

Thesis Title	Anti-Herpes Simplex Viruses, Antioxidant and Anticancer Activities of Some Herbal Extracts	
Author	Miss Raenu Yucharoen	
Degree	Doctor of Philosophy (Biotechnology)	
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Yingmanee Tragoolpua	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Chusie Trisonthi	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Songyot Anuchapreeda	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Sunee Chansakaow	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Usawadee Chanasut	Co-advisor

ABSTRACT

Anti-HSV activities of rosemary, chamomile, sage, peppermint, lavender, hoary basil, sweet basil, and holy basil were investigated on GMK cells. It was found that dichloromethane extract of rosemary showed the highest toxicity to GMK cells with CD_{50} value of 6.54 $\mu\text{g/ml}$. HSV-1F and HSV-2G viral particles were directly inhibited when treatment with chamomile, peppermint, and hoary basil extracts. Moreover, GMK cells were prevented from HSV-1F infection by peppermint extracts whereas dichloromethane extract of rosemary showed the highest TI value of 3.78 when the cells were treated before HSV-2G infection. Dichloromethane extract of chamomile demonstrated the highest inhibitory effects during HSV-1F adsorption with TI value of 20.74 whereas dichloromethane extract of rosemary showed the highest inhibitory effect during HSV-2G adsorption with TI of 45.63. In addition, dichloromethane

extract of lavender demonstrated significantly the highest inhibitory effects after HSV-1F adsorption with TI value of 45.9 whereas methanol extract of rosemary showed significantly the highest inhibitory effect after HSV-2G adsorption with TI value of 78.24. Peppermint and hoary basil extracts showed the highest anti-HSV-1F and HSV-2G replication. The inhibition of approximately 40 kDa HSV-1F proteins, which involved HSV capsid assembly, was observed after treatment with dichloromethane extract of peppermint.

Moreover, the dichloromethane extract of rosemary showed significantly highest TEAC of 1.262 after determination of free radical inhibition by ABTS decolorization assay whereas, dichloromethane extract of sage at 10 mg/ml showed the highest percentage protection against BSA protein damage, which was 75.38. Besides, the methanol extract of chamomile showed the highest toxicity on KB-3-1 cells with CD_{50} value of 0.062 mg/ml whereas the dichloromethane extract of lavender showed the highest toxicity on HeLa cells with CD_{50} value of 0.041 mg/ml after determination by MTT assay. The dichloromethane extract of rosemary demonstrated the highest toxicity on H520, HeLa, and H460 cells with CD_{50} values of 1.52, 1.034, and 1.94 μ g/ml, respectively after determination by crystal violet staining assay whereas the RMF4, RMF2, and RMF2 fractions of methanol extracts of rosemary showed the highest cytotoxicity on H520, HeLa, and H460 cells with CD_{50} values of 1.139, 0.513, and 1.543 μ g/ml, respectively.

Furthermore, comet cells was found after treating KB-3-1 cells with methanol extract of chamomile at the concentration of 0.12 mg/ml with the highest comet cells 92.43% whereas comet cells were observed when treating HeLa cells with

dichloromethane extract of lavender at the concentration of 0.08 mg/ml with the highest comet cells by 83.05%. At 24 hours incubation, the dichloromethane extract of rosemary was effective on H520 cells with the highest apoptotic cells by 87.4%. The methanol extract of holy basil was effective on HeLa cells with the highest apoptotic cells by 96.4% whereas dichloromethane extract of chamomile was effective on H460 cells with the highest apoptotic cells by 95.7%. In addition, RMF2 fraction of methanol extract of rosemary showed apoptotic induction higher than RDF5 fraction. Apoptotic cells of RMF2 fraction were 85.4 and 89.5 % when treatment on H520 and H460 cells. Analysis of RMF2 fraction by NMR showed that terpene was a major compound in this fraction. In summary, rosemary extracts showed the highest anti-HSV activities of various stage of the viral multiplication cycle, anti-oxidative, and anti-cancer activities. These knowledges obtained from this study will be useful in order to develop therapeutic potential drug from these herbs as anti-HSV, antioxidant, and anticancer agents in the future.

Key words: anti-cancer, anti-HSV, antioxidant, cancer, HSV, plant extract

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริม ด้านอนุมูลอิสระ และด้านมะเร็งของสารสกัดสมุนไพรบางชนิด	
ผู้เขียน	นางสาวเรณู อยู่เจริญ	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. ยິงมณี ตระกูลพั้ว รศ. ดร. ชุศรี ไตรสนธิ ผศ. ดร. ทรงยศ อนุชปริดา ผศ. ดร. สุนีย์ จันทร์สกา ผศ. ดร. อุษาดี ชนสุด	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพสมุนไพร ได้แก่ โรสแมรี่ คาโมมายด์ เสง เปปเปอร์มินท์ ลาเวนเดอร์ แมงลัก โหระพา และกะเพรา ต่อการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริม ในเซลล์ GMK โดยพบว่า สารสกัดไคคลอโรมีเทนของโรสแมรี่ มีค่าความเป็นพิษสูงสุดโดยมีค่า CD_{50} เท่ากับ 6.54 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดคาโมมายด์ เปปเปอร์มินท์ และแมงลักสามารถยับยั้งอนุภาคไวรัสของเชื้อไวรัสชนิดที่ 1 และไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ได้โดยตรง นอกจากนี้ สารสกัดเปปเปอร์มินท์สามารถป้องกันเซลล์ GMK จากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 ขณะที่สารสกัดไคคลอโรมีเทนของโรสแมรี่ มีค่า TI สูงสุดเท่ากับ 3.78 โดยสามารถป้องกันเซลล์จากการติดเชื้อไวรัสชนิดที่ 2 เมื่อทดสอบการยับยั้งในขั้นตอนระหว่างการเกาะติดของเชื้อไวรัสชนิดที่ 1 กับเซลล์ พบว่า สารสกัดไคคลอโรมีเทนของคาโมมายด์ มีค่า TI สูงสุดเท่ากับ 20.74 โดยสารสกัดไคคลอโรมีเทนของโรสแมรี่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งขั้นตอนระหว่างการเกาะติดของเชื้อไวรัสชนิดที่ 2 โดยมีค่า TI สูงสุดเท่ากับ 45.63 นอกจากนี้ประสิทธิภาพของสารสกัดไคคลอโรมีเทนของลาเวนเดอร์สามารถยับยั้งไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 ภายหลังจากเกาะติดพบว่า TI สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ 45.9 ขณะที่สารสกัดเมทานอลของโรสแมรี่สามารถยับยั้งขั้นตอนภายหลังไวรัสก่อโรคเริม

ชนิดที่ 2 เกษะติดมีค่า TI สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ 78.24 เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสพบว่า สารสกัดเปปเปอร์มินท์และแมงลักมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 และไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 และจากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งโปรตีนของไวรัสพบว่า สารสกัดไคคโลโรมีเทนของเปปเปอร์มินท์ยับยั้งโปรตีนของไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 ที่ขนาด 40 kDa ซึ่งเกี่ยวข้องกับการประกอบเป็นแคปซิดของอนุภาคไวรัส

นอกจากนี้เมื่อทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี ABTS decolorization พบว่า สารสกัดไคคโลโรมีเทนของโรสแมรี่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระโดยมีค่า TEAC สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ 1.262 ในขณะที่สารสกัดของเสกที่ความเข้มข้น 10 mg/ml สามารถป้องกันการเสียหายของ BSA โปรตีน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การป้องกันการสูญเสียสภาพโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 75.38 นอกจากนี้ จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยวิธี MTT พบว่า สารสกัดเมทานอลของคาโมไมด์ให้ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ KB-3-1 สูงสุดโดยมีค่า CD_{50} เท่ากับ 0.062 mg/ml ขณะที่สารสกัดไคคโลโรมีเทนของลาเวนเดอร์ให้ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa สูงสุดโดยมีค่า CD_{50} เท่ากับ 0.041 mg/ml เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ H520, HeLa, และ H460 โดยวิธี crystal violet staining พบว่าสารสกัดไคคโลโรมีเทนของโรสแมรี่ให้ค่าความเป็นพิษสูงสุดที่ CD_{50} เท่ากับ 1.52, 1.034, และ 1.94 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดแยกส่วนเมทานอลของโรสแมรี่ RMF4, RMF2, และ RMF2 ให้ค่าความเป็นพิษสูงสุดต่อเซลล์ H520, HeLa, และ H460 มีค่า CD_{50} เท่ากับ 1.139, 0.513, และ 1.543 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

เมื่อทำการทดสอบสารสกัดเมทานอลของคาโมไมด์ ในเซลล์ KB-3-1 โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.12 mg/ml พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์ comet สูงสุดเท่ากับ 92.43 ขณะที่ทำการทดสอบไคคโลโรมีเทนของลาเวนเดอร์ ในเซลล์ HeLa โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.08 mg/ml พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิด comet cell สูงสุดเท่ากับ 83.05 และจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโตซิส ในชั่วโมงที่ 24 พบว่า สารสกัดไคคโลโรมีเทนของโรสแมรี่มีประสิทธิภาพสูงสุดที่ทำให้เซลล์ H520 ตายแบบอะพอพโตซิสเท่ากับ 87.4% สารสกัดเมทานอลของกะเพรามีประสิทธิภาพสูงสุดที่ทำให้เซลล์ HeLa ตายแบบอะพอพโตซิสเท่ากับ 96.4% ขณะที่สารสกัดไคคโลโรมีเทนของคาโมไมด์มีประสิทธิภาพสูงสุดที่ทำให้เซลล์ H460 ตายแบบอะพอพโตซิสเท่ากับ 95.7% นอกจากนี้ส่วนสกัดแยกส่วนเมทานอลของโรสแมรี่ RMF2 มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโตซิสได้ดีกว่า สารสกัดแยกส่วน

ไดคลอโรมีเทนของโรสแมรี่ RDF5 โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดอะพอโตซิสของเซลล์ H520 และ H460 เท่ากับ 85.4 และ 89.5 ตามลำดับ และเมื่อทำการแยกวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการเคมีที่สำคัญ ใน RMF2 โดยเทคนิค NMR พบว่าเป็นสารในกลุ่ม terpene โดยสรุป สารสกัดโรสแมรี่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกลไกต่างๆในการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเรื้อรัง ต้านอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็งได้ดีที่สุด ความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ ในการพัฒนาที่มีประสิทธิภาพ จากพืชสมุนไพรในการต้านไวรัสก่อโรคเรื้อรัง ต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็งในอนาคต.

คำสำคัญ: ต้านมะเร็ง, ต้านไวรัสก่อโรคเรื้อรัง, ต้านอนุมูลอิสระ, มะเร็ง, ไวรัสก่อโรคเรื้อรัง, สารสกัดพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved