

ฤทธิ์ในการต้านเชื้อ ไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพล็กซ์ ชนิดที่ 1 ของสารสกัดหยาบจากยาห้าราก

Anti-Herpes Simplex Virus-1 Activity of Crude Extracts of Thai Traditional

Remedy: “Ya-Ha-Rak”

ดวงหทัย อรุณประเสริฐกุล (Duanghatai Aroonprasertkul)* ปานวาด ทองชัย (Panwad Tongchai)**

ทิพยา เอกลักษณานันท์ (Tipaya Ekalaksananan)**** ดร.อติ บุรัสการ (Dr.Ati Burassakarn)***

ดร.แจ่มใส เพียรทอง (Dr.Chamsai Pientong)***** ดร.ศรีสมพร ปรีเปรม (Dr.Srisomporn Preeprame)¹*****

(Received: August 20, 2020; Revised: November 23, 2020; Accepted: November 25, 2020)

บทคัดย่อ

จากการศึกษาที่ผ่านมา ระบุว่ายาห้ารากมีสรรพคุณบรรเทาอาการไข้จากโรคเริม และอาจมีฤทธิ์ต้านไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพล็กซ์ได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสชนิดนี้ โดยการสกัดสารออกฤทธิ์จากยาห้ารากชนิดบดผง (fine powdered herbs) และไม่บดผง (unprocessed herbs) ด้วยวิธีต้มเดือดและต้มเคี่ยว แล้วนำมาทดสอบกับเชื้อไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพล็กซ์ ชนิดที่ 1 สายพันธุ์ KOS ด้วยวิธี plaque reduction พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เชื้อบิว (Vero cell) และสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้ ให้ผลดังนี้ ยาห้ารากแบบบดผงต้มเดือด (B1) และต้มเคี่ยว (S1) มีค่าความเข้มข้นที่ไม่มีพิษต่อเซลล์เท่ากับ 0.625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและ 0.312 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนยาห้ารากแบบไม่บดผงแบบต้มเดือด (B2) และต้มเคี่ยว (S2) มีค่าความเข้มข้นที่ไม่มีพิษต่อเซลล์เท่ากับ 0.625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและ 0.312 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัด B2 และ S2 สามารถลดจำนวน Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสได้ร้อยละ 100 ส่วนสารสกัด B1 และ S1 สามารถลดจำนวน Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสได้ร้อยละ 80.31 ± 0.25 และ 91.00 ± 0.16 ตามลำดับ ในระยะก่อนที่ไวรัสเข้าสู่เซลล์ และเมื่อทำการทดสอบในระยะหลังไวรัสเข้าสู่เซลล์ จะพบว่าสารสกัด B1 และ S1 สามารถลดจำนวนไวรัสได้ร้อยละ 31.20 ± 0.30 และ 28 ± 0.09 ในขณะที่สารสกัด B2 และ S2 เท่านั้นที่สามารถลดจำนวน Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสได้ร้อยละ 100 เทียบเท่ากับยา Acyclovir สรุปว่าวิธีการเตรียมยาห้ารากโดยการต้มเดือดและต้มเคี่ยวแบบไม่บดผงออกฤทธิ์ยับยั้งไวรัสในระยะก่อนเข้าสู่เซลล์และหลังเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าการต้มเดือดและต้มเคี่ยวแบบบดผง

ABSTRACT

Previous studies have been indicated that the Thai traditional remedy, called Ya- Ha Rak, had a medicinal property for antipyretics from the chicken pox disease therefore this remedy may be used as an anti- Herpes simplex virus (HSV) agent. Thus, we propose to assess the antiviral activities of crude extracts of Ya- Ha Rak in the form of fine powdered herbs and unprocessed herbs extraction by boiling and stewing method against HSV- 1 strain KOS *in vitro* by plaque reduction assay. The crude extracts which presented anti-Herpes simplex virus type 1 and non toxic for

¹Corresponding author: srisompo@kku.ac.th

*นักศึกษาระดับปริญญาตรี ภาควิชาเภสัชกรรมแผนไทย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**นักวิทยาศาสตร์ กลุ่มวิจัย HPV กับ EBV และการก่อมะเร็ง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

***นักวิจัยหลังปริญญาเอก กลุ่มวิจัย HPV กับ EBV และการก่อมะเร็ง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

****รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*****ศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*****ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชเวชและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Vero cell are as following. The boiling fine powder herb (B1) and stewing fine powder herb (S1) exhibited non toxic concentration (IC) as 0.625, 0.312 , and the results for boiling unprocessed herb (B2) and stewing unprocessed herb (S2) exhibited non toxic concentration (IC) 0.625 and 0.312 respectively. The B1 and S1 could reduce virus infection in Vero cell for 80.31 ± 0.25 and 91.00 ± 0.16 while the B2 and S2 could reduce virus infection in Vero cell for 100 percent in pre-infection stages of HSV-1. For post infection stage of HSV-1 the B1 and S1 could reduce virus infection in Vero cell for 31.20 ± 0.30 and 28 ± 0.09 while the crud extract B2 and S2 could reduce virus infection in Vero cell for 100 percent as a Acyclovir. For conclusion Ya-Ha-Rak remedy preparing by boiling and stewing with unprocessed herb exhibit antiviral infection for pre-infection and post-infection stage better than preparing with boiling and stewing by fine powder herb.

คำสำคัญ: ไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพล็กซ์ ชนิดที่ 1 ยาห้ารากฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัส

Keywords: Herpes simplex virus type 1, Ya-Ha-Rak, Antiviral activity

บทนำ

ไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพล็กซ์ ชนิดที่ 1 เป็นไวรัสที่จัดอยู่ในวงศ์ *Herpesviridae* มีขนาดประมาณ 150-200 นาโนเมตร ประกอบด้วยสารพันธุกรรมดีเอ็นเอสายคู่ (Double stranded deoxyribonucleic acid) อยู่เป็นเส้นตรง บรรจุอยู่ในโปรตีนที่หุ้มล้อมสารพันธุกรรม เรียกว่า แคพซิด (capsid) และมีชั้นไขมันคือ เอนเวลลอป (envelope) ห่อหุ้มไว้ เอนเวลลอปประกอบด้วยไกลโคโปรตีน (glycoprotein) หลายชนิด ระหว่างแคพซิดและเอนเวลลอปมีชั้น เทกูเมนต์ (tegument) [1]

เริม (Herpes simplex) เป็นโรคติดต่อที่เกิดจากการได้รับเชื้อไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพล็กซ์ ชนิดที่ 1 จากการสัมผัสโดยตรงกับผู้ป่วยโรคเริม เช่น การคั้นน้ำแก้วเดียวกันกับผู้ป่วย หรือ การใช้ลิปสติกแท่งเดียวกันกับผู้ป่วย เป็นต้น ซึ่งโรคนี้เป็นโรคที่รู้จักมาอย่างยาวนาน [2] ลักษณะรอยโรคของเริม จะเกิดตุ่มน้ำใส บวมแดง และมีอาการแสบคัน บริเวณปาก และเยื่อเมือกบริเวณริมฝีปาก [3-4] นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยมากมายที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับไวรัสชนิดนี้ และพบว่าเชื้อไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพล็กซ์ ชนิดที่ 1 สามารถก่อให้เกิดอาการที่รุนแรงได้ เช่น กระจกตาและเยื่อตาอักเสบ [1, 5-6] และอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบ [7-9] ซึ่งหลังจากติดเชื้อจะพบว่าไวรัสสามารถแอบแฝงอยู่ในร่างกายโดยไม่แสดงอาการใดๆ แต่เมื่อภูมิคุ้มกันลดลง หรือ ได้รับปัจจัยเสี่ยงจะทำให้กลับมาเกิดโรคนี้ขึ้นอีกเป็นระยะๆ ในปัจจุบันโรคเริมสามารถรักษาให้หายได้ด้วยการใช้ยาแผนปัจจุบัน ชนิดของยาที่ใช้รักษาจะมีทั้งรูปแบบของยารับประทาน ยาฉีด ยาหยอดและยาทา เช่น ยาอะไซโคลเวียร์ (Acyclovir) เป็นยาในกลุ่มต้านไวรัสที่ช่วยชะลอการเติบโตและลดการแพร่กระจายของไวรัส แต่ผลข้างเคียงของการใช้ยานี้ในผู้ป่วยบางราย คือ เกิดการคลื่นไส้ อาเจียน ปัสสาวะบ่อย ปวดท้อง กระจกตาอักเสบ ไม่อยากอาหารหรืออ่อนแรง [10]

ยาสมุนไพร คือ ยาที่ได้จากพืช สัตว์ แร่ธาตุ ที่ยังไม่ได้ผสมปรุงหรือแปรสภาพ [11] ซึ่งเป็นยาที่มีผลข้างเคียงน้อย คำรับยาห้าราก เป็นคำรับที่มีอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ โดยจะมีส่วนผสมของรากพืช 5 ชนิด คือ รากชิงช้า (*Capparis micracantha* DC.) รากเท้าชายม่อม (*Clerodendrum indicum* (L.) Kuntze) รากมะเดื่อชุมพร (*Ficus racemosa* L.) รากคนทา (*Harrisonia perforata* (Blanco) Merr.) และรากย่านาง (*Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels) มีสรรพคุณใช้บรรเทาอาการไข้ [12] นอกจากนี้ยังพบข้อมูลที่ว่ายาห้ารากมีสรรพคุณใช้บรรเทาอาการไข้โดยเฉพาไข้ฉ้อฉล เช่น เริม งูสวัด สุกใส หัด หรือพิษไข้อื่นๆ [13-14]

เนื่องจากตำรับยาห้ำรากล เป็นยาสมุนไพรที่รู้จักกันมาอย่างยาวนาน และสามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่น ประกอบกับงานวิจัยที่ผ่านมา ยังมิได้ศึกษาคุณสมบัติและประสิทธิภาพของยาตำรับดังกล่าวต่อการติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 1 ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาฤทธิ์ของตำรับยาห้ำรากลในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ รวมทั้งเปรียบเทียบวิธีเตรียมยาตำรับห้ำรากลเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพต่อการต้านเชื้อสูงสุด

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อ HSV-1 ของสารสกัดหยาบจากยาห้ำรากล
2. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการเตรียมสารสกัดหยาบจากยาห้ำรากลที่แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อ HSV-1

วิธีการวิจัย

การเตรียมยาห้ำรากล

ในการศึกษานี้ ยาตำรับห้ำรากลจะถูกเตรียมเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ 1 แบบบดผง และชนิดที่ 2 แบบไม่บดผง โดยตัวอย่างรากลซึ่ง (1.2 กิโลกรัม) รากท้ายขมอม (1 กิโลกรัม) รากมะเดื่อชุมพร (3.3 กิโลกรัม) รากคนทา (1.4 กิโลกรัม) และ รากย่านาง (1.4 กิโลกรัม) ที่เก็บจากพื้นที่บริเวณจังหวัดขอนแก่น ซึ่งผ่านการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางพฤกษศาสตร์ โดยอาจารย์สาขาเภสัชเวทและพิษวิทยา จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จะถูกนำล้างทำความสะอาดและอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) จนแห้งสนิท สำหรับการเตรียมยาตำรับห้ำรากลชนิดบดผง รากที่ผ่านการอบจนแห้งจะถูกนำมาบดเป็นผงและร่อนผ่านร่อนยาที่มีรูขนาด 80 เมส (mesh) จากนั้นเก็บยาทั้งสองชนิดในภาชนะที่ปิดสนิท

การสกัดสารออกฤทธิ์จากยาห้ำรากล

สารสกัดหยาบจากยาตำรับห้ำรากลจะถูกสกัดโดยวิธีการต้มเดือดและการต้มเคี่ยว ซึ่งในการสกัดแบบต้มเดือดนั้น จะเริ่มจากผสมผงสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ๆ ละ 200 กรัม (g) เข้าด้วยกัน จากนั้นเติมน้ำปริมาตร 500 มิลลิลิตร (ml) ต้มจนเดือดและกรองโดยใช้กระดวยกรองขนาด 110 มิลลิเมตร (mm) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) และทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง lyophilizer (FreeZone 2.5 Liter -50C Benchtop Freeze Dryers, Labconco, Kansas, USA)

สำหรับการสกัดหยาบจากยาตำรับห้ำรากลโดยวิธีการต้มเคี่ยว จะทำการชั่งรากลสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ๆ ละ 200 g แล้วผสมด้วยกัน จากนั้นเติมน้ำปริมาตร 500 ml ต้มเคี่ยวจนเหลือปริมาตร 1 ส่วนใน 3 ส่วน และนำไปกรองโดยใช้กระดวยกรองขนาด 110 mm และทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง lyophilizer

เซลล์เพาะเลี้ยงและการเตรียมไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 1

เซลล์เยื่อผิวหนังไตของลิงสีเขียวแอฟริกัน (Vero cell) จะถูกใช้สำหรับการเตรียมเชื้อไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 1 และใช้สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสของสารสกัดจากยาห้ำรากล โดยเซลล์ชนิดนี้จะถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ประกอบด้วยร้อยละ 10 ของซีรัมตัวอ่อนลูกวัว (Fetal bovine serum) (Gibco, Thermofisher, New Zealand) และสารละลายยาปฏิชีวนะชนิด เพนนิซิลิน-สเตรปโตมัยซิน (penicillin-streptomycin) ความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (IU/mL) ในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 37°C คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เข้มข้นร้อยละ 5

เชื้อไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 1 สายพันธุ์ KOS จะถูกเตรียมใน Vero cells โดยทำการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวใน Vero cell ด้วยอัตราส่วนของตัวแทนต่อเป้าหมายการติดเชื้อ (Multiplicity of Infection, MOI) เท่ากับ 0.01 หลังจากทำการติดเชื้อนาน 72 ชั่วโมง ในสภาวะในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 37°C องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) คาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 5 จะทำการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยการปั่นแยกที่ความเร็ว $300\times g$ นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นทำการหา

ปริมาณไวรัส (Viral titers) ที่ผลิตได้ด้วยวิธี plaque assay ซึ่งปริมาณไวรัสที่ต้องการจะมีค่าเท่ากับ 10^6 PFU/ml. ไวรัสที่เตรียมได้จะถูกเก็บในตู้แช่แข็งซึ่งมีอุณหภูมิ -80°C

การศึกษาและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) ของสารสกัดหยาดจากยาห่าราก

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงของสารสกัดหยาดจากยาดำรับห่ารากจะทำการทดสอบด้วยวิธี MTT assay โดยทำการบ่มสารสกัดหยาดที่ได้เจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ กันที่ 5, 2.5, 1.25, 0.625, และ 0.312 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (mg/ml) ด้วยวิธีการเจือจางแบบ 2 เท่าต่อเนื่อง (Serial 2-fold dilution) จำนวน 100 ไมโครลิตร (μl) กับ Vero cell ที่ได้เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงชนิด ชนิด 96 หลุม ที่มีจำนวน 1×10^4 เซลล์ ต่อหลุม ในสภาวะอุณหภูมิ 37°C คาร์บอนไดร็อกไซด์เข้มข้น ร้อยละ 5 นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการเติมสารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 5 mg/ml (Applichem, Darmstadt, Germany) ปริมาตร 10 μl ลงในทุกหลุม และบ่มนาน 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม DMSO (Sigma-Aldrich, Germany) จำนวน 100 μl ลงในทุกหลุม และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่อง microplate reader (TECAN; P. intertrade equipments Co, LTD.) ร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) จะถูกคำนวณโดยสมการ (17)

$$\text{ร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัดหยาด}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของเซลล์ควบคุม}} \times 100$$

จากนั้นจึงคำนวณหาค่า half-maximum Cytotoxic concentration (CC_{50} ; ค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารที่ทำให้เซลล์ตาย ร้อยละ 50) และค่า subtoxic concentration (SC; ค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดไม่น้อยกว่าร้อยละ 90)

การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพลกซ์ชนิดที่ 1 ในระยะก่อนเข้าสู่เซลล์

เมื่อผลการทดสอบของสารสกัดหยาดให้ผลร้อยละของการยับยั้งการติดเชื้อมากกว่าร้อยละ 80 จะทำการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพลกซ์ชนิดที่ 1 ในระยะก่อนเข้าสู่เซลล์ โดยสารสกัดหยาดที่มีความเข้มข้น เท่ากับ SC จะนำมาบ่มร่วมกับเชื้อ HSV-1 ที่มีปริมาณ 500 PFU/mL ที่อุณหภูมิ 37°C ในเวลาต่าง ๆ กัน 60 นาที โดยทำการผสมไวรัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมผลลบ (Negative control) สำหรับตัวควบคุมผลบวก (Positive control) จะใช้การบ่มร่วมกันของไวรัสกับสารละลาย Dextran sulfate เข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส HSV ได้ เมื่อครบเวลา สารผสมทั้งหมดข้างต้น จำนวน 100 μl จะถูกผสมร่วมกับ Vero cell จำนวน 9×10^4 เซลล์ ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม ในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 37°C คาร์บอนไดร็อกไซด์เข้มข้นร้อยละ 5 นาน 1 ชั่วโมง จากนั้น ดูดสารผสมออก ทำการล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วยสารละลาย PBS (pH 7.5) 2 ครั้ง และอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM อีกหนึ่งครั้ง ตามด้วยการเติมสารละลาย CMC ความเข้มข้น ร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร (w/v) (Sigma chemical company, USA) (0.8% CMC, DMEM) แล้วบ่มในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 37°C คาร์บอนไดร็อกไซด์เข้มข้นร้อยละ 5 นาน 72 ชั่วโมง หลังจากครบเวลา ทำการตรึง (Fix) เซลล์ ด้วยสารละลาย Formalin เข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร (v/v) (V.S.Chem house, Thailand) นาน 30 นาที แล้วย้อมเซลล์ด้วยสารละลาย crystal violet เข้มข้น ร้อยละ 3 w/v นาน 30 นาที จำนวน Plaque ที่เกิดขึ้นจะถูกนับ ซึ่ง ค่าร้อยละของการยับยั้งการติดเชื้อ (% inhibitory activity) และ IC_{50} สามารถคำนวณตามสมการดังนี้

$$\text{ร้อยละของการยับยั้งการติดเชื้อ} = \frac{\text{จำนวน plaque กลุ่ม negative control} - \text{จำนวน plaque กลุ่มสารสกัดหยาด}}{\text{จำนวน plaque กลุ่ม negative control}} \times 100$$

การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพลกซ์ชนิดที่ 1 ในระยะหลังเข้าสู่เซลล์

การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพลกซ์ชนิดที่ 1 ในระยะหลังเข้าสู่เซลล์ ทำได้โดยการนำเชื้อ HSV-1 ที่มีปริมาณ 500 PFU/mL มาบ่มร่วมกับ Vero cell จำนวน 9×10^4 เซลล์ ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จากนั้น ดูดสารผสมออก ทำการล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย สารละลาย PBS (pH 7.5) 2 ครั้ง และอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM อีกหนึ่งครั้ง ตามด้วยการเติมสารละลาย CMC ความเข้มข้น ร้อยละ 0.8 w/v (0.8% CMC) แล้วบ่มในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 37 °C คาร์บอนไดออกไซด์ เข้มข้นร้อยละ 5 นาน 72 ชั่วโมง โดยตัวควบคุมผลลบ (Negative control) จะทำการผสมอาหารเลี้ยงเซลล์แทนสารสกัดหยาบในสารละลาย CMC เช่นเดียวกันตัวควบคุมผลบวก (Positive control) จะใช้การผสมยา Acyclovir เข้มข้น 5 µg/ml แทนสารสกัดหยาบ หลังจากครบเวลา ทำการตรึง (Fix) เซลล์ ด้วยสารละลาย Formalin เข้มข้น ร้อยละ 10 v/v นาน 30 นาที แล้วย้อมเซลล์ด้วยสารละลาย crystal violet เข้มข้น ร้อยละ 3 w/v นาน 30 นาที จำนวน Plaque ที่เกิดขึ้นจะถูกนับซึ่ง ค่าร้อยละของการยับยั้งการติดเชื้อ (% inhibitory activity) และ IC_{50} สามารถคำนวณโดยสมการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

การวิเคราะห์ด้วยสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำเสนอในรูปแบบของ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนเฉลี่ย (Mean $\pm$ SD) และค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มข้อมูลจะถูกวิเคราะห์ด้วย Student's t-test จากโปรแกรม GraphPad Prism (รุ่น 8.0.2, USA) การทดลองแต่ละการทดลองจะทำการทดสอบอย่างน้อย 3 ครั้ง ต่าง ๆ กัน

ผลการวิจัย

ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากยาห้ำรากล่อเซลล์เยื่อผิว

ดังแสดงในตารางที่ 1 การสกัดยาห้ำรากล่อเซลล์ด้วยวิธีการต้มเคี่ยว (B1) ให้ค่าร้อยละผลผลิต เท่ากับ 6.49 ± 0.75 และเมื่อทำการสกัดด้วยวิธีต้มเคี่ยว (S1) จะให้ผลดังกล่าว เท่ากับ 6.18 ± 0.54 ในขณะที่การสกัดยาห้ำรากล่อเซลล์ไม่ต้มเคี่ยวด้วยวิธีต้มเคี่ยวและต้มเคี่ยว (B2 และ S2) ให้ผลผลิตร้อยละ 2.44 ± 0.23 และ 2.93 ± 0.61 ตามลำดับ ซึ่งในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากยาห้ำรากล่อนั้น จะใช้ทำการทดสอบด้วยวิธี MTT assay โดย Vero cell เป็นเซลล์ทดสอบ ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของสารสกัด B1 และ S1 ที่ทำให้ค่าร้อยละของอัตราการรอดชีวิตของ Vero cell เท่ากับร้อยละ 50 เท่ากับ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (mg/ml) เท่ากัน ซึ่งความเข้มข้นที่ 0.625 mg/ml ของสารสกัด B1 ทำให้ Vero cell มีค่าร้อยละของอัตราการรอดชีวิต เท่ากับ 90 ในขณะที่ S1 มีความเข้มข้น เท่ากับ 0.312 mg/ml จึงจะทำให้ค่าร้อยละของอัตราการรอดชีวิตของ Vero cell เท่ากับร้อยละ 90 (ตารางที่ 2) สำหรับในส่วนของความเข้มข้นของ B2 และ S2 ที่ทำให้ค่าร้อยละของอัตราการรอดชีวิตของ Vero cell เท่ากับร้อยละ 50 จะมีค่า 10 mg/ml เท่ากัน และค่าความเข้มข้นของสารสกัด B2 และ S2 ที่ 0.625 mg/ml และ 0.312 mg/ml ก็ทำให้ค่าร้อยละของอัตราการรอดชีวิตของ Vero cell เท่ากับร้อยละ 90 (ตารางที่ 2) ดังนั้น ที่ระดับความเข้มข้นไม่เกิน 0.625 mg/ml ของ B1 และ B2 และ 0.312 mg/ml ของ S1 และ S2 จะไม่เป็นพิษต่อเซลล์เยื่อ ซึ่งเหมาะสมและดีที่สุดสำหรับการนำมาใช้เพื่อทำการทดลองต่อไป

ฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ในระยะก่อนเข้าสู่เซลล์ของสารสกัดของสารสกัดหยาบจากยาห้ำรากล่อ

เพื่อที่จะศึกษาผลของการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากยาห้ำรากล่อการต้านเชื้อ HSV-1 คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ดังกล่าวด้วยวิธี plaque reduction ในระยะก่อนเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ HSV-1 ดังแสดงในตารางที่ 3 สารสกัดหยาบ และ สารละลาย Dextran sulfate สามารถลดจำนวน plaque ที่เกิดจากการติดเชื้อ HSV-1 ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยในการเตรียมสารสกัด เวลา และลักษณะของเซลล์เยื่อ ที่เวลา 60 นาที สารสกัด B2 และ S2 สามารถต้านเชื้อ HSV-1

ในระยะก่อนเข้าสู่เซลล์ได้ร้อยละ 100 ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัด B1 และ S1 (B1: ร้อยละ 80.31 ± 0.25 ; S1 : ร้อยละ 91.00 ± 0.16) สำหรับ Dextran sulfate มีค่าร้อยละการผ่านเชื้อชนิดนี้ในระยะก่อนเข้าสู่เซลล์ เท่ากับ 89.62 ± 0.05 ดังนั้นข้อมูลข้างต้นจึงชี้ให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากยาห้ารากมีฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ในระยะก่อนเข้าสู่เซลล์

ฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ในระยะหลังเข้าสู่เซลล์ของสารสกัดของสารสกัดหยาบจากยาห้าราก

จากการทดลอง พบว่าสารสกัด B2 และ S2 สามารถลดจำนวน plaque ที่เกิดจากการติดเชื้อ HSV-1 ในระยะหลังเข้าสู่เซลล์ได้ร้อยละ 100 ที่เวลา 60 นาที ในขณะที่สารสกัด B1 และ S1 ไม่สามารถลดจำนวน plaque ที่เกิดจากการติดเชื้อ HSV-1 ในระยะหลังเข้าสู่เซลล์ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4 ดังนั้นในการศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบจากยาห้ารากชนิดไม่บดผงที่ได้จากวิธีการสกัดแบบต้มเดือดและต้มเคี่ยวสามารถต้านเชื้อ HSV-1 ในระยะหลังเข้าสู่เซลล์ได้

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้ ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านเชื้อ HSV-1 ของสารสกัดที่ได้จากยาห้ารากซึ่งเป็นยาที่มีสรรพคุณในการบรรเทาอาการไข้ โดยเฉพาะอาการไข้ จากโรคริม และยังเป็นยาที่ถูกบัญญัติไว้ในบัญชียาหลักแห่งชาติอีกด้วย คณะผู้วิจัยได้ทำการเตรียมยาห้าราก และสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 2 วิธี คือ การสกัดด้วยวิธีต้มเดือดและการต้มเคี่ยว ซึ่งความแตกต่างของวิธีการสกัด ไม่ทำให้เกิดความแตกต่างของค่าร้อยละผลผลิตที่ได้หลังจากการสกัด แต่เป็นที่น่าสนใจว่าลักษณะทางกายภาพของยาห้าราก ได้แก่ แบบบดผง กับ แบบไม่บดผง จะเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้การสกัดเพื่อให้ได้ร้อยละผลผลิตนั้น แตกต่างกัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบระหว่างยาห้ารากทั้งสองชนิดด้วยการสกัดวิธีเดียวกัน จะพบว่า ยาห้ารากชนิดบดผงจะให้ค่าร้อยละผลผลิตที่สูงกว่าแบบไม่บดผง ประมาณ 3 เท่า (ตารางที่ 1) การบดสมุนไพรเพื่อสกัดนั้นจะทำให้สารชนิดต่างๆ ออกมาได้มากกว่าการต้มยาทั้งรากหรือทั้งต้น [18] แต่อาจมีผลบดบังสารออกฤทธิ์ต้านไวรัส เนื่องจากมีสารที่ไม่ออกฤทธิ์ปนมาจำนวนมาก จึงอาจทำให้แสดงผลต้านไวรัสได้น้อยกว่าการที่สกัดโดยไม่บดผง อย่างไรก็ตามการวิจัยเพิ่มเติมและมีการสกัดยาห้ารากใหม่อาจได้ผลที่แตกต่างเนื่องจากข้อจำกัดในการควบคุมคุณภาพหรือการตรวจองค์ประกอบหลักของสารเคมีในยาห้าราก ซึ่งควรมีการศึกษาต่อเนื่องด้านปริมาณสารพิษเคมีที่เป็นส่วนประกอบจากการเตรียมสารสกัดด้วยวิธีต่างๆ

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ของสารสกัดดังกล่าว ทางคณะผู้วิจัยพบว่า สารสกัดหยาบจากยาห้ารากมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ HSV-1 (ตารางที่ 3) เนื่องจากการทดสอบและได้ผลเป็นครั้งแรกทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดชนิดนี้ และเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าวงจรชีวิตของเชื้อไวรัสนั้นเกี่ยวข้องกับเซลล์เจ้าบ้านเป็นสำคัญ [1] ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดชนิดนี้ในระยะก่อนและหลังการเข้าสู่เซลล์ของการติดเชื้อ HSV-1 ซึ่งฤทธิ์ในการต้านเชื้อ HSV-1 ในระยะก่อนเข้าสู่เซลล์นั้นเกี่ยวข้องกับปัจจัยทางด้านเวลา รวมทั้งปริมาณของไวรัสด้วย (ตารางที่ 3) และอาจจะเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากยาห้ารากนั้นมีส่วนเกี่ยวข้องกับการรบกวนบทบาทหน้าที่ของโครงสร้างที่เป็น envelope ของไวรัส ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สำคัญของเชื้อในกระบวนการเข้าสู่เซลล์ [1] เช่นเดียวกับการศึกษาของ Thongchai และคณะ [15] พบว่าสารสกัดจากพญาขอ มีฤทธิ์สามารถต้านเชื้อ HSV-1 ในระยะก่อนเข้าสู่เซลล์ ซึ่งมีสารในกลุ่ม Lupeol และ β -sitosterol [16] ซึ่งพบได้ในยาห้ารากและมีรายงานการพบสารทั้งสองตัวนี้ในมะเคือชุมพร [20] ซึ่งอาจมีฤทธิ์ยับยั้งไวรัสได้

นอกจากนี้ ยังเป็นที่น่าสนใจอีกว่า ผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4 พบว่า สารสกัดหยาบจากยาห้าราก B2 และ S2 อาจมีสารสำคัญที่มีกลไกในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ในระยะหลังเข้าสู่เซลล์ หรือ อาจกล่าวได้ว่า สารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์เจ้าบ้าน เทียบเท่ากับยา Acyclovir ซึ่งยา Acyclovir มี

คุณสมบัติในการรบกวนการทำงานของ DNA polymerase จึงทำให้ไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เจ้าบ้านได้ [19] และมีรายงานการวิจัยว่าสารกลุ่ม terpenes ในพืช *Marrubium Vulgare* สามารถรบกวนการเพิ่มจำนวนของ HSV-1 ได้ [21] ดังนั้นในการศึกษาในขั้นต่อไป จึงจำเป็นที่จะต้องสกัดแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในกลุ่ม terpenes ของยาห้ารากมาศึกษาถึงฤทธิ์ การเสริมฤทธิ์ รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ต่อเชื้อ HSV-1 ในระดับอนุชีวภาพและเนื่องจากประสิทธิภาพต่อเชื้อ HSV-1 ของสารสกัดแบบไม่บดผงโดยวิธีต้มเคี่ยวและต้มเคี่ยวเทียบเท่ากับ Acyclovir จึงน่าจะมีการนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้ร่วมกับยา Acyclovir เพื่อเพิ่มหรือเสริมประสิทธิภาพในการรักษาโรคที่เกิดจากติดเชื้อ HSV-1 ได้ที่มีการคือต่อยา Acyclovir

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้จะสำเร็จล่วงด้วยดี มิได้ หากขาดการสนับสนุน และความร่วมมือจาก บุคลากรในทุกด้านทุกฝ่าย ในภาควิชาเภสัชเวทและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และกลุ่มวิจัย HPV กับ EBV และการก่อมะเร็ง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นทุกท่าน

เอกสารอ้างอิง

1. Bhattarakosol P. Rok rerm puen Tai kong manud. 1st ed. Bangkok: Sri mueng karn pim; 2561. Thai.
2. Safeclinic. Herpes simplex [Internet].2019 [cited 2020 Oct 30]. Available from: <https://www.bangkoksafeclinic.com/th/herpesimplex/>. Thai.
3. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. The lancet. 2001; 357(9267): 1513-1518.
4. Spruance SL, Overall Jr JC, Kern ER, Krueger GG, Plam V, Miller W. The natural history of recurrent herpes simplex labialis implications for antiviral therapy. The New England Journal of Medicine 1977; 297(2): 69–75.
5. Hwang YS, Soruance SL. The epidemiology of uncommon herpes simplex virus type 1 infection. Herpes. 1999; 6:16-19.
6. Liesegang TJ. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. Cornea. 2001; 20(1): 1-13.
7. Arduino PG, Porter SR. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. Journal of Oral Pathology & Medicine. 2008; 37: 107-121.
8. Kennedy PGE, Chaudhuri A. Herpes simplex encephalitis. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 2002; 73: 237–238.
9. Sauerbrei A, Eichhorn U, Hottenrott G, Wutzler P. Virological diagnosis of herpes simplex encephalitis. Journal of Clinical Virology 2000; 17: 31–36.
10. Pobpad. Acyclovir [Internet].2019 [cited 2020 Oct 30]. Available from: <https://www.pobpad.com/acyclovir>
11. Foundation of Thai Traditional medicine Ayurveda (Jivaka Komarabhacca). 1st ed. Bangkok: Pi ga ne sha printing center; 2548. Thai.
12. National list of Essential medicines. List of herbal medicine product [Internet]. 2555 [cited 2020 Nov 7] Available from: <http://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2554/E/072/57.PDF>. Thai.

13. Khun rattan ya thai. Ya ben lo ka wi chian (Ya ha rak) [Internet]. [cited 2020 Nov 7] Available from: www.khunrattanyathai.com/product/9/Yabenlokawichian_Yaharak_Thai.
14. Khao La or. Ya ha rak sakad chanid med [Internet]. [cited 2020 Nov 7] Available from: www.itherb.com/product/54/khaolaor-KhaoLaor-harakchanidmed-60-med-kuat_Thai.
15. Thongchai S, Ekalaksananan T, Pientong C, Aromdee C, Kongyingyoes B, Seubsasana S. Anti-Herpes Simplex Virus Type 1 Activity of Crude Ethyl Acetate Extract of *Clinacanthus nutans*. kku research journal 2008; 8(2): 65-73.
16. Sakdarat S, Shuyprom A, Pientong C, Ekalaksananan T, Thongchai S. Bioactive constituents from the leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2009; 17: 1857-1860.
17. Srichan R, Korrsuwannawong S, Mala S. Evaluation of the proliferative and cell migration effect of *Clinacanthus nutans* powder on human gingival fibroblast cell line. Dental journal 2015; 35(3): 299-310.
18. Berkem. Plant extraction [Internet]. [cited 2020 Nov 8] Available from: <http://www.berkem.com/en/expertise-en/plant-extraction>
19. Roizman B. Herpes simplex viruses and their replication. Virology. 1996;2231-2295.
20. Chaware GK, Kumar V, Kumar S, Kumar P. Bioactive Compounds, Pharmacological Activity and Food Application of *Ficus racemosa*: A Critical Review. International Journal of Fruit Science. 2020; 20(2): 969-986.
21. Ghildiyal R, Prakash V, Chaudhary VK, Gupta V, Gabrani R. Phytochemicals as antiviral agents: recent updates. In Plant-derived bioactives 2020 (pp. 279-295). Springer, Singapore.

ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิต (%yield) ของสารสกัดหยาบจากยาห้ารากที่สกัดด้วยวิธีแตกต่างกัน

วิธีการสกัดยาห้าราก		ร้อยละผลผลิต (%yield)
ยาห้ารากแบบบดผง	ต้มเดือด	6.49 ± 0.75
	ต้มเคี่ยว	6.18 ± 0.54
ยาห้ารากแบบไม่บดผง	ต้มเดือด	2.44 ± 0.23
	ต้มเคี่ยว	2.93 ± 0.61

ตารางที่ 2 ร้อยละของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell survival) ของสารสกัดหยาบจากยาห้ารากที่สกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกัน

วิธีการสกัดยาห้าราก		CC ₅₀	SC
ยาห้ารากแบบบดผง	ต้มเดือด	10	0.625
	ต้มเคี่ยว	10	0.312
ยาห้ารากแบบไม่บดผง	ต้มเดือด	10	0.625
	ต้มเคี่ยว	10	0.312

ตารางที่ 3 ร้อยละของการยับยั้งไวรัส HSV-1 ในระยะก่อนเข้าสู่เซลล์ (% Inhibition) ของสารสกัดยาห้ารากที่สกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันของสารสกัด

วิธีการสกัดยาห้าราก	% Inhibition
ยาห้ารากบดเป็นผงแล้วต้มเดือด (0.625 mg)	80.31 $\pm$ 0.25
ยาห้ารากบดเป็นผงแล้วต้มเคี่ยว (0.625 mg)	91.00 $\pm$ 0.16
ยาห้ารากไม่บดผงแล้วต้มเดือด (0.312 mg)	100
ยาห้ารากไม่บดผงแล้วต้มเคี่ยว (0.312 mg)	100
Dextran	89.62 $\pm$ 0.05

ตารางที่ 4 ร้อยละของการยับยั้งไวรัส HSV-1 ในระยะหลังเข้าสู่เซลล์ (% Inhibition) ของสารสกัดยาห้ารากที่สกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันของสารสกัด

วิธีการสกัดยาห้าราก	% Inhibition
ยาห้ารากบดเป็นผงแล้วต้มเดือด (0.625 mg)	31.20 $\pm$ 0.30
ยาห้ารากบดเป็นผงแล้วต้มเคี่ยว (0.625 mg)	28 $\pm$ 0.09
ยาห้ารากไม่บดผงแล้วต้มเดือด (0.312 mg)	100
ยาห้ารากไม่บดผงแล้วต้มเคี่ยว (0.312 mg)	100
Acyclovir	100