



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การศึกษาสุมุไพรไทยที่มีฤทธิ์ในการลดการเกาะติด
และบุกรุกเซลล์เยื่อหุ้ม Hep-2 ของเชื้อ *Helicobacter pylori*”

โดย ผศ.ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ และคณะ

มกราคม พ.ศ. 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การศึกษาสמןไพรไทยที่มีฤทธิ์ในการลดการเกาะติด
และบุกรุกเซลล์เยื่อ Hep-2 ของเชื้อ *Helicobacter pylori*”

คณะผู้วิจัย

- | | |
|----------------------------------|-------------------|
| 1. ผศ. ดร.นันท์ ชัยชนะวงศาโรจน์* | หัวหน้าโครงการ |
| 2. นาย สุเมธ อมรยิ่งเจริญ* | ผู้ร่วมวิจัย |
| 3. ศ. นพ. ยง ภู่วรวรรณ** | นักวิจัยที่ปรึกษา |

สังกัด

*ศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์
ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสตับอักเสบ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และ
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รหัสโครงการ : MRG4880186

ชื่อโครงการ : การศึกษาสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ในการลดการเกาะติดและบุกรุกเซลล์เยื่อ
ของเชื้อ *Helicobacter pylori*

ชื่อนักวิจัย : นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ และคณะ, โครงการศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนา
เทคโนโลยีวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ภาควิชาเวชศาสตร์การ
ธนาคารเลือด คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Email Address: nuntaree@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

เชื้อ *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรังและแผล
ในกระเพาะอาหาร ในปัจจุบันถูกจัดเป็นเชื้อก่อโรคที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์ได้ การบุกรุกเข้าสู่เซลล์เยื่อ
กระเพาะอาหารทำให้การติดเชื้ออยู่อย่างต่อเนืองและทำให้การรักษาล้มเหลว วัตถุประสงค์ใน
การศึกษานี้เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* และ ฤทธิ์ในการต้านการบุ
กรุกเซลล์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 11 ชนิดที่ใช้ในการรักษาพื้นบ้านสำหรับโรคในระบบทางเดินอาหาร
ดังนี้ กระชายดำ กระเทียม กล้วย ขมิ้นชัน ตะไคร้ ใบบัวบก ฟ้าทะลายโจร ว่านหางจระเข้ กระเจี๊ยบ
มอญ โหระพา และ กระเพรา ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ
(MIC) *H. pylori* สายพันธุ์ทางคลินิก 11 สายพันธุ์ และ สายพันธุ์มาตรฐาน 2 สายพันธุ์โดยวิธี agar
dilution ทำการวัดปริมาณเชื้อที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์ HEp-2 ด้วยวิธี gentamicin internalization assay
ผลพบว่ามีเพียงสารสกัดเมทานอลจากขมิ้นชัน และ กระชายดำที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ
ที่ MIC เท่ากับ 32 และ 64 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ สารสกัดจากพืช 4 ชนิด คือ ขมิ้นชัน กระชายดำ
กระเทียม และ กล้วย มีฤทธิ์ในการยับยั้งการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ยกเว้น ขมิ้นชันมี
ฤทธิ์กระตุ้นการบุกรุกที่ 6 และ 12 ชั่วโมง ถึงแม้ว่ากระเทียมและกล้วยจะมีฤทธิ์ที่ตีมากในการต้าน
การบุกรุกของเชื้อเข้าสู่เซลล์แต่จากปริมาณของสารที่ค่อนข้างสูงมากอาจมีผลเป็นพิษกับเซลล์ได้
กระชายดำถูกนำมาสกัดเป็นลำดับขั้นด้วยน้ำ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ซึ่งให้ค่าการ
ทดสอบ MIC ในช่วงระหว่าง 32-64 $\mu\text{g/ml}$ ยกเว้นน้ำมันหอมระเหย สารสกัดเอทิลอะซิเตตซึ่งมีฤทธิ์
ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดีที่สุดพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านการบุกรุกเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
โดยการออกฤทธิ์มีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารสกัดและระยะเวลาในการบ่มเชื้อกับสารสกัด ยิ่งไป
กว่านั้นสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำสามารถยับยั้งการบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ได้ทั้ง
สายพันธุ์ที่รุนแรงที่มียีน *cagA* และ สายพันธุ์ที่ไม่รุนแรงที่ไม่มียีน *cagA* ดังนั้นฤทธิ์ในการต้านการบุ
กรุกเซลล์ของพืชสมุนไพรไทยน่าจะเป็นแนวทางใหม่ในการป้องกันและรักษาการติดเชื้อ *H. pylori*

คำสำคัญ : *Helicobacter pylori* พืชสมุนไพร anti-internalization เซลล์ HEp-2

Project Code : MRG4880186

Project Title : Study of the effects of Thai medicinal plants on anti-adherence and anti-internalization activity of *Helicobacter pylori* to Hep-2 cells

Investigators : Nuntaree Chaichanawongsaroj *et al.*, Innovation Center for Research and Development in Clinical Laboratory Diagnostic Technology Project, Department of Transfusion Medicine, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University

Email Address : nuntaree@gmail.com

Project Period : 2 years

Helicobacter pylori, an etiological agent of active chronic gastritis and peptic ulcer disease, is now considered to be as invasive enteropathogen. Invasion of gastric epithelium cells contribute to persistence infection and eradication failure. The aims of this study were to investigate the anti-*Helicobacter pylori* and anti-internalization activities of eleven Thai plant extracts used for gastric ailments in traditional medicine including *Kaempferia parviflora*, *Allium sativum*, *Musa sapientum*, *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Centella asiatica*, *Andrographis paniculata*, *Aloe vera*, *Abelmoschus esculentus*, *Ocimum sanctum* and *Ocimum basilicum*. The minimum inhibitory concentrations (MIC) against 11 clinical isolates and 2 reference strains of *H. pylori* were examined using an agar dilution method. The level of internalization against HEp-2 cells was determined by gentamicin internalization assay. Only the methanolic extracts of *Curcuma longa* and *Kaempferia parviflora* exhibited significant antibacterial activities at MIC of 32 µg/ml and 64 µg/ml, respectively. All four plants extracts, including *Curcuma longa*, *Kaempferia parviflora*, *Allium sativum* and *Musa sapientum*, showed inhibitory effects on the invasion of *H. pylori* to HEp-2 cells except *Curcuma longa* enhanced the invasion at 6 and 12 h. Although, *Allium sativum* and *Musa sapientum* demonstrated marked anti-internalization activities, the high concentrations of the extracts may have cytotoxic effects. *Kaempferia parviflora* was further sequentially extracted from hydrodistillation, hexane, ethyl acetate and methanol. Their MICs except volatile oil were ranging from 32-64 µg/ml. The most active extract of ethyl acetate exhibited significant anti-internalization activity which corresponded to dose and time of treatment. Moreover, *Kaempferia parviflora*'s ethyl acetate extract could significantly inhibit the invasion of both *H. pylori* virulent strains (*cagA*⁺) and non-virulent strains (*cagA*⁻) in HEp-2 cells. Thus, the anti-internalization activities of medicinal plants may be a new strategy for potential prevention and treatment of *H. pylori* infection.

Keywords: *Helicobacter pylori*, medicinal plants, anti-internalization, HEp-2 cells

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
สารบัญ	iii
รายการตารางประกอบ	iv
รายการภาพประกอบ	v
บทสรุปผู้บริหาร	vi
บทนำ	1
วิธีวิจัย	3
การวิเคราะห์ทางสถิติ	6
ผลการวิจัย	7
สรุปและอภิปรายผล	20
ข้อเสนอแนะ	23
เอกสารอ้างอิง	24
Output ที่ได้จากโครงการ	28
ภาคผนวก	30

รายการตารางประกอบ

	หน้า
ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรชนิดต่างๆ	3
ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียด Primer และขนาดของผลผลิต PCR	6
ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (MIC) ของสมุนไพรไทย 11 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญ ของเชื้อ <i>H. pylori</i> 13 สายพันธุ์	7
ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดจากกระชายดำในตัวทำละลาย ชนิดต่างๆที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>H. pylori</i>	9
ตารางที่ 5 % adhesion ของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำต่อการเกาะติด เซลล์HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ต่างๆกันที่เวลาบ่ม 3 ชั่วโมง และ ความเข้มข้น 64 µg/ml	16
ตารางที่ 6 แสดงอัตราส่วนความเข้มของยีน <i>alaA</i> ต่อยีน 16s rRNA ของการวัดระดับ การแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT PCR	18
ตารางที่ 7 แสดงอัตราส่วนความเข้มของยีน <i>babA</i> ต่อยีน 16s rRNA ของการวัดระดับ การแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT PCR	19

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 การทดสอบการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะที่มีสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรชนิดต่างๆ ที่เวลา 3, 6, 12, 24 ชม	8
รูปที่ 2 การทดสอบการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะที่มีและไม่สารสกัดของกระชายดำชนิดต่างๆ	10
รูปที่ 3 ลักษณะเซลล์ HEp-2 ปกติ	10
รูปที่ 4 ลักษณะเซลล์ HEp-2 หลังจากการเติมน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 1,024 µg/ml เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง	10
รูปที่ 5 การทดสอบการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะที่มีและไม่สารสกัดเอทิลอะซิเตตของกระชายดำที่เวลา 3, 6, 12, 24 ชม	11
รูปที่ 6 จำนวนของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่เจริญหลังจากบ่มเชื้อกับสารสกัดเป็นเวลา 3, 6, 12 และ 24 ชม	12
รูปที่ 7 การทดสอบการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะที่มีและไม่สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำที่ความเข้มข้นระหว่าง 8-128 µg/ml	13
รูปที่ 8 แสดงผลผลิต PCR ยีน <i>cagA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> บนวันอะกาโรส 2 %	13
รูปที่ 9 ผลผลิต PCR ยีน <i>cagA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้ทั้งหมด 20 สายพันธุ์บนวันอะกาโรส 2 %	14
รูปที่ 10 การทดสอบการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ HEp-2 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ต่างๆ ในสภาวะที่มีและไม่สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ	15
รูปที่ 11 แสดงผลผลิต RT-PCR ยีน 16s ribosomal และยีน <i>alpA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> บน 2 % วันอะกาโรส	17
รูปที่ 12 แสดงผลผลิต RT-PCR ยีน 16s ribosomal และยีน <i>babA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> บน 2 % วันอะกาโรส;	18

บทสรุปผู้บริหาร

ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) การศึกษาสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ในการลดการเกาะติดและบุกรุกเซลล์เยื่อ Hep-2 ของเชื้อ *Helicobacter pylori*

(ภาษาอังกฤษ) Study of the effects of Thai medicinal plants on anti-adherence and anti-internalization activity of *Helicobacter pylori* to Hep-2 cells

คณะนักวิจัย

1. หัวหน้าโครงการ : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์

(Asst. Prof. Dr. Nuntaree Chaichanawongsaroj)

โครงการศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์
ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ห้อง 324 อาคารจุฬาพัฒน์ 1 เลขที่ 154 ถ. พระราม 1 ปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

โทรศัพท์ 02-218-1084 (ต่อ 324), โทรสาร 02-218-1083

การศึกษา ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหิดล

ปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหิดล

ปริญญาเอก วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหิดล

2. ผู้ร่วมวิจัย:

2.1 ศาสตราจารย์ นพ. ยง ภู่วรวรรณ (Prof. Dr. Yong Poovorawan) (นักวิจัยที่ปรึกษา)

ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

โทรศัพท์ 02-2564909, โทรสาร 02-2564929

การศึกษา ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์การแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
แพทยศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วุฒิบัตรแสดงความรู้หรือความชำนาญ การประกอบวิชาชีพเวชกรรม สาขากุมารเวช
ศาสตร์ แพทยสภาแห่งประเทศไทย

2.2 นาย สุเมธ อมรยิ่งเจริญ (Mr. Sumet Amornyingjarean)

นิสิตปริญญาโท สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษา ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชาที่ทำการวิจัย

จุลชีววิทยาการแพทย์

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งกระเพาะอาหารเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับที่สองของการเสียชีวิตจากมะเร็งทั้งหมดทั่วโลก จึงนับเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญอันหนึ่งในปัจจุบัน ในประเทศไทยพบว่ามะเร็งกระเพาะอาหารเป็นสาเหตุอันดับที่ 6 ของมะเร็งในผู้ชาย และอันดับที่ 9 ของมะเร็งในผู้หญิง และมีความชุกประมาณ 3.9:100,000 คน และมีอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี ค่อนข้างต่ำ คือ 5-15% เท่านั้น (1, 2) สาเหตุของการเกิดโรคนี้นับว่าเกิดจากการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* (3) โดยพบอัตราการติดเชื้อนี้ในประชากรกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรทั้งหมดในโลก เนื่องจากเชื้อสามารถติดต่อกันได้ทางการกิน จากน้ำลาย จึงมีโอกาสดูดติดต่อกันได้ง่าย ปัจจัยในการเกิดโรคและพยาธิสภาพการเกิดโรคจะเริ่มจากเชื้อเข้าไปเกาะติด (adherence) บริเวณไมโครวิลไลของเซลล์เยื่อในกระเพาะอาหาร และมีการทำลายบริเวณดังกล่าว จากนั้นเชื้อจะบุกรุกเข้าไปยังภายในเซลล์ (invasion และ internalization) โดยกลไกที่ยังไม่ทราบแน่ชัด โปรตีน cytotoxin associated antigen (CagA) ที่เชื้อสร้างขึ้นจะ translocate เข้าไปในเซลล์ซึ่งจะไปทำให้เกิดผลทางชีวภาพหลายอย่างต่อเซลล์ เช่น กระตุ้นให้เกิดขบวนการอักเสบโดย neutrophil activation NF- κ B activation IL-8 induction (4) กระตุ้นให้เกิดการ oxidation มี Nitric oxide และ cyclooxygenase induction และทำให้เซลล์เกิด apoptosis ในที่สุด การติดเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มี *cagA*⁺ จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งในกระเพาะอาหารมากกว่าการติดเชื้อสายพันธุ์ *cagA*⁻ (5) อย่างไรก็ตามพบว่าปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคที่สำคัญที่สุดคือการเกาะติดของเชือบนผิวเซลล์มากกว่าการทำลายเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งพบว่าเชือนี้สามารถอาศัยอยู่ในกระเพาะอาหารได้เป็นเวลาหลายสิบปี ในขณะที่เชื้อจุลินทรีย์อื่นมักจะถูกทำลายจากการดื้อในกระเพาะหรือถูกขจัดผ่านจากกระเพาะไปอยู่ในลำไส้ (6) จากการศึกษาพบว่ายีน *AlpA* *AlpB* และ *BabA* เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการเกาะติดของเชื้อ (7, 8, 9) โปรตีน *BabA* พบว่าน่าจะใช้เป็นวัคซีนในการป้องกันและรักษาการติดเชื้อได้ (10) เซลล์เพาะเลี้ยงที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาหน้าที่การเกาะติดของเชื้อคือเซลล์ Hep-2 เนื่องจากพบว่ามีความสามารถในการจับกับเชื้อได้ดีและมีจำนวน receptor บนผิวเซลล์มากกว่าเซลล์ชนิดอื่น และจากการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการเกาะติดของเชื้อต่อเซลล์ HEp-2 กับเซลล์กระเพาะอาหาร 3 ชนิด คือ AGS, MKN-45 และ AZ-521 พบว่ามีรูปแบบลักษณะการเกาะติดเหมือนกัน คือ ความสามารถจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการบ่มเชื้อกับเซลล์ และ เพิ่มขึ้นตามปริมาณของเชื้อตั้งต้น โดยที่การเกาะติดจะสูงสุดที่เวลา 4 ชั่วโมง และ สูงสุดที่ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 4×10^7 แบคทีเรีย/หลุม แต่พบว่าเซลล์กระเพาะอาหารทั้ง 3 ชนิด มี binding affinity ต่ำกว่าเซลล์ HEp-2 ดังนั้นในการศึกษาเกี่ยวกับการเกาะติดและบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* จึงนิยมใช้เซลล์ HEp-2 (11,12, 13)

การรักษาโรคในปัจจุบัน จะใช้ยาลดกรดร่วมกับยาปฏิชีวนะ ซึ่งมีราคาแพง บางครั้งมีผลข้างเคียง และพบว่าเชื้อมีการดื้อยา การใช้สมุนไพรในการรักษาจึงเป็นการแพทย์ทางเลือกอีกทางหนึ่ง ยาสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคกระเพาะสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐานได้แก่ ขมิ้นชัน กล้าย ขิง กานพลู กระเทียม กระเพรา ตะไคร้ พริกไทยดำ ดีปลี ข่า กระชาย แห้วหมู กระวานไทย เร่ว และมะนาว (14) แต่สมุนไพรชนิดที่เป็นที่นิยมนำมาใช้ในการรักษาในปัจจุบันและมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *H. pylori* มีเพียง ขมิ้นชัน กระเทียม ขิง และ กล้าย โดยที่ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) มีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะ กระตุ้นการหลั่ง mucin ออกมาเคลือบกระเพาะ ลดการอักเสบ ขับน้ำดี มีฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ในการเกิด oxidation (14, 15, 16) และ ที่สำคัญพบว่าขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดขมิ้นชันในการ

ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) อยู่ระหว่าง 6.25-50 µg/ml (17) และ ยับยั้งฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเซลล์ เช่น NF-kB activation IL-8 induction ได้ (18) ขมิ้นเป็นสมุนไพรที่มีความปลอดภัยสูงและไม่มีผลในด้านการก่อกลายพันธุ์ (14, 19) กระเทียม (*Allium sativum*) มีฤทธิ์ขับลม ลดน้ำตาลในเลือด ลดไขมันในหลอดเลือด ลดความดันโลหิต ลดการอักเสบ และพบว่าสาร allyl-thiosulfinates ของกระเทียมมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ 90% (MIC90) เท่ากับ 5 mg/ml (20, 21) อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการติดเชื้อในผู้ที่บริโภคกระเทียมและไม่บริโภคกระเทียมในระยะยาวไม่แตกต่างกัน (22) ขิง (*Zingiber officinale*) มีฤทธิ์ขับลม ขับน้ำดี ช่วยกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ ป้องกันอาการคลื่นไส้อาเจียนได้ดี พบว่าสาร gingerols ในขิงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 6.25-50 mg/ml (23) ส่วน กล้วย (*Musa sapientum*) พบว่าไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *H. pylori* โดยมีค่า MIC มากกว่า 0.32-1000 µg/ml (24) แต่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์ในเยื่อบุกระเพาะหลั่งสารพวก mucin ออกมาเคลือบกระเพาะ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าสารสกัดmethanolของกล้วย มีฤทธิ์ทาง antiulcer และantioxidant ซึ่งช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งได้ ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรดังกล่าวต่อเชื้อในหลายๆด้าน แต่ไม่พบว่ามีฤทธิ์ในการลดการเกาะติดและลดการบุกรุกเข้าเซลล์ของเชื้อ จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการศึกษาในด้านดังกล่าว ซึ่งจะมีประโยชน์ในการใช้เป็นความรู้พื้นฐานในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *H. pylori* และลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารโดยใช้สมุนไพรได้ นอกจากนั้นการศึกษาดังนี้จะทำให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสมุนไพรต่อการเกาะติดและบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *H. pylori* โดยเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการเกาะติดและบุกรุกเข้าเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* อีกด้วย

วัตถุประสงค์

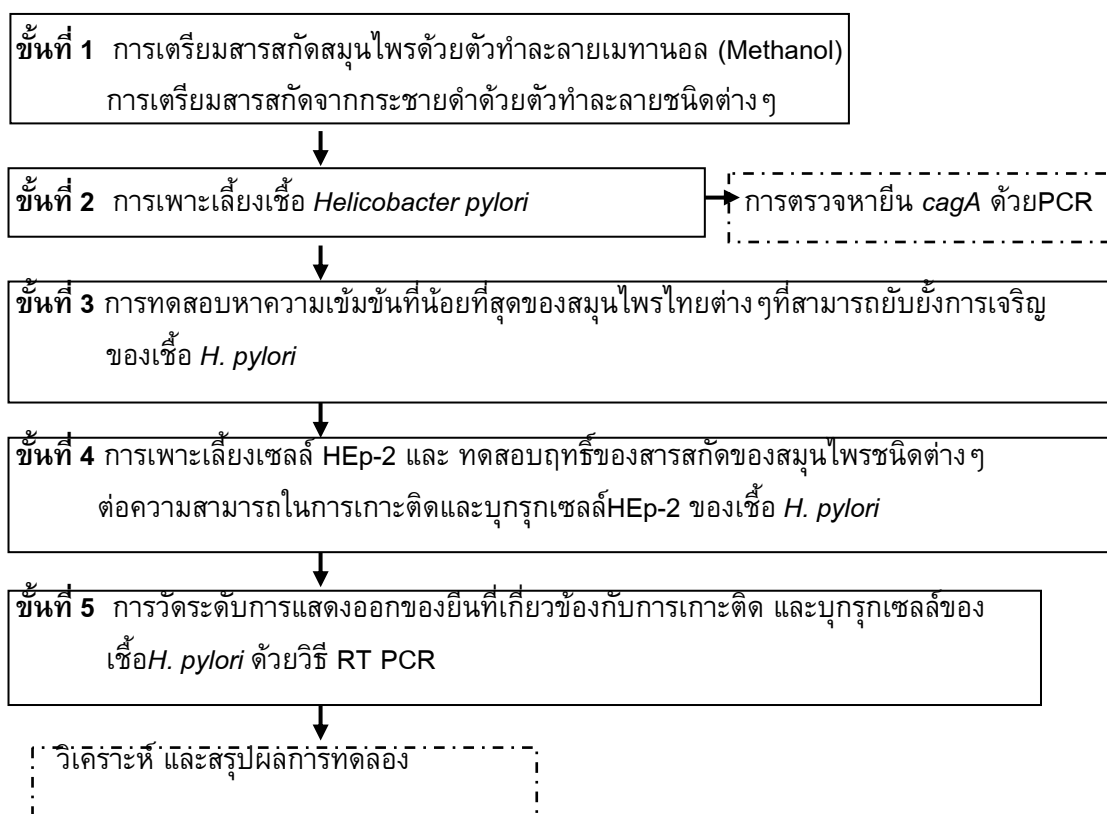
1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ของสมุนไพรไทยที่นิยมใช้ในการรักษาโรคในระบบทางเดินอาหาร ดังนี้ กระชายดำ กระเทียม กล้วย ขมิ้นชัน ตะไคร้ ใบบัวบก ฟาทะลายโจร ว่านหางจระเข้ กระเจี๊ยบมอญ โหระพา และ กระเพรา ในการลดการบุกรุกเข้าเซลล์เยื่อบุ (Internallization)
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้โดยรวมทั้งที่เคยมีรายงานว่า มีฤทธิ์เกี่ยวข้องกับการป้องกันการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารและลำไส้ในการลดการบุกรุกเข้าเซลล์เยื่อบุ(Internallization) ของเชื้อ *H.pylori*
3. เพื่อศึกษาความสามารถของสารสกัดจากกระชายดำในตัวทำละลายชนิดต่างๆในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*
4. เพื่อศึกษาความสามารถของสารสกัดจากกระชายดำในตัวทำละลายชนิดต่างๆในการลดการเกาะติด และการบุกรุกเซลล์เยื่อบุHEp-2ของเชื้อ *H. pylori*
5. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากกระชายดำต่อการแสดงออกของยีน *AlpA* และ *BabA* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดและการบุกรุกเซลล์เยื่อบุHEp-2ของเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี RT-PCR

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรไทยที่ใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับกระเพาะอาหาร เพื่อดูว่าสมุนไพรชนิดใดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* โดยเลือกเฉพาะสมุนไพรที่เป็นที่นิยมใช้ หาซื้อได้ง่าย ราคาถูก ดังนี้ กระชายดำ กระเทียม กล้วย ขมิ้นชัน ตะไคร้ ใบบัวบก ฟักทะลายโจร ว่านหางจระเข้ กระเจี๊ยบมอญ โหระพา และ กระเพรา และทำการคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ตีพิมพ์ทั้งที่เคยมีรายงานว่ามียุทธศาสตร์เกี่ยวข้องกับการป้องกันการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารและลำไส้มาทดสอบฤทธิ์ในการลดการเกาะติดและลดการบุกรุกเซลล์เยื่อบุ HEp-2 ของเชื้อ การวิจัยครั้งนี้ยังมุ่งศึกษาผลของสมุนไพรดังกล่าวต่อระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการเกาะติดเซลล์ของเชื้อ โดยเลือกเฉพาะยีนที่มีบทบาทสำคัญดังนี้ ยีน *AlpA* และ *BabA*

ระเบียบวิธีวิจัย

สามารถแบ่งการวิจัยออกได้เป็น 6 ขั้นตอนหลัก ดังแผนภูมิในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงลำดับขั้นตอนการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบฤทธิ์และระดับความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (MIC) ของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*
2. ทำให้ทราบฤทธิ์ของสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ตีพิมพ์ทั้งที่เคยมีรายงานว่ามียุทธศาสตร์เกี่ยวข้องกับการป้องกันการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารและลำไส้ต่อความสามารถใน

การเกาะติดและการบุกรุกเซลล์เยื่อ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori*

3. ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสมุนไพรต่อการเกาะติดและบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *H. pylori* โดยเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการเกาะติดและบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *H. pylori*
4. สามารถนำสมุนไพรมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพในการรักษาโรคกระเพาะอาหารได้

บทนำ

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

เชื้อ *H. pylori* สามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพทางคลินิกได้หลายรูปแบบ ปัจจัยความรุนแรงของโรคที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ Urease ซึ่งเปลี่ยน urea เป็น ammonia ซึ่งเป็นด่างจึงไปลดความเป็นกรดของกรดในกระเพาะอาหาร ทำให้เชื้อไม่ถูกทำลาย และการเคลื่อนที่ของเชื้ออาศัยการสร้างเอนไซม์ mucinase ทำให้เชื้อเคลื่อนที่ผ่านชั้นเมือกได้รวดเร็ว นอกจากนี้ยังมี virulence factor อื่นๆที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีน cytotoxin-associated antigen(CagA) ที่เชื้อสร้างขึ้นจะtranslocate เข้าไปในเซลล์ซึ่งจะทำให้เกิดผลทางชีวภาพหลายอย่างต่อเซลล์ เช่น กระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดยเหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารหลั่ง IL-8 ผ่านทาง NF- κ 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) บริเวณไมโครวิลไลของเซลล์เยื่อบุในกระเพาะอาหาร 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 ของเซลล์กระเพาะอาหาร(5) ในการศึกษาเชื้อ *H. pylori* จะทำการศึกษาใน AGS cells (Human gastric adenocarcinoma epithelial cell line) แต่จากการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ชนิดต่างๆพบว่าเซลล์ HEp-2 (human larynx carcinoma) สามารถจับกับตัวเชื้อ *H. pylori* ได้มากกว่าเซลล์ชนิดอื่นๆ(6) ทำให้การศึกษากการเกาะติดและการบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* นิยมใช้เซลล์ HEp-2 เป็นเซลล์แม่แบบในการศึกษา

การรักษาโรคกระเพาะอาหารอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ *H. pylori* ที่ทำกันอยู่ในปัจจุบันจะใช้ยาลดกรดร่วมกับยาปฏิชีวนะ ซึ่งมีราคาแพง และบางครั้งพบว่าเชื้อมีการดื้อยา การใช้สมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหาได้ ทำให้มีการศึกษาสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อ *H. pylori* อาทิเช่น

การศึกษาพืชที่ใช้ในการปรุงอาหารของประเทศอังกฤษกับการยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori*(7) การศึกษาสารสกัดจากผลแอปริคอตของประเทศญี่ปุ่นในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* และ การศึกษาสารสกัดของ cranberry ในการยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* (8) เป็นต้น ผลจากการศึกษาเหล่านี้ทำให้เห็นว่าการสนใจที่จะศึกษาสมุนไพรหรือพืชที่ใช้ในชีวิตประจำวันในการช่วยรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* มากขึ้น ในประเทศไทยมีการศึกษาสมุนไพรไทยกับเชื้อ *H. pylori* เช่น การศึกษาเครื่องเทศและพืชที่ใช้เป็นอาหารของคนไทย พบว่า ดอกจันทน์เทศ ใบต้นจิก เปราะหอม และ กานพลู สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้(9) ทำให้เป็นที่น่าสนใจศึกษาว่าพืชสมุนไพรไทยใดที่สามารถยับยั้งการเจริญ ยับยั้งการเกาะติด และยับยั้งการบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ได้ กระจายดำเป็นสมุนไพรไทยชนิดใหม่อีกชนิดหนึ่งที่มีการศึกษากันมากขึ้น จากการศึกษาพบว่ากระจายดำมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของกระเพาะอาหารในสัตว์ทดลอง หากได้รับกระจายดำ ในปริมาณ 60-120 mg/kg สามารถรักษาอาการกระเพาะอาหารอักเสบได้(10) และ จากการศึกษาคุณสมบัติในการต้านจุลชีพของกระจายดำพบว่า สารสกัดจากกระจายดำสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* ได้ (11) การศึกษาความเป็นพิษของผงกระจายดำในสัตว์ทดลอง พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆที่บ่งชี้ว่าเกิดพิษจากกระจายดำ(12) จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่า กระจายดำจะมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *H. pylori* ได้หรือไม่ และขั้นตอนแรกที่สำคัญในการเกิดพยาธิสภาพ คือ ขั้นตอนที่เชื้อเกาะและบุกรุกเข้าสู่เซลล์เยื่อกระเพาะอาหาร กระจายดำจะมีผลต่อการเกาะติดและบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* หรือไม่ ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้ทำให้เข้าใจกลไกของกระจายดำต่อการเกาะติดและการบุกรุกของเชื้อ *H. pylori* มีประโยชน์ในการนำกระจายดำไปใช้ในการช่วยรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *H. pylori* และลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารได้

วิธีวิจัย

1. พืชสมุนไพร

ในการศึกษาครั้งนี้ จะเลือกศึกษาสมุนไพรที่หาซื้อได้ง่ายตามท้องตลาด หรือสมุนไพรที่ใช้ในครัวเรือนทั้งสิ้น 11 ชนิด ดังนี้ กระชายดำ, กระเทียม, กลัวย, ขมิ้นชัน, ตะไคร้, ใบบัวบก, ฟ้าทะลายโจร, ว่านหางจระเข้, กระเจี๊ยบมอญ, โหระพา และ กระเพรา

2. การเตรียมสารสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายเมทานอล(Methanol)

นำพืชสมุนไพรทั้งหมดมาหั่นหรือสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ อบให้แห้งที่ 40-50°C ทำการชั่งน้ำหนัก ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมนเมทานอลให้ท่วม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชม กรองเมทานอลเก็บไว้ และ นำกากมาทำการสกัดเช่นเดิมอีกครั้งหนึ่ง นำเมทานอลที่กรองได้จากสารสกัดทั้ง 2 ครั้ง ไประเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50-60°C จนแห้ง ซึ่งน้ำหนัก นำมาละลายใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้นดังตารางที่ 1 ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 μ และเก็บไว้ที่ -20 °C

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรชนิดต่างๆ

สมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนของพืช	แหล่งที่มา	ความเข้มข้น (กรัมต่อ มิลลิลิตร)
กระชายดำ	<i>Kaempferia parviflora</i>	เหง้า	-	0.25
กระเทียม	<i>Allium sativum</i>	ผล	ศรีสะเกษ	0.5
กลัวยน้ำว่า	<i>Musa sapientum</i>	ผล	เพชรบุรี	0.5
ขมิ้นชัน	<i>Curcuma longa</i>	เหง้า	-	0.5
ตะไคร้	<i>Cymbopogon citratus</i>	ลำต้น	-	1.0
ใบบัวบก	<i>Centella asiatica</i>	ทุกส่วน	นครปฐม	1.0
ฟ้าทะลายโจร	<i>Andrographis paniculata</i>	ทุกส่วน	-	0.5
ว่านหางจระเข้	<i>Aloe vera</i>	วุ้นใสจากใบ	นนทบุรี	1.0
กระเจี๊ยบมอญ	<i>Abelmoschus esculentus</i>	ผลอ่อน	-	0.5
โหระพา	<i>Ocimum basilicum</i>	ลำต้น	นครปฐม	0.5
กระเพรา	<i>Ocimum sanctum</i>	ใบ	-	0.5

3. การเตรียมสารสกัดจากกระชายดำด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

นำกระชายดำมาล้าง ผึ่งให้แห้ง สับให้ละเอียด นำไปทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ (Hydrodistillation) ซึ่งน้ำหนักน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ ละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อมิลลิลิตร นำกากที่เหลือมาทำการอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50°C 1-2 วัน นำไปสกัดด้วยเฮกเซน (Hexane) ต่อ โดยเติมเฮกเซนให้ท่วม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชม กรองแยกเฮกเซนและทำการสกัดซ้ำเป็นครั้งที่ 2 นำสารสกัดเฮกเซนจากทั้ง 2 ครั้ง ไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40°C จนแห้ง ซึ่งน้ำหนัก

ละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้น 0.125 กรัมต่อมิลลิลิตร นำกากที่เหลือมาทำการอบให้แห้งเช่นเดิม นำไปสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต (Ethylacetate) ต่อ โดยเติมเอทิลอะซิเตตให้ท่วม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชม กรองแยกเอทิลอะซิเตตและทำการสกัดซ้ำเป็นครั้งที่ 2 นำสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากทั้ง 2 ครั้ง ไประเหยให้แห้ง ซึ่งน้ำหนัก ละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อมิลลิลิตร นำกากที่เหลือมาทำการอบให้แห้งเช่นเดิม นำไปสกัดด้วยเมทานอล (Methanol) ต่อ โดยเติมเมทานอลให้ท่วม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชม กรองแยกเมทานอลและทำการสกัดซ้ำเป็นครั้งที่ 2 นำสารสกัดเมทานอลจากทั้ง 2 ครั้ง ไประเหยให้แห้ง ซึ่งน้ำหนัก ละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดที่ละลายแล้วทั้งหมดไปทำให้ปราศจากเชื้อ โดยกรองผ่านตัวกรองขนาด $0.2\ \mu$ เก็บไว้ที่ -20°C

4. 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°C เป็นเวลา 3 วัน ในสภาวะ microaerophilic ($3-7\% \text{O}_2$, $5-10\% \text{CO}_2$, $80-85\% \text{H}_2$)

5. การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *H. pylori*

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *H. pylori* โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา) ตามวิธีการที่ระบุไว้ในชุดสกัดสำเร็จรูป

6. การตรวจหายีน *cagA* ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี PCR

ทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรทั้งหมด $25\ \mu\text{l}$ ประกอบด้วย buffer, $1\ \text{mM}$ dNTP, $0.4\ \mu\text{M}$ ไพร์เมอร์แต่ละเส้น (*cagA* Forward primer 5' - GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG G -3', *cagA* Reverse primer 5' - CTG CAA AAG ATT ATT TGG CAA GA -3' Real Taq DNA Polymerase (Real Biotech Corporation, USA) $0.025\ \text{U}$, DNA template 10-100 ng อุณหภูมิสำหรับปฏิกิริยา PCR คือ 94°C 5 นาที, 40 รอบของ 94°C 1 นาที 58°C 1 นาที 72°C 1 นาที และ 72°C อีก 10 นาที นำผลผลิต PCR ที่ได้ไปทำการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) บน บันนูนอะกาโรส 2 % จะเห็นผลผลิตขนาด 394 เบส

7. การทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสมุนไพรไทยต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*

เพื่อคัดกรองสมุนไพรไทยที่ใช้รักษาโรคกระเพาะอาหารต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* โดยการทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (Minimum inhibitory concentration, MIC) ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ต่างๆ นำสารสกัดสมุนไพรที่เตรียมไว้มาเจือจางใน Mueller Hinton broth เป็นลำดับไป 2 เท่า (2 folded dilutions) ให้ความเข้มข้นอยู่ระหว่าง $16-512\ \mu\text{g/ml}$ นำสารสกัดที่เจือจางปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ Mueller Hinton agar ที่เติมเลือดแกะ 5% ปริมาตร 24 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เทลงบนจานเพาะเชื้อทิ้งไว้ให้แข็งตัว ทำการละลายเชื้อ *H. pylori* ใน $0.85\% \text{NaCl}$ ให้มีความเข้มข้น 1×10^7 ถึง 1×10^8 CFUต่อมิลลิลิตร จุดเชื้อลงไปในอาหารที่ผสมสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นต่างๆ จุลละ $3\ \mu\text{l}$

บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 3 วัน ในสภาวะ microaerophilic อ่านผลความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัด
สมุนไพรร่วมแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ($\mu\text{g/ml}$)

8. การเพาะเลี้ยงเซลล์ Hep-2

เซลล์เยื่อ Human larynx carcinoma (HEp-2) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.พรเทพ เทียนสีวาทกุล
ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำเซลล์ HEp-2 ที่เพาะเลี้ยงใน
ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร (T25) มาทำการล้างด้วย Hank' balanced salt solution
(HBSS) โดยเทอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย HBSS 2 ครั้งๆละ 5 มิลลิลิตร เติม trypsin ปริมาตร 1
มิลลิลิตร เท trypsin ทิ้งไป เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะ [ดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle
Medium, DMEM) ที่เติมซีรัม (fetal bovine serum, FBS) ร้อยละ 10 และ สาร Antibiotic/Antimycotic (เพนนิ
ซิลิน (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 ปิเปตขึ้นลง และดูด
เซลล์ใส่ในขวดใหม่ นำไปเลี้ยงภายในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °ซ CO₂ 5% และมีความชื้น 80%

9. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดของสมุนไพรร่วมต่าง ๆ ต่อความสามารถในการเกาะติดและบุกรุก เซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*

นำเซลล์ HEp-2 ปริมาณ 1×10^6 เซลล์ มาเลี้ยงใน six wells plate ข้ามคืน ให้มีความหนาแน่นของเซลล์
ประมาณ 80% ล้างเซลล์ด้วย HBSS 2 ครั้ง เติมเชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 ในปริมาณ 10^8 CFU ต่อ มิลลิลิตร
ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไปในทุกหลุม จากนั้นเติมสารสกัดของสมุนไพรร่วมแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นเท่ากับ
MIC สำหรับหลุมควบคุมไม่ต้องเติมสารสกัดใดๆ ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 มิลลิลิตรด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์
ดีเอ็มอีเอ็ม นำไปบ่มภายในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 3 ชม ทำซ้ำ 2 ชุด ล้างด้วย HBSS 2
ครั้ง จากนั้นเติม gentamicin 100 $\mu\text{g/ml}$ ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ล้างด้วย HBSS 3 ครั้ง ทำให้เซลล์แตกด้วยน้ำกลั่น
เขย่าเป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายไปเจือจางเป็นลำดับไป 10 เท่า (10 folded dilution) เพาะเลี้ยงบน Brain
Heart Infusion agar ที่ผสมเลือดแกะ 7% บ่มภายใต้สภาวะ microaerophilic เป็นเวลา 5 วัน นับจำนวนโคโลนี
ที่เกิดขึ้น คำนวณเปอร์เซ็นต์การบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ในการทดสอบความสามารถในการเกาะติดของ
เชื้อ ทำเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น ยกเว้น ไม่ต้องทำขั้นตอน gentamicin

10. การวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดและบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี RT-PCR

10.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากเชื้อ *Helicobacter pylori*

นำเชื้อ *H. pylori* จาก cell lysate ของการทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์เยื่อ HEp-2 มาทำการ
สกัด Total RNA โดยใช้รีเอเจนต์ TRIZOL® Reagent (Invitrogen, USA) ทำการกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยรีเอเจนต์
RNase-Free DNase Set (Qiagen, USA) วัดปริมาณด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260 นา
โนเมตร เก็บ RNA ที่สกัดไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

10.2 การทำ RT-PCR ของยีน *alpA* และ *babA*

ขั้นแรกนำ RNA มาเปลี่ยนเป็น cDNA ก่อน โดยทำปฏิกิริยาดังนี้ ในปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร
ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ reverse transcription reaction, 1 mM dNTP, 0.2 μM Primer แต่ละชนิดดังตาราง, M-
MuLV Reverse Transcriptase (New England Biolabs ประเทศสหรัฐอเมริกา) 100 U, อาร์เอ็นเอ ปริมาตร 5-

10 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ 30 นาที ต่อด้วยปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย บัฟเฟอร์, 1 mM dNTP, 0.2 μ M Primer แต่ละชนิด, Real Taq DNA Polymerase (Real Biotech Corporation, USA) 0.025 U, cDNA 5-10 μ l ในปริมาตรรวม 25 μ l และโปรแกรม PCR ดังนี้ 95 °ซ 5 นาที, 44 รอบ ของ 95 °ซ 1 วินาที, 50 °ซ 5 วินาที 72 °ซ 11 วินาที, 72 °ซ 10 นาที นำผลผลิต PCR ที่ได้ไปทำการแยกขนาดบนวุ้นอะกาโรส 2 %

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียด Primer และขนาดของผลผลิต PCR

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

10. การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการเปรียบเทียบทางสถิติของ % internalization ระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร กับกลุ่มทดลองที่เติมสารสกัดจากสมุนไพรโดยใช้ one-way anova โดยใช้โปรแกรม SPSS ค่า P ทั้งหมดที่ ≤ 0.05 จะสันนิษฐานว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

1.ฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรไทยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*

ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* (Minimum inhibitory concentration, MIC) ของสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรไทย 11 ชนิด กับเชื้อ *H. pylori* จำนวน 13 สายพันธุ์ ประกอบด้วย เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน 2 สายพันธุ์ คือ ATCC 43504 และ ATCC 43526, สายพันธุ์ที่ได้จากการมหาวิทยาลัยการแพทย์ 2 สายพันธุ์ คือ DMST20165 และ DMST20885 และสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้ 9 สายพันธุ์ คือ C7, C53, 742, 818, 820, 849, 867, 912 และ 949 ผลเป็นดังตารางที่ 3 พบว่าสารสกัดเมทานอลจากขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ดีที่สุดโดยมีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ(MIC) เท่ากับ 32 µg/ml รองลงมา คือ สารสกัดเมทานอลจากกระชายดำมีค่า MIC เท่ากับ 64 µg/ml ส่วนสารสกัดเมทานอลจากกระเทียม, กลัวย, ตะไคร้, ใบบัวบก, ฟ้าทะลายโจร, ว่านหางจระเข้ กระเจี๊ยบมอญ กระเพรา และโหระพา ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* มีค่า MIC > 512 µg/ml ขณะที่ dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (v/v) ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ละลายสารสกัดสมุนไพรพบว่าไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ

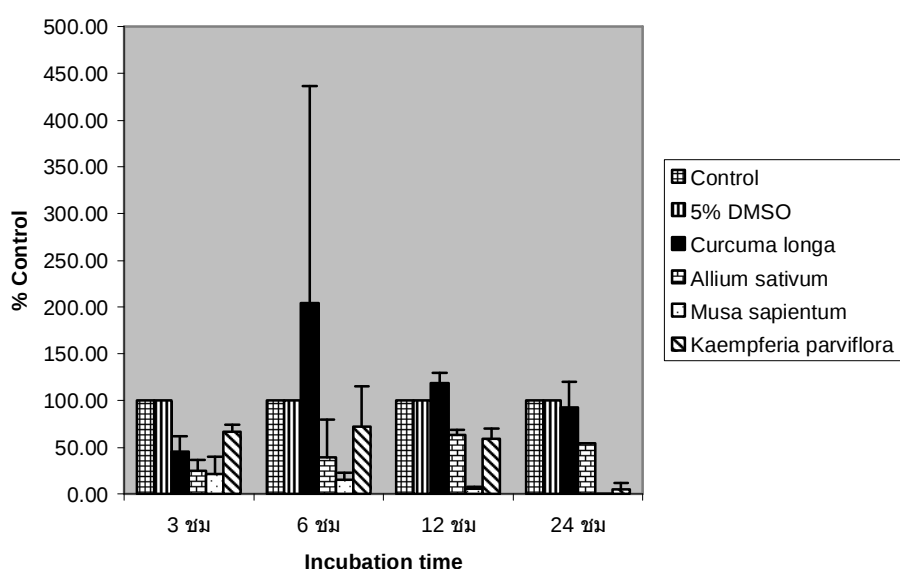
ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (MIC) ของสมุนไพรไทย 11 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญ ของเชื้อ *H. pylori* 13 สายพันธุ์

ชื่อสมุนไพรไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนของพืช	MIC (µg/ml)
ขมิ้นชัน	<i>Curcuma longa</i>	เหง้า	32
กระชายดำ	<i>Kaempferia parviflora</i>	เหง้า	64
กลัวยน้ำว่า	<i>Musa sapientum</i>	ผล	> 512
ว่านหางจระเข้	<i>Aloe barbadensis</i>	วุ้นในใบ	> 512
ใบบัวบก	<i>Centella asiatica</i>	ใบ	> 512
กระเทียม	<i>Allium sativum</i>	กลีบ	> 512
ฟ้าทะลายโจร	<i>Andrographis paniculata</i>	ทุกส่วน	> 512
กระเจี๊ยบมอญ	<i>Abelmoschus esculentus</i>	ผล	> 512
ตะไคร้	<i>Cymbopogon citratus</i>	ต้น	> 512
กระเพรา	<i>Ocimum basilicum</i>	ใบ	> 512
โหระพา	<i>Ocimum sanctum</i>	ใบ	> 512

2. ฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ในการต้านการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 43504

ทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* กับสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ดี คือ ขมิ้นชัน และ กระชายดำ และสมุนไพรที่มีการรายงานว่ามีฤทธิ์ในการรักษาและป้องกันโรคกระเพาะอาหารอักเสบและมะเร็งกระเพาะอาหาร คือ กระเทียม (21) และกลัวย (19) โดยบ่มเชื้อ

H. pylori ATCC 43504 กับเซลล์ HEp-2 และ สมุนไพรชนิดต่างๆ ที่เวลา 3, 6, 12 และ 24 ชม ตามลำดับ และใช้ความเข้มข้นของสมุนไพรเท่ากับ MIC ดังนี้ ขมิ้นชัน 32 $\mu\text{g/ml}$, กระชายดำ 64 $\mu\text{g/ml}$, กระเทียม 5 mg/ml และ กล้วยน้ำว่า 25 mg/ml ผลดังสรุปในรูปที่ 1 พบว่า เมื่อเทียบกับหลุมควบคุมที่ไม่มีสารสกัด กล้วยน้ำว่ามีฤทธิ์ในการต้านการบุกรุกเซลล์ได้ดีที่สุดมีค่าการบุกรุกเฉลี่ยเท่ากับ 21.03%, 15.06%, 7.14%, และ 0.19% ที่เวลา 3, 6, 12 และ 24 ชม ตามลำดับ รองลงมาคือ กระเทียม มีค่าการบุกรุกเฉลี่ยเท่ากับ 24.98%, 39.53%, 63.25% และ 54.61% ตามลำดับ ขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการต้านการบุกรุกเซลล์ที่ 3 ชม เท่ากับ 45.52% แต่พบว่ามีฤทธิ์กระตุ้นการบุกรุกเซลล์เมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้น โดยพบจำนวนเชื้อสูงขึ้นถึง 204.4% ที่เวลาบ่ม 6 ชม และ 118.62% ที่ 12 ชม เมื่อเทียบกับหลุมควบคุมที่เวลาเดียวกัน กระชายดำมีค่าการบุกรุกเฉลี่ยเท่ากับ 66.93%, 71.98%, 59.11%, และ 4.88% ที่เวลา 3, 6, 12 และ 24 ชม ตามลำดับ



รูปที่ 1 การทดสอบการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะที่มีสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรชนิดต่างๆ ที่เวลา 3, 6, 12, 24 ชม และใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ MIC ของแต่ละสาร ผลแสดงเป็นอัตราส่วนของเชื้อที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์เทียบกับหลุมควบคุมที่ไม่มีสารสกัด อัตราส่วนของเชื้อที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์คำนวณจากปริมาณเชื้อที่เข้าสู่เซลล์หารด้วยปริมาณเชื้อตั้งต้น

3. การทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดจากกระชายดำในตัวอย่างละลายชนิดต่าง ๆ ต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*

ถึงแม้ว่ากล้วยน้ำว่าและกระเทียม มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *H. pylori* ในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ได้ดี แต่ต้องใช้ความเข้มข้นของสารในปริมาณที่สูงมาก ซึ่งอาจทำให้มีผลข้างเคียงเป็นพิษกับเซลล์ได้ ในขณะที่ขมิ้นชันมีฤทธิ์กระตุ้นการบุกรุกเซลล์ของเชื้อ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจในการศึกษากระชายดำ เนื่องจากมีฤทธิ์ทั้งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อและต้านการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ได้ โดยนำกระชายดำมาสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ตั้งแต่ กลั่นด้วยไอน้ำ ได้เป็นน้ำมันหอมระเหย สกัดด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตด และ เมทานอล และ ทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum inhibitory concentration, MIC) ของสาร

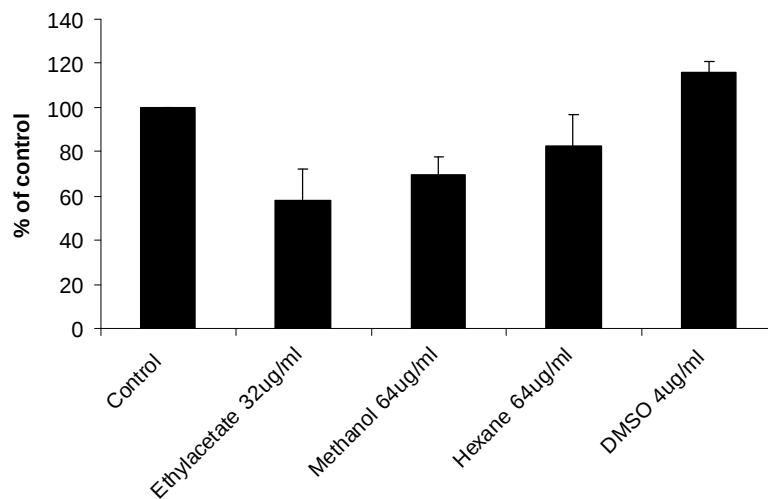
สกัดจากกระชายดำชนิดต่าง ๆ กับเชื้อ *H. pylori* จำนวน 13 สายพันธุ์ ประกอบด้วย เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน 2 สายพันธุ์คือ ATCC 43504 และ ATCC 43526, สายพันธุ์ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2 สายพันธุ์คือ DMST20165 และ DMST20885 และสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้ 9 สายพันธุ์คือ C7, C53, 742, 818, 820, 849, 867, 912 และ 949 ผลเป็นดังตารางที่ 4 พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *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) ซึ่งเป็นตัวละลายสารสกัดนั้นพบว่าไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดจากกระชายดำในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*

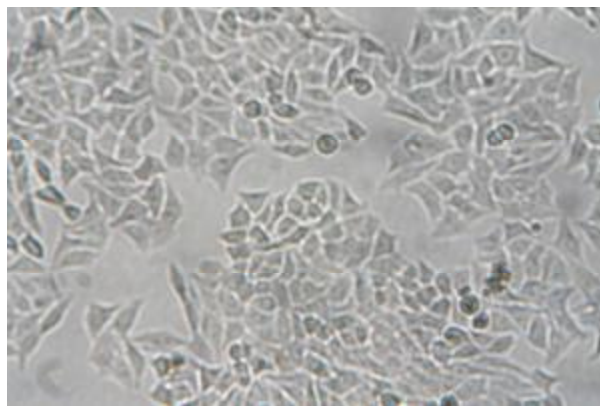
ชนิดของสารสกัด	ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสมุนไพรต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>H. pylori</i> (µg/ml)
น้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ	1,024
สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ	64
สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ	32
สารสกัดเมทานอลจากกระชายดำ	64

4. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori*

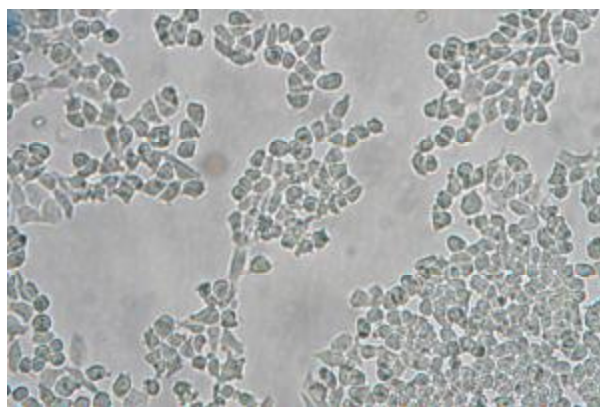
เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำ 4 ชนิดคือน้ำมันหอมระเหย สารสกัดเฮกเซน, สารสกัดเอทิลอะซิเตต และสารสกัดเมทานอล ต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยใช้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504 เวลาในการบ่ม 3 ชั่วโมง และความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเท่ากับ MIC ผลดังสรุปในรูปที่ 2 พบว่าสารสกัดของกระชายดำทุกชนิดยกเว้นน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ในการต้านการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* ได้ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) DMSO ไม่มีผลต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* ขณะที่น้ำมันหอมระเหยของกระชายดำพบว่า มีผลต่อรูปร่างและคุณสมบัติการเกาะของเซลล์ HEP-2 ดังรูปที่ 3 และ 4 คือสภาพเซลล์ HEP-2 จากที่มีลักษณะที่เป็นเซลล์ที่แผ่และเกาะอยู่บนจานเพาะเซลล์ เมื่อผ่านไป 3 ชั่วโมง สภาพเซลล์ HEP-2 จะมีการหดตัวลงมีลักษณะกลมมากขึ้น และเมื่อทำการล้างเซลล์ พบว่าเซลล์ HEP-2 จะขาดคุณสมบัติการเกาะ คือ เซลล์จะร่อนหลุดออกจากจานเพาะเลี้ยง เป็นเหตุให้ไม่สามารถทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยฆ่าเชื้อ *H. pylori* ที่เวลาทดสอบ 3 ชม



รูปที่ 2 การทดสอบการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ HEP-2 ของเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะที่มีและไม่มีการสกัดของกระชายดำ ชนิดต่างๆในการบ่มเชื้อ สารสกัด และ HEP-2 ใช้เวลา 3 ชม และใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ MIC ของแต่ละสาร ผลแสดงเป็นอัตราส่วนของเชื้อที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์เทียบกับหลุมควบคุมที่ไม่มีสารสกัด อัตราส่วนของเชื้อที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์คำนวณจากปริมาณเชื้อที่เข้าสู่เซลล์หารด้วยปริมาณเชื้อตั้งต้น



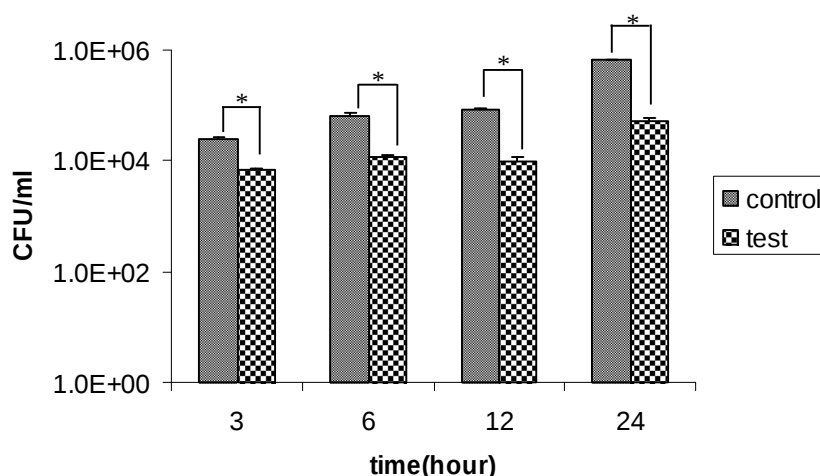
รูปที่ 3 ลักษณะเซลล์ HEP-2 ปกติ



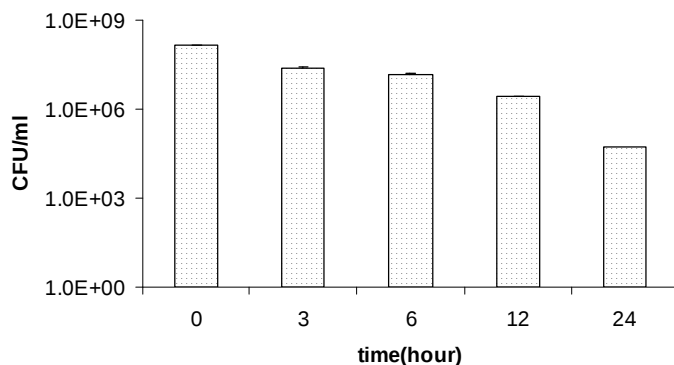
รูปที่ 4 ลักษณะเซลล์ HEP-2 หลังจากการเติมน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 1,024 µg/ml เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง

5. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ที่เวลาต่าง ๆ กัน

เพื่อที่จะดูผลของเวลาในการบ่มสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ ต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยทำการทดสอบกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504 ใช้เวลาในการบ่มที่ 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ และความเข้มข้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ เท่ากับ 32 µg/ml พบว่าปริมาณเชื้อ *H. pylori* ที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์มีความสัมพันธ์กับระยะเวลา ยิ่งระยะเวลานานเชื้อที่เข้าสู่เซลล์ยิ่งมากขึ้น อย่างไรก็ตามสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ สามารถลดการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ได้ทั้งที่ 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง โดยเชื้อสามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์ HEp-2 ในปริมาณที่ลดลงจาก 2.4×10^4 เหลือ 6.8×10^3 ที่ 3 ชม, 6.28×10^4 เหลือ 1.21×10^4 ที่ 6 ชม, 8.1×10^4 เหลือ 9.85×10^3 ที่ 12 ชม และ 6.6×10^5 เหลือ 5.3×10^4 ที่ 24 ชม ผลดังรูปที่ 5 จากการเปรียบเทียบทางสถิติด้วย one-way anova พบว่าปริมาณเชื้อที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์ HEp-2 ที่เวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบระหว่างที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำและไม่มีสารสกัดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากการดูผลของสารสกัดต่อความสามารถในการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ที่เวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (รูปที่ 6) พบว่าเชื้อมีการเจริญลดลงเล็กน้อยที่ 3 และ 6 ชม แต่มีการเจริญลดลงอย่างมากที่ 12 และ 24 ชม แสดงว่าเวลาบ่มสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่นานขึ้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมากขึ้นด้วย นอกจากนี้ในการเปรียบเทียบ %internalization พบว่าที่เวลา 3 ชั่วโมง % internalization ลดลง 3.7 เท่า, ที่เวลา 6 ชั่วโมง % internalization ลดลง 5.2 เท่า, ที่เวลา 12 ชั่วโมง % internalization ลดลง 8.2 เท่า และ ที่เวลา 24 ชั่วโมง % internalization ลดลง 12.5 เท่า ดังนั้นสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อและลดการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยที่ไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ HEp-2 เนื่องจากการส่องดูกล้องจุลทรรศน์พบว่าลักษณะของเซลล์ HEp-2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง



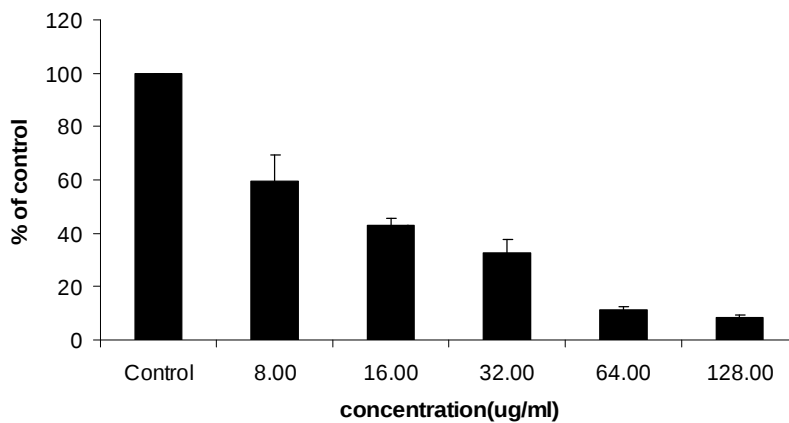
รูปที่ 5 การทดสอบการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ในสถานะที่มีและไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดของกระชายดำที่เวลา 3, 6, 12, 24 ชม และใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 32 µg/ml ปริมาณเชื้อที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์แสดงเป็นค่า log CFU/ml



รูปที่ 6 จำนวนของเชื้อ *H. pylori* ที่เจริญหลังจากบ่มเชื้อกับสารสกัดเป็นเวลา 3, 6, 12 และ 24 ชม ปริมาณเชื้อแสดงเป็นค่า log CFU/ml

6. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ Hep-2 ของเชื้อ *H. pylori*

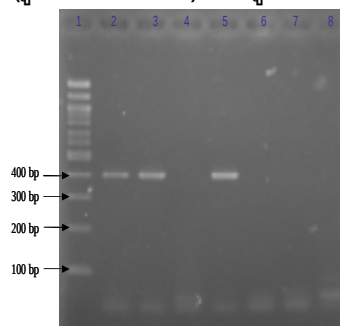
เพื่อดูผลของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ Hep-2 ของเชื้อ *H. pylori* โดยในการทดสอบจะใช้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504 บ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตดที่ความเข้มข้นในช่วง ± 2 MIC ดังนี้ ความเข้มข้นที่ 8, 16, 32, 64 และ 128 $\mu\text{g/ml}$ ผลดังรูปที่ 7 พบว่าปริมาณเชื้อ *H. pylori* ที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์แปรผกผันกับความเข้มข้นของสารสกัด อัตราส่วนของเชื้อที่เข้าสู่เซลล์เทียบกับหลุมควบคุมเท่ากับ 59.28 %, 42.96 %, 32.34 %, 11.63 % และ 8.47% ที่ความเข้มข้น 8, 16, 32, 64 และ 128 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 128 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งการบุกรุกได้สูงสุดโดยปริมาณเชื้อที่เข้าสู่เซลล์ลดลงถึง 100 เท่า จากเชื้อตั้งต้น $1.65 \pm 0.19 \times 10^8$ เข้าเซลล์เพียง $1.36 \pm 0.01 \times 10^6$ ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่มากขึ้นนอกจากมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากขึ้น ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการบุกรุกเซลล์ Hep-2 ของเชื้อ *H. pylori* ได้มากขึ้นด้วยโดยที่ไม่มีผลต่อเซลล์ Hep-2 เนื่องจากการส่องดูกล้องจุลทรรศน์พบว่าลักษณะของเซลล์ Hep-2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง



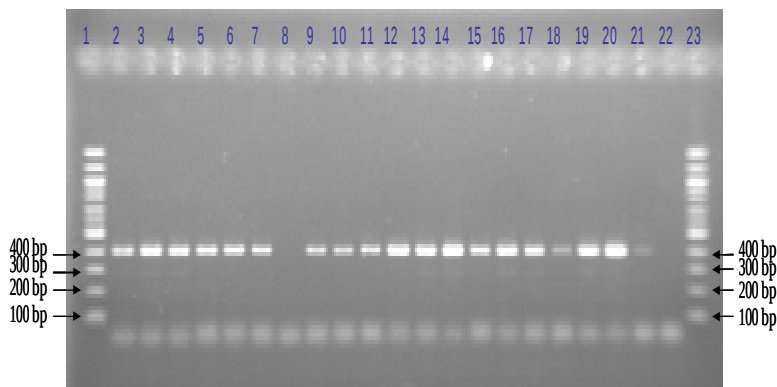
รูปที่ 7 การทดสอบการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะที่มีและไม่มีการสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำที่ความเข้มข้นระหว่าง 8-128 $\mu\text{g/ml}$ ที่เวลาบ่ม 3 ชม ผลแสดงเป็นอัตราส่วนของเชื้อที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์เทียบกับหลุมควบคุมที่ไม่มีสารสกัด อัตราส่วนของเชื้อที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์คำนวณจากปริมาณเชื้อที่เข้าสู่เซลล์หารด้วยปริมาณเชื้อตั้งต้น

7. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ต่าง ๆ

เนื่องจาก *H. pylori* สายพันธุ์ที่มียีน *cagA* จะมีความรุนแรงในการก่อโรค ขณะที่สายพันธุ์ที่ไม่มียีน *cagA* จะไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรค ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มียีน *cagA* เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ไม่มียีน *cagA* ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร โดยจะทำการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *H. pylori* ว่ามียีน *cagA* หรือไม่ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยผลผลิต PCR ของยีน *cagA* มีขนาดเท่ากับ 394 คู่เบส ผลที่ได้ดังรูปที่ 8 และ 9 พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐานทั้งหมด 4 สายพันธุ์มีเพียง 1 สายพันธุ์ที่ไม่มียีน *cagA* คือ ATCC 51932 (รูปที่ 6 แถวที่ 4) สายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้ 20 สายพันธุ์มีเพียง 1 สายพันธุ์ที่ไม่มียีน *cagA* คือ 292 (รูปที่ 7 แถวที่ 8) ส่วนสายพันธุ์ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2 สายพันธุ์ DMST20165 (รูปที่ 6 แถวที่ 6) และ DMST20885 (รูปที่ 6 แถวที่ 7) ทั้งคู่ไม่มียีน *cagA*

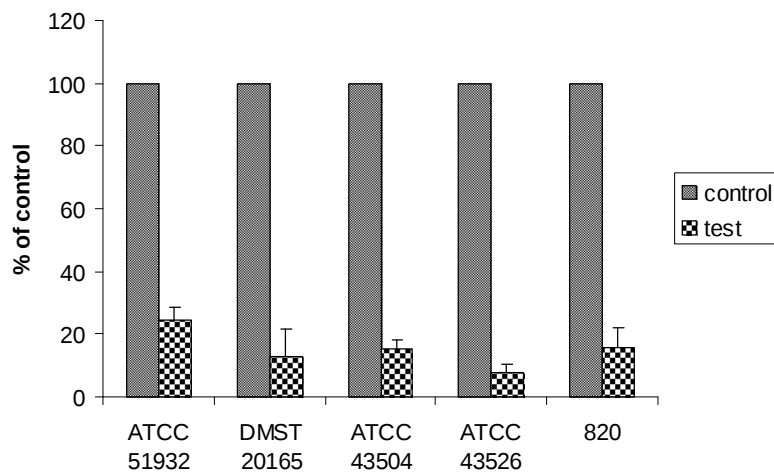


รูปที่ 8 แสดงผลผลิต PCR ยีน *cagA* ของเชื้อ *H. pylori* บนวุ้นอะกาโรส 2 % แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2-5 *H. pylori* ATCC 43504, ATCC 43526, ATCC 51932, ATCC 51110 แถวที่ 6-7 *H. pylori* DMST 20165 และ DMST 20885, แถวที่ 8 Negative control



รูปที่ 9 ผลผลิต PCR ยีน *cagA* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้ทั้งหมด 20 สายพันธุ์บนวันอะกาโรส 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

ทำการเลือกเชื้อ *H. pylori* ที่มียีน *cagA* คือสายพันธุ์ ATCC 43504, ATCC 43526 และ 820 และที่ไม่มียีน *cagA* คือ สายพันธุ์ ATCC 51932 และ DMST 20165 มาทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 โดยในการทดสอบครั้งแรกจะใช้เวลาบ่มที่ 6 ชั่วโมง และความเข้มข้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่ 64 $\mu\text{g/ml}$ เนื่องจากผลยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เวลา 6 ชั่วโมงมีค่าสูงกว่าที่ 3 ชั่วโมง ในขณะที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อมากเกินไปจนทำให้ปริมาณเชื้อตั้งต้นน้อยกว่าปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการบุกรุกเซลล์มาก และใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่ 64 $\mu\text{g/ml}$ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่สามารถลดการบุกรุกเซลล์ได้สูง และไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อมากเกินไป เมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ 128 $\mu\text{g/ml}$ ผล พบว่าการบ่มเชื้อกับสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ 64 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 6 ชม ไม่พบการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ทำให้สภาวะดังกล่าวไม่เหมาะสมในการศึกษาและเปรียบเทียบการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* จึงได้ลดเวลาการทดลองลงเหลือเพียง 3 ชั่วโมง ผลเป็นดังรูปที่ 10 พบว่าเชื้อที่มียีน *cag A* บุกรุกเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าเชื้อที่ไม่มียีน *cag A* แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำมีผลยับยั้งการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ได้ทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยอัตราส่วนของเชื้อที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์มีปริมาณ 24.41, 12.78, 15.27, 7.75, 15.79 สำหรับเชื้อ *H. pylori* ATCC51932, DMST20165, ATCC 43504, ATCC 43526 และ สายพันธุ์ 820 ที่แยกได้จากคนไข้ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับหลุมควบคุมที่ไม่มีสารสกัด



รูปที่ 10 การทดสอบการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ต่างๆในสภาวะที่มีและไม่มีการสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 64 $\mu\text{g/ml}$ ที่เวลาบ่ม 3 ชม ผลแสดงเป็นอัตราส่วนของเชื้อที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์เทียบกับหลุมควบคุมที่ไม่มีสารสกัด อัตราส่วนของเชื้อที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์คำนวณจากปริมาณเชื้อที่เข้าสู่เซลล์หารด้วยปริมาณเชื้อตั้งต้น

8. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อความสามารถในการเกาะติดเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีและไม่มียีน *cagA*

เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อความสามารถในการเกาะติดเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีและไม่มียีน *cagA* โดยจะบ่มสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำกับเชื้อ *H. pylori* 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มียีน *cagA* คือสายพันธุ์ ATCC 43504, ATCC 43526 และ 820 และกลุ่มที่ไม่มียีน *cagA* คือ สายพันธุ์ ATCC 51932 และ DMST 20165 กับ เซลล์ HEp-2 ซึ่งจะใช้เวลาในการบ่มที่ 3 ชั่วโมง และความเข้มข้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำ เท่ากับ 64 $\mu\text{g/ml}$ ผลดังตารางที่ 5 พบว่าในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดกระชายดำ มีค่า % adhesion ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 51932, DMST 20165, ATCC 43504, ATCC 43526 และ 820 เท่ากับ 1.66 ± 0.55 , 1.56 ± 0.32 , 1.70 ± 0.09 , 1.84 ± 0.74 และ 2.07 ± 0.08 ตามลำดับ ส่วนค่า % adhesion ของสภาวะที่มีสารสกัดของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 51932, DMST 20165, ATCC 43504, ATCC 43526 และ 820 เท่ากับ 1.48 ± 0.54 , 1.33 ± 0.25 , 0.25 ± 0.10 , 0.64 ± 0.17 และ 0.57 ± 0.09 ตามลำดับ เมื่อนำค่า % adhesion ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อเชื้อ *H. pylori* กลุ่มที่มีและไม่มียีน *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

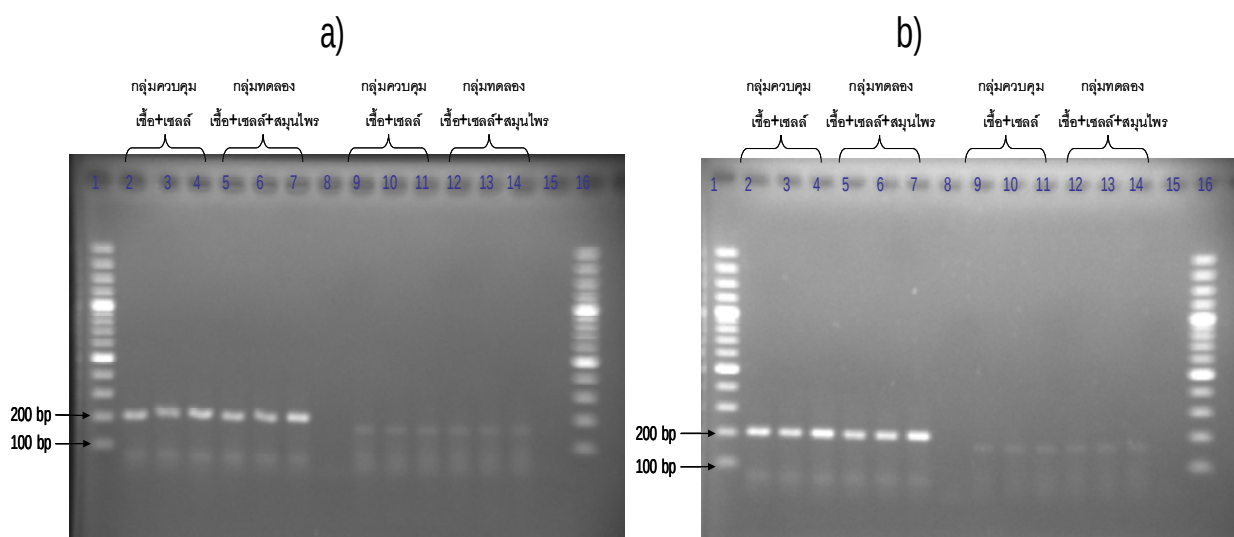
ตารางที่ 5 % adhesion ของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำต่อการเกาะติดเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ต่างๆกันที่เวลาบ่ม 3 ชั่วโมง และความเข้มข้น 64 µg/ml

สายพันธุ์ของเชื้อ <i>H. pylori</i>	ปริมาณเชื้อ <i>H. pylori</i> ตั้งต้น* (CFU/ml)	(เชื้อ+ สมุนไพร) ปริมาณเชื้อที่นับได้* (CFU/ml)	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลอง	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

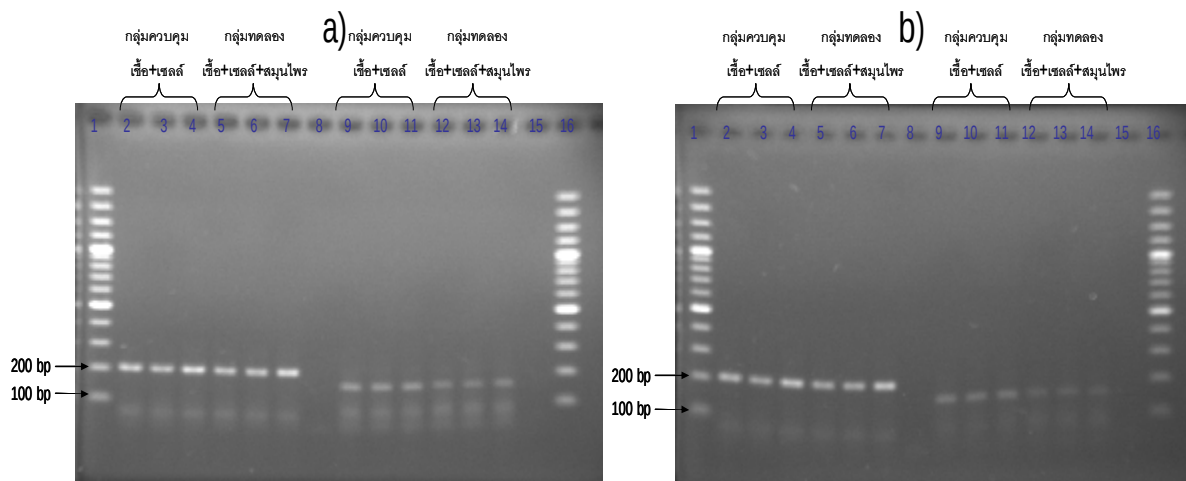
9. การวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี RT PCR

เนื่องจากกลไกการเกาะติดและบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* จะเกี่ยวข้องกับโปรตีนหลายชนิด ได้แก่ *alpA*, *alpB*, *babA*, *oipA*, *hopZ*, *hsp60* และ *hsp70* ดังนั้นการที่สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำสามารถยับยั้งความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ในการเกาะติดและบุกรุกเซลล์ HEp-2 นั้นมีกลไกอย่างไร เกี่ยวข้องกับยีนที่มีบทบาทสำคัญในการเกาะติดและบุกรุกเซลล์หรือไม่ โดยจะทำการศึกษาผลของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำต่อการแสดงออกของยีนที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติด และบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* คือ ยีน *alpA* และยีน *babA* ด้วยวิธี RT PCR และทำการเปรียบเทียบสัดส่วนการแสดงออกของยีน (Relative ratio) เทียบกับยีน 16S ribosomal RNA เลือกสภาวะการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีและไม่มียีน *cagA* ที่มีการบ่มเชื้อ และเซลล์ HEp-2 กับเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ นาน 3 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 64 µg/ml โดยศึกษาผลของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน 3 สายพันธุ์ คือ ATCC 43504, ATCC 43526 และ ATCC 51932 ผลดังรูปที่ 11 แสดงให้เห็นผลผลิตของยีน 16S ribosomal (รูปที่ 11a แถวที่ 2-7) ขนาดเท่ากับ 204 คู่เบส และผลผลิตของยีน *alpA* (รูปที่ 11b แถวที่ 9-14) ขนาดเท่ากับ 168 คู่เบส, และรูปที่ 12 แสดงให้เห็นผลผลิตของยีน 16S ribosomal (รูปที่ 12a แถวที่ 2-7) ขนาดเท่ากับ 204 คู่เบส และผลผลิตของยีน *babA* (รูปที่ 12b แถวที่ 9-14) ขนาดเท่ากับ 158 คู่เบส เมื่อนำภาพที่ถ่ายได้มาทำการวิเคราะห์ความเข้มของแถบผลผลิต PCR ด้วยโปรแกรม AlphaImager 2200 จะได้ผลดังตารางที่ 6 พบว่าอัตราส่วนความเข้มของยีน *alpA*/16S ribosomal ของกลุ่ม

ควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504, ATCC 43526 และ ATCC 51932 เท่ากับ 0.62 ± 0.07 , 0.63 ± 0.08 และ 0.55 ± 0.23 ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มทดลองที่มีการบ่มเชื้อ และเซลล์ กับสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ เท่ากับ 0.56 ± 0.03 , 0.60 ± 0.08 และ 0.62 ± 0.05 ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ พบว่าการแสดงออกของยีน *alpA* ในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำและกลุ่มทดลองที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำเหมือนกัน ($P > 0.05$) แสดงว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *alpA* ของเชื้อ *H. pylori* เมื่อพิจารณาในยีน *babA* พบว่าอัตราส่วนความเข้มของยีน *babA/16s* ribosomal ของกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504, ATCC 43526 และ ATCC 51932 เท่ากับ 0.66 ± 0.06 , 0.77 ± 0.08 และ 0.74 ± 0.05 ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มทดลองที่มีการบ่มเชื้อ และเซลล์ กับสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ เท่ากับ 0.60 ± 0.08 , 0.68 ± 0.07 และ 0.68 ± 0.06 ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ พบว่าการแสดงออกของยีน *babA* ในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำและกลุ่มทดลองที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำเหมือนกัน ($P > 0.05$) แสดงว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *babA* ของเชื้อ *H. pylori* จึงสรุปได้ว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *alaA* และยีน *babA*



รูปที่ 11 a และ b แสดงผลผลิต RT-PCR ยีน 16s ribosomal และยีน *alpA* ของเชื้อ *H. pylori* บน 2 % วัณอะกาโรส; แถวที่ 1 และ 16 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2-7 ยีน 16s ribosomal ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504, ATCC 43526 กลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ และกลุ่มทดลองที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำตามลำดับ, แถวที่ 8 Negative control 16s ribosomal : แถวที่ 9-14 ยีน *alpA* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504, ATCC 43526 กลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำ และกลุ่มทดลองที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำตามลำดับ ตามลำดับ, แถวที่ 15 Negative control ยีน *alpA*



รูปที่ 12 a และ b แสดงผลผลิต RT-PCR ยีน 16s ribosomal และยีน *babA* ของเชื้อ *H. pylori* บน 2 % วุ้นอะกาโรส; 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 6 แสดงอัตราส่วนความเข้มของยีน *alpaA* ต่อยีน 16s rRNA ของการวัดระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี 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>alpaA</i> /16s)	ratio of IDV* (<i>alpaA</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	

ตารางที่ 7 แสดงอัตราส่วนความเข้มของยีน *babA* ต่อยีน 16s rRNA ของการวัดระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี 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	

สรุปและอภิปรายผล

การเกาะติดและการบุกรุกเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารของเชื้อ *H. pylori* มีบทบาทที่สำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพ เชื้อ *H. pylori* สามารถอาศัยอยู่ในเซลล์ทำให้เชื้อสามารถคงอยู่ในกระเพาะอาหารได้เป็นเวลานาน ทำให้การติดเชื้อเรื้อรัง และ ยังทำให้เชื้อสามารถหลบหลีกจากยาปฏิชีวนะและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ให้การรักษาไม่ประสบผลสำเร็จ(13) เชื้อที่อยู่ในเซลล์ยังสามารถกลับออกมาเจริญภายนอกเซลล์ได้(14) ประจวบกับในปัจจุบันเชื่อมีการดื้อยาเพิ่มมากขึ้น ทำให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพลดลง(15) จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่อยู่ในเซลล์ดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์นอกเซลล์ เช่น amoxicillin และ gentamicin(16) แต่ถึงแม้ว่ายาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ เช่น Clarithromycin จะมีประสิทธิภาพในการรักษาแต่พบว่าอัตราการดื้อยานี้สูงขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้น triple therapy ที่ใช้ยา clarithromycin ในปัจจุบันจึงไม่จัดเป็นยาหลักอีกต่อไป(17) ดังนั้น การดำเนินการเกาะและบุกรุกเซลล์ของเชื่อน่าจะเป็นแนวทางใหม่ในการป้องกันและรักษาการติดเชื้อนี้ได้ และการใช้สารสกัดจากพืชยังเป็นอีกทางเลือกหนึ่งแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ เนื่องจากเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญหลายชนิด สารที่พบในพืชได้แก่ phenols, quinines, flavones, tannins, terpenoids, and alkaloids(18). ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสมุนไพรที่มีค่า MIC ดีที่สุด 2 อันดับแรก คือ ขมิ้นชัน และกระชายดำ ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 32 และ 64 µg/ml ตามลำดับ แต่จากการศึกษาของ Bhamarapravati และคณะ(9) พบว่าค่า MIC ของกระชายดำมีค่าเท่ากับ 25 µg/ml และในการศึกษาของ Goel และคณะ(19) พบว่าค่า MIC ของกลัวยอยู่ในช่วงระหว่าง 0.32-1000 µg/ml ในการศึกษาของ Mahady และคณะ(20) พบว่าค่า MIC ของขมิ้นชันอยู่ในช่วงระหว่าง 6.25-50 µg/ml ในการศึกษาของ Sivam และคณะ(21) พบว่าค่า MIC กระเทียม มีค่าเท่ากับ 40 µg/ml จะเห็นว่าการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* จากแต่ละงานวิจัยมีค่า MIC ทั้งที่ใกล้เคียงและแตกต่างกันบ้าง เนื่องจากหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น สถานที่ปลูกสมุนไพร, วิธีในการเตรียมสารสกัด, ตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียมสารสกัด และ วิธีเก็บรักษาสารสกัดจากสมุนไพร มีการศึกษาถึงฤทธิ์ของสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* เป็นจำนวนมากในหลายๆ ประเทศ เป็นต้นว่า การศึกษาพืชที่ใช้ในการปรุงอาหารของประเทศอังกฤษ พบว่า columbo weed, ดีปลี, ผักชีฝรั่ง, tarragon, ลูกจันทน์เทศ, yellow-berried nightshade, threadstem carpetweed, sage และ อบเชย สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้(22) การศึกษาเครื่องเทศและพืชที่ใช้เป็นอาหารของคนไทย พบว่า ดอกจันทน์เทศ, ใบต้นจิก, เปราะหอม และ กานพลู สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* MIC อยู่ในช่วง 12.5-100 µg/ml(9) การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสมุนไพรสมอไทยพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้น 1-2.5 mg/ml(23) การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ของกระเทียมพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้น 8-32 µg/ml(24) ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากกระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้น 250-500 µg/ml, การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ในสายพันธุ์ที่มียีน *cagA* ของซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้น 6.25-50 µg/ml(25)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการดื้อยาของเชื้อ *H. pylori* มีความสัมพันธ์กับปริมาณที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์ เนื่องจากเชื้อสามารถหลบหลีกจากยาได้(26) ในการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพร 4 ชนิด คือ

ขมิ้นชัน, กระชายดำ, กระเทียม และ กล้วยต่อความสามารถในการบุกรุกเซลล์ Hep-2 ของเชื้อ *H. pylori* พบว่าสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดมีความสามารถในการลดการบุกรุกเซลล์ Hep-2 ไม่แตกต่างกัน แต่เนื่องจากกระเทียมและกล้วยไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ดังนั้นเมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นที่ใช้ พบว่า ขมิ้นชัน และกระชายดำ ใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า กระเทียม และ กล้วย มาก ซึ่งความเข้มข้นของสมุนไพรที่สูงมากอาจมีความเป็นพิษกับเซลล์ได้ นอกจากนั้นปริมาณตัวทำละลาย DMSO ที่อยู่ในสารสกัดจะมากตามไปด้วย ซึ่งจะมีผลกระทบต่อเซลล์ เนื่องจากหาก %DMSO > 1% จะทำให้เซลล์เป็นพิษ ความสามารถในการบุกรุกเซลล์ Hep-2 ของเชื้อ *H. pylori* แปรผันตรงกับระยะเวลาในการบ่ม ที่ระยะเวลาบ่มที่นานขึ้นจะทำให้เชื้อ *H. pylori* สามารถบุกรุกเซลล์ Hep-2 ได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม กระชายดำ กระเทียม และกล้วย สามารถลดการบุกรุกเซลล์ Hep-2 ได้ทั้งที่เวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ขณะที่ขมิ้นชันกลับมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการบุกรุกเซลล์ Hep-2 เมื่อใช้เวลานานขึ้น จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารออกฤทธิ์ในขมิ้นชันชื่อว่า Curcumin สามารถป้องกันการเกิดมะเร็งของกระเพาะอาหารและลำไส้ของหนูได้(27) และยังพบว่ามีฤทธิ์ในการป้องกันการกระตุ้น NFκB และ กระตุ้นการตอบสนองของเซลล์เยื่อปูที่มีการติดเชื้อได้(28) อย่างไรก็ตามในการนำขมิ้นชันไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นทางเภสัชวิทยา ด้านการอักเสบ ด้านการกลายพันธุ์ หรือใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ จำเป็นต้องคำนึงถึงฤทธิ์ของขมิ้นชันในการกระตุ้นการบุกรุกเซลล์ของเชื้อด้วย ส่วนการบริโภคกระเทียมพบว่าสามารถลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารและลำไส้ได้(21, 29) กล้วยถึงแม้ว่าไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแต่พบว่ามีฤทธิ์ในการป้องกันมะเร็งกระเพาะอาหารและสมานแผล มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ(19, 30) กระชายดำพบว่าสามารถต้านการเกิดการอักเสบในกระเพาะอาหารได้(10) มีการศึกษาในการใช้กระชายดำในการช่วยรักษาโรคมะเร็งของเซลล์มะเร็งชนิดที่มีโปรตีนที่ดื้อต่อยา (multi drug resistance associated-proteins ,MRP)(31) และจากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าการรับประทานกระชายดำติดต่อกันเป็นเวลานานไม่พบการเกิดความเป็นพิษจากกระชายดำ(12)

ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด กระชายดำจึงเป็นสมุนไพรที่น่าสนใจที่สุดเนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* และลดความสามารถในการบุกรุกเซลล์ Hep-2 ได้ดีที่สุด กระชายดำมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Kaempferia parviflora* เป็นสมุนไพรไทยที่ใช้รักษาโรคกระเพาะอาหารและความผิดปกติในลำไส้(32) จากการนำกระชายดำมาสกัดแยกด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ น้ำ ได้เป็นน้ำมันหอมระเหย เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และ เมทานอล ซึ่งจะทำให้ได้สารสกัดชนิดต่างๆตามคุณสมบัติการมีขั้วที่แตกต่างกัน พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 32 µg/ml, รองลงมา คือ สารสกัดเฮกเซนจากกระชายดำ และสารสกัดเมทานอลจากกระชายดำ มีค่า MIC เท่ากับ 64 µg/ml ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ จากการศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นของสารสกัดกระชายดำในตัวทำละลายหลายๆชนิด ได้แก่ การศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ(11) ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 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 การศึกษาสารสกัดเอทานอลจากกระชายดำในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*(9) พบว่ามีค่า MIC

เท่ากับ 25 µg/ml ยังไม่มีการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ในสารสกัดกระชายดำจากเอทิลอะซิเตต และ เฮกเซน มาก่อน

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อความสามารถในบุกรุกเซลล์ Hep-2 ของเชื้อ *H. pylori* พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำมีผลกระทบต่อเซลล์ Hep-2 โดยจะทำให้เซลล์เสียคุณสมบัติไป มีรูปร่างลักษณะผิดปกติเซลล์จะเปลี่ยนรูปร่างจากเซลล์ที่มีลักษณะแผ่เกาะติดกับจานเพาะเลี้ยงเซลล์ กลายเป็นเซลล์ที่มีลักษณะกลม นอกจากนั้นยังเสียคุณสมบัติในการเกาะกับพื้นผิว ทำให้ไม่สามารถทดสอบความสามารถในการบุกรุกเซลล์ Hep-2 ของเชื้อ *H. pylori* ต่อไปได้ สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำมีฤทธิ์ยับยั้งการบุกรุกเซลล์ Hep-2 ของเชื้อ *H. pylori* ได้ดีที่สุด และยังพบว่าปริมาณการบุกรุกเซลล์ Hep-2 ของเชื้อ *H. pylori* แปรผันตามเวลาในการบ่มเชื้อกับเซลล์ ยิ่งเวลานานมากขึ้นเชื้อ *H. pylori* เข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bjorkholm และคณะ (13) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมงเชื้อ *H. pylori* สามารถบุกรุกเซลล์ Hep-2 ได้ประมาณ 0.5% ของเชื้อทั้งหมดที่ใช้ และเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมงเชื้อ *H. pylori* สามารถบุกรุกเซลล์ Hep-2 ได้ประมาณ 1-2% การบุกรุกเซลล์ Hep-2 ของเชื้อ *H. pylori* ยังขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดโดยพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำสูงขึ้นจะมีผลในการลดความสามารถในการบุกรุกเซลล์ Hep-2 ของเชื้อได้มากขึ้น ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่าปริมาณการบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ขึ้นกับปริมาณเชื้อตั้งต้นและระยะเวลาที่เชื้อสัมผัสกับเซลล์ (33) นอกจากนั้นยังพบว่าสารสกัดมีผลในการยับยั้งการเกาะติดและบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ได้ทั้งสายพันธุ์ที่มีและไม่มียีน *cagA* ไม่แตกต่างกัน และ จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากกระชายดำมีสารกลุ่ม flavonoid เป็นส่วนประกอบหลัก สาร flavonoid ประกอบด้วยสารต่างๆคือ 5-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone, 5-hydroxy-7-methoxyflavone, 5-3,7,4'-trimethoxyflavone, 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone, 5-hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavone, 3,5,7-trimethoxyflavone, 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone, 5,7,4'-trimethoxyflavone and 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone (32) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากระชายดำมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อพลาสมาเดียม(32) ต้านภูมิแพ้(34) ต้านการเกิดกระเพาะอาหารอักเสบ(10) และ ต้านเอมไซม์โปรตีเอสของไวรัส(35) การทดสอบในหนู โดยให้กระชายดำในปริมาณ 30, 60 and 120 mg/kg สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารได้(10) มีการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรบางชนิดในการต้านการเกาะติดของเชื้อต่อเซลล์ เป็นต้นว่า น้ำcranberry ยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* ต่อเซลล์กระเพาะอาหาร AGS ได้ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/ml(8) สาร acidic polysaccharide จากชาเขียวต้านการเกาะของเชื้อก่อโรคบางชนิด เช่น *H. pylori propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*(36) สารสกัดจากราก *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) ยับยั้งการเกาะของเชื้อ *H. pylori* กับเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารได้(37)

การวัดระดับการแสดงออกของยีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดและบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี RT PCR คือ ยีน*alpA* และยีน*babA* โดยมียีน 16s ribosomal RNA เป็นinternal control ยีน*alpA* และ*babA* เป็นยีนที่มีบทบาทเป็น outer membrane protein ของเชื้อ *H. pylori* มีการศึกษาวิจัยยีนทั้ง 2 ในด้านเกาะติด และการบุกรุกเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* เช่น การศึกษาผลของยีน*alpA* ในสัตว์ทดลอง(38) พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่ขาดยีนดังกล่าวจะทำให้เชื้อสูญเสียความสามารถใน

การเกาะติด และบุกรุกเซลล์กระเพาะอาหาร, ในการศึกษาหน้าที่ของยีน *alpA* ในเชื้อสายพันธุ์โลกผ้งตะวันตก และสายพันธุ์โลกผ้งตะวันออก(39) พบว่ายีน *alpA* มีหน้าที่สำคัญในการเกาะติดเซลล์กระเพาะอาหารในเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์โลกผ้งตะวันตก แต่ในเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์โลกผ้งตะวันออก พบว่าเมื่อดัดแปลงเชื้อให้ไม่มียีน *alpA* การเกาะติดของเชื้อสายพันธุ์โลกผ้งตะวันออกนี้ไม่มีการลดลง สำหรับในการศึกษายีน *babA* หลายๆการศึกษา(40) พบว่ายีน *babA* มีหน้าที่สำคัญในการเกาะติดเซลล์กระเพาะอาหาร โดยจับกับ Lewis b antigen ของโฮสต์เซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มียีนนี้จะมีความสามารถในการบุกรุกเซลล์กระเพาะอาหารที่สูง แต่ในการศึกษานี้พบว่าการแสดงออกของยีน *alpA* และ *babA* ในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำและกลุ่มทดลองที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำไม่แตกต่างกัน ดังนั้นคาดว่ากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำต่อการยับยั้งการบุกรุกเซลล์ไม่เกี่ยวข้องกับยีน *alpA* และ *babA* แต่อาจเกี่ยวข้องกับยีนอื่น ซึ่งต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ข้อเสนอแนะ

สมุนไพรกระชายดำสามารถออกฤทธิ์ต่อการเกาะติด และบุกรุกเซลล์HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ได้ โดยสารที่ออกฤทธิ์นั้นอยู่ในส่วนของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตด ดังนั้นในการศึกษาต่อไป ควรนำสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากกระชายดำมาทำการศึกษว่าประกอบด้วยสารต่างๆได้แก่อะไรบ้าง 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 เพื่อให้ง่ายต่อการศึกษาต่อไปว่ากลไกที่เกิดขึ้นระหว่างสารสกัดที่ได้กับตัวเชื้อ *H. pylori* เป็นอย่างไร

เอกสารอ้างอิง

- (1) Correa P (1992). Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Research* 52. 6735-6740.
- (2) Luk GD (1998). Tumors of the stomach. Gastrointestinal and liver disease Dallas (TX): WB Saunders. 733-749.
- (3) Nilius M, Strohle A, Bode G, Malfertheiner P (1993). Coccoid like forms (CLF) of *Helicobacter pylori*. Enzyme activity and antigenicity. *Zentralbl Bakteriologie* 280, 259-272.
- (4) นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ 2544. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
- (5) Figueiredo C, Machado JC, Yamaoka Y (2005). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 10, 14-20.
- (6) Nishihara K, Nozawa Y, Nomura S, Kitazato K, Miyake H (1999). Analysis of *Helicobacter pylori* binding site on HEP-2 cells and three cell lines from human gastric carcinoma. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 13, 555-561.
- (7) Megraud F, Lamouillat H, Boyanova L (1991). Bactericidal effect of amoxicillin on *Helicobacter pylori* in an in vitro model using epithelial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, 869-872.
- (8) Shmueli H, Burger O, Neeman I, Yahav J, Samra Z, Niv Y (2004). Susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates to the antiadhesion activity of a high-molecular-weight constituent of cranberry. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease* 50, 231-235.
- (9) Bhamarapravati S, Pendland SL, Mahady GB (2007). Extracts of spice and food plants from Thai traditional medicine inhibit the growth of the human carcinogen *Helicobacter pylori*. *In Vivo* 17, 541-544.
- (10) Rujjanawate C, Kanjanapothi D, Amornlerdpison D, Pojanagaroon S (2005). Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. *Journal of Ethnopharmacology* 102, 120-122.
- (11) Tanasiriwattana N, Natakutung S, Tanajaro T (1997). CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM *Kaempferia galanga*, *K. parviflora* and *K. angustifolia*. Bachelor's Thesis, Department of pharmacy, Chulalongkorn University,.
- (12) Prathanturarug S, Apichartbutra T, Chuakul W, Saralamp P (2007). Mass propagation of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker by in vitro regeneration. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 82, 179-183.
- (13) Björkholm B, Zhukhovitsky V, Löfman C, Hultén K, Enroth H, Block M, Rigo R, Falk P, Engstrand L (2000). *Helicobacter pylori* entry into human gastric epithelial cells: A

potential determinant of virulence, persistence, and treatment failures. *Helicobacter* 5,148-154.

- (14) Amieva MR, Salama NR, Tompkins LS, Falkow S (2002). *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cell Microbiol* 4, 677-690.
- (15) Levy SB (2002). The 2000 Garrod lecture. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 49, 25-30.
- (16) Molyneux AJ, Harris MD (1993). *Helicobacter pylori* in gastric biopsies--should you trust the pathology report? *J R Coll Physicians Lond* 27, 119-120.
- (17) Graham DY, Shiotani A (2008). New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 5, 321-331.
- (18) Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12, 564-582.
- (19) Goel RK, Sairam K, Rao CV (2001). Role of gastric antioxidant and anti-*Helicobacter pylori* activities in antiulcerogenic activity of plantain banana (*Musa sapientum* var. *paradisiaca*). *Indian J Exp Biol* 39, 719-722.
- (20) Mahady GB, Pendland SL, Yun G, Lu ZZ (2002). Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. *Anticancer Res* 22, 4179-4181.
- (21) Sivam GP (2001). Protection against *Helicobacter pylori* and other bacterial infections by garlic. *J Nutr* 131, 1106S-1108S.
- (22) O'Mahony R, Al-Khtheeri H, Weerasekera D, Fernando N, Vaira D, Holton J (2005). Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology* 117, 499-7507.
- (23) Malekzadeh F, Ehsanifar H, Shahamat M, Levin M, Colwell RR (2001). Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18, 85-88
- (24) O'Gara EA, Hill DJ, Maslin DJ (2000). Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2269-2273.
- (25) Mahady GB, Pendland SL, Yun GS, Lu ZZ, Stoia A (2003). Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and the gingerols inhibit the growth of Cag A+ strains of *Helicobacter pylori*. *Anticancer Research* 23, 3699-3702.
- (26) Lai CH, Kuo CH, Chen PY, Poon SK, Chang CS, Wang WC (2006). Association of antibiotic resistance and higher internalization activity in resistant *Helicobacter pylori* isolates. *J Antimicrob Chemother* 57, 466-471.

- (27) Ikezaki S, Nishikawa A, Furukawa F, Kudo K, Nakamura H, Tamura K, Mori H (2001). Chemopreventive effects of curcumin on glandular stomach carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and sodium chloride in rats. *Anticancer Res* 21, 3407-3411.
- (28) Foryst-Ludwig A, Neumann M, Schneider-Brachert W, Naumann M (2004). Curcumin blocks NF-kappaB and the motogenic response in *Helicobacter pylori*-infected epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 1065-1072.
- (29) Gonzalez CA, Riboli E (2006). Diet and cancer prevention: where we are, where we are going. *Nutr Cancer* 56, 225-231.
- (30) Mohan Kumar M, Joshi MC, Prabha T, Dorababu M, Goel RK (2006). Effect of plantain banana on gastric ulceration in NIDDM rats: role of gastric mucosal glycoproteins, cell proliferation, antioxidants and free radicals. *Indian J Exp Biol* 44, 292-299.
- (31) Patanasethanont D, Nagai J, Yumoto R, Murakami T, Sutthanut K, Sripanidkulchai BO, Yenjai C, Takano M (2006). Effects of *Kaempferia parviflora* extracts and their flavone constituents on P-glycoprotein function. *J Pharm Sci* 96, 223-233.
- (32) Yenjai C, Prasanphen K, Daodee S, Wongpanich V, Kittakoop P (2004). Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia* 75, 89-92.
- (33) Wilkinson, S.M., Uhl, J.R., Kline, B.C., Cockerill, F.R. 3rd., 1998. Assessment of invasion frequencies of cultured HEp-2 cells by clinical isolates of *Helicobacter pylori* using an acridine orange assay. *J Clin Pathol.* 51, 127-133.
- (34) Tewtrakul S, Subhadhirasakul S (2007). Anti-allergic activity of some selected plants in the *Zingiberaceae* family. *J Ethnopharmacol* 109, 535-538.
- (35) Sookkongwaree K, Geitmann M, Roengsumran S, Petsom A, Danielson UH., 2006. Inhibition of viral proteases by Zingiberaceae extracts and flavones isolated from *Kaempferia parviflora*. *Pharmazie* 61, 717-721.
- (36) Lee JH, Shim JS, Lee JS, Kim JK, Yang IS, Chung MS, Kim KH (2006). Inhibition of pathogenic bacterial adhesion by acidic polysaccharide from green tea (*Camellia sinensis*). *J Agric Food Chem* 54, 8717-8723.
- (37) Wittschier N, Faller G, Hensel A (2007). An extract of *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) inhibits in situ adhesion of *Helicobacter pylori* to human stomach. *Phytomedicine* 14, 285-288.
- (38) De Jonge R, Durrani Z, Rijpkema SG, Kuipers EJ, Kusters JG (2004). Role of the *Helicobacter pylori* outer-membrane proteins AlpA and AlpB in colonization of the guinea pig stomach. *Journal of Medical Microbiology* 53, 375-379.

- (39) Lu H, Wu JY, Beswick EJ, Ohno T, Odenbreit S, Haas R (2007). Functional and Intracellular Signaling Differences Associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB Adhesin from Western and East Asian Strains. *Journal of Biological Chemistry* 28, 26242.
- (40) Hennig EE, Mernaugh R, Edl J, Cao P, Cover TL (2004). Heterogeneity among *Helicobacter pylori* strains in expression of the outer Membrane Protein BabA. *Infection and Immunity* 72, 3429.

Output ที่ได้จากโครงการ

รางวัลวิทยานิพนธ์ระดับมหาบัณฑิตดีเด่น

ผลงานวิจัยเรื่อง “ฤทธิ์ของกระชายดำในการลดการเกาะติดและบุกรุกเซลล์เยื่อบุ HEP-2 ของเชื้อ *Helicobacter pylori*” ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเด่น สำหรับนิสิตระดับมหาบัณฑิต กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี 2550 จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก



ระดับนานาชาติ (เป็นการนำเสนอแบบโปสเตอร์)

ผลงานวิจัย เรื่อง “Anti-*Helicobacter pylori* and anti-internalization activities of Thai folk remedies used to treat gastric ailments” ในงานการประชุมวิชาการนานาชาติ European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ระหว่างวันที่ 16-19 พฤษภาคม พ.ศ. 2552 ณ เมือง Helsinki ประเทศ ฟินแลนด์

The effects of *Kaempferia parviflora* on anti-internalization activity of *Helicobacter pylori* to HEP-2 cells

S. Amontingcharoen^a, E. Saifah^b, Y. Poovorawan^c, N. Chaichanawongsaroj^{a*}.

^aDepartment of Transfusion Medicine, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

^bDepartment of , Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

^cCenter of Excellence in Viral Hepatitis Research unit, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Abstract

Helicobacter pylori, an etiological agent of active chronic gastritis and peptic ulcer disease, is now considered to be as invasive enteropathogen. Anti-adhesion and anti-internalization are new strategies for prevention and treatment of bacterial infection including the alternative of medicinal plants. In this study, four parts of *Kaempferia parviflora*'s extracts composing of volatile oil, hexane, ethyl acetate and methanol were evaluated for their antibacterial and anti-internalization activities of *Helicobacter pylori* against HEP-2 cells. All extracts except volatile oil showed significant antibacterial activity and had a minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 32-64 µg/ml. The most active extract of ethyl acetate exhibited significant anti-internalization activity which corresponded to dose and time of treatment. Moreover, *Kaempferia parviflora*'s ethyl acetate extract could significantly inhibit the invasion of both *H. pylori* virulent strains (*cagA*⁺) and non-virulent strains (*cagA*⁻) in HEP-2 cells. Thus, *Kaempferia parviflora* is one of the effective herbs for potential prevention and treatment of *H. pylori* infection.

Keywords: *Helicobacter pylori*; *Kaempferia parviflora*; HEP-2 cells; Anti-internalization activity

Introduction

Helicobacter pylori is a causative agent in gastroduodenal diseases such as chronic gastritis, peptic ulceration, gastric adenocarcinoma and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALT) (Graham, 1997; Raus et al., 1987; Wotherspoon et al., 1993). Its colonization most likely occurs during childhood and affects about half of the world's population by majority of fecal-oral transmission (Blaser, 1999; Covacci et al., 1999). The *H. pylori* infection is successfully treated by a combination of a proton pump inhibitor (PPI) and two antibiotics of clarithromycin, amoxicillin, or metronidazole. However, the incidence of antibiotic resistance has increased, causing the disease eradication failed. According to previous reports, *H. pylori* has been considered an intracellular microorganism which may be responsible for the chronic infection and the development of gastric cancer (Anderson and Holck, 1990; Evans et al., 1992; Wilkinson et al., 1998). The adherence and invasion of *H. pylori* in gastric

epithelial cells triggers the process of immune response and virulence properties including secretion of pro-inflammatory cytokines, cell proliferation, and apoptosis (Day et al., 2004; Ledig et al., 2004; Karabay et al., 2006). Therefore, a non-antibiotic agent, capable of inhibiting the growth of *H. pylori* and the invasion to the target cells may be an effective way for preventing or treating the infections. Medicinal plants are useful alternative source of novel drugs containing various pharmacological activities such as antimicrobial activities, anti-inflammatory and anti-ulcerogenic effects. *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker or Krachai Dam belonging to the Zingiberaceae family is one of the attractive plants for the reasons of its anti-gastric ulcer activity (Rujjanawate et al., 2005). It has long been used in Thai traditional medicine for rectifying male impotence, body pains, relief symptoms of colic and gastrointestinal upset. The extract could reduce

the time in the first 10 minutes of rat courtship behavior with no toxicity (Sudwan et al., 2006). Furthermore, the extracts and flavone derivatives from the rhizome of *K. parviflora* could suppress function of multidrug resistance associated-proteins (MRP), in addition to P-glycoprotein, in cancer cells, (Patanasetthanont et al., 2006; Patanasetthanont et al., 2007).

In this study the anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts from *K. parviflora* were investigated. In addition, internalization ability of *H. pylori* against HEP-2 cells was compared between the presence and absence of extracts using gentamicin internalization assay.

Materials and Methods

Plant materials and extraction

Kaempferia parviflora Wall. Ex Baker were bought from a Thai traditional drug store at Pak Klong market in Bangkok, Thailand. One kilogram of roughly ground air-dried plant material was extracted for 3 h by hydrodistillation method and volatile oil was collected. The residue was further extracted twice for 48 h with 200 ml of hexane at room temperature. The combined extracts were filtered and concentrated by evaporation at 40°C until dryness. The residue was dissolved in 200 ml of ethyl acetate and extracted twice for 48 h at room temperature. The filtrate was evaporated to dryness as described. The remaining residue was finally extracted twice for 48 h at room temperature with 200 ml of methanol. After filtration, the extract was evaporated similarly to dryness. The yield obtained under each extraction type was 0.129% for volatile oil, 0.046% for hexane, 0.721% for ethyl acetate and 1.27% for methanol. Each extract was dissolved at 0.25 g/ml with dimethyl sulfoxide (DMSO) except for hexane extract at 0.125 g/ml. These stock solutions were filtrated through 0.2 µm Millipore and stored at -20°C before use.

Bacterial strains and culture condition

Three reference strains of *H. pylori* (ATCC 43504 ATCC 43526 and ATCC 51932) were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Nine clinical isolated were a kind gift from Dr.

Ratha-korn Vilaichone, Division of Gastroenterology, Department of Medicine, Thammasat University Hospital (C7, C53, 742, 818, 820, 849, 867, 912 and 949) and 2 clinical isolates were purchased from Department of medicinal sciences, Ministry of Public Health, Thailand (DMST 20165 and DMST 20885). The bacteria were grown on brain heart infusion agar containing 5% sheep blood and were incubated at 37°C under microaerophilic conditions (N₂, 85%; O₂, 5 %; CO₂, 10%) using gas generating kit (Oxoid, UK) for 3-5 days.

Minimum inhibitory concentrations

Minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined, in duplicate, by an agar dilution method following the National Committee for Clinical Laboratory Standards guidelines using Mueller-Hinton agar with 5% sheep blood. The concentrations of the extracts were ranging from 16-512 µg/ml using two-fold serial dilutions. A 72-h bacterial colony of *H. pylori* strains were suspended in 0.85% NaCl to a turbidity of McFarland standard 2 (10⁷-10⁸ CFU/ml). Subsequently, three microliters of each inoculum was spotted on each plate and incubated as described for 3 days. The MIC was defined as the lowest concentration of each extract at which no visible growth was observed.

Culture of HEP-2 cells

HEP-2 cells from a patient with human larynx carcinoma were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC CCL 23) and were grown on tissue culture plasticware in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies Inc., Rockville, Md) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic-antimycotic solution (Gibco BRL Laboratories, Grand Island, N.Y.) at 37°C in 5% CO₂ with 80% humidity.

Gentamicin internalization assay

HEP-2 cells were washed two times with Hank's balanced salt solution (HBSS) treated with trypsin, and counted. Approximately 1X10⁶ cells were seeded on six wells tissue culture plates and incubated

overnight to obtain 80% confluency. Each well was washed twice with HBSS and added with DMEM containing no antibiotics. *H. pylori* was harvested, resuspended into HBSS (about 10^8 CFU/ml). One hundred microliter of bacterial suspension was added to each well in the absence or presence of the extracts and incubated for 3 h. After incubation, the cells were gently washed two times with HBSS, and treated with HBSS containing 100 µg/ml gentamicin and incubated for one hour to kill extracellular bacteria. HEp-2 monolayers were then washed three times with HBSS and treated with distilled water for 10 minutes to release intracellular bacteria. Serial 10-fold dilutions of the lysed monolayer were placed on brain heart infusion agar supplemented with 5% sheep blood, incubated as previously for 3-5 days to determine the number of viable intracellular bacteria.

Statistical analysis

All experiments were carried out independently in duplicate experiments. The inhibition of internalization by various *K. parviflora*'s extracts and various concentrations of *K. parviflora* ethyl acetate extract were evaluated by one way analysis of variance (ANOVA). While, the effect of *K. parviflora*'s extracts on internalization activities of each *H. pylori* strains and the effect of treatment time were compared under treated and untreated condition using the student's *t* test. Statistical significance was accepted at the $P = 0.05$ level.

Results and discussion

H. pylori colonization of the human stomach leads to a chronic infection associated with duodenal and gastric ulcers (Logan., 1994; Forman., 1996). In view of the rapid increase of bacterial resistance to antibiotic, medicinal plants are now more explored for their bioactivity. Here, we demonstrated the anti-*Helicobacter pylori* activity of *Kaempferia parviflora*, a Thai traditional herb for treatment of colic disorder and gastric ulcer (Yenjai et al., 2004). Four parts of *K. parviflora*'s extracts, volatile oil, hexane, ethyl acetate and methanol, were screened in vitro for the anti-*Helicobacter pylori* actions. As summarized in

Table 1, the strongest growth inhibitions against all thirteen test strains of *H. pylori* was ethyl acetate extract (MICs: 32 µg/ml). The MICs of the extracts from hexane and methanol were 64 µg/ml. While, volatile oil exhibited lowest inhibitory action (MICs: 1,024 µg/ml). Only the ethanol extract had been previously shown significant anti-*Helicobacter pylori* activity (Bhamarapavati et al, 2003). *K. parviflora* had been reported to possess antibacterial, antiparasmodial (Yenjai et al, 2004), anti-allergic activities (Tewtrakul and Subhadhirasakul, 2007; Tewtrakul et al., 2008), anti-peptic ulcer (Rujjanawate et al., 2005) and antiviral proteases (Sookkongwaree et al., 2006). It was suggested that some bioactive flavonoids containing in the rhizome of *K. parviflora* was the major active compound comprising of 5-hydroxy-3,7-

Table 1. Minimum inhibitory concentrations (MICs: µg/ml) of *Kaempferia parviflora*'s extracts against 13 *Helicobacter pylori* strains

Extracts	MIC (µg/ml)
Volatile oil	1,024
Hexane extract	64
Ethylacetate extract	32
Methanol extract	64

dimethoxyflavone, 5-hydroxy-7-methoxyflavone, 5-3,7,4'-trimethoxyflavone, 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone, 5-hydroxy-3,7,3'4'-tetramethoxyflavone, 3,5,7-trimethoxyflavone, 3,5,7,4'- tetramethoxy flavone, 5,7,4'-trimethoxyflavone and 5,7,3'4'tetramethoxyflavone (Yenjai et al., 2004). Some flavonoids derivatives and their metabolite, i.e., genistein, hesperitin, ponciretin, irisolidone, cabreuvin, displayed anti-*Helicobacter pylori* activity (Bae et al., 1999).

H. pylori has been proven an intracellular organism in both cell lines and human gastric biopsies (Bjorkholm et al., 2000). Therefore, anti-invasion agents may open a new avenue for effective prevention and treating infections. All *K. parviflora*'s extracts exhibited anti-internalization activities at the concentration

of MIC except volatile oil (Fig. 1). It was found that volatile oil affected the cellular structure and adherence ability of HEp-2 cells. HEp-2 cells were deformity and detached from the culture well. Moreover, volatile oil inhibited the growth of *H. pylori*, no viable bacteria was detected when incubated the volatile oil with *H. pylori* for 3 h. However, the inhibition activities of internalization were not significantly different between hexane, ethyl acetate and methanol extracts (Fig. 1; $P > 0.05$). Consequently, only ethyl acetate extract with the highest MIC was subjected to further studies.

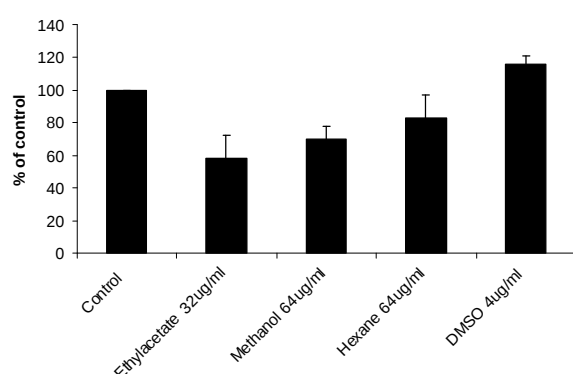


Fig. 1. Internalization assay of *H. pylori*-infected HEp-2 cells in the absence or presence of *K. parviflora*'s extracts at 3 h of incubation. The extracts were added at the concentration of the MIC. Results are presented as the proportion of internalized bacteria versus control. The proportion of internalized bacteria was calculated as the rate of the number of internalized bacteria divided by the bacterial inoculum. Data are presented as mean $\pm$ SD of separate duplicate experiments with two wells per experiment and duplicate plate counts from each well. The significant difference from control without the extract was set at * $p < 0.05$.

The anti-internalization ability of *H. pylori* against HEp-2 cells displayed in dose and time dependent manner. The result was summarized in Fig. 2 a, Fig 2 b and Fig. 3. The bacterial conferred higher capability to enter into the cells at the extended incubation times. This correlated with the previous study which found that HEp-2 cells penetration frequencies were inoculum dependent and accelerated with time (Wilkinson et al., 1998). However, ethyl acetate extract of *K. parviflora* still maintained effective anti-internalization activity upon *H. pylori* during the longer treatment period. The number of treated intracellular *H. pylori* was

significantly lower than the untreated (Fig 2a; $P < 0.05$). The bacterial viability was also investigated in order to determine the effect of *K. parviflora*'s ethyl acetate extract on growth of *H. pylori*. The number of viable bacteria was decreased slightly at 3 and 6 h and markedly decreased at 12 and 24 h of treatment (Fig. 2b). To examine the anti-internalization effect of *K. parviflora*, the optimum incubation time at 3 h or 6 h was utilized according to low effect of growth inhibition. The invasion efficiency had been shown to response to the concentrations of *K. parviflora*'s ethyl acetate extract in the range from 8 to 128 μ g/ml (Fig. 3). The proportions of intracellular bacteria were significantly different from the control without the extract (59.28 %, 42.96 %, 32.34 %, 11.63 % and 8.47%; $P < 0.05$). However, *K. parviflora*'s ethyl acetate extract of 128 μ g/ml effected the growth of *H. pylori*, the number of viable bacteria dramatically reduced about 100 fold ($1.36 \pm 0.01 \times 10^6$) from the initial inoculum ($1.65 \pm 0.19 \times 10^8$). The anti-internalization activities of *K. parviflora* implicated one possible mechanism for anti-peptic ulcer of this plant. Oral administration of *K. parviflora* at 30, 60 and 120 mg/kg significantly inhibited gastric ulcer formation in rats. Its gastroprotective potential was suggested to be related partly to preservation of gastric mucus secretion (Rujjanawate et al., 2005). No report of anti-internalization activity of medicinal plants against *H. pylori* has been documented before. While, the anti-adhesion effect against *H. pylori* have been investigated recently in some plants. A high-molecular-weight, nondialysable material (NDM) of cranberry juice at 0.2 mg/ml inhibited the adhesion of *H. pylori* to the gastric cells (Shmuely et al., 2004). An acidic polysaccharide from *Camellia sinensis*, green tea, possessed anti-adhesive effect against certain pathogenic bacteria including *Helicobacter pylori*, *Propionibacterium acnes*, and *Staphylococcus aureus* (Lee et al., 2006). Root extract from *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) could inhibit adherence of *H. pylori* to human stomach and gastric epithelial cells in a dose dependent manner (Wittschier et al.,

2007; Beil and Kilian, 2007). However, it was found that the antibiotic resistance in *H. pylori* was associated with higher internalization activity due to the ability to escape from antibiotic treatment. The close relationship between the elevated invading efficiency and clarithromycin resistance was investigated (Lai et al., 2006). So, blocking the *H. pylori* invasion by *K. parviflora* was suggested to enhance the curing rate of *H. pylori* and could synergize the conventional antibiotic treatment.

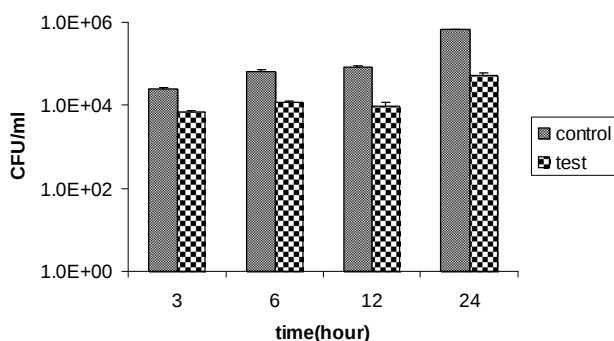


Fig. 2a. Quantitative internalization assay in HEp-2 cells incubated with *H. pylori* ATCC 43504 with and without ethyl acetate extract of *K. parviflora* at 3, 6, 12 and 24 h. The concentration of *K. parviflora*'s ethyl acetate extract was used at 32 μ g/ml. The number of internalized *H. pylori* was assessed by log CFU/ml. Data are presented as mean $\pm$ SD of separate duplicate experiments with two wells per experiment and duplicate plate counts from each well. The significant difference from each control was set at * $p < 0.05$.

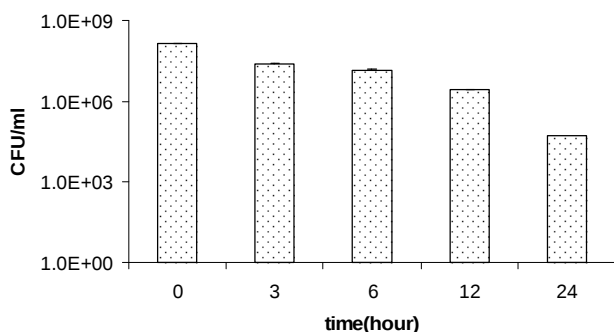


Fig 2b. The number of viable *H. pylori* after treating with 32 μ g/ml of *K. parviflora*'s ethyl acetate extract at 3, 6, 12 and 24 h. Data are presented as mean $\pm$ SD of separate duplicate experiments

Due to *H. pylori* harboring *cagA* is more virulence. So all *H. pylori* strains were screened for *cagA* gene using the PCR method. Only *H. pylori* ATCC 51932 and DMST 20165 did not possess *cagA* gene (data not shown). Comparison of the effect of *K. parviflora*'s

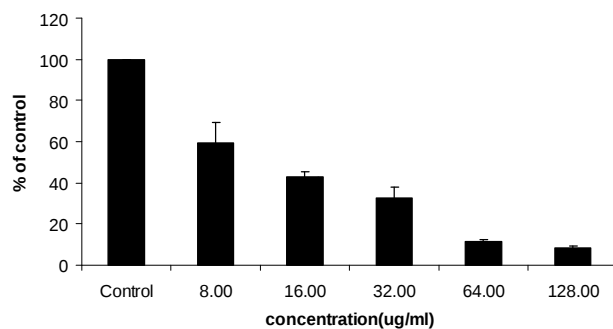


Fig. 3. The effect of various concentrations of *K. parviflora*'s ethyl acetate extracts on *H. pylori* ATCC 43504 internalization of HEp-2 cells at 3 h of incubation. The Data are presented as mean $\pm$ SD of independent duplicate experiments with two wells per experiment and duplicate plate counts from each well. The significant difference from control without the extract was set at * $p < 0.05$.

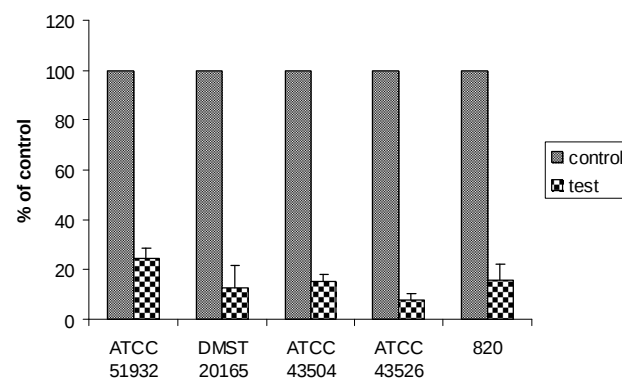


Fig 4. The effect of *K. parviflora*'s ethyl acetate extracts on internalization of different strains of *H. pylori* into HEp-2 cells. HEp-2 cells were co-cultured with *H. pylori* in the absence and presence of 64 μ g/ml of the extract for 3 h. Data are presented as mean $\pm$ SD of independent duplicate experiments with two wells per experiment and duplicate plate counts from each well. The significant difference from each control without the extract was set at * $p < 0.05$.

ethyl acetate extract between five *H. pylori* strains (3 *cagA* positive strains of ATCC 43504, ATCC 43526 and clinical isolated no. 820 and 2 *cagA* negative strains of ATCC 51932 and DMST 20165) for the anti-internalization activity against HEp-2 cells were performed. From preliminary study, using 64 μ g/ml of *K. parviflora*'s ethyl acetate extract and 6 h of incubation, no growth of *H. pylori* was detected. Thus, the most effective treatment condition was optimized at 64 μ g/ml of the extract and 3 h of incubation. The result

was demonstrated in Fig. 4. In consistent with our results, the invasion frequency and the association of adhering bacteria were found to be greater in the type I strains (VacA and *cagA* positive) than in type II strains (VacA and *cagA* negative) (Data not shown) (Petersen et al., 2000). Interaction between bacterial factors such as CagA and host signal transduction pathways was suggested to be critical for mediating cell transformation, cell proliferation, invasion, apoptosis/anti-apoptosis, and angiogenesis (Su et al., 1999). However, the extract significantly inhibited the invasion of individual *H. pylori* strains ($P < 0.05$). The bacterial invasion activities were reduced more than 75 %. Although, the superior invasion activities were contributed in the virulence *H. pylori* strains (*cagA* positive) than the non-virulence strains (*cagA* negative),

the extract exhibited similar antiinvasion activities against *H. pylori* in both groups. However, the antiinvasion mechanism of the *K. parviflora*'s extract has to be further elucidated by both biochemical and genetically studies. In conclusion to achieve the therapy against *H. pylori*, both extracellular and intracellular organism have to be eliminated. In this regard, *K. parviflora* may be considered in addition to current antimicrobial therapy for *H. pylori* eradication due to the potent anti-*H. pylori* activity and anti-internalization activity.

Acknowledgement

This work was supported by grants from Thailand research fund and "90 years Chulalongkorn University Grant" from Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund.

References

- Andersen, L.P., Holck, S., 1990. Possible evidence of invasiveness of *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 9, 135-138.
- Bae, E.A., Han, M.J., Kim, D.H., 1999. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activities of some flavonoids and their metabolites. Planta Med. 65, 442-443.
- Bhamarapravati, S., Pendland, S.L., Mahady, G.B., 2003. Extracts of spice and food plants from Thai traditional medicine inhibit the growth of the human carcinogen *Helicobacter pylori*. In Vivo. 17, 541-544.
- Beil, W., Kilian, P., 2007. EPs 7630, an extract from *Pelargonium sidoides* roots inhibits adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. Phytomed. 14, 5-8.
- Björkholm, B., Zhukhovitsky, V., Löfman, C., Hultén, K., Enroth, H., Block, M., Rigo, R., Falk, P., Engstrand, L., 2000. *Helicobacter pylori* entry into human gastric epithelial cells: A potential determinant of virulence, persistence, and treatment failures. Helicobacter. 5, 148-154.
- Blaser, M.J., 1999. Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. J Infect Dis. 179, 1523-1530.
- Covacci, A., Telford, J.L., Del Giudice G., Parsonnet, J., Rappuoli, R., 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. Science. 284, 1328-1333.
- Day, A.S., Su, B., Ceponis, P.J., Jones, N.L., Yau, E., Sieveking, D., Sherman, P.M., 2004. *Helicobacter pylori* infection induces interleukin-18 production in gastric epithelial (AGS) cells. Dig Dis Sci. 49, 1830-1835.
- Evans, D.G., Evans, D.J. Jr., Graham, D.Y., 1992. Adherence and internalization of *Helicobacter pylori* by HEp-2 cells. Gastroenterology. 102, 1557-1567.
- Graham, D.Y., 1997. *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: a model. Gastroenterology. 113, 1983-1991.
- Karabay, G., Nacar, A., Can, F., Demirbilek, M., Bacanlı, D., Take, G., Yazici, A.C., 2006. Apoptosis and proliferation in gastric epithelium due to *Helicobacter pylori*: an immunohistochemical and ultrastructural study. Acta Gastroenterol Belg. 69, 191-196.
- Lai, C.H., Kuo, C.H., Chen, P.Y., Poon, S.K., Chang, C.S., Wang, W.C., 2006. Association of antibiotic resistance and higher internalization activity in resistant *Helicobacter pylori* isolates. J Antimicrob Chemother. 57, 466-471.
- Ledig, S., Wagner, S., Manns, M.P., Beil, W., Athmann, C., 2004. Role of the receptor-mediated apoptosis in *Helicobacter pylori*

- in gastric epithelial Digestion 70, 178-186.
- Lee, J.H., Shim, J.S., Lee, J.S., Kim, J.K., Yang, I.S., Chung, M.S., Kim, K.H., 2006. Inhibition of pathogenic bacterial adhesion by acidic polysaccharide from green tea (*Camellia sinensis*). J Agric Food Chem. 54, 8717-8723.
- Logan, R.P., 1994. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. Lancet. 344, 1078-1079.
- Patanasethanont, D., Nagai, J., Yumoto, R., Murakami, T., Sutthanut, K., Sripanidkulchai, B.O., Yenjai, C., Takano, M., 2006. Effects of *Kaempferia parviflora* extracts and their flavone constituents on P-glycoprotein function. J Pharm Sci. 96, 223-233.
- Patanasethanont, D., Nagai, J., Matsuura, C., Fukui, K., Sutthanut, K., Sripanidkulchai, B.O., Yumoto, R., Takano, M., 2007. Modulation of function of multidrug resistance associated-proteins by *Kaempferia parviflora* extracts and their components. Eur J Pharmacol. 566, 67-74.
- Petersen, A.M., Blom, J., Andersen, L.P., Kroghelt, K.A., 2000. Role of strain type, AGS cells and fetal calf serum in *Helicobacter pylori* adhesion and invasion assays. FEMS Immunol Med Microbiol. 29, 59-67.
- Raus, E.A., Langenberg, W., Houthoff, H.J., Tytgut, G. N., 1987. *Campylobacter pyloridis*-associated chronic active antral gastritis. A prospective study of its prevalence and the effects of antibacterial and antiulcer treatment. Gastroenterology. 94, 33-40.
- Rujjanawate, C., Kanjanapothi, D., Amornlerdpison, D., Pojanagaroon, S., 2005. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. J Ethnopharmacol. 102, 120-122.
- Shmueli, H., Burger, O., Neeman, I., Yahav, J., Samra, Z., Niv, Y., Sharon, N., Weiss, E., Athamna, A., Tabak, M., Ofek, I., 2004. Susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates to the antiadhesion activity of a high-molecular-weight constituent of cranberry. Diagn Microbiol Infect. 50, 231-235.
- Sookkongwaree K, Geitmann M, Roengsumran S, Petsom A, Danielson UH., 2006. Inhibition of viral proteases by Zingiberaceae extracts and flavones isolated from *Kaempferia parviflora*. Pharmazie. 61, 717-721.
- Su, B., Johansson, S., Fällman, M., Patarroyo, M., Granström, M., Normark, S., 1999. Signal transduction-mediated adherence and entry of *Helicobacter pylori* into cultured cells. Gastroenterology. 117, 595-604.
- Sudwan, P., Saenphet, K., Saenphet, S., Suwansirikul, S., 2006. Effect of *Kaempferia parviflora* Wall. ex. Baker on sexual activity of male rats and its toxicity. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 37, 210-215.
- Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S., 2007. Anti-allergic activity of some selected plants in the Zingiberaceae family. J Ethnopharmacol. 109, 535-538.
- Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S., Kummee, S., 2008. Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*. J Ethnopharmacol. 116, 191-193.
- Wittschier, N., Faller, G., Hensel, A., 2007. An extract of *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) inhibits in situ adhesion of *Helicobacter pylori* to human stomach. Phytomedicine. 14, 285-288.
- Wilkinson, S.M., Uhl, J.R., Kline, B.C., Cockerill, F.R. 3rd., 1998. Assessment of invasion frequencies of cultured HEp-2 cells by clinical isolates of *Helicobacter pylori* using an acridine orange assay. J Clin Pathol. 51, 127-133.
- Wotherspoon, A.C., Diss, T.C., Pan L., Isaacson, P.G., Doglioni, C., Moschini, A., de Boni, M., 1993. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet 342, 575-577.
- Yenjai, C., Prasanphen, K., Daodee, S., Wongpanich, V., Kittakoop, P., 2004. Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. Fitoterapia 75, 89-92.

Anti-*Helicobacter pylori* and anti-internalization activities of Thai folk remedies used to treat gastric ailments.

Nuntaree Chaichanawongsaroj^{a*}, Sumet Amornyingjarean^a, Rathakorn Vilaichone^b, Yong Poovorawan^c.

^aDepartment of Transfusion Medicine, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Thailand 10300.

^bDivision of Gastroenterology, Department of Medicine, Thammasat University, Thailand 12120.

^cCenter of Excellence in Viral Hepatitis Research unit, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Abstract

Helicobacter pylori, an etiological agent of active chronic gastritis and peptic ulcer disease, is now considered to be as invasive enteropathogen. Invasion of gastric epithelium cells contribute to persistence infection and eradication failure due to the bacteria could escape from antibiotic treatment and immune defense mechanism. The aims of this study were to investigate the anti- *Helicobacter pylori* and anti-internalization activities of nine Thai plant extracts used for gastric ailments in traditional medicine including *Kaempferia parviflora*, *Allium sativum*, *Musa sapientum*, *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Centella asiatica*, *Andrographis paniculata*, *Aloe vera* and *Ocimum basilicum*. The minimum inhibitory concentrations against 11 clinical isolates and 2 reference strains of *H. pylori* were examined using an agar dilution method. The level of internalization against HEp-2 cells was determined by a conventional gentamicin internalization assay. Only the methanolic extracts of *Curcuma longa* and *Kaempferia parviflora* exhibited significant antibacterial activities at MIC of 32 µg/ml and 64 µg/ml, respectively. Four common medicinal plants including *Curcuma longa*, *Kaempferia parviflora*, *Allium sativum* and *Musa sapientum* were further tested for their anti-internalization activities against *H. pylori* ATCC 43504 at 3, 6 and 12 h of incubation using the concentration equal to their MIC. All four plant extracts showed inhibitory effects on the invasion of *H. pylori* to HEp-2 cells except *Curcuma longa* enhanced the invasion at 6 and 12 h. Although, *Allium sativum* and *Musa sapientum* demonstrated marked anti-internalization activities, the high concentrations of the extracts may have cytotoxic effects. However, the use of medicinal plants still have potential benefit in *H. pylori* eradication and could be a useful choice to avoid the antibiotic resistance. Moreover, the anti-internalization activities may be a new strategy to prevent *H. pylori* infection and improve the therapy.

Keywords: *Helicobacter pylori*, medicinal plants, anti-internalization

Introduction

Helicobacter pylori infection represents the major cause of peptic ulcer disease and gastric cancer (National Institutes of Health, 1994). It was classified by the World Health Organization as a group I, or definite, human carcinogen. Approximately 50% of the world's population is estimated to be infected with *H. pylori*. Transmission occurs via human-to-human contacts, fecal-oral route and intrafamilial transmission from mother to her offspring (Magalhaes Queiroz and Luzzza, 2006). The recommended eradication therapy continues to be triple therapy with a proton pump inhibitor (PPI) and two antibiotics of clarithromycin, amoxicillin, or metronidazole for 7 days (Cavallaro et al., 2006). However, the eradication rate achieves only 60-80% in clinical practice. The treatment failure resulted from an increasing of antibiotic resistance (Vilaichone et al., 2006) and reducing treatment efficacy due to intracellular survival (Anderson and Holck, 1990; Evans et al., 1992). A minor *H. pylori* population which localized inside gastric mucosal cells could not be entirely killed even a long-time administration of pertinent antibiotics (Korman et al., 1997). This leads to the relapses of gastric ulcers. Some other disadvantages of long antibiotic treatment attributed to drug resistance development and drug side-effects. Therefore, the alternative approaches of herbal medicines become more prominent and extensively studied worldwide in order to find new anti-*Helicobacter pylori* and anti-invasion agents. (Stamatis et al., 2003; Ndip et al., 2007; Shih et al., 2007). A number of natural products have been shown to have anti-*Helicobacter pylori* activity such as garlic extracts, cinnamon extracts, tea catechins, wasabi and honey (Mabe et al., 1999; Ohta et al., 1999; Osato et al., 1999; Tabak et al., 1999; Shin et al., 2004). Some spice and food plants used in Thai traditional medicine for the treatment of gastrointestinal diseases had been proven to exhibited growth-inhibitory effects against *H. pylori* including *Myristica fragrans* (aril), *Barringtonia acutangula* (leaf), *Kaempferia galanga* (rhizome), *Cassia grandis* (leaf), *Cleome viscosa* (leaf), *Myristica fragrans* (leaf), *Syzygium aromaticum* (leaf), *Pouzolzia pentandra* (leaf), *Cycas siamensis* (leaf), *Litsea elliptica* (leaf) and *Melaleuca quinquenervia* (leaf) (Bhamarapravati et al., 2003). However, no report on anti-invasion action of medicinal plants against *H. pylori* has been documented before. This study aimed to screen the anti-*Helicobacter pylori* and anti-internalization of nine Thai folk remedies which have been frequently prescribed for treating gastric ailments.

2. Materials and Methods

2.1. Plant materials and extraction

The plant materials were purchased from supermarket and Thai traditional drug store at Pak Klong market in Bangkok, Thailand. Five hundred grams of roughly ground air-dried plant materials were extracted twice with methanol. The extracts were

filtered and concentrated by evaporation at 40°C until dryness. Each sample was dissolved at 0.25-1 g/ml with dimethyl sulfoxide (DMSO). These stock solutions were filtrated through 0.2 µm Millipore and stored at -20°C before use.

2.2. Bacterial strains and culture condition

The *H. pylori* strains used in this study were two standard strains (ATCC 43504 and ATCC 43526) and eleven clinical isolates obtained from Division of Gastroenterology, Department of Medicine, Thammasat University Hospital and from Department of medicinal sciences, Ministry of Public Health. The bacteria were grown on brain heart infusion agar containing 7% sheep blood and were incubated at 37°C for 3-5 days under microaerophilic conditions (N₂, 85%; O₂, 5%; CO₂, 10%) using gas generating kit (Oxoid, UK).

2.3 Minimum inhibitory concentrations

Minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined, in duplicate, by an agar dilution method following the National Committee for Clinical Laboratory Standards guidelines. Briefly, 1 ml of each diluted plant extract was mixed with 24 ml of unsolidified Mueller-Hinton agar supplemented with 5% sheep blood and poured into sterile petri dishes. Final concentrations of each plant extract were set to be 16, 32, 64, 128, 256 and 512 µg/ml. A 72-h *H. pylori* strains were suspended in 0.85% NaCl to a turbidity of McFarland standard 2 (10⁷-10⁸ CFU/ml). Subsequently, three microliters of each inoculum was spotted on each plate and incubated as described for 3 days. The MIC was defined as the lowest concentration of each extract at which no visible growth was observed.

2.4 Culture of HEP-2 cells

HEP-2 cells from a patent with human larynx carcinoma were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC CCL 23) and were cultured in a medium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies Inc., Rockville, Md), 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic-antimycotic solution (Gibco BRL Laboratories, Grand Island, N.Y.) at 37°C in 5% CO₂ with 80% humidity.

2.5 Gentamicin internalization assay

HEP-2 cells were washed two times with Hank's balanced salt solution (HBSS) treated with trypsin, and seeded on six wells tissue culture plates at a density of 1X10⁶ cells/ml. After seeding, the cells were allowed to attach overnight in the same atmosphere as described above to obtain 80% confluency. After washing twice with HBSS, 900 µl of DMEM containing no antibiotics and 100 µl of *H. pylori* suspension (about 10⁸ CFU/ml) was added to each well in the absence or presence of the extracts and incubated for 3 h. Then, the cells were gently washed two times with HBSS, and treated with HBSS containing 100 µg/ml gentamicin and incubated for one hour to kill extracellular bacteria. HEP-2 monolayers

were then washed three times with HBSS and lysed in distilled water for 10 minutes to release intracellular bacteria. The cell lysate was diluted in HBSS in 10-fold dilutions and 100 μ l were plated onto brain heart infusion agar supplemented with 5% sheep blood, incubated as previously for 3-5 days to determine the number of viable intracellular bacteria. The proportion of internalized bacteria was calculated as the rate of the number of internalized bacteria divided by the bacterial inoculum.

2.6 Statistical analysis

All experiments were carried out independently in duplicate experiments. The inhibitions of internalization by various extracts at various time intervals were evaluated by one way analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was accepted at the $P = 0.05$ level.

3. Results

3.1 Effects on growth of *H. pylori*

Methanol extracts of 9 herbal medicines used traditionally for gastric ailments and also as food ingredients were screened in vitro for the anti-*Helicobacter pylori* activities. The minimum inhibitory concentrations (MIC) against all the 13 test strains of *H. pylori* were shown in Table 1. *Curcuma longa* exhibited the strongest growth inhibition with a MIC of 32 μ g/ml. Also significant anti-*Helicobacter pylori* actions with MIC of 64 μ g/ml belonged to *Kaempferia parviflora*. While, no growth inhibition against *H. pylori* was found in *Allium sativum*, *Musa sapientum*, *Cymbopogon citratus*, *Centella asiatica*, *Andrographis paniculata*, *Aloe vera* and *Ocimum basilicum* (MIC > 512 μ g/ml).

Table 1 Minimum inhibitory concentrations (MICs: μ g/ml) of 9 plant extracts against 11 clinical isolates and 2 reference strains of *Helicobacter pylori*.

	Parts	MIC (μ g/ml)
<i>Curcuma longa</i>	Rhizome	32
<i>Kaempferia parviflora</i>	Rhizome	64
<i>Musa sapientum</i>	Fruit	> 512
<i>Aloe barbadensis</i>	Gel in leaf	> 512
<i>Centella asiatica</i>	Leaf	> 512
<i>Allium sativum</i>	Capita	> 512
<i>Andrographis paniculata</i>	Whole plant	> 512
<i>Ocimum sanctum</i>	Leaf	> 512
<i>Cymbopogon citratus</i>	Stem	> 512

3.2 Effects on anti-internalization of *H. pylori* against HEp-2 cells

Curcuma longa and *Kaempferia parviflora* which possessed the significant anti-*Helicobacter pylori* activities was investigated for the inhibitory action against *H. pylori* invasion into HEp-2 cells. The effects against *H. pylori* invasion were also tested with *Allium sativum* and *Musa sapientum*. Although, *Allium sativum* was weakly active against *H. pylori*, consumption of Allium vegetables reduced the risk of the intestinal

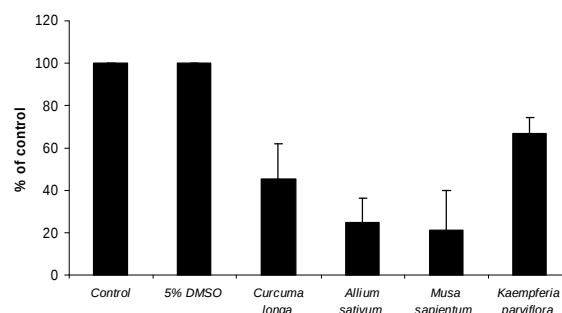


Fig. 1. Internalization assay of *H. pylori*-infected HEp-2 cells in the absence or presence of plant extracts at 3 h of incubation. The extracts were added at the concentration of the MIC. Results are presented as the proportion of internalized bacteria versus control. Data are presented as mean $\pm$ SD of separate duplicate experiments with two wells per experiment and duplicate plate counts from each well. The significant difference from control without the extract was set at * $p < 0.05$.

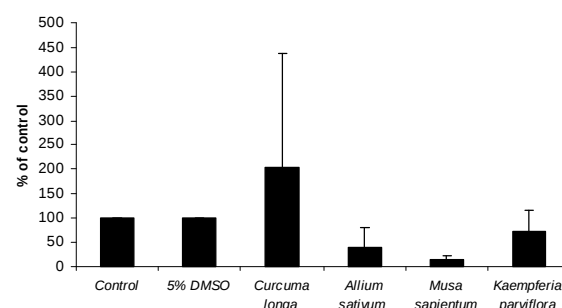


Fig. 2. Internalization assay of *H. pylori*-infected HEp-2 cells in the absence or presence of plant extracts at 6 h of incubation. The extracts were added at the concentration of the MIC. Results are presented as the proportion of internalized bacteria versus control. Data are presented as mean $\pm$ SD of separate duplicate experiments with two wells per experiment and duplicate plate counts from each well. The significant difference from control without the extract was set at * $p < 0.05$.

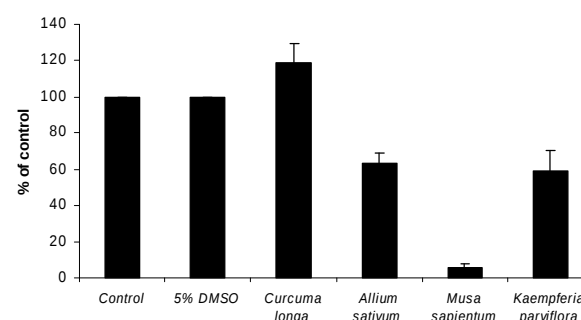


Fig. 3. Internalization assay of *H. pylori*-infected HEp-2 cells in the absence or presence of plant extracts at 12 h of incubation. The extracts were added at the concentration of the MIC. Results are presented as the proportion of internalized bacteria versus control. Data are presented as mean $\pm$ SD of separate duplicate experiments with two wells per experiment and duplicate plate counts from each well. The significant difference from control without the extract was set at * $p < 0.05$.

stomach cancer (Sivam, 2001; Gonzalez and Riboli, 2006). *Musa sapientum* had been indicated for gastric ulcer protection and healing activities through its

prominent effects on mucosal glycoprotein, cell proliferation, free radicals and antioxidant systems (Mukhopadhyaya et al., 1987; Goel et al., 2001; Mohan Kumar et al., 2006). The concentrations of *Curcuma longa*, *Kaempferia parviflora*, *Allium sativum* and *Musa sapientum* used for the anti-internalization assay were 32 µg/ml, 64 µg/ml, 5 mg/ml and 25 mg/ml, respectively. All the test extracts showed significant inhibition of internalization at 3 h of treatment (Fig. 1). However, *Curcuma longa* exhibited the opposite effects during 6 and 12 h of incubation (Fig. 2 and Fig. 3). The prominent activities conferred to *Musa sapientum* and *Allium sativum*, respectively.

4. Discussion

Adhesion and invasion to the gastric epithelial take the crucial role in the pathogenesis of *H. pylori* infection. The intracellular habitat of *H. pylori* established the persistent infection in the human gastric cells and caused the major problem for eradication failure (Bjorkholm et al., 2000). The intracellular *H. pylori* provided the repopulation in the extracellular environment (Amieva et al., 2002). Accompany with the increase of microbial resistance strains reduced the effectiveness of antibiotic treatments (Levy, 2002). In vitro studies have shown that the intracellular bacteria are resistant to extracellular antibiotics, such as amoxicillin and gentamicin (Molyneux and Harris, 1993). Although, the intracellular antibiotic such as clarithromycin, significantly increased the efficacy of therapy, the prevalence of resistance strains to such agent still appeared with the rate about 20%. So, clarithromycin-containing triple therapies are no longer acceptable as empiric therapy (Graham and Shiotani., 2008). Plant extracts are the alternative source of antimicrobial agents with multiple organic components including phenols, quinines, flavones, tannins, terpenoids, and alkaloids (Cowan., 1999). For centuries, numerous folk medicines have been used for curing the gastrointestinal disorders in many countries all over the world. Most studies have been focused to their anti-*Helicobacter pylori* activities (Bae et al., 1998; Yesilada et al., 1999; Stamatis et al., 2003; Ndip et al., 2007; Zaidi et al., 2009). In Thailand, some spice and food plants including *Myristica fragrans*, *Barringtonia acutangula*, *Kaempferia galanga*, *Cassia grandis*, *Cleome viscosa*, *Syzygium aromaticum* had been shown to exhibit the growth inhibition against *H. pylori* (Bhamarapravati et al., 2003). In this study, *Curcuma longa* and *Kaempferia parviflora* was shown to have significant anti-*Helicobacter pylori* activities. The MIC of *Curcuma longa* was related to the previous data (Mahady et al., 2002). Curcumin (diferuloylmethane), the major constituent derived from the rhizomes of *Curcuma longa* (Turmeric), has been shown to prevent gastric and colon cancers in rats (Ikezaki et al., 2001). Moreover, it was able to block the NF-κB activation and cellular motogenic response of epithelial cells induced by *H. pylori* infection (Foryst-Ludwig et al., 2004). *Kaempferia parviflora* is a Zingiberaceae plant,

possessed anti-gastric ulcer activity which was suggested to be related partly to preservation of gastric mucus secretion (Rujjanawate et al., 2005). The anti-internalization activities of some medicinal plants were firstly reported in our study. *Musa sapientum* has shown the strongest inhibition against *H. pylori* invasion to HEp-2 cells. However, in the test condition for gentamicin internalization assay, we used the concentration of each extracts at the level of MIC. The superior anti-*Helicobacter pylori* activities of *Musa sapientum* and *Allium sativum* should be considered towards adverse effects due to the high quantity of the extracts. *Curcuma longa* conferred the inhibitory action against *H. pylori* invasion to HEp-2 cells only in the beginning period (3 h) but it enhanced the internalization ability in the extended times (6 and 12 h). The inducement of cell invasion should be seriously concerned apart from its benefit such as pharmacological effects, anti-inflammatory, antimutagen, antibacterial, antiviral and antioxidant effects (Araújo and Leon, 2001). *Kaempferia parviflora* was the attractive plants carrying both the anti-*Helicobacter pylori* activity and anti-internalization activity. It has been reported to possess anti-allergic, antibacterial (Tewtrakul and Subhadhirasakul, 2007), antiparasitic activities (Yenjai et al., 2004) as well as anti-peptic ulcer effects (Rujjanawate et al., 2005).

In conclusion, we reported the potential *in vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity and anti-internalization activity of some Thai medicinal plants used in traditional treatment of gastrointestinal disorders. Further studies are needed to be carried out to investigate their mechanism and effects *in vivo*. This finding may be useful in the future drug development in combination with antibiotics for effective treatment and prevention of *H. pylori*-associated gastric cancer.

Acknowledgement

This work was supported by grants from The Commissioner of Higher Education (CHE) and The Thailand Research Fund (TRF) and partly supported by the Faculty of Allied Health Sciences Research Fund, Chulalongkorn University, Thailand. Special thanks are expressed to Department of Transfusion Medicine, Faculty of Allied Health Sciences and Innovation Center for Research and Development of Medical Technology Laboratory, Chulalongkorn University, Thailand, for providing of all laboratory equipments.

References

- Amieva MR, Salama NR, Tompkins LS, Falkow S (2002). *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cell Microbiol* 4, 677-690.
- Andersen LP, Holck S (1990). Possible evidence of invasiveness of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9, 135-138.
- Araújo CC, Leon LL (2001). Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 96, 723-728.

- Bae EA, Han MJ, Kim NJ, Kim DH (1998). Anti-*Helicobacter pylori* activity of herbal medicines. *Biol Pharm Bull* 21, 990-992.
- Bhamarapravati S, Pendland SL, Mahady GB (2003). Extracts of spice and food plants from Thai traditional medicine inhibit the growth of the human carcinogen *Helicobacter pylori*. *In Vivo* 17, 541-544.
- Björkholm B, Zhukhovitsky V, Löfman C, Hultén K, Enroth H, Block M, Rigo R, Falk P, Engstrand L (2000). *Helicobacter pylori* entry into human gastric epithelial cells: A potential determinant of virulence, persistence, and treatment failures. *Helicobacter* 5, 148-154.
- Cavallaro LG, Egan B, O'Morain C, Di Mario F (2006). Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 11 Suppl 1, 36-39.
- Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12, 564-582.
- Evans DG, Evans DJ Jr, Graham DY (1992). Adherence and internalization of *Helicobacter pylori* by HEp-2 cells. *Gastroenterology* 102, 1557-1567.
- Foryst-Ludwig A, Neumann M, Schneider-Brachert W, Naumann M (2004). Curcumin blocks NF-kappaB and the motogenic response in *Helicobacter pylori*-infected epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 1065-1072.
- Goel RK, Sairam K, Rao CV (2001). Role of gastric antioxidant and anti-*Helicobacter pylori* activities in antiulcerogenic activity of plantain banana (*Musa sapientum* var. *paradisiaca*). *Indian J Exp Biol* 39, 719-722.
- Gonzalez CA, Riboli E (2006). Diet and cancer prevention: where we are, where we are going. *Nutr Cancer* 56, 225-231.
- Graham DY, Shiotani A (2008). New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 5, 321-331.
- Ikezaki S, Nishikawa A, Furukawa F, Kudo K, Nakamura H, Tamura K, Mori H (2001). Chemopreventive effects of curcumin on glandular stomach carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and sodium chloride in rats. *Anticancer Res* 21, 3407-3411.
- Korman MG, Bolin TD, Engelman JL, Pianko S (1997). Sucralfate as an alternative to bismuth in quadruple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter* 2, 140-3.
- Levy SB (2002). The 2000 Garrod lecture. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 49, 25-30.
- Magalhães Queiroz DM, Luzzo F (2006). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 11 Suppl 1, 1-5.
- Mabe K, Yamada M, Oguni I, Takahashi T (1999). *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1788-1791.
- Mahady GB, Pendland SL, Yun G, Lu ZZ (2002). Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. *Anticancer Res* 22, 4179-4181.
- Mohan Kumar M, Joshi MC, Prabha T, Dorababu M, Goel RK (2006). Effect of plantain banana on gastric ulceration in NIDDM rats: role of gastric mucosal glycoproteins, cell proliferation, antioxidants and free radicals. *Indian J Exp Biol* 44, 292-299.
- Mukhopadhyaya K, Bhattacharya D, Chakraborty A, Goel RK, Sanyal AK (1987). Effect of banana powder (*Musa sapientum* var. *paradisiaca*) on gastric mucosal shedding. *J Ethnopharmacol* 21, 11-19.
- Molyneux AJ, Harris MD (1993). *Helicobacter pylori* in gastric biopsies--should you trust the pathology report? *J R Coll Physicians Lond* 27, 119-120.
- National Institutes of Health (1994). NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. *JAMA* 272, 65-69.
- Ndip RN, Malange Tarkang AE, Mbulah SM, Luma HN, Malongue A, Ndip LM, Nyongbela K, Wirmum C, Efange SM (2007). *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. *J Ethnopharmacol* 114, 452-457.
- Ohta R, Yamada N, Kaneko H, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T, Suzuki A (1999). *In vitro* inhibition of the growth of *Helicobacter pylori* by oil-macerated garlic constituents. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1811-1812.
- Osato MS, Reddy SG, Graham DY (1999). Osmotic effect of honey on growth and viability of *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 44, 462-464.
- Rujjanawate C, Kanjanapothi D, Amornlerdpison D, Pojanagaroon S (2005). Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. *J Ethnopharmacol* 102, 120-122.
- Shih YT, Wu DC, Liu CM, Yang YC, Chen IJ, Lo YC (2007). San-Huang-Xie-Xin-Tang inhibits *Helicobacter pylori*-induced inflammation in human gastric epithelial AGS cells. *J Ethnopharmacol* 112, 537-544.
- Shin IS, Masuda H, Naohide K (2004). Bactericidal activity of wasabi (*Wasabia japonica*) against *Helicobacter pylori*. *Int J Food Microbiol* 94, 255-61.
- Sivam GP (2001). Protection against *Helicobacter pylori* and other bacterial infections by garlic. *J Nutr* 131, 1106S-1108S.
- Stamatis G, Kyriazopoulos P, Golegou S, Basayiannis A, Skaltsas S, Skaltsa H (2003). *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. *J Ethnopharmacol* 88, 175-179.
- Tabak M, Armon R, Neeman I (1999). Cinnamon extracts' inhibitory effect on *Helicobacter pylori*. *J Ethnopharmacol* 67, 269-277.
- Tewtrakul S, Subhadhirasakul S (2007). Anti-allergic activity of some selected plants in the *Zingiberaceae* family. *J Ethnopharmacol* 109, 535-538.

- Vilaichone RK, Mahachai, V, Graham DY (2006). *Helicobacter pylori* diagnosis and management. *Gastroenterol Clin North Am* 35, 229-247.
- Yenjai C, Prasanphen K, Daodee S, Wongpanich V, Kittakoop P (2004). Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia* 75, 89-92.
- Yeşilada E, Gürbüz I, Shibata H (1999). Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. *J Ethnopharmacol* 66, 289-293.
- Zaidi SF, Yamada K, Kadowaki M, Usmanhane K, Sugiyama T (2009). Bactericidal activity of medicinal plants, employed for the treatment of gastrointestinal ailments, against *Helicobacter pylori*. *J Ethnopharmacol* 121, 286-291.