249699
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249699

การยับยั้งไวรัสก่อโรคเริมและแบคทีเรียก่อโรคปากเปื่อยในกุ้งก้ามกรามโดยโพรพอลิส

ศิรินาฏ มุธิเอก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์
บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
เมษายน 2554

b00254300

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249699

การยับยั้งไวรัสก่อโรคเริมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยโพรพอลิส

ศิรินาฏ มุสิเอก

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
เมษายน 2554

การยับยั้งไวรัสก่อโรคเริมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยโพรพอลิส

ศิรินาฏ มุสิเอก

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
อาจารย์ ดร. ดวงพร อมรเลิศพิศาล

.....กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยิ่งมณี ตระกูลพัว

.....กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขจรศักดิ์ ตระกูลพัว

.....กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นฤมล ทองไว

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยิ่งมณี ตระกูลพัว

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขจรศักดิ์ ตระกูลพัว

28 เมษายน 2554

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยิ่งมณี ตระกูลพัว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขจรศักดิ์ ตระกูลพัว อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ ให้ความรู้ เทคนิคต่างๆ รวมทั้งให้คำปรึกษา กำลังใจ ดูแลเอาใจใส่ ตลอดจนแก้ไขตรวจทานทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และแก้ไขข้อบกพร่อง พร้อมทั้งให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณวีระพันธ์ ตันติพงษ์ เจ้าของบริษัทบีโปรดักส์อินดัสตรี จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์สารสกัดโพรพอลิสเพื่อใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม ที่มอบทุนสนับสนุนการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้อันเป็นประโยชน์แก่ข้าพเจ้า และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ทุกท่าน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก ตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณเรณู อยู่เจริญ ที่คอยช่วยให้คำปรึกษาด้านเทคนิคต่างๆในการทำการวิจัย คุณเชิญขวัญ พื้นดี คุณปรัชญา เฉลียวฉลาด คุณเกวลิน อินทนนท์ ตลอดจน พี่ เพื่อน และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา และห้องปฏิบัติการข้างเคียง รวมทั้งคณาจารย์ ที่มีส่วนในการให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือต่างๆ รวมถึงให้กำลังใจในการทำงานด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่มอบความรัก และให้การสนับสนุนในเรื่องต่างๆ ตลอดจนให้คำปรึกษา คำแนะนำ และเป็นกำลังใจที่ดีแก่ข้าพเจ้าเสมอมา ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์นี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจหรือมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ศิรินาฏ มุสิเอก

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การยับยั้งไวรัสก่อโรคเริมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยโพรพอลิส

ผู้เขียน นางสาวศิรินาฏ มุสิเอก

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยิ่งมณี ตระกูลพัว อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขจรศักดิ์ ตระกูลพัว อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

249699

Herpes simplex virus แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ HSV-1 และ HSV-2 เชื้อก่อโรคเริมนี้สามารถติดเชื้อได้หลายบริเวณ เช่นบริเวณปาก ตาและผิวหนัง สามารถติดต่อทางเพศสัมพันธ์ และยังเป็นสาเหตุของมะเร็งปากมดลูกได้อีกด้วย ในปัจจุบันยังไม่มียาชนิดใดที่สามารถรักษาโรคเริมให้หายขาดได้ เชื้อไวรัสกลุ่มนี้มีลักษณะการติดเชื้อที่แอบแฝงทำให้สามารถกลับมาเป็นซ้ำได้ใหม่ สำหรับยาต้านไวรัสเริมที่มีผลในการรักษาค่อนข้างมีราคาแพง ดังนั้นการหันมาใช้สารสกัดจากธรรมชาติจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ปลอดภัยในการรักษาโรค โพรพอลิสเป็นส่วนผสมที่มีลักษณะเหนียวข้น เป็นยางไม้ที่ผึ้งเก็บได้จากส่วนต่างๆของพืช การวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลการยับยั้งของสารสกัดโพรพอลิสต่อเชื้อไวรัสก่อโรคเริมและเซลล์มะเร็งปากมดลูก จากผลการทดสอบเมื่อนำสารสกัดโพรพอลิสมาทดสอบความเป็นพิษของเซลล์เพาะเลี้ยง (Vero cells) พบว่าสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง ตาย 50 % เท่ากับ 280 μg/ml เมื่อทำการทดสอบโดยใช้สารสกัดโพรพอลิสในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสในการเข้าสู่เซลล์ในระยะต่างๆพบว่า โพรพอลิสที่ความเข้มข้นที่ 97.6 μg/ml สามารถยับยั้งการติดเชื้อ HSV-1 และ HSV-2 ก่อนเกาะติดกับเซลล์ เท่ากับ 32.3% และ 43.1% สามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 ขณะเกาะติดกับเซลล์เท่ากับ 42.8% และ 47.3% สามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 หลังเกาะติดกับเซลล์ เท่ากับ 60.0% และ 74.6 % โพรพอลิส ที่

249699

ความเข้มข้น 195.3 µg/ml สามารถทำลายอนุภาคของเชื้อ HSV-1 โดยตรงที่เวลา 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที เท่ากับ 23.2, 36.5, 77.4, 85.1, 97.4 และ 99.7% ตามลำดับ และการทำลายเชื้อ HSV-2 โดยตรง ที่เวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง เท่ากับ 9.7, 19.3, 52.3 และ 70.7% ตามลำดับ โพรพอลิส สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนอนุภาคไวรัสทั้งสองชนิด โดยสามารถยับยั้งเชื้อ HSV-1และ HSV-2 ได้ 99.4% และ 99.6%ในชั่วโมงที่ 7 หลังจากการติดเชื้อ นอกจากนั้นเมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโพรพอลิสกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) พบว่าสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกตาย 50 % เท่ากับ 316 µg/ml จากการทดสอบผลของสารสกัดโพรพอลิสในการทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ความเข้มข้นมากกว่า 316 µg/ml พบว่าที่ 24 ชั่วโมง โพรพอลิสที่ความเข้มข้นที่ 2190 µg/ml สามารถทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ 46.7% ดังนั้นความรู้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์จากโพรพอลิส ซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติเพื่อใช้ในการรักษาโรคเริม และมะเร็งปากมดลูก

Thesis Title Inhibition of Herpes Simplex Virus and Cervical Cancer Cells by Propolis

Author Miss Sirinad Musiaek

Degree Master of Science (Applied Microbiology)

Thesis Advisory Committee

Assistant Professor Dr. Yingmanee Tragoolpua Advisor

Assistant Professor Dr. Khajornsak Tragoolpua Co-advisor

ABSTRACT

249699

Herpes simplex viruses (HSV) are classified into 2 types; HSV-1 and HSV-2. The virus can infect several areas such as lip, eye and skin. The infection can be sexual transmitted and the virus is also a causative agent of cervical cancer. Nowadays, the disease is not entirely cured by antiviral drug. HSVs can be latent and can cause recurrent infection. Moreover, effective anti-herpes simplex virus are quit expensive. Thus, the use of natural extract is an alternative choice for treatment of disease. Propolis is a resinous mixture that honey bees collect from various parts of plant. The purpose of this study was to investigate inhibitory effect of the propolis extracts against herpes simplex virus and cervical cancer cell. After testing propolis extract on Vero cells, the results showed that 50% cytotoxic doses of propolis was 280 μg/ml. The inhibition of propolis at non toxic concentration was tested on inhibition of HSV infection at different stages of viral entry. Propolis at 97.6 μg/ml was found to inhibit HSV-1 and HSV-2 infection when propolis extract was added before virus attachment by 32.3% and 43.1% respectively. Inhibition of viral infection while attachment was 42.8% and 47.3% and inhibition after virus attachment was 60.0% and 74.6%. HSV-1 viral particles were directly inhibited by 23.2, 36.5, 77.4, 85.1,

249699

97.4 and 99.7% respectively at 10, 20, 30, 40, 50 and 60 minutes of treatment. HSV-2 virus particles were directly inhibited by 9.7, 19.3, 52.3 and 70.7% respectively at 1, 2, 3 and 4 hours of treatment. HSV-1 and HSV-2 replication were also inhibited by 99.4% and 99.6% at 7 hours after infection. Moreover, after testing of propolis extract on HeLa cells, the results showed that 50% cytotoxic doses of propolis was 316 μg/ml. HeLa cells were destroyed by propolis at concentration more than 316 μg/ml. After treatment HeLa cells with propolis (2190 μg/ml) for 24 hours, percentage of apoptotic cell dead was 46.7%. Therefore, the knowledge obtained from this research study will be used for development of product from propolis, which is natural product for treatment of HSV infection and cervical cancer.

สารบาญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบาญ	ซ
สารบาญตาราง	ฌ
สารบาญภาพ	ฎ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	25
บทที่ 4 ผลการวิจัย	35
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	54
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	61
บรรณานุกรม	63
ภาคผนวก	71
ภาคผนวก ก เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์	72
ภาคผนวก ข อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์	74
ภาคผนวก ค สารเคมีและสีย้อม	76
ประวัติผู้เขียน	78

สารบาญตาราง

ตาราง		หน้า
1	โรคที่เกิดจาก herpes simplex virus	8
2	ความเข้มข้นของ acyclovir ที่ยับยั้ง herpesvirus ชนิดต่างๆ	10
3	สถิติโรคมะเร็งในผู้หญิง 10 อันดับแรกของศูนย์มะเร็งลำปาง ปี พ.ศ. 2550	13
4	อัตราการอยู่รอด 5 ปี ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก	16
5	เปอร์เซ็นต์เซลล์ตายของ Vero cell เมื่อทดสอบกับสารสกัดโพรพอลิส	35
6	ปริมาณไวรัสเริ่มต้นของเชื้อ HSV	36
7	การยับยั้งเชื้อ HSV-1 ก่อนไวรัสเกาะติดกับ Vero cell โดยสารสกัดโพรพอลิส	36
8	การยับยั้งเชื้อ HSV-2 ก่อนไวรัสเกาะติดกับ Vero cell โดยสารสกัดโพรพอลิส	37
9	การยับยั้งเชื้อ HSV-1 ขณะไวรัสเกาะติดกับ Vero cell โดยสารสกัดโพรพอลิส	38
10	การยับยั้งเชื้อ HSV-2 ขณะไวรัสเกาะติดกับ Vero cell โดยสารสกัดโพรพอลิส	39
11	การยับยั้งเชื้อ HSV-1 หลังไวรัสเกาะติดกับ Vero cell โดยสารสกัดโพรพอลิส	40
12	การยับยั้งเชื้อ HSV-2 หลังไวรัสเกาะติดกับ Vero cell โดยสารสกัดโพรพอลิส	41
13	การยับยั้งอนุภาคของเชื้อ HSV-1 โดยตรงที่ชั่วโมงต่างๆ	44
14	การยับยั้งอนุภาคของเชื้อ HSV-2 โดยตรงที่ชั่วโมงต่างๆ	45
15	การยับยั้งเชื้อ HSV-1 เมื่อทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับสารสกัดโพรพอลิส และยาต้านไวรัส ACV ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมง	46

สารบาญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
16	การยับยั้งเชื้อ HSV-2 เมื่อทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับสารสกัดโพรพอลิส และยาต้านไวรัส ACV ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมง	48
17	เปอร์เซ็นต์เซลล์ตายของ HeLa cell เมื่อทดสอบกับสารสกัดโพรพอลิส	50
18	ตารางแสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 540 nm เมื่อทดสอบสารสกัดโพรพอลิสในการทำลายดีเอ็น-เอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกแบบ apoptosis	51

สารบาญภาพ

รูป		หน้า
1	โครงสร้างและส่วนประกอบสำคัญของไวรัส	3
2	กลไกการออกฤทธิ์ของยา acyclovir	11
3	multinucleated giant cell	12
4	การเปรียบเทียบลักษณะการตายแบบ apoptosis และ necrosis	18
5	apoptosome	19
6	กลไกการตายแบบ apoptosis	21
7	การยับยั้งเชื้อ HSV-1 ก่อนไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิส และยาต้านไวรัส ACV	37
8	การยับยั้งเชื้อ HSV-2 ก่อนไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิส และยาต้านไวรัส ACV	38
9	การยับยั้งเชื้อ HSV-1 ขณะไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิส และยาต้านไวรัส ACV	39
10	การยับยั้งเชื้อ HSV-2 ขณะไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิส และยาต้านไวรัส ACV	40
11	การยับยั้งเชื้อ HSV-1 หลังไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิส และยาต้านไวรัส ACV	41
12	การยับยั้งเชื้อ HSV-2 หลังไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิส และยาต้านไวรัส ACV	42
13	กราฟแสดงการเปรียบเทียบการยับยั้ง HSV-1 ในขั้นตอนก่อนเกาะติด ขณะเกาะติด และหลังเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง	42
14	กราฟแสดงการเปรียบเทียบการยับยั้ง HSV-2 ในขั้นตอนก่อนเกาะติด ขณะเกาะติด และหลังเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง	43

สารบาญภาพ (ต่อ)

รูป		หน้า
15	การยับยั้งอนุภาคของเชื้อ HSV-1 โดยตรง โดยสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 195.3 µg/ml	44
16	การยับยั้งอนุภาคของเชื้อ HSV-2 โดยตรง โดยสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 195.3 µg/ml	45
17	ปริมาณ HSV-1 ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมง หลังจากการติดเชื้อเมื่อทดสอบกับสารสกัดโพรพอลิส เปรียบเทียบกับยาต้านไวรัส acyclovir และไวรัสควบคุม	47
18	ปริมาณ HSV-2 ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมง หลังจากการติดเชื้อเมื่อทดสอบกับสารสกัดโพรพอลิส เปรียบเทียบกับยาต้านไวรัส acyclovir และไวรัสควบคุม	49
19	เซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ย้อมติดสีแดงของ APO*Percentage* dye เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 730 µg/ml	52
20	กราฟแสดงการเปรียบเทียบการทำลายดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกแบบ apoptosis เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดโพรพอลิสความเข้มข้น 730, 1100, 1460, 2190 µg/ml เป็นเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง	53
21	Vero cells	72
22	HeLa cells	73

อักษรย่อและสัญลักษณ์

%	=	percentage
ACV	=	acyclovir
Apaf-1	=	apoptotic protease activating factor-1
ATP	=	adenosine triphosphate
$^{\circ}C$	=	degree celcius
CAD	=	caspase activated DNase
cm^2	=	square centrimeter
DED	=	death effector domain
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
DNA	=	deoxyribonucleic acid
EDTA	=	ethylenediamine tetra-acetic acid
HSV	=	herpes simplex virus
HSV-1F	=	herpes simplex virus type 1 strain F
HSV-2G	=	herpes simplex virus type 2 strain G
ICAD	=	inhibitior of caspase activated DNase
log	=	logarithm
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mRNA	=	messenger RNA
nm	=	nanometer
PBS	=	phosphate buffer saline
PFU	=	plaque forming unit
TK	=	thymidine kinase gene
µg	=	microgram
µl	=	microliter