



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการฤทธิ์การต้านเชื้อไวรัส varicella zoster ของตำรับยาเขียว

Anti-varicella zoster virus of Ya-keaw remedies

โดย ดร. ดลฤดี สงวนเสริมศรี และคณะ

30 มิถุนายน 2548



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการฤทธิ์การต้านเชื้อไวรัส varicella zoster ของตำรับยาเขียว
Anti-varicella zoster virus of Ya-keaw remedies

โดย ดร. ดลฤดี สงวนเสริมศรี และคณะ

30 มิถุนายน 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการฤทธิ์การต้านเชื้อไวรัส varicella zoster ของตำรับยาเขียว Anti-varicella zoster virus of Ya-keaw remedies

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ดร. ดลฤดี สงวนเสริมศรี	มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. ดร. สุภาพร ลำเลิศชน	มหาวิทยาลัยนเรศวร
3. ดร. สุรชาติพงษ์ พงษ์เจริญ	มหาวิทยาลัยนเรศวร
4. ดร. กัลยา ปรีชาบุญกุล	มหาวิทยาลัยนเรศวร
5. ดร. สุภาพร ภูมิอมร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
6. ดร. เดือนฉนวน พรหมขัติแก้ว	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

สนับสนุนโดยทบวงมหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ทบวงฯ และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

ตำรับยาเขียว 3 ชื่อที่ใช้แพร่หลายในประเทศไทยซึ่งใช้ในการบรรเทาอาการอีสุกอีใส หัด และไข้ ถูกนำมาทดสอบการยับยั้งการติดเชื้อไวรัส varicella zoster (VZV) ตำรับยาเขียวถูกสกัดด้วย 20% ethanol ได้นำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง IMR-90 พบว่าที่ความเข้มข้น 250 µg/ml เป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ สารสกัดได้ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ VZV ด้วยวิธี plaque reduction assay จากผลการทดลองพบว่า Pre-treatment ไวรัสด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 250 µg/ml มีผลลดการติดเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม Post-treatment ของสารสกัดยาเขียวที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์กับเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสแล้ว พบว่าไม่มีการลดลงของ plaque อย่างมีนัยสำคัญ การศึกษา มีความเป็นไปได้ที่ผลของยาเขียวในการบรรเทาอาการของอีสุกอีใสอาจเนื่องมาจากฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหรือผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย

Abstract

The three most popular brand names of Ya-keaw remedies, traditional used in Thailand for alleviation of chickenpox, measles and fever, were tested for inhibition of varicella zoster virus (VZV). The remedies were extracted by 20% ethanol and then tested their toxicity in IMR-90 cell line. The concentration up to 250 µg/ml was not toxic to the cell line. The extracts were evaluated their efficiency for inhibition of VZV by plaque reduction assay. The results showed that pre-treatment of the virus with the extract at the concentration of 250 µg/ml significantly reduced virus infection in the cell line. However, post-treatment of the extract at the highest non-toxic concentration with the cell line after infection has not significantly reduced the number of plaque. It may be suggested that the ability of Ya-keaw remedies to alleviate the clinical sign of chickenpox may result from their antibacterial activities or immunostimulation effects.

Executive summary

สารสกัดชาเขียวที่สกัดโดย 20% alcohol ทั้ง 3 ขี้ห่อ ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml โดยบ่มกับไวรัส ก่อนที่จะให้ infect เข้าเซลล์เพื่อดูว่าสารสกัดมีฤทธิ์ neutralize ไวรัสหรือไม่ (pre-treatment) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการติดเชื้อ VZV อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ virus control ทั้งนี้จะเนื่องจาก interaction ของสารสกัดชาเขียวกับ VZV particle ทำให้ไวรัสถูก inactivate และเสียความสามารถในการทำให้เซลล์ติดเชื้อ โดยที่ความเข้มข้นนี้ยังเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ IMR-90 แต่ในขณะที่การทดสอบการทำ post-treatment เพื่อดูการยับยั้งการเพิ่มจำนวน (replication) ของไวรัส พบว่าสารสกัดชาเขียวทุกขี้ห่อไม่สามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัสได้ในทุกๆ ความเข้มข้น สำหรับสารสกัดชาเขียวที่ใช้สำหรับการทดสอบ pre-treatment ทำให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของไวรัส ของชาเขียวขี้ห่อ A, B และ C ลดลง 10%, 15.1% และ 10.65% ตามลำดับ จะบอกได้เบื้องต้นว่าในชาเขียวน่าจะมีสารบางชนิดจากพืชสมุนไพรที่เป็นองค์ประกอบของชาเขียวที่ทำหน้าที่ยับยั้งไวรัส VZV ได้ การศึกษาในขั้นต่อไปควรมีการทดสอบสมุนไพรเดี่ยวของชาเขียว ซึ่งอาจจะทำให้เห็นผลของสมุนไพรเดี่ยวได้ดียิ่งขึ้นและลดความเป็นพิษของสมุนไพรบางตัวลง อย่างไรก็ตามผลของการใช้ชาเขียวในการลดอาการของโรค อาจเนื่องจากฤทธิ์ด้านแบคทีเรียหรือฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายก็ได้

3. เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

เชื้อไวรัส varicella zoster virus (VZV) ทำให้เกิดโรคอีสุกอีใส (chickenpox) และโรคงูสวัด ถึงแม้โรคอีสุกอีใสจะไม่ใช่วิถีร้ายแรง ผู้ป่วยสามารถหายได้เองภายในเวลา 4-5 วัน เพียงแต่รับประทานยาตามอาการเช่น ยาลดไข้ ยาแก้คัน อย่างไรก็ตามอาจส่งผลให้เกิดโรคแทรกซ้อนได้ อาการแทรกซ้อนที่พบบ่อยได้แก่ การติดเชื้อแบคทีเรียบนผิวหนัง ทำให้ตุ่มคันเกิดเป็นหนองและเป็นแผลเป็นตามมา และในบางรายอาจมีอาการแทรกซ้อนของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจได้ นอกจากนี้โรคนี้เมื่อหายแล้วมักจะมีเชื้อหลบอยู่ที่ปมประสาท ซึ่งอาจก่อให้เกิดอาการของโรคงูสวัดได้ในภายหลังถ้าร่างกายอ่อนแอหรือภูมิคุ้มกันลดลง (Chanock et al., 1996) ดังนั้นบางรายที่มีอาการรุนแรงอาจต้องใช้ยายับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัส และยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียเพื่อป้องกันอาการแทรกซ้อน ซึ่งยาด้านไวรัสที่ใช้ในปัจจุบันคือ acyclovir มีราคาสูงและมักต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ ในประเทศไทยจึงมีการให้ยานี้เฉพาะผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงและในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำเท่านั้น นอกเหนือจากนั้นจะให้เฉพาะยาลดการติดเชื้อแบคทีเรียซ้ำซ้อนในบางราย

การแพทย์ทางเลือก (Alternative medicine) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ยาจากสมุนไพรในการรักษาตนเองเบื้องต้นจึงมีความจำเป็นต่อการพึ่งพาตนเอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรคที่แสดงอาการค่อนข้างเด่นชัดโดยไม่ต้องให้แพทย์ตรวจวินิจฉัย

‘ยาเขียว’ เป็นตำรับยาที่มีการระบุปริมาณพืชสมุนไพรส่วนประกอบ และสรรพคุณในการใช้เป็นยาลดไข้ แก้อ่อนใน แก้อีสุกอีใส และพิษหัด ไว้ในตำรายาแผนโบราณต่างๆ เช่น ตำราแพทยศาสตร์สงเคราะห์ฉบับหลวง และตำราคัมภีร์แผนโบราณของขุนโสดาบรรณลักษณ์ ซึ่งในปัจจุบันยาเขียวเป็นหนึ่งในยาตำรับที่ได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นยาแผนโบราณ และได้มีการผลิตออกมาจำหน่ายวางขายอยู่ทั่วไปตามท้องตลาด โดยนิยมใช้กันมาอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน (วิทยานารถไพศาล, 2538) ทั้งนี้ได้ยึดเอาเฉพาะความรู้ดั้งเดิมที่ปรากฏอยู่ในตำรายาแผนโบราณมาใช้ในการผลิตเพื่อจำหน่ายและการบำบัดโรค โดยที่ยังไม่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในแง่ของฤทธิ์ทางชีวภาพของยาตำรับเหล่านี้มาสนับสนุนความเป็นไปได้ในการใช้ตามสรรพคุณที่ได้ระบุไว้

ข้อมูลจากองค์การอาหารและยาระบุว่าในปัจจุบันมียาเขียวขึ้นทะเบียนเป็นยาแผนโบราณวางขายอยู่ทั่วไปตามท้องตลาดทั้งสิ้น 128 ตำรับ แต่ละตำรับมีองค์ประกอบต่างๆกันไป โดยสมุนไพรที่เป็นองค์ประกอบหลักจาก 3 ตำรับได้แก่ พืชนาคน์ (*Artemisia indica* Wild. Var. *heyneana* Pampan) พิมเสน (*Blumea basalmitera*) จันทน์แดง (*Dracaena loureiri*) และ จันทน์เทศ (*Myristica fragrans*) ยังไม่มีรายงานถึงฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิดแรก แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานฤทธิ์ด้านเชื้อ *Listeria monocytogenes* ของสารสกัดจากพืชในตระกูล *Artemisia* (Alzoreky et al., 2003) สารสกัดจากใบพิมเสนมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (Rai, 1999) ส่วนสารสกัดจากจันทน์เทศมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *Vibrio spp.* ฤทธิ์ต้านไวรัส Herpes simplex type 1 รวมทั้งฤทธิ์กดระบบภูมิคุ้มกัน (Sivarum et al., 2004)

จากการที่เราได้ใช้ตำรับยาเขียวในการบำบัดรักษาโรคติดเชื้อไวรัสบางชนิด เช่น หัด อีสุกอีใส และงูสวัดอย่างต่อเนื่องมาเป็นเวลานาน ทั้งๆที่ยังไม่มีข้อมูลทางด้านวิทยาศาสตร์มาสนับสนุนความเป็นไปได้ในการใช้ยาตำรับดังกล่าว ดังนั้นข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัส ที่มีการระบุสรรพคุณในการรักษาโรคอีสุกอีใส น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ประกอบการตัดสินใจในการเลือกใช้อย่างถูกต้องทดแทนการใช้ยาแผนปัจจุบันที่มีราคาแพง และนำไปสู่การพึ่งตนเองทางด้านการแพทย์ในที่สุด นอกจากนี้ข้อมูลดังกล่าวอาจนำไปใช้ในการวิจัยเชิงลึกต่อไป เช่น การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบหลักของตำรับ สารออกฤทธิ์ (Active ingredients) การพัฒนาสูตรและรูปแบบตำรับ เป็นต้น

วิธีการทดลองและผลการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดจากตำรับยาและตรวจสอบ Thin layer chromatography (TLC) fingerprint

ได้ทำการสกัดยาเขียว 3 ตำรับได้แก่ ยาเขียวตราใบโพธิ์ (A) ยาเขียวตราดอกบัว (B) และ ยาเขียวตราใบห่อ (C) ด้วยเตรียมสารสกัดจากตำรับยาเขียวโดยวิธีการแช่หมัก (maceration) และการต้ม โดยนำตำรับยาเขียวมาชั่ง บันทึคน้ำหนัก แล้วแช่หมักในภาชนะปิด ด้วย 20% และ 50% เอทานอล และ น้ำ โดยใช้ปริมาตร 10 เท่า ของน้ำหนักแห้ง แช่หมักเป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที และส่วนการนำตำรับยาเขียวที่ชั่งน้ำหนักแล้วต้มกับน้ำให้เดือดปริมาตร 10 เท่า ของน้ำหนักแห้ง เป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที เมื่อถึงเวลาที่กำหนดกรองแยกส่วนของสารสกัดและกากออกจากกันโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No. 1 จากนั้นนำส่วนของสารสกัดที่ได้มาทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง rotary vacuum evaporator (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) และระเหยต่อบนหม้ออังไอน้ำ (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) สำหรับสารสกัดเอทานอล ส่วนสารสกัดน้ำทำให้แห้งโดยการแช่แข็ง โดยใช้เครื่อง lyophilizer จากนั้นรวมสารสกัดที่ได้และชั่งน้ำหนัก สารสกัดแห้งที่ได้เก็บไว้ใน dessicator เมื่อจะนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสจึงชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของสารสกัดหยาบมาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อไป

การแยกองค์ประกอบของสารสกัดจากตำรับยาเขียวโดยใช้เทคนิค TLC (Silica gel GF254, Merck) โดยดู Spots ที่เกิดขึ้นภายใต้แสง ultraviolet 254 nm ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง chloroform และ methanol สำหรับการแยกองค์ประกอบที่ไม่มีขั้ว และ ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง ethyl acetate และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ สำหรับการแยกองค์ประกอบที่มีขั้ว พบว่าตัวทำละลายผสมระหว่าง chloroform และ methanol และ ตัวทำละลายผสมระหว่าง ethyl acetate และน้ำ ที่อัตราส่วน 9:1 และ อัตราส่วน 7:3 สามารถแยกองค์ประกอบของสารได้ดีที่สุด จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดยาเขียวด้วย 20% ethanol สามารถแยกองค์ประกอบของยาเขียวได้มากที่สุด นอกจากนี้ TLC Plate ยังถูก spray ด้วย anisaldehyde-sulfuric acid reagent พบว่าเห็น spot เป็นสีส้มแดง หมายถึงว่าองค์ประกอบที่แยกได้จาก TLC น่าจะจัดอยู่ในกลุ่ม steroid หรือ terpene

2. VZV preparation and titration by plaque assay

ไวรัสที่ใช้เป็น varicella zoster virus Oka vaccine strain (Tagahashi, M. et al., 1974) หลังจากนำไวรัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในเซลล์ IMR-90 เป็นเวลา 7 วัน ได้ CPE 70-80% นำมาเตรียมเป็น cell-free virus โดย scrape เซลล์ทั้งหมดลงใน overlayed medium และ sonicated โดยใช้ MSE 100 W ultrasonic disintegrator fitted with tapered probe (21 kHz and 9 uM amplitude) 15 sec, 3 ครั้ง, โดยพัก 15 sec ระหว่างการ sonicate แต่ละครั้ง จากนั้นนำไป Centrifuge ที่ 1000 g, 15 min, 4C จากนั้นนำ supernatant ไป aliquot เป็น virus stock ที่ -70C เพื่อนำไปใช้หาปริมาณต่อไป โดยการเลี้ยง IMR-90 cells ใน 24-well plate ($2-4 \times 10^4$ cells/well) เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำ virus stock มา thaw ที่ 37C และทำ 10-fold dilution ใน MEM medium จากนั้นนำมา infect เซลล์ที่เตรียมไว้ 0.2 ml/well นำไปบ่มที่ 37C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้เกิด virus absorption จากนั้น Remove inoculum แล้วเติม maintenance medium + 1% carboxymethylcellulose จากนั้น incubate 7 วัน แล้ว fix ด้วย 10% formaldehyde in PBS แล้วย้อมด้วย 0.5% crystal violet จากนั้น นับ plaque ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของ virus stock ได้เป็น 8.4×10^2 pfu/ml ซึ่งจะใช้ไวรัสที่เตรียมนี้ในการศึกษาทั้งหมด

3. การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากยาเขียวต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ VZV ในการศึกษาครั้งนี้คือ IMR-90 cells (Human embryonic lung fibroblast cell line, ATCC) จะถูก treat ด้วยสารสกัดยาเขียวที่ความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 100, 150, 200, 250, 500 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ EMEM ที่มี 0.3% carboxymethyl cellulose (CMC) โดยมีเซลล์ควบคุมที่ได้รับเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อ นาน 4 วัน ซึ่งใช้ระยะเวลาเดียวกับที่ไวรัส infect เซลล์แล้วทำให้เกิด plaque เมื่อครบเวลาจะนำเซลล์มา fix ด้วย 5-10% formaldehyde และย้อมสีด้วย 0.2% crystal violet เทียบกับ control โดยเซลล์ที่ถูก treat ด้วยยาที่ความเข้มข้นใด ไม่ทำให้เซลล์ตาย นั่นคือเซลล์มีลักษณะเหมือนเซลล์ควบคุมจะถือว่ายาไม่มีผลต่อเซลล์เมื่อ culture นาน 4 วัน

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากยาเขียวทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$ (ตารางที่ 1) เป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดนี้และไม่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ ดังนั้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านไวรัส VZV ของสารสกัดยาเขียวจะใช้ความเข้มข้นนี้เป็นความเข้มข้นสูงสุดในการทดสอบ

ตารางที่ 1 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากยาเขียวต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

ยาเขียว	ความเข้มข้นของยา ($\mu\text{g/ml}$)					
	1000	500	250	200	150	100
A	toxic	toxic	Non toxic	Non toxic	Non toxic	Non toxic
B	toxic	toxic	Non toxic	Non toxic	Non toxic	Non toxic
C	toxic	toxic	Non toxic	Non toxic	Non toxic	Non toxic

4. ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส

ศึกษาถึงขั้นตอนในการเพิ่มจำนวนของไวรัสที่มีผลในการถูกยับยั้งจากสารสกัดจากยาเขียวโดยดูการลดการเกิด Plaque (Plaque reduction assay) เทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงที่ถูก infect ด้วยไวรัสแต่ไม่ถูก treat ด้วยสารสกัด ดังนี้

4.1 การทำ pre-treatment โดยบ่มไวรัสกับสารสกัดจากยาเขียวก่อนที่จะ infect เข้าเซลล์ แล้วดูว่าสารสกัดมีฤทธิ์ neutralize ไวรัสหรือไม่ โดยวิธีทำดังนี้

1. ปรับจำนวนเซลล์ IMR-90 2×10^5 cell/ml ลงใน 24- well plate เป็นเวลา 3-4 วัน ที่ 37°C , 5% CO_2
2. ทำความเจือจางสารสกัดยาเขียว (10mg/ml) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน ตั้งแต่ 250,150,100 และ 75 $\mu\text{g/ml}$ จากนั้นนำมา inoculate ลง 24 well plate 1 ml/well (โดยดูด culture fluid ออกจาก plate ก่อน inoculate และล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง)
3. Incubate นาน 1 hour ที่ 37°C , 5% CO_2
4. ดูดยาเขียวออกจากแต่ละ well และล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง
5. Cell control จะถูก treat ด้วย medium ที่ใช้เป็น diluent (EMEM+2% FBS)
6. เจือจางไวรัสจาก stock เป็น 1:20 ซึ่งเป็น dilution ที่เหมาะสมต่อการนับจำนวน plaque (ระหว่าง 30-300 pfu)
7. Inoculate 150 μl /well และ incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง
8. ดูดไวรัสส่วนเกินออก และ เติม EMEM ที่มี 5% FBS, Penicillin 100 unit/ml-streptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$, 0.22g% NaHCO_3 และ 0.8% Carboxymethylcellulose ปริมาตร 1 ml/well จากนั้น incubate 37°C , 5% CO_2 นาน 3-4 วัน
9. นับจำนวน plaque หลังจากการ fix เซลล์ด้วย 10% formaldehyde นาน 20 นาที และย้อมสีด้วย 0.2% crystal violet in PBS นาน 10 นาที

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเพื่อศึกษาฤทธิ์ neutralize ของสารสกัดยาเขียวต่อไวรัส

pre-treatment		no. of plaque					P value (Compare to virus control)
Ya-keaw A	conc.(ug/ml)	well 1	well 2	well 3	well 4	mean	
	250	78	74	71	79	75.5	0.050*
	200	79	81	79	82	80.25	0.267
	150	87	84	76	80	81.75	0.576
	75	88	74	83	92	84.25	0.960
	virus control	80	92	79	85	84	

pre-treatment		no. of plaque					P value (Compare to virus control)
Ya-keaw B	conc.(ug/ml)	well 1	well 2	well 3	well 4	mean	
	250	68	73	64	76	70.25	0.008*
	200	73	77	81	79	77.5	0.084
	150	78	84	80	81	80.75	0.410
	75	79	81	81	83	81	0.427
	virus control	87	78	82	84	82.75	

pre-treatment		no. of plaque					P value (Compare to virus control)
Ya-keaw C	conc.(ug/ml)	well 1	well 2	well 3	well 4	mean	
	250	72	69	69	75	71.25	0.034*
	200	69	79	75	78	75.25	0.255
	150	79	87	77	74	79.25	0.902
	75	75	82	75	79	77.75	0.562
	virus control	86	73	82	78	79.75	

จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดยาเขียวทั้ง 3 ชนิดมีผลยับยั้งการติดเชื้อ VZV อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้นของยาเขียวที่ 250 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเทียบกับ virus control (ไม่มียาเขียวแต่มีไวรัส) แสดงว่ายาเขียวที่ความเข้มข้นนี้น่าจะมีฤทธิ์ neutralize ไวรัส ทำให้ความสามารถของไวรัสในการ infect cell ลดลง

4.2 การทำ post-treatment เพื่อดูการยับยั้งการเพิ่มจำนวน (replication) ของไวรัส โดยการ treat infected cells ด้วยสารสกัดเพื่อที่จะดูว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนหรือไม่ โดยทำเช่นเดียวกันกับการทำ pre-treatment แต่เซลล์จะถูก infect ก่อน 1 ชั่วโมง และดูไวรัสส่วนเกินออกก่อน เติมนยาเขียว 1ml ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน และ incubate นาน 3-4 วัน โดยเปรียบเทียบผลกับการใช้ยา Acyclovir โดยใช้ Acyclovir ที่ความเข้มข้น 200, 250, 300 และ 350 $\mu\text{g/ml}$

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเพื่อศึกษาการยับยั้งการเพิ่มจำนวน (replication) ของไวรัสของสารสกัดยาเขียว

post-treatment		no. of plaque					P value (Compare to virus control)
ACV	conc.(ug/ml)	well 1	well 2	well 3	well 4	mean	
	350	28	32	24	21	26.25	3.270×10^{-6} *
	300	36	42	39	32	37.25	9.471×10^{-6} *
	250	59	67	68	56	62.5	0.007*
	200	74	79	70	80	75.75	0.872
	virus control	77	75	81	72	76.25	

post-treatment		no. of plaque					P value (Compare to virus control)
Ya-keaw A	conc.(ug/ml)	well 1	well 2	well 3	well 4	mean	
	250	58	64	69	65	64	0.094
	200	69	76	72	67	71	0.847
	150	75	70	69	66	70	0.651
	75	71	63	68	79	70.25	0.756
	virus control	63	74	78	72	71.75	

post-treatment		no. of plaque					P value (Compare to virus control)
Ya-keaw B	conc.(ug/ml)	well 1	well 2	well 3	well 4	mean	
	250	64	61	67	62	63.5	0.164
	200	63	69	67	67	67.75	0.577
	150	62	68	70	71	67.75	0.886
	75	59	64	67	75	66.25	0.657
	virus control	67	69	75	62	68.25	

post-treatment		no. of plaque					P value (Compare to virus control)
Ya-keaw C	conc.(ug/ml)	well 1	well 2	well 3	well 4	mean	
	250	76	59	68	67	67.5	0.166
	200	77	80	74	85	79	0.098
	150	68	64	73	75	70	0.277
	75	83	78	69	71	75.25	0.642
	virus control	77	75	70	72	73.5	

จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดยาเขียวทั้ง 3 ชนิดไม่มีผลยับยั้งการติดเชื้อ VZV หลังการเกิด infection อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สารสกัดยาเขียว (20% alcohol extraction) ที่บ่มกับไวรัส ก่อนที่จะให้ infect เข้าเซลล์เพื่อดูว่าสารสกัดมีฤทธิ์ neutralize ไวรัสหรือไม่ พบว่าสารสกัดยาเขียวทั้ง 3 ยี่ห้อ ที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ยับยั้งการติดเชื้อ VZV อย่างมีนัยสำคัญทั้งนี้น่าจะเนื่องจาก interaction ของสารสกัดยาเขียวกับ VZV particle ทำให้ไวรัสเสียความสามารถในการทำให้เซลล์ติดเชื้อ โดยที่ความเข้มข้นนี้ยังเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ IMR-90 แต่ในขณะที่การทดสอบการทำ post-treatment เพื่อดูการยับยั้งการเพิ่มจำนวน (replication) ของไวรัส พบว่าสารสกัดยาเขียวทุกยี่ห้อไม่สามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัสได้ในทุกๆความเข้มข้น ทั้งนี้ถึงแม้ว่าสารสกัดยาเขียวที่ใช้จะทำให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของไวรัส ของยาเขียวยี่ห้อ A, B และ C ลดลงเพียง 10%, 15.1% และ 10.65% ตามลำดับก็ตาม แต่ข้อมูลนี้น่าจะบอกได้เบื้องต้นว่าในยาเขียวน่าจะมีสารบางชนิดจากพืชสมุนไพรที่เป็นองค์ประกอบของยาเขียวที่ทำหน้าที่ยับยั้งไวรัส VZV ได้ การศึกษาในขั้นต่อไปควรจะมีการทดสอบสมุนไพรเดี่ยวของยาเขียว ซึ่งอาจจะทำให้เห็นผลของสมุนไพรเดี่ยวได้ดียิ่งขึ้นและลดความเป็นพิษของสมุนไพรบางตัวลง นอกจากนี้การใช้ยาเขียวในการรักษาโรคหัด อีสุกอีใส และลดไข้ ที่ใช้กันนั้นถ้าใช้ในช่วงต้นของการติดเชื้อน่าจะให้ผลดีกว่าใช้ในระยะหลังๆ เนื่องจากยาเขียวมีความสามารถ inactivate เชื้อไวรัสที่อยู่นอกเซลล์ อย่างไรก็ตาม ผลของการใช้ยาเขียวในการลดอาการของโรคอาจเนื่องจากฤทธิ์ด้านแบคทีเรียหรือฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายก็ได้

มีรายงานฤทธิ์การต้านเชื้อไวรัสของพืชบางชนิดเช่น Blackcurrent (*Ribes nigrum* L.)(Suzutani T. et al., 2003) มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส HSV-1, HSV-2 และ VZV ภายในเซลล์เนื่องมาจากการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ นอกจากนี้มีรายงานว่าสาร glycyrrhizin (Baba M., 1987) ซึ่งเป็นสารสกัดจากรากชะเอม (*Glycyrrhiza radix*) มีผลยับยั้งทั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส (post-treatment) และมีผล inactivate ต่อเชื้อไวรัสด้วย นอกจากนี้พืชแล้วยังมี red microalgal polysaccharide ซึ่งสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็กสีแดง (red microalgae); *Porphyridium* sp., *P. aeruginium* และ *Rhodella reticulata* ก็พบว่า มีผลยับยั้ง

ทั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส (post-treatment) และมีผล inactivate ต่อเชื้อไวรัสด้วยเช่นกัน ในกรณีของตำรับยานั้น ไม่พบรายงานว่าตำรับยาใดมีผลต้านเชื้อไวรัสชนิดนี้เลย

Reference

วิทยานารถไพศาล, (2538) การศึกษาการประสานงานยาแผนโบราณสู่ระบบการบริการสาธารณสุขระดับชุมชน สถาบันการแพทย์แผนไทย, กรุงเทพฯ

Alzoreky N.S (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consume in Asia. International Journal of Food Microbiology, 80, 223-230.

Baba M, Shigeta S. (1987). Antiviral activity of glycyrrhizin against varicella-zoster virus in vitro. Antiviral Res, 7(2), 99-107.

Chanock, R.M., Joseph, L.M., Monath, T.P., Roizman, B. and Straus, S.E. (1996) Fields Virology. In: A.M. Arvin (Ed) Varicella zoster virus, Vol. 2. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York, p. 2950.

Rai, M. (1999). Screening of some Asteraceous plants for antimycotic activity. Compositae Newsletter, 34, 37-43.

Sivarum, V. (2004). Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epineperus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture, 237, 9-20.

Tagahashi, M., Otsuka, T., Okuno, Y., Asano, Y, Yasaki, T. (1974). Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital. Lancet ii, 1288-1290.

Suzutani T, Ogasawara M, Yoshida I, Azuma M, Knox YM. (2003). Anti-herpesvirus activity of an extract of *Ribes nigrum* L. Phytother Res, 17(6), 609-13.

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานที่ได้อยู่ในระหว่างเตรียมต้นฉบับสำหรับการลงตีพิมพ์ในวารสาร Acta Virologica