Original Article

Antiviral and Anticancer Activities of *Stemona collinsae*

Pannarat Akanitapichat[1,*], Pajaree Tongngok[1], Aree Wangmaneerat[1] and Bungorn Sripanidkulchai[2]

[1]*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190*
[2]*Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002*
** Corresponding author. Tel: 045-353600, 045-353671, Fax: 045-288384, E-mail address: pannarat.a@phar.ubu.ac.th*

Abstract

The roots of *Stemona* (Stemonaceae) have long been used traditionally for the treatment of respiratory diseases, enteric helminthes and as insecticides. In the present study, the dichloromethane–methanol (DCM-M, 1:1), 95% ethanol and aqueous extracts of *Stemona collinsae* roots were investigated for *in vitro* antimicrobial, antiviral and anticancer activities. Using a plaque reduction assay, the DCM-M extract showed moderate activity against herpes simplex virus (HSV) type 1 and type 2 with 50% inhibitory concentrations of 105 ± 3.5 and 107 ± 6.2 μg/ml, respectively. Ethanol and aqueous extracts minimally inhibited HSV even at 300 μg/ml. All extracts exerted antiproliferative activity against malignant cell lines KB and MCF-7, with 50% cytotoxic concentrations ranging from 85 to 270 μg/ml. For anti-hepatitis B study, none were active against HBsAg secretion. Using a disc diffusion assay, all extracts displayed no activity against *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans* and *Aspergillus niger*.

Key words

Antiviral, Anticancer, *Stemona collinsae*

นิพนธ์ต้นฉบับ

ฤทธิ์ต้านไวรัส และฤทธิ์ต้านมะเร็งของ *Stemona collinsae*

พรรณรัตน์ อกนิษฐาภิชาติ [1,*], ปาจารีย์ ทองงอก [1], อารี วังมณีรัตน์ [1] และ บังอร ศรีพานิชกุลชัย [2]

[1] *คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190*

[2] *ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002*

* *ผู้เขียนที่สามารถติดต่อได้ โทรศัพท์: 045-353600, 045-353671, โทรสาร: 045-288384, ที่อยู่ทางอิเลคโทรนิค : pannarat.a@phar.ubu.ac.th*

บทคัดย่อ

Stemona เป็นพืชในวงศ์ Stemonaceae แพทย์พื้นบ้านใช้รากของ *Stemona* รักษาโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ ถ่ายพยาธิ และใช้เป็นยาฆ่าแมลง การศึกษาวิจัยนี้ทำเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านไวรัส และฤทธิ์ต้านมะเร็ง ในหลอดทดลองของสารสกัดไดคลอโรมีเธน-เมทานอล (DCM-M, 1:1), 95% เอทานอลและน้ำของราก *Stemona collinsae* ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริมด้วยวิธี plaque reduction assay พบว่า สารสกัด DCM-M มีฤทธิ์ดีปานกลางต่อไวรัสเริมทัยป์ 1 และ 2 โดยความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งไวรัสเริมได้ร้อยละ 50 มีค่าเท่ากับ 105 ± 3.5 และ 107 ± 6.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ สารสกัดเอทานอลและน้ำยับยั้งไวรัสเริมได้เพียงเล็กน้อยแม้ความเข้มข้นสูงถึง 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเซลล์มะเร็ง KB และ MCF-7 โดยความเข้มข้นของสารสกัดที่ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์เท่ากับ 85-270 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบบี พบว่าส่วนสกัดเหล่านี้ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งของ HBsAg นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัด DCM-M, เอทานอลและน้ำไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans* และ *Aspergillus niger* เมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion assay

กุญแจคำ

ฤทธิ์ต้านไวรัส, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง, *Stemona collinsae*

บทนำ

Stemona เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและเป็นสกุลใหญ่ที่สุดในวงศ์ Stemonaceae ปัจจุบันมีประมาณ 32 ชนิด (1, 2) พบได้ทั่วไปในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สำหรับประเทศไทยพบในภาคต่างๆ โดยพบมากตามป่าดิบชื้น ป่าผลัดใบ และป่าไผ่ *Stemona* เป็นพืชที่ใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และการเกษตรมาช้านาน ประเทศจีนและญี่ปุ่นใช้รากของ *Stemona tuberosa, Stemona japonica* และ *Stemona sessilifolia* เป็นยาแก้ไอและขับเสมหะ ยาขับลม ยาถ่ายพยาธิ (3-5) และใช้เป็นสารกำจัดแมลง (6, 7) ประเทศลาวใช้ *Stemona collinsae* กำจัดหมัดและเหา หมอพื้นบ้านในประเทศไทยนำรากของ *Stemona* ไปใช้ในการฆ่าหิดและเหา รักษาโรคผิวหนัง ฆ่าพยาธิตัวกลมและพยาธิตัวจี๊ด ฆ่าแมลงและหนอน และยังเชื่อว่าเป็นยารักษาโรคมะเร็ง (8-10)

มีรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ของ *Stemona tuberosa* มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae* และ β-streptococcus group B (11, 12) และมีฤทธิ์ต้านราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช เช่น *Geotrichum candidum, Selerotinia libertiana, Ustilago maydis, Alternaria alternata* เป็นต้น (13)

งานวิจัยต่อมาพบว่าสารบริสุทธิ์พวก stilbenoids บางชนิดที่แยกได้จาก *Stemona collinsae* และ *Stemona* cf. *pierrei* มีฤทธิ์ต้านราในพืช ได้แก่ *Cladosporium herbarum, Alternaria citri, Fusarium avenaceum, Pyricularia grisea* และ *Botrytis cinerea* (14, 15)

สำหรับงานวิจัยครั้งนี้พืชที่ใช้คือ *Stemona collinsae* ซึ่งมีชื่อไทยภาคกลางว่า "หนอนตายหยาก" และชื่อภาคเหนือว่า "ปงช้าง" และเก็บในจังหวัดอุบลราชธานี โดยนำส่วนรากมาศึกษาฤทธิ์ชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย รา และยีสต์ ที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคติดเชื้อที่สำคัญในคนและมักมีรายงานการดื้อยา ศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัส herpes simplex virus type 1 (HSV-1) และ herpes simplex virus type 2 (HSV-2) ซึ่งก่อให้เกิดโรคเริมหลายชนิด โดยเฉพาะเริมที่อวัยวะเพศซึ่งติดต่อได้ทางเพศสัมพันธ์และมักเป็นซ้ำ และศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบบีซึ่งเป็นสาเหตุหลักของโรคตับอักเสบเรื้อรัง รวมถึงการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็ง

วัสดุและวิธีวิจัย

พืชสมุนไพร

พืช *Stemona collinsae* เก็บในจังหวัดอุบลราชธานี และพิสูจน์เอกลักษณ์โดย ผศ.ดร. สรัญญา วัชโรทัย ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิง (PS-UBU-S-0-1) เก็บไว้ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

การเตรียมสารสกัดหยาบ

สารสกัดหยาบ *Stemona collinsae* เตรียมโดยอบรากพืชที่บดเป็นชิ้นเล็กๆให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C แล้วสกัดด้วยวิธีแช่สกัด (percolation) โดยใช้ผงรากแห้ง 200 กรัม หมักกับตัวทำละลายไดคลอโรมีเธน-เมทานอล (DCM-M, 1:1) หรือ 95% เอทานอล หรือ น้ำ ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง แล้วไขออกช้าๆ เติมตัวทำละลายเหนือผงพืชและเก็บสารสกัดจนได้สารละลายสีใส จากนั้นนำไประเหยแห้งโดยการลดความดัน

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี Disc diffusion method (16)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25927, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 133311 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 บน Trytic soy agar slant ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง สำหรับ *Candida albicans* ATCC 10231 และ *Aspergillus niger* ATCC 10535 เพาะเลี้ยงบน Sabouraud dextrose agar slant ที่อุณหภูมิห้องนาน 1-2 วัน หรือ 5-10 วัน ตามลำดับ

เตรียมสารสกัดหยาบ DCM-M, เอทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้นสูงสุด (66.67, 100 และ 66.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ซึ่งละลายได้ในตัวทำละลายที่เหมาะสม ปิเปตสารสกัดหยาบอย่างละ 50 ไมโครลิตร ลงบน paper disc ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดหยาบทั้งสาม คือ 3,333, 5,000 และ 3,333 ไมโครกรัมต่อ disc ตามลำดับ ปรับความขุ่นของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบให้เท่ากับ 0.5 McFarland จากนั้น streak แบคทีเรียลงบนผิวหน้าของ Mueller hinton agar หรือ streak ราหรือยีสต์ลงบน Sabouraud dextrose agar วาง discs ที่เตรียมไว้ลงบน plates โดยทำ 3 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น แล้วนำแบคทีเรียไปบ่มเพาะที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง ส่วนราและยีสต์บ่มเพาะที่ 25 °C นาน 48 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบ paper disc ทำ negative control โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียหรือราบนอาหารที่ไม่มีสารสกัดหยาบ ใช้ tetracycline (30 ไมโครกรัมต่อ disc) และ amphotericin B (300 ไมโครกรัมต่อ disc) เป็น positive control สำหรับแบคทีเรียและรา/ยีสต์ตามลำดับ

เซลล์เพาะเลี้ยงและไวรัสเริม (HSV)

เพาะเลี้ยงเซลล์ Vero (African green monkey kidney: ATCC No.: CRL 1587), KB (Nasopharyngeal carcinoma: ATCC No.: CCL 17), MCF-7 (Breast adenocarcinoma: ATCC No.: HTB 22) และ PLC/PRF/5 (ATCC No.: CRL-8024) ในอาหาร RPMI-1640 ที่มี fetal bovine serum (FBS) 10% (v/v), L-glutamine 2 mM และ kanamycin 100 μg/ml และบ่มใน humidified 5% (v/v) CO_2 incubator ที่ 37°C เมื่อเซลล์เจริญเต็มภาชนะที่ใช้เลี้ยง

(confluent cell) เซลล์จำนวน 1/3-1/4 จะถูกแบ่งออกและถูกนำไปเลี้ยงใหม่ต่อไป

สต๊อคของ HSV-1 (KOS strain) และ HSV-2 (186 strain) เตรียมโดยใช้เซลล์ Vero และทำให้เซลล์ติดเชื้อที่ 0.01 plaque forming unit (pfu) /cell แล้วบ่มที่ 37°C จนเกิด cytopathic effect ร้อยละ 90 นำเซลล์ที่ติดเชื้อ (infec-ted cultures) ไปปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสที่ -80°C (17) จากนั้นหาปริมาณไวรัสโดยวิธี plaque assay เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริมต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริม โดยวิธี Plaque reduction assay

ใส่เซลล์ Vero จำนวน 1×10^5 ต่อหลุม (24 well plate) เพาะเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเต็มหลุมเป็นชั้นเดียว (confluent monolayer) จากนั้นทำให้เซลล์ติดเชื้อ HSV-1 หรือ HSV-2 ในปริมาณ 50 pfu ต่อหลุม และบ่มเพาะที่ 37°C เตรียม overlay media ให้มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบตามต้องการ โดยปิเปตสารสกัดหยาบ (ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามปริมาตรที่คำนวณ ลงใน overlay media 1 มิลลิลิตร

หลังจากที่เซลล์ติดเชื้อนาน 1 ชั่วโมง เติม overlay media ที่มีสารสกัดหยาบปริมาณ 450 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยทำ 2 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น บ่มเซลล์ที่ติดไวรัสเริมที่ 37°C นาน 2 วัน สำหรับกลุ่ม control และ positive control ทำด้วยวิธีเดียวกันแต่ใช้ overlay media ที่ไม่มีสารสกัดและมี acyclovir ตามลำดับ ย้อมสีด้วย crystal violet 0.8% (w/v) และนับจำนวน plaque ในแต่ละตัวอย่างโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งไวรัสเริมได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) จากกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเริมและความเข้มข้น

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ที่ใช้เพาะเลี้ยงไวรัสเริมและเซลล์มะเร็ง KB และ MCF-7

ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษทำด้วยวิธี sulforhodamine microtitre plate assay โดยดัดแปลงเล็กน้อยจาก Skehan และคณะ (18) อธิบายโดยย่อดังนี้ ปิเปตสารสกัดหยาบ (ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามปริมาตรที่คำนวณ ลงในเซลล์จำนวน 5×10^5 ต่อมิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ จากนั้นปิเปตสารสกัดและเซลล์ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม (96 well plate) โดยทำ 3 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น บ่มเซลล์ที่ 37°C นาน 3 วัน ทำให้โปรตีนของเซลล์ติดสีด้วย sulforhodamine B แล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 nm โดยใช้ Elisa reader คำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เซลล์มีจำนวนลดลงร้อยละ 50 (EC_{50})

การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบบี

ใส่เซลล์ PLC/PRF/5 จำนวน 1.5×10^4 ต่อหลุมใน 24 well plate แล้วบ่มเพาะ ที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีสารสกัดตามความเข้มข้นที่ต้องการ โดยทำ 2 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ไว้ 1 วัน ทำ positive control โดยใช้ glycyrrhizin ตรวจวัดปริมาณ HBsAg โดยใช้ HBsAg diagnostic kit และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450/620 nm ด้วย Elisa reader คำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ปริมาณ HBsAg ลดลงร้อยละ 50

ผลการทดลองและอภิปรายผล

เก็บส่วนรากของ *Stemona collinsae* จากจังหวัดอุบลราชธานี และสกัดด้วยวิธีแช่สกัด โดยใช้ไดคลอโรมีเธน-เมทานอล (DCM-M, 1:1), 95% เอทานอล และน้ำ เป็นตัวทำละลาย จากนั้นศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและรา ฤทธิ์ต้านไวรัสเริม ฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบบี รวมทั้งฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยงไวรัสเริมและเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบทั้งสามชนิดในหลอดทดลอง ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus*, แบคทีเรียแกรมลบ *Esche-richia coli, Salmonella typhimurium* และ *Pseudomonas aeruginosa*, รา *Aspergillus niger* และยีสต์ *Candida albicans* ด้วยวิธี paper disc diffusion ของสารสกัดหยาบ DCM-M, เอทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้นสูงถึง 3,333, 5,000 และ 3,333 μg/disc พบว่า ไม่มีโซนใสบริเวณรอบ paper disc ของสารสกัดทั้งสามชนิด ต่างจาก

tetracycline และ amphotericin B ซึ่งมีบริเวณใสรอบ paper disc และวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสได้ 16-27 และ 8 มิลลิเมตรตามลำดับ ข้อมูลนี้บ่งชี้ว่าสารสกัดหยาบ DCM-M, เอทานอล หรือน้ำ ของ *Stemona collinsae* ไม่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบดังกล่าว ผลการศึกษาครั้งนี้สนับสนุนว่าพืช *Stemona* ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ดังที่ Yang และคณะ (19) รายงานว่า สารสกัดจากน้ำและเอทานอล 95% ของ *Stemona tuberosa* ไม่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* แต่ต่างจากรายงานวิจัยของ พัชรินทร์ และคณะ (11) และ Zhao และคณะ (12) ซึ่งพบว่าสารสกัดจาก *Stemona tuberosa* มีฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus*

การศึกษาครั้งนี้ไม่พบฤทธิ์ต้านยีสต์ *Candida albicans* และรา *Aspergillus niger* ที่ก่อให้เกิดโรคในคนของสารสกัดหยาบ *Stemona collinsae* อย่างไรก็ดี มีรายงานฤทธิ์ต้านราที่ก่อให้เกิดโรคในพืชของ *Stemona collinsae* (14), *Stemona tuberosa* (13) และ *Stemona* cf. *pierrei* (15) เป็นที่น่าสังเกตว่าผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและราของ *Stemona collinsae* ในงานวิจัยครั้งนี้ที่ต่างจากผลงานวิจัยพืช *Stemona* ก่อนหน้านี้ อาจเกิดจากความแตกต่างของชนิดของจุลินทรีย์และวิธีที่ใช้ทดสอบ รวมถึงชนิดของ *Stemona* ที่ใช้ศึกษาซึ่งอาจมีผลต่อชนิดและปริมาณสารสำคัญ ดังเช่น Brem และคณะ (20) รายงานว่าแม้ *Stemona collinsae* และ *Stemona tuberosa* จะมีสารในกลุ่ม pyrrolo[1,2- a]azepine alkaloid เหมือนกัน แต่ *Stemona tuberosa* มีฤทธิ์ในการไล่แมลง (insect repellency) ขณะที่ *Stemona collinsae* ทำให้ตัวอ่อนของแมลงไม่กินอาหาร (antifeedant activity)

การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริมของสารสกัดหยาบ DCM-M, เอทานอล หรือน้ำ โดยวิธี plaque reduction assay พบว่าสารสกัดเอทานอลและน้ำมีฤทธิ์ต้านไวรัสเริมต่ำ กล่าวคือแม้ใช้ความเข้มข้นสูงถึง 300 μg/ml สามารถยับยั้งไวรัสเริมได้เพียงร้อยละ 10 (ตารางที่ 1 และ 2) แต่สารสกัด DCM-M มีฤทธิ์ต้าน HSV-1 และ HSV-2 ปานกลางคือ IC_{50} (HSV-1) = 105.3 ± 3.5 (รูปที่ 1ก) และ IC_{50} (HSV-2) 107 ± 6.2 μg/ml (รูปที่ 1ข) ตามลำดับ จากนั้นทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ตารางที่ 1. ฤทธิ์ต้านไวรัสเริมของสารสกัดเอทานอลจาก *Stemona collinsae*

ความเข้มข้น (μg/ml)	% HSV control*	
	HSV-1	HSV-2
90	100	96.0
150	98.6	96.0
210	**	98.6
300	93.7	94.0

* ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 2 ครั้ง

** ไม่ได้ทดสอบ

ตารางที่ 2. ฤทธิ์ต้านไวรัสเริมของสารสกัดน้ำจาก *Stemona collinsae*

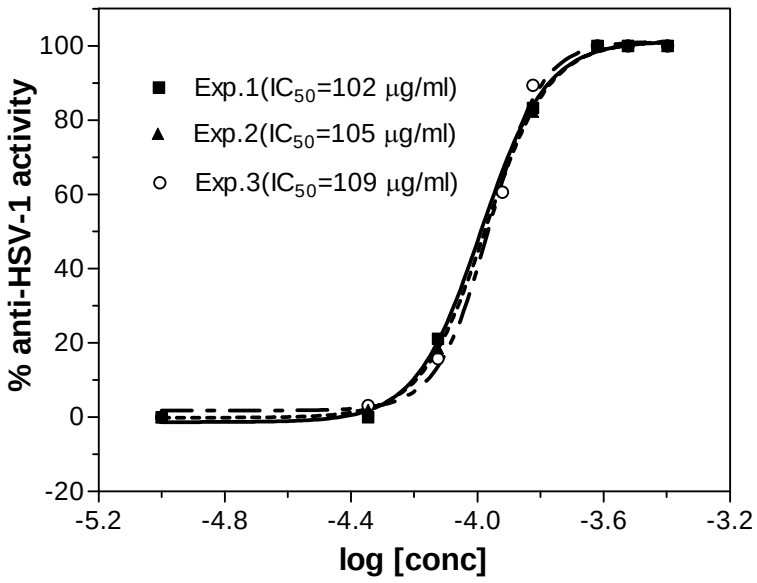
ความเข้มข้น (μg/ml)	% HSV control*	
	HSV-1	HSV-2
90	100	**
150	99.0	93.2
210	100	92.0
300	100	91.1

* ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 2 ครั้ง

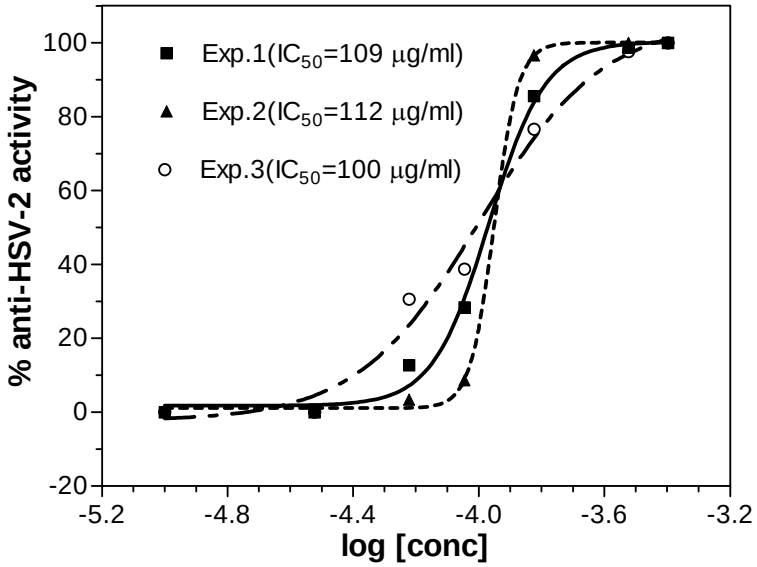
** ไม่ได้ทดสอบ

Vero ซึ่งใช้เพาะเลี้ยงไวรัสเริมด้วยวิธี sulforhodamine microtitre plate assay เพื่อหาดัชนีความเฉพาะเจาะจงในการออกฤทธิ์ต้านไวรัสเริม (selective index) ของสารสกัด ผลการทดลองพบว่า สารสกัด DCM-M มี EC_{50} (Vero) = 96 ± 7.5 μg/ml (รูปที่ 2ก) ขณะที่สารสกัดเอทานอลและน้ำมีค่า EC_{50} (Vero) = 266.3 ± 6.7 μg/ml (รูปที่ 2ข) และ 276.3 ± 3.2 μg/ml (รูปที่ 2ค) ตามลำดับ เมื่อคำนวณดัชนีความเฉพาะเจาะจงในการออกฤทธิ์ต้านไวรัสเริมของสารสกัด DCM-M [EC_{50} (Vero)/ IC_{50} (HSV)] พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.9 ข้อมูลนี้แสดงว่าสารสกัดหยาบ DCM-M อาจประกอบด้วยสาร 2 ชนิด คือสารที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเริมจริงแต่มีปริมาณน้อยและสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งมีปริมาณมากกว่า หรือมีเฉพาะสารที่เป็นพิษต่อ

ก.



ข.



(**หมายเหตุ** ค่า IC_{50} ของ acylovir ต่อ HSV-1 และ HSV-2 เท่ากับ 0.02 ± 0.01 และ 0.03 ± 0.01 μg/ml ตามลำดับ)

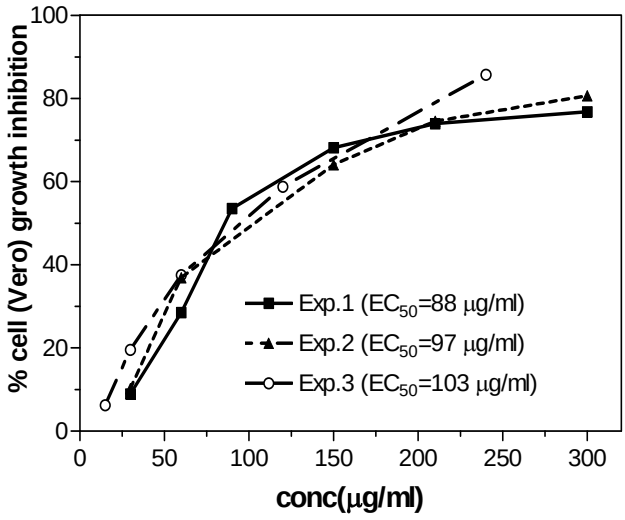
รูปที่ 1. ฤทธิ์ต้าน HSV-1 (ก.) และ HSV-2 (ข.) ของสารสกัด DCM-M จาก *Stemona collinsae*

เซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยงไวรัสเริมจึงเป็นผลให้พบฤทธิ์ต้านไวรัสเริม

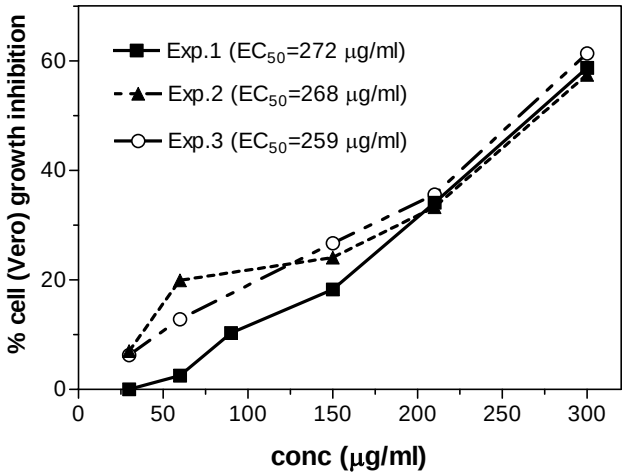
การศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบบี โดยการยับยั้งการปล่อย HBsAg ที่สร้างจากเซลล์ PLC/PRF/5 ผลการทดลองพบว่าแม้ใช้ความเข้มข้นของสารสกัด DCM-M, เอทานอล และน้ำ สูงสุดที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ Vero และเซลล์มะเร็งร้อยละ 50 {EC_{50} (Vero) และ EC_{50} [(KB หรือ MCF-7) ซึ่งจะกล่าวต่อไป]} สารสกัดทั้งสามชนิดสามารถลดปริมาณ HBsAg ได้เพียงร้อยละ 20-30 (ตารางที่ 3)

ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด *Stemona collinsae* เมื่อทดสอบด้วยการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเซลล์มะเร็งสองชนิดคือ KB และ MCF-7 พบว่าสารสกัดหยาบ

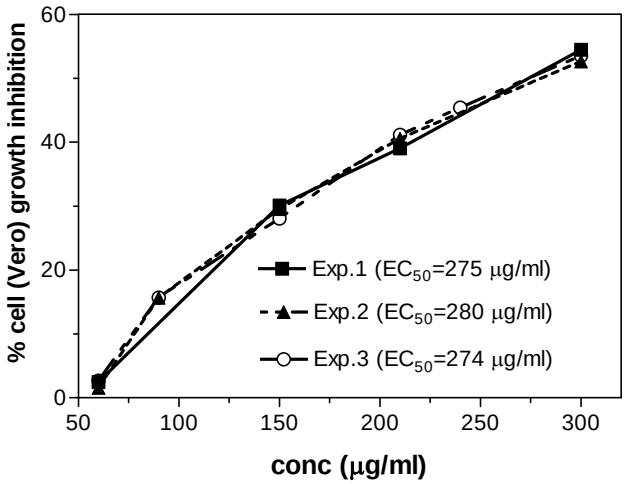
ก.



ข.



ค.



รูปที่ 2. ฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์ Vero ซึ่งใช้เพาะเลี้ยงไวรัสเริมของสารสกัด DCM–M (ก.), เอทานอล (ข.) และ น้ำ (ค) จาก *Stemona collinsae*

ตารางที่ 3. ฤทธิ์ยับยั้งการปล่อย HBsAg ของสารสกัด DCM-M (ก.) และสารสกัดหยาบเอทานอลและน้ำ (ข.) จาก *Stemona collinsae*

ก.

ความเข้มข้น (µg/ml)	% anti-HBsAg activity*
105	21.6
90	16.2
60	11.3

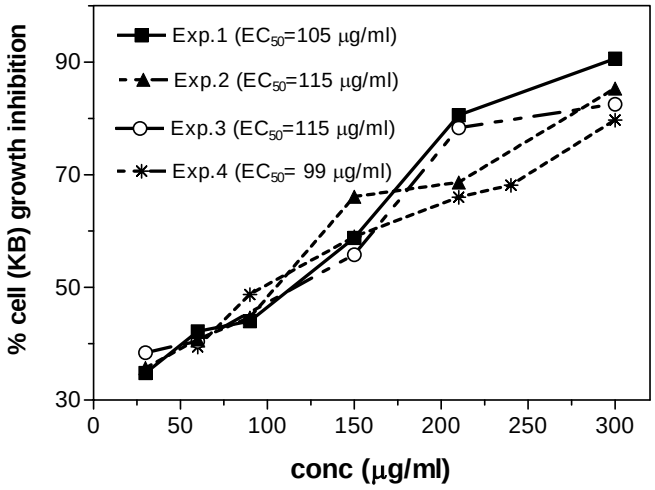
ข.

ความเข้มข้น (µg/ml)	% anti-HBsAg activity*	
	ส่วนสกัดเอทานอล	ส่วนสกัดน้ำ
240	27.4	23.4
210	18.4	16.6
150	14.4	11.4
90	7.3	2.9

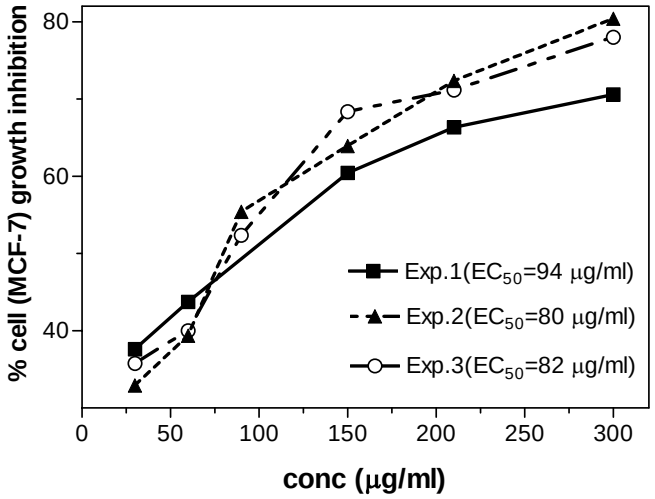
* ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 2 ครั้ง

(**หมายเหตุ** Glycyrrhizin 100 µg/ml มี %anti-HBsAg activity เท่ากับ 90)

ก.

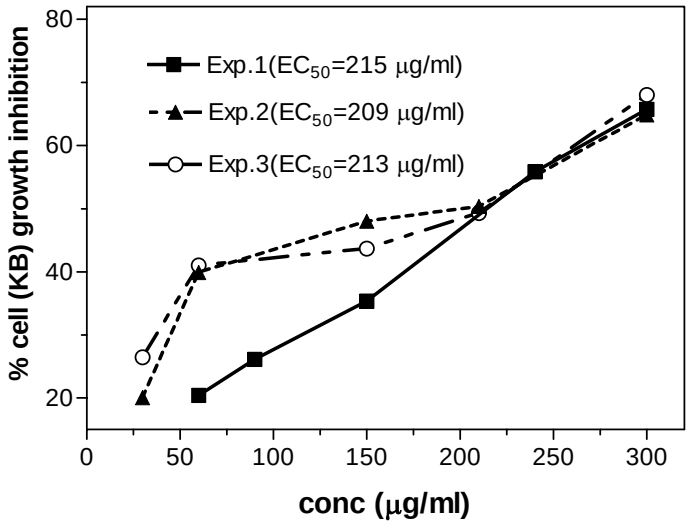


ข.

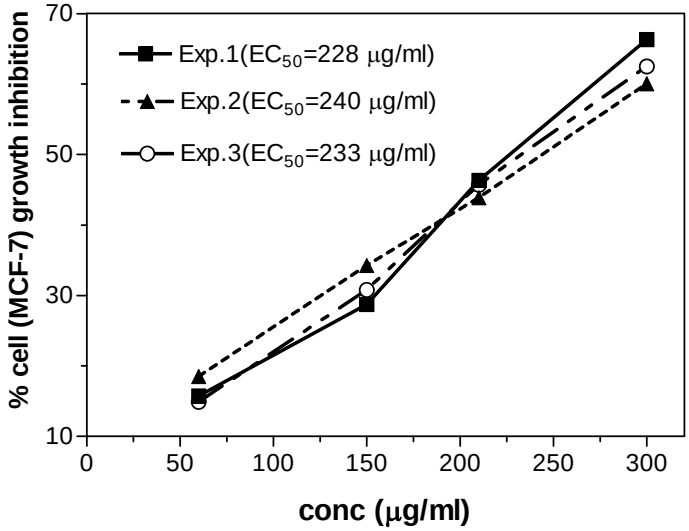


รูปที่ 3. ฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง KB (ก.) และ MCF-7 (ข.) ของสารสกัด DCM-M จาก *Stemona collinsae*

ก.



ข.



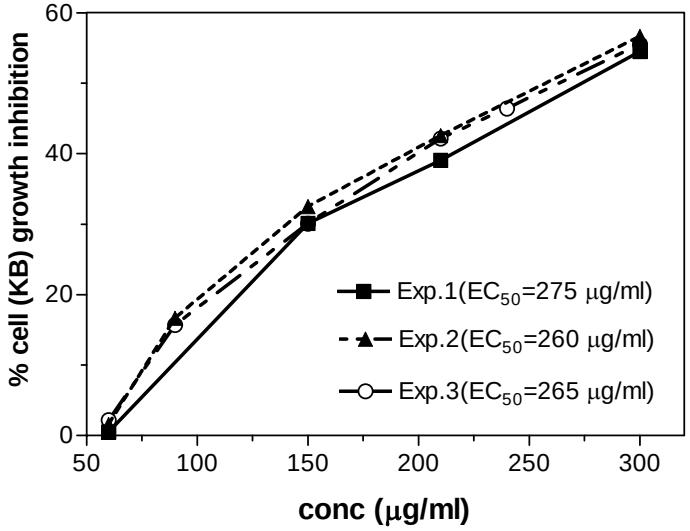
รูปที่ 4. ฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง KB (ก.) และ MCF-7 (ข.) ของสารสกัดเอทานอล จาก *Stemona collinsae*

ทั้งหมดล้วนมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ดังนี้คือ สารสกัด DCM-M มี EC_{50} (KB) = 108.5 ± 7.9 μg/ml (รูปที่ 3ก) และ EC_{50} (MCF-7) = 85.3 ± 7.6 μg/ml (รูปที่ 3ข) สารสกัดเอทานอล มี EC_{50} (KB) = 212.3 ± 3.1 μg/ml (รูปที่ 4ก) และ EC_{50} (MCF-7) = 233.7 ± 6.0 μg/ml (รูปที่ 4ข) สารสกัดน้ำมี EC_{50} (KB) = 266.7 ± 7.6 μg/ml (รูปที่ 5ก) EC_{50} (MCF-7) = 289 ± 7 μg/ml (รูปที่ 5ข) เมื่อพิจารณาค่า EC_{50} (Vero) และ EC_{50} (KB, MCF-7) ของสารสกัดชนิดเดียวกัน (ตารางที่ 4) จะเห็นว่ามีค่าใกล้เคียงกัน ข้อมูลนี้แสดงว่าสารสกัดหยาบอาจประกอบด้วยสาร 2 ประเภท โดยประเภทแรกเป็นพิษต่อเซลล์ปกติและอีกประเภทเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง หรือประกอบด้วยสารประเภทเดียวที่มีพิษทั้งต่อเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้สนับสนุนว่าพืช *Stemona* มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง เนื่องจากมีรายงานวิจัยของสารสกัดจาก *Stemona tuberosa* ซึ่งพบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่ต่อมไทรอยด์ (medullary thyroid carcinoma) และเพิ่มการ apoptosis (21)

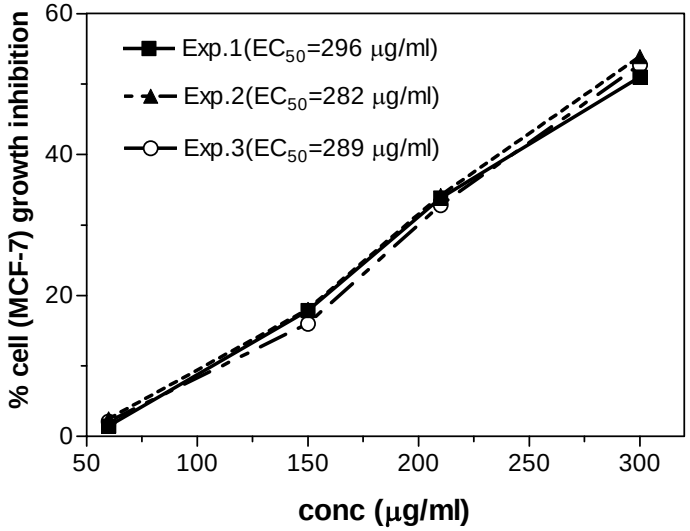
สรุปผลการวิจัย

การวิจัยนี้ทำเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านเริม ฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบบี และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของ

ก.



ข.



รูปที่ 5. ฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง KB (ก.) และ MCF-7 (ข.) ของสารสกัดน้ำจาก *Stemona collinsae*

ตารางที่ 4. ฤทธิ์ต้านไวรัสเริม และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งของสารสกัดจาก *Stemona collinsae*

ชนิดสารสกัด	Anti-HSV activity		Cytotoxicity		
	IC_{50} (HSV-1) μg/ml	IC_{50} (HSV-2) μg/ml	EC_{50} (Vero) μg/ml	EC_{50} (KB) μg/ml	EC_{50} (MCF-7) μg/ml
DCM-M	105.3 ± 3.5	107.0 ± 6.2	96 ± 7.5	108.5 ± 7.9	85.3 ± 7.6
เอทานอล	>300	>300	266.3 ± 3.1	212.3 ± 3.1	233.7 ± 6.0
น้ำ	>300	>300	276.3 ± 3.2	266.7 ± 7.6	289.0 ± 7.0

ราก *Stemona collinsae* ผลการศึกษาพบว่า สารสกัด DCM-M, เอทานอล และน้ำ ล้วนมีพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB และ MCF-7 โดยสารสกัด DCM-M มีความแรงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งมากกว่าสารสกัดเอทานอลและน้ำอย่างน้อย 2 เท่า (ตารางที่ 4) แต่เฉพาะสารสกัด DCM-M เท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้าน HSV-1 และ HSV-2 เมื่อทดสอบด้วยวิธี plaque reduction assay โดยมีค่า IC_{50} = 105.3 ± 3.5 และ 107.0 ± 6.2 μg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ดี สารสกัดทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ต่ำในการต้านไวรัสตับอักเสบบีจากการยับยั้งการปล่อย HBsAg และไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella typhimurium* และ *Pseudomonas aeruginosa* รวมถึงไม่มีฤทธิ์ต้านยีสต์ *Candida albicans* และรา *Aspergillus niger* เมื่อทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2545 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Associate Professor Kenneth F. Bastow, School of Pharmacy, University of North Carolina at Chapel Hill ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เซลล์เพาะเลี้ยง Vero, KB และ MCF-7 และไวรัสเริม ดร.เครือวัลย์ พลจันทร์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ได้อนุเคราะห์เซลล์เพาะเลี้ยง PLC/PFR/5 และขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ให้การสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. B. E. E. Duyfjes. Stemonaceae. *Flora Malesiana* ser.I **11**: 399-409 (1993).
2. Z. H. Tsi and B. E. E. Duyfjes. Stemonaceae. In Z. Y. Wu and P. H. Raven (eds.), *Flora of China*, Science Press, Beijing, 2000, pp. 70-72.
3. M. Terada, M. Sano, A. Ishii, H. Kino, S. Fukushima, and T. Noro. Studies on chemotherapy of infestation with parasitic helminths. III. Effects of tuberostemonine from *Stemona japonica* on the motility of parasitic helminths and isolated host tissues. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **79**: 93-103 (1982).
4. R. S. Xu, Y. J. Lu, J. H. Chu, T. Iwashita, H. Naoki, Y. Naya, and K. Nakanishi. Studies on some new *Stemona* alkaloids. *Tetrahedron* **38**: 2667-2670 (1982).
5. E. A. Stöger. *Arzneibuch der Chinesischen Medizin. Monographien des Arzneibuches der Volksrepublik China 1990 und 1995*, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 1999, pp. 1-6.
6. K. Sakata, K. Aoki, C. F. Chang, A. Sakurai, S. Tamura, and S. Murakoshi. Stemospironine, a new insecticidal alkaloid of *Stemona japonica* Miq. Isolation, structural determination and activity. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 457-463 (1978).
7. R. S Xu. Some bioactive natural products from Chinese medicinal plants. In B. V. Attaur-Rahman (ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier Science, Amsterdam, 2000, pp 729-772.
8. เลาจนา ธีรภัทรสกุล และ ประคอง พันธ์อุไร. การศึกษาพิษของหนอนตายหยากที่มีกับหนอนแมลงวันบ้าน. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์* **4**: 217-227 (2510).
9. วงศ์สถิตย์ ฉั่วสกุล และ นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. สมุนไพรพื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานี (1). *วารสารสมุนไพร* **4**: 29-61 (2540).
10. นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. *สมุนไพรไม้พื้นบ้าน เล่ม 5*, กรุงเทพฯ, 2543, หน้า 119-122.
11. พัชรินทร์ บูรพานนท์, ภูษิต ศิริวงศ์ไพรัฐ, และ มาลี เลิศสกุลพิสัย. การเตรียมและประเมินผลยาเม็ดแก้ไอ. *สารนิพนธ์*, 2527, หน้า 30.
12. W. Zhao, G. Qin, Y. Ye, R. Xu, and X. Le. Bibenzyls from *Stemona tuberosa*. *Phytochemistry* **38**: 711-713 (1995).
13. K. Soytong, V. Rakvidhvasastra, and T. Sommartya. Effect of some medicinal plants on growth fungi and potential in plant disease control. *Abstracts of the 11th Conference of Science and Technology Thailand*, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, October 24-26, 1985, pp. 361.

14. T. Pacher, C. Seger, D. Engelmeier, S. Vajrodaya, O. Hofer, and H. Greger. Antifungal stilbenoids from *Stemona collinsae*. *J. Nat. Prod.* **65**: 820-827 (2002).
15. K. Kostecki, D. Engelmeiera, T. Pachera, O. Hofer, S. Vajrodaya, and H. Greger. Dihydrophenanthrenes and other antifungal stilbenoids from *Stemona* cf. *pierrei*. *Phytochemistry* **65**: 99–106 (2004).
16. J. Jorgensen, J. Turnidge, and J. Washington. Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disk diffusion methods. In P. Murray, E. Baron, M. Pfaller, F. Tenove, and R. Yolken (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, New York, 1999, pp. 1526-1543.
17. P. Akanitapichat, C. T. Lowden, and K. F. Bastow. 1,3-Dihydroxyacridone derivatives as inhibitors of herpes virus replication. *Antiviral Res.* **45**: 123-134 (2000).
18. P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kemnny, and M. R. Boyd. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 1107-1112 (1990).
19. H. Yang, H. Chang, and T. Weng. Influence of several chinese drugs on the growth of some pathologic organisms: Preliminary report. *J. Formos. Med. Assoc.* **52**: 109 (1953).
20. B. Brem, C. Seger, T. Pacher, O. Hofer, S. Vajrodaya, and H. Greger. Feeding deterrence and contact toxicity of *Stemona* alkaloids-a source of potent natural insecticides. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 6383-6388 (2002).
21. B. Rinner, V. Siegl, P. Purstner, T. Efferth, B. Brem, H. Greger, and R. Pfragner. Activity of novel plant extracts against medullary thyroid carcinoma cells. *Anticancer Res.* **24**: 495-500 (2004).