


ฤทธิ์ของกระชายดำในการลดการเกาะติดและบุกรุกเซลล์เยื่อHUep-2 ของเชื้อ*Helicobacter pylori*



นายสุเมธ อมรยิ่งเจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE EFFECTS OF *Kaempferia parviflora* ON ANTI-ADHERENCE AND ANTI-INTERNALIZATION  
ACTIVITY OF *Helicobacter pylori* TO HEP-2 CELLS



Mr. Sumet Amonyngcharoen

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University



สุเมธ อมรยิ่งเจริญ : ฤทธิ์ของกระชายดำในการลดการเกาะติดและบุกรุกเซลล์เยื่อ HEp-2 ของเชื้อ *Helicobacter pylori*. (THE EFFECTS OF *Kaempferia parviflora* ON ANTI-ADHERENCE AND ANTI-INTERNALIZATION ACTIVITY OF *Helicobacter pylori* TO HEp-2 CELLS) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. เอกรินทร์ สายฟ้า 109 หน้า.

ได้ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดในการยับยั้งการเจริญ(MIC) ของเชื้อ *H. pylori* กับ สมุนไพรไทยที่ใช้ในการรักษาโรคกระเพาะอาหาร 9 ชนิด คือ กระชายดำ, กระเทียม, กลัวย, ขมิ้นชัน, ตะไคร้, ใบบัวบก, ฟักทะเล, ฝรั่ง, ว่านหางจระเข้ และ ลำต้นโหระพา พบว่า ขมิ้นชัน และกระชายดำ มีค่า MIC เท่ากับ 32 และ 64 µg/ml ตามลำดับ ส่วนสมุนไพรชนิดอื่น ๆ มีค่า MIC > 512 µg/ml จากนั้นทำการสกัดสมุนไพร กระชายดำออกเป็น 4 ชนิด คือ น้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ, สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ, สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ และสารสกัดเมทานอลจากกระชายดำ ได้ปริมาณ(%yield)เท่ากับ 0.129%, 0.046, 0.721% และ 1.277% ตามลำดับ นำไปทดสอบหาค่า MIC พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ มีค่า MIC เท่ากับ 32 µg/ml, สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ และสารสกัดเมทานอลจากกระชายดำ มีค่า MIC เท่ากับ 64 µg/ml และน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ มีค่า MIC > 512 µg/ml นำสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำมาทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะติด และบุกรุกเซลล์เยื่อ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี Gentamicin internalization assay พบว่าความสามารถในการลดการบุกรุกเซลล์เยื่อ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ขึ้นกับเวลา, ความเข้มข้นของสารสกัด และสายพันธุ์ของเชื้อ *H. pylori* พบว่าที่เวลามาก และที่ความเข้มข้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำที่มากขึ้น สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ สามารถลดการบุกรุกเซลล์ได้มากขึ้น และสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำมีผลในการลดการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มียีน *cagA* ได้ดีกว่าสายพันธุ์ที่ไม่มียีน *cagA* ในการศึกษาผลต่อการแสดงออกของยีน *alpA* และ *babA* ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ ด้วยวิธี RT-PCR พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *alpA* และ *babA* ดังนั้น กระชายดำจึงเป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่สามารถใช้ในการรักษา และป้องกันการติดเชื้อ *H. pylori*

ภาควิชา เคมีคลินิก

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิติ..... สุเมธ อมรยิ่งเจริญ.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# # 4877214637 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEY WORD: *Helicobacter pylori* / adherence / internalization / *Kaempferia parviflora*

SUMET AMONTINGCHAROEN : THE EFFECTS OF *Kaempferia parviflora* ON ANTI-ADHERENCE AND ANTI-INTERNALIZATION ACTIVITY OF *Helicobacter pylori* TO HEP-2 CELLS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. NUNTAREE CHAICHANAWONGSAROJ, PhD.  
 THESIS COADVISOR : ASSOC.PROF. EKARIN SAIFAH, PhD., 109 pp.

As certain Thai medicinal herbs had been used to treat gastric diseases, their minimum inhibitory concentrations (MIC) against *Helicobacter pylori* were examined with 9 Thai herbs including *Kaempferia parviflora*, *Allium sativum*, *Musa sapientum*, *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Centella asiatica*, *Andrographis paniculata*, *Aloe vera* and *Ocimum basilicum*. *Curcuma longa* and *Kaempferia parviflora* had MIC of 32 µg/ml and 64 µg/ml, respectively. Other herbs had MIC > 512 µg/ml. *Kaempferia parviflora* was subsequently extracted in 4 parts composing of volatile oil, hexane extract, ethylacetate extract and methanol extract. They resulted in yield of 0.129%, 0.046%, 0.721% and 1.277%, respectively. Ethylacetate extract had a MIC of 32 µg/ml. Hexane and methanol extracts had similar MIC of 64 µg/ml. Volatile oil had a MIC > 512 µg/ml. The effect of *Kaempferia parviflora*'s ethylacetate extract on adhesion and internalization of *H. pylori* to HEP-2 cells by Gentamicin internalization assay was conducted. It was found that *Kaempferia parviflora*'s ethylacetate extract could decrease internalization of *H. pylori* to HEP-2 cells. The anti-internalization activity was dependent on time of incubation, concentration of extract and strains of *H. pylori*. The longer incubation time and higher concentration of *Kaempferia parviflora*'s ethylacetate extract were inversely proportional to the degree of internalization. Furthermore, *Kaempferia parviflora*'s ethylacetate extract could inhibit the invasion of HEP-2 cells by *H. pylori* strains harboring *cagA* gene more effectively than strains without *cagA* gene. We found no effect of *Kaempferia parviflora*'s ethylacetate extract on the expression of the two important genes involving in adhesion and invasion, *alpA* and *babA*. Thus, *Kaempferia parviflora* is one of the effective herbs for potential prevention and treatment of *H. pylori* infection.

Department Clinical Chemistry

Student's signature.....*Sumet Amontingcharoen*

Field of study Clinical Biochemistry

Advisor's signature.....*Nuntaree Chaichanawongsaroj*

And Molecular Medicine

Academic year 2007

Co-advisor's signature.....*Ekarin Saifah*

## กิตติกรรมประกาศ

ความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เกิดขึ้นจากบุคคลที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ มากมาย จึงขอขอบพระคุณบุคคลต่างๆ มา ณ โอกาสนี้ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษา และ รองศาสตราจารย์ ดร. เอกรินทร์ สายฟ้า อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำ เทคนิค ตลอดจนข้อคิดต่างๆ ในการทำงาน จึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณารับเป็นประธาน สอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ และ อาจารย์ ดร. รัชนีพร ตริยะวิสุทธิศรี ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพ.รัฐกร วิไลชนม์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *H. pylori* ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.พรเทพ เทียนสีวากุล ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เซลล์ HEP-2 ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.เอกวรรณ ลือพร้อมชัย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมีในการทำวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย(สกว.) , ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบางส่วนจากทุนคณะสหเวชศาสตร์

ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ และศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำวิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
รายการคำย่อ.....	ณ
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ลักษณะทั่วไปของเชื้อ <i>Helicobacter pylori</i> .....	4
พยาธิสภาพการก่อโรคของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	6
กลไกการเกิดพยาธิสภาพและความรุนแรงในการเกิดโรค.....	7
การเกาะติด(adherence) และการโคโลไนส์(colonization).....	12
ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการโคโลไนส์ การเกาะติด และการบุกรุกเซลล์ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ..	12
ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดและการบุกรุกเซลล์ ของเชื้อ <i>Helicobacter pylori</i> .....	14
การบุกรุกเซลล์(Intermalization) ของ <i>H. pylori</i> ในเซลล์เพาะเลี้ยง.....	16
ระบาดวิทยาของเชื้อ <i>Helicobacter pylori</i> .....	17
แหล่งที่มาของการติดเชื้อ (Source of infection).....	17
วิธีการแพร่เชื้อ(Route of transmission).....	19
อัตราการติดเชื้อ(Prevalence of infection).....	20
การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ.....	21
การรักษา.....	22
สมุนไพรรักษาการรักษาการติดเชื้อ <i>Helicobacter pylori</i> .....	22
กระชายดำ.....	24

บทที่	หน้า
3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	25
พืชสมุนไพร.....	26
การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร.....	26
สารสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายเมทานอล(Methanol).....	26
การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ.....	27
การสกัดกระชายดำด้วยตัวทำละลายเฮกเซน(Hexane).....	28
การสกัดกระชายดำด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต(Ethylacetate).....	28
การสกัดกระชายดำด้วยตัวทำละลายเมทานอล(Methanol).....	29
การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Helicobacter pylori</i> .....	29
การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	30
การตรวจหายีน <i>cagA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction,PCR).....	30
การวัดปริมาณเชื้อด้วยวิธีการวัดความขุ่น และการทำ plate count.....	31
การทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสมุนไพรไทยต่างๆที่สามารถ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>H.pylori</i> .....	32
การเพาะเลี้ยงเซลล์ HEp-2.....	33
การนับปริมาณเซลล์ HEp-2.....	34
การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ <i>H.pylori</i> .....	34
การเพาะเลี้ยงเซลล์ HEp-2 สำหรับการทดสอบความสามารถในการบุกรุก เซลล์ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	35
การทดสอบหาสารที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์ HEp-2 แตกในการทดสอบ ความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	35
การทดสอบหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการทดสอบความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	36
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรชนิดต่างๆต่อความสามารถ ในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	37



บทที่

หน้า

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*..... 38

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆต่อ ความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ..... 38

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ที่เวลาต่างๆ.....38

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆกันต่อความสามารถ ในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*..... 39

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ต่างๆ..... 39

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อความสามารถในการเกาะติดเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ต่างๆ..... 39

การวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี RT PCR .....40

การสกัดอาร์เอ็นเอจากเชื้อ *Helicobacter pylori*..... 40

การวัดค่า OD (Optical Density) เพื่อหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้.....40

การกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนออกจากอาร์เอ็นเอ..... 41

การตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ(DNA) จากอาร์เอ็นเอ(RNA) ที่สกัดได้.....41

การเตรียมซีดีเอ็นเอ(cDNA)..... 42

การทำ RT-PCR ของยีน *alpA* และ *babA*..... 42

การวิเคราะห์ข้อมูล..... 43

4 ผลการทดลอง.....44

การทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสมุนไพรไทยต่างๆที่สามารถยับยั้ง การเจริญของเชื้อ *H. pylori* ..... 44

การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*..... 44

การทดสอบหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการทดสอบความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ..... 46

การทดสอบหาสารที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์ HEp-2 แตกในการทดสอบ ความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	46
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรชนิดต่างๆต่อความสามารถ ในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	49
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรที่เวลาต่างๆต่อความสามารถ ในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	52
การเตรียมสารสกัดจากกระชายดำ.....	58
การทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดจากกระชายดำชนิดต่างๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	58
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	59
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำชนิดต่างๆต่อความสามารถในการ เกาะติดเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	62
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่เวลาต่างๆกัน.....	64
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆกันต่อความสามารถ ในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	66
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อความสามารถใน การบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ต่างๆ.....	68
การตรวจหายีน <i>cagA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	68
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีและไม่มียีน <i>cagA</i> .....	71
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อความสามารถในการเกาะติดเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีและไม่มียีน <i>cagA</i> .....	75
การวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยวิธี RT PCR .....	77
5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....	82

บทที่	หน้า
รายการอ้างอิง.....	90
ภาคผนวก.....	105
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	109



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

๘

ตาราง		หน้า
3.1	ความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรชนิดต่างๆ.....	26
3.2	ความเข้มข้นของสมุนไพรชนิดต่างๆที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	32
3.3	แสดงรายละเอียด Primer.....	43
4.1	ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสมุนไพรต่างๆที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>H.pylori</i> .....	45
4.2	% internalization จากการทดลองการบุกรุกเซลล์โดยใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ต่าง ๆ กัน.....	47
4.3	ปริมาณเชื้อ <i>H. pylori</i> จากการทดสอบหาสารที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์ HEP-2 แตก.....	48
4.4	% internalization จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรชนิดต่างๆต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่เวลาบ่ม 3 ชั่วโมง.....	50
4.5	ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดจากกระชายดำชนิดต่างๆที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	60
4.6	ฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆต่อเปอร์เซ็นต์การบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	61
4.7	% internalization จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตตของกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่เวลาบ่ม 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง.....	65
4.8	% internalization ของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	67
4.9	% internalization ของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำต่อการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ต่างๆกัน ที่เวลาบ่ม 6 ชั่วโมง และความเข้มข้น 64 µg/ml.....	73
4.10	% internalization ของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำต่อการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ต่างๆกัน.....	74
4.11	% adhesion ของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำต่อการเกาะติดเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ต่างๆกัน.....	76

## สารบัญตาราง

ฐ  
หน้า

ตาราง

4.12	แสดงอัตราส่วนความเข้มของยีน <i>alaA</i> ต่อยีนมาตรฐาน ของการวัดระดับ การแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT PCR.....	80
4.13	แสดงอัตราส่วนความเข้มของยีน <i>babA</i> ต่อยีนมาตรฐาน ของการวัดระดับ การแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT PCR.....	80



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

	หน้า
2.1	เชื้อ <i>H. pylori</i> จากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....5
2.2	บริเวณที่พบเชื้อ <i>H. pylori</i> มากที่สุดในกระเพาะอาหาร.....6
2.3	บริเวณที่เชื้อ <i>H. pylori</i> จะก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ..... 7
2.4	แสดงการทำงานของยีน <i>cag</i> Pathogenicity Island.....9
2.5	แสดงลักษณะ EPIYA motif ของโปรตีน <i>cagA</i> ..... 10
2.6	แสดงกลไกการทำงานของโปรตีน <i>cagA</i> นับตั้งแต่ถูกนำพาเข้าไปในเซลล์ เยื่อบุกระเพาะอาหารจนถึงผลกระทบที่เกิดขึ้นตามมา..... 11
3.1	ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย.....27
3.2	Hemocytometer counting chamber..... 34
4.1	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % internalization กับสמןไพร 5 ชนิด คือ กระเทียม, กระชายดำ, กลัวย, ชิง และขมิ้น ที่เวลาบ่ม 3 ชั่วโมง.....51
4.2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % internalization กับสמןไพร 4 ชนิด คือ กระเทียม, กระชายดำ, กลัวย และขมิ้นชัน ที่เวลาบ่ม 6 ชั่วโมง..... 53
4.3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % internalization กับสמןไพร 4 ชนิด คือ กระเทียม, กระชายดำ, กลัวย และขมิ้นชัน ที่เวลาบ่ม 12 ชั่วโมง..... 55
4.4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % internalization กับสמןไพร 4 ชนิด คือ กระเทียม, กระชายดำ, กลัวย และขมิ้นชัน ที่เวลาบ่ม 24 ชั่วโมง..... 56
4.5	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % internalization กับสמןไพร 4 ชนิด คือ กระเทียม, กระชายดำ, กลัวย และขมิ้นชัน ที่เวลาบ่ม 3-24 ชั่วโมง.....57
4.6	ลักษณะเซลล์ HEp-2 ก่อนทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำต่อ ความสามารถในการเกาะติดเซลล์HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ..... 63
4.7	ลักษณะเซลล์ HEp-2 หลังจากการเติมน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำที่ ความเข้มข้น 1,024 µg/ml เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง ..... 62
4.8	แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 2 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน และสายพันธุ์ที่ได้จาก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์..... 69
4.9	แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 2 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่แยกได้จากคนไข้ 20 สายพันธุ์..... 70

4.10	แสดงอะกาโรสเจลิเล็กโตรโฟรีซิส 2 เปอร์เซ็นต์ของการทำ RT-PCR เชื้อ <i>H. pylori</i> บนยีน 16s ribosomal และยีน <i>alpA</i> ครั้งที่ 1 และ 2.....	78
4.11	แสดงอะกาโรสเจลิเล็กโตรโฟรีซิส 2 เปอร์เซ็นต์ของการทำ RT-PCR เชื้อ <i>H. pylori</i> บนยีน 16s ribosomal และยีน <i>babA</i> ครั้งที่ 1 และ 2.....	79



## คำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
%	percent
/	per
Abs.	Absorbance
bp	base pair
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
CFU	colony forming unit
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
FBS	Fetal Bovine Serum
HBSS	Hank' balanced salt solution
HEp-2	Human larynx carcinoma
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
μl	Microlitre
μM	Micromolar
ml	milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger Ribonucleic acid
OD	Optical Density
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
rpm	revolution per minute



**คำย่อ**

RT-PCR

UV

v/v

**ความหมาย**Reverse Transcription-Polymerase Chain  
Reaction

Ultraviolet light

volume by volume



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 1

### บทนำ

*Helicobacter pylori* เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบรูปร่างเกลียวเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกาศน้อย(microaerophilic) ทำให้เกิดการติดเชื้อบริเวณเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร (gastric ulcer) กระเพาะอาหารอักเสบ (gastritis) รวมไปถึงการก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่ลำไส้ส่วนต้น มีการศึกษาที่บ่งชี้ให้เห็นว่าการเป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบชนิดเรื้อรัง (chronic gastritis) มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งในกระเพาะอาหาร(1) ซึ่งมะเร็งกระเพาะอาหารเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับที่สองของการเสียชีวิตจากมะเร็งทั้งหมดทั่วโลก จึงนับเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญอย่างหนึ่งในปัจจุบัน ในประเทศไทยพบว่ามีมะเร็งกระเพาะอาหารเป็นสาเหตุอันดับที่ 6 ของมะเร็งในผู้ชาย และอันดับที่ 9 ของมะเร็งในผู้หญิง และมีความชุกประมาณ 3.9:100,000 คน และมีอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปีค่อนข้างต่ำ คือ 5-15%(2)

เชื้อ *H. pylori* สามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพทางคลินิกได้หลายรูปแบบ ปัจจัยทางความรุนแรงของโรคที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ Urease ซึ่งเปลี่ยน urea เป็น ammonia ซึ่งเป็นด่างจึงไปลดความเป็นกรดของกรดในกระเพาะอาหาร ทำให้เชื้อไม่ถูกทำลาย และการเคลื่อนที่ของเชื้ออาศัยการสร้างเอนไซม์ mucinase ทำให้เชื้อเคลื่อนที่ผ่านชั้นเมือกได้รวดเร็ว นอกจากนี้ยังมี virulence factor อื่นๆที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีน cytotoxin-associated antigen(CagA) ที่เชื้อสร้างขึ้นจะ translocate เข้าไปในเซลล์ซึ่งจะทำให้เกิดผลทางชีวภาพหลายอย่างต่อเซลล์ เช่น กระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดยเหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารหลั่ง IL-8 ผ่านทาง NF- $\kappa$ B IL-8 ที่หลั่งออกมาจะทำให้เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil เกิดการรวมตัวกัน และทำให้เซลล์เกิดอักเสบในที่สุด โปรตีน CagA ยังทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของ cytoskeleton ทำให้เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารมีรูปร่างเปลี่ยนไปและไม่สามารถทำงานได้(3, 4) นอกจากนี้เชื้อ *H. pylori* ยังสามารถสร้างสาร exotoxin ที่เกิดจากยีน *vacA* โดยสาร exotoxin นี้จะทำให้เยื่อบุกระเพาะอาหารสร้าง vacuole ก่อให้เกิดผลหลายอย่างตามมา ได้แก่ เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์, endosome/lysosome เสียการทำงาน และเกิดการ apoptosis ในที่สุด (5)

พยาธิสภาพของการเกิดโรคจะเริ่มขึ้นเมื่อเชื้อเข้าไปเกาะติด (adherence) บริเวณไมโครวิลไลของเซลล์เยื่อในกระเพาะอาหาร และมีการทำลายบริเวณดังกล่าว โดยการเกาะติดของเชื้อจะอาศัย outer membrane proteins(OMPs) ซึ่งยีนที่มีบทบาทเกี่ยวกับการเกาะติด ได้แก่ *babA*, *alpA* และ *alpB* จากการศึกษาพบว่า โปรตีน BabA หรือ blood group antigen-binding adhesin มีความสำคัญในการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* โดยจะจับกับ Lewis b antigen ของ

เซลล์กระเพาะอาหาร(5) ในการศึกษาเชื้อ *H. pylori* จะทำการศึกษาใน AGS cells (Human gastric adenocarcinoma epithelial cell line) แต่จากการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ชนิดต่างๆพบว่าเซลล์ HEP-2 (human larynx carcinoma) สามารถจับกับตัวเชื้อ *H. pylori* ได้มากกว่าเซลล์ชนิดอื่นๆ(6) ทำให้การศึกษากาการเกาะติดและการบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* นิยมใช้เซลล์ HEP-2 เป็นเซลล์แม่แบบในการศึกษา

การรักษาโรคกระเพาะอาหารอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ *H. pylori* ที่ทำกันอยู่ในปัจจุบัน จะใช้ยาลดกรดร่วมกับยาปฏิชีวนะ ซึ่งมีราคาแพง และบางครั้งพบว่าเชื้อมีการดื้อยา การใช้สมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหาได้ ทำให้มีการศึกษาสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อ *H. pylori* อาทิเช่น การศึกษาพืชที่ใช้ในการปรุงอาหารของประเทศอังกฤษกับการยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori*(7) การศึกษาสารสกัดจากผลแอฟริคอตของประเทศญี่ปุ่นในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* และ การศึกษาสารสกัดของ cranberry ในการยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* (8) เป็นต้น ผลจากการศึกษาเหล่านี้ทำให้เห็นว่ามีสารสนใจที่จะศึกษาสมุนไพรหรือพืชที่ใช้ในชีวิตประจำวันในการช่วยรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* มากขึ้น ในประเทศไทยมีการศึกษาสมุนไพรไทยกับเชื้อ *H. pylori* เช่น การศึกษาเครื่องเทศและพืชที่ใช้เป็นอาหารของคนไทย พบว่าดอกจันทน์เทศ ใบต้นจิก เปราะหอม และ กานพลู สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ (9) ทำให้เป็นที่น่าสนใจศึกษาว่าพืชสมุนไพรไทยใดที่สามารถยับยั้งการเจริญ ยับยั้งการเกาะติด และยับยั้งการบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ได้ กระจายด้าเป็นสมุนไพรไทยชนิดใหม่อีกชนิดหนึ่งที่มีการศึกษากันมากขึ้น จากการศึกษพบว่ากระจายด้ามีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของกระเพาะอาหารในสัตว์ทดลอง หากได้รับกระจายด้าในปริมาณ 60-120 mg/kg สามารถรักษาอาการกระเพาะอาหารอักเสบได้(10) และ จากการศึกษาคคุณสมบัติในการต้านจุลชีพของกระจายด้าพบว่า สารสกัดจากกระจายด้าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* ได้(11) การศึกษาความเป็นพิษของผงกระจายด้าในสัตว์ทดลอง พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆที่บ่งชี้ว่าเกิดพิษจากกระจายด้า(12) จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่า กระจายด้าจะมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *H. pylori* ได้หรือไม่ และขั้นตอนแรกที่สำคัญในการเกิดพยาธิสภาพ คือ ขั้นตอนที่เชื้อเกาะและบุกรุกเข้าสู่เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร กระจายด้าจะมีผลต่อการเกาะติดและบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* หรือไม่ ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้ทำให้เข้าใจกลไกของกระจายด้าต่อการเกาะติดและการบุกรุกของเชื้อ *H. pylori* มีประโยชน์ในการนำกระจายด้าไปใช้ในการช่วยรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *H. pylori* และลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารได้

### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสามารถของสารสกัดจากกระชายดำในการยับยั้งการเกาะติด และการบุกรุกเซลล์เยื่อ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori*
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากกระชายดำต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดและการบุกรุกเซลล์เยื่อ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori*

### ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากกระชายดำในยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ในหลอดทดลอง และฤทธิ์ของสารสกัดจากกระชายดำต่อการเกาะติดและการบุกรุกเซลล์เยื่อ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยสารสกัดที่ใช้ คือ น้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ, สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ, สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ และสารสกัดเมทานอลจากกระชายดำ เชื้อ *H. pylori* ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ และฤทธิ์ต่อการเกาะติด และการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี Gentamicin internalization assay ประกอบด้วย 26 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน 4 สายพันธุ์คือ ATCC 43504, ATCC 43526, ATCC 51932 และ ATCC 51110 สายพันธุ์ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2 สายพันธุ์ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกจากคนไข้ คือ DMST20165 และ DMST20885 และสายพันธุ์ที่แยกจากคนไข้จำนวน 20 สายพันธุ์ คือ FM2, C7, C37, C42, C53, C54, 292, 742, 749, 818, 820, 849, 851, 861, 867, 912, 920, 928, 949 และ 955 ในการวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดและการบุกรุกเซลล์ ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี RT PCR จะทำการศึกษาใน 2 ยีน คือ *alpA* และ *babA*

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบฤทธิ์และระดับความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (MIC) ของสารสกัดกระชายดำในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*
2. ทำให้ทราบผลของสารสกัดจากกระชายดำต่อความสามารถในการเกาะติดและการบุกรุกเซลล์เยื่อ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori*
3. สามารถนำกระชายดำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพในการรักษาโรคมะเร็งในกระเพาะอาหารได้

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นับตั้งแต่มีการรายงานการจำแนก(isolate)เชื้อ *Campylobacter pyloridis* โดย Dr J. Robin Warren และ Dr Barry J. Marshall ในปี ค.ศ. 1982 การค้นคว้าและวิจัยเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ก็มีเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว ย้อนกลับไปเมื่อ ค.ศ. 1979 เมื่อ Warren ซึ่งเป็นพยาธิแพทย์อยู่ที่ Royal Perth Hospital ออสเตรเลีย สังเกตพบว่า ชิ้นเนื้อที่ตัดออกจากกระเพาะอาหารของผู้ป่วยบางคนมีแบคทีเรียที่มีลักษณะโค้งงอคดเป็นเกลียว ส่วนใหญ่พบอยู่ใต้ชั้นเยื่อเมือกที่ปกคลุมกระเพาะอาหารบริเวณที่มีการอักเสบ Warren จึงได้ทำการสังเกตและศึกษากับเพื่อนร่วมงานซึ่งก็คือ Marshall เรื่อยมา จนกระทั่งวันหนึ่งเขาได้เพาะเชื้อชิ้นเนื้อของกระเพาะอาหารไว้แล้วลึ้มดูพอดีตรงกับช่วงวันหยุดหลายวันจากเทศกาลอีสเตอร์ เมื่อโรงพยาบาลเปิดทำการหลังจากหยุดไป 5 วัน เขาได้พบว่ามิโคลินของแบคทีเรียชนิดหนึ่งบนจานเพาะเชื้อนั้น ลักษณะคล้ายกับเชื้อแบคทีเรียจำพวก *Campylobacter* จึงให้ชื่อว่า *Campylobacter like organism* (CLO) ต่อมาจึงเปลี่ยนเป็น *Campylobacter pyloridis* เพื่อให้ถูกต้องตามหลักไวยากรณ์ของภาษา ใน ค.ศ. 1982 ต่อมาพบว่าเชื้อแบคทีเรียตัวนี้มีคุณสมบัติด้านชีวเคมี และรูปร่างลักษณะไม่เหมือนกับแบคทีเรียกลุ่ม *Campylobacter* จึงได้มีการตั้งชื่อใหม่เป็น *Helicobacter pylori* ในปี ค.ศ. 1989 ตามรูปร่างลักษณะที่เป็นเกลียว (helical) เชื้อ *H. pylori*(1) เป็นแบคทีเรียที่ถูกจับตาเป็นอย่างมาก มีการศึกษามากขึ้นเรื่อยๆ ในปัจจุบัน และการค้นพบเชื้อ *H. pylori* นี้ นับเป็นการจุดประกายดาวดวงใหม่ในแวดวงของการศึกษาโรกระบบทางเดินอาหาร ทำให้ Dr J. Robin Warren และ Dr Barry J. Marshall ได้รับรางวัลโนเบล สาขา Medicine & Physiology ในปี 2005 ปัจจุบันเชื้อ *H. pylori* เป็นที่ยอมรับว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคแผลในกระเพาะอาหาร (gastric ulcer) กระเพาะอาหารอักเสบ (gastritis) มะเร็งในกระเพาะอาหาร รวมไปถึงการก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่ลำไส้ส่วนต้น พบว่าประชากรโลกมากกว่า 50 % มีการติดเชื้อ *H. pylori* นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 1994 องค์การอนามัยโลก (The World Health Organization) ยังกำหนดให้เชื้อ *H. pylori* จัดเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ในมนุษย์

#### ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Helicobacter pylori*

เชื้อแบคทีเรีย *H. pylori* เมื่อทำการย้อมสี Gram stain จากการส่องกล้องจุลทรรศน์จะสามารถเห็นลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นเกลียว หรือรูปคล้ายตัว S ขนาดจากการ

ส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมีความยาว 2.5-5  $\mu\text{m}$  กว้าง 0.5-1  $\mu\text{m}$  มีflagella ประมาณ 4-6 เส้น และแต่ละเส้นของ flagella มีความยาวประมาณ 30  $\mu\text{m}$  และกว้าง 2.5 nm มีผนังเซลล์หนา 30 nm



รูปที่ 2.1 เชื้อ *H. pylori* จากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

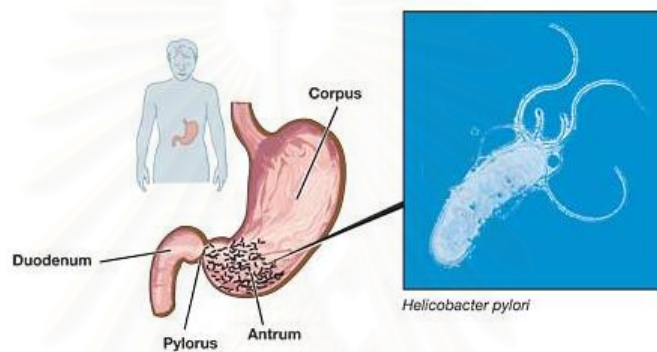
การเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ในห้องปฏิบัติการจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารที่ถูกตัดออกมาจากคนไข้ จะถูกนำมาทำการบดและเลี้ยงไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ และมีเลือดแกะผสมอยู่ร้อยละ 7 สภาพที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ต้องเป็นสภาพที่มีออกซิเจนน้อย (microaerophilic) หากเป็นสภาพมีออกซิเจน (aerobic conditions) เชื้อจะไม่เจริญและตายไป แต่ก็มีเชื้อ *Helicobacter* บางชนิดที่เจริญได้ดีทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนน้อย และสภาพที่ไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) นั่นคือเชื้อ *H. rodentium* (13) หลายสายพันธุ์ของเชื้อ *Helicobacter* ไม่ต้องการก๊าซไฮโดรเจนเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตทั้งที่ในการเจริญเติบโตของเชื้อสายพันธุ์นี้จะกระตุ้นให้สภาวะแวดล้อมมีก๊าซไฮโดรเจนมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามก็มีเชื้อ *Helicobacter* บางสายพันธุ์เช่น *H. cinaedi* (14) ที่ต้องการก๊าซไฮโดรเจนในการเจริญเติบโตทำให้ในหลายๆห้องปฏิบัติการใช้สภาวะที่มีออกซิเจนน้อยร่วมกับการมีก๊าซไฮโดรเจนในการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์นี้ เชื้อ *Helicobacter* จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อ *H. pylori* มีการเคลื่อนที่คล้ายเกลียวสว่าน แต่ถ้าหากเลี้ยงไว้เป็นเวลานานพบว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น Coccoid forms คือ จะเห็นรูปร่างเป็นตัวบ ที่เกิดจากการจับกันของปลายทั้งสองข้างของ *H. pylori* (3)

ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *H. pylori* พบว่าเชื้อชนิดนี้มีระบบเมแทบอลิซึมแบบใช้ออกซิเจน การสลายน้ำตาล (sugar catabolism) ไม่สามารถทำได้ทั้งการ oxidation และ fermentation แต่ก็สามารถพบการ oxidation ได้บ้างในเชื้อ *H. pylori* บางสายพันธุ์ กระบวนการ glycolysis-gluconeogenesis น่าจะเป็นแหล่งสร้างพลังงานหลักให้กับตัวเชื้อ กระบวนการ Entner-Doudoroff pathway, pentose phosphate shunt และ tricarboxylic acid สามารถพบได้บ้างเล็กน้อย ส่วนกระบวนการ glyoxylate shunt ไม่พบในเชื้อชนิดนี้ (15) เชื้อ *H. pylori* ไม่สามารถย่อยสลาย (hydrolysis) เจลละติน (Gelatin), แป้ง (starch), เคซีน (casein) และ ไทโร

ซีน(tyrosine)ได้ การทดสอบทางชีวเคมีต่างๆ ได้แก่ methyl red และ Voges-Proskauer ให้ผลลบ การทดสอบoxidase ให้ผลลบทุกสายพันธุ์ สายพันธุ์ส่วนใหญ่ให้ผลการทดสอบ catalase, urease และ alkaline phosphatase เป็นบวก

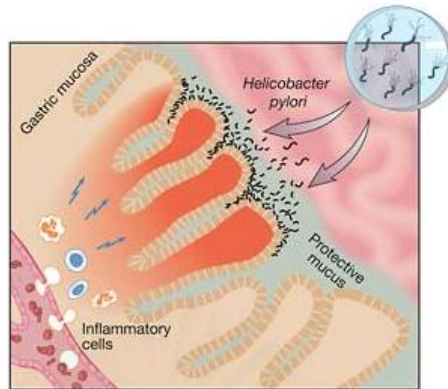
### พยาธิสภาพการก่อโรคของเชื้อ *H. pylori*

พยาธิสภาพการเกิดโรคเริ่มต้นเมื่อได้รับเชื้อ *H. pylori* เชื้อจะผ่านเข้าไปในกระเพาะอาหาร และเชื้อส่วนใหญ่จะรวมตัวกันอยู่ในส่วน Antrum ของกระเพาะอาหาร ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 บริเวณที่พบเชื้อ *H. pylori* มากที่สุดคือในกระเพาะอาหาร

เชื้อ *H. pylori* มีความสามารถในการหลบหลีกสภาวะที่ไม่เหมาะสมในกระเพาะอาหารด้วยการสร้างเอนไซม์ Urease ซึ่งเปลี่ยน urea เป็น ammonia ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่างจึงไปลดความเป็นกรดของกรดในกระเพาะอาหารทำให้เชื้อไม่ถูกทำลาย การสร้างเอนไซม์ Urease ขึ้นกับ pH ของสิ่งแวดล้อม ในสภาวะที่ pH ต่ำเชื้อจะมีการสร้างเอนไซม์ Urease มากขึ้นและจะหยุดหลังเมื่อสิ่งแวดล้อมมี pH เป็นกลาง เมื่อเชื้อ *H. pylori* มาถึงบริเวณ Antrum ของกระเพาะอาหารก็จะมี การเคลื่อนที่ผ่านเยื่อเมือก(mucus)ที่ปกป้องเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร(gastric mucosa)โดยอาศัยการสร้างเอนไซม์ mucinase ทำให้เชื้อเคลื่อนที่ผ่านชั้นเยื่อเมือกได้รวดเร็ว ในกระเพาะอาหารเชื้อจะเกาะติดอยู่กับเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร(gastric mucosa) ดังรูปที่ 2.3 นอกจากนี้ flagella ของเชื้อยังสามารถจับกับช่องเว้าระหว่างเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร(gastric niche)ทำให้เชื้อสามารถเกาะติดอยู่กับเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารได้ดียิ่งขึ้น



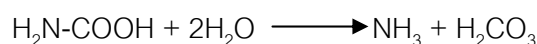
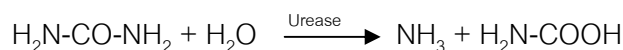
รูปที่ 2.3 บริเวณที่เชื้อ *H. pylori* จะก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ

พยาธิสภาพที่เกิดตามมาคือ เชื้อ *H. pylori* จะกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ มารวมกันบริเวณใต้เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร(gastric mucosa)เม็ดเลือดขาวเหล่านี้จะหลั่งสารไซโตไคน์ (cytokine)ทำให้เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร(gastric mucosa)เกิดการอักเสบ(inflammatory)เป็นเหตุให้เกิดเป็นโรคเพาะอาหารอักเสบ เมื่อผ่านไประยะหนึ่งเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร(gastric mucosa)ที่เกิดการอักเสบจะเกิดการตาย(apoptosis)ทำให้พยาธิสภาพพัฒนาไปเป็นโรคแผลในกระเพาะอาหาร ในคนไข้ที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง(chronic gastritis)ที่มีปัจจัยทั้งภายในและภายนอกที่เหมาะสม พยาธิสภาพสามารถพัฒนาไปเป็นมะเร็งในกระเพาะอาหาร (gastric cancer)ได้

### กลไกการเกิดพยาธิสภาพ และความรุนแรงในการเกิดโรค

ความรุนแรงและประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อ *H. pylori* มีหลายปัจจัยด้วยกันที่เกี่ยวข้อง โดยปัจจัยหลักๆที่เกี่ยวข้องได้แก่ เอนไซม์ urease, โปรตีน vacuolating cytotoxin และโปรตีน cytotoxin-associated antigen

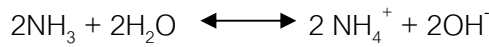
เอนไซม์ urease เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เชื้อ *H. pylori* มีความสามารถในการหลบหลีกสภาวะที่ไม่เหมาะสมที่มี pH ต่ำในกระเพาะอาหารได้ โดยการทำงานของเอนไซม์เป็นดังนี้



เอนไซม์ urease จะย่อยสลายยูเรีย(urea) ได้เป็นแอมโมเนีย(ammonia) และคาร์บาเมต(carbamate) ซึ่งคาร์บาเมตจะถูกย่อยสลายโดยน้ำ(hydrolysis)ได้เป็นแอมโมเนีย กับคาร์บอนิก



แอสิด(carbonic acid) แอมโมเนียที่เกิดขึ้นสามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาเป็นแอมโมเนียม(ammonium)ได้



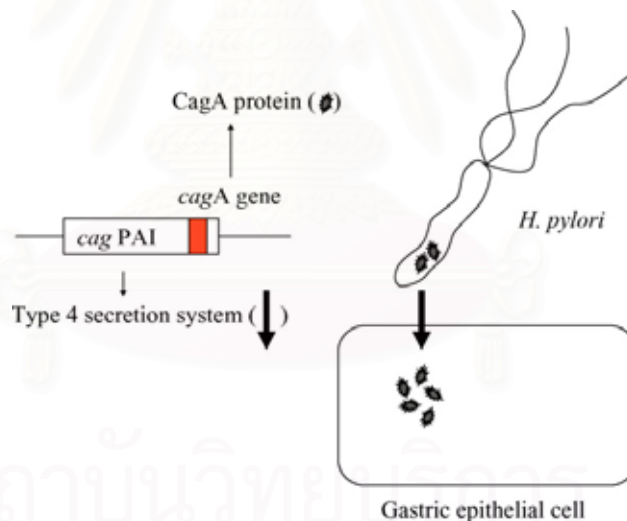
ไฮดรอกไซด์ไอออน(hydroxide ion)ที่เกิดจากเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นแอมโมเนียมสามารถไทเทรต(titrate)กับโปรตอน(proton;  $\text{H}^+$ )ที่เกิดจากกรดในกระเพาะอาหารทำให้เกิดเป็นน้ำซึ่งมีฤทธิ์เป็นกลาง การสร้างเอนไซม์ Urease ของเชื้อ *H. pylori* ขึ้นกับ pHของสิ่งแวดล้อม ในสภาวะที่ pHต่ำ เชื้อจะมีการสร้างเอนไซม์ Urease มากขึ้นและจะหยุดหลั่งเมื่อสิ่งแวดล้อมมี pHเป็นกลาง

โปรตีน VacA(vacuolating cytotoxin) เป็นสารจำพวก exotoxin ที่สร้างมาจากยีน *vacA* ของ *H. pylori* โดยทั่วไปจะมียีน *vacA* แต่มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่จะมีการผลิตโปรตีน VacA ที่มีประสิทธิภาพในการทำงานสูง ซึ่งการศึกษาใน *vacA* ที่ทำกันมากนั้นจะเน้นทำการศึกษาในเชื้อ *H. pylori* ที่มียีน *vacA* ชนิด s1/m1(16) โปรตีน VacA ถูกผลิตขึ้นมาในตอนต้นจะมีขนาดประมาณ 140 kDa แต่เมื่อพร้อมที่จะทำงานจะมีบางส่วนของโปรตีน VacA ถูกตัดออกไปจนมีขนาดประมาณ 90 kDa(17) โปรตีน VacA เป็นสาเหตุให้เกิดแควคิวโอล(vacuolation) ในเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร แต่ไม่ได้ทำให้เกิดการตายของเซลล์อย่างเฉียบพลัน เมื่อเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารสัมผัสกับโปรตีน VacA ในปริมาณมากเซลล์จะตายหลังจากนั้นประมาณ 2 วัน(18) ในการจับกันหรือการได้รับโปรตีน VacA ของเซลล์ยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างแน่ชัดนักทำให้มีการศึกษาด้านนี้มาก เช่น การทดลองดูการเกาะระหว่างโปรตีน VacA ชนิด s1/m1 กับเซลล์ HeLa แล้วทำการวิเคราะห์โดยเครื่อง flow-cytometer(19) หรือการศึกษาประสิทธิภาพของโปรตีน VacA ในสภาวะต่างๆพบว่าในสภาวะที่เป็นกรดประสิทธิภาพของโปรตีน VacA ในการก่อให้เกิดแควคิวโอลมีมากขึ้นในเซลล์ AZ-521(20) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน VacA จะจับกับ 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase  $\beta$  (RPTP $\beta$ ) มีหลายๆการทดลองที่พบว่าโปรตีน *vacA* จับกับ RPTP $\beta$  ของเซลล์ก่อนแล้วต่อมาจึงเกิดการเป็นพิษกับเซลล์(21) การศึกษาในเซลล์ AGS พบว่านอกจากที่โปรตีน VacA จับกับ RPTP $\beta$  แล้วยังสามารถจับกับ receptor อื่นด้วยที่มีขนาด 140 kDa(22) ทำให้ยังสรุปไม่ได้ว่า receptor ของโปรตีน VacA คือตัวใดอย่างแน่นอน receptor นั้นจะเปลี่ยนแปลงไปตามเซลล์ที่ใช้ศึกษาและพบว่าแต่ละเซลล์ยังมี receptor ต่อโปรตีน VacA มากกว่า 1 ชนิด

โปรตีน VacA ที่มีขนาดประมาณ 90 kDa จะประกอบไปด้วย 2 ซับยูนิต คือ s ซับยูนิต (small subunit)ที่มีขนาดประมาณ 37 kDa และ m ซับยูนิต(medium subunit)ที่มีขนาดประมาณ 58 kDa(23) หน้าที่แรกของโปรตีน VacA คือการก่อให้เกิดแควคิวโอล ในกระบวนการที่โปรตีน VacA กระตุ้นให้เกิดแควคิวโอลนั้นต้องอาศัยเอนไซม์ ATPase และสภาวะที่เป็นเบสอ่อนๆ(24) เมื่อ

โปรตีน VacA ผ่านผนังของเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารเข้าไปนอกจากเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการสร้างแควิวโอลแล้ว ยังทำให้เกิดผลอื่นตามมา ได้แก่ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยโปรตีน VacA จะจับตัวกันให้มีโครงสร้างเป็น hexameric ทำให้เกิดช่องที่ anion สามารถผ่านได้ นอกจากนี้โปรตีน VacA ยังมีเป้าหมายอยู่ที่เยื่อหุ้มของไมโทคอนเดรีย เป็นเหตุให้ไมโทคอนเดรียมีการหลั่ง cytochrome c มากขึ้น และเหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารเกิดการ apoptosis(25) กระบวนการในการทำงานส่วนใหญ่ของโปรตีน VacA ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดนักจึงทำให้มีการศึกษาผลกระทบของการทำงานของโปรตีน VacA อยู่เรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน

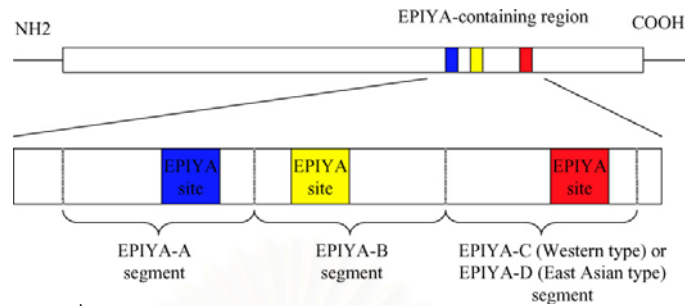
โปรตีน CagA(cytotoxin-associated antigen) เป็นอีกโปรตีนที่สำคัญ และมีการศึกษาเป็นจำนวนมากเกี่ยวกับโปรตีนตัวนี้ โปรตีน CagA สร้างมาจากยีน *cagA* ซึ่งยีน *cagA* เป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มยีน *cag* Pathogenicity Island(*cag* PAI) หน้าที่ของยีน *cag* PAI คือสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ Type 4 secretion system ซึ่งเป็นระบบที่เชื้อ *H. pylori* ใช้ในการบุกรุกเข้าไปในเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร ยีน *cag* PAI มีขนาดประมาณ 40 kb DNA ประกอบด้วยยีน 31 ยีน คือ ยีน *cagA-cagZ* และ *cag $\alpha$ -cag $\zeta$* (26)



รูปที่ 2.4 แสดงการทำงานของยีน *cag* Pathogenicity Island

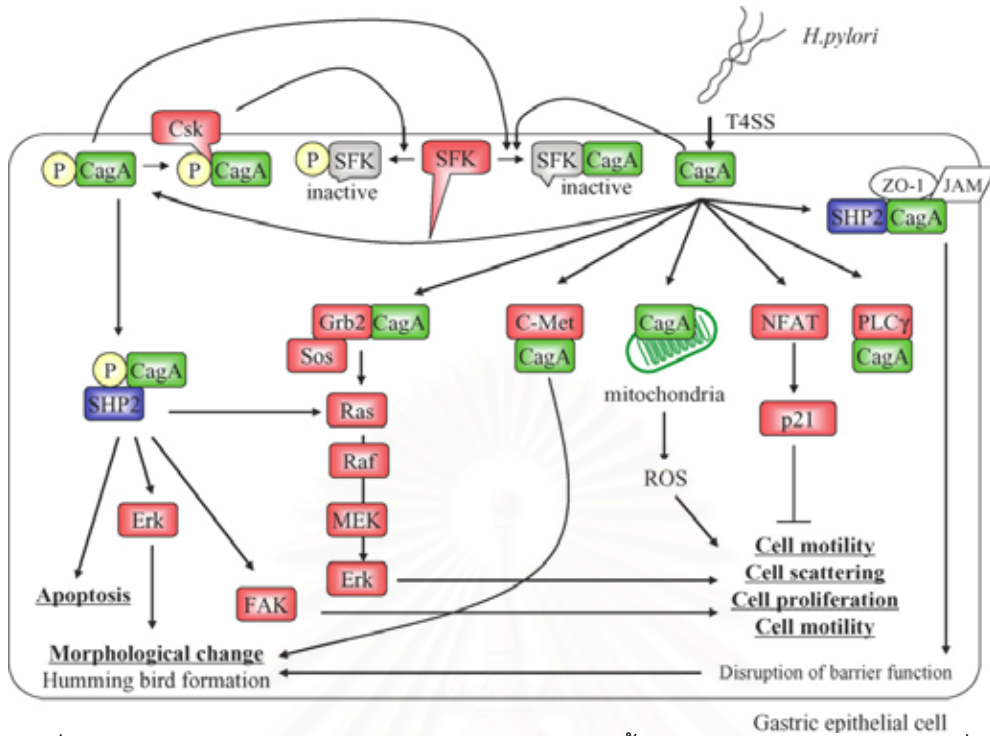
ยีน *cagA* เมื่อถูกถอดรหัสจะได้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 120 kDa หลังจากนั้นจะถูกส่งผ่านเข้าไปในเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารผ่านทาง Type 4 secretion system จากนั้นโปรตีน CagA จะถูก phosphorylation ที่ตำแหน่ง EPIYA motif (ตำแหน่งที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 5 ตัวเรียงกัน คือ Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) โดย EPIYA motif สามารถแบ่งออกเป็น 3 ซับยูนิต ในเชื้อ *H. pylori* สามารถมีส่วนของ EPIYA motif ได้ 2 แบบ คือ EPIYA motif ที่ประกอบด้วยซับยูนิต A,B และ C ซึ่งส่วนใหญ่พบในเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่อยู่ในแถบโลกตะวันตก และ EPIYA motif ที่

ประกอบด้วยซับยูนิต A,B และ D ซึ่งส่วนใหญ่พบในเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่อยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียง(27)



รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะ EPIYA motif ของโปรตีน CagA

เมื่อโปรตีน CagA ถูกส่งเข้าไปในเซลล์จะจับกับ Src family protein tyrosine kinases (SFK) ของโฮสต์เซลล์เพื่อที่จะเกิดกระบวนการ phosphorylation(28) เมื่อโปรตีน CagA ถูก phosphorylation ที่ตำแหน่ง tyrosine ของ EPIYA motif แล้ว โปรตีน CagA จะอยู่ในรูป active และจับกับ Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase (SHP2) เป็นผลให้เกิดการส่งสัญญาณกระตุ้นการทำงานของเซลล์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการหลั่ง cytokine, การเปลี่ยนแปลงของ cell cycle และการเปลี่ยนแปลงของ cell structure จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่อยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงที่มี EPIYA motif ในซับยูนิตที่ 3 เป็นชนิด D จะมีประสิทธิภาพสามารถจับกับ SHP2 ได้ดีกว่า EPIYA motif ที่มีซับยูนิตที่ 3 เป็นชนิด C มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งในกระเพาะอาหาร(29) SHP2 ที่ถูกกระตุ้นโดยโปรตีน CagA จะกระตุ้นการทำงานของ extracellular signal-regulated kinase (Erk) เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนรูปร่างของโฮสต์เซลล์ นอกจากนี้ยังมีผลทำให้เกิดกระบวนการ dephosphorylates กับ focal adhesion kinase (FAK) เป็นผลให้ FAK ไม่ทำงาน ก่อให้เกิดการตายของโฮสต์เซลล์มากขึ้น(30) โปรตีน CagA ที่ผ่านกระบวนการ phosphorylation พบว่า ร้อยละ 80 จะจับกับ SHPS และอีกร้อยละ 20 จะสามารถจับกับ carboxy-terminal Src kinase (Csk) ซึ่งจะมีผลยับยั้งการทำงานของ SFK(31)



รูปที่ 2.6 แสดงกลไกการทำงานของโปรตีน CagA นับตั้งแต่ถูกนำพาเข้าไปในเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารจนถึงผลกระทบที่เกิดขึ้นตามมา

โปรตีน CagA ที่ถูกฉีดเข้าไปในโฮสต์เซลล์บางส่วนสามารถจะจับกับ zonula occludens-1 (ZO-1) และ junctional adhesion protein (JAM) ทำให้เกิดการเรียก SHP2 มาจับเกิดการส่งสัญญาณต่างๆต่อไป(32) โปรตีน CagA สามารถจับกับ growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) และ son of sevenless (Sos) เกิดเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ นอกจากนี้โปรตีน CagA ยังสามารถจับกับ C-Met hepatocyte growth factor receptor(C-Met) และ phospholipase C-g (PLCg)(33, 34) ถึงแม้จะรู้ว่าโมเลกุลร่วมระหว่างโปรตีน CagA กับ C-Met จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโฮสต์เซลล์ แต่ยังไม่ทราบผลที่แน่ชัดของโมเลกุลที่เกิดจากการจับกันของโปรตีน CagA กับ PLCg การจับกันของโปรตีน CagA กับ Grb2 นั้นไม่ต้องอาศัยกระบวนการ phosphorylated ของโปรตีน CagA ก่อน ปัจจุบันพบว่าโปรตีน CagA สามารถกระตุ้นการทำงานของ nuclear factor of activated T cells(NFAT) จากการกระตุ้นการทำงานของ NFAT ทำให้เกิดการส่งสัญญาณต่อไป กระตุ้นการทำงานของ p21Cip1 cyclindependent kinase inhibitor ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆของโฮสต์เซลล์ตามมา(35) การที่โฮสต์เซลล์ได้รับโปรตีน CagA เข้าไป โปรตีน CagA จะมีกระบวนการต่างๆเกิดขึ้น 2 ทาง ทางแรกเกิดกระบวนการ phosphorylation แล้วโปรตีน CagA จึงจับกับ SHP2 เกิดการส่งสัญญาณต่างๆตามมา ทางที่ 2 คือ ไม่ผ่านกระบวนการ phosphorylation โดยตัวโปรตีน CagA เองไปจับหรือกระตุ้นการทำงานของสัญญาณต่างๆใน

ไฮสตร์เซลล์ ทั้ง 2 ทางส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง 3 แบบ คือ 1) กระตุ้นให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของ cytoskeleton ทำให้เซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนไปและสูญเสียการทำงาน 2) กระตุ้นการทำงานของ NF- $\kappa$ B ทำให้เกิดการหลั่งของ IL-8 เป็นเหตุทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของ neutrophil ก่อให้เกิดการอักเสบ 3) ทำให้เซลล์เกิดการหลั่ง growth factor และ cytokine ต่างๆ ก่อให้เกิดการ apoptosis(25)

### การเกาะติด(adherence) และการโคโลไนส์(colonization)

ในการศึกษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียมักทำการศึกษามุ่งเน้นไปที่การก่อโรค และความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย แต่ในการศึกษาเชื้อ *H. pylori* มีการศึกษาจำนวนมากที่เน้นไปในการศึกษาการเกาะติด(adhesion) และกระบวนการ colonization บนไฮสตร์เซลล์ ถึงแม้จะไม่ก่อให้เกิดการทำลายไฮสตร์เซลล์ แต่ในการศึกษาของเชื้อ *H. pylori* นั้นจำเป็น เพราะว่าเชื้อ *H. pylori* มีความสามารถคงอยู่บนไฮสตร์เซลล์ได้นานหลายปีโดยไม่มีการแสดงอาการใดๆ ในกระบวนการ colonization ของแบคทีเรียโดยทั่วไปประกอบด้วย 4 ขั้นตอนด้วยกัน 1) การเคลื่อนย้ายจากไฮสตร์ที่ตั้งต้นไปสู่ไฮสตร์ใหม่ 2) แบคทีเรียทำการเกาะติดกับ receptor ที่จำเพาะในไฮสตร์ใหม่ 3) การหลบหลีก หรือทำลายระบบป้องกันของไฮสตร์ และ 4) การยึดครองสารอาหาร และทรัพยากรต่างๆจากไฮสตร์ สิ่งที่แตกต่างกันชัดเจนระหว่างกระบวนการ colonization กับพยาธิสภาพการก่อโรค(pathogenesis) คือ กระบวนการ colonization จะไม่มีการทำลายไฮสตร์เซลล์(36) ตัวอย่างเช่น *Escherichia coli* จะไม่ทำลายลำไส้ หรือ Staphylococci บนผิวหนังจะไม่ทำลายเซลล์ผิวหนัง การเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* เป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องพิจารณาในการกำจัดการติดเชื้อ *H. pylori* เนื่องจากมีหลายปัจจัยที่ทำให้เชื้อ *H. pylori* ฝังแน่นอยู่ในเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารได้เป็นระยะเวลายาวนาน การเกาะติดต่างจากกระบวนการ colonization อยู่หลายประการได้แก่ การเกาะติดไม่เกี่ยวข้องกับ turnover ของเซลล์, ระบบภูมิคุ้มกันของไฮสตร์ และผลกระทบจากความหนาแน่นของเซลล์ แต่กระบวนการ colonization ต้องคำนึงถึงปัจจัยเหล่านี้

### ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการโคโลไนส์ การเกาะติด และการบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori*

ปัจจัยที่มีผลต่อการติดเชื้อ *H. pylori* มีอยู่หลายปัจจัยด้วยกัน โดยปัจจัยแรกมาจากผลกระทบของไฮสตร์เซลล์ จากการศึกษาพบว่าพันธุกรรมของไฮสตร์มีความเกี่ยวข้องเนื่องกับการติดเชื้อ *H. pylori* การศึกษาในฝาแฝดพบว่า ในฝาแฝดแท้มี 81 %ที่จะมีการติดเชื้อ *H. pylori* ทั้งคู่ มีน้อยรายที่คนหนึ่งติดเชื้อแต่อีกคนหนึ่งไม่ติดเชื้อ เมื่อเทียบกับการศึกษาในฝาแฝดไม่แท้พบว่ามีเพียง 63 %ที่จะมีการติดเชื้อ *H. pylori* ทั้งคู่(37) ในการศึกษาชนิดของ HLA (human leucocyte

antigen) ที่ยอมให้มีการติดเชื้อ *H. pylori* ได้แก่ HLA DR, HLA DQ\*0301, HLA DQA1\*0301 และ HLA DQ5 แต่ HLA เหล่านี้ก็ยอมให้เกิดการติดเชื้อของแบคทีเรียชนิดอื่นด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า HLA บางชนิด เช่น HLA-DQA1\*0102 สามารถป้องกันการเกิดโรคกระเพาะอาหารอักเสบ และโรคลำไส้เล็กส่วนต้นอักเสบ จากการติดเชื้อ *H. pylori* ได้(38) แต่อย่างไรก็ตามความรู้ในปัจจุบันเกี่ยวกับผลกระทบของโฮสต์ต่อกระบวนการ colonization ของเชื้อ *H. pylori* ยังมีไม่มากนัก

ปัจจัยที่ 2 เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ มีการศึกษาค้นคว้าที่จะผลิตวัคซีนที่จะป้องกันเชื้อ *H. pylori* อย่างถาวรแต่ก็ไม่ประสบความสำเร็จ จึงทำให้มีการศึกษาในวงกว้างถึงภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) และแบบที่สร้างขึ้นเองภายหลัง (humoral immunity) เพื่อที่จะนำมาดัดแปลงในการป้องกันการติดเชื้อ *H. pylori*(39) ตั้งแต่เริ่มมีการติดเชื้อ *H. pylori* จะกระตุ้นให้มีการตอบสนองของ Th1-cell มีผลทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ IFN- $\gamma$  มีบางสมมุติฐานเชื่อว่าการตอบสนองของ Th2-cell จะช่วยลดการติดเชื้อ *H. pylori* ในการทดลองเพื่อพิสูจน์ได้ทำในหนูที่ดัดแปลงพันธุกรรมให้มีการยับยั้งการแสดงออกของ Th2-cell แต่มีการแสดงออกของ Th1-cell ที่มาก พบว่าเมื่อทำให้ติดเชื้อ *H. felis* มีการติดเชื้อที่มากขึ้นของหนูที่มีการดัดแปลงพันธุกรรมเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นการสนับสนุนสมมุติฐานข้างต้น(40) แต่ Chen และคณะซึ่งทำการทดลองในลักษณะเดียวกันกลับไม่พบการติดเชื้อที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มหนูที่มีการดัดแปลงพันธุกรรมเมื่อใช้เชื้อ *H. pylori* (41) อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับ Th2-cell ต่อการติดเชื้อ *H. pylori* ก็ยังไม่เป็นที่แน่ชัดนัก นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงฮอร์โมนตัวหนึ่งต่อการติดเชื้อ *H. pylori* ฮอร์โมนตัวนั้น คือ gastrin เป็นฮอร์โมนที่สร้างมาจาก G เซลล์ในส่วน antrum ของกระเพาะอาหารทำหน้าที่ในการกระตุ้นการหลั่งของกรดในกระเพาะอาหาร ในคนไข้ที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* มีบ่อยครั้งที่พบว่ามีการหลั่งของ gastrin มากขึ้น(42) พบว่า gastrin มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อ *H. pylori* เมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของ gastrin ต่างกันพบว่า การเจริญเติบโตของเชื้อ *H. pylori* แปรผันตรงกับความเข้มข้นของ gastrin(43) สารจำพวก proinflammatory cytokines ได้แก่ IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  ซึ่งผลิตจากเม็ดเลือดขาวชนิด monocyte พบว่าสามารถกระตุ้นการหลั่งของ gastrin โดยการกระตุ้นการทำงานของ G เซลล์ในกระเพาะอาหาร(44) โดยสรุปก็คือ gastrin สามารถถูกกระตุ้นให้หลั่งมากขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อ *H. pylori* และเชื้อ *H. pylori* ใช้ gastrin ในการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่แน่ชัดนักสำหรับระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาแต่กำเนิดว่าจะเป็นประโยชน์ต่อการติดเชื้อ *H. pylori* เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันชนิดนี้ทำให้มีการหลั่งของ gastrin มากขึ้น และเพิ่มความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร ซึ่งเกิดขึ้นเป็นปกติเมื่อมีการติดเชื้อ *H. pylori*(45)

ปัจจัยอื่น ๆ มีผลต่อการติดเชื้อ *H. pylori* ได้แก่ ชนิดของอาหารที่ได้รับ, ยา และปัจจัยจากสภาพแวดล้อม โดยทั่วไปแล้วเชื้อ *H. pylori* มีระบบป้องกันตัวเองหลายอย่างจากปัจจัยภายนอก เช่น สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในกระเพาะอาหารที่มีสภาวะเป็นกรด และสามารถหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันได้ เป็นต้น ดังนั้นการป้องกันการปนเปื้อนเชื้อ *H. pylori* ที่มากับอาหารประจำวันจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุดสำหรับการป้องกันการติดเชื้อ *H. pylori*

### ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดและการบุกรุกเซลล์ ของเชื้อ *Helicobacter pylori*

การเกาะติดและการบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ต้องอาศัยสารที่มีคุณสมบัติเป็น Adhesins อาจเป็นสารจำพวก โปรตีน, น้ำตาล หรือ ไขมัน ก็ได้ ซึ่งมีหน้าที่ในตอนต้นของกระบวนการ colonization หน้าที่หลักของมัน คือ เป็นตัวกลางเชื่อมโยงระหว่างตัวแบคทีเรีย กับพื้นผิวของโฮสต์เซลล์ สาร Adhesin โดยทั่วไปมักจะถูกจัดให้เป็น virulence factors ของเชื้อแบคทีเรีย โฮสต์เซลล์จะมี receptors หลากหลายชนิด ประกอบด้วย ไขมัน, โปรตีน, ไกลโคลิปิด หรือ ไกลโคโปรตีน การเกาะติดของแบคทีเรียกับ receptors บนโฮสต์เซลล์จะทำให้เกิดการส่งสัญญาณต่างๆตามมามีผลทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดขาว และเกิดกำจัดสิ่งแปลกปลอมในที่สุด เชื้อ *H. pylori* มีการพัฒนาการเกาะติด และกระบวนการ colonization ให้มีกลไก และลักษณะที่จำเพาะกับเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร

Adhesins ของเชื้อ *H. pylori* มักมีปัญหาในการระบุว่า receptors ตัวไหนของโฮสต์เซลล์ที่จับกับ Adhesins แต่ละตัว เพราะการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์, การแสดงออกของจำนวน Adhesins แตกต่างกัน, ความแตกต่างของการแสดงออกของ Adhesins ในแต่ละการเลี้ยงมีสภาพแวดล้อมต่างกัน, ความแตกต่างของรูปร่างเชื้อ *H. pylori* ที่เป็นรูปร่างปกติ กับรูปร่าง coccoid , การใช้โฮสต์เซลล์ที่แตกต่างกันในการทดสอบระบุ receptors ของ Adhesins , ปัญหาที่เกิดจากการ autolysis ของเชื้อ *H. pylori*, ความหลากหลายของการแสดงออกของ receptors ที่เกิดจากการสัมผัสกับเชื้อ *H. pylori* และความหลากหลายของการแสดงออกของ receptors ที่เกิดจากโฮสต์ที่ต่างกัน ยังไม่มีการศึกษาใดที่บ่งบอกบทบาทของยีนที่เกี่ยวข้องกับ Adhesins ที่แน่ชัดในสิ่งมีชีวิต เนื่องจากความสัมพันธ์ระหว่าง Adhesins เชื้อ *H. pylori* ที่ก่อให้เกิดการเกาะติด และกระบวนการ colonization นั้นเป็นแบบหลายปัจจัย(multifactors) และไม่มี Adhesins ที่ทำงานเพียงตัวเดียวในการเกาะติด และกระบวนการ colonization แต่จากการศึกษาก็พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่เกาะติดอยู่บนเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารมีความสามารถต่อต้านยาปฏิชีวนะได้ดีกว่าเชื้อ *H. pylori* ที่ล่องลอยอยู่เดี่ยวๆ 100-1000 เท่า(7)

Adhesins ของเชื้อ *H. pylori* มักเป็นกลุ่มของโปรตีนที่อยู่บนพื้นผิวของเยื่อหุ้มเซลล์มีชื่อเรียกว่า Outer membrane proteins (OMPs) โดยมีหลายยีนที่เกี่ยวข้องด้วยกัน ได้แก่ *alpA*, *alpB*, *babA*, *oipA*, *hopZ*, *hsp60*, *hsp70* และกลุ่มของ LPS เป็นต้น กลุ่มของยีนที่คาดว่าสำคัญ และมีการศึกษากันมากในปัจจุบันได้แก่ยีน *alpA*, *alpB* และ *babA*

ยีน *alpA* และ *alpB* จะถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน Adhesin ที่มีจำนวนของกรดอะมิโน 518 ตัว แต่ยังไม่ทราบว่า receptor ของโฮสต์เซลล์ที่จับกับโปรตีนที่ถอดรหัสจากยีน *alpA* และ *alpB* คืออะไร(46) แต่จากการศึกษาของ Ramon de Jonge และคณะ ถึงบทบาทของยีน *alpA* และ *alpB* ในกระเพาะของหนูทดลองโดยใช้เชื้อ *H. pylori* ที่มีการดัดแปลงพันธุกรรมให้ไม่สามารถแสดงออกของยีน *alpA* และ *alpB* พบว่าเมื่อเชื้อ *H. pylori* ขาดยีนดังกล่าวจะทำให้เชื้อเสียความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์กระเพาะอาหาร(47) นอกจากการทดลองในสัตว์ทดลองแล้วยังมีการศึกษาผลของยีน *alpA* และ *alpB* ในการเกาะติด AGS เซลล์ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเยื่อบุกระเพาะอาหารพบว่าทั้งยีน *alpA* และ *alpB* มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกาะติดเซลล์ AGS ของเชื้อ *H. pylori* (48)

ยีน *babA* จะถูกถอดรหัสเป็นโปรตีนที่มีขนาด 78 kDa โดยโปรตีน BabA (blood group antigen-binding adhesin) จะไปจับกับ Lewis b antigen ของเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร พบว่าเชื้อ *H. pylori* กว่าครึ่งหนึ่งมียีน *babA*(49) จากการศึกษาพบว่าโปรตีน BabA จะจับกับ Lewis b antigen ในบริเวณโครงสร้างที่เป็น fucosylated มีการศึกษาผลของ monoclonal antibodies ของ Lewis b ต่อการเกาะติดเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารของเชื้อ *H. pylori* พบว่า monoclonal antibodies สามารถยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* ได้จึงเห็นว่าการที่เติม monoclonal antibodies ของ Lewis b ลงไปในการทดลอง monoclonal antibodies นั้นจะไปจับกับ Lewis b antigen ของโฮสต์เซลล์ เมื่อนำเชื้อ *H. pylori* มาทำการทดลองการเกาะติดเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารจึงทำให้เชื้อ *H. pylori* นั้นมีการเกาะติดที่น้อยลง(50) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีน BabA กับการเกิดแผลที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น และการเกิดมะเร็งโดยใช้เชื้อ *H. pylori* ที่มียีน *cagA* และ *vacA* พบว่ามีความสัมพันธ์กัน(51) มีการศึกษาจำนวนมากที่ทำให้เข้าใจการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* ผ่านทาง receptors ของ Lewis b อย่างไรก็ตามการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* ก็ไม่เป็นไปอย่างที่คิดเพราะว่า 1) ไม่ใช่เชื้อ *H. pylori* ทุกสายพันธุ์ที่จะจับกับ Lewis b antigen ของโฮสต์เซลล์ 2) Lewis b antigen สามารถพบได้บนทุกเนื้อเยื่อของโฮสต์เซลล์ทำให้ไม่สามารถอธิบายถึงความจำเพาะกับบางเนื้อเยื่อได้ 3) การแสดงออกของ Lewis b antigen ในแต่ละโฮสต์เซลล์ไม่แน่นอน ดังนั้นโฮสต์ และแบคทีเรียจึงมีบทบาทซึ่งกันและกันที่จะมีผลกระทบต่อเกาะติด และกระบวนการ colonization(52)



ในการศึกษาปัจจุบันมีคำถามอยู่ว่า receptors ของ Lewis b antigen ทำหน้าที่หลักในการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* หรือไม่ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* ต่อ Lewis b antigen เป็นอิสระต่อกัน(53) ในการศึกษาต่อมาของ Clyne และ Drumm(54) พิสูจน์โดยใช้โฮสต์เซลล์ที่มี Lewis a และ b มาทำการบ่มร่วมกับ monoclonal antibodies ทั้ง 2 ชนิด ก่อนที่จะทดสอบการเกาะติดโดยใช้เชื้อ *H. pylori* 3 สายพันธุ์ พบว่า Lewis antigens บนเซลล์กระเพาะอาหารไม่มีความสัมพันธ์กันกับการแสดงออกของโปรตีน BabA ของเชื้อ *H. pylori* ในการศึกษาเชื้อ *H. pylori* ที่แยกได้จากเด็กทั้งหมด 32 สายพันธุ์พบว่ามีเพียง 4 สายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีน *babA*(55) และพบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่แยกได้จากคนไข้ใหม่ ๆ มีเพียงร้อยละ 50 ที่มีการแสดงออกของยีน *babA*(56) ทำให้เป็นที่น่าคิดว่ายีน *babA* อาจจะไม่ใช้สาร Adhesin หลักที่ใช้ในการเกาะติดเซลล์กระเพาะอาหารของเชื้อ *H. pylori* ก็ได้ จากการทดลองต่างๆที่กล่าวมา อาจสรุปได้ว่า 1) เชื้อ *H. pylori* สามารถจับกับ Lewis b antigen ได้ทั้งในการทดสอบในหลอดทดลอง และในสิ่งมีชีวิต แต่ไม่จำเป็นเสมอไปสำหรับการเกาะติด 2) สาร Adhesin ที่ได้จากยีน *babA* จะมีความสัมพันธ์กับ Lewis b antigen บนโฮสต์เซลล์ และ 3) โฮสต์เซลล์สามารถมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างน้ำตาลบนผิวเซลล์เพื่อตอบสนองต่อการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori*

### การบุกรุกเซลล์ (Internalization) ของ *H. pylori* ในเซลล์เพาะเลี้ยง

ในการศึกษากระบวนการ Internalization ของเชื้อ *H. pylori* ในหลอดทดลองมีการใช้เซลล์มะเร็งหลายชนิดด้วยกันที่นิยมใช้ในการทดสอบ ได้แก่ AGS (human gastric epithelial adenocarcinoma cell line), MKN-45 (human, stomach, adenocarcinoma), AZ-521 (Human gastric cancer cell line) และ HEP-2 (Epidermoid carcinoma, larynx, human) เป็นต้น ในการศึกษาทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori*(6) กับเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด พบว่า เชื้อ *H. pylori* สามารถเกาะกับเซลล์ HEP-2 ได้มากที่สุดรองลงมาคือ เซลล์ AGS ทำให้มีการใช้ เซลล์ HEP-2 เป็นเซลล์ในการศึกษาเกี่ยวกับการเกาะติดและบุกรุกของเชื้อ *H. pylori* มากขึ้น เนื่องจากหาได้ง่าย สามารถเลี้ยงได้ง่าย และมีประสิทธิภาพในการศึกษามากกว่าเซลล์ AGS ในการศึกษาของ Bjorkholm B และคณะ ได้ทำการศึกษาปัจจัยของเชื้อ *H. pylori* ในการเข้าสู่เซลล์เยื่อกระเพาะอาหาร โดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ HEP-2 กับ เซลล์เยื่อกระเพาะที่ได้จากคนไข้ พบว่าความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ของเซลล์ทั้งสองมีประสิทธิภาพเท่ากัน และยังพบอีกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มียีน *vacA* มีประสิทธิภาพในการเข้าสู่เซลล์ HEP-2 ได้ดีกว่าเซลล์เยื่อกระเพาะที่ได้จากคนไข้(57) ในการศึกษาการเกาะติด และกระบวนการ Internalization ของเชื้อ *H. pylori* กับเซลล์ HEP-2(58) พบว่าเซลล์ HEP-2 นั้นมี

ความสามารถที่รวดเร็วในการจับกับเชื้อ *H. pylori*, เซลล์ HEp-2 ต้องการ N-acetylneuraminyllactose-binding adhesin ของเชื้อ *H. pylori* ในการจับกับเซลล์ HEp-2 และพบว่าในการเติม Dansylcadaverine ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของ receptor ของเซลล์ HEp-2 สามารถหยุดยั้งการรับเชื้อ *H. pylori* เข้าไปในเซลล์ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเกาะติดของเชื้อกับเซลล์ได้ และการศึกษาวิจัยยังพบอีกว่า การบ่มเชื้อ *H. pylori* ร่วมกับเซลล์ HEp-2 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่สามารถยับยั้งการเกาะติดของเชื้อกับเซลล์ได้

### ระบาดวิทยาของเชื้อ *Helicobacter pylori*

การศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อแบคทีเรียมักแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ทางด้วยกัน ได้แก่ 1) การศึกษาแหล่งที่มาของโรค (source of infection), 2) การศึกษาเส้นทางการติดต่อของโรค (route of transmission) และ 3) การศึกษาความชุกของโรค (prevalence of infection) มีการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ *H. pylori* นับตั้งแต่มีการค้นพบเชื้อ *H. pylori* มากมาย ทำให้คำถามหลายคำถามได้รับการตอบ แต่ก็ยังมีอีกหลายคำถามที่ยังเป็นที่โต้เถียงกันมาอย่างไม่สิ้นสุดจนถึงปัจจุบัน

### แหล่งที่มาของการติดเชื้อ (Source of infection)

มีการศึกษาจำนวนมากที่มีวัตถุประสงค์ที่จะเข้าใจถึงแหล่งที่มาของเชื้อ *H. pylori* จากสิ่งแวดล้อม การศึกษาส่วนใหญ่จำเพาะลงไปที สัตว์ และแหล่งน้ำ ว่าเป็นแหล่งที่มาของเชื้อ *H. pylori* ในช่วงแรกๆมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อ *H. pylori* เป็นเชื้อที่ติดต่อมาจากสัตว์ (zoonosis) เนื่องจากการศึกษาทางน้ำเหลืองวิทยา (serology) พบว่าความชุกของการติดเชื้อ *H. pylori* ในคนงานโรงฆ่าสัตว์ หรือคนที่ทำงานที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ มีการติดเชื้อ *H. pylori* สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับคนที่ไม่ได้ทำงานเกี่ยวกับสัตว์(59) ในการค้นพบนี้เป็นที่กังขา และมีคำถามต่างๆตามมา แต่ในปัจจุบันได้มีคำอธิบายเกี่ยวกับความชุกของการติดเชื้อ *H. pylori* ในคนที่ทำงานที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ว่า มาจากการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม(cross reaction) ระหว่างแอนติบอดีของเชื้อ *H. pylori* กับแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารชนิดอื่น ได้แก่ *Campylobacter jejuni* (60) จากการศึกษาของ Dore และคณะ(61)พบว่าในคนเลี้ยงแกะบนเกาะ Sardinian ในประเทศอิตาลี ที่มีการคลุกคลีอยู่กับฝูงแกะ และสุนัขเลี้ยงแกะมีการติดเชื้อ *H. pylori* ถึงร้อยละ 98 ซึ่งสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสมาชิกในครอบครัวที่มีหน้าที่เกี่ยวกับการดูแลสัตว์ซึ่งมีการติดเชื้อ *H. pylori* ร้อยละ 73 และจากผู้ป่วยโรคเลือดซึ่งมีการติดเชื้อ *H. pylori* ร้อยละ 46 ผู้วิจัยได้สรุปว่าวงจรการติดเชื้อ *H. pylori* ในกรณีนี้ในสิ่งแวดล้อมมาจากสัตว์(แกะ และสุนัข) และมนุษย์ด้วยกัน ในการศึกษาทางน้ำเหลืองวิทยาถึงความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์เลี้ยง กับเจ้าของในการติดเชื้อ *H. pylori* พบว่าผลที่ได้ไม่

สนับสนุนว่าแหล่งที่มาของโรคมาจากสัตว์(62) ในการทดลองจำแนกเชื้อ *H. pylori* จากกระเพาะอาหารของแมวที่ไม่มีพยาธิสภาพของการติดเชื้อ *H. pylori* โดย Handt และคณะ(63)พบว่าแมวอาจจะเป็นพาหะกักตุนเชื้อ(reservoir host)ที่สำคัญ มีการทดลองที่บ่งบอกว่าแมลงวันบ้านเป็นตัวนำพาให้เกิดการติดเชื้อ *H. pylori*(64) ซึ่งสันนิษฐานว่าแมลงวันบ้านซึ่งกินอุจจาระของมนุษย์เป็นพาหะของการติดเชื้อ *H. pylori* แต่ก็มีการศึกษาพบว่าแมลงวันบ้านไม่ได้เป็นพาหะของการติดเชื้อ *H. pylori* และก็ได้เป็นพาหะกักตุนเชื้อ *H. pylori*(65)

แหล่งที่มาของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการรายงานเป็นอันดับแรกโดย Klein และคณะ(66) มีการเสนอว่าน้ำดื่มเป็นแหล่งที่มาของเชื้อ *H. pylori* จากการศึกษาของพวกเขาพบว่าเด็กในประเทศเปรูที่ใช้น้ำจากนอกระบบสาธารณูปโภคมีการติดเชื้อ *H. pylori* มากกว่าเด็กที่ใช้น้ำจากระบบสาธารณูปโภคถึง 3 เท่า ถึงแม้ว่าในขณะนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ยังไม่เป็นที่ประสบความสำเร็จ ในโคลัมเบียพบว่าการติดเชื้อ *H. pylori* ในเด็กมีความสัมพันธ์กับการว่ายน้ำมากกว่า 1 ครั้งใน 1 ปี ในแม่น้ำ, น้ำตก และ สระว่ายน้ำ(67) ในตอนใต้ของอเมริกา Hopkins และคณะได้ศึกษาพบว่าเด็กที่บริโภคผักที่ไม่ผ่านการปรุงสุก ซึ่งผักนั้นปนเปื้อนน้ำที่ไม่สะอาด มีการติดเชื้อ *H. pylori* อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์นี้พบในเด็กที่มีอายุมากกว่า 5 ปี(68) มีหลายการศึกษาที่มีการค้นพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะกับ primer ของยีน *ureH* ของเชื้อ *H. pylori* ในแหล่งน้ำจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ บ่อน้ำ, น้ำพุตามธรรมชาติ, แม่น้ำ และทะเล แต่ไม่พบในน้ำประปาในประเทศญี่ปุ่น(69) ถึงแม้ว่าหลายๆการศึกษานับสนับสนุนข้อสันนิษฐานที่ว่าแหล่งน้ำเป็นแหล่งที่มาของเชื้อ *H. pylori* แต่ก็มีหลายปัจจัยสำคัญที่ต้องพิจารณา ประการแรก การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ไม่ได้บ่งบอกถึงการมีเชื้อ *H. pylori* ที่มีชีวิตอยู่ในแหล่งน้ำ ประการที่ 2 ความจำเพาะของการทำ PCR มีความเป็นไปได้ว่าสิ่งที่ตรวจพบอาจไม่ใช่เชื้อ *H. pylori* แต่เป็นเชื้อ *Helicobacter spp.* อื่นๆที่ไม่ทราบแน่ชัดก็เป็นได้ มีความพยายามที่จะทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* จากแหล่งน้ำแต่ก็ยังไม่เป็นที่สำเร็จ จึงมีข้อสันนิษฐานถึงการเพาะเลี้ยงที่ไม่สำเร็จนั้นมีผลมาจากความจริงที่ว่าเมื่อเชื้อ *H. pylori* สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเชื้อ *H. pylori* จะอยู่ในรูปที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ คือ อยู่ในรูป coccoid(70) ถึงแม้ว่ามีการศึกษาที่พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่อยู่ในรูป coccoid ไม่ใช่รูปแบบของเชื้อ *H. pylori* ที่มีชีวิตแต่เป็นลักษณะของเชื้อ *H. pylori* ที่เข้าสู่ระยะที่เริ่มมีการตายของเซลล์(71) โดยสรุปแล้วการค้นหาแหล่งที่มาของเชื้อ *H. pylori* จากสิ่งแวดล้อมอาจยังมีข้อกังขาอยู่ เนื่องจากมีความเป็นไปได้น้อยมากที่เชื้อ *H. pylori* สามารถมีชีวิตอยู่รอดในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ

## วิธีการแพร่เชื้อ(Route of transmission)

เป็นเรื่องที่ยากที่จะบอกว่าเส้นทางการติดต่อของเชื้อ *H. pylori* จริงๆแล้วมาจากทางไหน ในปัจจุบันการศึกษาเส้นทางการติดต่อของเชื้อ *H. pylori* เป็นเรื่องที่มีการศึกษามากที่สุดใน การศึกษาด้านระบาดวิทยาของเชื้อ *H. pylori* มีการคาดเดาเส้นทางการติดต่อของเชื้อ *H. pylori* ไว้หลายทางด้วยกัน ได้แก่ การติดต่อจากทางกระเพาะสู่ปาก (gastro-oral transmission), การติดต่อจากทางปากสู่ปาก (oral-oral transmission) และการติดต่อจากทางอุจจาระสู่ปาก (fecal-oral transmission) เป็นต้น แต่ความพยายามที่จะสอบสวนก็มีปัญหาอยู่คือ เชื้อ *H. pylori* จากตัวอย่างที่มาจากอุจจาระ หรือมาจากช่องปาก มักมีแบคทีเรียชนิดอื่นปะปนมาด้วย และแบคทีเรียเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าเชื้อ *H. pylori* ทำให้ไม่เห็นการเจริญเติบโตเชื้อ *H. pylori*

หลักฐานที่ยืนยันว่าเส้นทางการติดต่อของเชื้อ *H. pylori* มาจากทางกระเพาะสู่ปาก ใน การศึกษาของเหลวจากกระเพาะอาหารของคนไข้ที่ติดเชื้อ *H. pylori* พบว่าร้อยละ 58 ของคนไข้ สามารถตรวจพบเชื้อ *H. pylori* ได้ ทำให้มีความเป็นไปได้ว่าการอาเจียนเอาของเหลวจาก กระเพาะอาหารออกมาเป็นหนทางหนึ่งในการส่งผ่านของเชื้อ *H. pylori*(72) ในการสัมผัสโดยตรง กับสารคัดหลั่งจากกระเพาะอาหารมีความเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงของการติดเชื้อ *H. pylori* ซึ่งมีการ รายงานในกลุ่มของแพทย์ทางระบบทางเดินอาหาร(73) มีการสันนิษฐานว่าการอาเจียนเป็นทางที่ เป็นไปได้มากที่สุดในการติดต่อของเชื้อ *H. pylori* ถึงแม้ว่าเวลานี้จะยังมีหลักฐานสนับสนุนแนวคิด นี้ไม่มากนัก แต่การอาเจียน และการนำวัตถุที่ออกมาจากกระเพาะอาหารเข้าสู่ปาก สามารถพบได้ ทั่วไปในเด็ก หลักฐานหนึ่งที่สนับสนุนแนวคิดนี้มาจากการศึกษาของ Leung และคณะ(74) ใน การศึกษาเด็ก 4 คนที่เป็นโรคลำไส้อักเสบ และมีการอาเจียน พบว่า 1 คนของเด็กเหล่านี้สามารถ ตรวจพบการติดเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธีทางน้ำเหลืองวิทยา อีก 2 คนสามารถตรวจพบเชื้อ *H. pylori* ในอาเจียนด้วยวิธี PCR ที่น่าสนใจก็คือ เด็กที่เหลืออีก 1 คนที่ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *H. pylori* ทั้งทางน้ำเหลืองวิทยา และวิธี PCR เมื่อผ่านไป 6 เดือน เด็กคนนี้สามารถตรวจพบเชื้อ *H. pylori* ในอาเจียนได้ด้วยวิธี PCR อีกการทดลองหนึ่งที่สนับสนุนแนวคิดนี้มาจากการทดลองของ Parsonnet และคณะ(75) ในการศึกษาสามารถทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ได้ร้อยละ 100 จากอาเจียนของตัวอย่างที่เป็นผู้ใหญ่ ที่น่าสนใจก็คือ มีการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* จากอากาศใน ระยะ 0.3 เมตรจากบริเวณที่อาเจียน สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* 6 ตัวอย่างจาก 16 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 37.5 แต่เมื่อทำการเพาะเชื้อ *H. pylori* จากอากาศในระยะ 1.2 เมตรจากบริเวณที่ อาเจียนไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ได้

มีความพยายามที่จะทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* จากสิ่งตัวอย่างที่มาจากช่องปากแต่ ในหลายๆการทดลองก็ไม่ประสบความสำเร็จ ในการศึกษาแรกๆของ Krajden และคณะ(76) ในการ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* จาก dental plaque ของคนไข้ที่มีผลการทดสอบขึ้นเนื่องจากกระเพาะอาหารพบการติดเชื้อ *H. pylori* 29 ราย พบว่ามีเพียง 1 ตัวอย่างที่ทำการเพาะเลี้ยงสำเร็จ ในการศึกษาของ Ferguson และคณะ(77) พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* จาก dental plaque ได้ 1 ตัวอย่างจาก 9 ตัวอย่างของคนไข้ที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความเหมือนกันของเชื้อ *H. pylori* ที่เพาะได้จาก dental plaque กับที่เพาะได้จากกระเพาะอาหารด้วยวิธี restriction fragment length polymorphism พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่เพาะได้จาก dental plaque และกระเพาะอาหารมีลักษณะที่เหมือนกัน อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* จากสิ่งตัวอย่างที่มาจากช่องปากซึ่งจะสนับสนุนว่าเส้นทางการติดต่อของเชื้อ *H. pylori* มาจากทางกระเพาะสู่ปากยังทำได้ยาก แต่ก็ยังมีการรายงานการศึกษาออกมาเรื่อยๆในปัจจุบัน

หลักฐานที่ยืนยันว่าเส้นทางการติดต่อของเชื้อ *H. pylori* มาจากทางอุจจาระสู่ปาก ครั้งแรกในปี 1992 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ที่มาจากการอุจจาระ(78) นอกจากนี้ยังมีการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* จากอุจจาระ มีผลการรายงานที่หลากหลายออกไปว่าสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ 25-90% ของตัวอย่าง(79, 80) ซึ่งบางรายงานก็มีการรายงานว่าการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* จากอุจจาระได้ต่ำกว่า 10% ของตัวอย่าง(81) จึงเป็นไปได้ว่าอุจจาระเป็นอีกทางหนึ่งในการแพร่กระจายการติดต่อของเชื้อ *H. pylori*

### อัตราการติดเชื้อ(Prevalence of infection)

ระบาดวิทยาและการแพร่กระจายของเชื้อ *H. pylori* เชื้อนี้มีอัตราการติดเชื้อในประชากรกว่าครึ่งหนึ่งของโลก โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนามีอัตราการติดเชื้อนี้สูงถึง 70-90%(82) ในประเทศไทยพบอัตราการติดเชื้อประมาณ 55% ในประชากรเด็กจนถึงอายุ 30 ปี และในผู้ใหญ่ อายุ 30 ปีขึ้นไปพบอัตราการติดเชื้อสูงถึง 55-70%(83) กลไกการแพร่ระบาดของเชื้อเกิดจากการติดเชื้อจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่งโดยสันนิษฐานได้หลายทาง ได้แก่ gastro-oral transmission, oral-oral transmission และ Fecal-oral transmission เป็นต้น ปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่ระบาด เช่น สภาพทางเศรษฐกิจและสังคม ประเทศที่ยากจนหรือประเทศที่กำลังพัฒนาพบว่ามีอัตราการติดเชื้อสูงกว่าประเทศที่พัฒนา สุขลักษณะและความสะอาดที่ไม่ดี ที่อยู่อาศัยที่แออัด และระดับการศึกษาที่น้อย เหล่านี้พบว่ามีผลทำให้อัตราการระบาดของเชื้อสูง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงปัจจัยที่ทำให้ติดเชื้อ *H. pylori* อื่นๆ เช่น การดื่มสุรา (84) และการสูบบุหรี่(85) เป็นต้น พบว่าการดื่มสุราไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ *H. pylori* แต่จากการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาในคนจีน พบว่าการสูบบุหรี่จัดมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ *H. pylori* ส่วนในประเทศไทย (86) พบว่าการดื่มสุราไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ *H. pylori*

## การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

การวินิจฉัยเชื้ออาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นหลักซึ่งมีหลายวิธีด้วยกัน(87) คือ

1. วิธี invasive ซึ่งต้องทำการตัดชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยมาทำการทดสอบ

1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อทางห้องปฏิบัติการ วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะมากที่สุด แต่มีข้อเสีย คือ ใช้เวลานาน(1-2 สัปดาห์) ยุ่งยากต้องการภาวะพิเศษ คือ อาหารที่สมบูรณ์ อาหารที่นิยมใช้เลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ได้แก่ Bucella agar หรือ Columbia agar ที่ผสมเลือด 7-10% พบว่าเมื่อใช้เลือดม้าเชื้อจะเจริญได้ดีกว่าเลือดแกะ ต้องการสภาวะอากาศน้อย(microaerophilic) 3-7%O<sub>2</sub>, 5-10%CO<sub>2</sub>, 10%H<sub>2</sub> โดยปกติจะเลี้ยงในโถไร้อากาศ(Anaerobic jar) ที่มีชุดผลิตก๊าซ (Gaspak, gas-generation Kit)

1.2 การทดสอบเอนไซม์ Urease วิธีนี้เป็นวิธีที่แพทย์ใช้กันบ่อยที่สุด โดยตัดชิ้นเนื้อบริเวณ antrum ของเยื่อบุกระเพาะอาหารใส่ในชุดทดสอบสำเร็จรูป เช่น CLO test, ProntoDry และ HpONE ซึ่งสามารถอ่านผลการทดสอบภายใน 24 ชั่วโมง ผลบวกจะเห็นการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีชมพูอมแดง แสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ urease วิธีนี้มีความไวและความจำเพาะสูง 89-98% และ 93-98% ตามลำดับ

1.3 การตรวจโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส(Polymerase chain reaction, PCR) โดยทำการตรวจหาชิ้นที่จำเพาะของเชื้อ *H. pylori* เช่น 16S rRNA, random chromosomal sequence, 26-kDa species-specific antigen (SSA), urea A และ glmM เป็นต้น โดยพบว่า glmM มีความไวและความจำเพาะสูงสุด(88) วิธีPCR ยังมีข้อดีคือ ใช้ตัวอย่างน้อยมาก

1.4 การตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยนำชิ้นเนื้อมาย้อมสี เช่น Giemsa สี Warthin-Starry (WS staining) การย้อมด้วยสารเรืองแสง โดยใช้แอนติบอดีที่เรืองแสงและดูภายใต้กล้อง ซึ่งมีความไวและความจำเพาะ เท่ากับ 93-98% และ 95-98% ตามลำดับ(89)

2. วิธีที่ non-invasive ซึ่งใช้การตรวจจากลมหายใจ จากเลือด อุจจาระ และน้ำลาย

2.1 การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อตัวเชื้อ *H. pylori* จากเลือดของผู้ป่วย วิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถทำการตรวจตัวอย่างได้ครั้งละเป็นจำนวนมากเหมาะกับการศึกษาทางระบาดวิทยา และมีการผลิตเป็นชุดสำเร็จรูปจำหน่าย แต่ข้อเสียคือ ขาดความจำเพาะ เนื่องการตรวจแอนติบอดีไม่สามารถแยกแยะระหว่างการติดเชื้อปัจจุบัน และการติดเชื้อในอดีตที่หายแล้วได้

2.2 การตรวจ urea breath test เป็นการทดสอบอัตราในการใช้ urea ของคนไข้โดยการให้คนไข้ดื่ม urea ที่มี carbon isotope เป็นส่วนประกอบ เช่น C<sup>13</sup> และ C<sup>14</sup> จากนั้นทำการวัด

carbon isotope จากลมหายใจของคนไข้ วิธีนี้มีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 85-96% และ 90-100% ตามลำดับ(90)

### การรักษา

การรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหาร ในปัจจุบันนี้การรักษาโดยใช้เคมีบำบัดเป็นหลัก ในการกำจัดเชื้อ *H. pylori* ที่ได้ผลดี คือการรักษาพร้อมกันของยา 3 ชนิด (Triple therapy) ซึ่งประกอบไปด้วย ยาลดกรดในกระเพาะอาหาร (gastric acid inhibitor) 1 ชนิด และยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด เช่น metronidazole, amoxicillin หรือ clarithromycin แต่ในปัจจุบันเชื้อ *H. pylori* มีการดื้อต่อยา metronidazole, clarithromycin และ tetracycline เพิ่มขึ้น(91) ระยะเวลาในการให้ยานาน 7 วัน หลังจากหยุดให้ยาแล้วควรมีการติดตามการรักษาโดยทั่วไปการติดตามผลการรักษาอาศัยการดูอาการเป็นสำคัญไม่จำเป็นต้องส่องกล้องตรวจ หรือตรวจยืนยันเชื้อซ้ำอีก ยกเว้นแต่มีอาการแสดงออก หรือเป็นความต้องการของคนไข้

การดื้อยาของเชื้อ *H. pylori* ทั่วไปของเชื้อมักจะพบการดื้อในยาปฏิชีวนะ nitronidazole พบว่าเชื้อ *H. pylori* ประมาณร้อยละ 35 มีการดื้อยาชนิดนี้ โดยมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) > 8 µg/ml (92) แต่ในประเทศกำลังพัฒนาอัตราการดื้อยานี้มีสูงมากกว่า ร้อยละ 35 การดื้อยาที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดมาจากการใช้ยา metronidazole เป็นจำนวนมากทำให้เกิดผลต่อการดื้อยา nitronidazole ต่อมาเนื่องจากเป็นยาในกลุ่มเดียวกัน ปรากฏการณ์ของการดื้อยาของเชื้อ *H. pylori* ในยาในกลุ่ม macrolide เช่น clarithromycin และ erythromycin เป็นต้น พบว่ามีต่ำกว่า คือมีการดื้อยาอยู่ที่ร้อยละ 10 โดยมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) > 2 µg/ml (93) ส่วนการดื้อยา amoxicillin และ tetracycline พบได้น้อยมาก อย่างไรก็ตามปรากฏการณ์ของการดื้อยา amoxicillin และ tetracycline มีแนวโน้มสูงขึ้นในหลายๆประเทศ เช่น อิตาลี, บราซิล และอินเดีย เป็นต้น(94-96) แต่ก็มีรายงานอัตราการดื้อของยาทั้ง 2 ชนิดนี้ถึงร้อยละ 72(97)

### สมุนไพรรักษาการติดเชื้อ *Helicobacter pylori*

เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* เป็นการรักษาที่มีค่าใช้จ่ายสูง และยังพบการดื้อยาของเชื้อ ทำให้การรักษาไม่ประสบผลสำเร็จ จึงมีความสนใจในการศึกษาผลของสมุนไพรรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* เนื่องจากสมุนไพรมีพืชที่ใช้ในชีวิตประจำวัน มีราคาถูกลง และไม่เกิดผลข้างเคียงในการใช้ ทำให้มีการศึกษาถึงผลของสมุนไพรรักษาเชื้อ *H. pylori* เป็นจำนวนมากในหลายๆด้านด้วยกัน โดยเฉพาะผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ มีการทำการศึกษาแพร่หลายกันในหลายๆประเทศ ได้แก่ การศึกษาพืชที่ใช้ในการปลูก

อาหารของประเทศอังกฤษในการยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* (98) พบว่า columbo weed, ดีปลี, ผักชีฝรั่ง, tarragon, ลูกจันทน์เทศ, yellow-berried nightshade, threadstem carpetweed, sage และ อบเชย สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ การศึกษาสารสกัดจากผลแอฟริคอตของประเทศญี่ปุ่นในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* (99) พบว่าสกัดจากผลแอฟริคอตสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* ได้มากกว่า 90% ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml, การศึกษาสารประกอบใน cranberry (8) พบว่าที่ความเข้มข้น 0.2 mg/ml สารสามารถยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* ได้ เป็นต้น

ในบางการศึกษาลงลึกไปถึงสารสกัดที่จำเพาะในสมุนไพรนั้นๆ ต่อผลที่เกิดกับเชื้อ *H. pylori* เช่น การศึกษาสาร pectin-like acidic polysaccharide จากโสมเกาหลี (100) ในการยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียชนิดต่างๆ พบว่าสารนี้ไม่มีผลต่อการเกาะติดของเชื้อแบคทีเรีย แต่ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*, การศึกษาสาร plumbagin ที่สกัดได้จากสมุนไพรเจตมูลเพลิงขาวในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* (101) พบว่าสารนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้น 0.02-0.16 mg/ml และ การศึกษาสาร curcumin จากขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* (102) พบว่าสารนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้น 6.25-50 µg/ml เป็นต้น

มีการศึกษาสมุนไพรไทยต่อเชื้อ *H. pylori* หลายการศึกษา และหลายสมุนไพรด้วยกัน เช่น การศึกษาเครื่องเทศและพืชที่ใช้เป็นอาหารของคนไทย พบว่า ดอกจันทน์เทศ, ใบต้นจิก, เปราะหอม และ กานพลู สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* (9) พบว่าจากการทดสอบค่า minimum inhibitory concentration (MIC) อยู่ในช่วง 12.5-100 µg/ml โดยดอกจันทน์เทศมีค่า MIC สูงที่สุดที่ 12.5 µg/ml, การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสมุนไพรสมอไทย (103) พบว่าสมอไทยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้น 1-2.5 mg/ml, การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ของกระเทียม (104) พบว่าผงกระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้น 8-32 µg/ml ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากกระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้น 250-500 µg/ml, การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ในสายพันธุ์ที่มียีน *cagA* ของซิง (105) พบว่าสารสกัดเมทานอลของซิงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้น 6.25-50 µg/ml และ การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ของกล้วย (106) พบว่ากล้วยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้น 0.32-1000 µg/ml เป็นต้น จะเห็นได้ว่าการศึกษาสมุนไพรกับผลต่อเชื้อ



*H. pylori* มีแนวโน้มการรายงาน และการศึกษาที่มากขึ้น เป็นไปได้ว่าการใช้สมุนไพรในการป้องกัน และรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* อาจเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจต่างให้มีความสำคัญ

### กระชายดำ

กระชายดำ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Kaempferia parviflora* อยู่ในตระกูล Zingiberaceae ลักษณะต้นและหัว เป็นพันธุ์ไม้ล้มลุกที่มีลำต้นใต้ดินลักษณะเป็นแงงหรือเหง้า หัวคล้ายกระชาย แต่มีขนาดใหญ่กว่า มีกลิ่นหอม ใบ ก้านใบแทงขึ้นจากหัวใต้ดินขนาดใบกว้าง 7-9 cm ยาว 30-35 cm มีสีเขียวเข้ม ท้องใบมีพรายปรอทเนื้อใบละเอียด ลักษณะใบรูปรี ดอก เป็นดอกเดี่ยวแบบสมมาตรด้านข้าง (zygomorphic symmetry) รูปดอกเป็นรูปปากเปิด (bilabiate) กลีบดอกมีการเรียงตัวแบบควินคันเชียล (quincuncial) สีขาวอมชมพู สรรพคุณ ลดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ แน่นจุกเสียด การที่กระชายดำช่วยลดอาการท้องอืดเฟ้อได้ เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยช่วยขับลม ช่วยให้อาการท้องอืดและลำไส้เคลื่อนไหวดีขึ้น การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกระชายดำยังมีไม่มากนัก แต่ผลจากการศึกษาฤทธิ์ของกระชายดำเป็นที่น่าสนใจอย่างมาก อันได้แก่ การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของผงกระชายดำในสัตว์ทดลอง ผลการทดลองพบว่า หนูที่ได้รับกระชายดำทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น อาการ และสุขภาพไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่บ่งชี้ว่าเกิดจากความเป็นพิษของกระชายดำ(12) จากการศึกษาคุณสมบัติในการต้านจุลชีพของกระชายดำพบว่า น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากกระชายดำสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ได้ (11) และ การศึกษาสารประกอบของกระชายดำ พบว่าสารที่มีในเหง้ากระชายดำ ได้แก่ borneol, sylvestrene มีฤทธิ์ต้าน *Mycobacterium tuberculosis* และสาร 5,7- dimethoxyflavone (5,7 DMF) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ นอกจากนี้ ยังมีสารอื่นๆ เช่น สาร 5,7,4-trimethoxyflavone, 5,7,3,4-tetramethoxyflavone แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Plasmodium falciparum*, 3,5,7,4 - tetramethoxyflavone แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* เป็นต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

Boric acid, Absolute ethanol, Triton x-100, Hexane, Ethyl acetate และ Chloroform  
สั่งซื้อจากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

GenePure LE Agarose สั่งซื้อจากบริษัท Bioexpress ประเทศสหรัฐอเมริกา

Isopropyl alcohol, Ethylenediaminetetraacetic acid, Gemtamycin และ Poly-L-lysine  
สั่งซื้อจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

Tris Base และ Wizard Genomic DNA Purification Kit สั่งซื้อจากบริษัท Promega  
ประเทศสหรัฐอเมริกา

Ethidium Bromide, EtBr สั่งซื้อจากบริษัท Plusone ประเทศสวีเดน

100 bp ladder, M-MuLV Reverse Transcriptase และ dNTP สั่งซื้อจากบริษัท New  
England Biolabs ประเทศสหรัฐอเมริกา

Methanol สั่งซื้อจากบริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา

Agar bacteriological, Brain heart infusion และ Mueller-hinton agar สั่งซื้อจากบริษัท  
Oxoid ประเทศอังกฤษ

Hank' balanced salt solution และ trypan blue สั่งซื้อจากบริษัท Gibco ประเทศ  
สหรัฐอเมริกา

Dulbecco's Modified Eagle's Medium สั่งซื้อจากบริษัท JRH sciences ประเทศ  
สหรัฐอเมริกา

Fetal bovine serum, Trypsin/EDTA และ Antibiotic/Antimycotic สั่งซื้อจากบริษัท  
PAA laboratories ประเทศออสเตรเลีย

Real Taq DNA polymerase สั่งซื้อจากบริษัท Real biotech ประเทศไต้หวัน

TRIZOL<sup>®</sup> Reagent สั่งซื้อจากบริษัท Invitrogen ประเทศสหรัฐอเมริกา

RNase-Free DNase Set สั่งซื้อจากบริษัท Qiagen ประเทศสหรัฐอเมริกา

LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I สั่งซื้อจากบริษัท Roche  
ประเทศเยอรมัน

## วิธีการทดลอง

### 1. พืชสมุนไพร

ในการศึกษาครั้งนี้ จะเลือกศึกษาสมุนไพรที่หาซื้อได้ง่ายตามท้องตลาด หรือสมุนไพรที่ใช้ในครัวเรือนทั้งสิ้น 9 ชนิด ดังนี้ กระชายดำ, กระเทียม, กลั้ว, ขมิ้นชัน, ตะไคร้, ใบบัวบก, ฟ้าทะลายโจร, ว่านหางจระเข้ และ ลำต้นโหระพา ทำการบั่นทีกน้ำหนัก ลักษณะ รูปร่าง สี และแหล่งที่มา เพื่อใช้เตรียมสารสกัดต่อไป

### 2. การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร

#### 2.1. สารสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายเมทานอล(Methanol)

สารสกัดเมทานอลของ กระชายดำ, กระเทียม, กลั้ว, ขมิ้นชัน, ตะไคร้, ใบบัวบก, ฟ้าทะลายโจร, ว่านหางจระเข้ และ ลำต้นโหระพา เป็นสารสกัดที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำการชั่งน้ำหนักสารสกัดสมุนไพรจากตัวทำละลายเมทานอลแล้วนำมาละลายใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้นดังตารางที่ 3.1 นำมาทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านตัวกรอง (Minisart ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ

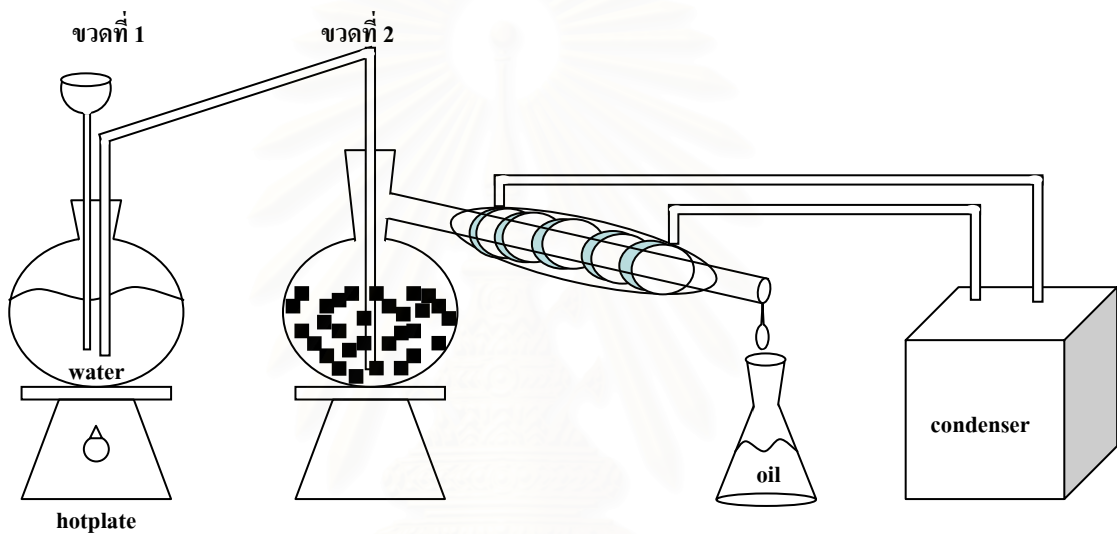
สมุนไพร	ความเข้มข้น (กรัมต่อมิลลิลิตร)
กระชายดำ	0.25
กระเทียม	0.5
กลั้ว	0.5
ขมิ้นชัน	0.5
ตะไคร้	1.0
ใบบัวบก	1.0
ฟ้าทะลายโจร	0.5
ว่านหางจระเข้	1.0
ลำต้นโหระพา	0.5

## 2.2. การเตรียมสารสกัดจากกระชายดำ

นำกระชายดำที่ได้มาทำการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา แล้วผึ่งลมทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 1 คืน นำมาหั่นด้วยมีดให้ละเอียดบรรจุใส่ถุงพลาสติก นำไปชั่งน้ำหนัก และบันทึกผลไว้ เพื่อที่จะนำไปทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยต่อไป

### 2.2.1. การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำใช้วิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ(Hydrodistillation)



รูปที่ 3.1 ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย

นำกระชายดำที่สับละเอียดปริมาณ 1 กิโลกรัมใส่ในขวดที่ 2 ของชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย ส่วนในขวดที่ 1 ซึ่งตั้งอยู่บนเครื่องกวนสารให้ความร้อน (hotplate) จะทำการเติมน้ำลงไป ต้มน้ำให้เดือดกลายเป็นไอ ไอน้ำจะถูกส่งผ่านมาตามท่อมาสู่ขวดที่ 2 ซึ่งบรรจุกระชายดำ สับละเอียด ไอน้ำจะนำพาเอาน้ำมันหอมระเหยของกระชายดำออกมาจากขวดที่ 2 ผ่านออกมาตามท่อที่หล่อไว้ด้วยน้ำเย็น เมื่อไอน้ำและน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำมาพบกับความเย็น ก็จะกลั่นตัวเป็นหยดน้ำและหยदन้ำมัน การแยกหยदनน้ำออกจากหยदनน้ำมันทำได้โดยการใช้กรวยแยก (separating funnel) ชั่งน้ำหนักน้ำมันหอมระเหยสกัดที่ได้ และบันทึกผล จากนั้นชั่งน้ำหนักน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำปริมาณ 0.25 กรัม ละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อ โดยกรองผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร จะได้น้ำมันหอมระเหยพร้อมใช้ที่ ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *H. pylori* และฤทธิ์ต่อการบุกรุกเซลล์ HEp-2

ของเชื้อ *H. pylori* ต่อไป ส่วนกากกระชายดำที่ผ่านการสกัดน้ำมันหอมระเหยนำมาทำการอบให้แห้งด้วยตู้อบ(Thermotec 2000 oven ประเทศนิวซีแลนด์)ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน หรือจนกว่ากากกระชายดำจะแห้ง แล้วจึงนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (Hexane) ต่อไป

### 2.2.2. การสกัดกระชายดำด้วยตัวทำละลายเฮกเซน(Hexane)

การเตรียมสารสกัดจากกระชายดำด้วยตัวทำละลายเฮกเซนทำโดยนำกากกระชายดำที่แห้งแล้วจากการสกัดน้ำมันหอมระเหยมาใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร จากนั้นทำการเติมเฮกเซนปริมาตร 200 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ปิดปากขวดให้สนิท บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 2 วัน เมื่อครบ 2 วัน ทำการกรองแยกเฮกเซนออกจากกากกระชายดำด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำกากกระชายดำที่แยกได้มาทำการสกัดซ้ำเป็นครั้งที่ 2 นำสารสกัดเฮกเซนที่ได้จากการกรองครั้งที่ 1 และ ครั้งที่ 2 มารวมกัน นำไประเหยตัวทำละลายเฮกเซนออกโดยเครื่อง rotary evaporator(Heidolpb ประเทศเยอรมัน)ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกว่าตัวทำละลายเฮกเซนจะระเหยออกไปหมด ทำการชั่งสารสกัดกระชายดำจากตัวทำละลายเฮกเซนที่ได้ และบันทึกไว้ จากนั้นชั่งสารสกัดกระชายดำจากตัวทำละลายเฮกเซนปริมาณ 0.125 กรัมละลายใน DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตรนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร จะได้สารสกัดจากกระชายดำพร้อมใช้ที่ความเข้มข้น 0.125 กรัมต่อมิลลิลิตรเก็บไว้ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *H. pylori* และฤทธิ์ต่อการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ต่อไป ส่วนกากกระชายดำที่กรองแยกจากเฮกเซนนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสนาน 1-2 วัน เพื่อกำจัดเฮกเซนที่ตกค้างออกจากกากกระชายดำ สำหรับใช้ในการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต (Ethylacetate) ต่อไป

### 2.2.3. การสกัดกระชายดำด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต(Ethylacetate)

การเตรียมสารสกัดจากกระชายดำด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตทำได้โดยนำกากกระชายดำที่แห้งแล้วจากการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมาใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร จากนั้นทำการเติมเอทิลอะซิเตตปริมาตร 200 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ปิดปากขวดให้สนิท บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 2 วัน เมื่อครบ 2 วัน ทำการกรองแยกเอทิลอะซิเตตออกจากกากกระชายดำด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำกากกระชายดำที่แยกได้มาทำการสกัดซ้ำเป็นครั้งที่ 2 นำสารสกัดเอทิลอะซิเตตที่กรองครั้งที่ 1 และ ครั้งที่ 2 มา

รวมกัน นำไปประเหยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตดออกโดยเครื่อง rotary evaporator ทำเช่นเดียวกับในขั้นตอน 2.2.2 ทำการบั่นทึกน้ำหนักรวมของสารสกัดจากเอทิลอะซิเตดจากนั้นซึ่งสารสกัดกระชายดำจากเอทิลอะซิเตดปริมาณ 0.25 กรัม ละลายใน DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร จะได้สารสกัดกระชายดำจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตดพร้อมใช้ที่ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *H. pylori* และฤทธิ์ต่อการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ต่อไป ส่วนกากกระชายดำที่กรองแยกจากเอทิลอะซิเตดนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสนาน 1-2 วัน เพื่อกำจัดเอทิลอะซิเตดที่ตกค้างออกจากกากกระชายดำ สำหรับใช้ในการสกัดด้วยเมทานอล (Methanol) ต่อไป

#### 2.2.4. การสกัดกระชายดำด้วยตัวทำละลายเมทานอล(Methanol)

การเตรียมสารสกัดจากกระชายดำด้วยตัวทำละลายเมทานอล ทำได้โดยนำกากกระชายดำที่แห้งแล้วจากการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตดมาใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร จากนั้นทำการเติมเมทานอล ปริมาตร 200 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ปิดปากขวดให้สนิท บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบ 2 วัน ทำการกรองแยกเมทานอลออกจากกากกระชายดำด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำกากกระชายดำที่แยกได้มาทำการสกัดซ้ำเป็นครั้งที่ 2 นำสารสกัดเมทานอลครั้งที่ 1 และ ครั้งที่ 2 มารวมกัน นำไปประเหยตัวทำละลายเมทานอลออกโดยเครื่อง rotary evaporator ทำเช่นเดียวกับในขั้นตอน 2.2.2 ทำการบั่นทึกน้ำหนักรวมของสารสกัดจากเมทานอล ซึ่งสารสกัดกระชายดำจากเมทานอล ปริมาณ 0.25 กรัม ละลายใน DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร จะได้สารสกัดกระชายดำจากตัวทำละลายเมทานอลพร้อมใช้ที่ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *H. pylori* และฤทธิ์ต่อการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ต่อไป

### 3. การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Helicobacter pylori*

เชื้อ *H. pylori* ที่ใช้มีทั้งหมด 26 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน 4 สายพันธุ์คือ ATCC 43504, ATCC 43526, ATCC 51932 และ ATCC 51110 และสายพันธุ์ที่แยกจากคนไข้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.นพ.รัฐกร วิไลชนม์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จำนวน 20 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

2 สายพันธุ์ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกจากคนไข้ คือ DMST20165 และ DMST20885 ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion agar ที่ผสมเลือดแกะร้อยละ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72-96 ชั่วโมงใน Anaerobe jar ที่ใส่ CampyGen™ (Oxiod ประเทศอังกฤษ) เพื่อให้ได้สภาวะ 3-7% ออกซิเจน(O<sub>2</sub>), 5-10% คาร์บอนไดออกไซด์(CO<sub>2</sub>), 80-85% ไฮโดรเจน(H<sub>2</sub>)

#### 4. การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *H. pylori*

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *H. pylori* โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยทำการชุบเชื้อ *H. pylori* ที่เพาะเลี้ยงไว้บน Brain Heart Infusion agar เป็นเวลานาน 3 วันปริมาณ 1 หัวไม้ขีดไฟ มาทำการละลายใน Nuclei lysis solution ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการปิเปตตีขึ้นลง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีแล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม RNase solution ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15-60 นาที เติม Protein precipitation solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องเขย่าผสม นำไปแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วนำไปเข้าเครื่องปั่นตกตะกอน(Vision, micro high speed refrigerated centrifuge ประเทศเกาหลี) ปั่นที่ความเร็ว 13,000-16,000 g นาน 3 นาที ดูดสารละลายส่วนบนปริมาณ 600 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล (Isopropanol) 600 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยเครื่องเขย่าผสม นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000-16,000 g นาน 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งและคว่ำหลอดบนกระดาษทิชชูซับให้แห้ง จากนั้นเติม 70% เอทานอล ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องเขย่าผสม นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000-16,000 g นาน 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งและคว่ำหลอดบนกระดาษทิชชูนำไปทำให้แห้งโดยเครื่องปั่นแห้งสุญญากาศ (Thermosavant, speed vac DNA110 ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่ระดับ High นาน 5 นาที เติม DNA rehydration solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที หรือ บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการทดลองตรวจหายีน *cagA* ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสต่อไป

#### 5. การตรวจหายีน *cagA* ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เพื่อทำการตรวจสอบเชื้อ *H. pylori* ว่าสายพันธุ์ใดเป็นสายพันธุ์ที่มียีน *cagA* และสายพันธุ์ใดไม่มียีน *cagA* โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอน 4. มาทำการตรวจหายีน *cagA* ในการเตรียม 1

ปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า ปฏิกิริยา (1x reaction buffer), ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต(dNTP)ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์, *cagA* Forward primer(5' - GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG G -3' ) ความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์, *cagA* Reverse primer(5' - CTG CAA AAG ATT ATT TGG CAA GA -3') ความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์, Real Taq DNA Polymerase (Real Biotech Corporation, USA) ความเข้มข้น 0.025 ยูนิต, ดีเอ็นเอแม่แบบปริมาณ 10-100 นาโนกรัม นำไปเข้าเครื่อง thermocycle (MJ Research, PTC-200 Peltier thermal cycler ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่ตั้ง อุณหภูมิต่างๆไว้ดังนี้ ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที, ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, ขั้นที่ 5 วงกลับไปทำขั้นที่ 2-4 จำนวน 40 รอบ, ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และขั้นสุดท้าย อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำออกจากเครื่อง thermocycler นำผลผลิต PCR ที่ได้ไปทำการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้า(electrophoresis) บน บันไดอะกาโรส 2 % จากนั้นนำไปย้อมสีใน เอทีเดียมโบรไมด์(ethidium bromide) ที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร นาน 30 นาที ทำการ destain ในน้ำกลั่นนาน 10 นาที นำ บันไดอะกาโรส 2 % ไปถ่ายรูปแบบเครื่องกำเนิดแสงยูวี (UV transilluminator ประเทศอังกฤษ) บันทึกผลโดยใช้กล้อง(UVitec ประเทศอังกฤษ)จะเห็นผลผลิต PCR ขนาด 394 เบส

## 6. การวัดปริมาณเชื้อด้วยวิธีการวัดความขุ่น และการทำ plate count

ทำการวัดปริมาณเชื้อ *H. pylori* ตั้งต้นเพื่อจะได้ทราบปริมาณเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสมุนไพรไทยต่างๆที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* และการทดสอบความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* วิธีวัดความขุ่นทำโดยละลายเชื้อ *H. pylori* ลงใน 1 มิลลิลิตร ของ Hank' balanced salt solution (HBSS) ให้มีความขุ่นเท่ากับ 2, 3, 5, 8 และ 10 McFarland standard นำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu, UV-16001 ประเทศญี่ปุ่น) ที่ความยาวคลื่น 600 nm จากนั้นนำไปทำการเจือจางทีละ 10 เท่าจำนวน 5 หลอด จะได้ความเข้มข้นที่  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-5}$  นำเชื้อที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-5}$  ปริมาตร 100 ไมโครลิตรไปกระจาย(spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion agar ที่ผสมเลือดแกะร้อยละ 7 ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72-96 ชั่วโมงใน Anaerobe jar ที่ใส่ CampyGen™ เพื่อให้ได้สภาวะ 3-7% ออกซิเจน, 5-10% คาร์บอนไดออกไซด์, 80-85% ไฮโดรเจน ทำการนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีตั้งแต่ 30-300 โคโลนี คำนวณปริมาณเชื้อแบคทีเรียตั้งต้นที่ค่าความขุ่นต่างๆ จากสูตร



ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย(CFUต่อมิลลิลิตร) = จำนวนโคโลนีที่นับได้  $\times 10 \times$  dilution factor  
โดย dilution factor คือ ความเข้มข้นที่เจือจางเชื้อ *H. pylori* ใน HBSS

### 7. การทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสมุนไพรไทยต่างๆที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*

เพื่อคัดกรองสมุนไพรไทยที่ใช้รักษาโรคกระเพาะอาหารต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* โดยการทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (Minimum inhibitory concentration, MIC) ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ต่างๆ นำสารสกัดสมุนไพรที่เตรียมไว้มาเจือจางใน Mueller Hinton broth เป็นลำดับไป 2 เท่า (2 folded dilutions) ให้ได้ความเข้มข้นดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ความเข้มข้นของสมุนไพรชนิดต่างๆที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*

สมุนไพร	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )
น้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ	128, 256 และ 512
สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ	16, 32, 64, 128 และ 256
สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ	16, 32, 64, 128 และ 256
สารสกัดเมทานอลจากกระชายดำ	16, 32, 64, 128 และ 256
สารสกัดเมทานอลจากกระเทียม	2500 และ 5000
สารสกัดเมทานอลจากกล้วย	12500 และ 25000
สารสกัดเมทานอลจากขมิ้นชัน	16, 32, 64, 128 และ 256
สารสกัดเมทานอลจากตระไคร้	128, 256 และ 512
สารสกัดเมทานอลจากใบบัวบก	128, 256 และ 512
สารสกัดเมทานอลจากฟ้าทะลายโจร	128, 256 และ 512
สารสกัดเมทานอลจากว่านหางจระเข้	128, 256 และ 512
สารสกัดเมทานอลจากลำต้นโหระพา	128, 256 และ 512
DMSO	5% (v/v)

นำสารสกัดจากสमु่นไพรชนิดต่างๆที่เจือจางใน Mueller Hinton broth แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Mueller Hinton agar ที่เติมเลือดและร้อยละ 5 ปริมาตร 24 มิลลิลิตรลงไปเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เทลงบนจานเพาะเชื้อที่ทิ้งไว้ให้แห้งตัว ทำการละลายเชื้อ *H. pylori* ในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ให้มีความขุ่น  $1 \times 10^7$  ถึง  $1 \times 10^8$  CFU ต่อ มิลลิลิตร จุดเชื้อลงไปบนอาหารที่ผสมสารสกัดสमु่นไพรความเข้มข้นต่างๆจุดละ 3 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมงใน Anaerobe jar ที่ใส่ CampyGen™ เพื่อให้ได้สภาวะ 3-7% ออกซิเจน, 5-10% คาร์บอนไดออกไซด์, 80-85% ไฮโดรเจน อ่านผลความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดสमु่นไพรแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ( $\mu\text{g/ml}$ )

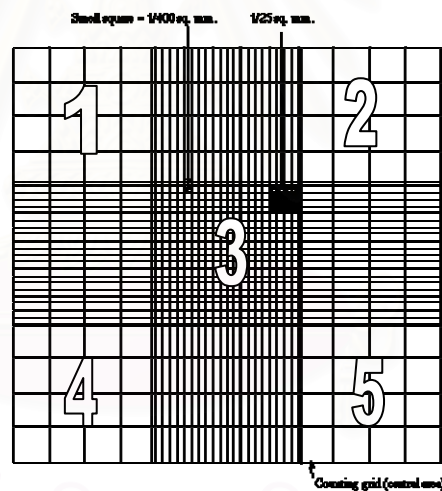
## 8. การเพาะเลี้ยงเซลล์ HEp-2

เซลล์เยื่อ Human larynx carcinoma (HEp-2) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.พรเทพ เทียนสิวกุล ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำเซลล์ HEp-2 ที่เพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร (T25) มาทำการล้างด้วย Hank' balanced salt solution (HBSS) โดยเทอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย HBSS 2 ครั้งๆละ 5 มิลลิลิตร เติม trypsin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรือเติมจนท่วมเซลล์ ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาทีสังเกตลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าเซลล์เริ่มมีลักษณะกลมหลุดแยกออกจากกันแต่ยังไม่หลุดออกจากผิวขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ เท trypsin ทิ้งไปแล้วทำการเคาะขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ด้านที่มีเซลล์ HEp-2 เกาะอยู่เพื่อให้เซลล์หลุดออกมา เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) ที่เติมซีรัม (fetal bovine serum, FBS) ร้อยละ 10 และ สารAntibiotic/Antimycotic (เพนนิซิลิน (Penicillin) ความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) ความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  และแอมโฟเทอริซิน บี (Amphotericin B) ความเข้มข้น 0.25  $\mu\text{g/ml}$ ) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดขวดขึ้นลงประมาณ 30 ครั้ง เพื่อให้เซลล์ HEp-2 หลุดจากขวดและแยกเป็นเซลล์เดี่ยวนับจำนวนเซลล์ และดูดเซลล์ใส่ในขวดใหม่ที่มีขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในปริมาณ  $2-5 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร หรืออาจประมาณโดยใช้อัตราส่วน 1:3-1:4 หรือใส่ในขวดใหม่ที่มีขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตรในปริมาณ  $2-5 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร หรืออาจประมาณโดยใช้อัตราส่วน 1:1-1:2 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มียาปฏิชีวนะ ให้มีปริมาตรสุดท้าย 5 มิลลิลิตรสำหรับขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ T25 หรือ 15 มิลลิลิตรสำหรับขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ T75 นำไปเลี้ยงภายในตู้  $\text{CO}_2$

incubator (Sheldon Manufacturing Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80%

### 9. การนับปริมาณเซลล์ HEp-2

เพื่อเตรียมเซลล์ให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงต่อไปในแต่ละครั้ง (passage) และใช้ในการทดสอบความสามารถในการเกาะติดและบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* จึงต้องทำการนับปริมาณเซลล์โดยนำเซลล์ HEp-2 ที่ถูก trypsin ให้หลุดจากขวดแล้ว มาในปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมกับสี trypan blue (Gibco ประเทศสหรัฐอเมริกา) 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้นาน 3-5 นาที ใช้ปิเปตดูดเซลล์ที่ผสมกับสีแล้วมาหยดลงบน Hemocytometer counting chamber ทั้ง 2 ข้าง โดยวาง cover slip ไว้ด้านบน ปล่อยให้ปิเปตแตะที่ขอบ cover slip ปล่อยให้เซลล์ซึมเข้าไปอย่างช้าๆ จนเต็ม ระวังไม่ให้ของเหลวล้นออกมา ทำการนับเซลล์ HEp-2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า นับเซลล์ที่ไม่ติดสีน้ำเงินในตารางจำนวน 5 ช่อง ตามรูปที่ 3



รูปที่ 3.3 Hemocytometer counting chamber

ทำการคำนวณปริมาณเซลล์ HEp-2 ตามสูตร

$$\text{จำนวนเซลล์ HEp-2 ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (เซลล์/ ลูกบาศก์เซนติเมตร)} = (\text{จำนวนเซลล์ HEp-2 ที่ไม่ติดสีน้ำเงิน} \div 5) \times \text{dilution factor} \times 10^4$$

โดย dilution factor คือ ความเข้มข้นที่เจือจางเซลล์ในสี trypan blue

### 10. การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*

เพื่อที่จะหาสภาวะต่างๆ ตั้งแต่สารที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์ HEp-2 แยก และปริมาณเชื้อ *H. pylori* ตั้งต้นที่เหมาะสมในการศึกษาการบุกรุกเซลล์ HEp-2 โดยทำการทดสอบ

สภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี Gentamicin internalization assay(58)

#### 10.1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ HEp-2 สำหรับการทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori*

การเตรียมเซลล์ HEp-2 สำหรับการทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* เริ่มต้นโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ HEp-2 ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด T75 จนมีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 70-80% ทำการเทอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก จากนั้นล้างเซลล์ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย HBSS ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เอียงขวดไปมา จากนั้นเท HBSS ที่ล้างซ้ำอีกครั้ง เติม trypsin ประมาณ 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที สังเกตลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าเซลล์เริ่มมีลักษณะกลมหลุดแยกออกจากกันแต่ยังไม่หลุดออกจากผิวขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ เท trypsin ทิ้งไปแล้วทำการเคาะขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ด้านที่มีเซลล์ HEp-2 เกาะอยู่เพื่อให้เซลล์หลุดออกมา เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มียาปฏิชีวนะ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดขวดขึ้นลงประมาณ 30 ครั้ง เพื่อให้เซลล์ HEp-2 หลุดจากขวดและแยกเป็นเซลล์เดี่ยว นับจำนวนเซลล์ตั้งขึ้นตอน 9. จากนั้นดูดเซลล์ HEp-2 จำนวน  $1 \times 10^6$  เซลล์ มาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์รูปวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร ขนาด 6 หลุม (six wells plate) แล้วเติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มียาปฏิชีวนะแต่ละหลุมๆละ 3 มิลลิลิตร บ่มภายในตู้ CO<sub>2</sub> incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% นาน 1 คืน จึงนำมาใช้ในการทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ต่อไป

#### 10.2. การทดสอบหาสารที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์ HEp-2 แตกในการทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*

เพื่อทำการหาสารเคมีที่มีผลทำให้เซลล์ HEp-2 แตกมากที่สุดแต่ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *H. pylori* จึงนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์รูปวงกลมขนาด 6 หลุม ในขึ้นตอน 10.1 มาทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งในทุกหลุมให้เติม HBSS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆเพื่อทำการล้างเซลล์ HEp-2 จากนั้นดูด HBSS ที่ล้างซ้ำอีกครั้ง เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม[Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM ที่เติมซีรัม (fetal bovine serum, FBS) ร้อยละ 10] ปริมาตร 900 ไมโครลิตร หลุมที่ 1-6 เติมเชื้อ *H. pylori* DMST 20165 ในปริมาณ  $10^8$  CFUต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไป นำไปบ่มภายในตู้ CO<sub>2</sub> incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารในหลุม

ทิ้งให้หมด เติม HBSS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ดูด HBSS ทิ้งล้างซ้ำอีกครั้ง เติม gentamicin (Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่ความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุม นำไปบ่มภายในตู้  $\text{CO}_2$  incubator เช่นเดิมเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูด gentamicin ทิ้งไป ล้างด้วย HBSS 3 ครั้งๆละ 2 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ครั้งสุดท้ายดูด HBSS ออกให้หมด ในหลุมที่ 1 เติมน้ำกลั่นปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าผสม (Stuart scientific, orbital shaker ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 10 นาที, หลุมที่ 2 เติม 0.01% poly-L-lysine ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าผสมที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 5 นาที, หลุมที่ 3-6 เติม 0.01%, 0.025%, 0.05% และ 0.1% triton x-100 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรตามลำดับ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าผสมที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำเซลล์ HEp-2 ที่แตกไปเจือจางเป็นลำดับไป 10 เท่า (10 folded dilution) จากความเข้มข้นที่  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-3}$  นำเชื้อที่เจือจางความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตรไปกระจายให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion agar ที่ผสมเลือดแกะร้อยละ 7 บ่มภายใต้สภาวะ 3-7% ออกซิเจน, 5-10% คาร์บอนไดออกไซด์, 80-85% ไนโตรเจน เป็นเวลา 72-96 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น คำนวณเปอร์เซ็นต์การบูกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori*

### 10.3. การทดสอบหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการทดสอบความสามารถในการเกาะติด และบูกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*

นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์รูปวงกลมขนาด 6 หลุม ในขั้นตอน 10.1 มาทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย HBSS 2 ครั้งๆละ 2 มิลลิลิตร เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มปริมาตร 900 ไมโครลิตร และเติมเชื้อ *H. pylori* DMST 20165 ที่ความเข้มข้นนี้ 5, 8 และ 10 McFarland standard ลงในหลุมที่ 1-3 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ นำไปบ่มภายในตู้  $\text{CO}_2$  incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง ดูดสารในหลุมทิ้งให้หมดจากนั้นเติม HBSS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ล้างซ้ำอีกครั้ง เติม gentamicin ที่มีความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  ลงในแต่ละหลุมปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มภายในตู้  $\text{CO}_2$  incubator เช่นเดิมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูด gentamicin ทิ้งไปล้างด้วย HBSS 3 ครั้งๆละ 2 มิลลิลิตร ครั้งสุดท้ายดูด HBSS ออกให้หมด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าผสมที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทำซ้ำ 2 ชุด นำเชื้อในแต่ละหลุมไปเจือจางเป็นลำดับไป 10 เท่า (10 folded dilution) จากความเข้มข้นที่  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-3}$  นำเชื้อที่เจือจางความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตรไปกระจายให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion agar ที่ผสมเลือดแกะร้อยละ 7 บ่มภายใต้สภาวะ 3-7% ออกซิเจน, 5-

10% คาร์บอนไดออกไซด์, 80-85% ไฮโดรเจน เป็นเวลา 72-96 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น คำนวณเปอร์เซ็นต์การบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori*

#### 11. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรชนิดต่างๆต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*

ทำการคัดเลือกสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ดีที่สุดมา 4 ชนิดดังนี้ กระจ่างดำ, กระจ่างขาว, กล้วย และ ขมิ้นชันมาทำการทดสอบฤทธิ์ต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยนำเซลล์ HEp-2 ที่เพาะเลี้ยงไว้ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์รูปวงกลมขนาด 6 หลุม ในขั้นตอน 10.1 มาทำการดูอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย HBSS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ จากนั้นดูด HBSS ทิ้งและล้างซ้ำอีกครั้งเติมเชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 ในปริมาณ  $10^8$  CFUต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไปในทุกหลุม จากนั้นเติมสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ(MIC) ที่ได้จากขั้นตอน 7 ลงในหลุมที่ 1-5 ตามลำดับ หลุมที่ 6 เป็น negative control คือไม่ต้องเติมสารสกัดใดๆ ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 มิลลิลิตรด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ตีเอ็มอีเอ็ม นำไปบ่มภายในตู้  $CO_2$  incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% โดยแต่ละจานจะบ่ม 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ ทำซ้ำ 2 ชุด เมื่อครบเวลาให้ดูดสารในแต่ละหลุมทิ้ง จากนั้นล้างด้วย HBSS 2 ครั้งๆละ 2 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เติม gentamicin ที่มีความเข้มข้น 100  $\mu$ g/ml ลงในหลุมแต่ละหลุมๆละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มภายในตู้  $CO_2$  incubator เช่นเดิมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูด gentamicin ทิ้ง ล้างด้วย HBSS 3 ครั้งๆละ 2 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ครั้งสุดท้ายดูด HBSS ออกไปให้หมด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าผสมที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีเพื่อให้เชื้อ *H. pylori* หลุดออกมาจากเซลล์ HEp-2 นำไปเจือจางเป็นลำดับไป 10 เท่า(10 folded dilution) จากความเข้มข้นที่  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-3}$  นำเชื้อที่เจือจางความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตรไปกระจายให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion agar ที่ผสมเลือดแกะร้อยละ 7 บ่มภายใต้สภาวะ 3-7% ออกซิเจน, 5-10% คาร์บอนไดออกไซด์, 80-85% ไฮโดรเจน เป็นเวลา 72-96 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น คำนวณเปอร์เซ็นต์การบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori*

## 12. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*

### 12.1. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*

เพื่อคัดเลือกชนิดของสารสกัดกระชายดำ 4 ชนิดดังนี้ น้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ, สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ, สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ และสารสกัดเมทานอลจากกระชายดำ ที่มีฤทธิ์ลดการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ได้ดีที่สุด นำเซลล์ HEp-2 ที่เพาะเลี้ยงไว้ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์รูปวงกลมขนาด 6 หลุม ในชั้นตอน 10.1 มาทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย HBSS 2 ครั้งๆละ 2 มิลลิลิตร เติมน้ำเชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 ในปริมาณ  $10^8$  CFUต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในทุกหลุม เติมน้ำสารสกัดกระชายดำแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) ที่ได้จากชั้นตอน 7 ลงในหลุมที่ 1-4 ตามลำดับ หลุมที่ 5 เป็น negative control คือไม่ต้องเติมน้ำสารสกัดใดๆ ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 มิลลิลิตรด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม นำไปบ่มภายในตู้  $CO_2$  incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดูดสารในหลุมทิ้งให้หมด จากนั้นล้างด้วย HBSS 2 ครั้งๆละ 2 มิลลิลิตร เช่าเบาๆ เติมน้ำ gentamicin ที่มีความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุม บ่มภายในตู้  $CO_2$  incubator เช่นเดิม นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูด gentamicin ทิ้งด้วย HBSS 3 ครั้งๆละ 2 มิลลิลิตร เช่าเบาๆ ครั้งสุดท้ายดูด HBSS ออกไปให้หมด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เช่าด้วยเครื่องเขย่าผสมที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีเพื่อให้เชื้อ *H. pylori* หลุดออกมาจากเซลล์ HEp-2 นำไปเจือจางเป็นลำดับไป 10 เท่า (10 folded dilution) จากความเข้มข้นที่  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-3}$  นำเชื้อที่เจือจางความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตรไปกระจายให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion agar ที่ผสมเลือดแกะร้อยละ 7 บ่มภายใต้สภาวะ 3-7% ออกซิเจน, 5-10% คาร์บอนไดออกไซด์, 80-85% ไฮโดรเจน เป็นเวลา 72-96 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น คำนวณเปอร์เซ็นต์การบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori*

### 12.2. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ที่เวลาต่างๆกัน

เพื่อหาเวลาที่ใช้ในการบ่มที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* นำสารสกัดกระชายดำที่มีฤทธิ์ต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ที่ดีที่สุด จากชั้นตอน 12.1.มาทำการทดลอง

เช่นเดียวกับขั้นตอน 12.1. ยกเว้นเวลาที่ใช้ในการบ่มจะทำการบ่มเชื้อกับสมุนไพรมะเขือเทศกับเซลล์ HEp-2 ในตอนแรกที่เวลาต่างๆกัน คือ ที่ 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

### 12.3. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆกันต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*

เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* นำสารสกัดกระชายดำที่มีฤทธิ์ต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ที่ดีที่สุด จากขั้นตอน 12.1. มาทำการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอน 12.1. ยกเว้นใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆกันดังนี้ +2MIC, +1MIC, MIC, -1MIC และ -2MIC

### 12.4. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ต่างๆกัน

เพื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดกระชายดำที่ดีที่สุดต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ต่างๆว่ามีแนวโน้มที่เหมือนหรือต่างกันอย่างไร โดยใช้เชื้อ *H. pylori* 5 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์มาตรฐาน 3 สายพันธุ์ ATCC 43504(*cagA*+), ATCC 43526(*cagA*+) และ ATCC 51932(*cagA*-) สายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้ 2 สายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ *cagA*+ 1 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ *cagA*- 1 สายพันธุ์ ทำการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอน 12.1 โดยใช้เวลาบ่มเชื้อกับสมุนไพรมะเขือเทศ HEp-2 ที่ได้จากขั้นตอน 12.2 และใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากกระชายดำที่เหมาะสมที่สุดจากขั้นตอน 12.3 เก็บเชื้อที่เหลือจากการนับจำนวนโคโลนีไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสสำหรับสกัดอาร์เอ็นเอต่อไป

### 12.5. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อความสามารถในการเกาะติดเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ต่างๆกัน

เพื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดกระชายดำที่ดีที่สุดต่อความสามารถในการเกาะติดเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ต่างๆว่ามีแนวโน้มที่เหมือนหรือต่างกันอย่างไร โดยใช้เชื้อ *H. pylori* 5 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์มาตรฐาน 3 สายพันธุ์ ATCC 43504(*cagA*+), ATCC 43526(*cagA*+) และ ATCC 51932(*cagA*-) สายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้ 2 สายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ *cagA*+ 1 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ *cagA*- 1 สายพันธุ์ ทำการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอน 12.4 ต่างกันตรงในการทดลองจะจางเพาะเลี้ยงเซลล์รูปวงกลมขนาด 6 หลุม 2 จาน จานที่ 1 ทำการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอน 12.4 ทุกขั้นตอน แต่ในจานที่ 2 ใช้ที่ขั้นตอนหลังจากการ



บ่มเชื้อกับสเต็มไพรกับเซลล์ HEp-2 เมื่อทำการล้างด้วย HBSS 2 ครั้งๆละ 2 มิลลิลิตรแล้วจะทำการเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรเลย โดยไม่ผ่านขั้นตอนการเติม gentamicin นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นจากทั้ง 2 จานเพาะเลี้ยง เพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกาะติดเซลล์ของเชื้อ *H. pylori*

### 13. การวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี RT PCR

#### 13.1. การสกัดอาร์เอ็นเอจากเชื้อ *Helicobacter pylori*

ทำการสกัด Total RNA โดยใช้รีเอเจนต์ TRIZOL<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, USA) นำเชื้อ *H. pylori* ที่เก็บไว้จากการทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์เชื้อ HEp-2 ในขั้นตอน 12.4 มาทำการปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมน้ำยา TRIZOL<sup>®</sup> Reagent 1 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปตขึ้นลงนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม (Chloroform) 0.2 มิลลิลิตรเขย่าเบาๆด้วยมือ นาน 15 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 g 15 นาที ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส หลังการปั่นสารจะแยกเป็น 3 ชั้น ทำการดูดสารละลายใสชั้นบนสุดออกมา 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่ในการดูดระวังอย่าให้ปิเปตดูดสารละลายชั้นอื่นๆ เติมน้ำไอโซโพรพานอล (Isopropanol) 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา ประมาณ 30 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ปั่นที่ความเร็ว 12,000 g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เทสารละลายในหลอดส่วนบนทิ้งล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% เอทานอล (Ethanol) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องเขย่าผสม 20 วินาที ปั่นที่ความเร็ว 12,000 g 15 นาที ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เทสารละลายส่วนบนทิ้ง คั่วหลอดบนกระดาษทิชชูทิ้งให้แห้งประมาณ 30-45 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ตรวจหาระดับการแสดงออก ของยีน *alpA* และ *babA* ด้วยวิธี RT PCR ต่อไป

#### 13.2. การวัดค่า OD (Optical Density) เพื่อหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากขั้นตอน 13.1 มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น โดยใช้อัตราส่วน 1:100 (อาร์เอ็นเอ: น้ำกลั่น) จากนั้นนำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu, UV-16001 ประเทศญี่ปุ่น) โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 260 นาโนเมตร โดยค่า OD 260 ที่มีค่าเท่ากับ 1.00 นั้นจะเทียบได้กับ อาร์เอ็นเอสายเดี่ยว ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 40

ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำค่า OD ที่วัดได้ ไปคำนวณหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ(ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)} = \text{OD}_{260} \times 40 \times \text{dilution factor} \times 10^{-3}$$

โดย dilution factor คือ ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่เจือจางเซลล์ในน้ำกลั่น (ในที่นี้เท่ากับ 100)

### 13.3. การกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนออกจากอาร์เอ็นเอ

เพื่อให้ได้อาร์เอ็นเอที่ปราศจากการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจึงทำการขจัดดีเอ็นเอ โดยนำยา RNase-Free DNase Set (Qiagen, USA) เตรียมปฏิกิริยาปริมาตรทั้งหมด 100 ไมโครลิตร ประกอบด้วย บัฟเฟอร์ RDD ความเข้มข้น 1 เท่าปฏิกิริยา (1x Buffer RDD), DNase I ความเข้มข้น 7.5 ยูนิต, อาร์เอ็นเอปริมาตรน้อยกว่าหรือเท่ากับ 87.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นทำการ inactivate DNase I ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 15 นาที นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปทำการเปลี่ยนเป็นซีดีเอ็นเอต่อไป

### 13.4. การตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ(DNA) จากอาร์เอ็นเอ(RNA) ที่สกัดได้

เพื่อยืนยันว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้นั้นไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอมา ทำได้โดยนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาทำการทดสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หากปรากฏแถบของผลผลิต PCR ขึ้นแสดงว่าอาร์เอ็นเอนั้นมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่าปฏิกิริยา(1x reaction buffer), ดิออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต(dNTP) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์, 16s Forward primer(5' – GAT GCT TAA CCA TAG AAC TGC ATT TGA A -3' ) ความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์, 16s Reverse primer(5' - CTG CAA AAG ATT ATT TGG CAA GA -3') ความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์, Real Taq DNA Polymerase ความเข้มข้น 0.025 ยูนิต, อาร์เอ็นเอแม่แบบ ปริมาณ 10-100 นาโนกรัม นำไปเข้าเครื่อง thermocycle ที่ตั้งอุณหภูมิต่างๆไว้ดังนี้ ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที, ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 วินาที, ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที, ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 11 วินาที, ขั้นที่ 5 วนกลับไปทำขั้นที่ 2-4 จำนวน 44 รอบ, ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และขั้นสุดท้าย อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำออกจากเครื่อง thermocycler นำผลผลิต PCR ที่ได้ไปทำการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้า(electrophoresis)

บนวุ้นอะกาโรส 2 % จากนั้นนำไปย้อมสีใน เอทิดียมโบรไมด์(ethidium bromide) ที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร นาน 30 นาที ทำการ destain ในน้ำกลั่นนาน 10 นาที นำวุ้นอะกาโรส ไปถ่ายรูปบนเครื่องเครื่องกำเนิดแสงยูวี (UV transilluminator ประเทศอังกฤษ) บันทึกผลโดยใช้กล้อง(UVitec ประเทศอังกฤษ) หากมีดีเอ็นเอปนเปื้อนจะเห็นผลผลิต PCR ขนาด 204 เบส

### 13.5. การเตรียมซีดีเอ็นเอ(cDNA)

เนื่องจากอาร์เอ็นเอมีความไม่เสถียร ในการเปรียบเทียบผลการแสดงออกของยีนจึงควรเปลี่ยนจากอาร์เอ็นเอให้เป็นดีเอ็นเอก่อน โดยการเตรียมปฏิกิริยา ในปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ reverse transcription reaction ความเข้มข้น 1 เท่า ปฏิกิริยา(1x reverse transcription reaction buffer), ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์, Primer16s หรือ *alpA* หรือ *babA* ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์, M-MuLV Reverse Transcriptase(New England Biolabs ประเทศสหรัฐอเมริกา) 100 ยูนิต, อาร์เอ็นเอจากข้อ 14.2 ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาทีที่จะได้ซีดีเอ็นเอสำหรับการทำ RT-PCR ต่อไป

### 13.6. การทำ RT-PCR ของยีน *alpA* และ *babA*

การเพิ่มจำนวน ซีดีเอ็นเอ เพื่อหาระดับการแสดงออกของยีน *alpA*, *babA* โดยใช้ยีน 16s ribosomal เป็นยีนมาตรฐานสำหรับการเปรียบเทียบ ในการเตรียม 1 ปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่าปฏิกิริยา (1x reaction buffer), ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต(dNTP)ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์, Primer16s หรือ *alpA* หรือ *babA* ดังตารางที่ 3.3 ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์, Real Taq DNA Polymerase (Real Biotech Corporation, USA) ความเข้มข้น 0.025 ยูนิต, ซีดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอน 13.5 ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่อง thermocycler

ตารางที่ 3.3 แสดงรายละเอียด Primer

ยีน	Primer	ลำดับเบส	ความยาว (bp)	ขนาดผลผลิต (bp)
16s ribosomal	Forward	5'GCTTAACCATAGAACTGCATTTGA A3'	25	204
	Reverse	5'TCGTTTAGGGCGTGGACT3'	18	
alpA	Forward	5'TACGGCACGAACACCAAT3'	18	168
	Reverse	5'TTGAGAGTAGGTTTGACCATCTG 3'	23	
babA	Forward	5'GCAAGGCATAGAAACCAATTACT AC3'	25	158
	Reverse	5'AGCCACCTGAATACCG3'	17	

ที่ตั้งอุณหภูมิต่างๆไว้ดังนี้ ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที, ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 วินาที, ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที, ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 11 วินาที, ขั้นที่ 5 วนกลับไปทำขั้นที่ 2-4 จำนวน 44 รอบ, ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และขั้นสุดท้าย อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำออกจากเครื่อง thermocycler นำผลผลิต PCR ที่ได้ไปทำการแยกขนาดด้วย กระแสไฟฟ้า(electrophoresis) บนวุ้นอะกาโรส 2 % จากนั้นนำไปย้อมสีใน เอทิดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร นาน 30 นาที ทำการ destain ในน้ำกลั่นนาน 10 นาที นำวุ้นอะกาโรส ไปถ่ายรูปแบบเครื่องเครื่องกำเนิดแสงยูวี นำ ภาพที่ถ่ายได้มาทำการวิเคราะห์ความเข้มของแถบผลผลิต PCR ด้วยโปรแกรม Alphamager 2200( Alpha Innotech Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา)

#### 14. การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการเปรียบเทียบทางสถิติของ % internalization ระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัด สมุนไพร กับกลุ่มทดลองที่เติมสารสกัดจากสมุนไพรโดยใช้ one-way anova การวิเคราะห์ทางสถิติจะเสร็จสมบูรณ์โดยใช้โปรแกรม SPSS ค่า P ทั้งหมดที่  $\leq 0.05$  จะสันนิษฐานว่าแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1. การทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสมุนไพรไทยต่างๆที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*

เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรไทยที่นิยมใช้ในการรักษาโรคในระบบทางเดินอาหารในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *H. pylori* โดยทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* (Minimum inhibitory concentration, MIC) ของสมุนไพรไทย 9 ชนิด กับเชื้อ *H. pylori* จำนวน 13 สายพันธุ์ ประกอบด้วย เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน 2 สายพันธุ์ คือ ATCC 43504 และ ATCC 43526, สายพันธุ์ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2 สายพันธุ์ คือ DMST20165 และ DMST20885 และสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้ 9 สายพันธุ์ คือ C7, C53, 742, 818, 820, 849, 867, 912 และ 949 ผลเป็นดังตารางที่ 4.1 พบว่าสารสกัดเมทานอลจากขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ดีที่สุดโดยมีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ(MIC) เท่ากับ 32 µg/ml รองลงมา คือ สารสกัดเมทานอลจากกระชายดำมีค่า MIC เท่ากับ 64 µg/ml ส่วนสารสกัดเมทานอลจากกระเทียม, กลั้วขี้, ตรีโค้ว, ใบบัวบก, ฟ้าทะลายโจร, ว่านหางจระเข้ และลำต้นโหระพา ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* มีค่า MIC > 512 µg/ml ขณะที่ dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (v/v) ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ละลายสารสกัดสมุนไพรพบว่าไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ จึงได้ทำการคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ดี คือ ขมิ้นชัน, กระชายดำ และสมุนไพรที่มีการรายงานว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* คือ กระเทียม(107) และกลั้วขี้(106) ไปทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรชนิดต่างๆต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ต่อไป

#### 2. การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*

ทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการศึกษาความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี Gentamicin internalization assay(58) ซึ่งจะทำการบ่มเชื้อ *H. pylori* กับเซลล์ HEp-2 เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเกาะติด และบุกรุกเข้าสู่เซลล์ จากนั้นจะทำการล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ HBSS และทำให้เซลล์แตก และนำเชื้อ *H. pylori* ที่อยู่ในภายในเซลล์มาทำการนับปริมาณ ดังนั้นในการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมจึงต้องทำการทดสอบหา ปริมาณเชื้อ *H. pylori* ตั้งต้นที่เหมาะสมเนื่องจากเชื้อ *H. pylori* มีความสามารถในการบุกรุก

ตารางที่ 4.1 ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสมุนไพรต่างๆที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) ของเชื้อ *H. pylori*

ชนิดของสารสกัด	ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสมุนไพรต่างๆที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>H. pylori</i> *.# (µg/ml)
DMSO 5% (v/v)	เชื้อ <i>H. pylori</i> ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้
สารสกัดเมทานอลจากกระเทียม	> 5000
สารสกัดเมทานอลจากกล้วย	25000
สารสกัดเมทานอลจากกระชายดำ	64
สารสกัดเมทานอลจากขมิ้นชัน	32
สารสกัดเมทานอลจากตระไคร้	> 512
สารสกัดเมทานอลจากใบบัวบก	> 512
สารสกัดเมทานอลจากฟ้าทะลายโจร	> 512
สารสกัดเมทานอลจากว่านหางจระเข้	> 512
สารสกัดเมทานอลจากลำต้นโหระพา	> 512

\*ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

#เชื้อ *H. pylori* จำนวน 13 สายพันธุ์ ประกอบด้วย เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน 2 สายพันธุ์ คือ ATCC 43504 และ ATCC 43526, สายพันธุ์ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2 สายพันธุ์ คือ DMST20165 และ DMST20885 และสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้ 9 สายพันธุ์ คือ C7, C53, 742, 818, 820, 849, 867, 912 และ 949

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เซลล์ที่ต่ำ(108) ประมาณ 0.1% นอกจากนั้นในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ทดสอบหาสารที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์ HEp-2 แดก โดยสารจะต้องมีคุณสมบัติ คือ ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ซึ่งจะนำสภาวะทั้งสองที่ได้ ไปทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 1 คือ กระเทียม, กระชายดำ, กลัวย และขมิ้นชัน ต่อความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ต่อไป

### 2.1. การทดสอบหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการทดสอบความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*

ในการทดสอบหาปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี Gentamicin internalization assay(58) นั้นจะให้เชื้อ *H. pylori* DMST 20165 โดยใช้เชื้อ 3 ความเข้มข้น คือ 5, 8 และ 10 McFarland standard ผลดังตารางที่ 4.2 พบว่า ที่ความขุ่น 5 McFarland standard มีปริมาณเชื้อตั้งต้นประมาณ  $10^6$  CFU/ml, ที่ความขุ่น 8 McFarland standard มีปริมาณเชื้อตั้งต้นประมาณ  $10^7$  CFU/ml และที่ความขุ่น 10 McFarland standard มีปริมาณเชื้อตั้งต้นประมาณ  $10^8$  CFU/ml เมื่อดูผลการทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 พบว่าปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ความขุ่น 5 และ 8 McFarland standard ไม่พบการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ขณะที่ความขุ่น 10 McFarland standard สามารถเห็นผลการทดสอบคือ จากจำนวนเชื้อ *H. pylori* ตั้งต้น  $10^8$  CFU/ml เชื้อสามารถบุกรุกเข้าไปในเซลล์ได้  $5 \times 10^4$  CFU/ml เมื่อนำค่าที่ได้มาทำการคำนวณ % internalization พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.05% ดังนั้นปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมในการทดสอบความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ต้องมีปริมาณเชื้อมากกว่าหรือเท่ากับ  $10^8$  CFU/ml ขึ้นไป หรือประมาณความขุ่นที่ 10 McFarland ขึ้นไป

### 2.2. การทดสอบหาสารที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์ HEp-2 แดกในการทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*

ในการทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี Gentamicin internalization assay(58) จะมีการใช้สารสำหรับทำให้เซลล์แตกอยู่หลายชนิด คือ น้ำกลั่น(109), 0.01% poly-L-lysine(108) และ 0.1% triton x-100(58) ดังนั้นในการทดสอบครั้งนี้จึงต้องการทดสอบหาสารที่เหมาะสมที่สุดในการทำให้เซลล์ HEp-2 แดก โดยสารจะต้องมีคุณสมบัติสำคัญ คือ ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *H. pylori* การทดสอบนี้ได้ทดลองกับสารทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ น้ำกลั่น, 0.01% poly-L-lysine, 0.01%, 0.025%, 0.05% และ 0.1% triton x-100 ผลเป็นดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 % internalization จากการทดลองการบุกรุกเซลล์โดยใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ต่างกัน

ความขุ่นของเชื้อ <i>H. pylori</i> (McFarland standard)	ปริมาณเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่นับได้ (CFU/ml)	ปริมาณเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่นับได้จาก การทดสอบ internalization assay (CFU/ml)	% internalization
10 McFarland	$\sim 10^8$	$\sim 5 \times 10^4$	0.05
8 McFarland	$\sim 10^7$	No growth	0
5 McFarland	$\sim 10^6$	No growth	0

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 4.3 ปริมาณเชื้อ *H. pylori* จากการทดสอบหาสารที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์ HEp-2 แตก

Internalization assay	Conditions	สารสำหรับทำให้เซลล์ HEp-2 แตก	ปริมาณเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่นับได้ (CFU/ml)
กลุ่มควบคุม	เชื้อ <i>H. pylori</i> + สารสำหรับทำให้เซลล์ HEp-2 แตก	1. น้ำกลั่น 2. 0.01% poly-L-lysine 3. 0.01% Triton-X-100 4. 0.025% Triton-X-100 5. 0.05% Triton-X-100 6. 0.1% Triton-X-100	1X10 <sup>8</sup> No growth No growth No growth No growth No growth
	เชื้อ <i>H. pylori</i> + Gentamycin 100 µg/ml	-	No growth
	เชื้อ <i>H. pylori</i> + HBSS	-	1X10 <sup>8</sup>
กลุ่มทดลอง	เชื้อ <i>H. pylori</i> + HEp-2 + สารสำหรับทำให้เซลล์ HEp-2 แตก	1. น้ำกลั่น 2. 0.01% poly-L-lysine 3. 0.01% Triton-X-100 4. 0.025% Triton-X-100 5. 0.05% Triton-X-100 6. 0.1% Triton-X-100	5X10 <sup>4</sup> No growth No growth No growth No growth No growth

พบว่าในกลุ่มควบคุมซึ่งจะบ่มเชื้อ *H. pylori* กับสารต่างๆเป็นเวลานาน 3 ชั่วโมงเพื่อดูผลของสารต่อการเจริญของเชื้อพบว่าน้ำกลั่นไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ โดยพบปริมาณเชื้อที่บุงกรุกเข้าไปในเซลล์ประมาณ  $5 \times 10^4$  CFU/ml มี % internalization เท่ากับ 0.05% ในขณะที่ 0.01% poly-L-lysine, 0.01% triton x-100, 0.025% triton x-100, 0.05% triton x-100 และ 0.1% triton x-100 ไม่พบการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ส่วนการบ่มเชื้อกับบัฟเฟอร์ HBSS ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองความสามารถในการบุงกรุก และยึดเกาะเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี Gentamicin internalization assay(58) โดยให้ในขั้นตอนต่างๆดังนี้ ขั้นตอนในการละลายเชื้อ *H. pylori* ให้ได้ความขุ่นที่ต้องการก่อนการทดลอง, ขั้นตอนการล้างเซลล์ HEp-2 หลังจากการบ่มเชื้อ *H. pylori* กับสารสกัดจากสมุนไพรกับ เซลล์ HEp-2, การล้างเซลล์ HEp-2 หลังจากการบ่มเชื้อ *H. pylori* กับ gentamicin และขั้นตอนในการเจือจางเชื้อ *H. pylori* หลังจากทำให้เซลล์ HEp-2 แยกเพื่อทำการนับปริมาณเชื้อที่บุงกรุก ผลพบว่าบัฟเฟอร์ HBSS ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *H. pylori* การทดลองบ่มเชื้อ *H. pylori* ร่วมกับสารต้านจุลชีพ gentamicin ที่ความเข้มข้น  $100 \mu\text{g/ml}$  ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการกำจัดเชื้อที่เกาะติดบนเซลล์ HEp-2 ปรากฏว่าไม่พบการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ดังนั้นสารที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์ HEp-2 แยกในการทดสอบความสามารถในการบุงกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* คือ น้ำกลั่น เนื่องจากเป็นสารชนิดเดียวที่ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ส่วน 0.01% poly-L-lysine, 0.01% triton x-100, 0.025% triton x-100, 0.05% triton x-100 และ 0.1% triton x-100 มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *H. pylori*

### 3. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรชนิดต่างๆต่อความสามารถในการบุงกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*

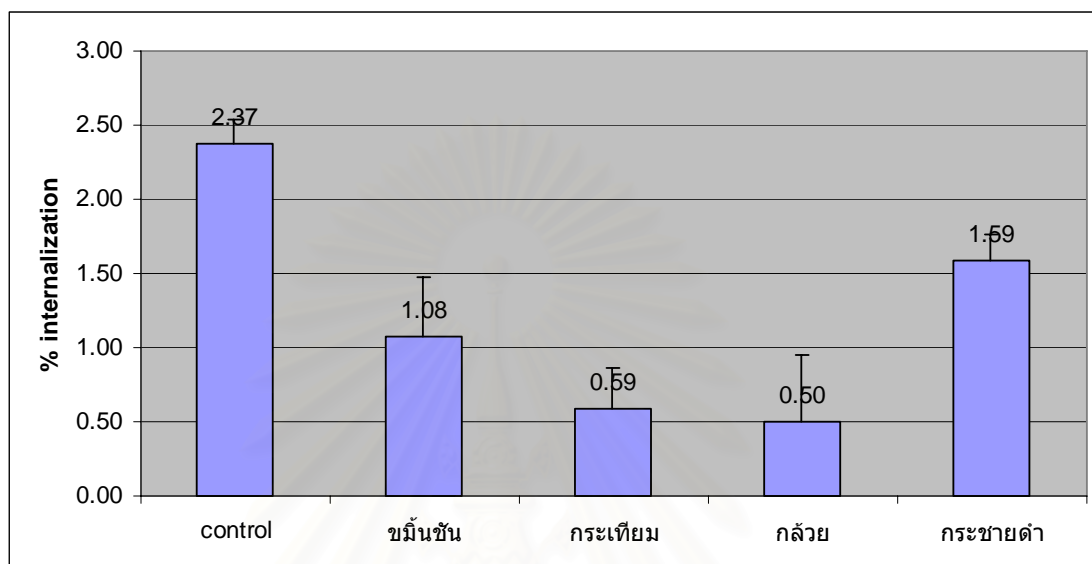
จากขั้นตอนที่ 1 และ 2 ทำให้เราสามารถเลือกพืชสมุนไพร และสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ Gentamicin internalization assay(58) เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรต่อความสามารถในการบุงกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยการทดลองนี้ได้ใช้สมุนไพร 4 ชนิด คือ กระเทียม, กระชายดำ, กล้ววย และขมิ้นชัน ในการทดสอบใช้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504 และใช้เวลาในการบ่ม 3 ชั่วโมง ผลเป็นดังตารางที่ 4.4 และ รูปที่ 4.1 จากปริมาณเชื้อตั้งต้นประมาณ  $10^8$  CFU/ml ในกลุ่มที่มีการบ่มเชื้อกับสมุนไพรเพื่อดูความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ผลการนับปริมาณเชื้อเป็นดังนี้ ขมิ้นชันมีปริมาณเชื้อตั้งต้น เท่ากับ  $1.09 \pm 0.12 \times 10^7$ , กระเทียม เท่ากับ  $5.74 \pm 0.35 \times 10^4$ , กล้ววย เท่ากับ  $1.51 \pm 0.70 \times 10^6$  และ กระชายดำ เท่ากับ  $6.93 \pm 0.58 \times 10^6$  การทดสอบความสามารถในการบุงกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* พบว่าในกลุ่มควบคุม ซึ่งบ่มเชื้อ *H. pylori* กับ เซลล์ HEp-2 ค่า % internalization เท่ากับ  $2.37 \pm 0.17\%$  ขณะที่ กลุ่มทดลองคือบ่มเชื้อ *H. pylori* กับเซลล์ HEp-2 และ สมุนไพรชนิด

ตารางที่ 4.4 % internalization จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรชนิดต่างๆต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ที่เวลาป่ม 3 ชั่วโมง

ชนิดของสมุนไพร	ความเข้มข้นของสมุนไพร	ปริมาณเชื้อ <i>H. pylori</i> ตั้งต้น* (CFU/ml)	(เชื้อ+ สมุนไพร) ปริมาณเชื้อที่นับได้* (CFU/ml)	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลอง	ค่า P-value
				(เชื้อ + เซลล์) % internalization*	(เชื้อ + เซลล์ + สมุนไพร) % internalization*	
ขมิ้นชัน	32 µg/ml	1.17±0.70× 10 <sup>8</sup>	1.09±0.12× 10 <sup>7</sup>	2.37±0.17	1.08±0.40	0.020
กระเทียม	5 mg/ml		5.74±0.35× 10 <sup>4</sup>		0.59±0.27	0.001
กลั้ว	25 mg/ml		1.51±0.70× 10 <sup>6</sup>		0.50±0.46	0.001
กระชายดำ	32 µg/ml		6.93±0.58× 10 <sup>6</sup>		1.59±0.17	0.070

\*ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % internalization กับสมุนไพร 4 ชนิด คือ กระจี้ยม, กระจี้ชยดำ, กล้วย และขม้ันช้ัน ที่เวลาบ่ม 3 ช้้วโมง



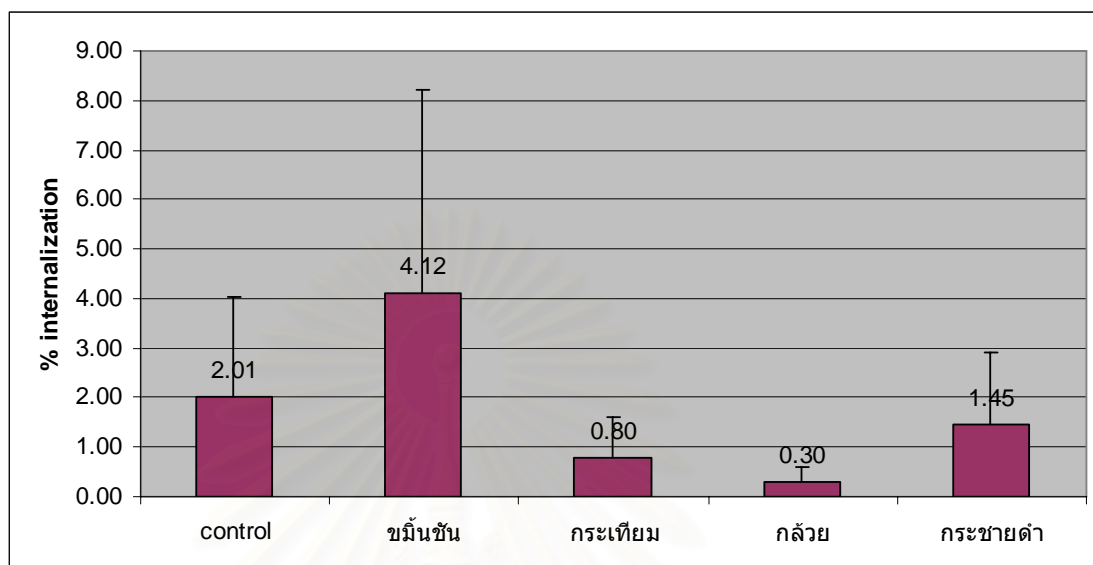
\*ทำการทดลองซ้ำ 2 คร้้ง

ต่างๆที่ความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) พบว่า% internalization ของสุมุนไพรรทั้ง 4 ชนิดเป็นดังนี้ % internalization ของกระชายดำมีค่าเท่ากับ  $1.59 \pm 0.17\%$ , ขมิ้นชันมีค่าเท่ากับ  $1.08 \pm 0.40\%$ , กระเทียมมีค่าเท่ากับ  $0.59 \pm 0.27\%$  และ กลัวยมีค่าเท่ากับ  $0.50 \pm 0.46\%$  ซึ่งพบว่าความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEP-2 เมื่อมีสารสกัดสุมุนไพรรทั้ง 4 ชนิดลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดสุมุนไพรร จากการเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่าค่า % internalization ของสุมุนไพรรทั้ง 4 ชนิด และกลุ่มควบคุม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ยกเว้นกระชายดำ ดังนั้นสารสกัดสุมุนไพรรของกระเทียม, กลัวย และขมิ้นชัน ที่ความเข้มข้นที่ MIC มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* และมีลดความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* ได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจาก กระเทียม และ กลัวย มีค่า MIC สูง จึงต้องใช้ความเข้มข้นในการทดสอบปริมาณมากกว่า กระชายดำ และขมิ้นชัน มาก ซึ่งไม่เหมาะกับการนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาหรือป้องกันการติดเชื้อ *H. pylori* เนื่องจากสารสกัดในปริมาณมาก อาจมีความเป็นพิษกับเซลล์หรือมีฤทธิ์ข้างเคียงอื่นได้ นอกจากนั้นปริมาณตัวทำละลายDMSO ในสารสกัดกระเทียม และ กลัวย จะมากตามไปด้วย พบว่าอยู่ในช่วง 1-5% ซึ่งจะมีผลกระทบต่อเซลล์ HEP-2 เนื่องจากหาก %DMSO > 1%(110) จะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ อย่างไรก็ตามจะทำการทดสอบผลของเวลาในการบ่มสารสกัดสุมุนไพรรทั้ง 4 ชนิด ต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEP-2 เพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการคัดเลือกสุมุนไพรรที่เหมาะสมในการศึกษาความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* ต่อไป

#### 4. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอลของสุมุนไพรรที่เวลาต่างๆต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori*

เพื่อศึกษาผลของเวลาในการบ่มของสารสกัดเมทานอลของสุมุนไพรร 4 ชนิด คือ กระเทียม, กระชายดำ, กลัวย และขมิ้นชัน ต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEP-2 และต่อ รูปร่างลักษณะของเซลล์ HEP-2 ที่เวลาต่างๆกัน จึงได้ทำการทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 ที่เวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ผลที่ได้เป็นดังรูปที่ 4.1-4.5 พบว่าที่เวลา 3 ชั่วโมง(รูปที่ 4.1) มีค่า % internalization เป็นดังนี้ กลุ่มควบคุมที่ไม่มีสุมุนไพรร เท่ากับ  $2.37 \pm 0.17\%$ , ขมิ้นชัน เท่ากับ  $1.08 \pm 0.40\%$ , กระเทียม เท่ากับ  $0.59 \pm 0.27\%$ , กลัวย เท่ากับ  $0.50 \pm 0.46\%$  และ กระชายดำ เท่ากับ  $1.59 \pm 0.17\%$  พบว่าสุมุนไพรรทุกชนิดสามารถลดการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* ที่เวลา 6 ชั่วโมง(รูปที่ 4.2)มีค่า % internalization เป็นดังนี้ กลุ่มควบคุมที่ไม่มีสุมุนไพรร เท่ากับ  $2.37 \pm 0.17\%$ ,

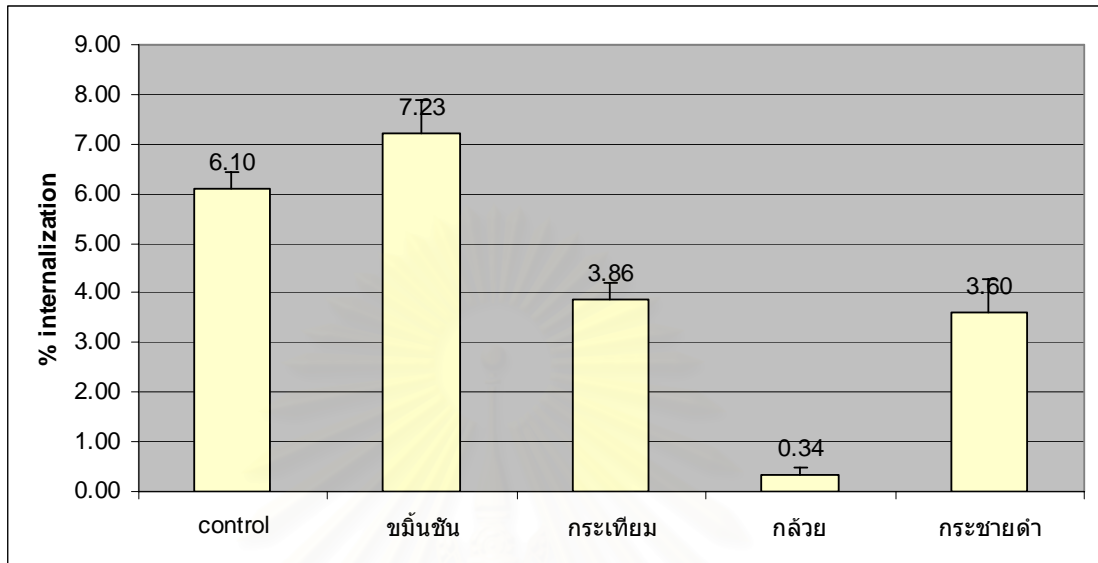
รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % internalization กับสมุนไพร 4 ชนิด คือ กระเทียม, กระชายดำ, กล้วย และขมิ้นชัน ที่เวลาบ่ม 6 ชั่วโมง



\*ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

ไขมันชั้น เท่ากับ  $4.12 \pm 4.67\%$ , กระจาเทียม เท่ากับ  $0.80 \pm 0.81\%$ , กลัวย เท่ากับ  $0.30 \pm 0.15\%$  และ กระจาตายดำ เท่ากับ  $1.45 \pm 0.87\%$  พบว่ากระจาเทียม, กลัวย และกระจาตายดำสามารถลดการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* แต่ไขมันชั้นกลับเพิ่มการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ที่เวลา 12 ชั่วโมง(รูปที่ 4.3) มีค่า % internalization เป็นดังนี้ กลุ่มควบคุมที่ไม่มีสุมุนไพรร เท่ากับ  $6.10 \pm 0.35\%$ , ไขมันชั้น เท่ากับ  $7.23 \pm 0.66\%$ , กระจาเทียม เท่ากับ  $3.86 \pm 0.36\%$ , กลัวย เท่ากับ  $0.34 \pm 0.13\%$  และ กระจาตายดำ เท่ากับ  $3.60 \pm 0.69\%$  พบว่ากระจาเทียม, กลัวย และกระจาตายดำสามารถลดการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* แต่ไขมันชั้นกลับเพิ่มการบุกรุกเซลล์ HEP-2 และที่เวลา 24 ชั่วโมง(รูปที่ 4.4) มีค่า % internalization เป็นดังนี้ กลุ่มควบคุมที่ไม่มีสุมุนไพรร เท่ากับ  $59.04 \pm 3.04\%$ , ไขมันชั้น เท่ากับ  $54.74 \pm 16.17\%$ , กระจาเทียม เท่ากับ  $32.24 \pm 0\%$ , กลัวย เท่ากับ  $0.11 \pm 0.15\%$  และ กระจาตายดำ เท่ากับ  $2.88 \pm 4.08\%$  พบว่ากระจาเทียม, กลัวย และกระจาตายดำสามารถลดการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* แต่ไขมันชั้นมีค่าการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ที่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสุมุนไพรร เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของเวลาตั้งแต่ 3-24 ชั่วโมง ต่อ % internalization โดยภาพรวม (รูปที่ 4.5) พบว่าที่เวลาบ่มนานมากขึ้นแนวโน้มของ % internalization ก็มากขึ้นตามไปด้วย ทั้งกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดสุมุนไพรรและกลุ่มทดลองที่มีสารสกัดสุมุนไพรร ยกเว้นกลัวยที่พบว่าที่เวลามากขึ้น % internalization มีแนวโน้มลดลง ดังนั้นสุมุนไพรรที่ผู้วิจัยสนใจในการศึกษาถึงฤทธิ์ในการลดการเกาะติดและบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* คือ กระจาตายดำ เนื่องจาก มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดี (MIC = 32  $\mu\text{g/ml}$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกระจาเทียม และกลัวย จึงใช้ความเข้มข้นของสุมุนไพรรต่ำ ยิ่งไปกว่านั้นยังมีฤทธิ์ในการลดการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ได้ดี โดยไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ในเวลา 3-24 ชั่วโมง ขณะที่ไขมันชั้นถึงแม้ว่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ดีกว่า แต่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* ถ้าบ่มเป็นเวลา > 3 ชั่วโมง ส่วน กระจาเทียม และกลัวย ถึงแม้ว่าจะมีฤทธิ์ในการลดการบุกรุกเซลล์ HEP-2 แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทำให้ต้องใช้ความเข้มข้นในการลดการบุกรุกเซลล์ในปริมาณสูง จึงได้เลือกทำการศึกษาเฉพาะฤทธิ์ของกระจาตายดำต่อการเกาะติดและบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* และฤทธิ์ในการลดการเกาะติดเซลล์ HEP-2 ของกระจาตายดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ทำการเลือกสารสกัดกระจาตายดำในตัวทำละลายที่ให้ผลดีที่สุดไปศึกษาต่อไป

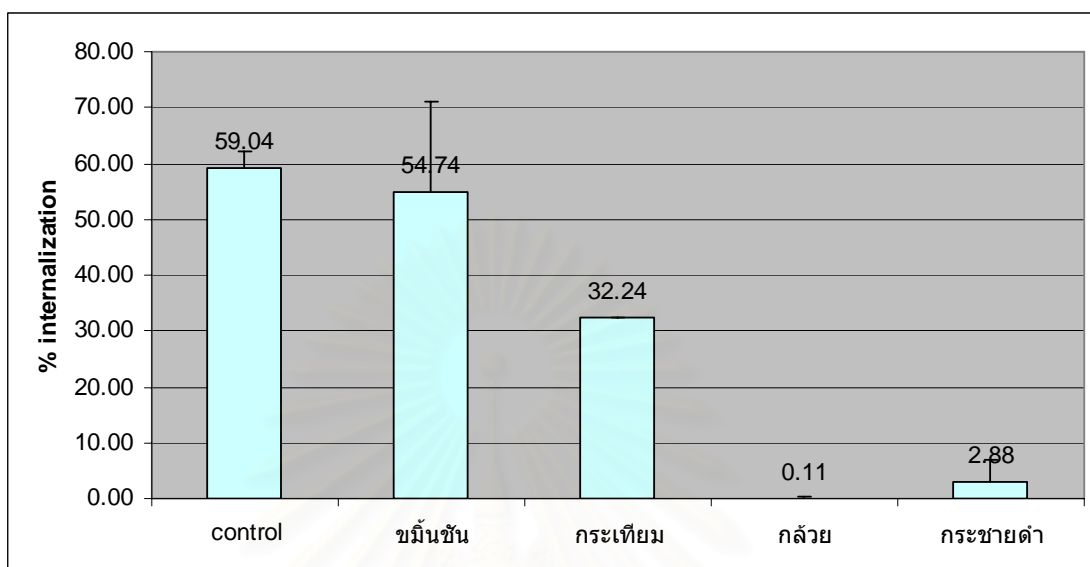
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % internalization กับสมุนไพร 4 ชนิด คือ กระเทียม, กระชายดำ, กล้วย และขมิ้นชัน ที่เวลาบ่ม 12 ชั่วโมง



\*ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

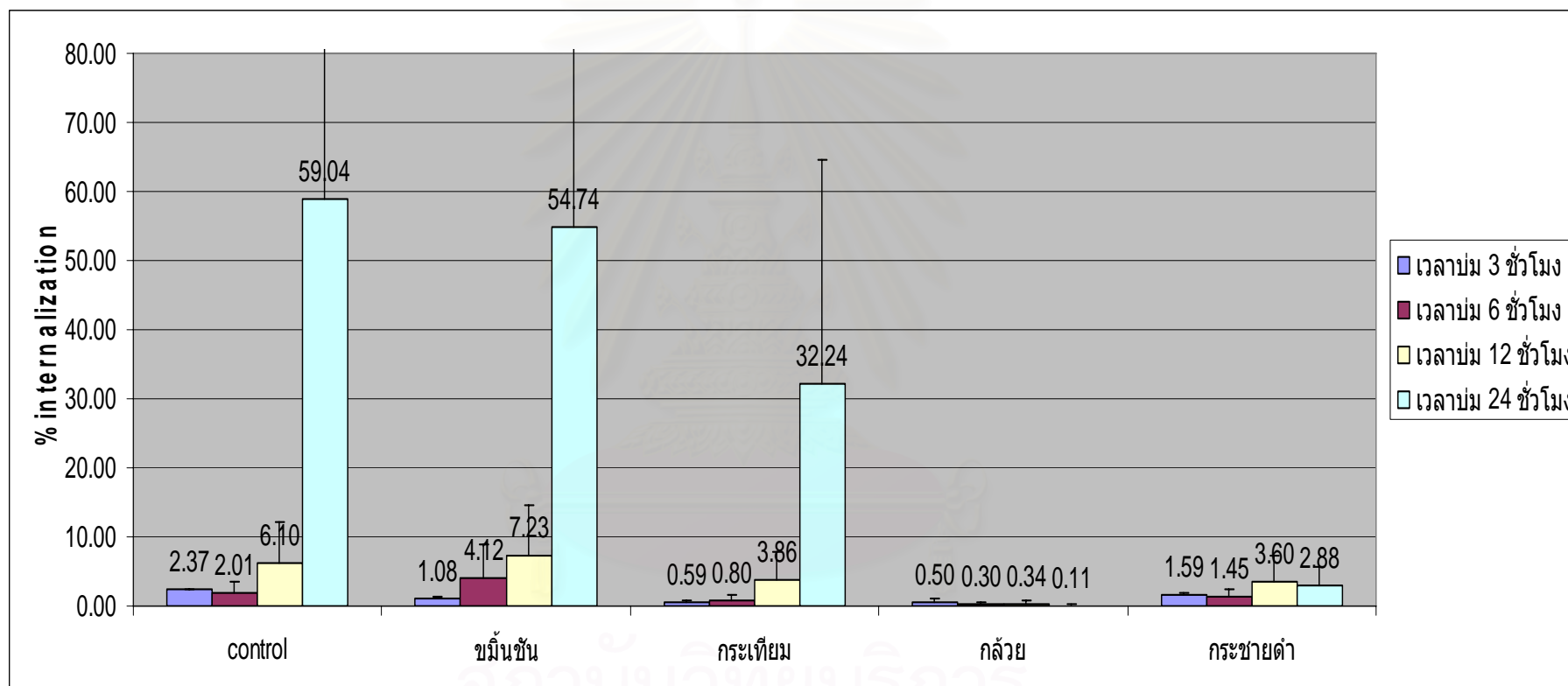


รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % internalization กับสมุนไพร 4 ชนิด คือ กระเทียม, กระชายดำ, กลัวย และขมิ้นชัน ที่เวลาบ่ม 24 ชั่วโมง



\*ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

รูปที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % internalization กับสมุนไพร 4 ชนิด คือ กระเทียม, กระชายดำ, กล้วย และขมิ้นชัน ที่เวลาบ่ม 3-24 ชั่วโมง



\*ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

## 5. การเตรียมสารสกัดจากกระชายดำ

ทำการสกัดสารจากพืชสมุนไพรกระชายดำ โดยสกัดน้ำมันหอมระเหย และ สกัดสารด้วยตัวละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน, เอทิลอะซิเตด และเมทานอล จากกระชายดำ 1 กิโลกรัม ผลของปริมาณสารสกัดที่ได้มีดังนี้ 1) น้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ สามารถสกัดได้ 1.29 กรัมเมื่อคิดเป็น %yield ได้เท่ากับ 0.129%, 2) สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ สามารถสกัดได้ 0.46 กรัมเมื่อคิดเป็น %yield ได้เท่ากับ 0.046%, 3) สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำสามารถสกัดได้ 7.21 กรัมเมื่อคิดเป็น %yield ได้เท่ากับ 0.721% และ 4) สารสกัดเมทานอลจากกระชายดำ สามารถสกัดได้ 12.77 กรัมเมื่อคิดเป็น %yield ได้เท่ากับ 1.277% จะเห็นว่าสารสกัดเมทานอลจากกระชายดำจะได้ปริมาณมากที่สุด และสารสกัดที่ได้น้อยที่สุด คือ สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ จากนั้นนำสารสกัดกระชายดำทั้ง 4 ชนิด ไปทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ต่อไป

## 6. การทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดจากกระชายดำชนิดต่างๆที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*

เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ของน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ, สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ, สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ และ สารสกัดเมทานอลจากกระชายดำ จึงทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum inhibitory concentration, MIC) ของสารสกัดจากกระชายดำชนิดต่างๆและ DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 (v/v) ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดทั้ง 4 ชนิด และทำการทดสอบกับเชื้อ *H. pylori* จำนวน 13 สายพันธุ์ ประกอบด้วย เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน 2 สายพันธุ์คือ ATCC 43504 และ ATCC 43526, สายพันธุ์ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2 สายพันธุ์คือ DMST20165 และ DMST20885 และสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้ 9 สายพันธุ์คือ C7, C53, 742, 818, 820, 849, 867, 912 และ 949 ผลเป็นดังตารางที่ 4.5 พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 32 µg/ml, รองลงมา คือ สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ และสารสกัดเมทานอลจากกระชายดำ มีค่า MIC เท่ากับ 64 µg/ml ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MIC เท่ากับ 1,024 µg/ml ส่วน DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 (v/v) ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ ดังนั้นสารสกัดกระชายดำที่เหมาะสมคือ สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ อย่างไรก็ตามจะทำการเปรียบเทียบความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ของสารสกัดกระชายดำแต่ละชนิดต่อไป โดยจะใช้ความเข้มข้นของสารสกัดกระชายดำแต่ละชนิดเท่ากับความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* (MIC)

## 7. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำชนิดต่างๆต่อความสามารถในการเกาะติดเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*

เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำ 4 ชนิดคือน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ, สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ, สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ และสารสกัดเมทานอลจากกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยใช้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504 เวลาในการบ่ม 3 ชั่วโมง และความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเท่ากับ MIC ดังนี้ สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ เท่ากับ 32 µg/ml, สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ สารสกัดเมทานอลจากกระชายดำ เท่ากับ 64 µg/ml และ น้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ เท่ากับ 1,024 µg/ml นอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองเพิ่มอีก 1 สารคือ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.4% (v/v) เนื่องจาก DMSO เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดจากกระชายดำ ผลเป็นดังตารางที่ 4.6 จากปริมาณเชื้อตั้งต้นประมาณ  $2.40 \pm 0.00 \times 10^8$  CFU/ml ในกลุ่มที่มีการบ่มเชื้อกับสมุนไพรเพื่อดูความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ผลการนับปริมาณเชื้อเป็นดังนี้ น้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำไม่พบการเจริญของเชื้อ สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำมีปริมาณเชื้อ เท่ากับ  $1.35 \pm 1.63 \times 10^5$  CFU/ml, สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ เท่ากับ  $2.19 \pm 0.68 \times 10^7$  CFU/ml, สารสกัดเมทานอลจากกระชายดำ เท่ากับ  $1.11 \pm 0.40 \times 10^7$  CFU/ml และ DMSO เท่ากับ  $3.23 \pm 1.00 \times 10^7$  CFU/ml การทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* พบว่า % internalization ของกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดจากกระชายดำ เท่ากับ  $5.50 \pm 1.74 \times 10^{-2}$  และค่า % internalization ของ DMSO เท่ากับ  $6.52 \pm 0.30 \times 10^{-2}$  จากค่าที่ได้จะเห็นว่า DMSO ไม่มีผลในการลดความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* และจากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า 0.4% DMSO ไม่มีผลกระทบต่อรูปร่าง และคุณสมบัติของเซลล์ HEp-2 ส่วนสารสกัดสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดพบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ ให้ค่า % internalization เท่ากับ  $3.19 \pm 0.80 \times 10^{-2}$ , รองลงมา คือ สารสกัดเมทานอล จากกระชายดำ มีค่า % internalization เท่ากับ  $3.83 \pm 0.44 \times 10^{-2}$  และ สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ มีค่า % internalization เท่ากับ  $4.53 \pm 0.81 \times 10^{-2}$  ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำไม่สามารถหาค่า % internalization ได้เนื่องจากเมื่อทำการบ่มเชื้อ *H. pylori* กับเซลล์ HEp-2

ตารางที่ 4.5 ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดจากกระชายดำชนิดต่างๆที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*

ชนิดของสารสกัด	ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสมุนไพรต่างๆที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>H. pylori</i> * ( $\mu\text{g/ml}$ )
DMSO 0.4% (v/v)	เชื้อ <i>H. pylori</i> ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้
น้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ	1,024
สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ	64
สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ	32
สารสกัดเมทานอลจากกระชายดำ	64

\*ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

ตารางที่ 4.6 ฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆต่อเปอร์เซ็นต์ การบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*

ชนิดของสมุนไพร	ความเข้มข้น ของสมุนไพร	ปริมาณเชื้อ <i>H. pylori</i> ตั้งต้น* (CFU/ml)	(เชื้อ+ สมุนไพร) ปริมาณเชื้อที่นับ ได้* (CFU/ml)	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลอง	ค่า P-value
				(เชื้อ + เซลล์) % internalization*	(เชื้อ + เซลล์ + สมุนไพร) % internalization*	
น้ำมันหอมระเหยจาก กระชายดำ	1,024 µg/ml	2.40±0.00× 10 <sup>8</sup>	No growth	5.50±1.74× 10 <sup>-2</sup>	อ่านผลไม่ได้**	-
สารสกัดเฮกเซนจาก กระชายดำ	64 µg/ml		1.35±1.63× 10 <sup>5</sup>		4.53±0.81× 10 <sup>-2</sup>	0.895
สารสกัดเอทิลอะซิ เตตจากกระชายดำ	32 µg/ml		2.19±0.68× 10 <sup>7</sup>		3.19±0.80× 10 <sup>-2</sup>	0.341
สารสกัดเมทานอล จากกระชายดำ	64 µg/ml		1.11±0.40× 10 <sup>7</sup>		3.83±0.44× 10 <sup>-2</sup>	0.596
DMSO	0.4% (v/v)		3.23±1.00× 10 <sup>7</sup>		6.52±0.30× 10 <sup>-2</sup>	0.878

\*ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

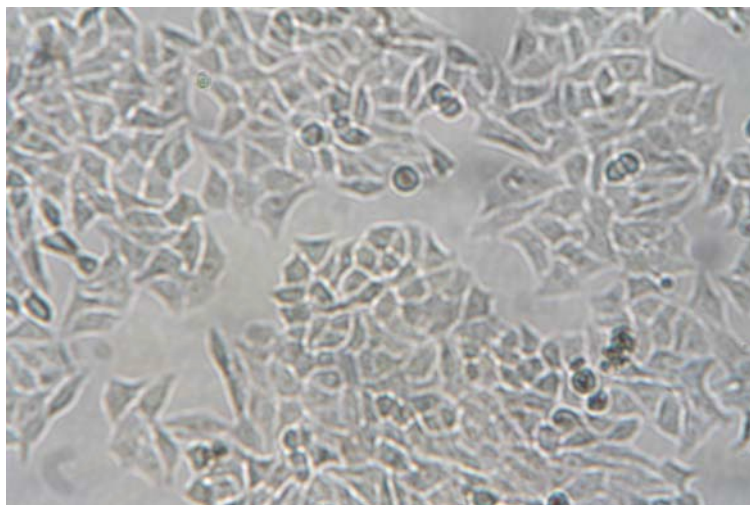
\*\*น้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำมีผลกระทบต่อเซลล์ HEp-2 โดยทำให้เซลล์เปลี่ยนรูปร่าง และไม่สามารถนับจานเพาะเลี้ยงได้

และน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำร่วมกันนาน 3 ชั่วโมง เซลล์ HEP-2 จะมีสภาพผิดปกติดังรูปที่ 4.6 และ 4.7 คือสภาพเซลล์ HEP-2 จากที่มีลักษณะที่เป็นเซลล์ที่แผ่ และเกาะอยู่บนจานเพาะเซลล์ เมื่อผ่านไป 3 ชั่วโมง สภาพเซลล์ HEP-2 จะมีการหดตัวลงมีลักษณะกลมมากขึ้น และเมื่อทำการล้างเซลล์ พบว่าเซลล์ HEP-2 จะขาดคุณสมบัติการเกาะ คือ เซลล์จะร่อนหลุดออกจากจานเพาะเลี้ยง เป็นเหตุให้ไม่สามารถทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEP-2 เชื้อ *H. pylori* ต่อไปได้ นอกจากนี้ยังพบว่าในเวลา 3 ชั่วโมงเชื้อ *H. pylori* ไม่สามารถเจริญได้เมื่อป้อนกับน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ เมื่อนำค่า % internalization ของสารสกัดจากกระชายดำทั้ง 3 ชนิด คือ สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ, สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ และสารสกัดเมทานอลจากกระชายดำมาเปรียบเทียบกันหาความสัมพันธ์ทางสถิติด้วย one-way anova พบว่าค่า % internalization ของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด มีค่า  $P > 0.05$  หมายความว่า ค่า % internalization ของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดเปรียบเทียบกันมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นในการตัดสินใจในการเลือกชนิดของสารสกัดจากกระชายดำจึงขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง พบว่าสารสกัดจากกระชายดำที่ใช้ความเข้มข้นที่น้อยที่สุด คือ สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ ที่ความเข้มข้น 32  $\mu\text{g/ml}$  มาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* ที่เวลา และ ความเข้มข้นต่างๆกัน และ ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ ต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ต่างๆต่อไป

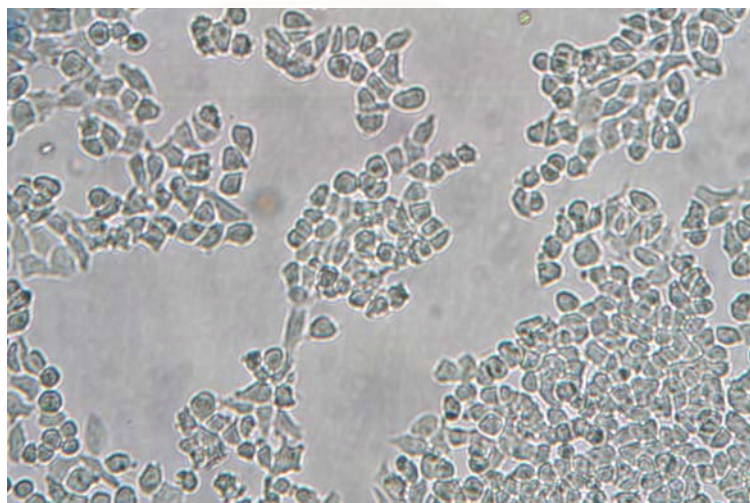
#### 8. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori*

จากสารสกัดกระชายดำ 4 ชนิด คือ น้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ, สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ, สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ และสารสกัดเมทานอลจากกระชายดำ ได้ทำการเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *H. pylori* ที่ดีที่สุด คือ สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ เนื่องจากเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดกระชายดำชนิดอื่นๆ และมีฤทธิ์ลดการบุกรุกเซลล์ได้ดี มาทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

รูปที่ 4.6 ลักษณะเซลล์ HEp-2 ก่อนทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำต่อความสามารถในการเกาะติดเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*



รูปที่ 4.7 ลักษณะเซลล์ HEp-2 หลังจากการเติมน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 1,024  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง





### 8.1. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ที่เวลาต่างๆกัน

เพื่อที่จะดูผลของเวลาในการบ่มสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ ต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยทำการทดสอบกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504 ใช้เวลาในการบ่มที่ 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ และความเข้มข้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ เท่ากับ 32 µg/ml ผลดังตารางที่ 4.7 จากปริมาณเชื้อตั้งต้นประมาณ  $1.41 \pm 0.07 \times 10^8$  CFU/ml ในกลุ่มที่มีการบ่มเชื้อกับสมุนไพรเพื่อดูความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ผลการนับปริมาณเชื้อเป็นดังนี้ ที่เวลา 3 ชั่วโมงมีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $2.62 \pm 0.16 \times 10^7$  CFU/ml, ที่เวลา 6 ชั่วโมง เท่ากับ  $1.40 \pm 0.10 \times 10^7$  CFU/ml, ที่เวลา 12 ชั่วโมง เท่ากับ  $2.96 \pm 0.33 \times 10^6$  CFU/ml และ ที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ  $5.20 \pm 0.14 \times 10^4$  CFU/ml จะเห็นได้ว่าปริมาณเชื้อค่อยๆลดลงที่เวลาบ่มนานขึ้น และจะลดลงอย่างมากที่เวลาบ่มนาน 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง การทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* พบว่าในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ มีค่า % internalization ที่เวลา 3, 6, 12 และ 24 เท่ากับ  $1.76 \pm 0.10 \times 10^{-2}$ ,  $4.45 \pm 0.73 \times 10^{-2}$ ,  $5.74 \pm 0.65 \times 10^{-2}$  และ  $4.68 \pm 0.20 \times 10^{-1}$  ตามลำดับ จะเห็นว่าค่า % internalization จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปนานมากขึ้นแสดงว่าที่เวลานานขึ้นจำนวนเชื้อ *H. pylori* ที่บุกรุกเซลล์HEp-2 ก็จะมีมากขึ้นด้วย ในส่วนของค่า % internalization ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่เวลา 3, 6, 12 และ 24 เท่ากับ  $4.82 \pm 0.50 \times 10^{-3}$ ,  $8.56 \pm 0.03 \times 10^{-3}$ ,  $6.99 \pm 1.05 \times 10^{-3}$  และ  $3.76 \pm 0.50 \times 10^{-2}$  ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบทางสถิติด้วย one-way anova พบว่าค่า % internalization ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่เวลาต่างๆของกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองค่าแตกต่างกันอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยพบว่าที่เวลา 3 ชั่วโมง % internalization ลดลง 3.7 เท่า, ที่เวลา 6 ชั่วโมง % internalization ลดลง 5.2 เท่า, ที่เวลา 12 ชั่วโมง % internalization ลดลง 8.2 เท่าและ ที่เวลา 24 ชั่วโมง % internalization ลดลง 12.5 เท่า แสดงว่าเวลาบ่มสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่นานขึ้นนอกจากมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากขึ้น ยังมีฤทธิ์ลดการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ได้มากขึ้นด้วย โดยที่ไม่มีผลกระทบต่อเซลล์HEp-2 เนื่องจากการส่องดูกล้องจุลทรรศน์พบว่าลักษณะของเซลล์ HEp-2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ลักษณะของเซลล์แผ่ และเกาะอยู่บนจานเพาะเซลล์ เช่นเดียวกับเซลล์ HEp-2 ที่ไม่ได้บ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ

ตารางที่ 4.7 % internalization จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดของกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ที่เวลาบ่ม 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

เวลาที่บ่ม (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ <i>H.</i> <i>pylori</i> ตั้งต้น* (CFU/ml)	(เชื้อ+ สมุนไพร) ปริมาณเชื้อที่นับ ได้* (CFU/ml)	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลอง	ค่า P- value
			(เชื้อ + เซลล์) % internalization*	(เชื้อ + เซลล์ + สมุนไพร) % internalization*	
3	1.41±0.07× 10 <sup>8</sup>	2.62±0.16× 10 <sup>7</sup>	1.76±0.10× 10 <sup>-2</sup>	4.82±0.50× 10 <sup>-3</sup>	0.040
6		1.40±0.10× 10 <sup>7</sup>	4.45±0.73× 10 <sup>-2</sup>	8.56±0.03× 10 <sup>-3</sup>	0.020
12		2.96±0.33× 10 <sup>6</sup>	5.74±0.65× 10 <sup>-2</sup>	6.99±1.05× 10 <sup>-3</sup>	0.009
24		5.20±0.14× 10 <sup>4</sup>	4.68±0.20× 10 <sup>-1</sup>	3.76±0.50× 10 <sup>-2</sup>	0.001

\*ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

## 8.2. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่ความเข้มข้น ต่างๆกันต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*

เพื่อดูผลของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำความเข้มข้นต่างๆต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยในการทดสอบจะใช้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504 ป่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตดที่ความเข้มข้นในช่วง  $\pm 2$  MIC ดังนี้ ความเข้มข้นที่ 8, 16, 32, 64 และ 128  $\mu\text{g/ml}$  ผลดังตารางที่ 4.8 จากปริมาณเชื้อตั้งต้นประมาณ  $1.65 \pm 0.19 \times 10^8$  CFU/ml ในกลุ่มที่มีการป่มเชื้อกับสมุนไพรเพื่อดูความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ผลการนับปริมาณเชื้อเป็นดังนี้ ที่ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g/ml}$  มีปริมาณเชื้อ เท่ากับ  $2.69 \pm 0.03 \times 10^7$  CFU/ml, ที่ความเข้มข้น 16  $\mu\text{g/ml}$  เท่ากับ  $2.14 \pm 0.74 \times 10^7$  CFU/ml, ที่ความเข้มข้น 32  $\mu\text{g/ml}$  เท่ากับ  $2.14 \pm 0.37 \times 10^7$  CFU/ml, ที่ความเข้มข้น 64  $\mu\text{g/ml}$  เท่ากับ  $1.46 \pm 0.37 \times 10^7$  CFU/ml และ ที่ความเข้มข้น 128  $\mu\text{g/ml}$  เท่ากับ  $1.36 \pm 0.01 \times 10^6$  CFU/ml จะเห็นได้ว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำความเข้มข้นระหว่าง 8-128  $\mu\text{g/ml}$  ( $\pm 2$  MIC) มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* โดยที่ความเข้มข้น 128  $\mu\text{g/ml}$  จะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อมากที่สุด การทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* พบว่าค่า % internalization ของกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสมุนไพรเท่ากับ  $1.01 \pm 0.10 \times 10^{-2}$  สำหรับค่า % internalization ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 8, 16, 32, 64 และ 128  $\mu\text{g/ml}$  เท่ากับ  $6.00 \pm 1.03 \times 10^{-3}$ ,  $4.35 \pm 0.24 \times 10^{-3}$ ,  $3.27 \pm 0.56 \times 10^{-3}$ ,  $1.18 \pm 0.08 \times 10^{-3}$  และ  $8.58 \pm 0.86 \times 10^{-4}$  ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบทางสถิติด้วย one-way anova พบว่าค่า % internalization ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆกันมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยที่ความเข้มข้นสูงซึ่งความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* จะลดลงเมื่อ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร % internalization ที่ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g/ml}$  ลดลง 1.7 เท่า, ที่ความเข้มข้น 16  $\mu\text{g/ml}$  % internalization ลดลง 2.3 เท่า, ที่ความเข้มข้น 32  $\mu\text{g/ml}$  % internalization ลดลง 3.1 เท่า, และที่ความเข้มข้น 64  $\mu\text{g/ml}$  % internalization ลดลง 8.6 เท่า และที่ความเข้มข้น 128  $\mu\text{g/ml}$  % internalization ลดลง 11.1 เท่า ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่มากขึ้นนอกจากมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากขึ้น ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ได้มากขึ้นด้วยโดยที่ไม่มีผลต่อเซลล์HEp-2 เนื่องจากการส่องดูกล้องจุลทรรศน์พบว่าลักษณะของเซลล์ HEp-2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ลักษณะของเซลล์แผ่ และเกาะอยู่บนจานเพาะเซลล์ เช่นเดียวกับเซลล์ HEp-2 ที่ไม่ได้ป่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ

ตารางที่ 4.8 % internalization ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ที่เวลาป่ม 3 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )	ปริมาณเชื้อ <i>H. pylori</i> ตั้งต้น* (CFU/ml)	(เชื้อ+ สมุนไพร) ปริมาณเชื้อที่นับ ได้* (CFU/ml)	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลอง	ค่า P- value
			(เชื้อ + เซลล์) % internalization*	(เชื้อ + เซลล์ + สมุนไพร) % internalization*	
8	1.65±0.19× 10 <sup>8</sup>	2.69±0.03× 10 <sup>7</sup>	1.01±0.10× 10 <sup>-2</sup>	6.00±1.03× 10 <sup>-3</sup>	0.055
16		2.14±0.74× 10 <sup>7</sup>		4.35±0.24× 10 <sup>-3</sup>	0.015
32		2.14±0.37× 10 <sup>7</sup>		3.27±0.56× 10 <sup>-3</sup>	0.013
64		1.46±0.37× 10 <sup>7</sup>		1.18±0.08× 10 <sup>-3</sup>	0.006
128		1.36±0.01× 10 <sup>6</sup>		8.58±0.86× 10 <sup>-4</sup>	0.006

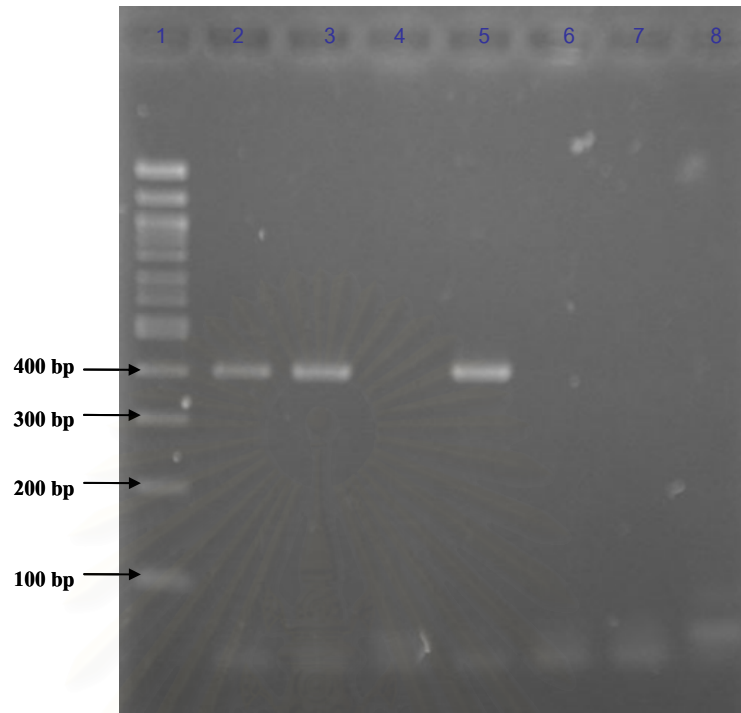
\*ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

### 8.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ต่างๆ

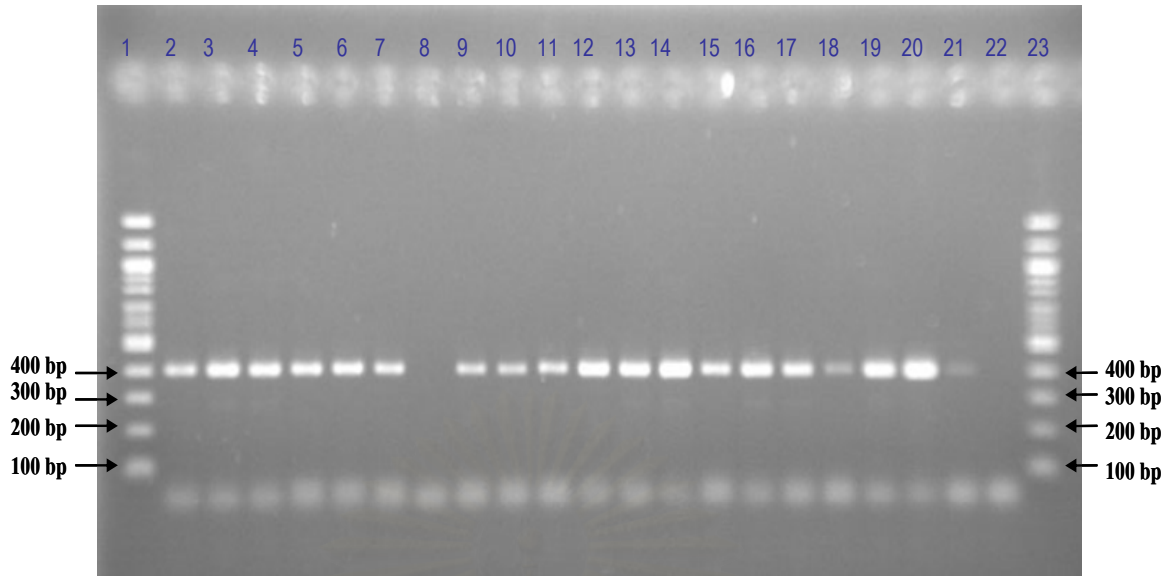
เนื่องจาก *H. pylori* สายพันธุ์ที่มียีน *cagA* จะมีความรุนแรงในการก่อโรค ขณะที่สายพันธุ์ที่ไม่มียีน *cagA* จะไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรค ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มียีน *cagA* เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ไม่มียีน *cagA* ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร โดยจะทำการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *H. pylori* ว่ามียีน *cagA* หรือไม่ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) จากนั้นจึงจะทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีและไม่มียีน *cagA* ต่อไป

#### 8.3.1 การตรวจหายีน *cagA* ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เพื่อจำแนกเชื้อ *H. pylori* ว่าเป็นสายพันธุ์ที่มียีน *cagA* หรือไม่ จึงได้ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *H. pylori* ทั้งหมด 26 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน 4 สายพันธุ์คือ ATCC 43504, ATCC 43526, ATCC 51932 และ ATCC 51110 สายพันธุ์ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2 สายพันธุ์ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกจากคนไข้ คือ DMST20165 และ DMST20885 และสายพันธุ์ที่แยกจากคนไข้จำนวน 20 สายพันธุ์ คือ FM2, C7, C37, C42, C53, C54, 292, 742, 749, 818, 820, 849, 851, 861, 867, 912, 920, 928, 949 และ 955 ทำการตรวจหายีน *cagA* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส แล้วทำการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบน 2% วุ้นอะกาโรส โดยผลผลิต PCR ของยีน *cagA* มีขนาดเท่ากับ 394 คู่เบส ผลที่ได้ดังรูปที่ 4.8 และ 4.9 พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐานทั้งหมด 4 สายพันธุ์มีเพียง 1 สายพันธุ์ที่ไม่มียีน *cagA* คือ ATCC 51932 (รูปที่ 4.8 แถวที่ 4) สายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้ 20 สายพันธุ์มีเพียง 1 สายพันธุ์ที่ไม่มียีน *cagA* คือ 292 (รูปที่ 4.9 แถวที่ 8) ส่วนสายพันธุ์ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2 สายพันธุ์ DMST20165 (รูปที่ 4.8 แถวที่ 6) และ DMST20885 (รูปที่ 4.8 แถวที่ 7) ทั้งคู่ไม่มียีน *cagA* ส่วนเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐานที่มียีน *cagA* คือ ATCC 43504 (รูปที่ 4.5 แถวที่ 2), ATCC 43526 (รูปที่ 4.5 แถวที่ 3) และ ATCC 51110 (รูปที่ 4.5 แถวที่ 5) สายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้ที่มียีน *cagA* คือ FM2, C7, C37, C42, C53, C54, 742, 749, 818, 820, 849, 851, 861, 867, 912, 920, 928, 949 และ 955 (รูปที่ 4.9 แถวที่ 12-7 และ 9-20) ซึ่งจะนำเชื้อสาย



รูปที่ 4.8 แสดงผลผลิต PCR ยีน *cagA* ของเชื้อ *H. pylori* บนวุ้นอะกาโรส 2 % แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2-5 *H. pylori* ATCC 43504, ATCC 43526, ATCC 51932, ATCC 51110 แถวที่ 6-7 *H. pylori* DMST 20165 และ DMST 20885, แถวที่ 8 Negative control



รูปที่ 4.9 ผลผลิต PCR ยีน *cagA* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้ทั้งหมด 20 สายพันธุ์บนวัฒนธรรมอะกาโรส 2 %; แถวที่ 1 และ 23 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2-21 เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ FM2, C7, C37, C42, C53, C54, 292, 742, 749, 818, 820, 849, 851, 861, 867, 912, 920, 928, 949 และ 955, แถวที่ 22 Negative control

พันธุ์มาตรฐานที่มียีน *cagA* 2 สายพันธุ์ คือ ATCC 43504 และ ATCC 43526 และไม่มียีน *cagA* 1 สายพันธุ์ คือ ATCC 43526 และสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้ 1 สายพันธุ์ คือ 820 และไม่มียีน *cagA* 1 สายพันธุ์ คือ DMST 20165 ไปทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ต่อไป รวมทั้งทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อความสามารถในการเกาะติดเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มียีน *cagA* เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ไม่มียีน *cagA* ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่อย่างไรด้วย

### 8.3.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อ

#### ความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีและไม่มียีน *cagA*

เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีและไม่มียีน *cagA* โดยจะบ่มสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำกับและเชื้อ *H. pylori* 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มียีน *cagA* (*cagA*+) คือสายพันธุ์ ATCC 43504, ATCC 43526 และ 820 และกลุ่มที่ไม่มียีน *cagA* (*cagA*-) คือ สายพันธุ์ ATCC 51932 และ DMST 20165 กับ เซลล์ HEp-2 โดยในการทดสอบครั้งแรกจะใช้เวลาบ่มที่ 6 ชั่วโมง และความเข้มข้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่ 64 µg/ml เนื่องจากผลยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เวลา 6 ชั่วโมงมีค่าสูงกว่าที่ 3 ชั่วโมง ในขณะที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อมากเกินไปจนทำให้ปริมาณเชื้อตั้งต้นน้อยกว่าปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการบุกรุกเซลล์มาก และใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่ 64 µg/ml เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่สามารถลดการบุกรุกเซลล์ได้สูง และไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อมากเกินไป เมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ 128 µg/ml ผลดังตารางที่ 4.9 ปริมาณเชื้อตั้งต้นของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504, ATCC 43526, ATCC 51932 และ DMST 20165 เท่ากับ  $1.25 \times 10^7$  CFU/ml,  $1.49 \times 10^7$  CFU/ml,  $2.68 \times 10^7$  CFU/ml และ  $2.86 \times 10^7$  CFU/ml ตามลำดับ พบว่าการบ่มเชื้อกับสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำไม่พบการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ทำให้สภาวะดังกล่าวไม่เหมาะสมในการศึกษาและเปรียบเทียบการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* จึงได้ลดเวลาการทดลองลงเหลือเพียง 3 ชั่วโมงผลเป็นดังตารางที่ 4.10 ปริมาณเชื้อตั้งต้นของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 51932,



DMST 20165, ATCC 43504, ATCC 43526 และ 820 เท่ากับ  $2.67 \pm 0.26 \times 10^8$  CFU/ml,  $7.25 \pm 1.06 \times 10^5$  CFU/ml,  $6.85 \pm 0.50 \times 10^6$  CFU/ml,  $7.00 \pm 2.12 \times 10^6$  CFU/ml และ  $4.50 \pm 1.27 \times 10^6$  CFU/ml ตามลำดับ ในกลุ่มที่มีการบ่มเชื้อกับ สมุนไพรเพื่อดูความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ผลการนับปริมาณของ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 51932, DMST 20165, ATCC 43504, ATCC 43526 และ 820 เท่ากับ  $9.68 \pm 0.04 \times 10^5$  CFU/ml,  $9.83 \pm 2.44 \times 10^4$  CFU/ml,  $9.20 \pm 0.35 \times 10^5$  CFU/ml,  $5.30 \pm 0.42 \times 10^5$  CFU/ml และ  $2.52 \pm 0.17 \times 10^6$  CFU/ml ตามลำดับ จะเห็นว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำมีผลยับยั้ง การเจริญของเชื้อสายพันธุ์ ATCC 51932 มากที่สุด การทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* พบว่าในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัด กระชายดำ มีค่า % internalization ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 51932, DMST 20165, ATCC 43504, ATCC 43526 และ 820 เท่ากับ  $7.20 \pm 0.38 \times 10^{-3}$ ,  $4.14 \pm 2.83 \times 10^{-2}$ ,  $1.88 \pm 0.44 \times 10^{-1}$ ,  $3.68 \pm 0.15 \times 10^{-1}$  และ  $3.45 \pm 0.32 \times 10^{-1}$  ตามลำดับ ส่วนค่า % internalization ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ ต่อเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 51932, DMST 20165, ATCC 43504, ATCC 43526 และ 820 เท่ากับ  $1.75 \pm 0.21 \times 10^{-3}$ ,  $6.55 \pm 7.31 \times 10^{-3}$ ,  $2.81 \pm 0.12 \times 10^{-2}$ ,  $2.83 \pm 0.86 \times 10^{-2}$  และ  $5.35 \pm 1.63 \times 10^{-2}$  ตามลำดับ เมื่อนำค่า % internalization ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อเชื้อ *H. pylori* กลุ่มสายพันธุ์ที่มีและไม่มียีน *cagA* กับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตด จากกระชายดำ มาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วย one-way anova พบว่า ค่า % internalization ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำในกลุ่มที่มี และไม่มียีน *cagA* มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ยกเว้น สายพันธุ์ DMST 20165 โดย พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำสามารถ ลดการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ในเชื้อ *H. pylori* กลุ่มที่มียีน *cagA* ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* กลุ่มที่ไม่มียีน *cagA* ประมาณ 2-3 เท่า

ตารางที่ 4.9 % internalization ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ต่างๆกัน ที่เวลาบ่ม 6 ชั่วโมง และความเข้มข้น 64 µg/ml

สายพันธุ์ของเชื้อ <i>H. pylori</i>	ปริมาณเชื้อ <i>H. pylori</i> ตั้งต้น* (CFU/ml)	(เชื้อ+ สมุนไพร) ปริมาณเชื้อที่นับได้* (CFU/ml)	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลอง
			(เชื้อ + เซลล์) % internalization*	(เชื้อ + เซลล์ + สมุนไพร) % internalization*
ATCC 51932	$2.68 \times 10^7$	No growth**	$4.20 \times 10^{-2}$	$1.09 \times 10^{-2}$
DMST 20165	$2.86 \times 10^7$	No growth**	$8.08 \times 10^{-3}$	$3.57 \times 10^{-3}$
ATCC 43504	$1.25 \times 10^7$	No growth**	$7.22 \times 10^{-2}$	$1.45 \times 10^{-2}$
ATCC43526	$1.49 \times 10^7$	No growth**	$7.51 \times 10^{-2}$	$4.01 \times 10^{-3}$
820	No growth **	No growth**	No growth	No growth

\*ทำการทดลอง 1 ครั้ง

\*\*เชื้อ *H. pylori* ไม่มีการเจริญ

ตารางที่ 4.10 % internalization ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ต่างๆกันที่เวลาบ่ม 3 ชั่วโมง และ ความเข้มข้น 64 µg/ml

สายพันธุ์ของเชื้อ <i>H. pylori</i>	ปริมาณเชื้อ <i>H. pylori</i> ตั้งต้น* (CFU/ml)	(เชื้อ+ สมุนไพร) ปริมาณเชื้อที่นับได้* (CFU/ml)	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลอง	ค่า P-value
			(เชื้อ + เซลล์) % internalization*	(เชื้อ + เซลล์ + สมุนไพร) % internalization*	
ATCC 51932	$2.67 \pm 0.26 \times 10^8$	$9.68 \pm 0.04 \times 10^5$	$7.20 \pm 0.38 \times 10^{-3}$	$1.75 \pm 0.20 \times 10^{-3}$	0.003
DMST 20165	$7.25 \pm 1.06 \times 10^5$	$9.83 \pm 2.44 \times 10^4$	$4.14 \pm 2.83 \times 10^{-2}$	$6.55 \pm 7.31 \times 10^{-3}$	0.234
ATCC 43504	$6.85 \pm 0.50 \times 10^6$	$9.20 \pm 0.35 \times 10^5$	$1.88 \pm 0.44 \times 10^{-1}$	$2.81 \pm 0.12 \times 10^{-2}$	0.036
ATCC 43526	$7.00 \pm 2.12 \times 10^6$	$5.30 \pm 0.42 \times 10^5$	$3.68 \pm 0.15 \times 10^{-1}$	$2.83 \pm 0.86 \times 10^{-2}$	0.001
820	$4.50 \pm 1.27 \times 10^6$	$5.75 \pm 0.14 \times 10^5$	$3.45 \pm 0.32 \times 10^{-1}$	$5.35 \pm 1.63 \times 10^{-2}$	0.007

\*ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

### 8.3.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อ ความสามารถในการเกาะติดเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สาย พันธุ์ที่มีและไม่มียีน *cagA*

เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อ  
ความสามารถในการเกาะติดเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีและไม่มี  
ยีน *cagA* โดยจะบ่มสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำกับเชื้อ *H. pylori* 2  
กลุ่ม คือ กลุ่มที่มียีน *cagA* (*cagA*+) คือสายพันธุ์ ATCC 43504, ATCC 43526  
และ 820 และกลุ่มที่ไม่มียีน *cagA* (*cagA*-) คือ สายพันธุ์ ATCC 51932 และ  
DMST 20165 กับ เซลล์ HEp-2 ซึ่งจะใช้เวลาในการบ่มที่ 3 ชั่วโมง และความ  
เข้มข้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ เท่ากับ 64 µg/ml การทดสอบ  
ความสามารถในการเกาะติดเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* จะทำเช่นเดียวกับการ  
ทดสอบความสามารถในการบุกรุก ต่างกันตรงที่การทดสอบความสามารถใน  
การเกาะติดจะไม่มีขั้นตอนที่บ่มเชื้อกับยาปฏิชีวนะ gentamicin ผลการทดลอง  
ความสามารถในการเกาะติดเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีและไม่มี  
ยีน *cagA* เป็นดังตารางที่ 4.11 ปริมาณเชื้อตั้งต้นของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์  
ATCC 51932, DMST 20165, ATCC 43504, ATCC 43526 และ 820 เท่ากับ  
 $1.09 \pm 0.71 \times 10^8$  CFU/ml,  $6.75 \pm 0.35 \times 10^7$  CFU/ml,  $8.65 \pm 3.46 \times 10^7$  CFU/ml,  
 $1.16 \pm 0.09 \times 10^8$  CFU/ml และ  $1.49 \pm 0.04 \times 10^7$  CFU/ml ตามลำดับ ในกลุ่มที่มี  
มีการบ่มเชื้อกับสมุนไพรเพื่อดูความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ผล  
การนับปริมาณของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 51932, DMST 20165,  
ATCC 43504, ATCC 43526 และ 820 เท่ากับ  $1.73 \pm 0.05 \times 10^7$  CFU/ml,  
 $1.24 \pm 0.01 \times 10^7$  CFU/ml,  $1.59 \pm 0.08 \times 10^7$  CFU/ml,  $1.82 \pm 0.04 \times 10^7$  CFU/ml  
และ  $2.52 \pm 0.17 \times 10^6$  CFU/ml ตามลำดับ การทดสอบความสามารถในการ  
เกาะติดเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* พบว่าในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัด  
กระชายดำ มีค่า % adhesion ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 51932,  
DMST 20165, ATCC 43504, ATCC 43526 และ 820 เท่ากับ  $1.66 \pm 0.55$ ,  
 $1.56 \pm 0.32$ ,  $1.70 \pm 0.09$ ,  $1.84 \pm 0.74$  และ  $2.07 \pm 0.08$  ตามลำดับ ส่วนค่า %  
adhesion ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์  
ATCC 51932, DMST 20165, ATCC 43504, ATCC 43526 และ 820 เท่ากับ  
 $1.48 \pm 0.54$ ,  $1.33 \pm 0.25$ ,  $0.25 \pm 0.10$ ,  $0.64 \pm 0.17$  และ  $0.57 \pm 0.09$  ตามลำดับ เมื่อ  
นำค่า % adhesion ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อ

ตารางที่ 4.11 % adhesion ของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำต่อการเกาะติดเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ต่างๆกันที่เวลาปม 3 ชั่วโมง และความเข้มข้น 64 µg/ml

สายพันธุ์ของ เชื้อ <i>H. pylori</i>	ปริมาณเชื้อ <i>H.</i> <i>pylori</i> ตั้งต้น* (CFU/ml)	(เชื้อ+ สมุนไพร) ปริมาณเชื้อที่นับ ได้* (CFU/ml)	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลอง	ค่า P- value
			(เชื้อ + เซลล์) % adhesion*	(เชื้อ + เซลล์ + สมุนไพร) % adhesion*	
ATCC 51932	$1.09 \pm 0.71 \times 10^8$	$1.73 \pm 0.05 \times 10^7$	1.84±0.74	0.64±0.17	0.157
DMST 20165	$6.75 \pm 0.35 \times 10^7$	$1.24 \pm 0.01 \times 10^7$	2.07±0.08	0.57±0.09	0.003
ATCC 43504	$8.65 \pm 3.46 \times 10^7$	$1.59 \pm 0.08 \times 10^7$	1.66±0.55	1.48±0.54	0.772
ATCC 43526	$1.16 \pm 0.09 \times 10^8$	$1.82 \pm 0.04 \times 10^7$	1.56±0.32	1.33±0.25	0.513
820	$1.49 \pm 0.04 \times 10^7$	$2.52 \pm 0.17 \times 10^6$	1.70±0.09	0.25±0.10	0.002

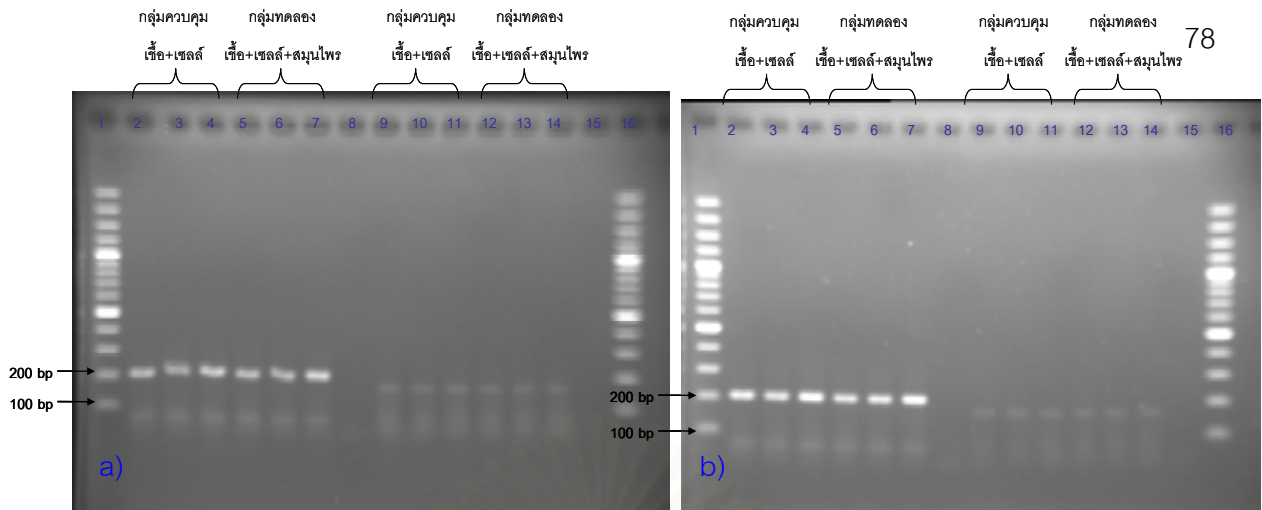
\*ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

เชื้อ *H. pylori* กลุ่มสายพันธุ์ที่มีและไม่มียีน *cagA* มาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วย one-way anova พบว่า ค่า % internalization แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีค่าเหมือนกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) 3 สายพันธุ์ คือ ATCC 51932, ATCC 43504 และ ATCC 43526 และกลุ่มที่มีค่าต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) 2 สายพันธุ์ คือ DMST 20165 และ 820 ดังนั้นสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำไม่สามารถยับยั้งการเกาะติดเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน แต่สามารถยับยั้งการเกาะติดเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากคนไข้

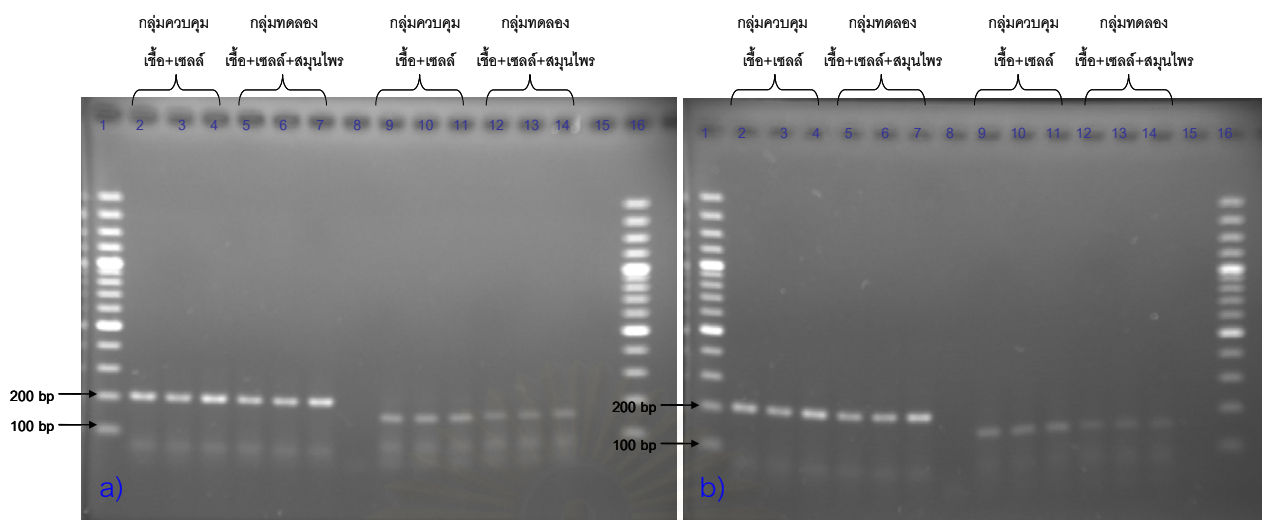
#### 9. การวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี RT PCR

เนื่องจากกลไกการเกาะติดและบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* จะเกี่ยวข้องกับโปรตีนหลายชนิด ได้แก่ *alpA*, *alpB*, *babA*, *oipA*, *hopZ*, *hsp60* และ *hsp70* ดังนั้นการที่สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำสามารถยับยั้งความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ในการเกาะติดและบุกรุกเซลล์ HEp-2 นั้นมีกลไกอย่างไร เกี่ยวข้องกับยีนที่มีบทบาทสำคัญในการเกาะติดและบุกรุกเซลล์หรือไม่ โดยจะทำการศึกษาผลของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อการแสดงออกของยีนที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* คือ ยีน *alpA* และยีน *babA* ด้วยวิธี RT PCR และทำการเปรียบเทียบสัดส่วนการแสดงออกของยีน (Relative ratio) เทียบกับยีน 16s ribosomal RNA เลือกสภาวะการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีและไม่มียีน *cagA* ที่มีการป้อนเชื้อ และเซลล์ HEp-2 กับเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ นาน 3 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 64  $\mu\text{g/ml}$  โดยศึกษาผลของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน 3 สายพันธุ์ คือ ATCC 43504, ATCC 43526 และ ATCC 51932 ผลดังรูปที่ 4.10 แสดงให้เห็นผลผลิตของยีน 16s ribosomal (รูปที่ 4.10 แถวที่ 2-7) ขนาดเท่ากับ 204 คู่เบส และผลผลิตของยีน *alpA* (รูปที่ 4.10 แถวที่ 9-14) ขนาดเท่ากับ 168 คู่เบส, และรูปที่ 4.11 แสดงให้เห็นผลผลิตของยีน 16s ribosomal (รูปที่ 4.11 แถวที่ 2-7) ขนาดเท่ากับ 204 คู่เบส และผลผลิตของยีน *babA* (รูปที่ 4.11 แถวที่ 9-14) ขนาดเท่ากับ 158 คู่เบส

เมื่อนำภาพที่ถ่ายได้มาทำการวิเคราะห์ความเข้มของแถบผลผลิต PCR ด้วยโปรแกรม Alphasampler 2200 จะได้ผลดังตารางที่ 4.12 พบว่าอัตราส่วนความเข้มของยีน *alpA*/16s



รูปที่ 4.10 a และ b แสดงผลผลิต RT-PCR ยีน 16s ribosomal และยีน *alpA* ของเชื้อ *H. pylori* บน 2% ภูโนอะกาไรส; แถวที่ 1 และ 16 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2-7 ยีน 16s ribosomal ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504, ATCC 43526 กลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ และกลุ่มทดลองที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำตามลำดับ, แถวที่ 8 Negative control 16s ribosomal : แถวที่ 9-14 ยีน *alpA* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504, ATCC 43526 กลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ และกลุ่มทดลองที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำตามลำดับ ตามลำดับ, แถวที่ 15 Negative control ยีน *alpA*



รูปที่ 4.11 a และ b แสดงผลผลิต RT-PCR ยีน 16s ribosomal และยีน *babA* ของเชื้อ *H. pylori* บน 2% ฝุ่นอะกาไรส; แถวที่ 1 และ 16 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2-7 ยีน 16s ribosomal ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504, ATCC 43526 กลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ และกลุ่มทดลองที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำตามลำดับ, แถวที่ 8 Negative control ยีน 16s ribosomal, แถวที่ 9-14 ยีน *babA* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504, ATCC 43526 กลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ และกลุ่มทดลองที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำตามลำดับ, แถวที่ 15 Negative control ยีน *babA*



ตารางที่ 4.12 แสดงอัตราส่วนความเข้มของยีน *alpA* ต่อยีน 16s rRNA ของการวัดระดับการ  
แสดงออกของยีนด้วยวิธี RT PCR

สายพันธุ์ของเชื้อ <i>H. pylori</i>	กลุ่มควบคุม เชื้อ <i>H. pylori</i> + เซลล์ HEp-2	กลุ่มทดลอง เชื้อ <i>H. pylori</i> + เซลล์ HEp-2 + สารสกัดเอทิลอะซิเตด	ค่า P-value
	ratio of IDV* ( <i>alpA</i> /16s)	ratio of IDV* ( <i>alpA</i> /16s)	
ATCC 43504	0.62±0.07	0.62±0.05	0.216
ATCC 43526	0.63±0.08	0.60±0.08	
ATCC 51932	0.55±0.23	0.56±0.03	

\*ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

ตารางที่ 4.13 แสดงอัตราส่วนความเข้มของยีน *babA* ต่อยีน 16s rRNA ของการวัดระดับการ  
แสดงออกของยีนด้วยวิธี RT PCR

สายพันธุ์ของเชื้อ <i>H. pylori</i>	กลุ่มควบคุม เชื้อ <i>H. pylori</i> + เซลล์ HEp-2	กลุ่มทดลอง เชื้อ <i>H. pylori</i> + เซลล์ HEp-2 + สารสกัดเอทิลอะซิเตด	ค่า P-value
	ratio of IDV* ( <i>babA</i> /16s)	ratio of IDV* ( <i>babA</i> /16s)	
ATCC 43504	0.74±0.05	0.68±0.06	0.131
ATCC 43526	0.77±0.08	0.68±0.07	
ATCC 51932	0.66±0.06	0.60±0.08	

\*ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

ribosomal ของกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504, ATCC 43526 และ ATCC 51932 เท่ากับ  $0.62 \pm 0.07$ ,  $0.63 \pm 0.08$  และ  $0.55 \pm 0.23$  ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มทดลองที่มีการบ่มเชื้อ และเซลล์ กับสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ เท่ากับ  $0.56 \pm 0.03$ ,  $0.60 \pm 0.08$  และ  $0.62 \pm 0.05$  ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วย one-way anova พบว่าการแสดงออกของยีน *alpA* ในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำและกลุ่มทดลองที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำเหมือนกัน ( $P > 0.05$ ) แสดงว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *alpA* ของเชื้อ *H. pylori* เมื่อพิจารณาในยีน *babA* พบว่าอัตราส่วนความเข้มของยีน *babA/16s* ribosomal ของกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504, ATCC 43526 และ ATCC 51932 เท่ากับ  $0.66 \pm 0.06$ ,  $0.77 \pm 0.08$  และ  $0.74 \pm 0.05$  ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มทดลองที่มีการบ่มเชื้อ และเซลล์ กับสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ เท่ากับ  $0.60 \pm 0.08$ ,  $0.68 \pm 0.07$  และ  $0.68 \pm 0.06$  ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วย one-way anova พบว่าการแสดงออกของยีน *babA* ในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำและกลุ่มทดลองที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำเหมือนกัน ( $P > 0.05$ ) แสดงว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *babA* ของเชื้อ *H. pylori* จึงสรุปได้ว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *alaA* และยีน *babA*

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การติดเชื้อ *Helicobacter pylori* นับเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญอันหนึ่งในปัจจุบัน เนื่องจากเชื้อนี้เป็นสาเหตุสำคัญของโรคแผลในกระเพาะอาหาร กระเพาะอาหารอักเสบ และ หากติดเชื้อนี้เรื้อรังจะก่อให้เกิดเป็นมะเร็งกระเพาะอาหารได้ (111) ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่ามีอัตราการติดเชื้อนี้สูงมากพบการติดเชื้อในประชากรกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรทั้งหมดในโลก(112) การรักษาโรคในขณะนี้ จะใช้ยาลดกรดร่วมกับยาปฏิชีวนะ ซึ่งมีราคาแพง บางครั้งมีผลข้างเคียง และพบว่าเชื้อมีการดื้อยา (113) การใช้สมุนไพรในการรักษาจึงเป็นการแพทย์ทางเลือกอีกทางหนึ่ง เนื่องจากปัจจัยในการเกิดโรคและพยาธิสภาพการเกิดโรคจะเริ่มจากเชื้อเข้าไปเกาะติด (adherence) บริเวณไมโครวิลไลของเซลล์เยื่อบุในกระเพาะอาหาร และมีการทำลายบริเวณดังกล่าว จากนั้นเชื้อจะบุกรุกเข้าไปยังภายในเซลล์ (invasion และ internalization) โดยกลไกที่ยังไม่ทราบแน่ชัด(114) ดังนั้นการป้องกันการเกาะติดและบุกรุกเซลล์จึงเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจสำหรับการรักษาและป้องกันการติดเชื้อ

การใช้สมุนไพรพื้นบ้านในการรักษาโรคในระบบทางเดินอาหารเป็นสิ่งที่ทำกันมาเป็นระยะเวลานาน สมุนไพรที่ใช้รักษาโรคกระเพาะสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐานได้แก่ ขมิ้นชัน กล้วย ชิงกานพลู กระเทียม กะเพรา ตะไคร้ พริกไทยดำ ดีปลี ข่า กระชาย แห้วหมู กระวานไทย เร่ว และมะนาว แต่สมุนไพรชนิดที่เป็นที่นิยมนำมาใช้ในการรักษาในปัจจุบันและมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *H. pylori* มีเพียง ขมิ้นชัน กระเทียม และ กล้วย ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกสมุนไพรที่หาได้ง่าย ที่ใช้ในชีวิตประจำวัน ทั้งหมด 9 ชนิด คือ กระชายดำ, กระเทียม, กล้วย, ขมิ้นชัน, ตะไคร้, ใบบัวบก, ฟ้าทะลายใจ, ว่านหางจระเข้ และ ลำต้นโหระพา มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* โดยทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล จากนั้นนำมาทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* (Minimum inhibitory concentration, MIC) พบว่าค่า MIC ของสมุนไพรที่มีค่า MIC ดีที่สุด 2 อันดับแรก คือ ขมิ้นชัน และกระชายดำ ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 32 และ 64  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ แต่จากการศึกษาของ Bhamarapravati และคณะ (9) พบว่าค่า MIC ของกระชายดำมีค่าเท่ากับ 25  $\mu\text{g/ml}$  และในการศึกษาของ Goel และคณะ (106) พบว่าค่า MIC ของกล้วยอยู่ในช่วงระหว่าง 0.32-1000  $\mu\text{g/ml}$  ในการศึกษาของ Mhady และคณะ (102) พบว่าค่า MIC ของขมิ้นชันอยู่ในช่วงระหว่าง 6.25-50  $\mu\text{g/ml}$  ในการศึกษาของ Sivam และคณะ (107) พบว่าค่า MIC กระเทียม มีค่าเท่ากับ 40  $\mu\text{g/ml}$  ส่วนในการศึกษาสมุนไพรตะไคร้, ใบบัวบก, ฟ้าทะลายใจ, ว่านหางจระเข้ และ ลำต้นโหระพา ไม่มีการศึกษาที่พบว่าสามารถต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆได้ แต่มีการศึกษาในด้านสาร

ด้านอนุมูลอิสระ, สารต่อต้านการแข็งตัวของเลือด และ สารต้านการอักเสบ(115-118) จะเห็นว่าการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* จากแต่ละงานวิจัยมีค่า MIC ทั้งที่ใกล้เคียงและแตกต่างกันบ้าง เนื่องจากหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น สถานที่ปลูกสมุนไพร, วิธีในการเตรียมสารสกัด, ตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียมสารสกัด และ วิธีเก็บรักษาสารสกัดจากสมุนไพร

ในการทดสอบความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี Gentamicin internalization assay ได้ทำการปรับสภาวะการทดสอบให้เหมาะสมในหลายๆด้านด้วยกันสำหรับการทดสอบกับเชื้อ *H. pylori* เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการบุกรุกเซลล์ต่ำคือประมาณ 0.1% (108) โดยต้องใช้ปริมาณเชื้อต่อจำนวนเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสมและอีกประการคือ สารที่ใช้ในการทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง HEp-2 แยก ต้องไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *H. pylori* จากการทดสอบความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* เบื้องต้น พบว่า ปริมาณเชื้อ *H. pylori* ตั้งต้นที่เหมาะสมต้องมากกว่า  $10^8$  CFU/ml หรือประมาณความขุ่น 10 McFarland standard ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนต่อเซลล์ HEp-2 เท่ากับ 100: 1 พบ % internalization เท่ากับ 0.05% และสารที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์ HEp-2 แยก คือ น้ำกลั่น เนื่องจากน้ำกลั่นสามารถทำให้เซลล์ HEp-2 แยก และน้ำกลั่นยังไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ส่วนสารอื่นๆ คือ 0.01%-0.1% triton-x 100 และ poly-L-lysine ไม่เหมาะสมเนื่องจากพบว่าสารทั้ง 2 ชนิดยับยั้งการเจริญของเชื้อ จากการศึกษานี้ของ Evans และคณะ(58) ในการทดลองเรื่องความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* พบว่าใช้อัตราส่วนของปริมาณเชื้อตั้งต้นต่อเซลล์ HEp-2 เท่ากับ 250:1 และใช้ triton-x 100 ที่ความเข้มข้น 0.1% พบ % internalization เท่ากับ 0.2% และในการศึกษาของ Wilkinson และคณะ(108) ทดลองเรื่องความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ที่มาจากคนไข้ พบว่าใช้อัตราส่วนของปริมาณเชื้อตั้งต้นต่อเซลล์ HEp-2 เท่ากับ 150:1 และใช้ poly-L-lysine ที่ความเข้มข้น 0.01% พบมี % internalization เท่ากับ 0.1% จากการทดลองข้างต้นพบว่าการที่อัตราส่วนเชื้อ *H. pylori* ต่อเซลล์ HEp-2 ที่มากขึ้นมีผลทำให้ % internalization มากขึ้นตามไปด้วย อาจเนื่องมาจากในสภาวะที่มีเชื้อ *H. pylori* อยู่มาก เชื้อจะแย่งกันเข้าไปในเซลล์ในอัตราส่วนที่มากตามไปด้วยเมื่อเทียบกับในสภาวะที่มีเชื่อน้อย ส่วนสารที่ทำให้เซลล์ HEp-2 แยกที่แตกต่างกันยังไม่สามารถสรุปผลกระทบที่เกิดต่อ % internalization ได้ ส่วนยาปฏิชีวนะ Gentamicin ซึ่งใช้กำจัดเชื้อที่เกาะอยู่บนเซลล์ HEp-2 เพื่อจะได้วัดปริมาณเชื้อที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์เท่านั้น พบว่าจากการทดลอง Gentamicin 100 µg/ml สามารถฆ่าเชื้อ *H. pylori* ที่เกาะอยู่ภายนอกเซลล์ได้หมดและไม่ทำลายเชื้อที่อยู่ภายในเซลล์ เนื่องจาก Gentamicin เป็นยาปฏิชีวนะที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่

จึงไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้(119) ผลของบัพเฟอร์ HBSS ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *H. pylori* ในการทดลองพบว่าบัพเฟอร์นี้ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *H. pylori* มีการศึกษาของ Osaki และคณะ (120) ในการตรวจหาเชื้อ *H. pylori* ในอุจจาระ ในการทดลองนี้ได้ใช้บัพเฟอร์ HBSS ในการละลายสิ่งตัวอย่างพบว่าสามารถนำเชื้อจากตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้สำเร็จ ทั้งๆที่เทคนิคในการเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งตัวอย่างอุจจาระให้สำเร็จทำได้ยาก

ในการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพร 4 ชนิด คือ ขมิ้นชัน, กระชายดำ, กระเทียม และ กลัวยต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี Gentamicin internalization assay โดยใช้สมุนไพรที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC ที่เวลาบ่มนาน 3 ชั่วโมงพบว่าสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดมีความสามารถในการลดการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ไม่แตกต่างกัน แต่เนื่องจากกระเทียมและกลัวยไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MIC > 5000 µg/ml และเท่ากับ 25000 µg/ml ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นที่ใช้ พบว่า ขมิ้นชัน และกระชายดำ ใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า กระเทียม และ กลัวย มาก คือ 32 µg/ml ซึ่งความเข้มข้นของสมุนไพรที่สูงมากอาจมีความเป็นพิษกับเซลล์ HEp-2 ได้ นอกจากนั้นปริมาณตัวทำละลาย DMSO ที่อยู่ในสารสกัดจะมากตามไปด้วย ซึ่งจะมีผลกระทบต่อเซลล์ HEp-2 เนื่องจากหาก %DMSO > 1 จะทำให้เซลล์เป็นพิษ อย่างไรก็ตามได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของเวลาในการบ่มสมุนไพรแต่ละชนิดกับความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยใช้ระยะเวลาบ่มที่ 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสมุนไพรระยะเวลาบ่มที่นานขึ้นจะทำให้เชื้อ *H. pylori* สามารถบุกรุกเซลล์ HEp-2 ได้มากขึ้น กระชายดำ, กระเทียม และกลัวย สามารถลดการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ได้ทั้งที่เวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ขณะที่ขมิ้นชันกลับมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการบุกรุกเซลล์ HEp-2 เมื่อใช้เวลานานขึ้น ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด กระชายดำจึงเป็นสมุนไพรที่น่าสนใจที่สุด เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* และลดความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ได้ดีที่สุด จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากระชายดำ สามารถต้านการเกิดการอักเสบในกระเพาะอาหารได้(10) มีการศึกษาในการใช้กระชายดำในการช่วยรักษาโรคมะเร็งของเซลล์มะเร็งชนิดที่มีโปรตีนที่ดื้อต่อยา(multi drug resistance associated-proteins ,MRP)(121) และจากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าการรับประทานกระชายดำติดต่อกันเป็นระยะเวลานานไม่พบการเกิดความเป็นพิษจากกระชายดำ(12)

ในการเตรียมสารสกัดจากกระชายดำในการทดลองนี้ได้ทำการเตรียมสกัดสารจากกระชายดำ ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆจนได้สารสกัดกระชายดำ 4 ชนิดด้วยกัน คือ น้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ, สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ, สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ และสารสกัดเมทานอลจากกระชายดำ โดย ปริมาณ (%yield) ของสารที่สกัดได้ในแต่ละส่วน

ข้างต้นจากกระชายดำ 1 กิโลกรัมมีปริมาณเท่ากับ 0.129%, 0.046, 0.721% และ 1.277% ตามลำดับ จะเห็นว่าสารสกัดเมทานอลจากกระชายดำจะได้ปริมาณมากที่สุด และสารสกัดที่ได้ น้อยที่สุด คือ สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ จะเห็นว่าการศึกษาสารสกัดสมุนไพรโดยทั่วไปมัก ใช้ตัวทำละลายที่เป็น สารจำพวกแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล หรือเอทานอล เพียงชนิดเดียว แต่ใน การทดลองสารสกัดที่จำเพาะลงไปการสกัดสารจะมีตัวทำละลายมากกว่า 1 ตัวขึ้นไป โดยจะ คำนึงถึงคุณสมบัติของการมีขั้ว และไม่มีขั้วของสารสกัดที่ได้ ซึ่งจะเริ่มจากการสกัดน้ำมันหอม ระเหยที่เป็นสารที่ไม่มีขั้ว และระเหยได้ง่าย ต่อมาคือ การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย เฮกเซนซึ่ง เป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ต่อมา คือการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตซึ่งเป็นตัวทำละลาย ที่มีขั้วน้อย และสุดท้าย คือการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วมาก ก็ จะทำให้ได้สารสกัดชนิดต่างๆตามคุณสมบัติการมีขั้วที่แตกต่างกัน การสกัดด้วยตัวทำละลาย หลายชนิดนี้มีข้อดีว่าการสกัดสมุนไพรโดยตัวทำละลายชนิดเดียวตรงที่ สารสกัดที่ได้จากตัวทำ ละลายหลายชนิดสามารถสกัดสารต่างๆออกจากสมุนไพรได้หมดเนื่องจากการใช้คุณสมบัติของ ตัวทำละลายและจำนวนครั้งในการสกัดที่มากกว่าตัวทำละลาย 1 ชนิด นอกจากนี้การเตรียมสาร สกัดสมุนไพรโดยตัวทำละลายหลายชนิดยังมีประโยชน์ในการนำสารสกัดที่ได้ ไปศึกษาถึงสารออก ฤทธิ์ต่อไป โดยใช้คุณสมบัติคร่าวๆของสารสกัดที่สนใจจากชนิดของตัวทำละลายที่ใช้

การทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดจากกระชายดำชนิดต่างๆที่สามารถ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* จากสารสกัดกระชายดำ 4 ชนิด คือ น้ำมันหอมระเหยจาก กระชายดำ, สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ, สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ และสารสกัด เมทานอลจากกระชายดำ พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ ของเชื้อได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 32 µg/ml, รองลงมา คือ สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ และ สารสกัดเมทานอลจากกระชายดำ มีค่า MIC เท่ากับ 64 µg/ml ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจาก กระชายดำ ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MIC เท่ากับ 1,024 µg/ml จากการศึกษาผล การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นของสารสกัดกระชายดำในตัวทำละลายหลายๆชนิด ได้แก่ การศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ(11) ในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพ 7 ชนิดคือ *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. faecalis*, *C. albicans* และ *M. gypseum* พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *B. subtilis* ได้, การศึกษาสารสกัดเอทานอลจากกระชายดำในการยับยั้งการ เจริญของเชื้อ *H. pylori* (9) พบว่ามีค่าMIC เท่ากับ 25 µg/ml ยังไม่มีการศึกษาการยับยั้งการ เจริญของเชื้อ *H. pylori* ในสารสกัดกระชายดำจากเอทิลอะซิเตต และเฮกเซน

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำ 4 ชนิด คือ น้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ, สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ, สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ และสารสกัดเมทานอลจากกระชายดำต่อความสามารถในบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำมีผลกระทบต่อเซลล์ HEp-2 โดยจะทำให้เซลล์เสียคุณสมบัติไป มีรูปร่างลักษณะผิดปกติเซลล์จะเปลี่ยนรูปร่างจากเซลล์ที่มีลักษณะแผ่เกาะติดกับจานเพาะเลี้ยงเซลล์ กลายเป็นเซลล์ที่มีลักษณะกลม นอกจากนี้ยังเสียคุณสมบัติในการเกาะกับพื้นผิว ทำให้ไม่สามารถทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ต่อไปได้ ส่วนฤทธิ์ของสารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ, สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ และสารสกัดเมทานอลจากกระชายดำต่อความสามารถในบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* พบว่าสามารถลดการบุกรุกได้ 1.4, 1.7 และ 1.2 เท่าตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำจึงมีฤทธิ์ยับยั้งการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ได้ดีที่สุด ในการศึกษาสมุนไพรกระชายดำมีการศึกษาสารสกัดที่จำเพาะในกลุ่ม flavonoid (122, 123) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่มีขั้วไปจนถึงมีขั้วน้อย ขึ้นกับโครงสร้างโมเลกุลของสาร จากการทดสอบเบื้องต้นหาสารกลุ่ม flavonoid ด้วยวิธี shinoda test (124) พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตดให้ผลบวก เป็นไปได้ว่าสาร flavonoid บางชนิดที่มีอยู่ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตดจะเป็นสารที่มีผลต่อความสามารถในบุกรุกเซลล์ จึงเป็นที่น่าศึกษาต่อไปว่าสาร flavonoid ตัวใดในกระชายดำที่มีผลต่อความสามารถในบุกรุกเซลล์

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ที่เวลาต่างๆกัน คือที่ 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ และใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ(MIC) เท่ากับ 32 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* พบว่าปริมาณการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* แปรผันตามเวลาในการบ่มเชื้อ กับเซลล์ ยิ่งเวลานานมากขึ้นเชื้อ *H. pylori* เข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้นด้วย ในขณะเดียวกันการบ่มเชื้อ *H. pylori* กับเซลล์ HEp-2 และสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่เวลานานมากขึ้น พบว่าเวลาที่มีผลต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 โดยเวลาบ่มสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่นานขึ้นมีฤทธิ์ลดการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ได้มากขึ้นด้วยดังนี้ ที่เวลา 3 6 12 24 ชั่วโมง % internalization ลดลงจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัด 3.7 เท่า 5.2 เท่า, 8.2 เท่า และ 12.5 เท่า ตามลำดับ จากการศึกษาการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ที่เวลา 1-6 ชั่วโมง ของ Bjorkholm และคณะ(109) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมงเชื้อ *H. pylori* สามารถบุกรุกเซลล์ HEp-2 ได้ประมาณ 0.5% ของเชื้อทั้งหมดที่ใช้ และเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมงเชื้อ *H. pylori* สามารถบุกรุกเซลล์ HEp-2 ได้ประมาณ 1-2% จะเห็นว่าที่เวลาในการบ่มนานมากขึ้นเชื้อ *H. pylori* สามารถบุกรุกเซลล์ HEp-2 ได้มาก

ขึ้น แต่ค่า % internalization ที่ได้จากการการศึกษาครั้งนี้ต่ำกว่าในการศึกษาข้างต้นมาก อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ของเชื้อ *H. pylori*, ปริมาณเชื้อ *H. pylori* ตั้งต้น, อายุของเซลล์ HEp-2 และรวมไปถึงสารเคมีต่างๆที่ใช้ในการทดลองที่ต่างกัน

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆกันต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยบ่มเชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 กับสารสกัดเอทิลอะซิเตดที่ความเข้มข้นในช่วง  $\pm 2$  MIC ดังนี้ ความเข้มข้นที่ 8, 16, 32, 64 และ 128  $\mu\text{g/ml}$  %การบุกรุกลดลงเป็น 1.7 2.3, 3.1, 8.6 11.1 เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัด พบว่าที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปจะมีผลในการลดความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อได้มากขึ้น

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีและไม่มียีน *cagA* เนื่องจากยีน *cagA* เป็นยีนที่สร้างโปรตีน cytotoxin-associated antigen ซึ่งเป็น virulent factor ของเชื้อ *H. pylori* ในการศึกษาเกี่ยวกับระบาดวิทยาของเชื้อ *H. pylori* พบว่าส่วนใหญ่ในคนไข้มักจะมีการติดเชื้อของเชื้อ *H. pylori* ที่มีสายพันธุ์มียีน *cagA* เป็นส่วนใหญ่ เช่นจากการศึกษาในอเมริกา(125) พบว่าคนไข้ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ทั้งหมดมีสายพันธุ์มียีน *cagA* คิดเป็นร้อยละ 69.8% ในประเทศญี่ปุ่น(126)คนไข้โรคมะเร็งกระเพาะอาหารมีการติดเชื้อ *H. pylori* ทั้งหมดมีสายพันธุ์มียีน *cagA* คิดเป็นร้อยละ 84.6% การทดสอบในเบื้องต้นจึงได้ทำการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *H. pylori* ทั้งหมด 26 สายพันธุ์ ว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีหรือไม่มียีน *cagA* ด้วยเทคนิค PCR ผลพบว่าเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่มียีน *cagA* 3 สายพันธุ์ คือ ATCC 43504, ATCC 43526 และ ATCC 51110 ไม่มียีน *cagA* 1 สายพันธุ์คือ ATCC 51932 เชื้อที่แยกจากคนไข้ที่มียีน *cagA* 19 สายพันธุ์ คือ FM2, C7, C37, C42, C53, C54, 742, 749, 818, 820, 849, 851, 861, 867, 912, 920, 928, 949 และ 955 ไม่มียีน *cagA* 1 สายพันธุ์คือ 292 จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มียีน *cagA* 3 สายพันธุ์ คือ ATCC 43504, ATCC 43526 และ 820 และสายพันธุ์ที่ไม่มียีน *cagA* 2 สายพันธุ์ คือ ATCC 51932 และ DMST 20165 พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำมีผลต่อเชื้อ *H. pylori* กลุ่มที่มียีน *cagA* ต่อการบุกรุกเซลล์ HEp-2 มากกว่าเชื้อ *H. pylori* กลุ่มที่ไม่มียีน *cagA* โดยสารสกัดเอทิลอะซิเตดจะทำให้เชื้อ *H. pylori* กลุ่มที่มียีน *cagA* มีความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ลดลงมากกว่าการบุกรุกที่ลดลงของเชื้อ *H. pylori* กลุ่มที่ไม่มียีน *cagA* ประมาณ 2-3 เท่า การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อความสามารถในการเกาะติดเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ที่มียีน *cagA* 3 สายพันธุ์ คือ ATCC 43504, ATCC 43526



และ 820 และสายพันธุ์ที่ไม่มียีน *cagA* 2 สายพันธุ์ คือ ATCC 51932 และ DMST 20165 พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำมีฤทธิ์ลดการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* ทั้งกลุ่มสายพันธุ์ที่มียีน *cagA* กับกลุ่มสายพันธุ์ที่ไม่มียีน *cagA* ไม่แตกต่างกัน แต่ในกลุ่มเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐานและสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากคนไข้พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำมีฤทธิ์ต่อความสามารถในการเกาะติดเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ในกลุ่มสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ คนไข้มากกว่ากลุ่มสายพันธุ์มาตรฐาน ดังนั้นสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำสามารถลดความสามารถในการเกาะติดเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ได้ ในกลุ่มสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากคนไข้ แต่ไม่สามารถลดความสามารถในการเกาะติดเซลล์ในกลุ่มสายพันธุ์มาตรฐาน

การวัดระดับการแสดงออกของยีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดและบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี RT PCR คือ ยีน *alpA* และยีน *babA* โดยมียีน 16s ribosomal RNA เป็น internal control ยีน *alpA* และ *babA* เป็นยีนที่มีบทบาทเป็น outer membrane protein ของเชื้อ *H. pylori* มีการศึกษาวิจัยยีนทั้ง 2 ในด้านเกาะติด และการบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* เช่น การศึกษาผลของยีน *alpA* ในสัตว์ทดลอง(47) พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่ขาดยีนดังกล่าวจะทำให้เชื้อสูญเสียความสามารถในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์กระเพาะอาหาร, ในการศึกษาหน้าที่ของยีน *alpA* ในเชื้อสายพันธุ์โลกฝั่งตะวันตก และสายพันธุ์โลกฝั่งตะวันออก(127) พบว่ายีน *alpA* มีหน้าที่สำคัญในการเกาะติดเซลล์กระเพาะอาหารในเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์โลกฝั่งตะวันตก แต่ในเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์โลกฝั่งตะวันออก พบว่าเมื่อตัดแปลงเชื้อให้ไม่มียีน *alpA* การเกาะติดของเชื้อสายพันธุ์โลกฝั่งตะวันออกนี้ไม่มีการลดลง สำหรับในการศึกษายีน *babA* หลายๆการศึกษา(49, 128, 129) พบว่ายีน *babA* มีหน้าที่สำคัญในการเกาะติดเซลล์กระเพาะอาหาร โดยจับกับ Lewis b antigen ของโฮสต์เซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มียีนนี้จะมีความสามารถในการบุกรุกเซลล์กระเพาะอาหารที่สูง จากการวิเคราะห์ความเข้มของแถบผลผลิต PCR ด้วยโปรแกรม Alphasizer 2200 พบว่าการแสดงออกของยีน *alpA* และ *babA* ในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำและกลุ่มทดลองที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำไม่แตกต่างกัน ดังนั้นคาดว่ากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อการยับยั้งการบุกรุกเซลล์จึงไม่เกี่ยวข้องกับยีน *alpA* และ *babA* แต่อาจเกี่ยวข้องกับยีนอื่น ในการศึกษาอื่น ๆ นั้นจะมุ่งเน้นไปที่ยีนที่ถูกถอดรหัสออกมาเป็น Outer membrane proteins ได้แก่ ยีน *hopZ* และยีน *hpaA* เป็นต้น ยีน *hopZ* (130) เป็น adhesion ที่สำคัญที่ใช้ในการเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร แต่ยังไม่ทราบถึง receptor บนโฮสต์เซลล์ที่จับด้วย ส่วนยีน *hpaA* (131) เป็น adhesin ที่จับกับ *N-acetylneuraminyllactose* (sialic acid) ที่อยู่บนโฮสต์เซลล์ ซึ่งต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สำหรับการทดลองในครั้งนี้ทำให้เราพบว่าสมุนไพรรักษาสามารถออกฤทธิ์ต่อการเกาะติด และบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ได้ โดยสารที่ออกฤทธิ์นั้นอยู่ในส่วนของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตด ดังนั้นในการศึกษาต่อไป ควรนำสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำมาทำการศึกษาว่าประกอบด้วยสารต่างๆได้แก่อะไรบ้าง ทำการแยกสารเหล่านั้นออกมาให้เป็นสารที่จำเพาะแต่ละชนิด โดยวิธีต่างๆ เช่น ด้วยวิธี high performance liquid chromatography; HPLC หรือ gas chromatography; GC เป็นต้น แล้วนำสารที่ได้แต่ละชนิดมาทำการทดสอบฤทธิ์ต่อการบุกรุก และเกาะติดเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* อีกครั้ง จะทำให้ทราบว่าสารใดเป็นสารที่ก่อให้เกิดการลดลงของการบุกรุก และเกาะติดเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ที่แท้จริง จากนั้นนำสารที่มีฤทธิ์ที่ดีที่สุดที่ได้มาศึกษาโครงสร้าง และรูปร่างของสาร เพื่อให้ง่ายต่อการศึกษาต่อไป ว่ากลไกที่เกิดขึ้นระหว่างสารสกัดที่ได้กับตัวเชื้อ *H. pylori* เป็นอย่างไร



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

- (1) Correa, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-  
-First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology  
and Prevention. Cancer Research. 52(1992): 6735-6740.
- (2) Luk, G. D. Tumors of the stomach. Gastrointestinal and liver disease Dallas (TX):  
WB Saunders. (1998): 733-749.
- (3) Nilius, M.; Strohle, A.; Bode, G.; Malfertheiner, P. Coccoid like forms (CLF) of  
Helicobacter pylori. Enzyme activity and antigenicity. Zentralbl Bakteri.  
280(1993): 259-272.
- (4) นงลักษณ์ สุวรรณพิณี. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์  
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, 2544.
- (5) Figueiredo, C.; Machado, J. C.; Yamaoka, Y. Pathogenesis of Helicobacter pylori  
Infection. Helicobacter. 10(2005): 14-20.
- (6) Nishihara, K.; Nozawa, Y.; Nomura, S.; Kitazato, K.; Miyake, H. Analysis of  
Helicobacter pylori binding site on HEp-2 cells and three cell lines from  
human gastric carcinoma. Fundamental & Clinical Pharmacology.  
13(1999): 555-561.
- (7) Megraud, F.; Lamouliatte, H.; Boyanova, L. Bactericidal effect of amoxicillin on  
Helicobacter pylori in an in vitro model using epithelial cells.  
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 35(1991): 869-872.
- (8) Shmueli, H.; Burger, O.; Neeman, I.; Yahav, J.; Samra, Z.; Niv, Y. Susceptibility  
of Helicobacter pylori isolates to the antiadhesion activity of a high-  
molecular-weight constituent of cranberry. Diagnostic Microbiology &  
Infectious Disease. 50(2004): 231-235.
- (9) Bhamarapavati, S.; Pendland, S. L.; Mahady, G. B. Extracts of spice and food  
plants from Thai traditional medicine inhibit the growth of the human  
carcinogen Helicobacter pylori. In Vivo. 17(2007): 541-544.
- (10) Rujjanawate, C.; Kanjanapothi, D.; Amornlerdpison, D.; Pojanagaroon, S. Anti-  
gastric ulcer effect of Kaempferia parviflora. Journal of  
Ethnopharmacology. 102(2005): 120-122.

- (11) Tanasiriwattana, N.; Natakuatung, S.; Tanajaro, T. CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM Kaempferia galanga, K. parviflora and K. angustifolia. Bachelor's Thesis, Department of pharmacy, Chulalongkorn University, 1997.
- (12) Prathanturarug, S.; Apichartbutra, T.; Chuakul, W.; Saralamp, P. Mass propagation of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker by in vitro regeneration. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 82(2007): 179-183.
- (13) Shen, Z.; Fox, J. G.; Dewhirst, F. E.; Paster, B. J.; Foltz, C. J.; Yan, L. *Helicobacter rodentium* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from laboratory mice. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 47(1997): 627-634.
- (14) Vandamme, P.; Harrington, C. S.; Jalava, K.; On, S. L. W. Misidentifying *Helicobacters*: the *Helicobacter cinaedi* Example. Journal of Clinical Microbiology. 38(2000): 2261-2266.
- (15) Tomb, J. F.; White, O.; Kerlavage, A. R.; Clayton, R. A.; Sutton, G. G.; Fleischmann, R. D. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature. 388(1997): 539-547.
- (16) Atherton, J. C.; Cao, P.; Peek, Jr. R. M.; Tummuru, M. K.; Blaser, M. J.; Cover, T. L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. Journal of Biological Chemistry. 270(1995): 17771-17777.
- (17) Cover, T. L.; Blaser, M. J. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. Journal of Biological Chemistry. 267(1992): 10570-10575.
- (18) Smoot, D. T.; Resau, J. H.; Earlington, M. H.; Simpson, M.; Cover, T. L. Effects of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin on primary cultures of human gastric epithelial cells. Gut. 39(1996): 795-799.

- (19) Massari, P.; Manetti, R.; Burrioni, D.; Nuti, S.; Norais, N.; Rappuoli, R. Binding of the *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin to Target Cells. American Society for Microbiology. 66(1998): 3981-3984.
- (20) Yahiro, K.; Niidome, T.; Kimura, M.; Hatakeyama, T.; Aoyagi, H.; Kurazono, H. Activation of *Helicobacter pylori* VacA Toxin by Alkaline or Acid Conditions Increases Its Binding to a 250-kDa Receptor Protein-tyrosine Phosphatase. Journal of Biological Chemistry. 274(1999): 36693-36699.
- (21) Bernard, M.; Moschioni, M.; Papini, E.; Telford, J. L.; Rappuoli, R.; Montecucco, C. TPA and butyrate increase cell sensitivity to the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*. FEBS Journal. 436(1998): 218-222.
- (22) Yahiro, K.; Niidome, T.; Hatakeyama, T.; Aoyagi, H.; Kurazono, H.; Padilla, P. I. *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin Binds to the 140-kDa Protein in Human Gastric Cancer Cell Lines, AZ-521 and AGS. Biochemical and Biophysical Research Communications. 238(1997): 629-632.
- (23) Reyrat, J.; Lanzavecchia, S.; Lupetti, P.; Bernard, M.; Pagliaccia, C.; Pelicic, V. 3 D Imaging of the 58 kDa Cell Binding Subunit of the *Helicobacter pylori* Cytotoxin. Journal of Molecular Biology. 290(1999): 459-470.
- (24) Cover, T. L.; Reddy, L. Y.; Blaser, M. J. Effects of ATPase inhibitors on the response of HeLa cells to *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. Infection and Immunity. 61(1993): 1427.
- (25) Suerbaum, S.; Michetti, P. *Helicobacter PYLORI* Infection. New England Journal of Medicine. 347(2002): 1175-1186.
- (26) Fischer, W.; Puls, J.; Buhrdorf, R.; Gebert, B.; Odenbreit, S.; Haas, R. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. Molecular Microbiology. 42(2001): 1337-1348.

- (27) Higashi, H.; Tsutsumi, R.; Fujita, A.; Yamazaki, S.; Asaka, M.; Azuma, T.  
Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. Proceedings of the National Academy of Sciences. 99(2002): 14428-14433.
- (28) Stein, M.; Rappuoli, R.; Covacci, A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. National Academy Sciences. 97(2000): 1263-1268.
- (29) Zheng, P. Y.; Jones, N. L. *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO(coronin 1) protein. Cellular Microbiology. 5(2003): 25-40.
- (30) Tsutsumi, R.; Takahashi, A.; Azuma, T.; Higashi, H.; Hatakeyama, M. Focal Adhesion Kinase Is a Substrate and Downstream Effector of SHP-2 Complexed with *Helicobacter pylori* CagA. Molecular and Cellular Biology. 26(2006): 261-276.
- (31) Murakami, K.; Kodama, M.; Fujioka, T. Latest insights into the effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric carcinogenesis. World Journal of Gastroenterology. 12(2006): 2713-2720.
- (32) Amieva, M. R.; Vogelmann, R.; Covacci, A.; Tompkins, L. S.; Nelson, W. J.; Falkow, S. Disruption of the Epithelial Apical-Junctional Complex by *Helicobacter pylori* CagA. Science. 300(2003): 1430.
- (33) Churin, Y.; Al-Ghoul, L.; Kepp, O.; Meyer, T. F.; Birchmeier, W.; Naumann, M. *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. The Journal of Cell Biology. 161(2003): 249-255.
- (34) Mimuro, H.; Suzuki, T.; Tanaka, J.; Asahi, M.; Haas, R.; Sasakawa, C. Grb 2 Is a Key Mediator of *Helicobacter pylori* CagA Protein Activities. Molecular Cell. 10(2002):745-755.

- (35) Yokoyama, K.; Higashi, H.; Ishikawa, S.; Fujii, Y.; Kondo, S.; Kato, H.  
Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 102(2005): 9661-9666.
- (36) Falkow, S. Bacterial entry into eukaryotic cells. Cell. 65(1991): 1099-1102.
- (37) Malaty, H. M.; Engstrand, L.; Pedersen, N. L.; Graham, D. Y. *Helicobacter pylori* Infection: Genetic and Environmental Influences: A Study of Twins. Annals of Internal Medicine. 120(1994): 982-986.
- (38) Azuma, T.; Ito, S.; Sato, F.; Yamazaki, Y.; Miyaji, H.; Ito, Y. The role of the HLA-DQA 1 gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. Cancer. 82(1998): 1013-1018.
- (39) Ghiara, P.; Rossi, M.; Marchetti, M.; Di Tommaso, A.; Vindigni, C.; Ciampolini, F. Therapeutic intragastric vaccination against *Helicobacter pylori* in mice eradicates an otherwise chronic infection and confers protection against reinfection. Infection and Immunity. 65(1997): 4996-5002.
- (40) Mohammadi, M.; Nedrud, J.; Redline, R.; Lycke, N.; Czinn, S. J. Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter* infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load. Gastroenterology. 113(1997): 1848-1857.
- (41) Chen, W. *Helicobacter pylori* Infection in Interleukin-4-Deficient and Transgenic Mice. Scandinavian Journal of Gastroenterology. 1999;34(1999): 987-992.
- (42) Calam, J. *Helicobacter pylori*, acid and gastrin. European journal of gastroenterology & hepatology. 7(1995):310-317.
- (43) Chowers, M. Y.; Keller, N.; Tal, R.; Barshack, I.; Lang, R.; Bar-Meir, S. Human gastrin: a *Helicobacter pylori*--specific growth factor. Gastroenterology. 117(1999):1113-1118.

- (44) Weigert, N.; Schaffer, K.; Schusdziarra, V.; Classen, M.; Schepp, W. Gastrin secretion from primary cultures of rabbit antral G cells: stimulation by inflammatory cytokines. Gastroenterology. 110(1996): 147-154.
- (45) Teichmann, R. K.; Andress, H. J.; Liebich, H. Role of cells of the immune system in the antrum in stimulation of digestive processes. Langenbecks Archiv fur Chirurgie. 362(1984):151-154.
- (46) McGee, D. J.; Mobley, H. L. T. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. Current Opinion in Gastroenterology. 16(2000): 24-31.
- (47) De Jonge, R.; Durrani, Z.; Rijpkema, S. G.; Kuipers, E. J.; Kusters, J. G. Role of the Helicobacter pylori outer-membrane proteins AlpA and AlpB in colonization of the guinea pig stomach. Journal of Medical Microbiology. 53(2004): 375-379.
- (48) Odenbreit, S.; Till, M.; Hofreuter, D.; Faller, G.; Haas, R. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of Helicobacter pylori to human gastric tissue. Molecular Microbiology. 31(1999): 1537-1548.
- (49) Hennig, E. E.; Mernaugh, R.; Edl, J.; Cao, P.; Cover, T. L. Heterogeneity among Helicobacter pylori Strains in Expression of the Outer Membrane Protein BabA. Infection and Immunity. 72(2004): 3429.
- (50) Boren, T.; Falk, P.; Roth, K. A.; Larson, G.; Normark, S. Attachment of Helicobacter pylori to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. Science. 262(1993): 1892.
- (51) Ilver, D.; Arnqvist, A.; Frick, I. M.; Kersulyte, D.; Incecik, E. T. Helicobacter pylori Adhesin Binding Fucosylated Histo-Blood Group Antigens Revealed by Retagging. Science. 279(1998): 373-377.
- (52) Syder, A. J.; Guruge, J. L.; Li, Q.; Hu, Y.; Oleksiewicz, C. M.; Lorenz, R. G. Helicobacter pylori Attaches to NeuAca2, 3Gal-1, 4 Glycoconjugates Produced in the Stomach of Transgenic Mice Lacking Parietal Cells. Helicobacter. 3(1999):263-274.



- (53) Normark, S. Type I helicobacter pylori shows lewisb-independent adherence to gastric cells requiring de novo protein synthesis in both host and bacteria. Journal of Infectious Diseases. 178(1998):1379-1390.
- (54) Clyne, M.; Drumm, B. Absence of effect of Lewis A and Lewis B expression on adherence of Helicobacter pylori to human gastric cells. Gastroenterology. 113(1997):72-80.
- (55) Celik, J.; Su, B.; Tiren, U.; Finkel, Y.; Thoresson, A. C.; Engstrand, L. Virulence and colonization-associated properties of Helicobacter pylori isolated from children and adolescents. Journal of Infectious Diseases. 177(1998): 247-252.
- (56) Gerhard, M.; Lehn, N.; Neumayer, N.; Boren, T.; Rad, R.; Schepp, W. Clinical relevance of the Helicobacter pylori gene for blood-group antigen-binding adhesin. National Academy Sciences; 96(1999): 12778-12783.
- (57) Rokbi, B.; Seguin, D.; Guy, B.; Mazarin, V.; Vidor, E.; Mion, F. Assessment of Helicobacter pylori gene expression within mouse and human gastric mucosae by real-time reverse transcriptase PCR. Infection and Immunity. 69(2001): 4759-4766.
- (58) Evans, D. G.; Evans, Jr. D. J.; Graham, D. Y. Adherence and internalization of Helicobacter pylori by HEp-2 cells. Gastroenterology. 102(1992): 1557-1567.
- (59) Vaira, D.; D'Anastasio, C.; Holton, J.; Dowsett, J. F.; Londei, M.; Bertoni, F. Campylobacter pylori in abattoir workers: is it a zoonosis? Lancet. 2(1988):725-726.
- (60) Fox, J G. Non-human reservoirs of Helicobacter pylori. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Supplement. 9(1995): 93-103.
- (61) Dore, M. P.; Bilotta, M.; Vaira, D.; Manca, A.; Massarelli, G.; Leandro, G. High Prevalence of Helicobacter pylori Infection in Shepherds. Digestive Diseases and Sciences. 44(1999): 1161-1164.

- (62) Ansorg, R.; Von Heinegg, E. H.; Von Recklinghausen, G. Cat owners' risk of acquiring a *Helicobacter pylori* infection. Zentralbl. Bakteriol. 283(1995):122-126.
- (63) Handt, L. K.; Fox, J. G.; Dewhirs, F. E.; Fraser, G. J.; Paster, B. J.; Yan, L.L. *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: Public health implications. Infection and Immunity. 62(1994): 2367-2374.
- (64) Grubel, P.; Hoffman, J. S.; Chong, F. K.; Burstein, N. A.; Mepani, C.; Cave, D. R. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. Journal of Clinical Microbiology. 35(1997): 1300-1303.
- (65) Osato, M. S.; Ayub, K.; Le, H. H.; Reddy, R.; Graham, D. Y. Houseflies Are an Unlikely Reservoir or Vector for *Helicobacter pylori*. Journal of Clinical Microbiology. 36(1998): 2786-2788.
- (66) Klein, P. D.; Graham, D. Y.; Gaillour, A.; Opekun, A. R.; Smith, E. O. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. Lancet. 337(1991): 1503-1506.
- (67) Goodman, K. J.; Correa, P.; Ramirez, H.; DeLany, J. P.; Pepinosa, O. G. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: A population-based study of transmission pathways. American Journal of Epidemiology. 144(1996):290-299.
- (68) Hopkins, R. J.; Vial, P. A.; Ferreccio, C.; Ovalle, J. Prado, P.; Sotomayor, V. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. Journal of Infectious Diseases. 168(1993): 222-226.
- (69) Sasaki, K. *Helicobacter pylori* in the Natural Environment. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 31(1999): 275-279.
- (70) Bode, G.; Mauch, F.; Malfertheiner, P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. Epidemiology and Infection. 111(1993): 483-490.

- (71) Kusters, J. G.; Gerrits, M. M.; Van Strijp, J. A.; Vandenbroucke-Grauls, C. M.  
Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. Infection and Immunity. 65(1997): 3672-3679.
- (72) Varoli, O.; Landini, M. P.; LaPlaca, M.; Tucci, A.; Corinaldesi, R.; Paparo, G. F.  
Presence of *Helicobacter pylori* in gastric juice. American Journal of Gastroenterology. 86(1991):249.
- (73) Lin, S. K.; Lambert, J. R.; Schembri, M. A.; Nicholson, L.; Korman, M. G.  
*Helicobacter pylori* prevalence in endoscopy and medical staff. Journal of gastroenterology and hepatology. 9(1994): 319-324.
- (74) Leung, W. K.; Kwok, C. K. L.; Chan, S. Y.; Sung, R.; Sung, J. J. Y. Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission. The American Journal of Gastroenterology. 94(1999): 2881-2884.
- (75) Parsonnet, J.; Shmueli, H.; Haggerty, T. Fecal and Oral Shedding of *Helicobacter pylori* From Healthy Infected Adults. The Journal of the American Medical Association. 282(1999): 2240-2245.
- (76) Krajden, S.; Fuksa, M.; Anderson, J.; Kempston, J. Boccia, A.; Petrea, C.  
Examination of human stomach biopsies, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*. Journal of Clinical Microbiology. 27(1989):1397-1398.
- (77) Ferguson, D. A.; Li, C.; Patel, N. R.; Mayberry, W. R.; Chi, D. S.; Thomas, E.  
Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. Journal of Clinical Microbiology. 31(1993):2802-2804.
- (78) Thomas, J. E.; Gibson, G. R.; Darboe, M. K.; Dale, A.; Weaver, L. T. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. Lancet. 340(1992): 1194-1195.
- (79) Mapstone, N. P.; Lynch, D. A.; Lewis, F. A.; Axon, A. T.; Tompkins, D. S.; Dixon, M. F. PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients. Lancet. 341(1993):447.

- (80) Li, C.; Ha, T.; Ferguson, Jr. D. A.; Chi, D. S.; Zhao, R.; Patel, N. R. A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. Digestive Diseases and Sciences. 41(1996): 2142-2149.
- (81) Namavar, F.; Roosendaal, R.; Kuipers, E. J.; de Groot, P.; van der Bijl, M. W. Presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity, oesophagus, stomach and faeces of patients with gastritis. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 14(1995): 234-237.
- (82) Pounder, R. E.; Ng, D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. Alimentary Pharmacology and Therapeutic. 9(1995): 33-39.
- (83) Perez-Perez, G. I.; Taylor, D. N.; Bodhidatta, L.; Wongsrichanalai, J.; Baze, W. B.; Dunn, B. E. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infections in Thailand. Journal of Infectious Diseases. 161(1990): 1237-1241.
- (84) Buzas, G. M. Prevalence of *Helicobacter pylori*, correlations between alcohol consumption and gastroduodenal damage. Orvosi Hetilap. 138(1997): 2791-2795.
- (85) Jun, Z. J.; Lei, Y.; Shimizu, Y.; Dobashi, K.; Mori, M. High Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chronic Bronchitis among Chinese Population. The Tohoku Journal of Experimental Medicine. 208(2006): 327-331.
- (86) Sriamporn, S.; Setiawan, V.; Pisani, P.; Suwanrungruang, K.; Sirijaichingkul, S.; Mairiang, P. Gastric Cancer: the Roles of Diet, Alcohol Drinking, Smoking and *Helicobacter pylori* in Northeastern Thailand. Asian Pacific journal of cancer prevention. 3(2003): 345-352.
- (87) Vaira, D.; Holton, J.; Menegatti, M.; Ricci, C.; Gatta, L.; Geminiani, A. Invasive and non-invasive tests for *Helicobacter pylori* infection. Alimentary Pharmacology and Therapeutics. 14(2000): 13-22.
- (88) Lu, J. J.; Perng, C. L.; Shyu, R. Y.; Chen, C. H.; Lou, Q.; Chong, S. K. F. Comparison of Five PCR Methods for Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Gastric Tissues. The Journal of the American Medical Association. 37(1999): 772-774.

- (89) Laine, L.; Lewin, D. N.; Naritoku, W.; Cohen, H. Prospective comparison of H&E, Giemsa, and Genta stains for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. Gastrointestinal Endoscopy. 45(1997): 463-467.
- (90) Dunn, B. E.; Cohen, H.; Blaser, M. J. *Helicobacter pylori*. The American Society for Microbiology. 10(1997): 720-741.
- (91) Jonkers, D.; van den Broek, E.; van Dooren, I.; Thijs, C.; Dorant, E.; Hageman, G. Antibacterial effect of garlic and omeprazole on *Helicobacter pylori*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 43(1999): 837-839.
- (92) Meyer, J. M.; Silliman, N. P.; Wang, W. Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: the surveillance of *H. pylori* antimicrobial resistance partnership (SHARP) study, 1993-1999. Annals Internal Medicine. 136(2002): 13-24.
- (93) Fallone, C. A. Epidemiology of the antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Canada. Canadian Journal of Gastroenterology. 14(2004): 879-882.
- (94) Mendonca, S.; Ecclissato, C.; Sartori, M. S.; Godoy, A. P. O.; Guerzoni, R. A.; Degger, M. Prevalence of *Helicobacter pylori* Resistance to Metronidazole, Clarithromycin, Amoxicillin, Tetracycline, and Furazolidone in Brazil. Helicobacter. 5(2000): 79-83.
- (95) Ecclissato, C.; Marchioretto, M. A. M.; Mendonca, S.; Godoy, A. P. O.; Guersoni, R. A.; Deguer, M. Increased Primary Resistance to Recommended Antibiotics Negatively Affects *Helicobacter pylori* Eradication. Helicobacter. 7(2002): 53-59.
- (96) Dore, M. P.; Sepulveda, A. R.; Mura, I.; Realdi, G.; Osato, M. S.; Graham, D. Y. Explanation for variability of omeprazole amoxicillin therapy? Tolerance of *H. pylori* to amoxicillin. Gastroenterology. 112(1997): 105.
- (97) Wu, H.; Shi, X. D.; Wang, H. T.; Liu, J. X. Resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole, tetracycline and amoxycillin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 46(2000): 121-123.

- (98) O'Mahony, R.; Al-Khtheeri, H.; Weerasekera, D.; Fernando, N.; Vaira, D.; Holton, J. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. World Journal of Gastroenterology. 11(2005):7499-7507.
- (99) Miyazawa, M.; Utsunomiya, H.; Inada, K.; Yamada, T.; Okuno, Y.; Tanaka, H. Inhibition of *Helicobacter pylori* Motility by (+)-Syringaresinol from Unripe Japanese Apricot. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 29(2006): 172-173.
- (100) Lee, J. H.; Shim, J. S.; Lee, J. S.; Kim, M. K.; Chung, M. S.; Kim, K. H. Pectin-like acidic polysaccharide from *Panax ginseng* with selective antiadhesive activity against pathogenic bacteria. Carbohydrate Research. 341(2006):1154-1163.
- (101) Wang, Y. C.; Huang, T. L. High-performance liquid chromatography for quantification of plumbagin, an anti-*Helicobacter pylori* compound of *Plumbago zeylanica* L. Journal of Chromatography. 1094(2005): 99-104.
- (102) Mahady, G. B.; Pendland, S. L.; Yun, G.; Lu, Z. Z. Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. Anticancer Research. 22(2002): 4179-4181.
- (103) Malekzadeh, F.; Ehsanifar, H.; Shahamat, M.; Levin, M.; Colwell, R. R. Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori*. International Journal of Antimicrobial Agents. 18(2001): 85-88.
- (104) O'Gara, E. A.; Hill, D. J.; Maslin, D. J. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. Applied and Environmental Microbiology. 66(2000): 2269-2273.
- (105) Mahady, G. B.; Pendland, S. L.; Yun, G. S.; Lu, Z. Z.; Stoia, A. Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and the gingerols inhibit the growth of Cag A+ strains of *Helicobacter pylori*. Anticancer Research. 23(2003): 3699-3702.

- (106) Goel, R. K.; Sairam, K.; Rao, C. V. Role of gastric antioxidant and anti-Helicobacter pylori activities in antiulcerogenic activity of plantain banana (*Musa sapientum* var. *paradisica*). Indian Journal of Experimental Biology. 39(2001): 719-722.
- (107) Sivam, G. P.; Lampe, J. W.; Ulness, B.; Swanzy, S. R.; Potter, J. D. Helicobacter pylori--in vitro susceptibility to garlic (*Allium sativum*) extract. Nutrition and Cancer. 27(1997): 118-121.
- (108) Wilkinson, S. M.; Uhl, J. R.; Kline, B. C. Cockerill 3rd FR. Assessment of invasion frequencies of cultured HEP-2 cells by clinical isolates of Helicobacter pylori using an acridine orange assay. British Medical Journal. 51(1998): 127.
- (109) Bjorkholm, B.; Falk, P.; Engstrand, L.; Nyren, O. Helicobacter pylori: resurrection of the cancer link. Journal of Internal Medicine. 253(2003): 102-119.
- (110) Cao, X. G.; Li, X. X.; Bao, Y. Z.; Xing, N. Z.; Chen, Y. Responses of Human Lens Epithelial Cells to Quercetin and DMSO. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 48(2007): 3714-3718.
- (111) Correa, P. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. The American Journal of Surgical Pathology. 19(1995): 37-43.
- (112) Fox, J. G.; Wang, T. C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. Journal of Clinical Investigation. 117(2007): 60.
- (113) De Francesco, V.; Margiotta, M.; Zullo, A.; Hassan, C.; Troiani, L.; Burattini, O. Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of Helicobacter pylori. Annals Internal Medicine. 144(2006): 94-100.
- (114) Suzuki, H.; Masaoka, T.; Miyazawa, M.; Suzuki, M.; Miura, S.; Ishii, H. Gastric mucosal response to Helicobacter pylori. Keio Journal of Medicine. 51(2002): 40-44.
- (115) Kelm, M. A.; Nair, M. G.; Strasburg, G. M.; DeWitt, D. L. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. Phytomedicine. 7(2000):7-13.

- (116) Keyhanian, S.; Stahl-Biskup, E. Phenolic Constituents in Dried Flowers of Aloe vera (*Aloe barbadensis*) and their in vitro Antioxidative Capacity. Planta Medica. 73(2007): 599-602.
- (117) Satake, T.; Kamiya, K.; An, Y.; Oishi, T.; Yamamoto, J. The Anti-thrombotic Active Constituents from *Centella asiatica*. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 30(2007): 935-940.
- (118) Abeywardena, M.; Runnie, I.; Nizar, M.; Head, R. Polyphenol-enriched extract of oil palm fronds (*Elaeis guineensis*) promotes vascular relaxation via endothelium-dependent mechanisms. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. 11(2002): 467-472.
- (119) Vaudaux, P.; Waldvogel, F. A. Gentamicin antibacterial activity in the presence of human polymorphonuclear leukocytes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 16(1979):743-749.
- (120) Osaki, T.; Yamaguchi, H.; Taguchi, H.; Kamiya, S. Trial for isolation of *Helicobacter pylori* from fecal specimen by immunomagnetic beads separation. Kansenshogaku Zasshi. 71(1997): 628-633.
- (121) Patanasethanont, D.; Nagai, J.; Matsuura, C.; Fukui, K.; Sutthanut, K.; Sripanidkulchai, B. O. Modulation of function of multidrug resistance associated-proteins by *Kaempferia parviflora* extracts and their components. European Journal Pharmacology. 566(2007): 67-74.
- (122) Sutthanut, K.; Sripanidkulchai, B.; Yenjai, C.; Jay, M. Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography. Journal of Chromatography. 1143(2007): 227-233.
- (123) Patanasethanont, D.; Nagai, J.; Yumoto, R.; Murakami, T.; Sutthanut, K.; Sripanidkulchai, B. O. Effects of *Kaempferia parviflora* extracts and their flavone constituents on P-glycoprotein function. Journal of Pharmaceutical Sciences. 96(2006): 223-233.
- (124) Shinoda, J. Color reactions of flavone and flavanol derivatives and the like. Journal of Chemical Pharmacology Society of Japan. 48(1928): 214.



- (125) Schneller, J.; Gupta, R.; Mustafa, J.; Villanueva, R.; Straus, E. W.; Raffaniello, R. D. Helicobacter pylori Infection is Associated with a High Incidence of Intestinal Metaplasia in the Gastric Mucosa of Patients at Inner-City Hospitals in New York. Digestive Diseases and Sciences. 51(2006): 1801-1809.
- (126) Satomi, S.; Yamakawa, A.; Matsunaga, S.; Masaki, R.; Inagaki, T.; Okuda, T. Relationship between the diversity of the cagA gene of Helicobacter pylori and gastric cancer in Okinawa, Japan. Journal of Gastroenterology. 41(2006):668-673.
- (127) Lu, H.; Wu, J. Y.; Beswick, E. J.; Ohno, T.; Odenbreit, S.; Haas, R. Functional and Intracellular Signaling Differences Associated with the Helicobacter pylori AlpAB Adhesin from Western and East Asian Strains. Journal of Biological Chemistry. 282(2007): 6242.
- (128) Dossumbekova, A.; Prinz, C.; Mages, J.; Lang, R.; Kusters, J. G.; Van Vliet, A. H. Helicobacter pylori HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of hopH gene polymorphisms. Journal of Infectious Diseases. 194(2006): 1346-1355.
- (129) Lai, C. H.; Kuo, C. H.; Chen, P. Y.; Poon, S. K.; Chang, C. S.; Wang, W. C. Association of antibiotic resistance and higher internalization activity in resistant Helicobacter pylori isolates. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 57(2006): 466-471.
- (130) Peck, B.; Ortkamp, M.; Diehl, K. D.; Hundt, E.; Knapp, B.; Journals, O. Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of Helicobacter pylori. Nucleic Acids Research. 27(1999): 3325-3333.
- (131) Evans, D. G.; Evans, D. J.; Moulds, J. J.; Graham, D. Y. N-acetylneuraminylactose-binding fibrillar hemagglutinin of Campylobacter pylori: a putative colonization factor antigen. Infection and Immunity. 56(1988): 2896-2906.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

#### 1. อีดีทีเอ EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) เข้มข้น 0.5 โมลาร์

ละลาย Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O จำนวน 136.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร กวนอย่างแรงด้วยการใช้แท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) ปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยการเติมกรดโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ลงไปจนกระทั่งได้ pH=8.0 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรดต่างที่ EDTA จะละลายหมดพอดี หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ Autoclave

#### 2. บัฟเฟอร์ 10X TBE (0.9M Tris-borate, 0.02M EDTA)

ละลายทริสเบส (Tris base) 108 กรัม, กรดบอริก (Boric acid) 55 กรัม อีดีทีเอ (EDTA) ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) = 8 เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบตามจำนวน 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องซึ่ง 10X buffer นี้จะสามารถนำไปใช้ในเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5X buffer ต่อไปเพื่อใช้ในการเตรียมวุ้นอะกาโรส และใช้ในงานอิเล็กโตรโฟรีซิสต่อไป

#### 3. เอทีเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลายเอทีเดียมโบรไมด์ 1 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร กวนด้วยการใช้แท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) จนกว่าจะละลาย เก็บให้พ้นแสงด้วยการห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ หรือเก็บใส่ขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิห้อง ต้องสวมถุงมือระหว่างการเตรียม

#### 4. แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO<sub>4</sub>) 1 โมลาร์

ละลาย MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 24.6 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ Autoclave

#### 5. ไฮโดรคลอริก (HCl) 1 โมลาร์

สำหรับปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 86.2 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 913.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ควรทำใน Chemical hood เพราะไอของกรดไฮโดรคลอริกจะเกิดเป็นควันฟุ้งกระจาย

#### 6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 10 โมลาร์

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ให้เป็น 100 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ Autoclave

#### 7. ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) 1 โมลาร์

ละลายทริสเบส(Tris base) 121.14 กรัม ในน้ำ 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างโดยการใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนกระทั่งได้ pH ที่ต้องการ (pH 7-8) แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ Autoclave

#### 8. SDS, 10 %

ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร อาจอุ่นเล็กน้อยเพื่อให้ละลายดีขึ้น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

#### 9. บัฟเฟอร์ 20X SSC [0.3 M Sodium Citrate (pH 7.0), 3 M NaCl]

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 350.6 กรัม และโซเดียมซิเตรด 176.4 กรัม ในน้ำ 800 มิลลิลิตรจนละลายดีหมด ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ค่า pH=7.0 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ และปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ Autoclave

#### 10. Loading dye BJ II สีย้อมสำหรับการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

ละลาย Bromphenol blue 0.05 กรัม และซูโครส (Sucrose) 6.2 กรัม ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เติมซีดีทีเอ 0.5 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร คนให้ละลายหมด เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### 11. Denaturing solution (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)

ละลายโซเดียมคลอไรด์(NaCl) 87.66 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) 20 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ Autoclave

## 12. การเตรียม 2% agarose gel (100 มิลลิลิตร)

ชั่งวุ้นอะกาโรสจำนวน 2 กรัม ด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียด จากนั้นเท 0.5X TBE ลงไปให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเพื่อให้เม็ดวุ้นแตกตัว นำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟเพื่อให้วุ้นหลอม จากนั้นเทใส่ที่หลอวุ้น ก่อนที่จะเสียบหวีที่ เพื่อแบ่งให้วุ้นเป็นช่องสำหรับในการทดลองแต่ละตัวอย่าง

## 13. การเตรียม DEPC-water (RNase-free water)

เทน้ำลงในขวดแก้ว ซึ่งขวดที่ใช้ในการเตรียม DEPC water นั้น ต้องเป็นขวดที่ปราศจาก RNase เติม Diethylpyrocarbonate (DEPC) ลงไป โดยให้ความเข้มข้นเป็น 0.01% (v/v) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำไป autoclave

## 14. การเตรียม 5, 8 และ 10 McFarland standard(10 มิลลิลิตร)

- 5 McFarland standard เตรียมจาก 1.175% Barium Chloride 0.5 ml กับ 1% Sulfuric acid 9.5 ml
- 8 McFarland standard เตรียมจาก 1.175% Barium Chloride 0.8 ml กับ 1% Sulfuric acid 9.2 ml
- 10 McFarland standard เตรียมจาก 1.175% Barium Chloride 1.0 ml กับ 1% Sulfuric acid 9.0 ml

## 15. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ที่มีเลือดแกะ 7%(500 มิลลิลิตร)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion 18.5 กรัม และ Bacto agar 5.5 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่น 465 ml นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการ autoclave จากนั้นพักให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นในระดับที่สัมผัสได้ ทำการเติมเลือดแกะ 35 ml เขย่าให้เข้ากัน นำไปเทบนจานเลี้ยงเชื้อขนาด 10 cm ปริมาตรจานละ 25 ml

## 16. การเตรียม 10% FBS working DMEM (50 มิลลิลิตร)

- DMEM 45 มิลลิลิตร
- Fetal Bovine Serum (Heat inactivate) 5 มิลลิลิตร
- 100 U/ml Antibiotics 0.5 มิลลิลิตร
- Antimycotics 0.05 มิลลิลิตร

เมื่อปิเปตต์สารตามข้างต้นแล้ว ให้ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายสุเมธ อมรยิ่งเจริญ เกิดเมื่อวันที่ 15 มิถุนายน พ.ศ.2526 ที่เขตป้อมปราบ จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขา เทคนิคการแพทย์ จาก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2548 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับ บัณฑิตศึกษา หลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย