การยับยั้งโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสเดงกี่โดยใช้เรสเวอราทรอลหรือมิโนไซคลินในเซลล์ Huh-7

Inhibition of intracellular envelope protein of dengue virus by resveratrol or minocycline in Huh-7 cells

ปุณณดา เรืองสวัสดิ์[1*], Shilu Malakar[2], เพทาย เย็นจิตโสมนัส[3], ศันสนีย น้อยสคราญ[4], และถาวรชัย ลิ้มจินดาพร[5]

Punnada Ruangsawat[1*], Shilu Malakar[2], Pa-thai Yenchitsomanus[3], Sansanee Noisakran[4] and Thawornchai Limjindaporn[5]

[1] นักศึกษาระดับปริญญาโท, ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

[1] Graduate student, Department of Anatomy, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

[2] นักวิจัย, ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

[2] Researcher, Department of Anatomy, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

[3] ศาสตราจารย์, หน่วยอณูเวชศาสตร์, สถานส่งเสริมการวิจัย, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

[3] Professor, Division of Molecular Medicine, Department of research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

[4] อาจารย์, หน่วยปฏิบัติการทางเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์, ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

[4] Division of Molecular Biology of Dengue Flavivirus Research Team, Medical Molecular Biotechnology Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency.

[5] รองศาสตราจารย์, ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

[5] Associate professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

[*]**Corresponding author, E-mail:** Thawornchai.lim@mahidol.ac.th

บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อไวรัสเดงกี่ถือเป็นหนึ่งในปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก พบระบาดในภูมิประเทศเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน รวมไปถึงประเทศไทย ซึ่งพบผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกี่กระจายอยู่ทั่วทุกภูมิภาค ของประเทศ ในเบื้องต้นผู้ป่วยอาจมีอาการคล้ายไข้หวัดจากนั้น จึงเพิ่มความรุนแรงจนทำให้เสียชีวิตได้ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนหรือยาต้านไวรัสที่มีประสิทธิภาพมากพอ การรักษาผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่จึงเป็นการรักษาตามอาการเท่านั้น ด้วยเหตุนี้การศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนายาที่มีอยู่เดิมเพื่อใช้สำหรับยับยั้งการติดเชื้อไวรัสจึงเป็นสิ่งสำคัญ ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ของยาสองชนิด

ประกอบด้วย เรสเวอราทรอลและมิโนไซคลิน โดยผู้วิจัยได้นำเซลล์ไลน์จากตับ (Huh-7) มาทำให้ติดเชื้อไวรัสเดงกี่ สายพันธุ์ที่ 2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่มด้วยยาแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เมื่อครบ 24 ชั่วโมงหลังจากติดเชื้อจึงทำการวัดปริมาณโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสโดยใช้วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้ Presto blue assay จากผลที่ได้ก็พบว่า เมื่อใช้เรสเวอราทรอลเข้มข้น 125 และ 250 ไมโครโมลาร์ ปริมาณโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสลดลงเหลือ 77% และ 57% ตามลำดับ และเมื่อใช้มิโนไซคลินเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ พบว่าปริมาณโปรตีนเปลือกหุ้มลดลงเหลือ 69% อย่างไรก็ตามปริมาณเซลล์ Huh-7 ที่มีชีวิตหลังจากได้รับเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้นดังกล่าวลดลงเหลือเพียง 67% และ 55% ตามลำดับ ส่วนเซลล์ Huh-7 ที่ได้รับมิโนไซคลินมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต 97% แสดงให้เห็นว่าการลดลงของโปรตีนเปลือกหุ้มหลังเซลล์ได้รับเรสเวอราทรอลอาจเป็นผลมาจากการตายของเซลล์ ในขณะที่มิโนไซคลินมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสได้อย่างมีนัยสำคัญโดยไม่ได้มีผลมาจากการตายของเซลล์ Huh-7 จากผลที่กล่าวมานี้จึงอาจนำไปสู่งานวิจัยต่อยอดเพื่อพัฒนายาต้านไวรัสเดงกี่ในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: ไวรัสเดงกี่, ยาต้านไวรัส, เรสเวอราทรอล, มิโนไซคลิน

Abstract

Dengue virus (DENV) infection is a public health problem in the tropical and subtropical region including Thailand. The clinical manifestation ranges from mild dengue fever to severe forms. Till date, dengue vaccine and drug have been ineffective, symptomatic treatment is used for treatment of the disease. For this reason, research to develop antiviral drug against DENV becomes necessary. Drug repurposing is one of the most effective approaches. In this study, the inhibitory effect of two drugs consisting resveratrol and minocycline were evaluated. After 2 hours of infection with DENV-2, the various doses of each drug were given to DENV-infected Huh-7 cell line. Their effects on the intracellular DENV envelope protein and cell viability were examined using ELISA and Presto blue cell viability assay at 24 hours post-infection. The results in our study showed that the intracellular DENV E protein was 77%, 57% and 69% after treated with resveratrol at 125 and 250 μM, and minocycline at 250 μM, respectively. Cell viability was reduced to 67% and 55% after treated with resveratrol at indicated doses whereas 97% of living cells were observed after minocycline treatment. Suggesting that resveratrol affected cell viability of DENV-infected Huh-7 cell line. In contrast, minocycline did not affected cell viability of DENV-infected Huh-7 cell line. These demonstrated that minocycline inhibited DENV-infected cells *in vitro*.

Keywords: Dengue virus, Antiviral drug, Resveratrol, Minocycline

บทนำ

ไข้เลือดออกเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี่โดยมียุงลายในตระกูล *Aedes* เป็นพาหะ ประกอบด้วยยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) ซึ่งมักพบระบาดในช่วงฤดูฝนของทุกปีในภูมิประเทศเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนรวมถึงประเทศไทย ไข้เลือดออกถือเป็นปัญหาทางสาธารณะสุขที่สำคัญเนื่องจากมีผู้เสี่ยงติดเชื้อทั่วโลกประมาณ 390 ล้านคน (Bhatt et al., 2013; Rattanaburee et al., 2015) รวมถึงมีรายงานจำนวนผู้ป่วยสูงถึง 96 ล้านคน และมีผู้เสียชีวิตประมาณ 22,000 รายเป็นประจำทุกปี (Gubler, 2002; Murray, Quam, & Wilder-Smith, 2013; Rattanaburee et al., 2015; Shepard, Coudeville, Halasa, Zambrano, & Dayan, 2011) ไวรัสเดงกี่เป็นอาร์เอ็นเอไวรัส จัดอยู่ในตระกูล Flaviviridae สกุล *Flavivirus* ประกอบด้วย 4 สายพันธุ์ คือ DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 โดยขนาดของจีโนมมีความยาวประมาณ 11 กิโลเบส ซึ่งถูกแปลไปเป็นโปรตีนโครงสร้าง 3 ชนิด ประกอบด้วย โปรตีนเปลือกหุ้มหรือโปรตีน envelope, โปรตีน capsid และโปรตีน membrane นอกจากนี้ยังแปลไปเป็นโปรตีนส่วนอื่นอีก 7 ชนิด ได้แก่ NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS2B และ NS5 (Morchang et al., 2021; Uno & Ross, 2018) โดยผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่มักพบได้ตั้งแต่ติดเชื้อโดยไม่มีอาการหรืออาจมีอาการไข้เล็กน้อย ไปจนถึงมีอาการไข้รุนแรงร่วมกับภาวะช็อกซึ่งนำไปสู่การเสียชีวิตได้ (Simmons, Farrar, Nguyen v, & Wills, 2012) โดยตับเป็นอวัยวะที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี่ โดยพบว่าในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่มักมีเอนไซม์ในตับเพิ่มสูงขึ้นและมีอาการอักเสบที่เนื้อตับรวมถึงเลือดออกร่วมด้วย (Kyle, Beatty, & Harris, 2007; Wichmann et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าไวรัสสามารถเพิ่มปริมาณได้ที่เซลล์ตับ แสดงให้เห็นว่าตับเป็นอวัยวะเป้าหมายที่สำคัญของไวรัสเดงกี่ (Martina, Koraka, & Osterhaus, 2009)

Dengvaxia เป็นวัคซีนที่ใช้สำหรับการป้องกันโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี่ แต่พบว่าผู้ที่สามารถรับวัคซีนได้ต้องมีอายุระหว่าง 9-45 ปี และต้องมีประวัติการป่วยเป็นโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี่มาก่อน เพราะหากได้รับวัคซีนโดยที่ไม่เคยมีประวัติการติดเชื้ออาจเพิ่มความรุนแรงของโรคได้ (Sridhar et al., 2018) จากข้อจำกัดของวัคซีนที่กล่าวไปข้างต้น ทำให้ยาที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสกลายเป็นทางเลือกที่สำคัญ แต่ในปัจจุบันยังไม่มียาต้านไวรัสเดงกี่ที่มีประสิทธิภาพมากพอ การนำยาที่เคยมีอยู่เดิมกลับมาใช้ใหม่ (Drug repurposing) ถือเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากเป็นการนำยาที่มีอยู่มาพัฒนาต่อยอด ซึ่งมีความปลอดภัยมากกว่าเมื่อเทียบกับการคิดค้นยาชนิดใหม่ (Krishnamurthy, Grimshaw, Axson, Choe, & Miller, 2022; Pushpakom et al., 2019) จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำยาหลายชนิดมาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี่ เช่น คลอโรควิน, บาลาพิราเวีย, ซีลโกซีเวียร์ และโลวาสแตติน แต่ยาเหล่านี้กลับไม่ถูกอนุมัติให้ใช้ในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่ เนื่องจากยาเหล่านี้ไม่ได้ช่วยให้ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้นและไม่ได้มีบทบาทในการต้านไวรัสอย่างมีนัยสำคัญ (Low et al., 2014; Nguyen et al., 2013; Tricou

et al., 2010; Whitehorn et al., 2012) มีการศึกษาในเรสเวอราทรอล ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์แพร่หลายทางด้านสุขภาพ โดยสามารถยับยั้งกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสหลายชนิด เช่น ไวรัสไข้หวัดใหญ่, ไวรัสเอชไอวี, ไวรัสซิการ์ และไวรัสเดงกี่ (Clouser et al., 2012; Palamara et al., 2005; Zainal et al., 2017) ซึ่งจากการศึกษาในไวรัสเดงกี่พบว่า เรสเวอราทรอลสามารถยับยั้งการสร้างโปรตีน NS3 ของไวรัสเดงกี่ อีกทั้งไม่มีรายงานว่าการลดลงนี้เป็นผลมาจากการที่เรสเวอราทรอลเป็นพิษต่อเซลล์หรือไม่ (Zainal et al., 2017). มิโนไซคลิน เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น โรคไขข้ออักเสบรูมาตอยด์, โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (Kloppenburg, Dijkmans, Verweij, & Breedveld, 1996; Sewell et al., 1996) ที่ผ่านมาได้มีการนำมิโนไซคลินมาใช้ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสเดงกี่ ซึ่งจากผลที่ได้พบว่ามิโนไซคลินสามารถยับยั้งกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสเดงกี่ในเซลล์ HepG2 (Leela et al., 2016) นอกจากนี้มิโนไซคลินยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสเดงกี่ในเซลล์ Huh-7 แต่ไม่มีรายงานว่าการลดลงของไวรัสเดงกี่ในเซลล์ Huh-7 เป็นผลมาจากการที่มิโนไซคลินเป็นพิษต่อเซลล์หรือไม่ (Lai et al., 2018)

ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้เลือกยา 2 ชนิด ประกอบด้วย เรสเวอราทรอลและมิโนไซคลิน มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ โดยดูปริมาณโปรตีนเปลือกหุ้มและดูอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ Huh-7 หลังจากที่ได้รับเรสเวอราทรอลและมิโนไซคลิน เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนายาต้านไวรัสเดงกี่ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ของเรสเวอราทรอลหรือมิโนไซคลินในเซลล์ Huh-7

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ยาและสารเคมี

เรสเวอราทรอล (Sigma-Aldrich Corporation, USA) ถูกเตรียมในสารละลาย DMSO ส่วนมิโนไซคลิน (Sigma-Aldrich Corporation, USA) ถูกเตรียมด้วยน้ำ ยาทั้งสองชนิดถูกเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์ Human hepatocellular carcinoma (Huh-7) ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเซลล์ Aedes albopictus (C6/36) ถูกเลี้ยงใน Leiboviz's L-15 Medium ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

3. การเพาะเลี้ยงไวรัส

เชื้อไวรัสเดงกี่ชนิดที่ 2 สายพันธุ์ 16681 (หน่วยอณูเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล) โดยทำการเลี้ยงเซลล์ C6/36 ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด T-75 จำนวน 8 x 10^6 เซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์ติดเชื้อไวรัสเดงกี่ที่ Multiplicity of infection (MOI) 0.1 โดยจะทำการเก็บไวรัสเมื่อสังเกตเห็นว่าเซลล์มีลักษณะเปลี่ยนไป (Cytopathic effect) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีการติดเชื้อ โดยไวรัสถูกเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

4. การหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของยาแต่ละชนิด

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้เลี้ยงเซลล์ Huh-7 ในถาดหลุมชนิด 96 หลุม หลุมละ 30,000 เซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นได้นำยาแต่ละชนิดประกอบด้วยเรสเวอราทรอลและมิโนไซคลินมาทำการเจือจางลงสองเท่าอย่างเป็นลำดับ (Two-folded serial dilution) หลังจากที่ได้รับยาแต่ละชนิดเซลล์ Huh-7 ถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นผู้วิจัยได้วัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดยเติมสาร Presto Blue ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุมและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570/600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader และทำการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 8

5. การวัดปริมาณโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสหลังจากได้รับยาแต่ละชนิด (Intracellular DENV E protein)

ในการวัดปริมาณโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสเดงกี่โดยใช้วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ผู้วิจัยได้นำเซลล์ Huh-7 ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี่ซึ่งได้รับเรสเวอราทรอลหรือมิโนไซคลินมาทำการย้อมด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิชนิด Mouse anti-DENV E monoclonal clone (4G2) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิชนิด Rabbit anti-mouse HRP conjugated เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงเติมสารซับสเตรท 3,3’5,5’-Tetramethylbenzidine (TMB) ลงไปและหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริก ปริมาณโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสเดงกี่ถูกวัดด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450/630 นาโนเมตร แล้วจึงนำมาคำนวณหาร้อยละของโปรตีนเปลือกหุ้มโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism รุ่นที่ 8

6. การวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากติดเชื้อและได้รับยาแต่ละชนิด

ผู้วิจัยทำการเลี้ยงเซลล์ Huh-7 ในถาดหลุมชนิด 96 หลุม หลุมละ 30,000 เซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์ติดเชื้อไวรัสเดงกี่ 2 สายพันธุ์ 16681 ที่ MOI 1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงรักษาเซลล์ Huh-7 ที่ติดเชื้อด้วยเรสเวอราทรอลหรือมิโนไซคลิน โดยเลือกความเข้มข้นของยาที่ไม่ส่งผลต่อค่าความเป็นพิษของเซลล์ หลังจากที่ได้รับยาแต่ละชนิดเซลล์ Huh-7 ถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 24 ชั่วโมงหลังจากติดเชื้อ ผู้วิจัยได้เติม Presto Blue dye ปริมาณ 10 ไมโครลิตร

ลงไปในแต่ละหลุมที่และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570/600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader และทำการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 8

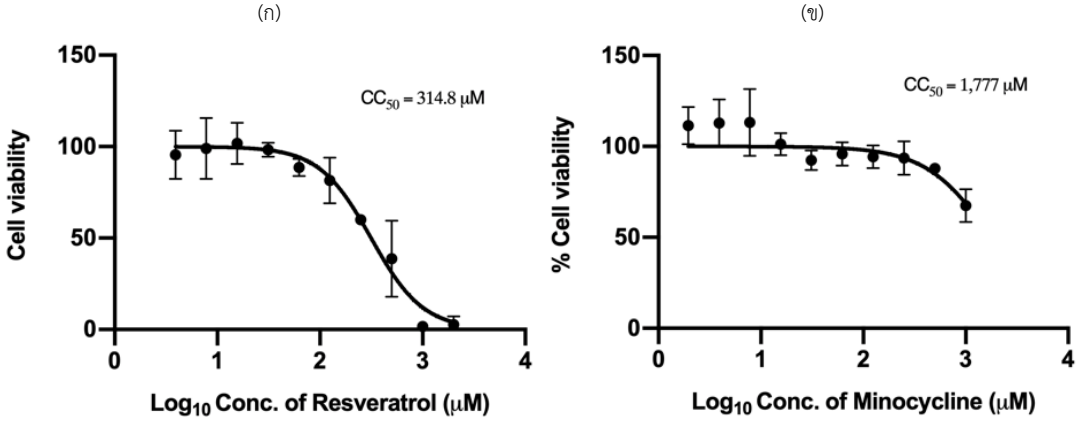
7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผู้วิจัยทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง ซึ่งผลที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม GraphPad รุ่นที่ 8 (GraphPad Software, Inc., USA) โดยใช้การวิเคราะห์แบบ One-way ANOVA มีค่านัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.05

ผลการวิจัย

1. ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของยาแต่ละชนิด (Cytotoxicity value)

ในเบื้องต้นผู้วิจัยต้องการที่จะทราบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (50% Cytotoxic concentration value : CC_{50}) ของยาแต่ละชนิด โดยผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ Huh-7 จากนั้นให้ยาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แก่เซลล์ แล้วจึงทำการวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโยใช้ Presto blue assay และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism ซึ่งผลที่ได้พบว่า เรสเวอราทรอลมีค่า CC_{50} เท่ากับ 314.8 ไมโครโมลาร์ และมิโนไซคลินมีค่า CC_{50} เท่ากับ 1,777 ไมโครโมลาร์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ปริมาณยาที่ความเข้มข้นน้อยกว่าค่า CC_{50} ของยาแต่ละชนิดสำหรับการทดลองในขั้นต่อไป



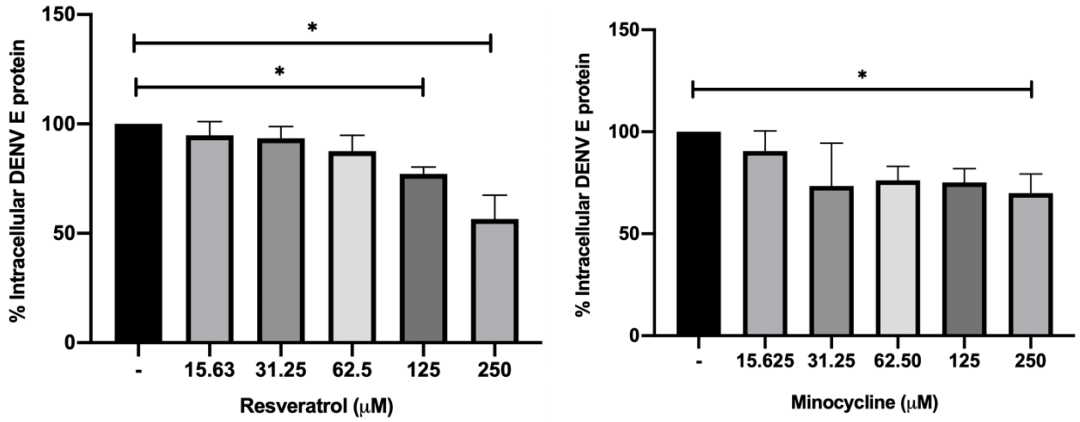
ภาพที่ 1 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของ (ก) เรสเวอราทรอลและ (ข) มิโนไซคลิน

2. ปริมาณโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสหลังจากได้รับยาแต่ละชนิด (Intracellular DENV E protein)

หลังจากทราบค่าความเข้มข้นของยาที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์แล้ว ผู้วิจัยต้องการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสของยาแต่ละชนิดโดยใช้วิธี ELISA และคำนวนหาร้อยละของโปรตีน

เปลือกหุ้มด้วยโปรแกรม GraphPad Prism โดยทำการเทียบปริมาณโปรตีนของไวรัสที่เกิดขึ้นในเซลล์ Huh-7 หลังจากได้รับยาแต่ละชนิดกับเซลล์ Huh-7 ที่ติดเชื้อและไม่ได้รับยา ซึ่งผลที่ได้พบว่าโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสมีปริมาณลดลงแบบ Dose-dependent manner หลังจากได้รับเรสเวอราทรอลหรือมิโนไซคลิน โดยจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้เรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 125 และ 250 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 2ก) อีกทั้งพบว่าเมื่อใช้มิโนไซคลินที่ 250 ไมโครโมลาร์ ปริมาณของโปรตีนเปลือกหุ้มก็ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน (ภาพที่ 2ข) แสดงให้เห็นว่าทั้งเรสเวอราทรอลและมิโนไซคลินสามารถลดปริมาณโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสเดงกี่ได้

(ก) (ข)

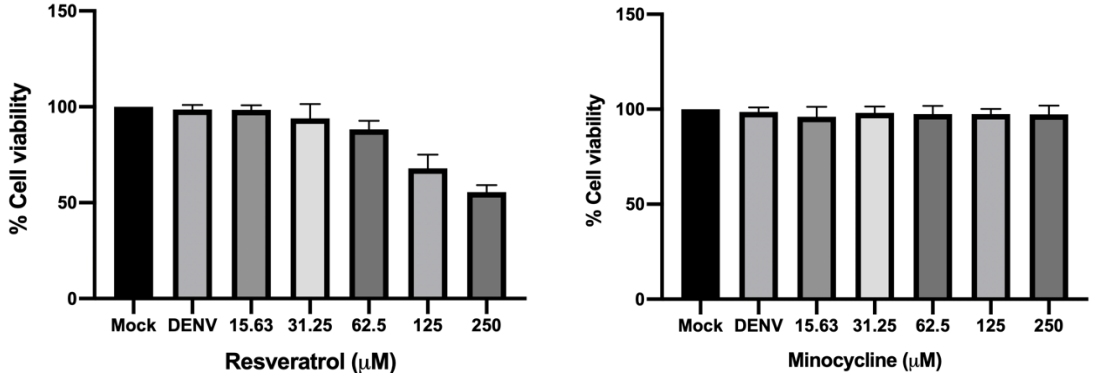


ภาพที่ 2 ปริมาณโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสเดงกี่ในเซลล์ Huh-7 ที่ติดเชื้อหลังจากได้รับ (ก) เรสเวอราทรอล และ (ข) มิโนไซคลินที่ความเข้มข้นต่างกัน (* แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ p value < 0.05)

3. การวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากติดเชื้อและได้รับยาแต่ละชนิด

ในการยืนยันว่าเรสเวอราทรอลหรือมิโนไซคลินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบดูว่าการลดลงของโปรตีนนั้นมีผลมาจากการตายของเซลล์หรือไม่ โดยในขั้นตอนนี้ผู้วิจัยได้วัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้ Presto Blue assay และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism ซึ่งจากผลที่ได้ก็พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเรสเวอราทรอลเพิ่มขึ้นจะมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดลงเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเซลล์ Huh-7 มีชีวิตรอดเพียง 55% เมื่อเซลล์ได้รับเรสเวอราทรอลที่ 250 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 3ก) ในขณะที่ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตนั้นมีค่ามากกว่า 97% ในทุกความเข้มข้นเมื่อเซลล์ได้รับมิโนไซคลิน (ภาพที่ 3ข) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนเปลือกหุ้มที่ลดลงหลังจากเซลล์ได้รับมิโนไซคลินไม่ได้มีผลมาจากการลดลงของเซลล์

(ก) (ข)



ภาพที่ 3 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากติดเชื้อและได้รับ (ก) เรสเวอราทรอล และ (ข) มิโนไซคลินที่ความเข้มข้นต่างกัน

สรุปและอภิปรายผล

โรคติดเชื้อไวรัสเดงกี่ถือเป็นปัญหาทางสาธารณะสุขที่สำคัญ เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนป้องกันหรือยาต้านไวรัสที่ประสิทธิภาพมากพอ การคิดค้นยาชนิดใหม่สำหรับใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี่ก็จัดเป็นวิธีที่ใช้เวลานาน การกลับมาใช้ยาที่เคยมีอยู่เดิม จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมเนื่องจากสามารถลดเวลาในการพัฒนายาและมีความปลอดภัยกว่าการทดลองยาชนิดใหม่ (Krishnamurthy et al., 2022; Pushpakom et al., 2019) ในครั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาประสิทธิภาพของยาสองชนิด คือ เรสเวอราทรอลและมิโนไซคลิน ซึ่งจากผลที่ได้พบว่า เมื่อให้เรสเวอราทรอลแก่เซลล์ Huh-7 ที่ติดเชื้อ ปริมาณโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสลดลงแบบ dose-dependent manner โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเซลล์ได้รับเรสเวอราทรอลที่ 125 และ 250 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 2ก) แต่พบว่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าเพียง 68% และ 55% ตามลำดับ (ภาพที่ 3ก) แสดงให้เห็นว่าการลดลงของโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสหลังจากที่เซลล์ Huh-7 ได้รับเรสเวอราทรอลนั้นอาจมีผลมาจากการตายของเซลล์ ยาอีกชนิดที่ผู้วิจัยเลือกศึกษาคือ มิโนไซคลิน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มเตตระไซคลิน ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายเพื่อรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย (Kloppenburg et al., 1996) และมีการนำมิโนไซคลินไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ (Michaelis, Kleinschmidt, Doerr, & Cinatl, 2007; Mishra, Ghosh, Duseja, & Basu, 2009; Szeto et al., 2010) จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณมิโนไซคลินให้แก่เซลล์ Huh-7 ที่ติดเชื้อจะเห็นว่าปริมาณโปรตีนเปลือกหุ้มนั้นลดลง โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเซลล์ได้รับมิโนไซคลินที่ 250 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 2ข) และพบว่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตมีมากกว่า 97% ในทุกความเข้มข้นที่ใช้ (ภาพที่ 3ข) แสดงให้เห็นว่ามิโนไซคลินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสในเซลล์ Huh-7 ที่ติดเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้าที่ได้นำมิโนไซคลินมาใช้ในการยับยั้งไวรัสเดงกี่ในเซลล์ HepG2 (Leela et al., 2016) อีกทั้งยังเป็นการยืนยันว่าการลดลงของโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสเดงกี่ในเซลล์ Huh-7 (Lai et al., 2018) ไม่ได้มีผลมาจากการตายของเซลล์

จากผลที่ได้ทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า ถึงแม้การลดลงของโปรตีนเปลือกหุ้มหลังจากเซลล์ Huh-7 ได้รับเรสเวอราทรอลอาจเป็นผลมาจากการตายของเซลล์ แต่มิโนไซคลินกลับเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปริมาณโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสเดงกี่โดยที่ไม่ส่งผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ Huh-7 ซึ่งจากข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปสู่แนวทางในงานวิจัยต่อยอดเพื่อศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ หน่วยอณูเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือสำหรับงานวิจัย โดยงานวิจัยได้รับการสนับสนุนจากทุนบัณฑิตศึกษาคณะแพทยาศาสตร์ศิริราชพยาบาล (Siriraj Graduate Thesis Scholarship)

เอกสารอ้างอิง

Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L.,. Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. Nature, 496(7446), 504-507.

Clouser, C. L., Chauhan, J., Bess, M. A., van Oploo, J. L., Zhou, D., Dimick-Gray, S., Patterson, S. E. (2012). Anti-HIV-1 activity of resveratrol derivatives and synergistic inhibition of HIV-1 by the combination of resveratrol and decitabine. Bioorg Med Chem Lett, 22(21), 6642-6646.

Gubler, D. J. (2002). The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. Arch Med Res, 33(4), 330-342.

Kloppenburg, M., Dijkmans, B. A., Verweij, C. L., & Breedveld, F. C. (1996). Inflammatory and immunological parameters of disease activity in rheumatoid arthritis patients treated with minocycline. Immunopharmacology, 31(2-3), 163-169.

Krishnamurthy, N., Grimshaw, A. A., Axson, S. A., Choe, S. H., & Miller, J. E. (2022). Drug repurposing: a systematic review on root causes, barriers and facilitators. BMC Health Serv Res, 22(1), 970.

Kyle, J. L., Beatty, P. R., & Harris, E. (2007). Dengue virus infects macrophages and dendritic cells in a mouse model of infection. J Infect Dis, 195(12), 1808-1817.

Lai, Y. C., Chuang, Y. C., Chang, C. P., Lin, Y. S., Perng, G. C., Wu, H. C., Yeh, T. M. (2018). Minocycline suppresses dengue virus replication by down-regulation of macro phagemigration inhibitory factor-induced autophagy. Antiviral Res, 155, 28-38.

Leela, S. L., Srisawat, C., Sreekanth, G. P., Noisakran, S., Yenchitsomanus, P. T., & Limjindaporn, T. (2016). Drug repurposing of minocycline against dengue virus infection. Biochem Biophys Res Commun, 478(1), 410-416.

Low, J. G., Sung, C., Wijaya, L., Wei, Y., Rathore, A. P. S., Watanabe, S., Vasudevan, S. G. (2014). Efficacy and safety of celgosivir in patients with dengue fever (CELADEN): a phase 1b, randomised, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept trial. Lancet Infect Dis, 14(8), 706-715.

Martina, B. E., Koraka, P., & Osterhaus, A. D. (2009). Dengue virus pathogenesis: an integrated view. Clin Microbiol Rev, 22(4), 564-581.

Michaelis, M., Kleinschmidt, M. C., Doerr, H. W., & Cinatl, J., Jr. (2007). Minocycline inhibits West Nile virus replication and apoptosis in human neuronal cells. J Antimicrob Chemother, 60(5), 981-986.

Mishra, M. K., Ghosh, D., Duseja, R., & Basu, A. (2009). Antioxidant potential of Minocycline in Japanese Encephalitis Virus infection in murine neuroblastoma cells: correlation with membrane fluidity and cell death. Neurochem Int, 54(7), 464-470.

Morchang, A., Malakar, S., Poonudom, K., Noisakran, S., Yenchitsomanus, P. T., & Limjindaporn, T. (2021). Melatonin Inhibits Dengue Virus Infection via the Sirtuin 1-Mediated Interferon Pathway. Viruses, 13(4), 1-4.

Murray, N. E., Quam, M. B., & Wilder-Smith, A. (2013). Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. Clin Epidemiol, 5(1), 299-309.

Nguyen, N. M., Tran, C. N., Phung, L. K., Duong, K. T., Huynh Hle, A., Farrar, J., Simmons, C. P. (2013). A randomized, double-blind placebo controlled trial of balapiravir, a polymerase inhibitor, in adult dengue patients. J Infect Dis, 207(9), 1442-1450.

Palamara, A. T., Nencioni, L., Aquilano, K., De Chiara, G., Hernandez, L., Cozzolino, F., Garaci, E. (2005). Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol. J Infect Dis, 191(10), 1719-1729.

Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., Pirmohamed, M. (2019). Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. Nat Rev Drug Discov, 18(1), 41-58.

Rattanaburee, T., Junking, M., Panya, A., Sawasdee, N., Songprakhon, P., Suttitheptumrong, A., Yenchitsomanus, P. T. (2015). Inhibition of dengue virus production and cytokine /chemokine expression by ribavirin and compound A. Antiviral Res, 124, 83-92.

Sewell, K. L., Breedveld, F., Furrie, E., O'Brien, J., Brinckerhoff, C., Dynesius-Trentham, R., Trentham, D. E. (1996). The effect of minocycline in rat models of inflammatory arthritis: correlation of arthritis suppression with enhanced T cell calcium flux. Cell Immunol, 167(2), 195-204.

Shepard, D. S., Coudeville, L., Halasa, Y. A., Zambrano, B., & Dayan, G. H. (2011). Economic impact of dengue illness in the Americas. Am J Trop Med Hyg, 84(2), 200-207.

Simmons, C. P., Farrar, J. J., Nguyen v, V., & Wills, B. (2012). Dengue. N Engl J Med, 366(15), 1423-1432.

Sridhar, S., Luedtke, A., Langevin, E., Zhu, M., Bonaparte, M., Machabert, T., DiazGranados, C. A. (2018). Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. N Engl J Med, 379(4), 327-340.

Szeto, G. L., Brice, A. K., Yang, H. C., Barber, S. A., Siliciano, R. F., & Clements, J. E. (2010). Minocycline attenuates HIV infection and reactivation by suppressing cellular activation in human CD4+ T cells. J Infect Dis, 201(8), 1132-1140.

Tricou, V., Minh, N. N., Van, T. P., Lee, S. J., Farrar, J., Wills, B., Simmons, C. P. (2010). A randomized controlled trial of chloroquine for the treatment of dengue in Vietnamese adults. PLoS Negl Trop Dis, 4(8), e785.

Uno, N., & Ross, T. M. (2018). Dengue virus and the host innate immune response. Emerg Microbes Infect, 7(1), 167.

Whitehorn, J., Van Vinh Chau, N., Truong, N. T., Tai, L. T., Van Hao, N., Hien, T. T., Farrar, J. (2012). Lovastatin for adult patients with dengue: protocol for a randomised controlled trial. Trials, 13, 203.

Wichmann, O., Gascon, J., Schunk, M., Puente, S., Siikamaki, H., Gjorup, I., European Network on Surveillance of Imported Infectious, D. (2007). Severe dengue virus infection in travelers: risk factors and laboratory indicators. J Infect Dis, 195(8), 1089-1096.

Zainal, N., Chang, C. P., Cheng, Y. L., Wu, Y. W., Anderson, R., Wan, S. W., Lin, Y. S. (2017). Resveratrol treatment reveals a novel role for HMGB1 in regulation of the type 1 interferon response in dengue virus infection. Sci Rep, 7, 42998.