

ฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อกระบวนการอักเสบและอะพอโทซิสของเซลล์กระเพาะอาหาร
ที่ติดเชื้อ *Helicobacter pylori*

นางสาววริยา เนมิตกนาม



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช

ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACTIVITIES OF *Kaempferia parviflora* EXTRACT AGAINST INFLAMMATION AND
APOPTOSIS OF *Helicobacter pylori* INFECTED-GASTRIC CELLS

Miss Variya Nemidkanam



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Molecular Science of Medical
Microbiology and Immunology
Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology
Faculty of Allied Health Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2016
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อกระบวนการอักเสบ
และอะพอโทซิสของเซลล์กระเพาะอาหารที่ติดเชื้อ
Helicobacter pylori

โดย

นางสาววริยา เนมิตกนาม

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์
และวิทยาภูมิคุ้มกัน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาสนีย์ อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร ชื้อชวาลกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. รัฐกร วิไลชนม์)

วริยา เนมิตกนาม : ฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อกระบวนการอักเสบและอะพอโทซิสของเซลล์กระเพาะอาหารที่ติดเชื้อ *Helicobacter pylori* (ACTIVITIES OF *Kaempferia parviflora* EXTRACT AGAINST INFLAMMATION AND APOPTOSIS OF *Helicobacter pylori* INFECTED-GASTRIC CELLS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. นันทรี ชัยชนะ วงศาโรจน์, 146 หน้า.

กระบวนการอักเสบและการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิสเป็นกระบวนการตอบสนองของเซลล์ที่ทำให้เกิดมะเร็งกระเพาะอาหารที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* จากปัญหาการดื้อยาที่เพิ่มสูงขึ้น สมุนไพรจึงเป็นการรักษาอีกทางเลือกหนึ่ง กระชายดำเป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีสรรพคุณใช้รักษาโรกระบบทางเดินอาหารและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อกระบวนการอักเสบและการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส โดยทำการทดสอบคัดกรองสารสกัดกระชายดำและเคอร์คิวมิน โดยทดสอบฤทธิ์ต่อการอยู่รอดของเซลล์ AGS ด้วยวิธี MTT ฤทธิ์ต่อการหลั่ง IL-8 ด้วยวิธี ELISA ฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของโมโนไซต์และนิวโทรฟิลล์ด้วยวิธี Boyden assay และทดสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7, caspase-8 และการแตกหักของดีเอ็นเอด้วยวิธี ELISA พบว่าเคอร์คิวมินเป็นพิษต่อเซลล์ AGS มากกว่าสารสกัดกระชายดำ และไม่สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-8 ในเซลล์ AGS ที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *H. pylori* ในขณะที่สารสกัดกระชายดำที่ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลกระทบต่ออายุรอดของเซลล์ AGS และยับยั้งการหลั่ง IL-8 ได้ 63% รวมถึงยับยั้งการเคลื่อนที่ของโมโนไซต์ที่กระตุ้นโดยโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* และ LPS ของเชื้อ *E. coli* ได้ เท่ากันที่ 61% และยับยั้งการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลล์ที่กระตุ้นโดย IL-8 ได้ 57% รวมถึงยับยั้งการแสดงออกของ MCP-1 สารสกัดกระชายดำยังมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ caspase - 3/7 และ 8 ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อได้ 85% และ 24% แต่ไม่สามารถยับยั้งการแตกหักของดีเอ็นเอได้ ดังนั้นกระชายดำเป็นสมุนไพรที่ใช้ต้านการหลั่งไซโตไคน์ การเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวและการทำงานของเอนไซม์ caspases ที่เป็นส่วนสำคัญในกระบวนการอักเสบและการตายของเซลล์กระเพาะอาหารแบบอะพอโทซิสเนื่องจากการติดเชื้อ *H. pylori* ได้

ภาควิชา เวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุล ลายมือชื่อนิสิต

ชีววิทยาคคลินิก ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุล

ชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยา

ภูมิคุ้มกัน

ปีการศึกษา 2559

5876660937 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORDS: HELICOBACTER PYLORI, KAEMPFERIA PARVIFLORA, INFLAMMATION, APOPTOSIS

VARIYA NEMIDKANAM: ACTIVITIES OF *Kaempferia parviflora* EXTRACT AGAINST INFLAMMATION AND APOPTOSIS OF *Helicobacter pylori* INFECTED-GASTRIC CELLS. ADVISOR: ASST. PROF. NUNTAREE CHAICHANAWONGSAROJ, Ph.D., 146 pp.

Inflammation and apoptosis are *H. pylori*-related cell responses. Plants extract is an alternative *H. pylori* infection treatment due to an elevation antimicrobial resistance. *Kaempferia parviflora* is a Thai traditional medicine for gastrointestinal diseases with anti-*H. pylori* activity. Thus, the effect of *K. parviflora* to inflammation and apoptosis was focused in this study. *K. parviflora* extract (KPE) and curcumin (CM) were screened for cell viability by MTT assay and IL-8 secretion by ELISA. KPE to monocyte and neutrophil chemotaxis was undertaken by Boyden assay and caspase-3/7 and 8 activities, DNA fragmentation was done by ELISA. CM exacerbated cell viability more than KPE, and could not reduce IL-8 secretion from infected AGS cell. 16 µg/ml KPE not decreased cell viability but reduced 63% of IL-8 secretion and inhibited MCP-1. KPE decreased 61% of monocyte chemotaxis attracted by *H. pylori* protein and LPS of *E. coli*. Neutrophil chemotaxis attracted by IL-8 was also inhibited by 57%. KPE reduced 85% and 24% of caspase-3/7 and 8 on infected cell, but not decreased DNA fragmentation. Accordingly, *K. parviflora* is an effective herb for ameliorating cytokine secretion, leukocyte chemotaxis and caspases activities which are the major pathways of inflammation and apoptosis mediated by *H. pylori* infection.

Department: Transfusion Medicine and Student's Signature

Clinical Microbiology Advisor's Signature

Field of Study: Molecular Science of
Medical Microbiology and
Immunology

Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจากบุคคลที่ให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ โดยเฉพาะผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์

อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ที่ให้คำแนะนำทั้งในการวางแผนงานวิจัย และติดตามความก้าวหน้าของงานวิจัยด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ตลอดจนให้โอกาสในการหาประสบการณ์ในการทำงานวิจัยที่ต่างประเทศ ข้าพเจ้าตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์ จึงใคร่ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รั้ววงศ์จิรกุล ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เซลล์ มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด AGS ในการทำวิจัยและให้คำแนะนำในการแก้ไขจุดบกพร่องของงานวิจัย

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ชื้อชวาลกุล ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , Professor Tetsuo Kubota และ Dr. Yuko Kato Department of Microbiology and Immunology, Tokyo Medical and Dental University ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์วัสดุและสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์และให้คำปรึกษาแนะนำงานวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.นพ.รัฐกร วิไลชนม์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่กรุณากรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงเจริญพระชนม์มายุครบ 72 พรรษา ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ทุนไปทำวิจัยในต่างประเทศและบางส่วนจากทุนคณะสหเวชศาสตร์

ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณคุณแม่ คุณแม่ ครอบครั้ว และเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูป	15
สารบัญตาราง.....	18
บทที่ 1 บทนำ	19
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	19
1.2 คำถามของการวิจัย	22
1.3 สมมติฐาน	22
1.4 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	23
1.5 ขอบเขตงานวิจัย	23
1.6 กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	24
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	25
1. เชื้อ <i>H. pylori</i>	25
1.1 การค้นพบ.....	25
1.2 ลักษณะทั่วไปทางจุลชีววิทยา.....	27
1.3 ช่องทางการติดต่อของเชื้อ	28
1.4 ปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ	29
1.5 ระบาดวิทยา	30
1.6 พยาธิกำเนิด พยาธิสภาพและการก่อโรค	32
1.7 แนวทางการรักษา.....	33

2. กระบวนการอักเสบ.....	34
2.1 Nuclear factor kappa B (NF- κ B)	35
2.1.1 Interleukin 8 (IL-8).....	37
2.1.2 Interleukin 1 beta (IL-1 β).....	37
2.1.3 Tumor necrosis factor (TNF- α)	38
2.1.4 Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1).....	39
2.2 กระบวนการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาว.....	40
2.2.1 การเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์.....	40
2.2.2 การเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล.....	41
3. กระบวนการตายแบบอะพอโทซิส	42
3.1 Extrinsic pathway.....	42
3.2 Intrinsic pathway	43
3.3 Cytotoxic lymphocyte-initiated granzyme B pathway.....	44
4. สารจากพืชและสมุนไพรต่อการตอบสนองของเซลล์.....	45
5. กระชายดำ (<i>Kaempferia parviflora</i>)	46
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย.....	48
1. สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยและการเพาะเลี้ยงเชื้อ.....	49
2. การเตรียมสารละลายของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมิน	49
3. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินที่น้อยที่สุดใน การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยวิธี Agar dilution.....	50
4. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเยื่อบุกระเพาะอาหาร.....	50
5. การนับปริมาณเซลล์	51

6. การทดสอบหาปริมาณเซลล์ AGS ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบการอยู่รอดของเซลล์ ด้วยวิธี MTT.....	52
7. การทดสอบสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ ต่อการอยู่รอดของเซลล์ AGS.....	52
8. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบเบื้องต้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินต่อการหลั่งสารอินเตอร์ลิวคิน-8 (IL-8) ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i>	53
8.1 การวัดปริมาณของเชื้อโดยวิธีวัดความขุ่นของเชื้อและการนับโคโลนี.....	53
8.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินในสภาวะ co-culture.....	54
8.3 การตรวจวัดปริมาณ IL-8 ด้วยวิธี ELISA.....	55
9. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการหลั่งสารอินเตอร์ลิวคิน-8 (IL-8) ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i>	55
9.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในสภาวะ co-culture ที่เวลาต่างๆ.....	56
9.2 การทดสอบฤทธิ์ป้องกันการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในสภาวะ pre-treatment ที่เวลาต่างๆ.....	56
9.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำหลังจากเซลล์ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> (pre-infection).....	57
9.4 การตรวจวัดปริมาณ IL-8 ด้วยวิธี ELISA.....	57
10. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการแสดงออกของโปรตีน MCP-1 ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยวิธี Western Blot....	58
10.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในสภาวะ co-culture ที่เวลา 12 ชั่วโมง.....	58
10.2 การสกัดโปรตีนภายในเซลล์.....	58
10.3 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford และการเตรียมโปรตีน.....	59

10.4 การแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE	59
10.5 การย้ายโปรตีนลงบนเมมเบรน (Protein Blotting)	60
10.6 การตรวจสอบโปรตีนด้วยแอนติบอดี	60
11. การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในเซลล์ เม็ดเลือดขาวที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ <i>H. pylori</i>	61
11.1 การสกัดโปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อ <i>H. pylori</i> โดยใช้คลื่นเสียง.....	61
11.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ THP-1 และ HL-60	62
11.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ที่ตอบสนองต่อโปรตีนของเชื้อ <i>H. pylori</i>	62
11.3.1 การเตรียมเซลล์ THP-1.....	62
11.3.2 การเตรียม Transwells สำหรับการทดสอบ	62
11.3.3 การทดสอบปริมาณโปรตีนของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่เหมาะสมต่อการทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์	63
11.3.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ที่ตอบสนองต่อโปรตีนของเชื้อ <i>H. pylori</i> และ LPS.....	63
11.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ที่ตอบสนองต่อสาร IL-8	67
11.4.1 การทดสอบเวลาที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์ HL-60 เป็นนิวโทรฟิลล์.....	67
11.4.2 การตรวจวัด CD 11b marker ด้วยวิธี Flow cytometry.....	68
11.4.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์.....	68
12. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ของเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยวิธี ELISA.....	71

12.1 การทดสอบเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ของเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i>	71
12.1.1 การเตรียมเซลล์สำหรับการทดสอบ	71
12.1.2 การตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ด้วยวิธี luminescence assay.....	71
12.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8.....	71
13. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยวิธี ELISA.....	72
13.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในสภาวะ co-culture ที่เวลาต่างๆ.....	72
13.2 การทดสอบฤทธิ์ป้องกันการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในสภาวะ pre-treatment ที่เวลาต่างๆ	72
13.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในสภาวะ pre-infection	73
13.4 การตรวจวัดระดับของเอนไซม์ caspase-3/7 ด้วยวิธี luminescence assay	74
14. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยวิธี ELISA.....	74
14.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการแตกหักของดีเอ็นเอของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในสภาวะ co-culture ที่เวลาต่างๆ	74
14.2 การตรวจสอบการแตกหักของดีเอ็นเอ	74
15. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	75
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	76
1. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินที่น้อยที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยวิธี Agar dilution.....	76

2. การทดสอบสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินต่อการอยู่รอดของเซลล์ AGS ด้วยวิธี MTT	76
2.1 การทดสอบหาปริมาณเซลล์ AGS ที่เหมาะสม	76
2.2 การทดสอบสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ ต่อการอยู่รอดของเซลล์ AGS	77
3. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบเบื้องต้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและขมิ้นชันต่อการหลั่งสารอินเตอร์ลูคิน-8 (IL-8) ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i>	81
3.1 การทดสอบหาปริมาณเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่เหมาะสม	81
3.2 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินต่อการหลั่งสารอินเตอร์ลูคิน-8 ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะ co-culture	82
4. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการหลั่งสาร อินเตอร์ลูคิน-8 ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่สภาวะและเวลาต่างๆกัน	86
4.1 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการหลั่ง สารอินเตอร์ลูคิน-8 ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่สภาวะ co-culture	86
4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการหลั่ง สารอินเตอร์ลูคิน-8 ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะ pre-treatment	89
4.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการหลั่งสาร อินเตอร์ลูคิน-8 หลังจากเซลล์ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> (pre-infection)	91
5. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการแสดงออกของ โปรตีน MCP-1 ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยวิธี Western Blot ...	92
6. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ที่ตอบสนองต่อโปรตีนของเชื้อ <i>H. pylori</i>	93
6.1 การทดสอบปริมาณโปรตีนของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่เหมาะสมต่อการทดสอบ การเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์	93

6.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ที่ตอบสนองต่อโปรตีนของเชื้อ <i>H. pylori</i> และ LPS.....	94
7. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ที่ตอบสนองต่อสาร IL-8.....	97
7.1 การทดสอบเวลาที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์ HL-60 เป็นนิวโทรฟิลล์.....	97
7.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์.....	99
8. การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและขมิ้นชันต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ของเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยวิธี ELISA	100
8.1 การทดสอบระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ของเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i>	100
8.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมิน ต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8.....	101
9. การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยวิธี ELISA	103
10. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยวิธี ELISA.....	105
10.1 การทดสอบฤทธิ์ด้านการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ ในสภาวะ co-culture ที่เวลาต่างๆ	105
10.2 การทดสอบฤทธิ์ป้องกันการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในสภาวะ pre-treatment ที่เวลาต่างๆ	107
10.3 การทดสอบฤทธิ์ด้านการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ ในสภาวะ pre-infection.....	109
11. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยวิธี ELISA.....	111
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	113

สรุปผลการทดลอง.....	125
รายการอ้างอิง	126
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	146



สารบัญรูป

รูปที่ 1 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>H. pylori</i>	27
รูปที่ 2 แสดงปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่มีผลกระทบต่อเซลล์.....	29
รูปที่ 3 แสดงอัตราการเกิดใหม่และอัตราการตายจากโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร.....	31
รูปที่ 4 พยาธิสภาพของกระเพาะอาหารเนื่องจากการติดเชื้อ <i>H. pylori</i> และปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง... 33	
รูปที่ 5 แสดงกลไกการกระตุ้น NF- κ B ในระดับโมเลกุลผ่านทาง Canonical pathway และ Non-canonical pathway.....	36
รูปที่ 6 แสดงกลไกการกระตุ้นการอะพอโทซิสในระดับโมเลกุลผ่านทาง Extrinsic pathway Intrinsic pathway และ Cytotoxic lymphocyte-initiated granzyme B pathway	45
รูปที่ 7 กระจายดำ (<i>Kaempferia parviflora</i>).....	47
รูปที่ 8 Hemocytometer counting chamber	52
รูปที่ 9 การย้ายโปรตีนลงบนเมมเบรน (Protein Blotting).....	60
รูปที่ 10 การทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์.....	65
รูปที่ 11 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ AGS หลังจากบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระจายดำความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 8 - 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง.....	79
รูปที่ 12 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ AGS หลังจากบ่มกับเคอร์คิวมินความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 8 - 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง	80
รูปที่ 13 กราฟแสดงปริมาณ IL-8 ที่หลั่งจากออกเซลล์ AGS และเซลล์ AGS ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะ co-culture ที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระจายดำความเข้มข้น 16 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของสุดท้าย DMSO 0.32% และ 0.032% ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	84
รูปที่ 14 กราฟแสดงปริมาณ IL-8 ที่หลั่งจากออกเซลล์ AGS และเซลล์ AGS ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะ co-culture ที่มีเคอร์คิวมินความเข้มข้น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่มีความเข้มข้นของสุดท้าย DMSO 0.32% และ 0.032% ที่เวลา 24 ชั่วโมง	85

รูปที่ 15 กราฟแสดงปริมาณ IL-8 ที่หลังจากออกเซลล์ AGS และเซลล์ AGS ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะ co-culture ที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง.....	87
รูปที่ 16 กราฟแสดงปริมาณ IL-8 ที่หลังจากออกเซลล์ AGS และเซลล์ AGS ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะ co-culture ที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	88
รูปที่ 17 ปริมาณ IL-8 ที่หลังจากเซลล์ AGS ที่บ่มกับสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะ pre-treatment ที่เวลารวม 6 และ 12 ชั่วโมง.....	90
รูปที่ 18 ปริมาณ IL-8 ที่หลังจากเซลล์ AGS ที่บ่มกับสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะ pre-infection ที่เวลารวม 12 ชั่วโมง.....	91
รูปที่ 19 การแสดงออกของโปรตีน MCP-1 จากเซลล์ AGS ที่บ่มกับสกัดกระชายดำ ที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะ co-culture ที่เวลา 12 ชั่วโมง.....	92
รูปที่ 20 กราฟแสดงการกระจายของจำนวนเซลล์โมโนไซต์ที่เคลื่อนที่เนื่องจากการตอบสนองต่อโปรตีนของเชื้อ <i>H. pylori</i> ความเข้มข้นต่าง	94
รูปที่ 21 กราฟแสดงฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการกระจายของจำนวนเซลล์โมโนไซต์ที่เคลื่อนที่เนื่องจากการตอบสนองต่อโปรตีนของเชื้อ <i>H. pylori</i>	96
รูปที่ 22 กราฟแสดงฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการกระจายของจำนวนเซลล์โมโนไซต์ที่เคลื่อนที่เนื่องจากการตอบสนองต่อ LPS ของเชื้อ <i>E. coli</i>	96
รูปที่ 23 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ CD11b ของเซลล์ HL-60 หลังจากถูกกระตุ้นด้วย 1.25% DMSO ที่จำนวนวันต่างๆ.....	98
รูปที่ 24 กราฟแสดงฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการกระจายของจำนวนเซลล์นิวโทรฟิลล์ที่เคลื่อนที่เนื่องจากการตอบสนองต่อ IL-8.....	99
รูปที่ 25 กราฟแสดงระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ในเซลล์ AGS ในสภาวะที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง	100

รูปที่ 26 กราฟแสดงฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ในเซลล์ AGS ที่มีและไม่มีเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะ co-culture ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	102
รูปที่ 27 กราฟแสดงฤทธิ์การยับยั้งของเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 16 $\mu\text{g/ml}$ ต่อการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ในเซลล์ AGS ที่มีและไม่มีเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะ co-culture ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	102
รูปที่ 28 กราฟแสดงฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในเซลล์ AGS ที่มีและไม่มีเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะ co-culture ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	104
รูปที่ 29 กราฟแสดงฤทธิ์การยับยั้งของเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 16 $\mu\text{g/ml}$ ต่อการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในเซลล์ AGS ที่มีและไม่มีเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะ co-culture ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	104
รูปที่ 30 กราฟแสดงการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของเซลล์ AGS ที่บ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ และเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะ co-culture ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง.....	106
รูปที่ 31 กราฟแสดงการระดับทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของเซลล์ AGS ที่บ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ และเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะ pre-treatment ที่เวลาบ่มรวม 6 และ 12 ชั่วโมง.....	108
รูปที่ 32 กราฟแสดงการระดับทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของเซลล์ AGS ที่บ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ และเชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะ pre-infection ที่เวลาบ่มรวม 12 ชั่วโมง.....	110
รูปที่ 33 กราฟแสดงค่า enrichment factor ของการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์ AGS ที่บ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำความเข้มข้นต่างๆ และ เชื้อ <i>H. pylori</i> ในสภาวะ co-culture ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง.....	112

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงแต่ละสปีชีส์ของ <i>Helicobacter</i> ที่สามารถการก่อโรคในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ.....	26
ตารางที่ 2 แสดงสารละลายที่เติมลงในหลุมด้านบนและหลุมด้านล่างของแต่ละชนิดของหลุมทดสอบในการทดสอบการเคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์.....	66
ตารางที่ 3 แสดงสารละลายที่เติมลงในหลุมด้านบนและหลุมด้านล่างของแต่ละชนิดของหลุมทดสอบในการทดสอบการเคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์.....	67
ตารางที่ 4 แสดงสารละลายที่เติมลงในหลุมด้านบนและหลุมด้านล่างของแต่ละชนิดของหลุมทดสอบในการทดสอบการเคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์.....	70
ตารางที่ 5 การเจริญของเชื้อ <i>H. pylori</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4 - 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	76
ตารางที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงสุทธิจากการทดสอบการอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT โดยใช้เซลล์ AGS ตั้งต้นจำนวนต่างๆ	77
ตารางที่ 7 จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรที่ความขุ่นต่างๆ.....	82

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

Helicobacter pylori (*H. pylori*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเกลียว มีแฟลกเจลลา ใช้ในการเคลื่อนที่ สามารถติดต่อเข้าสู่คนได้ง่าย เนื่องจากเชื้อปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม สัตว์เลี้ยง และสามารถติดต่อจากคนสู่คนโดยการรับประทานอาหารร่วมกันหรือรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนอุจจาระ (1, 2) โดย Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ได้จัดให้การติดเชื้อนี้เกี่ยวข้องกับการท้องเที่ยว โดยเฉพาะการท้องเที่ยวในประเทศที่กำลังพัฒนา หรือประเทศที่มีสุขอนามัยที่ไม่ดี และเนื่องจากการติดเชื้อนี้เกิดได้ง่ายและมีช่องทางการติดต่อหลายวิธี จึงส่งผลให้พบอัตราการติดเชื้อสูงประมาณ 50% ของประชากรทั่วโลก โดยในประเทศไทยมีอัตราการติดเชื้อประมาณ 57% ส่วนในประเทศเพื่อนบ้าน เช่น เวียดนามมีอัตราการติดเชื้อสูงถึง 75% (3) และจีน 67% (4)

เชื้อ *H. pylori* มักอาศัยและก่อโรคในกระเพาะอาหาร เนื่องจากสามารถทนอยู่ในสภาวะกรดของกระเพาะอาหารได้ดี โดยอาศัยความสามารถของเอนไซม์ยูรีเอสในการย่อยสลายยูเรียในกระเพาะอาหารและได้ผลผลิตเป็นแอมโมเนียที่มีฤทธิ์เป็นด่างมาเจือจางกรดได้ ทั้งยังสามารถเข้าชั้นเยื่อเมือกของกระเพาะอาหารเพื่อป้องกันตัวเองจากกรดได้อีกด้วย (1) และเนื่องจากการศึกษาบทบาทของเชื้อ *H. pylori* กับโรคมะเร็งกระเพาะอาหารอย่างกว้างขวาง โดยพบว่าเชื้อนี้เป็นปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เซลล์กระเพาะอาหารปกติเปลี่ยนแปลงไปและมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนที่ผิดปกติทำให้กลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ ดังนั้น *H. pylori* จึงถูกจัดเป็นสารก่อมะเร็งประเภทที่ 1 ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกับ ไวรัสตับอักเสบบี บุหรี่และแอลกอฮอล์ โดยสามารถชักนำให้เซลล์กลายเป็นเซลล์มะเร็งได้โดยไม่ต้องอาศัยปัจจัยอื่นมาสนับสนุน (5) โรคมะเร็งที่พบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับเชื้อนี้คือ gastric adenocarcinoma, gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma เป็นต้น ทั้งนี้พบว่าในทวีปเอเชียตะวันออก มีอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งกระเพาะอาหารสูงที่สุดในโลก โดยมีอุบัติการณ์เป็นครึ่งหนึ่งของอุบัติการณ์ทั่วโลก ซึ่งสอดคล้องไปตามอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ (6) โดยในปี 2012 องค์การอนามัยโลกได้รายงานอัตราการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหารในประเทศ

ญี่ปุ่นมี 30 คนต่อประชากรแสนคน ซึ่งเป็นอัตราามากที่สุดในเอเชียตะวันออก, ประเทศจีนมี 23 คนต่อประชากรแสนคน ส่วนในประเทศไทยพบอัตราการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร 3 คนต่อประชากรแสนคน

กลไกส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดมะเร็งกระเพาะอาหารนั้นอาศัยปัจจัยจากทั้งตัวเชื้อและการตอบสนองของเซลล์เจ้าบ้าน โดยตัวเชื้อมีปัจจัยความรุนแรงต่างๆ เช่น adhesin ที่ใช้เกาะติดเซลล์กระเพาะอาหาร, vacA cytotoxin และ cagA protein (7) ที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการตอบสนองของร่างกายได้เป็นอย่างดี ซึ่งปฏิกิริยาการอักเสบและกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิสเป็นสองกระบวนการที่มีบทบาทต่อการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร โดยปัจจัยความรุนแรงต่างๆของเชื้อสามารถกระตุ้นกระบวนการอักเสบของเซลล์โดยผ่าน NF- κ B ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สำคัญการถอดรหัสยีนของไซโตไคน์หลายชนิดที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เช่น IL-1 β , IL-8, TNF- α และ MCP-1 โดยที่ไซโตไคน์เหล่านี้มักทำหน้าที่เป็นสารดึงดูดเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบอื่นๆ มายังบริเวณที่มีการติดเชื้อ โดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์และโมโนไซต์ที่ทำหน้าที่หลักในการกำจัดเชื้อในระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity นอกจากนี้ปัจจัยความรุนแรงของเชื้อและไซโตไคน์บางชนิดจากปฏิกิริยาการอักเสบ สามารถกระตุ้นโมเลกุลต่างๆที่มีบทบาทสำคัญต่อการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารและเซลล์ต่อมที่ทำหน้าที่ผลิตกรดในกระเพาะอาหารด้วยเหตุนี้ทำให้จำนวนเซลล์และความเป็นกรดในกระเพาะอาหารลดลง ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งในการส่งเสริมการเจริญแบ่งตัวของเชื้อและเพิ่มระดับการตอบสนองของเซลล์ ส่งผลให้กระเพาะอาหารมีพยาธิสภาพที่รุนแรงขึ้นและอาจมีการดำเนินโรคไปถึงระยะมะเร็งกระเพาะอาหาร เนื่องจากสารอนุมูลอิสระที่เป็นผลผลิตจากกระบวนการตอบสนองของเซลล์สามารถชักนำให้สารพันธุกรรมในเซลล์ถูกทำลายและเกิดการกลายพันธุ์เนื่องจากสภาวะ oxidative stress ได้ (8)

ปัจจุบันการรักษาการติดเชื้อนี้จะใช้ยาคลาริโทรมายซินและเมโทรนิดาโซล ซึ่งเป็นยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาเบื้องต้น (First line therapy) แต่ในปัจจุบันพบเชื้อที่ดื้อต่อยาทั้ง 2 ชนิดมากขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพของยาในการกำจัดเชื้อออกจากกระเพาะอาหารลดลงและทำให้ผู้ป่วยมีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง ซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหารได้ มีงานวิจัยจำนวนมากศึกษาการใช้สารจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัยต่อร่างกายเพื่อการรักษาและป้องกันพยาธิสภาพของเซลล์เนื่องจากเชื้อ *H. pylori* โดยมีการศึกษาทั้งใน

ด้านการยับยั้งการเจริญของเชื้อหรือลดปัจจัยความรุนแรงต่างๆของเชื้อ เช่น สาร catechins ที่พบมากในใบชาสามารถกำจัดเชื้อออกจากกระเพาะอาหารของหนูทดลอง (9) สารสกัดจากพืชท้องถิ่นในประเทศปากีสถานสามารถลดการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอส (10) และสาร curcumin จากขมิ้นชันลดความสามารถในการเกาะติดของเชื้อกับเซลล์ได้โดยยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ (11) ทั้งนี้มีบางงานวิจัยศึกษาไปถึงความสามารถของสมุนไพรและพืชบางชนิดที่ใช้ประกอบอาหารในครัวเรือนเพื่อป้องกันการเกิดเซลล์มะเร็งเนื่องจากการติดเชื้อในหนูทดลอง (12)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสารสมุนไพรในการยับยั้งการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเซลล์ โดยเฉพาะการอักเสบและการอะพอโทซิส พบว่าในเซลล์ที่ติดเชื้อมีการกระตุ้นการอักเสบ โดยพบว่ามี การแสดงออก NF-kB และมีการเติมหมู่ฟอสเฟตที่โมเลกุล I κ B α ที่มากขึ้น ทำให้ NF-kB สามารถถอดรหัสยีนไซโตไคน์ต่างๆได้ ทั้งนี้สาร zerumbone จากเหง้ากระเทียม สามารถลดการแสดงออกของ NF-kB สาร apigenin ที่พบมากในผัก ผลไม้ ออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโมเลกุล I κ B α ได้ (13, 14) สารสกัดจากอบเชยและสาร curcumin จากขมิ้นชันสามารถลดการหลั่งและการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ (15, 16) และสาร cyanidin 3-O-Glucoside ที่จัดอยู่ในกลุ่มสาร anthocyanin ซึ่งพบมากในผลไม้ตระกูลเบอร์รี่สามารถยับยั้งการหลั่ง vacA cytotoxic จากเชื้อ *H. pylori* ส่งผลให้มีการลดระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 และ caspase-8 ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์ (17)

กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) เป็นพืชที่พบได้ในประเทศเขตร้อน มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ สารจำพวก methoxyflavone ซึ่งจะพบมากในส่วนเหง้าของกระชายดำ มีรายงานว่าสารสกัดกระชายดำมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา (18, 19) และยับยั้งการหลั่ง TNF- α และไนตริกออกไซด์ จากกระบวนการอักเสบของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (20) ทั้งยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งต่อทางเดินน้ำดี โดยส่งเสริมให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอโทซิสผ่านการทำงานของเอนไซม์ caspase มากขึ้น (21, 22) ทั้งนี้พบว่ากระชายดำสามารถยับยั้งการเจริญและการบุกรุกของเชื้อ *H. pylori* เข้าสู่เซลล์ได้ (23) ด้วยเหตุนี้จึงสันนิษฐานได้ว่า

สารสกัดจากกระชายดำน่าจะช่วยลดการตอบสนองต่างๆของเซลล์และป้องกันการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์เนื่องจากการติดเชื้อ *H. pylori* ได้

เนื่องจากการศึกษาสารสกัดจากกระชายดำต่อการตอบสนองของเซลล์กระเพาะอาหารที่ติดเชื้อ *H. pylori* นั้นมีอยู่อย่างจำกัด ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการยับยั้งการกระบวนการอักเสบและการตายแบบอะพอโทซิสที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพในกระเพาะอาหารที่ติดเชื้อ *H. pylori* รวมถึงศึกษากลไกระดับโมเลกุลของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการออกฤทธิ์ดังกล่าว ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการใช้สารสกัดจากกระชายดำในการรักษาและป้องกันการเกิดพยาธิสภาพในกระเพาะอาหารที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *H. pylori*

1.2 คำถามของการวิจัย

1. สารสกัดกระชายดำสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการอักเสบของเซลล์กระเพาะอาหารที่ติดเชื้อ *H. pylori* ได้หรือไม่
2. สารสกัดกระชายดำสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์และนิวโทรฟิลล์ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *H. pylori* ได้หรือไม่
3. สารสกัดกระชายดำสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการอะพอโทซิสของเซลล์กระเพาะอาหารที่ติดเชื้อ *H. pylori* ได้หรือไม่

1.3 สมมติฐาน

1. สารสกัดกระชายดำสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการอักเสบของเซลล์กระเพาะอาหารที่ติดเชื้อ *H. pylori* ได้
2. สารสกัดกระชายดำสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์และนิวโทรฟิลล์ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *H. pylori* ได้
3. สารสกัดกระชายดำสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการอะพอโทซิสของเซลล์กระเพาะอาหารที่ติดเชื้อ *H. pylori* ได้

1.4 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

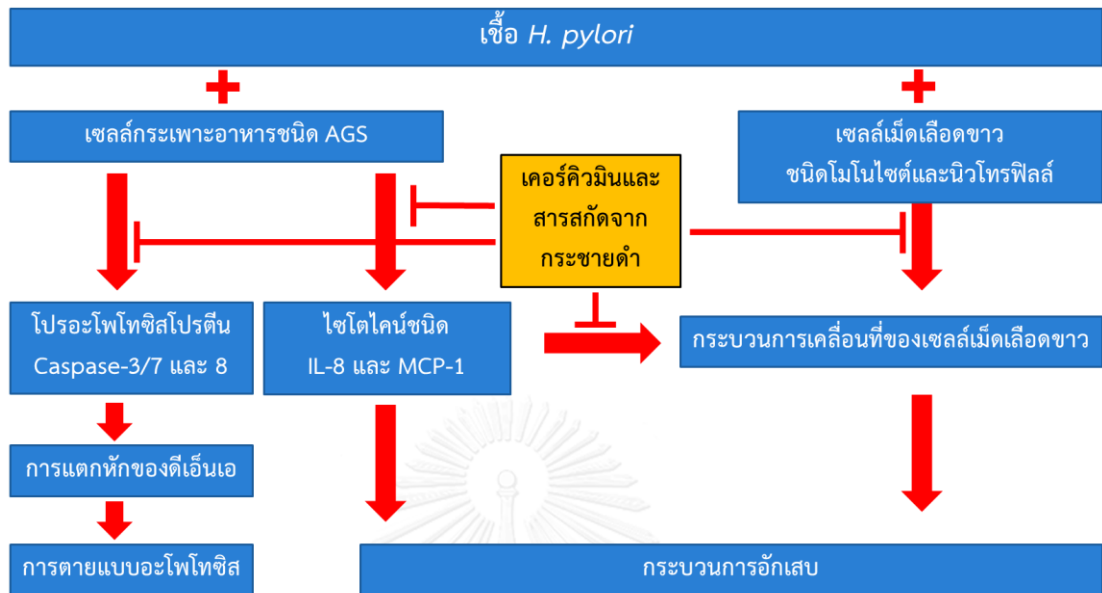
1. เพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในการยับยั้งกระบวนการอักเสบของเซลล์กระเพาะอาหารที่ติดเชื้อ *H. pylori*
2. เพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์และนิวโทรฟิลส์ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *H. pylori*
3. เพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในการยับยั้งกระบวนการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์กระเพาะอาหารที่ติดเชื้อ *H. pylori*

1.5 ขอบเขตงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้ใช้เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด adenocarcinoma (AGS) และทดสอบฤทธิ์ของกระชายดำที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทต่อการอยู่รอดของเซลล์ AGS ด้วยวิธี MTT จากนั้นเพาะเลี้ยงกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และทดสอบฤทธิ์ของกระชายดำที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทต่อกระบวนการอักเสบโดยการตรวจวัด IL-8 ด้วยวิธี ELISA และตรวจวัด MCP-1 ด้วยวิธี Western blot รวมถึงทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกดึงดูดด้วยโปรตีนที่สกัดจากเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และ LPS จากเชื้อ *E. coli* ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (THP-1) และทดสอบฤทธิ์ดังกล่าวต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลส์ที่เปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ตัวอ่อนระยะโปรโมอีโลไซต์ (HL-60) ที่ดึงดูดด้วย IL-8 รวมถึงตรวจสอบฤทธิ์ต่อกระบวนการตายแบบอะพอโทซิสโดยตรวจวัดการแตกหักของดีเอ็นเอ, caspase-3/7 และ caspase-8 ด้วยวิธี ELISA

ทั้งนี้ได้ทำการคัดกรองเคอร์คิวมินต่อการอยู่รอดของเซลล์ AGS ด้วยวิธี MTT จากนั้นเพาะเลี้ยงกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของเคอร์คิวมินต่อกระบวนการอักเสบโดยการตรวจวัด IL-8 ด้วยวิธี ELISA รวมถึงตรวจสอบฤทธิ์ต่อกระบวนการตายแบบอะพอโทซิสโดยตรวจวัดเอนไซม์ caspase-3/7 และ caspase-8 ด้วยวิธี ELISA

1.6 กรอบแนวความคิดในการวิจัย



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. เชื้อ *H. pylori*

1.1 การค้นพบ

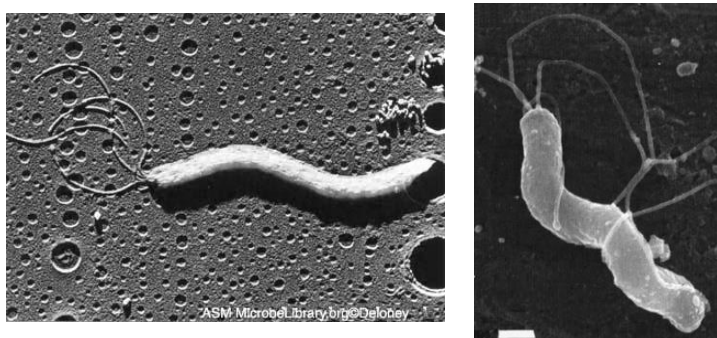
ในปี 1893 เป็นครั้งแรกที่มีการรายงานว่าพบแบคทีเรียรูปร่างเกลียวในกระเพาะอาหารของสุนัขโดย Bizzozero ต่อมาในปี 1906 มีการตรวจพบแบคทีเรียที่มีรูปร่างคล้ายกันในกระเพาะอาหารของผู้ป่วยเป็นโรคกระเพาะอาหารและมีการศึกษาขึ้นเนื้อจากกระเพาะอาหารของผู้ป่วยพบว่าเชื้อดังกล่าวมีความสัมพันธ์อย่างมากกับโรคกระเพาะอาหารอักเสบ จนกระทั่งในปี 1982 Robin Warren และ Barry Marshall ได้ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้จากชิ้นเนื้อของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารอักเสบซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวมีรูปร่างคล้ายกับ *Campylobacter* รวมไปถึงมีความคล้ายคลึงกันของผลการทดสอบชีวเคมีและอัตราส่วนระหว่าง guanine/cytosine ในสารพันธุกรรม จึงถูกจัดให้อยู่ในจีนัสของ *Campylobacter* และมีชื่อสปีชีส์เป็น *pyloridis* ต่อมา มีการเปลี่ยนชื่อเป็น *Campylobacter pylori* หลังจากการวิเคราะห์และสังเกตลักษณะภายนอกของ *Campylobacter pylori* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบความแตกต่างของ *Campylobacter pylori* กับ *Campylobacter* สปีชีส์อื่นๆ คือ ส่วนแฟลกเจลล่าของ *Campylobacter pylori* มีปลอกหุ้มและมีจำนวนแฟลกเจลล่ามากกว่า 1 เส้น และพบความแตกต่างกันของลำดับเบสบนยีนส์ 16s rRNA จากคุณลักษณะที่แตกต่างกันดังกล่าวจึงมีการตั้งชื่อจีนัสใหม่เป็น *Helicobacter* (24) โดยมี *Helicobacter pylori* เป็นสปีชีส์แรกที่ถูกบรรจุลงในจีนัส ปัจจุบันมีการค้นพบ *Helicobacter* หลายสปีชีส์แต่ *H. pylori* เป็นชนิดที่พบมากและมีมนุษย์เป็นสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้านจึงมีความสำคัญทางคลินิกมากที่สุด (1)

ตารางที่ 1 แสดงแต่ละสปีชีส์ของ *Helicobacter* ที่สามารถก่อโรคในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ (1)

สปีชีส์	สัตว์เจ้าบ้านระดับปฐมภูมิ	พยาธิสภาพ
Gastric <i>Helicobacter</i> spp.		
<i>H. pylori</i>	มนุษย์และไพรเมต	กระเพาะอาหารอักเสบ แผลในกระเพาะอาหาร gastric adenocarcinoma MALT lymphoma
<i>H. felis</i>	แมว สุนัข หนู	กระเพาะอาหารอักเสบและอาจเกิดแผลใน กระเพาะอาหาร gastric adenocarcinomaในหนู
<i>H. mustelae</i>	ตัวเฟอร์ริด	กระเพาะอาหารอักเสบ แผลในกระเพาะอาหาร gastric adenocarcinoma MALT lymphoma
<i>H. acinonychis</i>	สัตว์จำพวกเสือดาว	กระเพาะอาหารอักเสบ และแผลใน กระเพาะอาหาร
<i>H. heilmannii</i>	มนุษย์ แมว สุนัข หนู ลิง เสือดาว	กระเพาะอาหารอักเสบ อาหารไม่ย่อย MALT lymphoma
Enterohepatic <i>Helicobacter</i> spp.		
<i>H. hepaticus</i>	หนูและสัตว์ฟันแทะอื่นๆ	ตับอักเสบ, มะเร็งตับ, proliferative typhlocolitis

1.2 ลักษณะทั่วไปทางจุลชีววิทยา

เชื้อ *H. pylori* เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมลบ ไม่มีสปอร์ รูปร่างเป็นแท่ง มีขนาดยาวประมาณ 2.5-3 μm กว้าง 0.5-1 μm แต่อาจพบลักษณะเป็น U shape หรือ coccoid form ได้ หากมีการเพาะเลี้ยงเชื้อไว้นาน 3-4 วัน โดยจะเกิดจากการที่ periplasm ด้านในด้านหนึ่งของตัวเชื้อมีการเจริญเติบโตน้อยลง จึงทำให้ตัวเชื้อมีความโค้งงอมากขึ้นกลายเป็น U shape และเป็น coccoid form ในเวลาต่อมา (1) เชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลล่า 4-5 เส้น ซึ่งอยู่ที่ปลายด้านใดด้านหนึ่ง (lophotrichous flagella) (25) เชื้อมีการเคลื่อนที่แบบควงสว่าน (Screw-like movement) โดยอาศัยแฟลกเจลล่าดังกล่าว อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้คือ 34-40 $^{\circ}\text{C}$ แต่จะเจริญเติบโตได้ดีที่ 37 $^{\circ}\text{C}$ ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อย (Microaerophilic : 85% ไนโตรเจน, 10% คาร์บอนไดออกไซด์, และ 5% ออกซิเจน) นอกจากนี้ *H. pylori* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงยาก (Fastidious Bacteria) จึงจำเป็นต้องเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารพิเศษ เช่น เลือดหรือซีรัม และใช้เวลาเพาะเลี้ยงเชื่อนานประมาณ 3-7 วัน ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีขนาดเล็ก ใส และมีผิวเรียบ ผลการทดสอบทางชีวเคมีพบว่าให้ผล catalase บวก และ urease บวกอย่างรวดเร็ว เนื่องจากจำเป็นต้องเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานานกว่าปกติ ส่งผลให้มีความเสี่ยงต่อการเจริญของจุลชีพชนิดอื่นๆ เช่น แบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งมักมีโคโลนีขนาดใหญ่กว่า *H. pylori* มาก ดังนั้นเมื่อมีจุลชีพอื่นปนเปื้อน จะเจริญเบียดบังโคโลนีของ *H. pylori* ทำให้ยากต่อการคัดเลือกเฉพาะโคโลนี *H. pylori* ไปทำการทดสอบต่อในห้องปฏิบัติการบางแห่งจึงนิยมเติมยาปฏิชีวนะลงไปในการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วย



รูปที่ 1 แสดงลักษณะของเชื้อ *H. pylori*

(ที่มา: Cindy R. DeLoney, Loyola University of Chicago, Chicago, Illinois และ The MicrobeLibrary,(25))

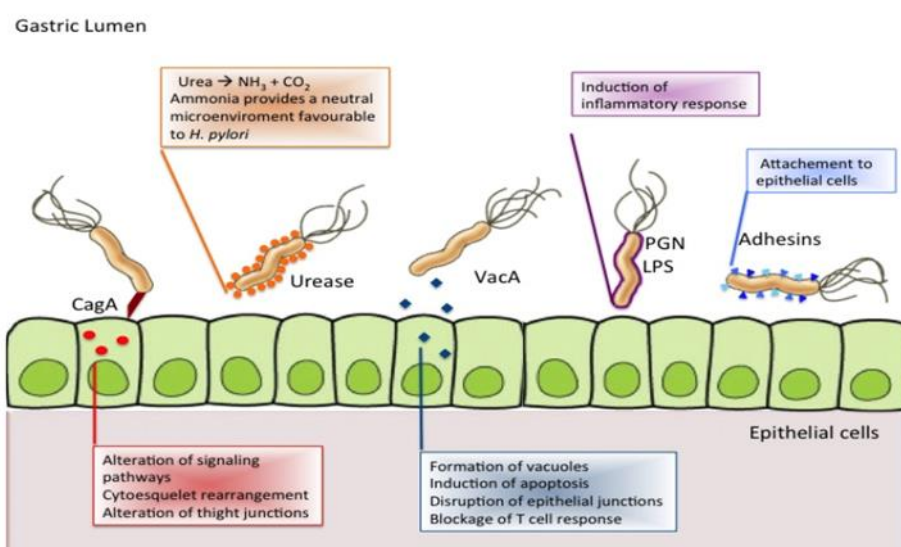
1.3 ช่องทางการติดต่อของเชื้อ

เป็นที่ทราบอย่างแน่ชัดแล้วว่า วิธีการที่เชื้อ *H. pylori* เข้าสู่ร่างกายนั้นผ่านมาจากช่องปาก แล้วเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร แต่ในส่วนของแหล่งที่มาของเชื้อยังไม่เป็นที่ทราบอย่างแน่ชัด ว่ารับมาจากแหล่งใดเป็นหลัก เนื่องจากเชื้อ *H. pylori* สามารถอาศัยอยู่ทั้งในสิ่งมีชีวิต เช่น คน แมว หรือ แกะ รวมไปถึงในสิ่งแวดล้อม (2) เช่น แหล่งน้ำตามธรรมชาติ ยังมีรายงานการตรวจพบเชื้อในน้ำดื่มบรรจุขวด 8 ตัวอย่างจากทั้งหมด 450 ตัวอย่าง ทั้งนี้เชื้อที่ตรวจพบเป็นสายพันธุ์ที่มี ปัจจัยความรุนแรงสูง *vacAs1a* ถึง 100% , *vacAm1a* 87.5 % และ *cagA* 62.5 % รวมถึงพบว่าเชื่อดังกล่าวยังมีการดื้อต่อยา erythromycin และ clarithromycin ด้วย (26) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ของแหล่งของการติดเชื้อของชาวไทย ที่อาศัย ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่า การบริโภคอาหารพื้นบ้าน เช่น ปลา ร้า ปูดอง และ ส้มตำ เพิ่มความเสี่ยงของการติดเชื้อมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะปลา ร้าสามารถเพิ่มความเสี่ยง ต่อการติดเชื้อถึง 11.27 เท่า (27) ดังนั้นการรับประทานน้ำหรืออาหารที่ปนเปื้อนเชื้อจึงเป็นอีก ช่องทางการติดเชื้อที่สำคัญ

การติดต่อมาจากคนสู่คนเป็นอีกช่องทางหนึ่งที่มีหลักฐานสนับสนุนจำนวนมาก มีการศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อจากผู้ป่วยที่มีอาการแสดง 99 รายสู่สมาชิกในครอบครัว จากการตรวจแอนติเจนของเชื้อจากอุจจาระของสมาชิกในครอบครัวของผู้ป่วยแต่ละรายพบว่า สมาชิกในครอบครัวจำนวนถึง 126 รายจากจำนวน 131 ราย ตรวจพบแอนติเจนของเชื้อ (28) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อมี genotype เดียวกันภายในครอบครัว โดยเฉพาะจากแม่สู่ลูก (29) สันนิษฐานว่า แม่และลูกมีการสัมผัสกันอย่างใกล้ชิด โดยเชื้ออาจอยู่ในน้ำนมและน้ำลายของแม่ ทำให้ลูกมีโอกาสติดเชื้อจากการดื่มนมแม่ หรือจากการที่แม่บดเคี้ยวอาหารก่อนป้อนให้ลูก นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การติดเชื้ออาจสามารถมาจากสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการปศุสัตว์มีความเสี่ยงสูงกว่าสัตว์เลี้ยงในบ้าน โดยมีรายงานพบว่าในกระเพาะอาหารของแกะ รวมถึงในน้ำนมของแกะและวัว มีความชุกของเชื้อที่มียีนปัจจัยความรุนแรงชนิด *s1a/m2* ซึ่งรูปแบบความชุกของยีนปัจจัยความรุนแรงดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับความชุกของยีนปัจจัย ความรุนแรงในตัวอย่างจากกระเพาะอาหารผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ (30, 31)

1.4 ปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ

เอนไซม์ยูเรียเอสเป็นปัจจัยความรุนแรงที่สำคัญที่เชื้อสามารถผลิตออกมาได้ในจำนวนมาก ซึ่งจะเปลี่ยนยูเรียเป็นแอมโมเนียที่มีฤทธิ์เป็นด่าง ช่วยในการเจือจางสภาวะกรดในกระเพาะอาหารในบริเวณที่เชื้ออาศัยอยู่ได้ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยความรุนแรงอื่นๆ เช่น Adhesin ที่ใช้เกาะติดกับเซลล์เยื่อบุได้ดี ทำให้เชื้อถูกกำจัดออกจากกระเพาะอาหารได้ยากขึ้นและอยู่ในกระเพาะอาหารเป็นเวลานาน, Toxin จากส่วน Lipopolysaccharide จะสามารถกระตุ้นกระบวนการต่างๆภายในเซลล์ได้โดยผ่านตัวรับ Toll like receptor ชนิดต่างๆที่อยู่บนผิวเซลล์ Cytotoxin-associated A protein (cagA) เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติของความเป็นแอนติเจนสูง สามารถกระตุ้นกระบวนการต่างๆของเซลล์ได้โดยอาศัย type IV secretory system เจาะผ่านผนังเซลล์เข้ามาและปล่อย cagA protein เข้าสู่เซลล์โดยตรงทำให้กระตุ้นกระบวนการอักเสบของกระเพาะอาหารที่รุนแรงและเรื้อรัง (32) นอกจากนี้ตัวเชื้อยังสามารถหลั่งเปปไทด์สายสั้นๆที่เรียกว่า cecropin-like peptide (HP 2-20) และ Neutrophil Activating Protein (HP-NAP) ซึ่งมีความสามารถในการดึงดูดเม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่ติดเชื้อได้จำนวนมาก (33, 34) หรือหลั่ง vacuolating A cytotoxin (vacA) ที่กระตุ้นกระบวนการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์กระเพาะอาหาร โดยสร้าง vacuole ในเซลล์และรบกวนเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียได้ (35) ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ *H. pylori* ที่มีผลกระทบต่อเซลล์ (36)

1.5 ระบาดวิทยา

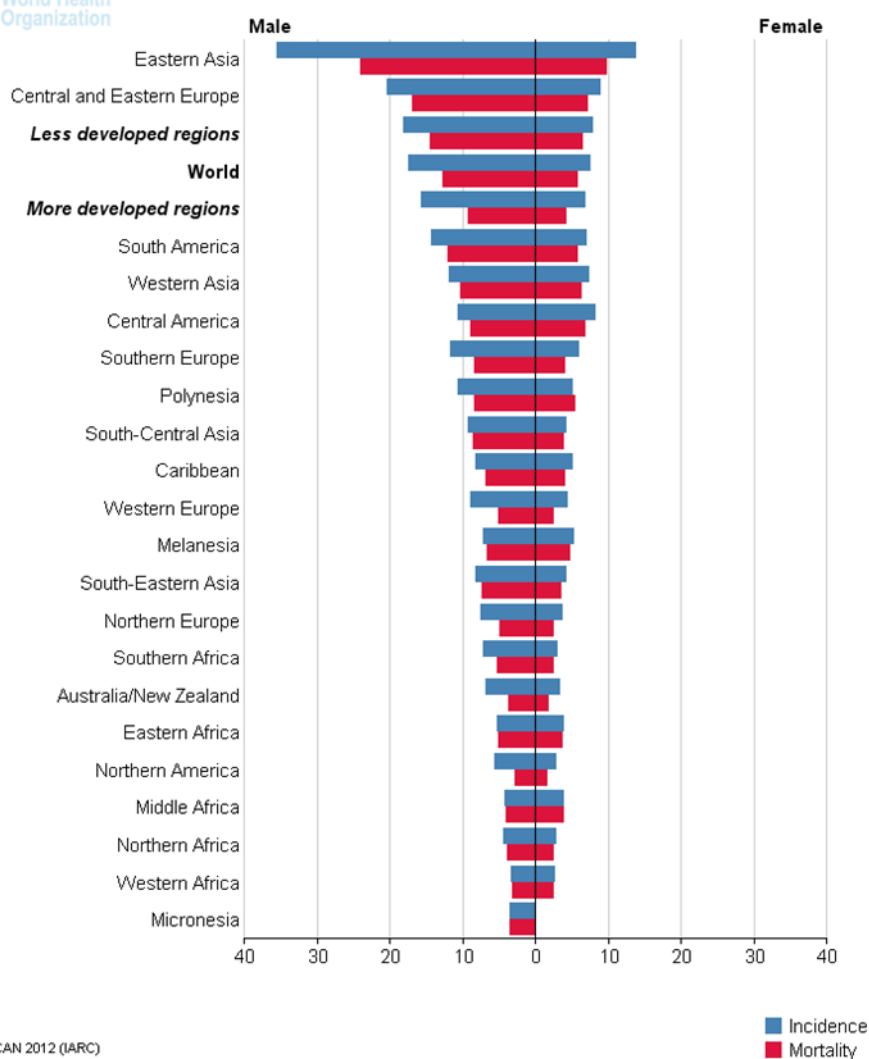
เนื่องจากการรับเชื้อเข้าสู่ร่างกายนั้นเกิดได้ง่ายและมีแหล่งของเชื้อที่หลากหลาย ทั้งนี้เมื่อติดเชื้อผู้ป่วยมักไม่มีอาการที่แสดงออกอย่างชัดเจน ทำให้ผู้ป่วยและบุคลากรรอบข้างไม่ได้ตระหนักในการป้องกันการระบาดติดเชื้อ ดังนั้นการควบคุมการติดเชื้อจึงทำได้ยากและส่งผลกระทบต่ออัตราการติดเชื้อมีค่อนข้างสูง ถึงแม้ในปัจจุบันนี้จะมีการวิจัยเกี่ยวกับการป้องกันการติดเชื้อและการคิดค้นวัคซีนจำนวนมาก แต่ยังไม่มีการป้องกันการป้องกันหรือการค้นพบวัคซีนที่มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการลดอัตราการติดเชื้อ จากรายงานของ The International Agency for Research Cancer (IARC) ได้ประมาณการว่า 2 ใน 3 ของประชากรทั่วโลกนั้นมีการติดเชื้อนี้ ซึ่งในประเทศที่กำลังพัฒนาหรือในชนเผ่าพื้นเมืองจะพบอัตราการติดเชื้อสูงกว่าประเทศที่พัฒนาแล้ว เนื่องจากมีระบบสุขาภิบาลที่ไม่ดี วัฒนธรรมการบริโภคอาหารที่ไม่ผ่านความร้อน รวมไปถึงการใช้มือในการรับประทานอาหาร โดยประเทศในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงนั้นมีอัตราการติดเชื้อที่สูงที่สุด (37) เช่น ไทย 57%, จีน 67% และเวียดนาม 75% (3, 4, 38) ทั้งนี้อัตราการติดเชื้อนั้นอาจแตกต่างกันไปในแต่ละช่วงวัย เช่น ในประเทศจีนพบว่าในกลุ่มผู้สูงอายุที่มีระบบภูมิคุ้มกันที่อ่อนแอจะมีอัตราการติดเชื้อที่สูงถึง 84% (39)

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันนี้มีการพัฒนาของระบบสาธารณสุขในแต่ละประเทศ ส่งผลให้อัตราการติดเชื้อลดลง แต่อย่างไรก็ตามเชื้อมีความสามารถในการมีชีวิตรอดโดยการกลายพันธุ์และดื้อต่อยาที่ใช้รักษาในปัจจุบันมากขึ้น มีรายงานว่าความชุกของเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั่วโลก (40) ส่งผลให้ยามีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อออกจากกระเพาะอาหารได้ลดลง ทำให้มีการติดเชื้อแบบเรื้อรังและเพิ่มความรุนแรงของโรคให้มากขึ้น จนกลายเป็นโรคมะเร็งกระเพาะอาหารได้ โดยในประเทศไทยมีอัตราของเชื้อดื้อยาคิดเป็น 50.3% ซึ่งเชื้อส่วนมากดื้อต่อยา metronidazole และพบความชุกสูงที่สุดในภาคใต้ (41)

จากข้อมูลของ Globocan ปี 2012 พบว่าอัตราการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารสูงเป็นอันดับ 4 และมีอัตราตายเป็นอันดับที่ 3 ของโลก ทั้งนี้อุบัติการณ์ของโรคมะเร็งกระเพาะอาหารพบว่าในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้อย่างเป็นบริเวณที่มีอุบัติการณ์มากที่สุดซึ่งมีความสอดคล้องกับอัตราการติดเชื้อ โดยในประเทศญี่ปุ่นมีอัตราการเกิดใหม่ของโรคมะเร็งมากที่สุดโดยพบผู้ป่วยใหม่จำนวน 30 คนในประชากรหนึ่งแสนคน รองลงมาคือประเทศจีนจำนวน 23 คนในประชากรหนึ่งแสนคน ส่วนแถบทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบว่า เวียดนามเป็นประเทศที่มีอุบัติการณ์มาก

ที่สุดเท่ากับ 16 คนในประชากรหนึ่งแสนคนและประเทศไทยมีอุบัติการณ์เป็นอันดับที่ 4 ในอัตรา 3 คนในประชากรหนึ่งแสนคน (42) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่สูงนัก ทั้งนี้มีการศึกษาพบว่า ความหลากหลายของยีนส์ *Mdm2* SNIP309 G/G นั้นมีความเกี่ยวข้องอย่างมากกับการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร (43) แต่ในประชากรไทยพบว่ามีความชุกของยีนส์ *Mdm2* SNIP309 G/G ที่ต่ำเพียง 3% (44) ในขณะที่ประชากรชาวญี่ปุ่นที่มีอัตราการเกิดใหม่ของโรคมะเร็งที่สูดพบความชุกของยีนส์ *Mdm2* SNIP309 G/G ถึง 30.7% (45)

International Agency for Research on Cancer



รูปที่ 3 แสดงอัตราการเกิดใหม่และอัตราการตายจากโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร (42)

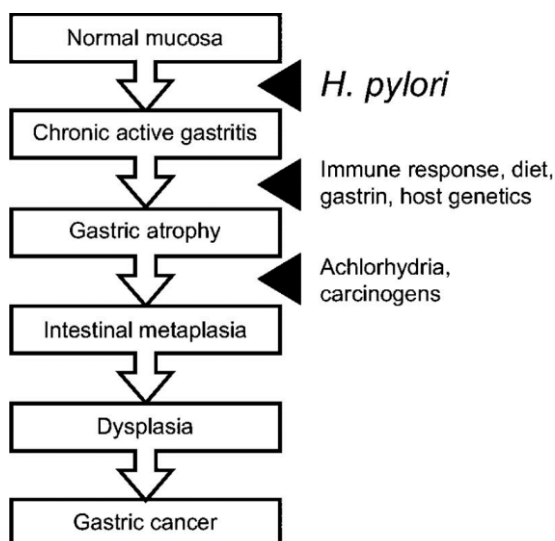
1.6 พยาธิกำเนิด พยาธิสภาพและการก่อโรค

พยาธิสภาพเนื่องจากการติดเชื้อ *H. pylori* เกิดจากทั้งปัจจัยความรุนแรงต่างๆ ของตัวเชื้อและระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย โดยพบว่า Lipopolysaccharide และ *cagA* เป็นปัจจัยความรุนแรงที่สำคัญในการกระตุ้นกระบวนการอักเสบโดยผ่าน NF- κ B และสร้างไซโตไคน์ต่างๆขึ้น (46) ปัจจัยความรุนแรงอื่นๆของเชื้อ เช่น Adhesin, การสร้างไบโอฟิล์ม, ความสามารถในการทนต่อยาปฏิชีวนะ รวมถึงการที่มีอาการแสดงที่ไม่ชัดเจน เป็นปัจจัยทำให้สามารถกำจัดเชื้อออกจากกระเพาะอาหารได้ยากและมีการอักเสบของกระเพาะอาหารที่เรื้อรัง ทำให้พยาธิสภาพของกระเพาะอาหารรุนแรงขึ้นและสามารถดำเนินโรคไปเป็นระยะโรคกระเพาะอักเสบเรื้อรัง (Chronic gastritis) และเกิดการตายของเซลล์กระเพาะอาหารแบบอะโพอโทซิสมากขึ้น ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญในการเกิดพยาธิสภาพของกระเพาะอาหารระยะ Gastric atrophy (1)

การตายแบบอะโพอโทซิสของเซลล์กระเพาะอาหารนั้นถูกกระตุ้นได้โดยสิ่งกระตุ้นหลายชนิด โดยเฉพาะ *vacA* ของตัวเชือนั้นสามารถเจาะทำลายเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (17) ส่งผลให้เอนไซม์ Cytochrome C ภายในไมโทคอนเดรียหลั่งออกมาเข้าสู่ไซโทพลาสซึมและกระตุ้นโมเลกุลต่างๆ ในกระบวนการอะโพอโทซิสได้ นอกจากนี้การอักเสบและการตายแบบอะโพอโทซิสนั้นเป็นกระบวนการที่มีความเกี่ยวข้องกัน โดยเมื่อมีการหลั่งไซโตไคน์บางชนิดในกระบวนการอักเสบ เช่น TNF- α หรือ สารอนุมูลอิสระจำพวก Reactive oxygen species จากการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาว สารต่างๆเหล่านี้สามารถกระตุ้นการตายแบบอะโพอโทซิสของเซลล์ได้ (18) ทั้งนี้ไซโตไคน์ชนิด IL-1 β สามารถยับยั้งการหลั่งกรดของเซลล์ในกระเพาะอาหาร ส่งผลให้กระเพาะอาหารมีความเป็นกรดน้อยลง (hypochlorhydria) (47) ซึ่งเป็นการส่งเสริมให้เชื้อเจริญแบ่งตัวได้ดีขึ้นและสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์ได้มากขึ้นจนเกิดพยาธิสภาพในระยะ Gastric atrophy

ถึงแม้ว่าเชือนี้จะถูกจำแนกให้เป็น Class I carcinogen ซึ่งสามารถก่อมะเร็งได้ด้วยตัวเองโดยไม่จำเป็นต้องอาศัยปัจจัยอื่นมาช่วยสนับสนุน แต่ทั้งนี้มีการศึกษาพบว่ามีปัจจัยที่เกี่ยวข้องอื่นๆที่สามารถช่วยส่งเสริมการดำเนินของโรคได้เร็วขึ้นและรุนแรงมากยิ่งขึ้น เช่น การดื่มแอลกอฮอล์ (48) และการรับประทานอาหารที่มีไนโตรสสูง (49) ด้วยปัจจัยต่างๆทั้งหมดนี้จะส่งเสริมให้กระเพาะอาหารดำเนินโรคเป็นระยะต่างๆและสนับสนุนให้เกิดการทำลายสารพันธุกรรมในเซลล์ ทำให้เซลล์กระเพาะอาหารมีความผิดปกติในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ของลำไส้เล็กใน

พยาธิสภาพระยะ Intestinal metaplasia จนถึงโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร (Gastric cancer) เช่น gastric adenocarcinoma , gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma ดังรูปที่ 4 นอกจากนี้การติดเชื้อ *H. pylori* ยังเป็นสาเหตุของการเกิดความผิดปกติในระบบอื่นๆ ของร่างกายอีกด้วย เช่น สภาวะโลหิตจาง เนื่องจากมีเลือดออกในทางเดินอาหารแบบเรื้อรัง (50)



รูปที่ 4 พยาธิสภาพของกระเพาะอาหารเนื่องจากการติดเชื้อ *H. pylori* และปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง (1)

1.7 แนวทางการรักษา

Triple therapy เป็นแผนการรักษาขั้นแรก (First line therapy) ของการติดเชื้อ *H. pylori* คือ การใช้ยาปฏิชีวนะสองชนิดร่วมกับยาลดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารเพื่อส่งเสริมการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะดังกล่าว โดยยาปฏิชีวนะที่สำคัญ คือ คลาริโทรมัยซินและเมโทรนิดาโซล (51) และยายับยั้งการหลั่งกรด คือ กลุ่มของยาประเภท Proton pump inhibitor (PPI) เช่น ยา Omeprazole แต่ปัจจุบันนี้มีการรายงานว่ามีแนวโน้มของเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดนี้มากขึ้นทั่วโลก ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อลดลง (40) ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีข้อกำหนดให้ใช้แนวทางการรักษาแบบ quadruple คือการใช้ยาปฏิชีวนะ 3 ชนิดร่วมกับ PPI โดยอาจใช้ Bismuth แทนยาปฏิชีวนะในการรักษาแบบ Bismuth quadruple (PBMT) หรือ การใช้ยาอะมอกซิซิลลินร่วมกับคลาริโทรมัยซินและเมโทรนิดาโซลในการรักษาแบบ Concomitant nonbismuth quadruple (PAMC) มีการศึกษาพบว่า

ยาคลาริโทรมายซินและยาลดการหลั่งกรดไม่เพียงแต่ออกฤทธิ์กำจัดจุลชีพ แต่ยังมีผลกระทบต่อเซลล์กระเพาะอาหาร โดยสามารถกระตุ้นกระบวนการอักเสบของเซลล์ให้เพิ่มขึ้นได้ (52, 53) Bismuth เป็นสารโลหะหนักที่อยู่กลุ่มเดียวกับสารหนู โดยการทดลองการบ่มเซลล์ไตของมนุษย์ ชนิด Human embryonic kidney 293 กับ Bismuth นาน 48 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของ Bismuth ตั้งแต่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์และยังสามารถเกิดผลข้างเคียงให้เซลล์ตายแบบ autophagy ได้ (54)

2. กระบวนการอักเสบ

การอักเสบเป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหลักของร่างกาย เมื่อร่างกายได้รับสิ่งแปลกปลอมโดยเฉพาะจุลชีพต่างๆ จะมีการกระตุ้นกระบวนการอักเสบของเซลล์ผ่านตัวรับบนผิวเซลล์และส่งสัญญาณเข้าไปในเซลล์ โดยมีโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจำนวนมากและมีกลไกที่ซับซ้อน โดยในการตอบสนองของเซลล์ที่ติดเชื้อ *H. pylori* นั้นมักถูกกระตุ้นโดยปัจจัยความรุนแรงต่างๆบนตัวเชื้อซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Pathogen associated molecular patterns (PAMPs) ที่สามารถกระตุ้นกระบวนการอักเสบผ่าน Toll-like receptors (TLRs) แต่ละชนิดที่จำเพาะบนผิวเซลล์กระเพาะอาหารและเซลล์เม็ดเลือดขาว แต่ TLRs แต่ละชนิดสามารถกระตุ้นกระบวนการอักเสบโดยส่งสัญญาณผ่านทางโมเลกุลต่างกัน เช่น TLR2 และ TLR5 ที่จับจำเพาะได้กับ *cagA* ของเชื้อจะกระตุ้นการทำงานของ Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) ภายในเซลล์เป็นโมเลกุลแรกของกระบวนการอักเสบ แต่ TLR 9 ที่จับจำเพาะได้กับ DNA ของเชื้อจะกระตุ้น Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ก่อน จากนั้น MyD88 และ MAPK จะมีการกระตุ้นโมเลกุลอื่นๆที่แตกต่างกันไป แต่โมเลกุลสุดท้ายของแต่ละวิถีทางมักเป็นการกระตุ้นการทำงานของโมเลกุล NF- κ B (55, 56) โดย NF- κ B ทำหน้าที่ในการถอดรหัสดีเอ็นเอของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบได้หลายชนิด เช่น IL-8, IL-1 β , MCP-1 เป็นต้น ซึ่งไซโตไคน์เหล่านี้ส่วนใหญ่มักทำหน้าที่ในการดึงดูดและกระตุ้นการทำงานของเซลล์ทางระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์และนิวโทรฟิลล์มายังบริเวณที่มีการติดเชื้อ จากนั้นเซลล์เม็ดเลือดขาวแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อเพื่อกำจัดจุลชีพโดยเซลล์โมโนไซต์ จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นแมจโครฟาจและกำจัดจุลชีพด้วย

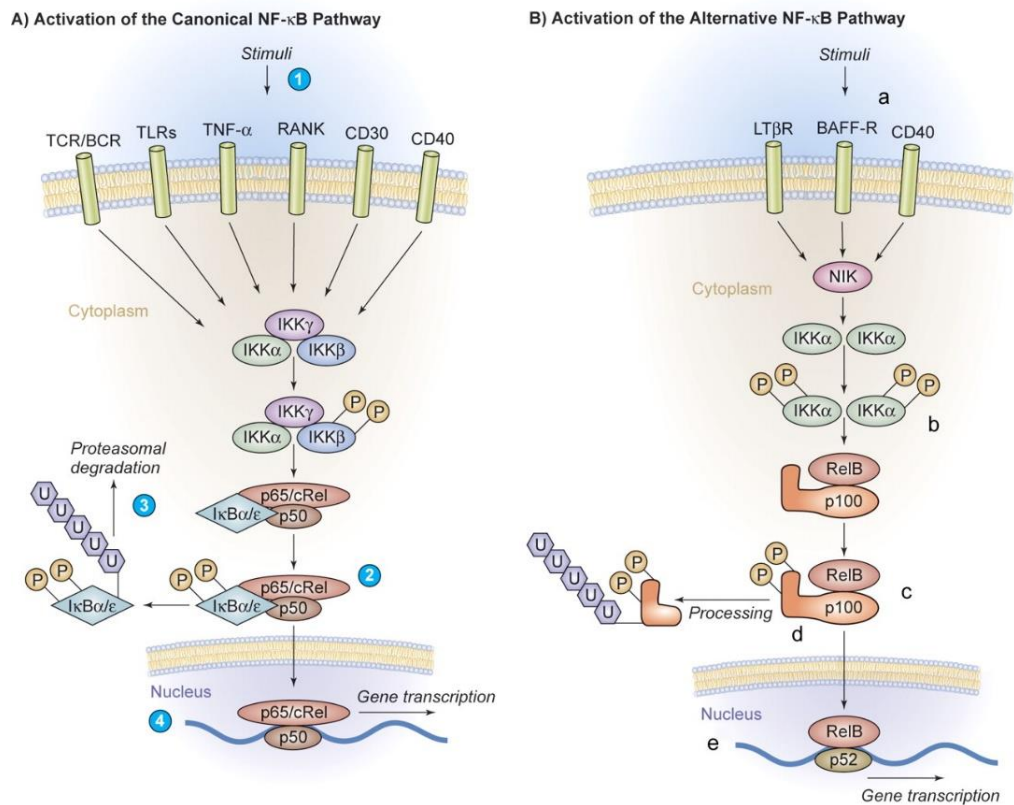
กระบวนการ Phagocytosis ส่วนในเซลล์นิวโทรฟิลส์จะหลั่ง Reactive oxygen species (ROS) เช่น NADPH oxygenase ที่เป็นสารอนุมูลอิสระหรือการสร้าง neutrophil extracellular trap (NETs) ที่ประกอบไปด้วยดีเอ็นเอ โปรตีนฮิสโตนและเอนไซม์หลายชนิด รวมถึงกระบวนการ Phagocytosis ได้เช่นกัน (57) นอกจากนี้เซลล์เม็ดเลือดขาวเหล่านี้ยังสามารถหลั่งไซโตไคน์หลายชนิด ทำให้มีการแทรกตัวและสะสมของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆอยู่ในเนื้อเยื่อทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่ออย่างเรื้อรัง (58)

2.1 Nuclear factor kappa B (NF- κ B)

เป็น Transcription factor ที่มีบทบาทต่อกระบวนการอักเสบมากที่สุด เนื่องจากสามารถจับจำเพาะกับ promoter ของยีนที่ควบคุมการสร้างไซโตไคน์หลายชนิด ทำให้เกิดการถอดรหัสและแปลรหัสของดีเอ็นเอดังกล่าวมาเป็นโปรตีนและไซโตไคน์ต่างๆ ที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณชักนำให้เซลล์ต่างๆในระบบภูมิคุ้มกันตอบสนองและเกิดกระบวนการอักเสบในที่สุด โดยจุลชีพต่างๆ รวมไปถึง *H. pylori* สามารถกระตุ้นให้เซลล์กระเพาะอาหารที่ติดเชื้อมีการแสดงออกของยีน NF- κ B เพิ่มขึ้นและการกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B ในระดับโปรตีน (59) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่า NF- κ B มีหลายชนิด ประกอบไปด้วยโปรตีน 5 หน่วยย่อย ดังนี้ p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) และ p52/p100 (NF- κ B2)

กลไกการทำงานของ NF- κ B นั้นเกิดได้ 2 วิธีทาง คือ Canonical pathway และ Non-canonical pathway ซึ่งในแต่ละวิธีนั้นได้รับสัญญาณกระตุ้นมาจาก TLRs ที่ต่างชนิดกัน ส่งผลให้มีการกระตุ้น NF- κ B ที่ต่างชนิดกันด้วย ทั้งนี้เซลล์ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ส่วนใหญ่จะมีการส่งสัญญาณกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B ผ่านทาง Canonical pathway และกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B ชนิดที่ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย p65 (RelA), c-Rel, p50/p105 โดยมีโมเลกุล I κ B ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ NF- κ B การกระตุ้น NF- κ B จะอาศัยสัญญาณจากภายนอกผ่านตัวรับหลายชนิดโดยเฉพาะ TLRs ที่จำเพาะกับ PAMPs ของตัวเชื้อทำให้เกิดการส่งสัญญาณผ่านโมเลกุลต่างๆเข้ามาในเซลล์ จนมีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ I κ B kinases (IKK) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยโมเลกุล I κ B ให้หลุดออกจาก NF- κ B และย่อยส่วน p105 ให้เหลือเพียง p50 เท่านั้น โดย p50 เป็นส่วนสำคัญที่ใช้จับกับส่วนของ promoter ของดีเอ็นเอเพื่อกระตุ้นการถอดรหัสต่อไป ดังรูปที่ 5A จากนั้นจะมีขั้นตอนอื่นที่จำเป็นต่อการทำงานของ

NF- κ B ได้แก่ การเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่งต่างๆบนโมเลกุลของ NF- κ B เช่น การเติมหมู่ฟอสเฟตที่ serine ลำดับที่ 536 บนโปรตีนส่วน p65 (60, 61) เพื่อกระตุ้นให้ NF- κ B เคลื่อนที่เข้าไปในนิวเคลียสได้และมีความคงตัวมากขึ้น ส่วนใน Non-canonical pathway กระตุ้น NF- κ B ชนิดที่ประกอบด้วย Rel-B และ p52/p100 เป็นหน่วยย่อยรับสัญญาณกระตุ้นผ่านตัวรับชนิด CD40, lymphotoxin beta (LTb) และ B-cell-activating factor (BAF) จากนั้นโมเลกุล NF- κ B-inducing kinase (NIK) จะตอบสนองต่อสัญญาณโดยกระตุ้น IKK ให้ย่อยส่วน p100 ให้เหลือเพียงตำแหน่งที่ใช้จับกับส่วนของ promoter ของดีเอ็นเอ คือ p52 ดังรูปที่ 5B



รูปที่ 5 แสดงกลไกการกระตุ้น NF- κ B ในระดับโมเลกุลผ่านทาง Canonical pathway (A) และ Non-canonical pathway (B) (62)

เมื่อ NF- κ B แต่ละชนิดเคลื่อนเข้าไปในนิวเคลียสและจับที่ promoter จะเกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีนส์ต่างๆที่จำเพาะซึ่งนำไปสู่การสร้างไซโตไคน์ต่างๆที่สำคัญดังนี้

2.1.1 Interleukin 8 (IL-8)

เป็นโปรตีนที่ถูกถอดรหัสมาจากยีน CXCL8 (Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 8) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบของเซลล์ต่อการติดเชื้อ เนื่องจาก Lipopolysaccharide และปัจจัยความรุนแรงอื่นๆสามารถกระตุ้นให้เซลล์มีการหลั่ง IL-8 ออกมาเป็นจำนวนมาก (63) ซึ่ง IL-8 ทำหน้าที่เป็นไซโตไคน์หลักที่ส่งสัญญาณดึงดูดและกระตุ้นเซลล์ทางระบบภูมิคุ้มกันต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้หลายชนิด เช่น นิวโทรฟิลล์ , เบโซฟิลล์ และ ลิมโฟไซต์ ปัจจุบันมีการศึกษาพบว่า IL-8 มีบทบาทที่สำคัญต่อการอักเสบของกระเพาะอาหารเนื่องจากเชื้อ *H. pylori* จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีนทั้งหมดในเซลล์กระเพาะอาหารที่ติดเชื้อ *H. pylori* พบว่ามีการแสดงออกของยีน IL-8 เพิ่มขึ้นได้เร็วและสูงกว่ายีนอื่น (64)

IL-8 ยังสามารถกระตุ้นปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินโรคมะเร็ง เช่น สามารถกระตุ้นการหลั่ง vascular endothelial growth factor (VEGF) ชักนำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ (Angiogenesis) ที่ทำหน้าที่หลั่งเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งอยู่รอดและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้เพิ่มขึ้น (8) และจากการศึกษาในหนูทดลองที่ถูกตัดแต่งพันธุกรรมให้มียีน IL-8 ของมนุษย์ พบว่ากลุ่มที่ถูกชักนำด้วยสารก่อมะเร็งมีระดับการแสดงออกของยีน IL-8 ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อมะเร็ง และเมื่อนำหนูทดลองปกติและหนูที่ตัดแต่งยีน IL-8 มาทำให้ติดเชื้อด้วย *Helicobacter felis* พบว่าหนูที่มียีน IL-8 เท่านั้นที่เกิดพยาธิสภาพในกระเพาะอาหาร (65)

2.1.2 Interleukin 1 beta (IL-1 β)

IL-1 β เป็นไซโตไคน์ที่อยู่ในกลุ่มของ IL-1 ที่สามารถกระตุ้นเซลล์ได้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะกระบวนการอักเสบซึ่งสามารถทำหน้าที่เป็นสัญญาณที่กลับไปกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B (66) และส่งเสริมการสร้างไซโตไคน์ชนิดต่างๆออกมาเป็นจำนวนมาก (67) ทั้งนี้ IL-1 β ยังสามารถรบกวนการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารและยับยั้งการตายของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารได้ (68)

มีการศึกษาพบความสัมพันธ์แบบเสริมฤทธิ์กันระหว่าง IL-1 β และการติดเชื้อ *H. pylori* ต่อกระบวนการอักเสบและการเกิดมะเร็ง โดยใช้หนูทดลองที่ถูกลำเลียง IL-1 β ออกนำไปติดเชื้อด้วย *H. pylori* พบว่ากลุ่มควบคุมมีการกระตุ้นกระบวนการอักเสบผ่าน NF-kB และเกิดก้อนมะเร็งขึ้นในกระเพาะอาหารแต่ในกลุ่มที่ไม่มี IL-1 β นั้นมีการกระตุ้น NF-kB น้อยลงและมีจำนวนก้อนมะเร็งที่น้อยกว่า (69)

2.1.3 Tumor necrosis factor (TNF- α)

ไซโตไคน์ชนิดนี้สามารถหลั่งมาจากเซลล์หลายชนิดในร่างกาย เช่น mast cells, lymphocytes, natural killer (NK) cells, neutrophils รวมถึง endothelial cells ไซโตไคน์ชนิดนี้มีบทบาทที่สำคัญต่อการติดเชื้อ *H. pylori* โดยเซลล์ที่ติดเชื้อจะเกิดการอักเสบและหลั่ง TNF- α ซึ่งทำหน้าที่เป็นสัญญาณส่งเสริม (Positive feedback) ให้เกิดการส่งสัญญาณกระตุ้น NF-kB ภายในเซลล์และเกิดการอักเสบที่เพิ่มมากขึ้นผ่านทาง Tumor necrosis factor receptors (TNFRs) บนผิวเซลล์ (70) และยังสามารถส่งสัญญาณกระตุ้นการอะพอโทซิสของเซลล์ผ่านทาง Caspase pathway ได้ (71) ปัจจุบันจึงนิยมนำ TNF- α มาใช้ในการรักษาโรคโดยนำมาใช้ในการทำลายเซลล์มะเร็ง

แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่า TNF- α นั้นมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดและระยะของโรคมะเร็ง โดยพบว่าในผู้ป่วยที่มีระยะของโรคที่มีความรุนแรงสูงจะมีการแสดงออกของยีน TNF- α มากกว่าระยะที่มีความรุนแรงต่ำ (72) ทั้งนี้พบว่า TNF- α มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเนื่องจากการติดเชื้อ *H. pylori* เช่นกัน จากการศึกษาการแสดงออกของ TNF- α ในหนูทดลองที่ทำให้เป็นโรค gastric mucosa associated lymphoid tissue lymphoma (GML) ด้วยการติดเชื้อ *H. pylori* พบว่ามีการหลั่งและแสดงออกของยีน TNF- α เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ไม่เป็นโรครวมถึงพบว่ามีแสดงออกของยีน Tumor necrosis factor receptors (TNFRs) ที่เพิ่มขึ้นด้วย (73) และพบว่าปริมาณ TNF- α จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรกระเพาะอาหารอักเสบด้วย โดยผู้ป่วยที่เป็นโรคระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรังและรุนแรงจะตรวจพบ TNF- α สูงในซีรัม (74)

2.1.4 Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)

MCP-1 หรือ CCL2 เป็นไซโตไคน์ชนิดแกมมาที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับเซลล์เม็ดเลือดขาวจำพวกโมโนไซต์ เนื่องจาก MCP-1 ส่วนใหญ่ถูกหลั่งออกมาจากโมโนไซต์หรือแมคโครฟาจ โดยการทำงานของโมโนไซต์เองสามารถถูก MCP-1 กระตุ้นได้เป็นอย่างดีผ่านตัวรับบนผิวเซลล์ชนิด CCR2 ซึ่งพบว่าบนผิวเซลล์โมโนไซต์มีการแสดงออกของ CCR2 อยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อโมโนไซต์ถูกกระตุ้นด้วย MCP-1 จะเกิดกระบวนการเคลื่อนที่และแทรกตัวเข้าไปในเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการอักเสบและหลั่ง MCP-1 จากนั้นจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นแมคโครฟาจเพื่อกำจัดจุลชีพแบบ phagocytosis นอกจากนี้ CCR2 ยังพบได้บนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่น เช่น $\gamma\delta$ T cells ซึ่งสามารถถูกกระตุ้นโดย MCP-1 และเคลื่อนที่เข้าไปในเนื้อเยื่อได้เช่นเดียวกัน แต่จะทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive โดยการจดจำแอนติเจนผ่าน major histocompatibility complex (MHC) เพื่อก่อการกระตุ้นการสร้าง immunoglobulin A ของ B-cell ตามลำดับ

MCP-1 ยังสามารถหลั่งจากผิวเซลล์เยื่อต่างๆ โดยเฉพาะเซลล์กระเพาะอาหารที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *H. pylori* สามารถหลั่ง MCP-1 ออกมาเป็นจำนวนมาก (75) และพบว่า *H. pylori* สายพันธุ์ที่มี *cag*-PAI เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ MCP-1 ผ่านการกระตุ้น NF- κ B ได้ (46) นอกจากนี้ส่วน *cagA*, *urease* และ lipopolysaccharide ของตัวเชื้อ *H. pylori* นั้นยังเป็นปัจจัยที่สำคัญในการกระตุ้นการแสดงออกของตัวรับ CCR2 บน $\gamma\delta$ T cells ให้เพิ่มขึ้น (76) ซึ่งจะส่งผลให้ $\gamma\delta$ T cells สามารถเคลื่อนที่แทรกตัวและสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารได้มากขึ้น ดังนั้นการติดเชื้อ *H. pylori* จึงเป็นการส่งเสริมกระบวนการอักเสบ โดยดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ให้เคลื่อนที่และแทรกตัวของเข้ามาในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดกระบวนการอักเสบรุนแรงและเรื้อรัง อันเป็นปัจจัยเริ่มต้นที่ทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็ง โดยมีการรายงานความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ $\gamma\delta$ T cells ที่แทรกตัวเข้าไปสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารกับระยะของโรคระเพาะอาหารอักเสบพบว่า ในระยะที่ 3 ของโรคนั้นมีจำนวน $\gamma\delta$ T cells ที่สูงกว่าระยะที่ 1 และ 2 มาก (76) นอกจากนี้การเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวแล้ว MCP-1 และการแสดงออกของตัวรับ CCR2 ที่สูงขึ้นบนเซลล์มะเร็ง

สามารถส่งเสริมการบุกรุกของเซลล์มะเร็งเข้าไปในกระแสเลือด (invasion) และแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นๆของร่างกาย (Metastasis)

2.2 กระบวนการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาว

2.2.1 การเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์

เซลล์โมโนไซต์ถูกดึงดูดให้เคลื่อนที่ไปยังบริเวณต่างๆของร่างกายได้ เนื่องจากบนผิวเซลล์มีการแสดงออกของตัวรับชนิดต่างๆ เช่น CCR2, CCR5, CCR7, CX3CR1 และ FPR1 (77) ที่สามารถจับจำเพาะกับไซโตไคน์ โดยเฉพาะไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่เกิดการอักเสบจากการติดเชื้อจุลชีพ ได้แก่ monocyte chemotactic protein – 1 (MCP-1), monocyte chemotactic protein – 2 (MCP-2), macrophage inflammatory protein one alpha (MIP1- α) และ macrophage inflammatory protein one beta (MIP1- β) นอกจากนี้แอนติเจนจากจุลชีพเองยังสามารถดึงดูดการเคลื่อนที่ของเซลล์โมโนไซต์ได้เช่นกัน โดยมีการศึกษาสายเปปไทด์สั้นๆ ชนิด cecropin-like *H. pylori*-derived peptide (HP 2-20) มีความสามารถดึงดูดและกระตุ้นการทำงานของโมโนไซต์ได้ โดยโมโนไซต์สามารถผลิตเอนไซม์ NADPH-oxidase ออกมาจำนวนมาก (78) ผ่านตัวรับ Formyl peptide receptors (FPRs) ชนิด FPR2 และ FPR3 บนผิวเซลล์โมโนไซต์ที่มีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวในกระบวนการอักเสบ (33, 79) รวมถึงเอนไซม์ยูรีเอสและโปรตีนจากบนผิวเซลล์ของตัวเชื้อสามารถดึงดูดเซลล์โมโนไซต์ได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน (80) และเมื่อทดสอบโปรตีนที่หลั่งออกมานอกตัวเชื้อ *H. pylori* พบว่าสามารถดึงดูดให้เซลล์โมโนไซต์เคลื่อนที่ได้ โดยเมื่อทดสอบเติมโปรตีนดังกล่าวทั้งหลุมด้านบนและด้านล่างที่ความเข้มข้นเท่ากันพบว่าเซลล์โมโนไซต์ที่เคลื่อนที่ลงมายังหลุมด้านล่างลดลง เหลือเพียง 11% เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมโปรตีนลงในหลุมด้านล่างเพียงอย่างเดียว (81) ทั้งนี้ปริมาณของเซลล์โมโนไซต์ที่เคลื่อนที่เข้าไปในเนื้อเยื่อและเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์แมคโคฟาจมีความสัมพันธ์อย่างมากต่อการเกิดเซลล์มะเร็งและการพัฒนาความรุนแรงของโรค โดยมีรายงานว่าจำนวนของเซลล์แมคโคฟาจในกระเพาะอาหารที่มากขึ้นมีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรคกระเพาะอาหารอักเสบในเด็กที่ติดเชื้อ *H. pylori* (82)

2.2.2 การเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์

เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์เป็นเซลล์ตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบได้อย่างรวดเร็วและเป็นเซลล์ชนิดแรกที่เคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่เกิดการอักเสบ บนผิวเซลล์นิวโทรฟิลล์มีตัวรับชนิดต่างๆ เช่น G protein-coupled receptors (GPCRs), Fc receptors, adhesion receptors, cytokine receptors และ pattern recognition receptors (PRRs) ซึ่งจะสามารถกระตุ้นโมเลกุลหลักที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ เช่น phosphoinositide 3-kinase- γ (PI3K γ), phospholipase C β และ extracellular signal-regulated kinase (ERK) (83) โดย cecropin-like *H. pylori*-derived peptide (HP 2-20) สามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์นิวโทรฟิลล์ได้เช่นเดียวกับโมโนไซต์ โดยสามารถจับจำเพาะได้กับ G protein-coupled receptors (GPCRs) ชนิด Formyl peptide receptors-2 (FPR2) (33) ทั้งนี้ตัวรับ CXCR1 และ CXCR2 ที่จำเพาะต่อ IL-8 เป็นตัวรับที่มีการแสดงออกบนผิวเซลล์นิวโทรฟิลล์ในระดับที่สูงมาก เมื่อเซลล์เยื่อบุที่ติดเชื่อมีการหลั่ง IL-8 จึงสามารถดึงดูดนิวโทรฟิลล์ได้อย่างรวดเร็ว (84, 85) โดยที่ปริมาณ IL-8 ในซีรัมของผู้ป่วยมีความสัมพันธ์อย่างมากกับการแทรกตัวของเซลล์นิวโทรฟิลล์เข้ามาในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารและโรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง (74) นอกจากนี้เอนไซม์ยูรีเอสและโปรตีนบนผิวเซลล์ของตัวเชื้อ *H. pylori* สามารถดึงดูดเซลล์นิวโทรฟิลล์ได้เช่นเดียวกับเซลล์โมโนไซต์ แต่พบว่าที่สภาวะเดียวกันนั้นมีปริมาณของเซลล์นิวโทรฟิลล์ที่ถูกดึงดูดมากกว่าประมาณ 1.3 เท่า (80) ทั้งนี้เอนไซม์ยูรีเอสสามารถกระตุ้นให้อุ้งเท้าของหนูทดลองมีอาการบวมและพบเซลล์นิวโทรฟิลล์จำนวนมากแทรกตัวเข้ามาในเนื้อเยื่อ (86) รวมถึง neutrophil-activating protein (HP-NAP) จากเชื้อสามารถดึงดูดการเคลื่อนที่ การเกาะติดกับผิวเซลล์เยื่อบุ และกระตุ้นการหลั่ง ROS ของนิวโทรฟิลล์ได้ดี (57) ทั้งนี้จากการตรวจติดตามผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารยังพบว่า การเคลื่อนที่ของเซลล์นิวโทรฟิลล์เข้าไปในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารนั้นมีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคไปเป็นระยะ Gastric atrophy (87) โดยระยะของโรคที่รุนแรงขึ้นจะมีจำนวนเซลล์นิวโทรฟิลล์ที่มากขึ้นด้วย ซึ่งในระยะ intestinal metaplasia มีจำนวนเซลล์นิวโทรฟิลล์สูงกว่าเซลล์ปกติประมาณ 9 เท่า ส่วนระยะของโรคมะเร็งกระเพาะอาหารมีจำนวนเซลล์นิวโทรฟิลล์สูงกว่าเซลล์ปกติถึง 24 เท่า (88)

3. กระบวนการตายแบบอะโพโทซิส

เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยปกติของร่างกายในการควบคุมสมดุลของจำนวนเซลล์และกำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการ โดยการทำให้เซลล์เกิดการตายแบบมีแบบแผน (Programmed cell death) ทั้งนี้สิ่งกระตุ้นภายนอกสามารถกระตุ้นสัญญาณต่างๆในการเกิดกระบวนการอะโพโทซิสของเซลล์ได้ เช่น ปัจจัยความรุนแรงของตัวเชื้อ หรือไซโตไคน์ต่างๆจากกระบวนการอักเสบซึ่งสามารถไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการตายแบบอะโพโทซิส (35, 89, 90) เอนไซม์ที่สำคัญ คือ เอนไซม์ caspase ชนิดต่างๆ โดยปกติโมเลกุล caspase มีคุณสมบัติเป็นโปรเอนไซม์ที่ยังไม่สามารถทำงานได้ แต่สิ่งกระตุ้นภายในหรือภายนอกเซลล์สามารถกระตุ้นให้ caspase ทำงานได้โดยเกิดปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชันบนโมเลกุลของโปรเอนไซม์ caspase

เอนไซม์ Caspase แบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามหน้าที่ คือ Initiator ได้แก่ caspase-2, 8, 9 และ 10 โดยเมื่อถูกกระตุ้นจะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ย่อยโมเลกุล caspase ชนิด Effector ได้แก่ Caspase-3, 6 และ 7 ที่ทำหน้าที่ไปกระตุ้นโมเลกุลอื่นๆที่มีบทบาทในกระบวนการตายแบบอะโพโทซิส เช่น กระตุ้นเอนไซม์ CAD (caspase-activated DNase) (91) ในการตัดสายดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) กระบวนการดังกล่าวจึงเป็นกระบวนการที่สำคัญในการใช้บ่งชี้การตายแบบอะโพโทซิสของเซลล์ (Hallmark) ทั้งนี้การอะโพโทซิสสามารถเกิดจากหลายกลไกขึ้นอยู่กับสิ่งกระตุ้น ดังนี้

3.1 Extrinsic pathway

กระบวนการอะโพโทซิสของเซลล์นี้จะอาศัยการกระตุ้นจาก Death receptor และ Death ligand ชนิดต่างๆที่จำเพาะ เช่น TNF- α ที่สร้างมาจากกระบวนการอักเสบนั้นสามารถจับกับตัวรับชนิด TNFR1, Fas Ligand กระตุ้นตัวรับ Fas และ tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) จะจำเพาะกับ Death receptor 4 และ 5 (DR4/DR5) ทั้งนี้พบว่าเชื้อ *H. pylori* กระตุ้นให้เซลล์ที่ติดเชื้อเกิดการอะโพโทซิสผ่าน Extrinsic pathway โดยอาศัย โมเลกุล TRAIL และ DR4 เป็นหลัก โดยมีการทดลองทำให้เซลล์กระเพาะอาหารติดเชื้อ *H.pylori* พบว่าเกิดการอะโพโทซิสเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่เมื่อเติม TRAIL ลงไปทำให้เซลล์เกิดการอะโพโทซิสที่มากขึ้นและเมื่อขัดขวางการจับกันของ TRAIL และ DR4 โดยเติมแอนติบอดีต่อ DR4 พบว่าเกิดการอะโพโทซิสที่ใกล้เคียงกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TRAIL(90) ซึ่ง TRAIL จะทำงาน

โดยส่งสัญญาณให้เกิดการสร้าง Death-inducing signaling complex (DISC) ที่ประกอบด้วย fas-associated death-domain protein (FADD) และ caspase-8 (92) จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชันบนโมเลกุล caspase-8 ทำให้ caspase-8 สามารถย่อย caspase ชนิด effector ได้แก่ caspase-3 และ 7 ส่งผลให้เกิดการอะโพโทซิสต่อไป แต่ทั้งนี้ caspase-8 ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของโมเลกุล BID ใน intrinsic pathway ได้ ดังรูปที่ 6

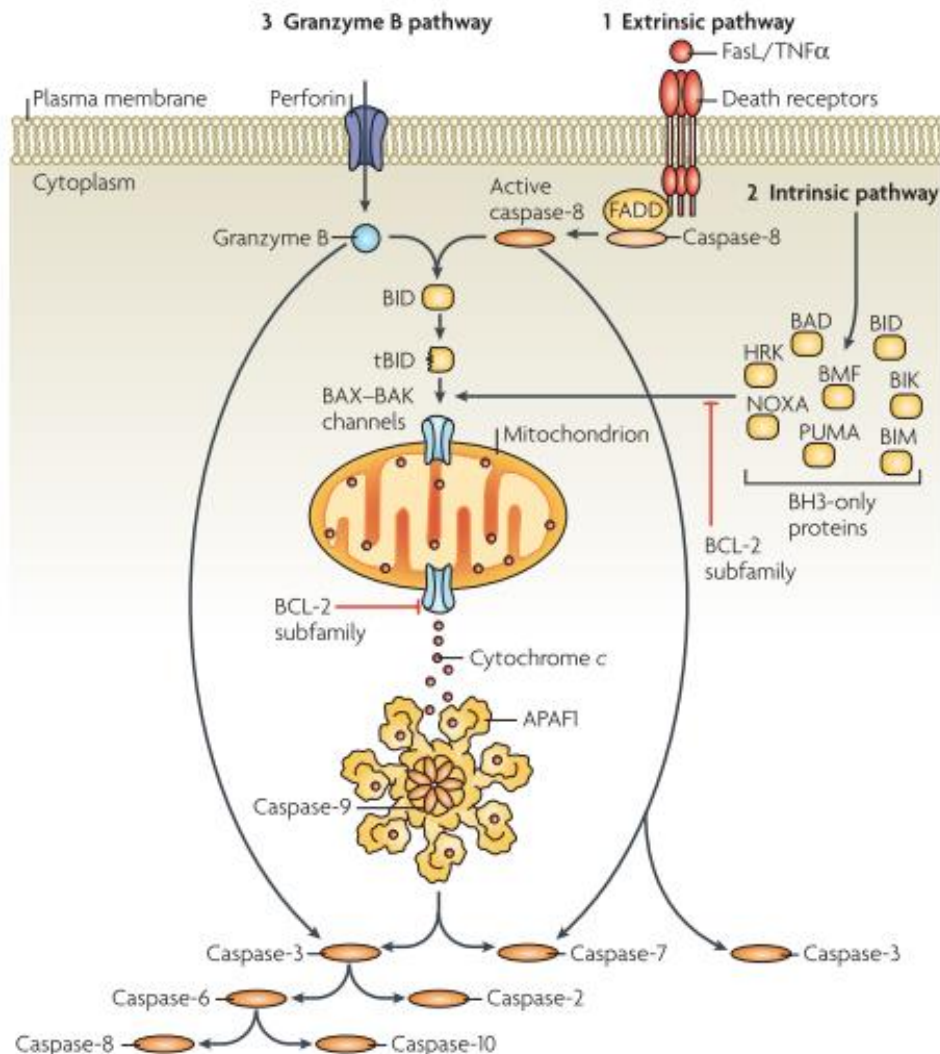
3.2 Intrinsic pathway

เป็นกระบวนการอะโพโทซิสของเซลล์ผ่านทางไมโทคอนเดรีย โดยอาศัยสิ่งกระตุ้นภายในเซลล์ เช่น เกิดสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ สารพันธุกรรมภายในเซลล์ถูกทำลาย รวมไปถึง caspase-8 จาก Extrinsic pathway และการติดเชื้อ *H. pylori* โดยมี vacA toxin เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการอะโพโทซิสผ่าน intrinsic pathway เนื่องจากสามารถทำลายเยื่อหุ้มของไมโทคอนเดรียได้โดยเข้าไปในเซลล์กระเพาะอาหารผ่านกระบวนการเอนโดไซโทซิส (Endocytosis) จากนั้นโมเลกุลของ vacA จะเข้าไปยังไมโทคอนเดรียและกระตุ้นให้เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของไมโทคอนเดรียเสียสมดุลประจุไฟฟ้า เนื่องจากโมเลกุลของ vacA สามารถเรียงตัวต่อกันทำให้เกิดรูซึ่งเป็นช่องทางผ่านเข้าออกของประจุต่างๆได้ (93) นอกจากนี้ vacA ยังสามารถกระตุ้นการสร้างทางผ่านเข้าออกของประจุโดยผ่านการทำงานของ Bax และยับยั้ง Bcl-2 ที่ทำหน้าที่ขัดขวางการเกิดอะโพโทซิส (89) เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ของไมโทคอนเดรียถูกทำลาย cytochrome c ที่อยู่ภายในจะหลั่งออกมาสู่ไซโทพลาสซึม โดย cytochrome c จะจับกับ apoptotic protease-activating factor (APAF-1) มารวมตัวกันเป็นกลุ่มของโปรตีน เรียกว่า apoptosome ซึ่งสามารถกระตุ้น caspase-9 ให้ไปกระตุ้น caspase-3 และ 7 ต่อไป ดังรูปที่ 6

3.3 Cytotoxic lymphocyte-initiated granzyme B pathway

กระบวนการนี้จะอาศัยเอนไซม์ที่เรียกว่า granzyme B จากแกรนูโลลของ cytotoxic T cell และ NK cell ซึ่งจะทำหน้าที่คล้าย caspase-8 ใน Extrinsic pathway และสามารถกระตุ้นการหลั่ง cytochrome c จากไมโทคอนเดรียใน intrinsic pathway ซึ่งจะไปกระตุ้น caspase ชนิด Effector ต่อไป ดังรูปที่ 6

มีการศึกษาพบว่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *H. pylori* และการเกิดอะโพอโทซิสของเซลล์กระเพาะอาหารผ่าน granzyme B โดยศึกษาในชั้นเนื้อของผู้ป่วย lymphocytic gastritis (LG) ที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *H.pylori* และนำไปเปรียบเทียบกับกลุ่มปกติพบว่ากลุ่มผู้ป่วย LG มีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อจำนวนมากว่า โดยมีสัดส่วนของเม็ดเลือดขาวชนิดที่หลั่ง granzyme B มาก รวมถึงมีปริมาณเซลล์ที่อะโพอโทซิสมากกว่า จึงสันนิษฐานว่าการอะโพอโทซิสของเซลล์ผู้ป่วยโรค LG นี้เกิดเนื่องจากการหลั่ง granzyme B ของเซลล์เม็ดเลือดขาว เพื่อยืนยันจึงได้ศึกษาเปรียบเทียบกับชั้นเนื้อของผู้ป่วย *H. pylori*-associated gastritis (HAG) พบสัดส่วนของเม็ดเลือดขาวชนิดที่หลั่ง granzyme B น้อยกว่าและปริมาณเซลล์ที่อะโพอโทซิสน้อยกว่ากลุ่ม LG (94)



รูปที่ 6 แสดงกลไกกระตุ้นการอะพอโทซิสในระดับโมเลกุลผ่านทาง [1]Extrinsic pathway [2]Intrinsic pathway และ [3]Cytotoxic lymphocyte-initiated granzyme B pathway (91)

4. สารจากพืชและสมุนไพรต่อการตอบสนองของเซลล์

ปัจจุบันนี้มีการแพทย์ทางเลือก (Complementary and Alternative Medicine) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการนำพืชและสมุนไพรหลายชนิดมาทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง หรือ สัตว์ทดลองแล้วพบว่า มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ยับยั้งการตอบสนองต่างๆของเซลล์ได้ ทั้งนี้สมุนไพรหลายชนิดได้ถูกนำไปทดลองใช้ในผู้ป่วยและสามารถบรรเทาอาการของโรคต่างๆได้ รวมถึงไม่มีอาการข้างเคียงจากการใช้สมุนไพรนั้นๆ (95) ทั้งนี้ปัจจุบันพบเชื้อ *H. pylori* ที่ติดต่อยาแผนปัจจุบันมากขึ้น ไม่สามารถกำจัดเชื้อออกจากกระเพาะอาหารได้หมด ทั้งยังเกิดผลข้างเคียงต่อเซลล์กระเพาะอาหาร จึงมีการนำ

พืชและสมุนไพรหลายชนิดมาทดลองในการยับยั้งเชื้อ *H. pylori* และการตอบสนองของเซลล์ต่อเชื้อ ตัวอย่างเช่น ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) เป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน โดยเคอร์คิวมินนั้นเป็นสารประเภท polyphenol ที่สกัดได้จากส่วนเหง้าของขมิ้นชันเรียกว่า เคอร์คิวมิน ซึ่งมีรายงานว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *H. pylori* ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 16 µg/ml (11) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งกระบวนการอักเสบโดยออกฤทธิ์ควบคุมการแสดงออกของยีนที่สร้างไซโตไคน์และ Toll-like receptors ได้ (16) สาร zerumbone จากเหง้ากระเทียม เป็นสารอีกชนิดหนึ่งที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *H. pylori* โดยมีความ MIC เท่ากับ 250 µg/ml และลดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารได้ดีกว่า PPI ที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อในการแพทย์แผนปัจจุบัน รวมถึงสามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระได้ดี เนื่องจากพบปริมาณกลูตาไธโอนที่สูงขึ้นในเซลล์ที่ติดเชื้อ (96) และสารสกัดจากอบเชย (*Cinnamomum osmophloeum*) สามารถลดปริมาณการหลั่ง IL-8 จากเซลล์ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ได้ (15) นอกจากนี้สารสกัดจากโสมแดงยังสามารถยับยั้งการแสดงออกของ MCP-1 และ iNOS รวมถึง Jak/STAT pathway ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ได้ (97) และสารต้านอนุมูลอิสระประเภท Anthocyanin ชนิด cyanidin 3-O-glucoside หรือที่เรียกว่า asterin สามารถยับยั้งการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์กระเพาะอาหารที่ติดเชื้อ *H. pylori* ได้ โดยต้านการทำงานของ caspase-3 และลดการแสดงออกของโมเลกุล poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) ที่มีหน้าที่ในการย่อยดีเอ็นเอ รวมไปถึงสามารถยับยั้งการหลั่งโปรตีน vacA ออกมานอกตัวเชื้อ *H. pylori* ด้วย (17)

5. กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*)

เป็นพืชล้มลุกที่จัดอยู่ใน Family *Zingiberaceae* มีเหง้าอยู่ใต้ดิน มีลักษณะคล้ายขิง พบมากในประเทศอินเดีย พม่า และประเทศไทย โดยในประเทศไทยนั้นนิยมปลูกที่จังหวัดต่างๆ ในภาคเหนือ เช่น เลย ตาก กาญจนบุรี คนท้องถิ่นมักใช้เหง้าของพืชชนิดนี้ในการรักษาโรคอยู่แล้ว เนื่องจากเชื่อว่ามีสรรพคุณในการรักษาโรคกระเพาะอาหาร ลดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ต่อมาได้ศึกษาพบว่าสารสกัดจากส่วนเหง้าของกระชายดำนั้นประกอบไปด้วยสารกลุ่ม flavonoid ได้แก่ 3,5,7,49-tetramethoxyflavone, 5,7,49-trimethoxyflavone และ 5,7,39,49-tetramethoxyflavone ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย เชื้อราและปรสิตได้ ทั้งยังไม่มีอันตรายต่อเซลล์เจ้าบ้าน (19) โดยมีรายงานว่าสารสกัดจากกระชายดำสามารถยับยั้งเชื้อ

Trichophyton rubrum, *Trichophyton mentagrophytes* และ *Microsporum gypsum* ที่ความเข้มข้น 62.5, 125 และ 250 µg/ml ตามลำดับ (18) นอกจากนี้สารสกัดกระชายดำยังสามารถลดขนาดแผลในกระเพาะอาหารและมีการสร้างเยื่อเมือกมากขึ้น (98) รวมถึงยับยั้งกระบวนการอักเสบโดยลดการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างไซโตไคน์และการเกาะติดของเซลล์แมโครฟาจกับเซลล์ผนังหลอดเลือด (99) ทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งต่อทางเดินน้ำดีโดยพบว่าการแสดงออกของ Bcl-2 น้อยลงและมีการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอโทซิสผ่านเอนไซม์ caspase-3, 8 และ 9 มากขึ้น (21) แต่ว่ามีรายงานพบสารสกัดจากกระชายดำในความเข้มข้นต่างๆ พบว่าแสดงฤทธิ์ในการต้านการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ โดยพบว่าสามารถลดศักยภาพบนเยื่อหุ้มนิวเคลียสของไมโทคอนเดรียและลดการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 ได้ (100)

การศึกษาสารสกัดจากกระชายดำกับเชื้อ *H. pylori* พบว่าสารสกัดเอทานอลจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 64 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อและลดการบุกรุกของ *H. pylori* เข้าไปในเซลล์ Hep-2 ได้ (23) แต่เนื่องด้วยกระชายดำเป็นสมุนไพรที่พบได้เฉพาะในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และยังไม่เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลาย จึงยังมีข้อมูลและกลไกการออกฤทธิ์ต่อกระบวนการตอบสนองของเซลล์กระเพาะอาหารเนื่องจากการติดเชื้อ *H. pylori* อย่างจำกัด



รูปที่ 7 กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) (ที่มา: <http://frynn.com/>)

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

Agar bacteriological, Brain heart infusion สั่งซื้อจากบริษัท Oxoid ประเทศอังกฤษ
 Mueller-hinton agar สั่งซื้อจากบริษัท Becton Dickinson ประเทศสหรัฐอเมริกา
 สี Trypan blue สั่งซื้อจากบริษัท Gibco ประเทศสหรัฐอเมริกา
 RPMI 1640, Fetal bovine serum และ Trypsin สั่งซื้อจากบริษัท Caisson Laboratories
 ประเทศสหรัฐอเมริกา
 Phosphate-buffered saline สั่งซื้อจากบริษัท GE Healthcare ประเทศสหรัฐอเมริกา
 Antibiotican/Antimycotic สั่งซื้อจากบริษัท Capricorn Scientific ประเทศเยอรมัน
 สี Cytoquick สั่งซื้อจากบริษัท Muto Pure Chemical ประเทศญี่ปุ่น
 Bovine Serum Albumin, Dimethyl sulfoxide, Paraformaldehyde และ Formalin สั่งซื้อ
 จากบริษัท Wako Pure Chemical Industries ประเทศญี่ปุ่น
 น้ำยา Bradford , Sodium dodecyl sulfate , 2x Laemmli Sample Buffer และ
 Polyacrylamide สั่งซื้อจากบริษัท Biorad ประเทศสหรัฐอเมริกา
 RIPA lysis buffer ที่ผสม protease inhibitor สั่งซื้อจากบริษัท Thermo Fisher Scientific
 ประเทศสหรัฐอเมริกา
 ชุดน้ำยา Amersham ECL Prime Western Blotting Detection สั่งซื้อจากบริษัท GE
 Healthcare ประเทศสหรัฐอเมริกา
 ชุดน้ำยา Human ELISA Kit สั่งซื้อจากบริษัท Abcam plc. ประเทศอังกฤษ
 ชุดน้ำยา Caspase-Glo® 8 และ Caspase-Glo® 3/7 Assay สั่งซื้อจากบริษัท Promega
 Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
 ชุดน้ำยา Cell Death Detection *ELISAPLUS* สั่งซื้อจากบริษัท Roche Diagnostics Ltd.
 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

วิธีการทดลอง

1. สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยและการเพาะเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ที่มีปัจจัยความรุนแรงชนิด vacA s1a/m1 และ cagA บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain heart infusion agar (Oxoid ประเทศอังกฤษ) ซึ่งมีส่วนประกอบของเลือดแกะ 7% (ปริมาตรต่อปริมาตร) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะออกซิเจนเจือจาง (Microaerobic condition, ออกซิเจน 6-12%, คาร์บอนไดออกไซด์ 5-8%) ใน Anaerobic jar โดยใส่ Gas Pack (Anaero Pack-MicroAero ประเทศญี่ปุ่น)

2. การเตรียมสารละลายของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมิน

ซึ่งสารสกัดเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) ของกระชายดำที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ ละลายใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) สำหรับการทดสอบ Minimum inhibitory concentration (MIC) เตรียมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ สำหรับการทดสอบ ในเซลล์เพาะเลี้ยง เตรียมที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยรายละเอียดที่มาของ สารสกัดกระชายดำใช้วิธีบ่ม (Maceration) ดังนี้ เริ่มจากการล้างทำความสะอาดเหง้าของ กระชายดำด้วยน้ำประปา หั่นให้ละเอียด เติมเอทิลอะซิเตท ปริมาตร 200 มิลลิลิตรลงไป บ่มไว้ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ทำการกรองแยกเอทิลอะซิเตทออกจากกากกระชายดำ ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำกากกระชายดำที่แยกได้มาทำการสกัดซ้ำเป็นครั้งที่ 2 นำสารสกัด เอทิลอะซิเตทที่กรองครั้งที่ 1 และ ครั้งที่ 2 มารวมกัน นำไประเหยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ออกโดยเครื่อง rotary evaporator (Heidolph ประเทศเยอรมัน) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกว่าตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทจะระเหยออกไปหมด ทำการบันทึกน้ำหนักรวมของสารสกัด จากเอทิลอะซิเตท จากนั้นละลายสารสกัดที่ได้ใน DMSO เพื่อเตรียม Stock solution ที่ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน (Minisart ประเทศสหรัฐอเมริกา) และเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียสในที่มืด

สำหรับเคอร์คิวมิน (Diferuloylmethane; CAS No. 458-37-7) (Sigma-aldrich ประเทศ สหรัฐอเมริกา) เตรียมโดยละลายผงเคอร์คิวมิน ใน DMSO ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตร สำหรับการทดสอบ Minimum inhibitory concentration (MIC) และ 100 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง

3. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินที่น้อยที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี Agar dilution

การทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (Minimum inhibitory concentration, MIC) ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Muller Hinton Agar (MHA) (Becton Dickinson ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่ประกอบด้วยเลือดแกะ 5% (ปริมาณต่อปริมาตร) นำสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำหรือเคอร์คิวมินมาเจือจางลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นลำดับ 2 เท่า (2 folded dilutions) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4, 8, 16, 32, 64 และ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรรวม 25 มิลลิลิตร จากนั้นเทลงในจานอาหาร ทิ้งไว้ให้อาหารที่ผสมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำหรือเคอร์คิวมินแข็งตัว จากนั้นนำเชื้อ *H. pylori* ที่มีอายุ 3 วัน มาละลายใน 0.85% NaCl ให้ได้ความขุ่น 1×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และจุดเชื้อปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำหรือเคอร์คิวมินความเข้มข้นต่างๆ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 3 วัน ในสภาวะออกซิเจนเจือจาง (101) จากนั้นสังเกตและอ่านผลการเจริญเติบโตของเชื้อ

4. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเยื่อบุกระเพาะอาหาร

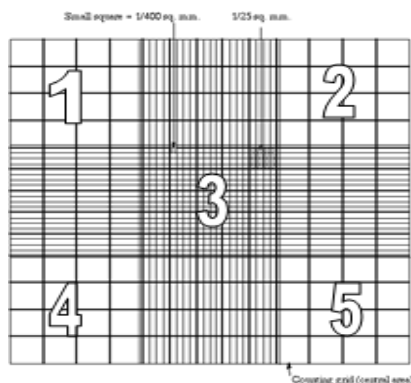
เซลล์มะเร็งเยื่อบุกระเพาะอาหารชนิด Gastric adenocarcinoma (AGS) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยา คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเลี้ยงเซลล์ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร (T25) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 (Caisson Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่ประกอบด้วย 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Caisson Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา) และ 1% antibiotic/antimycotic (Capricorn Scientific ประเทศเยอรมัน) โดยบ่มในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 5% และมีความชื้น 80% เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนมีความหนาแน่นประมาณ 80-90% ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกและล้างด้วย 1x Phosphate-buffered saline (PBS) (GE Healthcare ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่ปราศจากแคลเซียม (Ca^{2+}) และ

แมกนีเซียม (Mg^{2+}) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มเซลล์ใน 1x PBS ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ในสภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์นาน 5 นาที เท PBS ออกแล้วเติม 0.5% trypsin (Caisson Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-4 นาที และเคาะขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ด้านข้าง เพื่อให้เซลล์หลุดออกมาจนหมด สังเกตลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เซลล์ควรมีลักษณะกลม หลุดแยกออกจากขวดเพาะเลี้ยง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อลงไป 3 มิลลิลิตร และปิเปตชะล้างขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ทั่ว เพื่อให้เซลล์หลุดจากขวดทั้งหมด จากนั้นย้ายเซลล์ลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปปั่นด้วยความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี trypsin ผสมอยู่ออก จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อลงไปจำนวน 2-4 มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับปริมาณเซลล์ที่ได้ ปิเปตขึ้นลงประมาณ 30 ครั้ง เพื่อให้เซลล์แยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว จากนั้นจึงนำไปเซลล์ไปนับใต้กล้องจุลทรรศน์และคำนวณปริมาณเซลล์ที่ต้องการดูดเซลล์ใส่ในขวดใหม่ที่มีขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตรหรือ 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในปริมาณ $2-5 \times 10^4$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีปริมาตรสุดท้าย 5 มิลลิลิตรสำหรับขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ T25 หรือ 15 มิลลิลิตรสำหรับขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ T75

5. การนับปริมาณเซลล์

การทดสอบต่างๆในเซลล์เพาะเลี้ยงต้องใช้ปริมาณเซลล์ตั้งต้นตามมาตรฐานที่กำหนด จึงต้องทำการนับปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยนำเซลล์ที่ถูกเก็บเกี่ยวออกมาและปิเปตให้แยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว ดูดเซลล์ปริมาณ 20 ไมโครลิตร มาผสมกับสี trypan blue (Gibco ประเทศสหรัฐอเมริกา) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้เวลานาน 1 นาที ใช้ปิเปตดูดเซลล์ที่ผสมกับสีแล้วมาเติมลงบน Hemocytometer counting chamber ทั้ง 2 ข้างจนเต็ม ระวังไม่ให้ขอบของเหลวล้นออกมาหรือมีฟองอากาศ ทำการนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า นับเซลล์ที่ไม่ติดสีน้ำเงินในตาราง 5 ช่อง ดังรูปที่ 8 และทำการคำนวณปริมาณเซลล์ตามสูตร

จำนวนเซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร = (จำนวนเซลล์ที่นับได้ \div 5) \times ค่าการเจือจางในสี trypan blue $\times 10^4$



รูปที่ 8 Hemocytometer counting chamber

6. การทดสอบหาปริมาณเซลล์ AGS ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบการอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ AGS บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์รูปวงกลมขนาด 96 หลุม จำนวน 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 และ 5×10^4 เซลล์ต่อหลุม นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (Bio Basic INC. ประเทศแคนาดา) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในสภาวะเดียวกับที่ใช้เลี้ยงเซลล์และอยู่ในที่มืด นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นละลายตะกอน formazan สีม่วงที่เกิดขึ้นด้วย 10% SDS ที่เตรียมใน 0.01 N HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และบ่มต่อในสภาวะเดิมนานข้ามคืน หากยังสังเกตเห็นตะกอนสีม่วงใต้กล้องจุลทรรศน์ ให้บ่มต่อจนกว่าตะกอนสีม่วงจะละลายหมดทุกหลุม แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่าน microplate (Synergy HT, BioTek ประเทศอเมริกา) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และความยาวคลื่นอ้างอิง 630 นาโนเมตร เลือกปริมาณเซลล์ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสุทธิในช่วง 0.75 - 1.25 นำไปทำการทดสอบต่อไป โดยคำนวณค่าการดูดกลืนแสงสุทธิดังสูตร

ค่าการดูดกลืนแสงสุทธิ = ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร - ความยาวคลื่นอ้างอิง 630 นาโนเมตร

7. การทดสอบสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ ต่อการอยู่รอดของเซลล์ AGS

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ AGS จำนวน 1×10^4 บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์รูปวงกลมขนาด 96 หลุม โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย 10% FBS และปราศจากยาปฏิชีวนะ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกและเติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจาก

กระชายดำหรือเคอร์คิวมินที่เตรียมไว้ โดยทำการเจือจางเป็นลำดับ 2 เท่า ในอาหารเลี้ยงเซลล์จนได้ความเข้มข้น 8-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมสารสกัดลงในหลุมทดสอบ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติม DMSO ที่ความเข้มข้นที่สูงสุดที่ละลายอยู่ในสารสกัด (0.128 %) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมควบคุม เพื่อทดสอบผลกระทบของตัวทำละลายต่อเซลล์ และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมควบคุมลบ เตรียมการทดสอบทั้งหมด 3 ชุด แต่ละชุดบ่มที่เวลาต่างกัน ดังนี้ 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ในสถานะเดียวกับที่ใช้เลี้ยงเซลล์และอยู่ในที่มืด จากนั้นเติมน้ำยา MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในสถานะเดิม นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นละลายตะกอนด้วย 10% SDS ที่เตรียมใน 0.01 N HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และบ่มต่อในสถานะเดิมนานข้ามคืน หากยังสังเกตเห็นตะกอนสีม่วงใต้กล้องจุลทรรศน์ ให้บ่มต่อจนกว่าตะกอนสีม่วงจะละลายหมดทุกหลุม แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่าน microplate ที่ความยาวคลื่น 570 nm และความยาวคลื่นอ้างอิง 630 nm จากนั้นคำนวณค่าการดูดกลืนแสงสุทธิ โดยนำค่าดูดกลืนแสงทั้ง 2 ความยาวคลื่นมาหักลบกัน โดยใช้หลุมที่ไม่มีเซลล์อยู่เป็นหลุม blank คำนวณ % การอยู่รอดของเซลล์เปรียบเทียบกับหลุมควบคุมลบที่ไม่ได้เติมสารสกัด ดังสูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ การอยู่รอดของเซลล์} = (\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของหลุมทดสอบ} \div \text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุมลบ}) \times 100$$

8. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบเบื้องต้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินต่อการหลั่งสารอินเทอร์ลูคิน-8 (IL-8) ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori*

เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในเบื้องต้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมิน รวมไปถึงการคัดเลือกเฉพาะสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบไปศึกษาในการทดสอบอื่น

8.1 การวัดปริมาณของเชื้อโดยวิธีวัดความขุ่นของเชื้อและการนับโคโลนี

เพื่อวัดปริมาณของเชื้อ *H. pylori* ในแต่ละระดับความขุ่นมาตรฐาน McFarland standard ว่ามีจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรเท่ากับเท่าใด เพื่อใช้คำนวณอัตราส่วนของเซลล์ต่อเชื้อใน

การทดสอบปฏิกิริยาการอักเสบและอะพอโทซิสของเซลล์ โดยนำเชื้อที่มีอายุ 3 วัน ตามข้อ 1 ละลายลงใน 0.85% NaCl และนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องวัดความขุ่น (Densitometer) (Biomérieux Biotechnology ประเทศฝรั่งเศส) ปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 2, 4, 5, 6 และ 7 McFarland standard จากนั้นเจือจางแต่ละความขุ่นลง 10 เท่าด้วย 0.85% NaCl จำนวน 7 หลอด จะได้ความเข้มข้นที่ 10^{-1} ถึง 10^{-7} จากนั้นนำเชื้อจากหลอดที่มีความเข้มข้น 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} และ 10^{-7} ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปกระจายด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion agar ที่ผสมเลือดแกะ 7% ด้วย Hockey stick และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ และสภาวะเดียวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ นาน 3 วัน ทำการนับเฉพาะจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวน โคโลนีในช่วง 30 - 300 โคโลนี จากนั้นคำนวณปริมาณเชื้อแบคทีเรียตั้งต้นที่ค่าความขุ่นต่างๆ จากสูตร

ปริมาณเชื้อต่อมิลลิลิตร = จำนวนโคโลนี x ปริมาตรที่นำมากระจาย x ค่าการเจือจาง (โคโลนีต่อมิลลิลิตร)

8.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินใน สภาวะ co-culture

โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ AGS จำนวน 5×10^4 เซลล์ ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์รูปร่างกลมขนาด 24 หลุม บ่มในสภาวะเพาะเลี้ยงเซลล์ตั้งข้างต้น นาน 24 ชั่วโมง สำหรับหลุมทดลองที่เติม สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำกับเซลล์ที่ติดเชื้อ *H. pylori* เริ่มจากนำเชื้อ *H. pylori* อายุ 3 วัน มาละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย 10% FBS ให้มีความขุ่น 5 McFarland standard (ประมาณ 5×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) แล้วเติมลงในแต่ละหลุมที่กำหนดไว้ หลุมละ 100 ไมโครลิตร ในอัตราส่วนเซลล์ต่อเชื้อเท่ากับ 1:100 ต่อมาเติมสารสกัด เอทิลอะซิเตทจากกระชายดำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8 หรือ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับหลุมทดลองสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำกับเซลล์ เติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจาก กระชายดำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 16 หรือ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับหลุมควบคุมตัวทำลาย เติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.032% และ หลุมควบคุมลบเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยทุกหลุมมีปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8.3 การตรวจวัดปริมาณ IL-8 ด้วยวิธี ELISA

นำอาหารเลี้ยงเซลล์จากข้อ 8.2 มาปั่นแยกตะกอนเซลล์ออกที่ความเร็ว 1,000 x g นาน 10 นาที ทดสอบด้วยชุดน้ำยา Human ELISA Kit (Abcam plc. ประเทศอังกฤษ) โดยนำตัวอย่างทั้งในหลุมทดสอบและหลุมควบคุมอย่างละ 100 ไมโครลิตร และสารละลายมาตรฐานที่ทราบปริมาณ IL-8 อย่างละ 100 ไมโครลิตร เติมลงในหลุมทดสอบสำเร็จรูป รูปวงกลมขนาด 96 หลุม ที่ถูกติดแอนติบอดีต่อ IL-8 ไว้แล้วที่ก้นหลุม จากนั้นเติมแอนติบอดีต่อ IL-8 ที่ติดฉลากด้วย Biotin ลงไป หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปิดหลุมทดสอบด้วยพลาสติกใส บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออก 3 ครั้ง ด้วย wash buffer จำนวน 300 ไมโครลิตร จากนั้นเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย streptavidin และ เอนไซม์ Horse Radish Peroxidase (HRP) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปิดหลุมทดสอบด้วยพลาสติกใสและ บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 300 ไมโครลิตร จากนั้นเติม TMB substrate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดนาน 12-15 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย stop solution 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วยเครื่องอ่าน microplate และคำนวณปริมาณ IL-8 ของตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานระหว่างสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 62.5 - 2,000 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละความเข้มข้น

9. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการหลั่งสารอินเทอร์ลิวคิน-8 (IL-8) ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori*

เพื่อศึกษารูปแบบต่างๆของการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ โดยทำการบ่มเซลล์ AGS กับเชื้อ *H. pylori* และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในสภาวะต่างกัน 3 แบบ คือ บ่มในสภาวะ co-culture เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยรวม บ่มในสภาวะ pre-treatment เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์แบบป้องกันการอักเสบและบ่มในสภาวะ pre-infection เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบหลังจากการติดเชื้อแล้ว

9.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในสภาวะ co-culture ที่เวลาต่างๆ

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ AGS จำนวน 5×10^4 เซลล์ ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์รูปวงกลมขนาด 24 หลุม บ่มในสภาวะเพาะเลี้ยงเซลล์ตั้งข้างต้น นาน 24 ชั่วโมง สำหรับหลุมทดลองสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำกับเซลล์ที่ติดเชื้อ *H. pylori* เริ่มจากนำเชื้อ *H. pylori* อายุ 3 วัน มาละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย 10% FBS ให้มีความขุ่น 5 McFarland standard (ประมาณ 5×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) แล้วเติมลงในแต่ละหลุมที่กำหนดไว้ หลุมละ 100 ไมโครลิตร ในอัตราส่วนเซลล์ต่อเชื้อเท่ากับ 1:100 ต่อมาเติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8 หรือ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับหลุมทดลองสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำกับเซลล์ เติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8 หรือ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับหลุมควบคุมตัวทำละลาย เติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.016% และหลุมควบคุมลบเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยทุกหลุมมีปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร โดยเตรียมการทดสอบทั้งหมด 3 ชุด แต่ละชุดบ่มที่เวลาต่างกัันดังนี้ 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

9.2 การทดสอบฤทธิ์ป้องกันการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในสภาวะ pre-treatment ที่เวลาต่างๆ

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ AGS จำนวน 5×10^4 เซลล์ ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์รูปวงกลมขนาด 24 หลุม นำไปเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง สำหรับหลุมทดลองที่เติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำก่อนใส่เชื้อ *H. pylori* เริ่มจากบ่มเซลล์กับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่มีความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลุมที่กำหนดเท่ากับ 8 หรือ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ล้างสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำออกด้วย 1 X PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 1 มิลลิลิตร นำเชื้อ *H. pylori* อายุ 3 วัน มาละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย 10% FBS โดยเตรียมเชื้อให้มีความขุ่น 5 McFarland standard (ประมาณ 5×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) แล้วเติมลงในแต่ละหลุมที่กำหนดไว้ หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ครบ 1 มิลลิลิตร จะทำให้ได้อัตราส่วนเซลล์ต่อเชื้อเท่ากับ 1:100 สำหรับหลุมทดลองสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำกับเซลล์ เติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจาก

กระชายดำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8 หรือ 16 ไมโครกรัมต่อ สำหรับหลุมควบคุม ตัวทำละลายเติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.016% และหลุมควบคุมลบเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยให้ทุกหลุมมีปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร ล้างทุกหลุมด้วย 1 X PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 1 มิลลิลิตร แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปหลุมละ 1 มิลลิลิตร โดยเตรียมการทดสอบทั้งหมด 2 ชุด บ่มที่เวลาต่างกันคือ 3 และ 6 ชั่วโมง หลังจากขั้นตอนการล้างจึงนำไปบ่มในสภาวะเดิม ต่ออีก 3 และ 6 ชั่วโมง

9.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำหลังจากเซลล์ติดเชื้อ *H. pylori* (pre-infection)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ AGS จำนวน 5×10^4 เซลล์ ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์รูปร่างกลมขนาด 24 หลุม นำไปเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง สำหรับหลุมทดลองที่เติมเชื้อ *H. pylori* ก่อนบ่มกับ สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ เริ่มจากบ่มเซลล์กับเชื้อ *H. pylori* อายุ 3 วัน ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย 10% FBS โดยเตรียมเชื้อให้มีความขุ่น 5 McFarland standard (ประมาณ 5×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) แล้วเติมลงในแต่ละหลุมที่กำหนดไว้ หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ครบ 1 มิลลิลิตร จะทำให้ได้อัตราส่วนเซลล์ต่อเชื้อเท่ากับ 1:100 นำไปบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นล้างเชื้อ *H. pylori* ออกด้วย 1X PBS จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร เติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8 หรือ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มต่ออีกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง สำหรับหลุมทดลองสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำกับเซลล์ เติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8 หรือ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับหลุมควบคุมตัวทำละลาย เติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.016% และหลุมควบคุมลบเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยทุกหลุมมีปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

9.4 การตรวจวัดปริมาณ IL-8 ด้วยวิธี ELISA

นำอาหารเลี้ยงเซลล์จากข้อ 9.1-9.3 มาปั่นแยกตะกอนเซลล์ออกที่ความเร็ว 1,000 x g นาน 10 นาที ทดสอบด้วยชุดน้ำยา Human ELISA Kit (Abcam plc. ประเทศอังกฤษ) ดังขั้นตอนในข้อที่ 8.3

10. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการแสดงออกของโปรตีน MCP-1 ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี Western Blot

10.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในสภาวะ co-culture ที่เวลา 12 ชั่วโมง

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ AGS จำนวน 5×10^4 เซลล์ ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์รูปร่างกลมขนาด 24 หลุม บ่มในสภาวะเพาะเลี้ยงเซลล์ตั้งข้างต้น นาน 24 ชั่วโมง สำหรับหลุมทดลอง สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำกับเซลล์ที่ติดเชื้อ *H. pylori* เริ่มจากนำเชื้อ *H. pylori* อายุ 3 วัน มาละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย 10% FBS ให้มีความขุ่น 5 McFarland standard (ประมาณ 5×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) แล้วเติมลงในแต่ละหลุมที่กำหนดไว้ หลุมละ 100 ไมโครลิตร ในอัตราส่วนเซลล์ต่อเชื้อเท่ากับ 1:100 ต่อมาเติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8 หรือ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับหลุมทดลองสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำกับเซลล์ เติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8 หรือ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับหลุมควบคุมตัวทำลาย เติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.016% และหลุมควบคุมลบเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยทุกหลุมมีปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่เวลา 12 ชั่วโมง

10.2 การสกัดโปรตีนภายในเซลล์

ย้ายจานเพาะเลี้ยงเซลล์ข้อที่ 10.1 ไปวางไว้บนน้ำแข็ง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง แล้วล้างด้วย 1X PBS อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม RIPA lysis buffer ที่ผสม protease inhibitor (Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มบนน้ำแข็ง นาน 5 นาที โดยทำการเคาะจานเพาะเลี้ยงทุกๆ 1 นาที จากนั้นใช้ cell scraper ขูดเซลล์ออกจากกันหลุม เอียงจานเพาะเลี้ยงและเติม 1X PBS อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 100 ไมโครลิตร เพื่อชะล้างเซลล์ออกจากกันหลุมให้หมด จากนั้นดูดใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มบนน้ำแข็งต่ออีก 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเฉพาะส่วนใสไปทำการวัดโปรตีนต่อไป

10.3 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford และการเตรียมโปรตีน

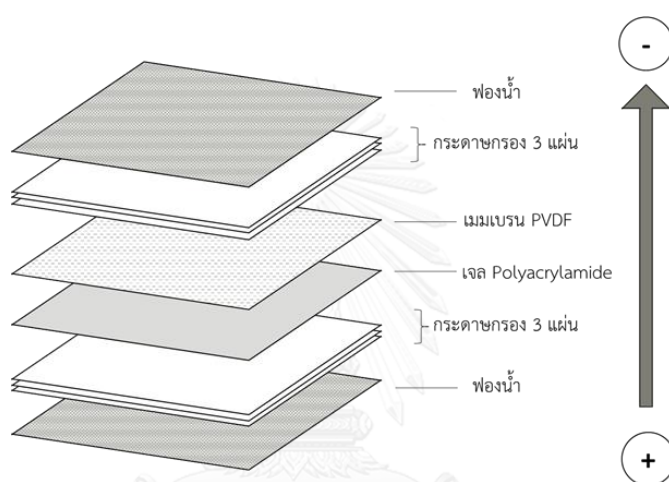
เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานดังนี้ ละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น จากนั้นเจือจางลงเป็นลำดับ 2 เท่า ให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.005-2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นและโปรตีนที่สกัดได้ลงในหลุมรูปร่างกลมขนาด 96 หลุม หลุมละ 10 ไมโครลิตร เติมน้ำยา Bradford สำเร็จรูป (Biorad ประเทศสหรัฐอเมริกา) ลงไปหลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย plate shaker เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง อ่านผลด้วยเครื่อง microplate reader (Tecan Group Ltd. ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) คำนวณปริมาณโปรตีนรวมจากกราฟสารละลายมาตรฐาน ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลาย BSA มาตรฐาน จากนั้นปรับความเข้มข้นโปรตีนของตัวอย่างด้วย RIPA buffer ให้เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำโปรตีนความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 15 ไมโครลิตร ไปผสมกับ 2x Laemmli Sample Buffer (Biorad ประเทศสหรัฐอเมริกา) จำนวน 15 ไมโครลิตร ทำให้ได้ความเข้มข้นโปรตีนสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรรวม 30 ไมโครลิตร ก่อนนำตัวอย่างไปแยกภายใต้กระแสไฟฟ้าด้วยวิธี SDS-PAGE ให้ปัมที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

10.4 การแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

ประกอบชุดสำหรับเตรียมเจลในการทำ SDS-PAGE (Biorad ประเทศสหรัฐอเมริกา) จากนั้นเติมแอลกอฮอล์ลงไป เพื่อตรวจสอบรอยรั่วของกระจก เติม 12% separating gel ลงไป 4.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นเพื่อไล่ฟองอากาศในเจลออกให้หมด รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 15 นาที แล้วซับน้ำกลั่นออก เติม 6% stacking gel ประมาณ 2 มิลลิลิตร และใส่หัวลงไป รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 10 นาที จากนั้นจึงดึงหัวออก แล้วย้ายเจลที่เตรียมไว้ลงใน electrophoresis chamber และเติม 1 x running buffer ลงไปจนถึงขีดบอกปริมาณด้านบน เติมโปรตีนตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 11.3 ลงไปในเจลจำนวน 30 ไมโครลิตร และเติม marker จำนวน 5 ไมโครลิตร จากนั้นให้กระแสไฟฟ้าที่ 80 โวลต์ นาน 30 นาที และ 120 โวลต์ นาน 60 นาที

10.5 การย้ายโปรตีนลงบนเมมเบรน (Protein Blotting)

แช่เมมเบรนชนิด Polyvinylidene difluoride (PVDF) ที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน (Merck ประเทศเยอรมัน) ด้วย 100% เมทานอล นาน 5 นาที ล้างออกด้วย 1 x transfers buffer จากนั้นวางฟองน้ำ แผ่นกระดาษกรอง เจลจากการทำ SDS-PAGE ในข้อที่ 11.4 และ เมมเบรนชนิด PVDF ดังรูปที่ 9 แล้วใช้ลูกกลิ้งกำจัดฟองอากาศออกให้หมด จากนั้นย้ายลงไปใน Blotting chamber ที่วางบนน้ำแข็งและเติม 1 x transfers buffer ลงไปจนถึงขีดบอกระดับด้านนอก ให้กระแสไฟฟ้า 150 แอมแปร์ นาน 90 นาที



รูปที่ 9 การย้ายโปรตีนลงบนเมมเบรน (Protein Blotting)

10.6 การตรวจสอบโปรตีนด้วยแอนติบอดี

แช่เมมเบรน PVDF จากข้อ 10.5 ลงใน 1 x blocking buffer เขย่าเบาๆ ประมาณ 20 รอบ ต่อนาที นาน 30 นาที จากนั้นเท blocking buffer ออก และทำการตัดเมมเบรนที่ระหว่าง 13 kDA และ 40 kDA โดยสังเกตจากแถบของ marker จากนั้นเติมแอนติบอดีต่อ MCP-1 (Abcam plc. ประเทศอังกฤษ) ที่เจือจางด้วย 1 x blocking buffer ในอัตราส่วน 1:4000 จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในเมมเบรนส่วน 13 kDA หรือแอนติบอดีต่อ GAPDH (Abcam plc. ประเทศอังกฤษ) ที่เจือจางด้วย 1 x blocking buffer ในอัตราส่วน 1:800 จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในเมมเบรนส่วน 40 kDA บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าเบาๆ ประมาณ 20 รอบ ต่อนาที นานข้ามคืน จากนั้นเทแอนติบอดีออกแล้วล้างเมมเบรนด้วย 1 x TBST ประมาณ 10 มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่าเบาๆ ประมาณ 20 รอบต่อนาที 3 ครั้งๆละ 10 นาที

จากนั้นเท 1 x TBST ออก แล้วเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย HRP (Abcam plc. ประเทศอังกฤษ) ที่เจือจางด้วย 1 x blocking buffer ในอัตราส่วน 1:1000 ลงในเมมเบรนทั้ง 2 ส่วน ส่วนละ 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าเบาๆ ประมาณ 20 รอบต่อนาที่ นาน 1 ชั่วโมง เทออกแล้วล้างเมมเบรนด้วย 1 x TBST ประมาณ 10 มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่าเบาๆ ประมาณ 20 รอบต่อนาที่ 3 ครั้งๆละ 10 นาที จากนั้นใช้ชุดน้ำยา Amersham ECL Prime Western Blotting Detection (GE Healthcare ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยเติม substrate 1 และ substrate 2 ในอัตราส่วน 1 : 1 ลงไปในเมมเบรนแต่ละส่วน ปิดด้วยพลาสติกใส แล้วนำไปถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยใช้เวลา exposure นาน 30 นาที

11. การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *H. pylori*

เป็นที่ทราบกันว่าตัวเชื้อ *H. pylori* สามารถกระตุ้นการตอบสนองในกระบวนการอักเสบของเซลล์ต่างๆ ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่ไม่มีชีวิตและส่วนของโปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้จากตัวเชื้อ *H. pylori* นั้นสามารถกระตุ้นกระบวนการอักเสบได้ในระดับที่ไม่แตกต่างกัน (102) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยใช้โปรตีนจากตัวเชื้อ *H. pylori* เป็นสารกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์

11.1 การสกัดโปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* โดยใช้คลื่นเสียง

เพื่อสกัดแยกเฉพาะโปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* นำเชื้อ *H. pylori* อายุ 3 วัน ละลายใน 1X PBS ให้ได้ความขุ่น 6 McFarland standard (ประมาณ 1×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียง (High Intensity Ultrasonic processor) (Sonics & Materials ประเทศอเมริกา) ความถี่คลื่นที่ 40 แอมพลิจูดไมครอน จำนวน 30 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที แห่หลอดเขี่ยบนน้ำแข็งตลอดเวลา ปั่นตกตะกอนเศษเซลล์ที่ 12,000 รอบต่อนาที่ นาน 15 นาที เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว นำไปวัดปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford ดังข้อที่ 10.3

11.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ THP-1 และ HL-60

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (THP-1) และ เซลล์ตัวอ่อนเม็ดเลือดขาวระยะโปรโมอีโลไซต์ (HL-60) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ Tetsuo Kubota, School of Health Care Sciences, Department of Immunology and Microbiology, Tokyo Medical and Dental University โดยเลี้ยงเซลล์ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร (T25) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย 10% FBS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 5% และมีความชื้น 80% เมื่อสีของอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเหลืองให้ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไป หากเซลล์เจริญเติบโตจนมีความหนาแน่น 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้แบ่งเซลล์ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ โดยปิเปิดขึ้นลงประมาณ 30 ครั้ง เพื่อให้เซลล์แยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว ดูดเซลล์ใส่ในขวดใหม่ ในปริมาณ $1-5 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรรวม 5 มิลลิลิตร สำหรับขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ T25 หรือ 15 มิลลิลิตรสำหรับขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ T75

11.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ที่ตอบสนองต่อโปรตีนของเชื้อ *H. pylori*

11.3.1 การเตรียมเซลล์ THP-1

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ THP-1 จำนวน 5×10^6 เซลล์ ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม 0.1% FBS (starvation medium) เป็นเวลา 2 วัน ในสภาวะเดียวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ข้างต้น ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง เติม starvation medium ใหม่ลงไป 1 มิลลิลิตร ปิเปิดขึ้นลงประมาณ 10 ครั้ง แล้วนำไปกรองผ่านที่กรองเซลล์ที่มีรูพรุนขนาด 40 ไมครอน เพื่อกำจัดเซลล์ที่เกาะกลุ่มกันออก เนื่องจากเซลล์ที่เกาะกลุ่มกันทำให้มีผลต่อความแปรปรวนของการนับเซลล์เคลื่อนที่ได้ นำเซลล์ไปนับใต้กล้องจุลทรรศน์

11.3.2 การเตรียม Transwells สำหรับการทดสอบ

เจือจาง fibronectin (Becton Dickinson ประเทศสหรัฐอเมริกา) ในอัตราส่วน 1:20 จากความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย 1x PBS จากนั้นเติมลงใน Transwells ด้านบน

ที่มีเมมเบรนรูปทรงแท่งขนาด 5 ไมครอน จำนวน 75 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย 1X PBS หรือ starvation medium ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง

11.3.3 การทดสอบปริมาณโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* ที่เหมาะสมต่อการทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์

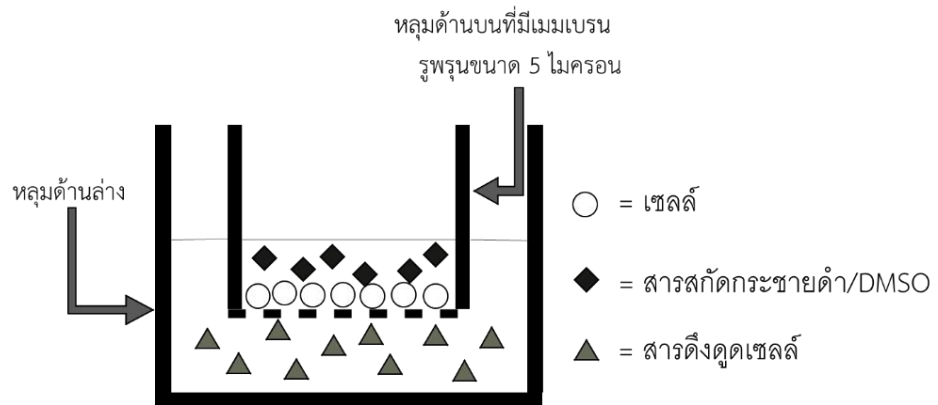
เติมสารตั้งคูดเซลล์ที่ต้องการทดสอบลงในหลุมทดสอบด้านล่างของแต่ละ Transwells ดังนี้ หลุมควบคุมลบเติม starvation medium , หลุมควบคุมบวกเติม Platelet-Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB) ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (PeproTech ประเทศสหรัฐอเมริกา) , หลุมทดสอบเติมโปรตีนที่สกัดจากเชื้อ *H. pylori* ในข้อ 11.1 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร , 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเติมสารตั้งคูดเซลล์ดังกล่าว จำนวนหลุมละ 600 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเซลล์ THP-1 ที่เตรียมไว้ในข้อที่ 11.3.1 จำนวน 10^5 เซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไปหลุมด้านบนทุกหลุม สังเกตและกำจัดฟองอากาศออกให้หมด จากนั้นนำไปบ่มที่สภาวะเดียวกับการเลี้ยงเซลล์ โดยใช้เวลาบ่มนาน 90 นาที ล้างหลุมด้านบนด้วย 1X PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติม 10% Formalin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ดูด 10% Formalin ทิ้ง จากนั้นย้อมสีเมมเบรนด้วยสี Cytoquick (Muto Pure Chemical Co.Ltd. ประเทศญี่ปุ่น) โดยย้อมด้วย Cytoquick stain solution A นาน 5 วินาที และ Cytoquick stain solution B นาน 15 วินาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยการนำไปแกว่งในน้ำประปาเบาๆ ปลอ่ยให้เมมเบรนแห้งนานข้ามคืน ตรวจสอบการกระจายของเซลล์ได้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อหลีกเลี่ยงการนับเซลล์ในบริเวณที่มีเซลล์เกาะกลุ่มกัน ใช้ไม้พันสำลีชุบน้ำสะอาดหมาด เช็ดเซลล์ด้านบนของเมมเบรนออก ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่ได้มีการเคลื่อนที่เข้ามาในรูพรุนของเมมเบรน นำไปถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 20X จำนวน 10 วงกลิ้ง นับเซลล์ด้วยโปรแกรม ImageJ และคำนวณค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่นับได้

11.3.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ที่ตอบสนองต่อโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* และ LPS

นอกจากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวเนื่องจากการตั้งคูดของโปรตีนจากเชื้อ *H. pylori* แล้ว ยังมีการทดสอบ

เปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวเนื่องจาก Lipopolysaccharide (LPS) ที่เป็นส่วนประกอบของแบคทีเรียแกรมลบทั่วไป รวมถึงเปรียบเทียบความสามารถในการดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ระหว่างโปรตีนจากเชื้อ *H. pylori* และ LPS โดยการเตรียมเซลล์ THP-1 และ หลุมทดสอบดังข้อที่ 11.3.1 และ 11.3.2 จากนั้นเตรียมหลุมทดสอบทั้งหมด 2 ชุด ที่หลุมด้านล่างของแต่ละชุดประกอบด้วย หลุมควบคุมลบที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์, หลุมควบคุมบวกที่เติม PDGF-BB, หลุมที่เติมโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* หรือ หลุมที่เติม LPS สำหรับหลุมควบคุมตัวทำละลาย DMSO และหลุมทดสอบสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ ดังตารางที่ 2 และ 3 จากนั้นเติมสารดึงดูดเซลล์ลงในหลุมด้านล่างของหลุมทดสอบ ดังนี้ หลุมควบคุมลบ เติม starvation medium ปริมาณ 600 ไมโครลิตร, หลุมควบคุมบวก เติม PDGF-BB 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 600 ไมโครลิตร, หลุมทดสอบเติมโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* ที่สกัดได้จากข้อ 11.1 ที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ LPS 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Sigma-aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) ปริมาณ 600 ไมโครลิตร อย่างละ 3 หลุม, หลุมควบคุมตัวทำละลายเติมโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* ที่สกัดได้จากข้อ 11.1 ที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ LPS 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Sigma-aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) ปริมาณ 600 ไมโครลิตร ต่อมาเติมเซลล์ THP-1 ในข้อ 11.3.1 จำนวน 1×10^5 เซลล์ ที่หลุมด้านบนทุกหลุมของทั้ง 2 ชุด ทดสอบ จากนั้นเติม 0.016 % DMSO ที่ด้านบนของหลุมควบคุมตัวทำละลาย และเติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ด้านบนของหลุมทดสอบโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* หรือ LPS แต่ละหลุม โดยปรับปริมาตรของหลุมด้านบนให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม สังเกตและกำจัดฟองอากาศออกทั้งหมด จากนั้นนำไปปั่นที่สภาวะเดียวกับการเลี้ยงเซลล์ บ่มนาน 90 นาที ล้างหลุมด้านบนด้วย 1X PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติม 10% Formalin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทั้งไว้นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูด 10% Formalin ทิ้งและย้อมสีเมมเบรนด้วยสี Cytoquick โดยเติม Cytoquick stain solution A นาน 5 วินาที และ Cytoquick stain solution B นาน 15 วินาที จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกด้วยการนำไปแกว่งในน้ำประปาเบาๆ และปล่อยให้เมมเบรนแห้งนานข้ามคืน ตรวจสอบการกระจายของเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้ไม้พันสำลีชุบน้ำ

สะอาดหมด เช็ดเซลล์ด้านบนของเมมเบรนออก นำไปถ่ายภาพได้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 20X จำนวน 10 วงกล้อง นับเซลล์ด้วยโปรแกรม ImageJ และคำนวณค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่นับได้



รูปที่ 10 การทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์



ตารางที่ 2 แสดงสารละลายที่เติมลงในหลุมด้านบนและหลุมด้านล่างของแต่ละชนิดของหลุมทดสอบในการทดสอบการเคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์

ชนิดของหลุมทดสอบ	สารละลายที่เติมลงในแต่ละหลุมทดสอบ	
หลุมควบคุมลบ	หลุมด้านบน	Starvation Medium
	หลุมด้านล่าง	Starvation Medium
หลุมควบคุมบวก	หลุมด้านบน	Starvation Medium
	หลุมด้านล่าง	PDGF-BB 10 ng/ml
หลุมที่เติมโปรตีนจากเชื้อ <i>H. pylori</i> หรือ LPS	หลุมด้านบน	Starvation Medium
	หลุมด้านล่าง	โปรตีนจากเชื้อ <i>H. pylori</i> 100 ng/ml หรือ LPS 1 µg/ml
หลุมควบคุมตัวทำลาย	หลุมด้านบน	0.016% DMSO
	หลุมด้านล่าง	โปรตีนจากเชื้อ <i>H. pylori</i> 100 ng/ml หรือ LPS 1 µg/ml

ตารางที่ 3 แสดงสารละลายที่เติมลงในหลุมด้านบนและหลุมด้านล่างของแต่ละชนิดของหลุมทดสอบในการทดสอบการเคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (ต่อ)

ชนิดของหลุมทดสอบ	สารละลายที่เติมลงในแต่ละหลุมทดสอบ	
หลุมทดสอบสารสกัด เอทิลอะซิเตทจาก กระชายดำ 8 µg/ml	หลุมด้านบน	สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 8 µg/ml
	หลุมด้านล่าง	โปรตีนจากเชื้อ <i>H. pylori</i> 100 ng/ml หรือ LPS 1 µg/ml
หลุมทดสอบสารสกัด เอทิลอะซิเตทจาก กระชายดำ 16 µg/ml	หลุมด้านบน	สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 16 µg/ml
	หลุมด้านล่าง	โปรตีนจากเชื้อ <i>H. pylori</i> 100 ng/ml หรือ LPS 1 µg/ml

11.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ที่ตอบสนองต่อสาร IL-8

11.4.1 การทดสอบเวลาที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์ HL-60 เป็นนิวโทรฟิลล์

เนื่องจาก HL-60 เป็นเซลล์ตัวอ่อนเม็ดเลือดขาวระยะโปรโมอีโไลไซต์จึงจำเป็นต้องทำการเปลี่ยนแปลงเซลล์เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ก่อน โดยเลี้ยงเซลล์ HL-60 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขวดขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย 10% FBS และ 1.25% DMSO ในปริมาตรรวม 5 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 5% และมีความชื้น 80% ที่เวลาต่าง ๆ กันดังนี้ 3 , 5 , 6 และ 7 วัน ทำการแบ่งเซลล์ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนมีความหนาแน่น 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

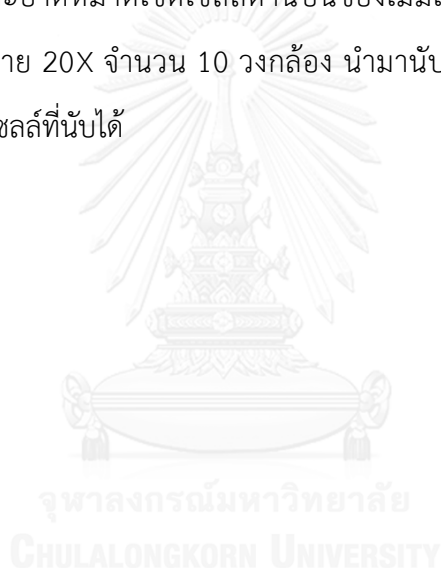
11.4.2 การตรวจวัด CD 11b marker ด้วยวิธี Flow cytometry

นับจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่ทำการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงด้วย DMSO ที่ 3 ,5 ,6 และ 7 วัน ในข้อ 12.4.1 แบ่งใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 1×10^6 เซลล์ และปั่นตกตะกอนเซลล์ ที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งและเติม 1x PBS ที่ประกอบด้วย 1% BSA และ 2 mM EDTA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมแอนติบอดีต่อ CD11b หรือแอนติบอดีควบคุมลบ (Isotype) ที่ติดฉลากด้วย FITC โดยใช้แอนติบอดีที่เจือจาง ในอัตราส่วน 1:1000 ด้วย 1x PBS ที่ประกอบด้วย 1% BSA และ 2 mM EDTA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดบนน้ำแข็งนาน 30 นาที ปั่นที่ 2,500 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส ล้างด้วย 1x PBS ที่ประกอบด้วย 1% BSA และ 2 mM EDTA ที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 900 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นผสมตะกอนเซลล์ให้เข้ากับ Paraformaldehyde จำนวน 1 มิลลิลิตร และบ่มนาน 10 นาที เพื่อคงสภาพของเซลล์ ปั่นที่ 2,500 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใส และเติม 1x PBS ที่ประกอบด้วย 1% BSA และ 2 mM EDTA จำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านตัวกรองและวิเคราะห์ด้วย เครื่อง Flow cytometer (Beckman coulter ประเทศสหรัฐอเมริกา) อ่านผล วิเคราะห์และ สร้าง scatter plot ด้วยโปรแกรม CytExpert

11.4.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์

เตรียมหลุมทดสอบดังข้อ 11.3.2 ในหลุมด้านล่างของหลุมทดสอบประกอบด้วย หลุมควบคุมที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ หลุมควบคุมบวกที่เติม IL-8 หลุมควบคุมตัวทำลายและ หลุมทดสอบสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ ดังตารางที่ 4 โดยหลุมควบคุมเติม starvation medium ปริมาณ 600 ไมโครลิตร, หลุมควบคุมบวก หลุมควบคุมตัวทำลาย และ หลุมทดสอบสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ เติม IL-8 (Shenandoah Biotechnology Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา) ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 600 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุม จากนั้นเติมเซลล์ HL-60 ที่เตรียมไว้ในข้อ 11.5.1 จำนวน 5×10^5 เซลล์ ที่หลุมด้านบนทุกหลุมของทั้ง 2 ชุดทดสอบ จากนั้นเติม 0.016 % DMSO ที่ด้านบนของหลุม ควบคุมตัวทำลาย และเติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ

8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ที่ด้านบนของหลุมทดสอบสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ โดยปรับปริมาตรของหลุมด้านบนให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม สังเกตและกำจัดฟองอากาศออกให้หมด จากนั้นนำไปบ่มที่สภาวะเดียวกับการเลี้ยงเซลล์ โดยใช้เวลาบ่มนาน 30 นาที ล้างหลุมด้านบนด้วย 1X PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติม 10% Formalin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูด 10% Formalin ทิ้ง และย้อมสีเมมเบรนด้วย สี Cytoquick โดยย้อมด้วย Cytoquick solution A นาน 5 วินาที และ Cytoquick solution B นาน 15 วินาที จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกด้วยการนำไปแกว่งในน้ำประปาเบาๆ ปล่อยให้เมมเบรนแห้งนานข้ามคืน ใช้ไม้พันสำลีชุบน้ำสะอาดหมาดเช็ดเซลล์ด้านบนของเมมเบรนออก นำไปถ่ายภาพได้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 20X จำนวน 10 วงกล้อง นำมานับเซลล์ด้วยโปรแกรม ImageJ และคำนวณค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่นับได้



ตารางที่ 4 แสดงสารละลายที่เติมลงในหลุมด้านบนและหลุมด้านล่างของแต่ละชนิดของหลุมทดสอบในการทดสอบการเคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์

ชนิดของหลุมทดสอบ	สารละลายที่เติมลงในแต่ละหลุมทดสอบ	
หลุมควบคุมลบ	หลุมด้านบน	Starvation Medium
	หลุมด้านล่าง	Starvation Medium
หลุมควบคุมบวก	หลุมด้านบน	Starvation Medium
	หลุมด้านล่าง	IL-8 10 ng/ml
หลุมควบคุมตัวทำลาย	หลุมด้านบน	0.016% DMSO
	หลุมด้านล่าง	IL-8 10 ng/ml
หลุมทดสอบสารสกัด เอทิลอะซิเตทจาก กระชายดำ 8 µg/ml	หลุมด้านบน	สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 8 µg/ml
	หลุมด้านล่าง	IL-8 10 ng/ml
หลุมทดสอบสารสกัด เอทิลอะซิเตทจาก กระชายดำ 16 µg/ml	หลุมด้านบน	สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 16 µg/ml
	หลุมด้านล่าง	IL-8 10 ng/ml

12. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ของเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี ELISA

12.1 การทดสอบเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ของเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori*

12.1.1 การเตรียมเซลล์สำหรับการทดสอบ

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ AGS จำนวน 5×10^3 เซลล์ ลงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์สี่ขารูปวงกลมขนาด 96 หลุม นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อ *H. pylori* อายุ 3 วัน มาละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย 10% FBS ให้ได้ความขุ่น 5 McFarland standard (ประมาณ 5×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) เติมน้ำลงในหลุมทดสอบที่กำหนดไว้หลุมละ 10 ไมโครลิตร จะทำให้ได้อัตราส่วนเซลล์ต่อเชื้อเท่ากับ 1:100 จากนั้นนำไปบ่มในสภาวะเดียวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

12.1.2 การตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ด้วยวิธี luminescence assay

นำเซลล์ที่เตรียมไว้ตั้งข้อ 12.1.1 มาการตรวจวัด caspase-8 โดยใช้ชุดน้ำยา caspase-Glo® 8 Assay (Promega Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยผสม caspase-8 buffer และ caspase-8 substrate เข้าด้วยกัน แล้วเติมน้ำยาทดสอบที่ผสมแล้วลงไปจำนวน 100 ไมโครลิตร บ่มนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง อ่านผลด้วยเครื่องอ่าน microplate

12.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 5×10^3 เซลล์ ลงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์สี่ขารูปวงกลมขนาด 96 หลุม นำไปเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อ *H. pylori* อายุ 3 วัน มาละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย 10% FBS ให้ได้ความขุ่น 5 McFarland (ประมาณ 5×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) เติมน้ำลงในหลุมทดสอบที่กำหนดไว้หลุมละ 10 ไมโครลิตร จะทำให้ได้อัตราส่วนเซลล์ต่อเชื้อเท่ากับ 1:100 สำหรับหลุมทดสอบเติมสารละลายกระชายดำให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลุมที่กำหนดเท่ากับ 16 หรือ

32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับหลุมควบคุมตัวทำลาย เติม 0.032% DMSO และหลุมควบคุมลบเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยให้ทุกหลุมมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มในสภาวะเดียวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจวัด caspase-8 ดังข้อ 12.1.2

13. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี ELISA

13.1 การทดสอบฤทธิ์ด้านการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในสภาวะ co-culture ที่เวลาต่างๆ

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 5×10^3 เซลล์ ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์สี่ขารูปวงกลมขนาด 96 หลุม นำไปเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อ *H. pylori* อายุ 3 วัน มาละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ที่ประกอบด้วย 10% FBS ให้ได้ความขุ่น 5 McFarland (ประมาณ 5×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) หลุมละ 10 ไมโครลิตร แล้วเติมลงในแต่ละหลุมที่กำหนดไว้ จะทำให้ได้อัตราส่วนเซลล์ต่อเชื้อเท่ากับ 1:100 ต่อมาเติมสารละลายกระชายดำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลุมที่กำหนดเท่ากับ 8 หรือ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับหลุมทดสอบสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำกับเซลล์ เติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8 หรือ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับหลุมควบคุมตัวทำลาย เติม 0.016% DMSO ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และหลุมควบคุมลบเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 100 ไมโครลิตร โดยให้ทุกหลุมมีปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร โดยเตรียมการทดสอบทั้งหมด 3 ชุด แต่ละชุดบ่มที่เวลาต่างกัันดังนี้ 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

13.2 การทดสอบฤทธิ์ป้องกันการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในสภาวะ pre-treatment ที่เวลาต่างๆ

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ AGS จำนวน 5×10^3 เซลล์ ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์สี่ขารูปวงกลมขนาด 96 หลุม นำไปเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง สำหรับหลุมทดสอบที่เติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำก่อนใส่เชื้อ *H. pylori* เริ่มจากบ่มเซลล์กับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8 หรือ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ล้างสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำออกด้วย 1 X PBS จำนวน 3 ครั้งๆละ 100 ไมโครลิตร

นำเชื้อ *H. pylori* อายุ 3 วัน มาละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย 10% FBS โดยเตรียมเชื้อให้มีความขุ่น 5 McFarland standard (ประมาณ 5×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) แล้วเติมลงในแต่ละหลุมที่กำหนดไว้ หลุมละ 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ครบ 1 มิลลิลิตร ทำให้ได้อัตราส่วนเซลล์ต่อเชื้อเท่ากับ 1:100 สำหรับหลุมทดสอบ สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำกับเซลล์ เติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 8 หรือ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับหลุมควบคุมตัวทำละลายเติม 0.016% DMSO และหลุมควบคุมลบเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยให้ทุกหลุมมีปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร ล้างทุกหลุมด้วย 1 X PBS จำนวน 3 ครั้งๆละ 100 ไมโครลิตร แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยเตรียมการทดสอบทั้งหมด 2 ชุด บ่มที่เวลาต่างกันคือ 3 และ 6 ชั่วโมง หลังจากขั้นตอนการล้างจึงนำไปบ่มในสภาวะเดิมต่ออีก 3 และ 6 ชั่วโมง

13.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในสภาวะ pre-infection

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ AGS จำนวน 5×10^3 เซลล์ ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์สีขาวรูปวงกลมขนาด 96 หลุม นำไปเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง สำหรับหลุมทดสอบที่เติมเชื้อ *H. pylori* ก่อนบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ เริ่มจากบ่มเซลล์กับเชื้อ *H. pylori* อายุ 3 วัน ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย 10% FBS โดยเตรียมเชื้อให้มีความขุ่น 5 McFarland standard (ประมาณ 5×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) แล้วเติมลงในแต่ละหลุมที่กำหนดไว้ หลุมละ 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ครบ 100 ไมโครลิตร จะทำให้ได้อัตราส่วนเซลล์ต่อเชื้อเท่ากับ 1:100 นำไปบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นล้างเชื้อ *H. pylori* ออกด้วย 1X PBS จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 100 ไมโครลิตร เติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8 หรือ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มต่ออีกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง สำหรับหลุมทดสอบสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำกับเซลล์ เติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8 หรือ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับหลุมควบคุมตัวทำละลาย เติม 0.016% DMSO และหลุมควบคุมลบเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยทุกหลุมมีปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

13.4 การตรวจวัดระดับของเอนไซม์ caspase-3/7 ด้วยวิธี luminescence assay

นำเซลล์ที่เตรียมไว้ตั้งข้อ 13.1-13.3 มาการตรวจวัด caspase-3/7 โดยใช้ชุดน้ำยา caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยผสม caspase-3/7 buffer และ caspase-3/7 substrate เข้าด้วยกัน แล้วเติมน้ำยาทดสอบที่ผสม แล้วลงไปจำนวน 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปอ่านผลด้วยเครื่องอ่าน microplate

14. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี ELISA

14.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการแตกหักของดีเอ็นเอของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในสภาวะ co-culture ที่เวลาต่างๆ

ทำการเตรียมเซลล์ด้วยสภาวะเดียวกับข้อ 12.1 จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วล้างด้วย 1X PBS 3 ครั้ง ต่อมาทำให้เซลล์แตกด้วย Lysis buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อให้ DNA ออกมาจากเซลล์ นำสารละลายที่ได้ไปปั่นแยกตะกอนเซลล์ออกด้วยความเร็ว $200 \times g$ นาน 10 นาที แล้วนำส่วนใสไปเจือจางลง 10 เท่าด้วย incubation buffer

14.2 การตรวจสอบการแตกหักของดีเอ็นเอ

ใช้ชุดน้ำยา Cell Death Detection ELISAPLUS (Roche Diagnostics Ltd. ประเทศสวีตเซอร์แลนด์) โดยเตรียมหลุมทดสอบรูปวงกลมขนาด 96 หลุม โดยการเคลือบด้วยแอนติบอดีต่อ histone ที่เจือจางในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 จำนวน 100 ไมโครลิตร ปิดหลุมทดสอบด้วยพลาสติกใสและนำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เทแอนติบอดีส่วนเกินออก แล้วเติม incubation buffer ลงไป หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มในที่มืดและอยู่ในอุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เทแอนติบอดีส่วนเกินออกและล้างด้วย washing solution 3 ครั้งๆละ 300 ไมโครลิตร เติมส่วนใสของตัวอย่างที่ได้เจือจางไว้จากข้อ 14.1 ลงไป 100 ไมโครลิตร ปิดหลุมทดสอบด้วยพลาสติกใสและนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 90 นาที ล้างด้วย washing solution 3 ครั้งๆละ 300 ไมโครลิตร เติมแอนติบอดีต่อดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย Peroxidase (POD) ที่เจือจางด้วย incubation buffer ในอัตราส่วน

1:10 จำนวน 100 ไมโครลิตร ปิดหลุมทดสอบด้วยพลาสติกใสและนำไปปั่นต่อในสภาวะเดิมนาน 90 นาที ล้างด้วย washing solution 3 ครั้งๆละ 300 ไมโครลิตร จากนั้นเติม substrate solution หลุมละ 100 ไมโครลิตร และนำไปปั่นในสภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่าน microplate ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร และความยาวคลื่นอ้างอิง 495 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหา Enrichment factor ตามสูตรคำนวณต่อไปนี้

Enrichment factor = (ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง_{405 นาโนเมตร} - ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง_{495 นาโนเมตร}) ÷ (ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุมลบ_{405 นาโนเมตร} - ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุมลบ_{495 นาโนเมตร})

15. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เพื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองใช้วิธี Mann-Whitney U test โดยที่ * แสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติในระดับ $p \leq 0.05$ ระหว่างหลุมควบคุมกับหลุมอื่น

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินที่น้อยที่สุดใน การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี Agar dilution

เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินในการยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อ *H. pylori* โดยทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* (Minimum inhibitory concentration, MIC) จากความ เข้มข้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำตั้งแต่ 4 - 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสาร สกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมิน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ที่ค่า ความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (MIC) เท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยความเข้มข้นที่มากที่สุดของ ตัวทำละลาย DMSO ที่อยู่ในสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินในการทดลอง นี้เท่ากับ 0.64% ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *H. pylori* ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การเจริญของเชื้อ *H. pylori* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ และเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4 - 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	8	16	32	64	0.64% DMSO
กระชายดำ	growth	growth	No-growth	No-growth	growth
เคอร์คิวมิน	growth	growth	No-growth	No-growth	growth

2. การทดสอบสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินต่อการอยู่รอดของเซลล์ AGS ด้วยวิธี MTT

2.1 การทดสอบหาปริมาณเซลล์ AGS ที่เหมาะสม

เพื่อหาปริมาณเซลล์ AGS ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบการอยู่รอดเซลล์ด้วยวิธี MTT ซึ่งจำนวนเซลล์ต่อหลุมที่เหมาะสมต้องมีค่าการดูดกลืนแสงสุทธิอยู่ในช่วง 0.75 - 1.25

โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ AGS ลงในแต่ละหลุมด้วยจำนวนที่ต่างกัันดังนี้ 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 และ 5×10^4 เซลล์ต่อหลุม พบว่าปริมาณเซลล์ที่ต่างกันให้ค่าการดูดกลืนแสงสุทธิที่ต่างกััน ดังตารางที่ 6 ทั้งนี้เซลล์จำนวน 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม ให้ค่าการดูดกลืนแสงสุทธิในช่วง 0.75 - 1.25 ดังนั้นจึงเลือกปริมาณเซลล์นี้สำหรับทดสอบการอยู่รอดของเซลล์กับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินต่อไป

ตารางที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงสุทธิจากการทดสอบการอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT โดยใช้เซลล์ AGS ตั้งต้นจำนวนต่างๆ

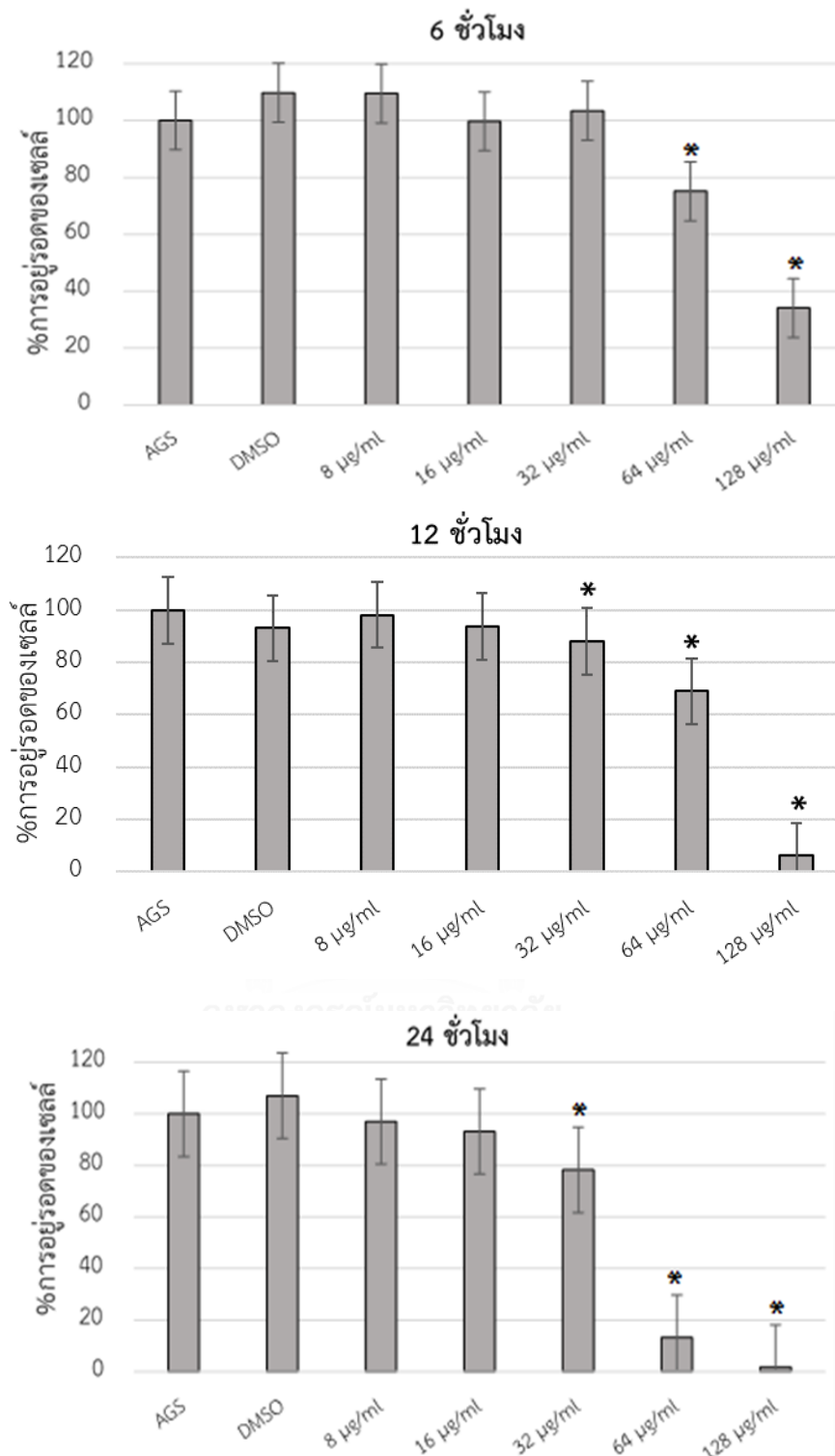
จำนวนเซลล์ต่อหลุม	ค่าการดูดกลืนแสง
1×10^3	0.13 ± 0.009
5×10^3	0.65 ± 0.02
1×10^4	1.00 ± 0.04
5×10^4	2.01 ± 0.006

2.2 การทดสอบสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ ต่อการอยู่รอดของเซลล์ AGS

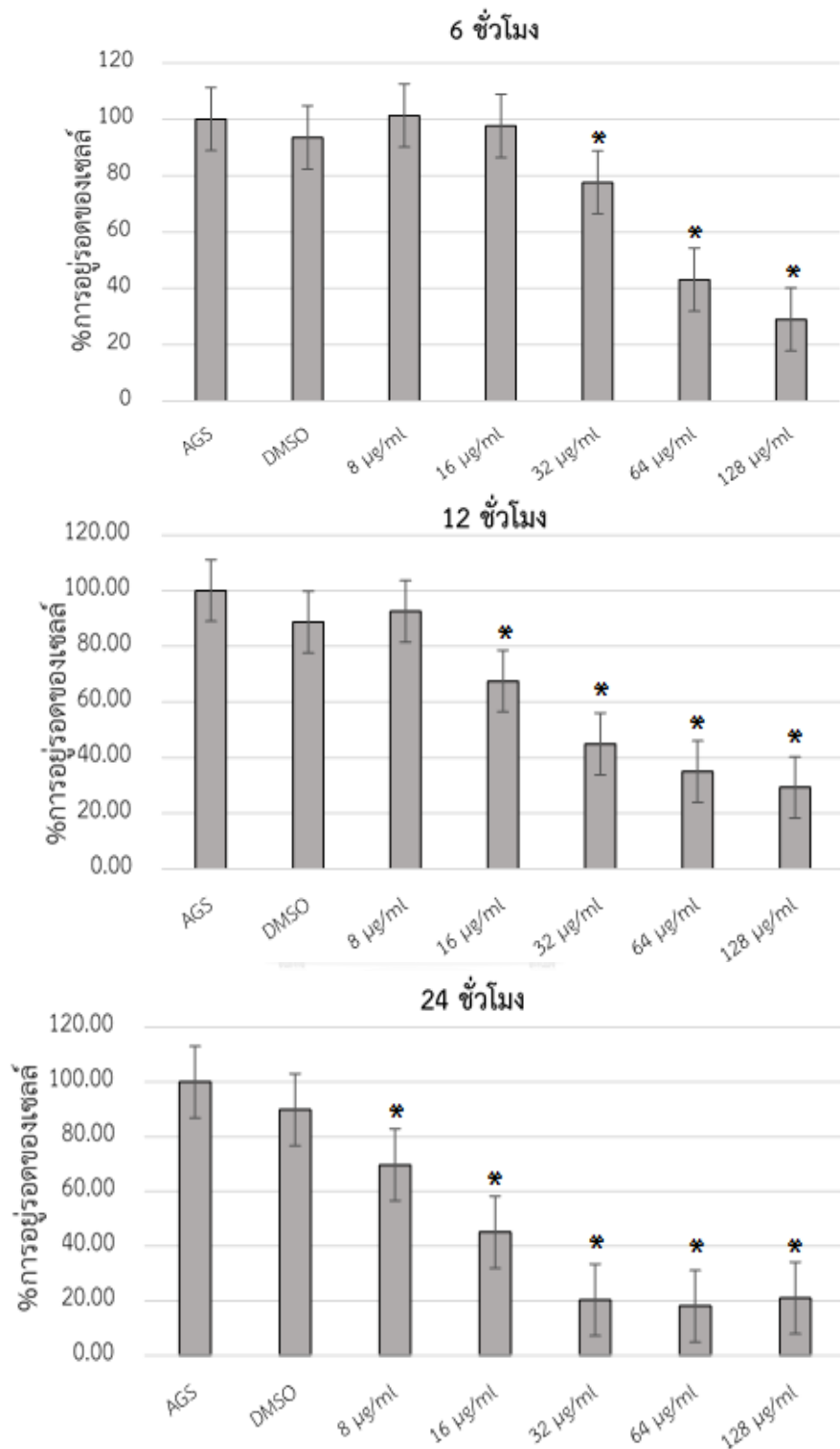
เพื่อศึกษาผลกระทบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินต่อการอยู่รอดของเซลล์ AGS รวมถึงหาเวลาและความเข้มข้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินที่ไม่มีผลกระทบต่ออยู่รอดของเซลล์ในการนำไปใช้ในการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการยับยั้งกระบวนการต่างๆในเซลล์ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ได้แก่ การหลั่งสารอินเตอร์ลูคิน-8 (IL-8), การแสดงออกของโปรตีน MCP-1, การเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว, ระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8, ระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 และ การแตกหักของดีเอ็นเอ โดยบ่มสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำแลเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 8 -128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับเซลล์ AGS นานเป็นเวลา 6 ,12 และ 24 ชั่วโมง ผลดังแสดงในรูปที่ 11 พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำมีผลกระทบต่ออยู่รอดของเซลล์ตามเวลาและความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยที่เวลาการบ่ม 6 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดเข้มข้น 64 และ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการอยู่รอดของเซลล์ AGS ลงอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ โดยลดลงไป 24.8% และ 65.8% ตามลำดับ เมื่อเพิ่มเวลาการบ่มเป็น 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่มีผลต่อเซลล์ AGS ลดลงเป็น 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ที่เวลา 12 ชั่วโมง สารสกัดความเข้มข้น 8 -128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลดการอยู่รอดของเซลล์เหลือ 98% , 93.6% , 88% , 69% และ 6% ตามลำดับ และที่เวลา 24 ชั่วโมง ลดการอยู่รอดของเซลล์เหลือ 97% , 93% , 78.3% , 13.3% และ 1.7% ตามลำดับ

ส่วนเคอร์คิวมินมีผลกระทบต่อการอยู่รอดของเซลล์ตามเวลาและความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกัน ดังรูปที่ 12 โดยที่เวลาการบ่ม 6 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดเข้มข้น 32 ,64 และ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการอยู่รอดของเซลล์ AGS ลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยลดลงไป 22.5% 56.9% และ 70.9% ตามลำดับ เมื่อเพิ่มเวลาการบ่มเป็น 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของเคอร์คิวมินที่มีผลต่อเซลล์ AGS ลดลงเป็น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ที่เวลา 12 ชั่วโมง สารสกัดความเข้มข้น 8 - 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลดการอยู่รอดของเซลล์เหลือ 92.6% , 67.5% , 45% , 35% และ 29.3% ตามลำดับ และที่เวลา 24 ชั่วโมง ลดการอยู่รอดของเซลล์เหลือ 69.7% , 45% , 20.3% , 18% และ 21% ตามลำดับ ทั้งนี้ทุกความเข้มข้นของเคอร์คิวมินมีผลกระทบต่อเซลล์ AGS แต่สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รวมถึงตัวทำละลาย DMSO ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ละลายสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ ในการทดลองนี้ ได้แก่ 0.128% ไม่มีผลกระทบต่อการอยู่รอดของเซลล์ AGS ในทุกเวลาที่ทดสอบ ดังนั้นจึงเลือกใช้สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดสอบอื่นๆต่อไป



รูปที่ 11 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ AGS หลังจากบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ ความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 8 - 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (*p-value \leq 0.05)



รูปที่ 12 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ AGS หลังจากบ่มกับเคอร์คิวมินความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 8 - 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (*p-value ≤ 0.05)

3. การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบเบื้องต้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและขมิ้นชันต่อการหลั่งสารอินเตอร์ลูคิน-8 (IL-8) ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori*

3.1 การทดสอบหาปริมาณเชื้อ *H. pylori* ที่เหมาะสม

เพื่อวัดปริมาณของเชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 ที่เหมาะสมในการคำนวณอัตราส่วนเซลล์ AGS ต่อเชื้อเท่ากับ 1:100 ที่ใช้สำหรับการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งกระบวนการต่างๆในเซลล์ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ได้แก่ การหลั่งสารอินเตอร์ลูคิน-8 (IL-8), การแสดงออกของโปรตีน MCP-1, ระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8, ระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 และการแตกหักของดีเอ็นเอ โดยทำการเจือจางเชื้อที่ความเข้มข้นมาตรฐานต่างๆ (McFarland standard) ตั้งแต่ 2, 4, 5, 6 และ 7 McFarland standard และนับจำนวนโคโลนีที่ความเข้มข้นต่างๆด้วยวิธี agar dilution พบว่าแต่ละความเข้มข้นของเชื้อมีจำนวนโคโลนี ดังตารางที่ 7 ทั้งนี้เนื่องจากแต่ละการทดลองมีการใช้ปริมาณเซลล์ AGS และขนาดหลุมที่แตกต่างกัน ดังนั้นการปรับปริมาณเชื้อให้เหมาะสมในอัตราส่วนเซลล์ AGS ต่อเชื้อเท่ากับ 1:100 จึงแตกต่างกันออกไปในแต่ละการทดลอง โดยที่ความเข้มข้น 5 McFarland standard (5×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เหมาะสมสำหรับการทดสอบการหลั่งสารอินเตอร์ลูคิน-8 (IL-8) และการแสดงออกของโปรตีน MCP-1 ที่ใช้เซลล์ AGS จำนวน 5×10^7 เซลล์ และมีปริมาตรในการทดสอบรวม 1 มิลลิลิตร ส่วนความเข้มข้น 6 McFarland standard (1×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เหมาะสมสำหรับการทดสอบระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8, ระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 และการแตกหักของดีเอ็นเอที่ใช้เซลล์ AGS จำนวน 1×10^4 เซลล์ และมีปริมาตรในการทดสอบรวม 100 มิลลิลิตร

ตารางที่ 7 จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรที่ความขุ่นต่างๆ

ความขุ่นของเชื้อ <i>H. pylori</i> (McFarland standard)	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร
2 McFarland	1×10^6
4 McFarland	5×10^6
5 McFarland	5×10^7
6 McFarland	1×10^8
7 McFarland	3×10^8

3.2 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินต่อการหลั่งสารอินเตอร์ลูคิน-8 ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะ co-culture

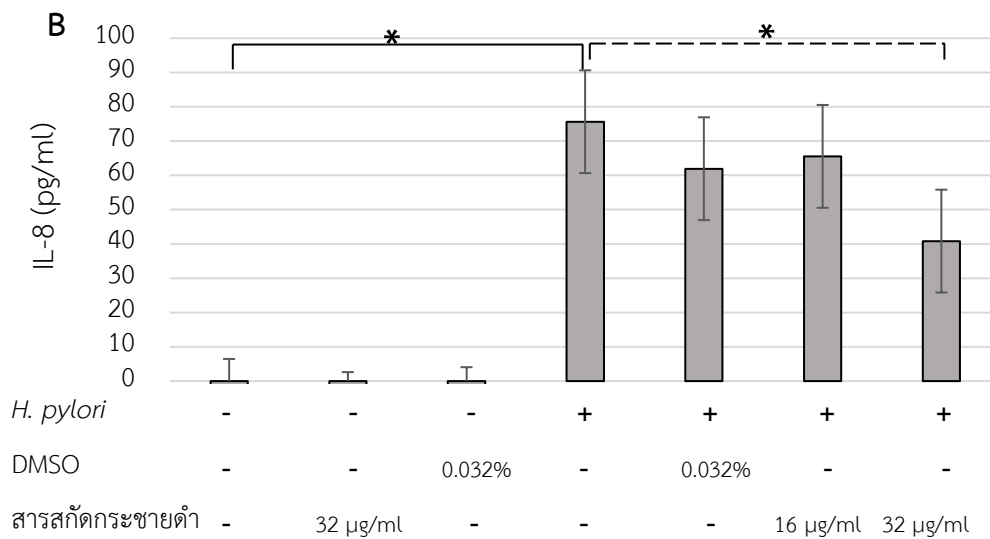
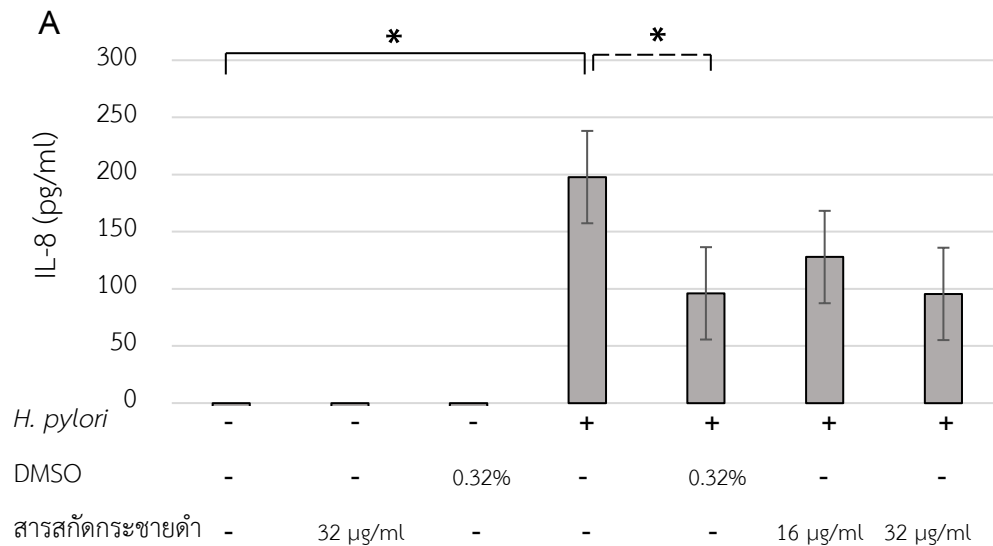
เพื่อศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินในการยับยั้งการหลั่งสารอินเตอร์ลูคิน-8 ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ โดยเฉพาะเมื่อเซลล์ติดเชื้อ *H. pylori* โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ AGS ร่วมกับ (co-culture) เชื้อ *H. pylori* และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำหรือเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) และต่ำกว่าระดับที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* (sub-MIC) โดยใช้สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 16 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ละลายอยู่มากที่สุด 0.32% หรือ 0.032% ในการทดสอบสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เท่ากับ 0.32% หลุมควบคุมที่ติดเชื้อมีการหลั่ง IL-8 ในปริมาณ 197.77 ± 39.1 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ผลดังแสดงในรูปที่ 13A ขณะที่ในหลุมที่ติดเชื้อและบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณการหลั่ง IL-8 ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเหลือ 95.54 ± 24.21 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการยับยั้งการหลั่ง IL-8 ได้ 48.30% ส่วนหลุมที่ติดเชื้อและบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถลดปริมาณการหลั่ง IL-8 ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่หลุมควบคุมตัวทำละลายที่ติดเชื้อและบ่ม 0.32% DMSO พบว่า มีปริมาณการหลั่ง IL-8 ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีระดับใกล้เคียงกับหลุมที่บ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

โดยเฉลี่ย 96.03 ± 2.67 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการยับยั้งการหลั่ง IL-8 ได้ 48.56% แต่ในการทดสอบสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เท่ากับ 0.032% หลุมควบคุมที่ติดเชื่อมีการหลั่ง IL-8 ในปริมาณ 75.65 ± 0.59 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ผลดังแสดงในรูปที่ 13B ขณะที่ในหลุมที่ติดเชื่อและบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณการหลั่ง IL-8 ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เหลือ 40.84 ± 5.19 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการยับยั้งการหลั่ง IL-8 ได้ 46.02% ส่วนหลุมที่ติดเชื่อและบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถลดปริมาณการหลั่ง IL-8 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้หลุมควบคุมตัวทำลายที่ติดเชื่อและบ่มกับ 0.032% DMSO ไม่พบว่าการลดปริมาณการหลั่ง IL-8 สำหรับหลุมควบคุมเซลล์ AGS พบว่าไม่สามารถตรวจพบ IL-8 ได้

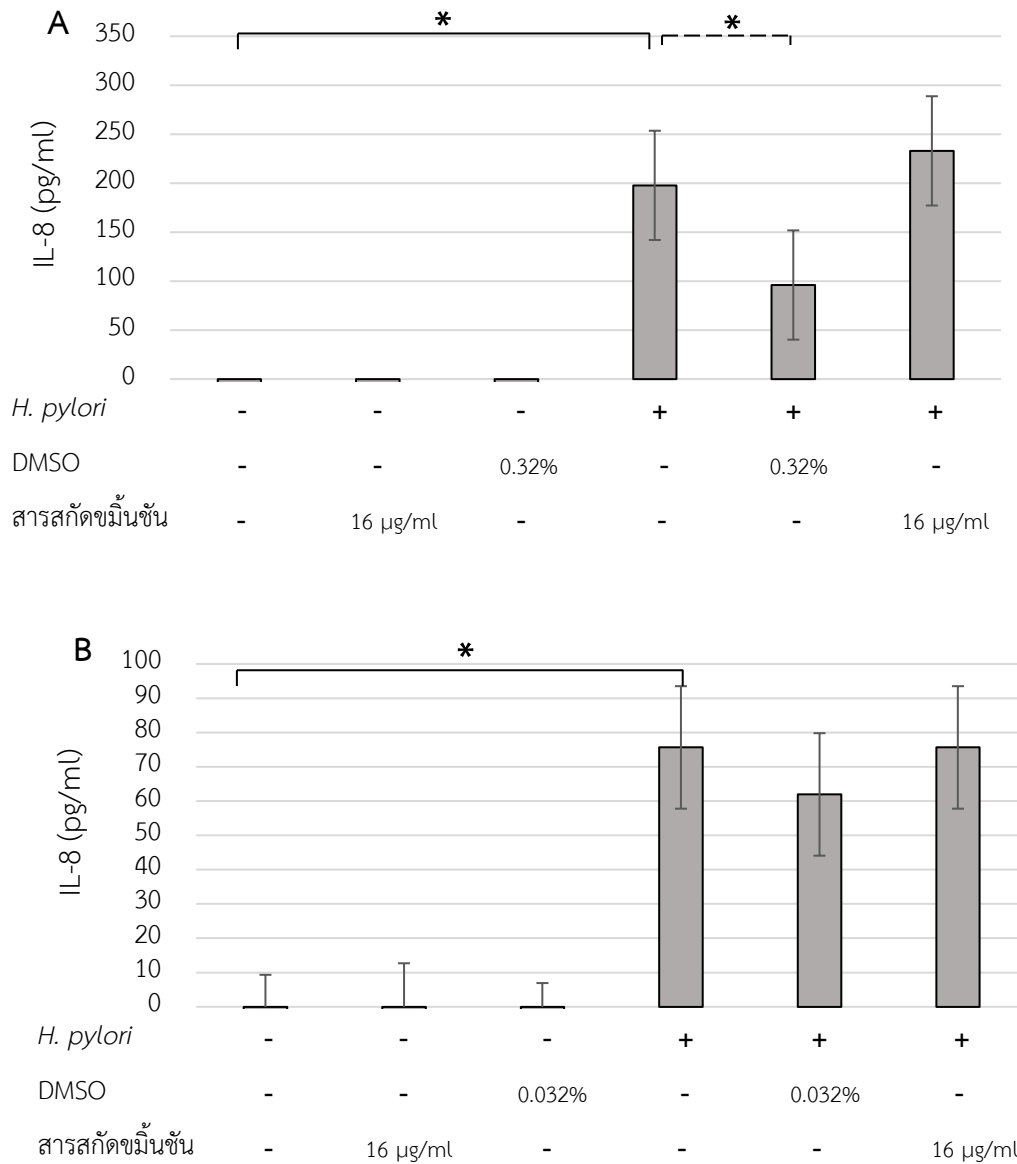
ส่วนการทดสอบการออกฤทธิ์ของเคอร์คิวมิน 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เท่ากับ 0.32% พบว่าไม่สามารถลดปริมาณการหลั่ง IL-8 ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีปริมาณ IL-8 สูงกว่าหลุมควบคุมที่ติดเชื่อเล็กน้อยที่ 232.98 ± 22.47 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ผลดังแสดงในรูปที่ 14A ทั้งนี้หลุมควบคุมตัวทำลายที่ติดเชื่อและบ่ม 0.32% DMSO พบว่ามีปริมาณการหลั่ง IL-8 ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในการทดสอบเคอร์คิวมิน 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เท่ากับ 0.032% ผลดังแสดงในรูปที่ 14B เคอร์คิวมินยังคงไม่สามารถลดปริมาณการหลั่ง IL-8 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้หลุมควบคุมตัวทำลายที่ติดเชื่อและบ่มกับ 0.032% DMSO ไม่มีผลในการยับยั้งการหลั่ง IL-8 ของเซลล์แต่อย่างใด สำหรับหลุมควบคุมเซลล์ AGS พบว่าไม่สามารถตรวจพบ IL-8 ได้

เนื่องจากสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำแสดงการออกฤทธิ์ในการยับยั้ง IL-8 ได้ดีกว่าเคอร์คิวมิน รวมถึงความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ที่ไม่มีผลรบกวนต่อการทดลองคือ 0.032% ดังนั้นในการทดสอบการยับยั้งการหลั่งสารอินเตอร์ลูคิน-8 (IL-8) ที่สภาวะต่างๆ , การแสดงออกของโปรตีน MCP-1, การเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว, ระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 , ระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 และการแตกหักของดีเอ็นเอ จะเลือกเฉพาะสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO น้อยกว่าหรือ

เท่ากับ 0.032% ไปทดสอบ โดยความเข้มข้นที่เลือกใช้นั้นจำเป็นต้องคำนึงถึงการมีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ จากผลการทดสอบ MTT ดังข้อที่ 2.2 ด้วย



รูปที่ 13 กราฟแสดงปริมาณ IL-8 ที่หลั่งจากออกเซลล์ AGS และเซลล์ AGS ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะ co-culture ที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำความเข้มข้น 16 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของสุดท้าย DMSO 0.32% (3A) และ 0.032% (3B) ที่เวลา 24 ชั่วโมง (*p-value \leq 0.05)



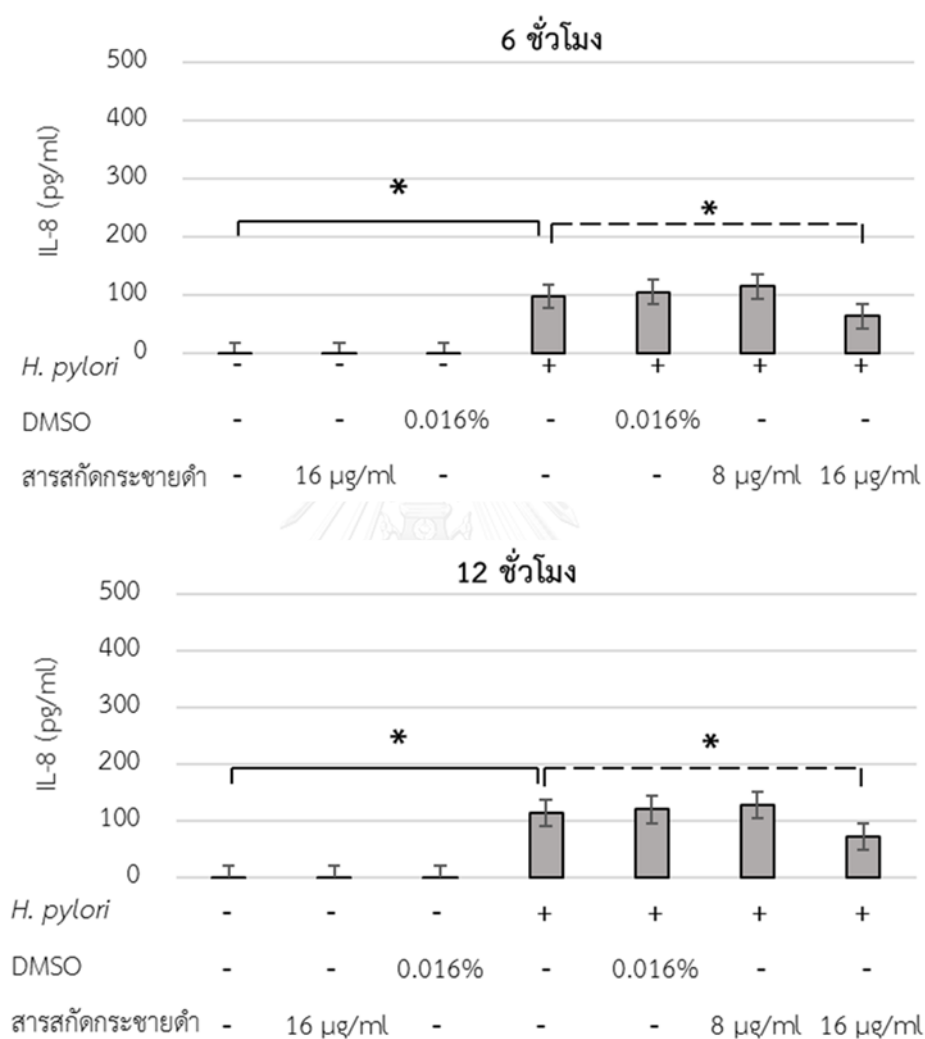
รูปที่ 14 กราฟแสดงปริมาณ IL-8 ที่หลั่งจากออกเซลล์ AGS และเซลล์ AGS ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะ co-culture ที่มีเคอร์คิวมินความเข้มข้น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของสุดท้าย DMSO 0.32% (4A) และ 0.032% (4B) ที่เวลา 24 ชั่วโมง (*p-value \leq 0.05)

4. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการหลั่งสารอินเตอร์ลูคิน-8 ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ที่สภาวะและเวลาต่างๆกัน

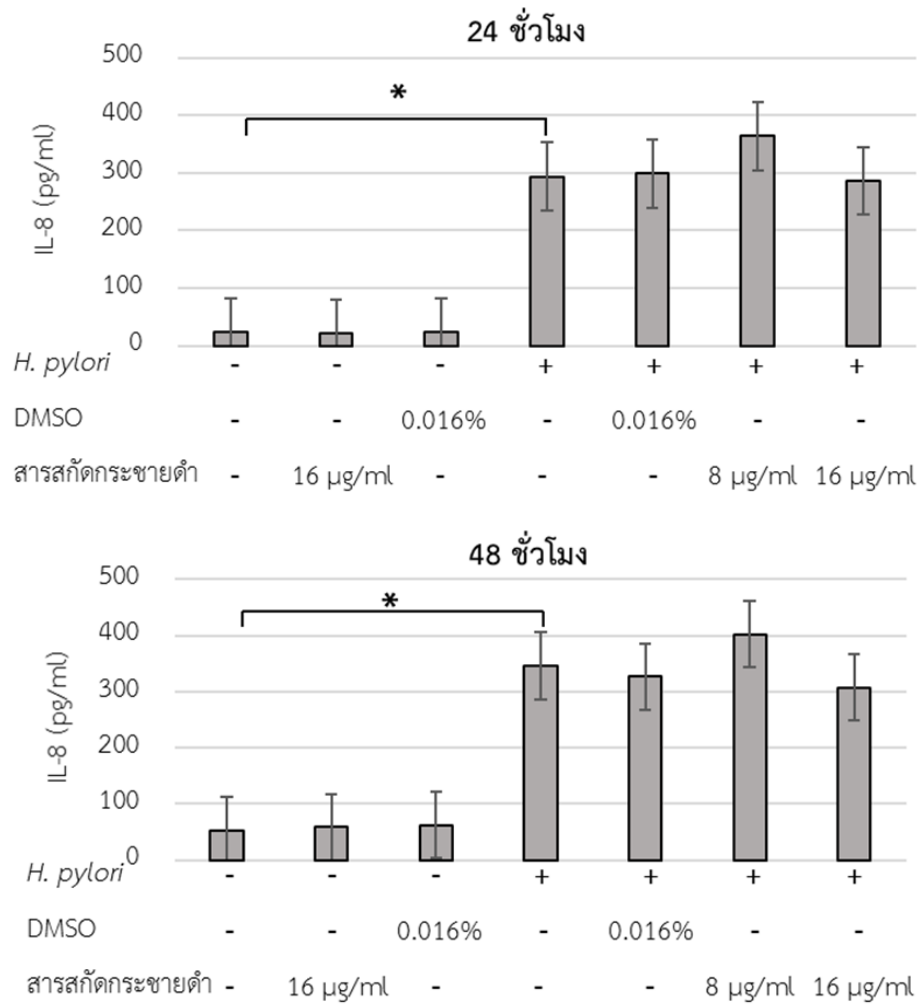
4.1 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการหลั่งสารอินเตอร์ลูคิน-8 ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ที่สภาวะ co-culture

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในการยับยั้งการหลั่งสารอินเตอร์ลูคิน-8 ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ที่เวลาต่างๆ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ AGS ร่วมกับ (co-culture) เชื้อ *H. pylori* และ สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำกว่าระดับที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* (sub-MIC) และไม่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ บ่มเป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง หลุมควบคุมที่ติดเชื้อมีการหลั่ง IL-8 ในปริมาณ 97.04 ± 7.06 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ผลดังกล่าวแสดงในรูปแบบที่ 15 และ 16 ขณะที่ในหลุมที่ติดเชื้อและบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณการหลั่ง IL-8 ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เหลือ 63.31 ± 1.83 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการยับยั้งการหลั่ง IL-8 ได้ 34.76% ที่เวลา 12 ชั่วโมง หลุมควบคุมที่ติดเชื้อมีการหลั่ง IL-8 ในปริมาณที่มากขึ้นเป็น 114.57 ± 9.93 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ในหลุมที่ติดเชื้อและบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณการหลั่ง IL-8 ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เหลือ 72.47 ± 0.52 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการยับยั้งการหลั่ง IL-8 ได้ 63.25% ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง หลุมควบคุมที่ติดเชื้อมีการกระตุ้นการหลั่ง IL-8 มากที่สุดถึง 293.30 ± 29.68 และ 345.85 ± 28.37 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำทั้ง 2 ความเข้มข้นคือ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-8 ได้ สำหรับหลุมควบคุมเซลล์ AGS พบว่าที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง ไม่สามารถตรวจพบ IL-8 ได้ แต่ในเวลาบ่มที่นานขึ้นเป็น 24 และ 48 ชั่วโมง พบการหลั่ง IL-8 ที่เพิ่มขึ้น โดยตรวจวัดได้ในปริมาณต่างๆที่ 23.18 ± 1.70 และ 52.20 ± 2.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำไม่มีผลต่อการหลั่ง IL-8 ในเซลล์ AGS ที่ไม่ติดเชื้อ รวมถึงตัวทำลายละลาย 0.016% DMSO ไม่มีผลในการยับยั้งการหลั่ง IL-8 ของเซลล์แต่อย่างใด

สรุปว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-8 ได้ดีที่สุดในขณะนั้นเฉพาะเวลา 6 และ 12 ชั่วโมงจึงถูกเลือกนำไปใช้ในทดสอบการยับยั้งการหลั่ง IL-8 ที่สภาวะอื่นๆต่อไป



รูปที่ 15 กราฟแสดงปริมาณ IL-8 ที่หลั่งจากออกเซลล์ AGS และเซลล์ AGS ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะ co-culture ที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง (*p-value \leq 0.05)

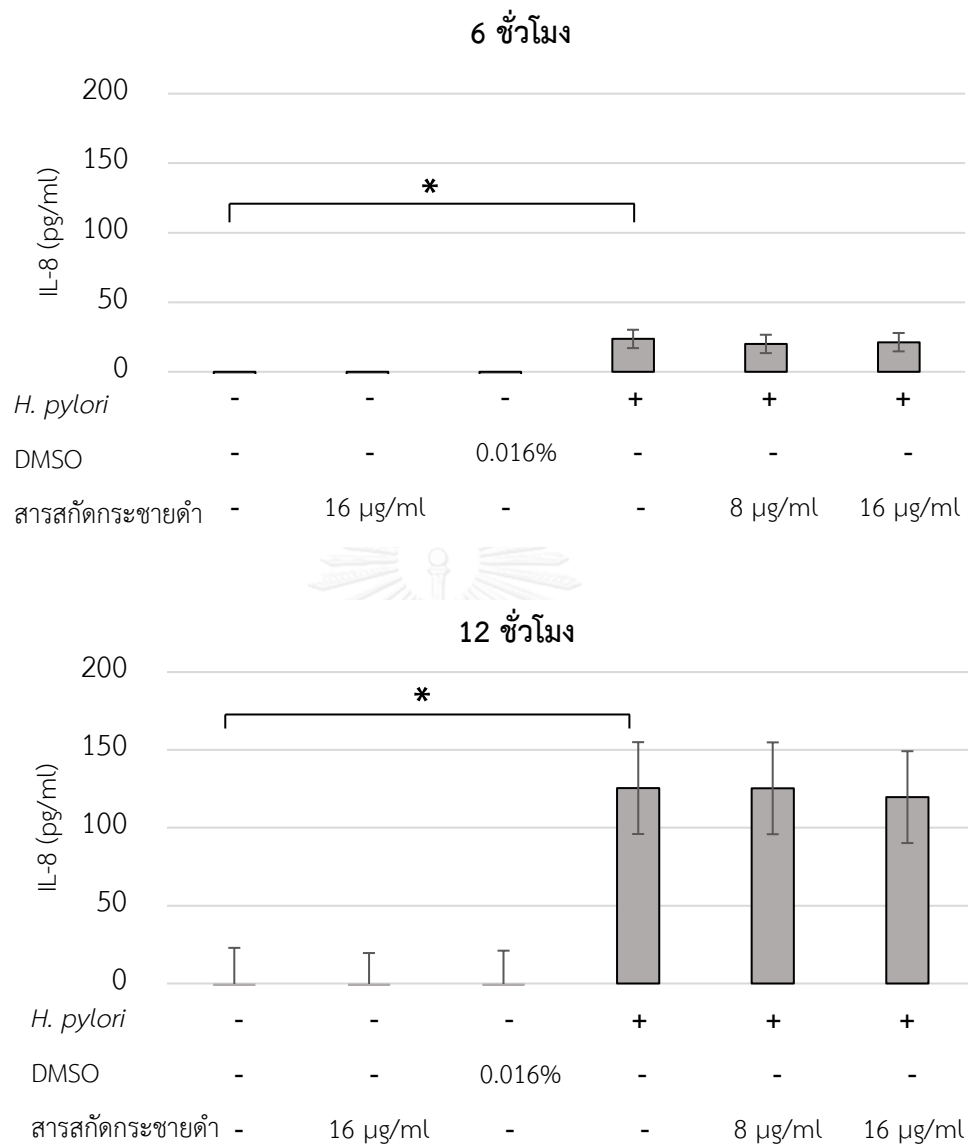


รูปที่ 16 กราฟแสดงปริมาณ IL-8 ที่หลั่งจากออกเซลล์ AGS และเซลล์ AGS ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะ co-culture ที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (*p-value \leq 0.05)

4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการหลั่งสารอินเตอร์ลูคิน-8 ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะ pre-treatment

เนื่องจากการทดสอบในสภาวะ co-culture ก่อนหน้าพบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำสามารถลดปริมาณ IL-8 ได้ที่ 6 และ 12 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญ ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในการป้องกันการอักเสบจึงบ่มสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับเซลล์ AGS เป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง และล้างสารสกัดออก ก่อนกระตุ้นการอักเสบด้วยเชื้อ *H. pylori* เป็นเวลาอีก 3 และ 6 ชั่วโมง เพื่อกำจัดปัจจัยแทรกซ้อนของสารสกัดและจะได้วัดผลในการป้องกันการอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ *H. pylori* อย่างแท้จริง ผลดังแสดงในรูปที่ 17 พบว่า ที่เวลา 6 ชั่วโมง หลุมควบคุมที่ติดเชื้อมีการหลั่ง IL-8 ในปริมาณ 32.64 ± 1.06 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร แต่หลุมที่ทำการบ่มเซลล์ AGS กับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำทั้ง 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนการติดเชื้อ ไม่พบความแตกต่างของปริมาณ IL-8 เมื่อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมที่ติดเชื้อ และที่เวลา 12 ชั่วโมง หลุมควบคุมที่ติดเชื้อมีการหลั่ง IL-8 ในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นเป็น 125.50 ± 3.06 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนหลุมที่ทำการบ่มเซลล์ AGS กับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำก่อนการติดเชื้อทั้ง 2 ความเข้มข้นนั้น ไม่พบความแตกต่างของปริมาณ IL-8 เมื่อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมที่ติดเชื้อเช่นเดียวกันกับที่เวลา 6 ชั่วโมง สำหรับหลุมควบคุมเซลล์ AGS พบว่า ไม่สามารถตรวจพบ IL-8 และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำไม่มีผลต่อการหลั่ง IL-8 ในเซลล์ AGS ที่ไม่ติดเชื้อ รวมทั้งตัวทำละลาย 0.016% DMSO ไม่มีผลในการยับยั้งการหลั่ง IL-8 ของเซลล์แต่อย่างใด

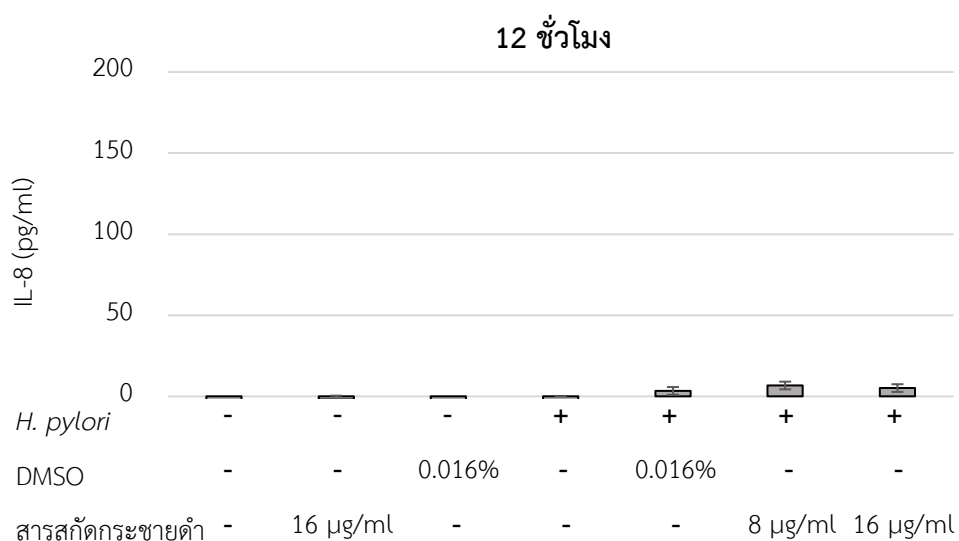
สรุปว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง ไม่สามารถออกฤทธิ์ป้องกันการหลั่ง IL-8 ก่อนการติดเชื้อ *H. pylori* ได้ และเนื่องจากที่เวลาทดสอบรวม 12 ชั่วโมง ให้ผลการทดลองที่ชัดเจนกว่าที่ 6 ชั่วโมง ดังนั้นเฉพาะเวลา 12 ชั่วโมง เท่านั้นที่ถูกนำไปใช้ในการทดสอบการยับยั้งการหลั่ง IL-8 ในสภาวะ pre-infection ต่อไป



รูปที่ 17 ปริมาณ IL-8 ที่หลั่งจากเซลล์ AGS ที่บ่มกับสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรและเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะ pre-treatment ที่เวลารวม 6 และ 12 ชั่วโมง (*p-value \leq 0.05)

4.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการหลั่งสารอินเทอร์ลูคิน-8 หลังจากเซลล์ติดเชื้อ *H. pylori* (pre-infection)

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในการออกฤทธิ์ด้านการหลั่ง IL-8 หลังจากเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *H. pylori* โดยการบ่มเชื้อ *H. pylori* กับเซลล์ AGS ก่อนเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และล้างเชื้อออก ก่อนเติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มต่ออีกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อกำจัดปัจจัยแทรกซ้อนของเชื้อ *H. pylori* และวัดผลโดยตรงของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการหลั่ง IL-8 ผลดังแสดงในรูปที่ 18 พบว่าปริมาณ IL-8 ระดับต่ำมากในทุกหลุมการทดสอบ เนื่องจาก IL-8 ที่หลั่งออกมาในช่วงแรกหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *H. pylori* ถูกล้างออกไปพร้อมกับเชื้อ ทำให้ในช่วงเวลาบ่มต่อจากนั้นไม่มีเชื้อที่กระตุ้นการอักเสบของเซลล์อีก และสารสกัดเอทิลอะซิเตท



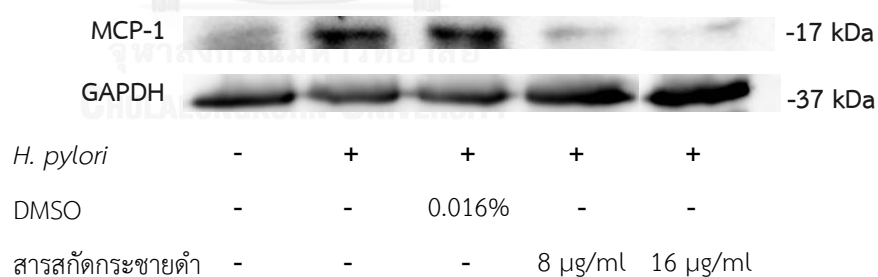
จากกระชายดำไม่มีผลต่อการหลั่ง IL-8 ในเซลล์ AGS จึงทำให้ปริมาณ IL-8 ต่ำ

รูปที่ 18 ปริมาณ IL-8 ที่หลังจากเซลล์ AGS ที่บ่มกับสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะ pre-infection ที่เวลารวม 12 ชั่วโมง (*p-value ≤ 0.05)

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการแสดงออกของ โปรตีน MCP-1 ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี Western Blot

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน MCP-1 ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ AGS ร่วมกับ (co-culture) เชื้อ *H. pylori* และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าหลุมควบคุมที่ติดเชื้อ มีแถบของโปรตีน MCP-1 ที่เข้มกว่าหลุมควบคุมที่ไม่มีเซลล์ AGS ผลดังแสดงในรูปที่ 19 ขณะที่ในหลุมที่ติดเชื้อและบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีแถบของโปรตีน MCP-1 ที่จางกว่าหลุมควบคุมที่ติดเชื้อ และ 0.016% DMSO ไม่มีผลในการยับยั้งการแสดงออกของ MCP-1 แต่อย่างใด

สรุปว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีแนวโน้มในการออกฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของ MCP-1 ได้ ทั้งนี้เนื่องจาก MCP-1 เป็นไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ ดังนั้นจึงควรทำการทดสอบโดยการตรวจวัด MCP-1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ด้วยวิธี ELISA เพื่อยืนยันการออกฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทดังกล่าว

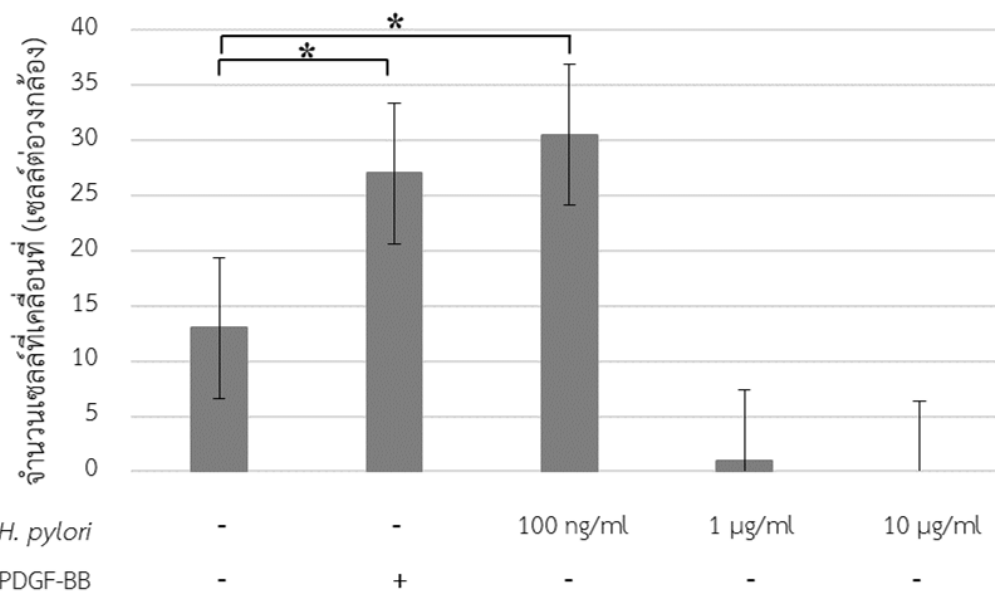


รูปที่ 19 การแสดงออกของโปรตีน MCP-1 จากเซลล์ AGS ที่บ่มกับสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะ co-culture ที่เวลา 12 ชั่วโมง

6. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ที่ตอบสนองต่อโปรตีนของเชื้อ *H. pylori*

6.1 การทดสอบปริมาณโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* ที่เหมาะสมต่อการทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์

ในการดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ให้เคลื่อนที่จากหลุมด้านบนลงมาในรูพรุนของเมมเบรนนั้น จำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของสารดึงดูดเซลล์ที่เหมาะสม จึงทดสอบโปรตีนที่สกัดได้จากเชื้อ *H. pylori* ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารควบคุมบวก Platelet-Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB) ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า โปรตีนที่สกัดจากเชื้อ *H. pylori* ที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถดึงดูดเซลล์ได้จำนวนเฉลี่ย 29 ± 1 เซลล์ ซึ่งใกล้เคียงกับ PDGF-BB ที่ 30 ± 3 เซลล์ และสารดึงดูดเซลล์ทั้ง 2 ชนิด สามารถเพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์โมโนไซต์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนโปรตีนจากเชื้อ *H. pylori* ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดึงดูดเซลล์ลงไปที่หลุมด้านล่างจนหมด ทำให้ไม่พบเซลล์ที่อยู่ในเมมเบรนเหลืออยู่ โดยหลุมควบคุมลบที่ไม่มีสารดึงดูดเซลล์นั้น มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เพียง 14 ± 4 เซลล์ ดังรูปที่ 20 ดังนั้นโปรตีนจากเชื้อ *H. pylori* ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์และเหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ต่อไป



รูปที่ 20 กราฟแสดงการกระจายของจำนวนเซลล์โมโนไซต์ที่เคลื่อนที่เนื่องจากการตอบสนองต่อโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* ความเข้มข้นต่างๆ (PDGF-BB : Platelet-Derived Growth Factor-BB, HP : *H. pylori*) (*p-value \leq 0.05)

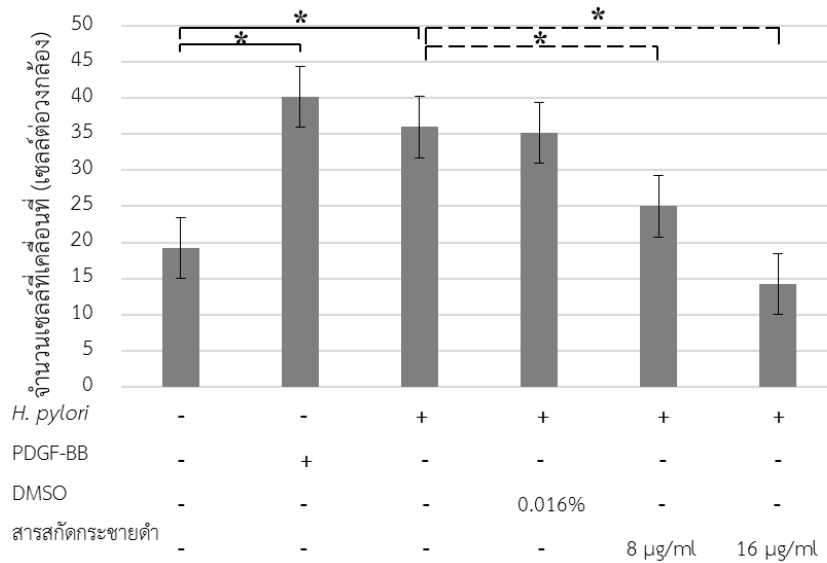
6.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ที่ตอบสนองต่อโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* และ LPS

จากการทดสอบก่อนหน้าพบว่าโปรตีนจากเชื้อ *H. pylori* ที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ได้เป็นอย่างดีเทียบเท่ากับสารควบคุมบวก PDGF-BB นอกจากนี้ยังมีการทดสอบกับ LPS ที่เป็นส่วนประกอบของแบคทีเรียแกรมลบทั่วไป โดยการเปรียบเทียบความสามารถในการดึงดูดการเคลื่อนที่ของเซลล์และฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ที่ตอบสนองต่อโปรตีนที่สกัดจากเชื้อ *H. pylori* และ LPS จาก *E. coli* ผลดังรูปที่ 21 พบว่าหลุมที่กระตุ้นด้วยโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* มีจำนวนเซลล์เคลื่อนที่เฉลี่ย 36 ± 8 เซลล์ ขณะที่หลุมที่กระตุ้นด้วยโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* และเติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์เคลื่อนที่เฉลี่ย 25 ± 7 และ 14 ± 3 เซลล์ ตามลำดับ และ 0.016% DMSO ไม่มีผลในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์แต่อย่างใด โดยหลุมควบคุมที่ไม่มีสารดึงดูดเซลล์นั้น มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เพียง 19 ± 4 เซลล์ ดังนั้นสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

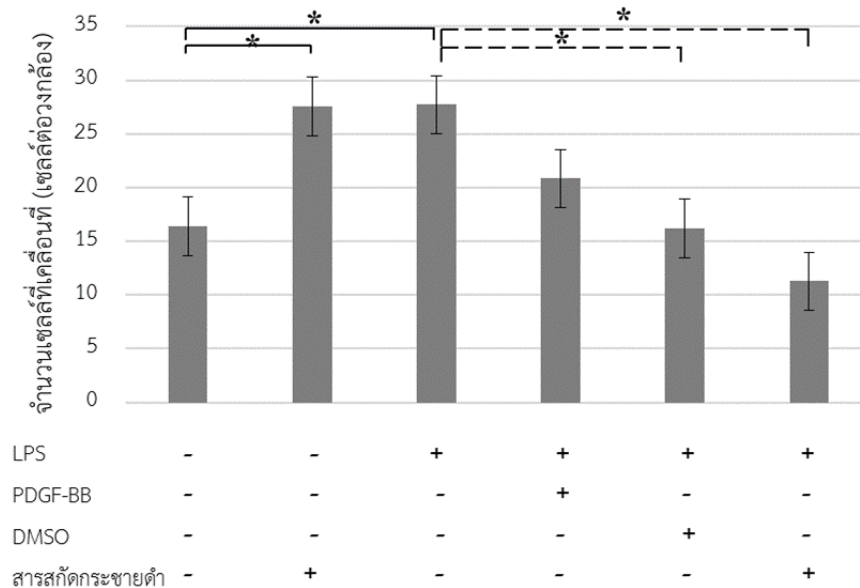
สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ที่กระตุ้นด้วยโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* คิดเป็นอัตราการยับยั้งที่ 30.56% และ 61.12% ตามลำดับ

สำหรับการกระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อ *E.coli* มีจำนวนเซลล์เคลื่อนที่เฉลี่ย 28 ± 8 เซลล์ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อ *E.coli* และเติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจาก กระจายดำที่ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์เคลื่อนที่เฉลี่ย 16 ± 7 และ 11 ± 6 เซลล์ ตามลำดับ และ 0.016% DMSO ไม่มีผลในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ แต่อย่างใด โดยหลุมควบคุมที่ไม่มีสารดึงดูดเซลล์นั้น มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เพียง 16 ± 5 เซลล์ ดังรูปที่ 22 ดังนั้นสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระจายดำที่ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ที่กระตุ้นด้วย LPS ของ เชื้อ *E. coli* คิดเป็นอัตราการยับยั้งที่ 42.85% และ 60.71% ตามลำดับ

สรุปว่าโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* และ LPS สามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์โมโนไซต์ ได้ดี ในขณะที่สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระจายดำสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ โมโนไซต์ที่ตอบสนองต่อโปรตีนจากเชื้อ *H. pylori* และ LPS จาก *E. coli* ได้ในอัตราการยับยั้ง ที่ใกล้เคียงกันและมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 21 กราฟแสดงฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการกระจายของจำนวนเซลล์โมโนไซต์ที่เคลื่อนที่เนื่องจากการตอบสนองต่อโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* (PDGF-BB : Platelet-Derived Growth Factor-BB, HP : *H. pylori*, KP : สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ) (*p-value \leq 0.05)

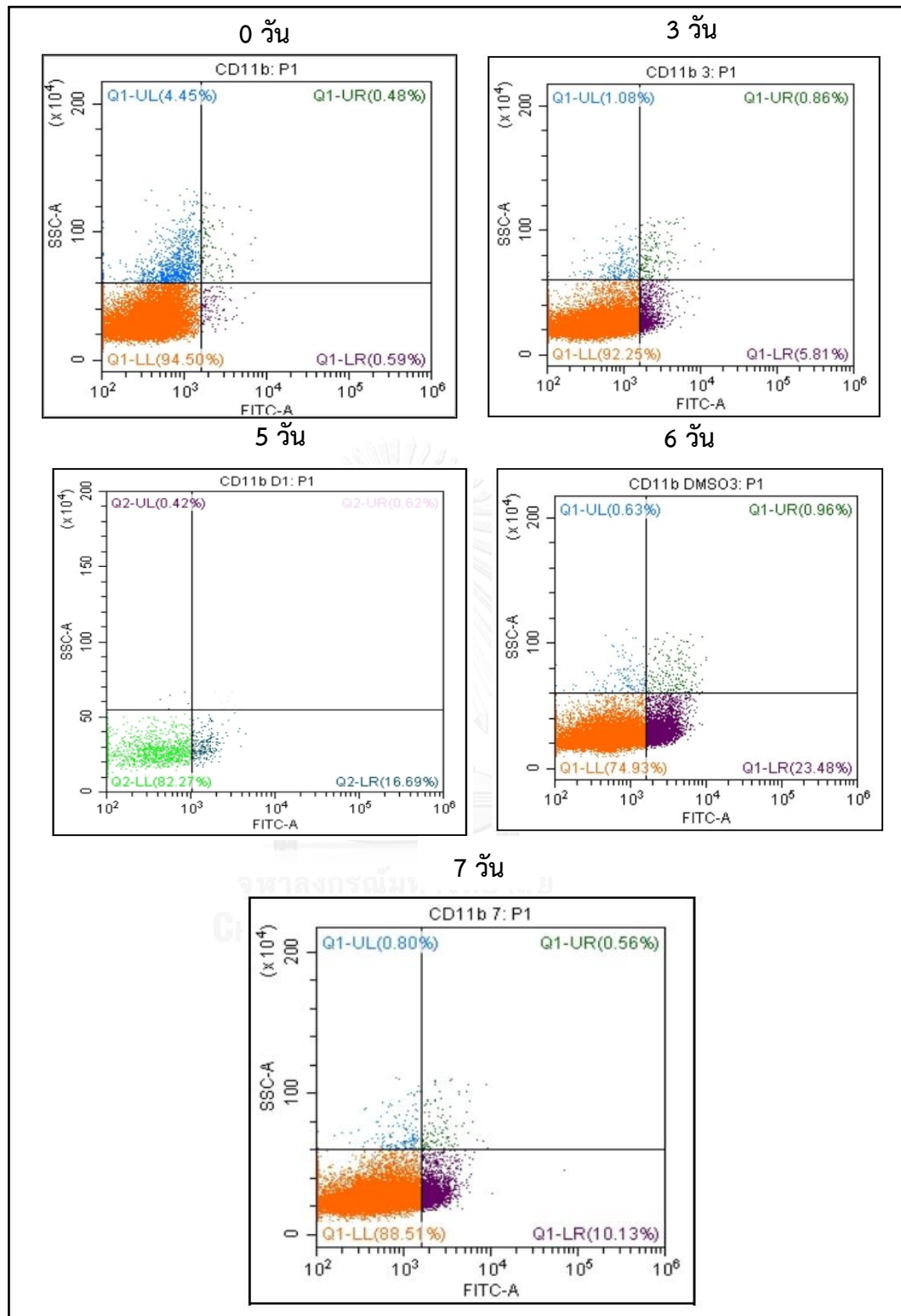


รูปที่ 22 กราฟแสดงฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการกระจายของจำนวนเซลล์โมโนไซต์ที่เคลื่อนที่เนื่องจากการตอบสนองต่อ LPS ของเชื้อ *E. coli* (PDGF-BB: Platelet-Derived Growth Factor-BB, LPS: Lipopolysaccharide, KP: สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ) (*p-value \leq 0.05)

7. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ที่ตอบสนองต่อสาร IL-8

7.1 การทดสอบเวลาที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์ HL-60 เป็นนิวโทรฟิลล์

เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงเซลล์ HL-60 ไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์นั้นยังไม่มีเวลาการบ่มที่เป็นมาตรฐาน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสถานะของเซลล์และสถานะที่ใช้เก็บรักษาเซลล์ก่อนหน้า ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงเซลล์ โดยหลังจากที่เพาะเลี้ยง HL-60 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี DMSO อยู่ 1.25% แล้วทำการตรวจสอบ CD11b ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ใช้บ่งชี้เซลล์นิวโทรฟิลล์ ด้วยวิธี flow cytometry โดยจะทำการตรวจสอบเซลล์หลังจากกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงแล้ว 0, 3, 5, 6 และ 7 วัน จากการทดสอบพบว่า การแสดงออกของ CD11b ในแต่ละวันสามารถสังเกตได้จากบริเวณของกราฟส่วน UR และ LR ดังรูปที่ 23 ซึ่งพบว่าการแสดงออกเป็น 0.6% ,6.67% ,17.31% ,24.41% และ 10.69% ที่ 0, 3, 5, 6 และ 7 วัน ตามลำดับ ทั้งนี้การกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ HL-60 พบว่ามีการแสดงออกของ CD11b มากขึ้นตามจำนวนวันที่บ่มและมีการแสดงออกสูงสุดที่ 6 วัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกเซลล์ HL-60 ที่กระตุ้นด้วย 1.25% DMSO นาน 6 วัน ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ต่อไป

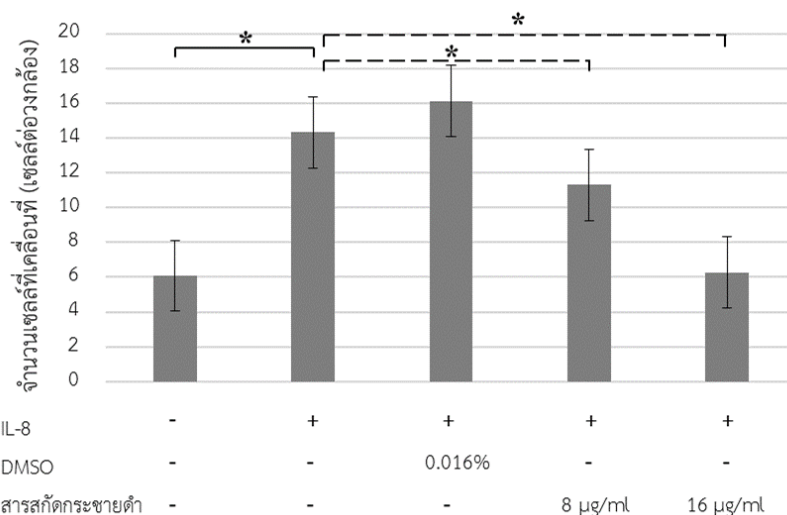


รูปที่ 23 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ CD11b ของเซลล์ HL-60 หลังจากถูกกระตุ้นด้วย 1.25% DMSO ที่จำนวนวันต่างๆ

7.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์

เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์มีตัวรับที่จำเพาะกับ IL-8 เป็นจำนวนมาก IL-8 จึงเป็นสารที่มีความสามารถในการดึงดูดเซลล์นิวโทรฟิลล์ได้เป็นอย่างดี และจากผลการทดลองก่อนหน้าพบว่า IL-8 ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ในปริมาณมาก ในการวิจัยนี้จึงต้องการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์นิวโทรฟิลล์ที่ตอบสนองต่อ IL-8 ผลดังรูปที่ 24 พบว่าหลุมควบคุมบวกที่กระตุ้นด้วย IL-8 มีจำนวนเซลล์เคลื่อนที่เฉลี่ย 14 ± 6 เซลล์ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่เติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์เคลื่อนที่เฉลี่ย 11 ± 3 และ 6 ± 3 เซลล์ ตามลำดับ และ 0.016% DMSO ไม่มีผลในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์แต่อย่างใด โดยหลุมควบคุมลบที่ไม่มีสารดึงดูดเซลล์นั้น มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เพียง 6 ± 4 เซลล์

สรุปว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำทั้ง 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์นิวโทรฟิลล์เนื่องจากการตอบสนองต่อ IL-8 ได้ อย่างมีนัยสำคัญ คิดเป็นอัตราการยับยั้งที่ 21.43% และ 57.14% ตามลำดับ

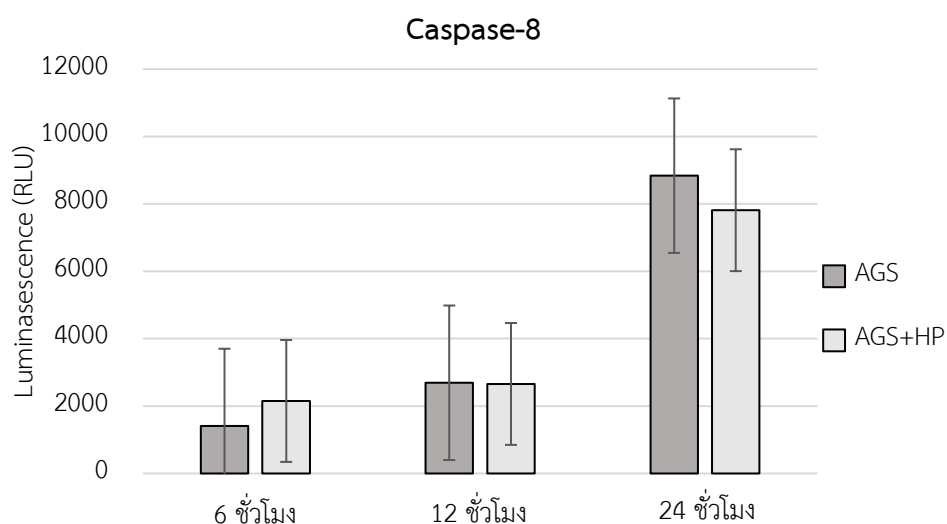


รูปที่ 24 กราฟแสดงฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการกระจายของจำนวนเซลล์นิวโทรฟิลล์ที่เคลื่อนที่เนื่องจากการตอบสนองต่อ IL-8 (IL-8 : อินเตอร์ลูคิน-8, KP : สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ) (*p-value ≤ 0.05)

8. การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและขมิ้นชัน ต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ของเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี ELISA

8.1 การทดสอบระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ของเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori*

เนื่องจากการศึกษาพบว่า เชื้อ *H. pylori* สามารถกระตุ้นการตายแบบอะพอโทซิสได้ทั้ง 2 แบบ คือ แบบผ่านการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 และแบบไม่ผ่าน caspase-8 การทดสอบนี้จึงต้องการยืนยันกลไกการตายแบบอะพอโทซิสที่เกิดจากการติดเชื้อ *H. pylori* ว่าผ่านการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 หรือไม่ โดยกระตุ้นเซลล์ AGS ด้วยเชื้อ *H. pylori* นาน 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ผลดังรูปที่ 25 พบว่าเซลล์ AGS ที่ไม่ติดเชื้อมีระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ที่เพิ่มสูงขึ้นดังนี้ $1,409 \pm 12$, $2,692 \pm 176.6$ และ $8,838 \pm 186$ RLU ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ขณะที่เซลล์ AGS ที่มีเชื้อ *H. pylori* ระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกเวลาทดสอบ ดังนั้นเชื้อ *H. pylori* ไม่น่าจะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ได้

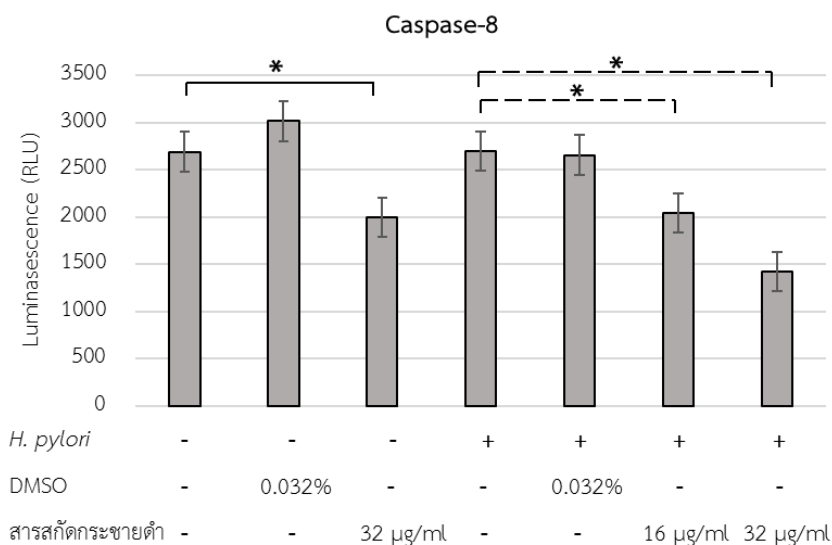


รูปที่ 25 กราฟแสดงระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ในเซลล์ AGS ในสถานะที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (AGS : เซลล์ Gastric adenocarcinoma, HP : *H. pylori*)

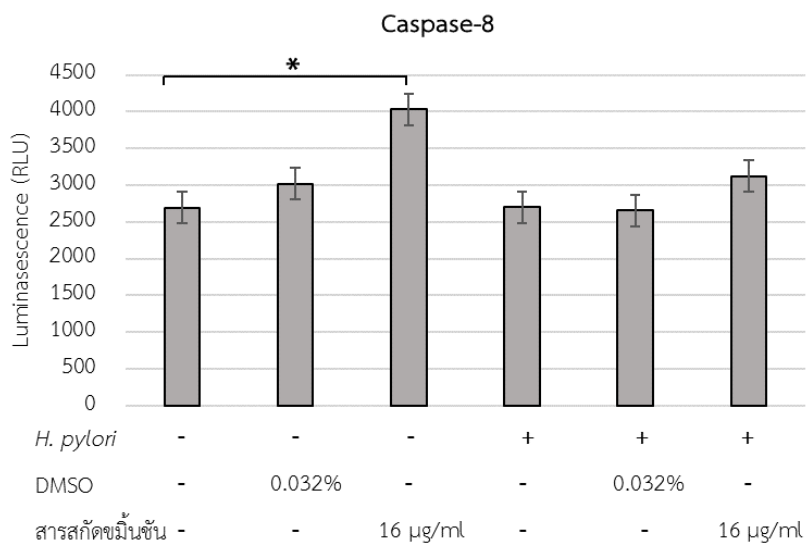
8.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมิน ต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8

เพื่อศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 โดยบ่มเซลล์ AGS กับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ ความเข้มข้น 16 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ เคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสถานะที่มีและไม่มีเชื้อ *H. pylori* นาน 24 ชั่วโมง ผลดังแสดงในรูปที่ 26 พบว่าระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ในเซลล์ AGS ที่มีเชื้อ *H. pylori* มีปริมาณเท่ากับเซลล์ AGS ที่ไม่มีเชื้อ *H. pylori* คือ เท่ากับ $2,698 \pm 19$ RLU ขณะที่หลุมที่มีเชื้อ *H. pylori* และบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ 16 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับของเอนไซม์ caspase-8 ที่ลดลงเหลือ $2,046 \pm 511$ และ $1,421 \pm 787$ RLU คิดเป็นอัตราการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 เป็น 24.20% และ 47.33% ตามลำดับ และหลุมที่มีเซลล์ AGS บ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ที่ลดลงเหลือ $1,997 \pm 378$ RLU คิดเป็นอัตราการยับยั้ง 25.81% ส่วนฤทธิ์ของเคอร์คิวมิน ผลดังแสดงในรูปที่ 27 พบว่าหลุมที่มีเชื้อ *H. pylori* และเคอร์คิวมินความเข้มข้น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 สูงกว่าหลุมควบคุมที่ติดเชื้อ *H. pylori* เล็กน้อยที่ $3,121 \pm 116$ RLU คิดเป็นอัตราการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 15.67% แต่หลุมที่มีเซลล์ AGS บ่มกับเคอร์คิวมินที่ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็น $4,028 \pm 150$ RLU คิดเป็นอัตราการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ถึง 49.27% และตัวทำละลาย 0.032% DMSO พบว่าไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-8

สรุปว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ทั้งในเซลล์ AGS และ เซลล์ AGS ที่มีเชื้อ *H. pylori* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทางกลับกัน เคอร์คิวมินนั้นมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ในเซลล์ AGS แต่มีระดับลดลงในเซลล์ AGS ที่มีเชื้อ *H. pylori*



รูปที่ 26 กราฟแสดงฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ในเซลล์ AGS ที่มีและไม่มีเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะ co-culture ที่เวลา 24 ชั่วโมง (*p-value ≤ 0.05)

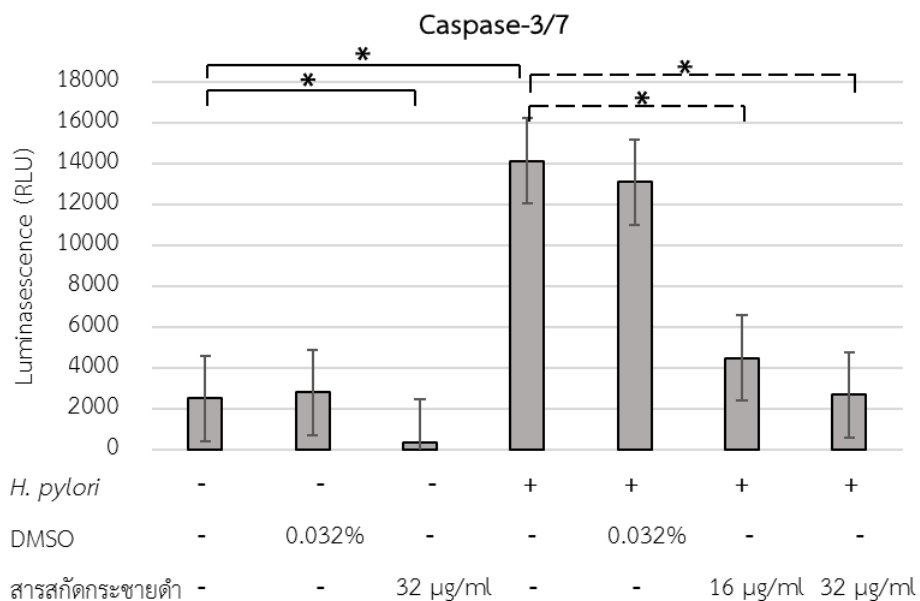


รูปที่ 27 กราฟแสดงฤทธิ์การยับยั้งของเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 16 µg/ml ต่อการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ในเซลล์ AGS ที่มีและไม่มีเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะ co-culture ที่เวลา 24 ชั่วโมง (*p-value ≤ 0.05)

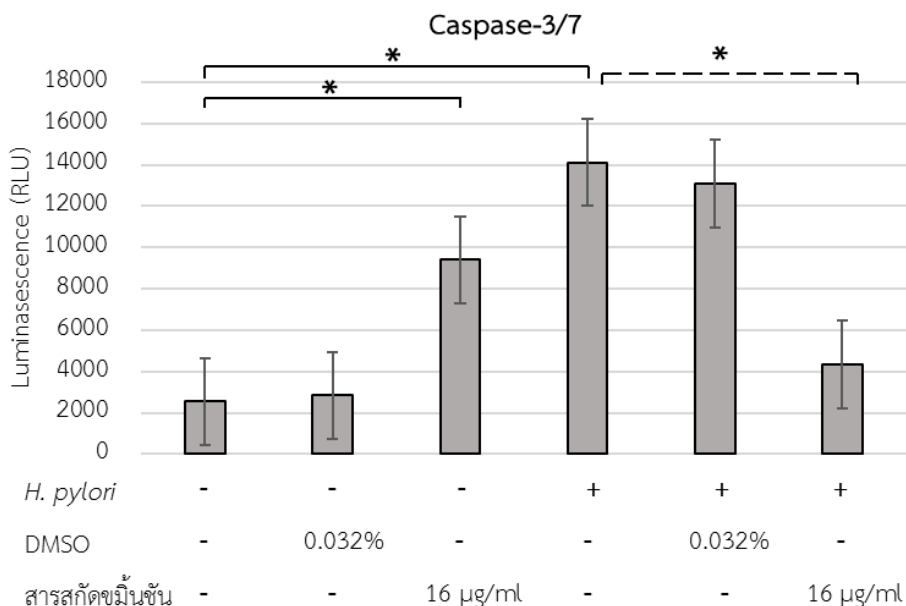
9. การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี ELISA

เพื่อศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 โดยบ่มเซลล์ AGS กับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำความเข้มข้น 16 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ เคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสถานะที่มีและไม่มีเชื้อ *H. pylori* นาน 24 ชั่วโมง ผลดังแสดงในรูปที่ 28 พบว่าระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในเซลล์ AGS ที่มีเชื้อ *H. pylori* มีปริมาณสูงกว่าในเซลล์ AGS ที่ไม่มีเชื้อ *H. pylori* อย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ $14,124 \pm 309$ RLU คิดเป็นอัตราการกระตุ้นระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ถึง 82.03% ขณะที่หลุมที่มีเชื้อ *H. pylori* และบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ 16 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับของเอนไซม์ caspase-3/7 ที่ลดลงเหลือ $4,516 \pm 476$ และ $2,711 \pm 47$ RLU คิดเป็นอัตราการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 เป็น 68.02% และ 80.80% ตามลำดับ และหลุมที่มีเซลล์ AGS บ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ที่ลดลงเหลือ $1,997 \pm 378$ RLU คิดเป็นอัตราการยับยั้ง 25.81% ส่วนทดสอบฤทธิ์ของเคอร์คิวมิน ผลดังแสดงในรูปที่ 29 พบว่าหลุมที่มีเชื้อ *H. pylori* และเคอร์คิวมินความเข้มข้น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ที่ลดลงเหลือ $4,348 \pm 784$ RLU คิดเป็นอัตราการยับยั้ง 69.22% และหลุมที่มีเซลล์ AGS บ่มกับเคอร์คิวมินที่ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ที่เพิ่มขึ้นเป็น $9,396 \pm 1,108$ RLU คิดเป็นอัตราการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 72.98% เทียบกับหลุมที่มีเซลล์ AGS และตัวทำละลาย 0.032% DMSO พบว่าไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7

สรุปว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ทั้งในเซลล์ AGS และ เซลล์ AGS ที่มีเชื้อ *H. pylori* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเคอร์คิวมินนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในเซลล์ AGS มีเชื้อ *H. pylori* แต่มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในเซลล์ AGS ที่ไม่มีเชื้อ



รูปที่ 28 กราฟแสดงฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในเซลล์ AGS ที่มีและไม่มีเชื้อ *H. pylori* ในสถานะ co-culture ที่เวลา 24 ชั่วโมง (*p-value \leq 0.05)



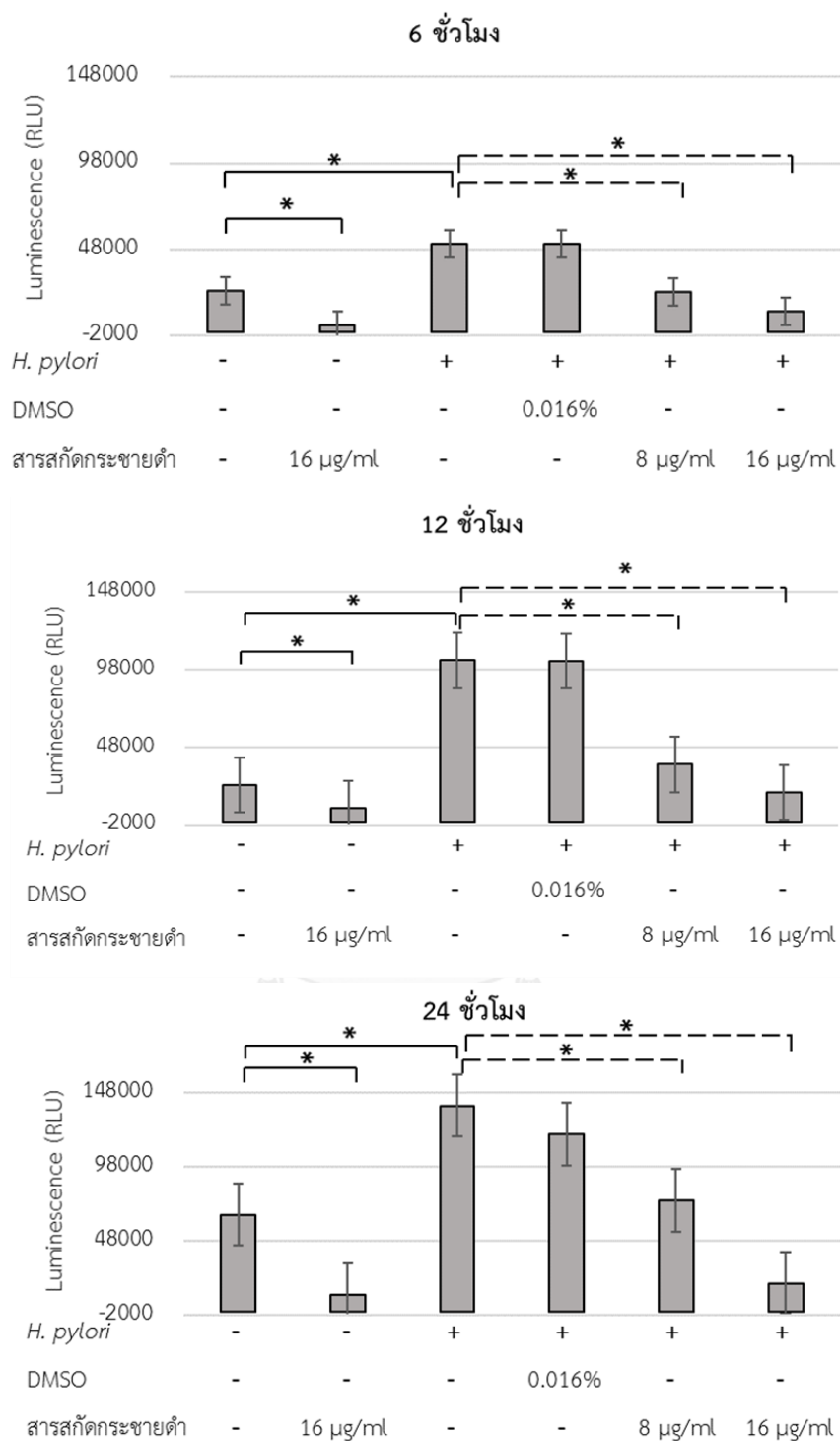
รูปที่ 29 กราฟแสดงฤทธิ์การยับยั้งของเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 16 µg/ml ต่อการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในเซลล์ AGS ที่มีและไม่มีเชื้อ *H. pylori* ในสถานะ co-culture ที่เวลา 24 ชั่วโมง (*p-value \leq 0.05)

10. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี ELISA

10.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ ในสภาวะ co-culture ที่เวลาต่างๆ

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในกระบวนการตายแบบอะพอโทซิส โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ AGS ร่วมกับเชื้อ *H. pylori* และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง เชื้อ *H. pylori* สามารถกระตุ้นระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในกลุ่มควบคุมบวกที่มีเชื้อ *H. pylori* ในปริมาณ $51,404 \pm 1969$ RLU ดังแสดงในรูปที่ 30 ซึ่งในหลุมที่ติดเชื้อและบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ที่ลดลงเหลือ $23,697 \pm 78$ และ $12,783 \pm 57$ RLU คิดเป็นอัตราการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 เท่ากับ 53.90% และ 75.13% ที่เวลา 12 ชั่วโมง เชื้อ *H. pylori* สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในอัตราที่สูงขึ้นเป็น $104,432 \pm 305$ ซึ่งในหลุมที่ติดเชื้อและบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ที่ลดลงเหลือ $37,386 \pm 331$ และ $9,555 \pm 163$ คิดเป็นอัตราการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ได้ 64.20% และ 81.27% ในขณะที่เวลา 24 ชั่วโมงมีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 มากที่สุดถึง $140,359 \pm 703$ RLU ซึ่งในหลุมที่ติดเชื้อและบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ที่ลดลงเหลือ $76,073 \pm 3,466$ และ $20,299 \pm 6,080$ RLU คิดเป็นอัตราการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 เป็น 45.80% และ 85.54% และหลุมที่มีเซลล์ AGS ที่บ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ลดลงเหลือ $4,401 \pm 85$, $9,005 \pm 117$ และ $12,456 \pm 1,107$ RLU คิดเป็นอัตราการยับยั้งเท่ากับ 83.76%, 64.84% และ 82.41% ตามลำดับ โดยตัวทำลาย 0.016% DMSO พบว่าไม่มีผลในการยับยั้งทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7

สรุปว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ทั้งในเซลล์ AGS และ เซลล์ AGS ที่มีเชื้อ *H. pylori* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

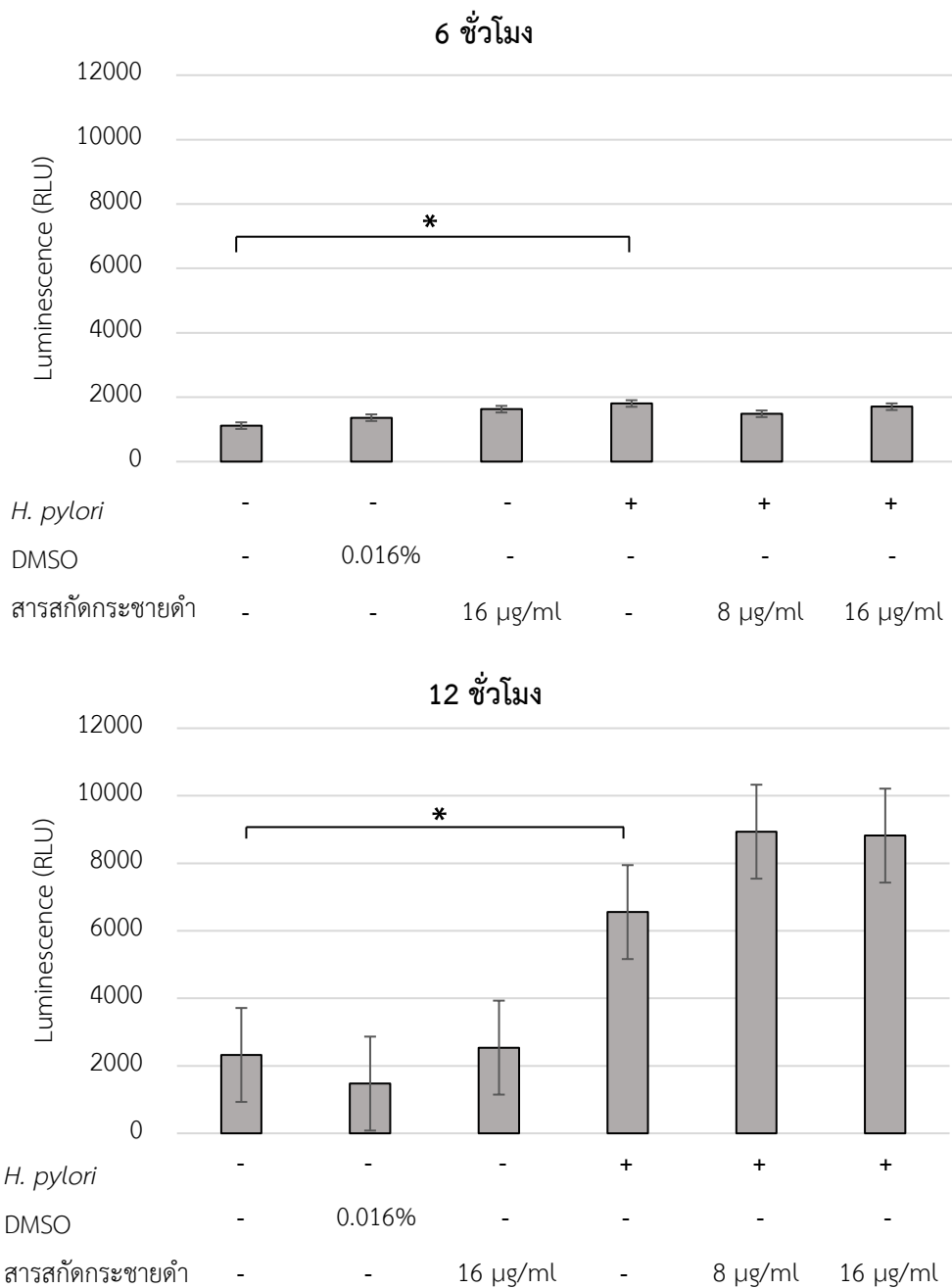


รูปที่ 30 กราฟแสดงการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของเซลล์ AGS ที่ป่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ และเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะ co-culture ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (*p-value \leq 0.05)

10.2 การทดสอบฤทธิ์ป้องกันการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในสภาวะ pre-treatment ที่เวลาต่างๆ

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในการป้องกันการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในกระบวนการตายแบบอะพอโทซิส โดยบ่มเซลล์ AGS กับ สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไว้ด้วยก้านาน 3 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นล้างสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำออกและกระตุ้นเซลล์ต่อด้วยเชื้อ *H. pylori* นาน 3 และ 6 ชั่วโมง รวมเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ผลดังแสดงในรูปที่ 31 พบว่า ที่เวลา 6 ชั่วโมง หลุมควบคุมที่ติดเชื้อมีระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 เท่ากับ $1,804 \pm 53$ RLU แต่หลุมที่ทำการบ่มเซลล์ AGS กับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำทั้ง 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนการติดเชื้อ ไม่พบความแตกต่างของระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 เมื่อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมที่ติดเชื้อ และที่เวลา 12 ชั่วโมง หลุมควบคุมที่ติดเชื้อมีระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในระดับที่เพิ่มขึ้นเป็น $6,553 \pm 446$ RLU และหลุมที่ทำการบ่มเซลล์ AGS กับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำก่อนการติดเชื้อทั้ง 2 ความเข้มข้นนั้น ไม่พบความแตกต่างของระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 เมื่อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมที่ติดเชื้อเช่นเดียวกันกับที่เวลา 6 ชั่วโมง สำหรับหลุมควบคุมเซลล์ AGS พบว่า ตรวจพบระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในปริมาณต่ำๆ และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำไม่มีผลต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในเซลล์ AGS ที่ไม่ติดเชื้อ รวมทั้งตัวทำละลาย 0.016% DMSO ไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของเซลล์แต่อย่างใด ทั้งนี้สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำเข้มข้น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่แสดงฤทธิ์ในการลดการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ

สรุปว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง ไม่สามารถออกฤทธิ์ป้องกันการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ก่อนการติดเชื้อ *H. pylori* ได้ และเนื่องจากที่เวลาทดสอบรวม 12 ชั่วโมง ให้ผลการทดลองในการกระตุ้นระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในหลุมที่ติดเชื้อได้ชัดเจนกว่าที่ 6 ชั่วโมง ดังนั้นเฉพาะเวลา 12 ชั่วโมง เท่านั้นที่ถูกนำไปใช้ในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในสภาวะ pre-infection ต่อไป

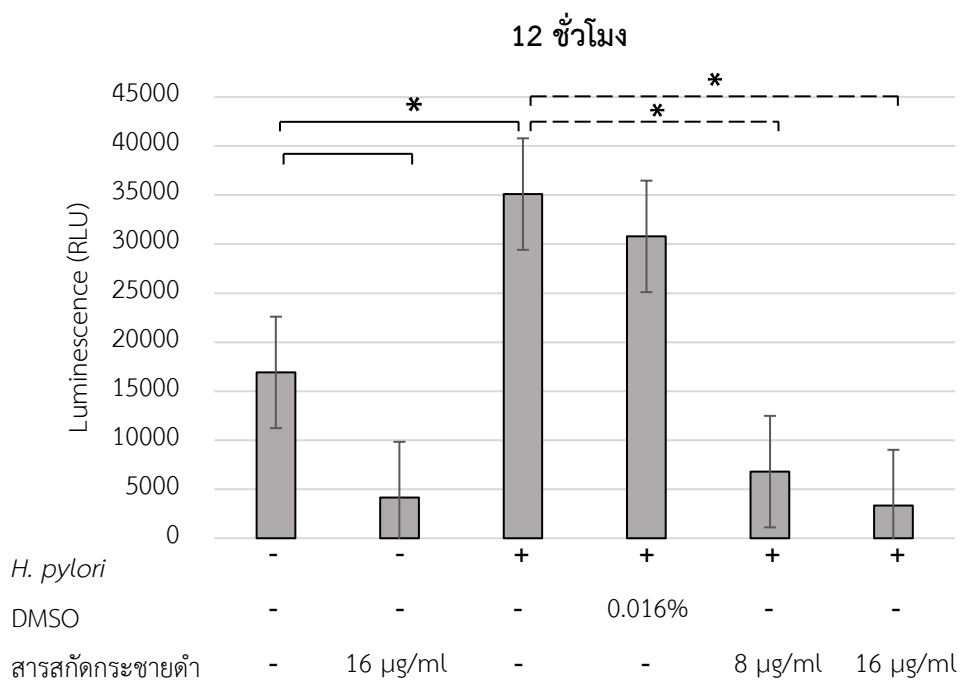


รูปที่ 31 กราฟแสดงการระดับทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของเซลล์ AGS ที่บ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ และเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะ pre-treatment ที่เวลาบ่มรวม 6 และ 12 ชั่วโมง (*p-value \leq 0.05)

10.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ ในสภาวะ pre-infection

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในการออกฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 หลังจากเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *H. pylori* โดยการบ่มเชื้อ *H. pylori* กับเซลล์ AGS ก่อน 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มต่ออีกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลดังแสดงในรูปที่ 32 พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง หลุมควบคุมที่ติดเชื้อมีระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 เท่ากับ $35,106 \pm 3,651$ RLU และหลุมที่ทำการบ่มเซลล์ AGS กับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำทั้ง 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนการติดเชื้อ มีการระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เหลือ $6,797 \pm 1,700$ และ $3,333 \pm 83$ RLU คิดเป็นอัตราการยับยั้งเท่ากับ 80.64% และ 90.50% ตามลำดับ สำหรับหลุมควบคุมเซลล์ AGS พบว่า ตรวจพบระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในปริมาณ $16,915 \pm 291$ RLU และหลุมที่บ่มสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำเข้มข้น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับเซลล์ AGS ที่ไม่ติดเชื้อ มีระดับของเอนไซม์ caspase-3/7 ลดลงเหลือ $4,149 \pm 205$ RLU เมื่อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมเซลล์ AGS คิดเป็นอัตราการยับยั้งเท่ากับ 75.47% และตัวทำละลาย 0.016% DMSO ไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของเซลล์แต่อย่างใด

สรุปว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง สามารถออกฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ทั้งในเซลล์ AGS และ เซลล์ AGS หลังจากเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *H. pylori* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

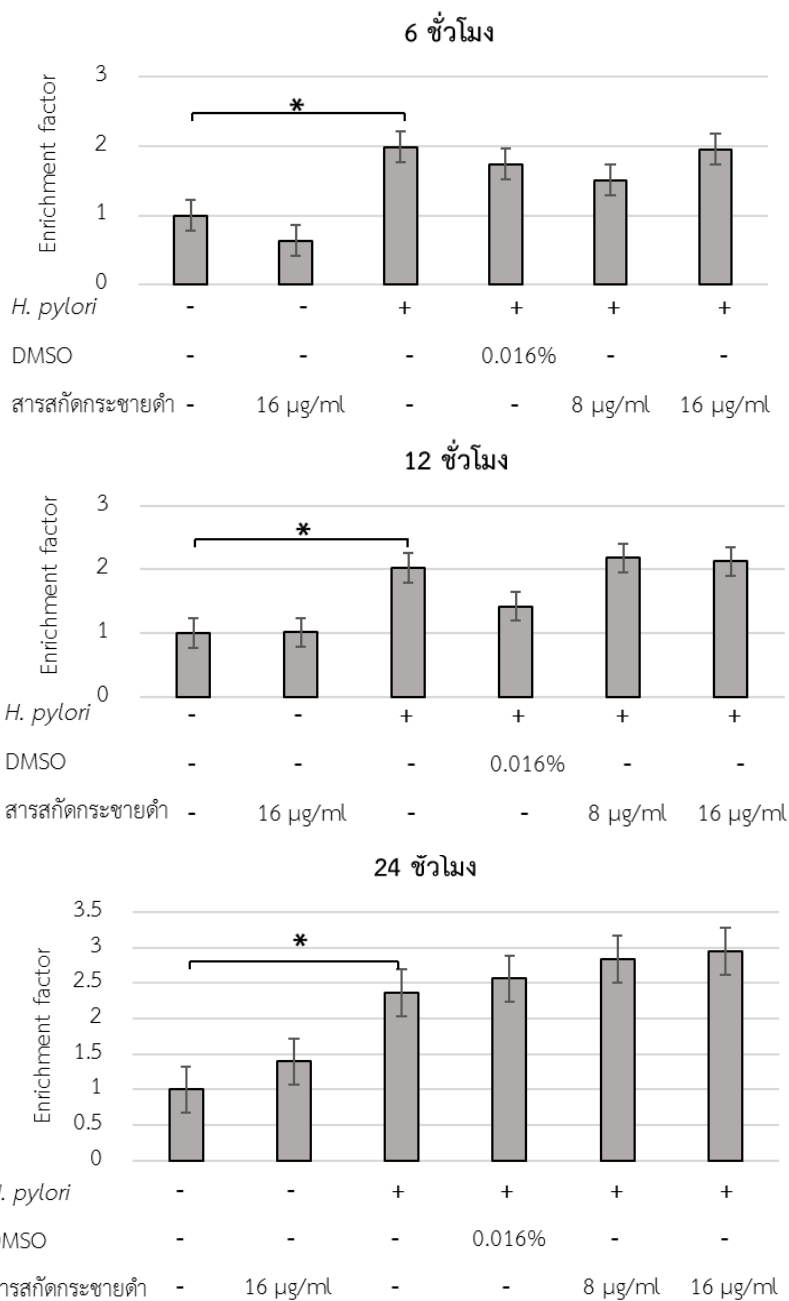


รูปที่ 32 กราฟแสดงการระดับทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของเซลล์ AGS ที่ป่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ และเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะ pre-infection ที่เวลาบ่มรวม 12 ชั่วโมง (*p-value \leq 0.05)

11. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี ELISA

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในการยับยั้งการแตกหักของดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นกระบวนการบ่งชี้การตายแบบอะพอโทซิส โดยบ่มเซลล์ AGS ร่วมกับ (co-culture) เชื้อ *H. pylori* และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ผลดังแสดงในรูปที่ 33 ที่เวลา 6 ชั่วโมง มีการแตกหักของดีเอ็นเอ เท่ากับ 1.98 ± 0.02 ขณะที่ในหลุมที่ติดเชื้อและบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่พบความแตกต่างของการแตกหักของดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมที่ติดเชื้อ และที่เวลา 12 ชั่วโมง หลุมควบคุมที่ติดเชื้อ มีการแตกหักของดีเอ็นเอที่เพิ่มสูงขึ้นเป็น 2.02 ± 0.14 ขณะที่ในหลุมที่ติดเชื้อและบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่พบความแตกต่างของการแตกหักของดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมที่ติดเชื้อเช่นเดียวกันกับที่เวลา 6 ชั่วโมง ที่เวลา 24 ชั่วโมง หลุมควบคุมที่ติดเชื้อมีการแตกหักของดีเอ็นเอที่สูงที่สุดเท่ากับ 2.36 ± 0.05 ขณะที่ในหลุมที่ติดเชื้อและบ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยังคงไม่พบความแตกต่างของการแตกหักของดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมที่ติดเชื้อเช่นเดียวกันกับที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง และหลุมควบคุมเซลล์ AGS พบว่ามีการแตกหักของดีเอ็นเออยู่ในปริมาณต่ำๆ รวมถึงสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์ AGS ที่ไม่ติดเชื้อ และตัวทำละลาย 0.016% DMSO ไม่มีผลต่อการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์แต่อย่างใด

สรุปว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์ AGS ได้



รูปที่ 33 กราฟแสดงค่า enrichment factor ของการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์ AGS ที่บ่มกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำความเข้มข้นต่างๆ และ เชื้อ *H. pylori* ในสภาวะ co-culture ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (*p-value \leq 0.05)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

เป็นที่ทราบดีว่าเชื้อ *H. pylori* เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดพยาธิสภาพในกระเพาะอาหารทั้งนี้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและการตอบสนองของเซลล์ต่อตัวเชื้อเป็นส่วนหนึ่งของการเกิดพยาธิสภาพดังกล่าว โดยปัจจัยความรุนแรงจากตัวเชื้อ เช่น โปรตีน *cagA*, *vacA* นั้นเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนสูง (High antigenicity) จึงสามารถกระตุ้นกระบวนการตอบสนองของเซลล์ได้เป็นอย่างดี ซึ่งกระบวนการอักเสบและการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์กระเพาะอาหารเป็น 2 กระบวนการตอบสนองเริ่มต้นของเซลล์ที่สามารถนำไปสู่การดำเนินโรคในระยะต่างๆ ไปจนถึงมะเร็งกระเพาะอาหาร โดยกระบวนการอักเสบเป็นกระบวนการแรกที่ตอบสนองต่อเชื้อ *H. pylori* ซึ่งพบว่ากระเพาะอาหารที่ติดเชื่อนั้นมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนอย่างรวดเร็วและความรุนแรงของการอักเสบนั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็ง พบอัตราการเกิด neoplasia ในผู้ป่วยระยะที่ 3 ของโรคกระเพาะอาหารอักเสบประมาณ 30% และพบอัตราดังกล่าวในผู้ป่วยระยะที่ 4 ของโรคกระเพาะอาหารอักเสบสูงถึง 90% (103) นอกจากนี้การอักเสบยังเกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอโทซิส โดยในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารอักเสบแบบรุนแรงมีการตายแบบอะพอโทซิสมากกว่าผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารอักเสบแบบไม่รุนแรงประมาณ 2.2 เท่า (104) การตายแบบอะพอโทซิสยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร โดยมีการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารที่ติดเชื้อ *H. pylori* ตรวจพบการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์กระเพาะอาหารสูงกว่าในผู้ป่วยที่ไม่ได้ติดเชื้อถึง 2 เท่า (105) ทั้งนี้ยังพบการอะพอโทซิสจำนวนมากในระยะ atrophic gastritis และ intestinal metaplasia ที่เป็นระยะที่มีความเสี่ยงสูงในการพัฒนาเป็นโรคมะเร็ง (106, 107) ปัจจุบันมีข้อกำหนดว่าให้ยกเลิกการรักษาการติดเชื่อดังกล่าวด้วยวิธี first line therapy เนื่องจากพบว่าการรักษาด้วยวิธีนี้มักไม่ได้ผล เพราะมีอัตราของเชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ใช้ในวิธี first line therapy สูงมาก (108) จึงมีการศึกษาสารจากพืชสมุนไพรต่างๆ เพื่อนำมาใช้รักษาร่วมกับยาต้านจุลชีพ (109) รวมถึงกระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) และ ขมิ้นชัน (*Curcuma longa L.*) ที่เป็นพืชสมุนไพรที่พบได้มากในแถบเอเชีย เช่น มาเลเซียและประเทศไทย โดยนิยมใช้รักษาอาการจุกเสียด แน่นท้อง และปวดท้อง

ตามภูมิปัญญาไทยมาช้านานจนถึงปัจจุบัน (110) ซึ่งสมุนไพรทั้งสองมีการศึกษาก่อนหน้าพบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและกระบวนการติดเชื้อของ *H. pylori* ได้ (11, 23, 111) ดังนั้นสารสกัดดังกล่าวอาจสามารถยับยั้งกระบวนการอักเสบและการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์กระเพาะอาหารเนื่องจากเชื้อ *H. pylori* และน่าจะเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการยับยั้งการเกิดพยาธิสภาพและการดำเนินโรคกระเพาะอาหารได้

โดยในการศึกษานี้พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (MIC) เท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการรายงานพบว่า ค่า MIC ของเคอร์คิวมินต่อการเจริญของเชื้อ *H. pylori* นั้นมีค่าประมาณ 16 -32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (11, 23) และพบว่า ค่า MIC ของสารสกัดเมทานอลจากกระชายดำกับเชื้อ *H. pylori* มีค่า MIC ที่ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ รวมถึงสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการบุกรุกของเชื้อ *H. pylori* เข้าสู่เซลล์ HEp-2 ได้ดีกว่าการใช้ตัวทำละลายอื่น (23, 111) แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีความสามารถในการสกัดสารที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อ *H. pylori* ออกมาจากเหง้าของกระชายดำได้มีประสิทธิภาพมากกว่าเมทานอล นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายเอทิลอะซิเตทสามารถสกัดสารประเภท flavonoid ออกมาจากใบฮันนีโลคัสได้มากกว่าเมทานอลและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า (112) เนื่องจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทและเมทานอลมีคุณสมบัติของความมีขั้วที่แตกต่างกัน โดยเอทิลอะซิเตทมีขั้วน้อยกว่า ดังนั้นการสกัดด้วยตัวละลายที่ต่างกันจะได้สารออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้เคอร์คิวมินและกระชายดำยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้ด้วย เช่น สารสกัดกระชายดำยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่ความเข้มข้น 3.70 - 4.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ,ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ที่ความเข้มข้น 17.63 - 39.71 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (19) และเคอร์คิวมินยังสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus* (MSSA) และ *S. aureus* (MRSA) ได้ที่ความเข้มข้น 163 ,219 และ 217 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (113) ถึงแม้สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *H. pylori* ได้ดี อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิด มีผลกระทบต่อการอยู่รอดของเซลล์ AGS ตามความเข้มข้นและเวลาบ่มที่มากขึ้น จากการทดสอบหาเปอร์เซ็นต์

การอยู่รอดของเซลล์ AGS ด้วยวิธี MTT พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 6 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ แต่ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีชีวิตรอดเหลือ 88% และ 78% ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แม้ที่เวลาบ่มนานถึง 24 ชั่วโมง ยังมีผลกระทบต่ำมากต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยเซลล์มีชีวิตรอดมากกว่า 90% แตกต่างจากความเข้มข้น 32, 64 และ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดการอยู่รอดของเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง ลงเหลือเพียง 78%, 13% และ 1.7% ส่วนเคอร์คิวมินนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ AGS ที่สูงกว่า โดยเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองในความเข้มข้นและเวลาบ่มเดียวกัน ที่เวลา 24 ชั่วโมง เคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเซลล์ที่มีชีวิตรอดเหลือน้อยกว่า 70% การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ (ประมาณ 14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และบ่มนาน 24 ชั่วโมง ลดการอยู่รอดของเซลล์ลงเหลือเพียง 40% (114) ดังนั้นสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงเป็นความเข้มข้นที่ปลอดภัยที่สุดสำหรับเซลล์ AGS ในการทำการทดสอบอื่นๆ เช่นเดียวกับการทดลองของ Wongsrikaew et al. ปี 2012 พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ AGS เมื่อบ่มสารสกัดกับเซลล์ AGS นานถึง 48 ชั่วโมง (115)

สารสกัดจากกระชายดำสามารถออกฤทธิ์รักษาเยื่อเมือกของกระเพาะอาหาร ควบคุมการอักเสบและลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูทดลอง (98) รวมถึงลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ คือ nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ (116) และเคอร์คิวมินสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเกาะติดและการสร้างไบโอฟิล์มของ *H. pylori*, ลดการหลั่งไซโตไคน์ที่กระตุ้นการอักเสบ และรักษาแผลอักเสบในสัตว์ทดลองได้ (11, 16, 23, 117) จากรายงานดังกล่าวสารสกัดทั้ง 2 ชนิดจึงถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของเซลล์ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *H. pylori* มีระดับของไซโตไคน์ต่างๆ เพิ่มขึ้นหลายชนิด เช่น MCP-1, MCP-4, IL-8 และ TNF- α (118) ทั้งนี้พบว่าในการตรวจ IL-8 ใน ชิ้นเนื้อของผู้ป่วย 20 ราย ให้ผลบวกถึง 19 ราย เมื่อเปรียบเทียบกับในคนปกติจะให้ผลบวกเพียง 4 รายเท่านั้น

(119) และยังพบว่ามีการแสดงออกของ MCP-1 ที่สูงขึ้นทั้งในส่วนของ antrum และ corpus (120) ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการหลั่ง IL-8 ซึ่งเป็นหนึ่งในไซโตไคน์ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบของเซลล์ที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* โดยการตอบสนองของเซลล์กระเพาะอาหารต่อการติดเชื้อ *H. pylori* นั้นพบว่ามีการแสดงออกและหลั่ง IL-8 ออกมาเป็นจำนวนมาก รวมถึง IL-8 ยังมีความสามารถในการดึงดูดเซลล์ทางระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆมายังบริเวณที่ติดเชื้อ โดยมีการศึกษายืนยันว่าการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวปริมาณมากเข้ามาในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลทำให้เกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงมากขึ้น (121, 122) ดังนั้น IL-8 จึงเหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ในการทดสอบการฤทธิ์ต้านการอักเสบเบื้องต้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำและเคอร์คิวมินในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* โดยในการทดสอบเซลล์ AGS ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *H. pylori* พบว่ามีการหลั่ง IL-8 จำนวนมากที่เวลา 24 ชั่วโมง และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-8 ลง 48.56% ในขณะที่เคอร์คิวมินไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-8 ได้ ทั้งนี้ Koosirirat et al. ปี 2010 ได้รายงานว่เคอร์คิวมินมีประสิทธิภาพต่ำในการกำจัดเชื้อ *H. pylori* ออกจากกระเพาะอาหารของผู้ป่วยและไม่สามารถลดการหลั่งของ IL-8 ได้ (123) และเนื่องจาก IL-8 เป็นไซโตไคน์ที่ไวต่อการติดเชื้อ *H. pylori* มาก โดยมีระดับการแสดงออกของยีนสูงและรวดเร็วกว่ายีนอื่นเมื่อทำให้เซลล์ติดเชื้อ *H. pylori* (64) ทั้งนี้เชื้อ *H. pylori* สามารถกระตุ้นการหลั่งของ IL-8 ผ่าน NF- κ B pathway (124) ที่มีความสัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบอย่างมาก ดังนั้นสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำมีแนวโน้มในการยับยั้งกระบวนการอักเสบได้ดีกว่าเคอร์คิวมิน จากผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการหลั่งสาร IL-8 ในเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะและเวลาต่างๆ พบว่าเชื้อ *H. pylori* กระตุ้นการหลั่ง IL-8 ของเซลล์ AGS สูงขึ้นตามเวลาที่ใช้บ่ม โดยที่ 48 ชั่วโมง มีการหลั่ง IL-8 ที่สูงที่สุด ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าที่เวลาบ่ม 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ถึง 3.5, 3 และ 1.7 เท่า ตามลำดับ สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยกว่าค่า MIC และไม่ส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตของเซลล์ แต่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่ง IL-8 ของเซลล์ในสภาวะ co-culture โดยพบว่าที่ 6 และ 12 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งการหลั่ง IL-8 ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ ซึ่งสามารถลดปริมาณการหลั่ง IL-8 ได้สูงสุด 63.25% ที่ 12 ชั่วโมง

ด้วยการทดสอบในสภาวะ co-culture เป็นสภาวะการทดสอบที่มีความเสมือนจริงในการรักษาผู้ป่วย ซึ่งยาปฏิชีวนะจะคงอยู่ในกระเพาะอาหารหรือกระแสเลือดพร้อมกับเชื้อ จากรายงานของ Skiba et al. ปี 2016 พบว่า Kaempferol ที่เป็นสารอนุพันธ์ของกระชายดำ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-8 จากเซลล์ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ได้ประมาณ 1.4 เท่า (125) ในขณะที่สภาวะ pre-treatment โดยการบ่มเซลล์กับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำเป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง ก่อนทำให้เซลล์ติดเชื้อเป็นเวลาอีก 3 และ 6 ชั่วโมง นั้น ไม่มีผลในการลดการหลั่ง IL-8 แต่อย่างใด ดังนั้นสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำไม่มีผลในการป้องกันเซลล์จากการกระตุ้นกระบวนการอักเสบได้ แต่สามารถออกฤทธิ์ในการลดการอักเสบได้ในสภาวะที่บ่มสารสกัดพร้อมกับเชื้อ *H. pylori* นอกจากนี้พบว่า ในการทดสอบเซลล์โดยทำให้เซลล์ติดเชื้อก่อน จากนั้นล้างเชื้อออกจากหลุมทดสอบและบ่มต่อไปอีก 12 ชั่วโมง ในสภาวะ pre-infection พบว่าไม่มีการหลั่ง IL-8 ออกมาจากเซลล์อีก อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันและรักษา อาจเพิ่มระยะเวลาในการทดสอบ pre-treatment และ pre-infection มากกว่า 12 ชั่วโมง หรือการ co-culture หลังจาก pre-treatment และ pre-infection โดยไม่ขจัดสารสกัดหรือเชื้อออก อาจจะทำให้สารสกัดมีฤทธิ์ในการป้องกันและลดการอักเสบได้ดีขึ้น จากการทดลองแบบ pre-treatment เซลล์ AGS กับสารสกัดจากโสมแดงนาน 2 ชั่วโมงก่อนการติดเชื้อ *H. pylori* พบว่าสามารถลดการหลั่ง iNOS และ MCP-1 รวมถึงการทำงานของ STAT-3 และ Jak-2 ได้ (97) และการบ่มเซลล์กับสารสกัดจาก *Rumex Aquaticus* ก่อน 12 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดการแสดงออกของ IL-8 และ IL-1 β ได้ (126) การศึกษาในเซลล์ HeLa ที่กระตุ้นด้วยโปรตีนของเชื้อ *Yersinia enterocolitica* พบว่า ปริมาณ IL-8 จะเริ่มลดลงหลังจากขั้นตอนการล้างโปรตีนดังกล่าวออกจากเซลล์เพียง 3 ชั่วโมง (127) ดังนั้นเชื้อ *H. pylori* ไม่ได้มีผลกระทบในการเพิ่มการแสดงออกของ IL-8 ของเซลล์อย่างถาวร เนื่องจากเซลล์จะมีการหลั่ง IL-8 เฉพาะเมื่อมีตัวเชื้ออยู่เท่านั้น ทั้งนี้การทดลองแบบ pre-infection ยังมีอยู่อย่างจำกัดจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบสภาวะดังกล่าวในการศึกษาในอนาคต นอกจากนี้ DMSO ที่นิยมใช้เป็นตัวทำละลายในการเตรียมสารสกัดต่างๆเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบและมีรายงานว่า DMSO ที่ความเข้มข้น 0.1% - 0.5% มีผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-1, IL-6 และ COX-2 ในเซลล์ Caco-2 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย IL-1 β (128) และในการทดลองนี้พบว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายในการเตรียม stock solution มีคุณสมบัติในการลดปริมาณ IL-8 ในเซลล์ AGS ที่

ติดเชื้อ *H. pylori* ได้ โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ที่อยู่ในสารสกัดที่ใช้ในการทดลอง คือ 0.32% สามารถลดปริมาณ IL-8 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและใกล้เคียงกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ ทำให้ไม่สามารถแปลผลฤทธิ์ของสารสกัดได้ แต่เมื่อเตรียม stock solution ของสารสกัดให้เข้มข้นขึ้น 10 เท่า ทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ที่ใช้ในการทดลองลดลงเหลือ 0.032% พบว่าไม่มีผลต่อการหลั่ง IL-8 อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อ *H. pylori*

MCP-1 เป็นไซโตไคน์ในกระบวนการอักเสบอีกหนึ่งชนิดที่ถูกกระตุ้นการแสดงออกเนื่องจากการติดเชื้อ *H. pylori* และมีบทบาทสำคัญในการดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์มายังบริเวณที่ติดเชื้อ นอกจากนี้การกระตุ้นเซลล์กระเพาะอาหารชนิด MKN-48 ด้วยโปรตีนที่สกัดจากเชื้อ *H. pylori* ยังสามารถสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ mRNA และการหลั่งไซโตไคน์ MCP-1 ได้ (75) จากการทดลองพบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการแสดงออกของ MCP-1 ได้ เช่นเดียวกับการยับยั้งการหลั่ง IL-8 มีรายงานว่าสารสกัดจากโสมแดงความเข้มข้นตั้งแต่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Alpha-lipoic acid (Alpha-LA) ซึ่งเป็นสารประเภท thiol ที่พบได้ในอาหาร เช่น ผักโขม บล็อกโคลี่ และเครื่องในสัตว์ สามารถยับยั้งการหลั่งและการแสดงออกของยีน MCP-1 ในเซลล์ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ได้ (97, 129)

ดังนั้นสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำสามารถยับยั้งการสร้าง IL-8 และ MCP-1 ซึ่งเป็นไซโตไคน์หลักที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบ อย่างไรก็ตามเนื่องจากบริเวณ promoter ของยีนไซโตไคน์ทั้ง 2 ชนิด สามารถจับจำเพาะและกระตุ้นการถอดรหัสของดีเอ็นเอได้ด้วย transcription factor ชนิดเดียวกัน เช่น NF- κ B และ AP-1 (130-132) จึงสันนิษฐานว่าฤทธิ์ในการยับยั้ง IL-8 และ MCP-1 ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำอาจจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้ง transcription factor โดยมีการศึกษาพบความสามารถของสารสกัดกระชายดำในการยับยั้ง transcription factor ชนิด C/EBP ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อไขมันได้ (133) นอกจากนี้มีงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำสามารถลดการเกาะติดของเชื้อกับเซลล์และการบุกรุกของเชื้อเข้ามาในเซลล์ (23) ซึ่งกระบวนการเกาะติดกับเซลล์นั้นเป็นกระบวนการแรกในการกระตุ้นการตอบสนองต่างๆของเซลล์เจ้าบ้าน

รวมถึงกระบวนการอักเสบในเซลล์ด้วย การลดจำนวนเชื้อ *H. pylori* ที่เกาะติดและบุกรุกเซลล์จึงมีผลลดการอักเสบของเซลล์ด้วยอีกทางหนึ่ง

เซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดกระบวนการอักเสบเนื่องจากการตอบสนองต่อการติดเชื้อจุลชีพต่างๆ โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือดจะถูกดึงดูดให้เคลื่อนที่มายังบริเวณที่มีการติดเชื้อ ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดจะถูกชักนำให้เคลื่อนที่โดยสารดึงดูดเซลล์ที่แตกต่างกันออกไป โดยเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ถูกชักนำได้ด้วย MCP-1, PDGF-BB และ LPS (134, 135) นอกจากนี้ในการศึกษานี้พบว่าส่วนของโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* สามารถดึงดูดการเคลื่อนที่ของเซลล์โมโนไซต์ได้ โดยมีรายงานว่าโปรตีนที่สกัดได้จากเชื้อ *H. pylori* รวมถึงส่วนของตัวเชื้อที่ตายแล้ว มีความสามารถในการกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ในกระบวนการอักเสบโดยการหลั่งไซโตไคน์ชนิด Transforming growth factor (TGF) ได้เทียบเท่ากับเชื้อ *H. pylori* ที่มีชีวิต (102) โดยโปรตีนจากส่วนที่แตกต่างกันจากตัวเชื้อ *H. pylori* ได้แก่ โปรตีนที่ถูกหลั่งออกจากนอกเซลล์, โปรตีนบนผิวของตัวเชื้อ และ โปรตีนจากตัวเชื้อ สามารถดึงดูดเซลล์โมโนไซต์ให้เคลื่อนที่ได้ทั้งหมด (80, 81, 136) ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับ LPS ของเชื้อ *E. coli* กับโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* พบว่าโปรตีนของเชื้อ *H. pylori* สามารถดึงดูดการเคลื่อนที่ของเซลล์โมโนไซต์ได้ดีกว่า เนื่องจากใช้โปรตีนของเชื้อ *H. pylori* ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า LPS ถึง 10 เท่า ในการดึงดูดเซลล์โมโนไซต์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน อันเนื่องมาจากโปรตีนที่สกัดได้จากเชื้อ *H. pylori* ประกอบไปด้วยโปรตีนอื่นๆ หลายชนิด เช่น vacA, ureA และ ureB (137) ทำให้มีคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนสูงและดึงดูดการเคลื่อนที่ของเซลล์โมโนไซต์ได้ดีกว่า LPS ของเชื้อ *E. coli* ในการทดสอบความเป็นพิษของสารอนุพันธ์ของกระชายดำต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์ (PBMCs) พบว่า ที่เวลาบ่มนาน 24 ชั่วโมง สารอนุพันธ์ของกระชายดำชนิดต่างๆ มีผลกระทบต่อการอยู่รอดของเซลล์ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวलिम्โฟไซต์ชนิด U937 และ MOLT-4 พบว่า สารอนุพันธ์ของกระชายดำที่ความเข้มข้นเพียง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่สามารถส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตของเซลล์ (22) ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์โมโนไซต์เนื่องจากโปรตีนจากเชื้อ *H. pylori* และ LPS ได้ในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกันที่

ประมาณ 30% และ 60% ทั้งนี้มีรายงานว่าสารสกัดเอทานอลจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะติดของเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์บนเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดเนื่องจากการกระตุ้นด้วยไซยาไนด์ ได้ประมาณ 2 เท่า นอกจากนี้สารสกัดเอทานอลจากกระชายดำยังแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่ง MCP-1 และการแสดงออกของยีน VCAM-1 บนเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดได้ตามความเข้มข้นที่ใช้ (99) สารจำพวก Isothiocyanate ชนิด Sulforaphane จากผักและผลไม้ ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่และกระบวนการ phagocytosis ของเซลล์โมโนไซต์ เนื่องจากการกระตุ้นด้วย stromal cell-derived factor-1 α (SF-1 α) โดย Sulforaphane สามารถยับยั้งกระบวนการตอบสนองดังกล่าวผ่านการยับยั้งการทำงานของโมเลกุล NF-kB pathway และโมเลกุลในกลุ่มของ Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway ได้แก่ SAPK/JNK ,Erk1/2 และ p38 ที่มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระบวนการอักเสบ (138, 139)

การตรวจติดตามการแสดงออกของ CD11b ที่เป็นโมเลกุลที่ใช้บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จากระยะโปรโมอีโตไซต์ไปเป็นเซลล์นิวโทรฟิลล์ พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์ HL-60 เป็นเซลล์นิวโทรฟิลล์ คือ 6 วัน จากการทดสอบตรวจวัดการแสดงออกของ CD11b และรูปร่างของเซลล์ HL-60 พบว่า เซลล์ HL-60 มีเริ่มมีการแสดงออกของ CD11b มากขึ้นตั้งแต่วันที่ 3 (ประมาณ 78%) และสูงสุดในวันที่ 5 (ประมาณ 90%) โดยวันที่ 6 มีระดับลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ประมาณ 88%) (140) และถึงแม้ว่าเซลล์ HL-60 ที่ใช้ในการทดลองนี้มีการแสดงออกของ CD11b ในปริมาณที่ไม่สูงนัก เนื่องจากเซลล์ไม่ได้ถูกใช้งานมานาน ทำให้ส่งผลกระทบต่อความสามารถในการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ แต่การแปลผลการทดลองนั้นได้ทำการเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมบวกและลบจากเซลล์ชุดเดียวกัน พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์นิวโทรฟิลล์เนื่องจากการดึงดูดของ IL-8 ได้ในอัตราส่วนประมาณ 21.43% และ 57.14% เช่นเดียวกับสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 0.1 - 10 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์นิวโทรฟิลล์ได้ 15 - 60 % โดยใช้ N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) ในการกระตุ้นเซลล์ ทั้งนี้เมื่อใช้ fMLP และ leukotriene B4 (LTB4) ในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและโป๊ยกั๊กที่ความ

เข้มข้น 1 – 27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ประมาณ 20 - 40% ตามความเข้มข้นที่ใช้ (141) โดยทั้ง IL-8, fMLP และ LTB4 เป็นสารที่มีสามารถจับจำเพาะกับตัวรับประเภท G protein-coupled receptors (GPCRs) ชนิด CXCR1, FPR1 และ BLT1 ตามลำดับ ซึ่งตัวรับเหล่านี้สามารถกระตุ้นการส่งสัญญาณผ่าน p38 MAPK และ phosphatidylinositol-3 kinase pathway (PI3K) ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ (79) ทั้งนี้มีรายงานว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีชีวิตและโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์นิวโทรฟิลล์ได้ เช่น เอนไซม์ Urease จากเชื้อ *H. pylori* ที่ความเข้มข้น 10 – 100 นาโนโมลาร์ สามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่และการหลั่ง ROS ของเซลล์นิวโทรฟิลล์ได้มากขึ้นตามความเข้มข้น (86) รวมถึงเชื้อ *H. pylori* ที่มีชีวิตและ *H. pylori* neutrophil activating protein (HP-NAP) ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์นิวโทรฟิลล์ผ่านเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดได้ แต่ทั้งนี้ไม่พบการเคลื่อนที่ของเซลล์นิวโทรฟิลล์เมื่อกระตุ้นด้วยเชื้อ *H. pylori* ที่ถูกทำให้ตายด้วยวิธี formalin fixation และโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเชื้อ *H. pylori* ที่ถูกนำไปผ่านความร้อน (Heat inactivation) (34) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแต่ละส่วนของเชื้อ *H. pylori* รวมถึงแบคทีเรียชนิดอื่นมีความสามารถที่แตกต่างกันออกไปในการดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด โดยมีการศึกษาพบว่าส่วน LPS ของ *E. coli* สามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์โมโนไซต์ได้เป็นอย่างดี แต่ไม่สามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ รวมถึงการหลั่ง IL-8 ออกมาจากเซลล์นิวโทรฟิลล์ได้ (142) เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดมีการแสดงออกของตัวรับที่อยู่บนผิวเซลล์ที่ต่างกัน โดยหลังจากกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์และนิวโทรฟิลล์ด้วย LPS จากเชื้อ *E. coli* แล้วพบว่า มีระดับการแสดงออกของ TLR 2 และ TLR 4 บนเซลล์โมโนไซต์ที่สูงกว่านิวโทรฟิลล์มาก จึงเป็นสาเหตุทำให้นิวโทรฟิลล์มีการตอบสนองต่อ LPS น้อยกว่า (143) เช่นเดียวกับส่วน LPS ของ *H. pylori* สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ TLR 4 บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ แต่มีระดับการแสดงออกที่น้อยกว่าการกระตุ้นด้วยเชื้อ *H. pylori* และ LPS จากเชื้อ *E. coli* (144) จากการทดลองการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว จึงสันนิษฐานว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ อาจสามารถยับยั้งการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับตัวรับประเภท G protein-coupled receptors (GPCRs) ในเซลล์นิวโทรฟิลล์ และ TLR ในเซลล์โมโนไซต์ได้ดี

กระบวนการตายแบบอะโพโทซิสของเซลล์เป็นกระบวนการที่เกิดตามปกติ เพื่อรักษาสสมดุลของจำนวนเซลล์ แต่เชื้อ *H. pylori* นั้นมีความสามารถในการกระตุ้นกระบวนการดังกล่าวมากขึ้น จนอาจนำไปสู่พยาธิสภาพที่รุนแรง ดังในการศึกษาครั้งนี้พบว่า เมื่อตรวจสอบการแตกหักของดีเอ็นเอที่เป็นกระบวนการสำคัญที่ใช้บ่งชี้การตายแบบอะโพโทซิส เชื้อ *H. pylori* กระตุ้นให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอที่มากขึ้น 1.98 - 2.36 เท่า ตามเวลาที่ใช้บ่มที่ 6 - 24 ชั่วโมง ทั้งนี้กระบวนการตายแบบอะโพโทซิสก่อนการแตกหักของดีเอ็นเอนั้น สามารถเกิดผ่านโมเลกุลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องหลายชนิด โดยเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่ม caspase และจากการตรวจสอบระดับการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวพบว่า เชื้อ *H. pylori* สามารถกระตุ้นการทำงานของ caspase-3/7 ที่สูงขึ้นตามเวลาที่ใช้บ่มเช่นเดียวกันกับการแตกหักของดีเอ็นเอ โดยที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีระดับการทำงานของ caspase-3/7 มากกว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง เป็นจำนวน 2 และ 2.7 เท่าตามลำดับ แต่ทั้งนี้ไม่พบว่าเชื้อ *H. pylori* สามารถกระตุ้นการทำงานของ caspase-8 ได้ ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่า เชื้อ *H. pylori* กระตุ้นการตายของเซลล์ AGS แบบอะโพโทซิสโดยผ่านทางไมโทคอนเดรีย โดยมีหลักฐานว่า เชื้อ *H. pylori* กระตุ้นการตายแบบอะโพโทซิสผ่านทางไมโทคอนเดรีย โดยผ่านการทำงานของเอนไซม์ caspase-3, caspase-9, Bid และ Bax แต่ไม่ผ่านการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 (145) มีการศึกษาพบว่า ปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ *H. pylori* นั้นเป็นส่วนสำคัญในการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ caspase โดย CagA แสดงการยับยั้งการทำงานของ caspase-8 (146) ส่วน VacA นั้นสามารถกระตุ้นการตายแบบอะโพโทซิสผ่านทางไมโทคอนเดรีย โดยการทำงานผ่านเอนไซม์ caspase-3, Bax และการหลั่ง cytochrome C ออกมาจากไมโทคอนเดรีย (35, 89, 147) ซึ่งเชื้อ *H. pylori* ในงานวิจัยนี้ประกอบด้วยโปรตีน CagA และ VacA จึงช่วยสนับสนุนว่า CagA และ VacA เป็นโปรตีนที่กระตุ้นระดับการทำงานของ caspase-3/7 ได้ดีกว่า caspase-8 โดยในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการยับยั้งการตายแบบอะโพโทซิส พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำในทุกความเข้มข้นและเวลาการบ่มไม่สามารถยับยั้งการแตกหักของดีเอ็นเอได้ทั้งในเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อและเซลล์ที่ติดเชื้อ แต่จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ได้ทั้งในเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อและในเซลล์

ที่ติดเชื้อได้ 25.81% และ 47.33% ตามลำดับ ทั้งนี้สารสกัดจากพืชอื่นๆยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง caspase-8 ในเซลล์ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ได้เช่นเดียวกับสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ เช่น *Solanum lyratum* ที่เป็นสมุนไพรพื้นบ้านของจีนความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ออกฤทธิ์ยับยั้ง caspase-8 ได้โดยไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ AGS (148) ส่วนเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ทั้งในเซลล์ AGS ที่ไม่ติดเชื้อและในเซลล์ที่ติดเชื้อ 49.27% และ 15.67% ตามลำดับ โดยการศึกษาอื่นพบว่าเคอร์คิวมินกระตุ้นการทำงานของ caspase-8 ได้ที่ 24 ชั่วโมง ทั้งในเซลล์ AGS และ เซลล์ปมประสาทตาของหนู (114, 149) นอกจากนี้สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำยังออกฤทธิ์ยับยั้งระดับการทำงานของ caspase-3/7 ได้เช่นเดียวกับ caspase-8 โดยพบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ของเซลล์ที่ติดเชื้อในสภาวะ co-culture ได้สูงสุดที่ 11 เท่า โดยการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ caspase-3/7 ได้ดีที่สุดที่เวลา 12 ชั่วโมง เช่นเดียวกับเวลาในการออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-8 นอกจากนี้พบการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 หลังการติดเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะ pre-infection ที่ 12 ชั่วโมง ได้สูงสุด 10.5 เท่า ดังนั้นสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำไม่เพียงแต่สามารถยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* กับเซลล์ (23) แต่ยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 เนื่องจากการติดเชื้อ *H. pylori* ได้โดยตรง แต่ทั้งนี้ไม่พบความสามารถในการป้องกันการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ก่อนการติดเชื้อ *H. pylori* ในสภาวะ pre-treatment แต่อย่างใด ทั้งนี้สาร Flavonoid ชนิด Quercetin สามารถยับยั้งการทำงานของ caspase-3 ในเซลล์ HeLa ที่ถูกกระตุ้นด้วย vacA toxin ได้เช่นกัน โดย Quercetin ความเข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์สามารถยับยั้งการเปลี่ยนรูปของ pro-caspase-3 ไปเป็น cleaved caspase-3 ที่เป็นรูป active form (150) ส่วนในเซลล์ที่ไม่ติดเชื่อนั้นสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ได้สูงสุด 83.76% เช่นเดียวกับในเซลล์ promonocyte พบว่าสารสกัดเอทานอลจากกระชายดำที่ความเข้มข้นต่ำ 10 - 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นผลให้ยับยั้งการตายแบบอะพอโทซิสในเวลาต่อมา แต่เมื่อใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นสูงที่ 80 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดเอทานอลจากกระชายดำจะออกฤทธิ์ส่งเสริมการตายแบบอะพอโทซิส โดยกระตุ้น

ศักยภาพไฟฟ้าของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียและการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 ได้ และสารสกัดเอทานอลจากกระชายดำที่ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 4 ชั่วโมง ยังแสดงฤทธิ์กระตุ้นระดับการทำงานของ caspase-3 ในเซลล์ HL-60 ได้ (100, 151) รวมถึง 5,7,4-trimethoxyflavone ที่เป็นสารอนุพันธ์จากกระชายดำที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กระตุ้นระดับการทำงานของ caspase-3 ในเซลล์ cholangiocarcinoma ที่เวลา 18 ชั่วโมง (152) เนื่องจากในสารสกัดจากกระชายดำนั้นประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ถึง 9 ชนิด จึงสันนิษฐานว่าความเข้มข้นและสารอนุพันธ์แต่ละชนิดของกระชายดำออกฤทธิ์ต่อการตายแบบอะพอโทซิสที่แตกต่างกันออกไป ส่วนเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นั้น ออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในเซลล์ AGS ได้ 72.98% ที่เวลา 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการทดลองในเซลล์ AGS และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 ของ Cao et al. ปี 2013 โดยเคอร์คิวมินสามารถเพิ่มการแสดงออกของ caspase-3 และ caspase-7 ทั้งในรูปที่ยังไม่ถูกกระตุ้น (full caspase) และรูปที่ถูกกระตุ้นการทำงานแล้ว (cleaved caspase) (114) ถึงแม้ว่าจะไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งการแตกหักของดีเอ็นเอของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ แต่พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 และ caspase-3/7 ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งของการตายแบบอะพอโทซิส การแตกหักของดีเอ็นเอยังมีกลไกอื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ caspase เช่น apoptosis inducing factor (AIF) (153) และ endonuclease G (Endo-G) (154) ที่หลั่งออกมาจากไมโทคอนเดรีย โดยมีการศึกษาพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อ *H. pylori* สามารถกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์ AIF และทำให้เกิดการตายแบบอะพอโทซิส โดยย่อย lamins ที่ส่วนประกอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (155) ดังนั้นจึงสันนิษฐานได้ว่าเชื้อ *H. pylori* สามารถกระตุ้นการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์ AGS ผ่านทางไมโทคอนเดรียเป็นหลัก โดยไม่อาศัยการทำงานของเอนไซม์ caspase และ การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำต่อกลไกอื่นๆของการตายแบบอะพอโทซิสผ่านทางไมโทคอนเดรียจะเป็นประโยชน์ในการนำสารสกัดกระชายดำไปใช้รักษามะเร็งกระเพาะอาหารที่เกิดจากการติดเชื้อ *H. pylori* ในอนาคต

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การติดเชื้อ *H. pylori* กระตุ้นการอักเสบของเซลล์ AGS โดยมีการแสดงออกของ IL-8 และ MCP-1 ที่สูงขึ้น กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 และการตายแบบอะพอโทซิสได้ ซึ่งสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำแสดงคุณสมบัติในการลดการแสดงออกของ IL-8 และ MCP-1 รวมไปถึงยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เกี่ยวข้องที่เป็นกระบวนการสำคัญในกระบวนการอักเสบ และมีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์ ส่วนเคอร์คิวมินนั้นไม่แสดงฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและมีคุณสมบัติเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase ทั้งยังแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ AGS ที่สูงกว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำ โดยการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่า ในสภาวะ co-culture เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบการติดเชื้อ *H. pylori* ต่อเซลล์ เนื่องจากสามารถแสดงถึงการตอบสนองของเซลล์ได้ใกล้เคียงกับในร่างกายผู้ป่วย อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการตายแบบอะพอโทซิสเนื่องจากเชื้อ *H. pylori* โดยเฉพาะการตายผ่านโมเลกุล AIF และ Endo-G รวมถึงศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากกระชายดำต่อการส่งสัญญาณในกระบวนการอักเสบภายในเซลล์ AGS เช่น โมเลกุล NF- κ B และการส่งสัญญาณภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ เช่น การเปลี่ยนแปลงของโปรเจคตินในเซลล์ หรือโมเลกุลต่างๆใน Protein kinase C (PKC) pathway

รายการอ้างอิง

1. Kusters JG, Van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev. 2006;19(3):449-90.
2. Bauer B, Meyer TF. The Human Gastric Pathogen *Helicobacter pylori* and Its Association with Gastric Cancer and Ulcer Disease. Ulcers. 2011;2011:1-23.
3. Hoang TT, Bengtsson C, Phung DC, Sorberg M, Granstrom M. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in urban and rural Vietnam. Clin Diagn Lab Immunol. 2005;12(1):81-5.
4. Shi R, Li X, Xu S, Yan Z, Zhang H, Ding Y, et al. Prevalence and Risk Factors for *Helicobacter pylori* Infection in Chinese Populations. Helicobacter. 2008;13:157-65.
5. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994;61:1-241.
6. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015;65(2):87-108.
7. Ahn HJ, Lee DS. *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis. World J Gastrointest Oncol. 2015;7(12):455-65.
8. Lee KE, Khoi PN, Xia Y, Park JS, Joo YE, Kim KK, et al. *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric cancer. World J Gastroenterol. 2013;19(45):8192-202.
9. Yang JC, Yang HC, Shun CT, Wang TH, Chien CT, Kao JY. Catechins and Sialic Acid Attenuate *Helicobacter pylori* -Triggered Epithelial Caspase-1 Activity and Eradicate *Helicobacter pylori* Infection. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:248585.
10. Amin M, Anwar F, Naz F, Mehmood T, Saari N. Anti- *Helicobacter pylori* and urease inhibition activities of some traditional medicinal plants. Molecules. 2013;18(2):2135-49.
11. Pattiyathanee P, Vilaichone RK, Chaichanawongsaroj N. Effect of curcumin on *Helicobacter pylori* biofilm formation. Afr J Biotechnol. 2009;8(19):5106-15.

12. Jeong M, Lee DH, Park JM, Yoo JH, Han YM, Cho JY, et al. Dietary prevention of *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer with kimchi. *Oncotarget*. 2015;6(13).
13. Tsuboi K, Matsuo Y, Shamoto T, Shibata T, Koide S, Morimoto M, et al. Zerumbone inhibits tumor angiogenesis via NF-kappaB in gastric cancer. *Oncol Rep*. 2014;31(1):57-64.
14. Wang YC, Huang KM. In vitro anti-inflammatory effect of apigenin in the *Helicobacter pylori*-infected gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem Toxicol*. 2013;53:376-83.
15. Fang SB, Ko HY, Huang ST, Huang CH, Li LT, Chen CC, et al. *Cinnamomum osmophloeum* extracts inhibit growth of *Helicobacter pylori* and postinfectious interleukin-8 expression in human gastric epithelial cells. *RSC Adv*. 2015;5(28):22097-105.
16. Santos AM, Lopes T, Oleastro M, Gato IV, Floch P, Benejat L, et al. Curcumin inhibits gastric inflammation induced by *Helicobacter pylori* infection in a mouse model. *Nutrients*. 2015;7(1):306-20.
17. Kim SH, Woo H, Park M, Rhee KJ, Moondongsup C, Seo LD, et al. Cyanidin 3-O-Glucoside Reduces *Helicobacter pylori* VacA-Induced Cell Death of Gastric KATO III Cells through Inhibition of the SecA Pathway. *Int J Res Med Sci*. 2014;11(7):742-7.
18. Kummee S, Tewtrakul S, Subhadhirasakul S. Antimicrobial activity of the ethanol extract and compounds from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 2008;30(4):463-6.
19. Yenjai C, Prasanphen K, Daodee S, Wongpanich V, Kittakoop P. Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia*. 2004;75(1):89-92.
20. Sae-Wong C, Matsuda H, Tewtrakul S, Tansakul P, Nakamura S, Nomura Y, et al. Suppressive effects of methoxyflavonoids isolated from *Kaempferia parviflora* on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol*. 2011;136(3):488-95.
21. Qin Y, Cui W, Yang X, Tong B. Kaempferol inhibits the growth and metastasis of cholangiocarcinoma in vitro and in vivo. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2016;48(3):238-45.

22. Wudtiwai B, Sripanidkulchai B, Kongtawelert P, Banjerdpongchai R. Methoxyflavone derivatives modulate the effect of TRAIL-induced apoptosis in human leukemic cell lines. *J Hematol Oncol*. 2011;4(52).
23. Chaichanawongsaroj N, Amonyngcharoen S, Pattiyathanee P, Vilaichone RK, Poovorawan Y. Anti-*Helicobacter pylori* and anti-internalization activities of Thai folk remedies used to treat gastric ailments. *J Med Plants Res*. 2012;6(8):1389-93.
24. Martin Buckley CM. *Helicobacter* biology - discovery. *Br Med Bull*. 1998;54(1):7-16.
25. O'rourke J, Bode G. Morphology and Ultrastructure. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington, D.C.: MBio; 2001.
26. Ranjbar R, Khamesipour F, Jonaidi-Jafari N, Rahimi E. *Helicobacter pylori* in bottled mineral water: genotyping and antimicrobial resistance properties. *BMC Microbiol*. 2016;16:40.
27. Tongtawee T, Kaewpitoon S, Kaewpitoon N, Dechsukhum C, Leraanansaksiri W, Loyd RA, et al. Characteristics and Risk Factors of *Helicobacter pylori* Associated Gastritis: A Prospective Cross-Sectional Study in Northeast Thailand. *Gastroenterol Res Pract*. 2016;2016.
28. Manfredi M, Iuliano S, Gismondi P, Bizzarri B, Gaiani F, Luigi AGG. *Helicobacter pylori* Infection: We Should Always Verify the Intrafamilial Transmission. *Biology and Medicine*. 2017;09(01).
29. Kivi M, Tindberg Y, Sorberg M, Casswall TH, Befrits R, Hellstrom PM, et al. Concordance of *Helicobacter pylori* Strains within Families. *J Clin Micro*. 2003;41(12):5604-8.
30. Momtaz H, Dabiri H, Souod N, Gholami M. Study of *Helicobacter pylori* genotype status in cows, sheep, goats and human beings. *BMC Gastroenterology*. 2014;14(61).
31. Talaei R, Souod N, Momtaz H, Dabiri H. Milk of livestock as a possible transmission route of *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepato*. 2015;8:30-6.

32. Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis. *Cell Host Microbe*. 2014;15(3):306-16.
33. Rossi FW, Prevete N, Montuori N, Ragno P, Selleri C, Marone G, et al. Hp(2-20) peptide of *Helicobacter pylori* and the innate immune receptors: Specific role(s) of the formyl peptide receptors. *Le Infezioni in Medicina*. 2012;Suppl. 2:19-25.
34. Brisslert M, Enarsson K, Lundin S, Karlsson A, Kusters JG, Svennerholm AM, et al. *Helicobacter pylori* induce neutrophil transendothelial migration: role of the bacterial HP-NAP. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;249(1):95-103.
35. Kim JM, Kim JS, Kim N, Ko SH, Jeon JI, Kim YJ. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin induces apoptosis via activation of endoplasmic reticulum stress in dendritic cells. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30(1):99-108.
36. Morales-Guerrero SE, Mucito-Varela E, Aguilar-Gutiérrez GNRN, Lopez-Vidal Y, Castillo-Rojas G. The Role of CagA Protein Signaling in Gastric Carcinogenesis — CagA Signaling in Gastric Carcinogenesis. In: Mozsik G, editor. *Current Topics in Gastritis - 2012*: InTech; 2013.
37. Rahman R, Asombang AW, Ibdah JA. Characteristics of gastric cancer in Asia. *World J Gastroenterol*. 2014;20(16):4483-90.
38. Deankanob W, Chomvarin C, Hahnvajanawong C, Intapan PM, Wongwajana S, Mairiang P, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* in dyspeptic patients and volunteer blood donors. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2006;37(5):958-65.
39. Zhang M, Zhou YZ, Li XY, Tang Z, Zhu HM, Yang Y, et al. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in elderly people in the Beijing region, China. *World J Gastroenterol*. 2014;20(13):3635-9.
40. Thung I, Aramin H, Vavinskaya V, Gupta S, Park JY, Crowe SE, et al. Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(4):514-33.
41. Vilaichone RK, Gumnarai P, Ratanachu-Ek T, Mahachai V. Nationwide survey of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;77(4):346-9.

42. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: GLOBOCAN; 2012 [updated 2013. v10:]
43. Ohmiya N, Taguchi A, Mabuchi N, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, et al. MDM2 promoter polymorphism is associated with both an increased susceptibility to gastric carcinoma and poor prognosis. *J Clin Oncol*. 2006;24(27):4434-40.
44. Tongtawee T, Dechsukhum C, Talabnin K, Leeanansaksiri W, Kaewpitoon S, Kaewpitoon N, et al. Correlation between Patterns of Mdm2 SNIP 309 and Histopathological Severity of *Helicobacter pylori* Associated Gastritis in Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(17):7781-4.
45. Enokida Y, Shimizu K, Atsumi J, Kakegawa S, Takase Y, Kaira K, et al. Prognostic potential of the MDM2 309T>G polymorphism in stage I lung adenocarcinoma. *Cancer Med*. 2016;5(8):1791-801.
46. Mori N, Ueda A, Geleziunas R, Wada A, Hirayama T, Yoshimura T, et al. Induction of monocyte chemoattractant protein 1 by *Helicobacter pylori* involves NF-kappaB. *Infect Immun*. 2001;69(3):1280-6.
47. Hong JB, Zuo W, Wang AJ, Lu NH. *Helicobacter pylori* Infection Synergistic with IL-1beta Gene Polymorphisms Potentially Contributes to the Carcinogenesis of Gastric Cancer. *Int J Med Sci*. 2016;13(4):298-303.
48. Ma S-H, Jung W, Weiderpass E, Jang J, Hwang Y, Ahn C, et al. Impact of alcohol drinking on gastric cancer development according to *Helicobacter pylori* infection status. *Br J Cancer*. 2015;113(9):1381-8.
49. Raei N, Behrouz B, Zahri S, Latifi-Navid S. *Helicobacter pylori* Infection and Dietary Factors Act Synergistically to Promote Gastric Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(3):917-21.
50. Sapmaz F, Basyigit S, Kalkan IH, Kisa U, Kavak EE, Guliter S. The impact of *Helicobacter pylori* eradication on serum hepcidin-25 level and iron parameters in patients with iron deficiency anemia. *Wien Klin Wochenschr*. 2016;128(9-10):335-40.

51. Yazbek PB, Trindade AB, Chin CM, Dos Santos JL. Challenges to the Treatment and New Perspectives for the Eradication of *Helicobacter pylori*. Dig Dis Sci. 2015;60(10):2901-12.
52. Peng YC, Ho SP, Shyu CL, Chang CS, Huang LR. Clarithromycin modulates *Helicobacter pylori* -induced activation of nuclear factor-kappaB through classical and alternative pathways in gastric epithelial cells. Clin Exp Med. 2014;14(1):53-9.
53. Peng YC, Huang LR, Shyu CL, Cheng CC, Ho SP. Interaction of omeprazole and *Helicobacter pylori*-induced nuclear factor-kappaB activation and mediators in gastric epithelial cells. J Chin Med Assoc. 2014;77(11):567-72.
54. Liu Y, Zhuang J, Zhang X, Yue C, Zhu N, Yang L, et al. Autophagy associated cytotoxicity and cellular uptake mechanisms of bismuth nanoparticles in human kidney cells. Toxicol Lett. 2017;275:39-48.
55. Hu Y, Liu JP, Zhu Y, Lu NH. The Importance of Toll-like Receptors in NF-kappaB Signaling Pathway Activation by *Helicobacter pylori* Infection and the Regulators of this Response. Helicobacter. 2016.
56. Stein M, Ruggiero P, Rappuoli R, Bagnoli F. Helicobacter pylori CagA: From Pathogenic Mechanisms to Its Use as an Anti-Cancer Vaccine. Front Immunol. 2013;4:328.
57. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nat Rev Immunol. 2013;13(3):159-75.
58. Schiwon M, Weisheit C, Franken L, Gutweiler S, Dixit A, Meyer-Schwesinger C, et al. Crosstalk between sentinel and helper macrophages permits neutrophil migration into infected uroepithelium. Cell. 2014;156(3):456-68.
59. Van Den Brink GR, Ten Kate FJ, Ponsioen CY, Rive MM, Tytgat GN, Van Deventer SJH, et al. Expression and Activation of NF-kB in the Antrum of the Human Stomach. J Immunol. 2000;164(6):3353-9.
60. Mattioli I, Sebald A, Bucher C, Charles RP, Nakano H, Doi T, et al. Transient and Selective NF-kB p65 Serine 536 Phosphorylation Induced by T Cell Costimulation Is Mediated by Ikb Kinase and Controls the Kinetics of p65 Nuclear Import. J Immunol. 2004;172(10):6336-44.

61. Yang F, Tang E, Guan K, Wang CY. IKK Plays an Essential Role in the Phosphorylation of RelA/p65 on Serine 536 Induced by Lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2003;170(11):5630-5.
62. Jost PJ, Ruland J. Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood*. 2007;109(7):2700-7.
63. He W, Qu T, Yu Q, Wang Z, Lv H, Zhang J, et al. LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NF-kappaB and MAPK pathways in human dental pulp stem cells. *Int Endod J*. 2013;46(2):128-36.
64. Eftang LL, Esbensen Y, Tannæs TM, Bukholm IR, Bukholm G. Interleukin-8 is the single most up-regulated gene in whole genome profiling of *H. pylori* exposed gastric epithelial cells. *BMC Microbiology*. 2012;12(9).
65. Asfaha S, Dubeykovskiy AN, Tomita H, Yang X, Stokes S, Shibata W, et al. Mice that express human interleukin-8 have increased mobilization of immature myeloid cells, which exacerbates inflammation and accelerates colon carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2013;144(1):155-66.
66. Datta De D, Datta A, Bhattacharjya S, Roychoudhury S. NF-kappaB mediated transcriptional repression of acid modifying hormone gastrin. *PLoS One*. 2013;8(8):e73409.
67. Alomar SY, Gentili A, Zaibi MS, Kepczynska MA, Trayhurn P. IL-1beta (interleukin-1 beta) stimulates the production and release of multiple cytokines and chemokines by human preadipocytes. *Arch Physiol Biochem*. 2016;122(3):117-22.
68. Guo T, Qian JM, Zhao YQ, Li XB, Zhang JZ. Effects of IL-1 beta on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and acid secretion from isolated rabbit parietal cells. *Mol Med Rep*. 2013;7(1):299-305.
69. Shigematsu Y, Niwa T, Rehnberg E, Toyoda T, Yoshida S, Mori A, et al. Interleukin-1beta induced by *Helicobacter pylori* infection enhances mouse gastric carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2013;340(1):141-7.
70. Katanov C, Lerrer S, Liubomirski Y, Leider-Trejo L, Meshel T, Bar J, et al. Regulation of the inflammatory profile of stromal cells in human breast cancer:

prominent roles for TNF-alpha and the NF-kappaB pathway. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:87.

71. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008;214(2):149-60.
72. Al Obeed OA, Alkhayal KA, Al Sheikh A, Zubaidi AM, Vaali-Mohammed MA, Boushey R, et al. Increased expression of tumor necrosis factor-alpha is associated with advanced colorectal cancer stages. *World J Gastroenterol.* 2014;20(48):18390-6.
73. Floch P, Laur AM, Korolik V, Chrisment D, Cappellen D, Idrissi Y, et al. Characterisation of inflammatory processes in *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphomagenesis in a mouse model. *Oncotarget.* 2015;6(33).
74. Siregar GA, Halim S, Sitepu RR. Serum TNF- α , IL-8, VEGF Levels in *Helicobacter pylori* Infection and Their Association with Degree of Gastritis. *Acta Med Indones-Indones J Intern Med.* 2015;47(2):120-6.
75. Futagami S, Hiratsuka T, Tatsuguchi A, Suzuki K, Kusunoki M, Shinji Y, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) released from *Helicobacter pylori* stimulated gastric epithelial cells induces cyclooxygenase 2 expression and activation in T cells. *Gut.* 2003;52:1257-64.
76. Futagami S, Hiratsuka T, Suzuki K, Kusunoki M, Wada K, Miyake K, et al. gammadelta T cells increase with gastric mucosal interleukin (IL)-7, IL-1 beta, and *Helicobacter pylori* urease specific immunoglobulin levels via CCR2 upregulation in *Helicobacter pylori* gastritis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006;21(1 Pt 1):32-40.
77. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J Immunol.* 2006;177(10):7303-11.
78. Betten Å, Bylund J, Cristophe T, Boulay F, Romero A, Hellstrand K, et al. A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest.* 2001;108:1221-8.
79. Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev.* 2009;61(2):119-61.

80. Mai UEH, Perez-Perez GI, Allen JB, Wahl SM, Blaser MJ, Smith PD. Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa. *The Journal of Experimental Medicine*. 1992;175:517-25.
81. Craig PM, Territo MC, Karnes WE, Walsh JH. *Helicobacter pylori* secretes a chemotactic factor for migration monocyte and neutrophil. *Gut*. 1992;33:1020-3.
82. Whitney AE, Emory TS, Marty AM, O'shea PA, Newman GW, Gold BD. Increased Macrophage Infiltration of Gastric Mucosa in *Helicobacter pylori* -Infected Children. *Dig Dis Sci*. 2000;45(7):1337-42.
83. De Oliveira S, Rosowski EE, Huttenlocher A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(6):378-91.
84. Hartl D, Krauss-Etschmann S, Koller B, Hordijk PL, Kuijpers TW, Hoffmann F, et al. Infiltrated Neutrophils Acquire Novel Chemokine Receptor Expression and Chemokine Responsiveness in Chronic Inflammatory Lung Diseases. *J Immunol*. 2008;181(11):8053-67.
85. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(5):593-619.
86. Uberti AF, Olivera-Severo D, Wassermann GE, Scopel-Guerra A, Moraes JA, Barcellos-De-Souza P, et al. Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease. *Toxicon*. 2013;69:240-9.
87. Sakaki N, Kozawa H, Egawa N, Tu Y, Sanaka M. Ten-year prospective follow-up study on the relationship between *Helicobacter pylori* infection and progression of atrophic gastritis, particularly assessed by endoscopic finding. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16(Suppl. 2):198–203.
88. Fu H, Ma Y, Yang M, Zhang C, Huang H, Xia Y, et al. Persisting and Increasing Neutrophil Infiltration Associates with Gastric Carcinogenesis and E-cadherin Downregulation. *Sci Rep*. 2016;6:29762.

89. Chang H, Chen D, Ni B, Zuo Q, Wang C, Han R, et al. Cortactin Mediates Apoptosis of Gastric Epithelial Cells Induced by VacA Protein of *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci*. 2016;61(1):80-90.
90. Lin WC, Tsai HF, Liao HJ, Tang CH, Wu YY, Hsu PI, et al. *Helicobacter pylori* sensitizes TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human gastric epithelial cells through regulation of FLIP. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1109.
91. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(3):231-41.
92. Tsai HF, Hsu PN. Modulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis by *Helicobacter pylori* in immune pathogenesis of gastric mucosal damage. *J Microbiol Immunol Infect*. 2016.
93. Rassow J. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin A and apoptosis. *Rassow Cell Communication and Signaling*. 2011;9(26).
94. Han SH, Joo M, Kim KM. High proportion of granzyme B+ intraepithelial lymphocytes contributes to epithelial apoptosis in *Helicobacter pylori* -associated lymphocytic gastritis. *Helicobacter*. 2013;18(4):290-8.
95. Izzo AA, Hoon-Kim S, Radhakrishnan R, Williamson EM. A Critical Approach to Evaluating Clinical Efficacy, Adverse Events and Drug Interactions of Herbal Remedies. *Phytother Res*. 2016;30(5):691-700.
96. Sidahmed HM, Hashim NM, Abdulla MA, Ali HM, Mohan S, Abdelwahab SI, et al. Antisecretory, gastroprotective, antioxidant and anti- *Helicobacter pylori* activity of zerumbone from *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121060.
97. Cho SO, Lim JW, Kim H. Red ginseng extract inhibits the expression of MCP-1 and iNOS in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells by suppressing the activation of NADPH oxidase and Jak2/Stat3. *J Ethnopharmacol*. 2013;150(2):761-4.
98. Rujjanawate C, Kanjanapothi D, Amornlerdpison D, Pojanagaroon S. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. *J Ethnopharmacol*. 2005;102(1):120-2.
99. Horigome S, Yoshida I, Ito S, Inohana S, Fushimi K, Nagai T, et al. Inhibitory effects of *Kaempferia parviflora* extract on monocyte adhesion and cellular reactive

oxygen species production in human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Nutr.* 2015;56(3):949-64.

100. Banjerdpongchai R, Chanwikruy Y, Rattanapanone V, Sripanidkulchai B. Induction of Apoptosis in the Human Leukemic U9 3 7 Cell Line by *Kaempferia parviflora* Wall.ex.Baker Extract and Effects of Paclitaxel and Camptothecin. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2009;10:1137-40.

101. Jorgensen JH, Hindler JA, Bernard K, Citron DM, Cockerill FR, Fritsche TR, et al. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline—Second Edition: The Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.

102. Wu MS, Lin JT, Hsu PN, Lin CY, Hsieh YT, Chiu YH, et al. Preferential induction of transforming growth factor-beta production in gastric epithelial cells and monocytes by *Helicobacter pylori* soluble proteins. *J Infect Dis.* 2007;196(9):1386-93.

103. Rugge M, Meggio A, Pennelli G, Pisciole F, Giacomelli L, De Pretis G, et al. Gastritis staging in clinical practice: the OLGA staging system. *Gut.* 2007;56(5):631-6.

104. Scotiniotis IA, Rokkas T, Furth EE, Rigas B, Shiff SJ. Altered gastric epithelial cell kinetic in *Helicobacter pylori*-associated intestinal metaplasia : Implication for gastric carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2000;85:192–200.

105. Tiwari S, Ghoshal U, Ghoshal UC, Dhingra S, Pandey R, Singh M, et al. *Helicobacter pylori*-induced apoptosis in pathogenesis of gastric carcinoma. *Indian J Gastroenterol.* 2005;24:193-6.

106. Xia HH, Talley NJ. Apoptosis in Gastric Epithelium Induced by *Helicobacter pylori* Infection: Implications in Gastric Carcinogenesis. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(1).

107. Ohata H, Kitauchi S, Yoshimura N, Mugitani K, Iwane M, Nakamura H, et al. Progression of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. *Int J Cancer.* 2004;109(1):138-43.

108. Fallone CA, Chiba N, Van Zanten SV, Fischbach L, Gisbert JP, Hunt RH, et al. The Toronto Consensus for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection in Adults. *Gastroenterology.* 2016;151(1):51-69.

109. Vale FF, Oleastro M. Overview of the phytomedicine approaches against *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*. 2014;20(19):5594-609.
110. Tangjitman K, Wongsawad C, Kamwong K, Sukkho T, Trisonthi C. Ethnomedicinal plants used for digestive system disorders by the Karen of northern Thailand. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2015;11:27.
111. Chaichanawongsaroj N, Amonyngcharoen S, Saifah E, Poovorawan Y. The effects of *Kaempferia parviflora* on anti-internalization activity of *Helicobacter pylori* to HEP-2 cells. *Afr. J. Biotechnol*. 2010;9(30).
112. El-Sayed MM, El-Nahas HA, Adel-Hameed E-SS, El-Wakil EA. Investigation and antioxidant of phenolic compounds of the leaves of *Gleditsia Triacanthos L*. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2013;Vol 5(Suppl 2):172-7.
113. Gunes H, Gulen D, Mutlu R, Gumus A, Tas T, Topkaya AE. Antibacterial effects of curcumin: An in vitro minimum inhibitory concentration study. *Toxicol Ind Health*. 2016;32(2):246-50.
114. Cao A, Li Q, Yin P, Dong Y, Shi H, Wang L, et al. Curcumin induces apoptosis in human gastric carcinoma AGS cells and colon carcinoma HT-29 cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis*. 2013;18(11):1391-402.
115. Wongsrikaew N, Kim H, Vichitphan K, Cho SK, Han J. Antiproliferative activity and polymethoxyflavone composition analysis of *Kaempferia parviflora* extracts. *J Korean Soc Appl Biol*. 2012;55(6):813-7.
116. Sae-Wong C, Tansakul P, Tewtrakul S. Anti-inflammatory mechanism of *Kaempferia parviflora* in murine macrophage cells (RAW 264.7) and in experimental animals. *J Ethnopharmacol*. 2009;124(3):576-80.
117. Lim YS, Kwon SK, Park JH, Cho CG, Park SW, Kim WK. Enhanced mucosal healing with curcumin in animal oral ulcer model. *Laryngoscope*. 2016;126(2):E68-73.
118. Ellmark P, Ingvarsson J, Carlsson A, Lundin BS, Wingren C, Borrebaeck CA. Identification of protein expression signatures associated with *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma using recombinant antibody microarrays. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5(9):1638-46.

119. Lindholm C, Quiding-Jarbrink M, Lonroth H, Hamlet A, Svennerholm AM. Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect Immun*. 1998;66(12):5964-71.
120. Shimoyama T, Everett SM, Dixon MF, Axon AT, Crabtree JE. Chemokine mRNA expression in gastric mucosa is associated with *Helicobacter pylori* *cagA* positivity and severity of gastritis. *Journal of Clinical Pathology*. 1998;51(10):765-70.
121. Wu MH, Lee WJ, Hua KT, Kuo ML, Lin MT. Macrophage Infiltration Induces Gastric Cancer Invasiveness by Activating the beta-Catenin Pathway. *PLoS One*. 2015;10(7):e0134122.
122. Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12493-8.
123. Koosirirat C, Linpisarn S, Changsom D, Chawansuntati K, Wipasa J. Investigation of the anti-inflammatory effect of *Curcuma longa* in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(7):815-8.
124. Sue S, Shibata W, Maeda S. *Helicobacter pylori*-Induced Signaling Pathways Contribute to Intestinal Metaplasia and Gastric Carcinogenesis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1-9.
125. Skiba MA, Szendzielorz K, Mazur B, Krol W. The inhibitory effect of flavonoids on interleukin-8 release by human gastric adenocarcinoma (AGS) cells infected with *cag* PAI (+) *Helicobacter pylori*. *Central European Journal of Immunology*. 2016;41(3):229-35.
126. Kampik D, Schulte R, Autenrieth IB. *Yersinia enterocolitica* Invasin Protein Triggers Differential Production of Interleukin-1 , Interleukin-8 , Monocyte Chemoattractant Protein 1, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, and Tumor Necrosis Factor Alpha in Epithelial Cells: Implications for Understanding the Early Cytokine Network in *Yersinia* Infections. *Infect Immun*. 2000;68:2484-92.
127. Hollebeeck S, Raasa T, Pirontb N, Schneidera Y-J, Toussaintb O, Larondellea Y, et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) attenuates the inflammatory response in the in vitro intestinal Caco-2 cell model. *Toxicol Lett*. 2011;206:268- 75.

128. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*. 1999;18:6853-66.
129. Jundi K, Greene CM. Transcription of Interleukin-8: How Altered Regulation Can Affect Cystic Fibrosis Lung Disease. *Biomolecules*. 2015;5(3):1386-98.
130. Ueda A, Ishigatsubo Y, Okubo T, Yoshimura T. Transcriptional Regulation of The Human Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene. *J Biol Chem*. 1997;272(49):31092-9.
131. Kyung SY, Lim JW, Kim H. Alpha-Lipoic Acid Inhibits Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in *Helicobacter pylori*-Infected Gastric Epithelial Cells. *FASEB J*. 2017;31(1):Supplement lb406.
132. Bradfield PF, Johnson-Leger CA, Zimmerli C, Imhof BA. LPS differentially regulates adhesion and transendothelial migration of human monocytes under static and flow conditions. *Int Immunol*. 2008;20(2):247-57.
133. Horikawa T, Shimada T, Okabe Y, Kinoshita K, Koyama K, Miyamoto K, et al. Polymethoxyflavonoids from *Kaempferia parviflora* induce adipogenesis on 3T3-L1 preadipocytes by regulating transcription factors at an early stage of differentiation. *Biol Pharm Bull*. 2012;35(5):686-92.
134. Bradfield PF, Johnson-Leger CA, Zimmerli C, Imhof BA. LPS differentially regulates adhesion and transendothelial migration of human monocytes under static and flow conditions. *Int Immunol*. 2008;20(2):247-57.
135. Siegbahn A, Hammacher A, Westermarck B, Heldin CH. Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *J Clin Invest*. 1990;85(3):916-20.
136. Nielsen H, Andersen LP. Chemotactic activity of *Helicobacter pylori* sonicate for human polymorphonuclear leucocytes and monocytes. *Gut*. 1992;33:738-42.
137. Lock RA, Cordwell SJ, Coombs GW, Walsh BJ, Forbes GM. Proteome analysis of *Helicobacter pylori*: major proteins of type strain NCTC 11637. *Pathology*. 2001;33(3):365-74.
138. Reddy SA, Shelar SB, Dang TM, Lee BN, Yang H, Ong SM, et al. Sulforaphane and its methylcarbonyl analogs inhibit the LPS-stimulated inflammatory response in

human monocytes through modulating cytokine production, suppressing chemotactic migration and phagocytosis in a NF-kappaB and MAPK-dependent manner. *Int Immunopharmacol.* 2015;24(2):440-50.

139. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 2002;12(1):9-18.

140. Koyama S, Narita E, Suzuki Y, Taki M, Shinohara N, Miyakoshi J. Effect of a 2.45-GHz radiofrequency electromagnetic field on neutrophil chemotaxis and phagocytosis in differentiated human HL-60 cells. *J Radiat Res.* 2015;56(1):30-6.

141. Estevao-Silva CF, Kummer R, Fachini-Queiroz FC, Grespan R, Nogueira De Melo GA, Baroni S, et al. Anethole and eugenol reduce in vitro and in vivo leukocyte migration induced by fMLP, LTB₄, and carrageenan. *J Nat Med.* 2014;68(3):567-75.

142. De BM, Berghmans N, Portner N, Vanbrabant L, Cockx M, Struyf S, et al. Serum amyloid A1 alpha induces paracrine IL-8/CXCL8 via TLR2 and directly synergizes with this chemokine via CXCR2 and formyl peptide receptor 2 to recruit neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2015;98(6):1049-60.

143. Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MKB, Dower SK. Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 in Human Peripheral Blood Granulocytes: A Critical Role for Monocytes in Leukocyte Lipopolysaccharide Responses. *J Immunol.* 2002;168(9):4701-10.

144. Park JY, Kim HY, Lee JY, Kim KH, Jang MK, Lee JH, et al. Macrolide-affected Toll-like receptor 4 expression from *Helicobacter pylori*-infected monocytes does not modify interleukin-8 production. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;44(2):171-6.

145. Zhang H, Fang D-C, Lan C-H, Luo Y-H. *Helicobacter pylori* infection induced apoptosis in gastric cancer cells through the mitochondrial pathway. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22(7):1051-6.

146. Wan XK, Yuan SL, Wang YC, Tao HX, Jiang W, Guan ZY, et al. *Helicobacter pylori* inhibits the cleavage of TRAF1 via a CagA-dependent mechanism. *World J Gastroenterol.* 2016;22(48):10566-74.

147. Galmiche A, Rassow J, Doye A, Cagnol S, Chambard J-C, Stephanette Contamin, et al. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J.* 2000;19:6361-70.

148. Hsu YM, Lai CH, Su CH, Kuo WW, Kuo CL, Hsu CK, et al. Solanum lyratum Extract Inhibits *Helicobacter pylori* -mediated Apoptosis in Human Gastric Epithelial Cells. *Anticancer Res.* 2010;30:1189-94.
149. Lu HF, Lai KC, Hsu SC, Lin HJ, Yang MD, Chen YL, et al. Curcumin induces apoptosis through FAS and FADD, in caspase-3-dependent and -independent pathways in the N18 mouse-rat hybrid retina ganglion cells. *Oncol Rep.* 2009;22(01):97-104.
150. Shin J, Kim J, Bae E, Hyun Y, Kim D. In vitro inhibitory effect of flavonoids on growth, infection and vacuolation of *Helicobacter pylori*. *Planta Med.* 2005;71(3):197-201.
151. Banjerdpongchai R, Suwannachot K, Rattanapanone V, Sripanidkulchai B. Ethanolic Rhizome Extract from *Kaempferia parviflora* Wall. ex. Baker Induces Apoptosis in HL-60 Cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2008;9:595-600.
152. Leardkamolkarn V, Tiemyuyen S, Sripanidkulchai B-O. Pharmacological Activity of *Kaempferia parviflora* Extract against Human Bile Duct Cancer Cell Lines. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2009;10:695-8.
153. Matsui N, Yoshioka R, Nozawa A, Kobayashi N, Shichijo Y, Yoshikawa T, et al. Caspase-Independent Apoptosis Induced by Reperfusion Following Ischemia without Bile Duct Occlusion in Rat Liver. *Biol Pharm Bull.* 2017;40:104-7.
154. Lily Y, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when release from mitochondria. *Nature.* 2001;412(6842):95-9.
155. Hassan A, Rod HD, Mohaiza MD, Syed IZ, Stephen MH, William RG, et al. *H. pylori* -Induced Apoptosis in Human Gastric Cancer Cells Mediated via the Release of Apoptosis-Inducing Factor from Mitochondria. *Helicobacter.* 2008;13:506-17.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ที่มีเลือดแกะ 7% (500 มิลลิลิตร)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion 18.5 กรัม และ Bacteriology agar 5.5 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่น 465 ml นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่อง autoclave จากนั้นพักอาหารเลี้ยงเชื้อให้อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ทำการเติมเลือดแกะ 35 ml ผสมให้เข้ากันดี นำไปเทบนจานเลี้ยงเชื้อขนาด 10 cm ปริมาตรจานละ 25 ml

2. การเตรียม Complete RPMI 1640 Medium (50 มิลลิลิตร)

ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 จำนวน 45 มิลลิลิตร กับ Fetal Bovine Serum ที่ผ่านการ inactivate ด้วยความร้อน 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จำนวน 5 มิลลิลิตร และ 1 x Antibiotics/antimycotics 0.05 มิลลิลิตร ให้ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3. 0.01 โมลาร์ ไฮโดรคลอริก (HCl) (1000 มิลลิลิตร)

เติมน้ำกลั่น 999.17 มิลลิลิตร ลงในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จำนวน 0.83 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยในขั้นตอนทั้งหมดควรปฏิบัติใน Chemical hood เพื่อป้องกันอันตรายจากไอของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น

4. 10 % SDS ใน 0.01 โมลาร์ ไฮโดรคลอริก (HCl) (100 มิลลิลิตร)

ละลาย SDS 10 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.01 โมลาร์ที่เตรียมไว้ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี อาจอุ่นเล็กน้อยเพื่อให้ละลายดีขึ้น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. 10 X TBS, pH 7.4 (1000 มิลลิลิตร)

ละลาย Tris base 60.57 กรัม , โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 87.66 กรัม ในน้ำ 500 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างโดยการใส่กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนกระทั่งได้ pH 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

6. 0.5 โมลาร์ Tris-HCl, pH 6.8 (500 มิลลิลิตร)

ละลาย Tris base 30.28 กรัม ในน้ำ 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างโดยการใส่กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนกระทั่งได้ pH 6.8 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

7. 1.5 โมลาร์ Tris-HCl, pH 8.8 (500 มิลลิลิตร)

ละลาย Tris base 90.86 กรัม ในน้ำ 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างโดยการใส่กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนกระทั่งได้ pH 8.8 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

9. TBST (1000.5 มิลลิลิตร)

ผสม 10 X TBS จำนวน 100 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่นจำนวน 900 มิลลิลิตร แล้วเติม Tween 20 ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี

10. 10 x Running Buffer, pH 8.3 (1000 มิลลิลิตร)

ละลาย Tris base 30.3 กรัม และ Glycine 144.1 กรัม ในน้ำ 500 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างโดยการใส่กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนกระทั่งได้ pH 8.3 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

11. 1 x Running Buffer (1000.5 มิลลิลิตร)

ผสม 10 x Running Buffer จำนวน 100 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 20% SDS ลงไป 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี

12. 1 x Transfer Buffer (1000 มิลลิลิตร)

ผสม 10 x Running Buffer จำนวน 100 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Methanol ลงไป 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี

13. 1% Tween, 3% BSA Blocking Buffer (500 มิลลิลิตร)

ละลาย BSA 1.5 กรัม ลงใน 1 X PBS จำนวน 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Tween 20 ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี

14. 12% separating gel

ผสมสารละลายดังกล่าวต่อไปนี้ให้เข้ากันตามลำดับ

- น้ำกลั่น 2.65 มิลลิลิตร
- 30% Acrylamide 3.2 มิลลิลิตร
- 1.5 โมลาร์ Tris-HCl, pH 8.8 2 มิลลิลิตร
- 10% SDS 160 ไมโครลิตร
- 10% APS 80 ไมโครลิตร
- TEMED 8 ไมโครลิตร

15. 6% stacking gel

ผสมสารละลายดังกล่าวต่อไปนี้ให้เข้ากันตามลำดับ

- น้ำกลั่น 2.6 มิลลิลิตร
- 30% Acrylamide 1 มิลลิลิตร
- 0.5 โมลาร์ Tris-HCl, pH 6.8 1.25 มิลลิลิตร
- 10% SDS 50 ไมโครลิตร
- 10% APS 50 ไมโครลิตร
- TEMED 5 ไมโครลิตร

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววริยา เนमितกนาม เกิดเมื่อวันที่ 27 สิงหาคม พ.ศ.2535 ที่ตำบลนครสวรรค์ดก อำเภอมือง จังหวัดนครสวรรค์ สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขา เทคนิคการแพทย์ จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์ และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2558

