บทคัดย่อ

การติดเชื้อ high risk human papillomavirus (HR-HPV) ที่ปากมดลูกเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งปากมดลูก ซึ่งเป็นโรคที่ก่อปัญหาทางด้านสาธารณสุขทำให้เกิดการเจ็บป่วยและการตายสูง โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา การศึกษาทางระบาดวิทยาพบ HPV 16 DNA ในมะเร็งปากมดลูกมากที่สุด กลไกการเกิดมะเร็งในเซลล์ที่ติดเชื้อ HPV 16 พบว่า viral oncogene ที่มีบทบาทในมะเร็งปากมดลูกคือจีน 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 ผลการยับยั้งการแสดงออกของจีน E6 ส่งผลให้เซลล์ที่ติดเชื้อ HPV เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ซึ่งจะเป็นอีกกลไกหนึ่งที่จะทำลายเซลล์มะเร็ง

ปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ HPV มีน้อยมาก และค่อนข้างมีราคาแพง เนื่องจากไวรัสนี้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ทำให้มีความจำกัดในการพัฒนายาที่ใช้รักษา ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงให้ความสนใจในการค้นหาสารจากสมุนไพรไทยเพื่อนำมาพัฒนาตัวยาใหม่ที่จะสามารถรักษาการติดเชื้อ HPV ดังกล่าว รวมทั้งเพื่อพัฒนางานทางด้านพืชสมุนไพร 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 P_{97} 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 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อ 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

การเตรียมสารสกัดสมุนไพรจากฟ้าทะลายโจรและพญายอได้สารบริสุทธิ์สำหรับใช้ในการวิจัยนี้ 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 พบว่าสารสกัดจากฟ้าทลายโจรชนิด SS1 มีผลยับยั้ง transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR แต่ SS2 และสารสกัดจากพญายอชนิด 136B ไม่มีผลต่อต่อ transcription activity ของ pGL3-HPV16 LCR ในขณะที่สารสกัดจากฟ้าทลายโจรชนิด 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 subcytoxic 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 และควรจะทำการวิจัยต่อว่าการยับยั้งการแสดงออกของ HPV 16 E6 ในเซลล์นั้นส่งผลต่อการเกิด apoptosis ของเซลล์หรือไม่