

ผลของขมิ้นชันต่อการรั่วของโปรตีนในหลอดเลือดขนาดเล็กในกระเพาะอาหาร การ  
แสดงออกของเอ็นเอฟแคปปี-พีหกสิบห้า และการเปลี่ยนแปลงระดับวีอีจีเอฟในหนูที่  
ติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรี



นางสาวกวีญา สินธรา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**EFFECTS OF CURCUMIN ON GASTRIC MICROVASCULAR LEAKAGE,  
NF-KB-p65 EXPRESSION, AND CHANGE IN VEGF LEVEL IN  
*HELICOBACTER PYLORI* INFECTED RATS**

**Miss Kawiya Sintara**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science**

**Faculty of Medicine**

**Chulalongkorn University**

**Academic Year 2006**

**Copyright of Chulalongkorn University**

**492244**

Thesis Title: EFFECTS OF CURCUMIN ON GASTRIC MICROVASCULAR  
LEAKAGE, NF-KB-p65 EXPRESSION, AND CHANGE IN VEGF  
LEVEL IN *HELICOBACTER PYLORI* INFECTED RATS

By Miss Kawiya Sintara

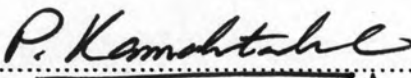
Field of Study Medical Science

Thesis Advisor Associate Professor Duangporn Thong-Ngam, M.D.


Thesis Co-advisor Associate Professor Suthiluk Patumraj, Ph.D.

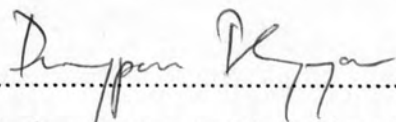
---

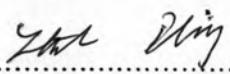
Accepted by the Medical Science Program, Faculty of Medicine, Chulalongkorn  
University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

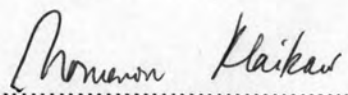
  
.....Dean of the Faculty of Medicine  
(Professor Pilom Kamolratanakul, M.D.)

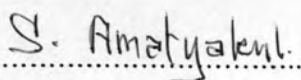
THESIS COMMITTEE

  
.....Chairman  
(Associate Professor Vilai Chentanez, M.D.)

  
.....Thesis Advisor  
(Associate Professor Duangporn Thong-Ngam, M.D.)

  
.....Thesis Co-advisor  
(Associate Professor Suthiluk Patumraj, Ph.D.)

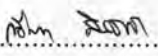
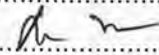

  
.....Member  
(Associate Professor Naruemon Klaikeaw, M.D.)

  
.....Member  
(Assistant Professor Supathra Amatyakul, Ph.D.)

กวีญา สีนธารา: ผลของไขมันชั้นต่อการรั่วของโปรตีนในหลอดเลือดขนาดเล็กในกระเพาะอาหาร การแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปายี-พีทกสลิปห้ำ และการเปลี่ยนแปลงระดับวีโอจีเอฟในหนูที่ติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรี (EFFECTS OF CURCUMIN ON GASTRIC MICROVASCULAR LEAKAGE, NF-KB-p65 EXPRESSION, AND CHANGE IN VEGF LEVEL IN *HELICOBACTER PYLORI* INFECTED RATS)  
 อ. ที่ปรึกษา: รศ.พญ. ดวงพร ทองงาม อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช, 94 หน้า.

การติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรี เป็นสาเหตุของกระเพาะอาหารอักเสบ และการหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เคอร์คูมินซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ของไขมันชั้นมีคุณสมบัติต่อต้านการอักเสบ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลจากการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรี และผลในการต่อต้านการอักเสบของเคอร์คูมินที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการรั่วของสาร โมเลกุลใหญ่ออกจากหลอดเลือดขนาดเล็กในกระเพาะอาหาร การแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปายี-พีทกสลิปห้ำในเซลล์เยื่ออุกระเพาะอาหาร และการเปลี่ยนแปลงระดับวีโอจีเอฟในซีรัมของหนู การทดลองใช้หนูเพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมที่ให้เคอร์คูมิน กลุ่มติดเชื้อ กลุ่มติดเชื้อที่ได้รับการรักษาด้วยเคอร์คูมินขนาด 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และขนาด 600 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม หลังติดเชื้อนาน 2 สัปดาห์ หนูในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยเคอร์คูมินจะถูกป้อนเคอร์คูมินขนาด 200 หรือ 600 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นใช้เทคนิค intravital fluorescence microscopy ศึกษาการรั่วของสาร โมเลกุลใหญ่จากหลอดเลือดขนาดเล็กในกระเพาะอาหาร ใช้วิธีทาง immunohistochemistry ศึกษาการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปายี-พีทกสลิปห้ำในเซลล์เยื่ออุกระเพาะอาหาร และใช้เทคนิค ELISA ตรวจสอบระดับของวีโอจีเอฟในซีรัม

ผลการศึกษาพบความสำเร็จต่อการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรีถึงร้อยละ 85 และการติดเชื้อนำไปสู่การรั่วของสาร โมเลกุลใหญ่ การแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปายี-พีทกสลิปห้ำ และระดับวีโอจีเอฟที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) โดยค่าเฉลี่ยการรั่วของสาร โมเลกุลใหญ่คือร้อยละ  $10.69 \pm 1.43$  และ  $15.41 \pm 2.83$  ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปายี-พีทกสลิปห้ำคือร้อยละ  $28.58 \pm 2.82$  และ  $44.2 \pm 5.24$  และ ค่าเฉลี่ยระดับวีโอจีเอฟในหน่วยพิโคกรัมต่อมิลลิลิตร คือ  $228.57 \pm 40.41$  และ  $619.43 \pm 145.68$  เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มควบคุม และกลุ่มติดเชื้อตามลำดับ กลุ่มควบคุมที่ได้เคอร์คูมินไม่มีผลต่อตัวแปรที่ศึกษาเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่พบว่าเคอร์คูมินทั้งสองความเข้มข้นมีผลลดการรั่วของสาร โมเลกุลใหญ่และการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปายี-พีทกสลิปห้ำ ( $p \leq 0.05$ ) ค่าเฉลี่ยการรั่วของสาร โมเลกุลใหญ่คือร้อยละ  $12.32 \pm 2.13$  และ  $13.72 \pm 2.22$  และ ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปายี-พีทกสลิปห้ำคือร้อยละ  $33.99 \pm 4.83$  และ  $37.11 \pm 4.34$  ในกลุ่มติดเชื้อที่ได้รับการรักษาด้วยเคอร์คูมิน ขนาด 200 และ 600 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมตามลำดับ ในขณะที่เคอร์คูมินไม่มีผลต่อการลดระดับวีโอจีเอฟ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรีเพิ่มการรั่วของสาร โมเลกุลใหญ่ออกจากหลอดเลือดของกระเพาะอาหาร การแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปายี-พีทกสลิปห้ำ และระดับวีโอจีเอฟ ถึงแม้ว่าเคอร์คูมินทั้งสองความเข้มข้นไม่สามารถลดระดับวีโอจีเอฟได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เคอร์คูมินสามารถลดการรั่วของสาร โมเลกุลใหญ่และการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปายี-พีทกสลิปห้ำได้ซึ่งแสดงว่าเคอร์คูมินมีคุณสมบัติต่อต้านการอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรีในหนูทดลอง

สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์การแพทย์.....ลายมือชื่อนิสิต.....   
 ปีการศึกษา.....2549.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....   
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 

## 4774804230: MEDICAL SCIENCE PROGRAM

KEY WORD: *HELICOBACTER PYLORI*/ CURCUMIN/ GASTRIC MICROCIRCULAION/ NF-KB-p65/ VEGF

KAWIYA SINTARA: EFFECTS OF CURCUMIN ON GASTRIC MICROVASCULAR LEAKAGE, NF-KB-p65 EXPRESSION, AND CHANGE IN VEGF LEVEL IN *HELICOBACTER PYLORI* INFECTED RATS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. DUANGPORN THONG-NGAM, M.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SUTHILUK PATUMRAJ, Ph.D. 94 pp.

The *H. pylori* infection causes gastric inflammation and the release of inflammatory mediators. Curcumin, an active ingredient of tumeric (*Curcuma longa*), has many of biological activities including anti-inflammation. Therefore, this study aims to determine effects of *H. pylori* infection and anti-inflammatory effect of curcumin doses on the macromolecular leakage from gastric microcirculation, NF-KB-p65 expression in gastric epithelial cells and serum VEGF level in rats. Male Sprague-Dawley rats were divided into five groups including control, curcumin control, *H. pylori* infected, *H. pylori* infected with curcumin 200 mg/kg BW treated, and *H. pylori* infected with curcumin 600 mg/kg BW treated groups. Two weeks after *H. pylori* inoculation, curcumin 200 mg/kg BW or 600 mg/kg BW were fed once daily to curcumin treated group for one week. The intravital fluorescence microscopic technique was performed to examine macromolecular leakage from gastric postcapillary venules. Then, the stomach was removed for immunohistochemistry of NF-KB-p65 expression. In addition, serum VEGF was analyzed by using ELISA technique.

The successful inoculation of *H. pylori* was 85%. *H. pylori* infection led to the macromolecular leakage, the NF-KB-p65 expression, and increase of VEGF level compared with control group. The average percentages of macromolecular leakage were 10.69% ± 1.43 and 15.41% ± 2.83, NF-KB-p65 immunoreactive cells were 28.58% ± 2.82 and 44.2% ± 5.24, and the average concentrations (pg/ml) of VEGF level were 228.57 ± 40.41 and 619.43 ± 145.68 in control and *H. pylori* infected group, respectively. Curcumin control group did not significantly change baseline of these parameters. There were significant decrease of macromolecular leakage and NF-KB-p65 expression ( $p \leq 0.05$ ) in the both curcumin treated groups compared with *H. pylori* infected group. The average percentages of macromolecular leakage were 12.32% ± 2.13 and 13.72% ± 2.22, and NF-KB-p65 immunoreactive cells were 33.99% ± 4.83 and 37.11% ± 4.34 in curcumin 200 and 600 mg/kg BW treated groups, respectively. Whereas, the effect of curcumin on VEGF level did not significantly change compared with *H. pylori* infected group. These results could be concluded that *H. pylori* infection increased macromolecular leakage, NF-KB-p65 expression, and serum VEGF level. Although curcumin did not significantly decrease serum VEGF level, it can reduce macromolecular leakage and NF-KB-p65 expression. It is implied that curcumin may have the anti-inflammatory effect on *H. pylori* infection.

Field of Study.....Medical Science.....Student's signature.....*Kawiya Sintara*  
Academic year.....2006.....Advisor's signature.....*Duangporn Thong-ngam*  
Co-advisor's signature.....*Suthiluk Patumraj*

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study could not succeed without my advisor Assoc. Prof. Duangporn Thong-Ngam and my co-advisor Assoc. Prof. Suthiluk Patumraj. Their advices and encouragement throughout this study provided this complete experiment.

Moreover, Assoc. Prof. Taniittha Chatsuwana and Miss Panjaporn Prasurthsin, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University offers their help in preparing *H. pylori*. In addition, I am also appreciated members of Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. Especially, Assoc. Prof. Naruemon Klaikeaw offers her helps in detecting *H. pylori* infection and informing pathology in gastric mucosa after *H. pylori* infection, and Mr. Preecha Ruangvejvorachai offers his help and facilities in studying immunohistochemistry technique. My thankful is extended to Assoc. Prof. Somjit Eiam-Ong, Mrs. Mariam Yusuksawad, and Miss Napassanan Dhuansak for their guidance in the part of ELISA technique.

Furthermore, my grateful is extended to members of the thesis committee for their valuable comments and the correction of this thesis.

In addition, I would like to very thank my family and friends for their support, love, and encouragement.

This study was supported by the Graduate Thesis Grant, Graduated School, Chulalongkorn University (2005) and Thai Research Fund (TRF) code RMU 4980032.

## TABLE OF CONTENTS

	PAGE
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
TABLE OF CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xii
CHAPTER	
I BACKGROUND AND RATIONALE.....	1
II LITERATURE REVIEWS.....	2
The model used in this study.....	2
The stomach areas used in this study.....	3
The stomach vessels used in this study.....	5
<i>Helicobacter pylori</i> ( <i>H. pylori</i> ).....	7
Vascular permeability and macromolecular leakage.....	13
Vascular endothelial growth factor (VEGF).....	16
Nuclear factor-kappa B (NF-KB).....	20
Curcumin (diferuloylmethane).....	23
III MATERIALS AND METHODS.....	29
Chemical substances.....	29
Bacterial and animal preparation.....	30
Methods.....	32
<i>H. pylori</i> inoculation in the rat stomach.....	32
Experimental protocol for intravital fluorescent microscopic study of gastric microcirculatory change.....	32
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	37
Detection of <i>H. pylori</i> infection in gastric tissues.....	40
Immunohistochemistry.....	41
Statistic analysis.....	43

## TABLE OF CONTENTS (Continue)

		PAGE
IV	RESULTS.....	44
	<i>H. pylori</i> detection in rat stomach.....	44
	Physiologic characters of <i>H. pylori</i> infection and role of curcumin.....	46
	Effects of <i>H. pylori</i> infection on gastric microvascular leakage and role of curcumin.....	47
	Effects of <i>H. pylori</i> infection on serum VEGF level and role of curcumin.....	55
	Effects of <i>H. pylori</i> infection on NF-KB p65 expression in gastric epithelial cells and role of curcumin.....	56
V	DISCUSSIONS.....	60
	Rat model of <i>H. pylori</i> infection.....	60
	Physiologic characters of animals.....	61
	Effects of <i>H. pylori</i> infection on gastric microvascular leakage, serum VEGF level, and NF-KB p65 expression.....	62
	Role of curcumin on gastric microvascular leakage, serum VEGF level, and NF-KB p65 expression.....	66
VI	CONCLUSIONS.....	72
	REFERENCES.....	73
	BIOGRAPHY.....	94



**LIST OF TABLES**

<b>TABLE</b>	<b>PAGE</b>
1. The collected O.D. plotted on y-axis of standard curve .....	39
2. Mean $\pm$ SD of hemodynamic parameters, systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), mean arterial pressure (MAP), and heart rate (HR) of all experimental groups.....	47
3. Means $\pm$ SD of macromolecular leakage (%) of experimental groups.....	48
4. Means $\pm$ SD of serum VEGF level (pg/ml) of experimental groups.....	55
5. Means $\pm$ SD of Immunoreactive cells (%) of experimental groups.....	57

## LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
1. Anatomy of stomach.....	4
2. Structure of gastric wall.....	5
3. Blood supply of the stomach.....	6
4. Schematic representation of microvasculature in gastric wall.....	7
5. Characteristic of <i>H. pylori</i> .....	8
6. Pathogenesis of <i>H. pylori</i> infection.....	12
7. Macromolecular leakage induced by neutrophil extravasations.....	14
8. Regulation of VEGF expression.....	19
9. Chemical structure of curcumin (diferuloylmethane).....	23
10. Diagram of experimental groups.....	31
11. Preparation model for study macromole leakage on gastric PCVs.....	34
12. Intravital fluorescent microscopy and instruments are used for studying of macromolecular leakage.....	35
13. GLOBAL LAB <sup>®</sup> image/2, an image analysis program is used for determining intensity ratio at 0 minute.....	36
14. GLOBAL LAB <sup>®</sup> image/2, an image analysis program is used for determining intensity ratio at 30 minute.....	37
15. A standard curve of VEGF .....	39
16. Rapid urease test.....	40
17. Immunohistochemical staining of NF-KB p65 antibody.....	42
18. Histopathology of control group.....	44
19. Histopathology of <i>H. pylori</i> infected group.....	45
20. Histopathology of <i>H. pylori</i> infected group ( <i>H. pylori</i> clumping on gastric epithelium)..	46
21. A bar graph shows the mean $\pm$ SD of macromolecular leakage (%) of experimental groups.....	49
22. Intravital fluorescent microscopic images (20x) demonstrate macromolecular leakage from vessels to the interstitial fluid of control groups.....	50

## LIST OF FIGURES (Continue)

FIGURE	PAGE
23. Intravital fluorescent microscopic images (20x) demonstrate macromolecular leakage from vessels to the interstitial fluid of curcumin control groups.....	51
24. Intravital fluorescent microscopic images (20x) demonstrate macromolecular leakage from vessels to the interstitial fluid of <i>H.pylori</i> infected groups.....	52
25. Intravital fluorescent microscopic images (20x) demonstrate macromolecular leakage from vessels to the interstitial fluid of 200 mg/kg BWcurcumin treated groups.....	53
26. Intravital fluorescent microscopic images (20x) demonstrate macromolecular leakage from vessels to the interstitial fluid of 600 mg/kg BWcurcumin treated groups.....	54
27. A bar graph shows the mean $\pm$ SD of serum VEGF level (pg/ml) of experimental groups.....	56
28. A bar graph shows the mean $\pm$ SD of NF-KB expression (%) of experimental groups.....	57
29. Immunohistochemical staining of NF-KB p65 antibody of all studied group.....	58
30. Immunohistochemical staining of NF-KB p65 antibody of control and <i>H.pylori</i> infected groups.....	59
31. Diagram of this study.....	71

## LIST OF ABBREVIATIONS

AP-1	=	Activator protein-1
APCs	=	Antigen-presenting cells
BW	=	Body weight
°C	=	Degree Celsius
CagA	=	Cytotoxin-associated gene product A
<i>cag</i> PAI	=	<i>cag</i> Pathogenicity Island gene
CCl <sub>4</sub>	=	Carbon tetrachloride
CFU/ml	=	Colony forming unit per milliliter
cm	=	Centimeter
CO <sub>2</sub>	=	Carbondioxide
CVs	=	Collecting venules
Da	=	Dalton
DAB	=	Diaminobenzidine
DBP	=	Diastolic blood pressure
ELAM-1	=	Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	=	Endothelial nitric oxide synthase
ERK	=	Extracellular signal-regulated kinase
FGF	=	Fibroblast growth factor
g	=	Gram
G	=	Gravity
GSTP1-1	=	Glutathione S-transferase P1-1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	=	Hydrogenperoxide
<i>H. pylori</i>	=	<i>Helicobacter pylori</i>
H&E	=	Hematoxylin and Eosin
HGF	=	Hepatocyte growth factor
HR	=	Heart rate
ICAM-1	=	Intercellular adhesion molecule-1
IHC	=	Immunohistochemistry

## LIST OF ABBREVIATIONS (Continue)

IKB	=	NF-KB inhibitor
IKK	=	NF-KB inhibitor-kinase
IL	=	Interleukin
ip	=	Intraperitoneal injection
JNK	=	c-Jun N-terminal kinase
kDa	=	Kilo Dalton
kg	=	Kilogram
LPS	=	Lipopolysaccharide
m	=	Meter
MA	=	Muscle arteriole
MALT	=	Mucosa-associated lymphoid tissue
MAP	=	Mean arterial blood pressure
MAPK	=	Mitogen-activated protein kinase
MC	=	Muscle capillary
MEK	=	Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal-regulated kinase kinase
mg	=	Milligram
mmHg	=	Millimeter of mercury
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
mm <sup>2</sup>	=	Millimeter square
MTA	=	Mucosal terminal arterioles
MV	=	Muscle venules
NAP	=	Neutrophil-activating protein
NF-KB p65	=	Nuclear factor-kappa B subunit p65
NLS	=	Nuclear localization sequence
nm	=	Nanometer
O.D.	=	Optical density
PAF	=	Platelet activating factor

**LIST OF ABBREVIATIONS (Continue)**

PCVs	=	Postcapillary venules
PGE2	=	Prostaglandin E <sub>2</sub>
pg/ml	=	Picogram per milliliter
PI(3)K	=	Phosphatidylinositol-3-OH kinase
PLC- $\gamma$	=	Phospholipase C- $\gamma$
rpm	=	Round per minute
RH	=	Rel homology
ROS	=	Reactive oxygen species
SA	=	Small arteries
SBP	=	Systolic blood pressure
SD	=	Standard deviation
SMA	=	Submucosal arterioles
SMV	=	Submucosal venules
SV	=	Small veins
T4SS	=	Type IV secretion system
TGF	=	Transforming growth factor
Th	=	T helper
TNF	=	Tumor necrosis factor
TPA	=	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
$\mu$ l	=	Microliter
$\mu$ m	=	Micrometer
VacA	=	Vacuolating cytotoxin A
VCAM-1	=	Vascular-cell adhesion molecule-1
VEGF	=	Vascular endothelial growth factor
<i>veg</i> f-A	=	Vascular endothelial growth factor-A gene
VVOs	=	Vesiculo-vacuolar organelles