2. การเตรียม 293FT cell line และการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT cell line ดังแสดงในรูปที่ 1 และตารางที่ 1



รูปที่ 1 % survival ของ 293FT cell line เมื่อ treated ด้วยสารสกัดแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้น ต่างกัน

ตารางที่ 1 Sub-cytotoxic concentration และ CC_{50} ของสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร และพญายอ เมื่อทดสอบกับ 293FT cell line

Compounds	293FT cell line	
	Sub-cytotoxic concentration ($\mu\text{g/ml}$)	CC_{50} value ($\mu\text{g/ml}$)
SS1	4.73	34.67
SS2	1.13	14.28
SS3	11.29	29.11
136B	3.79	7.73
136C	7.60	59.62
136D	19.41	106.07

3. การเตรียม competent cells และเตรียม plasmid (p16L1h, p16L2h, p16SheLL, pYSEAP, pfwB)

ผลการเตรียม plasmid ชนิดต่าง ๆ ใน competent cells หลังจากสกัด plasmid และหาปริมาณความเข้มข้นของ plasmid แสดงในตารางที่ 2

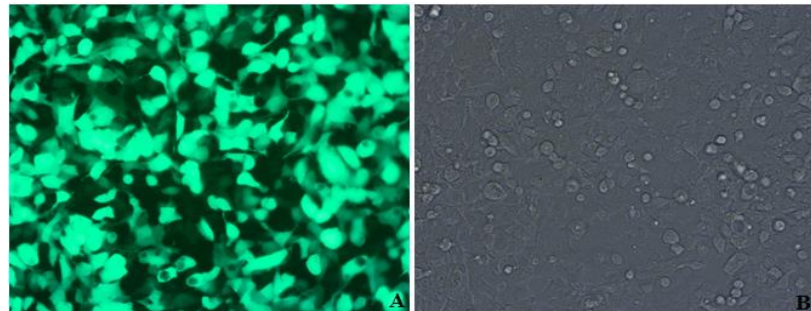
ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของ plasmid แต่ละชนิดสำหรับใช้เตรียม HPV16 PsV

Plasmid	ขนาด (bp.)	230 nm.	260 nm.	280 nm.	260 nm/ 280 nm	260 nm/ 230 nm	[DNA] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.
pfwB	5,904	0.102	0.183	0.102	1.792	1.789	0.915
p16sheLL	10,827	0.098	0.176	0.099	1.768	1.794	0.878
p16L1h	5,781	0.116	0.201	0.112	1.796	1.733	1.005
p16L2h	5,685	0.191	0.184	0.118	1.564	0.967	0.921
pYSEAP	5,297	0.070	0.063	0.040	1.568	0.905	0.315

4. การผลิต HPV16 pseudovirus การคัดเลือกและทำให้ HPV16 pseudovirus และการหาปริมาณ HPV16 pseudovirus

HPV16 PsV ถูกเตรียมโดยการ co-transfection พลาสมิด 2 ชนิด ได้แก่ p16SheLL และ pfwB (อย่างละ 19 $\mu\text{g/ml}$) เข้าสู่ 293FT cell line โดยใช้ Lipofectamine® 2000 reagent จากนั้นบ่มที่

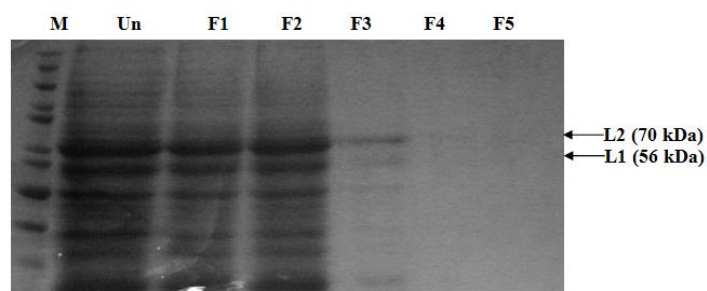
อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และส่องดูเซลล์ที่ถูก transfected ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซนซ์ (รูปที่ 3)



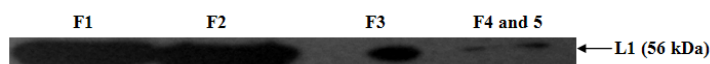
รูปที่ 3 293FT cell line ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากที่ transfected ด้วยพลาสมิด p16SheLL และ pfwB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (3A) ส่องภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ (3B) ส่องภายใต้แสงธรรมดา (กำลังขยาย 200X)

หลังจากเก็บ HPV16 PsV และนำไป purify โดยผ่าน column ขนาด 0.8 cm x 4 cm (cation exchange column chromatography) โดยการเติม elution buffer ที่มีความเข้มข้นของ NaCl ที่ค่อยๆ เพิ่มขึ้น และเก็บเป็น fraction จำนวน 5 fractions

ผลจากการนำแต่ละ fraction ไปตรวจหา purity โดยวิธี SDS-PAGE และตรวจสอบ โปรตีน L1 ซึ่งมีขนาดประมาณ 56 kDa ในแต่ละ fraction โดย western blot analysis โดยใช้ primary antibody คือ monoclonal mouse-anti HPV16 L1 และ secondary antibody คือ goat-anti mouse IgG + HRP ซึ่งจะ detected ภายใต้ chemiluminescence แสดงในรูปที่ 4 และ 5



รูปที่ 4 การตรวจสอบ purity ของแต่ละ fraction โดยวิธี SDS-PAGE



รูปที่ 5 การตรวจสอบโปรตีน L1 ของ HPV16 PsV ในแต่ละ fraction

ผลการทดลองพบว่า Fraction ที่ 3-5 มี purity สูงที่สุดเนื่องจากไม่มีโปรตีนอื่นบนเบื่อน พบเฉพาะ แบนโปรตีน L1 ขนาด 56 kDa และ L2 ขนาด 70 kDa ดังนั้นจะเลือก fraction เหล่านี้เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป และต้องทำการ dialysis ใน normal saline เพื่อลดปริมาณเกลือ

การหาปริมาณ HPV16 PsV

HPV16 PsV จะถูกนำมาหาปริมาณโดยการทำ 10-flods dilution และ infected ใน 293FT cell line เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณ HPV16 PsV จะนับจากจำนวนเซลล์ที่เรืองแสง ฟลูออเรสเซนซ์และคำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{The viral titer (transducing units/mL)} = \frac{\text{Mean of infected cell x dilution factor x 1000 } \mu\text{L}}{\text{Working volume (50 } \mu\text{L)}}$$

ปริมาณ HPV16 PsV ที่คำนวณได้สูงสุดเท่ากับ 4.6×10^6 transducing units/mL

5. อภิปรายผล/วิจารณ์ (Discussion/Comment)

สารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร และพญายอ ทั้ง 6 ชนิดมีปริมาณเพียงพอสำหรับการศึกษาตลอดโครงการ ทำให้ไม่มีปัญหาเรื่องผลการทดสอบที่อาจคลาดเคลื่อนจากการเตรียมในแต่ละครั้ง

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถเจือจางสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้นำสารทั้ง 6 ชนิดไปทดสอบฤทธิ์ด้านต่างๆ ใน 293FT cell line โดยไม่มีปัญหาเรื่องความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ต่อไป

การเตรียม HPV16 PsV ต้องเตรียมให้ได้ virus titer สูง และปริมาณมากพอสำหรับการทดลองแต่ละการทดลอง จากการทดลองสามารถเตรียมได้ virus titer สูงและปริมาณมากเพียงพอ แต่มีปัญหาเรื่องการเก็บ พบว่าถ้าเก็บไว้ปริมาณ virus titer จะลดลงเรื่อยๆ

6. สรุปผลการวิจัย/ข้อเสนอแนะ (Conclusion/Suggestion)

ผลการดำเนินการวิจัยในปีที่ 1 ผลลัพธ์ที่ได้คือ สารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร และพลาสมาที่จะใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในโครงการวิจัยต่อไป ทราบค่าความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ของสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร และพลาสมา และได้ HPV 16 pseudovirus ที่มีปริมาณมากเพียงพอสำหรับการทดสอบฤทธิ์ในโครงการวิจัยต่อไป

ผลสำเร็จของงานวิจัยระยะนี้เป็นผลสำเร็จเบื้องต้น (P)

บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Soutter, W.P., P. Sasieni, and T. Panoskaltsis, *Long-term risk of invasive cervical cancer after treatment of squamous cervical intraepithelial neoplasia*. Int J Cancer, 2006. **118**(8): p. 2048-55.
2. Cox, J.T., M. Schiffman, and D. Solomon, *Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy*. Am J Obstet Gynecol, 2003. **188**(6): p. 1406-12.
3. Guido, R., et al., *Postcolposcopy management strategies for women referred with low-grade squamous intraepithelial lesions or human papillomavirus DNA-positive atypical squamous cells of undetermined significance: a two-year prospective study*. Am J Obstet Gynecol, 2003. **188**(6): p. 1401-5.
4. ACOG Practice Bulletin number 66, September 2005. *Management of abnormal cervical cytology and histology*. Obstet Gynecol, 2005. **106**(3): p. 645-64.
5. Chumworathayi, B., et al., *Cryotherapy for HPV clearance in women with biopsy-confirmed cervical low-grade squamous intraepithelial lesions*. Int J Gynaecol Obstet. **108**(2): p. 119-22.
6. Ault, K.A., *Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials*. Lancet, 2007. **369**(9576): p. 1861-8.
7. Schlecht, N.F., et al., *Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia*. Jama, 2001. **286**(24): p. 3106-14.
8. Christensen, N.D., et al., *Papillomavirus microbicidal activities of high-molecular-weight cellulose sulfate, dextran sulfate, and polystyrene sulfonate*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(12): p. 3427-32.
9. Mistry, N., et al., *The anti-papillomavirus activity of human and bovine lactoferricin*. Antiviral Res, 2007. **75**(3): p. 258-65.
10. Roberts, J.N., et al., *Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan*. Nat Med, 2007. **13**(7): p. 857-61.
11. Abdulkarim, B., et al., *Antiviral agent Cidofovir restores p53 function and enhances the radiosensitivity in HPV-associated cancers*. Oncogene, 2002. **21**(15): p. 2334-46.
12. Andrei, G., et al., *Induction of apoptosis by cidofovir in human papillomavirus (HPV)-positive cells*. Oncol Res, 2000. **12**(9-10): p. 397-408.

13. Harvey, R., et al., *GSK983: a novel compound with broad-spectrum antiviral activity*. Antiviral Res, 2009. **82**(1): p. 1-11.
14. Cao, W., et al., *A novel polysaccharide, isolated from Angelica sinensis (Oliv.) Diels induces the apoptosis of cervical cancer HeLa cells through an intrinsic apoptotic pathway*. Phytomedicine.
15. Tsuda, H., et al., *Phase I study of combined radiation, hyperthermia and intra-arterial carboplatin for local recurrence of cervical cancer*. Ann Oncol, 2003. **14**(2): p. 298-303.
16. Yokoyama, M., et al., *The tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate effects on growth, apoptosis, and telomerase activity in cervical cell lines*. Gynecol Oncol, 2004. **92**(1): p. 197-204.
17. Li, Z.B., et al., *Benzobijuglone, a novel cytotoxic compound from Juglans mandshurica, induced apoptosis in HeLa cervical cancer cells*. Phytomedicine, 2007. **14**(12): p. 846-52.
18. Chao, W.W., Y.H. Kuo, and B.F. Lin, *Anti-inflammatory activity of new compounds from Andrographis paniculata by NF-kappaB transactivation inhibition*. J Agric Food Chem. **58**(4): p. 2505-12.
19. Zhao, F., et al., *Anti-tumor activities of andrographolide, a diterpene from Andrographis paniculata, by inducing apoptosis and inhibiting VEGF level*. J Asian Nat Prod Res, 2008. **10**(5-6): p. 467-73.
20. Mishra, K., et al., *Anti-malarial activities of Andrographis paniculata and Hedyotis corymbosa extracts and their combination with curcumin*. Malar J, 2009. **8**: p. 26.
21. Zhao, H.Y. and W.Y. Fang, *Antithrombotic effects of Andrographis paniculata nees in preventing myocardial infarction*. Chin Med J (Engl), 1991. **104**(9): p. 770-5.
22. Rana, A.C. and Y. Avadhoot, *Hepatoprotective effects of Andrographis paniculata against carbon tetrachloride-induced liver damage*. Arch Pharm Res, 1991. **14**(1): p. 93-5.
23. Kapil, A., et al., *Antihepatotoxic effects of major diterpenoid constituents of Andrographis paniculata*. Biochem Pharmacol, 1993. **46**(1): p. 182-5.
24. Trivedi, N.P. and U.M. Rawal, *Hepatoprotective and antioxidant property of Andrographis paniculata (Nees) in BHC induced liver damage in mice*. Indian J Exp Biol, 2001. **39**(1): p. 41-6.
25. Wiart, C., et al., *Antiviral properties of ent-labdene diterpenes of Andrographis paniculata nees, inhibitors of herpes simplex virus type 1*. Phytother Res, 2005. **19**(12): p. 1069-70.

26. Reddy, V.L., et al., *A new bis-andrographolide ether from Andrographis paniculata nees and evaluation of anti-HIV activity*. Nat Prod Res, 2005. **19**(3): p. 223-30.
27. Rajagopal, S., et al., *Andrographolide, a potential cancer therapeutic agent isolated from Andrographis paniculata*. J Exp Ther Oncol, 2003. **3**(3): p. 147-58.
28. Kumar, R.A., et al., *Anticancer and immunostimulatory compounds from Andrographis paniculata*. J Ethnopharmacol, 2004. **92**(2-3): p. 291-5.
29. Cheung, H.Y., et al., *Andrographolide isolated from Andrographis paniculata induces cell cycle arrest and mitochondrial-mediated apoptosis in human leukemic HL-60 cells*. Planta Med, 2005. **71**(12): p. 1106-11.
30. Sheeja, K., C. Guruvayoorappan, and G. Kuttan, *Antiangiogenic activity of Andrographis paniculata extract and andrographolide*. Int Immunopharmacol, 2007. **7**(2): p. 211-21.
31. Schon, M.P. and M. Schon, *Imiquimod: mode of action*. Br J Dermatol, 2007. **157** Suppl 2: p. 8-13.
32. Daayana, S., et al., *Phase II trial of imiquimod and HPV therapeutic vaccination in patients with vulval intraepithelial neoplasia*. Br J Cancer.
33. Sangkitporn, S., et al., *Treatment of herpes zoster with Clinacanthus nutans (bi phaya yaw) extract*. J Med Assoc Thai, 1995. **78**(11): p. 624-7.
34. Sakdarat, S., et al., *Bioactive constituents from the leaves of Clinacanthus nutans Lindau*. Bioorg Med Chem, 2009. **17**(5): p. 1857-60.
35. Kim, S.H., S.C. Lee, and Y.S. Song, *Involvement of both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in apoptosis induced by genistein in human cervical cancer cells*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1171**: p. 196-201.
36. Buck, C.B., et al., *Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors*. J Virol, 2004. **78**(2): p. 751-7.
37. Pastrana, D.V., et al., *Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18*. Virology, 2004. **321**(2): p. 205-16.