

1. บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) เป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับสองของผู้หญิงทั่วโลก มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ human papillomavirus (HPV) ทางเพศสัมพันธ์ ส่วนใหญ่มักจะพบผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกในประเทศที่กำลังพัฒนา ซึ่งพบว่ามะเร็งปากมดลูกเป็นสาเหตุที่สำคัญของการเสียชีวิตของผู้หญิงอีกด้วย ในประเทศไทยพบว่ามะเร็งปากมดลูกพบได้เป็นอันดับสองของมะเร็งทุกชนิดในผู้หญิง ผลการตรวจชิ้นเนื้อปากมดลูกที่มีความผิดปกติพบว่ามี การติดเชื้อ HPV จีโนไทป์ 16 (HPV16) บ่อยที่สุด ซึ่ง HPV16 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม high risk (HR) HPV โดยตรวจพบ HPV16 ในชิ้นเนื้อปากมดลูกที่ผิดปกติในระดับ CIN I, CIN II-III และ CA ร้อยละ 8, 12 และ 63 ตามลำดับ

การติดเชื้อ HPV ทั้งกลุ่ม HR-HPV และ low risk (LR) HPV จะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปากมดลูก และอาจเกิดการติดเชื้อแบบยืดเยื้อ (persistent infection) แต่การติดเชื้อในกลุ่ม HR-HPV แบบยืดเยื้อจะทำให้เซลล์บริเวณนั้นพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ นอกจากการติดเชื้อ HR-HPV แล้ว การเกิดมะเร็งปากมดลูกยังขึ้นกับปัจจัยอื่นด้วย ได้แก่ ปัจจัยด้านผู้ติดเชื้อ HPV เช่น อายุ และภาวะภูมิคุ้มกัน และปัจจัยด้านตัวเชื้อ HPV เอง พบว่าเชื้อในกลุ่ม HR-HPV มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูกเนื่องจากการแสดงออกของ oncoprotein ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์

ปัจจุบันมียาที่ใช้รักษาการติดเชื้อ HPV น้อยมาก เนื่องจากไม่สามารถเพาะเลี้ยงไวรัสในห้องปฏิบัติการได้ จึงมีข้อจำกัดในการศึกษาพัฒนาการรักษาโรค ปัจจุบันยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อ HPV คือ imiquimod ซึ่งยาดังกล่าวค่อนข้างมีราคาแพง ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงให้ความสนใจในการค้นคว้าหาสารสกัดจากสมุนไพรไทย เพื่อนำมาพัฒนาตัวยาใหม่ที่จะสามารถรักษาและ/หรือป้องกันการติดเชื้อ HPV รวมทั้งเพื่อเป็นพัฒนางานทางด้านพืชสมุนไพร หรือสารในกลุ่ม natural product ต่างๆ

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

วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

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

วัตถุประสงค์โครงการวิจัยปีที่ 2

เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการติดเชื้อ HPV16 pseudovirus ของสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร และพญายอดังนี้

1. ฤทธิ์ด้านการยับยั้ง binding ของ pseudovirus
2. ฤทธิ์การยับยั้ง internalization ของ HPV16 pseudovirus
3. ฤทธิ์ neutralization of HPV16 pseudovirus

2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review literature)

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

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

ตามแนวทาง (guideline) ของการรักษาในผู้ที่มีการติดเชื้อ HPV หรือไม่พบ HPV แต่มี cervical lesion LSIL/CINI จะต้องได้รับการตรวจ cytology ซ้ำทุก 6 เดือนสองครั้งติดกัน ถ้าไม่พบการติดเชื้อ HR-

HPV ก็สามารถติดตามการตรวจคัดกรองในภาวะปกติได้เนื่องจากในระยะนี้ ร้อยละ 70 ของการติดเชื้อจะ regress ไปได้ [4] หรือในประเทศกำลังพัฒนาการนำวิธี cryosurgery มาใช้ก็อาจจะสามารถลดความกังวลของผู้ป่วยได้แต่จากการศึกษาโดยกลุ่มวิจัยนี้ไม่พบความแตกต่างระหว่างให้การรักษา โดย cryosurgery และในกลุ่มเฝ้าติดตาม โดยพบอัตรา HPV clearance และ HPV persistent ไม่ต่างกัน [5] จึงเห็นว่าการตรวจภาวะการติดเชื้อ HPV ด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งจะมีความสำคัญในการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกในปัจจุบัน

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

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

(2) Carrageenan เป็นสารสกัดจากสาหร่ายสีแดงมีฤทธิ์ในการป้องกันการติดเชื้อ HPV ได้ [10]

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

ยังมีสารสกัดจากพืชที่ถูกนำมาศึกษาในการเป็น antiviral ต่อเชื้อ HPV และ anticancer ที่เกิดจากการติดเชื้อ HPV ได้แก่

(1) APS-1d เป็น polysaccharide ที่แยกได้จาก *Angelica sinensis* (Oliv.) พันธุ์ไม้ขนาดใหญ่ในตระกูลแครอท มีชื่อเรียกอีกชื่อว่า โสมสตรี จากรายงานการวิจัยพบว่าสารนี้มีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ของ cervical cancer cell ชนิด HeLa cells [14]

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

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

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

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

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

Kumar และคณะ [28] ทำการศึกษาผลการต้านการเกิดมะเร็ง (anticancer) และฤทธิ์การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulatory activity) ของ compound ที่สกัดแยกได้จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata* compound) โดยสกัดสารด้วยตัวทำละลายเมทานอล (methanolic extract) จากนั้นทำการแยกส่วน fraction เพื่อให้ได้เป็น compounds ชนิดต่างๆด้วยตัวทำละลาย dichloromethane, petroleum ether และ น้ำ โดยศึกษาฤทธิ์ของ compounds ที่แยกได้ในแต่ละตัวทำละลาย ซึ่งพบว่าสารที่แยกด้วย dichloromethane มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่น โดยที่ระดับความเข้มข้นต่ำของสารสกัดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์ HT-29 (colon cell line) ได้ดีและยังสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ human peripheral blood lymphocytes (HPBLs) ได้ดี และพบว่าสารที่สามารถแยกได้จากตัวทำละลายดังกล่าว ประกอบด้วยสาร 3 ชนิด คือ andrographolide, 14-deoxyandrographolide และ 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide จากการนำ สารทั้ง 3 ชนิดมาทดสอบพบว่า andrographolide compound มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้ดีกว่าสารชนิดอื่นๆ โดยผลการยับยั้งให้ผลตีแตกต่างกันในเซลล์ทดสอบแต่ละชนิดและยังสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ lymphocyte และระดับ interleukin-2 (IL-2) ที่เซลล์ HPBLs สร้างขึ้นด้วย

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

Sheeja K และ Kuttan G [30] ทำการศึกษา antiangiogenic activity ของ *Andrographis paniculata* extract (APE) and andrographolide (ANDLE) ใน *in vitro* และ *in vivo* models จากการศึกษาใน C57BL/6 mice พบว่าการฉีด APE และ ANDLE เข้าที่ช่องท้องนั้นสามารถยับยั้งการสร้างหลอดเลือดฝอยในเซลล์ B16F-10 melanoma cell line ได้ และเมื่อทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของ cytokine ในซีรัม พบว่าสารเหล่านี้ทำให้ระดับของ proinflammatory cytokines such as IL-1 β ,

IL-6, TNF-alpha and GM-CSF และ angiogenic factor VEGF ลดลง ซึ่งสารเหล่านี้จะพบมากในสัตว์ที่เหนียวทำให้เกิด angiogenesis นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ VEGF mRNA ใน B16F-10 cell line พบว่าสารนี้มีผลในการลดระดับการแสดงออกของ VEGF mRNA ได้เมื่อเทียบกับกลุ่ม control

Zhao F และคณะ [19] ทำงานศึกษาฤทธิ์ต้านเนื้องอก (anti-tumor) ของ andrographolide ต่อเซลล์มะเร็ง ศึกษาใน *in vitro* จากการศึกษาพบว่าสารนี้มีผลในการเหนียวทำให้เกิด apoptosis ในเซลล์ prostate cancer (PC-3) ผ่านการกระตุ้น caspase 3, up-regulation ของ bax และ down-regulation ของ bcl-2 นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาโดยวิธี ELISA พบว่าสารนี้สามารถยับยั้ง vascular endothelial growth factor ได้อีกด้วย

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

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

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

การศึกษาค้นคว้านี้ต้องการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*) และสมุนไพรพญายอ (*C. nutans*) ในการต้านเชื้อ HPV ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาฤทธิ์ด้านการเกิดมะเร็งของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรแล้ว แต่ยังไม่มียางานฤทธิ์ด้านการติดเชื้อ HPV หรือการเกิดมะเร็งปากมดลูก โดยมีความสนใจว่าสมุนไพรฟ้าทะลายโจร น่าจะมีผลยับยั้งเชื้อ HPV ได้ ส่วนพืชสมุนไพรพญายอ (*C. nutans*) ยังไม่มีรายงานที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์การต้านมะเร็งแต่ก็เป็นพืชที่น่าสนใจในการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรในด้านการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ซึ่งถ้าหากพืชทั้ง 2 ชนิดที่นำมาทำการศึกษาศึกษาสามารถให้ผลในการยับยั้งเชื้อ HPV ได้จะทำให้ได้ความรู้ใหม่เพิ่มเติมในการศึกษาทางด้านสมุนไพรและสามารถนำมาประยุกต์ใช้งานทางด้านสาธารณสุขในการผลิตยาชนิดใหม่ในการใช้รักษามะเร็งและโรคติดเชื้อ HPV ได้ ซึ่งจะเป็นการช่วยสนับสนุนการนำพืชสมุนไพรที่หาได้ทั่วไปในประเทศมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรค ทำให้สามารถพึ่งพาตนเองได้อย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

3. วิธีดำเนินการวิจัย (Method)

สารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและพญายอ

สารสกัดที่เตรียมได้จากการดำเนินโครงการวิจัยในปีที่ 1 มีดังนี้

1. สารสกัดจากพืชสมุนไพรฟ้าทะลายโจร 3 ชนิด ได้แก่

- 1.1 Andrographolide (SS1)
- 1.2 14-deoxy-11,12-didehydro-andrographolide (SS2)
- 1.3 3, 19- isopropylidene andrographolide (SS3)

2. สารสกัดจากพืชสมุนไพรพญายอ 3 ชนิด ได้แก่

- 2.1 $C_{55}H_{74}N_4O_5$ (136B)
- 2.2 $C_{55}H_{72}N_4O_7$ (136C)
- 2.3 $C_{53}H_{70}N_4O_5$ (136D)

สารสกัดทั้ง 6 ชนิดถูกละลายใน DMSO ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2 mg/ml และถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและพญายอต่อ HPV16 PsV

นำสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและพญายอ และ HPV16 PsV ที่เตรียมได้จากการดำเนินโครงการวิจัยในปีที่ 1 มาตรวจสอบฤทธิ์โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับ sub-toxic concentration ดังตารางที่ 3.1 และในแต่ละการทดสอบใช้ปริมาณ HPV16 PsV 1×10^6 fluorescence cells/mL การทดลองแต่ละสภาวะทำแบบ triplicate และทำซ้ำอีก 2 ครั้งรวมเป็น 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 3.1 Sub-cytotoxic concentration ของสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร และพญายอ ที่ใช้ในการทดสอบ

	Compounds	Sub-cytotoxic concentration (µg/ml)
สมุนไพรฟ้าทะลายโจร	SS1	4.73
	SS2	1.13
	SS3	11.29
สมุนไพรพญายอ	136B	3.79
	136C	7.60
	136D	19.41

3.1 Screening antiviral activity

- เลี้ยง 293FT cell line ใน 96-wells plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- นำ HPV16 pseudoviruses บ่มกับสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรหรือพญายอ (ความเข้มข้นเท่ากับค่า sub-cytotoxic concentration) ใน serum-free medium เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับ control บ่ม HPV16 pseudoviruses กับ serum-free medium เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
- นำ HPV16 pseudoviruses ในข้อ b) adsorb บน 293FT cells ที่เลี้ยงไว้ บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
- ล้าง unadsorbed HPV16 pseudoviruses ออกด้วย cold phosphate buffered saline (PBS) แล้วเติม media ที่มีสารสกัดที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า sub-cytotoxic concentration บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับ control เติม media ที่ไม่มีสารสกัด
- อ่านผลการทดลองโดยนำ 293FT cells ที่ทดสอบไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ เปรียบเทียบกับ control เซลล์ที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนส์แสดงว่า HPV16 pseudoviruses สามารถเข้าไปภายในเซลล์และมีการแสดงออกของ green fluorescent protein (GFP) ถ้าสารสกัดมีฤทธิ์ antiviral activity จะมีปริมาณเซลล์ที่เรืองแสงน้อยกว่า control
สารสกัดที่มีฤทธิ์ antiviral activity จะถูกนำไปทดสอบต่อไป

3.2 Internalization assay [9]

- เลี้ยง 293FT cell line ใน 96-wells plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- นำ HPV16 pseudoviruses มา adsorb บน 293FT cells ที่เลี้ยงไว้ และบ่มที่ 20 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

- c) ล้าง unadsorbed HPV16 pseudoviruses ออกด้วย cold PBS แล้วเติม media ที่มีสารสกัดที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า sub-cytotoxic concentration บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับ control เติม media ที่ไม่มีสารสกัด
- d) อ่านผลการทดลองโดยนำ 293FT cells ที่ทดสอบไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ เปรียบเทียบกับ control เซลล์ที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนส์แสดงว่า HPV16 pseudoviruses สามารถเข้าไปภายในเซลล์และมีการแสดงออกของ green fluorescent protein (GFP) ถ้าสารสกัดมีฤทธิ์ antiviral activity โดยยับยั้งการนำ viral particle เข้าสู่เซลล์จะมีปริมาณเซลล์ที่เรืองแสงน้อยกว่า control

3.3 Binding assay (Direct binding of compounds to viral particles) [9]

- a) เลี้ยง 293FT cell line ใน 96-wells plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- b) นำ HPV16 pseudoviruses บ่มกับสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรหรือพญายอ (ความเข้มข้นเท่ากับค่า sub-cytotoxic concentration) ใน serum-free medium เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับ control บ่ม HPV16 pseudoviruses กับ serum-free medium เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
- c) นำ HPV16 pseudoviruses ในข้อ b) adsorb บน 293FT cells ที่เลี้ยงไว้ บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
- d) ล้าง unadsorbed HPV16 pseudoviruses ออกด้วย cold PBS แล้วเติม media ที่ไม่มีสารสกัด บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับ control เติม media ที่ไม่มีสารสกัดเช่นเดียวกัน
- e) อ่านผลการทดลองโดยนำ 293FT cells ที่ทดสอบไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ เปรียบเทียบกับ control เซลล์ที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนส์แสดงว่า HPV16 pseudoviruses สามารถเข้าไปภายในเซลล์และมีการแสดงออกของ green fluorescent protein (GFP) ถ้าสารสกัดมีฤทธิ์ antiviral activity โดยจับกับ viral particles จะมีปริมาณเซลล์ที่เรืองแสงน้อยกว่า control

3.4 Binding assay (Direct binding of compounds to host cell receptors)

- a) เลี้ยง 293FT cell line ใน 96-wells plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- b) บ่ม 293FT cells กับสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรหรือพญายอ (ความเข้มข้นเท่ากับค่า sub-cytotoxic concentration) ใน serum-free medium ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สำหรับ negative control ใช้ serum-free medium ที่ไม่มีสารสกัด
- c) ล้างเซลล์ด้วย PBS

- d) นำ HPV16 pseudoviruses มา adsorb บน 293FT cells ที่ถูกล้างแล้ว บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
- e) ล้าง unadsorbed HPV16 pseudoviruses ออกด้วย PBS แล้วเติม media ที่ไม่มีสารสกัด บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับ control เติม media ที่ไม่มีสารสกัดเช่นเดียวกัน
- f) อ่านผลการทดลองโดยนำ 293FT cells ที่ทดสอบไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ เปรียบเทียบกับ control เซลล์ที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนส์แสดงว่า HPV16 pseudoviruses สามารถเข้าไปภายในเซลล์และมีการแสดงออกของ green fluorescent protein (GFP) ถ้าสารสกัดมีฤทธิ์ antiviral activity โดย block ที่ host cell receptors จะมีปริมาณเซลล์ที่เรืองแสงน้อยกว่า control

3.5 Neutralization assay [34]

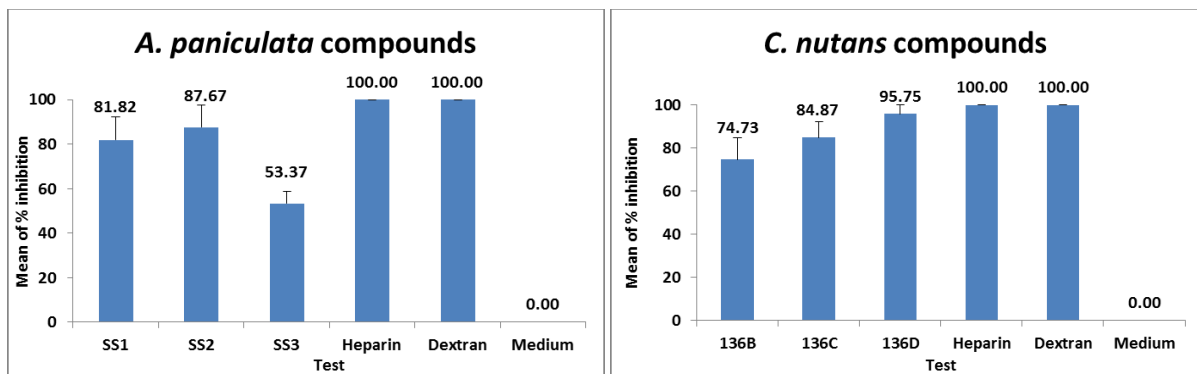
- a) เลี้ยง 293FT cell line ใน 96-wells plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- b) นำ HPV16 pseudoviruses บ่มกับสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรหรือพญายอ โดยเริ่มต้นจากความเข้มข้นเท่ากับค่า sub-cytotoxic concentration และเจือจางแบบ serial 2-fold dilution ใน serum-free medium เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับ negative control บ่ม HPV16 pseudoviruses กับ serum-free medium และ positive control บ่ม HPV16 pseudoviruses กับ mouse anti-HPV16 L1 monoclonal antibody (CamVir 1, Abcam, Cambridge, UK) โดยเริ่มต้นจาก 1:20,000 และเจือจางแบบ serial 2-fold dilution ใน serum-free medium
- c) นำ HPV16 pseudoviruses ในข้อ b) adsorb บน 293FT cells ที่เลี้ยงไว้ บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- d) อ่านผลการทดลองโดยนำ 293FT cells ที่ทดสอบไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ เปรียบเทียบกับ control เซลล์ที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนส์แสดงว่า HPV16 pseudoviruses สามารถเข้าไปภายในเซลล์และมีการแสดงออกของ green fluorescent protein (GFP) ถ้าสารสกัดมีฤทธิ์ neutralization จะมีปริมาณเซลล์ที่เรืองแสงน้อยกว่า negative control

4. ผลการวิจัย (Result)

4.1 Screening antiviral activity

ในการทดสอบฤทธิ์ antiviral activity ของสารสกัดทั้ง 6 ชนิด ได้นำสารสกัดบ่มกับ pseudovirus ก่อน แล้วจึง adsorb บนเซลล์ 293FT หลังจากนั้นจึงเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารที่ผสมกับสารสกัดแต่ละชนิด โดยมี negative control คืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผสมสารสกัด และ positive control คืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม heparin หรือ dextran อ่านผลการทดลองโดยนำ 293FT cells ที่ทดสอบไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ โดยตรวจหาเซลล์ที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ซึ่งแสดงว่า HPV16 pseudoviruses สามารถเข้าไปภายในเซลล์และมีการแสดงออกของ green fluorescent protein (GFP) และเปรียบเทียบกับ negative control ซึ่งจะมีปริมาณเซลล์ที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนส์คิดเป็น 100%

ผลการทดลองพบว่า heparin และ dextran สามารถยับยั้งการติดเชื้อ pseudovirus ได้ 100% คือตรวจไม่พบเซลล์ที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนส์เลย แสดงว่า pseudovirus ไม่สามารถเข้าไปภายในเซลล์ จึงไม่มีการแสดงออกของ green fluorescent protein ส่วนสารสกัด SS1, SS2, SS3, 136B, 136C และ 136D สามารถยับยั้งการติดเชื้อ pseudovirus ได้ 81.82%, 87.67%, 53.37%, 74.73%, 84.84% และ 95.75% ตามลำดับ (รูปที่ 4.1)



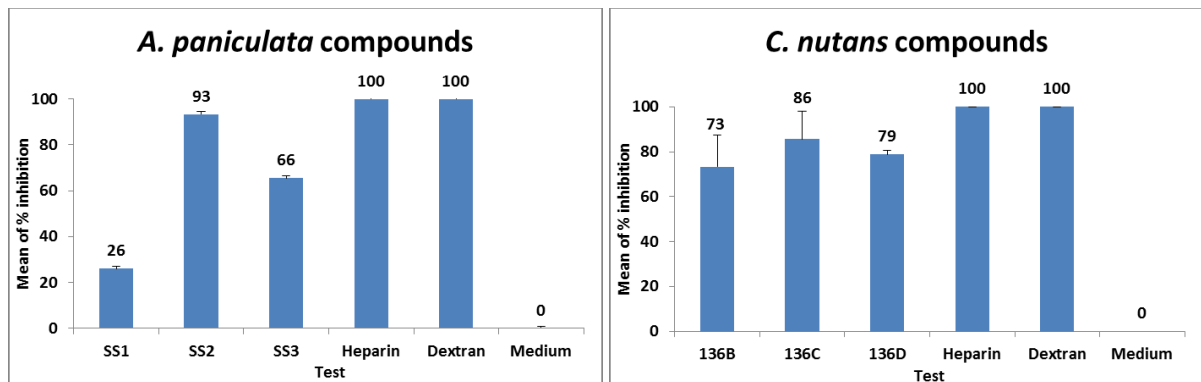
รูปที่ 4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ antiviral activity ของสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*) และพญายอ (*C. nutans*)

4.2 Internalization assay

จากการทดลอง screening antiviral activity พบว่าสารสกัดทุกชนิดสามารถยับยั้ง pseudovirus infection ได้ จึงได้ทำการทดสอบการยับยั้งในขั้นตอนการเข้าสู่เซลล์ โดย adsorb HPV16

pseudoviruses บน 293FT cells ที่ 20 °C ก่อน แล้วจึงเติมสารสกัดและบ่มเซลล์ที่ 37 °C เพื่อเข้าสู่ขั้นตอน internalization ในขณะที่มีสารสกัดอยู่

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดทุกชนิดสามารถยับยั้ง internalization ของ pseudovirus ได้ โดย SS1, SS2, SS3, 136B, 136C และ 136D สามารถยับยั้ง internalization ของ pseudovirus ได้ 26%, 93%, 66%, 73%, 86% และ 79% ตามลำดับ (รูปที่ 4.2)

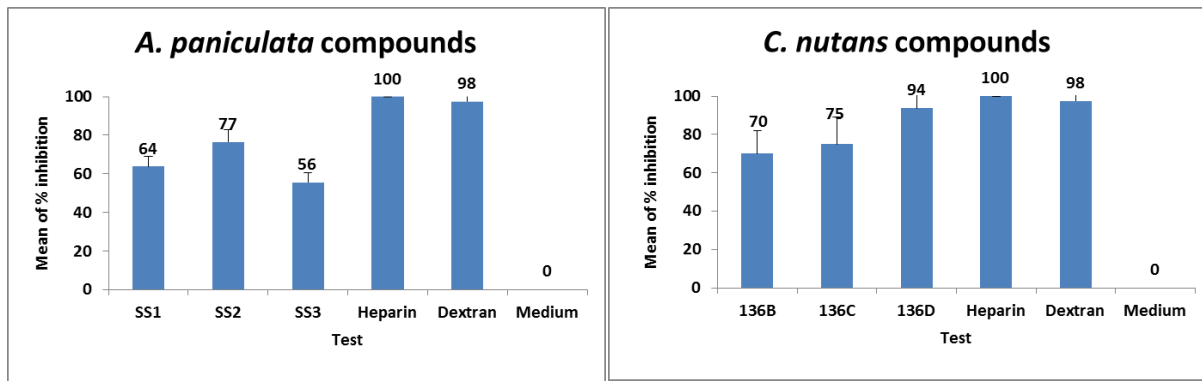


รูปที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*) และพญายอ (*C. nutans*) ในการยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของ pseudovirus

4.3 Binding assay (Direct binding of compounds to viral particles)

การทดสอบนี้ต้องการทราบว่าสารสกัดสามารถยับยั้ง pseudovirus infection โดยการจับกับอนุภาค pseudovirus โดยตรง ทำให้ไม่สามารถไปจับ host receptor หรือไม่ ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดบ่มกับ pseudovirus ก่อน แล้วจึง adsorb บนเซลล์ 293FT หลังจากนั้นจึงเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารที่ไม่มีสารสกัด

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดทุกชนิดสามารถจับกับอนุภาค pseudovirus โดยตรง โดย SS1, SS2, SS3, 136B, 136C และ 136D สามารถยับยั้ง pseudovirus infection ได้ 64%, 77%, 56%, 70%, 75% และ 94% ตามลำดับ (รูปที่ 4.3)

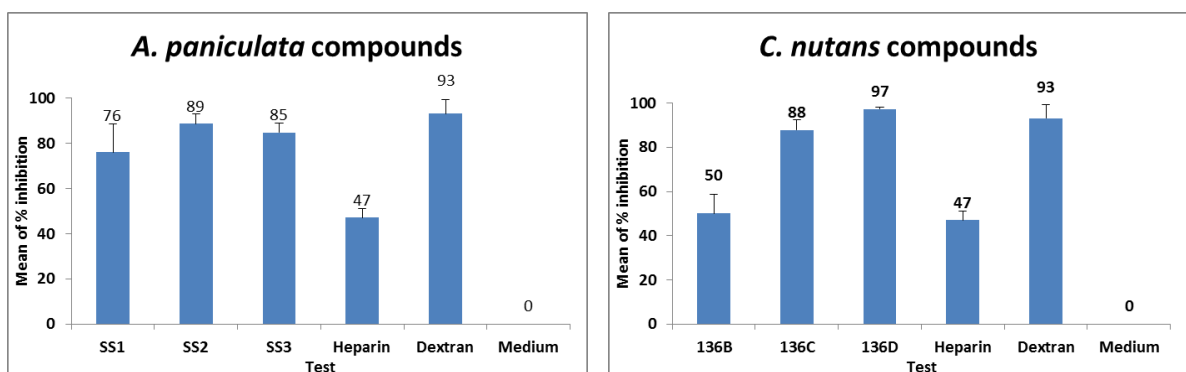


รูปที่ 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*) และพญายอ (*C. nutans*) ในการจับกับอนุภาค pseudovirus

4.4 Binding assay (Direct binding of compounds to host cell receptors)

การทดสอบนี้ต้องการทราบว่าสารสกัดสามารถยับยั้ง pseudovirus infection โดยการจับกับ host receptor แล้วทำให้อนุภาค pseudovirus ไม่สามารถไปจับ host receptor หรือไม่ ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดบ่มกับ เซลล์ 293FT ก่อน แล้วจึง adsorb pseudovirus บนเซลล์ 293FT หลังจากนั้นจึงเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารที่ไม่มีสารสกัด

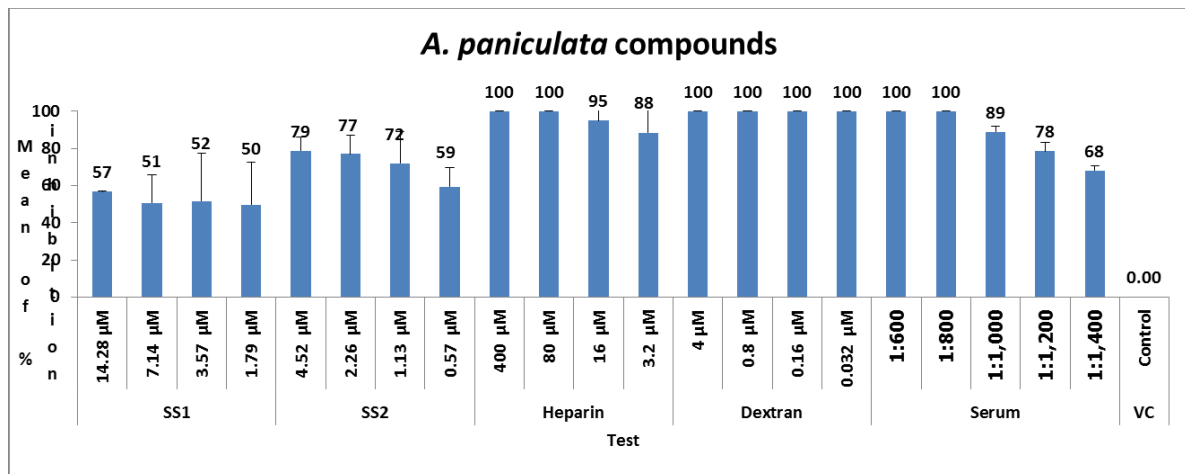
ผลการทดลองพบว่าสารสกัดทุกชนิดสามารถจับกับ host receptor ได้ โดย SS1, SS2, SS3, 136B, 136C และ 136D สามารถยับยั้ง pseudovirus infection ได้ 76%, 89%, 85%, 50%, 88% และ 97% ตามลำดับ (รูปที่ 4.4)



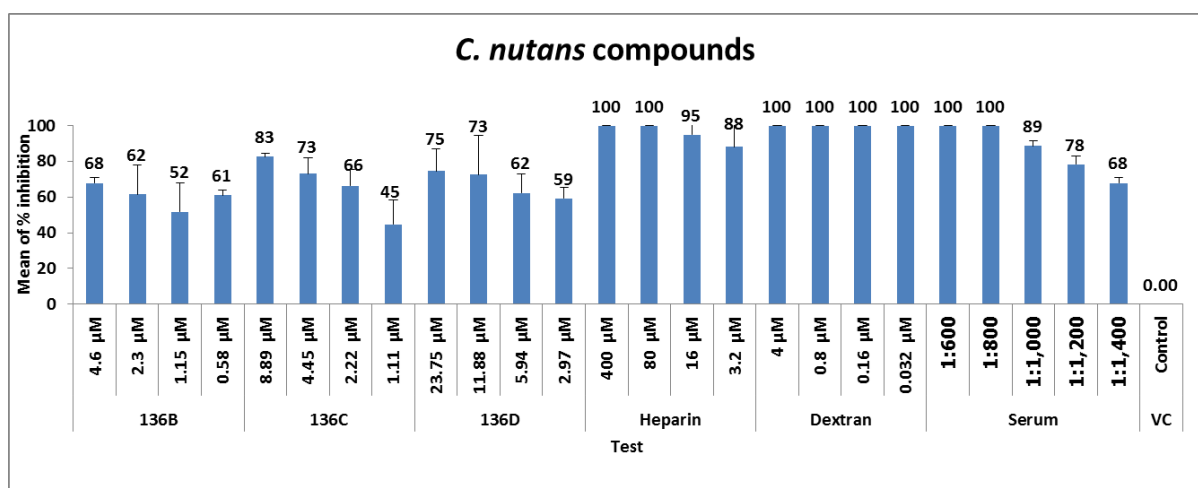
รูปที่ 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*) และพญายอ (*C. nutans*) ในการจับกับตัวรับบนผิวเซลล์

4.5 Neutralization assay

เพื่อยืนยันผลการทดสอบว่าสารสกัดสามารถยับยั้ง pseudovirus infection โดยการจับกับอนุภาค pseudovirus และยับยั้งไม่ให้เข้าไปภายในเซลล์ จึงทำการทดสอบด้วยวิธี neutralization พบว่าการยับยั้งขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด (dose dependent manner) ดังแสดงในรูปที่ 4.5 และ 4.6



รูปที่ 4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ neutralization ของสารสกัด SS2 จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*)



รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ neutralization ของสารสกัดสมุนไพรพญาเสือ (*C. nutans*)

5. อภิปรายผล/วิจารณ์ (Discussion/Comment)

การทดสอบฤทธิ์ antiviral activity ของสารสกัดทั้ง 6 ชนิด โดยนำสารสกัดบ่มกับ pseudovirus ก่อน แล้วจึง adsorb บนเซลล์ 293FT หลังจากนั้นจึงเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารที่ผสมกับสารสกัดแต่ละชนิด เป็นการ screening ก่อนว่าสารใดมีฤทธิ์ พบว่าสารสกัดทุกชนิดสามารถยับยั้ง pseudovirus infection ได้ โดยสารสกัด 136D มีฤทธิ์มากที่สุด รองลงมาคือ SS2 จากนั้นจึงทำการทดสอบการยับยั้งในขั้นตอนการเข้าสู่เซลล์ internalization ผลการทดลองพบว่าสารสกัดทุกชนิดสามารถยับยั้ง internalization ของ pseudovirus ได้ โดยสารสกัด SS2 มีฤทธิ์มากที่สุด รองลงมาคือ 136C จากนั้นจึงทำการทดสอบการยับยั้งในขั้นตอน binding ทั้งจับกับอนุภาค pseudovirus โดยตรง และจับกับ host receptor พบว่า 136D สามารถจับกับอนุภาค pseudovirus โดยตรง และจับกับ host receptor ได้ดีที่สุด และจากการทดสอบฤทธิ์ neutralization พบว่าเป็นแบบ dose dependent manner โดย 136C มีฤทธิ์มากที่สุด รองลงมาคือ SS2

6. สรุปผลการวิจัย/ข้อเสนอแนะ (Conclusion/Suggestion)

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง internalization ของ HPV16 pseudovirus ของสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและพญายอ พบว่า สารสกัดทุกชนิดที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มีฤทธิ์ยับยั้ง internalization ของ HPV16 pseudovirus แต่ไม่สามารถยับยั้งการติดเชื้อ HPV16 pseudovirus ได้ สมบูรณ์เมื่อเปรียบเทียบกับ heparin และ dextrane โดยสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร SS2 สามารถยับยั้ง internalization ของ HPV16 pseudovirus ได้มากที่สุดคือ 93% สารที่มีฤทธิ์รองลงมาคือ สารสกัดจากสมุนไพรพญายอ 136C ยับยั้งได้ 86%

การศึกษาฤทธิ์ด้านการยับยั้ง binding ของ pseudovirus ของสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและพญายอ พบว่า สารสกัดทุกชนิดที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มีฤทธิ์ยับยั้ง binding ของ pseudovirus โดยสารสกัดจากสมุนไพรพญายอ 136D สามารถยับยั้ง binding ได้มากที่สุดคือ 97% สารที่มีฤทธิ์รองลงมาคือ สารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร SS2 และสารสกัดจากสมุนไพรพญายอ 136C โดยยับยั้ง binding ได้ 89% และ 88% ตามลำดับ

การศึกษาฤทธิ์ neutralization of HPV16 pseudovirus ของสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและพญายอ พบว่า สารสกัดทุกชนิดที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มีฤทธิ์ neutralization of HPV16 pseudovirus แต่ไม่สามารถยับยั้งการติดเชื้อ HPV16 pseudovirus ได้ สมบูรณ์เมื่อเปรียบเทียบกับ heparin, dextrane และ specific serum โดยสารสกัดจากสมุนไพรพญายอ 136C สามารถยับยั้งการติดเชื้อได้มากที่สุดคือ 83% สารที่มีฤทธิ์รองลงมาคือ สารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร SS2 ยับยั้งการติดเชื้อได้ 79%

แม้ว่าสารสกัดทุกชนิดจะมีฤทธิ์ด้านการติดเชื้อ pseudovirus ได้ แต่มีความแรงไม่เท่ากัน และมีความสามารถในการยับยั้งในแต่ละขั้นตอนแตกต่างกัน น่าจะเป็นเรื่องของโครงสร้างที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม สารสกัดเหล่านี้สามารถนำไปพัฒนาสำหรับการป้องกันการติดเชื้อ HPV ได้ในอนาคต

ผลสำเร็จของงานวิจัยระยะนี้เป็นผลสำเร็จเบื้องต้น (P)

บรรณานุกรม (Bibliography)

- [1] Soutter WP, Sasieni P, Panoskaltsis T. Long-term risk of invasive cervical cancer after treatment of squamous cervical intraepithelial neoplasia. *International journal of cancer*. 2006 Apr 15;118(8):2048-55.
- [2] Cox JT, Schiffman M, Solomon D. Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2003 Jun;188(6):1406-12.
- [3] Guido R, Schiffman M, Solomon D, Burke L. Postcolposcopy management strategies for women referred with low-grade squamous intraepithelial lesions or human papillomavirus DNA-positive atypical squamous cells of undetermined significance: a two-year prospective study. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2003 Jun;188(6):1401-5.
- [4] ACOG Practice Bulletin number 66, September 2005. Management of abnormal cervical cytology and histology. *Obstetrics and gynecology*. 2005 Sep;106(3):645-64.
- [5] Chumworathayi B, Thinkhamrop J, Blumenthal PD, Thinkhamrop B, Pientong C, Ekalaksananan T. Cryotherapy for HPV clearance in women with biopsy-confirmed cervical low-grade squamous intraepithelial lesions. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. Feb;108(2):119-22.
- [6] Ault KA. Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials. *Lancet*. 2007 Jun 2;369(9576):1861-8.
- [7] Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *Jama*. 2001 Dec 26;286(24):3106-14.
- [8] Christensen ND, Reed CA, Culp TD, Hermonat PL, Howett MK, Anderson RA, et al. Papillomavirus microbicidal activities of high-molecular-weight cellulose sulfate, dextran sulfate, and polystyrene sulfonate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001 Dec;45(12):3427-32.

- [9] Mistry N, Drobni P, Naslund J, Sunkari VG, Jenssen H, Evander M. The anti-papillomavirus activity of human and bovine lactoferricin. *Antiviral Res.* 2007 Sep;75(3):258-65.
- [10] Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, Kines R, Bernardo M, Choyke PL, et al. Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat Med.* 2007 Jul;13(7):857-61.
- [11] Abdulkarim B, Sabri S, Deutsch E, Chagraoui H, Maggiorella L, Thierry J, et al. Antiviral agent Cidofovir restores p53 function and enhances the radiosensitivity in HPV-associated cancers. *Oncogene.* 2002 Apr 4;21(15):2334-46.
- [12] Andrei G, Snoeck R, Schols D, De Clercq E. Induction of apoptosis by cidofovir in human papillomavirus (HPV)-positive cells. *Oncol Res.* 2000;12(9-10):397-408.
- [13] Harvey R, Brown K, Zhang Q, Gartland M, Walton L, Talarico C, et al. GSK983: a novel compound with broad-spectrum antiviral activity. *Antiviral Res.* 2009 Apr;82(1):1-11.
- [14] Cao W, Li XQ, Wang X, Fan HT, Zhang XN, Hou Y, et al. A novel polysaccharide, isolated from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels induces the apoptosis of cervical cancer HeLa cells through an intrinsic apoptotic pathway. *Phytomedicine.* Jan 19.
- [15] Tsuda H, Tanaka M, Manabe T, Ikeda H, Negoro S, Ishiko O, et al. Phase I study of combined radiation, hyperthermia and intra-arterial carboplatin for local recurrence of cervical cancer. *Ann Oncol.* 2003 Feb;14(2):298-303.
- [16] Yokoyama M, Noguchi M, Nakao Y, Pater A, Iwasaka T. The tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate effects on growth, apoptosis, and telomerase activity in cervical cell lines. *Gynecol Oncol.* 2004 Jan;92(1):197-204.
- [17] Li ZB, Wang JY, Jiang B, Zhang XL, An LJ, Bao YM. Benzobijuglone, a novel cytotoxic compound from *Juglans mandshurica*, induced apoptosis in HeLa cervical cancer cells. *Phytomedicine.* 2007 Dec;14(12):846-52.
- [18] Chao WW, Kuo YH, Lin BF. Anti-inflammatory activity of new compounds from *Andrographis paniculata* by NF-kappaB transactivation inhibition. *J Agric Food Chem.* Feb 24;58(4):2505-12.
- [19] Zhao F, He EQ, Wang L, Liu K. Anti-tumor activities of andrographolide, a diterpene from *Andrographis paniculata*, by inducing apoptosis and inhibiting VEGF level. *J Asian Nat Prod Res.* 2008 May-Jun;10(5-6):467-73.

- [20] Mishra K, Dash AP, Swain BK, Dey N. Anti-malarial activities of *Andrographis paniculata* and *Hedyotis corymbosa* extracts and their combination with curcumin. *Malar J*. 2009;8:26.
- [21] Zhao HY, Fang WY. Antithrombotic effects of *Andrographis paniculata* nees in preventing myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)*. 1991 Sep;104(9):770-5.
- [22] Rana AC, Avadhoot Y. Hepatoprotective effects of *Andrographis paniculata* against carbon tetrachloride-induced liver damage. *Arch Pharm Res*. 1991 Mar;14(1):93-5.
- [23] Kapil A, Koul IB, Banerjee SK, Gupta BD. Antihepatotoxic effects of major diterpenoid constituents of *Andrographis paniculata*. *Biochem Pharmacol*. 1993 Jul 6;46(1):182-5.
- [24] Trivedi NP, Rawal UM. Hepatoprotective and antioxidant property of *Andrographis paniculata* (Nees) in BHC induced liver damage in mice. *Indian J Exp Biol*. 2001 Jan;39(1):41-6.
- [25] Wiat 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.
- [26] Reddy VL, Reddy SM, Ravikanth V, Krishnaiah P, Goud TV, Rao TP, et al. A new bis-andrographolide ether from *Andrographis paniculata* nees and evaluation of anti-HIV activity. *Nat Prod Res*. 2005 Apr;19(3):223-30.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] Sheeja K, Guruvayoorappan C, Kuttan G. Antiangiogenic activity of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Int Immunopharmacol*. 2007 Feb;7(2):211-21.
- [31] Schon MP, Schon M. Imiquimod: mode of action. *The British journal of dermatology*. 2007 Dec;157 Suppl 2:8-13.

- [32] Daayana S, Elkord E, Winters U, Pawlita M, Roden R, Stern PL, et al. Phase II trial of imiquimod and HPV therapeutic vaccination in patients with vulval intraepithelial neoplasia. *British journal of cancer*. Mar 16.
- [33] Sangkitporn S, Chaiwat S, Balachandra K, Na-Ayudhaya TD, Bunjob M, Jayavas C. Treatment of herpes zoster with *Clinacanthus nutans* (bi phaya yaw) extract. *J Med Assoc Thai*. 1995 Nov;78(11):624-7.
- [34] Diana V. Pastrana CBB, Douglas R. Lowy and John T. Schiller. Papillomavirus Neutralization Assay. Retrieve 11 July 2010, <http://home.ccr.cancer.gov/lco/neutralizationassay.htm>.