ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ของสารสกัดจากเขยตาย สะอึก และคุย

นายไพศาล พิบูลรัตนากุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN : 974-17-6318-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTIHERPES SIMPLEX VIRUS ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM *GLYCOSMIS PENTAPHYLLA* (RETZ.) DC., *IPOMOEA MAXIMA* (LINN.F.) DON, AND *WILLUGHBEIA EDULIS* ROXB

Mr.Paisan Piboonrattanakul

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy in Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN : 974-17-6318-2

Thesis Title	ANTIHERPES SIMPLEX VIRUS ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM *GLYCOSMIS PENTAPHYLLA* (RETZ.) DC., *IPOMOEA MAXIMA* (LINN.F.) DON, AND *WILLUGHBEIA EDULIS* ROXB.
By	Mr.Paisan Piboonrattanakul
Field of Study	Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Instructor Pagorn Taweechotipatr

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph. D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Pintip Pongpech, Ph. D.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

..... Thesis Co-Advisor
(Instructor Pagorn Taweechotipatr)

..... Member
(Assiociate Professor Chaiyo Chaicharntipayut)

.....Member
(Assistant Professor Wongcare Hongvisitgul)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไพศาล พิบูลรัตนากุล : ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ของสารสกัดเขยตาย สะอึก และคุย. ANTIHERPES SIMPLEX VIRUS ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM *GLYCOSMIS PENTAPHYLLA* (RETZ.) DC., *IPOMOEA MAXIMA* (LINN.F.) DON, AND *WILLUGHBEIA EDULIS* ROXB:อ.ที่ปรึกษา รศ. ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์ :อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ. ปกรณ์ ทวีโชติภัทร์ , 80 หน้า ISBN : 974-17-6318-2

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ทัยป์ 1(KOS) และทัยป์ 2 (Baylor 186) ของสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด คือ เขยตาย สะอึก และคุย โดยวิธี inactivation, prophylactic activity และ plaque reduction ใน Vero cell line สารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ดีที่สุดในวิธี inactivation โดยพบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสในสารสกัดเอธานอล (F1) คลอโรฟอร์ม (F2) เมธานอล (F3) เฮกเซน (F4) และ น้ำ (F5) สารสกัด F4 /เขยตาย F3 /สะอึก และ F4/คุย ให้ผลยับยั้งเชื้อไวรัสได้สูงสุด โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ไวรัสทัยป์1(ทัยป์2) ได้ 50%(EC_{50})เท่ากับ11.36±0.51(9.66±0.20),9.14±0.49(10.11±0.21),15.05±0.46(18.87±0.86) ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า selective index ในการมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ทัยป์ 1 (ทัยป์ 2) ของสารสกัด F4 /เขยตาย F3 /สะอึก และ F4 / คุย เท่ากับ 80.93(95.17), 15.46 (13.97) และ 71.36 (56.91) ตามลำดับ

สารสกัดที่ให้ผลดีที่สุดคือ F4 /เขยตาย F3 /สะอึก และ F4 / คุย นำไปศึกษากลไกเบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อไวรัสโดยวิธี post binding , penetration inhibition และ virus yield inhibition ใน post binding assay ค่ายับยั้งการเกิด plaque สูงสุดของ F4 /เขยตาย F3 /สะอึก และ F4 / คุย ที่ความเข้มข้น 1600 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร เท่ากับ 55, 70 และ 55% ตามลำดับ ใน penetration assay สารสกัดยับยั้งการเกิด plaque ได้สูงสุดที่ 15 นาทีของการ penetrate ของไวรัสเข้าสู่เซลล์โดยมีค่าเท่ากับ 60% ของF4 /เขยตาย F3 /สะอึก และ F4/คุย ใน virus yield inhibition พบว่า สารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ให้ผลยับยั้งการเกิด plaque ได้สูงสุดที่การบ่มนาน 72 ชั่วโมง และให้ผลแปรตามความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร

จากการศึกษานี้แสดงถึงฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ไวรัสทัยป์1 และทัยป์2 โดยการทดสอบในหลอดทดลอง และสามารถนำสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดนี้มาศึกษาและพัฒนาเป็นยายับยั้งเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ได้ต่อไป

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....ไพศาล พิบูลรัตนากุล.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....วิมลมาศ ลิปิพันธ์.....

ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....ปกรณ์ ทวีโชติภัทร์.....

4476596833 : MAJOR Microbiology

KEY WORD: Herpes simplex virus type1 and type 2/Crude extracts/Antiherpes simplex virus activity/ Medicinal plants/Plaque reduction assay

ANTIHERPES SIMPLEX VIRUS ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM *GLYCOSMIS PENTAPHYLLA* (RETZ.) DC., *IPOMOEA MAXIMA* (LINN.F.) DON, AND *WILLUGHBEIA EDULIS* ROXB. THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR VIMOLMAS LIPIPUN ,Ph.D., THESIS COADVISOR : PAGORN TAWEECHOTIPATR 80 pp. ISBN : 974-17-6318-2

The extracts from the leaves of 3 medicinal plants:*Glycosmis pentaphylla* (Retz*)* DC, *Ipomoea maxima* Linn, f., and *Willughbeia edulis* Roxb. Were tested for antiviral activity *in vitro* against HSV-1 strain KOS and HSV-2 strain Baylor 186 by inactivation, prophylactic activity and plaque reduction assay in Vero cell line. The inactivation assay revealed the highest antiviral activities of these three plant extracts. The inactivation activity of active extracts from three plants were showed in ethanol fraction (F1), chloroform fraction (F2), methanol fraction (F3), hexane fraction (F4), and aqueous fraction (F5). The most active extracts of *G. pentaphylla, I. maxima* and *W. edulis* were F4, F3 and F4, respectively. The 50% effective dose (EC_{50}) of these extracts against HSV-1 (HSV-2) were 11.36±0.51(9.66±0.20), 9.14±0.49 (10.11±0.21), 15.05±0.46(18.87±0.86) µg/ml, respectively. The selective index for anti-HSV-1 (anti-HSV-2) of 80.93(95.17), 15.46 (13.97) and 71.36 (56.91) were observed for F4/*G. pentaphylla* , F3/*I. maxima* and F4/*W. edulis,* respectively.

The most active fraction of each plant, F4/ *G. pentaphylla*, F3 / *I. maxima* and F4 /*W. edulis* were selected for preliminary mechanism study of antiviral activity in post binding assay , penetration inhibition assay and virus yield inhibition assay, In post binding assay, the maximum of inhibition in plaque forming at concentration of 1600 ug/ml were observed at 55% for F4/ *G. pentaphylla*, 70% for F3 / *I. maxima*, and 55% for F4 / *W. edulis*. For the penetration assay, the maximum inhibition in plaque forming were exhibited at 15 min of penetration of HSV-1 and HSV-2 into the cells were 60% for all 3 extracts, F4 / *G. pentaphylla*, F3 / *I. maxima*, and F4/ *W. edulis.* In virus yield inhibition assay, it was found that the percent inhibition of plaque forming was maximum at 72 h incubation and was concentration dependent for all 3 plant extracts.

This study has indicated some of the ethanobotanical reports of these three medicinal plants having *in vitro* antiviral properties against herpes simplex virus. These 3 medicinal plants will be further studied and used for anti-herpes simplex virus drug development.

Department/Program Microbiology		Student's signature..... Paisan Piboonrodtanakul
Field of study	Microbiology	Advisor's signature..... Vimolmas Lipipun
Academic year	2004	Co-Advisor's signature..... Pagorn Taweechotipatr

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my infinite gratitude and deep appreciation to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun for her guidance, suggestion, kindness and encouragement throughout my research study. She is always stand beside me to help, consult and advise me in every way that would bring me success and great development.

I also would like to express my thanks and deep gratitude to Instructor Pagorn Taweechotipatr, thesis co-advisor , for his helpful suggestion for the completion of this thesis.

I would like to express my sincere gratitude and deep appreciation to Associate Professor Dr. Pintip Pongpech for her kindness and helpful suggestion during my study.

I also would like to express my sincere thanks to Associate Professor Chaiyo Chaichantipayuth and Assistant Professor Wongcare Hongvisitgul for their valuable advices.

I also would like to express my thanks to all stuff in the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their kindness and valuable help.

My financial support was provided by the teaching assistantship of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

The budget of this study was supported by the research budget of Department of University Affair, Ministry of Education.

I wish to express my sincere appreciation to the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for providing facilities during my study.

My sincere gratitude is also given to my friends for their great love, understanding, assistance, and encouragement throughout this graduate study.

Finally, special gratitude is extended to my dear parents and my freinds for their love, understanding, helpful and continuous support all my life.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI)....iv

ABSTRACT (ENGLISH)....v

ACKNOWLEDGEMENTS....vi

CONTENTS....vii

LIST OF TABLES....viii

LIST OF FIGURES....ix

LIST OF ABBREVIATIONS....xi

CHAPTER I INTRODUCTION....1

CHAPTER II LITERATURE REVIEWS....4

CHAPTER III MATERIALS AND METHODS....29

CHAPTER IV RESULTS....36

CHAPTER V DISCUSSION....59

CHAPTER V CONCLUSION....64

REFERENCES....66

APPENDIX....75

BIOGRAPHY....80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table Page

1 In vitro antiviral screening assay.....17
2 List of medicinal plants with antiviral activities against herpes simplex viruses 26
3 Plant materials used in this study.....30
4 Percent yield of crude extracts.....39
5 In vitro cytotoxic concentration (CC_{50}) of medicinal plant extracts.....39
6 Antiviral activities of *Glycosmis pentaphylla* against HSV-1 and HSV-2 in inactivation, prophylactic and plaque reduction assay.....40
7 Antiviral activities of *Ipomoea maxima* against HSV-1 and HSV-2 in inactivation, prophylactic and plaque reduction assay.....41
8 Antiviral activities of *Willughbeia edulis* against HSV-1 and HSV-2 in inactivation , prophylactic and plaque reduction assay.....42
9 Antiviral activity of acyclovir against herpes simplex virus.....46
10 Inhibitory concentration (IC_{50}) of medicinal plant in virus yield inhibition assay.....56
11 Penetration assay of acyclovir against herpes simplex virus.....57
12 Virus yield inhibition assay of acyclovir against herpes simplex virus.....58

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Diagram of a virion of herpes simplex virus	8
2	Sequence of events in the multiplication of herpes simplex virus	8
3	Acyclovir inhibition of viral DNA synthesis	21
4	Extraction scheme of medicinal plants	31
5	Antiviral activity of hexane extract from *Glycosmis pentaphylla* against herpes simplex virus A, inactivation assay B, prophylactic assay C, plaque reduction assay	43
6	Antiviral activity of aqueous extract from *Ipomoea maxima* against herpes simplex virus A, inactivation assay B, prophylactic assay C, plaque reduction assay	44
7	Antiviral activity of hexane extract from *Willughbeia edulis* against herpes simplex virus A, inactivation assay B, prophylactic assay C, plaque reduction assay	45
8	Post binding assay against herpes simplex virus of hexane extract from *Glycosmis pentaphylla*	49
9	Post binding assay against herpes simplex virus of aqueous extract from *Ipomoea maxima*	49
10	Post binding assay against herpes simplex virus of aqueous extract from *Willughbeia edulis*	49
11	Penetration assay against herpes simplex virus of hexane extract from *Glycosmis pentaphylla*	50
12	Penetration assay against herpes simplex virus of aqueous extract from *Ipomoea maxima*	51
13	Penetration assay against herpes simplex virus of hexane extract from *Willughbeia edulis*	52
14	Virus yield inhibition assay against herpes simplex virus of hexane extract from *Glycosmis pentaphylla*	53

LIST OF FIGURES(cont.)

Figure Page

15 Virus yield inhibition assay against herpes simplex virus of aqueous extract from *Ipomoea maxima* 54

16 Virus yield inhibition assay against herpes simplex virus of hexane extract from *Wiilughbeia edulis*.....55

17 Post-binding assay of acyclovir against herpes simplex virus.....57

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATION

ACV	acyclovir
Anti-HSV	anti-herpes simplex virus
CC50	50% cytotoxicity concentration
EC50	50% effective concentration
F1	ethanol fraction
F2	chloroform fraction
F3	methanol fraction
F4	hexane fraction
F5	aqueous fraction
h	hour
MEM	Minimum Essential Medium
mg	milligram
µg	microgram
µl	microliter
µM	micromolar
min	minute
ml	milliliter
MOI	multiplicity of infection
PBS	phosphate buffered saline solution
PFU	plaque forming unit
SI	selective index

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย