



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

“ผลของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรและพญายอในการยับยั้ง HPV16 E6 oncoprotein”

“Inhibitory effect of *Andrographis paniculata* and *Clinacanthus nutans* compounds
to
HPV 16 E6 oncoprotein”

คณะผู้วิจัย

รศ.ดร.ฉันทนา อารมย์ดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ดร.สุภาวดี สืบศาสนา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.ดร. บุญเกิด คงยิ่งยศ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.ดร.พญ. แจ่มใส เพียรทอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โครงการนี้เป็นหนึ่งโครงการย่อยของชุดโครงการ “บทบาทของการติดเชื้อ human papillomavirus
ต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูก และการหาแนวทางการรักษาเบื้องต้น”

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 - 2554
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้เป็นหนึ่งโครงการย่อยของชุดโครงการ “บทบาทของการติดเชื้อ human papillomavirus ต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูก และการหาแนวทางการรักษาเบื้องต้น” ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 - 2554 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นเป็นอย่างสูง ที่ให้การสนับสนุนทำให้การวิจัยสำเร็จได้ตามวัตถุประสงค์

รศ.ฉันทนา อารมย์ดี
(หัวหน้าโครงการวิจัย)

บทคัดย่อ

การติดเชื้อ high risk human papillomavirus (HR-HPV) ที่ปากมดลูกเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งปากมดลูก ซึ่งเป็นโรคที่ก่อปัญหาทางด้านสาธารณสุขทำให้เกิดการเจ็บป่วยและการตายสูง โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา การศึกษาทางระบาดวิทยาพบ HPV 16 DNA ในมะเร็งปากมดลูกมากที่สุด กลไกการเกิดมะเร็งในเซลล์ที่ติดเชื้อ HPV 16 พบว่า viral oncogene ที่มีบทบาทในมะเร็งปากมดลูกคือ E6 และ E7 ซึ่ง encode โปรตีน E6 และ E7 ที่สามารถทำให้เซลล์ติดเชื้อ พัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งได้

โปรตีน E6 ของ HPV 16 เป็นสาเหตุทำให้เซลล์เกิดการ immortalization และ transformation โดยการยับยั้งการทำงานของโปรตีน p53 tumor suppressor นอกจากนี้ โปรตีน E6 ยังสามารถทำงานได้ด้วยตัวมันเองหรือทำงานร่วมกับโปรตีน E7 ทำให้เกิดการ immortalize ของ primary keratinocyte cell, fibroblast, และ epithelial cell ได้ ซึ่งการเกิด transcription ของ E6 จะเกี่ยวข้องกับหน้าที่ในการทำให้เกิดเป็นมะเร็งเกิดขึ้น ผลการยับยั้งการแสดงออกของ E6 ส่งผลให้เซลล์ที่ติดเชื้อ HPV เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ซึ่งจะเป็นอีกกลไกหนึ่งที่จะทำลายเซลล์มะเร็ง

ปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ HPV มีน้อยมาก และค่อนข้างมีราคาแพง เนื่องจากไวรัสชนิดนี้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ทำให้มีความจำกัดในการพัฒนายาที่ใช้รักษา ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงให้ความสนใจในการค้นหาสารจากสมุนไพรไทยเพื่อนำมาพัฒนาตัวยาใหม่ที่จะสามารถรักษาการติดเชื้อ HPV ดังกล่าวยวบรวมทั้งเพื่อพัฒนางานทางด้านพืชสมุนไพร หรือสารในกลุ่มที่เป็น natural product ต่าง ๆ ขึ้นมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคติดเชื้อ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้าง recombinant vector สำหรับใช้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรจากฟ้าทะลายโจรและพญายอ เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรจากฟ้าทะลายโจรและพญายอ ต่อ transcriptional activity ของ viral promoter ของ HPV 16 E6 gene และเพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรและพญายอ ต่อการยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 protein

การสร้าง recombinant vector สำหรับใช้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร ต่อ transcriptional activity ของ HPV16 E6 gene ภายใต้การกระตุ้นจาก HPV16 E6 promoter คือ promoter P₉₇ ที่อยู่ใน ส่วน long control region (LCR) ของ HPV16 ทำโดยนำส่วนของ HPV 16 LCR ซึ่งได้จากการ amplify DNA จาก HPV 16 reference plasmid ใส่เข้าไปใน cloning vector ชนิด pDRIVE vector จากนั้นจึงตัดส่วนของ HPV 16 LCR ใส่เข้าไปใน pGL3-Basic vector ซึ่งมี luciferase reporter gene จะได้ pGL3-HPV16LCR สำหรับใช้ transfect เข้าเซลล์ C33A เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร ต่อ transcriptional activity ของ HPV16 E6 gene เมื่อทดสอบคุณสมบัติ transcriptional activity ของ pGL3-HPV16LCR โดย transfect เข้าเซลล์ C33A พบว่ามีการ expression ของ luciferase reporter gene ได้ดี โดย transcriptional activity จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของ pGL3-HPV16LCR ที่ใช้ transfect

การเตรียมสารสกัดสมุนไพรจากฟ้าทะลายโจรและพญายอได้สารบริสุทธิ์สำหรับการวิจัยนี้ 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)

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด ต่อ transcriptional activity ของ HPV16 E6 gene โดย transfect pGL3-HPV16LCR เข้าเซลล์ C33A แล้วเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีและไม่มีสารสกัด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจวัด transcriptional activity พบว่าสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรชนิด SS1 มีผลยับยั้ง transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR แต่ SS2 และสารสกัดจากพญายอชนิด 136B ไม่มีผลต่อ transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR ในขณะที่สารสกัดจากฟ้าทะลายโจรชนิด SS3 และสารสกัดจากพญายอชนิด 136C และ 136D สามารถกระตุ้น transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR ได้

การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและพญายอต่อการแสดงออกของ HPV16 E6 oncogene โดยการเลี้ยง และ subculture SiHa cell line และ CaSki cell line ในอาหารที่มีสารสกัด พบว่าสาร SS1 มีผลต่อการตายของเซลล์มากที่สุดจึงนำ SS1 มาศึกษาต่อใน SiHa cell line โดยเปรียบเทียบกับ SS2 และ SS3 โดยเลี้ยง SiHa cell ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้นในระดับ subcytotoxic concentration และ 2 เท่าของ subcytotoxic concentration เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะสกัด total RNA แล้ว convert ไปเป็น cDNA โดยใช้ SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit แล้วตรวจหาการแสดงออกของ E6 โดยตรวจหาปริมาณ mRNA ของ E6 โดยวิธี SYBR Green Real-time PCR พบว่าสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร SS1 ที่ระดับ subcytotoxic concentration สามารถยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 ใน SiHa cell ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการแสดงออกจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด แต่ไม่เพิ่มขึ้นตามเวลา ในขณะที่ สารสกัด SS2 ไม่มีผลยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 ใน SiHa cell ส่วนสารสกัด SS3 จะมีผลยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 ใน SiHa cell เมื่อเพิ่มความเข้มข้น และเวลา

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารบริสุทธิ์จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร 2 ชนิดคือ 14-deoxy-11,12-didehydro-andrographolide (SS2) และ 3, 19- isopropylidene andrographolide (SS3) และสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรพญายอ 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) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง transcriptional activity ของ viral promoter ของ HPV 16 E6 gene แต่ Andrographolide (SS1) มีฤทธิ์ยับยั้ง transcriptional activity ของ viral promoter ของ HPV 16 E6 gene ได้ นอกจากนี้ Andrographolide (SS1) ที่ระดับ subcytotoxic concentration สามารถยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 ใน SiHa cell ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ 3, 19- isopropylidene andrographolide (SS3) สามารถยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 ใน SiHa cell

ได้เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงกว่า subcytotoxic concentration หรือใช้เวลานานขึ้นที่ระดับ subcytotoxic concentration

ดังนั้น Andrographolide (SS1) น่าจะเป็นสารบริสุทธิ์ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นยาต้าน HPV หรือต้านมะเร็งที่เกิดจากการติดเชื้อได้ และควรจะทำการศึกษาวิจัยต่อการยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 ในเซลล์นั้นส่งผลต่อการเกิด apoptosis ของเซลล์หรือไม่

สารบัญ

	หน้า
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์	2
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีดำเนินการวิจัย	15
ผลการวิจัย	25
อภิปรายผล/วิจารณ์	41
สรุปผลการวิจัย/ข้อเสนอแนะ	43
บรรณานุกรม	44

1. บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) มีสาเหตุจากการติดเชื้อ human papillomavirus (HPV) ทางเพศสัมพันธ์ จัดเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับสองของประชากรผู้หญิงทั่วโลก ส่วนใหญ่มักพบในประเทศที่กำลังพัฒนา และยังพบว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้หญิงเสียชีวิตอีกด้วย ในประเทศไทย โรคมะเร็งปากมดลูกพบเป็นอันดับ 1 ของมะเร็งทุกชนิดในสตรี จากการตรวจชิ้นเนื้อปากมดลูกที่มีความผิดปกติพบว่าการติดเชื้อ HPV16 ซึ่งเป็น high risk (HR) HPV ได้บ่อยที่สุด โดยตรวจพบในชิ้นเนื้อปากมดลูกที่ผิดปกติในระดับ CIN I, CIN II-III และ CA ร้อยละ 8, 12 และ 63 ตามลำดับ

ในการติดเชื้อ HPV ทั้ง HR และ low risk (LR) มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่บริเวณปากมดลูกขึ้นซึ่งเป็นการติดเชื้อแบบยืดเยื้อ (persistent infection) แต่การติดเชื้อในกลุ่ม HR-HPV จะทำให้เซลล์ที่เปลี่ยนแปลงพัฒนากลายเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ทั้งจากผู้ที่ได้รับเชื้อ (เช่น อายุ และภูมิคุ้มกัน) และจากตัวเชื้อเอง พบว่าเชื้อ HR-HPV มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูกเนื่องจากการแสดงออกของ oncoprotein ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และ HR-HPV แต่ละ type ทำให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูกได้บ่อยแตกต่างกัน โดยทั่วไปแล้วเมื่อเกิดการติดเชื้อ HPV เข้าสู่เซลล์โฮสต์ ดีเอ็นเอของ human papillomavirus จะอยู่ในรูปวงกลมและแยกตัวเป็นอิสระกับโครโมโซมของเซลล์โฮสต์ หรือเรียกว่ามี physical status เป็น episomal form แต่สำหรับ HPV ในกลุ่มที่เป็น HR type ที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูก เชื้อกลุ่มนี้จะสามารถแทรก genome ของมันเข้าสู่โครโมโซมของเซลล์โฮสต์ได้ หรือเรียกว่ามี physical status เป็น integration form เมื่อมีปัจจัยส่งเสริมทั้งจากสภาพแวดล้อมของเซลล์โฮสต์และเกี่ยวกับเชื้อจะมีผลส่งเสริมให้โครโมโซมของโฮสต์มีภาวะที่ไม่เสถียร เป็นผลให้เชื้อสามารถแทรก (integration) genome เข้าสู่โครโมโซมของโฮสต์และเกิดการแตกหักของ genome ของไวรัส (1, 2)

การติดเชื้อ HPV พบได้ในคนทั้งที่มีเซลล์ปากมดลูกปกติและในคนที่มีเซลล์ปากมดลูกผิดปกติ โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีเซลล์ปกติและมีการติดเชื้อแบบยืดเยื้อซึ่งถือว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงเบื้องต้นของการเกิดมะเร็งปากมดลูก ในกลุ่มผู้หญิงดังกล่าว ปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ HPV มีน้อยมาก เนื่องจากไวรัสนี้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ทำให้มีความจำกัดในการพัฒนาการรักษาที่ใช้รักษา ซึ่งยาที่ให้ประสิทธิผลในการรักษาในปัจจุบันคือ imiquimod ซึ่งยาดังกล่าวค่อนข้างมีราคาแพง ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงให้ความสนใจในการค้นหาสารจากสมุนไพรไทยเพื่อนำมาพัฒนาตัวยาใหม่ที่จะสามารถรักษาการติดเชื้อ HPV ดังกล่าวยุบรวมทั้งเพื่อพัฒนางานทางด้านพืชสมุนไพร หรือสารในกลุ่มที่เป็น natural product ต่าง ๆ ขึ้นมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคติดเชื้อ จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากสมุนไพรพญา ยอ และฟ้าทะลายโจร มีฤทธิ์ยับยั้ง herpes simplex virus ซึ่งเป็นเชื้อที่ติดต่อทางเพศสัมพันธ์เช่นกัน จึงคิดว่าควรจะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดดังกล่าวต่อ HPV โดยอาศัยความรู้จากกลไกในการก่อโรคของเชื้อ

HPV16 โดยเฉพาะกลุ่มจีนที่มีผลในการทำให้เกิดมะเร็ง (E6) เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษา ซึ่งจะมีผลป้องกันการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูกด้วย

วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1. เพื่อสร้าง recombinant vector สำหรับใช้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรจากฟ้าทะลายโจรและพญายอ
2. เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรจากฟ้าทะลายโจรและพญายอ ต่อ transcriptional activity ของ viral promoter ของ HPV 16 E6 gene
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรและพญายอ ต่อการยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 protein

2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review literature)

Human papillomavirus (HPV) เป็นไวรัสที่มีขนาดเล็ก อยู่ในกลุ่ม *Papillomaviridae* เป็นไวรัสชนิดที่ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-enveloped หรือ naked virus) แคปซิด มี 72 แคปโซเมอร์ หุ้มอยู่ภายนอก ภายในประกอบด้วยจีโนมที่มีลักษณะเป็นวงกลมสายคู่ (dsDNA) มีความยาวประมาณ 8,000 เบส. HPV สามารถติดเชื้อในคนได้ทางผิวหนัง และเยื่อเมือก ก่อให้เกิดโรคหูดหรือเนื้องอก ปัจจุบันพบ HPV มากกว่า 130 types แยกตามลำดับเบสที่แตกต่างกันในบริเวณจีโนม E6, E7 และ L1 HPV ประมาณ 40 types สามารถติดเชื้อบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ของมนุษย์ ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ high risk HPV (HR-HPV) และ low risk HPV (LR-HPV) ตามความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูก HR- HPV ที่พบบ่อย ได้แก่ HPV type 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, และ 82 และ LR- HPV ที่พบบ่อย ได้แก่ HPV type 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 และ 81 (3, 4)

จีโนมของ HPV ประกอบด้วย 3 ส่วนใหญ่ ๆ คือ ส่วนที่สร้างโปรตีนในระยะแรก หรือ early region โดยจะสร้างโปรตีน E1, E2, E4, E5, E6 และ E7 ส่วนที่สร้างโปรตีนในระยะหลัง หรือ late region จะสร้างโปรตีน L1 และ L2 และส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของจีโนม เรียกว่า Long Control Region (5) โดยจะควบคุมการ transcription และการแสดงออกของโปรตีนของไวรัสชนิดนี้

HPV สามารถเข้าสู่เซลล์บริเวณผิวหนังและเยื่อเมือกที่ฉีกขาด และเข้าไปติดเชื้อที่เซลล์ basal เพราะว่าเป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ โดยตัวเชื้อไวรัสจับกับ receptor บนผิวเซลล์คือ $\alpha 6$ integrin family และ heparin sulphate (6) ทำให้มีการ endocytosis เป็นแบบ clathrin coated vesicles และจีโนมของเชื้อหลุดออกจากแคปซิดเข้าสู่นิวเคลียส (7) แล้วเกิดกระบวนการ replication และ transcription โดยปริมาณของเชื้อในเซลล์ในระยะเริ่มต้นคือ 50-100 genome copies ต่อ 1 เซลล์ซึ่งเป็นช่วงที่ยังไม่มีการสร้างอนุภาคของไวรัส (non productive infection) ในช่วงนี้โปรตีนบางตัวจะถูกสร้างขึ้นได้แก่ โปรตีน E1, E2, E6 และ E7 ซึ่งมีการแสดงออกในระดับต่ำๆ โดยโปรตีน E1 จับกับโปรตีน E2 และไปยังบริเวณ origin of replication ทำให้ไวรัสเกิดการ replication ได้ และโปรตีน E1 ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ helicase ที่จะทำหน้าที่ในการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว โปรตีน E2 ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของจีโนมโดยไปจับที่ E2 binding site บน LCR และเมื่อเซลล์ที่มีการติดเชื้อมีการแบ่งตัว และเคลื่อนตัวขึ้นสู่ suprabasal layer เซลล์ที่มี differentiation จะกระตุ้นให้มีการแสดงออกของจีโนม และสร้างโปรตีนแคปซิดมาหุ้มจีโนมของเชื้อไวรัส และสร้างโปรตีน E4 และ E5 ทำให้ได้อนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์

HR-HPV มีคุณสมบัติในการทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงไป (8) ร่วมกับเกิดการแบ่งตัวอย่างไม่มีที่สิ้นสุด (9) ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์มะเร็ง โดยเป็นผลมาจากการทำงานของโปรตีน E6 และ E7 ที่มีคุณสมบัติเป็น oncoproteins ที่เป็นโปรตีนที่จะทำให้เกิดเป็นมะเร็งของ HPV (1) ซึ่งเกิดขึ้นโดยโปรตีน E6 ไปทำจับกับโปรตีน p53 ซึ่ง p53 ถูกจัดไว้ในกลุ่มยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) มีหน้าที่ในการควบคุมการเพิ่มจำนวน ของเซลล์ โดยทำให้เซลล์หยุดวงจร (cell cycle) อยู่ที่ระยะ

G1 ก่อนเข้าสู่ระยะ S ชั่วคราวเพื่อซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ได้รับอันตราย และทำให้เซลล์ตาย แบบที่เรียกว่า apoptosis หากอันตรายนั้นรุนแรงเกินกว่าที่จะแก้ไขได้ การควบคุมเหล่านี้ผ่านการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 กับลำดับดีเอ็นเอ ที่จำเพาะ เป็นการควบคุมยีนเป้าหมายในระดับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (transcription) โปรตีน E6 จะทำให้โปรตีน p53 ถูกทำลายผ่านทาง ubiquitin pathway ร่วมกับโปรตีน E6 associated protein (E6AP) ทำให้ค่าครึ่งชีวิตของโปรตีน p53 ลดลงจาก 3 ชั่วโมงเป็น 20 นาที และยังพบว่า โปรตีน E6 ยังไปกระตุ้นเอนไซม์ telomerase ทำให้เซลล์มีอายุที่นานขึ้น การสูญเสียหน้าที่ของ p53 ทำให้เซลล์มีดีเอ็นเอหรือยีนที่ผิดปกติสะสมมากขึ้นเรื่อยๆ จนอาจกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด โปรตีน E7 ไปจับกับ โปรตีน retinoblastoma (pRB) ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมไม่ให้เซลล์เกิดเป็นมะเร็ง (tumor suppressor protein) ทำให้โปรตีน E2F ซึ่งจับกับ โปรตีน retinoblastoma (pRB) หลุดออกมา โดยโปรตีน E2F ทำหน้าที่ในการกระตุ้นดีเอ็นเอให้มีการเกิด replication และ transcription ทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น จากกระบวนการดังกล่าวจึงเชื่อว่าการติดเชื้อ HR-HPV เป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์ติดเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลง และกระบวนการที่เกิดขึ้นมีหลายขั้นตอนเริ่มจาก LSIL เปลี่ยนแปลงเป็น HSIL และกลายเป็น squamous cervical cancer (10, 11)

การติดเชื้อ HR-HPV ที่บริเวณปากมดลูกในปัจจุบันเชื่อว่าเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งปากมดลูกเนื่องจากตรวจพบเชื้อ HPV ได้ร้อยละ 99.7 ในชิ้นเนื้อ มะเร็งปากมดลูกเป็นโรคที่ก่อปัญหาทางด้านสาธารณสุขทำให้เกิดการเจ็บป่วยและการตายสูงโดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา จากการศึกษาทางระบาดวิทยา ได้ระบุถึงความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจพบ HPV 16 DNA ว่าจะมีอัตราเสี่ยงในการเกิดเป็นมะเร็งปากมดลูกมากที่สุด เนื่องจากสามารถตรวจพบในเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ทุกภูมิภาคของโลก (12, 13, 14) ซึ่งจากการศึกษาของ Clifford และคณะในปี 2006 ในเรื่องของ การแพร่กระจายของชนิดของ HPV ในผู้หญิงที่มีและไม่มีภาวะผิดปกติของเซลล์ปากมดลูก จากตัวอย่างที่ได้ทั่วโลก พบว่าในทุกๆทวีปจะสามารถตรวจพบการแพร่กระจายของ HPV 16 DNA มากที่สุด (15) ซึ่งในประเทศไทย โรคมะเร็งปากมดลูกพบเป็นอันดับ 1 ของมะเร็งทุกชนิดในสตรีจากการตรวจชิ้นเนื้อปากมดลูกที่มีความผิดปกติพบมีการติดเชื้อกลุ่ม HR-HPV โดยเฉพาะ HPV16 จะพบได้บ่อยที่สุด ซึ่งตรวจพบในชิ้นเนื้อผิดปกติในระดับ CIN I, CIN II-III และ CA ร้อยละ 8, 12 และ 63 ตามลำดับ

การติดเชื้อ HPV ทั้ง HR และ LR มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่บริเวณปากมดลูกขึ้นซึ่งเป็นการติดเชื้อแบบยืนยัย (Persistent infection) แต่การติดเชื้อในกลุ่ม HR-HPV จะทำให้เซลล์ที่เปลี่ยนแปลงพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ทั้งจากผู้ที่ได้รับเชื้อ (เช่น อายุ และภูมิคุ้มกัน) และจากตัวเชื้อเอง พบว่าเชื้อ HR-HPV มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูกเนื่องจากมีการแสดงออกของ oncoprotein ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และ HR-HPV แต่ละ type ทำให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูกได้บ่อยแตกต่างกัน

จากลักษณะการติดเชื้อ HPV มีลักษณะเป็นแบบยืนยัย และเชื่อดังกล่าวมีระยะการพักตัวที่ค่อนข้างนานประมาณ 3 สัปดาห์ถึง 8 เดือนโดยเฉลี่ยและระยะเวลาในการกำจัดเชื้อ HPV ออกจากร่างกายค่อนข้างนานโดยเฉพาะในกลุ่ม HR-HPV จึงเป็นการยากที่จะตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HPV

ในการตรวจทางภูมิคุ้มกัน เพราะการติดเชื้อ HPV มักเกิดขึ้นที่บริเวณเยื่อเมือกปากมดลูก ไม่ค่อยเข้าสู่กระแสเลือดจึงไม่มีระยะ viremia เกิดขึ้น ดังนั้นวิธีการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunology) เพื่อตรวจหา antibody ต่อเชื้อ HPV จึงไม่เป็นที่นิยมใช้ในการวินิจฉัย แต่มีวิธีการวินิจฉัยการติดเชื้อ HPV วิธีการอื่น ๆ เช่น 1) การตรวจทางคลินิก (Clinical) โดยวิธีการดังกล่าวจะเป็นการตรวจดูรอยโรคหูดหงอนไก่และมะเร็งปากมดลูกซึ่งสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า แต่ถ้าเป็นลักษณะพยาธิสภาพของการเกิดโรคจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าแต่จะตรวจพบได้จากการตรวจด้วยกล้องส่องขยายทางช่องคลอด (colostomy) เพื่อทำการตรวจดูความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกในระยะเริ่มแรก 2) การตรวจทางเซลล์วิทยา (cytology) เป็นการตรวจพบความผิดปกติของเซลล์เยื่อเมือกปากมดลูกที่ระดับความรุนแรงต่าง ๆ กันเช่น mild dysplasia/CIN1 (LSIL), moderate/severe dysplasia (CIN2/3) หรือ HSIL เป็นต้น 3) การตรวจทางพยาธิวิทยา (pathology) เป็นการตรวจพยาธิสภาพของรอยโรคที่ความรุนแรงต่าง ๆ เช่น LSIL, HSIL และมะเร็งปากมดลูก 4) การตรวจทางไวรัสวิทยา (virology) หรืออณูชีววิทยา (molecular biology) เนื่องจากเชื้อ HPV ไม่สามารถทำการเพาะเชื้อได้เหมือนไวรัสชนิดอื่น ๆ จึงต้องตรวจหา DNA ของเชื้อ HPV แทนซึ่งมีวิธีการตรวจ 3 วิธีคือ (4.1) การตรวจหา DNA ของเชื้อ HPV เช่นวิธี Southern blot, Dot blot และ in situ hybridization วิธีเหล่านี้เป็นวิธีการที่ไม่ใช่การเพิ่มจำนวน DNA (non-amplified methods) (4.2) วิธีการขยายสัญญาณ (signal amplification methods) วิธีการดังกล่าวอาศัยปฏิกิริยาการทำให้เกิดเป็นพันธะผสม (hybridization) ได้แก่วิธี Hybrid Capture เป็นต้น (4.3) วิธีการขยาย/เพิ่มจำนวน DNA เป้าหมาย (target amplification methods) วิธีนี้จะขยายจำนวน DNA ก่อนแล้วจึงตรวจหา DNA เป้าหมายได้แก่วิธี polymerase chain reaction (PCR) เช่น AMPLIPOR HPV test และ linear Array HPV test เป็นต้น (16, 17)

ในปัจจุบันมีการรายงานว่าการรักษาโรคติดเชื้อ HPV นิยมรักษาด้วยยา Imiquimod โดยยาดังกล่าวอยู่ในรูปครีมและได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาหูดที่อวัยวะเพศ ทั้งนี้กลไกการออกฤทธิ์ที่แท้จริงของยาชนิดนี้ยังไม่เป็นที่ทราบอย่างแน่ชัด แต่เชื่อว่าความสามารถชักนำก่อให้เกิด cytokine ของยานี้ทำให้เกิดการลดลงของ HPV ยา Imiquimod เป็นยาชนิดใหม่ ในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกทางภูมิคุ้มกัน ยาชนิดนี้เป็นสารประกอบในกลุ่ม imidazoquinolin heterocyclic amine ที่สามารถชักนำก่อให้เกิด cytokine ได้หลายชนิดเช่น interferon-alpha (IFN-alpha), interferon-gamma (IFN-gamma), tumor necrosis factor-alpha, interleukins-1, 6, 8 และ 12 โดยยา imiquimod สามารถเพิ่ม interferon- α ซึ่งเป็นกลไกเริ่มแรกในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่จะส่งผลกระทบต่อการแสดงออกทางภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity และแบบ acquired immunity ในการตอบสนองต่อภาวะติดเชื้อภายในร่างกาย (18, 19, 20, 21) และนอกจากยังมียาอีกชนิดที่สามารถใช้รักษาอาการติดเชื้อ HPV คือ Carboplatin ยาดังกล่าวนี้นิยมนำมารักษา มะเร็งหลายชนิดโดยอาจใช้เป็นยาเดี่ยวหรือใช้ร่วมกับยาชนิดอื่น ๆ รวมทั้งใช้ควบคู่กับการรักษาโดยการฉายรังสี (radiation) ซึ่งยาดังกล่าวเป็นยาสังเคราะห์ที่ได้จาก second-generation ของสารประกอบแพลทินัมโดยนาดังกล่าวถูกจัดเป็น non-

classical alkylating agent ยานชนิดนี้สามารถทำให้เกิด interstrand หรือ intrastrand ในสาย DNA ได้โดยการทำปฏิกิริยาตรงตำแหน่ง N⁷ guanine ทำให้เกิดการเติมหมู่ alkyl- ที่ตำแหน่งไฮโดรเจน (alkylation) ที่ตำแหน่งดังกล่าวทำให้เกิดการแตกหักของสายดีเอ็นเอเกิดขึ้น (22) จากข้อจำกัดในการรักษาโรคติดเชื้อ HPV มียาที่ใช้ในการรักษาค่อนข้างน้อย มีราคาที่ยากแพง และข้อจำกัดในการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อดังกล่าวในการศึกษาหาสมุนไพรที่สามารถนำมาใช้ในการรักษามีค่อนข้างน้อยแต่ในปัจจุบันได้มีผู้วิจัยเริ่มให้ความสำคัญในการศึกษาเรื่องดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นโดยการใช้สมุนไพรที่เป็นที่รู้จักกันทั่วไป ยกตัวอย่างเช่น สารสกัดที่ได้จากขมิ้น (curcumin) เป็นต้น โดยจากการศึกษาของ Prusty BK และ Das BC (23) ในการศึกษาผลของ curcumin ในการยับยั้งการ transcription ของเชื้อ HPV18 และ AP-1 activity ในเซลล์ HeLa พบว่าสาร curcumin สามารถ downregulate Ap-1 binding activity ของ HPV18 ในเซลล์ HeLa ได้อย่างสมบูรณ์ และมีผลกระตุ้นให้การแสดงออกของ c-fos และ fra-1 ในเซลล์ที่เป็นมะเร็งให้กลับมามีลักษณะการแสดงออกได้เหมือนในเซลล์มะเร็งที่ไม่ถูก treat ด้วยสารสกัด curcumin ได้ และนอกจากนี้ Divya CS และ Pillai MR (24) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัด curcumin ในการต้านการเกิดมะเร็งในเซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV โดยดูผลการยับยั้งของสารในการ down regulate การแสดงออกของ viral oncogenes, การยับยั้งการ translocation ของ NF-kB และ AP-1 ในการทำให้เกิดเป็นมะเร็งและการทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ที่เป็นมะเร็งได้ โดยจากผลการศึกษาดังกล่าวพบว่า สาร curcumin มีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งได้ดีโดยขึ้นกับความเข้มข้นของสารและเวลาในการ treat สาร (dose and time-dependent manner) และสาร curcumin มีฤทธิ์ต่อเซลล์ที่ติดเชื้อ HPV16 และ 18 ได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ HPV และนอกจากนี้เซลล์ที่ถูก treat ด้วย curcumin สารกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้โดยพบการเกิด nuclear และ DNA fragmentation. จากการทำ RT-PCR และ western blot พบว่าสาร curcumin ลดการแสดงออกของยีนในกลุ่ม oncogenes คือ ยีน E6 และ E7 และยังมีผลในการยับยั้งการกระตุ้น NF-kB โดยสามารถ block เกิด degradation ของ I κ B (NF-kB inhibitor) ทำให้ส่งผลไม่มีการกระตุ้น NF-kB เกิดขึ้นในเซลล์ที่ treat ด้วย curcumin และนอกจากนี้ curcumin ยังมีผลลดการ binding ของ AP-1 ซึ่งส่งผลให้ลดการ transcription ของ HPV ได้ จากข้อมูลดังกล่าวมาแล้วนั้นพบว่า สาร curcumin สามารถที่จะยับยั้งเชื้อ HPV ได้ โดยมีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งได้ซึ่งสารดังกล่าวน่าจะมีการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งที่ใช้ในการรักษาเซลล์ที่ติดเชื้อ HPV ต่อไปได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษายับยั้งเชื้อ HPV ยังมีการพัฒนาในการศึกษาผลของสารที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งโดยอาศัยการแสดงออกของยีนในกลุ่มดังกล่าวภายใต้ viral promoter ชนิดต่างๆเพื่อทำการศึกษากลไกในการยับยั้งเชื้อ HPV เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนายาที่ใช้ในการรักษาต่อไป

จากความรู้เรื่องกลไกการเกิดมะเร็งในเซลล์ที่ติดเชื้อ HPV-16 และ 18 ในกลุ่ม high risk (HR-HPV) พบว่ายีนที่มีบทบาทในการทำให้เกิดเป็นมะเร็งปากมดลูกคือยีน E6 และ E7 ซึ่งยีนทั้ง 2 นี้ จัดเป็น oncogene สามารถที่จะทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อ พัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งเกิดขึ้นได้ โปรตีน E6 ของ

HPV 16 เป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์เกิดการ immortalization และ transformation โดยการยับยั้งการทำงานของโปรตีน p53 tumor suppressor และนอกจากนี้ โปรตีน E6 ยังสามารถทำงานได้ด้วยตัวเองหรือทำงานร่วมกับโปรตีน E7 ทำให้เกิดการ immortalize ของ primary keratinocytes cell, fibroblast, และ epithelial cell ได้ ซึ่งการเกิดการ transcription ของ E6 จะเกี่ยวข้องกับหน้าที่ในการทำให้เกิดเป็นมะเร็งเกิดขึ้น (1, 25, 26) ดังนั้น จีน E6 และ E7 จึงถือเป็นกลุ่มจีนเป้าหมายที่จะใช้เป็นตัวพัฒนายาที่ออกฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพได้ต่อไป (27, 28, 29, 30)

ปัจจุบันมีการศึกษาถึงบทบาทในการเกิด transcriptional activity ของจีน E6 โดยอาศัย heterologous viral promoter หลายชนิดเช่น กลุ่มที่ส่งผลในการกระตุ้นการแสดงออกของจีน E6 ได้แก่ adenovirus E2 (AdE2), herpes simplex virus thymidine kinase gene (HSV-TK), human immunodeficiency virus long terminal repeat (HIV LTR), adenovirus major late (Adml) และ simian virus 40 (SV40) early promoters เป็นต้น (31, 32, 33, 34, 35) แต่อย่างไรก็ตาม การกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของจีน E6 ยังสามารถศึกษาได้จาก cellular promoter ต่างๆ ได้แก่ c-fos promoter, transforming growth factor- β 1 promoter, c-myc promoter, and the mouse fibronectin gene (36, 34, 37, 38, 39) และนอกจากนี้ ยังมี promoter หลายชนิดที่สามารถกดการแสดงออกของจีน E6 ดังกล่าวได้ยกตัวอย่าง moloney murine leukemia virus LTR and cytomegalovirus immediate early promoter (40) เป็นต้น โดยในปี 2000 Craig J และคณะ (41) ได้ทำการศึกษาผลของ nordihydroguaiaretic acid (NDGA) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ lignan ในพืชต่อการยับยั้งการแสดงออกของ HPV16 gene จากผลการศึกษาพบว่าสารอนุพันธ์ 3 ชนิดคือ Mal.4, M₄N และ tetra-acetyl NDGA สามารถยับยั้งการแสดงออกของจีน HPV16 ภายใต้ P₉₇ promoter และจากการศึกษาประสิทธิภาพของสารต่อการแสดงออกของจีนโดยอาศัย recombinant vector ที่สร้างขึ้นมาที่มีการเชื่อมต่อกับ viral promoter และ enhancer-luciferase reporter gene เป็นตัวชี้วัด แสดงให้เห็นว่าภายใต้ viral promoter HIV, HSV และ SV40 สาร Mal.4 และ M₄N มีผลต่อการแสดงออกของจีนเป็นแบบ dose dependent manner ในขณะที่สาร tetra-acetyl NDGA มีผลต่อ HPV16 P₉₇ promoter มากกว่าสาร Mal.4 และ M₄N และสารทั้งหมดไม่มีผลต่อการแสดงออกของจีนภายใต้ adenovirus major late promoter และ cytomegalovirus promoter. และต่อมา Kang YH และคณะ (42) ได้ทำการศึกษาผลของยาต้านมะเร็งต่อการยับยั้งการแสดงออกของจีน HPV16 E6 ภายใต้การควบคุมของ RSV promoter โดยทำการศึกษาจาก viral promoter-luciferase reporter gene หลายชนิดได้แก่ RSV, CMV, SV40 และ HIV และ eukaryotic E6 expression vector จากผลการทดลองทำให้เห็นว่า จีน E6 สามารถถูกกระตุ้นให้เกิดการ transcription ได้ภายใต้ RSV, SV40 และ HIV promoter ในขณะที่ CMV promoter ไม่สามารถกระตุ้นการ transcription ของจีน E6 ได้ และเมื่อทำการ treat ยาต้านมะเร็งด้วยยาชนิดต่างๆ คือ carboplatin, mitomycin และ cisplatin ในเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย E6-responsive promoter ชนิดต่างๆ พบว่า ยาต้านมะเร็งสามารถลดการแสดงออกของจีน E6 ในเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย RSV-luc promoter

เท่านั้น จากการศึกษาของ Faluhelyi Z และคณะ (43) พบว่า สาร All-trans retinoic acid (ATRA) ที่ระดับความเข้มข้นสูง (10^{-7} - 10^{-6}) สามารถกดการแสดงออกของ HPV16 P₉₇ promoter ทำให้กดการแสดงออกของจีน HPV16 E6 ในการกระตุ้นให้เกิดมะเร็งในเซลล์ SiHa ซึ่งเป็น cervical squamous carcinoma cells ได้

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลการยับยั้งการแสดงออกของจีน E6 ส่งผลให้เซลล์ที่ติดเชื้อ HPV เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ เช่นในการศึกษาของ Singh S และคณะ (22) พบว่ายา Carboplatin สามารถ down regulate constitutive NF- κ B activity ซึ่งจำเป็นต่อการ survival ของเชื้อ JPV 18 E6-positive HEp-2 cells ได้และยังสามารถกดการเกิด phosphorylation ของ constitutive I κ B α ซึ่งส่งผลทำให้เกิด stabilization ของ I κ B α protein ในเซลล์ได้และยังสามารถยับยั้งการ binding ของ NF- κ B ที่ตำแหน่ง Bcl-2 promoter ได้ ทำให้เกิดการ down regulate โปรตีน Bcl-2 ทำให้กระตุ้นเซลล์ดังกล่าวเกิดการตายแบบ apoptosis ได้ และจากการศึกษาของ Karl T และคณะ (44) พบว่า ยา Sulindac ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด cell cycle arrest ได้ที่ระยะ G1/S phase ในเซลล์ HeLa ได้ในลักษณะเป็นแบบ dose dependent manner โดยมีผล suppress cyclin E และ A และยังสามารถ inactivate cdk2 ได้เป็นผลให้เกิดการ degradation ของ HPV E7 gene โดยอาศัยกลไกผ่าน proteasomal pathway และนอกจากนี้ยังพบว่ายา sulindac สามารถกระตุ้นให้เซลล์ที่มี HPV เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ไม่มีผลต่อจีนในกลุ่ม pro-apoptotic เช่น Bax แต่มีผลกดการแสดงออกของจีนในกลุ่ม antiapoptotic ซึ่งได้แก่ Bcl-2 และ Bcl-x_L ซึ่งกระตุ้นการเกิด apoptosis โดยผ่าน mitochondria pathway และนอกจากนี้ในการศึกษาของ Allen KL และคณะ (45) ได้ทดลองนำสาร lignan (3'-O-Methyl-Nordihydroguaiaretic Acid) ที่สกัดได้จาก creosote bush มาทดสอบเซลล์ที่ติดเชื้อ HPV โดยพบว่าในเซลล์ที่มี HPV และถูก treat ด้วยสารดังกล่าวสามารถยับยั้งการแสดงออกของจีน E6 โดยสารดังกล่าวทำลาย function ของจีน E6 เป็นผลทำให้เกิด stabilization ของ p53 protein และเกิดการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ได้เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่มี HPV ที่ถูก treat ด้วยสารดังกล่าวเช่นเดียวกัน ซึ่งจากผลการศึกษาทั้งหมดทำให้ทราบว่าหากจีน E6 และ E7 ถูกกดการแสดงออกจะส่งผลทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อ HPV เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ ซึ่งจะเป็นอีกกลไกหนึ่งที่จะทำลายเซลล์มะเร็งได้

ในปัจจุบันมีสมุนไพรที่น่าสนใจในการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดมะเร็ง (anticancer) ในเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ เช่น ฟ้าทะลายโจร และพืชสมุนไพรชนิดอื่นๆ อีกมากมาย

ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. Ex Nees, อยู่ในวงศ์ Acanthaceae เป็นพืชที่ชาวอินเดียและจีนใช้เป็นยามาแต่โบราณเพ็ญจะเป็นที่นิยมในเมืองไทยเมื่อไม่นานมานี้ โดยใช้สมุนไพรฟ้าทะลายโจรในการรักษาโรคจะใช้เฉพาะส่วนใบหรือทั้งต้น ในการรักษาอาการเจ็บคอ แก้ท้องเสีย แก้ไข้ หรือเป็นยาขม เจริญอาหาร เป็นต้น ฟ้าทะลายโจร เป็นไม้ล้มลุก สูง 30-60 เซนติเมตร ทั้งต้นมีรสขม ลำต้นเป็นสี่เหลี่ยม แตกกิ่งออกเป็นพุ่มเล็ก ใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามสลับเป็น

มัน ดอกออกเป็นช่อใหญ่ที่ปลายกิ่ง และช่อใบ ดอกย่อยขนาดเล็ก กลีบดอกสีขาว ผลเป็นฝักสีเขียวอมน้ำตาล เมื่อผลแก่จะแตกตืดเมล็ดออกมา

จากการศึกษา สารสกัดที่ได้จากฟ้าทะลายโจรพบว่ามีสารสกัดดังกล่าวประกอบไปด้วย สารสำคัญชนิดต่างๆ เช่น สารในกลุ่ม diterpenes, flavonoids และ stigmasterols และจากการศึกษา การออกฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรพบว่ามีฤทธิ์ต่างๆมากมายเช่น ฤทธิ์ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (46,4) ฤทธิ์การต้านเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ เช่น เชื้อ herpes simplex virus type 1 (HSV-1), human immunodeficiency virus (HIV) (48, 49, 50) ฤทธิ์การต้านการแข็งตัวของหลอดเลือด (antithrombotic) (51) ฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulatory activity) (52, 53, 54) ฤทธิ์ในการลดระดับกลูโคสในกระแสเลือด (hypoglycaemic activity) (55) ฤทธิ์ในการลดความดันโลหิต (hypotensive activity) (56) และฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง (anticancer activity) (57) เป็นต้น และต่อมาได้มีการศึกษาแยกสารสำคัญในกลุ่ม diterpenes (diterpenoid lactone) ซึ่งพบว่าเป็นสารที่พบมากที่สุดในพื้นที่สมุนไพรฟ้าทะลายโจร พบว่าสารสำคัญหลักพบในกลุ่มดังกล่าว คือสาร Andrographolide และนอกจากนี้ยังพบสารอนุพันธ์อื่นๆ ของ andrographolide เช่น 14-deoxyandrographolide, neoandrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydro- andrographolide (58, 59) เป็นต้น ซึ่งก็ได้มีการศึกษาการออกฤทธิ์ต่างๆของสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรรวมถึงฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ดังนี้

Rajagopal S และคณะ (60) รายงานว่าในการศึกษาใน in vitro พบว่าสารสกัดจากสมุนไพร *A. paniculata* และสารสำคัญของพืชชนิดนี้ สามารถยับยั้งการเกิด cancer cell proliferation ได้ในเซลล์แต่ละชนิดและยังพบว่าสารสำคัญของพืชดังกล่าว คือ Andrographolide สามารถเกิด cell-cycle arrest ที่ระยะ G0/G1 phase โดยการเหนี่ยวนำ cell-cycle inhibitory protein p27 และการลดระดับการแสดงออกของ cyclin-dependent kinase 4 (CDK4). และนอกจากนี้สาร andrographolide ยังมีฤทธิ์ Immunostimulatory activity โดยสามารถกระตุ้นการเกิด cell proliferation ของ lymphocytes และกระตุ้นการสร้าง interleukin-2. และจากการศึกษาใน in vivo พบว่าสาร andrographolide มีฤทธิ์ anticancer ในการศึกษาใน model B16F0 melanoma syngenic และ HT-29 xenograft models ซึ่งผลจากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบว่า สาร andrographolide น่าจะนำมาศึกษาและพัฒนาเป็น new anticancer drug ต่อไป

Kumar และคณะ (58) ได้ทำการศึกษาผลการต้านการเกิดมะเร็ง (anticancer) และฤทธิ์การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulatory activity) ของ compound ที่สกัดแยกได้จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata* compound) โดยสกัดสารด้วยตัวทำละลายเมทานอล (methanolic extract) จากนั้นทำการแยกส่วน fraction เพื่อให้ได้เป็น compounds ชนิดต่างๆด้วยตัวทำละลาย dichloromethane, petroleum ether และ น้ำ และจากนั้นทำการศึกษาฤทธิ์ของ compounds ที่แยกได้ในแต่ละตัวทำละลาย จากการศึกษพบว่า สารที่ถูกแยกด้วย dichloromethane มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่น โดยที่ระดับ

ความเข้มข้นต่ำของสารสกัดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวน(proliferation)ของเซลล์ HT-29 ซึ่งเป็น colon cell line ได้ดีและยังสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ human peripheral blood lymphocytes (HPBLs) ได้ดี และพบว่าสารที่สามารถแยกได้จากตัวทำละลายดังกล่าวประกอบด้วยสาร 3 ชนิด (compounds) คือ andrographolide, 14-deoxyandrographolide และ 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide และจากการนำ compounds ทั้ง 3 ชนิดมาทดสอบพบว่า andrographolide compound มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้ดีกว่าสารชนิดอื่น โดยผลการยับยั้งให้ผลที่แตกต่างกันในเซลล์ทดสอบแต่ละชนิดและยังสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟไซต์ และระดับ interleukin-2 (IL-2) ที่เซลล์ HPBLs สร้างขึ้นด้วย

Cheung HY และคณะ (61) ได้ทำการศึกษาผล cytotoxicities ของสารสกัดส่วน ethanol extract ของ *Andrographis paniculata* (APE) และสารสำคัญในกลุ่ม diterpenoid พบว่าสารสกัด APE ยับยั้งการเจริญของเซลล์ human acute myeloid leukemic HL-60 cells โดยมีค่า IC₅₀ value เท่ากับ 14.01 µg/mL หลังการ treat สารนาน 24 ชม. และนอกจากนี้สารสำคัญในกลุ่ม diterpenoid ทั้ง 3 ชนิดพบว่าสาร andrographolide มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สาร deoxyandrographolide ในขณะที่สาร neoandrographolide ให้ผลน้อยที่สุด. จากการศึกษาการเกิดการตายแบบ apoptosis โดยวิธี Laser confocal microscopy และ gel electrophoresis พบการเกิด DNA fragmentations และเมื่อทำการศึกษา cell cycle arrest พบว่าในเซลล์ที่ treat สาร andrographolide นาน 36 ชม. สามารถเพิ่มระยะ G₀/G₁ phase ซึ่งการที่ cell cycle เกิดการ arrest ที่ระยะ G₀/G₁ phase จะทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis เกิดขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับการไม่สามารถตรวจพบ mitochondrial cytochrome c และ Bax มีการ expression เพิ่มขึ้นในขณะที่ Bcl-2 proteins expression ลดลง. จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่าสาร APE และ andrographolide สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด cell cycle arrest และการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ HL-60 ได้

จากการศึกษาของ Zhou J และคณะ (62) ได้ทำการศึกษาการเหนี่ยวนำทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งของสารสกัด *Andrographis paniculata* ทำให้ทราบว่าสารดังกล่าวสามารถเหนี่ยวนำทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งได้โดยการกระตุ้น caspase 8 ผ่าน the extrinsic death receptor pathway และกระตุ้นการเกิด apoptosis โดยอาศัย mitochondria pathway ได้ ซึ่งสารดังกล่าวทำให้เกิด caspase 8-dependent Bid cleavage และก่อให้เกิดการ conformation ของ Bax ทำให้เกิดการเคลื่อนไปยัง mitochondria และทำให้เกิดการกระตุ้น caspase 9 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งจากผลการ inhibition ของสารสกัดที่มีผลต่อ caspase 8 ในการ blocked Bid cleavage และ Bax conformational change ทำให้ผลสุดท้ายเซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ได้

Srinivasa RJ และคณะ (59) ได้ทำการสังเคราะห์สาร andrographolide analog ขึ้นมาและทำการศึกษาฤทธิ์การต้านการเกิดมะเร็งในเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ เซลล์ MCF-7 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cell line) และเซลล์ HCT-116 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ (colon cancer cell line) ใน vitro จากผลการศึกษาดังกล่าวพบว่า สารสังเคราะห์ andrographolide derivatives ซึ่งได้แก่ 3,19-

isopropylideneandrographolide (compound 2), 14-acetyl-3,19- isopropylideneandrographolide (compound 3) and 14-acetylandrographolide (compound 4) จากการนำเอา compound 2 และ 4 ทำการ screening หาฤทธิ์การต้านมะเร็ง 60 ชนิดจากสถาบันมะเร็งของสหรัฐอเมริกาพบว่า compound 2 มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukaemia) และ มะเร็งลำไส้ (colon cancer cells) ได้ดี ส่วน compound 4 สามารถต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukaemia), มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer cells) และมะเร็งที่บริเวณส่วนไต (renal cancer cells) ได้ดี โดยทั้งหมดมีฤทธิ์การยับยั้งที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบ (dose-response) และเมื่อนำ compound 2 และ 4 มาทำการศึกษาในเซลล์ MCF-7 พบว่าสารทั้ง 2 ให้ผลในการ arrest cell cycle ได้เมื่อทำการ treated สารในแต่ละช่วงของ cell cycle และที่ความเข้มข้นที่แตกต่าง

Sheeja และคณะ (63) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านการเกิด angiogenesis (antiangiogenic) ของสารสกัด *Andrographis paniculata* extract (APE) สารสำคัญ andrographolide (ANDLE) ทั้งใน in vitro และ in vivo จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อให้สารผ่านทาง intraperitoneal สารดังกล่าวให้ผลในการยับยั้ง B16F-10 melanoma cell line ที่ถูกชักนำให้เกิดการสร้างหลอดเลือดในหนู C57BL/6 และเมื่อทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของ cytokine ในซีรัม พบว่าสารดังกล่าวสามารถลดระดับ proinflammatory cytokines ต่างๆเช่น IL-1 β , IL-6, TNF- α and GM-CSF และ the angiogenic factor VEGF ที่มีผลทำให้เกิด angiogenesis ได้ และนอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ VEGF mRNA ใน B16F-10 cell line พบว่าสารมีผลลดระดับการแสดงออกของ VEGF mRNA ดังกล่าวได้เมื่อเทียบกับกลุ่ม control

Verma N และคณะ (64) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ antioxidant ของสารสกัด *A. paniculata* (AP) ในเซลล์ lymphoma ของหนู พบว่าเมื่อให้สารสกัด AP ทางการกินพบว่าสารเพิ่มระดับ catalase, superoxide dismutase และ glutathione S transferase activities ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ antioxidant ซึ่งจะมียับยั้งที่สำคัญในการออกฤทธิ์เป็นสาร anticarcinogenic ได้โดยไปมีผลลดภาวะ the oxidative stress และในเซลล์ที่เป็นมะเร็งจะมีระดับ Lactate dehydrogenase (LDH) ที่สูงแต่กลับพบว่าสาร AP ลดระดับ LDH ได้อย่างมีนัยสำคัญและเมื่อเปรียบเทียบกับยา Doxorubicin (DOX) ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม anticancerous drug พบว่าสารสกัด AP มีประสิทธิภาพให้ผลดีกว่ายาดังกล่าว

นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจรสามารถออกฤทธิ์ด้านการอักเสบได้อีกด้วยดังจากการรายงานการศึกษาของ Batkhuu และคณะ(65) ทำการศึกษาลดการสร้างสารในเซลล์ nitric oxide (NO) ใน mouse peritoneal macrophages ที่ถูกนำเสนอล้างมาจากการกระตุ้นของ bacillus Calmette-Guérin (BCG) และกระตุ้นการสร้าง NO ด้วย lipopolysaccharide (LPS). จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัด *A. paniculata* สามารถลดการสร้าง NO ได้ และเมื่อทำการศึกษากับ compounds ที่แยกได้จากสารดังกล่าวคือ andrographolide และ neoandrographolide พบว่า compounds ของ *A. paniculata* สามารถลดการสร้าง NO ได้โดยขึ้นกับความเข้มข้นของสารที่นำมาทดสอบ (dose-dependent manner) (ความเข้มข้นเฉลี่ยที่ใช้ 0.1-

100 μ M) และมีค่า IC_{50} 7.9 และ 35.5 μ M ตามลำดับ และเมื่อให้สารสกัดทางการกิน (oral administration) พบว่า neoandrographolide ลดระดับการสร้าง NO ในขณะที่ andrographolide ไม่สามารถลดระดับการสร้าง NO ได้ ซึ่งจากผลดังกล่าวทำให้ทราบว่าสาร neoandrographolide มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดการอักเสบได้ (anti-inflammatory) เมื่อทดสอบทั้งใน in vitro และ ex vivo

ในประเทศไทยพืชสมุนไพรพญาไย ได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ HSV ซึ่งสมุนไพรพญาไย (*Clinacanthus nutans* Lindau.) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่อยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น คือ ผักมันไก่ ผักลิ้นเขียด (เชียงใหม่) พญาปล้องคำ (ลำปาง) เสลดพังพอนตัวเมีย พญาปล้องทอง, พญาปล้องคำ (กลาง) ลิ้นมังกร โพะโซ่จาง (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) มีลักษณะเป็นไม้พุ่มเลื้อยสูง 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 สามารถพบได้ทั่วไปตามป่าประเทศไทย หรือปลูกกันตามบ้าน ส่วนที่ใช้ในการนำมาทำเป็นยารักษาโรค มักนิยมใช้ส่วนของใบ ซึ่งพืชดังกล่าวให้ผลสรรพคุณทางยา ดังนี้ (1) ใบรักษาอาการอักเสบเฉพาะที่ ถอนพิษแมลงสัตว์กัดต่อย รักษาโรคเรื้อรัง งูสวัด (2) ต้น แก้กิด ซึ่งมีรายงานการวิจัย พบว่าสารสำคัญในพญาไยได้แก่ ใบ ประกอบด้วยสาร lupeol, Beta-sitosterol ราก ประกอบด้วยสาร betulin, lupeol, Beta-sitosterol, stigmasterol ลำต้น ประกอบด้วยสาร lupeol ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพญาไยนั้นมีหลายชนิดรวมทั้งมีฤทธิ์ต้านการติดเชื้อ HSV ซึ่งมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านการติดเชื้อ HSV โดยจากการศึกษาของ Sangkitporn และคณะ [(66)] ได้ทำการทดลองรักษาผู้ป่วยโรคงูสวัดโดยทาแผลด้วยครีมพญาไย (5%) วันละ 5 ครั้งทุกวัน ปรากฏว่าแผลจะตกสะเก็ดภายใน 1-3 วัน และหายภายใน 7-10 วัน ในขณะที่ผู้ป่วยที่ได้รับยาหลอกแผลจะตกสะเก็ดภายใน 4-7 วัน และหายภายใน 10-14 วัน ผู้ป่วยกลุ่มที่รักษาด้วยครีมพญาไย จะมีระดับความเจ็บปวดลดลงรวดเร็วกว่ากลุ่มที่รักษาด้วยยาหลอก และไม่พบอาการข้างเคียงใด ๆ จากการให้สารสกัดใบพญาไย และในปี 1992 Jayavasul และคณะ (67) ได้ทดลองรักษาผู้ป่วยโรคเรื้อรังบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ที่ติดเชื้อ HSV-2 ครั้งแรกและติดเชื้อซ้ำ ด้วยครีมพญาไย (5%) เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน acyclovir และยาหลอก (placebo) จากผู้ป่วยจำนวนทั้งสิ้น 77 ราย พบว่า แผลของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาจากสารสกัดใบพญาไยและ acyclovir จะตกสะเก็ดภายในวันที่ 3 และหายภายในวันที่ 7 ต่างกับแผลของผู้ป่วยที่ใช้ยาหลอก จะตกสะเก็ดในวันที่ 4-7 และหายในวันที่ 7-14 หรือนานกว่านั้น แสดงว่ายาครีมพญาไยและครีม acyclovir มีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยโรคเรื้อรังบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ให้หายได้เร็ว ลดความเจ็บปวดได้ นอกจากนี้ยังพบว่าครีมพญาไยไม่ทำให้เกิดการแพ้ ระบายเคือง และอาการข้างเคียง ในขณะที่ครีม acyclovir ทำให้แสบและระคายเคือง

การนำสมุนไพรพญาไยมาใช้ในการรักษามีมากขึ้นเนื่องได้รับการพิสูจน์ทางคลินิกมากพอสมควร การใช้เป็นการนำเอา crude extract มาใช้และการศึกษาผลการออกฤทธิ์ยับยั้งต่อการติดเชื้อ HSV เช่นในรายงานการศึกษาของ Jayavasul และคณะ (68) ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพญา

ยอ ที่เตรียมไว้ให้อยู่ในรูปผงแห้ง (lyophilized powder) ที่ได้จากฝ่ายพฤกษเคมี กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพรต่อการติดเชื้อ HSV-2 โดยศึกษาผลของสมุนไพรต่อระยะต่างๆ ของ viral infection cycle คือ pre-treatment, post-treatment และ inactivation และตรวจดูผลการยับยั้งโดยการทำ plaque reduction assay พบว่าสารสกัดใบพญาายไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการติดเชื้อ HSV-2 โดยวิธี pre-treatment และ post-treatment แต่มีฤทธิ์ในการทำลายไวรัส HSV-2 (inactivation) โดยการให้สารสกัดออกฤทธิ์โดยตรงกับเชื้อไวรัส และเมื่อนำใบพญาายมาสกัดเป็นสารสกัดชนิดต่างๆ พบว่าสารสกัด C2, C3, C4 มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัสได้สูงในระดับความเข้มข้นที่มากกว่า 1: 4800 ขึ้นไป และจากการศึกษาของ Yoosook และคณะ [(69)] ได้ทำการศึกษาดูหาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-2 ของพืชสมุนไพรพญาายที่ทำการสกัดจากทุกส่วนของพืชสมุนไพร (whole plant) ด้วยตัวทำละลายเมทานอล (methanol extract) และนำเอา crude extract ที่ได้นำมาทดสอบกับเชื้อไวรัส HSV-2 สายพันธุ์ G และ HSV-2 ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 5 isolate โดยใช้วิธี plaque reduction assay พบว่าสารสกัดจากพญาายสามารถฆ่าไวรัสนอกเซลล์ (virucidal activity) ของเชื้อ HSV-2 สายพันธุ์ G แต่ไม่มีฤทธิ์ intracellular activity ต่อทั้ง HSV-2 สายพันธุ์ G และสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาและแยกสารสำคัญที่อยู่ในสมุนไพรพญาาย เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ HSV พบว่าจากการศึกษาของ Janwitayanuchit และคณะ (70) ได้ทำการสังเคราะห์สารกลุ่ม 19 monoglycosyl diglycerides ซึ่งมีรายงานว่า เป็นสารประกอบที่พบในพญาาย และศึกษา anti-HSV-1 activity ในระยะก่อนเข้าเซลล์โดยวิธี plaque reduction assay พบว่า 1,2-O-dilinolenoyl-3-O-beta-D-glucopyranosyl-sn-glycerol มีฤทธิ์ดีที่สุด ส่วน Tuntiwachwuttikul และคณะ รายงานว่า ethyl acetate fraction ของส่วนสกัด ethanolic extract จากพญาายมีฤทธิ์ anti-HSV-1 activity ในระยะก่อนเข้าเซลล์ และแยกสารประกอบ (2S)-1-O-linolenoyl-3-O-beta-D-galactopyranosyl-glycerol ได้จาก fraction ดังกล่าว แต่ไม่ได้ศึกษา anti-HSV-1 activity

จากรายงานการศึกษาทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่า กลไกการออกฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรน่าจะเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย, ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory), ด้านไวรัส (anti-viral activity) และต้านมะเร็งได้ (anticancer). และนอกจากนี้จากการศึกษาผลของฟ้าทะลายโจรจากโครงการวิจัยทางด้านสมุนไพรของ Aromdee C. และคณะ (unpublished data) ในการทดสอบกับเชื้อ HSV พบว่าสารสกัด compound ที่แยกได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ HSV ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวน (anti-replication activity) ได้และข้อมูลจากรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรพญาายพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้เช่นเดียวกัน ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นที่สนใจในการนำเอาสมุนไพรฟ้าทะลายโจรมาทำการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อ HPV เนื่องจากว่าสมุนไพรดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านมะเร็งชนิดอื่นแต่ในการศึกษาในเชื้อ HPV ยังไม่มีการศึกษาและนอกจากนี้สมุนไพรพญาายก็ถือเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาในครั้งนี้เช่นเดียวกันเนื่องจากว่าสมุนไพรดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสได้เช่นเดียวกันและจากการศึกษาของ Ekalaksananan T. และคณะ (unpublished data) ซึ่งได้ทำการศึกษาสารสำคัญในรูปของ fraction ของสารสกัด ethyl acetate จากส่วนใบของสมุนไพรพญาาย ซึ่งพบว่า fraction ของสาร

ดังกล่าวยับยั้งเชื้อ HSV ในขั้นตอนก่อนเข้าสู่เซลล์ในระยะ pre-incubation และไม่มีผลการยับยั้งในขั้นตอน replication หรือ ในระยะ post -incubation ได้

แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้เป็นส่วนหนึ่งในการศึกษาของนักศึกษาระดับปริญญาโทในการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*) และสมุนไพรพญาเสือ (*C. nutans*) ในการต้านเชื้อ HPV ได้โดยมีความสนใจว่าสมุนไพรฟ้าทะลายโจร น่าจะมีผลยับยั้งเชื้อ HPV ได้และถึงแม้ในพืชสมุนไพรพญาเสือ (*C. nutans*) จะยังไม่มีรายงานที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์การต้านมะเร็งแต่ก็เป็นพืชที่น่าสนใจในการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรในด้านในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสชนิดอื่นอื่น ซึ่งถ้าหากพืชทั้ง 2 ชนิดที่นำมาทำการศึกษานำมาศึกษาสามารถให้ผลในการยับยั้งเชื้อ HPV ได้จะทำให้ได้ความรู้ใหม่เพิ่มเติมในการศึกษาทางด้านสมุนไพรและสามารถนำมาประยุกต์ใช้งานทางด้านสาธารณสุขในการผลิตยาชนิดใหม่ในการใช้รักษามะเร็งและโรคติดเชื้อ HPV ได้ซึ่งจะเป็นการช่วยสนับสนุนการนำพืชสมุนไพรนำมาใช้พึ่งพาตนเองได้อย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

3. วิธีดำเนินการวิจัย (Method)

3.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร

วัสดุและอุปกรณ์

ฟ้าทะลายโจรแห้งซื้อจากเกษตรกรชุมชนจังหวัดอุบลราชธานี

สารเคมีที่ใช้ สังเคราะห์เป็น ชนิด reagent grade ของ บริษัท Merck

Solvent ที่ใช้ในการสกัดเป็นชนิด commercial grade

เครื่อง Infrared เป็นของบริษัท Perkin Elmers รุ่นวิธีการทดลอง

NMR spectra คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นเป็นของบริษัท Variance, Mercury 400,

CDCl₃ and CD₃OH

LC-MS คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นของบริษัท Bruker Daltonics's, electrospray

ionization ตรวจวัด positive mass โดย TOF detector.

การแยก andrographolide และ 14-deoxy 11,12-didehydroandrographolide จาก ฟ้าทะลายโจร

หมักฟ้าทะลายโจรจำนวน 1 ก.ก. ต่อ methanol 2 ลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำน้ำหมักมากรองและระเหยแห้ง จากนั้นนำมาแยกสารโดย column chromatography โดยใช้ สารละลายผสม methylene chloride และ methanol โดยเพิ่มปริมาณ methanol เป็นลำดับได้ 14-deoxy 11,12-didehydroandrographolide และ andrographolide ลำดับที่ 34-42 และ 56-72 ตามลำดับ

ตรวจเช็คความบริสุทธิ์ ด้วยวิธี TLC โดยใช้ 10% methanol ใน methylene chloride เป็น mobile phase

การสังเคราะห์ 3, 19- isopropylidene andrographolide

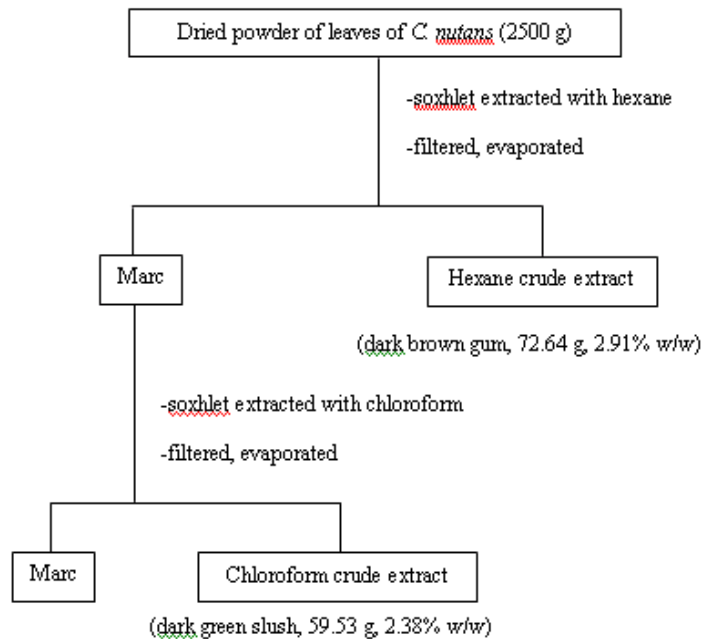
ละลาย andrographolide (200 ม.ล., 0.571 mmole) ใน DMSO ด้วยปริมาณที่น้อยที่สุด เติม pyridinium p-toluene sulphonate 1-2 ม.ล. เติม benzene เติม dimethoxy propane (0.6 mmole) stir บน magnetic stirrer 8 ชม นำมาเติม ether 100 ม.ล. น้ำ 100 ม.ล. แยกชั้นน้ำทั้งล่างชั้น ether ด้วยน้ำอีกครั้งหนึ่ง นำชั้น ether ไประเหยจนแห้ง นำไปผ่าน short column elute ด้วย chloroform เก็บ chloroform fraction ครั้งละ 20 ม.ล.

ตรวจเช็คความบริสุทธิ์ ด้วยวิธี TLC โดยใช้ 10% methanol ใน methylene chloride เป็น mobile phase และตรวจเช็คด้วยการ spray ด้วย Kedde' reagent

3.2 การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพรใบพญายอ

วิธีการสกัด

นำผงสมุนไพรพญายอส่วนที่เป็นใบ (2.5 กิโลกรัม) มาสกัดด้วย hexane และ chloroform ตามลำดับในเครื่องสกัด soxhlet apparatus นำส่วนที่สกัดได้ด้วย chloroform มาทำให้แห้งโดยการกลั่นแบบลดความดันได้สารสกัดหยาบ (59.53 กรัม) วิธีการสกัดแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 วิธีการแยกสารสำคัญจากสารสกัดและตรวจยืนยันสูตรโครงสร้างของสารสำคัญที่แยกได้

วิธีการแยกสารสำคัญจากสารสกัดและตรวจยืนยันสูตรโครงสร้างของสารสำคัญที่แยกได้

นำสารสกัดหยาบที่ได้ (18.7 g) มาทำการแยกสารสำคัญให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจล 60 เป็นตัวดูดซับ แล้วทำการชะด้วยตัวทำละลาย ดังนี้ เฮกเซน (hexane) เฮกเซน-เอทิลอะซิเตต 1:1 (hexane-ethyl acetate) เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) คลอโรฟอร์ม (chloroform) คลอโรฟอร์ม-เอทานอล 1:1 (chloroform-ethanol) และเอทานอล (ethanol) ตามลำดับ ตรวจสอบสารสำคัญในสารละลายที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ด้วย TLC (Thin layer chromatography) ใช้ตัวทำละลายผสม toluene-petroleum ether-methanol-methyl ethyl ketone 30:60:5:5 รวมส่วนที่เหมือนกันหรือใกล้เคียงกัน

3.3 การเตรียมสารสกัดสำหรับทดสอบ

นำ compound ของสารสกัดฟ้าทะลายโจร (3 ชนิด) และสารสกัดจากสมุนไพรพญาอ (3 ชนิด) แต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ต้าน HPV นำมาละลายใน DMSO และเจือจางด้วย DEM ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 1-2 mg/ml ทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ filter membrane ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บสารสกัดที่ได้ ที่ 4°C สำหรับใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้าน HPV

3.4 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

C33A cell line (HPV negative cell line) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Magnus von Knebel Doeberitz และ CaSki cell line (HPV positive cell line) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Peter JF Snijders เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่จะถูกนำมาใช้ในทดลองโดยใช้ในการทำ transfect ด้วย vector ที่สร้างขึ้นในการศึกษานี้ และใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร เซลล์ทั้งสองนี้จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่เติม 2 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum อบที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5 % CO₂ incubator โดยทำการ subculture สัปดาห์ละ 1-2 ครั้ง

3.5 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (42, 22, 72)

เลี้ยงเซลล์ C33A และ CaSki ให้มีลักษณะเป็น monolayer ใน 96-well tissue culture plate ภายในเวลา 18-24 ชั่วโมง นำสารสกัดมาทำการเจือจางใน อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ด้วยวิธีการเจือจางแบบ serial two-fold dilution แล้วทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก จากนั้นเติมสารสกัดที่เจือจางแล้วในแต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน 96-well tissue culture plate แทน สำหรับหลุมควบคุม ประกอบด้วย เซลล์ C33A และ CaSki ซึ่งเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสารสกัด และ solvent control ซึ่งเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO เพื่อเป็นตัวควบคุมผลการทดลอง นำไปอบที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5 % CO₂ incubator นาน 3 วัน เมื่อครบตามกำหนดเวลา เติม MTT ความเข้มข้น 5mg/ml ลงไปในหลุมๆละ 20 µl หลังจากนั้นเขย่า plate 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการดูด media เก่าออก เติม DMSO 200 µl เพื่อละลายตะกอน ทำการเขย่า 200 rpm นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัด OD ที่ความยาวคลื่น 540 nm เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม subtoxic concentration คือความเข้มข้นของสารสกัดที่มากที่สุดที่ให้ค่า OD ไม่ต่างจาก cell control ส่วนค่า CC₅₀ (50% cytotoxic concentration) คือความเข้มข้นของสารสกัดที่ให้ค่า OD น้อยกว่า cell control ร้อยละ 50 ซึ่งหาได้จาก dose-response curve

3.6 การสร้าง cloning plasmid สำหรับการสร้าง recombinant plasmid เพื่อใช้ในการศึกษาผลของสารสกัดต่อ transcription activity ของ HPV 16 E6 gene promoter

เพื่อทำการศึกษา transcriptional activity ของ HPV16 E6 gene ภายใต้การกระตุ้นจาก HPV16 E6 promoter คือ promoter P₉₇ ที่อยู่ใน ส่วน LCR ของ HPV16 โดยการสร้าง recombinant plasmid ที่มีส่วนของ HPV 16 E6 gene promoter และ luciferase reporter gene เพื่อใช้ transfect เข้าเซลล์ C33A

การเตรียม HPV16 reference plasmid (pHPV16R)

นำ HPV16 reference (R) plasmid (pHPV16R, ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Ethel-Michele de Villiers) ซึ่งมี whole genome ของ HPV16 prototype และ ampicillin

resistance gene ไปทำการ transformation ใน *E.coli* HB 101 เพื่อเพิ่มปริมาณให้เพียงพอสำหรับการใช้ในโครงการวิจัยนี้ โดยทำการเตรียม competent *E.coli* HB 101 และทำการ transformation ใส่ plasmid เข้าไปใน competent *E.coli* HB 101 นำ *E.coli* HB 101 ที่มี plasmid ไปทำการ spread plate โดยใช้ LB-agar plate ที่มียา ampicillin 50 µg/ml แล้วนำไป incubate ที่ 37°C overnight จากนั้นทำการคัดเลือก clones และสกัด plasmid ทำการตรวจสอบ plasmid ที่สกัดได้โดยการทำ agarose gel electrophoresis

การสร้าง pDRIVE cloning vector ที่มี LCR ของ HPV16R (pDRIVE-HPV16R LCR)

pDRIVE cloning vector (Qiagen PCR Cloning Kit, QIAGEN) เป็น linearized cloning vector ที่มี U overhang ที่ปลาย 3' ทั้ง 2 ข้าง ใช้สำหรับ ligate PCR product ที่มี 3'-end A overhangs

เพิ่มปริมาณ LCR ของ HPV16R ให้มากเพียงพอสำหรับการ Ligation ใน cloning vector โดยวิธีการ PCR โดยใช้ specific primers สำหรับ HPV16 LCR ดังแสดงในตารางด้านล่างซึ่งครอบคลุมในส่วนจีน LCR ที่มี promoter P₉₇ ในการกระตุ้นการแสดงออกของจีน E6 จากนั้นนำ PCR product ไปตรวจสอบ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 3.1 Primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน HPV16R LCR โดยวิธีการ PCR

Primers	Primer sequence (5'-3')	Genomic location (nts)	Length (bp)	PCR product size (bp)
HPV16 LCR1-F	GAAAACGAAAAGCTACACCCA	7083-7104	21	926
HPV16 LCR4-R	TGCAGTTCTCTTTTGGTGC	85-103	19	

จากนั้นแยกเอาเฉพาะส่วนของ LCR PCR product ที่อยู่ในเจลมาทำการ purify ด้วยวิธีการ Gel cut method ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit (RBC) นำส่วน LCR PCR product ที่ purified แล้ว มาทำ Ligation ใน pDRIVE cloning vector (Qiagen PCR Cloning Kit, QIAGEN) ซึ่งมี lacZ α -peptide element ที่อยู่บริเวณ several unique restriction endonuclease recognition site ที่อยู่รอบๆบริเวณ cloning site และมี ampicillin resistance gene ถ้า LCR ถูก ligate เข้าระหว่าง cloning site จะทำให้สามารถ select colony ที่เกิดการ ligate ของ LCR ใน pDRIVE cloning vector ได้ด้วยวิธีการ blue/white selection

นำ ligated products ที่ได้ transformation เข้าไปใน competent *E.coli* XL-1 Blue cells แล้ว spread plate โดยใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LB medium ที่ประกอบด้วย Tryptone, Bacto-yeast extract, NaCl, X-gal, IPTG และยา ampicillin 50 µg/ml แล้วนำไป incubate ที่ 37°C overnight

จากนั้นทำการคัดเลือก clones ที่มีสีขาว นำไปเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย และสกัด plasmid ทำการตรวจสอบ plasmid ที่สกัดได้โดยการทำ agarose gel electrophoresis และทำ HPV16 LCR PCR amplification ด้วย primers คู่เดิม แล้วตรวจสอบผล

Plasmid clone ที่ให้ผล HPV16 LCR PCR positive จะนำมาทำการตัดด้วย restriction endonuclease *KpnI* and *Hind III* (NEB) และตรวจสอบผลที่ได้โดยการทำ agarose gel electrophoresis

3.7 การสร้าง recombinant plasmid (pGL3-HPV16 LCR) เพื่อใช้ในการศึกษาผลของสารสกัดต่อ transcription activity ของ HPV 16 E6 gene promoter

เมื่อได้ cloning plasmid ที่มีส่วนของ HPV16 E6 gene promoter แล้ว จะทำการตัดส่วนของ HPV16 E6 gene promoter ออกจาก cloning plasmid เพื่อใส่เข้าไปใน pGL3-Basic vector ซึ่งมี luciferase reporter gene จะได้ pGL3-HPV16LCR สำหรับ transfect เข้าเซลล์ C33A

การเตรียม pGL3-Basic vector

นำ pGL3-Basic vector ซึ่งเป็น vector ที่มีจีน luciferase แต่ไม่มี eukaryotic promoter และ enhancer sequence ไปทำการ transformation ใน *E.coli* XL-1 Blue เพื่อเพิ่มปริมาณให้เพียงพอสำหรับการใช้ในโครงการวิจัยนี้

วิธีทำ

1. นำ pGL3-Basic vector มาทำการ transform เข้าไปใน *E.coli* XL-1 Blue โดยเตรียมเวกเตอร์ 100 ng ผสมกับ competent *E.coli* XL-1 Blue cell 1×10^8 แล้ววางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที
2. Heat shock ที่ 42°C 45 วินาที แล้ววางบนน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 15 นาที
3. เติม LB broth 500 μ l แล้วบ่มที่ตู้ Shaker incubator 37°C 200 rpm เป็นเวลา 1 ชม. 30 นาที
4. นำไป spread บน LB plate ที่มี ampicillin 50 μ g/ μ l, 50 μ M IPTG และ 80 μ g/ml X-gal แล้วบ่มที่ตู้ incubator 37°C เป็นเวลา 24 ชม.
5. เลือก colony สีขาวแล้วเชี่ยลงใน LB broth ที่มี Ampicillins 50 μ g/ml บ่มใน Shaking incubator 37°C 200 rpm เป็นเวลา 18-20 ชม.
6. นำไปสกัดพลาสมิดโดยใช้วิธี Mini Prep

การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Mini Prep

วิธีทำ

1. นำ LB broth culture มา centrifuge ให้เซลล์ตกตะกอนที่ 1,500 rpm นาน 10 นาที
2. เท supernatant ที่ทิ้ง แล้วเติม Solution I (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH8.0) 100 μ l ผสมให้เข้ากันโดยการดูด-เป่า ด้วย autopipette

3. เติม solution II (0.1 M NaOH, 1%SDS) 150 μ l ผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดไปมา
4. เติม solution III (1.5M Potassium Acetate pH 5.4) 200 μ l ผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดไปมา แล้ววางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที
- 5.ปั่นตกที่ 12,000 rpm 10 นาที แล้ว ดูด supernatant ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่
6. เติม phenol-chloroform (1:1) ในอัตราส่วน 1 เท่าของ supernatant ที่ดูดมาได้ แล้วผสมให้เข้ากัน โดยการคว่ำหลอดไปมา
7. ปั่นตกที่ 12,000 rpm 10 นาที แล้ว ดูด supernatant (ส่วนใสด้านบน) ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่
8. เติม Isopropanol อัตราส่วน 1 เท่าของ supernatant ที่ดูดได้ แล้วผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดไปมา แล้วนำไป incubate ที่ -70°C เป็นเวลา 1 ชม.
9. ปั่นตกที่ 12,000 rpm 15 นาที แล้วเท supernatantทิ้ง
10. ปั่นล้างพลาสติก ด้วย 70% ethanol ที่ 12,000 rpm 5 นาที
11. นำพลาสติกที่ได้ มา dry ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที
12. เติม TE solution 50 μ l เคาเบาๆ แล้ว incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชม.
13. นำไปวัดปริมาณความเข้มข้นของพลาสติกที่สกัดได้
14. เก็บที่ -20°C

การตัด pGL3-Basic vector ให้เป็น linear form

นำ plasmid ที่สกัดได้มาทำการตัดด้วย restriction enzyme *KpnI* และ *Hind III* (NEB) โดยใช้ pGL3-Basic vector 10 μ g และเอนไซม์ *KpnI* และ *Hind III* อย่างละ 1 unit บ่มที่ 37°C overnight ตรวจสอบผลโดยการทำ 0.7% agarose gel electrophoresis

การทำ dephosphorylation ที่ปลาย linear pGL3-Basic vector

นำ linear pGL3-Basic vector มา purify และทำ dephosphorylation เพื่อให้สามารถทำ ligation ได้ในขั้นตอนต่อไป โดยใช้ linear pGL3-Basic vector 0.5 μ g ผสมกับ dephosphorylation buffer containing 1 U of calf intestine alkaline phosphatase 50 μ l บ่มที่ 37°C 30 min หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่ 85°C 15 min นำ dephosphorylated pGL3-Basic vector มา purify โดยใช้ HiYieldTM Gel/PCR DNA Extraction Kit และวัดปริมาณ DNA ด้วย spectrophotometer

การเตรียมชิ้นส่วน HPV16 LCR สำหรับ ligation เข้ากับ linear dephosphorylated pGL3-Basic vector

นำ pDRIVE-HPV16 LCR cloning vector ซึ่งมีชิ้นส่วนของ HPV16 LCR ที่ต้องการ มาตัดด้วย restriction endonuclease *KpnI* and *Hind III* นำไปแยกเอาเฉพาะชิ้นส่วนของ HPV16 LCR ที่ต้องการออกมาโดยทำ low melting agarose gelelectrophoresis ตัด gel บริเวณที่มี band ของ HPV16 LCR แล้ว purify โดยใช้ HiYieldTM Gel/PCR DNA Extraction Kit

การทำ ligation ระหว่าง HPV16 LCR และ linear dephosphorylated pGL3-Basic vector

นำส่วน HPV16 LCR ที่ตัดออกมาจาก pDRIVE-HPV16 LCR cloning vector มาเชื่อมต่อกับ linear dephosphorylated pGL3-Basic vector แล้ว ในอัตราส่วน 4:1 โดยใช้ T4 ligase

1. เตรียม reaction mixture 20 μ l ซึ่งประกอบด้วย 5x ligation buffer 4 μ l, HPV16 LCR และ linear dephosphorylated pGL3-Basic vector ในอัตราส่วน 4:1
2. เติม T4 ligase 1 unit
3. บ่มที่ 16°C 16 h

การทำ Transformation

นำ ligated solution ที่ได้ transform เข้า competent *E.coli* XL-1 Blue cells

1. ใช้ ligated solution 3 μ l ผสมกับ competent *E.coli* XL-1 Blue cell 1×10^8 แล้ววางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
2. Heat shock ที่ 42°C 45 วินาที แล้ววางบนน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 15 นาที
3. เติม LB broth 500 μ l แล้วบ่มที่ตู้ Shaker incubator 37°C 200 rpm เป็นเวลา 1 ชม. 30 นาที
4. นำไป spread บน LB plate ที่มี ampicillin 50 μ g/ μ l, 50 μ M IPTG และ 80 μ g/ml X-gal แล้วบ่มที่ตู้ incubator 37°C เป็นเวลา 24 ชม.
5. เลือก colony สีขาวแล้วเชยลงใน LB broth ที่มี Ampicillins 50 μ g/ml บ่มใน Shaking incubator 37°C 200 rpm เป็นเวลา 18-20 ชม.
6. นำไปสกัดพลาสมิดโดยใช้วิธี Mini Prep

การตรวจสอบ pGL3-HPV16 LCR ที่สร้างขึ้น

หลังจากคัดเลือก clones และสกัด plasmid แล้ว ตรวจสอบได้ 2 วิธีคือ

A. การตัด recombinant plasmid ด้วย restriction enzyme *Kpn I* and *Hind III*

ทำการตัด recombinant plasmid ด้วย restriction enzyme *Kpn I* and *Hind III* (NEB) ตรวจสอบ recombinant plasmid โดยวิธีการ agarose gel electrophoresis

B. การ amplify ส่วนของ LCR ที่อยู่ใน recombinant plasmid โดยวิธี PCR

นำ plasmid ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณ LCR โดยวิธี PCR ด้วย specific primers ต่อ LCR แล้วตรวจดูขนาดของ PCR product โดยวิธีการ agarose gel electrophoresis

3.8 การศึกษา transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR

นำ pGL3-HPV16 LCR vector ที่ purify ไว้จำนวน 0.8 ug, 1.6 ug และ 3.2 ug มา transfect เข้าสู่ C33A cell line และมี negative control เป็น C33A cell line ที่ไม่ถูก transfect หลังจาก transfection 24 ชั่วโมง วัด transcriptional activity ของ HPV16 LCR โดยการตรวจหา luciferase activity ด้วย standard luciferase assay โดยใช้ Bright-Glo™ Reagent

1. เตรียม C33A cell line ใน 24-well tissue culture plate อายุ 1 วัน
2. นำ pGL3-HPV16 LCR vector ที่ purify ไว้จำนวน 0.8 ug, 1.6 ug และ 3.2 ug มา transfect เข้าสู่ C33A cell line ใน 24-well tissue culture plate โดยใช้ Lipofectamine 2000 จำนวน 2 µl และมี negative control เป็น C33A cell line ที่ไม่ถูก transfect
3. บ่มที่ 37°C 24 ชั่วโมง
4. วัด transcriptional activity ของ HPV16 LCR โดยการตรวจหา luciferase activity ด้วย standard luciferase assay โดยเติม Bright-Glo™ Reagent หลุมละ 150 µl
5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที ดูด cell ที่ถูก lyses ปริมาณ 300 µl ใส่ microcentrifuge tube
6. วัด luciferase activity ด้วยเครื่อง Modulus Single tube Multimode reader (Turner Biosystem)

3.9 การศึกษาความเป็นพิษต่อ transfected cell ของสารสกัดสมุนไพร (Cell cytotoxicity assay)

เนื่องจาก transfected cell จะมีความไวต่อความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่างจากเซลล์ที่ไม่ถูก transfect จึงต้องทำการหาความเข้มข้นที่สูงที่สุดของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อ transfected cell เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

วิธีทำ

1. เตรียม เซลล์ C33A อายุ 1 วัน ใน 96-well tissue culture plate โดยเลี้ยงใน growth media ที่ไม่เติม antibiotics
2. เปลี่ยน media เป็น maintenance media 50 µL ที่ไม่เติม fetal bovine serum และ antibiotics
3. เติม lipofectamine 0.5 µL/well
4. อบที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ นาน 4 ชั่วโมง

5. เปลี่ยน media เป็น maintenance media 100 μ L ที่ไม่เติม fetal bovine serum และ antibiotics
6. อบที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ overnight
7. เติมสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด ที่เจือจางแบบ serial dilution ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ส่วนชุดควบคุมจะไม่ทำการเติมสารสกัดสมุนไพร
8. อบที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ นาน 18-24 ชั่วโมง
9. ดูด media ออก เติม methythiazole tetrazolium (MTT)
10. อบที่อุณหภูมิ 37°C นาน 4 ชั่วโมง
11. ละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO
12. เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที
13. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm คำนวณค่า percentage of cell viability เทียบกับ untreated cell (ODเฉลี่ย ของ untreated cell มีค่าเท่ากับ 100%)

3.10 การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรจากฟ้าทะลายโจรและพญายอ ต่อ transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR

นำ pGL3-HPV16 LCR transfect เข้า C33A cells แล้วเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่เติมสารสกัดสกัดสมุนไพรจากฟ้าทะลายโจรและพญายอ เพื่อดูผลของสารสกัด ต่อ transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR

1. ทำการ plate เซลล์ C33A จำนวน 2×10^4 cell ลงใน 96-well plate และนำไปบ่มในตู้ 37°C 5%CO₂ overnight
2. เตรียม DNA-lipofectamineTM 2000 complexes โดยใช้ปริมาณ plasmid DNA 0.4 μ g และ lipofectamine 0.5 μ L ใน DMEM (ที่ปราศจาก antibiotic และ fetal bovine serum) 50 μ L ต่อ 1 well
3. ดูด pGL3-HV16 LCR E prototype หรือ pGL3-HV16 LCR As variant 0.4 μ g ละลายใน 25 μ L DMEM แล้วบ่มไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูด lipofectamineTM 2000 มา 0.5 μ L ละลายใน 25 μ L DMEM แล้วบ่มไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. ผสม plasmid DNA กับ lipofectamine แล้ว mix เบาๆ และบ่มไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
5. ดูด DNA-lipofectamineTM 2000 complexes 50 μ L ใส่ใน เซลล์ C33A บ่มในตู้ 37°C, 5%CO₂ เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง

6. ทำการเปลี่ยน media เก่าออก แล้วเติม 100 μ l DMEM ที่มี 2% FBS และสารสกัดที่ความเข้มข้น subcytotoxic concentration ลงไปแทน จากนั้นนำไป บ่มในตู้ 37°C, 5%CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
7. ตรวจหา Luciferase activity โดย เติม 100 μ l Bright-GloTM luciferase assay reagent ลงในแต่ละ well และบ่มไว้ 2 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกมาใส่ใน microtube ขนาด 1.5 ml และวัด Luciferase activity ด้วยเครื่อง Luminometer

3.11 การศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพร ต่อการแสดงออกของ HPV 16 E6

การศึกษานี้จะเลี้ยง cell line ที่มี HPV E6 ในสารสกัดจากสมุนไพร และ subpassage เซลล์ไปเรื่อยๆ เพื่อดูผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของ HPV E6 โดยวัดจากปริมาณ mRNA ของ HPV E6

วิธีทำ

1. เตรียม CaSki cell line และ SiHa cell line ใน 24-well tissue culture plate โดยเริ่มจากปริมาณ เซลล์ 2×10^4 cells/well
2. บ่มในตู้ 37°C, 5%CO₂, overnight
3. เปลี่ยน media เป็น growth media ที่ผสมสารสกัดให้มีปริมาณเท่ากับ subtoxic concentration และสังเกตดูเซลล์ทุกวัน
4. เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนถึง 100% confluence ทำการ subpassage ด้วย trypsin และเลี้ยงต่อใน growth media ที่ผสมสารสกัดให้มีปริมาณเท่ากับ subtoxic concentration โดยใช้ split ratio = 1:4 และเก็บเซลล์ที่เหลือไว้ใน Trizol ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อใช้สำหรับการสกัด RNA ต่อไป
5. ทำข้อที่ 4 ซ้ำไปเรื่อยๆ จนกว่าเซลล์จะตายหมด โดยบันทึก passage number ของเซลล์เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง
6. สกัด RNA จากเซลล์ที่เก็บไว้ใน Trizol ในข้อ 4 แล้วตรวจหาปริมาณ mRNA ของ E6 โดยวิธี SYBR Green Real-time PCR
7. ยืนยันผลของสารสกัดอีกครั้งโดยเลี้ยง SiHa cell ในสถานะที่มีและไม่มีสารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้นในระดับ subcytotoxic concentration (1X) และ 2 เท่าของ subcytotoxic concentration (2X) ใน 24-well tissue culture plate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะสกัด total RNA แล้ว convert ไปเป็น cDNA โดยใช้ SuperScript[®] VILO[™] cDNA Synthesis Kit แล้วตรวจหาการแสดงออกของ E6 โดยตรวจหาปริมาณ mRNA ของ E6 โดยวิธี SYBR Green Real-time PCR

4. ผลการวิจัย (Result)

4.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร

สามารถแยกสารประกอบบริสุทธิ์จำนวน 3 ชนิดดังนี้

- 1) Andrographolide ปริมาณ Andrographolide ที่ได้ 4%
- 2) 14-Deoxy-11,12-didehydroandrographolide 0.8%
- 3) 3, 19- isopropylidene andrographolide 80%

Andrographolide:

¹H NMR: 6.84 (1H, *dt*, *J*= 7.02, 1.56Hz, H-12), 5.00 (1H, *d*, *J*=5.5 Hz, H-14), 4.88 (1H, *s*, H-17a), 4.66 (1H, *s*, H-17b), 4.15 (1H, *dd*, *J*=10.1, 1.95, Hz, H-15a), 4.11 (1H, *d*, *J*=10.9 Hz, H-15b), 3.40 (1H, *m*, *J*=7.03, H-3), 3.3 (1H, *d*, *J*=8.2, H-19), 1.21 (3H, *s*, H-18), 0.74 (3H, *s*, H-20)
¹³C NMR: 170.52 (C, C-16), 149.4 (CH, C-12), 148.9 (C, C-8), 129.8 (C, C-13), 109.2 (CH₂, C-17), 80.9 (CH, C-3), 76.2 (CH₂, C-15), 66.7 (CH, C-14), 65.0 (CH₂, C-19), 57.4 (CH, C-9), 56.3 (CH, C-5), 46.7 (C, C-4), 40.0 (C, C-10), 39.0 (CH₂, C-7), 38.1 (CH₂, C-1), 29.0 (CH₂, C-2), 25.11 (CH₂, C-6), 25.2 (CH₂, C-11), 23.4 (CH₃, C-18), 15.5 (CH₃, C-20).

14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide:

White or colourless crystals (CH₂Cl₂), **m.p.** 198-200 °C, *R_f* 0.58, silica gel 60F₂₅₄, 10% methanol in CH₂Cl₂.

¹H NMR: 7.43 (1H, *t*, *J*=1.76 Hz, H-14), 6.85 (1H, *q*, *J*=10.1 and 15.8 Hz, H-12), 6.15 (1H, *d*, *J*=15.8 Hz, H-11), 4.86 (2H, *d*, *J*=1.3 Hz, H-15), 4.75 (1H, *d*, *J*=1.8 Hz, 17a), 4.49 (1H, *d*, *J*=1.8 Hz, 17b), 4.12 (1H, *d*, *J*=11.0 Hz, H-19a), 3.39 (1H, *t*, *J*=5.3 Hz, H-3), 3.38 (1H, *d*, *J*=11.4 Hz, H-19b), 1.22 (3H, *s*, H-20), 0.83 (3H, *s*, H-18).

¹³C NMR: 172.2 (C=O, C-16), 148.0 (C, C-8), 136.0 (CH, C-14), 142.8 (CH, C-12), 129.2 (C, C-13), 121.1 (CH, C-11), 109.2 (CH₂, C-17), 80.8 (CH, C-3), 143.9 (CH₂, C-15), 64.2 (CH₂, C-19), 61.7 (CH, C-9), 54.7 (CH, C-5), 43.0 (C, C-4), 38.5 (C, C-10), 38.2 (CH₂, C-1), 36.6 (CH₂, C-7), 28.1 (CH₂, C-2), 22.9 (CH₂, C-6), 22.6 (CH₃, C-18), 15.9 (CH₃, C-20).

3,19-Isopropylidene andrographolide:

^1H NMR: 6.97 (1H, td, $J=1.5$ and 8.0 Hz, H-12), 5.05 (1H, d , $J=5.9$ Hz, H-14), 4.91 (1H, s , H-17a), 4.62 (1H, s , H-17b), 4.45 (1H, dd , $J=6.2$ Hz and 10.5 Hz, H-15a), 4.26 (1H, dd , $J=2.0$ and 10.5 Hz, H-15b), 3.96 (1H, d , $J=11.3$ Hz, H-19a), 3.50 (1H, dd , $J=3.1$ and 8.6 Hz, H-3), 3.18 (1H, d , $J=11.7$ Hz, H-19b), 2.57 (2H, t , $J=6.8$ Hz, H-11), 1.41 (3H, s , H-1'), 1.37 (3H, s , H-2'), 1.20 (3H, s , H-18), 0.97 (3H, s , H-20).

4.2 การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพรวัวป่า

สามารถแยกสารสำคัญจากสารสกัดได้เป็น 4 fraction ดังนี้ fraction ที่ I 6.65 กรัม fraction ที่ II 1.40 กรัม fraction ที่ III 6.24 กรัม fraction ที่ IV 0.97 กรัม

สารสำคัญที่อยู่ใน fraction ที่ I (1.0017 กรัม) ได้นำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ อีกครั้งหนึ่งด้วยวิธี preparative thin layer chromatography (hexane-ethyl acetate 7:3) สามารถแยกสารสำคัญได้ 5 fraction (A 0.0450 กรัม B 0.0406 กรัม C 0.0791 กรัม D 0.0697 กรัม และ E 0.1469 กรัม)

Fraction A (0.0450 กรัม) ได้นำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่งด้วยวิธี preparative thin layer chromatography (hexane-ethyl acetate 7:3) ได้สารสำคัญ 1 (0.0105 กรัม) และ 2 (0.0098 กรัม) ซึ่งจากการทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกในตัวทำละลาย methanol ได้ [สารสำคัญที่บริสุทธิ์ 1](#) (0.0052 กรัม) และ [2](#) (0.0098 กรัม) ข้อมูล ^1H และ ^{13}C -NMR แสดงไว้ในตารางที่ 1 และตารางที่ 2

Fraction B (0.0406 กรัม) ได้นำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่งด้วยวิธี preparative thin layer chromatography (hexane-ethyl acetate 7:3) ได้สารสำคัญ 3 (0.0105 กรัม) ซึ่งจากการทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกในตัวทำละลาย methanol ได้ [สารสำคัญที่บริสุทธิ์ 3](#) (0.0047 กรัม) ข้อมูล ^1H และ ^{13}C -NMR แสดงไว้ในตารางที่ 1 และตารางที่ 2

Fraction C (0.0791 กรัม) ได้นำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่งด้วยวิธี preparative thin layer chromatography (hexane-ethyl acetate 7:3) ได้สารสำคัญ 4 (0.0136 กรัม) ซึ่งจากการทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกในตัวทำละลาย methanol ได้ [สารสำคัญที่บริสุทธิ์ 4](#) (0.0058 กรัม) ข้อมูล ^1H และ ^{13}C -NMR แสดงไว้ในตารางที่ 1 และตารางที่ 2

Fraction D (0.0791 กรัม) ได้นำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่งด้วยวิธี preparative thin layer chromatography (hexane-ethyl acetate 7:3) ได้สารสำคัญ 5 (0.0117 กรัม) และ 6 (0.0113 กรัม) ซึ่งจากการทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกในตัวทำละลาย methanol ได้ [สารสำคัญที่บริสุทธิ์ 5](#) (0.0061 กรัม) และ [6](#) (0.0057 กรัม) ข้อมูล ^1H และ ^{13}C -NMR แสดงไว้ในตารางที่ 1 และตารางที่ 2

Fraction III (6.24 กรัม) ได้ถูกนำมาทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจล 60 เป็นตัวดูดซับ และใช้ตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม และคลอโรฟอร์ม-เอทานอลเป็นตัวชะตามลำดับตรวจสอบสารสำคัญในสารละลายที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ด้วย TLC (Thin layer chromatography) ใช้ตัวทำละลายผสม toluene-petroleum ether-methanol-methyl ethyl ketone 30:60:5:5 รวมส่วนที่เหมือนกันหรือใกล้เคียงกัน สามารถแยกสารสำคัญได้ 5 fraction (A 0.28 กรัม B 0.16 กรัม C 0.10 กรัม D 1.22 กรัม และ E 0.51 กรัม) Fraction A (0.28 กรัม) ได้ถูกนำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่งด้วยวิธี preparative thin layer chromatography (chloroform-methanol 9:1) ได้สารสำคัญ 7 (0.07 กรัม) ซึ่งจากการทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกในตัวทำละลาย methanol ได้ [สารสำคัญที่บริสุทธิ์ 7](#) (0.0128 กรัม) ข้อมูล ^1H และ ^{13}C -NMR แสดงไว้ในตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.2) Fraction B (0.16 กรัม) ได้ถูกนำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่งด้วยวิธี preparative thin layer chromatography (chloroform-methanol 9:1) ได้สารสำคัญ 8 (0.0745 กรัม) ซึ่งจากการทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกในตัวทำละลาย methanol ได้ [สารสำคัญที่บริสุทธิ์ 8](#) (0.0182 กรัม) ข้อมูล ^1H และ ^{13}C -NMR แสดงไว้ในตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.2

เมื่อนำส่วนสกัดด้วย คลอโรฟอร์มของใบพญาธามาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 8 ชนิด จากการวิเคราะห์โครงสร้างของสารทั้งหมดที่แยกได้ โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี (DEPT, COSY, NOESY, HMQC และ HMBC) พบว่าเป็นสารประกอบที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับ คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี คือ 13^2 -hydroxy-(13^2 -S)-chlorophyll b (1), 13^2 -hydroxy-(13^2 -R)-chlorophyll b (2), 13^2 -hydroxy-(13^2 -S) - phaeophytin b (3), 13^2 -hydroxy-(13^2 -R) - phaeophytin b (4), 13^2 - hydroxy - (13^2 -S) - phaeophytin a (5), 13^2 - hydroxy - (13^2 -R) - phaeophytin a (6), purpurin 18 phytol ester (7) and phaeophorbide a (8) ดังแสดงในรูปที่ 2

ตารางที่ 4.1 ^1H -NMR chemical shifts of the compounds 1-8

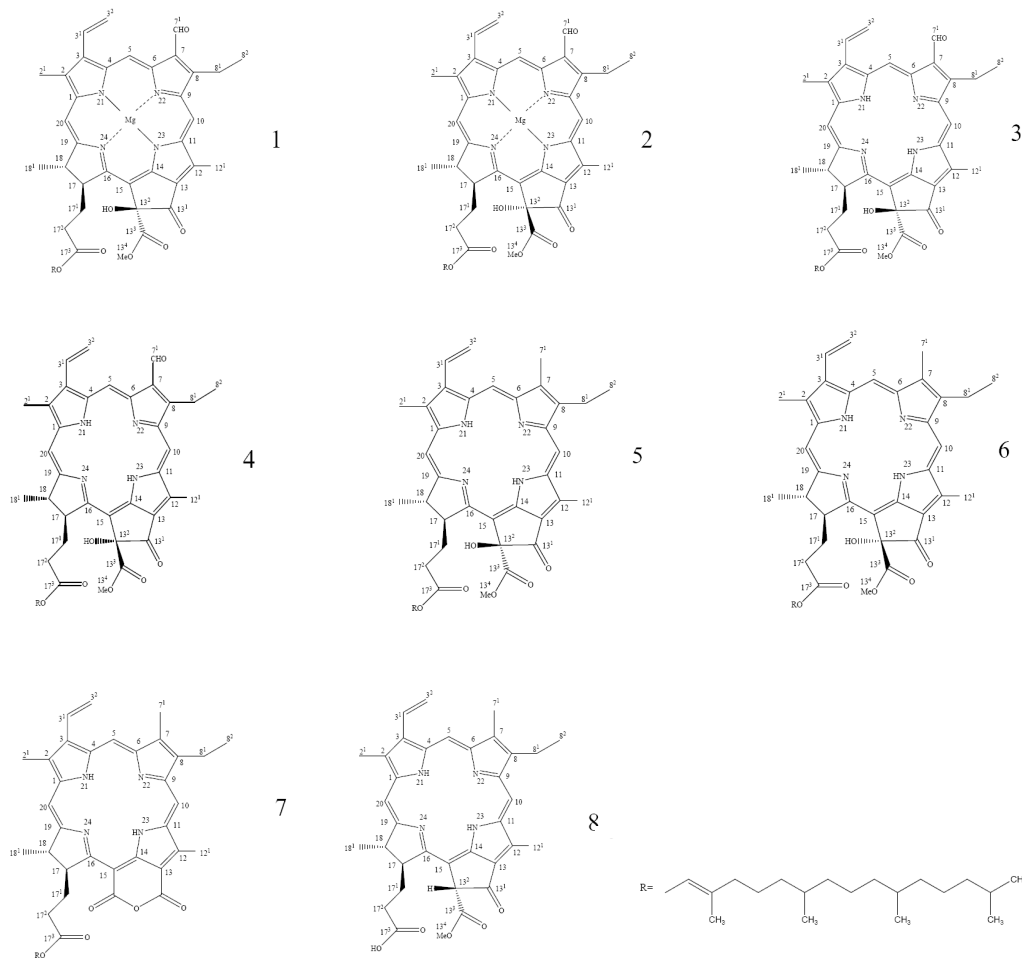
Proton	Chemical Shifts in ppm (Coupling Constant in Hz)								
	1		2	3	4	5	6	7	8
2^1	3.27	s	3.27	3.45	3.35	3.61	3.40	3.32	3.38
3^1	8.26	dd, $J = 11.65, 10.9$	8.26	8.18	8.19	7.85	8.10	8.10	8.22
3^2 (E)	6.49	dd, $J = 17.8, 2.5$	6.49	6.54	6.54	6.41	6.37	6.41	6.40
3^2 (Z)	6.06	dd, $J = 12.6, 2.5$	6.06	6.21	6.21	6.25	6.18	6.20	6.21
5	10.91	s	10.91	11.01	11.00	9.91	9.70	9.66	9.73

7 ¹	11.57	<i>s</i>				3.29	3.19	3.17	3.26
			11.57	11.48	11.50				
8 ¹	4.18	<i>q, J = 7.65</i>	4.18	4.19	4.22	3.76	3.66	3.71	3.75
8 ²	1.75	<i>t, J = 7.55</i>	1.75	1.81	1.83	1.73	1.68	1.69	1.71
10	10.06	<i>s</i>				9.76	9.88	9.89	9.90
			10.06	10.16	10.16				
12 ¹	3.68	<i>s</i>	3.68	3.72	3.70	3.87	3.73	3.84	3.69
13 ² -H		<i>s</i>							6.90
13 ² -OH	6.48	<i>s</i>	6.46	6.52	6.20	5.53	5.35		
13 ⁴ -OMe	3.74	<i>s</i>	3.74	3.85	3.85	3.69	3.71		3.93
17	5.14	<i>m</i>	5.54	5.23	5.41	5.24	5.77	5.46	4.59
18	4.49	<i>dq, J = 7.3</i>	4.50	4.67	4.60	4.41	4.60	4.67	4.66
18 ¹	1.56	<i>d, J = 6.95</i>	1.56	1.74	1.71	1.61	1.74	1.74	1.86
20	8.55	<i>s</i>	8.57	8.92	8.89	8.74	8.93	8.84	8.86
21-NH		<i>(br,s)</i>		-1.33	-1.32	-0.89	-1.48	0.11	-1.30
23-NH		<i>(br,s)</i>		0.66	0.68	0.78	0.67	0.38	0.89

ตารางที่ 4.2 ¹³C-NMR chemical shifts of the compounds 1-8

Carbon	1	2	3	4	5	6	7	8
1	148.7	148.6	144.0	150.0	142.6	142.6	144.8	142.7
2	149.5	149.5	133.5	135.5	132.8	132.8	133.0	133.0
2 ¹	12.8	12.8	12.4	12.1	12.4	12.5	12.3	12.5
3	140.9	140.8	137.5	135.5	136.8	136.7	137.9	137.8
3 ¹	130.9	130.9	129.5	124.3	129.9	129.8	129.3	129.9
3 ²	120.8	120.7	123.0	121.5	123.4	123.3	123.0	123.0
4	137.3	137.1	137.4	136.0	136.3	136.8	138.0	137.3
5	104.5	104.2	102.6	104.9	98.7	98.6	104.0	90.3
6	156.6	156.4	160.2	152.0	155.9	156.1	157.2	156.4
7	132.2	131.9	138.8	134.3	137.4	137.4	137.5	137.3
7 ¹	188.8	188.7	188.0	191.7	11.5	11.5	11.4	11.6
8	143.3	143.5	148.2	149.7	146.2	146.0	147.0	146.1
8 ¹	19.9	19.8	19.6	18.7	19.1	19.3	20.0	20.0
8 ²	19.9	19.6	19.6	18.7	18.0	18.0	20.0	20.0
9	156.4	156.2	151.8	150.2	152.0	151.9	151.4	152.0
10	110.5	109.9	108.2	114.6	105.2	105.1	108.9	105.5

11	139.4	139.3	138.1	135.9	137.9	138.6	132.5	138.8
12	131.4	131.0	138.8	135.7	129.7	129.9	140.8	129.7
12 ¹	12.8	12.9	12.5	12.3	12.5	12.4	12.7	12.3
13	149.0	149.1	128.8	135.8	128.3	128.1	112.7	130.1
13 ¹	195.4	195.3	194.9	196.5	194.6	194.7	160.1	190.3
13 ²	92.2	92.4	91.3	92.1	91.1	91.2	165.0	65.9
13 ³	175.0	174.4	174.0	172.8	174.2	173.5		170.8
13 ⁴	53.3	53.4	53.6	54.9	53.1	53.1		53.1
14	163.2	163.8	151.1	150.4	150.7	150.7	140.0	150.5
15	110.7	109.2	111.0	106.0	111.7	111.2	94.0	106.9
16	160.1	160.4	166.8	162.5	163.5	163.5	178.3	163.0
17	50.8	50.4	51.5	51.8	51.7	51.3	56.0	52.5
17 ¹	31.1	31.0	32.4	31.1	31.1	32.4	32.4	31.2
17 ²	31.6	31.0	32.7	31.6	32.3	32.7	33.6	32.9
17 ³	173.5	173.3	173.5	173.6	173.9	173.9	173.6	177.8
18	50.6	50.3	51.1	50.3	51.1	51.1	49.8	50.9
18 ¹	23.3	23.3	23.3	22.7	23.1	23.1	24.4	23.6
19	170.4	171.7	175.6	178.7	173.5	173.0	177.7	173.8
20	94.1	94.2	95.1	95.1	94.9	91.8	96.2	94.6



รูปที่ 4.1 โครงสร้างสารประกอบ 1-8

4.3 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

จากการศึกษาได้ค่า subtoxic concentration และ CC50 ดังแสดงในตารางที่ 4.3

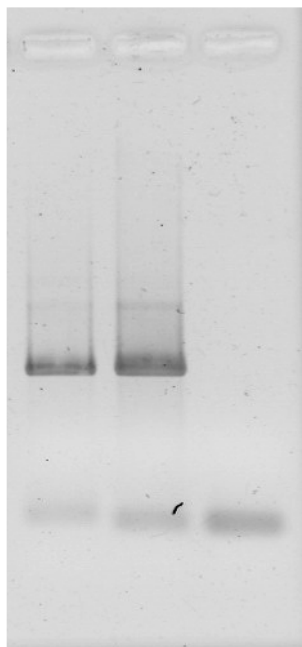
4.4 การสร้าง cloning vector ที่มี LCR ของ HPV16R

จากการคัดเลือก clones ที่มีสีขาว แล้วนำไปเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย เพื่อสกัด plasmid แล้วตรวจสอบ plasmid ที่สกัดได้ว่ามี LCR ของ HPV16R หรือไม่โดยการ PCR ด้วย primers คู่เดิม พบว่ามี PCR product ขนาด 926 bp ซึ่งตรงกับขนาดของ LCR ดังแสดงในรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.3 ค่า subtoxic concentration และ CC50 ของสารสกัดในเซลล์ C33A และ CaSki

สมุนไพร		C33A (μM)		CaSki (μM)	
		Subtoxic concentration	CC50	Subtoxic concentration	CC50
ฟ้าทะลายโจร	SS1	16	76	16	76
	SS2	16	80	16	80
	SS3	12	40	12	40
พญายอ	Componnd 1	46.61	369.65	46.61	369.65
	Componnd 2	60.7	202.71	60.7	202.71
	Componnd 3 (136C)	22.22	55.56	22.22	55.56
	Componnd 4	5.89	38.89	5.89	38.89
	Componnd 5	6.21	30	6.21	30
	Componnd 6	6.21	30	6.21	30
	Componnd 7 (136D)	23.75	59.38	23.75	59.38
	Componnd 8 (136B)	5.75	28.74	5.75	28.74

Lane 1 2 3



← 926 bp

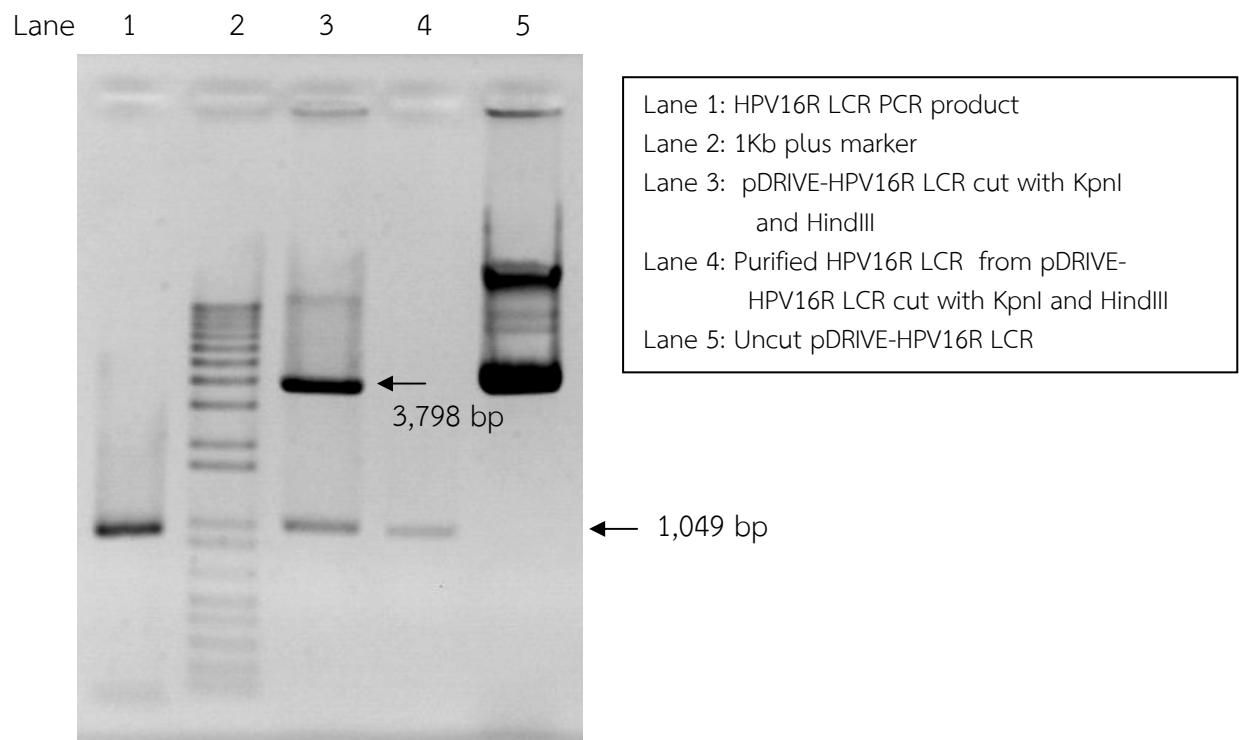
Lane1: pHPV16R (positive control)

Lane2: pDRIVE-HPV16R LCR

Lane3: Negative control

รูปที่ 4.2 1.5% agarose gel electrophoresis ของ PCR product ที่ได้จากการ amplify LCR จาก pDRIVE-HPV16R LCR ที่สร้างขึ้น

Plasmid clone ที่ให้ผล HPV16 LCR PCR positive เมื่อถูกตัดด้วย restriction endonuclease *KpnI* และ *Hind III* (NEB) จะได้ linear DNA ขนาด 1,049 bp (LCR) และ 3,798 bp (vector) เมื่อทำ 0.7% agarose gel electrophoresis ได้ผลดังรูปที่ 4.3 Lane 3

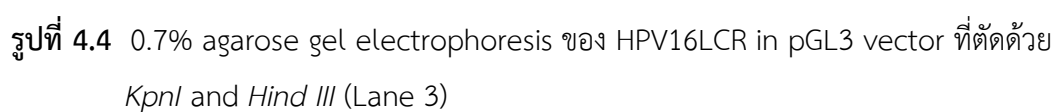


รูปที่ 4.3 0.7% agarose gel electrophoresis ของ pDRIVE-HPV16R LCR (Lane 5) และ pDRIVE-HPV16R LCR ที่ตัดด้วย *KpnI* and *HindIII* (Lane 3)

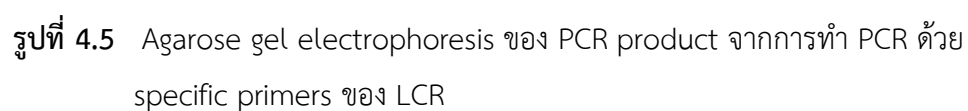
4.5 การสร้าง recombinant vector ที่มี LCR ของ HPV16R

การตรวจสอบ pGL3-HPV16 LCR ที่สร้างขึ้นด้วย restriction enzymes

ผลการสกัด recombinant plasmid จาก clone ได้ แล้วทำการตัดด้วย restriction enzyme *KpnI* and *Hind III* และตรวจสอบ recombinant plasmid โดยวิธีการ agarose gel electrophoresis แสดงในรูปที่ 4.4

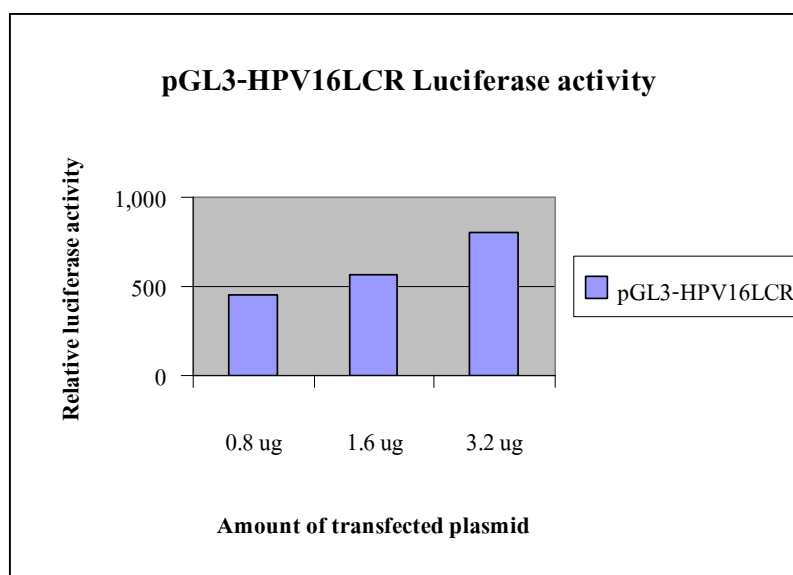


ผลการเพิ่มปริมาณ LCR โดยวิธี PCR ด้วย specific primers ต่อ LCR แล้วตรวจดูขนาดของ PCR product โดยวิธีการ agarose gel electrophoresis แสดงในรูปที่ 4.5



4.6 การศึกษา transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR

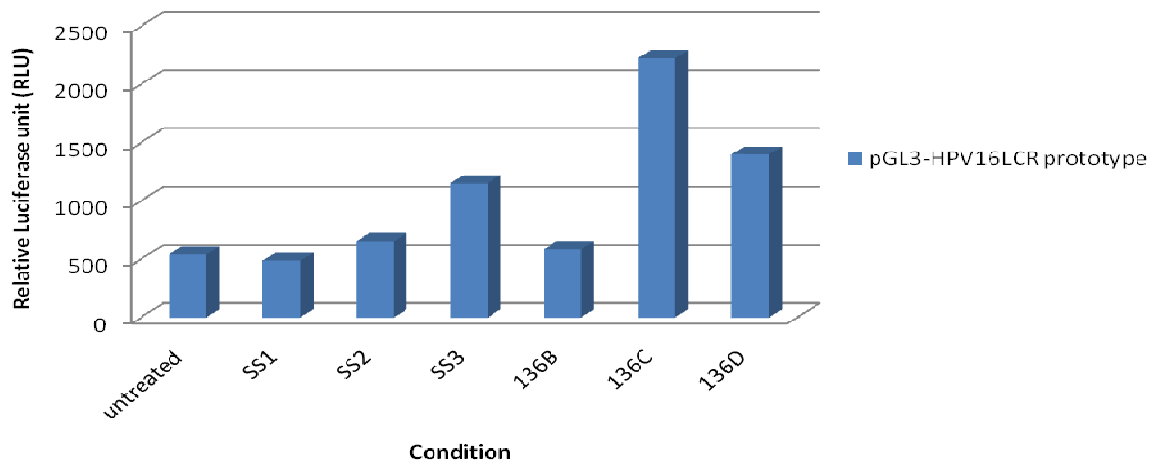
ผลจากการนำ pGL3-HPV16 LCR vector จำนวน 0.8 ug, 1.6 ug และ 3.2 ug มา transfect เข้าสู่ C33A cell line แล้ววัด transcriptional activity ของ HPV16 LCR เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูก transfect พบว่า transcriptional activity เพิ่มขึ้นตามปริมาณของ plasmid ที่ใช้ในการ transfect ดังแสดงในรูปที่ 4.6



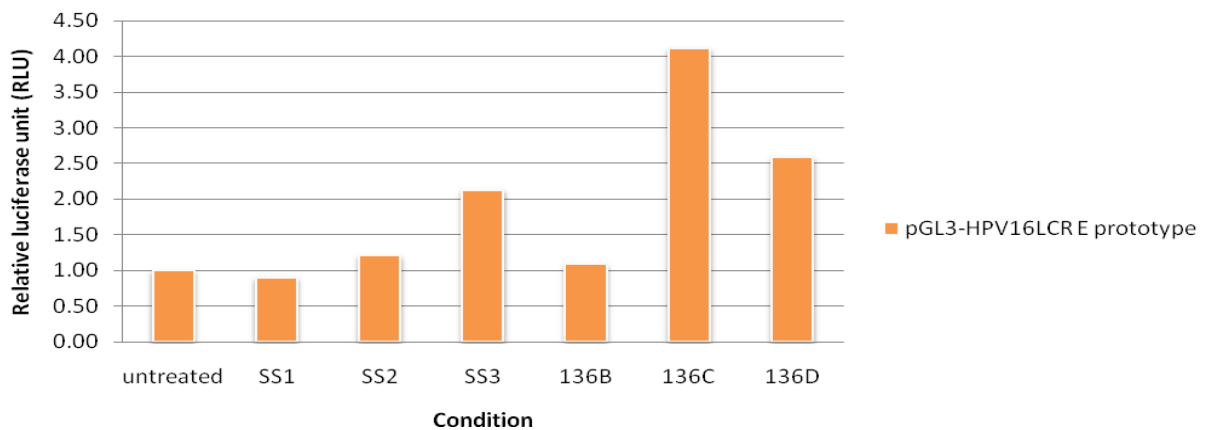
รูปที่ 4.6 Transcriptional activity ของ HPV16 LCR เมื่อใช้ปริมาณ plasmid ที่ต่างกัน

4.7 การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรจากฟ้าทะลายโจรและพญายอ ต่อ transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR

เมื่อนำ pGL3-HPV16 LCR transfect เข้า C33A cells แล้วเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่เติมสารสกัดสกัดสมุนไพรจากฟ้าทะลายโจรและพญายอ ผลของสารสกัด ต่อ transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR แสดงในรูปที่ 4.7 และ 4.8



รูปที่ 4.7 ผลของสารสกัดสมุนไพรจากฟ้าทะลายโจรและพญายอ ต่อ transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ treat สารสกัด



รูปที่ 4.8 ผลของสารสกัดสมุนไพรจากฟ้าทะลายโจรและพญายอ ต่อ transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR เป็นจำนวนเท่าของเซลล์ที่ไม่ได้ treat สารสกัด

จากรูปแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรชนิด SS1 มีผลยับยั้ง transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR แต่ SS2 และสารสกัดจากพญายอชนิด 136B ไม่มีผลต่อ transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR ในขณะที่สารสกัดจากฟ้าทะลายโจรชนิด SS3 และสารสกัดจากพญายอชนิด 136C และ 136D มีผลต่อ transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR คือสามารถกระตุ้น transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR ได้

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดสมุนไพรจากฟ้าทะลายโจรและพญายอ ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง transcriptional activity ของ viral promoter ของ HPV 16 E6 gene

4.8 การศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพร ต่อการแสดงออกของ HPV 16 E6 ใน cell line ที่มีการติดเชื้อ HPV

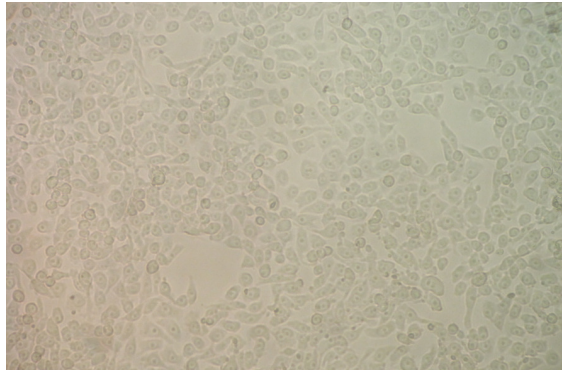
ผลการทดลองเลี้ยง SiHa cell line และ CaSki cell line ในอาหารที่มีสารสกัดจากสมุนไพร แสดง passage number ของ cell line ในตารางที่ 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ และแสดง morphology ของเซลล์ในรูปที่ 4.9 – 4.12

ตารางที่ 4.4 Passage number ของ SiHa cell line ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากสมุนไพร

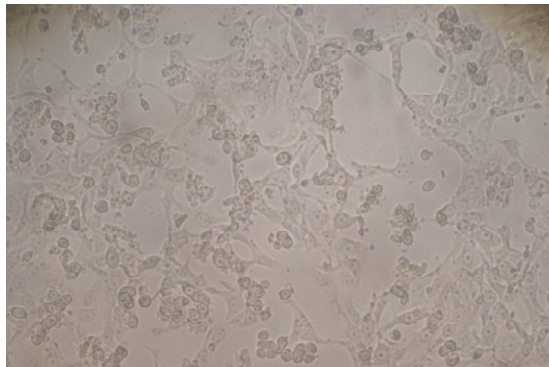
Compounds	Passage	Description
Control	P1-P11	P-11 เซลล์ยังไม่ตาย
SS1	P1-P3	P-3 เซลล์ลอย คล้ำ ไม่เกาะ flask
SS2	P1-P12	P-12 เซลล์ยังไม่ตาย
SS3	P1-P8	P-11 เซลล์ตาย
136B	P1-P8	P-11 เซลล์ตาย
136C	P1-P11	P-11 เซลล์ยังไม่ตาย
136D	P1-P7	P-11 เซลล์ตาย

ตารางที่ 4.5 Passage number ของ CaSki cell line ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากสมุนไพร

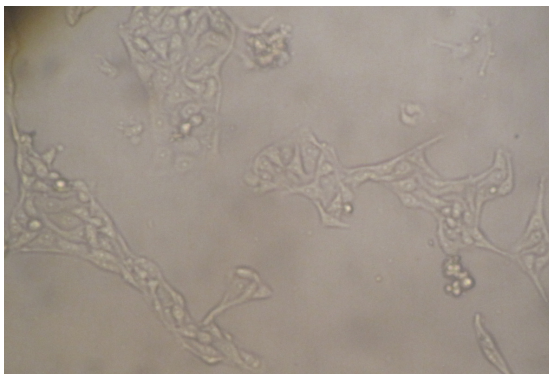
Compounds	Passage	Description
Control	P1-P14	P-14 เซลล์ยังไม่ตาย
SS1	P1-P2	P-2 เซลล์ลอย คล้ำ ไม่เกาะ flask
SS2	P1-P11	P-11 เซลล์ตาย
SS3	P1-P6	P-4 เซลล์เริ่มเกาะกลุ่มอยู่กลาง well
136B	P1-P13	P-13 เซลล์ยังไม่ตาย
136C	P1-P14	P-14 เซลล์ยังไม่ตาย
136D	P1-P8	P-4 มีเซลล์เกาะและลอยจำนวนมาก



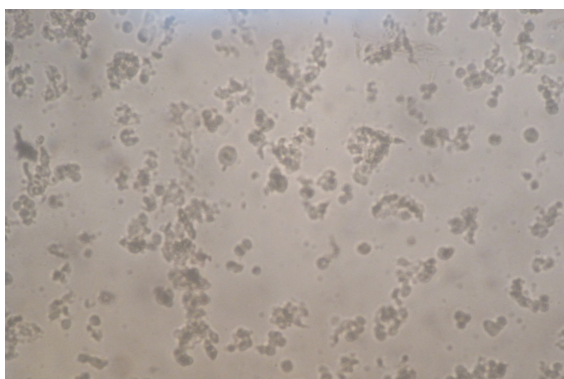
รูปที่ 4.9 Cell control: CaSki ใน media ที่ P14



รูปที่ 4.10 CaSki ในสารสกัด 136B ที่ P13

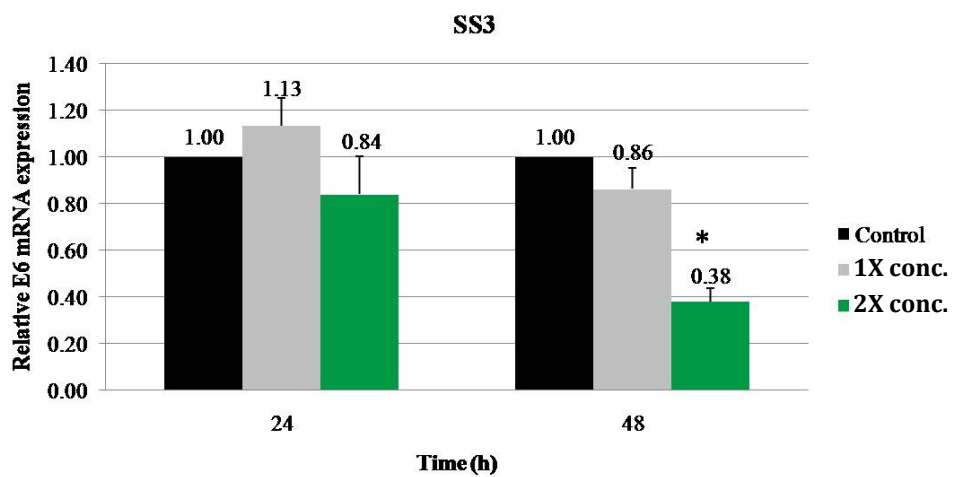
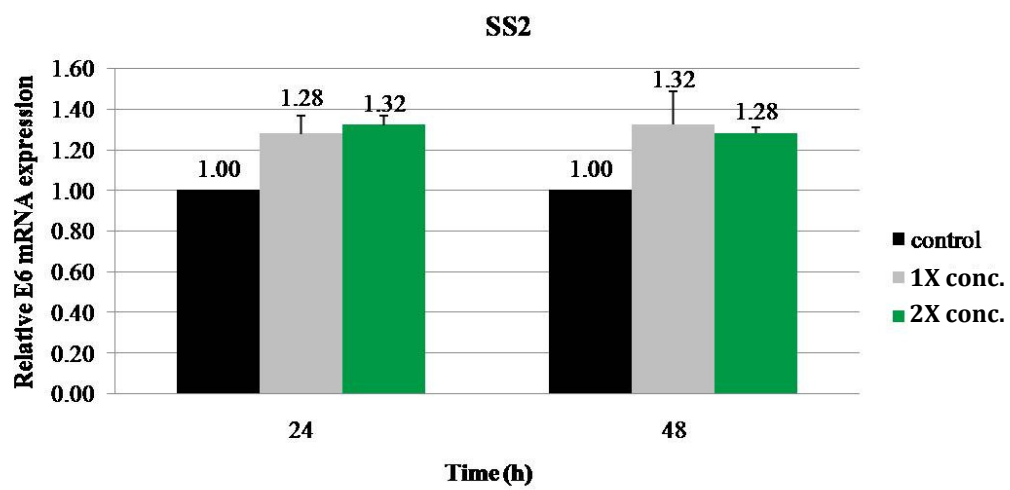
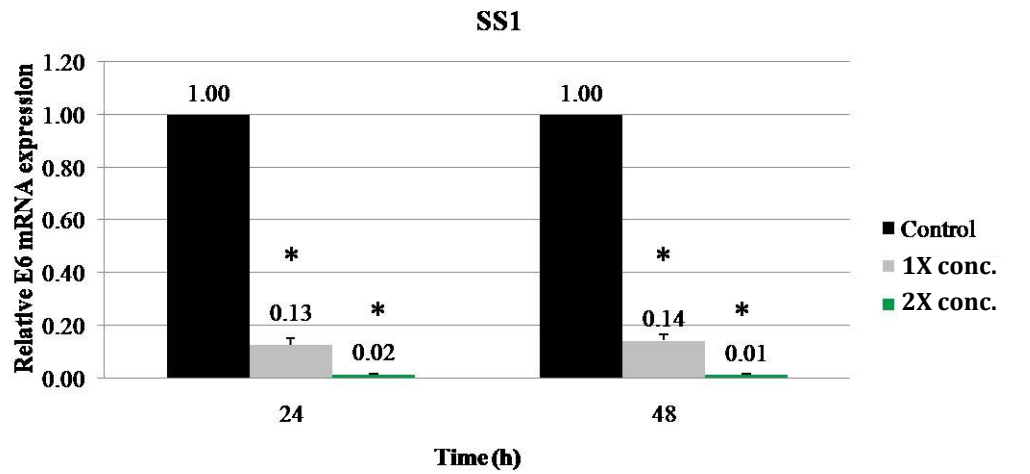


รูปที่ 4.11 CaSki ในสารสกัด 136C ที่ P14



รูปที่ 4.12 CaSki ที่ตาย

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาร SS1 มีผลต่อการตายของเซลล์มากที่สุดจึงนำ SS1 มาศึกษาต่อใน SiHa cell line โดยเปรียบเทียบกับ SS2 และ SS3 วิธีการศึกษาคือเลี้ยง SiHa cell ในสถานะที่มีและไม่มีสารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้นในระดับ subcytotoxic concentration (1X) และ 2 เท่าของ subcytotoxic concentration (2X) ใน 24-well tissue culture plate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะสกัด total RNA แล้ว convert ไปเป็น cDNA โดยใช้ SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit แล้วตรวจหาการแสดงออกของ E6 โดยตรวจหาปริมาณ mRNA ของ E6 โดยวิธี SYBR Green Real-time PCR ซึ่งได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 ผลของสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรต่อการแสดงออกของ HPV16 E6 oncogene ใน SiHa cells ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีสารสกัด

ผลการทดลองในรูปแบบที่ 4.13 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร SS1 ที่ระดับ subcytotoxic concentration สามารถยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 ใน SiHa cell ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการแสดงออกจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด แต่ไม่เพิ่มขึ้นตามเวลา ในขณะที่ สารสกัด SS2 ไม่มีผลยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 ใน SiHa cell ส่วนสารสกัด SS3 จะมีผลยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 ใน SiHa cell เมื่อเพิ่มความเข้มข้น และเวลา

5. อภิปรายผล/วิจารณ์ (Discussion/Comment)

พลาสมิดเวกเตอร์ pGL3-HPV16 LCR ที่สร้างขึ้นจากการศึกษานี้ สามารถใช้ทดสอบ transcription activity ของ HPV16 LCR ใน C33A cell line ได้โดยการวัดปริมาณ luciferase activity และปริมาณ transcription activity จะขึ้นอยู่กับปริมาณพลาสมิดเวกเตอร์ pGL3-HPV16 LCR ที่ถูก transfect เข้าไปใน C33A cell line การเพิ่มปริมาณพลาสมิดเวกเตอร์ pGL3-HPV16 LCR สามารถทำได้ง่าย และให้ผลการทดลองคงที่ สามารถนำไปศึกษาฤทธิ์ของสารอื่น ๆ ต่อไปได้

การเตรียมสารสกัดสมุนไพรจากฟ้าทะลายโจรและพญายอได้สารบริสุทธิ์หลายชนิด แต่ได้คัดเลือกเฉพาะสารที่เตรียมได้ปริมาณมาก มีความเสถียร และทำการทดสอบเบื้องต้นแล้วว่าน่าจะมีฤทธิ์ที่ต้องการ โดยได้คัดเลือกสารบริสุทธิ์สำหรับการวิจัยนี้ จากฟ้าทะลายโจร 3 ชนิดคือ Andrographolide (SS1), 14-deoxy-11,12-didehydro-andrographolide (SS2) และ 3, 19-isopropylidene andrographolide (SS3) ซึ่งเคยมีรายงานว่ามีความสัมพันธ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านเกล็ดเลือด ต้านไวรัส ต้านมะเร็ง กระตุ้นภูมิคุ้มกัน 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) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม chlorophyll a และ chlorophyll b

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด ต่อ transcriptional activity ของ HPV16 E6 gene โดย transfect pGL3-HPV16LCR เข้าเซลล์ C33A แล้วเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีและไม่มีสารสกัด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจวัด transcriptional activity พบว่าสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรชนิด SS1 มีผลยับยั้ง transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR แต่ SS2 และสารสกัดจากพญายอชนิด 136B ไม่มีผลต่อ transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR ในขณะที่สารสกัดจากฟ้าทะลายโจรชนิด SS3 และสารสกัดจากพญายอชนิด 136C และ 136D สามารถกระตุ้น transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR ได้

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า host cell transcription factors, such as activator protein-1 (AP-1) สามารถจับที่ HPV LCR และควบคุมการแสดงออกของจีน (78) ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของสาร SS1 อาจเกิดผ่านการทำปฏิกิริยากับ transcription factor, AP-1 ของเซลล์ เช่นเดียวกับสารที่เคยมีการศึกษามาก่อนคือ Berberine ซึ่งสามารถยับยั้ง HPV transcription โดยการ modulate AP-1 activity ใน SiHa และ HeLa cells (79)

ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับ การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและพญายอต่อการแสดงออกของ HPV16 E6 oncogene โดยการเลี้ยง และ subculture SiHa cell line และ CaSki cell line ในอาหารที่มีสารสกัด พบว่าสาร SS1 มีผลต่อการตายของเซลล์มากที่สุดจึงนำ SS1 มาศึกษาต่อใน SiHa cell line โดยเปรียบเทียบกับ SS2 และ SS3 โดยเลี้ยง SiHa cell ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้นในระดับ subcytotoxic concentration และ 2 เท่าของ subcytotoxic concentration เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วตรวจหาการแสดงออกของ E6 โดยตรวจหาปริมาณ

mRNA ของ E6 โดยวิธี SYBR Green Real-time PCR พบว่าสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร SS1 ที่ระดับ subcytotoxic concentration สามารถยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 ใน SiHa cell ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการแสดงออกจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด แต่ไม่เพิ่มขึ้นตามเวลา ในขณะที่ สารสกัด SS2 ไม่มีผลยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 ใน SiHa cell ส่วนสารสกัด SS3 จะมีผลยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 ใน SiHa cell เมื่อเพิ่มความเข้มข้น และเวลา

6. สรุปผลการวิจัย/ข้อเสนอแนะ (Conclusion/Suggestion)

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารบริสุทธิ์จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร 2 ชนิดคือ 14-deoxy-11,12-didehydro-andrographolide (SS2) และ 3, 19- isopropylidene andrographolide (SS3) และสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรพญาอ 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) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง transcriptional activity ของ viral promoter ของ HPV 16 E6 gene แต่ Andrographolide (SS1) มีฤทธิ์ยับยั้ง transcriptional activity ของ viral promoter ของ HPV 16 E6 gene ซึ่งจะส่งผลให้ยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 gene

นอกจากนี้เมื่อศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและพญาอต่อการแสดงออกของ HPV16 E6 oncogene ก็ได้ผลทำนองเดียวกันคือพบว่า Andrographolide (SS1) ที่ระดับ subcytotoxic concentration สามารถยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 ใน SiHa cell ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ 3, 19- isopropylidene andrographolide (SS3) สามารถยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 ใน SiHa cell ได้เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงกว่า subcytotoxic concentration หรือใช้เวลานานขึ้นที่ระดับ subcytotoxic concentration

ดังนั้น Andrographolide (SS1) น่าจะเป็นสารบริสุทธิ์ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นยาด้าน HPV หรือต้านมะเร็งที่เกิดจากการติดเชื้อได้ และควรจะทำการศึกษาต่อไปว่าการยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 ในเซลล์นั้นส่งผลต่อการเกิด apoptosis ของเซลล์หรือไม่

บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol.* 1987 Apr;61(4):962-71.
2. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci.* 2004 Jan;50(1-2):9-19.
3. Dong XP, Stubenrauch F, Beyer-Finkler E, Pfister H. Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int J Cancer.* 1994 Sep 15;58(6):803-8.
4. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003 Feb 6;348(6):518-27.
5. Piscopo M, Campisi G, Colella G, Bilancione M, Caccamo S, Di Liberto C, et al. H3 and H3.3 histone mRNA amounts and ratio in oral squamous cell carcinoma and leukoplakia. *Oral Dis.* 2006 Mar;12(2):130-6.
6. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem.* 1999 Feb 26;274(9):5810-22.
7. Li M, Beard P, Estes PA, Lyon MK, Garcea RL. Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virol.* 1998 Mar;72(3):2160-7.
8. Human papillomavirus: often harmless but in some cases carcinogenic. *Prescrire Int.* 2007 Jun;16(89):115-9.
9. Agarwal C, Rorke EA, Irwin JC, Eckert RL. Immortalization by human papillomavirus type 16 alters retinoid regulation of human ectocervical epithelial cell differentiation. *Cancer Res.* 1991 Aug 1;51(15):3982-9.
10. Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 2002 Nov;89(2):213-28.
11. Hebner CM, Wilson R, Rader J, Bidder M, Laimins LA. Human papillomaviruses target the double-stranded RNA protein kinase pathway. *J Gen Virol.* 2006 Nov;87(Pt 11):3183-93.

12. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, et al. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Jun 4;89(11):796-802.
13. Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, Durst M, et al. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol.* 1992 Apr;66(4):2057-66.
14. Calleja-Macias IE, Kalantari M, Huh J, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, Gonzalez-Guerrero JF, et al. Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology.* 2004 Feb 20;319(2):315-23.
15. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Munoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine.* 2006 Aug 21;24 Suppl 3:S26-34.
16. Denny L, Kuhn L, De Souza M, Pollack AE, Dupree W, Wright TC, Jr. Screen-and-treat approaches for cervical cancer prevention in low-resource settings: a randomized controlled trial. *Jama.* 2005 Nov 2;294(17):2173-81.
17. Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: A summary of meta-analyses. *Vaccine.* 2006 Aug 21;24 Suppl 3:S78-89.
18. Stanley MA. Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clin Exp Dermatol.* 2002 Oct;27(7):571-7.
19. Tying S, Conant M, Marini M, Van Der Meijden W, Washenik K. Imiquimod; an international update on therapeutic uses in dermatology. *Int J Dermatol.* 2002 Nov;41(11):810-6.
20. Tying S. Immune response modification: imiquimod. *Australas J Dermatol.* 1998 Nov;39 Suppl 1:S11-3.
21. Tomai MA, Gibson SJ, Imbertson LM, Miller RL, Myhre PE, Reiter MJ, et al. Immunomodulating and antiviral activities of the imidazoquinoline S-28463. *Antiviral Res.* 1995 Nov;28(3):253-64.
22. Singh S, Bhat MK. Carboplatin induces apoptotic cell death through downregulation of constitutively active nuclear factor-kappaB in human HPV-18 E6-positive HEp-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 May 28;318(2):346-53.

23. Prusty BK, Das BC. Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. *Int J Cancer*. 2005 Mar 1;113(6):951-60.
24. Divya CS, Pillai MR. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. *Mol Carcinog*. 2006 May;45(5):320-32.
25. Howley PM. Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res*. 1991 Sep 15;51(18 Suppl):5019s-22s.
26. Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci*. 2007 Oct;98(10):1505-11.
27. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, et al. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*. 1990 Dec 1;50(23):7717-22.
28. Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol*. 1991 Jan;65(1):473-8.
29. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *Embo J*. 1989 Dec 1;8(12):3905-10.
30. Munger K, Phelps WC, Bubbs V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*. 1989 Oct;63(10):4417-21.
31. Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, Hubbert NL, Haas JA, Lowy DR, et al. The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol*. 1991 Sep;65(9):4860-6.
32. Shirasawa H, Jin MH, Shimizu K, Akutsu N, Shino Y, Simizu B. Transcription-modulatory activity of full-length E6 and E6*I proteins of human papillomavirus type 16. *Virology*. 1994 Aug 15;203(1):36-42.
33. Crook T, Wrede D, Tidy J, Scholefield J, Crawford L, Vousden KH. Status of c-myc, p53 and retinoblastoma genes in human papillomavirus positive and negative squamous cell carcinomas of the anus. *Oncogene*. 1991 Jul;6(7):1251-7.

34. Desaintes C, Hallez S, Van Alphen P, Burny A. Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 1992 Jan;66(1):325-33.
35. Akutsu N, Shirasawa H, Asano T, Isono K, Simizu B. p53-Dependent and -independent transactivation by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol.* 1996 Mar;77 (Pt 3):459-63.
36. Morosov A, Phelps WC, Raychaudhuri P. Activation of the c-fos gene by the HPV16 oncoproteins depends upon the cAMP-response element at -60. *J Biol Chem.* 1994 Jul 15;269(28):18434-40.
37. Dey A, Atcha IA, Bagchi S. HPV16 E6 oncoprotein stimulates the transforming growth factor-beta 1 promoter in fibroblasts through a specific GC-rich sequence. *Virology.* 1997 Feb 17;228(2):190-9.
38. Kinoshita T, Shirasawa H, Shino Y, Moriya H, Desbarats L, Eilers M, et al. Transactivation of prothymosin alpha and c-myc promoters by human papillomavirus type 16 E6 protein. *Virology.* 1997 May 26;232(1):53-61.
39. Shino Y, Shirasawa H, Kinoshita T, Simizu B. Human papillomavirus type 16 E6 protein transcriptionally modulates fibronectin gene expression by induction of protein complexes binding to the cyclic AMP response element. *J Virol.* 1997 Jun;71(6):4310-8.
40. Etscheid BG, Foster SA, Galloway DA. The E6 protein of human papillomavirus type 16 functions as a transcriptional repressor in a mechanism independent of the tumor suppressor protein, p53. *Virology.* 1994 Dec;205(2):583-5.
41. Craigo J, Callahan M, Huang RC, DeLucia AL. Inhibition of human papillomavirus type 16 gene expression by nordihydroguaiaretic acid plant lignan derivatives. *Antiviral Res.* 2000 Jul;47(1):19-28.
42. Kang YH, Kang MJ, Paik SG, Park SN, Yoon DY. Repression of HPV E6-activated RSV promoter activity by anti-cancer agents. *Antiviral Res.* 2003 Mar;58(1):65-71.
43. Faluhelyi Z, Rodler I, Csejtei A, Tying SK, Ember IA, Arany I. All-trans retinoic acid (ATRA) suppresses transcription of human papillomavirus type 16 (HPV16) in a dose-dependent manner. *Anticancer Res.* 2004 Mar-Apr;24(2B):807-9.
44. Karl T, Seibert N, Stohr M, Osswald H, Rosl F, Finzer P. Sulindac induces specific degradation of the HPV oncoprotein E7 and causes growth arrest and apoptosis in cervical carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2007 Jan 8;245(1-2):103-11.

45. Allen KL, Tschantz DR, Awad KS, Lynch WP, DeLucia AL. A plant lignan, 3'-O-methyl-nordihydroguaiaretic acid, suppresses papillomavirus E6 protein function, stabilizes p53 protein, and induces apoptosis in cervical tumor cells. *Mol Carcinog*. 2007 Jul;46(7):564-75.
46. Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Cai WJ, Yi Z. Nitric oxide and calcium ions in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenite. *World J Gastroenterol*. 2002 Feb;8(1):40-3.
47. Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Cai WJ, Zeng Y. Mitochondria, calcium and nitric oxide in the apoptotic pathway of esophageal carcinoma cells induced by As₂O₃. *Int J Mol Med*. 2002 Apr;9(4):385-90.
48. Chang K, Ding I, Kern FG, Willingham MC. Immunohistochemical analysis of p53 and HER-2/neu proteins in human tumors. *J Histochem Cytochem*. 1991 Sep;39(9):1281-7.
49. Calabrese C, Berman SH, Babish JG, Ma X, Shinto L, Dorr M, et al. A phase I trial of andrographolide in HIV positive patients and normal volunteers. *Phytother Res*. 2000 Aug;14(5):333-8.
50. Wiart C, Kumar K, Yusof MY, Hamimah H, Fauzi ZM, Sulaiman M. Antiviral properties of ent-labdene diterpenes of *Andrographis paniculata* nees, inhibitors of herpes simplex virus type 1. *Phytother Res*. 2005 Dec;19(12):1069-70.
51. Zhao HY, Fang WY. Antithrombotic effects of *Andrographis paniculata* nees in preventing myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)*. 1991 Sep;104(9):770-5.
52. Puri A, Rizvi SY, Haq W, Guru PY, Kundu B, Saxena RP, et al. Immunostimulant activity of a novel lipopeptide and its protective action against *Leishmania donovani*. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1993 Nov;15(5):539-56.
53. Puri A, Saxena R, Saxena RP, Saxena KC, Srivastava V, Tandon JS. Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *J Nat Prod*. 1993 Jul;56(7):995-9.
54. See D, Mason S, Roshan R. Increased tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and natural killer cell (NK) function using an integrative approach in late stage cancers. *Immunol Invest*. 2002 May;31(2):137-53.
55. Zhang XF, Tan BK. Antihyperglycaemic and anti-oxidant properties of *Andrographis paniculata* in normal and diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000 May-Jun;27(5-6):358-63.

56. Zhang CY, Tan BK. Hypotensive activity of aqueous extract of *Andrographis paniculata* in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996 Aug;23(8):675-8.
57. Matsuda T, Kuroyanagi M, Sugiyama S, Umehara K, Ueno A, Nishi K. Cell differentiation-inducing diterpenes from *Andrographis paniculata* Nees. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1994 Jun;42(6):1216-25.
58. Kumar RA, Sridevi K, Kumar NV, Nanduri S, Rajagopal S. Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*. *J Ethnopharmacol*. 2004 Jun;92(2-3):291-5.
59. Jada SR, Subur GS, Matthews C, Hamzah AS, Lajis NH, Saad MS, et al. Semisynthesis and in vitro anticancer activities of andrographolide analogues. *Phytochemistry*. 2007 Mar;68(6):904-12.
60. Rajagopal S, Kumar RA, Deevi DS, Satyanarayana C, Rajagopalan R. Andrographolide, a potential cancer therapeutic agent isolated from *Andrographis paniculata*. *J Exp Ther Oncol*. 2003 May-Jun;3(3):147-58.
61. Cheung HY, Cheung SH, Li J, Cheung CS, Lai WP, Fong WF, et al. Andrographolide isolated from *Andrographis paniculata* induces cell cycle arrest and mitochondrial-mediated apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *Planta Med*. 2005 Dec;71(12):1106-11.
62. Zhou J, Zhang S, Ong CN, Shen HM. Critical role of pro-apoptotic Bcl-2 family members in andrographolide-induced apoptosis in human cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2006 Jul 14;72(2):132-44.
63. Sheeja K, Guruvayoorappan C, Kuttan G. Antiangiogenic activity of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Int Immunopharmacol*. 2007 Feb;7(2):211-21.
64. Verma N, Vinayak M. Antioxidant action of *Andrographis paniculata* on lymphoma. *Mol Biol Rep*. 2007 Sep 5.
65. Batkhuu J, Hattori K, Takano F, Fushiya S, Oshiman K, Fujimiya Y. Suppression of NO production in activated macrophages in vitro and ex vivo by neoandrographolide isolated from *Andrographis paniculata*. *Biol Pharm Bull*. 2002 Sep;25(9):1169-74.
66. Sangkitporn S, Chaiwat S, Balachandra K, Na-Ayudhaya TD, Bunjob M, Jayavasut C. Treatment of herpes zoster with *Clinacanthus nutans* (bi phaya yaw) extract. *J Med Assoc Thai*. 1995 Nov;78(11):624-7.

67. Jayavas C, Balachandra K, Sangkitjaporn S, Maharungraungrat A, Thavatsupa P, Bunjob M, et al. Clinical trial in the treatment of genital herpes pateints. Communicable Disease Journal (Thailand). 1992b;18(3):152-61.
68. Jayavas C, Dechatiwongse T, Balachandra K, Chavalittumrong P, Jongtrakulsiri S. The virucidal activity of *Clinacanthus nutans* Lindau extracts against herpes simplex virus type 2: an in vitro study,. Bulletin of the Department of Medical Science (Thailand). 1992a;34(4):153-8.
69. Yoosook C, Panpisutchai Y, Chaichana S, Santisuk T, Reutrakul V. Evaluation of anti-HSV-2 activities of *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans*. J Ethnopharmacol. 1999 Nov 1;67(2):179-87.
70. Janwitayanuchit W, Suwanborirux K, Patarapanich C, Pummangura S, Lipipun V, Vilaivan T. Synthesis and anti-herpes simplex viral activity of monoglycosyl diglycerides. Phytochemistry. 2003 Dec;64(7):1253-64.
71. Norton PA, Coffin JM. Bacterial beta-galactosidase as a marker of Rous sarcoma virus gene expression and replication. Mol Cell Biol. 1985 Feb;5(2):281-90.
72. Yim EK, Lee MJ, Lee KH, Um SJ, Park JS. Antiproliferative and antiviral mechanisms of ursolic acid and dexamethasone in cervical carcinoma cell lines. Int J Gynecol Cancer. 2006 Nov-Dec;16(6):2023-31.
73. Villanueva R, Morales-Peza N, Castelan-Sanchez I, Garcia-Villa E, Tapia R, Cid-Arregui A, et al. Heparin (GAG-hed) inhibits LCR activity of human papillomavirus type 18 by decreasing AP1 binding. BMC Cancer. 2006;6:218.
74. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54.
75. Busch SJ, Sassone-Corsi P. Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. Trends Genet. 1990 Feb;6(2):36-40.
76. Busch SJ, Sassone-Corsi P. Fos, Jun and CREB basic-domain peptides have intrinsic DNA-binding activity enhanced by a novel stabilizing factor. Oncogene. 1990 Oct;5(10):1549-56.
77. Bradbury D, Clarke D, Seedhouse C, Corbett L, Stocks J, Knox A. Vascular endothelial growth factor induction by prostaglandin E2 in human airway smooth muscle cells is mediated by E prostanoid EP2/EP4 receptors and SP-1 transcription factor binding sites. J Biol Chem. 2005 Aug 26;280(34):29993-30000.

78. Chong T, Chan WK, Bernard HU. Transcriptional activation of human papillomavirus 16 by nuclear factor I, AP1, steroid receptors and a possibly novel transcription factor, PVF: a model for the composition of genital papillomavirus enhancers. *Nucleic Acids Res* 1990 Feb 11; 18(3): 465-70.
79. Mahata S, Bharti AC, Shukla S, Tyagi A, Husain SA, Das BC. Berberine modulates AP-1 activity to suppress HPV transcription and downstream signaling to induce growth arrest and apoptosis in cervical cancer cells. *Mol Cancer* 2011; 10: 39.