Journal of Agr. Research & Extension 30(1): 33-43

346146

ฤทธิ์ต้านไวรัสของสารสกัดหยาบทองพันชั่งต่อการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145

Anti-viral Potential of *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz Crude Extracts on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection in MARC-145 Cells

โสภิตา ช่วยชู[1] ชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล[2] ธัญวรัตน์ กาจสงคราม[2] รุ่งทิพย์ กาวารี[1] และวศิน เจริญตัณฑนกุล[1*]

Sopitha Chuaychu[1], Chuleerat Banchonglikitkul[2], Tanwarat Kajsongkram[2], Rungthip Kawaree[1] and Wasin Charerntantanakul[1*]

[1]สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[2]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ปทุมธานี 12120

[1]Program of Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

[2]Thailand Institute of Science and Technological Research, Pathum Thani, Thailand 12120

*Corresponding author: wasin@mju.ac.th

Abstract

The present study investigates the anti-viral potential of *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz crude extracts on porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus replication in MARC-145 cells. Leaves and branches of *R. nasutus* were dried at 50-60°C for 3 days, pulverized, and percolated in distilled water or ethanol 50, 70 or 95%. The crude extracts were assessed for optimal concentration, i.e. highest concentration that was least cytotoxic to MARC-145 cells, for subsequent studies. Results showed that, of all crude extracts obtained, the 50% ethanolic extract demonstrated highest anti-viral activity in both pre- and post-infection assays. The extract reduced PRRS virus titer from 10^8 tissue culture infectious $dose_{50}$ ($TCID_{50}$)/ml to $10^{2.1}$ and $10^{2.2}$ $TCID_{50}$/ml in pre- and post-infection assays, respectively. On the contrary, crude water and 70 and 95% ethanolic extracts reduced PRRS virus titers to the range of $10^{4.7}$ and $10^{5.5}$ $TCID_{50}$/ml. Findings of this study suggest that *R. nasutus* may be applied for future PRRS virus control to reduce clinical loss of pigs.

Keywords: *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz, porcine reproductive and respiratory syndrome virus

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz) ต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอส (PRRS; porcine reproductive and respiratory syndrome) ในเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145 การศึกษาเริ่มจากนำส่วนใบและกิ่งอ่อนของทองพันชั่ง มาผ่านกระบวนการทำแห้งที่อุณหภูมิ 50-60°ซ เป็นเวลา 3 วัน แล้วบดละเอียด สกัดโดยใช้ตัวทำละลายน้ำกลั่นหรือเอธานอลที่ความ

เข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 50, 70 และ 95% โดยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง (percolation) นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145 และนำความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ มาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการติดเข้าสู่เซลล์ (pre-infection assay) และฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสภายหลังติดเข้าสู่เซลล์ (post-infection assay) ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดทองพันชั่งด้วยเอธานอล 50% มีฤทธิ์ยับยั้งไวรัสพีอาร์อาร์เอส ทั้งก่อนและหลังการติดเข้าสู่เซลล์ดีที่สุด โดยสามารถลดไตเตอร์ไวรัสจาก 10^{8} tissue culture infectious $dose_{50}$ ($TCID_{50}$)/มล. เหลือ $10^{2.1}$ และ $10^{2.2}$ $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดด้วยน้ำกลั่นเอธานอล 70 และ 90% สามารถลดไตเตอร์ของไวรัสทั้งก่อนและหลังการติดเข้าสู่เซลล์เหลือระหว่าง $10^{4.7}$ และ $10^{5.5}$ $TCID_{50}$/มล. องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้อาจนำไปประยุกต์ใช้เพื่อลดความสูญเสียของสุกรจากไวรัสพีอาร์อาร์เอสในอนาคตได้

คำสำคัญ: ทองพันชั่ง ไวรัสพีอาร์อาร์เอส

คำนำ

ไวรัสพีอาร์อาร์เอส (PRRS; porcine reproductive and respiratory syndrome) เป็นไวรัสในวงศ์ *Arteriviridae* ที่ก่อปัญหาทางระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจของสุกร เชื้อไวรัสมีจีโนม (genome) เป็นกรดไรโบนิวคลีอิกสายเดี่ยวแบบบวก (positive-sense single–stranded ribonucleic acid) หุ้มด้วยเอนวีโลป (envelope) เชื้อไวรัสทำให้สุกรเกิดปัญหาผสมติดยากและแท้งระยะท้าย และทำให้ลูกที่รอดออกมาโตช้า แคระแกร็น และมีอัตราการติดเชื้อแทรกซ้อนอื่นๆ สูง (Mengeling *et al.*, 1998; Halbur *et al.*, 2000; van der Linden *et al.*, 2003; Cheon and Chae., 2004) สุกรขุนที่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสจะแสดงอาการปอดอักเสบ โตช้า และตาย (Rossow *et al.*, 1994; van der Linden *et al.*, 2003; Thanawongnuwech *et al.*, 2004)

เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสมีความสามารถในการกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสุกร ทั้งต่อตัวไวรัสเองและต่อเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆ เช่น ไวรัสอหิวาต์สุกร (classical swine fever virus) ไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม (pseudorabies virus) และกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อโรคทางระบบทางเดินหายใจในสุกร ส่งผลให้สุกรป่วยด้วยโรคติดเชื้อต่างๆ ง่ายขึ้นและรุนแรงขึ้น (Thacker, 2001) และมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าลง ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสุกรมีต้นทุนการผลิตสุกรสูงขึ้น รวมถึงมีค่าใช้จ่ายด้านเวชภัณฑ์เพื่อการรักษาโรคติดเชื้อแทรกซ้อนมากขึ้น ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีรายงานการประเมินมูลค่าความเสียหายทางเศรษฐกิจ ที่เกิดจากเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกร คิดเป็นมูลค่าประมาณปีละ 500 ล้านเหรียญสหรัฐ (Neumann *et al.*, 2005) ส่วนในประเทศไทย มูลค่าความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่เกิดจากไวรัสพีอาร์อาร์เอส ยังไม่มีรายงานอย่างเป็นทางการ แต่เป็นที่ยอมรับในกลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตสุกรว่า ไวรัสพีอาร์อาร์เอสทำให้ผลผลิตสุกรของฟาร์มลดลงอย่างชัดเจน

ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการจัดการใดที่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในสุกรได้อย่างมีประสิทธิภาพ การฉีดวัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสเป็นวิธีหนึ่งในหลายวิธีที่เกษตรกรนิยมใช้ เพราะมีค่าใช้จ่ายที่ไม่สูงมากและสามารถป้องกันโรคได้ แต่ว่าการฉีดวัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสมีข้อจำกัด คือ วัคซีนจะป้องกันโรคได้ต่อเมื่อสุกรมีการติดเชื้อซ้ำภายหลังได้รับวัคซีนไปแล้วอย่างน้อย 1 เดือน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่นานมาก ถ้าหากสุกรติดเชื้อซ้ำภายในระยะเวลาไม่ถึง 1 เดือนหลังฉีดวัคซีน สุกรอาจแสดงอาการป่วยไม่แตกต่างจากสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนเลย นอกจากนี้ ภูมิคุ้มกันที่สุกรสร้างขึ้นภายหลังการฉีดวัคซีนยังมีความจำเพาะกับสายพันธุ์ของไวรัส สุกรที่ได้รับวัคซีนและมีการติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสที่มีสายพันธุ์แตกต่างจากวัคซีน อาจป่วยด้วยโรคพีอาร์อาร์เอสได้ และความรุนแรงของโรค อาจไม่แตกต่างกับสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีน (Zuckermann *et al.*, 2007; Charerntantanakul, 2012)

วิธีการจัดการอื่นร่วมกับการใช้วัคซีนป้องกันโรค ที่อาจช่วยลดระดับความรุนแรงของโรคพีอาร์อาร์เอสได้ดียิ่งขึ้น เช่น การใช้สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านไวรัส ซึ่งในประเทศไทยมีพืชสมุนไพรหลายชนิดที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านไวรัส (วันดี, 2536) และบางชนิดมีรายงานว่ามีฤทธิ์ยับยั้งไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ เช่น พญายอ (*Clinacantus nutans*) และพลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb) (โสภิตา และคณะ, 2554a และ 2554b) เป็นต้น และยังมีพืชสมุนไพรอีกหลายชนิดที่ยังไม่เคยมีการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสพีอาร์อาร์เอส คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ดังกล่าวของพืชสมุนไพรไทยชนิดต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลต่อการประยุกต์ใช้พืชสมุนไพรเหล่านั้นในอนาคต

ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz) เป็นพืชในวงศ์ *Acanthaceae* มีลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูงประมาณ 1 เมตร มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านไวรัส ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านมะเร็ง เป็นต้น (Sendl *et al.*, 1996; Akanitapichat *et al.*, 2002; Sattar *et al.*, 2004; Tewtrakul *et al.*,2009) ฤทธิ์ต้านไวรัสของทองพันชั่งมีรายงานว่า สารสกัดหยาบด้วยเอธานอล (ethanol) สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ herpes simplex type-1 และ cytomegalovirus ในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ (Sendl *et al.*, 1996; Akanitapichat *et al.*, 2002)

ทองพันชั่งเป็นพืชสมุนไพรที่ปลูกได้ง่าย ปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทยและปลูกได้ตลอดปี ทำให้พืชสมุนไพรชนิดนี้มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตสุกรเพื่อช่วยลดความรุนแรงของโรคพีอาร์อาร์เอส รวมถึงการศึกษาต่อเนื่องในเรื่องของการประยุกต์ใช้พืชสมุนไพรไทยเพื่อการควบคุมโรคไวรัสในปศุสัตว์

อุปกรณ์และวิธีการ

การสกัดและเตรียมสารออกฤทธิ์จากทองพันชั่ง

นำส่วนใบและกิ่งอ่อนของทองพันชั่งจากแหล่งปลูกในมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ผึ่งแดดประมาณ 3 วัน แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 50-60°ซ จากนั้นนำมาบดละเอียดและสกัดสารออกฤทธิ์ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ น้ำกลั่น และเอธานอล 50, 70 และ 95%

การสกัดด้วยน้ำกลั่น โดยการต้มผงสมุนไพรในน้ำเดือด 1 ชั่วโมง แล้วกรองสารละลายด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman) ตามลำดับ จากนั้นระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ก่อนทำแห้งด้วยวิธีการพ่นฝอยด้วยเครื่อง spray dryer

การสกัดด้วยเอธานอล โดยการแช่ผงสมุนไพรลงในภาชนะขวดแก้วที่มีตัวทำละลายชนิดต่างๆ นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้สมุนไพรพองตัวเต็มที่ก่อนหมักทิ้งไว้ในถังหมัก (percolator) นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำเอาสารสกัดออกจากถังหมัก กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator

ทำละลายกลับสารสกัดหยาบทองพันชั่งด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++} ซึ่งประกอบด้วย minimal essential media (MEM; Thermo Scientific), 10% fetal bovine serum (PAA), 1% tissue-culture penicillin/streptomycin (Gibco) และ 1% dimethyl sulfoxide (Fisher) ปรับความเข้มข้นตั้งต้นของสารละลายสารสกัดหยาบให้เท่ากับ 100 มก./มล. กรองสารละลายสารสกัดหยาบผ่านตัวกรองขนาด 0.22 ไมครอน (Sartorius) แล้วเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ -2°ซ

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบทองพันชั่งต่อเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145

เจือจางสารละลายสารสกัดหยาบทองพันชั่งด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++} ให้ได้สารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้น 50, 25, 12.50, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10, 0.05, 0.02 และ 0.01 มก./มล.

บ่มเซลล์ MARC-145 ที่ความเข้มข้น $5x10^5$ เซลล์/มล. จำนวน 100 ไมโครลิตร (ได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงศ์นุเวช คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) กับสารละลายสารสกัดหยาบทองพันชั่งที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-well plate; Nunc) ที่อุณหภูมิ 37°ซ ในตู้บ่มที่มีความชื้น และ 5% CO_2 เป็นเวลา 3 วัน

วิเคราะห์การตายของเซลล์ MARC-145 โดยการย้อมสี 0.5% crystal violet และ Sorenson's citrate buffer และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (Fernandes *et al.*, 2005) เลือกความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดหยาบทองพันชั่งที่มากที่สุด ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไว้ศึกษาต่อกลุ่มควบคุม ได้แก่ เซลล์ MARC-145 ที่ไม่ได้รับสารละลายสารสกัดหยาบทองพันชั่ง แต่ได้รับ 100 ไมโครลิตร ของอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++} ทดแทน

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดหยาบที่ทำให้เซลล์ MARC-145 ตาย 50% (ค่า 50% cytotoxic concentration หรือ CC50) โดยคำนวณจากโค้งมาตรฐาน ที่มีแกนตั้งเป็นค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ และแกนนอนเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัด ค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์คำนวณจากสูตร ดังนี้

$$\text{ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงในเซลล์ที่ได้รับสารสกัด}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงในเซลล์กลุ่มควบคุม}} \times 100$$

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการยับยั้งการติดเข้าสู่เซลล์ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส (pre-infection assay)

บ่มเซลล์ MARC-145 ที่ความเข้มข้น $5x10^5$ เซลล์/มล. จำนวน 10 มล. ในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด T25 (Nunc) ที่อุณหภูมิ 37°ซ ในตู้บ่มที่มีความชื้น และ 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง

ที่ 1 ชั่วโมงก่อนครบเวลาบ่มที่กำหนด บ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ 01NP1 (passage 9^{th}; ไตเตอร์ (titer) 10^8 tissue culture infectious $dose_{50}$ ($TCID_{50}$); ปริมาตร 1 มล.) (ได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงศ์นุเวช คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ร่วมกับสารละลายสารสกัดหยาบทองพันชั่ง ที่ความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 (ปริมาตร 5 มล.) ในหลอดทดลองขนาด 14 มล. (Nunc) โดยบ่มนาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°ซ ในตู้บ่มที่มีความชื้น และ 5% CO_2

จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ในถาดเพาะเลี้ยงออก แล้วเติมไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบทองพันชั่งที่เตรียมไว้ลงในถาดเพาะเลี้ยง ร่วมกับเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++} ปริมาตร 4 มล. (ปริมาตรรวมในถาดเพาะเลี้ยง เท่ากับ 10 มล.) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°ซ ในตู้บ่มที่มีความชื้น และ 5% CO_2 เป็นเวลา 4 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง (cytopathic effect; CPE) (รุ่งโรจน์, 2548) (Figure 1)

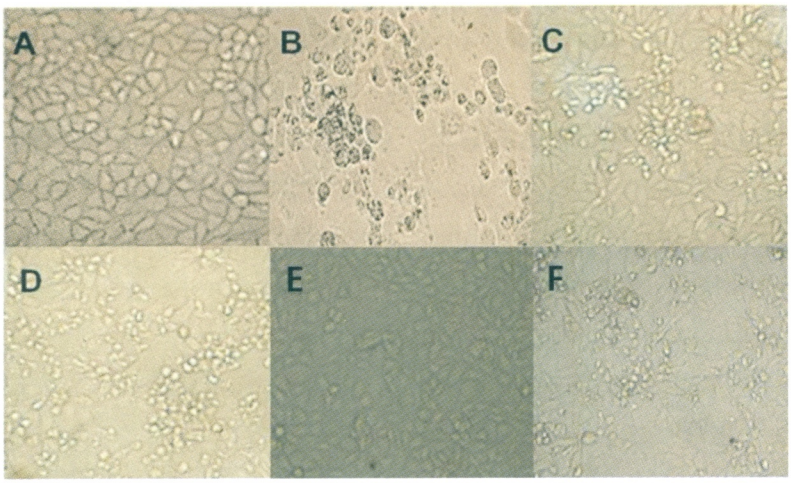

Figure 1 Comparison of (A) normal MARC-145 cells, (B) PRRSV-infected MARC-145 cells with pyknosis, (C) PRRSV-infected MARC-145 cells with shrinkage, (D) PRRSV-infected MARC-145 cells with aggregation, (E) MARC-145 cells incubated with *R. nasutus* crude extract and (F) MARC-145 cells incubated with *R. nasutus* crude extract and PRRSV

สำหรับกลุ่มควบคุม บ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์ 01NP1 (passage 9th; ไตเตอร์ 10^8 $TCID_{50}$; ปริมาตร 1 มล.) ร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++} (ปริมาตร 5 มล.) ในหลอดทดลองขนาด 14 มล. นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°ซ ในตู้บ่มที่มีความชื้น และ 5% CO_2 จากนั้นเติมไวรัสดังกล่าวลงในถาดเพาะเลี้ยง ร่วมกับเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++} ปริมาตร 4 มล. (ปริมาตรรวมในถาดเพาะเลี้ยง เท่ากับ 10 มล.) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°ซ ในตู้บ่มที่มีความชื้น และ 5% CO_2 เป็นเวลา 4 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง

ทำการเก็บไวรัสด้วยวิธี freeze-thaw 2 ครั้ง ปั่นแยกตะกอนเซลล์ และกรองส่วนใส (supernatant) ผ่านตัวกรองขนาด 0.22 ไมครอน (Sartorius) แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -80°ซ

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอส (post-infection assay)

บ่มเซลล์ MARC-145 ที่ความเข้มข้น $5x10^5$ เซลล์/มล. จำนวน 10 มล. ในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด T25 ที่อุณหภูมิ 37°ซ ในตู้บ่มที่มีความชื้น และ 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาที่กำหนด ปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติมไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ 01NP1 (passage 9th; ไตเตอร์ 10^8 $TCID_{50}$; ปริมาตร 1 มล.) แล้วบ่มต่อในตู้บ่มนาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้ไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ (Charerntantanakul and Kasinrerk, 2012) จากนั้นเติมสารละลายสารสกัดหยาบทองพันชั่งที่ความเข้มข้นสูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ปริมาตร 5 มล. พร้อมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++} อีก 4 มล. ลงในภาชนะเพาะเลี้ยง บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°ซ ในตู้บ่มที่มีความชื้น และ 5% CO_2 นาน 4 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง

สำหรับกลุ่มควบคุม ปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติมไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ 01NP1 (passage 9th; ไตเตอร์ 10^8 $TCID_{50}$; ปริมาตร 1 มล.) แล้วบ่มต่อในตู้บ่มนาน 1 ชั่วโมง เช่นเดียวกับข้างต้น จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++} ปริมาตร 9 มล. ลงในภาชนะเพาะเลี้ยง บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°ซ ในตู้บ่มที่มีความชื้น และ 5% CO_2 นาน 4 วัน ทำการเก็บไวรัสด้วยวิธี freeze-thaw 2 ครั้ง ปั่นแยกตะกอนเซลล์ และกรองส่วนใสผ่านตัวกรองขนาด 0.22 ไมครอน (Sartorius) แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -80°ซ

การหาไตเตอร์ของไวรัสโดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง

ปิเปตเซลล์ MARC-145 ที่ความเข้มข้น $5x10^5$ เซลล์/มล. ใส่ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°ซ ในตู้บ่มที่มีความชื้น และ 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง

นำส่วนใสที่กรองและเก็บไว้จาก pre- และ post-infection assay มาละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วเจือจางส่วนใสดังกล่าวลงทีละ 10 เท่า (10-fold dilution) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++} ปิเปตส่วนใสแต่ละความเจือจางลงในหลุมที่มีเซลล์ MARC-145 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำซ้ำความเจือจางละ 2 หลุม (duplication) บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°ซ ในตู้บ่มที่มีความชื้น และ 5% CO_2 นาน 4 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์ MARC-145 และคำนวณไตเตอร์ของไวรัสด้วยวิธี Reed and Muench (1938)

การหาไตเตอร์ของไวรัสด้วยวิธี plaque formation assay

การหาไตเตอร์ของไวรัสด้วยวิธีนี้ทำในสารสกัดเอธานอล 50% เพื่อยืนยันผลการทดลองของไตเตอร์ที่สังเกตจากการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง เพราะสารสกัดดังกล่าวเป็นสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ต้านไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้ดีที่สุด

ปิเปตเซลล์ MARC-145 ที่ความเข้มข้น $5x10^5$ เซลล์/มล. ใส่ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม (24-well plate; Nunc) ปริมาตรหลุมละ 500 ไมโครลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°ซ ในตู้บ่มที่มีความชื้น และ 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง

ประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนครบเวลาบ่มที่กำหนด นำส่วนใสที่กรองและเก็บไว้จาก pre- และ post-infection assay มาละลายที่อุณหภูมิห้อง เจือจางส่วนใสดังกล่าวลงทีละ 10 เท่า (10-fold dilution) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++}

จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมเพาะเลี้ยงออก แล้วเติมส่วนใสแต่ละความเจือจางลงในหลุมที่มีเซลล์ MARC-145 หลุมละ 450 ไมโครลิตร ทำซ้ำความเจือจางละ 2 หลุม (duplication) บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°ซ ในตู้บ่มที่มีความชื้น และ 5% CO_2 นาน 1 ชั่วโมง

จากนั้นปิเปตส่วนใสออกจากหลุมเพาะเลี้ยง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++} ที่มี 0.6% agarose gel (research organics) ปริมาตรหลุมละ 1 มล. บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°ซ ในตู้บ่มที่มีความชื้น และ 5% CO_2 นาน 4 วัน

เมื่อครบเวลาบ่มที่กำหนดปิเปตอาหารและ agarose gel ในแต่ละหลุมทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย phosphate buffered saline ปริมาตร 2 มล. จำนวน 2 ครั้ง แล้วยึดเซลล์ (fix) ด้วยสารละลาย acetone-methanol (60:40 v/v) ปริมาตรหลุมละ 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 30 นาที เทสารละลายทิ้ง และตั้งทิ้งไว้จนแห้งสนิท จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย 0.25% Coomassie Briliant Blue R250 (Panreac) ใน acetic acid และ 50% methanol (1:9 v/v) ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วดูดสีย้อมทิ้ง นับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้นและคำนวณหาไตเตอร์ของไวรัส

ผลการทดลอง

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบทองพันชั่งต่อเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145

ความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดหยาบทองพันชั่งที่สกัดด้วยน้ำกลั่น และเอธานอล 50, 70 และ 95% สูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เท่ากับ 0.39, 0.02, 0.02 และ 0.02 มก/มล. ตามลำดับ (Figure 2) และมีค่า CC50 เท่ากับ 6.33, 0.017, 0.076 และ 0.012 มก./มล. ตามลำดับ

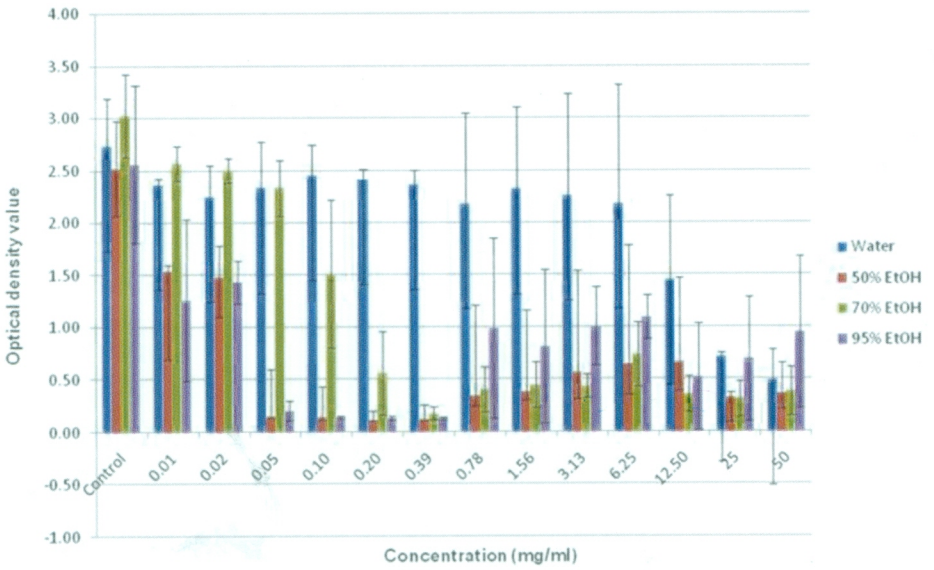

Figure 2 Optimization of *R. nasutus* crude extract concentrations for MARC-145 cells

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการยับยั้งการติดเข้าสู่เซลล์ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส (pre-infection assay)

เมื่อเปรียบเทียบกับไตเตอร์ตั้งต้นของไวรัส พบว่า สารละลายสารสกัดหยาบทองพันชั่งที่สกัดด้วยน้ำกลั่น สามารถลดไตเตอร์ของไวรัสลงจาก 10^8 $TCID_{50}$/มล. เหลือ $10^{5.5}$ $TCID_{50}$/มล. ซึ่งคิดเป็นร้อยละที่ลดลง เท่ากับ 31.25 ส่วนสารละลายสารสกัดหยาบทองพันชั่งที่สกัดด้วยเอธานอล 50% สามารถลดไตเตอร์ของไวรัสลงจาก 10^8 $TCID_{50}$/มล. เหลือ $10^{2.1}$ $TCID_{50}$/มล. ซึ่งคิดเป็นร้อยละที่ลดลง เท่ากับ 73.75 และสารละลายสารสกัดหยาบทองพันชั่งที่สกัดด้วยเอธานอล 70 และ 95% สามารถลดไตเตอร์ของไวรัสลงจาก 10^8 $TCID_{50}$/มล. เหลือ $10^{4.7}$ $TCID_{50}$/มล. ซึ่งคิดเป็นร้อยละที่ลดลง เท่ากับ 41.25 (Table 1)

เมื่อนำสารละลายสารสกัดหยาบทองพันชั่งที่สกัดด้วยเอธานอล 50% ซึ่งเป็นสารละลายสารสกัดที่มีฤทธิ์มากที่สุด มาทดสอบซ้ำและวัดไตเตอร์ของไวรัสด้วยวิธี plaque formation assay เปรียบเทียบกับไวรัสที่ไม่ได้รับสารละลายสารสกัด พบว่า สารละลายสารสกัดดังกล่าว สามารถลดไตเตอร์ของไวรัสลงได้อย่างมาก (Figure 3) โดยไตเตอร์ของไวรัสที่คำนวณได้เท่ากับ 2.25×10^3 plaque-forming unit (PFU)/มล. ในขณะที่ไตเตอร์ของไวรัสในกลุ่มควบคุมมีค่าสูงกว่ามาก ดังแสดงโดยจำนวน plaque ที่มากกว่าในทุกความเจือจางที่ทดสอบ

Table 1 Titers of PRRS virus determined from the presence of CPE

Type of extraction	Initial titer ($TCID_{50}$/ml)	End titer ($TCID_{50}$/ml)		%Virus reduction	
		Pre-infection	Post-infection	Pre-infection	Post-infection
Control	10^8	10^8	10^8	-	-
Water	10^8	$10^{5.5}$	$10^{5.1}$	31.25	36.25
50% EtOH	10^8	$10^{2.1}$	$10^{2.2}$	73.75	72.50
70% EtOH	10^8	$10^{4.7}$	$10^{5.5}$	41.25	31.25
95% EtOH	10^8	$10^{4.7}$	$10^{4.7}$	41.25	41.25

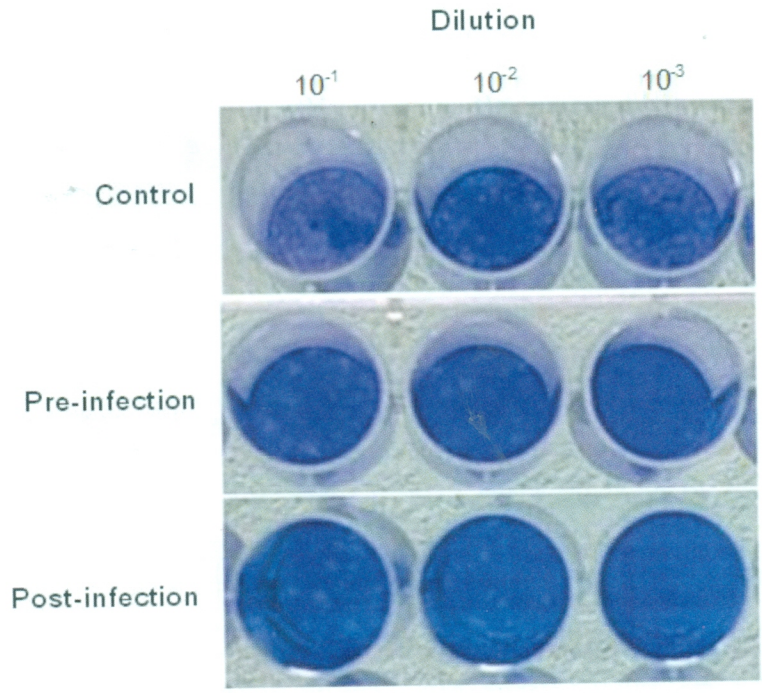

Figure 3 Potential determination of *R. nasutus* crude 50% ethanolic extract on PRRS virus titers assessed by plaque formation assay

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอส (post-infection assay)

เมื่อเปรียบเทียบกับไตเตอร์ตั้งต้นของไวรัส พบว่า สารละลายสารสกัดหยาบทองพันชั่งที่สกัดด้วยน้ำกลั่นสามารถลดไตเตอร์ของไวรัสลงจาก 10^8 $TCID_{50}$/มล. เหลือ $10^{5.1}$ $TCID_{50}$/มล. ซึ่งคิดเป็นร้อยละที่ลดลง เท่ากับ 36.25 (Table 1)

ส่วนสารละลายสารสกัดหยาบทองพันชั่งที่สกัดด้วยเอธานอล 50% สามารถลดไตเตอร์ของไวรัสลงจาก 10^8 $TCID_{50}$/มล. เหลือ $10^{2.2}$ $TCID_{50}$/มล. ซึ่งคิดเป็นร้อยละที่ลดลงเท่ากับ 72.50

สารละลายสารสกัดหยาบทองพันชั่งที่สกัดด้วยเอธานอล 70 และ 95% สามารถลดไตเตอร์ของไวรัสลงจาก 10^8 $TCID_{50}$/มล. เหลือ $10^{5.5}$ และ $10^{4.7}$ $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นร้อยละที่ลดลงเท่ากับ 31.25 และ 41.25 ตามลำดับ

เมื่อนำสารละลายสารสกัดหยาบทองพันชั่งที่สกัดด้วยเอธานอล 50% ทดสอบซ้ำและวัดไตเตอร์ของไวรัสด้วยวิธี plaque formation assay เปรียบเทียบกับไวรัสที่ไม่ได้รับสารละลายสารสกัด พบว่า สารละลายสารสกัดดังกล่าวสามารถลดไตเตอร์ของไวรัสลงได้อย่างมากเช่นเดียวกับที่พบในการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์ (Figure 3) และเมื่อนำไตเตอร์ของไวรัสที่ได้หลังการบ่มร่วมกับสารสกัดมาคำนวณหาร้อยละการยับยั้ง โดยเทียบกับไตเตอร์ของไวรัสในกลุ่มควบคุม พบว่า ไตเตอร์ของไวรัสในการทดสอบ pre-infection assay ลดลงร้อยละ 78.125 ในขณะที่ไตเตอร์ของไวรัสในการทดสอบ post-infection assay ลดลงร้อยละ 71.875 (Figure 4)

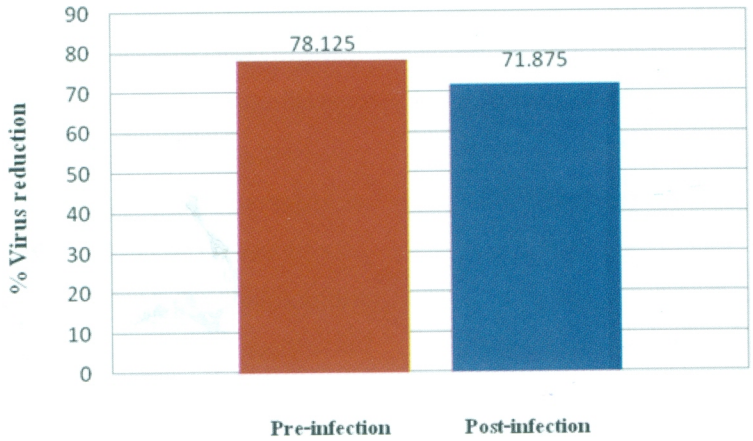

Figure 4 Percentage of PRRSV reduction in pre-infection and post-infection assays after incubation with *R. nasutus* crude 50% ethanolic extract as determined by plaque formation assay

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

สารละลายสารสกัดทองพันชั่งที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเอธานอล 50, 70 และ 95% มีความสามารถในการยับยั้งการติดเข้าสู่เซลล์และการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145 ได้ โดยสารละลายสารสกัดที่มีฤทธิ์มากที่สุด ได้แก่ สารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยเอธานอล 50% ซึ่งสามารถลดไตเตอร์ของไวรัส ได้คิดเป็นร้อยละเท่ากับ 73.75 และ 72.50 ใน pre- และ post-infection assay ตามลำดับ และเมื่อทดสอบด้วยวิธี plaque formation assay พบว่า สามารถลดไตเตอร์ของไวรัสลงคิดเป็นร้อยละ เท่ากับ 78.125 และ 71.875 ใน pre- และ post-infection assay ตามลำดับ

ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาถึงสารออกฤทธิ์สำคัญของทองพันชั่ง ที่ทำหน้าที่ต้านไวรัสพีอาร์อาร์เอส แต่ในการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Sendl *et al.* (1996) รายงานว่า ทองพันชั่งมีสารพฤกษเคมีที่สำคัญที่มีฤทธิ์ต้านไวรัส คือ สาร rhinacanthin ซึ่งสามารถต้านไวรัส herpes simplex-1 และ cytomegalovirus ในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ ซึ่งในการศึกษาขั้นต่อไปอาจทดลองใช้ rhinacanthin บริสุทธิ์มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์เพาะเลี้ยงได้

ผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นซึ่งบ่งชี้ว่าทองพันชั่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้ ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวอาจใช้เพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัส (pre-infection) หรือช่วยยับยั้งการแบ่งตัว

ของไวรัสหลังสุกรติดเชื้อไวรัสแล้ว (post-infection) ซึ่งการศึกษาในขั้นต่อไป ควรศึกษาหาสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ต้านไวรัสพีอาร์อาร์เอส และแนวทางการประยุกต์ใช้พืชสมุนไพรนี้ในกระบวนการผลิตสุกร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และโครงการการสร้างภาคีในการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโท-เอก ระหว่างสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) กับสถาบันการศึกษา ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัย (นางสาวโสภิตา ช่วยชู ได้รับทุน) และขอขอบพระคุณฝ่ายเภสัชกรรมและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ วว. ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

รุ่งโรจน์ ธนาวงศ์นุเวช. 2548. **พยาธิวินิจฉัยโรคพีอาร์อาร์เอส.** ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคลปอยท์ กราฟฟิค, กรุงเทพฯ. 189 น.

วันดี กฤษณพันธ์ บรรณาธิการ. 2536. **เภสัชวินิจฉัยยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 1.** คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ. 189 น.

โสภิตา ช่วยชู ชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล ธัญวรัตน์ กาจสงคราม รุ่งทิพย์ กาวารี และวศิน เจริญตัณธนกุล. 2554a. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพญายอต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145. **รายงานการประชุมทางวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ "แม่โจ้-แพร่ วิจัย ครั้งที่ 2".** มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ แพร่, 1-2 กันยายน 2554. น. 271-275.

โสภิตา ช่วยชู ชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล ธัญวรัตน์ กาจสงคราม และวศิน เจริญตัณธนกุล. 2554b. ผลยับยั้งของสารสกัดพลูคาวต่อการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145. **รายงานการประชุมทางวิชาการ ประจำปี 2554.** มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่, 1-2 ธันวาคม 2554 น. 146-152.

Akanitapichat, P., M. Kurokawa, S. Tewtrakul and M. Hattori. 2002. Inhibitory activities of Thai medicinal plants against herpes simplex type 1, poliovirus type 1, and measles virus. **J. Trad. Med**. 19: 174-180.

Charerntantanakul, W. 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine: Immunogenicity, efficacy and safety aspects. **World J. Virology**. 1(1): 23-30.

Charerntantanakul, W. and W. Kasinrerk. 2012. Plasmids expressing interleukin-10 short hairpin RNA mediate IL-10 knockdown and enhance tumor necrosis factor alpha and interferon gamma expressions in response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Vet. Immuno Immunopathol.** 146(2): 159-168.

Cheon, D.S. and C. Chae. 2004. Comparison of the pathogenicity of two strains (wild type and vaccine-like) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in expreri-mentally infected sows. **J. Comp. Pathol**. 130(2-3): 105-111.

Fernandes, M.J.B., C. Limas, M.H. Rossi, E. Gonçales and I.C. Simoni. 2005. Cytotoxicity of subfractions and compounds from *Polymnia sonchifolia*. **Braz. J. Microbiol**. 36: 338-341.

Halbur, P., C. Thanawongnuwech, R. Brown, G. Kinyon, J. Roth, E. Thacker and B. Thacker. 2000. Efficacy of antimicrobial treatment and vaccination regimens for control of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Streptococcus suis* coinfection of nursery pig. **J. Clin. Microbiol.** 38(3): 1156-1160.

Mengeling, W.L., K.M. Lager and A.C. Vorwald. 1998. Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of "a typical" PRRS. **Am. J. Vet. Res.** 59: 1540-1544.

Neumann, E.J., J.B. Kliebenstein, C.D. Johnson, J.W. Mabry, E.J. Bush, A.H. Seitzinger, A.L. Green and J.J. Zimmerman. 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 227: 385-392.

Reed, L.J. and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **Am. J. Hyg**. 27: 493-497.

Rossow, K.D., E.M. Bautista, S.M. Goyal, T.W. Molitor, M.P. Murtaugh, R.B. Morrison, D.A. Benfield and J.E. Collins. 1994. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. **J. Vet. Diag. Invest**. 6: 3-12.

Sattar, A.M., A.N. Abdullah, H.A. Khan and M.A. Noor. 2004. Evaluation of anti-bacterial activity of a local plant *Rhinacanthus nasutus* (L.). **J. of Biological Sci.** 4(4): 498-500.

Sendl, A., L.J. Chen, D.S. Jolad and M. Kernan. 1996. Two new napthoquinones with antiviral activity from *Rhinacanthus nasutus*. **J. Nat. Prod**. 59(8): 808-811.

Tewtrakul, S., P. Tansakul and P. Panichayupa-karanant. 2009. Anti-allergic principle of *Rhinacanthus nasutus* leaves. **Phytomedicine.** 16(10): 929-34.

Thacker, E.L. 2001. Immunology of the porcine respiratory disease complex. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 17: 551-565.

Thanawongnuwech, R., A. Amonsin, A. Tatsanakit and S. Damrongwatanapokin. 2004. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. **Vet. Microbiol.** 101: 9-21.

Van Der Linden, I.F., J.J. Voermans, E.M. van der Linde-Bril, A.T. Bianchi and P.J. Steverink. 2003. Virological kinetics and immunological responses to a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of pigs at different ages. **Vaccine.** 21: 1952-1957.

Zuckermann, F.A., E.A. Garcia, I.D. Luque, J.C. Hennings, A. Doster, M. Brito and F. Osorio. 2007. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. **Vet. Microbiol.** 123: 69-85.