

สัญญาเลขที่ MRG 5980069

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

The Genetic Diversity of *Helicobacter pylori* Outer Inflammatory Protein A (*oipA*) Status
with Genetic Polymorphisms of IL-8 and IL-8 Receptors in Thai Dyspeptic Patients

โดย

ผู้วิจัย	อ.ดร.วงศ์วรุตม์ บุญญานุโกมล (มหาวิทยาลัยมหิดล)
นักวิจัยที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ นพ.ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์ (มหาวิทยาลัยมหิดล)
นักวิจัยที่ปรึกษา	Professor Dr. Seung-Chul Baik (Gyeongsang National University, Republic of Korea)

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5980069

ชื่อโครงการ: ความหลากหลายของยีน Outer inflammatory Protein A (*oipA*) ของเชื้อ *Helicobacter pylori* ร่วมกับรูปแบบยีน IL-8 และ IL-8 receptors ในผู้ป่วยคนไทยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารและลำไส้

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน: อ.ดร.วงศ์วรุตม์ บุญญานูโกลมล โครงการจัดตั้งวิทยาเขตอำนาจเจริญ มหาวิทยาลัยมหิดล

อีเมล: wongwarut.boo@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ: เชื้อ *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคกระเพาะอาหารและลำไส้ โดยเฉพาะโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร อาการทางคลินิกจากการติดเชื้อ *H. pylori* มักแสดงอาการที่แตกต่างกันออกไปโดยขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ปัจจัยจากเชื้อแบคทีเรีย ปัจจัยจากตัวผู้ป่วย รวมถึงปัจจัยจากพฤติกรรมและสิ่งแวดล้อม เป็นที่ทราบกันว่าการติดเชื้อ *H. pylori* สามารถกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร โดยในช่วงปี ค.ศ. 2000 ได้มีผู้ค้นพบว่ายีน outer inflammatory protein A (*oipA*) ในเชื้อ *H. pylori* มีความสัมพันธ์กับการอักเสบเช่นเดียวกันกับที่พบในยีน *cag* pathogenicity island (*cagPAI*) จากการศึกษาในครั้งนี้ผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทยสามารถตรวจพบยีน *oipA* และ *cagPAI* ในอัตรา 33.75% และ 76.25% ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *oipA* ส่วนใหญ่มีสถานะการทำงานของยีนแบบทำงานได้ (status-on) ซึ่งผู้วิจัยพบว่าตัวอย่างขึ้นเนื้อกระเพาะอาหารที่ตรวจพบยีน *oipA* เพียงอย่างเดียว / หรือยีน *cagPAI* เพียงอย่างเดียว มีความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีน IL-1 β และ IL-8 ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ตรวจไม่พบทั้งสองยีน แต่สิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาค้นครั้งนี้คือ ตัวอย่างขึ้นเนื้อกระเพาะอาหารที่ตรวจพบยีน *oipA* ร่วมกับยีน *cagPAI* มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน IL-1 β และ IL-8 ในระดับที่สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างกระเพาะอาหารที่ตรวจพบเพียงยีนใดยีนหนึ่ง / หรือไม่พบทั้งสองยีน

นอกจากปัจจัยจากแบคทีเรีย ยังมีปัจจัยอีกอย่างที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับการอักเสบเมื่อมีการติดเชื้อ *H. pylori* นั่นคือปัจจัยจากตัวผู้ป่วย การเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันออกไป (gene polymorphisms) มักส่งผลให้ผู้ป่วยแต่ละคนอาจมีระดับอาการของโรคที่แตกต่างกัน การเกิด gene polymorphisms ในยีน IL-8 (+781) ในรูปแบบ heterozygous (CT) และ homozygous mutant (TT) มีความสัมพันธ์กับกลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* แต่ไม่พบความแตกต่างกันในกลุ่มอาการต่างๆของโรคกระเพาะอาหาร อีกทั้งรูปแบบของยีน IL-8 (+781) ไม่มีความเกี่ยวข้องกับระดับการแสดงออกของยีน IL-8 แต่สิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาครั้งนี้คือ การเกิด gene polymorphisms ในยีน IL-8 (-251) ในรูปแบบ heterozygous (TA) และ homozygous mutant (AA) มีความสัมพันธ์กับกลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* โดยเฉพาะอย่างยิ่งรูปแบบ homozygous mutant (AA) มีความสัมพันธ์กับกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารและมีความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ที่สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาการเกิด gene polymorphisms ในยีน IL-8 receptors (CXCR1, CXCR2) ด้วยเช่นกัน ซึ่งพบว่าในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารทั้งกลุ่มที่พบและไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori* โดยส่วนใหญ่เกิด gene polymorphisms ในรูปแบบ homozygous wild type [CXCR1 (+2681 GG) และ CXCR2 (+1208 CC)]

สรุปผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปัจจัยจากตัวเชื้อแบคทีเรีย (*H. pylori*) และปัจจัยจากตัวผู้ป่วยล้วนมีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบจากการติดเชื้อ *H. pylori* ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหาร ซึ่งปัจจัยจากตัวผู้ป่วยที่มีสาเหตุจากการเกิด gene polymorphisms ในยีน IL-8 (-251) มีความสัมพันธ์กับการอักเสบและกระบวนการเกิดมะเร็ง ซึ่งอาจนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวทำนายการดำเนินของโรค โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร นอกจากนั้นปัจจัยจากตัวแบคทีเรีย (*H. pylori*) ที่มีสาเหตุมาจากการทำงานของยีน *oipA* นั้นพบว่าเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน IL-1 β และ IL-8 ซึ่งมีความสำคัญต่อการอักเสบและการก่อโรคของเชื้อ *H. pylori* ซึ่งแม้ว่าโปรตีน OipA จะถูกพบว่าเกี่ยวข้องกับไซโตไคน์ IL-1 β และ IL-8 แต่อย่างไรก็ตามกลไกการทำงานร่วมกันระหว่างโปรตีน OipA และตัวรับ (receptors) รวมถึงบทบาทของโปรตีน OipA ต่อการกระตุ้น pro-inflammatory cytokines ตัวอื่นๆ (IL-6, IL-12, IL-18, Tumor Necrosis Factor, Interferon-gamma, granulocyte-macrophage colony stimulating factor) จำเป็นจะต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: *H. pylori*, *oipA*, *cagPAI*, IL-8 gene polymorphisms, IL-8 receptors gene polymorphisms

Abstract

Project code: MRG5980069

Project title: The Genetic Diversity of *Helicobacter pylori* Outer Inflammatory Protein A (*oipA*) Status with Genetic Polymorphisms of IL-8 and IL-8 Receptors in Thai Dyspeptic Patients

Investigator: Dr. Wongwarut Boonyanugomol
Mahidol University, Amnat Charoen Campus

E-mail Address: wongwarut.boo@mahidol.ac.th

Project period: 2 years

Abstract: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) plays an important role in the development of gastrointestinal diseases and is indicated as a class I carcinogen that is involved with the development of gastric carcinoma. The clinical outcome of *H. pylori* infection varies according to the involvement of various bacterial, host, and environmental factors. Infection with this bacterium has been found to stimulate of various pro-inflammatory cytokines from gastric cells such as interleukin-1 (IL-1), IL-6 and IL-8, that is play important roles in gastric inflammation. Recently, *H. pylori* outer inflammatory protein A (*oipA*) has been found to associate with inflammation that is similar to *cag* pathogenicity island (*cagPAI*). Among Thai gastroduodenal patients, we detected the *oipA* and *cagPAI* genes in 33.75% and 76.25%, respectively. The *oipA* “on” status was mostly found (93.75%) in *oipA*-positive samples. We observed higher levels of IL-1 β and IL-8 gene expression in *oipA*-positive tissues (with “on” status), similar to those with *cagPAI*-positive tissues. Interestingly, samples positive for both *oipA* and *cagPAI* genes showed significantly higher levels of IL-1 β and IL-8 gene expression, when compared with tissues single-positive for either *oipA* or *cagPAI*, or double-negative for these two genes.

Besides bacterial factors inducing inflammation, host factors regulated by gene polymorphisms have also been involved with inflammatory responses. Our study, IL-8 (+781), the heterozygous (CT) and homozygous mutant (TT) was found to correlate with Thai gastroduodenal patients infected with *H. pylori*, compared to those of un-infected patients. However, there was no significant association of IL-8 (+781) gene polymorphisms among the Thai patient groups and these gene polymorphisms of IL-8 (+781) were not found to involve with the IL-8 gene expression levels. Interestingly, our findings revealed that the heterozygous (TA) and homozygous mutant (AA) of IL-8 (-251) were associated with *H. pylori*-infected patients, compared to those of un-infected group. Among Thai gastroduodenal patients-infected with *H. pylori*, the homozygous mutant (AA) was found the significant correlation with gastric cancer group, in addition, IL-8 (-251 A/A) were also associated with the higher of IL-8 gene expression than the T/T and T/A. Gene polymorphisms of IL-8 receptors (CXCR1, CXCR2) were also studied, the homozygous wild type of CXCR1 (+2681 GG) and CXCR2 (+1208 CC) were mostly found in both of Thai gastroduodenal patients infected- and un-infected of *H. pylori*.

Taken together, bacterial and host factors were found to involve with *H. pylori*-inducing inflammation. The host factors, the gene polymorphisms of IL-8 (-251) associated with inflammation and carcinogenesis, which suggested that these polymorphisms might be applied as the bio-marker of gastric cancer. The bacterial factors, *H. pylori oipA* gene was found to stimulate of IL-1 β and IL-8 gene expression levels, which indicated that *oipA* plays an important role in *H. pylori* pathogenesis. Although, *H. pylori* OipA associated with IL-1 β and IL-8 regulation, however, OipA-receptors interaction and OipA-inducing other pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-12, IL-18, Tumor Necrosis Factor, Interferon-gamma, granulocyte-macrophage colony stimulating factor) should be further studied.

Keywords: *H. pylori*, *oipA*, *cagPAI*, IL-8 gene polymorphisms, IL-8 receptors gene polymorphisms

2. บทสรุปผู้บริหาร

2.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อ *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบและต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญเติบโต (microaerophilic bacteria) เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้จัดเป็นสาเหตุสำคัญของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร อย่างไรก็ตาม โรคมะเร็งกระเพาะอาหารมีอุบัติการณ์ที่ค่อนข้างน้อยในประเทศไทย แต่อัตราการติดเชื้อ *H. pylori* ยังมีจำนวนที่สูงและยังคงเป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารด้วยเช่นกัน กระบวนการเกิดโรคกระเพาะอาหารรวมทั้งโรคมะเร็งกระเพาะอาหารประกอบไปด้วยหลายปัจจัย เช่น ปัจจัยจากเชื้อแบคทีเรีย (bacterial factors) ปัจจัยจากตัวผู้ป่วย (host factors) ปัจจัยจากพฤติกรรมหรือสิ่งแวดล้อม (behavioral and environmental factors) เป็นต้น แต่ปัจจัยที่ผู้วิจัยให้ความสนใจมากที่สุดคือ ปัจจัยจากตัวเชื้อแบคทีเรียและปัจจัยจากตัวผู้ป่วย โดยเชื้อ *H. pylori* จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียอีกกลุ่มที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง (genetic variation) และมีความแตกต่างของสายพันธุ์ในแต่ละพื้นที่ ในกระบวนการก่อโรคของเชื้อ *H. pylori* อาศัยการทำงานของยีนหลายๆกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (virulence-associated genes) หนึ่งในนั้นคือ ยีน outer inflammatory protein A (*oipA*) ซึ่งเมื่อไม่นานมานี้ได้ถูกค้นพบว่ายีนกลุ่มนี้ช่วยในการเกาะติดของแบคทีเรียและยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการอักเสบได้จากการศึกษาในระดับหลอดทดลอง (*in vitro* study) แต่อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษายังไม่เกิดความชัดเจนมากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งความเกี่ยวข้องในการกระตุ้นการอักเสบ เพราะฉะนั้นการศึกษาจากตัวอย่างชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารของกลุ่มผู้ป่วย (*in vivo* study) จะช่วยยืนยันหน้าที่ของยีน *oipA* ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้มากยิ่งขึ้น

นอกจากปัจจัยจากตัวแบคทีเรีย (bacterial factors) ยังมีปัจจัยอีกอย่างที่น่าสนใจคือ ปัจจัยจากตัวผู้ป่วย (host factors) ซึ่งนับว่าเป็นสิ่งที่มีความสำคัญเช่นกันในกระบวนการเกิดโรคกระเพาะอาหาร มีรายงานว่า การเกิดรูปแบบของยีนที่แตกต่างกัน (gene polymorphisms) ในยีนบางกลุ่มอาจส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการของโรคกระเพาะอาหารที่แตกต่างกันออกไป หนึ่งในนั้นคือการเกิด gene polymorphisms ภายในยีน IL-8 ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างไซโตไคน์กลุ่ม IL-8 และมีความสำคัญในกระบวนการอักเสบเมื่อมีการติดเชื้อ *H. pylori* แต่ข้อมูลในผู้ป่วยคนไทยยังไม่ทราบถึงรูปแบบของยีนกลุ่มนี้ และนอกจากนั้นการเกิด gene polymorphisms ภายในยีน IL-8 receptors (CXCR1, CXCR2) ยังไม่เคยมีการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารมาก่อน โครงการวิจัยนี้

จึงมุ่งเน้นศึกษาถึงความเกี่ยวข้องของยีน *oipA* ที่พบในเชื้อ *H. pylori* รวมถึงการเกิด gene polymorphisms ภายในยีน IL-8 และ IL-8 receptors (CXCR1, CXCR2) ที่มีผลต่อระดับการสร้างไซโตไคน์ IL-8 ในตัวอย่างชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารผู้ป่วย เพื่อให้ทราบข้อมูลพื้นฐานที่มากขึ้นเกี่ยวกับการอักเสบและกระบวนการเกิดโรคกระเพาะอาหารที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *H. pylori*

2.2 ทบทวนวรรณกรรม

เชื้อ *H. pylori* เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ รูปร่างท่อน-โค้ง ที่ต้องการก๊าซ CO₂ ในการเจริญเติบโต [1] เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคมะเร็งกระเพาะอาหารซึ่งเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์ที่สูงในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ จีน ญี่ปุ่น และเกาหลีใต้ แต่ในประเทศไทยแม้ว่าจะมีอุบัติการณ์โรคมะเร็งกระเพาะอาหารที่ค่อนข้างต่ำ แต่อัตราการติดเชื้อ *H. pylori* ยังมีอัตราที่ค่อนข้างสูงและเป็นสาเหตุของการเกิดโรคกระเพาะอาหารอักเสบ (gastritis) และแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ (peptic ulcer diseases) [2] เพราะฉะนั้นการติดเชื้อ *H. pylori* ก็ยังคงเป็นสาเหตุหลักที่สำคัญในการเกิดโรคกระเพาะอาหารในกลุ่มประชากรคนไทยมาจนถึงปัจจุบัน

ตารางที่ 1 แสดง seroprevalence ของการติดเชื้อ *H. pylori* ในประเทศต่างๆของทวีปเอเชีย [3]

Country	Authors	Ref.	Year	n	Age Distribution of the Study	Seroprevalence	Seroprevalence, 20th and 30th*
Bangladesh	Ahmad <i>et al.</i>	2	1997	181	22–44	91.7%	91.7% (original data)
China	Mitchell <i>et al.</i>	3	1992	1727	~50	44.2%	58% (estimated) (62%, Guangzhou; 43%, Guangdong)
	Forman <i>et al.</i> †	4	1990	1882	35–64	60.4%	
	Wong <i>et al.</i> ‡	5	1991	1853	36–65	80.4% and 58.4% (Changle and Hong Kong)	
India	Graham <i>et al.</i>	6	1991	238	~70	81.0%	86.2% (n = 109)
	Gill <i>et al.</i>	7	1994	340	~68	67.0%	87% (estimated)
Japan	Yamagata <i>et al.</i>	8	2000	2602	~40	71.5% and 62.5% (men and women, respectively)	
	Fujisawa <i>et al.</i>	9	1999	264	~89	39.3% (1974, 72.9%; 1984, 54.6%)	25% (estimated)
	Asaka <i>et al.</i>	10	1992	418	>80	Increase 1%/yr and 7–80% (before and after 40 yr, respectively)	34% (estimated)
Korea	Chung <i>et al.</i>	11	1996	867	~94	54.3%	
	Malaty <i>et al.</i>	12	1996	413	~21	75%	67% (n = 67)
Malaysia	Go and Parasakthi	13	2000	2382	~45	26.4–55.0% (Chinese, 26.7–57.5%; Malay, 11.9–29.2%; Indian, 49.4–52.3%)	42.8% (n = 327)
Singapore	Kang <i>et al.</i>	14	1997	487	10–60	34.9% (Chinese, 30.0%; Malay, 25.0%; Indian, 51.0%)	32.2% (n = 180)
	Fock <i>et al.</i>	15	1997	2626	~70	31.4% (Chinese, 31.4%; Malay, 13.7%; Indian, 33.6%)	
Taiwan	Lin <i>et al.</i>	16	1993	823	>70	62.0%	58.2% (n = 251)
Thailand	Perez-Perez <i>et al.</i>	17	1990	194	~64	74%	70% (estimated)
	Bodhidatta <i>et al.</i>	18	1993	814	10–60	53.7% (estimated)	55% (estimated)

* estimated = estimated from the graphs that appeared in the reports.

† Data from rural areas.

‡ Data from Changle, in the southern part of China, and Hong Kong.

เชื้อ *H. pylori* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ส่งผลให้เชื้อในแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกันพอสมควร จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าการติดเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่แตกต่างกันอาจส่งผลให้ผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารมีอาการที่แตกต่างกันออกไป [4] โดยพบว่ายีนที่มีความสำคัญเป็นอันดับต้นๆ ของเชื้อ *H. pylori* คือยีน cytotoxin-associated gene A (*cagA*) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ภายในยีน *cag* pathogenicity island (*cagPAI*) และเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่ายีนกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่รุนแรงและการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร [5, 6] จากการวิเคราะห์โปรตีน CagA สามารถจำแนกออกเป็น 2 ประเภทคือ ชนิด Western และ East Asian โดยกลุ่มผู้ป่วยคนไทยมักจะพบชนิด Western เป็นหลัก ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยแถบเอเชียตะวันออก (จีน ญี่ปุ่น เกาหลี) โดยส่วนใหญ่จะพบชนิด East Asian [7] จากผลการศึกษาที่ได้จากกลุ่มผู้ร่วมวิจัยพบว่าในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทยไม่พบความแตกต่างกันของยีน *cagA* ในกลุ่มอาการต่างๆ ของโรคกระเพาะอาหาร จึงบ่งชี้ได้ว่าอาจมียีนกลุ่มอื่นๆ อีกเป็นจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อ *H. pylori*

Outer membrane proteins (OMPs) เป็นกลุ่มโปรตีนที่สามารถพบได้ในแบคทีเรียแกรมลบ โดยมีการคาดการณ์ว่าประมาณ 4% ของจีโนมเชื้อ *H. pylori* โดยส่วนใหญ่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนในกลุ่ม OMPsหน้าที่ของโปรตีนกลุ่ม OMPs โดยส่วนใหญ่จะทำหน้าที่ช่วยเชื้อแบคทีเรียในการเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้านซึ่งจัดเป็นขั้นตอนที่สำคัญในกระบวนการก่อโรค จึงเกิดการสันนิษฐานว่าโปรตีนกลุ่ม OMPs เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญที่อยู่ในกระบวนการก่อโรคในเชื้อ *H. pylori* [8] ในช่วงปี ค.ศ. 2000 ได้มีการค้นพบว่า Outer Inflammatory Protein A (OipA) ซึ่งจัดเป็นสมาชิกของโปรตีนกลุ่ม OMPs โดยโมเลกุลของโปรตีนชนิดนี้จะอยู่บริเวณผิวเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ทำหน้าที่ช่วยในการเกาะติดและอีกหน้าที่หนึ่งคือ สามารถกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ IL-8 นำไปสู่การอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยงกระเพาะอาหาร (*in vitro* study) [9] ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาได้ค้นพบว่าการแสดงออกของโปรตีน OipA ถูกควบคุมด้วยกระบวนการที่เรียกว่า Phase variation ซึ่งก่อให้เกิด CT dinucleotide repeats motif ซึ่งอาจส่งผลให้ยีนดังกล่าวแสดงสถานการณ์ทำงานของยีนได้ 2 แบบ คือ แบบทำงานได้ (on-status) และแบบทำงานไม่ได้ (off-status) [9] ต่อมาได้มีการศึกษาเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มียีน *oipA* ที่มีสถานะยีนแบบ on-status พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร การอักเสบแบบรุนแรง (severe neutrophil infiltration) รวมถึงช่วยให้เชื้อเกิดการเกาะติดที่มากขึ้น [10, 11] โดยมีความแตกต่างจากเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มียีน *oipA* ที่มีสถานะยีนแบบ off-status โดยเชื้อสายพันธุ์นี้มีการเกาะติด

กับเซลล์เจ้าบ้านที่ลดน้อยลง รวมถึงการสร้างไซโตไคน์ IL-8 ก็มีระดับลดลงเช่นเดียวกัน [12] จากรายงานเกี่ยวกับการกระจายตัวของเชื้อทำให้ทราบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มียีน *oipA* ที่มีสถานะยีนแบบ on-status ถูกตรวจพบได้สูงในกลุ่มผู้ป่วยแถบเอเชียตะวันออก (ประเทศจีน ญี่ปุ่น และเกาหลี) แต่พบได้น้อยในกลุ่มผู้ป่วยแถบอเมริกาและยุโรป และที่สำคัญการพบยีน *oipA* มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบยีนก่อโรคลกลุ่มอื่นๆ ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเช่นกัน ซึ่งได้แก่ *babA*, *vacA* และ *cagA* [12, 13] แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในแต่ละประเทศยังคงมีความแตกต่างกันออกไป จึงทำให้ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดเกี่ยวกับกลไกการทำงานของยีน *oipA* ที่เชื่อมโยงกับการก่อโรค นอกจากนั้นหน้าที่ของยีน *oipA* เกี่ยวกับการกระตุ้นการอักเสบและการสร้างไซโตไคน์ IL-8 ยังสรุปได้ไม่แน่ชัดเช่นกัน โดยอาจมีสาเหตุมาจากการมีข้อมูลการศึกษาที่ค่อนข้างน้อย ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในระดับ *in vitro* study โดยเฉพาะยังขาดข้อมูลการศึกษาในชั้นเนื้อกระเพาะอาหารของผู้ป่วย (*in vivo* study) และขณะนี้ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับตัวรับ (receptor) ที่จำเพาะต่อโปรตีน OipA ดังนั้นการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยอาจทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของยีน *oipA* ที่เชื่อมโยงกับการอักเสบและการสร้างไซโตไคน์ IL-8 ได้มากยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ตามปัจจัยจากตัวเชื้อแบคทีเรีย (bacterial factors) เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอที่จะช่วยอธิบายกลไกการก่อโรคของเชื้อ *H. pylori* ดังนั้นการศึกษาปัจจัยจากตัวผู้ป่วย (host factors) นับว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญเช่นกันที่ควรจะต้องมีการศึกษาควบคู่กัน ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าการติดเชื้อ *H. pylori* สัมพันธ์กับระดับไซโตไคน์ที่สูงขึ้นโดยเฉพาะในกลุ่ม pro-inflammatory cytokines หลายชนิด เช่น IL-1 β , IL-8, TNF-alpha เป็นต้น [14, 15] โดยเฉพาะอย่างยิ่งไซโตไคน์ IL-8 นอกจากเป็นสาเหตุของการอักเสบแล้วยังพบว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการก่อโรคหลายด้าน เช่น การกระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) การกระตุ้นเซลล์ให้เพิ่มจำนวน (cell proliferation) การกระตุ้นให้เซลล์เกิดการพัฒนามะเร็ง (cancer cell progression) รวมถึงการบุกรุกของเซลล์มะเร็ง (cancer cell invasion) เป็นต้น จึงนับได้ว่าไซโตไคน์ IL-8 มีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหารโดยเฉพาะเมื่อมีการติดเชื้อ *H. pylori* [16] จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าเกิดการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกัน (gene polymorphisms) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้หลายระดับ เช่น gene transcription, gene splicing, gene stability และ mRNA translation ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยแต่ละคนมีอาการของโรคที่แตกต่างกันออกไป [17] ได้มีการศึกษาว่าการเกิด gene polymorphism

บริเวณ promoter region ในยีนที่สร้างไซโตไคน์อาจส่งผลให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ในระดับที่แตกต่างกันออกไป [18] การเกิด gene polymorphisms ในยีน IL-8 บริเวณตำแหน่ง promoter region (-251 T/A) มีความสัมพันธ์กับกลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารและมะเร็งกระเพาะอาหารชาวญี่ปุ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงมีการให้ข้อสังเกตว่าการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันออกไป (gene polymorphisms) ของยีน IL-8 (-251 T/A) อาจจะมีความสัมพันธ์กับกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็ง [19] แต่ในทางตรงกันข้ามได้มีการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยแถบทวีปยุโรปพบว่าการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันออกไป (gene polymorphisms) ของยีน IL-8 (-251) ในลักษณะ T/A มักจะสัมพันธ์กับกลุ่มอาการอื่นๆ เช่น กระเพาะอาหารอักเสบ (gastritis) และ แผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ (peptic ulcer diseases) [20] จากรายงานการวิจัยในแถบเอเชียใต้พบว่าการเกิด gene polymorphisms ของยีน IL-8 (-251) กลับไม่พบความสัมพันธ์กับกลุ่มอาการใดๆของโรคกระเพาะอาหาร [21] ดังนั้นจึงมีการตั้งสมมุติฐานว่าการเกิด gene polymorphisms ในยีน IL-8 อาจมีความแตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละเชื้อชาติ ดังนั้นการศึกษา gene polymorphisms ในกลุ่มผู้ป่วยคนไทยซึ่งอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จะทำให้มีข้อมูลเพิ่มเติมที่มากยิ่งขึ้นเกี่ยวกับรูปแบบของยีน IL-8 ของผู้ป่วยในพื้นที่แถบนี้ ซึ่งสามารถนำผลการศึกษา มาเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีเชื้อชาติที่แตกต่างกันออกไป และอาจนำมาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาเป็นตัวทำนาย (predictive bio-marker) เพื่อจำแนกชนิดกลุ่มอาการต่างๆของโรคกระเพาะอาหารได้ต่อไปในอนาคต

การทำงานของไซโตไคน์ IL-8 เมื่อถูกสร้างขึ้น โมเลกุลของไซโตไคน์จะจับกับตัวรับ (receptors) อย่างจำเพาะ คือ IL-8 receptors (IL-8R) โดยมีโครงสร้างซึ่งประกอบไปด้วย CXCR1 (IL-8RA) และ CXCR2 (IL-8RB) [22] โดยตัวรับทั้งสองแบบนี้พบได้ทั่วไปบนผิวเซลล์ของเม็ดเลือดขาวหรือเซลล์เยื่อบุต่างๆ (epithelial cells) การทำงานโดยส่วนใหญ่ของตัวรับชนิดนี้มักเกี่ยวข้องกับการสร้าง antimicrobial peptides หรือแม้แต่การสร้าง เอนไซม์ super oxide dismutase ในเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่ม neutrophil [23] ได้มีการค้นพบว่าเชื้อ *H. pylori* สามารถกระตุ้นให้เซลล์เพาะเลี้ยง (AGS cell line) มีการสร้าง IL-8 receptors มากขึ้น จึงเป็นข้อมูลที่สนับสนุนได้ว่าการติดเชื้อ *H. pylori* มีความสัมพันธ์กับโมเลกุลตัวรับในกลุ่มนี้และอาจมีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเมื่อมีการติดเชื้อ *H. pylori* [24] สิ่งที่สำคัญอีกอย่างคือการจับกันระหว่างไซโตไคน์ IL-8 และ IL-8 receptor 2 (CXCR2) มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยมีการศึกษาว่าเซลล์ที่บกพร่องการสร้างโมเลกุล CXCR2 จะลดระดับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้เล็ก จึงแสดงให้เห็นว่าไซโตไคน์ IL-8 และ IL-8

receptors มีบทบาทที่สำคัญต่อการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง [25] การเกิด gene polymorphisms ในยีนกลุ่ม IL-8 receptors สามารถตรวจพบได้เช่นเดียวกันกับยีน IL-8 จากข้อมูลการศึกษาการเกิด gene polymorphisms ในยีน CXCR2 (C/T) บริเวณ exon (+1208) มีความสัมพันธ์และเชื่อมโยงกับการเกิดโรคนิดเรื้อรังเป็นจำนวนมาก [26, 27] โดยเฉพาะโรคมะเร็งเต้านม โรคหลอดเลือดตีบ โรคมะเร็งตับอ่อน และโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก [26, 28-30] แต่อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารและมะเร็งกระเพาะอาหาร ดังนั้นการศึกษารูปแบบยีนที่แตกต่างกันของ IL-8 receptors (CXCR1, CXCR2) ในกลุ่มโรคกระเพาะอาหาร อาจเป็นข้อมูลหนึ่งที่จะช่วยให้ทราบถึงกระบวนการเกิดโรคที่กระจ่างชัดมากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อมีการติดเชื้อแบคทีเรีย *H. pylori*

ดังนั้นโครงการวิจัยเรื่องนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาปัจจัยจากเชื้อแบคทีเรีย *H. pylori* (bacterial factors) ร่วมกับปัจจัยจากตัวผู้ป่วย (host factors) ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคกระเพาะอาหาร โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาถึงระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารผู้ป่วย โดยหาความสัมพันธ์ร่วมกับการตรวจพบยีน *oipA* (ในเชื้อ *H. pylori*) และการเกิด gene polymorphisms ของยีน IL-8 และ IL-8 receptors โดยการศึกษาทั้งปัจจัยจากแบคทีเรียและปัจจัยจากตัวผู้ป่วยจะเป็นข้อมูลที่จะช่วยให้ทราบถึงกระบวนการเกิดโรคกระเพาะอาหารอันมีผลมาจากการติดเชื้อ *H. pylori* ที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

2.3 วัตถุประสงค์การศึกษา

- เพื่อศึกษาอุบัติการณ์การพบยีน *oipA* และการเกิด gene polymorphisms ของยีน IL-8 และ IL-8 receptors ในตัวอย่างชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *H. pylori*
- ศึกษาอัตราการแสดงออกของยีน IL-8 ในตัวอย่างชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยที่มีการตรวจพบยีน *oipA* และการเกิด gene polymorphisms (IL-8, IL-8 receptors) ที่แตกต่างกัน
- หาความสัมพันธ์ของการพบยีน *oipA* และการเกิด gene polymorphisms (IL-8, IL-8 receptors) ร่วมกับอัตราการแสดงออกของยีน IL-8 ในกลุ่มอาการต่างๆของโรคกระเพาะอาหาร

2.4 วิธีการทดลอง

2.4.1 ผู้ป่วยและการเก็บตัวอย่าง

ดำเนินการเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่เข้ารับการส่องกล้องเพื่อตรวจวินิจฉัยของหน่วยอายุรศาสตร์ส่องกล้อง (Endoscopy Medicine) โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี การคัดกรองผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* จะทดสอบโดยการตัดชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารมาวางทดสอบการสร้างเอนไซม์ urease (Rapid Urease Test, RUT) ซึ่งเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูป หากพบการติดเชื้อ *H. pylori* ชุดทดสอบจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู แต่ถ้าไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori* ชุดทดสอบจะยังคงมีสีเหลืองอ่อนเหมือนเดิม เมื่อแพทย์ได้ดำเนินการตัดชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารและวินิจฉัยเสร็จสิ้นแล้ว ทางผู้วิจัยได้นำชุดทดสอบ RUT กลับมาดำเนินการวิจัยต่อที่ห้องปฏิบัติการโครงการจัดตั้งวิทยาเขตอำนาจเจริญ โดยผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการได้รับการชี้แจงวัตถุประสงค์ของโครงการ สิทธิของอาสาสมัคร และลงนามในเอกสารยินยอมเข้าร่วมโครงการ ซึ่งโครงการวิจัยเรื่องนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนชุดกลาง มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่รับรอง MU-CIRB 2016/157.0912

2.4.2 การสกัดดีเอ็นเอและการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทำการบดตัวอย่างชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารในน้ำยาสกัด (Lysis buffer) และดำเนินการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ น้ำยาชุดสกัดสำเร็จรูปซึ่งปฏิบัติตามขั้นตอนที่กำหนดไว้ (Invitrogen) และละลายดีเอ็นเอที่ตกตะกอนโดย TE buffer และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

ชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารที่ให้ผล RUT เป็นบวก ได้ถูกทดสอบยืนยันการติดเชื้อ *H. pylori* โดยการตรวจหา ยีน *16SrRNA* จากนั้นดำเนินการตรวจหา ยีน *oipA* และ *cagPAI* ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* (ไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 2) ในขั้นตอนการทำ PCR ได้ใช้น้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการตรวจหา ยีนทั้งสอง (OnePCR Ultra[®], Bio-Helix Co., LTD. Taiwan) โดยประกอบไปด้วย ไพรเมอร์ (primers) ความเข้มข้น $0.5\ \mu\text{M}$ ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ความเข้มข้น $100\ \text{ng}$ จากนั้นนำหลอดทดลองเข้าเครื่อง PCR (BioRad T100TM, USA) โดยมีสภาวะการทำ PCR ดังนี้ ยีน *16SrRNA*: 35 cycles; $30\ \text{sec} / 94^{\circ}\text{C}$, $30\ \text{sec} / 60^{\circ}\text{C}$, และ $30\ \text{sec} / 72^{\circ}\text{C}$; ยีน *cagPAI*: 35 cycles; $1\ \text{min} / 94^{\circ}\text{C}$, $1\ \text{min} / 57^{\circ}\text{C}$, and $1\ \text{min} / 72^{\circ}\text{C}$; และยีน

oipA: 35 cycles; 1 min / 94 °C, 1 min / 57 °C, and 1 min / 72 °C หลังจากนั้นตรวจสอบ PCR product โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (1.5% agarose gel electrophoresis) และถ่ายภาพภายใต้เครื่องฉายแถบสารพันธุกรรม (UV illuminator)

ตารางที่ 2 แสดงลำดับของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี PCR

Genes	Primer sequences	Product size (bp)
<i>H. pylori</i> 16SrRNA	5'-GCGACCTGCTGGAACATTAC-3' 5'-CGTTAGCTGCATTACTGGAGA-3'	120
<i>H. pylori oipA</i>	5'-GTTTTTGATGCATGGGATTT-3' 5'-GTGCATCTCTTATGGCTTT-3'	401
<i>H. pylori cagPAI</i>	5'-ACATTTTGGCTAAATAACGCTG-3' 5'-TCTCCATGTTGCCATTATGCT-3'	350

2.4.3 การตรวจสอบสถานะของยีน *oipA*

ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ให้ผลการตรวจพบยีน *oipA* ที่เป็นบวก จะถูกวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการทำ DNA sequencing จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจะถูกวิเคราะห์สถานะของยีนโดยเริ่มจากตำแหน่ง initiation site หรือ start codon (ATG) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เรื่อยไป หากตรวจพบว่ามี stop codon เกิดขึ้นบริเวณ signal-peptide coding region จะถือว่ายีน *oipA* นั้นมีสถานะไม่ทำงาน (status-off) แต่หากไม่พบ stop codon จะถือว่ายีน *oipA* นั้นมีสถานะทำงานได้ (status-on)

2.4.4 การศึกษา gene polymorphisms ของยีน IL-8 และ IL-8 receptors

ดำเนินการตรวจหารูปแบบยีนที่แตกต่างกัน (gene polymorphisms) ในยีน IL-8 บริเวณตำแหน่ง promoter region (-251 T/A) และตำแหน่ง intron (+781 C/T) โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) ซึ่งอ้างอิงจากข้อมูลงานวิจัยที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้ [19, 31] เริ่มจากการทำ PCR ของยีน IL-8 (-251) และ IL-8 (+781) จากนั้นนำ PCR product ของยีน IL-8 (-251) (size=108 bp)

มาทำการตัดด้วย restriction enzymes (MunI) ส่วนยีน IL-8 (+781) (size=203 bp) ทำการตัดด้วย restriction enzymes (EcoRI) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (5% agarose gel electrophoresis) และถ่ายภาพด้วยเครื่องฉายแถบสารพันธุกรรม (UV illuminator) ซึ่งขนาดชิ้นส่วนของการเกิด gene polymorphisms ได้ระบุไว้ในตารางที่ 3

ในส่วนของการศึกษา gene polymorphisms ของยีน IL-8 receptors (CXCR1 และ CXCR2) ทำการศึกษาโดยวิธี allele-specific primers-PCR (AP-PCR) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ส่วน forward ที่มีความแตกต่างกัน 2 เส้น เป็นตัวตรวจหาการเกิด gene polymorphisms โดยอ้างอิงจากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ [26, 32] ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

จากการศึกษา gene polymorphisms ของยีน IL-8 และ IL-8 receptors ได้ดำเนินการศึกษาในตัวอย่างผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารกลุ่มที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่พบการติดเชื้อ

ตารางที่ 3 แสดงลำดับไพรเมอร์ และการทำ PCR-RFLP และ AP-PCR ในยีน IL-8 และ IL-8 receptors

polymorphisms	Methods	Primer Sequences	Digestion Enzymes	PCR product sizes (bp)
IL-8 -251 T/A	PCR-RFLP	5'-TTCTAACACCTGCCACTCTAG-3' 5'-CTGAAGCTCCACAATTTGGTG-3'	<i>Mfe</i> I	TT=108 AA=76,32 TA=108,76,32
IL-8 +781 C/T	PCR-RFLP	5'-CTCTAACTCTTTATATAGGAATT-3' 5'-GATTGATTTTATCAACAGGCA-3'	<i>Eco</i> RI	CC=203 TT=180,23 CT=203,180,23
CXCR1+2608 G/C	AP-PCR	F: 5'-CCCAGGTGATCCAGGAGAG-3' F: 5'-CCCAGGTGATCCAGGAGAC-3' R: 5'-TCAGAGGGTTGGAAGAGACATT-3'	-	205
CXCR2+1208 C/T	AP-PCR	F: 5'-CCATTGTGGTCACAGGAAGT-3' F: 5'-CCATTGTGGTCACAGGAAGC-3' R: 5'-GTCTTGTGAATAAGCTGCTATGA-3'	-	627

2.4.5 การสกัด RNA และการศึกษาการแสดงออกของยีน IL-8 และ IL-1 β

ดำเนินการสกัด RNA จากชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารผู้ป่วย โดยใช้ชุดสกัด RNA สำเร็จรูปโดยใช้วิธีการตามข้อแนะนำของบริษัท (RiboZolTM, Amresco, VWR Company, USA) ตะกอน RNA ที่สกัดได้จะถูกละลายโดยใช้ น้ำบริสุทธิ์ (RNase-free distilled water) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

จากนั้นนำ RNA ที่สกัดได้เข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนเป็น cDNA โดยวิธี Reverse-Transcription โดยใช้ น้ำยาสำเร็จรูปและปรับสภาวะตามคำแนะนำของบริษัท (SuperScriptTM III Reverse Transcriptase Invitrogen) เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการนี้ ได้ดำเนินการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน IL-8 โดยการศึกษาครั้งนี้ ได้ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน IL-1 β เพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่มากขึ้น ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาอ้างอิง จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ [33, 34] ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดนี้ ได้ศึกษาโดยใช้วิธี quantitative RT-PCR (qRT-PCR) ซึ่งใช้น้ำยา SYBR Green (Roche Molecular Systems, Inc.) ร่วมกับการใช้เครื่อง ThermalCycler96[®] Real-time PCR (Roche Molecular Systems, Inc.) เป็นตัวตรวจวัดการแสดงออกของยีน โดยตั้งค่าสภาวะ PCR ดังนี้ initial denaturation at 95°C 10 min, 40 cycles of 95°C for 30 sec and 60°C for 30 sec ซึ่งระดับการแสดงออกของยีน IL-8 และ IL-1 β จะถูก normalize ด้วยค่าของระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม housekeeping gene (18S rRNA) โดยการแสดงออกของยีนได้วิเคราะห์โดยค่าความแตกต่างของ threshold cycle หรือค่า CT ($\Delta\Delta$ CT-method)

ตารางที่ 4 แสดงลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน IL-8 และ IL-1 β

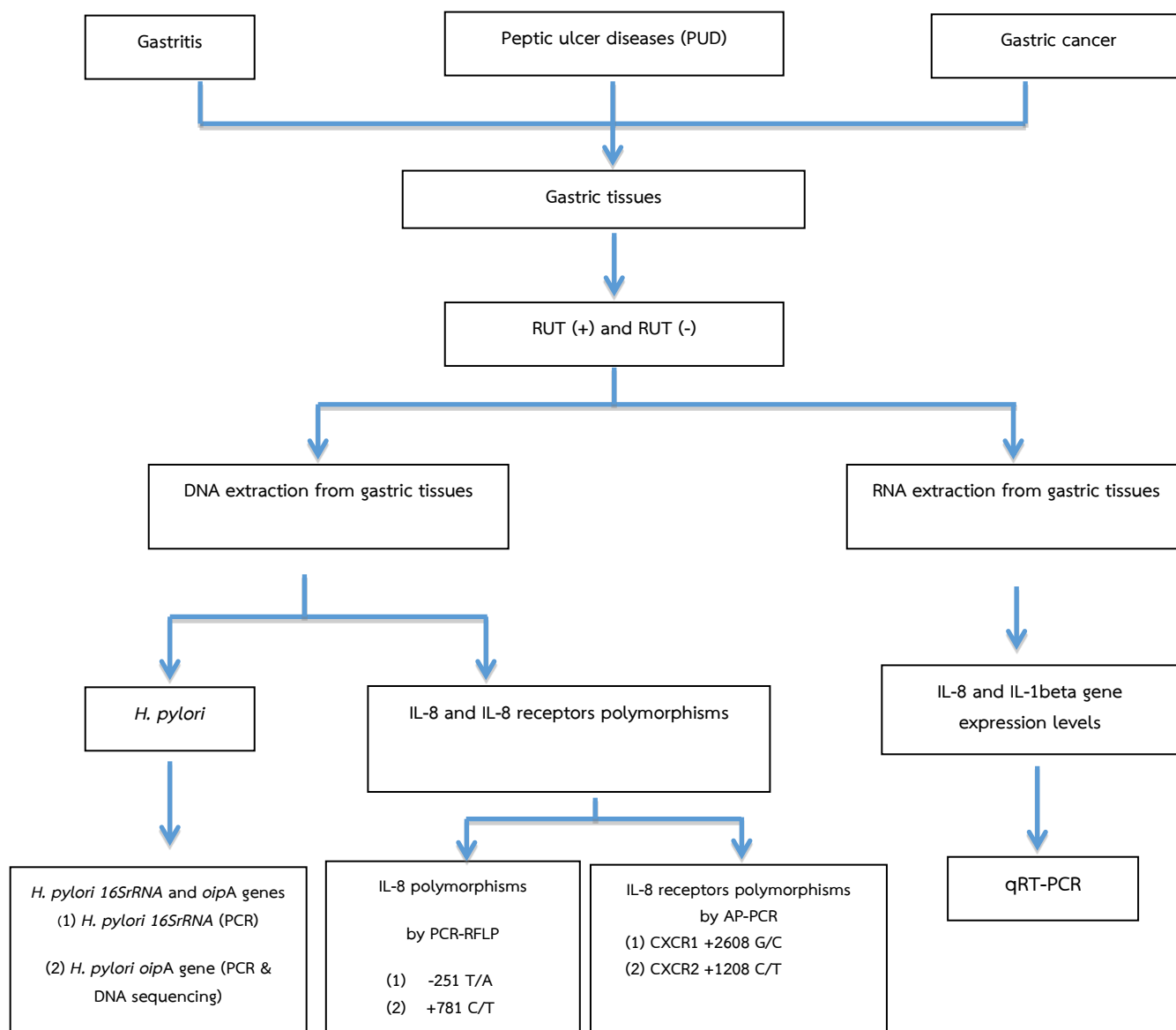
Genes	Primer Sequences
<i>IL-8</i>	5'-ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC-3' 5'-AACCCCTCTGCACCCAGTTTTTC-3'
<i>IL-1beta</i>	5'-GCACGATGCACCTGTACGAT-3' 5'-CACCAAGCTTTTTTGCTGTGAGT-3'
<i>18SrRNA</i>	5'-CGGCGACGACCCATTCGAAC-3' 5'-GAATCGAACCTGATTCCCCGTC-3'

2.4.6 การวิเคราะห์ผลและสถิติ

การศึกษาความสัมพันธ์ของอุบัติการณ์ของยีน *oipA* รวมถึงการเกิด gene polymorphisms ในยีน IL-8 และ IL-8 receptors ในกลุ่มอาการต่างๆของโรคกระเพาะอาหาร ได้วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ Chi-square test (χ^2) ส่วนระดับการแสดงออกของยีน IL-8 แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความแตกต่างกันของระดับการแสดงออกใช้สถิติ *t*-test เป็นตัววิเคราะห์ หากค่า *p*-value มีค่าน้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ

2.5 แผนการดำเนินงาน

ขั้นตอนการดำเนินงานได้สรุปภาพรวมไว้ flow chart ที่ 1 โดยกิจกรรมต่างๆในโครงการได้สรุปไว้ในตารางที่ 5



Flow chart 1 แสดงภาพรวมของการทดลองต่างๆในโครงการวิจัยเรื่องนี้

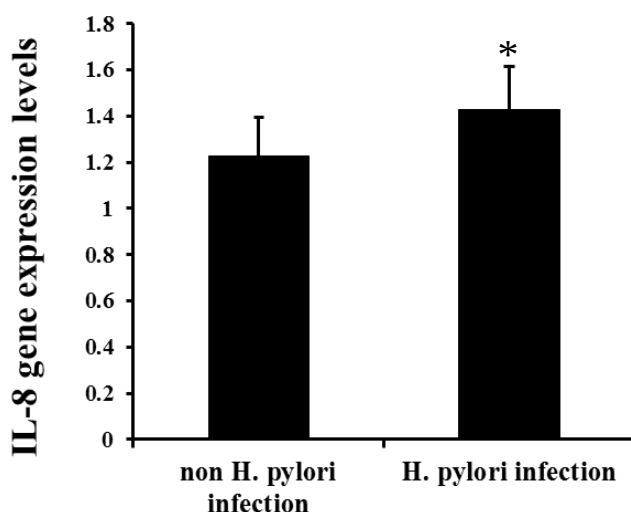
ตารางที่ 5 แสดงกิจกรรมต่างๆในโครงการวิจัยเรื่องนี้ภายในระยะเวลา 2 ปี

กิจกรรม	เดือนที่											
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1. การเก็บตัวอย่าง												
2. PCR detection of <i>H. pylori</i>												
3. PCR detection of <i>H. pylori</i> <i>oipA</i> and DNA sequencing												
4. การศึกษา gene polymorphisms of IL-8, CXCR1 and CXCR2												
5. การศึกษาระดับการแสดงออก ของยีน IL-8												
6. การวิเคราะห์ข้อมูล												
7. เขียน manuscript และตีพิมพ์												

3. ผลการทดลอง

3.1 ระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่มีการติดเชื้อ *H. pylori*

ผลจากการศึกษาพบว่าระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* (*H. pylori* infection) มีระดับการแสดงออกที่สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่ไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori* (non *H. pylori* infection) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 1 จากผลการทดลองบ่งชี้ได้ว่า การติดเชื้อ *H. pylori* ส่งผลให้ผู้ป่วยมีระดับการอักเสบที่สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่พบการติดเชื้อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

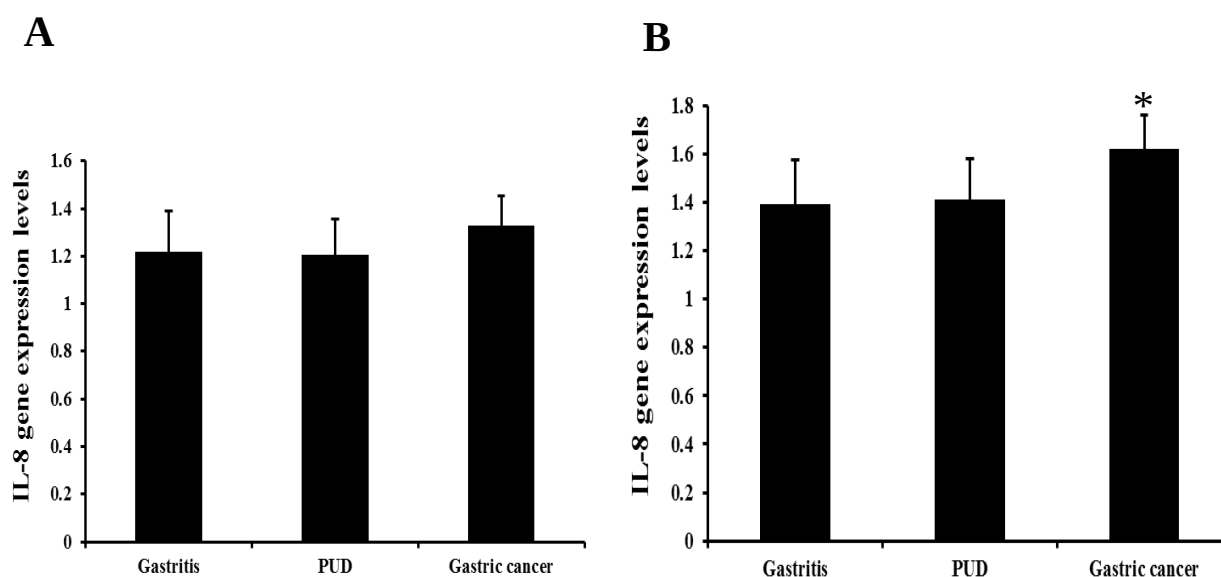


ภาพที่ 1 แสดงระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori* (non *H. pylori* infection) กับกลุ่มที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* (*H. pylori* infection)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างกลุ่มที่ไม่พบ/และพบการติดเชื้อ *H. pylori*

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ในกลุ่มอาการต่างๆของโรคกระเพาะอาหาร ได้แก่ gastritis, PUD และ gastric cancer (ภาพที่ 2) ผลการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori* (non *H. pylori* infection) พบว่าระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ทั้งสามกลุ่มอาการมีระดับไม่แตกต่างกันมากนัก แม้ว่าในกลุ่มผู้ป่วย gastric cancer จะมีระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ที่สูงขึ้นมาเล็กน้อย แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$)

ขณะที่ผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* (*H. pylori* infection) ระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ในกลุ่มอาการ gastritis และ PUD มีระดับที่ไม่แตกต่างกัน แต่กลุ่มอาการ gastric cancer นั้น มีระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ที่สูงกว่ากลุ่ม gastritis และ PUD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 2) หากเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่พบและไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori* จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* มีระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ที่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่พบการติดเชื้อ จึงบ่งชี้ได้ว่าการติดเชื้อ *H. pylori* อาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่จะช่วยใหเกิดการอักเสบที่สูงขึ้น และที่สำคัญการติดเชื้อ *H. pylori* อาจส่งเสริมให้เกิดการอักเสบที่รุนแรงในกลุ่มผู้ป่วย gastric cancer อย่างไรก็ตามผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าปัจจัยจากตัวผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารอาจมีความสัมพันธ์ร่วมกับการติดเชื้อ *H. pylori* ที่ชักนำให้เกิดการอักเสบที่รุนแรงขึ้น



ภาพที่ 2 แสดงระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ในกลุ่มอาการต่างๆของโรคกระเพาะอาหาร โดยแบ่งเป็น

(A) กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori* และ (B) กลุ่มผู้ป่วยที่พบการติดเชื้อ *H. pylori*

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง gastric cancer และ gastritis / PUD

3.2 การศึกษาอุบัติการณ์การตรวจพบยีน *oipA* ในเชื้อ *H. pylori*

จากการตรวจชิ้นเนื้อผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* สามารถตรวจพบยีน *oipA* ในผู้ป่วยกลุ่ม gastritis จำนวน 20 ราย (40%) ผู้ป่วยกลุ่ม PUD จำนวน 7 ราย (35%) แต่ไม่พบในกลุ่ม gastric cancer (0%) สรุปภาพรวมการตรวจพบยีน *oipA* ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่ติดเชื้อ *H. pylori* คิดเป็นร้อยละ 33.75 (ตารางที่ 6) ผู้วิจัยคาดว่ายีน *oipA* อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลุ่มอาการ gastritis และ PUD ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทยที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* จากนั้นได้ดำเนินการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *oipA* โดยวิธี DNA sequencing พบว่ายีน *oipA* ที่ตรวจพบโดยส่วนใหญ่มีสถานะของยีนเป็นแบบ function status-on คิดเป็นร้อยละ 96.30 ซึ่งหมายความว่ายีนมีสถานะการทำงานได้เป็นปกติสมบูรณ์ โดยมีเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น (3.7%) ที่พบสถานะของยีนเป็นแบบ function status-off (ตารางที่ 7) โดยตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งแบบ function on/off status ได้แสดงไว้ในตารางที่ 8

นอกเหนือจากนั้นผู้วิจัยได้ดำเนินการตรวจหายีน *cag* pathogenicity island (*cagPAI*) ซึ่งเป็นยีนอีกกลุ่มที่มีตำแหน่งยีนใกล้เคียงกับยีน *oipA* และเป็นยีนมีความสำคัญเกี่ยวกับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบในเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* จากการตรวจโดยวิธี PCR พบว่าสามารถตรวจพบยีน *cagPAI* ในผู้ป่วยกลุ่ม gastritis, PDU และ gastric cancer คิดเป็นร้อยละ 72, 85 และ 80 ตามลำดับ (ตารางที่ 6) โดยภาพรวมของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่ติดเชื้อ *H. pylori* ตรวจพบยีน *cagPAI* คิดเป็นร้อยละ 76.25 ซึ่งเป็นอัตราที่สูงกว่าการตรวจพบยีน *oipA* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการตรวจพบยีน *cagPAI* จะถูกนำมาศึกษาความสัมพันธ์กับการอักเสบร่วมกับยีน *oipA* ในการทดลองถัดไป

ตารางที่ 6 แสดงอุบัติการณ์การตรวจพบยีน *oipA*, *cagA* และ *cagPAI* ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทย

กลุ่มยีน	กลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> กลุ่มอาการต่างๆ			
	Gastritis (n=50)	Peptic ulcer diseases (n=20)	Gastric cancer (n=10)	Total (n=80)
<i>oipA</i>	20 (40%)	7 (35%)	0 (0%)	27 (33.75%)
<i>cagPAI</i>	36 (72%)	17 (85%)	8 (80%)	61 (76.25%)

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนและรูปแบบสถานะการทำงานของยีน *oipA* ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทย

กลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหาร ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> กลุ่มอาการต่างๆ	สถานะการทำงานของยีน <i>oipA</i>	
	Status-on	Status-off
Gastritis (n=20)	19 (95%)	1 (5%)
Peptic ulcer diseases (n=7)	7 (100%)	0 (0%)
Total (n=27)	26 (96.30%)	1 (3.70%)

ตารางที่ 8 แสดงตัวอย่างลำดับดีเอ็นเอของยีน *oipA* ในสถานะการทำงานต่างๆ

ตัวอย่าง	กลุ่ม	ลำดับดีเอ็นเอของยีน <i>oipA</i> บริเวณ signal peptide coding region	สถานะ
GT24	Gastritis	<u>ATG</u> AAAAAAGCCCTCTTACTCTCTCTCTTTCTCTCGTTTTGGCTCCCGCTGAAAGGAACGGA	on
PUD2	PUD	<u>ATG</u> AAAAAAACCCTTTTACTAACTCTCTTTTTCTCTCGTTTTGGCTCCACGCTGAAAGGAATGGAT	on
GT28	Gastritis	<u>ATG</u> AGAAACCATGAAAAAGCTCTCTTACTCTCTCTCTCTCTCTCGTTTTGGCTCCACGCT <u>TGA</u>	off

PUD = Peptic ulcer diseases, ATG = start codon, TGA = stop codon

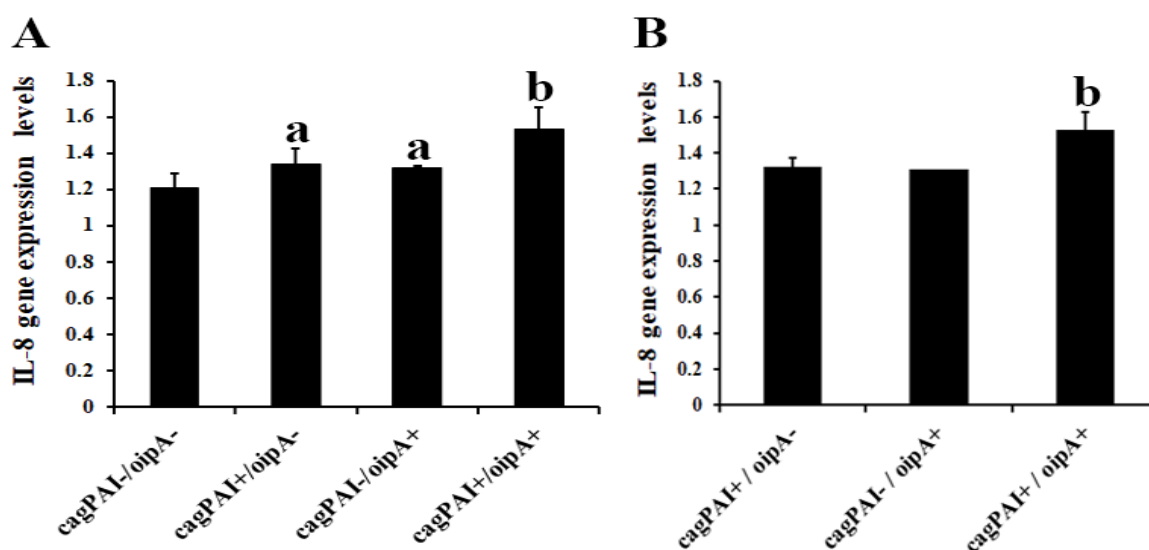
3.3 การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *cagPAI* และ *oipA* ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน IL-8

และ IL-1 β

เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของยีน *oipA* (ในเชื้อ *H. pylori*) ที่เชื่อมโยงกับการอักเสบในเซลล์กระเพาะอาหารผู้ป่วย ทางผู้วิจัยได้ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ร่วมกับการตรวจพบยีน *oipA* โดยใช้วิธี qRT-PCR โดยการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบผลร่วมกับการตรวจพบยีน *cagPAI* (ซึ่งเป็นยีนหลักของเชื้อ *H. pylori* ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ)

จากระดับการแสดงออกของยีน IL-8 พบว่าขึ้นเนื้อกระเพาะอาหารที่มีการตรวจพบยีน *cagPAI* (*cagPAI*+/ *oipA*-) /หรือยีน *oipA* (*cagPAI*-/ *oipA*+) เพียงยีนใดยีนหนึ่ง พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ที่สูงกว่าขึ้นเนื้อที่ตรวจไม่พบทั้งยีน *cagPAI* และ *oipA* (*cagPAI*-/ *oipA*-) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่สิ่งที่น่าสนใจคือตัวอย่างขึ้นเนื้อกระเพาะอาหารที่มีการตรวจพบทั้งยีน *cagPAI* ร่วมกับยีน *oipA* (*cagPAI*+/ *oipA*+) พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ที่สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับขึ้นเนื้อที่ตรวจพบเพียงยีน *cagPAI* (*cagPAI*+/ *oipA*-) /หรือ *oipA* (*cagPAI*-/ *oipA*+) /หรือไม่พบทั้ง 2 ยีน (*cagPAI*-/ *oipA*-) ดังแสดงในภาพที่ 3

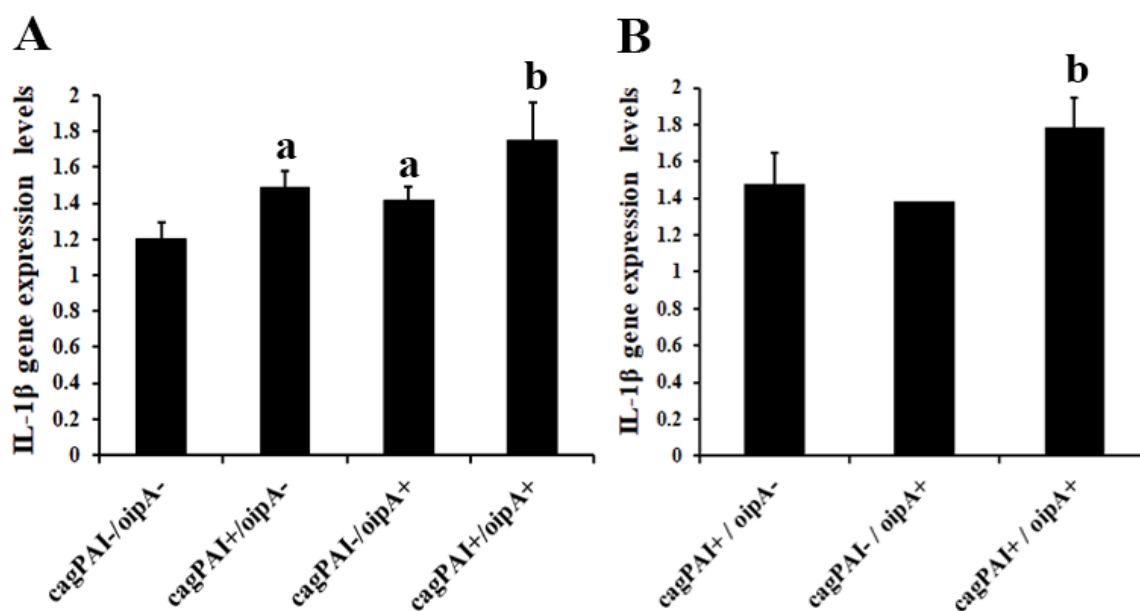
นอกจากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ทางผู้วิจัยได้ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน IL-1 β ร่วมด้วย เนื่องจากว่า IL-1 β เป็นกลุ่ม pro-inflammatory cytokine เช่นเดียวกับ IL-8 และมีความสำคัญในกระบวนการก่อโรคของเชื้อ *H. pylori* เช่นเดียวกัน จากการศึกษาพบว่าระดับการแสดงออกของยีน IL-1 β มีระดับการแสดงออกเช่นเดียวกันกับยีน IL-8 (ภาพที่ 4) ดังนั้นทางผู้วิจัยสรุปเบื้องต้นว่ายีน *oipA* ในเชื้อ *H. pylori* อาจมีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบเช่นเดียวกันกับยีน *cagPAI* และอาจทำงานร่วมกับยีน *cagPAI* ในกระบวนการชักนำการอักเสบ



ภาพที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ของยีน *cagPAI* และ *oipA* ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน IL-8 ในกลุ่มผู้ป่วย gastritis (A) และ PUD (B)

^a แสดงความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน IL-8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างชั้นเนื้อที่ตรวจพบยีน *cagPAI* /หรือ *oipA* เปรียบเทียบกับชั้นเนื้อที่ตรวจไม่พบทั้งยีน *cagPAI* และ *oipA* (*cagPAI-/oipA-*)

^b แสดงความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน IL-8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างชั้นเนื้อที่ตรวจพบทั้งยีน *cagPAI* และ *oipA* (*cagPAI+/oipA+*) เปรียบเทียบกับชั้นเนื้อที่ตรวจพบยีน *cagPAI* /หรือ *oipA* หรือไม่พบทั้ง 2 ยีน (*cagPAI-/oipA-*)



ภาพที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ของยีน *cagPAI* และ *oipA* ที่เกี่ยวข้องกับระดับการแสดงออกของยีน IL-1 β ในกลุ่มผู้ป่วย gastritis (A) และ PUD (B)

^a แสดงความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน IL-1 β อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างชิ้นเนื้อที่ตรวจพบยีน *cagPAI* /หรือ *oipA* เปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อที่ตรวจไม่พบทั้งยีน *cagPAI* และ *oipA* (*cagPAI*-/*oipA*-)

^b แสดงความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน IL-1 β อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างชิ้นเนื้อที่ตรวจพบทั้งยีน *cagPAI* และ *oipA* (*cagPAI*+/*oipA*+) เปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อที่ตรวจพบยีน *cagPAI* /หรือ *oipA* หรือไม่พบทั้ง 2 ยีน (*cagPAI*-/*oipA*-)

3.4 การศึกษารูปแบบของยีน IL-8 ตำแหน่ง +781 ร่วมกับการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน IL-8

จากการศึกษารูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 ตำแหน่ง +781 พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori* มีรูปแบบยีน IL-8 (+781) โดยส่วนใหญ่แบบ homozygous wild type (CC) ซึ่งมีจำนวนที่สูงกว่ารูปแบบ heterozygous (CT) และ homozygous mutant (TT) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 9

ขณะที่กลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* มีรูปแบบยีน IL-8 (+781) โดยส่วนใหญ่เป็นแบบ heterozygous (CT) ซึ่งมีจำนวนที่สูงกว่ารูปแบบอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 10

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 ตำแหน่ง +781 ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่พบ/และพบการติดเชื้อ *H. pylori* ทางผู้วิจัยพบว่ารูปแบบยีน homozygous wild type (CC) สัมพันธ์กับกลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่ไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori* ในขณะที่รูปแบบยีน heterozygous (CT) และ homozygous mutant (TT) สัมพันธ์กับกลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 9 แสดงการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 (+781) ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่ไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori*

IL-8 (+781) gene polymorphisms	กลุ่มอาการต่างๆของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทยที่ไม่พบการติดเชื้อ <i>H. pylori</i>			
	Gastritis (n=30)	PUD (n=10)	Gastric cancer (n=4)	Total (n=44)
CC	21 (70%)	7 (70%)	3 (75%)	31 (70.45%) ^{a, b}
TT	2 (6.67%)	1 (10%)	0 (0%)	3 (6.82%)
CT	7 (23.33%)	2 (20%)	1 (25%)	10 (22.73%)

^a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบ CC กับ TT [odds ratio = 32.5897 (95% confidence interval, 8.5397-124.3716), $\chi^2 = 34.94$, $p < 0.0001$]

^b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบ CC กับ CT [odds ratio = 8.1077 (95% confidence interval, 3.1125-21.1194), $\chi^2 = 18.27$, $p < 0.0001$]

ตารางที่ 10 แสดงการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 (+781) ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori*

IL-8 (+781) gene polymorphisms	กลุ่มอาการต่างๆของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทยที่พบการติดเชื้อ <i>H. pylori</i>			
	Gastritis (n=50)	PUD (n=20)	Gastric cancer (n=10)	Total (n=80)
CC	10 (20%)	0 (0%)	1 (10%)	11 (13.75%)
TT	14 (28%)	8 (40%)	4 (40%)	26 (32.50%) ^c
CT	26 (52%)	12 (60%)	5 (50%)	43 (53.75%) ^{a, b}

^a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบ CT กับ TT [odds ratio = 2.4137 (95% confidence interval, 1.2703-4.5864), $\chi^2 = 6.52$, $p = 0.0104$]

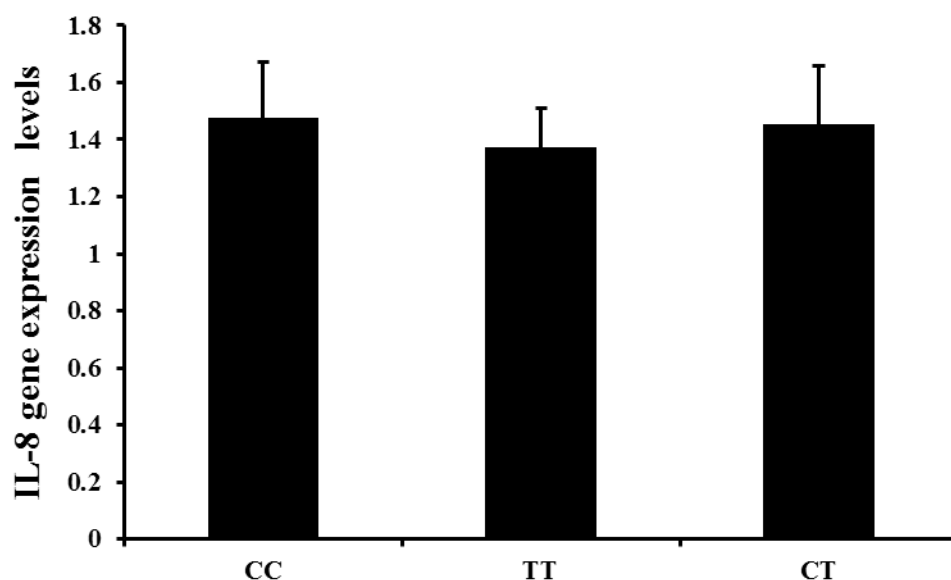
^b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบ CT กับ CC [odds ratio = 12.1197 (95% confidence interval, 4.9701-29.5543), $\chi^2 = 35.64$, $p < 0.0001$]

^c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบ TT กับ CC [odds ratio = 0.1992 (95% confidence interval, 0.0805-0.4927), $\chi^2 = 12.37$, $p = 0.000331$]

ตารางที่ 11 แสดงการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 (+781) ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ไม่พบ/และพบการติดเชื้อ *H. pylori*

IL-8 (+781) gene polymorphisms	ผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหาร		OR (95% CI)	p-value
	Non <i>H. pylori</i> infection n (%)	<i>H. pylori</i> infection n (%)		
CC	31 (70.45%)	11 (13.75%)	0.0669 (0.027-0.1657)	<0.0001
TT	3 (6.82%)	26 (32.50%)	6.5802 (1.8624-23.249)	0.001537
CT	10 (22.73%)	43 (53.75%)	3.9514 (1.7215-9.0694)	0.001147

จากนั้นผู้วิจัยได้ศึกษาการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 (+781) ร่วมกับการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* จากการศึกษาโดยใช้วิธี qRT-PCR พบว่าการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 (+781) ทั้ง 3 รูปแบบ มีระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ที่ไม่แตกต่างกัน บ่งชี้ได้ว่าการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 (+781) ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน IL-8 ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แสดงระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ที่พบในการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 (+781) ทั้งสามรูปแบบ ในชั้นเนื้อผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori*

3.5 การศึกษารูปแบบของยีน IL-8 ตำแหน่ง -251 ร่วมกับการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน IL-8

จากการศึกษาการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 ตำแหน่ง -251 พบว่ากลุ่มที่ไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori* มีรูปแบบยีน IL-8 (-251) โดยส่วนใหญ่เป็นแบบ homozygous wild type (TT) ซึ่งมีจำนวนที่สูงกว่ารูปแบบ heterozygous (TA) และ homozygous mutant (AA) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 12

ขณะที่กลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* มีการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 (-251) โดยส่วนใหญ่เป็นแบบ heterozygous (TA) ซึ่งมีจำนวนที่สูงกว่ารูปแบบอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 13 อีกทั้งยังพบว่ารูปแบบ homozygous mutant (AA) สัมพันธ์กับกลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหาร

เมื่อเปรียบเทียบการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 ตำแหน่ง -251 ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่พบ/และพบการติดเชื้อ *H. pylori* ทางผู้วิจัยพบว่ารูปแบบยีน homozygous wild type (TT) สัมพันธ์กับกลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่ไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori* ในขณะที่รูปแบบยีน heterozygous (TA) และ homozygous mutant (AA) สัมพันธ์กับกลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 12 แสดงการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 (-251) ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่ไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori*

IL-8 (-251) gene polymorphisms	กลุ่มอาการต่างๆของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทยที่ไม่พบการติดเชื้อ <i>H. pylori</i>			
	Gastritis (n=30)	PUD (n=10)	Gastric cancer (n=4)	Total (n=44)
TT	25 (83.33%)	6 (60%)	3 (75%)	34 (77.27%) ^{a,b}
AA	2 (6.67%)	1 (10%)	1 (25%)	4 (9.09%)
TA	3 (10%)	3 (30%)	0 (0%)	6 (13.64%)

^a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบ TT กับ AA [odds ratio = 34 (95% confidence interval, 9.776- 118.2488), $\chi^2 = 38.95$, $p < 0.0001$]

^b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบ TT กับ TA [odds ratio = 21.5333 (95% confidence interval, 7.0761- 65.5285), $\chi^2 = 33.41$, $p < 0.0001$]

ตารางที่ 13 แสดงการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 (-251) ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori*

IL-8 (-251) gene polymorphisms	กลุ่มอาการต่างๆของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทยที่พบการติดเชื้อ <i>H. pylori</i>			
	Gastritis (n=50)	PUD (n=20)	Gastric cancer (n=10)	Total (n=80)
TT	12 (24%)	6 (30%)	1 (10%)	19 (23.75%)
AA	7 (14%)	3 (15%)	8 (80%)	18 (22.50%)
TA	31 (62%)	11 (55%)	1 (10%)	43 (53.75%) ^{a,b}

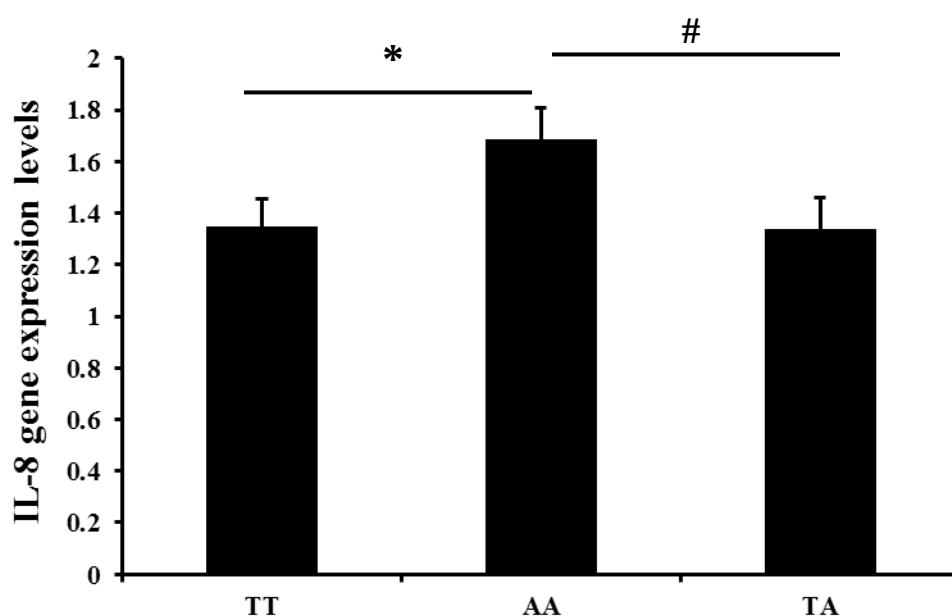
^a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบ TA กับ AA [odds ratio = 4.003 (95% confidence interval, 2.0189- 7.9371), $\chi^2 = 15.26$, $p = 0.00008$]

^b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบ TA กับ TT [odds ratio = 3.7312 (95% confidence interval, 1.8959- 7.3428), $\chi^2 = 13.93$, $p = 0.00019$]

ตารางที่ 14 แสดงการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 (-251) ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ไม่พบ/และพบการติดเชื้อ *H. pylori*

IL-8 (-251) gene polymorphisms	ผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหาร		OR (95% CI)	p-value
	Non <i>H. pylori</i> infection n (%)	<i>H. pylori</i> infection n (%)		
TT	34 (81.82%)	19 (23.75%)	0.0916 (0.0383-0.2193)	<0.0001
AA	4 (2.27%)	18 (22.50%)	2.9032 (0.9156-9.2061)	0.104204
TA	6 (22.73%)	43 (53.75%)	7.3604 (2.7994-19.3524)	0.0000166

จากนั้นผู้วิจัยได้ศึกษาการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 (-251) ร่วมกับการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* จากการศึกษาโดยใช้วิธี qRT-PCR พบว่ารูปแบบยีน IL-8 (-251) ประเภท homozygous mutant (AA) มีความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกที่สูงของยีน IL-8 ซึ่งสูงกว่ารูปแบบประเภท homozygous wild type (TT) และ heterozygous (TA) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 6) บ่งชี้ได้การเกิดรูปแบบยีนลักษณะแบบ homozygous mutant (AA) ของยีน IL-8 (-251) อาจเกี่ยวข้องกับการอักเสบที่รุนแรงและเชื่อมโยงกับการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร



ภาพที่ 6 แสดงระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ที่พบในรูปแบบยีน IL-8 (-251) ทั้งสามรูปแบบ ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori*

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่าง AA และ TT

แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่าง AA และ TA

3.6 การศึกษารูปแบบของยีน IL-8 receptor 1 (CXCR1) ตำแหน่ง +2608

จากการศึกษาการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 receptor 1 (CXCR1) ตำแหน่ง +2608 พบว่ากลุ่มที่ไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori* มีรูปแบบยีนโดยส่วนใหญ่เป็นแบบ homozygous wild type (GG) ซึ่งมีจำนวนที่สูงกว่ารูปแบบ heterozygous (GC) และ homozygous mutant (CC) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 15

เช่นเดียวกันกับกลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* มีการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 receptor 1 (CXCR1) ตำแหน่ง +2608 โดยส่วนใหญ่เป็นแบบ homozygous wild type (GG) ซึ่งมีจำนวนที่สูงกว่ารูปแบบ heterozygous (GC) และ homozygous mutant (CC) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 16

เมื่อเปรียบเทียบการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 receptor 1 (CXCR1) ตำแหน่ง +2608 ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่พบ/และพบการติดเชื้อ *H. pylori* ทางผู้วิจัยพบว่าผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีรูปแบบที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันแต่อย่างใด ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 15 แสดงการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 receptor 1 (CXCR1) +2608 ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่ไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori*

IL-8 receptor 1 +2608 polymorphisms	กลุ่มอาการต่างๆของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทยที่ไม่พบการติดเชื้อ <i>H. pylori</i>			
	Gastritis (n=30)	PUD (n=10)	Gastric cancer (n=4)	Total (n=44)
GG	26 (86.67%)	8 (80%)	4 (100%)	38 (86.36%) ^{a,b}
CC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
GC	4 (13.33%)	2 (20%)	0 (0%)	6 (13.64%)

^a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบ GG กับ CC [odds ratio = ∞ (95% confidence interval, ∞), $\chi^2 = 63.41$, $p<0.0001$]

^b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบ GG กับ GC [odds ratio = 40.1111 (95% confidence interval, 11.8696- 135.5478), $\chi^2 = 43.68$, $p<0.0001$]

ตารางที่ 16 แสดงการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 receptor 1 (CXCR1) +2608 ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori*

IL-8 receptor 1 +2608 polymorphisms	กลุ่มอาการต่างๆของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทยที่พบการติดเชื้อ <i>H. pylori</i>			
	Gastritis (n=50)	PUD (n=20)	Gastric cancer (n=10)	Total (n=80)
GG	45 (90%)	17 (85%)	10 (100%)	72 (90%) ^{a,b}
CC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
GC	5 (10%)	3 (15%)	0 (0%)	8 (10%)

^a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบ GG กับ CC [odds ratio = ∞ (95% confidence interval, ∞), $\chi^2 = 127.3$, $p < 0.0001$]

^b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบ GG กับ GC [odds ratio = 81 (95% confidence interval, 28.8306- 227.5704), $\chi^2 = 99.23$, $p < 0.0001$]

ตารางที่ 17 แสดงการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 receptor 1 (CXCR1) +2608 ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ไม่พบ/และพบการติดเชื้อ *H. pylori*

IL-8 receptor 1 +2608 polymorphisms	ผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหาร		OR (95% CI)	p-value
	Non <i>H. pylori</i> infection n (%)	<i>H. pylori</i> infection n (%)		
GG	38 (86.36%)	72 (90%)	1.4211 (0.4595-4.3952)	0.56299
CC	0 (0%)	0 (0%)	-	-
GC	6 (13.64%)	8 (10%)	0.7037 (0.2275-2.1765)	0.56299

3.7 การศึกษารูปแบบของยีน IL-8 receptor 2 (CXCR2) ตำแหน่ง +1208

จากการศึกษาการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 receptor 2 (CXCR2) ตำแหน่ง +1208 พบว่ากลุ่มที่ไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori* มีรูปแบบยีนโดยส่วนใหญ่เป็นแบบ homozygous wild type (CC) ซึ่งมีจำนวนที่สูงกว่ารูปแบบ heterozygous (CT) และ homozygous mutant (TT) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 18

เช่นเดียวกันกับกลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* มีการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 receptor 2 (CXCR2) ตำแหน่ง +1208 โดยส่วนใหญ่เป็นแบบ homozygous wild type (CC) ซึ่งมีจำนวนที่สูงกว่ารูปแบบ heterozygous (CT) และ homozygous mutant (TT) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 19

เมื่อเปรียบเทียบการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 receptor 2 (CXCR2) ตำแหน่ง +1208 ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่พบ/และพบการติดเชื้อ *H. pylori* ทางผู้วิจัยพบว่าผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีรูปแบบที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันแต่อย่างใด ดังแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 18 แสดงการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 receptor 2 (CXCR2) +1208 ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่ไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori*

IL-8 receptor 2 +1208 polymorphisms	กลุ่มอาการต่างๆของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทยที่ไม่พบการติดเชื้อ <i>H. pylori</i>			
	Gastritis (n=30)	PUD (n=10)	Gastric cancer (n=4)	Total (n=44)
CC	28 (93.33%)	9 (90%)	3 (75%)	40 (86.36%) ^{a,b}
TT	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
CT	2 (6.67%)	1 (10%)	1 (25%)	4 (13.64%)

^a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบ CC กับ TT [odds ratio = ∞ (95% confidence interval, ∞), $\chi^2 = 69.71$, $p<0.0001$]

^b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบ GG กับ GC [odds ratio = 100 (95% confidence interval, 23.3733- 427.8382), $\chi^2 = 55.68$, $p<0.0001$]

ตารางที่ 19 แสดงการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 receptor 2 (CXCR2) +1208 ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori*

IL-8 receptor 2 +1208 polymorphisms	กลุ่มอาการต่างๆของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทยที่พบการติดเชื้อ <i>H. pylori</i>			
	Gastritis (n=50)	PUD (n=20)	Gastric cancer (n=10)	Total (n=80)
CC	46 (92%)	20 (100%)	10 (100%)	76 (95%) ^{a,b}
TT	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
CT	4 (8%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (5%)

^a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบ GG กับ CC [odds ratio = ∞ (95% confidence interval, ∞), $\chi^2 = 140.98$, $p < 0.0001$]

^b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบ GG กับ GC [odds ratio = 361 (95% confidence interval, 87.0902- 1496.3909), $\chi^2 = 126.03$, $p < 0.0001$]

ตารางที่ 20 แสดงการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 receptor 2 (CXCR2) +1208 ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ไม่พบ/และพบการติดเชื้อ *H. pylori*

IL-8 receptor 2 +1208 polymorphisms	ผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหาร		OR (95% CI)	p-value
	Non <i>H. pylori</i> infection n (%)	<i>H. pylori</i> infection n (%)		
CC	40 (86.36%)	76 (95%)	0.5263 (0.125-2.2166)	0.45257
TT	0 (0%)	0 (0%)	-	-
CT	4 (13.64%)	4 (5%)	1.9 (0.4511-8.002)	0.45257

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* มีโอกาสเกิดการอักเสบได้สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่ไม่พบการติดเชื้อ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ส่งผลให้มีการสร้างไซโตไคน์ IL-8 ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sanduleanu และคณะ ได้ศึกษาพบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรค

กระเพาะอาหารที่ไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori* ส่งผลให้มีระดับของไซโตไคน์กลุ่ม IL-1 β และ IL-8 ที่ต่ำกว่ากลุ่มที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* [35] เมื่อพิจารณาในกลุ่มผู้ป่วยที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* จำแนกตามกลุ่มอาการต่างๆ ได้แก่ ผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบ (gastritis) ผู้ป่วยแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ (PUD) และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric cancer) พบว่าการอักเสบเกิดขึ้นได้สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มผู้ป่วย gastric cancer ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าการติดเชื้อ *H. pylori* จะชักนำให้ผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารเกิดการอักเสบที่รุนแรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการอักเสบอาจชักนำให้ผู้ป่วยบางรายสามารถพัฒนาต่อไปเป็นมะเร็งกระเพาะอาหารได้ แต่อย่างไรก็ตามการอักเสบที่เกิดขึ้นสามารถเกิดได้จากปัจจัยหลายอย่าง ไม่ว่าจะเป็นปัจจัยจากแบคทีเรีย (bacterial factors) หรือปัจจัยจากตัวผู้ป่วย (host factors) ดังนั้นผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษาเพื่อค้นหาข้อมูลบางอย่างที่อาจเกี่ยวข้องกับการอักเสบ เพื่อทำให้ทราบถึงกระบวนการก่อโรคของเชื้อ *H. pylori* ให้เกิดความกระจ่างมากยิ่งขึ้น

ผู้วิจัยได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับยีน *oipA* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนกลุ่ม outer membrane protein จากการศึกษาพบว่ายีนกลุ่มนี้ทำหน้าที่ได้หลายอย่าง ไม่ว่าจะเป็นช่วยในการเกาะติดของแบคทีเรีย [12] รวมถึงการชักนำให้เซลล์เยื่อบุเกิดการอักเสบ [9] โดยคุณสมบัตินี้คล้ายคลึงกันกับยีน *cagPAI* ซึ่งเป็นอีกยีนที่มีความสำคัญในเชื้อ *H. pylori* ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและกระบวนการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร จากการตรวจขึ้นเนื้อผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหาร พบยีน *oipA* ในอัตราร้อยละ 33.75 ในขณะที่ยีน *cagPAI* ถูกพบได้สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ร้อยละ 76.25) โดยยีน *oipA* นั้นถูกพบว่ามีความสัมพันธ์กับกลุ่มอาการ gastritis และ PUD ซึ่งผลการทดลองที่ได้นั้นมีความแตกต่างจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่ายีน *oipA* มักจะสัมพันธ์กับกลุ่มอาการ PUD และ gastric cancer ในผู้ป่วยบางประเทศ อาจเนื่องมาจากความแตกต่างกันของเชื้อชาติและการกระจายตัวของเชื้อ *H. pylori* ที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละพื้นที่

จากการศึกษาของ Yamaoka ในปี ค.ศ. 2000 พบว่าตำแหน่งของยีน *oipA* อยู่ห่างจากตำแหน่งของยีน *cagPAI* ประมาณ 100 kb [9] จากคุณสมบัติการชักนำการอักเสบของยีน *oipA* และตำแหน่งที่อยู่ใกล้กันกับยีน *cagPAI* ทำให้ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่ายีนทั้งสองชนิดนี้อาจจะมีความสัมพันธ์หรือเกี่ยวข้องในการทำงานที่เชื่อมโยงกับการกระตุ้นการอักเสบในเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารของผู้ป่วย จึงได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *oipA* และ *cagPAI* ในการกระตุ้นหรือชักนำการแสดงออกของยีนกลุ่ม pro-inflammatory cytokine ซึ่งได้แก่ IL-1 β และ IL-8 โดยการสกัด RNA และวิเคราะห์โดยวิธี qRT-PCR ผลจากการศึกษาทำให้พบว่า ตัวอย่างชิ้นเนื้อ

ที่ตรวจพบยีน *cagPAI* /หรือยีน *oipA* (ยีนใดยีนหนึ่ง) มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีน IL-1 β และ IL-8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างขึ้นเนื้อที่ตรวจไม่พบยีนทั้งสอง (*cagPAI*-/ *oipA*-) ซึ่งเป็นสิ่งที่แสดงให้เห็นว่ายีน *oipA* อาจมีความเกี่ยวข้องในการชักนำให้เกิดการอักเสบในกระเพาะอาหารได้ เช่นเดียวกันกับยีน *cagPAI* แต่สิ่งที่น่าสนใจคือขึ้นเนื้อกระเพาะอาหารที่ตรวจพบทั้งยีน *cagPAI* ร่วมกับยีน *oipA* (*cagPAI*+/*oipA*+) มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกที่สูงมากยิ่งขึ้นของยีน IL-1 β และ IL-8 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างขึ้นเนื้อที่ตรวจพบเพียงยีน *cagPAI* /หรือ *oipA* /หรือตรวจไม่พบทั้งสองยีน จึงสรุปได้ว่ายีน *cagPAI* และ *oipA* อาจจะมีกลไกการทำงานร่วมกันเพื่อกระตุ้นให้เกิดการอักเสบในเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร เมื่อพิจารณาผลการศึกษาพบว่าผลการทดลองที่ได้นั้นมีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งได้ศึกษาในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยได้นำเสนอว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่ไม่พบการทำงานของยีน *oipA* (status-off) นั้นกระตุ้นให้เซลล์เพาะเลี้ยงกระเพาะอาหาร (AGS cell line) มีระดับการสร้างไซโตไคน์ IL-8 ที่ลดน้อยลง และที่สำคัญคือส่งผลให้ประสิทธิภาพการนำส่งโปรตีน CagA ไปยังเซลล์กระเพาะอาหารลดน้อยลงไปจากเดิมอย่างมีนัยสำคัญ จึงอาจจะเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ IL-8 ที่ลดน้อยลงจากเดิม [36] จึงอาจสรุปได้ว่ายีน *cagPAI* และ *oipA* อาจจะมีกลไกการทำงานร่วมกันเพื่อกระตุ้นให้เกิดการอักเสบในเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร

จากที่กล่าวมาข้างต้นคือผลจากปัจจัยจากแบคทีเรีย *H. pylori* (bacterial factors) ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหาร และในโครงการวิจัยเรื่องนี้ยังมุ่งเน้นศึกษาปัจจัยจากตัวผู้ป่วย (host factors) ที่มีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของการอักเสบ การเกิดรูปแบบของยีนที่แตกต่างกัน (gene polymorphisms) เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่มีผลต่อการดำเนินของโรค ทางผู้วิจัยได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับรูปแบบของยีน IL-8 เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบและการสร้างไซโตไคน์ IL-8 โดยการเกิด gene polymorphisms ของยีน IL-8 สามารถเกิดได้หลายตำแหน่งของยีน ไม่ว่าจะเป็นบริเวณ intron หรือแม้แต่ว่าบริเวณ promoter region ทางผู้วิจัยได้สนใจทั้งบริเวณ intron (+781) และ promoter region (-251) ภายในยีน IL-8 ซึ่งจากการศึกษาผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทยพบว่าบริเวณยีน IL-8 (+781) ในรูปแบบ heterozygous (CT) และ homozygous mutant (TT) มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อแบคทีเรีย *H. pylori* ($p < 0.05$) ในขณะที่รูปแบบ homozygous wild type (CC) จะพบในผู้ป่วยที่ไม่มีการติดเชื้อ *H. pylori* ($p < 0.05$) แต่ทางผู้วิจัยพบว่าการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันทั้งสาม

รูปแบบนั้นไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ($p>0.05$) บ่งชี้ได้ว่าการเกิดรูปแบบที่แตกต่างกันของยีน IL-8 บริเวณ intron +781 ไม่มีผลต่อการสร้างไซโตไคน์ IL-8 และการอักเสบแต่อย่างใด

เมื่อศึกษาถึงรูปแบบที่แตกต่างกันของยีน IL-8 บริเวณตำแหน่ง promoter region -251 พบว่าในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทย รูปแบบ homozygous wild type (TT) พบในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่ไม่มีการติดเชื้อ *H. pylori* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในทางตรงกันข้ามรูปแบบ heterozygous (TA) พบว่าสัมพันธ์กับการติดเชื้อ *H. pylori* ($p<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามรูปแบบ homozygous mutant (AA) ก็ตรวจพบในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *H. pylori* ด้วยเช่นกันแต่มีจำนวนที่ไม่มากนัก โดยพบว่ารูปแบบนี้ (AA) สัมพันธ์กับผู้ป่วยในกลุ่มมะเร็งกระเพาะอาหารเป็นส่วนใหญ่ (gastric cancer) ($p<0.05$) ผลจากการวิเคราะห์ร่วมกับการแสดงออกของยีน IL-8 พบว่าบริเวณ promoter region -251 รูปแบบ homozygous mutant (AA) จะสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน IL-8 ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) หากเปรียบเทียบกับอีกสองรูปแบบ จึงบ่งชี้ได้ว่าการเกิดรูปแบบ homozygous mutant (AA) บริเวณ promoter region -251 อาจส่งผลชักนำให้มีการสร้างไซโตไคน์ IL-8 และเกิดการอักเสบที่สูงขึ้นในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหาร โดยการอักเสบที่สูงขึ้นในรูปแบบนี้ (AA) อาจมีความเกี่ยวข้องกับการเป็นมะเร็งกระเพาะอาหารได้

นอกจากการศึกษาการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 แล้วนั้น การศึกษาครั้งนี้ยังตรวจหาการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 receptors 1 (CXCR1) และ 2 (CXCR2) โดยเป็นงานวิจัยเรื่องแรกที่ศึกษาในจีนเนื้อผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหาร แต่ผลจากการศึกษาพบว่าการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน CXCR1 และ CXCR2 โดยส่วนใหญ่มีรูปแบบ homozygous wild type ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันแต่อย่างใดระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่ไม่พบการติดเชื้อและกลุ่มที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* ดังนั้นผู้วิจัยจึงไม่ได้ทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบยีนของ CXCR1/CXCR2 ร่วมกับระดับการแสดงออกของยีน IL-8 จึงสรุปได้เพียงว่าการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน CXCR1 และ CXCR2 อาจไม่มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *H. pylori*

ดังนั้นการเกิดรูปแบบยีนที่แตกต่างกันของยีน IL-8 จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง จากการศึกษาในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทย ในบริเวณ intron (+781) และ promoter region (-251) บ่งชี้ได้ว่ารูปแบบ homozygous wild type มีความเกี่ยวข้องกับกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่พบการติดเชื้อ *H. pylori* โดยรูปแบบยีนชนิดนี้อาจ

ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน IL-8 จึงอาจส่งผลให้กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่พบมีการติดเชื้อ *H. pylori* มีการแสดงออกของยีน IL-8 ที่ไม่สูงมาก ในขณะที่รูปแบบ heterozygous และ homozygous mutant พบว่ามีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ *H. pylori* โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ promoter region (-251) การพบรูปแบบ homozygous mutant (AA) มีความเกี่ยวข้องกับระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ที่สูงที่สุดและสัมพันธ์กับกลุ่มมะเร็งกระเพาะอาหาร จึงสรุปได้ว่าบริเวณ promoter region (-251) ของยีน IL-8 อาจจะเป็นบริเวณที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการพยากรณ์โรคกระเพาะอาหารได้ต่อไป

ดังนั้น สรุปภาพรวมจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการอักเสบในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารสามารถเกิดจากปัจจัยต่างๆ ซึ่งรวมถึงปัจจัยจากตัวแบคทีเรีย (*H. pylori*) และปัจจัยจากตัวผู้ป่วย (gene polymorphisms) ปัจจัยจากตัวแบคทีเรียโดยส่วนใหญ่มาจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (virulence factors) ซึ่งหนึ่งในนั้นได้แก่ ยีน *oipA* ที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการอักเสบโดยส่งผลให้เกิดการสร้าง pro-inflammatory cytokine ในกลุ่ม IL-1 β และ IL-8 และสันนิษฐานว่ายีน *oipA* อาจมีกลไกทำงานร่วมกันกับยีน *cagPAI* ในการกระตุ้นการอักเสบ แต่นอกเหนือจากปัจจัยจากแบคทีเรียแล้ว ยังมีปัจจัยจากตัวผู้ป่วยที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ซึ่งพบว่าการเกิด gene polymorphisms บริเวณ promoter region ของยีน IL-8 (-251) มีผลต่อการอักเสบที่สูงขึ้นและพบความสัมพันธ์กับโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร ซึ่งอาจใช้บริเวณนี้เป็นตัวทำนายหรือพยากรณ์โรคในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาในผู้ป่วยคนไทย การศึกษาในผู้ป่วยที่มีเชื้อชาติที่แตกต่างกันออกไปควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำผลการศึกษามาเปรียบเทียบกันให้เกิดความกระจ่างชัดมากขึ้น

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมจากการศึกษาครั้งนี้ ทางผู้วิจัยเสนอว่ายีน *oipA* ที่พบในเชื้อ *H. pylori* มีความสัมพันธ์กับการอักเสบในชั้นเนื้อกระเพาะอาหารผู้ป่วย อาจจัดได้ว่ายีน *oipA* เป็นยีนกลุ่มที่มีความสำคัญในกระบวนการก่อโรคของเชื้อ *H. pylori* แต่อย่างไรก็ตาม หน้าทีและกลไกของยีน *oipA* ในกระบวนการก่อโรคและการกระตุ้นการอักเสบในวิถี (pathway) อื่นๆ ยังไม่ทราบถึงกลไกและหน้าที่ ยกตัวอย่างเช่น

1. หน้าทีของโปรตีน OipA ต่อการกระตุ้น pro-inflammatory cytokine ตัวอื่นๆ เช่น IL-6, IL-12, IL-18, Tumor necrosis factor (TNF), Interferon gamma (IFN-gamma) และ granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) ยังไม่ทราบกลไกและหน้าที่จึงควรมีการศึกษาครั้งต่อไป

2. การศึกษาโมเลกุลตัวรับบนผิวเซลล์ที่ติดเชื้อ (receptors) โดยเฉพาะกลุ่ม Toll-like receptors (TLRs) ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีน OipA ในการส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ในกลุ่ม pro-inflammatory cytokines) ยังไม่ทราบกลไกและหน้าที่จึงควรมีการศึกษาครั้งต่อไป

ดังนั้นผู้วิจัยมีความมุ่งหวังที่จะส่งเค้าโครงงานวิจัยในการศึกษาแบบต่อยอดเพื่อขอรับการพิจารณาจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) ในครั้งต่อไป โดยจะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับ กลไกระดับโมเลกุลของโปรตีน OipA ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ Toll-like receptors (TLRs) ในการกระตุ้น pro-inflammatory cytokine (IL-6, IL-12, IL-18, TNF, IFN-gamma, GM-CSF) ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระเพาะอาหาร (AGS cells) เพื่อที่จะทำให้ทราบถึงกลไกการกระตุ้นการอักเสบของโปรตีน OipA ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):449-90. doi: 10.1128/CMR.00054-05. PubMed PMID: 16847081; PubMed Central PMCID: PMC1539101.
2. Mitipat N, Siripermpool P, Jadwattanakul T, Chaunthongkum S. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with gastrointestinal symptoms in Chon Buri, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005;36(2):341-6. PubMed PMID: 15916039.
3. Miwa H, Go MF, Sato N. *H. pylori* and gastric cancer: the Asian enigma. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(5):1106-12. doi: 10.1111/j.1572-0241.2002.05663.x. PubMed PMID: 12014714.
4. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Megraud F, Pena S, Midolo P, Queiroz DM, et al. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 1999;116(4):823-30. PubMed PMID: 10092304.
5. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelmann H. Risk for gastric cancer in people with *CagA* positive or *CagA* negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 1997;40(3):297-301. PubMed PMID: 9135515; PubMed Central PMCID: PMC1027076.
6. Witherell HL, Hansen S, Jellum E, Orentreich N, Vogelmann JH, Parsonnet J. Risk for gastric lymphoma in persons with *CagA*⁺ and *CagA*⁻ *Helicobacter pylori* infection. *J Infect Dis.* 1997;176(6):1641-4. PubMed PMID: 9395383.
7. Azuma T. *Helicobacter pylori CagA* protein variation associated with gastric cancer in Asia. *J Gastroenterol.* 2004;39(2):97-103. doi: 10.1007/s00535-003-1279-4. PubMed PMID: 15069615.
8. Oleastro M, Menard A. The Role of *Helicobacter pylori* Outer Membrane Proteins in Adherence and Pathogenesis. *Biology (Basel).* 2013;2(3):1110-34. doi: 10.3390/biology2031110. PubMed PMID: 24833057; PubMed Central PMCID: PMC3960876.
9. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(13):7533-8. doi: 10.1073/pnas.130079797. PubMed PMID: 10852959; PubMed Central PMCID: PMC16580.
10. Markovska R, Boyanova L, Yordanov D, Gergova G, Mitov I. *Helicobacter pylori oipA* genetic diversity and its associations with both disease and *cagA*, *vacA* s, m, and i alleles among Bulgarian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;71(4):335-40. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.008. PubMed PMID: 21937185.
11. Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S, Haas R, Gutierrez O, et al. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut.* 2006;55(6):775-81. doi: 10.1136/gut.2005.083014. PubMed PMID: 16322107; PubMed Central PMCID: PMC1856239.

12. Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R, Kusters JG, Van Vliet AH, et al. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of hopH gene polymorphisms. *J Infect Dis.* 2006;194(10):1346-55. doi: 10.1086/508426. PubMed PMID: 17054063.
13. Ando T, Peek RM, Pride D, Levine SM, Takata T, Lee YC, et al. Polymorphisms of *Helicobacter pylori* HP0638 reflect geographic origin and correlate with cagA status. *J Clin Microbiol.* 2002;40(1):239-46. PubMed PMID: 11773122; PubMed Central PMCID: PMCPMC120108.
14. Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, Imanishi J, Kashima K, Graham DY. Relation between clinical presentation, *Helicobacter pylori* density, interleukin 1beta and 8 production, and cagA status. *Gut.* 1999;45(6):804-11. PubMed PMID: 10562576; PubMed Central PMCID: PMCPMC1727763.
15. Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Tanahashi T, Kashima K, et al. Chemokines in the gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 1998;42(5):609-17. PubMed PMID: 9659152; PubMed Central PMCID: PMCPMC1727111.
16. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):6735-41. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4843. PubMed PMID: 18980965.
17. Bidwell JL, Wood NA, Morse HR, Olomolaiye OO, Laundry GJ. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments, 1998. *Eur J Immunogenet.* 1998;25(2-3):83-265. PubMed PMID: 9615915.
18. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. *Genes Immun.* 2001;2(2):61-70. doi: 10.1038/sj.gene.6363733. PubMed PMID: 11393658.
19. Taguchi A, Ohmiya N, Shirai K, Mabuchi N, Itoh A, Hirooka Y, et al. Interleukin-8 promoter polymorphism increases the risk of atrophic gastritis and gastric cancer in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(11 Pt 1):2487-93. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0326. PubMed PMID: 16284368.
20. Hofner P, Gyulai Z, Kiss ZF, Tiszai A, Tiszlavicz L, Toth G, et al. Genetic polymorphisms of NOD1 and IL-8, but not polymorphisms of TLR4 genes, are associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer and gastritis. *Helicobacter.* 2007;12(2):124-31. doi: 10.1111/j.1523-5378.2007.00481.x. PubMed PMID: 17309748.
21. Qadri Q, Rasool R, Afroze D, Naqash S, Gulzar GM, Yousuf A, et al. Study of TLR4 and IL-8 gene polymorphisms in *H.pylori*-induced inflammation in gastric cancer in an ethnic Kashmiri population. *Immunol Invest.* 2014;43(4):324-36. doi: 10.3109/08820139.2013.854378. PubMed PMID: 24295404.

22. Morris SW, Nelson N, Valentine MB, Shapiro DN, Look AT, Kozlosky CJ, et al. Assignment of the genes encoding human interleukin-8 receptor types 1 and 2 and an interleukin-8 receptor pseudogene to chromosome 2q35. *Genomics*. 1992;14(3):685-91. PubMed PMID: 1427896.
23. Hammond ME, Lapointe GR, Feucht PH, Hilt S, Gallegos CA, Gordon CA, et al. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J Immunol*. 1995;155(3):1428-33. PubMed PMID: 7636208.
24. Backhed F, Torstensson E, Seguin D, Richter-Dahlfors A, Rokbi B. *Helicobacter pylori* infection induces interleukin-8 receptor expression in the human gastric epithelium. *Infect Immun*. 2003;71(6):3357-60. PubMed PMID: 12761119; PubMed Central PMCID: PMC155779.
25. Lee YS, Choi I, Ning Y, Kim NY, Khatchadourian V, Yang D, et al. Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in the tumour microenvironment promote colon cancer growth, progression and metastasis. *Br J Cancer*. 2012;106(11):1833-41. doi: 10.1038/bjc.2012.177. PubMed PMID: 22617157; PubMed Central PMCID: PMC3364111.
26. Renzoni E, Lympay P, Sestini P, Pantelidis P, Wells A, Black C, et al. Distribution of novel polymorphisms of the interleukin-8 and CXCR2 receptor 1 and 2 genes in systemic sclerosis and cryptogenic fibrosing alveolitis. *Arthritis Rheum*. 2000;43(7):1633-40. doi: 10.1002/1529-0131(200007)43:7<1633::AID-ANR29>3.0.CO;2-9. PubMed PMID: 10902769.
27. Barnes PJ. Genetics and pulmonary medicine. 9. Molecular genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1999;54(3):245-52. PubMed PMID: 10325902; PubMed Central PMCID: PMC1745439.
28. Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, Fekih M, Khairi H, Helal AN, et al. Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness. *BMC Cancer*. 2010;10:283. doi: 10.1186/1471-2407-10-283. PubMed PMID: 20540789; PubMed Central PMCID: PMC2895614.
29. Donahue TR, Hines OJ. CXCR2 and RET single nucleotide polymorphisms in pancreatic cancer. *World J Surg*. 2009;33(4):710-5. doi: 10.1007/s00268-008-9826-z. PubMed PMID: 19057948.
30. Yang HP, Woodson K, Taylor PR, Pietinen P, Albanes D, Virtamo J, et al. Genetic variation in interleukin 8 and its receptor genes and its influence on the risk and prognosis of prostate cancer among Finnish men in a large cancer prevention trial. *Eur J Cancer Prev*. 2006;15(3):249-53. doi: 10.1097/01.cej.0000199504.07947.e7. PubMed PMID: 16679868.
31. Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(3):671-6. doi: 10.1016/j.jaci.2004.06.038. PubMed PMID: 15356575.

32. Boyton RJ, Reynolds C, Wahid FN, Jones MG, Ozerovitch L, Ahmad T, et al. IFN gamma and CXCR-1 gene polymorphisms in idiopathic bronchiectasis. *Tissue Antigens*. 2006;68(4):325-30. doi: 10.1111/j.1399-0039.2006.00670.x. PubMed PMID: 17026468.
33. Tsai KW, Lai HT, Tsai TC, Wu YC, Yang YT, Chen KY, et al. Difference in the regulation of IL-8 expression induced by uropathogenic *E. coli* between two kinds of urinary tract epithelial cells. *J Biomed Sci*. 2009;16:91. doi: 10.1186/1423-0127-16-91. PubMed PMID: 19799797; PubMed Central PMCID: PMC2762471.
34. Bhat IA, Naykoo NA, Qasim I, Ganie FA, Yousuf Q, Bhat BA, et al. Association of interleukin 1 beta (IL-1beta) polymorphism with mRNA expression and risk of non small cell lung cancer. *Meta Gene*. 2014;2:123-33. doi: 10.1016/j.mgene.2013.12.002. PubMed PMID: 25606396; PubMed Central PMCID: PMC4287803.
35. Sanduleanu S, Jonkers D, De Bruine A, Hameeteman W, Stockbrugger RW. Double gastric infection with *Helicobacter pylori* and non-*Helicobacter pylori* bacteria during acid-suppressive therapy: increase of pro-inflammatory cytokines and development of atrophic gastritis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001;15(8):1163-75. PubMed PMID: 11472319.
36. Horridge DN, Begley AA, Kim J, Aravindan N, Fan K, Forsyth MH. Outer inflammatory protein a (OipA) of *Helicobacter pylori* is regulated by host cell contact and mediates CagA translocation and interleukin-8 response only in the presence of a functional cag pathogenicity island type IV secretion system. *Pathog Dis*. 2017;75(8). doi: 10.1093/femspd/ftx113. PubMed PMID: 29040466.

5. ภาคผนวก (Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.)

5.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

โครงการวิจัยนี้ได้ส่งผลงานวิจัยเข้าตีพิมพ์ในวารสารวิจัยนานาชาติ จำนวน 2 เรื่อง คือ

- Synergistic Effects of *Helicobacter pylori* Outer Inflammatory Protein A (*oipA*) and *cag* Pathogenicity Island (*cag* PAI) on Interleukin-1 β and Interleukin-8 Gene Expression Levels in Gastric Tissues of Thai Gastroduodenal Patients ซึ่งได้รับการตอบรับตีพิมพ์ (Accepted) ในวารสารนานาชาติของ *Journal of Pure and Applied Microbiology*, Volume 12, No.2 (2018) (ได้รับการตอบรับการตีพิมพ์เมื่อวันที่ 20 เมษายน 2561 และอยู่ระหว่างการรอ reprint) ซึ่งผู้วิจัยมีบทบาทใน manuscript เป็น first author และ corresponding author โดยรายละเอียดอยู่ในเอกสารแนบท้ายที่ 1

- โครงการวิจัยเรื่องนี้ ผู้วิจัยได้นำผลการศึกษาเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการต่างประเทศ (นักวิจัยที่ปรึกษาประเทศเกาหลีใต้) โดยผู้วิจัยมีบทบาทใน manuscript เป็น first author และ corresponding author ซึ่งได้ส่งผลงาน manuscript เรื่อง *Distinct genetic variation of Helicobacter pylori cagA, vacA, oipA, and sabA genes in Thai and Korean dyspeptic patients* เข้ารับการพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติของ *Journal Microbiology and Biotechnology Letters* (submitted ตั้งแต่วันที่ 6 กุมภาพันธ์ 2561) โดยขณะนี้อยู่ในขั้นตอน Editor's decision ซึ่งหากได้รับการตอบรับตีพิมพ์จะดำเนินการแจ้งต่อ สกว.ต่อไป โดยรายละเอียดอยู่ในเอกสารแนบท้ายที่ 2

เอกสารแนบท้ายที่ 1

เอกสารตอบรับการตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Pure and Applied Microbiology
Volume 12, No.02, 2018



Click here to enable desktop notifications for Mahidol University Mail. [Learn more](#) [Hide](#)

Mail ▾
16 of 3,133

COMPOSE

Inbox (1,328)
Starred
Sent Mail
Drafts (14)
[imap]Trash
Unwanted
More ▾

 Wongwarut ▾ +



No recent chats
[Start a new one](#)

Acceptance letter JPAM/5080/18
Inbox x

 Dr. M.N. Khan
to me ▾

Apr 20 (7 days ago) ☆

Dear Dr Boonyanugomol

With reference to your manuscript accepted for publication in **Journal of Pure and Applied Microbiology**, Vol. **12** No. **2 (2018)**, please find attached the acceptance letter cum bill.

The bank details for the transfer of publication charges are as follows:

Account: **JOURNAL OF PURE AND APPLIED MICROBIOLOGY**

Address: **54, Near Post Office, Thana Street, Shahjahanabad, Bhopal - 462 001 (India)**

Bank: **STATE BANK OF INDIA**

Branch: **SULTANIA ROAD, BHOPAL - 462 001, INDIA**

Account No.: **31837749425**

Swift Code: **SBI NINBB 802**

IFSC Code: **SBIN0000332**

You are requested to please send extra charges (10\$) for bank deduction so that we can receive here the exact amount.

Looking forward to hear from you soon.

Regards

Dr. M.N. Khan
Editor

เอกสารตอบรับการตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Pure and Applied Microbiology
Volume 12, No.02, 2018



BILL

Registered with Registrar of Newspapers in India, vide Regn. No. MPENG 00850/12/2007 ISSN 0973-7510

Journal of Pure & Applied Microbiology
An International Research Journal of Microbiology

Dr. M. N. Khan
Editor

Postal Address
54, Near Post Office, Thana Street,
Shahjahanabad, Bhopal - 462 001. INDIA.
Contact No.: +91-9893809167
E-mail : micro_drkhan@yahoo.com
www.microbiologyjournal.org

S.No. **JPAM/5080/18**
M/s. Received on **20/02/2018**

Dear Dr. **Wongwarut Boonyanugomol**
.....
Department of Sciences and Liberal Arts,
.....
Mahidol University, Amnat Charoen Campus,
.....
Amnat Charoen, 37000, Thailand.
.....

(A) Your manuscript **Synergistic Effects of Helicobacter pylori Outer**
.....
Inflammatory Protein A (oipA) and cag Pathogenicity Island
.....
(cag PAI) on Interleukin-1? and Interleukin-8 Gene
.....
Levels in Gastric Tissues of Thai Gastroduodenal Patients
.....

has been accepted for publication in **JOURNAL OF PURE & APPLIED MICROBIOLOGY** Vol. **12**
No. **02** 20 **18**.....

(B) To expedite the process of publication please send your subscription charges and of your co-authors
subscription charges **Kamolchanok Rukseree, Prasit Palittapongarnpim,**
.....
Worarat Kongkasem and Seung-Chul Baik
.....

(C) Please send at your earliest A CROSSED BANK DRAFT OF **US\$ 500**..... Drawn in
favour of **JOURNAL OF PURE & APPLIED MICROBIOLOGY , BHOPAL** failing which the paper may
not be included in the coming issue.

Annual Subscription	:	US\$	Nil
Printing Charges	:	US\$	500
Color Printing Charges	:	US\$	
Cost of Reprints	:	US\$	Free
Air mail/postal charges	:	US\$	Nil

Total **US\$ 500**
.....
Five Hundred Only
.....
0..... Reprints will be supplied free of cost.

Dated **19-04-2018**.....

For : Executive Editor/Publisher

Synergistic Effects of *Helicobacter pylori* Outer Inflammatory Protein A (*oipA*) and *cag* Pathogenicity Island (*cag* PAI) on Interleukin-1 β and Interleukin-8 Gene Expression Levels in Gastric Tissues of Thai Gastroduodenal Patients

Wongwarut Boonyanugomol¹*, Kamolchanok Rukseree¹, Prasit Palittapongarnpim², Worrarat Kongkasem³, Seung-Chul Baik⁴

¹ Department of Sciences and Liberal Arts, Mahidol University, Amnat Charoen Campus, Amnat Charoen, 37000, Thailand.

² Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand.

³ Unit of Endoscopy Medicine, Supprasittiprasong Hospital, Ubon Ratchathani, 30000, Thailand.

⁴ Department of Microbiology, Gyeongsang National Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University School of Medicine, Jinju, Korea.

Corresponding author

Wongwarut Boonyanugomol, Department of Sciences and Liberal Arts, Mahidol University, Amnat Charoen Campus, Amnat Charoen, 37000, Thailand.

E-mail: wongwarut.boo@mahidol.edu

Tel/Fax: +66 45 523211

Running head: IL-1 β AND IL-8 EXPRESSION BY OIPA AND CAG-PAI

24 **ABSTRACT**

25 *Helicobacter pylori* outer inflammatory protein A (OipA) has been found to associate
26 with inflammation that is similar to *cag* pathogenicity island (*cag*PAI). However, the roles of the
27 presence of *oipA* gene involving inflammatory responses *in vivo* need to be clarified. We
28 investigated the association of *oipA* and *cag*PAI on the expression of pro-inflammatory cytokine
29 genes (*IL-1 β* and *IL-8*) in gastric tissues of Thai gastroduodenal patients. We detected the *oipA*
30 and *cag*PAI genes in 35.56% and 77.78%, respectively. The *oipA* “on” status was mostly found
31 (93.75%) in *oipA*-positive samples. We observed higher levels of *IL-1 β* and *IL-8* gene
32 expression in *oipA*-positive tissues (with “on” status), similar to those with *cag*PAI-positive
33 tissues. Interestingly, samples positive for both *oipA* and *cag*PAI genes showed significantly
34 higher levels of *IL-1 β* and *IL-8* gene expression, when compared with tissues single-positive for
35 either *oipA* or *cag*PAI, or double-negative for these two genes. We conclude that *H. pylori*
36 induces *IL-1 β* and *IL-8* gene expression via *oipA*-dependent mechanisms. Furthermore, synergy
37 in the presence of both *oipA* and *cag*PAI genes associated with increased *IL-1 β* and *IL-8* gene
38 expression levels in gastric tissues, which suggested that *oipA* plays a critical role in the *H.*
39 *pylori* pathogenesis.

40

41 **Keywords** *H. pylori*, *oipA*, *cag* PAI, *IL-1 β* , *IL-8*, inflammation

47

48 **INTRODUCTION**

49 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a Gram-negative microaerophilic bacterium and a
50 causative agent in various gastroduodenal diseases in humans. The association between *H. pylori*
51 infection and gastric cancer led to its classification as a class I carcinogen ¹. Infection with this
52 bacterium has been found to stimulate of various pro-inflammatory cytokines from gastric cells
53 such as interleukin-1 (IL-1), IL-6 and IL-8, that is play important roles in gastric inflammation ².
54 The most important *H. pylori* virulence factor is the *cag* pathogenicity island (*cagPAI*) which
55 encodes a type 4 secretory system (T4SS) and immunodominant antigen of CagA. Strains
56 expressing the *cagPAI* have been associated with a more severe inflammatory response than that
57 induced by *cagPAI*-negative strains. *H. pylori* has been reported to depend upon both T4SS- and
58 CagA-dependent mechanisms to induce IL-8 production in gastric cells, resulting in increased
59 inflammation ^{3,4}. It has also been shown that studies of gastric biopsies from patients infected
60 with *H. pylori* *cag*-positive strains induce significantly more IL-1 α and IL-1 β than do *cag*-
61 negative strains ⁵. Therefore, several studies have suggested that the *H. pylori* *cagPAI* is a
62 putative marker for virulent strains of *H. pylori* that are associated with severe gastroduodenal
63 diseases, especially gastric adenocarcinoma ^{6,7}. Interestingly, however, some IL-1 β and IL-8
64 responses have also been found to be independent of the *cagPAI* mechanisms ^{8,9}. Therefore, we
65 speculated that several *H. pylori* virulence factors may be involved together in promoting
66 inflammation and disease severity.

67 Bacterial adherence to gastric epithelial cells is a critical step in *H. pylori* pathogenesis.
68 *H. pylori* contains a large family of outer membrane proteins (OMPs), comprising 32 members
69 involved in adhesion, immunostimulatory fuctions and micropore formation ^{10,11}. The outer

inflammatory protein A (OipA), or HopH, encodes one of the outer membrane proteins, with the *oipA* gene located approximately 100 kb from the *cag* PAI in the *H. pylori* genome¹². Aside from promoting bacterial adherence to gastric epithelial cells, OipA (status “on”) increases inflammatory responses by inducing IL-8 production and regulating its secretion through the PI3/Akt pathway in these cells¹³. Using purified OipA protein was shown to cause cell cytotoxicity and apoptotic cell death by modulation of Bax/Bcl-2 levels in the AGS human gastric epithelial cell line, indicating that *H. pylori* OipA may play a pathogenic role by damaging host cells^{14,15}. However, previous studies on the role of OipA-induced inflammation have been reported and revealed that mutagenesis of the *H. pylori oipA* gene did not alter IL-8 production in gastric cells *in vitro* nor in animal model studies^{16,17}. Currently, the effect of *H. pylori* OipA on inflammatory responses of IL-8 is still controversial, in particular its role *in vivo*. Additionally, the association of OipA with the expression of IL-1 β has not yet been examined. We hypothesized that *H. pylori* OipA may associate with pro-inflammatory responses by regulating the expression of IL-1 β and IL-8 in the human gastric cells *in vivo*. To investigate this question, the purpose of the current study was to determine the association between the *oipA* and *cagPAI* gene status of *H. pylori* infections with *IL-1 β* and *IL-8* gene expression levels in the gastric tissue samples from Thai subjects with gastroduodenal disease (gastritis and peptic ulcer disease).

88

89 MATERIALS AND METHODS

90

91 Patients and Sample Collection

Gastric tissues were obtained from subjects undergoing gastroduodenal examination at the unit of endoscopy medicine, Supprasittiprasong Hospital, Ubon Ratchathani, Thailand. *H. pylori* infection status of the subjects was determined by the Rapid Urease Test kit (RUT). A total of 45 gastric tissues were collected for this study from subjects with confirmed gastritis (GT=35) and peptic ulcer disease (PUD=10). Ethic committee approval was received for this study from The Institutional Review Board of Mahidol University (MU-CIRB2016/157.0912). Written inform consent was obtained from patients who participated in this study.

Genomic DNA Extraction and PCR

Genomic DNA was extracted from RUT positive gastric tissues using DNA purification kits (RBC Real Genome, RBCBioscience), according to the manufacturer's protocol. Isolated DNA was solubilized by Tris-EDTA (TE) buffer and kept at -20°C until polymerase chain reaction (PCR) was performed.

PCR was used to detect *H. pylori* using primers specific for *16SrRNA*, *oipA*, and *cagPAI*. All primer sequences were selected from published data with slight modifications, as shown in Table 1¹⁸⁻²⁰. The PCR were prepared in a volume of 25 µl using a ready-to-use PCR master mix (OnePCR Ultra®, Bio-Helix Co., LTD. Taiwan), containing 0.5 µM of each primer. PCR amplifications were performed in an automated thermal cycler (BioRad T100™, USA) with the following cycle conditions: *16SrRNA*: 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 60 °C, and 30 s at 72 °C; *cagPAI*: 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 57 °C, and 1 min at 72 °C; and *oipA*: 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 57 °C, and 1 min at 72 °C. PCR products were analyzed on 1.5% agarose gels and visualized under a UV illuminator. *H. pylori oipA* amplicons were subsequently

114 sequenced to determine their functional status by observing the stop codons of a signal-peptide
 115 coding region ¹².

116

117 **RNA Extraction and mRNA Quantification**

118 Total RNA was extracted from RUT positive tissues using RiboZol™ (Amresco, VWR
 119 Company, USA), according to the manufacturer's protocol. RNA pellets were solubilized with
 120 RNase-free distilled water. The RNA yield and quality were measured by spectrophotometer.
 121 RNA (1 µg) was reverse transcribed using SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen),
 122 as described by the manufacturer. *IL-1β* and *IL-8* gene expression were quantified by the SYBR
 123 Green assay on a ThermalCycler96® Real-time PCR (Roche Molecular Systems, Inc.) with an
 124 initial denaturation at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s and 60°C for 30 sec, and
 125 normalized to *18SrRNA*. The primer sequences for *IL-1β*, *IL-8* and *18SrRNA* genes are listed in
 126 Table 1 ^{21,22}. Gene expression levels were quantified using the $\Delta\Delta CT$ -method.

127

128 **Data Analysis**

129 All data were performed using GraphPad Prism software (version 5.0) and significance
 130 evaluated with the Student's *t*-test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

131

132 **RESULTS**

133 As shown in table 2, 45 RUT positive samples were confirmed to harbor *H. pylori*
 134 infection by PCR amplification. A 401-bp PCR product, indicating the presence of the *oipA*
 135 gene, was obtained in 16 (35.56%) of these subjects. No significant differences between the
 136 gastritis and PUD were detected. Subsequently, the *oipA* functional status (“on” / “off”) was

137 determined by PCR-based sequencing. We found that in 15 of 16 (93.75%) subjects, the *oipA*
 138 status was “on”.

139 The *cagPAI*-positive samples was found 77.78% (35/45) of gastric tissues of Thai
 140 gastroduodenal subjects (Table 2). The vital components of *cagPAI*, *cagA* and *cagE*, were also
 141 found in the *cagPAI* positive samples (data not shown). There were no significant differences
 142 between the gastritis and PUD. The frequency distributions of the combined genotypes of *H.*
 143 *pylori cagPAI* and *oipA* in the 45 samples of Thai subjects are presented in table 3. We clustered
 144 a total 4 different *cagPAI* / *oipA* genotype combinations, out of which the most prevalent
 145 genotypes was *cagPAI*⁺ / *oipA*⁻, but the genotype of *cagPAI*⁻/*oipA*⁻ was not found in PUD.

146 In order to study the association of *H. pylori oipA* and *cagPAI* genes with inflammatory
 147 responses, we determined *IL-1β* and *IL-8* gene expression levels in the gastric tissues of Thai
 148 subjects with gastroduodenal disease. As shown in fig. 1 and 2, *IL-1β* and *IL-8* gene expression
 149 levels in samples containing single-positive gene status of *cagPAI* (*cagPAI*⁺/*oipA*⁻) were
 150 significantly higher than in those containing double-negative genes (*cagPAI*⁻/*oipA*⁻) (*p*<0.05).
 151 Similarly, samples containing single-positive *oipA* gene status (*cagPAI*⁻/*oipA*⁺) were found to
 152 have significantly increased *IL-1β* and *IL-8* gene expression levels when compared with those
 153 with a double-negative gene status (*cagPAI*⁻/*oipA*⁻) (*p*<0.05), however, the levels were slightly
 154 lower than for the *cagPAI*⁺ samples (*cagPAI*⁺/*oipA*⁻). Our study, only one sample carrying *oipA*-
 155 functional “off” status was combined with the *cagPAI*-negative samples that showed the
 156 decreasing of *IL-1β* and *IL-8* gene expression. Interestingly, we found that samples with double-
 157 positive gene status for *oipA* and *cagPAI* (*cagPAI*⁺/*oipA*⁺), had higher *IL-1β* and *IL-8* levels
 158 compared with single-positive and double-negative samples. These results were consistent for
 159 subjects with gastritis and PUD.

160

161 **DISCUSSION**

162 *H. pylori* has been shown to stimulate the production of various pro-inflammatory
 163 cytokines from gastric epithelial cells ²³. IL-1 β is a pro-inflammatory cytokine that has been
 164 involved in pain, inflammation and autoimmune condition ²⁴. The biological effects of IL-1 β is
 165 involved to induce expression of many cytokine genes by either initiating their transcription or
 166 stabilizing their mRNA, including tumor necrosis factor α (TNF- α), IL-2, IL-6, IL-12, interferon
 167 α , β , and γ , granulocyte-colony stimulating factor and macrophage-colony stimulating factor ²⁵.
 168 The *in vitro* study revealed that *H. pylori* *cagA* and *cagE* mutant strains showed a marked
 169 decrease in the induction of IL-1 β production of human peripheral blood mononuclear cells. It
 170 was suggested that the components of *cagPAI* more frequently associated with the production of
 171 IL-1 β ²⁶, especially *H. pylori* requires the expression of *cagE* for the full induction of IL-1, IL-
 172 12, and TNF- α in the immature dendritic cells ²⁷. However, the molecular mechanisms of *H.*
 173 *pylori* lipopolysaccharide (LPS) and vacuolating cytotoxin A (VacA) induced IL-1 β have been
 174 determined ^{9,28}. Thus, based on the previous data, we assumed that other components of *H. pylori*
 175 might be associated with the production of IL-1 β .

176 IL-8 is also a pro-inflammatory cytokine and is well known to be a chemoattractant for
 177 neutrophils and an activator of macrophages that plays important role in pro-inflammatory
 178 responses. This chemokine is also associated with cell proliferation, migration and survival of
 179 endothelial cells, thereby potentiating the epithelial-mesenchymal transition and survival of
 180 cancer cells, required for cancer progression ²⁹. IL-8 has been found to play a dominant role in
 181 gastric epithelial cells exposed to *H. pylori* infection and in pathological processes leading to
 182 gastroduodenal disease ³⁰. It was shown that *H. pylori* can also stimulate gastric epithelial cells

183 to produce IL-8 through a CagA-dependent mechanism. In addition to the CagA protein,
 184 bacterial cell wall components, such as peptidoglycan and heptose-1,7-bisphosphate, are also
 185 translocated via the T4SS into host epithelial cells and recognized by the nucleotide-binding
 186 oligomerization domain receptor (NOD) and the TRAF-interacting protein with forkhead-
 187 associated domain (TIFA), respectively, to induce NF- κ B activation and up-regulation of pro-
 188 inflammatory immune responses^{31,32}. Although previous studies reported that *H. pylori* *cagPAI*
 189 mutant strains induced reduced levels of IL-8 secretion *in vitro*, other *H. pylori* components may
 190 also be involved³³. This suggests that although the *cagPAI* may promote clinical disease, other
 191 factors important for *H. pylori* pathogenicity remain to be investigated³⁴.

192 Approximately 4% of the *H. pylori* genome is composed of genes encoding OMPs.
 193 Among them, OipA has emerged as another virulence factor involved in promoting PUD and
 194 gastric cancer¹². Previous *in vitro* study showed that IL-8 production was significantly reduced
 195 in epithelial cells stimulated with *H. pylori* *oipA* mutant strains on a *cag*-positive background,
 196 indicating the important role of OipA in IL-8 production¹². Conversely, OipA-positive strains on
 197 a *cag*-negative background, did not induce higher IL-8 amounts than OipA-negative strains.
 198 These results suggest that the OipA protein alone is not able to stimulate IL-8 secretion in AGS
 199 cells, but that OipA expression seems to support Cag-induced cytokine secretion³⁵. However,
 200 the effect of OipA on IL-8 secretion *in vitro* might not be sufficient to explain the exact role of
 201 OipA under physiological conditions *in vivo*. Additionally, the association of OipA on the
 202 expression of IL-1 β has not been extensively studied. Thus, we evaluated the association of the
 203 *oipA* gene, in the presence or absence of the *cagPAI*, on *IL-1 β* and *IL-8* gene expression levels in
 204 gastric tissues of subjects with gastroduodenal disease. We found that *IL-1 β* and *IL-8* gene
 205 expression levels in gastric tissues was dependent on the *cagPAI* gene (*cagPAI*⁺/*oipA*⁻). We also

found that tissue samples positive for the *oipA* gene (*cagPAI/oipA*⁺) also exhibited higher levels of *IL-1 β* and *IL-8* gene expression, when compared with those double-negative for the *oipA* and *cagPAI* genes. Our data indicated that increasing levels of *IL-1 β* and *IL-8* gene expression might be associated with the *oipA* gene. Additionally, the highest levels of *IL-1 β* and *IL-8* gene expression were found in the tissue samples that were positive for both *oipA* and *cagPAI*, when compared to single-positive gene and double-negative genes of *oipA* and/or *cagPAI*. It is possible that the association of *oipA* and *cagPAI* might be associated with heightened levels of *IL-1 β* and *IL-8* gene expression in gastric tissues. The results of the present study are consistent with the findings of previous *in vitro* study which showed that *H. pylori oipA* mutant bacteria displayed reduced levels of cell adherence and induced less IL-8 secretion in the AGS cell line. Furthermore, these mutant bacteria were unable to translocate CagA into gastric epithelial cells³⁶. Taken together, these data suggest that *H. pylori* OipA might involve in bacterial adherence leading to *IL-1 β* and *IL-8* production through direct signaling and that, moreover, this OMP might co-operate with the *cagPAI* to induce inflammation.

220

221 CONCLUSIONS

Our study investigate that *H. pylori oipA* gene associates with increased IL-1 β expression in gastric tissues of subjects with gastroduodenal disease, as well as IL-8 expression. Our findings conclude that *IL-1 β* and *IL-8* gene expression levels were dependent on the *H. pylori oipA* gene. In addition, synergistic effects of *oipA* combined with *cagPAI* have been found to associate with increased levels of *IL-1 β* and *IL-8* gene expression. These data suggest that OipA might be an important *H. pylori* virulence factor associated with inflammation. However, the molecular mechanisms of *oipA*-induced *IL-1 β* expression should be further determined.

229

230 **ACKNOWLEDGEMENTS**

231

232 This study was supported by the grant of Thailand research Fund (MRG5980069). We
 233 kindly thank the staff at Endoscopy Medicine, Sapprasittiprasong Hospital, for gastric tissue
 234 collection. We acknowledge Dr. Richard L. Ferrero (Hudson Institute of Medical Research) for
 235 review and English editing. Finally, we would like to thank Central Laboratory, Amnat Charoen
 236 Campus, Mahidol University, for the instruments used in this study.

237

238 **REFERENCES**

- 239 1. NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus
 240 Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. *JAMA*
 241 1994;**272**(1):65-69.
- 242 2. Noach LA, Bosma NB, Jansen J, Hoek FJ, van Deventer SJ, Tytgat GN. Mucosal tumor
 243 necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with
 244 *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 1994;**29**(5):425-429.
- 245 3. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection.
 246 *Clin Microbiol Rev* 2006;**19**(3):449-490.
- 247 4. Tegtmeyer N, Lind J, Schmid B, Backert S. *Helicobacter pylori* CagL Y58/E59 mutation
 248 turns-off type IV secretion-dependent delivery of CagA into host cells. *PLoS One*
 249 2014;**9**(6):e97782.

- 250 5. Peek RM, Jr., Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Zhao X, Atherton JC, *et al.*
 251 Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to *cagA*⁺
 252 *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest* 1995;**73**(6):760-770.
- 253 6. Figura N, Guglielmetti P, Rossolini A, Barberi A, Cusi G, Musmanno RA, *et al.*
 254 Cytotoxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic
 255 ulcers and from patients with chronic gastritis only. *J Clin Microbiol* 1989;**27**(1):225-
 256 226.
- 257 7. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, *et al.*
 258 Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an
 259 increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*
 260 1995;**55**(10):2111-2115.
- 261 8. Beswick EJ, Bland DA, Suarez G, Barrera CA, Fan X, Reyes VE. *Helicobacter pylori*
 262 binds to CD74 on gastric epithelial cells and stimulates interleukin-8 production. *Infect*
 263 *Immun* 2005;**73**(5):2736-2743.
- 264 9. Luo JJ, Li CY, Liu S, Yu W, Tang SY, Cai HL, *et al.* Overexpression of *Helicobacter*
 265 *pylori* VacA N-terminal fragment induces proinflammatory cytokine expression and
 266 apoptosis in human monocytic cell line through activation of NF-kappaB. *Can J*
 267 *Microbiol* 2013;**59**(8):523-533.
- 268 10. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, *et al.* The
 269 complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*
 270 1997;**388**(6642):539-547.

- 271 11. Alm RA, Bina J, Andrews BM, Doig P, Hancock RE, Trust TJ. Comparative genomics of
 272 *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. *Infect Immun*
 273 2000;**68**(7):4155-4168.
- 274 12. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane
 275 protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**(13):7533-7538.
- 276 13. Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori*-associated regulation of
 277 forkhead transcription factors FoxO1/3a in human gastric cells. *Helicobacter*
 278 2012;**17**(3):193-202.
- 279 14. Teymournejad O, Mobarez AM, Hassan ZM, Noori S, Moazzeni SM, Khoramabadi N.
 280 Cloning, Expression, Purification and Toxicity Evaluation of *Helicobacter pylori* Outer
 281 Inflammatory Protein A. *Indian J Microbiol* 2013;**53**(4):391-394.
- 282 15. Teymournejad O, Mobarez AM, Hassan ZM, Talebi Bezmin Abadi A. Binding of the
 283 *Helicobacter pylori* OipA causes apoptosis of host cells via modulation of Bax/Bcl-2
 284 levels. *Sci Rep* 2017;**7**(1):8036.
- 285 16. Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R, Kusters JG, Van Vliet AH, *et al.*
 286 *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional
 287 genomic analysis of hopH gene polymorphisms. *J Infect Dis* 2006;**194**(10):1346-1355.
- 288 17. Franco AT, Johnston E, Krishna U, Yamaoka Y, Israel DA, Nagy TA, *et al.* Regulation
 289 of gastric carcinogenesis by **Helicobacter pylori** virulence factors. *Cancer Res*
 290 2008;**68**(2):379-87.
- 291 18. Gramley WA, Asghar A, Frierson HF, Jr., Powell SM. Detection of *Helicobacter pylori*
 292 DNA in fecal samples from infected individuals. *J Clin Microbiol* 1999;**37**(7):2236-2240.

- 293 19. Kauser F, Hussain MA, Ahmed I, Ahmad N, Habeeb A, Khan AA, *et al.* Comparing
 294 genomes of *Helicobacter pylori* strains from the high-altitude desert of Ladakh, India. *J*
 295 *Clin Microbiol* 2005;**43**(4):1538-1545.
- 296 20. Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, *et al.*
 297 Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*
 298 1998;**28**(1):37-53.
- 299 21. Tsai KW, Lai HT, Tsai TC, Wu YC, Yang YT, Chen KY, *et al.* Difference in the
 300 regulation of IL-8 expression induced by uropathogenic *E. coli* between two kinds of
 301 urinary tract epithelial cells. *J Biomed Sci* 2009;**16**:91.
- 302 22. Bhat IA, Naykoo NA, Qasim I, Ganie FA, Yousuf Q, Bhat BA, *et al.* Association of
 303 interleukin 1 beta (IL-1beta) polymorphism with mRNA expression and risk of non small
 304 cell lung cancer. *Meta Gene* 2014;**2**:123-133.
- 305 23. Maekawa T, Kinoshita Y, Matsushima Y, Okada A, Fukui H, Waki S, *et al.* *Helicobacter*
 306 *pylori* induces proinflammatory cytokines and major histocompatibility complex class II
 307 antigen in mouse gastric epithelial cells. *J Lab Clin Med* 1997;**130**(4):442-449.
- 308 24. Ren K, Torres R. Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *Brain Res Rev*
 309 2009;**60**(1):57-64.
- 310 25. El-Omar EM. The importance of interleukin 1beta in *Helicobacter pylori* associated
 311 disease. *Gut* 2001;**48**(6):743-747.
- 312 26. Khamri W, Walker MM, Clark P, Atherton JC, Thursz MR, Bamford KB, *et al.*
 313 *Helicobacter pylori* stimulates dendritic cells to induce interleukin-17 expression from
 314 CD4⁺ T lymphocytes. *Infect Immun* 2010;**78**(2):845-853.

- 315 27. Galgani M, Busiello I, Censini S, Zappacosta S, Racioppi L, Zarrilli R. *Helicobacter*
 316 *pylori* induces apoptosis of human monocytes but not monocyte-derived dendritic cells:
 317 role of the *cag* pathogenicity island. *Infect Immun* 2004;**72**(8):4480-4485.
- 318 28. Basak C, Pathak SK, Bhattacharyya A, Mandal D, Pathak S, Kundu M. NF-kappaB- and
 319 C/EBPbeta-driven interleukin-1beta gene expression and PAK1-mediated caspase-1
 320 activation play essential roles in interleukin-1beta release from *Helicobacter pylori*
 321 lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Biol Chem* 2005;**280**(6):4279-4288.
- 322 29. Yuan A, Chen JJ, Yao PL, Yang PC. The role of interleukin-8 in cancer cells and
 323 microenvironment interaction. *Front Biosci* 2005;**10**:853-865.
- 324 30. Crabtree JE, Wyatt JJ, Trejdosiewicz LK, Peichl P, Nichols PH, Ramsay N, *et al.*
 325 Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic
 326 gastroduodenal mucosa. *J Clin Pathol* 1994;**47**(1):61-66.
- 327 31. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, *et al.* Nod1 responds
 328 to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island. *Nat*
 329 *Immunol* 2004;**5**(11):1166-1174.
- 330 32. Stein SC, Faber E, Bats SH, Murillo T, Speidel Y, Coombs N, *et al.* *Helicobacter pylori*
 331 modulates host cell responses by CagT4SS-dependent translocation of an intermediate
 332 metabolite of LPS inner core heptose biosynthesis. *PLoS Pathog* 2017;**13**(7):e1006514.
- 333 33. Boonyanugomol W, Chomvarin C, Hahnvajjanawong C, Sripa B, Kaparakis-Liaskos M,
 334 Ferrero RL. *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island (*cagPAI*) involved in bacterial
 335 internalization and IL-8 induced responses via NOD1- and MyD88-dependent
 336 mechanisms in human biliary epithelial cells. *PLoS One* 2013;**8**(10):e77358.

- 337 34. Jenks PJ, Megraud F, Labigne A. Clinical outcome after infection with *Helicobacter*
338 *pylori* does not appear to be reliably predicted by the presence of any of the genes of the
339 *cag* pathogenicity island. *Gut* 1998;**43**(6):752-758.
- 340 35. Odenbreit S, Swoboda K, Barwig I, Ruhl S, Boren T, Koletzko S, *et al.* Outer membrane
341 protein expression profile in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Infect Immun*
342 2009;**77**(9):3782-3790.
- 343 36. Horridge DN, Begley AA, Kim J, Aravindan N, Fan K, Forsyth MH. Outer inflammatory
344 protein a (OipA) of *Helicobacter pylori* is regulated by host cell contact and mediates
345 CagA translocation and interleukin-8 response only in the presence of a functional *cag*
346 pathogenicity island type IV secretion system. *Pathog Dis* 2017;**75**(8).

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360 **TABLE 1** Primers used in the study.

Genes	Primer sequences
<i>16SrRNA</i>	F: GCGACCTGCTGGAACATTAC R: CGTTAGCTGCATTACTGGAGA
<i>oipA</i>	F: GTTTTGTGATGCATGGGATTT R: GTGCATCTCTTATGGCTTT
<i>cagPAI</i>	F: ACATTTTGGCTAAATAAACGCTG R: TCTCCATGTTGCCATTATGCT
<i>IL-1β</i>	F: GCACGATGCACCTGTACGAT R: CACCAAGCTTTTTTGCTGTGAGT
<i>IL-8</i>	F: ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC R: AACCTCTGCACCCAGTTTTC
<i>18SrRNA</i>	F: CGGCGACGACCCATTCGAAC R: GAATCGAACCCTGATTCCCCGTC

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372 **TABLE 2** The prevalence of *oipA* and *cagPAI* genes in Thai subjects with gastroduodenal
 373 disease

Genes	Patient groups		Total (n=45)
	Gastritis	PUD	
	(n=35)	(n=10)	
<i>oipA</i> ⁺	13 (37.14%)	3 (30%)	16 (35.56%)
<i>oipA</i> ⁺ status on	12 (92.31%)	3 (100%)	15 (93.75%)
<i>cag PAI</i> ⁺	22 (62.86%)	9 (90%)	35 (77.78%)

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

TABLE 3 Distribution of *H. pylori* *cagPAI* and *oipA* combined genotypes in Thai subjects with gastroduodenal disease

Gene combinations	Patient groups		Total (n=45)
	Gastritis (n=35)	PUD (n=10)	
<i>cagPAI</i> ⁻ / <i>oipA</i> ⁻	10 (28.57%)	0 (0%)	10 (22.22%)
<i>cagPAI</i> ⁺ / <i>oipA</i> ⁻	12 (34.29%)	7 (70%)	19 (42.22%)
<i>cagPAI</i> ⁻ / <i>oipA</i> ⁺	3 (8.57%)	1 (10%)	4 (8.89%)
<i>cagPAI</i> ⁺ / <i>oipA</i> ⁺	10 (28.57%)	2 (20%)	12 (26.67%)

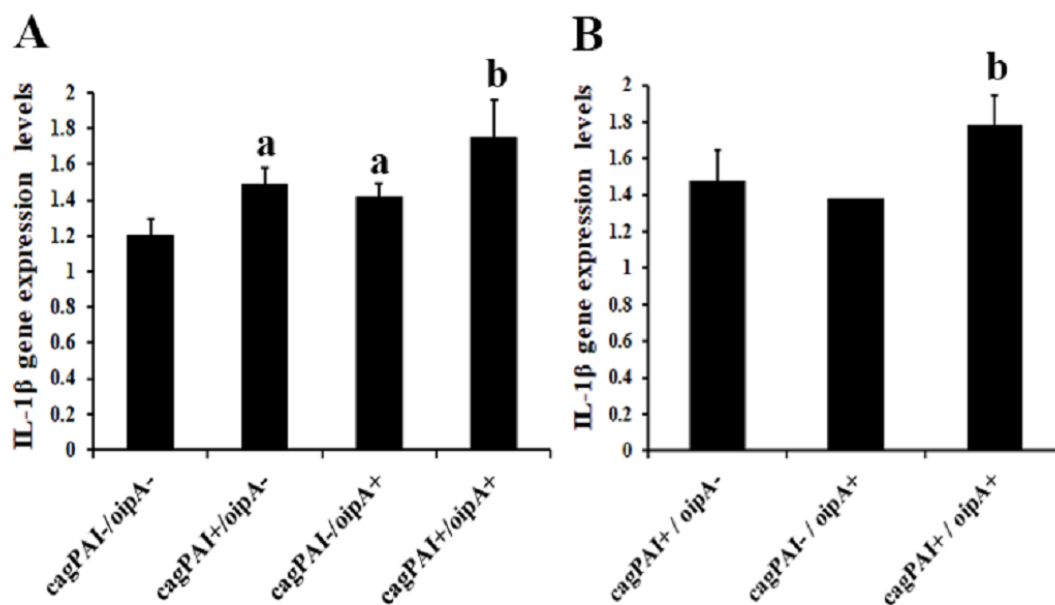


Fig. 1 *IL-1 β* gene expression levels in the presence/absence of *oipA* and *cagPAI* genes in gastric tissues of subjects with gastritis (A) and PUD (B).

^a significant differences when compared with double-negative *cagPAI* / *oipA* gene status ($p < 0.05$).

^b significant differences when compared with single-positive *oipA*, *cagPAI* gene status, or double-negative for these two genes ($p < 0.05$).

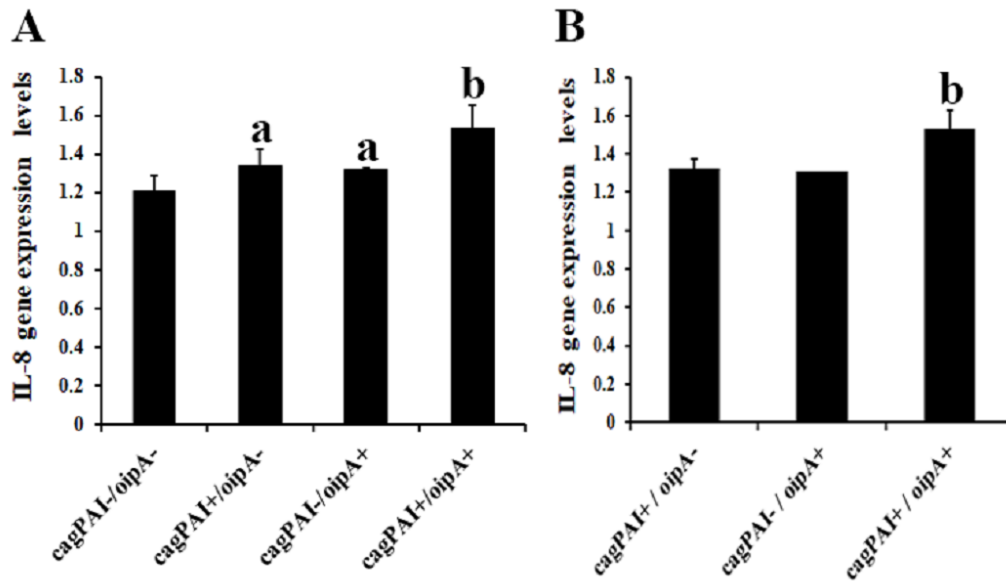


Fig. 2 *IL-8* gene expression levels in the presence/absence of *oipA* and *cagPAI* genes in gastric tissues of subjects with gastritis (A) and PUD (B).

^a significant differences when compared with double-negative *cagPAI* / *oipA* gene status ($p < 0.05$).

^b significant differences when compared with single-positive *oipA*, *cagPAI* gene status, or double-negative for these two genes ($p < 0.05$).

เอกสารแนบท้ายที่ 2

เอกสารการส่ง submit ในวารสาร Microbiology and Biotechnology Letters



MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY LETTERS

Online ISSN : 2234-7305 Print ISSN : 1598-642X

한국미생물·생명공학회지

it a manuscript > View Manuscript

Author ▼ MB

Step 1 : Type, Title & Abstract

MS ID	MBL18-02002	Date Submitted	Feb 6, 2018	Date Received	Feb 6, 2018
Manuscript type**	보문 (Article)	Date Revised	-	Date Accepted	None (or N/A)
Status	Editor's Decision 1 st				
Category of the manuscript	Molecular and Cellular Microbiology / Biomedical Sciences (Molecular Genetics, Omics, and Systems Biology)				
Title(Korean)**					
Title(English)**	Distinct genetic variation of <i>Helicobacter pylori</i> cagA, vacA, oipA, and sabA genes in Thai and Korean dyspeptic patients				
Running Title(English)	Genetic variation of <i>H. pylori</i> in Thai and Korean				
Abstract(Korean)**					
Abstract(English)**	Differences in host ethnicities and geographical distributions might influence the genetic variation and pathogenesis of <i>Helicobacter pylori</i> strains, especially between a high risk of gastric cancer and Asian Enigma regions. We simultaneously identified virulence genes involving inflammation and cell damage in Thai and Korean dyspeptic patients. The virulence-associated genes of cagA, cagA genotypes (East Asian and Western type cagA), vacA genotypes (s- and m-), oipA, and sabA were detected in Thai and Korean dyspeptic patients by Polymerase Chain Reaction (PCR), Real-Time PCR, and DNA sequence analysis. Comparisons between the two regions showed that the cagA gene, East Asian type cagA, and vacA s1/m1 in Korean dyspeptic patients occurred at rates of 100%, 86.67%, and 88.89%, respectively ($P < 0.05$). The oipA and sabA positive samples were significantly more predominant in the Korean population (95.56%, 91.11%) than in the Thai population (32%, 34%). DNA sequence analysis revealed differences in the patterns of cytosine-thymine dinucleotide repeats of the oipA and sabA genes among the two populations of dyspeptic patients. Our results indicate that the <i>H. pylori</i> strains detected in two regions were divergence and strains colonizing the Korean dyspeptic patients were more virulent than the Thai population. Our data may be one of the factors to explain <i>H. pylori</i> pathogenesis at the low gastric cancer incidence in Asian Enigma areas. However, other factors involving <i>H. pylori</i> infection of these two regions should be further analyzed.				
Keywords(English)**	<i>H. pylori</i> , virulence genes, Thai, Korean, Asian Enigma				
English Proof-reading	Yes				
Conflict of interests**	The authors claim no conflict of interest to declare and this is stated in the manuscript.				

Suggested reviewer**	Name	Institution	E-mail
	Richard Ferrero	Hudson Institute Medical Research	Richard.ferrero@hudson.org.au
	Syed Faisal Zaidi	King Saud bin Abdulaziz University of Health Scien	sfaisalhz@gmail.com
Non-preferred reviewer	Name	Institution	E-mail
	None (or N/A)		

Step 2 : Authors & Institutions

Institution	¹ Mahidol University, Amnat Charoen Campus, Thailand, ² Department of Microbiology, Gyeongsang National University, School of Medicine, Republic of Korea
Authors	Wongwarut Boonyanugomol ^{1*} , Worarat Kongkasem ² , Prasit Palittapongarnpim ³ , Myunghwan Jung ⁴ , Min-Kyoung Shin ⁴ , Hyung-Lyun Kang ⁴ , Seung-Chul Baik ⁴ , Woo-Kon Lee ⁴ and Myung-Je Cho ⁴
Corresponding Author Information	Wongwarut Boonyanugomol, Department of Sciences and Liberal Arts, Mahidol University, Amnat Charoen Campus, 259, Chayangkoon Rd., Amnat Charoen, Thailand [37000] Tel : 66815934559, Fax : 6645523211, E-mail : wongwarut.boo@mahidol.ac.th

Step 3 : Cover Letter

File Name	Date
CoverLetterJMB.docx (36kb)	Feb 6, 2018

Step 4 : File Upload

Order	File Name	File Designation	Date
Original File	Manuscript JMB.docx (139kb)	Manuscript File + Table	Feb 6, 2018

Step 5 : PDF File

Original File	MBL18-02002.pdf
---------------	-----------------

▶ LIST

Manuscript Number: MBL18-02002

Title: Distinct genetic variation of *Helicobacter pylori* cagA, vacA, oipA, and sabA genes in Thai and Korean dyspeptic patients

Article Type: 보문(Article)

Keywords: *H. pylori*, virulence genes, Thai, Korean, Asian Enigma

1 **Distinct genetic variation of *Helicobacter pylori* cagA, vacA, oipA, and sabA genes in Thai**
 2 **and Korean dyspeptic patients**

3

4 **Wongwarut Boonyanugomol^{1*}, Worrarat Kongkasem², Prasit Palittapongarnpim³,**
 5 **Myunghwan Jung⁴, Min-Kyoung Shin⁴, Hyung-Lyun Kang⁴, Seung-Chul Baik⁴, Woo-Kon**
 6 **Lee⁴, and Myung-Je Cho⁴**

7 ¹*Department of Sciences and Liberal Arts, Mahidol University, Amnat Charoen Campus, Amnat*
 8 *Charoen, 37000, Thailand*

9 ²*Unit of Endoscopy Medicine, Sapprasitpiprasong Hospital, Ubon Ratchatani, 34000, Thailand*

10 ³*Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, 10400,*
 11 *Thailand*

12 ⁴*Department of Microbiology, Gyeongsang National Institute of Health Sciences, Gyeongsang*
 13 *National University School of Medicine, Jinju, 660-751, Republic of Korea*

14

15 **Address of institutions:** Mahidol University, Amnat Charoen Campus, Amnat Charoen,
 16 Thailand and Department of Microbiology, Gyeongsang National University School of Medicine,
 17 Jinju, 660-751, Republic of Korea.

18 ***Corresponding author:***

19 Wongwarut Boonyanugomol, PhD

20 Address: Department of Sciences and Liberal Arts, Mahidol University, Amnat Charoen Campus,
 21 259, Chayangkoon Rd., Amnat Charoen, 37000, Thailand.

22 E-mail: Wongwarut.boo@mahidol.ac.th Tel/Fax: 66-45-523211

23 **Running title:** Genetic variation of *H. pylori* in Thai and Korean

24 Abstract

25 Differences in host ethnicities and geographical distributions might influence the genetic
26 variation and pathogenesis of *Helicobacter pylori* strains, especially between a high risk of
27 gastric cancer and Asian Enigma regions. We simultaneously identified virulence genes
28 involving inflammation and cell damage in Thai and Korean dyspeptic patients. The virulence-
29 associated genes of *cagA*, *cagA* genotypes (East Asian and Western type *cagA*), *vacA* genotypes
30 (s- and m-), *oipA*, and *sabA* were detected in Thai and Korean dyspeptic patients by Polymerase
31 Chain Reaction (PCR), Real-Time PCR, and DNA sequence analysis. Comparisons between the
32 two regions showed that the *cagA* gene, East Asian type *cagA*, and *vacA* s1/m1 in Korean
33 dyspeptic patients occurred at rates of 100%, 86.67%, and 88.89%, respectively ($P < 0.05$). The
34 *oipA* and *sabA* positive samples were significantly more predominant in the Korean population
35 (95.56%, 91.11%) than in the Thai population (32%, 34%). DNA sequence analysis revealed
36 differences in the patterns of cytosine-thymine dinucleotide repeats of the *oipA* and *sabA* genes
37 among the two populations of dyspeptic patients. Our results indicate that the *H. pylori* strains
38 detected in two regions were divergence and strains colonizing the Korean dyspeptic patients
39 were more virulent than the Thai population. Our data may be one of the factors to explain *H.*
40 *pylori* pathogenesis at the low gastric cancer incidence in Asian Enigma areas. However, other
41 factors involving *H. pylori* infection of these two regions should be further analyzed.

42

43 **Keywords:** *H. pylori*, virulence genes, Thai, Korean, Asian Enigma

44

45 Introduction

46 Infection with *Helicobacter pylori* is the most commonly diagnosed bacterial infection
47 worldwide [1]. This bacterium plays an important role in the development of gastrointestinal
48 diseases and is indicated as a class I carcinogen that is involved with the development of gastric
49 carcinoma and mucosal-associated lymphoid tissue lymphoma (MALT) [2]. Gastric cancer is a
50 leading cause of cancer-related deaths worldwide, especially in East Asian countries. However, it
51 has been postulated that more than 50% of the world's population is infected with *H. pylori*, but
52 less than 2% develop gastric cancer [1]. The incidence of *H. pylori* infection and gastric cancer
53 varies geographically and ethnically, even among countries in East and Southeast Asia. An
54 epidemiological study showed that the prevalence of *H. pylori* infection was similar in Thailand
55 and Korea [3], although the morbidity and mortality rates of gastric cancer were significantly
56 greater in Korea [4-7]. Due to Thailand is classified in Asian Enigma with high prevalence of *H.*
57 *pylori* infection but does not translate into high gastric cancer incidence [8]. It is possible that the
58 differences in geography and host ethnicities of these two countries might affect the genetic
59 variation of *H. pylori* strains.

60 The clinical outcome of *H. pylori* infection varies according to the involvement of
61 various bacterial, host, and environmental factors. Besides the host genetic and environmental
62 components, the divergence of the virulence factors of *H. pylori* in different area should be
63 emphasized. Several studies of the variation in *H. pylori* virulence-associated genes have
64 suggested that the cytotoxin-associated gene A (*cagA*) is an important marker of the virulent
65 strains of *H. pylori* [9, 10]. The CagA protein is delivered into the host cell via a type IV
66 secretory system and has been associated with the induction and production of interleukin 8 (IL-
67 8) by gastric epithelial cells [11]. The genotypes of the *cagA* gene have been classified into East
68 Asian and Western types according to the amino acid sequences surrounding the EPIYA (Glu-

69 Pro-Ile-Tyr-Ala) motif. The East Asian type of CagA strongly binds to Src homology 2 domain-
70 containing protein tyrosine phosphatase and induces IL-8 secretion more than the Western type
71 of CagA, indicating that the East Asian type of *cagA* is more virulent than are strains of the
72 Western type [12, 13]. Vacuolating cytotoxin A (*vacA*), which is produced by all *H. pylori*
73 strains, plays a predominant role in vacuolating activities and host cell injury [14]. Studies of the
74 variations of *vacA* due to the sequence heterogeneity at the signal (s; s1/s2) and middle (m;
75 m1/m2) regions have shown that the combination of *vacA* s1/m1 type exhibits higher levels of
76 cytotoxic activity than do the *vacA* s1/m2 or s2/m2 types [15].

77 The outer membrane proteins (OMPs) of bacterial pathogens play important roles in
78 bacterial colonization, antibiotic resistance, interactions with host receptors, and immunological
79 responses [16]. The *H. pylori* outer inflammatory protein A (*oipA*) gene encodes the OMP and
80 induces IL-8 production by gastric epithelial cells [17]. The putative virulence factor, sialic acid-
81 binding adhesion (*sabA*), is believed to play a critical role in *H. pylori* colonization, which leads
82 to persistence of infection. Besides adherence properties, the SabA protein binds specifically to
83 the sialyl-dimeric-Lewis^x glycosphingolipid on the neutrophil membrane, suggesting that it
84 might play an important role in pro-inflammatory and immune responses.

85 Although, several *H. pylori* virulence genes have been previously revealed, but data of
86 other genes were lacking in Thailand and Korea, which need to be investigated, including *oipA*
87 and *sabA* genes. Importantly, there was no simultaneous comparison of *H. pylori* virulence
88 genes in high risk gastric cancer and Asian Enigma regions, which may explain to the low gastric
89 cancer incidence in Thailand. We aimed to elucidate the prevalence of the variations of the *H.*
90 *pylori* virulence genes involving inflammation and cell damage detected between Thai and

91 Korean dyspeptic patients, including *cagA* (Western and East Asian), *vacA* (s- and m-), *oipA*,
92 and *sabA*.

93

94 **Materials and Methods**

95 **Patients and specimen collection**

96 To date, a total of 45 *H. pylori* Korean strains (30 associated with gastritis, 10 with peptic
97 ulcer diseases, and 5 with gastric cancer) have deposited to the *H. pylori* Korean Type Culture
98 Collection (<http://hpkctc.knrrc.or.kr/>) of the Gyeongsang National University School of
99 Medicine. A total of 50 Thai dyspeptic patients, including 35 with gastritis, 10 with peptic ulcer
100 diseases, and 5 with gastric cancer, underwent gastro-endoscopy at the Unit of Endoscopy
101 Medicine of Sapprasittiprosong Hospital (Ubon Ratchathani, Thailand). Gastric biopsy
102 specimens were screened for *H. pylori* infection using a rapid urease test (RUT) kit (Pronto Dry®,
103 Herford, Germany) according to manufacturer's instructions. The RUT-positive biopsy
104 specimens were subsequently collected for DNA extraction and *H. pylori* genotyping. The study
105 protocol was approved by the Human Ethics Committee of Mahidol University (approval no.
106 MU-CIRB 2016/030.1202), and all patients provided informed consent.

107

108 **DNA extraction and *H. pylori* genotyping**

109 Genomic DNA from *H. pylori* Korean strains and the RUT-positive biopsy specimens
110 collected from Thai patients was extracted using DNAzol reagent (Invitrogen Corporation,
111 Paisley, Scotland, UK) in accordance with the manufacturer's instructions. The DNA pellet was
112 solubilized in TE buffer and stored at -20 °C until amplification by polymerase chain reaction
113 (PCR).

114 The PCR was performed in a reaction volume of 25 μ l of a ready-to-use OnePCR™ Plus
 115 (GeneDireX, BIO-HELIX Co., LTD, Korea) containing 0.5 μ M of each primer, 100 ng of
 116 genomic DNA from gastric biopsy specimens, or 10 ng of *H. pylori* genomic DNA. The primer
 117 sequences used in this study were designed as reported elsewhere [18-23] with slight
 118 modifications and are listed in Table 1. The *16SrRNA* gene was amplified to confirm the
 119 presence of *H. pylori* in gastric biopsy specimens. PCR amplifications were performed in an
 120 automated thermal cycler (BioRad T100™, USA) with the following cycle conditions: *16SrRNA*:
 121 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 60 °C, and 30 s at 72 °C; *cagA*: 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1
 122 min at 52 °C, and 1 min at 72 °C; *oipA*: 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 57 °C, and 1 min at
 123 72 °C; and *sabA*: 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 56 °C, and 1 min at 72 °C. The PCR
 124 amplicons were detected by 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized under ultraviolet
 125 light. The amplified DNA of the *oipA* and *sabA* genes was purified and sequenced. The
 126 nucleotide sequences were analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool
 127 (www.ncbi.nlm.nih.gov), and the functional status of these two genes was determined as either
 128 “on” or “off.”

129 The *cagA* genotypes (Western and East Asian type of *cagA*) were determined by real-
 130 time PCR using the LightCycler® 96 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics Deutschland
 131 GmbH, Mannheim, Germany). PCR was performed in a 20- μ l reaction mixture containing 1 $\times$
 132 SYBR Green (FastStart DNA Green Master; Roche Diagnostics Deutschland GmbH), a 0.5 μ M
 133 concentration of each primer, and 100 ng of DNA template. The PCR cycling conditions
 134 comprised an initial denaturation step at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles at 95 °C for 30 s
 135 and 60 °C for 30 s. Fluorescence was measured at each extension step. Melting curve analysis
 136 was performed to assess the specificity of the amplicons.

137

138 Data analysis

139 Data were analyzed using the chi-square (χ^2) test. A probability (P) value of <0.05 was
140 considered statistically significant.

141

142 Results**143 Prevalence of *H. pylori* *cagA* and *vacA* genotypes in Thai and Korean dyspeptic patients**

144 To determine the presence of *H. pylori* infection in RUT-positive samples of Thai
145 dyspepsia, we performed PCR using primers specific for the *H. pylori* *16SrRNA* gene. As shown
146 in Table 2, the prevalence of the *cagA* gene was significantly greater in Korean than in Thai
147 dyspeptic patients (45/45, 100% vs. 35/50, 70%, respectively). However, there was no significant
148 association between the *cagA* gene and the dyspeptic clinical outcomes of the Thai and Korean
149 populations. The *cagA* genotypes were also examined by real-time PCR analysis. The Western
150 type *cagA* gene was significantly more common in Thai dyspeptic patients (28/35, 80%),
151 whereas the East Asian type *cagA* gene was significantly more common in Korean dyspeptic
152 patients (39/45, 86.67%).

153 Only *vacA* s1 type was found in both Thai and Korean dyspeptic patients. As revealed by
154 statistical analyses, the prevalence of *vacA* s1/m1 genotypes of Korean dyspeptic patients was
155 significantly higher than that of Thai dyspeptic patients (40/45, 88.89% vs. 21/50, 42%,
156 respectively). However, there was no significant association between the *vacA* s- and m-
157 genotypes and dyspeptic clinical outcomes in the Thai and Korean populations.

158

159

Prevalence of the *H. pylori oipA* gene in Thai and Korean dyspeptic patients

As shown in Table 2, the *oipA* gene was detected significantly more often in Korean than in Thai dyspeptic patients (43/45, 95.56% vs. 16/50, 32%, respectively; $P < 0.05$). Nevertheless, there was no significant relationship between *oipA* and dyspeptic clinical outcomes in either population. The functional status of the *oipA* gene was determined by DNA sequence analysis. The *oipA* “on”-status was similar between Thai and Korean dyspeptic patients (15/16, 93.75% vs. 41/43, 95.35%, respectively; $P > 0.05$). In this study, the number of cytosine-thymine dinucleotide repeats (CT repeats) at the signal-peptide coding region was observed. The number of *oipA* “on”-status patterns with 4-CT repeats was most commonly found in both Thai and Korean dyspeptic patients. The *oipA* “off”-status with 8-CT repeats was found in Thai dyspeptic patients, whereas 3-CT repeats were detected in Korean dyspeptic patients (Table 3).

Prevalence of the *H. pylori sabA* gene in Thai and Korean dyspeptic patients

The 650-bp PCR product indicating the presence of the *sabA* gene are shown in Table 2. Statistical analysis showed that the *sabA* gene was more dominant in Korean than in Thai dyspeptic patients (41/45, 91.11% vs. 17/50, 34%, respectively; $P < 0.05$). Comparisons of three clinical outcomes showed no significant relationship between the presence of the *sabA* gene and dyspeptic clinical outcomes in the Thai and Korean populations.

In addition, *sabA* gene sequence analysis showed a similar frequency of *sabA* “on”-status in the Thai and Korean dyspeptic patients (10/17, 58.82% vs. 29/41, 70.73%, respectively; $P > 0.05$). Further analysis of the number of CT repeats at the signal-peptide coding region in Thai dyspeptic patients showed that only 3 and 12-CT repeats were found in the *sabA* gene with an

182 “on” and “off” statuses, respectively (Table 3). In contrast, the number of CT repeats varied in
183 the *sabA* gene with “on” and “off” statuses in Korean dyspeptic patients.

184

185 Discussion

186 Thailand is a Southeast Asian country that is at the cultural crossroads between South and
187 East Asia and has two major ethnicities: Thai and Chinese. Conversely, Korea is an East Asian
188 country between Japan and China. It is noteworthy that the rate of *H. pylori* infection in these
189 two countries seems to be equal, although there are significant differences in the severity of
190 dyspeptic symptoms, especially in peptic ulcer diseases and gastric cancer. In Korea, a high-risk
191 area of gastric cancer, *H. pylori* infection is highly associated with peptic ulcer diseases and
192 gastric cancer, but much lower in Thailand [24, 25]. It is now clear that Asian Enigma, which
193 included Thailand, refers to regions where *H. pylori* infection is high but gastric cancer is
194 relatively low. Enigmas have been explained by several factors, such as host genetics, bacterial
195 genetics behavioral and environmental factors [8]. Among factors, infection with different
196 genotypes of *H. pylori* strains, especially the virulence genes involving inflammation and cell
197 damage, might be involved in differences in disease severity between these two countries.

198 We examined the putative virulence of the *cagA* gene, which is part of the *cag*
199 pathogenicity island (*cagPAI*) and involved in the inflammatory process by induction of IL-8
200 production via the bacterial type IV secretory system [26]. Infection with *H. pylori cagA*-
201 positive strains increases the risk of gastric cancer more than infection with *H. pylori cagA*-
202 negative strains [27]. There are two major genotypes of the *cagA* gene: East Asian and Western
203 types. Additionally, the East Asian type of *cagA* was found to be more virulent than the Western
204 type of *cagA* [28]. It has been reported that the East Asian CagA-positive strain is associated

205 with a greater mortality rate of gastric cancer in Asia [29]. Korean dyspeptic patients had a
206 higher prevalence of *cagA*-positive strains and East Asian type *cagA*, as compared with Thai
207 dyspeptic patients who more often carry the Western type of *cagA*. Our data support the findings
208 of several previous studies, showing that the East Asian type *cagA* was more common in East
209 Asian countries [30], whereas the Western type of *cagA* is widely distributed in south and
210 southeastern areas of Asia and Thailand [4]. Thus, our finding suggest that the East Asian type of
211 *cagA*, which is associated with a greater risk of gastric carcinogenesis, was more common in
212 Korean than in Thai populations.

213 The *vacA* gene, which is present in all *H. pylori* strains that induce vacuolization and cell
214 damage, contains two variable parts, the *vacA*-s and *vacA*-m regions. Of the two variable regions,
215 the *vacA* s1 type possesses higher toxin activity and causes more severe damage to gastric
216 epithelial cells than do the other alleles [31]. The m-region plays an important role in binding to
217 the receptor on the host cell membrane [32]. Amino acid sequence analysis showed that VacA
218 m2 strain, but not VacA m1, has a 23-amino acid insert, which forms an additional β -helix [33].
219 It has been suggested that *H. pylori* m1 strains are associated with a higher risk of gastric
220 ulceration and cancer than are the m2 strains owing to difference in amino acid sequences, which
221 may affect receptor binding affinities of VacA m1 and m2 [34]. The results of the present study
222 showed that strains carrying the *vacA* s1/m1 types were significantly more common in Korean
223 than in Thai populations, which is in accordance with a previous report by Yamaoka et al [35].
224 We concluded that the difference in *vacA* m-region genotypes might affect the receptor binding
225 affinity and toxin production of the host cells, which might have led to the differences in *H.*
226 *pylori* pathogenesis between these two populations.

227 The *H. pylori* OMP plays a pivotal role in bacterial attachment during initial colonization
228 in gastric epithelial cells. The expression of *H. pylori* OMPs is regulated by several factors, such
229 as gene conversion, gene duplication, and phase variation. The *H. pylori oipA* gene codes for a
230 surface protein involved in the in vitro production of IL-8 by gastric cells via the PI3/Akt
231 pathway, although the host receptor of OipA remains unknown [36]. Previous studies reported
232 that the presence/absence of the *oipA* gene and its functional status varied among countries [37].
233 Overall, the association of the *oipA* gene with clinical outcomes remains unclear. Expression of
234 the *H. pylori* OipA protein is controlled by phase variation within a CT dinucleotide repeat motif
235 at the 5' end of the signal-peptide coding region [17]. Several studies have shown that OipA is
236 significantly related with more severe gastric diseases, including high level of mucosal IL-8
237 production in gastric tissues, cytotoxic effects in the AGS human gastric cancer cell line, *H.*
238 *pylori* density in epithelial cells, and promotion of neutrophil infiltration [38, 39]. Thus, OipA
239 may indirectly contribute to the tight adhesion between *H. pylori* and epithelial cells, leading to
240 strong cellular signaling of the type IV secretory system and CagA [40]. Our study showed that
241 *oipA*-positive samples were significantly predominant in the Korean dyspeptic patients. It is
242 possible that the high prevalence of the *oipA* gene might partly account for the increased risk of
243 developing severe gastroduodenal diseases in the Korean population, as compared with the Thai
244 population.

245 SabA is the most well-characterized adhesion protein of *H. pylori* and has been
246 associated with binding of the bacterium to the sialyl-dimeric-Lewis^x glycosphingolipid on the
247 membrane of gastric epithelial cells [41]. The interaction between SabA and its ligand enhances
248 attachment to the host epithelial cell, thereby facilitating successful colonization [42]. Besides
249 these attachment properties, SabA has been identified as a hemagglutinin, which specifically

250 binds to sialylated carbohydrate structures on neutrophils and stimulates neutrophils to produce
251 reactive oxygen species, which leads to gastric epithelial cell damage by oxidative stress [43].
252 The *sabA* gene appears to be the one of the most divergent genes in the *H. pylori* genome [44]. It
253 was found that the *sabA* expression was regulated by the CT dinucleotide repeats present at the 5'
254 end of the signal-peptide coding region caused by phase variation through a slipped strand
255 mispairing, similar to that observed with the *oipA* gene. Our findings demonstrated that the *sabA*
256 “on”-status was similar in Korean and Thai dyspeptic patients, although there were differences in
257 *sabA* CT repeat patterns among the two populations. Hence, we hypothesized that the variation
258 of the *sabA* gene detected in two populations was due to differences in bacterial adaptation
259 among host ethnicities and environments. However, owing to the greater prevalence of *sabA*-
260 positive samples in Korean dyspeptic patients, as compared with the Thai population, the
261 differences in the severity of gastric cell damage in Thai and Korean dyspeptic patients might be
262 involved by SabA-induced immune responses.

263 This is the first study to simultaneously compare *H. pylori* virulence genes between areas
264 of a high risk of gastric cancer and Asian Enigma. The genetic variation of *H. pylori* virulence
265 genes in Korean dyspeptic patients, as compared with Thai dyspeptic patients, showed a high
266 frequency of *cagA*, East Asian *cagA* type, *vacA* s1/m1, *oipA*-positive, and *sabA*-positive genes
267 in Korean. Taken together, we hypothesized that the *H. pylori* virulence-associated genes might
268 be distinctly diverse and antigenically different in patients from different geographic areas and
269 the Korean population was at a greater risk of exposure and colonization with the virulent *H.*
270 *pylori* strains than the Thai population was, which might explain the *H. pylori* pathogenesis
271 between a high gastric cancer epidemiology and Asian Enigma regions. However, other host

272 genetic, environmental, and behavioral factors may be involved in the *H. pylori* pathogenesis of
273 these two countries and should be further elucidated.

274

275 **Acknowledgments**

276 This research was funded by grants from the Thailand Research Fund (MRG5980069)
277 and Talent Management Project of Mahidol University (TM116/2557). The authors would like to
278 thank Korean Type Culture Collection of the Gyeongsang National University School of
279 Medicine for providing the *H. pylori* Korean strains. We would like to thank the Central
280 Laboratory of Mahidol University, Amnat Charoen Campus, for supplying the instruments used
281 in this study. We also would like to thank the clinical staff of the Endoscopy Medicine Unit of
282 Sapprasitthiprasong Hospital for assisting in specimen collection. Finally, the authors would like
283 to thank Enago (www.enago.com) for the English language review.

284

285 **Conflict of interest**

286 The authors have no conflict of interest to declare.

287

288

289

290

291

292 References

- 293 1. Peek RM, Jr., Blaser MJ. 2002. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract
294 adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*. **2**: 28-37.
- 295 2. 1994. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the
296 Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval*
297 *Carcinog Risks Hum*. **61**: 1-241.
- 298 3. Miwa H, Go MF, Sato N. 2002. *H. pylori* and gastric cancer: the Asian enigma. *Am J*
299 *Gastroenterol*. **97**: 1106-1112.
- 300 4. Uchida T, Miftahussurur M, Pittayanon R, Vilaichone RK, Wisedopas N, Ratanachu-Ek
301 T, *et al*. 2015. *Helicobacter pylori* Infection in Thailand: A Nationwide Study of the
302 CagA Phenotype. *PLoS One*. **10**: e0136775.
- 303 5. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. 2014. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection.
304 *Helicobacter*. **19 Suppl 1**: 1-5.
- 305 6. Shin A, Shin HR, Kang D, Park SK, Kim CS, Yoo KY. 2005. A nested case-control
306 study of the association of *Helicobacter pylori* infection with gastric adenocarcinoma in
307 Korea. *Br J Cancer*. **92**: 1273-1275.
- 308 7. Rahman R, Asombang AW, Ibdah JA. 2014. Characteristics of gastric cancer in Asia.
309 *World J Gastroenterol*. **20**: 4483-4490.
- 310 8. Zaidi SF. 2016. *Helicobacter pylori* associated Asian enigma: Does diet deserve
311 distinction? *World J Gastrointest Oncol*. **8**: 341-350.
- 312 9. Figura N, Guglielmetti P, Rossolini A, Barberi A, Cusi G, Musmanno RA, *et al*. 1989.
313 Cytotoxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic
314 ulcers and from patients with chronic gastritis only. *J Clin Microbiol*. **27**: 225-226.

- 315 10. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, *et al.* 1995.
316 Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an
317 increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* **55**: 2111-2115.
- 318 11. Segal ED, Falkow S, Tompkins LS. 1996. *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells
319 induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins.
320 *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**: 1259-1264.
- 321 12. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, *et al.* 2002.
322 Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by
323 variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 14428-
324 14433.
- 325 13. Argent RH, Hale JL, El-Omar EM, Atherton JC. 2008. Differences in *Helicobacter pylori*
326 CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains,
327 and influences on interleukin-8 secretion. *J Med Microbiol.* **57**: 1062-1067.
- 328 14. Cover TL. 1996. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.* **20**:
329 241-246.
- 330 15. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Jr., Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. 1995.
331 Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of
332 specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem.* **270**:
333 17771-17777.
- 334 16. Matsuo Y, Kido Y, Yamaoka Y. 2017. *Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein-
335 Related Pathogenesis. *Toxins (Basel).* **9**.

- 336 17. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. 2000. A M(r) 34,000 proinflammatory outer
337 membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**: 7533-
338 7538.
- 339 18. Kauser F, Hussain MA, Ahmed I, Ahmad N, Habeeb A, Khan AA, *et al.* 2005.
340 Comparing genomes of *Helicobacter pylori* strains from the high-altitude desert of
341 Ladakh, India. *J Clin Microbiol*. **43**: 1538-1545.
- 342 19. Lehours P, Menard A, Dupouy S, Bergey B, Richy F, Zerbib F, *et al.* 2004. Evaluation of
343 the association of nine *Helicobacter pylori* virulence factors with strains involved in low-
344 grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Infect Immun*. **72**: 880-888.
- 345 20. Qiao W, Hu JL, Xiao B, Wu KC, Peng DR, Atherton JC, *et al.* 2003. *cagA* and *vacA*
346 genotype of *Helicobacter pylori* associated with gastric diseases in Xi'an area. *World J*
347 *Gastroenterol*. **9**: 1762-1766.
- 348 21. Yamazaki S, Kato S, Matsukura N, Ohtani M, Ito Y, Suto H, *et al.* 2005. Identification of
349 *Helicobacter pylori* and the *cagA* genotype in gastric biopsies using highly sensitive real-
350 time PCR as a new diagnostic tool. *FEMS Immunol Med Microbiol*. **44**: 261-268.
- 351 22. Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, *et al.* 1998.
352 Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*. **28**: 37-
353 53.
- 354 23. Gramley WA, Asghar A, Frierson HF, Jr., Powell SM. 1999. Detection of *Helicobacter*
355 *pylori* DNA in fecal samples from infected individuals. *J Clin Microbiol*. **37**: 2236-2240.
- 356 24. Tantrachoti P, WD, Soontornmanokul T, Rerknimitr R, Gonlachanvit S. 2013.
357 Epidemiological Study of *Helicobacter pylori* Infection and Endoscopic Findings in
358 Thailand. *Thai Journal of Gastroenterology*. **14**: 110-116.
-

- 359 25. Malaty HM, Kim JG, El-Zimaity HM, Graham DY. 1997. High prevalence of duodenal
360 ulcer and gastric cancer in dyspeptic patients in Korea. *Scand J Gastroenterol.* **32**: 751-
361 754.
- 362 26. Fischer W. 2011. Assembly and molecular mode of action of the *Helicobacter pylori* Cag
363 type IV secretion apparatus. *FEBS J.* **278**: 1203-1212.
- 364 27. Ekstrom AM, Held M, Hansson LE, Engstrand L, Nyren O. 2001. *Helicobacter pylori* in
365 gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection.
366 *Gastroenterology.* **121**: 784-791.
- 367 28. Matsunari O, Shiota S, Suzuki R, Watada M, Kinjo N, Murakami K, *et al.* 2012.
368 Association between *Helicobacter pylori* virulence factors and gastroduodenal diseases in
369 Okinawa, Japan. *J Clin Microbiol.* **50**: 876-883.
- 370 29. Azuma T. 2004. *Helicobacter pylori* CagA protein variation associated with gastric
371 cancer in Asia. *J Gastroenterol.* **39**: 97-103.
- 372 30. Hirai I, Sasaki T, Kimoto A, Fujimoto S, Moriyama T, Yamamoto Y. 2009. Assessment
373 of East Asian-type *cagA*-positive *Helicobacter pylori* using stool specimens from
374 asymptomatic healthy Japanese individuals. *J Med Microbiol.* **58**: 1149-1153.
- 375 31. Cover TL, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. 1994. Divergence of genetic
376 sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem.*
377 **269**: 10566-10573.
- 378 32. Pagliaccia C, de Bernard M, Lupetti P, Ji X, Burrone D, Cover TL, *et al.* 1998. The m2
379 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc*
380 *Natl Acad Sci U S A.* **95**: 10212-10217.
-

- 381 33. Gangwer KA, Mushrush DJ, Stauff DL, Spiller B, McClain MS, Cover TL, *et al.* 2007.
 382 Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain. *Proc Natl*
 383 *Acad Sci U S A.* **104**: 16293-16298.
- 384 34. Yahiro K, Hirayama T, Moss J, Noda M. 2016. New Insights into VacA Intoxication
 385 Mediated through Its Cell Surface Receptors. *Toxins (Basel).* **8**.
- 386 35. Yamaoka Y, Orito E, Mizokami M, Gutierrez O, Saitou N, Kodama T, *et al.* 2002.
 387 *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS Lett.* **517**: 180-
 388 184.
- 389 36. Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y. 2012. *Helicobacter pylori*-associated regulation
 390 of forkhead transcription factors FoxO1/3a in human gastric cells. *Helicobacter.* **17**: 193-
 391 202.
- 392 37. Liu J, He C, Chen M, Wang Z, Xing C, Yuan Y. 2013. Association of presence/absence
 393 and on/off patterns of *Helicobacter pylori* *oipA* gene with peptic ulcer disease and gastric
 394 cancer risks: a meta-analysis. *BMC Infect Dis.* **13**: 555.
- 395 38. Yamaoka Y, Kikuchi S, el-Zimaity HM, Gutierrez O, Osato MS, Graham DY. 2002.
 396 Importance of *Helicobacter pylori* *oipA* in clinical presentation, gastric inflammation,
 397 and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology.* **123**: 414-424.
- 398 39. Teymournejad O, Mobarez AM, Hassan ZM, Noori S, Moazzeni SM, Khoramabadi N.
 399 2013. Cloning, Expression, Purification and Toxicity Evaluation of *Helicobacter pylori*
 400 Outer Inflammatory Protein A. *Indian J Microbiol.* **53**: 391-394.
- 401 40. Posselt G, Backert S, Wessler S. 2013. The functional interplay of *Helicobacter pylori*
 402 factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell*
 403 *Commun Signal.* **11**: 77.

- 404 41. Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, *et al.* 2002.
405 *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation.
406 *Science*. **297**: 573-578.
- 407 42. Marcos NT, Magalhaes A, Ferreira B, Oliveira MJ, Carvalho AS, Mendes N, *et al.* 2008.
408 *Helicobacter pylori* induces beta3GnT5 in human gastric cell lines, modulating
409 expression of the SabA ligand sialyl-Lewis x. *J Clin Invest*. **118**: 2325-2336.
- 410 43. Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, Bergstrom J, Boren T, Danielsson D, *et al.* 2005.
411 The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic
412 activation of human neutrophils. *J Biol Chem*. **280**: 15390-15397.
- 413 44. Saunders NJ, Boonmee P, Peden JF, Jarvis SA. 2005. Inter-species horizontal transfer
414 resulting in core-genome and niche-adaptive variation within *Helicobacter pylori*. *BMC*
415 *Genomics*. **6**: 9.

425 **Table 1.** Primer sequences of *H. pylori* virulence-associated genes

Genes	Primer sequences (5'-3')	PCR size (bp)	Ref
<i>l6SrRNA</i>	F: GCGACCTGCTGGAACATTAC	139	[23]
	R: CGTTAGCTGCATTACTGGAGA		
<i>cagA</i>	F: TTGACCAACAACCACAAACCGAAG	183	[22]
	R: CTTCCCTTAATTGCGAGATTCC		
<i>cagA</i> (Western type)	F: AGGCATGATAAAGTTGATGAT	91	[21]
	R: AAAGGTCCGCCGAGATCAT		
<i>cagA</i> (East Asian type)	F: AAAGGAGTGGGCGGTTTCA	91	[21]
	R: CCTGCTTGATTTGCCTCATCA		
<i>vacA</i> s1/s2	F: ATGGAAATACAACAAACACAC	259/286	[20]
	R: CTGCTTGAATGCGCCAAAC		
<i>vacA</i> m1/m2	F: CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	567/642	[20]
	R: GCGTCAAAATAATTCCAAGG		
<i>oipA</i>	F: GTTTTTGATGCATGGGATTT	401	[18]
	R: GTGCATCTCTTATGGCTTT		
<i>sabA</i>	F: TTTTGTGTCAGCTACGCGTTC	650	[19]
	R: ACCGAAGTGATAACGGCTTG		

426

427

428

429

Table 2. Prevalence of the *H. pylori* *cagA*, *vacA*, *oipA*, and *sabA* genes in Thai and Korean dyspeptic patients.

<i>H. pylori</i> genes	Thai dyspeptic patients				Korean dyspeptic patients			
	GT (n = 35)	PUD (n = 10)	GC (n = 5)	Total (n = 50)	GT (n = 30)	PUD (n = 10)	GC (n = 5)	Total (n = 45)
<i>cagA</i> +	22 (62.86%)	9 (90%)	4 (80%)	35 (70%)	30 (100%)	10 (100%)	5 (100%)	45 ^a (100%)
<i>cagA</i> Western	18 (81.82%)	7 (77.78%)	3 (75%)	28 ^a (80%)	4 (13.33%)	1 (10%)	1 (20%)	6 (13.33%)
<i>cagA</i> East Asian	4 (18.18%)	2 (22.22%)	1 (25%)	7 (20%)	26 (86.67%)	9 (90%)	4 (80%)	39 ^a (86.67%)
<i>vacA</i> s1 m1	15 (42.86%)	4 (40%)	2 (40%)	21 (42%)	27 (90%)	8 (80%)	5 (100%)	40 ^a (88.89%)
<i>vacA</i> s1 m2	20 (57.14%)	6 (60%)	3 (60%)	29 ^a (58%)	3 (10%)	2 (20%)	0 (0%)	5 (11.11%)
<i>oipA</i> +	13 (37.14%)	3 (30%)	0 (0%)	16 (32%)	30 (100%)	8 (80%)	5 (100%)	43 ^a (95.56%)
<i>oipA</i> on-status	12 (92.31%)	3 (100%)	-	15 (93.75%)	28 (93.33%)	8 (100%)	5 (100%)	41 (95.35%)
<i>sabA</i> +	14 (40%)	3 (30%)	0 (0%)	17 (34%)	28 (93.33%)	8 (80%)	5 (100%)	41 ^a (91.11%)
<i>sabA</i> on-status	8 (57.14%)	2 (66.67%)	-	10 (58.82%)	19 (67.86%)	6 (75%)	4 (80%)	29 (70.73%)

Abbreviations: GT, gastritis; PUD, peptic ulcer diseases; GC, gastric cancer.

^a Significant difference between the Thai and Korean populations ($p < 0.05$).

Table 3. The examples of DNA sequences and gene status of the *H. pylori oipA* and *sabA* genes in Thai dyspeptic patients

Strains	Groups	DNA sequences of signal-peptide coding region	Status
PUD2 (<i>oipA</i>)	PUD	<u>ATG</u> AAAAAACCCCTTTTACTAA <u>CTCTCTTTTCT</u> CGTTTGGCTCCACGCTGAAAGGAATGGA [4-CT]	on
GT28 (<i>oipA</i>)	Gastritis	<u>ATG</u> AGAAACCATGAAAAAGTACT <u>CTCTCTCTCTCTCTCT</u> CGTTTGGCTCCACGCTGA [8-CT] *	off
GT22 (<i>sabA</i>)	Gastritis	<u>ATG</u> AACCCCTTTCACGGCCTCTCTCTAGCCGTTTTCACCTCTGTAAAAATTTTGGCCAAAAAT [3-CT]	on
GT23 (<i>sabA</i>)	Gastritis	<u>ATG</u> AAAAAAACAATTTTACTCTCTCTCTCTCTCTCCCTCTCCCCCTCTTACACCCTGAAAAACAACG GCTTTTGTGA [12-CT] *	off

ATG = start codon * TGA = stop codon