รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

กลไกการออกฤทธิ์ของ lupinifolin จาก *Albizia myriophylla* ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคฝันผุ *Streptococcus mutans*

Mechanism of lupinifolin from *Albizia myriophylla* Benth. against cariogenic *Streptococcus mutans*

คณะนักวิจัย

ดร. สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ คณะการแพทย์แผนไทย
ผศ.ดร. นันทิยา จ้อยชะรัด คณะการแพทย์แผนไทย
ผศ.ดร. ศศิธร ชูศรี คณะการแพทย์แผนไทย

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภททั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2556 รหัสโครงการ TTM560514S

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำนักวิจัยและพัฒนา ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ คณะการแพทย์แผนไทย ที่เอื้อเฟื้อความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณนางสาวกชกร มุสิกพงษ์ นักศึกษาปริญญาโท คณะการแพทย์แผนไทย

สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ

ชื่องานวิจัย กลไกการออกฤทธิ์ของ lupinifolin จาก *Albizia myriophylla* ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคฟันผุ *Streptococcus mutans*

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร.สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ
คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

โรคฟันผุเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขทั่วโลก โดยมีเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อโรค ในทางการแพทย์แผนไทยและแพทย์พื้นบ้านภาคใต้ใช้ชะเอมไทย (*Albizia myriophylla* Benth.) เป็นส่วนประกอบสำคัญในตำรับยารักษาโรคฟันผุ ซึ่งสารออกฤทธิ์สำคัญในชะเอมไทย คือ lupinifolin งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสาร lupinifolin ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคฟันผุ *S. mutans* จากการศึกษาด้วยวิธี broth microdilution เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (minimal inhibitory concentration: MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (minimal bactericidal concentration: MBC) ของสาร lupinifolin ต่อเชื้อ *S. mutans* ที่แยกได้จากผู้ป่วย 11 สายพันธุ์และสายพันธุ์อ้างอิง *S. mutans* ATCC 25175 พบว่า lupinifolin มีค่า MIC อยู่ในช่วง 2-4 μg/ml และค่า MBC อยู่ในช่วง 2-8 μg/ml การศึกษาฤทธิ์ฆ่าเชื้อด้วยวิธี time kill assay พบว่า lupinifolin ที่ความเข้มข้น 4MIC, 8MIC และ 16MIC สามารถฆ่าเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ได้ 90.0%, 90.0% และ 99.9% ภายในระยะเวลา 24, 20 และ 20 ชั่วโมง ตามลำดับ จากการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ lupinifolin ในการทำลายเซลล์ พบว่าที่ความเข้มข้น 4MIC, 8MIC และ 16MIC มีผลทำให้เกิดการรั่วไหลของไซโทพลาสซึมของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ออกมานอกเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง แต่ไม่พบการทำให้เซลล์แตกในระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM) พบว่ารูปร่างภายนอกของเซลล์แบคทีเรียที่ทดสอบด้วย lupinifolin มีความผิดปกติ ผิวเซลล์มีลักษณะไม่เรียบ มีรอยยุบตัวและบางเซลล์มีลักษณะยืดยาว และจากภาพถ่ายโครงสร้างภายในเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy: TEM) พบรอยเหี่ยวย่นและรอยฉีกขาดของผนังเซลล์ และพบการรั่วไหลของไซโทพลาสซึมออกมานอกเซลล์ จากการศึกษาตำแหน่งของ lupinifolin ภายในเซลล์ พบว่ามีการสะสมของสาร lupinifolin บริเวณไซโทพลาสซึมของเชื้อแบคทีเรีย จากการศึกษาการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มด้วยวิธี crystal violet assay พบว่า lupinifolin ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC มีผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ

S. mutans NPRC OR 007 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากภาพถ่ายโครงสร้างของไบโอฟิล์มด้วย SEM พบว่ามีการลดลงของชั้นไบโอฟิล์ม จากการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม ได้แก่ การศึกษาผลต่อคุณสมบัติ cell-surface hydrophobicity ด้วยวิธี microbial adhesion to hydrocarbon และการยับยั้งระบบ quorum sensing ด้วยวิธี agar disc diffusion พบว่า lupinifolin ที่ความเข้มข้น 1/2MIC ทำให้เชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 มี cell-surface hydrophobicity ในระดับ low hydrophobicity เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่อยู่ในระดับ moderate hydrophobicity และ lupinifolin ที่ความเข้มข้น 1/2MIC ไม่มีผลรบกวนระบบ quorum sensing ของเชื้อ *Chromobacterium violaceum* DMST 21761 และจากการศึกษาการยับยั้งความสามารถในการสร้างกรด พบว่า lupinifolin มีผลลดการสร้างกรดของเชื้อ *S. mutans* NPRC OR 001 โดยไม่มีผลต่อการมีชีวิตของเชื้อ

Project title Mechanism of lupinifolin from *Albizia myriophylla* Benth. against cariogenic *Streptococcus mutans*

Principal investigator Dr. Surasak Limsuwan
Faculty of Traditional Thai Medicine, Prince of Songkla University

Abstract

Dental caries is considered as one of major public health problem globally. *Streptococcus mutans* is among the most common cause of human dental caries. *Albizia myriophylla* is especially an important ingredient herb in Thai herbal formulas used as a remedy for dental caries by traditional healers in southern Thailand. Lupinifolin, an active component, is isolated from this plant. Therefore, the aim of this study was to determine the antibacterial mechanism of action of lupinifolin on cariogenic *S. mutans*. The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of lupinifolin against *S. mutans* ATCC 25175 and 11 clinical isolates were determined by broth microdilution method. Lupinifolin showed a strong activity against all tested *S. mutans* with MIC and MBC ranging from 2-4 and 2-8 µg/ml, respectively. Time kill assay was performed to determine how quickly the compound act on *S. mutans*. At the concentrations equivalence to 4MIC, 8MIC and 16MIC, lupinifolin displayed 90.0, 90.0 and 99.9% killing activity after 24, 20 and 20 h of treatment, respectively. The compound-treated cells demonstrated no lysis within 24 h of incubation. However, cytoplasmic leakage through the bacterial membrane was significantly observed after 2 h of treatment with the compound at 4MIC, 8MIC, and 16MIC. As revealed in the ultrastructural analysis of the treated cells by scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscopy (TEM), this compound showed dramatic changes on the bacterial cell wall and membrane. When the bacterial cells were exposed to the compound, cell elongation, collapsed bacterial cell walls, and cytoplasmic leakage cells were observed. The localization of lupinifolin in *S. mutans* was determined and the compound was observed in cytoplasmic fraction of lupinifolin-treated cells. The biofilm formation inhibition activity of lupinifolin against selected clinical isolate of *S. mutans* was determined by crystal violet assay and visualized by SEM. The biofilm formation by *S. mutans* NPRC OR 007 was statistically significant inhibited when treated with lupinifolin at

MIC, and the decreasing of biofilm production was observed by SEM. The effect of lupinifolin on factors influence biofilm formation including cell hydrophobicity property and quorum sensing system were studied by microbial adhesion to hydrocarbon and agar disc diffusion methods, respectively. The result demonstrated that lupinifolin at concentration equivalence to 1/2MIC could decrease cell-surface hydrophobicity of *S. mutans* ATCC 25175 from moderate to low hydrophobicity. However, the compound displayed no effect on quorum sensing system using *Chromobacterium violaceum* DMST 21761 as biomonitor strain. By glycolytic pH-drop assay, lopinifolin showed inhibitory effect on acid production by *S. mutans* NPRC OR 001, without affecting the cell viability.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(7)
รายการตาราง	(8)
รายการรูป	(9)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(11)
บทที่ 1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	30
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุและอุปกรณ์	31
วิธีการ	33
บทที่ 3 ผลการทดลอง	42
บทที่ 4 บทวิจารณ์	63
บทที่ 5 สรุปผล	71
เอกสารอ้างอิง	72
ภาคผนวก	96

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	Distribution of bacterial population in human oral cavity	4
2.	The possible antibacterial mechanisms and biological activities on bacterial virulence factors of selected medicinal plants	16
3.	Lupinifolin from several plants and biological studies	27
4.	The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of lupinifolin and chlorhexidine diacetate against *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and 11 clinical isolates.	43
5.	The biofilm forming ability of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and 11 clinical isolates.	53
6.	Effect of lupinifolin from *Albizia myriophylla* on cell-surface hydrophobicity of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 compared to the control (1% DMSO).	56
7.	Mean zone diameters around lupinifolin from *Albizia myriophylla*, catechin, chlorhexidine diacetate, and DMSO disc using *Chromobacterium violaceum* DMST 21761 biomonitor strain and agar disc diffusion method.	57
8.	The duration of acid production in a critical pH level (pH =5.5) of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and 11 clinical isolates.	59

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	Non-cavitated caries lesion	4
2.	Cavitated caries lesion	4
3.	Dental caries and related factors of caries	4
4.	The cycle of biofilm formation	9
5.	The structure of chlorhexidine	11
6.	The Lewis dot structure of fluoride	12
7.	The possible effect of plant compound on bacterial cell wall and membrane by cell lysis activity.	21
8.	The possible effect of plant compound on bacterial cell wall and membrane by inducing the leakage of intracellular materials through the cytoplasmic membrane without cell lysis activity.	21
9.	The structure of lupinifolin	26
10.	Time-kill determination of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 after treatment with lupinifolin from *Albizia myriophylla* at minimal inhibitory concentration.	44
11.	Bacteriolytic activity of lupinifolin from *Albizia myriophylla* against *Streptococcus mutans* ATCC 25175 at 16 × minimum inhibitory concentration.	45
12.	Measuring absorbance of the cell materials contents at 260 nm releasing from *Streptococcus mutans* ATCC 25175 after treatment with lupinifolin from *Albizia myriophylla* at supra-minimal inhibitory concentration.	46
13.	Measuring absorbance of the cell materials contents at 260 nm releasing from *Streptococcus mutans* ATCC 25175 after treatment with chlorhexidine diacetate at supra-minimal inhibitory concentration.	46

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
14.	Scanning electron micrographs of lupinifolin from *Albizia myriophylla* treated *Streptococcus mutans* ATCC 25175 cells for 12 h at 16 × minimum inhibitory concentration.	47
15.	Transmission electron micrographs of lupinifolin from *Albizia myriophylla* treated *Streptococcus mutans* ATCC 25175 cells at supra-minimum inhibitory concentrations.	49
16.	Localization of lupinifolin from *Albizia myriophylla* in *Streptococcus mutans* ATCC 25175 as determined by a Thin-layer chromatography (TLC) technique with 3 solvent systems.	51
17.	Effects of minimal inhibitory concentration (MIC) and sub-MICs (1/2-1/16MIC) of lupinifolin from *Albizia myriophylla* on bacterial growth and biofilm production by *Streptococcus mutans* NPRC OR 007 at 24 h.	54
18.	Scanning electron micrographs of biofilm produced by *Streptococcus mutans* NPRC OR 007 treated with lupinifolin from *Albizia myriophylla* for 24 h.	55
19.	Inhibition of violacein production by lupinifolin from *Albizia myriophylla*, catechin, chlorhexidine diacetate, and DMSO using *Chromobacterium violaceum* DMST 21761 biomonitor strain and agar disc diffusion method.	57
20.	The acid production of *Streptococcus mutans* NPRC OR 001 treated with lupinifolin from *Albizia myriophylla*.	60
21.	The growth of *Streptococcus mutans* NPRC OR 001 treated with lupinifolin from *Albizia myriophylla* at 0 h and 1 h.	62

ตัวย่อและสัญลักษณ์

ATCC	=	American Type Culture Collection
cfu	=	colony forming unit
DMST	=	Department of Medical Sciences Culture Collection
M	=	molar
mg	=	milligram
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
nm	=	nanometer
OD	=	optical density
µg	=	microgram
µl	=	microlitre
µM	=	micromolar