

ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอนติเจนชนิดผิวของไวรัสตับอักเสบบีโดยสารสกัดพืชสมุนไพร



นายทวีชัย วชิรยนเสถียร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4058-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INHIBITION OF HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN EXPRESSION BY MEDICINAL PLANT EXTRACTS

Mr. Thaveechai Vachirayonstien

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 2003

ISBN 974-17-4058-1

นายทวีชัย วชิรยนเสถียร : ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอนติเจนชนิดผิวของไวรัสตับอักเสบบี
 โดยสารสกัดพืชสมุนไพร. (INHIBITION OF HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN
 EXPRESSION BY MEDICINAL PLANT EXTRACTS) อ. ที่ปรึกษา : รศ. สัตถาพร
 สิโรตมรัตน์, อ. ที่ปรึกษาร่วม ดร. เครือวัลย์ พลจันทร์, 73 หน้า ISBN 974-17-4058-1

เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบบีของพืชสมุนไพร สารสกัดของพืชสมุนไพร 13 ชนิดถูกนำมาทดสอบการยับยั้งการหลั่ง hepatitis B surface antigen (HBsAg) จากเซลล์เพาะเลี้ยง PLC/PRF/5 ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเอธานอลของพืชสมุนไพร 12 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง HBsAg จากเซลล์เพาะเลี้ยงและมีค่าดัชนีความจำเพาะ [selectivity index (SI) = 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) / 50% inhibition concentration (IC₅₀)] มากกว่า 1 สารสกัดของสมุนไพรที่มีค่า IC₅₀ ต่ำสุดสามชนิดได้แก่ เถาวัลย์เปรียง ทองพันชั่ง และแก่นจันทร์ ถูกคัดเลือกมาสกัดต่อด้วย เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอธิลอะซีเตต และบิวทานอล ตามลำดับ แล้วทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธีเดียวกันพบว่า ค่า IC₅₀ จากสารสกัดบิวทานอลของเถาวัลย์เปรียง สารสกัดเฮกเซนของทองพันชั่ง และสารสกัดเฮกเซนของแก่นจันทร์ มีค่าต่ำสุดในสารสกัดพืชแต่ละชนิด ต่อมานำสารสกัดบิวทานอลของเถาวัลย์เปรียง และสารสกัดเฮกเซนจากทองพันชั่งผ่านวิธีทางโครมาโตกราฟีเพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง HBsAg เพิ่มเติม พบว่าสารสกัดจากทองพันชั่งมีค่า IC₅₀ ต่ำที่สุดคือ 3.13 µg/ml มีค่า CC₅₀ เท่ากับ 14.11 µg/ml และมีค่า SI เท่ากับ 4.51 สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงมีค่า IC₅₀ ต่ำที่สุด คือ 48.36 µg/ml มีค่า CC₅₀ เท่ากับ 90.99 µg/ml และมีค่า SI เท่ากับ 1.88 แล้วทำการศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดนี้โดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) พบว่าประกอบด้วยสารมากกว่า 1 ตัว ในแต่ละสารสกัด ดังนั้นทองพันชั่งและเถาวัลย์เปรียงมีความน่าสนใจนำไปศึกษาหาสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง HBsAg

ภาควิชา จุลชีววิทยา
 สาขาวิชา จุลชีววิทยา
 ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต..... ทวีชัย วชิรยนเสถียร.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... สัตถาพร สิโรตมรัตน์.....

4476573333 : MAJOR Microbiology

KEY WORD: Hepatitis B surface antigen/Hepatitis B virus/Medicinal plants/Crude extracts/ PLC/PRF/5

THAVEECHAI VACHIRAYONSTIEN : INHIBITION OF HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN EXPRESSION BY MEDICINAL PLANT EXTRACTS. THESIS ADVISOR : Assoc. Prof. SATTAPORN SIROTAMARAT, THESIS COADVISOR : KRUA VON BALACHANDRA, Ph. D., 73 pp. ISBN 974-17-4058-1

The purpose of this study was to investigate antiviral activity of thirteen medicinal plants by studying the inhibition of hepatitis B surface antigen (HBsAg) secretion from PLC/PRF/5 cells. The result showed that 12 ethanol plant extracts could inhibit HBsAg secretion from PLC/PRF/5 cells and all of them showed the selectivity index [SI = 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) / 50% inhibition concentration (IC_{50})] more than one. Ethanol extracts of *Derris scandens*, *Rhinacanthus nasutus*, and *Santalum album* were then selected to be partitioned with hexane, chloroform, ethyl acetate, and butanol, respectively. These fractions were further investigated for anti-HBsAg activity and cytotoxicity. The butanol fraction of *D. scandens*, hexane fraction of *R. nasutus*, and hexane fraction of *S. album* exhibited the lowest IC_{50} in each plant. Furthermore, the butanol fraction of *D. scandens* and hexane fraction of *R. nasutus* which showed low IC_{50} were selected for partial purification by column chromatography and tested for anti-HBsAg activity. The fraction of *R. nasutus* which exhibited the highest activity had IC_{50} of 3.13 $\mu\text{g/ml}$, CC_{50} of 14.11 $\mu\text{g/ml}$, and SI of 4.51. The fraction of *D. scandens* which exhibited the highest activity had IC_{50} of 48.36 $\mu\text{g/ml}$, CC_{50} of 90.99 $\mu\text{g/ml}$, and SI of 1.88. In addition, thin layer chromatography (TLC) of these fractions were also performed. The results showed more than one substances in each fraction. *R. nasutus* and *D. scandens* were interested to perform more investigation for anti-HBsAg pure compounds.

Department/Program

Field of study

Academic year

Microbiology

2003

Student's signature... THAVEECHAI VACHIRAYONSTIEN

Advisor's signature... Sattapon Sirotamarat

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my infinite gratitude and deep appreciation to my thesis advisor, Associate Professor Sattaporn Sirotamarat for her guidance, suggestion, and kindness throughout my research study.

I would like to express my sincere gratitude and deep appreciation to Associate Professor Dr. Pintip Pongpech, Associate Professor Dr. Ekarin Saifah, Assistant Professor Dr. Mali Wirotasangthong and Dr. Kruavon Balachandra for their kindness and helpful suggestion for the completion of this thesis.

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

I also would like to express my thanks to Anicha Luengchaichawang and all staff in the Department of Biotechnology, National Institute of Health (NIH), Ministry of Public Health for their kindness and help during my study.

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



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	ix
LIST OF ABBREVIATIONS.....	x
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEWS.....	5
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....	27
CHAPTER IV RESULTS.....	34
CHAPTER V DISCUSSION.....	50
CHAPTER VI CONCLUSION.....	54
REFERENCES.....	55
APPENDIX.....	70
BIOGRAPHY.....	73

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table	Page
1. List of medicinal plants with anti-HBsAg activity.....	3
2. The four stages of hepatitis B infection.....	15
3. Serological markers of hepatitis B infection.....	18
4. Plant materials and ratio between ethanol extract : PVP used in this study.....	27
5. Ratio between solvent extract : PVP used in this study.....	28
6. <i>In vitro</i> IC ₅₀ of medicinal plant extracts.....	34
7. <i>In vitro</i> CC ₅₀ of medicinal plant extracts.....	35
8. Selectivity index (SI) [CC ₅₀ / IC ₅₀].....	35
9. <i>In vitro</i> CC ₅₀ and IC ₅₀ of solvent extracts.....	37
10. SI of solvent extracts.....	39
11. <i>In vitro</i> CC ₅₀ and IC ₅₀ of Chromatographic extracts.....	40
12. SI of chromatographic extracts.....	42
13. <i>In vitro</i> CC ₅₀ and IC ₅₀ of gel filtration chromatographic extracts.....	43
14. SI of gel filtration chromatographic extracts.....	43
15. Percent yield of crude extracts.....	44
16. Percent yield of solvent extracts.....	45
17. Percent yield of chromatographic extracts.....	45
18. Percent yield of gel filtration chromatographic extracts.....	46

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Composition of subunits and assembled HBsAg and virus particles.....	7
2. Hepatitis B virus and its components.....	7
3. Genome of HBV.....	8
4. Clinical outcomes of hepatitis B virus infection.....	14
5. Serological events associated with the typical course of acute type B hepatitis.....	17
6. The development of the chronic hepatitis B virus carrier state.....	17
7. Prevalence of HBsAg in the world.....	19
8. <i>In vitro</i> IC ₅₀ of solvent extracts.....	37
9. <i>In vitro</i> CC ₅₀ of solvent extracts.....	38
10. SI of solvent extracts.....	38
11. <i>In vitro</i> IC ₅₀ and CC ₅₀ of Chromatographic extracts of <i>Derris scandens</i>	40
12. SI of Chromatographic extracts of <i>Derris scandens</i>	41
13. <i>In vitro</i> IC ₅₀ and CC ₅₀ of Chromatographic extracts of <i>Rhinacanthus nasutus</i>	41
14. SI of Chromatographic extracts of <i>Rhinacanthus nasutus</i>	42
15. TLC of <i>Derris scandens</i> chromatographic extracts.....	47
16. TLC of <i>Rhinacanthus nasutus</i> extracts.....	48

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

ALT	alanine aminotransferase	l	liter
AST	aspartate aminotransferase	MEM	minimal essential media
°C	degree celsius	mg	milligram
CC	column chromatography	mcg	microgram
CC ₅₀	50% cytotoxic concentration	µg	microgram
cm	centimeter	µl	microliter
CMV	cytomegalovirus	µM	micromolar
CO ₂	carbondioxide	ml	milliliter
DMSO	dimethyl sulfoxide	mm	millimeter
DNA	deoxyribonucleic acid	mRNA	messenger RNA
EDTA	ethylene diamine tetra acetate	MTT	3-(4,5-dimethyl-thiazoyl-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay		
FBS	fetal bovine serum	nm	nanometer
h or hr	hour	OD	optical density
HBcAg	hepatitis B core antigen	PBS	phosphate buffered saline
HBeAg	hepatitis B e antigen	PVP	polyvinylpyrrolidone
HBsAg	hepatitis B surface antigen	Rf	retardation factor
HBV	hepatitis B virus	RNA	ribonucleic acid
HCC	hepatocellular carcinoma	rpm	round per minute
HCV	hepatitis C virus	SI	selectivity index
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) piperazine- N'-(2-ethane-sulfonic acid)	TLC	thin layer chromatography
		UD	unable to determined
HIV	human immunodeficiency virus	USA	United State of America
H ₂ O	water	UV	ultraviolet
HSV-2	herpes simplex virus type2		
HTLV	human T-cell lymphotropic virus		
IC ₅₀	50% inhibition concentration		
Ig	immunoglobulin		
kg	kilogram		