

<b>Thesis Title</b>	Study on Mode of Inhibition of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 <i>in vitro</i> by Some Highland Medicinal Plants
<b>Author</b>	Miss Jiraporn Nikomtat
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Biotechnology)
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Asst. Prof. Dr. Yingmanee Tragoolpua Advisor Prof. Dr. Saisamorn Lumyong Co-advisor Assoc. Prof. Dr. Chusie Trisonthi Co-advisor Asst. Prof. Dr. Narumol Thongwai Co-advisor Asst. Prof. Dr. Puttinan Meepowpan Co-advisor

### ABSTRACT

Highland medicinal plants, *Inula cappa* (Ham. ex D. Don) DC., *Cissus repanda* Vahl, and *Drymaria diandra* Blume were extracted with dichloromethane and methanol and investigated for *in vitro* antiviral activity against herpes simplex virus. Cytotoxicity tests on GMK cells was performed by the MTT assay and revealed that dichloromethane extract of *I. cappa* (Ham. ex D. Don) DC. (ID) showed the highest toxicity on GMK cells. In all experiments, non-toxic concentrations of the plant extracts were used to determine the inhibitory effect on various targets in the HSV multiplication cycle.

Both HSV-1 and HSV-2 particles were directly inactivated by the extracts during early incubation period. Methanol extracts of *I. cappa* (Ham. ex D. Don) DC., *C. repanda* Vahl and *D. diandra* Blume and dichloromethane extracts of *D. diandra* Blume showed efficiency in the inhibition of both HSV standard strains. Moreover, methanol extract of *C. repanda* Vahl and dichloromethane extract of *D. diandra* Blume exhibited inhibitory effect on HSV-1 ACV resistant strains; No. 12, 22, 31 and 1B.

Methanol extract of *I. cappa* (Ham. ex D. Don) DC., dichloromethane and methanol extract of *C. repanda* Vahl exhibited strong inhibition of HSV-1 and HSV-2 attachment, when the cells were pretreated with the extracts. On the other hand, *D. diandra* Blume extracts inhibited HSV attachment better than *I. cappa* (Ham. ex D. Don) DC. and *C. repanda* Vahl extracts, when the virus and the extract were simultaneously added to the cells. Moreover, the inhibitory effect of the extract was enhanced by heparin.

In addition, *D. diandra* Blume extracts inhibited HSV penetration better than other two plant extracts. Methanol extract of *D. diandra* Blume showed the highest inhibition of HSV penetration and replication with in 30 hours. However, *D. diandra* Blume extracts affected vhs RNase activity only modestly. All extracts also showed potent activities against viral deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis, resulting in 1.3-2 fold after treatment with the extracts as determined by real time polymerase chain reaction and slot blot hybridization.

Furthermore, approximately 45 kilodalton HSV-1 proteins were clearly diminished after treatment with methanol extract of *I. cappa* (Ham. ex D. Don) DC. and dichloromethane extract of *C. repanda* Vahl whereas HSV-2 proteins were

clearly diminished after treatment with methanol extract of *C. repanda* Vahl, dichloromethane extract of *C. repanda* Vahl, and methanol extract of *D. diandra* Blume. Moreover, methanol extract of *D. diandra* Blume had an inhibitory effect on the UL42 protein whereas dichloromethane extract of *D. diandra* Blume had inhibitory effect on the ICP0 protein. The partial purified fractions of *D. diandra* Blume did not showed effect on vhs activity whereas the partial purified fraction, FD 2/2 showed dramatically reduction of HSV-1 replication and had an inhibitory effect on the UL42 protein. Alkaloids and flavonoids (flavanones) were found in the FD2/2. The high quantity compounds found in the FD2/2 were pentadecanone, hydroxymethyldihydrofuranone, plamitic acid (ester), plamitic acid and stearic acid.

Therefore, in this study dichloromethane extract of *D. diandra* Blume showed the highest activities against HSV-1 and HSV-2 by its effect on multiple steps in HSV life cycle.

**Key words:** *Inula cappa.* , *Cissus repanda*, *Drymaria diandra*, plant, HSV

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การศึกษากลไกการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 และ 2 ในหลอดทดลอง โดยสมุนไพรมันที่สูงบางชนิด

ผู้เขียน

นางสาวจิราภรณ์ นิคมทัศน์

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. ยິงมณี ตระกูลพั้ว

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ศ. ดร. สายสมร ถ้ายอง

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รศ. ดร. ชุศรี ไตรสนธิ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ผศ. ดร. นฤมล ทองไว

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ผศ. ดร. พุดินันท์ มีเผ่าพันธุ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

## บทคัดย่อ

สมุนไพรมันที่สูงสามชนิด ได้แก่ หนาดคำ เถาวัลย์ปูน และหญ้าเกล็ดหอย ถูกนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเมทานอล และศึกษากลไกการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมในเซลล์เพาะเลี้ยง การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดขยายต่อ GMK cells ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดหนาดคำที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์สูงที่สุด จากนั้นนำค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มาทดสอบในขั้นตอนของการเพิ่มจำนวนของไวรัส

สารสกัดขยายสามารถทำลายอนุภาคเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดได้โดยตรงตั้งแต่ระยะแรกของการบ่ม สารสกัดขยายหนาดคำ เถาวัลย์ปูน หญ้าเกล็ดหอยที่สกัดด้วยเมทานอล และสารสกัดขยายหญ้าเกล็ดหอยสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนแสดงผลการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมสายพันธุ์มาตรฐานทั้งสองชนิด นอกจากนี้สารสกัดขยายเถาวัลย์ปูนที่สกัดด้วยเมทานอลและสารสกัดขยายหญ้าเกล็ดหอยที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีผลยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 สายพันธุ์คือต่อต้านไวรัส acyclovir (HSV-1 strain 12, 22, 31 และ 1B)

สารสกัดขยายหนาดคำที่สกัดด้วยเมทานอล สารสกัดเถาวัลย์ปูนที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไวรัสก่อโรคเริมในการเกาะติดกับผิวเซลล์โดยการบ่มสารสกัดกับเซลล์ก่อนบ่มไวรัสได้สูงที่สุด ขณะที่เมื่อบ่มสารสกัดกับเซลล์พร้อมกับไวรัส พบว่าสารสกัดขยายหญ้าเกล็ดหอยทั้งที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอลสามารถยับยั้งการเกาะติด

ของไวรัสกับผิวเซลล์ได้ดีกว่า นอกจากนี้ยังพบว่า heparin สามารถเพิ่มการยับยั้งการติดเชื้อของไวรัส

สารสกัดหยาบเห็ดเกี๊ยงที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล สามารถยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัสได้ดีกว่าสารสกัดจากพืชอีกสองชนิด สารสกัดหยาบเห็ดเกี๊ยงที่สกัดด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัสได้ดีที่สุดและยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัส ที่ 30 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อได้ดีที่สุดเช่นเดียวกัน แต่สารสกัดหยาบเห็ดเกี๊ยงสามารถยับยั้งกิจกรรม vhs RNase ได้เพียงเล็กน้อย สารสกัดหยาบทั้งหมดสามารถลดปริมาณ HSV DNA ได้ 1.3-2 เท่า เมื่อตรวจสอบปริมาณ HSV DNA ด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction และ slot blot hybridization

สารสกัดหยาบขนาดค่าที่สกัดด้วยเมทานอลและเอทิลแอลกอฮอล์ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนสามารถลดปริมาณโปรตีนของ HSV-1 ขนาด 45 kilodalton อย่างชัดเจน ส่วนสารสกัดหยาบเอทิลแอลกอฮอล์ที่สกัดด้วยเมทานอล สารสกัดหยาบเอทิลแอลกอฮอล์ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และสารสกัดหยาบเห็ดเกี๊ยงที่สกัดด้วยเมทานอล สามารถลดปริมาณโปรตีน HSV-2 นอกจากนี้สารสกัดหยาบเห็ดเกี๊ยงที่สกัดด้วยเมทานอลมีผลต่อการยับยั้งโปรตีน UL42 ส่วนสารสกัดหยาบเห็ดเกี๊ยงที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีผลต่อการยับยั้งโปรตีน ICP0 ขณะที่ส่วนสกัดกิ่งบริสุทธิ์ของสารสกัดหยาบไม่มีผลต่อ vhs นอกจากนี้ ส่วนสกัดกิ่งบริสุทธิ์ FD2/2 ยังแสดงผลในการลดปริมาณ HSV-1 DNA หลังจากบ่มกับส่วนสกัด และมีผลยับยั้งโปรตีน UL42 สารประกอบที่พบในส่วนสกัดกิ่งบริสุทธิ์ FD2/2 ประกอบด้วยกลุ่ม alkaloids และ flavonoids และสารประกอบ 5 ชนิดที่มีปริมาณสูงที่สุด ได้แก่ pentadecanone, plamitic acid (ester), hydroxymethyldihydrofuranone, plamitic acid and stearic acid

ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้ สารสกัดหยาบเห็ดเกี๊ยงที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนแสดงผลการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีที่สุด เนื่องจากสารสกัดได้แสดงผลการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริม ในหลายขั้นตอนของวงจรการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส

**คำสำคัญ:** ขนาดค่า, เอทิลแอลกอฮอล์, เห็ดเกี๊ยง, พืช, ไวรัสก่อโรคเริม