

ฤทธิ์ต้านไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพล็กซ์ของเพียนจื่อหวังในหลอดทดลอง

กษิต ชาญนฤตติ¹, มณฑุทธิ์ จันทรหอม¹, มะลิ วิโรจน์แสงทอง^{2*}

¹ นิสิตคณะเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ ๙ 10330

²Ph.D. in Microbiology; รองศาสตราจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

*ติดต่อผู้พิมพ์: มะลิ วิโรจน์แสงทอง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

อีเมล: mali.w@chula.ac.th

บทคัดย่อ

ฤทธิ์ต้านไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพล็กซ์ของเพียนจื่อหวังในหลอดทดลอง

กษิต ชาญนฤตติ¹, มณฑุทธิ์ จันทรหอม¹, มะลิ วิโรจน์แสงทอง^{2*}

ว. เภสัชศาสตร์อีสาน 2562; 15(1) : 195-203

รับบทความ : 22 มิถุนายน 2561

แก้ไขบทความ: 21 สิงหาคม 2561

ตอบรับ: 4 กันยายน 2561

เพียน จื่อ หวัง (PienTze Huang, PZH) เป็นยาแผนโบราณจีนที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย สำหรับรักษาโรคตับ โรคมะเร็ง และ บรรเทาอาการอักเสบ อย่างไรก็ตามความรู้เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านไวรัสมีน้อยมาก ยังไม่พบรายงานที่ PZH มีฤทธิ์ต้านโรคที่เกิดจากไวรัส เฮอร์ปีสซิมเพล็กซ์ (herpes simplex virus, HSV) การศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของ PZH ที่มีต่อ HSV ทัยป์หนึ่ง (type 1)(HSV-1) และ ทัยป์สอง (type 2)(HSV-2) ในหลอดทดลอง (*in vitro*) วิธีดำเนินการวิจัย: นำ PZH มาทดสอบกับ HSV-1 KOS strain และ HSV-2 Baylor 186 strain ใน Vero cell เปรียบเทียบกับ acyclovir (ACV) ด้วยวิธี modified plaque reduction assay ผลการวิจัย: พบว่า ค่า 50% inhibitory concentration (IC₅₀) ของ PZH ต่อ HSV-1 และ HSV-2 เท่ากับ 297.31 ± 16.72 และ 283.99 ± 28.93 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ค่า IC₅₀ ของ ACV เท่ากับ 0.21 ± 0.01 และ 0.63 ± 0.18 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ส่วนความเป็นพิษต่อเซลล์ โดย cytotoxicity test พบค่า 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) ของ PZH และ ACV เท่ากับ 1,414.21 และ 282.84 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ในการประเมินค่า therapeutic index (TI) ของ PZH ต่อ HSV-1 และ HSV-2 มีค่าเท่ากับ 4.75 และ 4.98 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับค่า TI ของ ACV ต่อ HSV-1 และ HSV-2 เท่ากับ 1,340.48 และ 451.82 ตามลำดับ สรุปผลการวิจัย: ผลการวิจัยนี้ พบว่า PZH มีฤทธิ์ต้าน HSV แต่มีค่า TI ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นการนำ PZH ไปใช้ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเริม จำเป็นต้องมีการวิจัยต่อไปเพื่อสนับสนุน เช่น งานวิจัยในสัตว์ทดลองและงานวิจัยทางคลินิก

คำสำคัญ: เพียน จื่อ หวัง, ฤทธิ์ต้านไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพล็กซ์, modified plaque reduction assay, IC₅₀, CC₅₀



In Vitro Anti-Herpes Simplex Virus Activities of PienTze Huang

Kasidit Charnnirutti¹, Monnaphruet Chanhom¹, Mali Wirotasangthong^{2*}

¹Pharmacy student, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Wangmai, Pathumwan, Bangkok 10330

²Ph.D. in Microbiology; Associated Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University,
Wangmai, Pathumwan, Bangkok 10330

*Corresponding Author: Mali Wirotasangthong, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University,
Wangmai, Pathumwan, Bangkok 10330

e-mail: mali.w@chula.ac.th

Abstract

In Vitro Anti-Herpes Simplex Virus Activities of PienTze Huang

Kasidit Charnnirutti¹, Monnaphruet Chanhom¹, Mali Wirotasangthong^{2*}

IJPS, 2019; 15(1) : 195-203

Received: 22 June 2018

Revised: 21 August 2018

Accepted: 4 September 2018

PienTze Huang (PZH), is a popular traditional Chinese medicine formula used for treat liver diseases, cancers and inflammation. Little is known about any antiviral activity of PZH. PZH with anti-herpes simplex virus (HSV) activity has not been reported yet. The aim of this study was to study *in vitro* effects of PZH on HSV type 1 (HSV-1) and HSV type 2 (HSV-2).

Method: Modified plaque reduction assay was used to demonstrate the effects of PZH on HSV-1, KOS strain and HSV-2, *Baylor* 186 strain, compared with those of acyclovir (ACV). **Results:** The 50% inhibition concentrations (IC₅₀) of PZH were 297.31 ± 16.72 and 283.99 ± 28.93 µg/ml for HSV-1 and HSV-2, respectively. Whereas the IC₅₀ of ACV were 0.21 ± 0.01 and 0.63 ± 0.18 µg/ml for HSV-1 and HSV-2, subsequently. Cytotoxicity test showed that the 50% cytotoxic concentrations (CC₅₀) of PZH and ACV were 1,414.21 and 282.24 µg/ml, respectively. Moreover, the therapeutic indexes (TI) of PZH were 4.75 and 4.98; and those of ACV were 1,340.48 and 451.82 for HSV-1 and HSV-2, subsequently. **Conclusion:** The results of this study showed that PZH possess anti-HSV activities but the TI were slightly low. Consequently, further studies such as *in vivo* studies and clinical trials are necessary to support the treatment of patient with HSV infection.

Keywords: Pien Tze Huang, anti-HSV activity, modified plaque reduction assay, IC₅₀, CC₅₀

บทนำ

เพียน จื่อ หวัง (PienTze Huang, PZH) เป็นยาแผนโบราณจีนที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในแถบเอเชีย รวมทั้งประเทศไทย พบว่ามีการใช้ PZH มานานมาก คือประมาณ 450 ปี โดยแพทย์หลวงในราชวงศ์หมิงของจีนเป็นผู้คิดค้น PZH ได้ถูกนำมาใช้รักษาหลายโรค เช่น โรคตับ โรคมะเร็ง และบรรเทาอาการอักเสบ (Lee *et al.*, 2002)

Lee และคณะ (2002) พบว่า PZH สามารถป้องกันตับจากการทำลายด้วยสาร carbon tetrachloride (CCl₄) ในหนู mouse และเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด hepatoma, He และคณะ (2014) ได้แสดงให้เห็นว่า PZH สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด human ovarian cancer ได้ Lü และคณะ (2009) รายงานฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิด



neuroblastoma ของ PZH นอกจากนี้ Zang และคณะ (2010) ยังพบว่า PZH มีฤทธิ์ในการป้องกันสมองจาก cerebral chronic ischemia และ hypertensive stroke ในหนู rat โดยฤทธิ์ดังกล่าว ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการบวม อาการอักเสบ และการอุดตันของหลอดเลือด

อย่างไรก็ดี ความรู้เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านไวรัสนั้นมีน้อยมาก ยังไม่พบรายงานที่ PZH มีฤทธิ์ต้านโรคที่เกิดจากไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ (herpes simplex virus, HSV) การศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของ PZH ที่มีต่อ HSV ทั่วยปีหนึ่ง (type 1)(HSV-1) และ ทั่วยปีสอง (type 2)(HSV-2) ในหลอดทดลอง (in vitro)

โรคเริมเป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจาก herpes simplex virus (HSV) ซึ่งเป็น DNA virus อยู่ในวงศ์ *Herpesviridae*, subfamily *Alpha-herpesvirinae* (ซึ่งเป็น subfamily เดียวกับ varicella-zoster virus). HSV แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ HSV type 1 (HSV-1) มักก่อโรคติดเชื้อบริเวณปากและใบหน้า (orofacial) โดยติดต่อผ่านทางสารสัมผัส HSV-1 เป็นสาเหตุสำคัญของโรคสมองอักเสบในผู้ใหญ่ ส่วน HSV type 2 (HSV-2) มักก่อโรคติดเชื้อบริเวณอวัยวะเพศ โดยติดต่อผ่านทางเพศสัมพันธ์ ยิ่งไปกว่านั้น HSV-2 ยังสามารถก่อโรคติดเชื้อทางผิวหนังและเยื่อเมือกทั่วร่างกาย รวมทั้งสมองอักเสบในทารกแรกเกิดได้ทางแม่สู่ลูก (Ayoade and Todd, 2017)

ยารักษาโรคเริม ในปัจจุบันมีหลายชนิด เช่น acyclovir (ACV), famciclovir, idoxuridine เป็นต้น ซึ่ง ACV เป็นยาหลักในการรักษาโรคเริม กลไกการออกฤทธิ์ของยา ACV จะยับยั้งการสร้าง DNA ของไวรัส โดยกระบวนการ competitive inhibition กับ DNA polymerase ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์ DNA ของไวรัส (Superti et al., 2008) ข้อจำกัดของ ACV คือการใช้วันละหลายครั้ง ผลข้างเคียงของยาที่พบได้บ่อยคือ อ่อนเพลีย (11.5%) คลื่นไส้อาเจียน (2.7-3.2%) และอาการแพ้ยาที่อาจพบได้ นอกจากนี้การใช้ ACV ในระยะยาว อาจก่อให้เกิดภาวะเชื้อดื้อยาได้ ทำให้ยาไม่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรค (Bacon et al., 2003)

จากปัญหาของการใช้ยาข้างต้น ทำให้การศึกษเกี่ยวกับสมุนไพรธรรมชาติก็เป็นอีกหนทางหนึ่งที่มนุษย์พยายามหาเพื่อมาใช้ร่วม หรือทดแทน สมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรคเริมนั้นมีหลายชนิด เช่น เสดดพังพอนตัวเมีย หรือ พญา ยอ [*Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau] เสดดพังพอนตัวผู้หรือเสดดพังพอน (*Barleria lupulina* Lindl.)

(Yoosook et al., 1999) และบัวบก (*Centella asiatica* Linn.) (Yoosook et al., 2000) เป็นต้น จากข้อมูลพบว่า PZH เป็นหนึ่งในตำรับสมุนไพรจีน ที่มีสรรพคุณมากมาย ทั้งที่มีงานวิจัยรองรับและยังไม่มีงานวิจัยรองรับ เช่น ลดอาการอักเสบ รักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และบำรุงตับ พบว่ายังไม่มีงานวิจัยที่เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านไวรัสของ PZH แต่หากพิจารณาถึงองค์ประกอบของ PZH พบว่า PZH ประกอบด้วยสมุนไพรหลัก 4 ชนิด ได้แก่ 1) โสมคน (*Panax pseudoginseng* Wall) 2) โคโรค (*Bostaurus domesticus* Gmelin) 3) ชะมดเชียง (*Moschus moschiferus* Linnaeus) 4) ดีงู (*Ophiophagus hannah*) งานวิจัยของ Pei และคณะ (2011) พบว่า โสมคนมีสารสำคัญคือ notoginsenoside ST-4 ซึ่งค้นพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ HSV-1, HSV-2 ได้ เมื่อพิจารณาส่วนประกอบอื่น ๆ ของตำรับแล้ว หรือยา PZH เอง ยังไม่มีงานวิจัยใดสนับสนุนฤทธิ์ในการต้านเชื้อ HSV ทั้งหมดนี้จึงเป็นแนวคิดสำคัญในการศึกษาผลของ PZH ต่อ HSV-1 และ HSV-2 ในหลอดทดลอง (in vitro)

วิธีดำเนินการวิจัย

ยาและสารเคมี

เพียน จื่อ หวัง [PienTze Huang (PZH)(เวชพงศ์ โอสด)], acyclovir (ACV, Viler™)(Siam) tablet 200 mg, polyvinyl pyrrolidone (PVP) K30™(Fluka), growth medium (GM)[minimum essential medium (MEM)(Gibco), 10% fetal bovine serum (FBS)(Biowest), 1% antibiotic-antimycotic 100x (penicillin 10,000 units/ml, streptomycin 10,000 µg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)(Gibco)], trypsin-EDTA 100x (Gibco).

เซลล์เพาะเลี้ยงและไวรัส

African monkey kidney cell line (Vero), herpes simplex virus type 1 (HSV-1)(KOS strain), herpes simplex virus type 2 (HSV-2)(Baylor 186 strain) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ภญ.ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์

วัสดุและเครื่องมือ

24-wells tissue culture plate, 96-wells tissue culture plate, 25 cm²tissue culture flask (Nunc, Germany), เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany), Biosafety cabinet class II (Microflow™, Science Tech), inverted microscope (Olympus), เครื่อง centrifuge (Safeguard centrifuge, Clay-Adams)

การเตรียมสารสกัดเพน จีโอ หวัง (PZH) และ acyclovir (ACV)

เตรียมสารเพน จีโอ หวัง โดยบดยาเม็ดเพน จีโอ หวัง ให้ละเอียดแล้วผสมผงยากับ PVP ในอัตราส่วน 1:4 แล้วละลายด้วย PBS ให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/ml เป็น stock solution และยา ACV เตรียมโดยบดยาเม็ด Vilerem™ ให้ละเอียดแล้วละลายด้วย PBS ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml เป็น stock solution

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test) ของสารเพน จีโอ หวัง

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ เพน จีโอ หวัง ใช้วิธี serial dilution end point โดยสังเกต cytopathic effect (CPE) ของ Vero cells ที่บ่มกับสารเพน จีโอ หวัง หาค่า 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) ด้วยวิธีของ Reed และ Muench (Reed and Muench, 1938) โดยเลี้ยง Vero cells ใน GM บน tissue culture flask (25 cm²) จนได้ confluence cells จากนั้นทำการย่อยเซลล์ด้วยสารละลาย trypsin-EDTA 1x ใน PBS, เจือจางด้วย GM ให้ได้ 2.4 X 10⁶ cells/ml เพาะลงใน 96-well tissue culture plate ปริมาณ 100 µl/well นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 °C และมี 5% CO₂ นาน 1 วัน ทำการเจือจาง stock solution ของเพน จีโอ หวังด้วย GM เป็น 2-fold dilution ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 4,000; 2,000; 1,000; 500; 250 และ 125 µg/ml และทำการเจือจาง stock solution ของ ACV ให้ได้ความเข้มข้น 400, 200, 100, 50, 25 และ 12.5 µg/ml ทำการดูด GM ออกจาก 96-well plate เติมน้ำทดสอบปริมาณ 100 µl/well โดยแต่ละความเข้มข้นทำ 4 ซ้ำ (n = 4) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37°C และมี 5% CO₂ นาน 2 วัน สังเกต CPE ใน inverted microscope คำนวณหาค่า CC₅₀

การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสด้วยวิธี Modified plaque reduction assay

เตรียม Vero cells ใน GM ให้มีความเข้มข้น 2.4 X 10⁵ cells/ml เติมน้ำใน 24-well tissue culture plate, 500 µl/well กระจายเซลล์ให้ทั่ว นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37°C และมี 5% CO₂ นาน 18 – 20 ชั่วโมง จากนั้นนำ plate มาสังเกตดูใน inverted microscope เซลล์ต้องเป็น monolayer จากนั้นนำสารละลาย PZH ที่เตรียมไว้เป็น stock solution มาเจือจางใน GM ให้มีความเข้มข้นต่างๆ เป็น 1000, 500, 250, 125 และ 62.5 µg/ml เป็น PZH ชุดที่ 1 จากนั้นทำการเจือจางไวรัส HSV-1 หรือ HSV-2 ให้ได้ปริมาณที่เหมาะสม ใน GM (HSV-1 ควร

เป็น 50 - 100 plaque forming unit (PFU) ต่อ 1 well ของ 24-well tissue culture plate; HSV-2 ควรเป็น 30 - 80 PFU ต่อ 1 well ของ 24-well tissue culture plate) นำมาผสมกับ PZH ชุดที่ 1 ทุกความเข้มข้น ในสัดส่วน 1:1 (0.5 ml กับ 0.5 ml) กระจายให้สม่ำเสมอ นำสารผสมไปบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37°C และมี 5% CO₂ นาน 1 ชั่วโมง โดยมีกลุ่มควบคุมไวรัส (มีเฉพาะไวรัส และ GM ที่มี % solvent เท่ากับในตัวอย่างทดสอบ) หลังจากนั้นนำ 24-well tissue culture plate ที่เซลล์มีลักษณะ monolayer มาดูด GM ออก เติมน้ำผสมที่บ่มแล้ว (250 µl/well) โดยแต่ละความเข้มข้นรวมทั้งที่เป็นไวรัสควบคุม ทำ 4 ซ้ำ (n = 4) หมุน plate ให้สารกระจายสม่ำเสมอ นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37°C และมี 5% CO₂ นาน 1 ชั่วโมง ระหว่างนั้นเตรียม PZH ชุดที่ 2 ทุกความเข้มข้นเดิม ใน 2x MEM + 10% FBS แล้วนำมาผสมกับสารละลาย 4% methyl cellulose แบบ 1:1 ได้เป็น overlay medium นำไปเติมน้ำใน 24-well tissue culture plate (250 µl/well) ที่บ่มไว้แล้ว หมุน plate ให้ overlay medium กระจายเข้ากับสารใน well เสมอ นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37°C และมี 5% CO₂ นาน 2 วัน (หลุมที่เป็นไวรัสควบคุมไม่มี PZH) นำ culture plate มา fix ด้วย fixing solution (12.5% formalin ใน normal saline) โดยเติม fixing solution 250 ml/well (5 drops/well) หมุน plate ให้กระจายเข้ากับสารใน well เสมอ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนานมากกว่า 3 ชั่วโมง หรือข้ามคืน จากนั้นเทสารใน culture plate ทิ้ง แล้วล้างทุก well ด้วยน้ำประปา นำ culture plate มาย้อมด้วย 1% methyl blue solution ที่มี 10% methanol บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นเทสีย้อมใน plate ทิ้ง แล้วล้างทุก well ด้วยน้ำประปา นำ plate มาตรวจนับจำนวน PFU/well โดยสังเกตด้วยกล้อง inverted microscope ใน well ที่มี PZH เทียบกับหลุมที่ไม่มี PZH (virus control) คำนวณหาค่าปริมาณ virus control, virus ใน well ที่มี PZH ความเข้มข้นต่างๆ เป็น PFU/ml คำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้จำนวน plaque ตั้งต้น (virus control) ลดลง 50% (50% inhibitory concentration, IC₅₀)

ทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยน PZH เป็น ACV โดยใช้ความเข้มข้น 2.5, 1.25, 0.62, 0.31 และ 0.16 µg/ml

ทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยน HSV-1 เป็น HSV-2 และความเข้มข้นของ ACV เป็น 5.0, 2.5, 1.25, 0.62 และ 0.31 µg/ml



การหาค่า Therapeutic Index (TI)

TI ของยา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ มีค่าเท่ากับ อัตราส่วนของค่า 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) ต่อค่า 50% inhibitory concentration (IC₅₀) ตามสูตร

$$\text{Therapeutic index (TI)} = \frac{\text{CC}_{50}}{\text{IC}_{50}}$$

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลองใช้สถิติ Oneway-ANOVA (p < 0.05)

ผลการวิจัย

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของเพียน จื่อ หวัง ในความเข้มข้น 125-4,000 µg/ml โดยสังเกต CPE ของ Vero cells ผลการทดลอง คำนวณค่า CC₅₀ ได้เท่ากับ 1414.214 µg/ml (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าเพียน จื่อ หวัง มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำมาก จึงน่าจะมีความปลอดภัยที่จะนำมาใช้รักษา

จากการทดลองหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของ ACV ในความเข้มข้น 12.5-400 µg/ml ต่อ Vero cells ได้ผลการ

ทดลอง คำนวณค่า CC₅₀ ได้เท่ากับ 282.842 µg/ml (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบกับเพียน จื่อ หวัง แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษต่อ Vero cell ของ ACV มีมากกว่าประมาณ 5 เท่า

การทดสอบฤทธิ์ต้าน HSV-1 และ HSV-2 ด้วยวิธี modified plaque reduction assay ของ เพียน จื่อ หวัง (PZH) และ ACV แสดงเป็นค่า IC₅₀ ในตารางที่ 1 พบว่าค่า IC₅₀ เฉลี่ยของ ACV ต่อ HSV-1 และ HSV-2 เท่ากับ 0.211 และ 0.626 µg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ค่า IC₅₀ เฉลี่ยของ เพียน จื่อ หวัง ต่อ HSV-1 และ HSV-2 เท่ากับ 297.31 และ 284 µg/ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบพบว่าค่า IC₅₀ ของ ACV ต่ำกว่า ค่า IC₅₀ ของ เพียน จื่อ หวัง มาก ซึ่งให้เห็นว่า ACV มีฤทธิ์ต้าน HSV ดีกว่า เพียน จื่อ หวัง มาก นอกจากนี้ยังพบว่าค่า IC₅₀ ของ ACV ต่อ HSV-1 และ HSV-2 มีความต่างกันประมาณ 3 เท่า ในขณะที่ค่า IC₅₀ ของ PZH ต่อ HSV-1 และ HSV-2 มีความใกล้เคียงกัน

จากการหาค่า therapeutic index (TI) พบว่า TI ของ PZH ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ HSV-1 และ HSV-2 มีค่าเท่ากับ 4.76 และ 4.98 ตามลำดับ ในขณะที่ค่า TI ของ ACV ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ HSV-1 และ HSV-2 เท่ากับ 1,340.48 และ 451.82 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่า 50% cytotoxic concentration (CC₅₀), ค่า 50% inhibitory concentration (IC₅₀) และค่า therapeutic index (TI) ของ Pien Tze Huang (PZH) และ acyclovir (ACV) ต่อ herpes simplex virus type 1 (HSV-1)(KOS strain), herpes simplex virus type 2 (HSV-2)(Baylor 186 strain) ใน African monkey kidney cells (Vero cells) ด้วยวิธี serial dilution end point (CC₅₀) และวิธี modified plaque reduction assay (IC₅₀)(n = 4, p < 0.05)

Drugs	Virus					
	HSV-1			HSV-2		
	IC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	TI	IC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	TI
PZH	297.31	1414.21	4.75	283.99	1414.21	4.98
ACV	0.21	282.84	1,340.48	0.626	282.84	451.82

อภิปรายผลการทดลอง

Plaque reduction assay (PRA) เป็นการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านไวรัสของสารตัวอย่าง โดยดูจากความสามารถในการลดจำนวน plaques ที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนของไวรัส พบว่า ยาสมนไพร Pien Tze Huang (PZH) สามารถยับยั้งการเจริญ

ของ herpes simplex virus type 1 (HSV-1) และ HSV-2 (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า IC₅₀ ของ ACV ต่อ HSV-1 และ HSV-2 ที่ได้จากการทดลองเดียวกัน ทั้งนี้ PZH เป็นยาสมุนไพรที่ประกอบด้วยสารสกัดหลายชนิด ได้แก่ 1) โสมคน

2) โคโรค 3) ชะมดเชียง 4) ติงู มีมวลโมเลกุลใหญ่ การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสด้วยวิธี modified PRA จะเหมาะสมกว่าเพราะเชื้อให้สารสกัดหยาบได้สัมผัสกับ extracellular viruses และสารสกัดหยาบจะแพร่ไปสู่ไวรัสในเซลล์ได้น้อย ส่วน ACV เป็นสารบริสุทธิ์ที่เป็น active ingredient ที่ได้จากการสังเคราะห์ จึงมีมวลโมเลกุลเล็ก สามารถแพร่ไปสู่ไวรัสในเซลล์ได้ดีกว่าและมีฤทธิ์ต้านไวรัสที่เฉพาะ คือยับยั้งการสร้าง DNA ของไวรัสโดย competitive inhibition กับ viral DNA polymerase ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์ DNA ของไวรัส อย่างไรก็ตาม การเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของ PZH และ ACV อาจจะไม่ยุติธรรมเนื่องจากมี active ingredient ไม่เท่ากัน นอกจากนี้ยังพบว่าค่า IC_{50} ของ ACV ต่อ HSV-1 และ HSV-2 มีความต่างกันประมาณ 3 เท่า ทั้งนี้เนื่องจาก HSV-2 โดยทั่วไปมีความรุนแรงกว่า HSV-1 แสดงในรูป plaque size ที่ใหญ่กว่าและการก่อโรคทางคลินิก ในขณะที่ ค่า IC_{50} ของ PZH ต่อ HSV-1 และ HSV-2 มีความใกล้เคียงกัน อาจเพราะฤทธิ์ต้านไวรัสของ PZH มาจากฤทธิ์ cytotoxic ของ PZH

โสมคน หรือ โสมซานซี (จีนกลาง) (*Panax pseudoginseng* Wall., *Panax notoginseng* Burk.) อยู่ในวงศ์ Araliaceae สารพฤษของโสมจะช่วยในการเพิ่มการไหลเวียนของเลือด ลดอาการอักเสบ ลดอาการเจ็บปวด เสริมสร้างภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยมะเร็ง เป็นต้น มีรายงานพบว่ามีสารสำคัญคือ notoginsenoside ST-4 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ HSV-1, HSV-2 โดยวิธี PRA มี IC_{50} เท่ากับ 16.47, 19.44 μ M ตามลำดับ และโดยวิธี XTT มี CC_{50} ต่อ Vero cells เท่ากับ 510.64 μ M นอกจากนี้ยังพบกลไกการออกฤทธิ์ต้านไวรัสของ notoginsenoside ST-4 คือยับยั้งการเข้าเซลล์ (penetration) ของ HSV-1 (Pei *et al.*, 2011)

โคโรค หรือ นิ้วในถุงน้ำดีวัว (cow bezoar, ox-gallstone, *Calculus bovis*) ซึ่งมักจะเกิดกับวัวที่มีอายุมากกว่า 10 ปี เมื่อเป็นนิ้วในถุงน้ำดี วัวจะมีรูปร่างผอม กินอาหารได้น้อย ตีมน้ำมาก ไม่ค่อยมีแรง เรียกนิ้วในถุงน้ำดีของวัวว่า “โคโรค” ซึ่งเป็นสิ่งมีค่าและราคาแพงมาก (แพงกว่าตัววัว) และเนื่องจากโคโรคจากธรรมชาติมีน้อยและหาได้ยาก เพื่อทดแทนโคโรคจากธรรมชาติ นักวิทยาศาสตร์จึงได้นำเอาน้ำดีจากวัว แพะ และหมู มาทำเป็นโคโรคเทียม ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับโคโรคธรรมชาติแล้วสรรพคุณต่างกันมาก นักวิทยาศาสตร์จีนก็ได้ทำลองวิจัยทำโคโรคในตั้ววัวได้สำเร็จ โดยทำการใส่สารชนิดหนึ่งเข้าไปในถุงน้ำดีแล้วกระตุ้นให้น้ำดีหลั่งออกมาและจับบนผิวของสารที่

เข้าไบนั่น หลังจากนั้น 1 ปี จึงผ่าเอานิ้วออกมา สารที่พบ ได้แก่ bilirubin, cholesterol, cholic acid, fatty acid, lecithin, taurine, alanine, aspartic acid, arginine, glycine, methionine, leucine, vitamin D แคลเซียม ธาตุเหล็ก ธาตุทองเหลือง เป็นต้น สรรพคุณใช้เป็นยาบำรุงกำลัง ยาสงบระงับ แก้อาการตกใจง่าย ยาขับพิษร้อนถอนพิษไข้ ลดไข้สูง ไข้หมดสติ อาการเพ้อลมบ้าหมู ใช้ชักในเด็ก แก่ตับอักเสบ และอื่นๆ (Wannawiboon, 1987) นอกจากนี้แหล่งข้อมูลจากจีนระบุว่า bilirubin และ taurine ในโคโรค มีฤทธิ์ neuroprotective effect และโคโรคอยู่ในตำรับยาจีนบางชนิดเพื่อขับพิษ (Zhang *et al.*, 2011)

ชะมดเชียง (musk deer, *Moschus moschiferus* Linnaeus) อยู่ในวงศ์กวางชะมด Moschidae ชะมดเชียง คือไข่มุกในต่อมกลิ่นของชะมดตัวผู้ เป็นสารมีกลิ่นหอม ปัจจุบันตัวยานี้หาได้ยากและมีราคาแพง สรรพคุณเป็นยาปิดทวารทั้ง 7 เป็นส่วนผสมสำคัญในยาหอม ทำให้เลือดไหลเวียนดี ในประเทศจีนมีการใช้ชะมดเชียงตำแน่งเพื่อแก้โรคที่เรื้อรัง อักเสบ และลดอาการท้องอืด ชะมดเชียงถูกนำมาเป็นส่วนผสมในยาจีนแผนโบราณเพื่อใช้รักษาโรคกระเพาะอาหารและลำไส้ และมีการวิจัยสนับสนุนฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วยการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งนอกเซลล์โดยกลไก apoptosis (Xu and Cao, 2016) นอกจากนี้แหล่งข้อมูลจากจีนระบุว่า muscone ในชะมดเชียงมีฤทธิ์ neuroprotective effect และชะมดเชียงอยู่ในตำรับยาจีนบางชนิดเพื่อขับพิษ (Zhang *et al.*, 2011)

ติงู (snake's gall) ได้มาจากงู อาจพบอยู่ในรูปของติงูตากแห้ง หรือตองในเหล้า โดยในหลายๆ สูตรนั้นจะมีการนำติงูหลายสายพันธุ์มาผสมกัน เช่น ติงูเห่า ติงูจาง เป็นต้น ในประเทศจีนนิยมรับประทานติงูเพื่อบำรุงสายตาและแก้ปวดข้อ แม้ว่ามีความรู้เรื่ององค์ประกอบในติงูน้อยมากก็ยังมีชาวจีนนิยมรับประทานติงู แต่มีรายงานจากกลุ่มแพทย์ที่พบผู้ป่วยรายหนึ่งหลังรับประทานติงู 20 ชิ้น ภายใน 2 วัน มีอาการไม่พึงประสงค์รุนแรง คือเป็นตับอักเสบแบบเฉียบพลันในวันที่ 4 และต่อมาเกิดภาวะไตวายแบบช้า (Chao *et al.*, 2006)

ดังนั้นฤทธิ์ต้าน HSV ของ PZH น่าจะมาจากโสมคนที่มีสาร notoginsenoside ST-4 ส่วนค่า therapeutic index (TI) ของ PZH ก่อนข้างต่ำ (4.7 และ 4.9) แสดงว่าขนาดยาที่เป็นพิษต่อเซลล์และขนาดยาที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสมีค่าห่างกันเกือบ 5 เท่า โดยทั่วไป TI ยาที่ดีควรมีค่าประมาณ 10 ซึ่งค่า TI ของ ACV อยู่ในช่วงที่สูงมาก (451.82 และ 1,340.48) แสดงว่า ACV เป็นยาที่ปลอดภัย อย่างไรก็ตาม การที่ PZH มีค่า TI ต่ำแสดงถึงความ



เป็นพิษต่อเซลล์ด้วยซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการที่ PZH มีความสามารถในการเหนี่ยวนำเซลล์มะเร็งให้เกิด apoptosis โดยจากการศึกษาของ Zhang และคณะ (Zhang *et al.*, 2014) พบว่า PZH มีฤทธิ์เหนี่ยวนำ apoptosis ในเซลล์มะเร็ง osteosarcoma โดยพบว่าสัดส่วนการเกิด apoptosis มากถึง 53.86% เมื่อทดสอบด้วย PZH ที่ความเข้มข้น 1.6 mg/ml นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ cytotoxic ของ PZH ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่จากรายงานของ Wei และคณะ (Wei *et al.*, 2014) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ของ PZH โดยการให้สารละลาย PZH แก่ cancer stem cells (CSC) แล้วติดตามผลโดยการวัดขนาดของ side population (SP) ของ human colorectal cancer cell line HT-29 ผลที่ได้พบว่า SP มีขนาดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารละลาย PZH

นอกจากฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้าน HSV แล้ว PZH ยังมีฤทธิ์อื่นๆ อีก เช่น ฤทธิ์ปกป้องตับและลดการอักเสบของตับ Lee และคณะ ศึกษาฤทธิ์การปกป้องตับจากการถูกทำลายด้วย carbon tetrachloride (CCl_4) ในหนูทดลอง พบว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ alanine amino transferase (ALT) ระหว่างหนูที่ได้รับสาร CCl_4 และหนูที่ได้รับประทาน PZH ก่อนแล้วจึงให้ CCl_4 พบว่าปริมาณเอนไซม์ ALT ที่วัดได้เป็น 1079.8 และ 684.0 ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการป้องกันการทำลายเซลล์ตับได้อย่างมีนัยสำคัญ (Lee *et al.*, 2002)

Yoosook และคณะ (Yoosook *et al.*, 1999) ศึกษาผลยับยั้ง HSV-2, 6 สายพันธุ์จากสารสกัดเมทานอลจากใบและกิ่งของพญาขอ และสกัดผงพอน ด้วยวิธี PRA พบว่าสารสกัดจากสกัดผงพอนมีฤทธิ์ยับยั้ง HSV-2 ที่ดี (IC_{50} อยู่ระหว่าง 442.1 - 987.7 $\mu\text{g/ml}$) ส่วนสารสกัดจากพญาขอไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง ในขณะที่ Wirotasangthong และ Rattanakit (Wirotasangthong and Rattanakit, 2006) ศึกษาผลยับยั้ง HSV-2, สายพันธุ์ Baylor 186 จากสารสกัดใบของพญาขอและสกัดผงพอน ด้วยวิธี modified PRA พบว่าสารสกัดจากสกัดผงพอนมีฤทธิ์ยับยั้ง HSV-2 ดีกว่าพญาขอทุก fraction แต่สารสกัดสกัดผงพอนมีความเป็นพิษมากกว่าสารสกัดพญาขอ อย่างไรก็ดีเมื่อพิจารณา fraction ที่มีความเป็นพิษต่ำสุด คือ aqueous-ethyl acetate fraction, IC_{50} ของสารสกัดสกัดผงพอนอยู่ที่ 163.54 $\mu\text{g/ml}$ (CC_{50} = 707.95 $\mu\text{g/ml}$, TI = 4.33) และ aqueous-ethanol fraction, IC_{50} ของสารสกัดพญาขออยู่ที่ 202.72 $\mu\text{g/ml}$ (CC_{50} >

1,000 $\mu\text{g/ml}$, TI > 4.93) ฤทธิ์ยับยั้ง HSV-2 ของสารสกัดทั้งสองไม่ได้แตกต่างกันมาก แต่สารสกัดพญาขอมีความปลอดภัยมากกว่า IC_{50} ของสารสกัดสกัดผงพอนต่ำกว่าที่ Yoosook และคณะรายงานเนื่องจากวิธี modified PRA เอื้อให้สารสกัดมีฤทธิ์ดีกว่า เมื่อเทียบกับ IC_{50} ของสารสกัด PZH ต่อ HSV-2 (284.00 $\mu\text{g/ml}$) ในงานวิจัยนี้อาจจะดูเหมือนสารสกัด PZH มีฤทธิ์ยับยั้งต่ำกว่า แต่มีความต่างกันที่จำนวน plaque control งานวิจัยนี้เลี้ยงเซลล์ใน 24-well plate, virus control ประมาณ 100 plaque forming unit (PFU) ต่อหลุม ในขณะที่งานวิจัยของ Yoosook และคณะ (Yoosook *et al.*, 1999) และ Wirotasangthong และ Rattanakit (Wirotasangthong and Rattanakit, 2006) เลี้ยงเซลล์ใน 96-well plate, virus control ประมาณ 30 plaque forming unit (PFU) ต่อหลุม

การติดต่อยาต้านไวรัส ACV ของ HSV สามารถเกิดขึ้นได้เมื่อมีการใช้ยาในระยะยาว โดยการติดต่อยาของเชื้อไวรัสจะแบ่งเป็นสองแบบคือ การกลายพันธุ์ของยีนที่จะถอดรหัสต่อต่อไปเป็นเอนไซม์ thymidine kinase และการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งส่วนมากการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสมักเป็นการกลายพันธุ์ที่ยีนของเอนไซม์ thymidine kinase (95%) และที่เหลือจะเป็นการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ DNA polymerase ตามที่ได้มีการกล่าวไว้ในการศึกษาของ Shin และคณะ (Shin *et al.*, 2001) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Bacon และคณะ (Bacon *et al.*, 2003) พบว่าในช่วง 2 ทศวรรษที่ผ่านมา แม้จะมีการใช้ยา ACV อย่างกว้างขวาง แต่กลับพบอุบัติการณ์ของการติดต่อยาน้อยในคนทั่วไปโดยความถี่ในการติดต่อยา ACV ของ HSV เพียง 0.1 - 0.7% (ค่าเฉลี่ย 0.3%) แต่พบผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องมีความถี่ของการติดต่อยาอยู่ที่ 4- 7% ทั้งนี้เนื่องจากคนกลุ่มนี้มีอัตราการติดเชื้อ HSV ซ้ำบ่อยและต้องใช้ยา ACV บ่อยและนานกว่าจะหาย จึงมีโอกาสติดยาสูงกว่า ยาสมุนไพร PZH อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องจากโรคเริมและติดเชื้อ HSV เนื่องจาก PZH มีฤทธิ์ต้านมะเร็งหลายชนิดและฤทธิ์ต้าน HSV อย่างไรก็ดียังไม่สามารถสรุปได้จนกว่าจะมีการศึกษาต่อไปในสัตว์ทดลองและทางคลินิก

ผลการทดลองนี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ของ PZH ต่อ HSV-1 และ HSV-2 ใน Vero cells จึงอาจมีความแตกต่างกับผู้ป่วยตามปกติที่เชื้อไวรัสจะไปแฝงตัวในปมประสาท นอกจากนี้ PZH มีข้อจำกัดทางด้านราคาค่อนข้างสูง อาจทำให้ผู้ป่วยบางคนไม่สามารถเข้าถึงยาได้ จากผลการทดลองและงานวิจัยที่ได้

กล่าวทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่า PZH เป็นยาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ HSV-1 และ HSV-2 จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาต่อไปในสัตว์ทดลองและทางคลินิก เพื่อประโยชน์แก่ผู้ป่วยที่ป่วยด้วย PZH ให้มีประสิทธิภาพและคุ้มค่าในอนาคต

สรุปผลการทดลอง

ผลการวิจัยนี้ พบเป็นครั้งแรกว่า PZH มีฤทธิ์ต้าน HSV แต่มีค่า TI ค่อนข้างต่ำ การนำไปใช้ในผู้ป่วย จำเป็นต้องมีการวิจัยต่อไป เช่น งานวิจัยในสัตว์ทดลองและงานวิจัยทางคลินิก

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายวิจัยและฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการสนับสนุนในด้านงบประมาณ ขอขอบพระคุณ รศ.ภญ.อารีรัตน์ ลอภักษา สำหรับความอนุเคราะห์ตัวอย่างยาสมุนไพรเพียนจื่อหวัง และขอขอบพระคุณ รศ.ภญ.ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์ สำหรับความอนุเคราะห์เซลล์เพาะเลี้ยงและไวรัส มา ณ โอกาสนี้ด้วย

References

- Ayoade FO, Todd JR. Herpes smplex [Online]. 2017 Mar 09 [cited 2017 Jul 25]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/218580-overview>
- Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT and Sutton D. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1): 114-128.
- Chao TC, Wu ML, Tsai WJ, Ger J and Deng JF. Acute hepatic injury and renal failure after ingestion of snake gallbladder (case report). *Clin Toxicol* 2006; 44: 387-390.
- He F, Wu HN, Cai MY, *et al.* Inhibition of ovarian cancer cell proliferation by Pien Tze Huang via the AKT-mTOR pathway. *Oncol Lett* 2014; 7: 2047-2052.
- Lee KK, Kwong WH, Chau FT, Yew DT and Chan WY. Pien Tze Huang protects the liver against carbon tetrachloride-induced damage. *Pharmacol Toxicol* 2002; 91(4): 185-192.

- Lü L, Wai Maria SM, David T, Mak Yew & Ying T. Pien Tze Huang, a composite Chinese traditional herbal extract, affects survival of neuroblastoma cells. *Int J Neurosci* 2009; 119(2): 255-262.
- Pei Y, Du Q, Liao PY, *et al.* Notoginsenoside ST-4 inhibits virus penetration of herpes simplex virus in vitro. *J Asian Nat Prod Res* 2011; 13(6): 498-504.
- Reed LJ and Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27: 493-497.
- Shin YK, Cai GY, Weinberg A, Leary JJ and Levin MJ. Frequency of acyclovir-resistant herpes simplex virus in clinical specimens and laboratory isolates. *J Clin Microbiol* 2001; 39(3): 913-917.
- Superti F, Ammendolia MG and Marchetti M. New advances in anti-HSV chemotherapy. *Curr Med Chem* 2008; 15(9): 900-911.
- Wannawiboon, W. Cow-exalted animal. Thaihealthbook [online] 1987 May [cited 2018 May 29]. Available from: <http://www.doctor.or.th/article/detail/4172>
- Wei L, Chen P, Chen Y, *et al.* Pien Tze Huang suppresses the stem-likeside population in colorectal cancer cells. *Molec Med Rep* 2014; 9(1): 261-266.
- Wirotsangthong M and Rattanakit S. Anti-herpes simplex virus type 2 activities of some Thai medicinal plants. *Thai J Pharm Sci* 2006; 30(1-2):19-27.
- Xu L, Cao Y. Native musk and synthetic musk ketone strongly induced the growth repression and the apoptosis of cancer cells. *BMC Complement Altern Med* 2016; 16: 511. DOI 10.1186/s12906-016-1493-2
- Yoosook C, Bunyapraphatsara N, Boonyakiat Y and Kantasuk C. Anti-herpes simplex virus activities of crude water extracts of Thai medicinal plants. *Phytomed: Int J Phytother Phytopharmacol* 2000; 6(6): 411-419.



- Yoosook C, Panpisutchai Y, Chaichana S, Santisuk T and Reutrakul V. Evaluation of anti-HSV-2 activities of *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans*. *J Ethnopharmacol* 1999; 67: 179-187.
- Zhang L, Lam WP, Lü L, *et al.* Protective effects and potential mechanisms of Pien Tze Huang on cerebral chronic ischemia and hypertensive stroke. *Chinese Med* 2010; 5: 35-49.
- Zhang L, Lam WP, Lü L, *et al.* How would composite traditional Chinese medicine protect the brain - an example of the composite formula "Pien Tze Huang". *Curr Med Chem* 2011; 18: 3590-3594.
- Zhang Y, Wang Q, Niu S, Liu J and Zhang L. Pien Tze Huang induces apoptosis in multidrugresistant U2OS/ADM cells via downregulation of Bcl2, survivin and P-gp and upregulation of Bax. *Oncol Rep* 2014; 31(2): 763-70.