



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาคูณสมบัติของ

คอมพาวด์เอจากพืช *Salsola tuberculatiformis* และ

สารแอลฟาแมงโกสทินจากเปลือกมังคุดในการต้านการติดเชื้อ

และการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสแดงกี

โดย ดร. มยุรี ธาราสุข

พฤษภาคม 2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาคุณสมบัติของ

คอมพาวด์เอจากพืช *Salsola tuberculatiformis* และ

สารแอลฟาแมงโกสทินจากเปลือกมังคุดในการต้านการติดเชื้อและการ

อักเสบจากการติดเชื้อไวรัสแดงกี

ดร. มยุรี ธาราสุข

วิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. เพทาย เย็นจิตโสมนัส นักวิจัยที่ปรึกษา สำหรับโอกาส คำแนะนำ กำลังใจ และการสนับสนุนการทำวิจัยในโครงการนี้ในทุกๆ ด้าน

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. เกศรา ณ บางช้าง และ Prof. Guy Haegeman ที่ปรึกษา โครงการวิจัย ที่กรุณาอนุเคราะห์สารสกัดจากธรรมชาติซึ่งเป็นส่วนสำคัญของโครงการวิจัยนี้ อีกทั้งยังให้คำแนะนำกำลังใจและการสนับสนุนในทุกๆ ด้านเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณอาจารย์ นักวิจัย นักวิทยาศาสตร์ ผู้ช่วยวิจัย นักศึกษา และเพื่อนร่วมงานใน หน่วยอณูเวชศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลมหาวิทยาลัยมหิดล และวิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ทุกท่านในการสนับสนุน การปฏิบัติงานของผู้วิจัยทั้งทางตรงและทางอ้อม

ท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ หน่วยอณูเวชศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับการสนับสนุนสถานที่ อุปกรณ์-เครื่องมือวิจัย และสารเคมี พื้นฐานต่างๆ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญยิ่งต่องานวิจัยนี้ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องที่เอื้อให้การดำเนินงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามเป้าหมาย ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า องค์ความรู้และผลผลิตที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นพื้นฐานในการศึกษาพัฒนาต่อยอด ผลผลิตไปสู่การนำไปใช้รักษาโรคในมนุษย์ได้ในอนาคต

ดร.มยุรี ธาราสุข

พฤษภาคม 2559

ABSTRACT

Project Code : TRG5680057
Project Title : Antiviral and Anti-inflammatory Effects of Compound A from *Salsola tuberculatiformis* and α -Mangostin from *Garcinia mangostana* Linn. in Dengue Virus Infection
Investigator : Dr. Mayuri Tarasuk
Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University
E-mail Address : mayuri.tarasuk@gmail.com
Project Period : 3 June 2013 - 2 June 2016

Dengue hemorrhagic fever caused by dengue virus infection is the major health problem in tropical countries including Thailand. The severity of disease in the patients with dengue infection correlates with high viral load and excessive immune activation which creates a cascade of cytokine production, called “cytokine storm”. Currently, neither a preventive vaccine nor an effective therapeutic agent is available. In this study we investigated antiviral and anti-inflammatory activities of α -Mangostin from *Garcinia mangostana* Linn. against dengue virus infection by determining its effect on cellular viral load, viral production, and cytokine/chemokine expression profile after the cells were infected with dengue virus. Our data demonstrated that α -Mangostin could effectively inhibit all four serotypes of dengue virus (DENV-1, 2, 3, and 4). Treatment of dengue infected cells with α -Mangostin significantly reduced cell infection rates and viral released into the culture supernatant. Furthermore, treatment with α -Mangostin could effectively reduce cytokine (IL-6 and TNF- α) and chemokine (RANTES, MIP-1 β , and IP-10) transcription. Overall, cytokine/chemokine gene expression was more robustly inhibited by α -Mangostin than antiviral agent, ribavirin and anti-inflammatory drug, dexamethasone. Therefore, α -Mangostin is a promising candidate for using as antiviral and anti-inflammatory agent that offers a greater efficiency to combat dengue virus infection.

Keywords : dengue virus, α -Mangostin, antiviral, anti-inflammatory

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5680057

ชื่อโครงการ : การศึกษาคุณสมบัติของคอมพาวด์เอกจากพืช *Salsola tuberculatiformis* และสารแอลฟาแมงโกสตินจากเปลือกมังคุดในการต้านการติดเชื้อและการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี

ชื่อนักวิจัย : ดร. มยุรี ธาราสุก
วิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

E-mail Address : mayuri.tarasuk@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 3 มิถุนายน 2556 - 2 มิถุนายน 2559

โรคไข้เลือดออกเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศในเขตร้อนรวมทั้งประเทศไทย ซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยพบว่าความรุนแรงของโรคมีความสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อไวรัสภายในร่างกายและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มากเกินไปจนอาจเป็นสาเหตุให้เกิดกระบวนการผลิตสารไซโตไคน์จำนวนมากที่เรียกว่า “พายุไซโตไคน์” แต่ในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนป้องกันโรค หรือ ยาต้านไวรัสเดงกีที่มีประสิทธิภาพ ในการวิจัยนี้ ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาคุณสมบัติของสารแอลฟาแมงโกสตินจากเปลือกมังคุดในการต้านการติดเชื้อและการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยวัดผลของสารแอลฟาแมงโกสตินที่มีต่อปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส, ปริมาณไวรัสที่ถูกผลิตขึ้น และการแสดงออกของยีนไซโตไคน์หรือคีโมไคน์หลังจากที่เซลล์ติดเชื้อไวรัสเดงกี จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารแอลฟาแมงโกสตินสามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่โรไทป์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีในอาหารที่มีสารแอลฟาแมงโกสตินสามารถลดปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อและลดปริมาณไวรัสที่ถูกผลิตขึ้นในน้ำเลี้ยงเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้สารแอลฟาแมงโกสตินยังสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ (IL-6 และ TNF- α) และคีโมไคน์ (RANTES, MIP-1 β , และ IP-10) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์และคีโมไคน์ที่ดีกว่ายาต้านไวรัสโรบาไวรัส และยาต้านการอักเสบเดกซาเมทาโซน ดังนั้นสารแอลฟาแมงโกสตินเป็นสารที่มีศักยภาพในการพัฒนาต่อไปเพื่อใช้เป็นยาต้านไวรัสและต้านการอักเสบที่มีประสิทธิภาพในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกี

คำหลัก : ไวรัสเดงกี, แอลฟาแมงโกสติน, ต้านการติดเชื้อไวรัส, ต้านการอักเสบ

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
ABSTRACT	ii
บทคัดย่อ	iii
สารบัญ	iv
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	4
วิธีการทดลอง	5
ผลการทดลอง	10
บทวิจารณ์	28
เอกสารอ้างอิง	32
OUTPUT	36

บทนำ

โรคไข้เลือดออกเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยและหลายประเทศซึ่งอยู่ในเขตภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ในปัจจุบันพบว่ามีประชากรกว่า 3,600 ล้านคนทั่วโลกอาศัยอยู่ในบริเวณที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกีและพบผู้ติดเชื้อประมาณ 50-200 ล้านคน ในจำนวนนี้พบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกขั้นรุนแรงประมาณ 500,000 ราย และมีผู้เสียชีวิตมากกว่า 22,000 รายต่อปี (Murray *et al.*, 2013) ที่สำคัญพบว่าพื้นที่การแพร่กระจายของโรคมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นเป็นบริเวณกว้างสำหรับในประเทศไทยจะพบการระบาดของโรคไข้เลือดออกเป็นระยะตามฤดูกาล โดยผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกส่วนใหญ่เป็นเด็กในวัยเรียน (อายุระหว่าง 5-14 ปี) การติดเชื้อไวรัสเดงกีเกิดจากการกัดของยุงลายเพศเมีย (genus *Aedes*) ซึ่งมีการแพร่พันธุ์และการระบาดของโรคในเขตชุมชนที่มีผู้อยู่อาศัยหนาแน่น อาการของโรคไข้เลือดออกในผู้ป่วยจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีมีหลายระดับตั้งแต่อาการไข้ธรรมดา (dengue fever, DF) จนถึงขั้นรุนแรงคือมีเลือดออกในอวัยวะและเนื้อเยื่อ (dengue hemorrhagic fever, DHF) และเกิดภาวะช็อค (dengue shock syndrome, DSS) ซึ่งมีอันตรายถึงชีวิตหากไม่ได้รับการรักษาอย่างถูกต้องและทันเวลา (Simmons *et al.*, 2012) โรคไข้เลือดออกที่รุนแรงมักเกิดในผู้ป่วยที่ติดเชื้อซ้ำซึ่งมีทฤษฎีเป็นที่ยอมรับว่าแอนติบอดี (antibody) ที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีครั้งแรกช่วยให้ไวรัสเดงกีซึ่งต่างชนิดในการติดเชื้อครั้งหลังเข้าเซลล์เพื่อแบ่งตัวส่งผลให้การติดเชื้อครั้งใหม่เกิดโรคที่รุนแรง (Halstead 2007) และพบว่าความสามารถของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ที-เซลล์ (T-cells) ในการกำจัดไวรัสเดงกีจากการติดเชื้อซ้ำของเชื้อต่างชนิดจะเกิดอย่างไม่สมบูรณ์และยังส่งผลให้เกิดการผลิตและหลั่งสารไซโตไคน์ (cytokines) ที่มากเกินไปจนเกิดภาวะ “พายุไซโตไคน์” (cytokine storm) ภายในร่างกายของผู้ป่วยส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพหลายอย่าง โดยพยาธิสภาพที่สำคัญ คือ การรั่วของพลาสมาออกจากหลอดเลือด (plasma leakage) และความผิดปกติของระบบห้ามเลือด (abnormal homeostasis) (Rothman 2011)

ในปัจจุบันโรคไข้เลือดออกยังไม่มีวัคซีนสำหรับป้องกันและยังไม่มียาสำหรับรักษา การรักษาผู้ป่วยยังคงเป็นการรักษาแบบประคับประคองตามอาการร่วมกับการสังเกตอาการและผลตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาและทางชีวเคมี การป้องกันการติดเชื้อไวรัสเดงกีที่ได้ผลดีที่สุด คือ การควบคุมปริมาณยุงพาหะและการหลีกเลี่ยงจากการถูกยุงกัด จากข้อมูลผลการศึกษาในผู้ป่วยที่ผ่านมามีหลักฐานบ่งชี้ว่าปริมาณไวรัสในร่างกายของผู้ป่วย (level of viral load) มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีปริมาณไวรัสเดงกีในร่างกายมากจะมีความรุนแรงของโรคมากด้วย และปริมาณไวรัสเดงกีในร่างกายที่มากจะกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายตอบสนองอย่างรุนแรงต่อการติดเชื้อโดยเฉพาะการสร้างและหลั่งสารไซโตไคน์ (cytokines) จากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันซึ่งมีผลต่อการเกิดพยาธิสภาพและความรุนแรงของโรค (Green and Rothman 2006; Guilarde *et al.*, 2008; Vaughn *et al.*, 2000) โดยในผู้ป่วยที่มีอาการโรคไข้เลือดออกที่รุนแรง (DHF) และเกิดภาวะช็อค (DSS) จะตรวจพบไซโตไคน์หลายชนิดในระดับที่สูง เช่น IP-10, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, MIP-1 β , IFN- γ และ RANTES

(Costa *et al.*, 2013; Liao *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2004; Hober *et al.*, 1993) ดังนั้นการลดปริมาณเชื้อไวรัสเดงกีในร่างกายและการยับยั้งการสร้างและหลั่งสารไซโตไคน์ก่อนการพัฒนาไปสู่การเสียชีวิตและพยาธิสภาพในร่างกายของผู้ป่วยจึงเป็นกลยุทธ์ที่สำคัญในการพัฒนาการรักษาโรคไข้เลือดออก ซึ่งจะช่วยป้องกันและลดความเสี่ยงในการดำเนินของโรคสู่ความรุนแรงจนกลายเป็นโรคไข้เลือดออกและการเกิดภาวะช็อก (DHF/DSS) และจะเป็นการพัฒนาวิธีการรักษาใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นในอนาคต ซึ่งจะช่วยเสริมวิธีการดูแลรักษาผู้ป่วยแบบประคับประคองที่เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการค้นหาสารเพื่อใช้เป็นยาต้านเชื้อไวรัสเดงกี (anti-dengue virus) และต้านการอักเสบ (anti-inflammatory molecules) และการหลั่งสารไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) จากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยจะนำสารสกัดจากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ เนื่องจากมีความปลอดภัยและมีผลข้างเคียงน้อยเมื่อเทียบกับยาที่เป็นสารสังเคราะห์ (synthetic compounds) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง compound A (CpdA) ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากพืชทะเลทรายชื่อ *Salsola tuberculatiformis* และมีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบได้เป็นอย่างดี โดยมีการศึกษาถึงกลไกการทำงานในระดับโมเลกุลแล้วพบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบที่เกิดโดยผ่านการทำงานของ NF- κ B ซึ่งจะสามารถลดการแสดงออกของสารไซโตไคน์ (cytokines) และคีโมไคน์ (chemokines) ที่จะเกิดขึ้นในกระบวนการอักเสบได้ (De Bosscher *et al.*, 2005; Gossye *et al.*, 2009) ซึ่งจากการทดสอบทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) แสดงให้เห็นแล้วว่า CpdA สามารถช่วยต้านการอักเสบที่เกิดขึ้นทั้งในโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory diseases) และโรคภูมิคุ้มกันตนเอง (autoimmune diseases) เช่น arthritis, encephalomyelitis, multiple sclerosis, autoimmune neuritis, และ asthma โดยไม่มีผลข้างเคียงเหมือนกับยาจำพวกสเตียรอยด์ทั่วไป (Gossye *et al.*, 2009; van Loo *et al.*, 2010; Dewint *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009)

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังมีความสนใจในการศึกษาฤทธิ์ต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีและต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีของสาร α -Mangostin (α -MG) ซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่พบในเปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* Linn) เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant), ฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง (anticancer), ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation), ฤทธิ์ต้านอาการแพ้ (anti-allergy), ฤทธิ์ต้านการติดเชื้อแบคทีเรีย, รา และไวรัส (antibacterial, antifungal และ antiviral activities) (Chen *et al.*, 2008; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2009; Chomnawang *et al.*, 2007) สาร α -MG มีฤทธิ์ต้านการติดเชื้อ HIV โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ protease ของเชื้อไวรัสซึ่งส่งผลยับยั้งการเพิ่มจำนวน (replication) ของเชื้อไวรัส (Chen *et al.*, 1996; Vlietinck *et al.*, 1998) และสาร α -MG ยังมีฤทธิ์ต้านการติดเชื้อ rotavirus ได้อีกด้วย (Shaneyfelt *et al.*, 2006) นอกจากนี้ผลการทดสอบทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ยังแสดงให้เห็นว่าสาร α -MG มีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบ เช่น สามารถยับยั้งการหลั่งสารไซโตไคน์ TNF- α และ IL-4 ในเซลล์ U937 ที่ถูก

กระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS) (Liu SH *et al.*, 2012) สามารถยับยั้งการสร้างสาร nitric oxide (NO) and PGE₂ ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS และสามารถยับยั้งอาการบวมของอุ้งเท้าหนู mice ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยสาร carrageenan ได้ (Chen *et al.*, 2008) สาร α -MG ยังสามารถลดอาการอักเสบที่เกิดในหนูทดลองที่เป็นโรค asthma โดยสามารถยับยั้งการดึงดูดเซลล์มายังบริเวณที่มีการอักเสบและช่วยลดระดับไซโตไคน์ชนิด Th2 (Jang *et al.*, 2012)

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาถึงคุณสมบัติและประสิทธิภาพของ CpdA และสาร α -MG ในการต้านการติดเชื้อไวรัสแดงกีและต้านการอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสแดงกี โดยจะทำการศึกษาถึงผลของ CpdA และสาร α -MG ที่มีต่อปริมาณไวรัสแดงกี การสร้างสารไซโตไคน์ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อไวรัสแดงกี ซึ่งเชื่อว่าน่าจะมีประโยชน์ในการพัฒนาสำหรับใช้เป็นยาเพื่อรักษาและลดความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยโรคไขข้อเลือดออกได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. การศึกษาคุณสมบัติการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกี (anti-dengue virus activity) และการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory effect) ของ compound A ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี
 - 1.1 เพื่อศึกษาคุณสมบัติการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกี (anti-dengue virus activity) ของ compound A ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี
 - 1.2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory effect) ของ compound A ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี
2. การศึกษาคุณสมบัติการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกี (anti-dengue virus activity) และการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory effect) ของสาร α -Mangostin ในเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงชนิด HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี
 - 2.1 เพื่อศึกษาคุณสมบัติการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกี (anti-dengue virus activity) ของสาร α -Mangostin ในเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงชนิด HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี
 - 2.2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory effect) ของสาร α -Mangostin ในเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงชนิด HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี

วิธีทดลอง

1. การศึกษาคุณสมบัติการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกี (anti-dengue virus activity) และการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory effect) ของ compound A ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี

1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสเดงกีในเซลล์เพาะเลี้ยง

เชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่ซีโรไทป์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ DENV serotype 1 (DENV-1) สายพันธุ์ Hawaii, DENV serotype 2 (DENV-2) สายพันธุ์ 16681, DENV serotype 3 (DENV-3) สายพันธุ์ H87, and DENV serotype 4 (DENV-4) สายพันธุ์ H241 เชื้อไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์จะถูกเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด C6/36 โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ C6/36 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด L-15 แล้วทำให้ติดเชื้อไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์ที่ MOI 0.1 เป็นเวลา 3 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เข้าไป และเลี้ยงเซลล์ต่อที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 5-7 วัน หรือจนพบ cytopathic effect (CPE) ปรากฏบนเซลล์เพาะเลี้ยง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีเชื้อไวรัสเดงกีอยู่ในตู้เย็น -70°C แล้วทำการวัดปริมาณไวรัสเดงกีที่ได้ด้วยวิธี focus formation assay เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 การวัดปริมาณเชื้อไวรัสเดงกีด้วยวิธี focus formation assay

การวัดปริมาณเชื้อไวรัสเดงกีในน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี focus formation assay จะทำในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ Vero ใน 96-well plate ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Minimum Essential Medium (MEM) นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเชื้อไวรัสเดงกีมาทำการเจือจาง (10-fold dilutions) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วเติมลงในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชม. และเททับด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมวุ้น อบทิ้งไว้ 3 วัน ที่ 37°C หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมวุ้นออก ล้างเซลล์ด้วย PBS แล้ว fix เซลล์ด้วย formaldehyde/PBS นาน 15 นาที จากนั้นวัดปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสโดยใช้ mouse monoclonal anti-DENV-E (4G2) protein antibody ที่มีความจำเพาะกับโปรตีนอีของเชื้อไวรัสเดงกีโดยบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. ตามด้วย HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. และวัดปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสโดยการย้อมด้วย DAB (3,3'-diaminobenzidine) substrate solution แล้วนับปริมาณ foci-forming unit ด้วยกล้อง stereo microscope

1.3 ทดสอบหาปริมาณและความเข้มข้นที่เหมาะสมของ compound A ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์

นำ compound A (CpdA) ที่ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-100 μM) มาผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI และนำมาผสมกับเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ U937 ใน 96-well plate และเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นทำการทดสอบผลของ CpdA

ต่อการเจริญเติบโตและการตายของเซลล์โมโนไซต์ด้วย PrestoBlue™ Cell Viability Reagent โดยมีเซลล์ที่ไม่ได้ปัมกับ CpdA เป็นตัวควบคุม

1.4 ทดสอบฤทธิ์และประสิทธิภาพของสาร **compound A** ในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีและการต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี

เพื่อจำลองภาวะการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีในเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ U937 จะถูกกระตุ้นให้เป็นเซลล์แมคโครฟาจด้วยสาร phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) ที่ความเข้มข้น 160 nM ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นทำให้เซลล์ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่ multiplicity of infection (MOI) เท่ากับ 5 โดยใช้ enhancing antibody ช่วยส่งเสริมการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัสโดยการนำไวรัสเดงกี DENV-2 ผสมกับ mouse monoclonal anti-DENV-E (4G2) protein antibody สำหรับเป็น enhancing antibody แล้วทิ้งไว้ให้เกิดการจับกันของเชื้อไวรัสและแอนติบอดีที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 ชม. โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงเบาๆ จากนั้นนำมาเติมลงบนเซลล์แมคโครฟาจใน 12-well plate และเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชม. จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร CpdA ที่ความเข้มข้น 2.5 μM ลงไป แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชม. ทั้งนี้จะทำการทดสอบควบคู่ไปกับยา Ribavirin ที่ความเข้มข้น 100 μM และ Dexamethasone ที่ความเข้มข้น 50 μM ซึ่งมีรายงานว่ามียฤทธิ์ในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีและต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบจะต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ทั้งนี้กำหนดให้เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ยังมีชีวิต (% Cell viability) ที่ทดสอบด้วยวิธี Trypan blue exclusion assay จะต้องมากกว่า 80% ขึ้นไป ทำการเก็บเซลล์เพื่อหาปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อด้วยวิธี flow cytometry และทดสอบการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ต่างๆ ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกด้วยวิธี real-time RT-PCR

2. การศึกษาคุณสมบัติการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกี (anti-dengue virus activity) และการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory effect) ของสาร **α -Mangostin** ในเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงชนิด HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี

2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่ผสมด้วย 10% Fetal bovine serum, 36 mg/ml Penicillin G, 60 mg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1 mM non-essential amino acids, and 1 mM sodium pyruvate ในตู้ปัมเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂

2.2 ทดสอบหาปริมาณและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร α -Mangostin ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงชนิด HepG2

เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร α -Mangostin ในการใช้ทดสอบความสามารถในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีและต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี นำสาร α -MG มาผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-80 μ M) จากนั้นนำมาผสมกับเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงชนิด HepG2 ใน 96-well plate และเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นทำการทดสอบผลของ α -MG ต่อการเจริญเติบโตและการตายของเซลล์ HepG2 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วย PrestoBlue™ Cell Viability Reagent ด้วยการเติม PrestoBlue™ Reagent ปริมาณ 10 μ l ในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 570 และ 600 nm ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า IC50 โดยมีเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสาร α -MG เป็นตัวควบคุม

2.3 การทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HepG2 ติดเชื้อไวรัสเดงกีและการทดสอบประสิทธิภาพของสารต่าง ๆ

เพื่อการทดสอบฤทธิ์และประสิทธิภาพของสาร α -MG ในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีและต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่ซีโรไทป์ เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HepG2 จะถูกทำให้ติดเชื้อ DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 ที่ MOI 20, 5, 40 และ 5 ตามลำดับ โดยมีเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกี (Mock) เป็นตัวควบคุม เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชม. จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร α -Mangostin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. ทั้งนี้จะทำการทดสอบควบคู่ไปกับยา Ribavirin และ Dexamethasone ซึ่งมีรายงานว่ามียุทธในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีและต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบจะต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ทั้งนี้กำหนดให้เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ยังมีชีวิต (% Cell viability) ที่ทดสอบด้วยวิธี Trypan blue exclusion assay จะต้องมากกว่า 80% ขึ้นไป ทำการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อทำการทดสอบหาปริมาณเชื้อไวรัสเดงกีด้วยวิธี focus formation assay และทำการเก็บเซลล์เพื่อหาปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อด้วยวิธี flow cytometry และดูลักษณะการติดเชื้อไวรัสเดงกีด้วยวิธี immunofluorescence assay จากนั้นทดสอบการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ต่างๆ ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกด้วยวิธี real-time RT-PCR

2.4 ทดสอบฤทธิ์และประสิทธิภาพของสาร α -Mangostin ในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกี

นำสาร α -MG ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มาผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วนำมาผสมกับเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HepG2 ที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ที่ 1, 2, 3 และ 4 (DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้น

จึงทำการทดสอบประสิทธิภาพการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีโดยวัดปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสด้วยวิธี flow cytometry ซึ่งทำโดยการ fix เซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น permeabilize ด้วย 0.2% Triton-X100/PBS เป็นเวลา 10 นาที แล้วบ่มกับ mouse monoclonal anti-DENV-E (4G2) protein antibody ที่มีความจำเพาะกับโปรตีนอีของเชื้อไวรัสเดงกีที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. ตามด้วย Alexa Flour 488-conjugated goat anti-mouse Ig ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที และวัดปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสด้วยเครื่อง flow cytometer โดยมีเซลล์ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสาร α -MG และเซลล์ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่บ่มกับยา Ribavirin (100 μ M) หรือยา Dexamethasone (200 μ M) เป็นตัวควบคุม

นอกจากนี้ทำการทดสอบประสิทธิภาพการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีโดยดูปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสด้วยวิธี immunofluorescence assay โดยเลี้ยงเซลล์ HepG2 บนแผ่น cover slip แล้วทำให้ติดเชื้อไวรัสเดงกีจากนั้นเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร α -MG หรือยา Ribavirin หรือยา Dexamethasone บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกีของเซลล์ โดยการ fix เซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น permeabilize ด้วย 0.2% Triton-X100/PBS เป็นเวลา 10 นาที แล้วบ่มกับ mouse monoclonal anti-DENV-E (4G2) protein antibody ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. ตามด้วย Alexa Flour 488-conjugated goat anti-mouse Ig ผสมกับ antinuclear staining reagent (Hoechst) ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. และดูลักษณะการติดเชื้อไวรัสเดงกีของเซลล์ด้วยกล้อง laser scanning confocal microscope

ทดสอบประสิทธิภาพของสาร α -MG ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่ซีโรไทป์ โดยการวัดปริมาณไวรัสที่ถูกผลิตขึ้น (viral production) ในน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี focus formation assay (ตามรายละเอียดข้อ 1.2) โดยใช้ mouse monoclonal anti-DENV-E (4G2) protein antibody ตามด้วย HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG และย้อมด้วย DAB (3,3'-diaminobenzidine) substrate solution แล้วนับปริมาณ foci-forming unit ด้วยกล้อง stereo microscope โดยมีเซลล์ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสาร α -Mangostin และเซลล์ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่บ่มกับยา Ribavirin หรือยา Dexamethasone เป็นตัวควบคุม

2.5 ทดสอบฤทธิ์และประสิทธิภาพของสาร α -Mangostin ในการต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี

นำสาร α -MG ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มาผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วนำมาผสมกับเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HepG2 ที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ที่ 1-4 (DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นจึงทำการทดสอบการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ต่างๆ ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคไข้เลือดออก ได้แก่ IL-6, TNF- α , RANTES, MIP-1 β และ IP-10 ในระดับ mRNA โดยนำเซลล์เพาะเลี้ยงที่ทำให้ติดเชื้อไวรัสเดงกีมาสกัด RNA โดยใช้ยา Trizol (Invitrogen) แล้วเปลี่ยนให้เป็น complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป reverse transcription

reagent (Superscript[®] III reverse transcriptase) จากนั้นใช้ cDNA ที่ได้เป็นต้นแบบสำหรับการทำ real-time PCR โดยใช้ SYBR Green PCR master mix kit (Roche) และ primer ที่จำเพาะต่อยีนของไซโตไคน์แต่ละชนิด (ดังแสดงในตารางที่ 1) ซึ่งออกแบบมาจากฐานข้อมูลแล้วทำการคำนวณความแตกต่างของการแสดงออกของไซโตไคน์ต่างๆ โดยเทียบกับ β -actin mRNA โดยมีเซลล์ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสาร α -Mangostin และเซลล์ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่บ่มกับยา Ribavirin หรือยา Dexamethasone ซึ่งมีการรายงานว่าสามารถลดการแสดงออกของสารไซโตไคน์ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเป็นตัวควบคุม

ตารางที่ 1 แสดงลำดับ DNA ของ Primer ที่ใช้สำหรับทดสอบการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ต่าง ๆ ด้วยวิธี real-time RT-PCR

Primer	Orientation	Sequence (5'-3')
IL-6_F	Forward	GTACATCCTCGACGGCATC
IL-6_R	Reverse	AGCCACTGGTTCTGTGCCT
TNF- α _F	Forward	TGCTTGTTCTCAGCCTCTT
TNF- α _R	Reverse	ATGGGCTACAGGCTTGTCAC
RANTES_F	Forward	TCCTGCAGAGGATCAAGACA
RANTES_R	Reverse	TCCTGCAGAGGATCAAGACA
MIP-1 β _F	Forward	CCTCTTTGCCACCAATACCA
MIP-1 β _R	Reverse	AGCAGAGGCTGCTGGTCTC
IP-10_F	Forward	GAATCGAAGGCCATCAAGAA
IP-10_R	Reverse	AAGCAGGGTCAGAACATCCA
β -Actin_F	Forward	AGAAAATCTGGCACCACACC
β -Actin_R	Reverse	CTCCTTAATGTCACGCACGA

ผลการทดลอง

1. การศึกษาคุณสมบัติการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกี (anti-dengue virus activity) และการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory effect) ของ compound A ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี

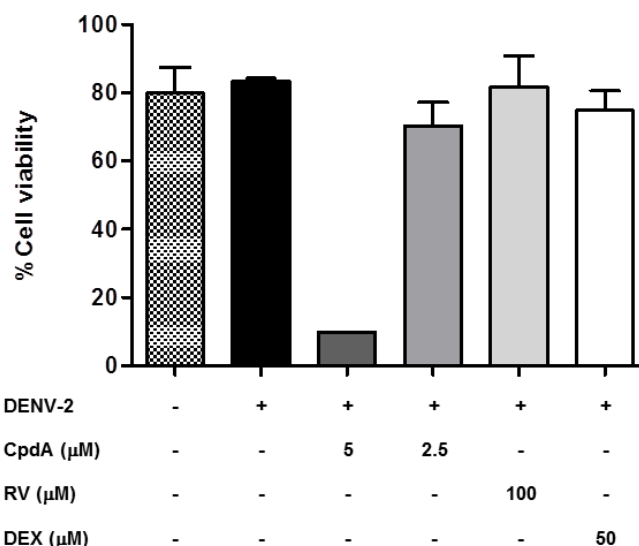
เมื่อนำสาร CpdA มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ U937 เพื่อหาปริมาณและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร CpdA ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ U937 และมีความสามารถในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีและต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีโดยใช้ PrestoBlue™ Cell Viability Reagent พบว่าค่า IC50 ของสาร CpdA ต่อเซลล์ U937 เท่ากับ $65.76 \pm 7.27 \mu\text{M}$ ผู้วิจัยจึงทดลองใช้สาร CpdA ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าค่า IC50 ดังกล่าวในการทำการทดลองต่อไปโดยกำหนดให้มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ยังมีชีวิต (% Cell viability) มากกว่า 80% ขึ้นไป ผลการทดลองเมื่อทำให้เซลล์แมคโครฟาจที่เกิดจากการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วยสาร PMA ติดเชื้อไวรัสเดงกี DENV-2 ที่ MOI 5 และเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร CpdA ที่ความเข้มข้น $2.5 \mu\text{M}$ หรือยา Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{M}$ หรือยา Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น $50 \mu\text{M}$ พบว่าที่เวลา 48 ชม. ภายหลังการติดเชื้อ เซลล์ในกลุ่มที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่มี CpdA ผสมอยู่มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ยังมีชีวิต (% Cell viability) โดยเฉลี่ยต่ำกว่า 80% โดยเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มี CpdA ผสมอยู่ 2.5 และ $5 \mu\text{M}$ มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ยังมีชีวิตเท่ากับ 70.24% และ 9.80% ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าเซลล์ในกลุ่มอื่นๆ (รูปที่ 1)

เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสาร CpdA ในการต้านการติดเชื้อไวรัส DENV-2 โดยการวัดปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสด้วยวิธี flow cytometry พบว่าสาร CpdA ไม่มีฤทธิ์ในการต้านการติดเชื้อไวรัส DENV-2 เมื่อเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีในอาหารที่ผสมสาร CpdA ความเข้มข้น $2.5 \mu\text{M}$ พบเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อ เท่ากับ 45.86% ขณะที่เซลล์ติดเชื้อไวรัส DENV-2 ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่ผสมสารใดๆ มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อ เท่ากับ 40.81% ซึ่งแตกต่างจากยาต้านไวรัส Ribavirin (RV) ที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบสามารถลดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส DENV-2 ลงเหลือ 11.21% ในขณะที่ยาต้านการอักเสบ Dexamethasone (DEX) ไม่สามารถลดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อได้ (เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อ เท่ากับ 40.56%) (รูปที่ 2)

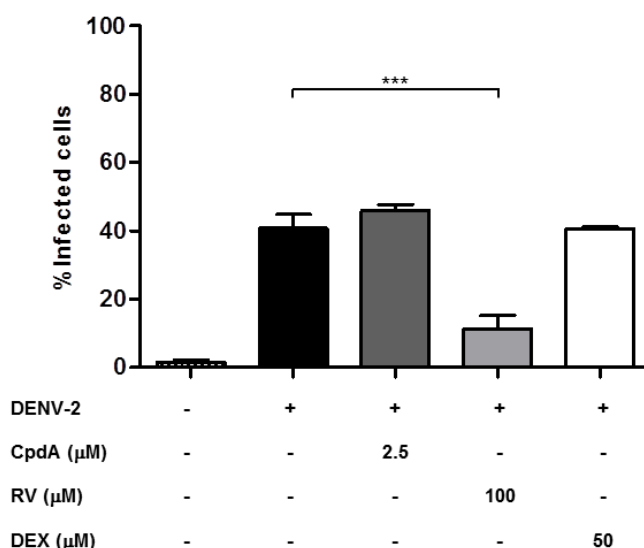
เมื่อนำสาร CpdA มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี DENV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยดูผลของสาร CpdA ต่อการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-6, TNF- α , RANTES, MIP-1 β และ IP-10 ซึ่งมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคไข้เลือดออก พบว่าสาร CpdA ที่ความเข้มข้น $2.5 \mu\text{M}$ สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ TNF- α , RANTES, MIP-1 β และ IP-10 ได้โดยมี % transcription เท่ากับ 62.42%, 74.74%, 57.43% และ 33.45% ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-6 ได้ ในขณะที่ยาต้านไวรัส Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{M}$ สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ทุกตัวได้ ยกเว้น RANTES ส่วนยาต้านการอักเสบ Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น $50 \mu\text{M}$

สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ทุกตัวได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ชนิด IL-6 ได้ (รูปที่ 3)

จากผลการทดลองเบื้องต้นถึงคุณสมบัติการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีและการต้านการอักเสบของ CpdA ในเซลล์เพาะเลี้ยง U937 ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีพบว่าสาร CpdA มีความเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างสูงและไม่มีฤทธิ์ในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกี แต่มีฤทธิ์ในการการยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ TNF- α , RANTES, MIP-1 β และ IP-10 แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ค่อนข้างต่ำสังเกตได้จากการลดลงของ % transcription ที่อยู่ในระดับต่ำ นอกจากนี้การแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-6, TNF- α , RANTES, MIP-1 β และ IP-10 ในเซลล์ U937 ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีไม่ดีเท่าที่ควรซึ่งสังเกตได้จากระดับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ (fold change) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ (mock) อยู่ในระดับต่ำ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนมาใช้เซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงชนิด HepG2 สำหรับการทดลองเนื่องจากในรายงานก่อนหน้านี้พบว่าเซลล์ชนิดนี้มีการแสดงออกของยีนไซโตไคน์อยู่ในระดับสูงเมื่อเซลล์ติดเชื้อไวรัสเดงกีและทดลองนำสารชนิดใหม่ทีคาดว่าจะมีทั้งฤทธิ์ต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีและฤทธิ์ต้านการอักเสบมาทำการทดสอบ

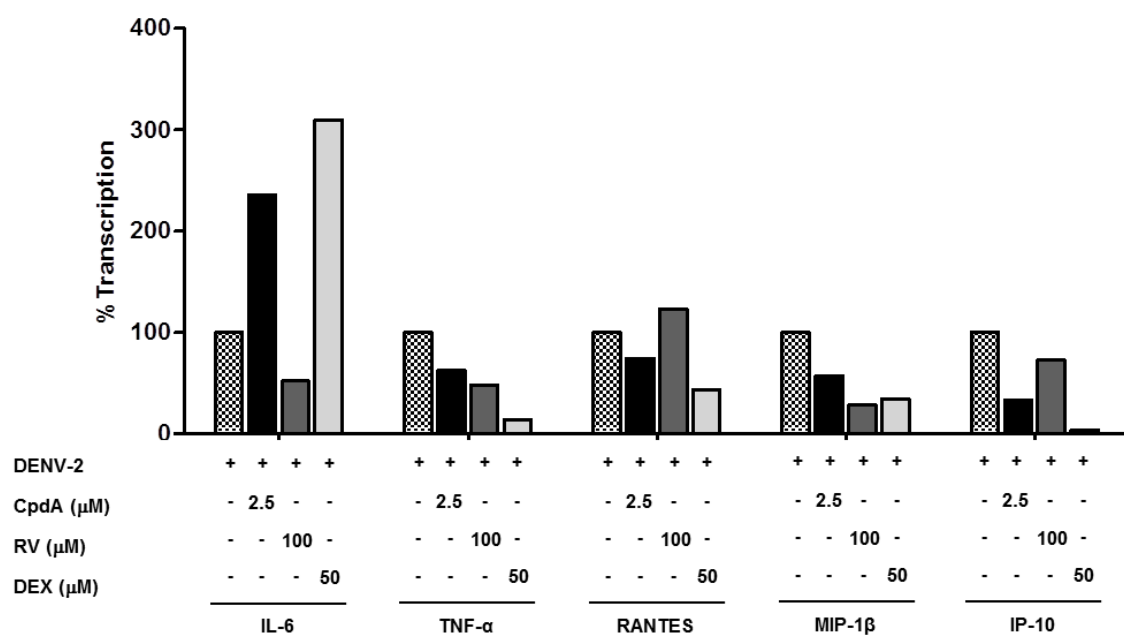


รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ยังมีชีวิต (% Cell viability) ที่ทดสอบด้วยวิธี Trypan blue exclusion assay เมื่อเซลล์แมคโครฟาจที่เกิดจากการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วยสาร PMA ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัส DENV-2 ที่ MOI 5 แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร CpdA ที่ความเข้มข้น 2.5 และ 5 μ M หรือผสมกับยา Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M หรือยา Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 50 μ M ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบเป็นเวลา 48 ชม. ภายหลังการติดเชื้อ



รูปที่ 2 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์แมคโครฟาจที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่ทดสอบด้วยวิธี flow cytometry เมื่อเซลล์แมคโครฟาจที่เกิดจากการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วยสาร PMA ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัส DENV-2 ที่ MOI 5 แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร CpdA ที่ความเข้มข้น 2.5 μ M หรือผสมยา Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M หรือยา Dexamethasone (DEX) ที่ความ

เข้มข้น 50 μM ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบเป็นเวลา 48 ชม. ภายหลังการติดเชื้อ โดยแสดงผลเป็นค่า mean $\pm$ SEM ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$)



รูปที่ 3 แผนภูมิแสดงประสิทธิภาพของสาร CpdA ในการต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี เมื่อเซลล์แมคโครฟาจที่เกิดจากการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วยสาร PMA ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัส DENV-2 ที่ MOI 5 แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร CpdA ที่ความเข้มข้น 2.5 μM หรือผสมกับยา Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μM หรือยา Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 50 μM ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบเป็นเวลา 48 ชม. ภายหลังการติดเชื้อ โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การ transcription (%Transcription) ของยีน IL-6, TNF- α , RANTES, MIP-1 β และ IP-10 ของเซลล์แมคโครฟาจที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่ทดสอบด้วยวิธี real-time RT-PCR

2. การศึกษาคุณสมบัติการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกี (anti-dengue virus activity) และการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory effect) ของสาร α -Mangostin ในเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงชนิด HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี

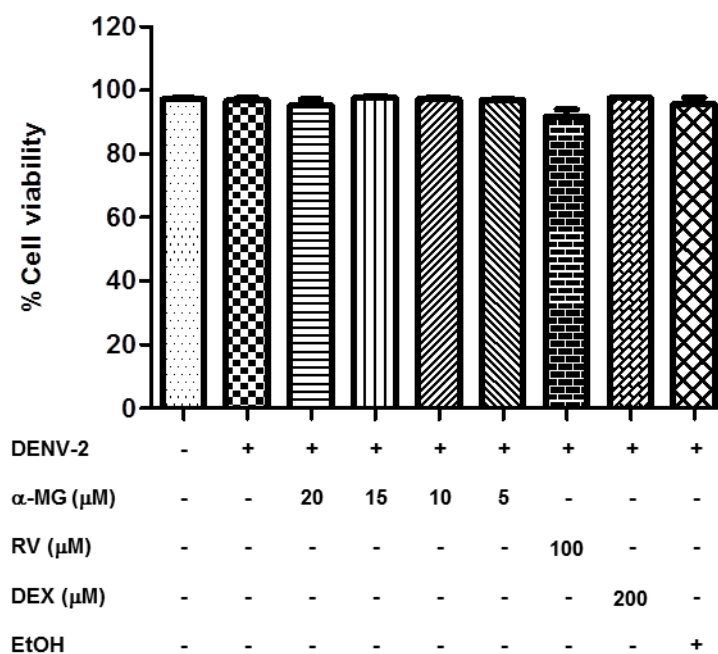
2.1 สาร α -Mangostin มีฤทธิ์ในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกี DENV-2

เมื่อนำสาร α -MG มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงชนิด HepG2 เพื่อหาปริมาณและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร α -MG ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงชนิด HepG2 และมีความสามารถในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีและต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีโดยใช้ PrestoBlue™ Cell Viability Reagent พบว่าค่า IC50 ของสาร α -MG ต่อเซลล์ HepG2 เท่ากับ $36.40 \pm 5.71 \mu\text{M}$ ผู้วิจัยจึงทดลองใช้สาร α -MG ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าค่า IC50 ดังกล่าวในการทำการทดลองต่อไปโดยกำหนดให้มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ยังมีชีวิต (%Cell viability) มากกว่า 80% ขึ้นไป ผลการทดลองเมื่อทำให้เซลล์ HepG2 ติดเชื้อไวรัสเดงกี DENV-2 ที่ MOI 5 และเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 μM หรือยา Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μM หรือยา Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μM พบว่าที่เวลา 24 ชม. ภายหลังการติดเชื้อ เซลล์ในแต่ละกลุ่มมีเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ยังมีชีวิต (%Cell viability) โดยเฉลี่ยมากกว่า 90% ขึ้นไป ซึ่งไม่แตกต่างจากเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกีและเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผสมสารใดๆ (mock) หรือเซลล์ที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสเดงกี DENV-2 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม Ethanol (EtOH) ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสาร α -MG ที่ใช้ในการทดลอง (รูปที่ 4)

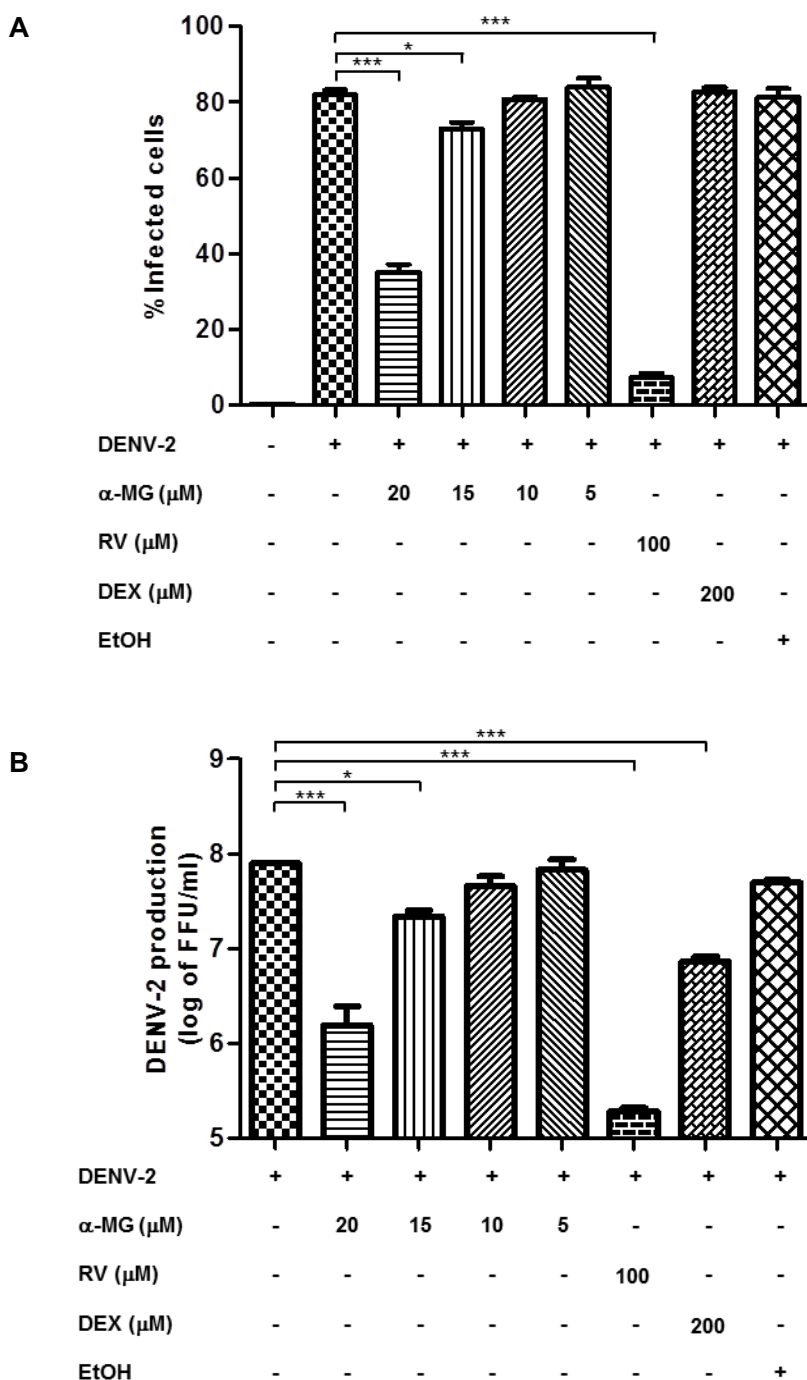
เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสาร α -MG ในการต้านการติดเชื้อไวรัส DENV-2 โดยการวัดปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสด้วยวิธี flow cytometry พบว่าสาร α -MG มีฤทธิ์ในการต้านการติดเชื้อไวรัส DENV-2 ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวขึ้นอยู่กับปริมาณสาร α -MG ที่ใช้ โดยสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 และ 15 μM สามารถลดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส DENV-2 ลงเหลือ 34.93% และ 72.91% ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส DENV-2 ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสาร α -MG ผสมอยู่ โดยพบเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส DENV-2 สูงถึง 81.86% สำหรับยาด้านไวรัส Ribavirin (RV) ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบสามารถลดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส DENV-2 ลงเหลือ 7.20% ในขณะที่ยาด้านการอักเสบ Dexamethasone (DEX) ไม่สามารถลดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อได้ (รูปที่ 5A)

เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสาร α -MG ในการต้านการติดเชื้อไวรัส DENV-2 โดยการวัดปริมาณไวรัสที่ถูกผลิตขึ้น (viral production) ในน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี focus formation assay พบว่าสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 และ 15 μM สามารถลดปริมาณไวรัส DENV-2 ที่ถูกผลิตขึ้นในน้ำเลี้ยงเซลล์ได้ โดยพบปริมาณไวรัส DENV-2 ในน้ำเลี้ยงเซลล์จำนวน 1.88×10^6 และ 2.24×10^7 FFU/ml ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส DENV-2 ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสาร α -MG ผสมอยู่ที่พบปริมาณไวรัส DENV-2 ในน้ำเลี้ยงเซลล์ 7.90×10^7

FFU/ml สำหรับยาด้านไวรัส Ribavirin (RV) และยาด้านการอักเสบ Dexamethasone (DEX) ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบพบปริมาณไวรัส DENV-2 ในน้ำเลี้ยงเซลล์ 1.96×10^5 และ 7.42×10^6 FFU/ml ตามลำดับ (รูปที่ XB)



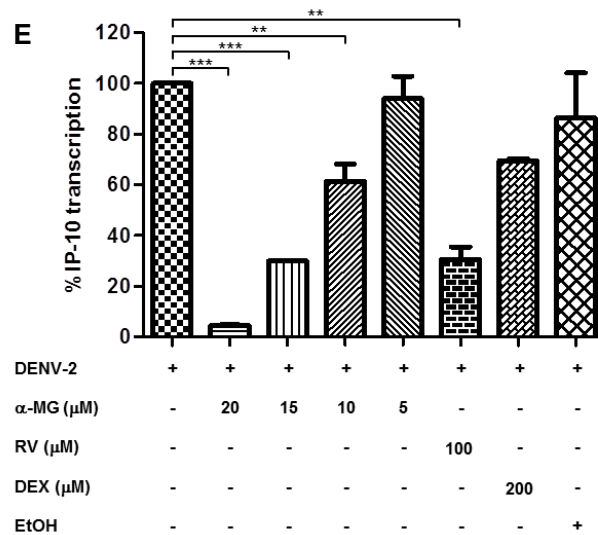
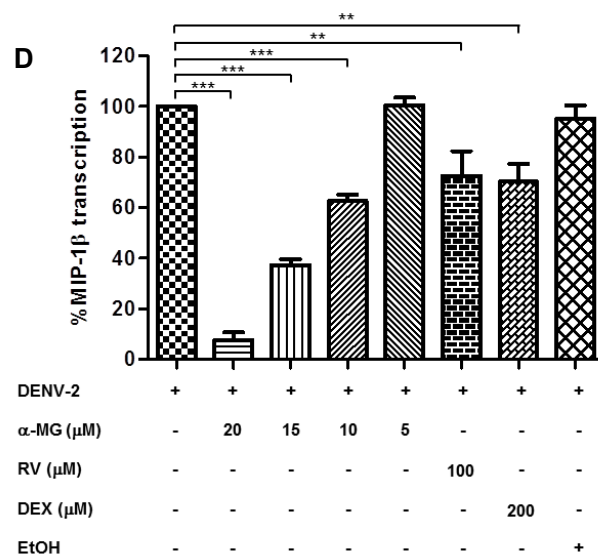
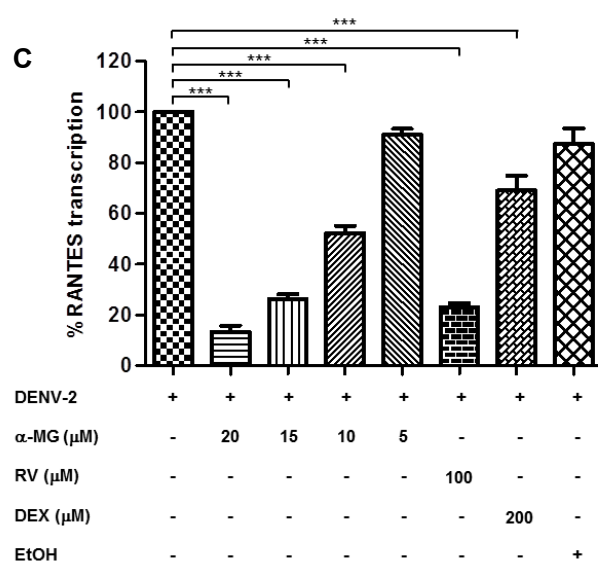
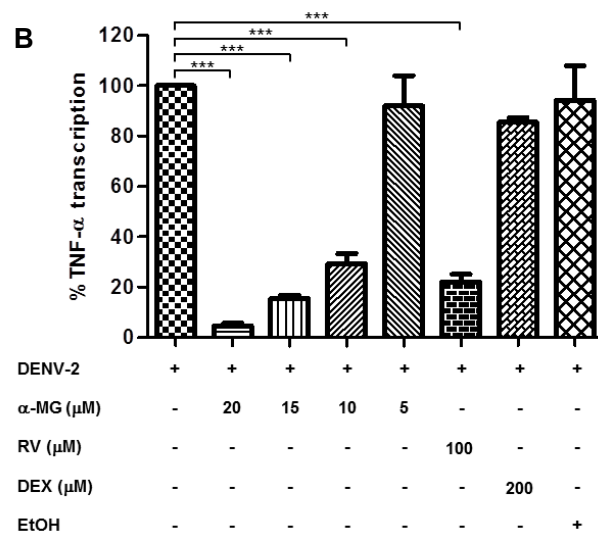
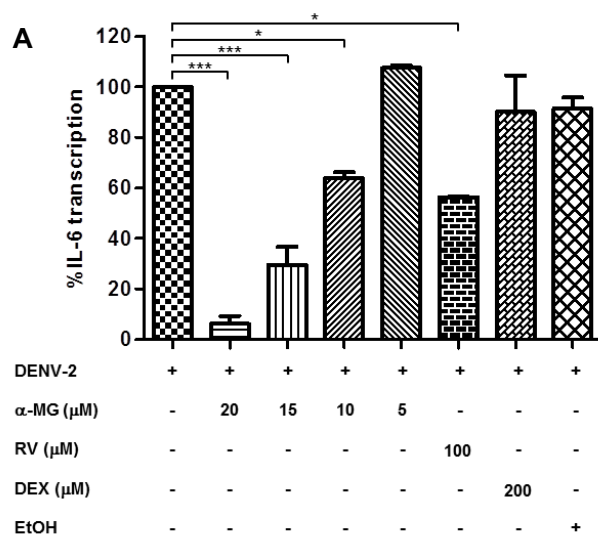
รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ยังมีชีวิต (%Cell viability) ที่ทดสอบด้วยวิธี Trypan blue exclusion assay เมื่อเซลล์ HepG2 ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัส DENV-2 ที่ MOI 5 แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร α -Mangostin (α -MG) ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 μ M หรือผสมกับยา Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M หรือยา Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μ M ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบเป็นเวลา 24 ชม. ภายหลังการติดเชื้อ



รูปที่ 5 แผนภูมิแสดงประสิทธิภาพของสาร α -Mangostin (α -MG) ในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกี เมื่อเซลล์ HepG2 ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัส DENV-2 ที่ MOI 5 แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 μ M หรือผสมยา Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M หรือยา Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μ M ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบเป็นเวลา 24 ชม. ภายหลังการติดเชื้อ (A) แสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์ HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่ทดสอบด้วยวิธี flow cytometry และ (B) แสดงปริมาณไวรัสที่ถูกผลิตขึ้น (viral production) ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยวิธี focus formation assay โดยแสดงผลเป็นค่า mean $\pm$ SEM ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$)

2.2 สาร α -Mangostin มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี DENV-2

เมื่อนำสาร α -MG มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี DENV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยดูผลของสาร α -MG ต่อการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-6, TNF- α , RANTES, MIP-1 β และ IP-10 ซึ่งมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคไข้เลือดออก พบว่าสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20, 15 และ 10 μ M สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-6, TNF- α , RANTES, MIP-1 β และ IP-10 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสาร α -MG ที่ใช้ในการทดลอง โดยเมื่อใช้สาร α -MG ที่ความเข้มข้น 5 μ M ไม่พบความเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ในขณะที่ยาด้านไวรัส Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ทุกตัวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนยาด้านการอักเสบ Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μ M สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ชนิด TNF- α , RANTES และ MIP-1 β ได้แต่ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ชนิด IL-6, และ IP-10 ได้ (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 แผนภูมิแสดงประสิทธิภาพของสาร α -Mangostin (α -MG) ในการต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี เมื่อเซลล์ HepG2 ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัส DENV-2 ที่ MOI 5 แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 μ M หรือผสมกับยา Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M หรือยา Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μ M ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบเป็นเวลา 24 ชม. ภายหลังการติดเชื้อ (A-E) แสดงเปอร์เซ็นต์การ transcription (%Transcription) ของยีน IL-6, TNF- α , RANTES, MIP-1 β และ IP-10 ของเซลล์ HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่ทดสอบด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยแสดงผลเป็นค่า mean $\pm$ SEM ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$)

2.3 สาร α -Mangostin มีฤทธิ์ในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกี DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4

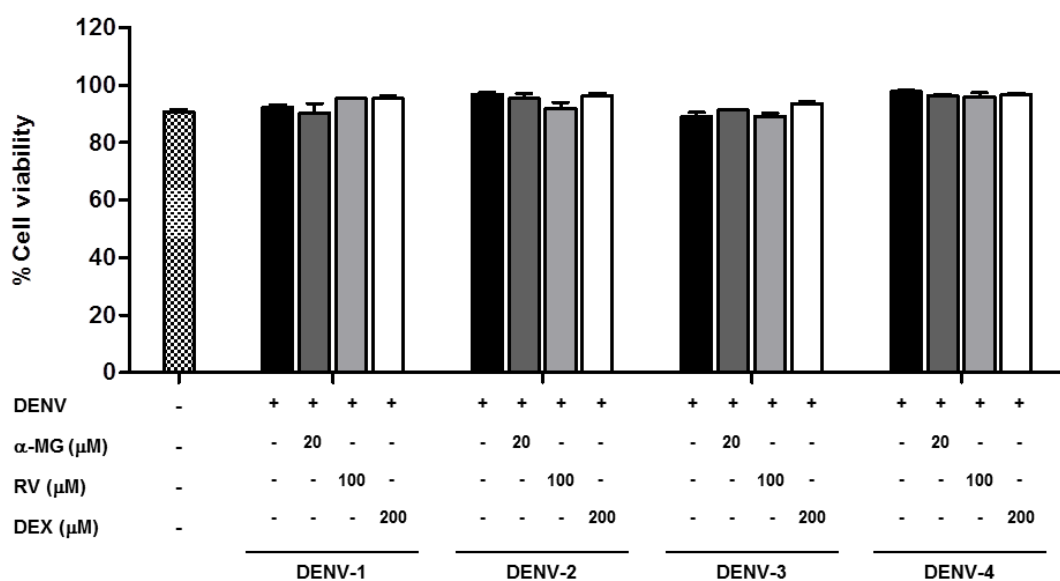
เมื่อนำสาร α -MG มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่ชนิด (DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4) โดยทำให้เซลล์ HepG2 ติดเชื้อไวรัส DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 ที่ MOI 20, 5, 40 และ 5 ตามลำดับ แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 μ M หรือผสมกับยาด้านไวรัส Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M หรือยาด้านการอักเสบ Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μ M ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบเป็นเวลา 24 ชม. ภายหลังการติดเชื้อ พบว่าเซลล์ในแต่ละกลุ่มมีเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ยังมีชีวิต (%Cell viability) โดยเฉลี่ยมากกว่า 89% ขึ้นไป ซึ่งไม่แตกต่างจากเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกีและเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผสมสารใดๆ (mock) (รูปที่ 7)

เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสาร α -MG ในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่ชนิด โดยการวัดปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสด้วยวิธี flow cytometry พบว่าสาร α -MG มีฤทธิ์ในการต้านการติดเชื้อไวรัสทั้งสี่ชนิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 μ M สามารถลดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 ลงเหลือ 8.54% (64.36%), 34.93% (81.86%), 17.75% (67.92%), และ 18.77% (66.45%) ตามลำดับ เทียบกับเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสาร α -MG ผสมอยู่ดังเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสที่แสดงไว้ในวงเล็บ สำหรับยาด้านไวรัส Ribavirin (RV) ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบสามารถลดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสทั้งสี่ชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ยาด้านการอักเสบ Dexamethasone (DEX) ไม่สามารถลดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสทั้งสี่ชนิดได้ (รูปที่ 8A)

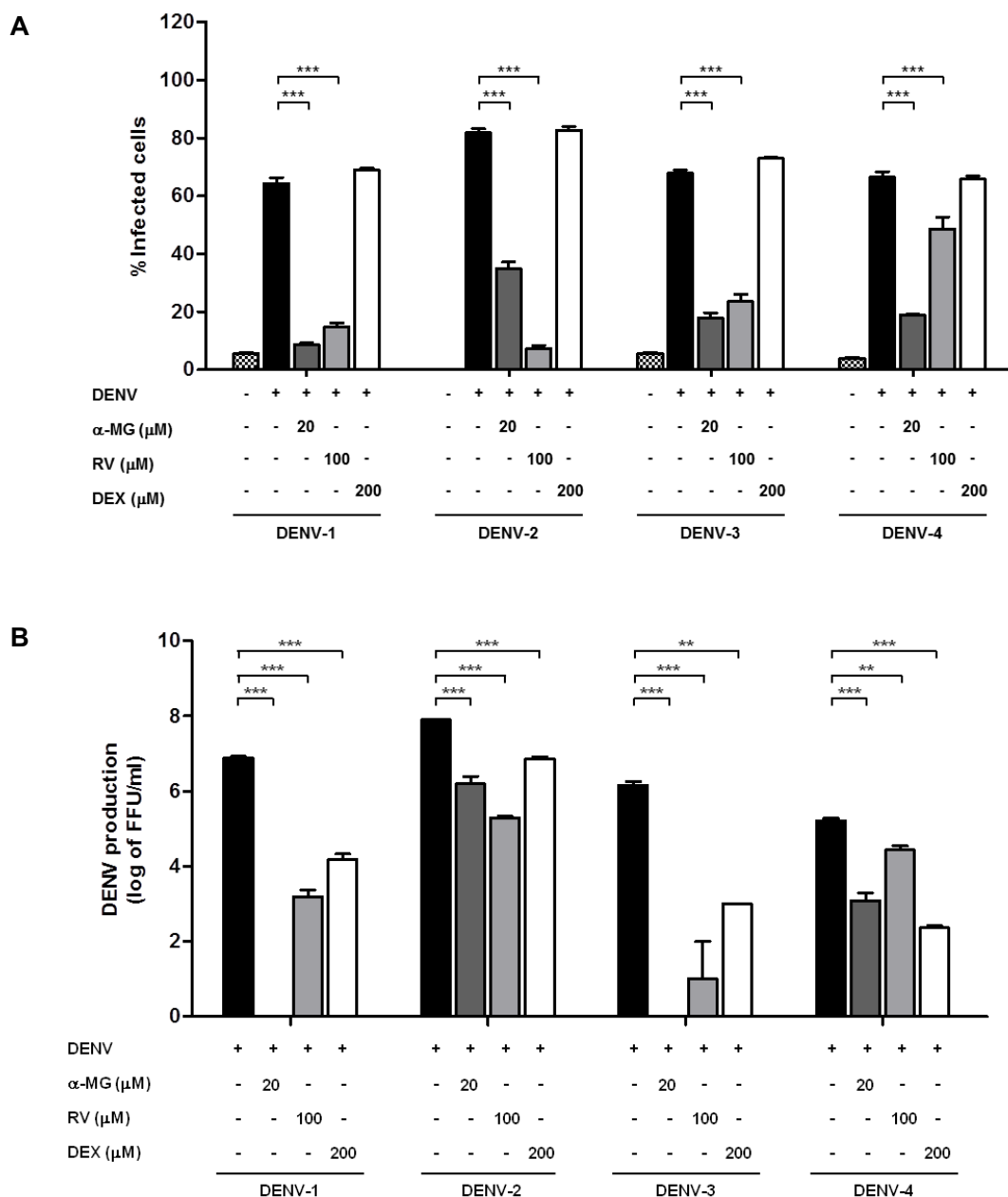
เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสาร α -MG ในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่ชนิด โดยการวัดปริมาณไวรัสที่ถูกผลิตขึ้น (viral production) ในน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี focus formation assay พบว่าสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 μ M สามารถลดปริมาณไวรัสทั้งสี่ชนิดที่ถูกผลิตขึ้นในน้ำเลี้ยงเซลล์ได้ โดยพบปริมาณไวรัส DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 ในน้ำเลี้ยงเซลล์จำนวน 0 (7.70×10^6), 1.88×10^6 (7.90×10^7), 0 (1.51×10^6) และ 1.47×10^3 (1.66×10^5) FFU/ml

ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสแดงกีที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสาร α -MG ผสมอยู่ ดังปริมาณไวรัสที่ถูกผลิตขึ้นที่แสดงไว้ในวงเล็บ สำหรับยาต้านไวรัส Ribavirin (RV) และยาต้านการอักเสบ Dexamethasone (DEX) ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบสามารถลดปริมาณไวรัสทั้งสี่โรไทป์ที่ถูกผลิตขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 8B)

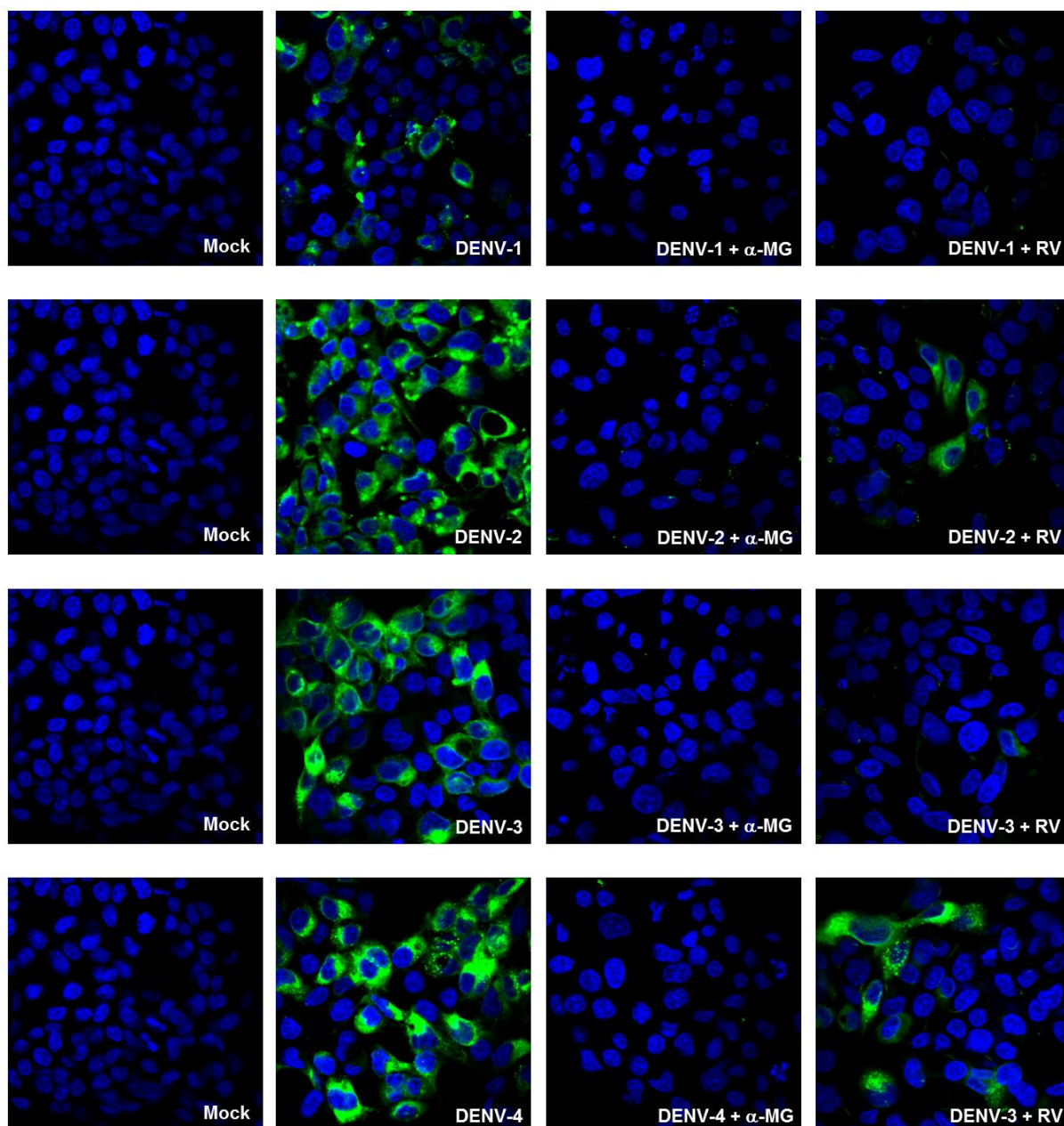
นอกจากนี้ทำการทดสอบประสิทธิภาพการต้านการติดเชื้อไวรัสแดงกีโดยดูปริมาณและลักษณะของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสแดงกีทั้งสี่โรไทป์ด้วยวิธี immunofluorescence assay พบว่าสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 μ M สามารถลดปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสแดงกีทั้งสี่โรไทป์ได้อย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสแดงกีที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสาร α -MG ผสมอยู่ (รูปที่ 9)



รูปที่ 7 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ยังมีชีวิต (%Cell viability) ที่ทดสอบด้วยวิธี Trypan blue exclusion assay เมื่อเซลล์ HepG2 ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัส DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 ที่ MOI 20, 5, 40 และ 5 ตามลำดับ แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร α -Mangostin (α -MG) ที่ความเข้มข้น 20 μ M หรือผสมกับยา Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M หรือยา Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μ M ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบเป็นเวลา 24 ชม. ภายหลังการติดเชื้อ



รูปที่ 8 แผนภูมิแสดงประสิทธิภาพของสาร α -Mangostin (α -MG) ในการต้านการติดเชื้อไวรัส เดงกี เมื่อเซลล์ HepG2 ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัส DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 ที่ MOI 20, 5, 40 และ 5 ตามลำดับ แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 μ M หรือผสมกับยา Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M หรือยา Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μ M ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบเป็นเวลา 24 ชม. ภายหลังการติดเชื้อ (A) แสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์ HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่ทดสอบด้วยวิธี flow cytometry และ (B) แสดงปริมาณไวรัสที่ถูกผลิตขึ้น (viral production) ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยวิธี focus formation assay โดยแสดงผลเป็นค่า mean $\pm$ SEM ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$)



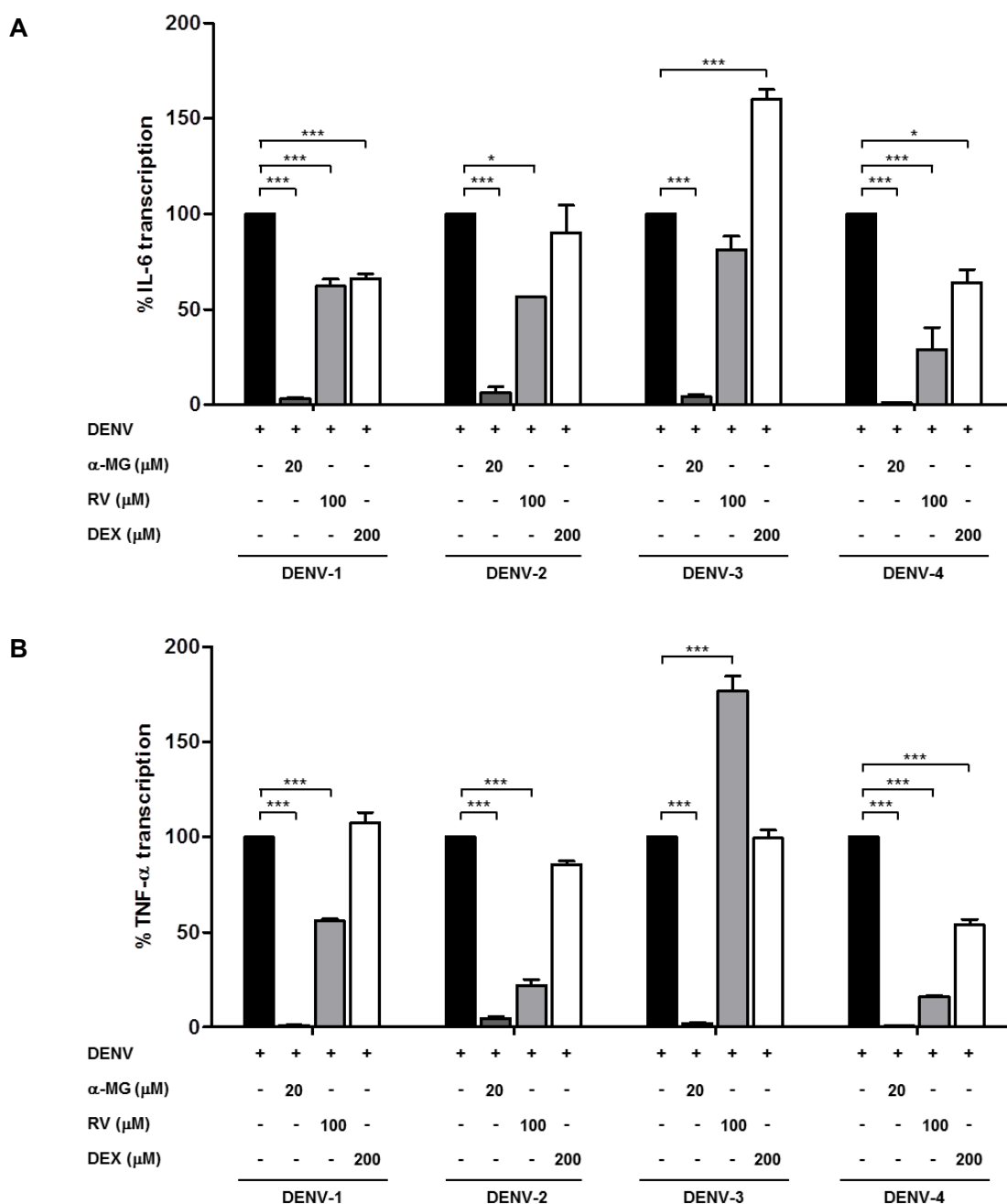
รูปที่ 9 แสดงประสิทธิภาพของสาร α -Mangostin (α -MG) ในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีด้วยวิธี immunofluorescence assay เมื่อเซลล์ HepG2 ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัส DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 ที่ MOI 20, 5, 40 และ 5 ตามลำดับ แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร α -MG ที่ความเข้มข้น $20 \mu\text{M}$ หรือผสมกับยา Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{M}$ ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบเป็นเวลา 24 ชม. ภายหลังการติดเชื้อ โดยเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีเมื่อตรวจติดตามด้วย mouse monoclonal anti-DENV-E (4G2) protein antibody ตามด้วย Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse Ig แสดงเป็นสีเขียว สีน้ำเงินแสดงส่วนนิวเคลียสของเซลล์ที่ย้อมด้วย antinuclear staining reagent (Hoechst) เมื่อดูภายใต้กล้อง laser scanning confocal microscope

2.4 สาร α -Mangostin มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4

เมื่อนำสาร α -MG มาทดสอบความฤทธิ์ในการต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่ชนิด (DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4) โดยทำให้เซลล์ HepG2 ติดเชื้อไวรัส DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 ที่ MOI 20, 5, 40 และ 5 ตามลำดับ แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 μ M หรือผสมกับยาต้านไวรัส Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M หรือยาต้านการอักเสบ Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μ M ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบเป็นเวลา 24 ชม. ภายหลังการติดเชื้อ แล้วดูผลของสาร α -MG ต่อการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-6, TNF- α , RANTES, MIP-1 β และ IP-10 ด้วยวิธี real-time RT-PCR

พบว่าสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 μ M สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-6 ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่ชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ยาต้านไวรัส Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-6 ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส DENV-1, DENV-2 และ DENV-4 ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-6 ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส DENV-3 ได้ ส่วนยาต้านการอักเสบ Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μ M สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ชนิด IL-6 ได้ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส DENV-1 และ DENV-4 แต่ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-6 ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส DENV-2 และ DENV-3 ได้ (รูปที่ 10A)

สาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 μ M สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ TNF- α ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่ชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ยาต้านไวรัส Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ TNF- α ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส DENV-1, DENV-2 และ DENV-4 ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ TNF- α ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส DENV-3 ได้ ส่วนยาต้านการอักเสบ Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μ M สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ชนิด TNF- α ได้เฉพาะในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส DENV-4 แต่ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ TNF- α ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส DENV-1, DENV-2 และ DENV-3 ได้ (รูปที่ 10B)

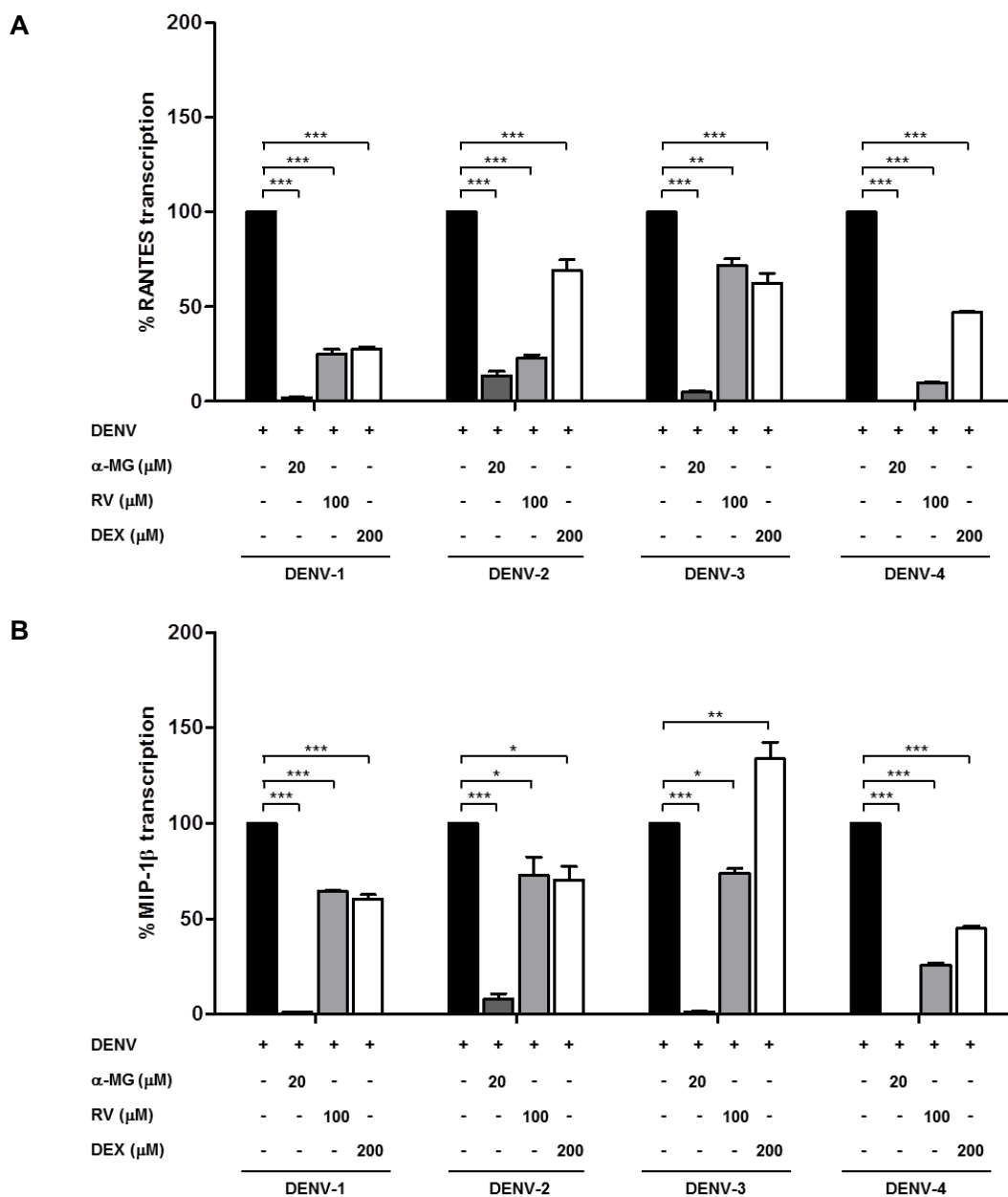


รูปที่ 10 แผนภูมิแสดงประสิทธิภาพของสาร α -Mangostin (α -MG) ในการต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี เมื่อเซลล์ HepG2 ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัส DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 ที่ MOI 20, 5, 40 และ 5 และบ่มกับสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 μ M หรือบ่มกับยา Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M หรือยา Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μ M ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบที่เวลา 24 ชม. ภายหลังการติดเชื้อ (A) แสดงเปอร์เซ็นต์การ transcription (%Transcription) ของยีน IL-6 และ (B) แสดงเปอร์เซ็นต์การ transcription ของยีน TNF- α ของเซลล์ HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่ทดสอบด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยแสดงผลเป็นค่า mean $\pm$ SEM ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$)

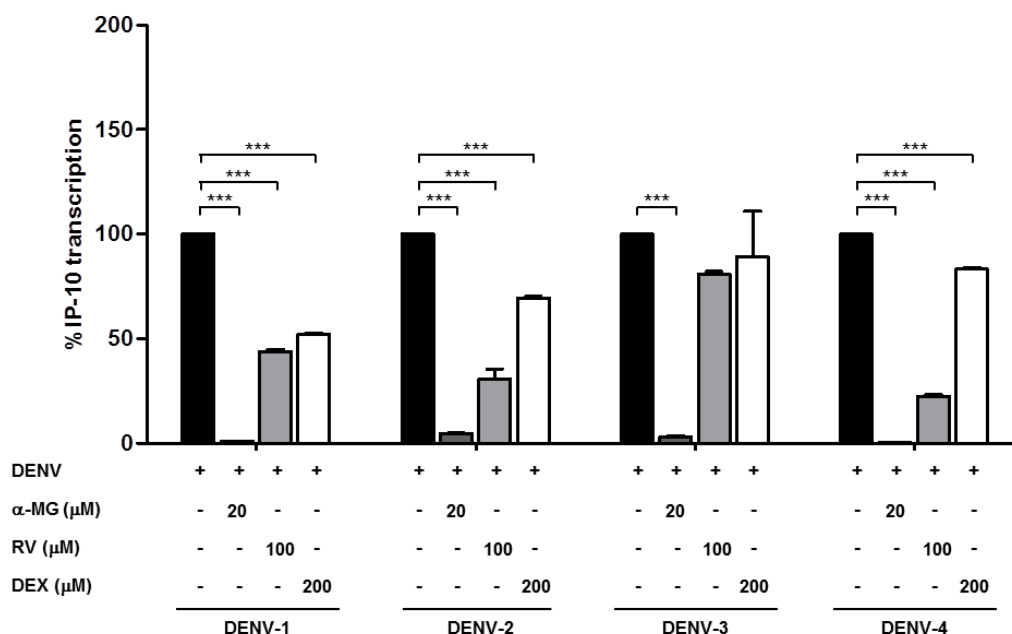
การแสดงออกของยีนไซโตไคน์ RANTES ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่โรไทยี สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 μ M, ยาต้านไวรัส Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M หรือยาต้านการอักเสบ Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μ M เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผสมสารใดๆ (รูปที่ 11A)

สาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 μ M สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ MIP-1 β ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่โรไทยีได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ยาต้านไวรัส Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ MIP-1 β ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่โรไทยีได้ ส่วนยาต้านการอักเสบ Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μ M สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ชนิด MIP-1 β ได้ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส DENV-1, DENV-2 และ DENV-4 แต่ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ MIP-1 β ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส DENV-3 ได้ (รูปที่ 11B)

สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ของสาร α -MG ต่อการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IP-10 พบว่า สาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 μ M สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IP-10 ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่โรไทยีได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ยาต้านไวรัส Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M และยาต้านการอักเสบ Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μ M สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IP-10 ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส DENV-1, DENV-2 และ DENV-4 แต่ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IP-10 ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส DENV-3 ได้ (รูปที่ 12)



รูปที่ 11 แผนภูมิแสดงประสิทธิภาพของสาร α -Mangostin (α -MG) ในการต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี เมื่อเซลล์ HepG2 ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัส DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 ที่ MOI 20, 5, 40 และ 5 และบ่มกับสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 μ M หรือบ่มกับยา Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M หรือยา Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μ M ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบที่เวลา 24 ชม. ภายหลังการติดเชื้อ (A) แสดงเปอร์เซ็นต์การ transcription (%Transcription) ของยีน RANTES และ (B) แสดงเปอร์เซ็นต์การ transcription ของยีน MIP-1 β ของเซลล์ HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่ทดสอบด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยแสดงผลเป็นค่า mean $\pm$ SEM ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$)



รูปที่ 12 แผนภูมิแสดงประสิทธิภาพของสาร α -Mangostin (α -MG) ในการต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี เมื่อเซลล์ HepG2 ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัส DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 ที่ MOI 20, 5, 40 และ 5 และบ่มกับสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 μ M หรือบ่มกับยา Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M หรือยา Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μ M ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบที่เวลา 24 ชม. ภายหลังการติดเชื้อ แสดงเปอร์เซ็นต์การ transcription (%Transcription) ของยีน IP-10 ของเซลล์ HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่ทดสอบด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยแสดงผลเป็นค่า mean $\pm$ SEM ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ด้านการติดเชื้อไวรัสเดงกี (anti-dengue virus activity) และฤทธิ์ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory effect) ของสาร α -Mangostin (α -MG) ในเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงชนิด HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยวัดผลจากประสิทธิภาพของสาร α -MG ในการลดปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี (infected cells) การลดปริมาณไวรัสที่ถูกผลิตขึ้น (viral production) ในน้ำเลี้ยงเซลล์ และการยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคไข้เลือดออก การเลือกใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HepG2 สำหรับการทดลองนี้เนื่องจากเซลล์ดังกล่าวเป็นหนึ่งในเซลล์เป้าหมายในการติดเชื้อไวรัสเดงกีในร่างกายคนไข้โรคไข้เลือดออก (Rosen L *et al.*, 1999) และในการทดลองในระดับเซลล์พบว่าเซลล์นี้เป็นเซลล์ที่มีความไวต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกีและเซลล์มีการตอบสนองต่อการติดเชื้อโดยการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ต่างๆ ซึ่งบ่งถึงภาวะการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี (Suksanpaisan *et al.*, 2007; Suttiheptumrong *et al.*, 2013) จากการทดลองครั้งนี้พบว่าเซลล์ HepG2 มีความไวต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่ซีโรไทป์ (DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4) (รูปที่ 8A) และมีผลการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ชนิด IL-6, TNF- α , RANTES, MIP-1 β และ IP-10 ที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ (Suttiheptumrong *et al.*, 2013) ดังนั้นเซลล์ HepG2 จึงมีความเหมาะสมในการใช้ทดสอบฤทธิ์ด้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีและฤทธิ์ด้านการอักเสบของสาร α -MG

สาร α -Mangostin เป็นสารประกอบหลักในเปลือกมังคุดซึ่งเป็นผลไม้ที่พบโดยทั่วไปในประเทศเขตร้อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสาร α -MG มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant), ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเนื้องอก (antitumor), ฤทธิ์ด้านการอักเสบ (anti-inflammation), ฤทธิ์ต้านอาการแพ้ (antiallergic), ฤทธิ์ด้านการติดเชื้อแบคทีเรีย, รา และไวรัส (antibacterial, antifungal และ antiviral activities) (Chen *et al.*, 2008; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2009; Chomnawang *et al.*, 2007) แต่ยังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ของสาร α -MG ในการต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีและด้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี ซึ่งจากผลการทดลองนี้พบว่าสาร α -MG มีฤทธิ์ต้านการติดเชื้อไวรัสเดงกีและด้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีได้เป็นอย่างดี โดยสามารถลดปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่ซีโรไทป์ (DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อทดสอบวัดปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีด้วยวิธี flow cytometry พบว่าสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 μ M สามารถลดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 ได้ 55.82%, 46.93%, 50.17% และ 47.68% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสาร α -MG ผสมอยู่ (รูปที่ 8A) และเมื่อเปรียบเทียบกับยาต้านไวรัส Ribavirin ซึ่งเป็นยาที่มีฤทธิ์ต้านการติดเชื้อไวรัสก่อโรคในคนหลายชนิด เช่น เชื้อไวรัสตับอักเสบซี (Hepatitis C), เชื้อเอชไอวี (HIV) และ เชื้ออะดีโนไวรัส (Adenovirus) (De Clercq and Li, 2016;

Gavin and Katz, 2002) อีกทั้งผลการทดลองจากกลุ่มวิจัยเรายังพบว่ายาชนิดนี้มีฤทธิ์ด้านการติดเชื้อไวรัสแดงก็ได้ดี (Rattanaburee *et al.*, 2015) ผลการทดลองนี้พบว่าสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 μ M สามารถลดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส DENV-1, DENV-3 และ DENV-4 ได้ดีกว่ายา Ribavirin ที่ความเข้มข้น 100 μ M ยกเว้นในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส DENV-2 ที่พบว่ายา Ribavirin สามารถลดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสได้ดีกว่าสาร α -MG (รูปที่ 8A) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการวัดปริมาณไวรัสที่ถูกผลิตขึ้น (viral production) ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยวิธี focus formation assay และที่น่าสังเกตคือสาร α -MG สามารถยับยั้งการผลิตไวรัส DENV-1 และ DENV-3 ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสได้อย่างดีเยี่ยมเนื่องจากเมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาปริมาณไวรัสแล้วไม่พบ foci ของไวรัส (0 FFU/ml) ดังแสดงในรูปที่ 8B นอกจากนี้คุณสมบัติของสาร α -MG ในการด้านการติดเชื้อไวรัสแดงก็ยังเห็นได้อย่างชัดเจนเมื่อนำเซลล์ที่ติดเชื้อมาตรวจหาแอนติเจนของเชื้อแดงก็ด้วยวิธี immunofluorescence assay ซึ่งพบว่าสาร α -MG สามารถลดทั้งปริมาณไวรัสและปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสทั้งสี่ชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ รูปที่ 9 จากรายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าสาร α -MG สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ protease และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส HIV-1 ได้ (Chen *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการติดเชื้อ Rotavirus ได้อีกด้วย (Shaneyfelt *et al.*, 2006) แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาถึงโมเลกุลเป้าหมายของสาร α -MG ที่มีต่อเชื้อไวรัสแดงก็ซึ่งถือเป็นเรื่องที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาเพื่อต่อยอดงานวิจัยในอนาคต ซึ่งคุณสมบัติในการด้านการติดเชื้อไวรัสแดงก็ทั้งสี่ชนิดของสาร α -MG น่าจะมีประโยชน์ในการลดความเสี่ยงของการเกิดโรคไข้เลือดออกที่รุนแรงที่เกิดในผู้ป่วยที่ติดเชื้อซ้ำซึ่งแอนติบอดี (antibody) ที่ถูกสร้างขึ้นจากการติดเชื้อไวรัสแดงก็ครั้งแรกสามารถช่วยให้ไวรัสแดงก็ต่างชนิดในการติดเชื้อครั้งหลังเข้าเซลล์เพื่อแบ่งตัวและส่งผลให้การติดเชื้อครั้งใหม่มีอาการของโรคที่รุนแรงตามทฤษฎี Antibody-dependent enhancement (Ref.) อีกทั้งปริมาณเชื้อไวรัสในกระแสเลือดที่สูงยังมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคอีกด้วย (Vaughn *et al.*, 2000; Libraty *et al.*, 2002) ถึงแม้ว่าในบางรายงานจะพบว่าปริมาณไวรัสไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคแต่ก็พบว่าปริมาณไวรัสที่สูงมีสัมพันธ์กับภาวะเกร็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) ที่ยาวนานขึ้นและมีผลทำให้การฟื้นตัวจากโรคช้าลง (Singla *et al.*, 2016) ดังนั้นฤทธิ์ด้านการติดเชื้อไวรัสแดงก็ของสาร α -MG น่าจะช่วยลดความรุนแรงของโรคและลดการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสแดงก็ได้

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการด้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสแดงก็ของสาร α -MG ผู้วิจัยได้เลือกทดสอบความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-6, TNF- α , RANTES, MIP-1 β และ IP-10 ซึ่งมีรายงานว่ามีการแสดงออกที่สูงในเซลล์ HepG2 เมื่อเซลล์ติดเชื้อไวรัสแดงก็ (Suttitheptumrong *et al.*, 2013) และสอดคล้องกับสารไซโตไคน์ที่มีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในคนไข้โรคไข้เลือดออกที่ตรวจพบระดับของ IP-10, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, MIP-1 β , IFN- γ และ RANTES สูงขึ้นและสัมพันธ์กับอาการโรคไข้เลือดออกที่รุนแรง (DHF) และเกิดภาวะช็อค (DSS) (Costa *et al.*, 2013; Liao *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2004;

Hober *et al.*, 1993) และพบว่าปริมาณ IL-6 สูงในคนไข้ที่มีภาวะ plasma leakage (Eppy *et al.*, 2016) นอกจากนี้ยังพบว่า TNF- α มีฤทธิ์ในการกระตุ้นเซลล์ endothelial cells และกระตุ้นการหลั่ง IL-6 ซึ่งคาดว่าจะเป็สาเหตุสำคัญของพยาธิสภาพของโรคไข้เลือดออกที่รุนแรง (Anderson *et al.*, 1997) ดังนั้นการยับยั้งการสร้างหรือการทำหน้าที่ของไซโตไคน์เหล่านี้น่าจะมีผลช่วยลดความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกได้ ดังตัวอย่างผลงานวิจัยของ Phanthanawiboon และคณะที่แสดงให้เห็นว่า เมื่อหนูที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีได้รับแอนติบอดีที่จำเพาะกับไซโตไคน์ TNF- α (neutralizing anti-TNF- α antibody) จะช่วยลดความรุนแรงที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีในหนูได้ และการลดลงของ TNF- α ยังมีผลยับยั้งปริมาณไซโตไคน์ IL-6 ที่เกิดจากการติดเชื้อด้วย (Phanthanawiboon *et al.*, 2016) สำหรับ RANTES, MIP-1 β และ IP-10 เป็นไซโตไคน์ที่มีฤทธิ์ในการดึงดูด immune cells มายังบริเวณที่มีการติดเชื้อ (cell recruitment) หรือมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าคีโมไคน์ (chemokine) ซึ่งถือเป็นตัวแปรสำคัญในการเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอันนำมาสู่ภาวะการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี (Lin *et al.*, 2000) โดยมีรายงานการตรวจพบ RANTES-positive cells ในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออก (de-Oliveira-Pinto *et al.*, 2012) ในเซลล์ human PBMC ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีจะถูกกระตุ้นให้สร้าง MIP-1 β และสันนิษฐานว่าไซโตไคน์ชนิดนี้น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดอาการไข้และ bone marrow suppression ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี (Spain-Santana *et al.*, 2001) ในเซลล์ตับของหนูที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IP-10 ที่สูงขึ้นได้อย่างรวดเร็วและมีผลในการดึงดูด NK cells มายังบริเวณที่มีการติดเชื้อ โดยเมื่อหนูที่ติดเชื้อได้รับแอนติบอดีที่จำเพาะกับไซโตไคน์ IP-10 สามารถช่วยลดปริมาณ NK cells ได้ (Chen *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าไซโตไคน์ IP-10 มีความเกี่ยวข้องกับการรั่วของพลาสมาออกจากหลอดเลือด (plasma leakage) ในโรคไข้เลือดออกที่รุนแรง และยังมีความสัมพันธ์กับระดับเอนไซม์ตับ alanine transaminase (ALT) และ aspartate transaminase (AST) ที่บ่งถึงภาวะที่เซลล์ตับเกิด injury ในผู้ป่วยอีกด้วย (Conroy *et al.*, 2015) จากผลการทดสอบพบว่าเซลล์ HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่ซีโรไทป์มีการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-6, TNF- α , RANTES, MIP-1 β และ IP-10 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีพบว่าสาร α -MG ที่ความเข้มข้น 20 μ M สามารถลดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-6, TNF- α , RANTES, MIP-1 β และ IP-10 ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่ซีโรไทป์ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และให้ผลดีกว่ายาต้านไวรัส Ribavirin (RV) ที่ความเข้มข้น 100 μ M หรือยาต้านการอักเสบ Dexamethasone (DEX) ที่ความเข้มข้น 200 μ M ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากคุณสมบัติเฉพาะของสาร α -MG ที่มีทั้งฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation) ร่วมกับฤทธิ์ต้านการติดเชื้อไวรัส (antiviral activity) ที่สามารถเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการผลิตไซโตไคน์และการลดปริมาณเชื้อไวรัสเดงกี ดังรายงานของ Rattanaburee และคณะ (Rattanaburee T *et al.*, 2015) ที่พบว่าการใช้ยาต้านไวรัส Ribavirin ร่วมกับสาร CpdA ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบจะเสริมฤทธิ์กันในการลดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี ทั้งนี้การลดปริมาณของไวรัสจะช่วยให้โปรตีนต่างๆ ที่ผลิตจากไวรัส

ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างสารไซโตไคน์ต่างๆ เช่น โปรตีน NS1 ซึ่งสร้างโดยเชื้อไวรัสเดงกีที่สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-6 และ TNF- α สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคไข้เลือดออก (Chen J *et al.*, 2015; Chua *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังพบว่าการหลั่งสารไซโตไคน์ IL-6, IL-8, IP-10, TNF- α or IFN- γ ในเซลล์โมโนไซต์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีมีความสัมพันธ์กับปริมาณไวรัสเดงกี และเกิดจากการกระตุ้นโดยโปรตีน NS4B และ NS5 ที่ผลิตจากเชื้อไวรัส (Kelley *et al.*, 2012; Kelley *et al.*, 2011) ดังนั้นสาร α -MG ที่มีทั้งฤทธิ์ต้านการติดเชื้อไวรัสและต้านการอักเสบน่าจะช่วยลดความรุนแรงจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีได้

โดยสรุป α -MG อาจเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการพัฒนาเป็นยาเพื่อรักษาโรคไข้เลือดออกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี เนื่องจากผลของ α -MG ไม่เพียงลดปริมาณไวรัส ลดปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส แต่ยังลดผลของไวรัสในการกระตุ้นการสร้างสารไซโตไคน์ซึ่งมีผลต่อการเกิดพยาธิสภาพและความรุนแรงของโรคอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Anderson R, Wang S, Osiowy C, Issekutz AC. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J Virol* 1997;71:4226-4232.
2. Chen J, Ng MM, Chu JJ. Activation of TLR2 and TLR6 by dengue NS1 protein and its implications in the immunopathogenesis of dengue virus infection. *PLoS Pathog.* 2015;11(7):e1005053.
3. Chen JP, Lu HL, Lai SL, *et al.* Dengue virus induces expression of CXC chemokine ligand 10/IFN-gamma-inducible protein 10, which competitively inhibits viral binding to cell surface heparan sulfate. *J Immunol.* 2006;177(5):3185-92.
4. Chen LG, Yang LL, Wang CC. Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:688–693.
5. Chen SX, Wan M, Loh BN. Active constituents against HIV-1 protease from *Garcinia mangostana*. *Planta Med.* 1996;62(4):381-2.
6. Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W. Effect of *Garcinia mangostana* on inflammation caused by *Propionibacterium acnes*. *Fitoterapia.* 2007;78:401–408.
7. Chua JJ, Bhuvanakantham R, Chow VT, Ng ML. Recombinant non-structural 1 (NS1) protein of dengue-2 virus interacts with human STAT3beta protein. *Virus Res.* 2005;112(1-2):85-94.
8. Conroy AL, Gélvez M, Hawkes M, *et al.* Host biomarkers are associated with progression to dengue haemorrhagic fever: a nested case-control study. *Int J Infect Dis.* 2015;40:45-53.
9. Costa VV, Fagundes CT, Souza DG, Teixeira MM. Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: protection versus disease induction. *Am J Pathol.* 2013;182(6):1950-61.
10. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Beck IM, *et al.* A fully dissociated compound of plant origin for inflammatory gene repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:15827-15832.
11. De Clercq E, Li G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(3):695-747.
12. de-Oliveira-Pinto LM, Marinho CF, Pova TF, *et al.* Regulation of inflammatory chemokine receptors on blood T cells associated to the circulating versus liver chemokines in dengue fever. *PLoS One.* 2012;7(7):e38527.

13. Dewint P, Gossye V, De Bosscher K, *et al.* A plant-derived ligand favoring monomeric glucocorticoid receptor conformation with impaired transactivation potential attenuates collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 2008;180:2608-2615.
14. Eppy, Suhendro, Nainggolan L, Rumende CM. The differences between interleukin-6 and C-reactive protein levels among adult patients of dengue infection with and without plasma leakage. *Acta Med Indones.* 2016;48(1):3-9.
15. Gavin PJ, Katz BZ. Intravenous ribavirin treatment for severe adenovirus disease in immunocompromised children. *Pediatrics.* 2002;110(1 Pt 1):e9.
16. Gossye V, Elewaut D, Bougarne N, *et al.* Differential mechanism of NF-kappaB inhibition by two glucocorticoid receptor modulators in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2009;60:3241-3250.
17. Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis.* 2006;19(5):429-36.
18. Guilarde AO, Turchi MD, Siqueira JB Jr, *et al.* Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. *J Infect Dis.* 2008;197(6):817-24.
19. Halstead SB. Dengue. *Lancet.* 2007;370:1644-1652.
20. Hober D, Poli L, Roblin B, *et al.* Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;48(3):324-31.
21. Jang HY, Kwon OK, Oh SR, Lee HK, Ahn KS, Chin YW. Mangosteen xanthones mitigate ovalbumin-induced airway inflammation in a mouse model of asthma. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(11):4042-50.
22. Kelley JF, Kaufusi PH, Nerurkar VR. Dengue hemorrhagic fever-associated immunomediators induced via maturation of dengue virus nonstructural 4B protein in monocytes modulate endothelial cell adhesion molecules and human microvascular endothelial cells permeability. *Virology.* 2012;422(2):326-37.
23. Kelley JF, Kaufusi PH, Volper EM, Nerurkar VR. Maturation of dengue virus nonstructural protein 4B in monocytes enhances production of dengue hemorrhagic fever-associated chemokines and cytokines. *Virology.* 2011;418(1):27-39.
24. Liao B, Tang Y, Hu F, *et al.* Serum levels of soluble vascular cell adhesion molecules may correlate with the severity of dengue virus-1 infection in adults. *Emerg Microbes Infect.* 2015;4(4):e24.

25. Libraty DH, Endy TP, Hough HS, *et al.* Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis.* 2002; 185:1213-1221.
26. Lin YL, Liu CC, Chuang JI, *et al.* Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver cells. *Virology.* 2000;276(1):114-26.
27. Liu SH, Lee LT, Hu NY, *et al.* Effects of alpha-mangostin on the expression of anti-inflammatory genes in U937 cells. *Chin Med.* 2012;7(1):19.
28. Murray NE, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol.* 2013;5:299-309.
29. Nguyen TH, Lei HY, Nguyen TL, *et al.* Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis.* 2004;189(2):221-32.
30. Pedraza-Chaverri J, Reyes-Fermín LM, Nolasco-Amaya EG, *et al.* ROS scavenging capacity and neuroprotective effect of α -mangostin against 3-nitropropionic acid in cerebellar granule neurons. *Exp Toxicol Pathol.* 2009;61:491–501.
31. Rattanaburee T, Junking M, Panya A, *et al.* Inhibition of dengue virus production and cytokine/chemokine expression by ribavirin and compound A. *Antiviral Res.* 2015;124:83-92.
32. Rosen L, Drouet MT, Deubel V. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(5):720-4.
33. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:532-543.
34. Shaneyfelt ME, Burke AD, Graff JW, *et al.* Natural products that reduce rotavirus infectivity identified by a cell-based moderate-throughput screening assay. *Virol J.* 2006;3:68.
35. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen vV, Wills B. Dengue. *N Engl J Med.* 2012;366(15):1423-32.
36. Singla M, Kar M, Sethi T, *et al.* Immune Response to Dengue Virus Infection in Pediatric Patients in New Delhi, India-Association of Viremia, Inflammatory Mediators and Monocytes with Disease Severity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(3):e0004497.
37. Spain-Santana TA, Marglin S, Ennis FA, Rothman AL. MIP-1 alpha and MIP-1 beta induction by dengue virus. *J Med Virol.* 2001;65(2):324-30.
38. Suksanpaisan L, Cabrera-Hernandez A, Smith DR. Infection of human primary hepatocytes with dengue virus serotype 2. *J Med Virol.* 2007;79(3):300-7.

39. Suttitheptumrong A, Khunchai S, Panaampon J, *et al.* Compound A, a dissociated glucocorticoid receptor modulator, reduces dengue virus-induced cytokine secretion and dengue virus production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;436(2):283-8.
40. van Loo G, Sze M, Bougarne N, *et al.* Antiinflammatory properties of a plant-derived nonsteroidal, dissociated glucocorticoid receptor modulator in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Endocrinol.* 2010;24:310-322.
41. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, *et al.* Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis.* 2000;181:2-9.
42. Vlietinck AJ, De Bruyne T, Apers S, Pieters LA. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Med.* 1998;64(2):97-109.
43. Zhang Z, Zhang ZY, Schluesener HJ. Compound A, a plant origin ligand of glucocorticoid receptors, increases regulatory T cells and M2 macrophages to attenuate experimental autoimmune neuritis with reduced side effects. *J Immunol.* 2009;183:3081-3091.

OUTPUT

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จากโครงการที่ได้รับทุนจาก สกว.

Tarasuk M, Songprakhon P, Chimmma P, Na-Bangchang K, Yenchitsomanus PT. Antiviral and Anti-inflammatory Effects of α -Mangostin from *Garcinia mangostana* Linn. in Dengue Virus Infection. (อยู่ในระหว่างการเตรียม manuscript เพื่อส่งผลงานไปตีพิมพ์ในวารสาร Virus Research)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลงานวิจัยนี้มีประโยชน์ในเชิงวิชาการหลายประการ ได้แก่ การพัฒนาศักยภาพนักวิจัยรุ่นใหม่ซึ่งจะสามารถนำความรู้และประสบการณ์ที่ได้รับจากการทำวิจัยนี้ไปถ่ายทอดหรือประยุกต์ใช้ในการเรียนการสอนที่เกี่ยวข้องได้ และจากการเผยแพร่ผลงานในรูปแบบต่างๆ ในวงวิชาการจะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาต่อในเชิงลึกหรือการพัฒนาต่อยอดผลงานวิจัยนี้เพื่อไปสู่การพัฒนาพืชสมุนไพรไทยเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคไข้เลือดออกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีในอนาคต

3. ผลงานอื่นๆ ในระหว่างดำเนินโครงการวิจัย

3.1.การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Anti-inflammatory Effects of Compound A from *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. in Dengue Virus Infection” ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Australasian Society of Clinical and Experimental Pharmacologists and Toxicologists (ASCEPT) and the British Pharmacological Society (BPS) Joint Scientific Meeting ณ University of Hong Kong ประเทศฮ่องกง ระหว่างวันที่ 19-21 พฤษภาคม 2558

3.2.การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Anti-inflammatory Effects of Compound A from *Atractylodes Lancea* (Thunb.) Dc. In Dengue Virus Infection” ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ The 37th Congress on Pharmacology of Thailand ณ Sunee Grand Hotel & Convention Center จังหวัดอุบลราชธานี ระหว่างวันที่ 28-30 พฤษภาคม 2558

3.3.การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Anti-inflammatory Effects of Compound A from *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. in Dengue Virus Infection” ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ The 13th Asia Pacific Federation of Pharmacologist (APFP) Meeting “New Paradigms in Pharmacology for Global Health” ณ The Berkeley Hotel Pratunam กรุงเทพมหานคร ระหว่างวันที่ 1-3 กุมภาพันธ์ 2559