



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์  
โครงการ

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* และต้านการอักเสบ  
ของสาร 4-methoxycinnamaldehyde ที่ได้จากเหง้าเร่วหอมเพื่อใช้  
พัฒนาเป็นยารักษาโรคแผลในกระเพาะอาหาร  
(Study on anti-*Helicobacter pylori* and anti-inflammatory of 4-  
methoxycinnamaldehyde isolated from *Etingera pavieana*  
rhizome for development as anti-peptic ulcer agent)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข  
รศ. พรรณนิภา ศิริเพิ่มพูล  
อาจารย์ปรีญา ปะบุญเรือง  
นางสาววรรณภา จงโยธา  
ผศ.ดร. ณ์ฐฎกานต์ จิรัณธน์ฐ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560  
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 258316

สัญญาเลขที่ 151/2560

## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* และต้านการอักเสบ  
ของสาร 4-methoxycinnamaldehyde ที่ได้จากเหง้าเร่วหอมเพื่อใช้  
พัฒนาเป็นยารักษาโรคแผลในกระเพาะอาหาร

(Study on anti-*Helicobacter pylori* and anti-inflammatory of 4-  
methoxycinnamaldehyde isolated from *Etingera pavieana*  
rhizome for development as anti-peptic ulcer agent)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

รศ. พรรณนิภา ศิริเพิ่มพูล

อาจารย์ปรียา ปะบุญเรือง

นางสาววรรณภา จงโยธา

ผศ.ดร. ณ์ฐฎกานต์ จิรัณฐนัฐ

ธันวาคม พ.ศ. 2561

## บทคัดย่อ

สาร Trans-4-methoxycinnamaldehyde (MCD) ที่แยกจากเหง้าของเร่วหอม แสดงฤทธิ์ต้านอักเสบ อย่างไรก็ตาม ยังไม่ทราบกลไกการต้านอักเสบของสาร MCD ในการศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจสอบกลไกการอักเสบของสาร MCD ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เหนี่ยวนำด้วยไลโปพอลิแซคคาไรด์ (LPS) และพบว่าสาร MCD สามารถยับยั้งการผลิต nitric oxide, prostaglandin E<sub>2</sub> และ tumor necrosis factor- $\alpha$  ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น สาร MCD ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) ในระดับโปรตีนและ mRNA นอกจากนี้ยังยับยั้งการฟอสโฟริเลชันของโปรตีน inhibitory **KB** (I**KB**) และการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ nuclear factor-**KB** (NF-**KB**) p65 สาร MCD ยังยับยั้งการฟอสโฟริเลชันบนเอนไซม์ JNK แต่ไม่ยับยั้งเอนไซม์ ERK และ p38 mitogen-activated protein kinases (MAPKs).

นอกจากนี้ทำการประเมินฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ สาร MCD ต่อเชื้อ *Helicobacter pylori* 3 สายพันธุ์ คือ ATCC43579 (Amoxicillin-resistant strain), ATCC43504 (Metronidazole-resistant strain) และ ATCC700392 (Tetracycline-resistant strain) และพบว่าสาร MCD มีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ต่อเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ เท่ากับ 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ยิ่งกว่านั้นทำการศึกษาฤทธิ์รวมระหว่างสาร MCD กับยา amoxicillin ในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* โดยวิธี Checkerboard agar dilution เพื่อวิเคราะห์หาค่าดัชนีประสิทธิภาพรวมของการออกฤทธิ์ยับยั้ง (Fractional inhibitory concentration indices; FICI) พบว่าสาร MCD กับยา amoxicillin มี additive effect ต่อเชื้อ *H. pylori* ATCC43504 ด้วยค่า FICI เท่ากับ 1.0 ในขณะที่มี indifference effect ต่อเชื้อ *H. pylori* ATCC43579 และ ATCC700392 (FICI เท่ากับ 1.0-1.75)

ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านอักเสบของสาร MCD ที่เกิดโดยผ่านการยับยั้งการผลิต nitric oxide, prostaglandin E<sub>2</sub> และ tumor necrosis factor- $\alpha$  โดยการห้ามวิถีสัญญาณ NF-**KB** และ JNK/MAPK เราแสดงให้เห็นว่าสาร MCD มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการ

อักเสบ นอกจากนี้สาร MCD ยังอาจนำไปใช้เป็นยา anti-Helicobacter ชนิดใหม่ในลักษณะใช้สารเดี่ยวหรือใช้รวมระหว่างสาร MCD กับยา amoxicillin

**คำสำคัญ:** Trans-4-methoxycinnamaldehyde, nitric oxide, nitric oxide synthase, prostaglandin E<sub>2</sub>, cyclooxygenase-2, ฤทธิ์ต้านอักเสบ, ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย, *Helicobacter pylori*.

## Abstract

Trans-4-methoxycinnamaldehyde (MCD) was isolated from the rhizomes of *Etingera paviana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. showing an anti-inflammatory effect. However, heretofore the molecular mechanism underlying its anti-inflammatory action has not been described. In this study, we investigated this mechanism in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 macrophages and found MCD significantly inhibited nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) production in relation to concentration. MCD could decrease LPS-induced protein and mRNA expressions of both inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2). The phosphorylation of inhibitory  $\mathbf{I}\mathbf{K}\mathbf{B}$  ( $\mathbf{I}\mathbf{K}\mathbf{B}$ ) and translocation of nuclear factor- $\mathbf{I}\mathbf{K}\mathbf{B}$  (NF- $\mathbf{I}\mathbf{K}\mathbf{B}$ ) p65 subunit into the nucleus were inhibited by MCD. Moreover, MCD suppressed phosphorylation of JNK but not ERK and p38 mitogen-activated protein kinases (MAPKs).

Moreover, MCD was determined for anti-bacterial activity against three *Helicobacter pylori* strains ATCC43579 (Amoxicillin-resistant strain), ATCC43504 (Metronidazole-resistant strain) and ATCC700392 (Tetracycline-resistant strain) and displayed minimum inhibitory concentration (MIC) at 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for all tested strains. Moreover, its combination effect with standard antibiotics amoxicillin against these bacteria were determined. The combined effect of MCD with amoxicillin was evaluated using the checkerboard agar dilution method to obtain a fractional inhibitory concentration index (FICI). An additive effect was observed with MCD and amoxicillin against *H. pylori* ATCC43504 with FICI at 1.0 while the FICI value of the combination of MCD and amoxicillin suggested indifference effect was observed with MCD and amoxicillin against *H. pylori* ATCC43579 and ATCC700392 (FIC index =1.0-1.75).

These findings indicate MCD exerts anti-inflammatory activity through inhibiting production of NO, PGE<sub>2</sub> and TNF- $\alpha$  by blocking NF- $\kappa$ B and JNK/MAPK signaling pathways. We suggest MCD might be potentially developed as a novel therapeutic agent for inflammatory disorders. Moreover, MCD may be useful alone or in combination with amoxicillin for development as a new class of anti-*Helicobacter* drugs

**Keywords:** Trans-4-methoxycinnamaldehyde, nitric oxide, nitric oxide synthase, prostaglandin E<sub>2</sub>, cyclooxygenase-2, anti-inflammatory activity, anti-bacterial activity, *Helicobacter pylori*.

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี และ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณ ดร. พรพรรณ อร่ามแสงเทียนชัย นางสาวสกุลรัตน์ มั่นคง นางสาวกิตติยา กองสมัคร นางสาวภัศรา ทองจุไร และ นางสาวณัฐานิต กิจวิวัฒน์ สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	3
กิตติกรรมประกาศ	5
สารบัญเรื่อง	6
สารบัญภาพ	7
สารบัญตาราง	9
บทนำ	10
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
วิธีการทดลอง	20
ผลการทดลองและอภิปราย	29
สรุปผลการทดลอง	54
บรรณานุกรม	56
ผลผลิตของโครงการวิจัย	59
ประวัตินักวิจัย	60



## สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 4-1	การวิเคราะห์การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCD ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	29
ภาพที่ 4-2	ความเข้มข้นของไนไตรท์ (A) PGE <sub>2</sub> (B) และ TNF- $\alpha$ (C) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ MCD ที่ความเข้มข้นต่างๆ	30
ภาพที่ 4-3	ปริมาณโปรตีน iNOS (A) และ COX-2 (B) ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCD ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 และ 50 $\mu$ M ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS	33
ภาพที่ 4-4	ผลของสาร MCD ต่อการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCD ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS	34
ภาพที่ 4-5	ผลการยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS (A) และ COX-2 (B) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS	36
ภาพที่ 4-6	ปริมาณ mRNA ของ COX-1 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCD	38
ภาพที่ 4-7	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน p-I $\kappa$ B ในเซลล์ โดยวิธี Western blot ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร MCD	39
ภาพที่ 4-8	การวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของ NF- $\kappa$ B p65 เข้าสู่นิวเคลียส โดยเทคนิค immunocytochemistry	40
ภาพที่ 4-9	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน MAPKs ด้วยวิธี Western blot ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร MCD	41
ภาพที่ 4-10	ผลการทดสอบความไวของเชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC700392 ต่อ Cephalothin (A) และ Nalidixic acid (B)	44

## สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 4-11	ลักษณะการเจริญของ <i>H. pylori</i> ATCC700392 ในการทดสอบหาค่า MIC ที่ของ MCD ด้วยวิธี Agar dilution	46
ภาพที่ 4-12	ลักษณะการเจริญของ <i>P.aeruginosa</i> ATCC27853 ในการทดสอบหาค่า MIC ของยา Gentamicin	47
ภาพที่ 4-13	การเปลี่ยนแปลงของ <i>H. pylori</i> ATCC43579, <i>H. pylori</i> ATCC43504 และ <i>H. pylori</i> ATCC700392 หลังสัมผัสสาร MCD	48
ภาพที่ 4-14	เซลล์รูปท่อนโค้งของ <i>Helicobacter pylori</i> ATCC43579 ย้อมสีแบบแกรม (กำลังขยาย 100x)	49
ภาพที่ 4-15	เซลล์รูปกลมปะปนกับเศษเซลล์ของ <i>Helicobacter pylori</i> ATCC43579 หลังสัมผัส สาร MCD จากเร็วหอมความเข้มข้น 1MIC เป็นเวลา 6 ชั่วโมง	50
ภาพที่ 4-16	เซลล์รูปท่อนโค้งปะปนกับเซลล์รูปกลมของ <i>Helicobacter pylori</i> ATCC43579 หลัง สัมผัสสาร MCD จากเร็วหอมความเข้มข้น 1/8MIC เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	51
ภาพที่ 4-17	เซลล์รูปท่อนโค้ง ท่อนสั้นและรูปกลมปะปนกับเซลล์ของ <i>Helicobacter pylori</i> ATCC43579 หลังสัมผัสสาร MCD จากเร็วหอมความเข้มข้น 1/8MIC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	51

## สารบัญตาราง

	หน้า	
ตารางที่ 4-1	ขนาด Inhibition zone ของสาร MCD ในการยับยั้งเชื้อ <i>H. pylori</i>	45
ตารางที่ 4-2	ค่า MIC ของยา Amoxicillin ในการยับยั้งการเจริญของ <i>H. pylori</i> โดยวิธี Agar dilution	52
ตารางที่ 4-3	Fractional inhibitory concentrations*(FICs) และ FIC indices (FICI) ของสาร MCD กับยา Amoxicillin ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>H. pylori</i>	53

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันโรคแผลในกระเพาะอาหารหรือโรคแผลเพปติก (peptic ulcer disease) เป็นโรคที่พบได้บ่อยในกลุ่มประชากรทั่วโลก เป็นโรคที่เกิดเป็นแผลที่บริเวณกระเพาะอาหารโดยตรงหรือเกิดเป็นแผลที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นซึ่งอยู่ติดกับกระเพาะอาหาร ประมาณ 70-80 % ของผู้ป่วยจะประสบปัญหาการเป็นซ้ำ ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ (ฝ่ายชุมชนและผู้ด้อยโอกาส สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, มปป.) สาเหตุของโรคแผลในกระเพาะอาหาร อาจแบ่งได้เป็นสามกลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่เกิดจากการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ในกระเพาะอาหาร 2) กลุ่มที่เกิดจากการใช้ยาต้านการอักเสบชนิดที่ไม่ใช่ สเตียรอยด์ (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) เช่น aspirin, ibuprofen, naproxen และ 3) กลุ่มที่ไม่ได้เกิดจากทั้งการติดเชื้อ *H.pylori* และการใช้ยาต้านการอักเสบกลุ่ม NSAIDs ซึ่งในกลุ่มสุดท้ายนี้ แผลในกระเพาะอาหารอาจเกิดขึ้นเองโดยไม่ทราบสาเหตุ เกิดจากความเครียดทางอารมณ์ เกิดจากการใช้ยาอื่นบางชนิด เกิดจากการสูบบุหรี่และสุรา หรือเกิดจากภาวะที่มีการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารมากผิดปกติ (พิเศษ พิเศษพงษา, มปป.; Nanjundaiyah et al., 2011; Bakhtaoui et al., 2014).

การติดเชื้อ *H.pylori* เป็นสาเหตุโดยตรงที่ทำให้เกิดการอักเสบของกระเพาะอาหาร (gastritis) และเป็นสาเหตุสำคัญอันหนึ่งของโรคแผลในกระเพาะอาหาร การติดเชื้อนี้ยังสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหารอีกด้วย (นิศาชล เศรษฐไกรกุล และคณะ, มปป.; Lopes et al., 2014) กลไกของ *H.pylori* ในการก่อให้เกิดโรคแผลในบริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น คือ เมื่อเกิดการติดเชื้อ *H.pylori* แล้วร่างกายจะสร้างกระบวนการทางภูมิคุ้มกัน คือ เม็ดเลือดขาวจะรวมตัวกันในบริเวณที่เกิดการติดเชื้อ คือ บริเวณ gastric mucosa และ gastric epithelium (ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์ และคณะ, 2554; White et al., 2015) เพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อ จึงมีการหลั่งสารจากเม็ดเลือดขาวเหล่านี้ คือ proinflammatory mediators เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) และพรอสตาแกลนดิน E2 (PGE2) และ proinflammatory

cytokines เช่น tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) และ interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ซึ่งสารเหล่านี้ที่ถูกหลั่งมากเกินไป หรือหลั่งต่อเนื่องในระยะเวลาต่างๆ จะทำให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ (Srisook et al., 2015) และเมื่อผนวกกับกรดที่ระเพาะอาหารหลั่งออกมาก็ทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น นอกจากนี้การติดเชื้อ *H.pylori* สามารถพัฒนาไปเป็นมะเร็งกระเพาะอาหาร โดยจะมีกระบวนการคือ เมื่อมีการติดเชื้อ *H.pylori* ในกระเพาะอาหารจะทำให้มีผลต่อการหลั่งของกรดในกระเพาะอาหาร ทำให้เยื่อกระเพาะอาหารฝ่อ และมีการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุกระเพาะอาหารจนในที่สุดกลายเป็นมะเร็งกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ผลที่เกิดจากการอักเสบเรื้อรังของกระเพาะอาหารก็เป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดมะเร็งที่กระเพาะอาหาร (อรพิน ธนพันธุ์พานิชย์ และคณะ, 2552; นิศาชล เศรษฐภูไกรกุล และคณะ, มปป.; Lopes et al., 2014; White et al., 2015)

แนวทางการรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหาร ที่มีสาเหตุมาจากการใช้ยาต้านการอักเสบกลุ่ม NSAIDs ซึ่งจะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง cyclooxygenase-1 (COX-1) และ COX-2 ซึ่งนำไปสู่การเกิดอาการไม่พึงประสงค์ต่างๆ ตามมา โดยเฉพาะการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร เนื่องจากไปยับยั้งเอนไซม์ COX-1 ที่ผลิตพรอสตาแกลนดินที่ควบคุมการสร้างเยื่อเมือกที่กระเพาะอาหาร (Rao and Knaus, 2008) จึงมีความจำเป็นที่จะค้นคว้าหายาที่มีความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นในขณะที่มีการอักเสบเกิดขึ้น แต่ไม่ยับยั้งเอนไซม์ COX-1 เพื่อลดการการแผลในกระเพาะอาหาร

ส่วนแนวทางในการรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหาร ในผู้ที่ตรวจพบแผลในกระเพาะอาหารร่วมกับการตรวจพบเชื้อ *H.pylori* การรักษาการติดเชื้อจะช่วยรักษาแผล และยังช่วยป้องกันการเกิดโรคซ้ำ อีกทั้งลดโอกาสการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากแผล เช่น เลือดออกในกระเพาะอาหาร<sup>[17]</sup> นอกจากนี้การกำจัดเชื้อ *H.pylori* มีแนวโน้มที่จะสามารถลดความเสี่ยงในการเกิดเป็นมะเร็งกระเพาะอาหารได้ (White et al., 2015) สมาคมแพทยระบบทางเดินอาหารแห่งประเทศไทยแนะนำสูตรยาต่างๆ ในการรักษาและกำจัดการติดเชื้อ *H.pylori* คือ การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด (เนื่องจากเชื้อ *H.pylori* เป็นเชื้อที่ดื้ออย่างง่าย) ร่วมกับยาลดการหลั่งกรด 1 ชนิด เป็นระยะเวลา 1– 2 สัปดาห์ พบว่าได้ผลการกำจัดเชื้อมากกว่า 90 % และเป็นการรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหารที่ต้นเหตุอย่างแท้จริง สำหรับประเทศไทยมีการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะ amoxicillin,

clarithromycin, tetracycline และ metronidazole ในการรักษาเป็นอันดับต้นๆ (นิตาชล เศรษฐโกกุล และคณะ, มปป.) อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการดื้อยาของเชื้อ *H.pylori* ทั่วโลกมีอัตราที่สูงขึ้น การดื้อต่อยา amoxicillin ของเชื้อ *H.pylori* มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในประเทศไทย (ปัญจพร ประเสริฐสิน, 2548) และยังพบว่าผู้ป่วยปฏิเสธการรักษาระหว่างการรักษา เนื่องจากอาการข้างเคียงจากยาปฏิชีวนะที่ใช้ เช่น คลื่นไส้ อาเจียน อาหารไม่ย่อย หรือมีการติดเชื้อซ้ำ (Bonifácio et al., 2014) ดังนั้นการค้นคว้าหาชนิดใหม่ต่อต้านเชื้อ *H.pylori* จึงมีความจำเป็นต้องศึกษา โดยแหล่งของสารที่สำคัญ คือผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืชอาหาร และพืชสมุนไพร เนื่องจากสารที่ได้จากธรรมชาติมีข้อดีเหนือสารสังเคราะห์หลายประการ อาทิ มีผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ต่ำ และมีพิษต่ำกว่า (Bonifácio et al., 2014)

สาร 4-methoxycinnamaldehyde (MCD) หรือ 3-(4-methoxyphenyl)prop-2-enal เป็นสารที่ผู้วิจัยแยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของเหง้าเร่วหอม (*Etingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm.) เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555) จากการศึกษาเพิ่มเติมของผู้วิจัยพบว่าสาร MCD ที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{M}$  สามารถยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E2 ที่ผลิตจากเอนไซม์ COX-2 โดยไม่ลดปริมาณเอนไซม์ COX-1 (กล่าวขวัญ ศรีสุข, ข้อมูลยังไม่ตีพิมพ์เผยแพร่) แต่การศึกษานี้ทำการศึกษาสารเพียงความเข้มข้นเดียว จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมทั้งในลักษณะ dose response และกลไกที่สารออกฤทธิ์ต้านอักเสบ นอกจากนี้สาร MCD ยังแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรียแกรมลบ *Klebsiella pneumoniae* และ *Enterobacter cloacae* และแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* (National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=641294) คณะผู้วิจัยเล็งเห็นศักยภาพของสาร MCD ในการนำไปพัฒนาเป็นสารชนิดใหม่ที่ต้านเชื้อ *H.pylori* และมีฤทธิ์ต้านอักเสบร่วมด้วย ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบและกลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในระดับโมเลกุลของสาร MCD ที่แยกได้จากเหง้าเร่วหอมในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *H.pylori* รวมทั้งทดสอบประสิทธิภาพของสาร MCD เมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ amoxicillin เพื่อเป็นข้อมูลในการนำสารนี้ไปพัฒนาเป็นยาด้านเชื้อ *H.pylori* และต้านการอักเสบ หรือในการนำไปเป็นสารนำ (lead compound) ในการพัฒนา

ยาต้านเชื้อ *H.pylori* และต้านการอักเสบในอนาคต เป็นการลดการนำเข้ายาต้านอักเสบจากต่างประเทศ เป็นการประหยัดงบประมาณและอาจนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของสาร MCD ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  และ IL-1 $\beta$  ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS
2. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบในระดับโมเลกุลของสาร 4-methoxycinnam-aldehyde ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS
3. การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี Disc diffusion และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร MCD ในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* (MIC) โดยวิธี agar dilution
4. การศึกษาผลของ MCD ต่อการเปลี่ยนแปลง ลักษณะ รูปร่างเซลล์ และจำนวนเชื้อ *H. pylori*
5. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลาย MCD ร่วมกับยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *H. pylori*

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

นำสารประกอบ MCD ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากเหง้าเร่วหอม ทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อสัมผัสกับสารทดสอบ ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริก ออกไซด์, PGE<sub>2</sub> และ TNF- $\alpha$  ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งเป็นการจำลองเหตุการณ์การอักเสบในหลอดทดลอง ศึกษาผลของสารต่อปริมาณโปรตีนและ mRNA ของ iNOS, COX-2 และ TNF- $\alpha$  รวมทั้งเอนไซม์ COX-1 นอกจากนี้จะทำการศึกษาผลของสารต่อวิถีสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการลดการอักเสบ เช่น วิถี NF- $\kappa$ B และวิถี MAPKs ในเซลล์แมคโครฟาจของหนู RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

นำสารประกอบ 4-methoxycinnamaldehyde มาประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา amoxicillin และไวต่อ amoxicillin โดยวิธี Disc Diffusion หลังจากนั้นนำมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำ

ที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ของเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี Agar Dilution ทำการศึกษาผลของ MCD ต่อการเปลี่ยนแปลง ลักษณะ รูปร่างเซลล์ และจำนวนเชื้อ *H. Pylori* และทดสอบประสิทธิภาพของ MCD เมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ amoxicillin ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์คือยา amoxicillin



## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

*H. pylori* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) ที่มีรูปร่างเกลียว (spiral) มีขนาดกว้าง 0.5-1.0  $\mu\text{m}$  ยาว 2.5-5.0  $\mu\text{m}$  มีอวัยวะช่วยในการเคลื่อนที่ชนิดมีปลอกหุ้ม ประมาณ 2-6 อัน ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (polar sheathed flagella) เชื้อเจริญได้ในสภาวะออกซิเจนต่ำ (microaerophilic) โดยปกติแล้วกระเพาะอาหารจะมีสภาพที่เป็นกรดอย่างแรง ซึ่งจะทำหน้าที่ทำลายแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ แต่เนื่องจาก *H. pylori* จะมีลักษณะพิเศษที่สำคัญ คือสามารถสร้างต่างมาหักล้างกับกรดได้ ทำให้เชื้อมีชีวิตอยู่ และเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดอย่างแรงในกระเพาะอาหารได้ (Berry *et al.*, 1995; Lopes *et al.*, 2014)

*H. pylori* สามารถทำลายเนื้อเยื่อต่างๆโดยการผลิตทอกซิน ดังนี้

1. Vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) ซึ่งทำให้เกิด vacuols มากมายในเซลล์ที่ถูกเพาะเชื้อ หลักการคือ *H. pylori* urease enzyme จำนวนมหาศาล ซึ่งสามารถเปลี่ยนยูเรีย ให้เป็นแอมโมเนีย ทำงานร่วมกับ cytotoxin

2. CagA gene (Cytotoxin – associated gene) ประกอบด้วย 128 Da protein มีความสัมพันธ์กับการสร้าง Cytotoxin ออกพิษได้โดยตรง บุคคลที่ติดเชื้อที่มี CagA –negative strain จะเป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง และมีโอกาสน้อยมากที่จะเกิดแผลในกระเพาะอาหารหรือลำไส้เล็ก และมะเร็งในกระเพาะอาหาร

3. CagA gene (Cytotoxin-associated gene) ประกอบด้วย 128 k Da protein มีความสัมพันธ์กับการสร้าง cytotoxin และสามารถออกพิษได้โดยตรง

*H. pylori* จัดเป็นเชื้อที่เพาะได้ยาก สาเหตุคือว่ามันจะโตช้า และเป็นจุลชีพแบบ anaerobic วิธีเพาะเชื้อถือเป็นการตรวจมาตรฐาน และเป็นวิธีเดียวที่สามารถที่จะหาความไวของยาปฏิชีวนะต่อ *H. pylori* (Nomura *et al.*, 1991)

เชื้อ *H. pylori* เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคแผลในกระเพาะอาหาร มีการประมาณการว่าประชากรโลกประมาณ 50% ในเกือบทุกประเทศทั่วโลกติดเชื้อชนิดนี้ แต่ผู้ที่ติดเชื้อส่วนใหญ่ไม่มีอาการแสดงของโรค การติดเชื้อ *H. pylori* มีอุบัติการณ์สูงในประเทศกำลังพัฒนา ในขณะที่ประเทศที่พัฒนาแล้วมีอุบัติการณ์การติดเชื้อที่ต่ำกว่า (White et al., 2015) จากการสำรวจในประเทศไทยช่วงปี พ.ศ. 2552-2554 พบผู้ติดเชื้อ *H.pylori* อยู่ประมาณ 40.2 % โดยพบมากในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (45-55 %) (นิตาชล เศรษฐกรกุล และคณะ, มปป.; ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์ และคณะ, 2554) สาเหตุของการติดเชื้อมีความเชื่อว่าอาจติดมาจากการปนเปื้อนอยู่ในอาหาร และอุจจาระโดยส่วนมากจะพบอัตราการติดเชื้อตั้งแต่ในเด็กโดยคาดว่าเป็นการติดเชื้อจากแม่สู่ลูก (Parsonnet et al., 1991) นอกจากการติดเชื้อ *H.pylori* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคแผลและการอักเสบในกระเพาะอาหารแล้ว การติดเชื้อนี้ยังสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหารอีกด้วย (นิตาชล เศรษฐกรกุล และคณะ, มปป.; Forman et al., 1991; Lopes et al., 2014)

เนื่องจาก *H. pylori* เป็นเชื้อสาเหตุของโรคแผลในกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก รวมทั้งมะเร็งกระเพาะอาหาร การรักษาทำได้โดยการให้ยาปฏิชีวนะ เช่น clarithromycin, amoxicillin หรือ metronidazole ร่วมกับยาต้านการหลั่งกรดกลุ่ม H2-blockers (เช่น ranitidine) และ bismuth salt เป็นระยะเวลานาน 2 สัปดาห์นั้นยังคงมีปัญหาข้างเคียงจากการใช้ยา เช่น คลื่นไส้ อาเจียน และยังมีรายงานการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *H. pylori* (นิตาชล เศรษฐกรกุล และคณะ, มปป.; Mollison et al., 2000) จึงทำให้มีความพยายามในการเลือกใช้สมุนไพร หรือสารสกัดจากพืชมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการรักษาโรค และพบว่ามีสมุนไพรบางชนิดที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคกระเพาะอาหารได้ สารสกัดจากพืชในวงศ์ Zingiberaceae มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *H. pylori* และลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหารได้ เช่น สารสกัดจากขิง (*Zinger officinale*) (Nanjundaiah et al., 2011) นอกจากนี้แสงอุลตราไวโอเล็ต และพริกขี้หนู (2554) ได้ศึกษาผลของเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชันต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และจำนวนของ *H. pylori* จำนวน 5 ไอโซเลท ด้วยวิธี agar dilution พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* ทั้ง 5 ไอโซเลทได้ โดยมีค่า MIC 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าเคอร์คูมินอยด์ที่ความเข้มข้น 3.125

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้เชื้อเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากท่อนโค้งไปเป็นท่อนสั้น รูปกลม และ  
สลายไป จนกระทั่งเพาะเชื้อไม่ได้ในที่สุดตามระยะเวลาที่ได้รับเคอร์คูมินอยด์ที่เพิ่มขึ้น

ไนตริกออกไซด์ เป็นอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์จาก L-arginine เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) มีโมเลกุลของออกซิเจนเป็นสารตั้งต้นร่วม เกิด five-electron oxidation ขึ้นที่อะตอมของ ไนโตรเจนที่อยู่ในกลุ่มกวานิดิน (guanidine) ของ L-arginine ได้เป็นไนตริกออกไซด์รวมทั้งได้ L-citrulline เป็นผลผลิตร่วม โดยในปฏิกิริยานี้จะอาศัย flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), heme, calmodulin (CaM) และ tetrahydrobiopterin (BH4) เป็นโคแฟกเตอร์ร่วม เอนไซม์ NOS มีทั้งหมด 3 ไอโซฟอร์ม คือ neuronal nitric oxide synthase (nNOS) และ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ซึ่งมีการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive isoforms) ผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณต่ำ และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งจะมีการแสดงออกของยีนเมื่อถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้าต่างๆ (MacMicking, et al., 1997 และ Alderton et al., 2001) ไนตริกออกไซด์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น การสื่อสารสัญญาณประสาท (neurotransmission) ควบคุมความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vascular relaxation) ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และการจับตัวกันของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion) รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบมีมาแต่กำเนิด (innate immunity) แมคโครฟาจทำหน้าที่กำจัดจุลชีพที่บุกรุก โดยผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณมากจาก เอนไซม์ iNOS ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนเมื่อมีการสัมผัสกับ cytokine, endotoxin ของแบคทีเรีย หรือไลโปพอลิแซกคาไรด์ lipopolysaccharide (LPS) จากแบคทีเรีย (Coleman, 2001) การกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS ส่งผลให้มีการผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณมาก โดยไนตริกออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางของการอักเสบที่สำคัญที่ถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์แมคโครฟาจ ถึงแม้ว่าไนตริกออกไซด์จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดจุลชีพที่รุกรานร่างกายมนุษย์ แต่ไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นในปริมาณที่มากเกินไปจาก iNOS พบว่ามีส่วนร่วมในการเกิดอาการของโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ

โพรสตาแกลนดิน (prostaglandins, PGs) เป็นสารตัวกลางในกลุ่มลิพิดที่ควบคุมกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น ควบคุมความดันโลหิต การแข็งตัวของหลอดเลือด และตอบสนองต่อการอักเสบ ในกระบวนการสังเคราะห์โพรสตาแกลนดินจาก arachidonic acid ถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์หลักคือ cyclooxygenase

(COX) เอนไซม์นี้มี 2 ไอโซฟอร์ม คือ COX-1 ซึ่งมีการแสดงออกเป็นประจำเพื่อผลิต โพรสตาแกลนดินที่ทำหน้าที่ทางสรีรวิทยา ควบคุมระบบหลอดเลือดและป้องกันเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร (Rao and Knaus, 2008) และอีกไอโซฟอร์ม คือ COX-2 เป็นเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้ากลุ่มเดียวกับ iNOS ทำให้เกิดการหลั่งของโพรสตาแกลนดินในปริมาณมาก (Katzung, 2001; Rao and Knaus, 2008) PGE<sub>2</sub> เป็นไอโซฟอร์มหนึ่งของโพรสตาแกลนดินทำหน้าที่ร่วมกับสารในร่างกายนในการหดตัวและการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ การขยายตัวและบีบตัวของหลอดเลือด ควบคุมความดันเลือด (Serhan and Levy, 2003) และเป็นตัวกลางการอักเสบที่กระตุ้นการทำลายเนื้อเยื่อ

มีการรายงานว่ LPS จะเข้าจับที่ Toll-like receptor 4 (TLR4) และกระตุ้นการส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นการทำงานของ nuclear factor kappa B (NF-**K**B) ซึ่งเป็น transcription factor ที่ก่อให้เกิดการแสดงออกของ iNOS, COX-2 และ pro-inflammatory cytokines (Lowenstein et al., 1993; Zhang et al., 2012) ในสภาวะที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF-**K**B จะอยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) จับกับโปรตีน inhibitor of **K**B (I**K**B) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง NF-**K**B ทำให้ NF-**K**B ไม่สามารถเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสได้ (Zhang et al., 2012) ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS หรือ ไซโตไคน์ต่างๆ จะเกิดการจับกับตัวรับสัญญาณ (receptor) ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ inhibitor of **K**B kinase (I**K**B kinase) ทำให้เกิดกระบวนการฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) จากนั้น I**K**B จะถูกทำลายด้วยการกระบวนการ proteasome-mediated proteolytic ทำให้ NF-**K**B อยู่ในรูป heterodimer ของ p65 ที่รวมกับ p50 หรือ p52 (Tak and Firestein, 2001) ทำให้สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส ซึ่งจะไปจับกับตำแหน่ง NF-**K**B binding site ที่บริเวณส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน (promoter) ทำให้เกิดกระบวนการถอดรหัสของยีน การกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 จะเกิดการส่งสัญญาณผ่านวิถีสัญญาณ MAPKs อีกด้วย (Lu et al., 2012) นอกจากนี้ยังมี transcription factor ตัวอื่นที่ควบคุมการแสดงออกของยีน COX-2 และ iNOS เช่น activate protein-1 (AP-1), c-AMP response element binding protein (C/EBPs) และ CREB เป็นต้น (Yang et al., 2012)

เร่วหอม [*Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm.] เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae เป็นไม้สกุลเดียวกับกาหลาและปุด พบมากในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เช่น ระยอง จันทบุรี และตราด (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550b) มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน ใบเดี่ยว เรียงสลับ ดอกช่อแทงจากเหง้า ดอกย่อยสีแดง ทุกส่วนมีกลิ่นหอมแรง เหง้าหรือลำต้นใต้ดินใช้ขับปัสสาวะ แก้ลมและแก้ท้องอืดท้องเฟ้อ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) นอกจากนี้ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีการนำเหง้าของเร่วหอมมาใช้เป็นเครื่องเทศผสมในอาหาร เช่น ก๋วยเตี๋ยวหมูเสียง ก๋วยเตี๋ยวเนื้อเสียง แกงป่า และผัดเผ็ด จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่าส่วนสกัดจากเหง้าของเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Srisook และ Srisook, 2011) และต้านการอักเสบ โดยส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมยังยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ในเซลล์แมคโครฟาจที่เหนี่ยวนำด้วย LPS (เอกรัฐศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2551) ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมนี้มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ได้ลดการกระตุ้น nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) ซึ่งเป็น transcription factor สำคัญที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ heme oxygenase-1 (Palachot, 2015) ต่อมา มีการแยกสารประกอบจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ 4-methoxycinnamyl 4-coumarate, p-anisic acid, p-hydroxy benzaldehyde, 4-methoxycinnamyl alcohol, p-coumaric acid, 4-methoxycinnamaldehyde, สาร (E)-methyl isoeugenol, trans-anethole และ , p-anisaldehyde (เอกรัฐศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555) มีการรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร MCD ในด้านการต้านแบคทีเรีย *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. cloacae* และ *B. subtilis* (National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=641294) และไวรัส RSV (Wang et al., 2009).

## บทที่ 3

### วิธีการทดลอง

#### 3.1 การสกัดสาร 4-methoxycinnamaldehyde (MCD) จากเหง้าเร่วหอม

ทำการสกัดสาร MCD เหง้าเร่วหอมตามวิธีที่รายงานในโดยเอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555) ทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารโดยเทคนิคสเปกโทรสโกปี และเปรียบเทียบสเปกตรัม NMR ละลายสาร MCD ใน DMSO และกรองด้วยแผ่นกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.22  $\mu\text{m}$  ก่อนนำไปใช้ทดสอบ

#### 3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสาร (MCD)

##### 3.2.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ของสาร MCD

เซลล์ที่ใช้ศึกษากลไกในการยับยั้งการอักเสบของสาร MCD คือ เซลล์ไลน์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เลี้ยงใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ซึ่งมี 100 U/ml penicillin, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin, 4 mM L-glutamine, 25 mM D-glucose, 1 mM sodium pyruvate และ 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) ในตู้บัพ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 %

จากนั้นทำการทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของสาร MCD ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้วิธี MTT assay เพื่อนำช่วงความเข้มข้นที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มาทดสอบในการทดลองต่อไป วิธีการโดยย่อดังนี้ เลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับสาร MCD ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-200  $\mu\text{M}$ ) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีสารละลาย MTT แล้วนำกลับไปบัพต่อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นละลายสาร formazan ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (Srisook et al., 2015) แสดงผลในรูปร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารทดสอบ/ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ)  $\times$  100 ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง

### 3.2.2 การทดสอบสาร MCD ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์, PGE<sub>2</sub> และ TNF- $\alpha$

ไนไตรท์ (nitrite) เกิดจากการออกซิเดชันไนตริกออกไซด์ ที่ผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นดัชนีที่บ่งชี้แอกทีวิตีของเอนไซม์ iNOS ปริมาณไนไตรท์ทดสอบได้โดยปฏิกิริยา Griess โดยมีวิธีการโดยย่อ ดังนี้ ให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีสาร MCD ในช่วงที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ พร้อมทั้ง LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้บัพ 37 องศาเซลเซียส ที่ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml และนำอาหารเลี้ยงเซลล์นี้จำนวน 100  $\mu$ l ผสมกับสารละลาย Griess [0.1% *N*-(1-naphtyl)-ethylenediamine and 1% sulfanilamide in 5 % phosphoric acid] จำนวน 100  $\mu$ l จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานที่สร้างจาก sodium nitrite (Srisook et al., 2015)

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ตามสภาวะที่กล่าวไว้ด้านบนมาทดสอบการยับยั้งการผลิต PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  และ IL-1 $\beta$  ทดสอบโดยวิเคราะห์ปริมาณ TNF- $\alpha$  และ IL-1 $\beta$  ที่ถูกหลั่งจากเซลล์ออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใช้ชุด ELISA kit สำหรับวิเคราะห์ PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  และ IL-1 $\beta$  ตามลำดับ ในการทดสอบผลของสารทดสอบต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ และ PGE<sub>2</sub> นี้ จะใช้ยาแก้แอสเพอที่ไม่ใช่สารสเตียรอยด์ และมีเป้าหมายที่เอนไซม์ iNOS และ COX-2 ที่ขายในท้องตลาดเป็นตัวเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสารบริสุทธิ์ที่ได้ ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง

### 3.2.3 การทดสอบสาร MCD ต่อการแสดงออกของยีน iNOS, COX-1, COX-2 และ TNF- $\alpha$

วิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$  และ IL-1 $\beta$  ด้วยเทคนิค real time-reverse-transcription polymerase chain reaction (real time-RT-PCR) โดยให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีสาร MCD ในช่วงที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ พร้อมทั้ง LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้บัพ 37 องศาเซลเซียส ที่ เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และสกัด RNA ทั้งหมด ทำการวัดปริมาณ RNA ที่ได้ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer โดย 1 A<sub>260</sub> เท่ากับ 40  $\mu$ g/mL ของ RNA สังเคราะห์ cDNA

จาก RNA ทั้งหมดที่ได้การทำปฏิกิริยากับ 5x RT supermix ซึ่งประกอบด้วย (iScript MMLV-RT (RNaseH+), RNase inhibitor, dNTPs, oligo (dT), random primer, buffer, MgCl<sub>2</sub>) ปริมาตร 4 µl และเติมน้ำที่ปราศจาก Nuclease ปรับปริมาตรให้เป็น 20 µl สภาวะที่ใช้สังเคราะห์ cDNA คือ 25 °C นาน 5 นาที, 42 °C นาน 30 นาทีและ 82 °C นาน 5 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR โดยใช้ SYBR Green และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$  และ elongation factor (EF-2) (Buapool et al., 2013) ปฏิกิริยาสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ประกอบด้วย (2X) iTaq™ Universal SYBR® Green supermix [antibody-mediated hot-start iTaq DNA polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, SYBR® Green I dye, enhancers, stabilizers และ blend of passive reference dyes] จำนวน 10 µl, 10 µM Forward primer จำนวน 0.5 µl, 10 µM Reverse primer จำนวน 0.5 µl, cDNA ที่สังเคราะห์ จำนวน 2 µl และปรับปริมาตรให้เป็น 20 µl ด้วยน้ำปราศจาก DNase และ RNase ในสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Real-time PCR ของยีน iNOS, COX-1, COX-2, TNF- $\alpha$  และ EF-2 และวิเคราะห์หา cycle of threshold (Ct) ของแต่ละปฏิกิริยาจากนั้นนำค่า Ct ที่ได้มาคำนวณหาโดยเปรียบเทียบเชิงสัมพันธ์กับตัวอย่างควบคุม ตามสมการด้านล่าง

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{ตัวอย่างทดสอบ}) - \Delta Ct (\text{ตัวอย่างควบคุม})$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ of target gene} - Ct \text{ of housekeeping gene}$$

ในการศึกษาที่ใช้ EF-2 เป็น housekeeping gene ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง

การทดสอบปริมาณโปรตีน iNOS, COX-1 และ COX-2 โดยวิธี Western blot analysis โดยให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีสาร MCD ในช่วงที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ พร้อมทั้ง LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส ที่เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub>] ที่เย็น 2 ครั้งก่อนเติม RIPA protein lysis buffer [150 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 0.1%(v/v) SDS, 1% (v/v) sodium



deoxycholate, 1%(v/v) Nonidet P-40] ปริมาตร 50  $\mu$ L ที่เติมสารละลาย 1X protease inhibitors จากนั้นใช้ cell scraper ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนเก็บใส่หลอดพลาสติกหลอดใหม่ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA assay และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ต่อไป

ทำการแยกโปรตีนรวมที่สกัดได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ความเข้มข้นเจล 10% separating gel และ 4% stacking gel นำสารละลายโปรตีนรวมที่สกัดได้ 30  $\mu$ g ผสมกับ (1X) protein loading dye [0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 0.01% (w/v) bromophenol blue, 10% (v/v) glycerol และ 200 mM  $\beta$ -mercaptoethanol] และน้ำกลั่น จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้โปรตีนเสียสภาพ ก่อนหยอดลงช่องของเจลที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (1X) running buffer [0.025 M Tris, 0.192 M glycine และ 0.1% (w/v) SDS] ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 80 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ก่อนจะย้ายแผ่นเจลที่ได้ไปบนเมมเบรน Polyvinylidenedifluoride (PVDF) ที่ผ่านการแช่ใน absolute methanol เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ transfer buffer [192 mM glycine, 25 mM Tris, 10% (v/v) methanol] เป็นเวลา 5 นาทีแล้ว นำเมมเบรน PVDF ที่ประกบกับเจลไปใส่ในแทงค์ที่มีบัฟเฟอร์ transfer buffer ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 25 V เป็นเวลานานข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 °C นำแผ่นเมมเบรนที่ผ่านการส่งผ่านโปรตีนแล้วมาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T [10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl และ 0.1% (v/v) Tween 20] ที่มี 5% (w/v) non-fat dried milk ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำเมมเบรนแช่ในสารละลายแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน iNOS, COX-2 และ  $\beta$ -actin ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T จำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 5 นาที ก่อนนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ในสารละลาย anti-mouse IgG (H+L) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T จำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 5 นาที นำแผ่นเมมเบรนบ่มในสารละลายซับสเตรทสำหรับ enhanced chemiluminescence (ELC) เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปประกบฟิล์มเอ็กซ์เรย์ในห้องมืด วิเคราะห์ผลแถบสัญญาณโปรตีนที่ได้โดยโปรแกรม BIO-1D เวอร์ชัน 12.10a

แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) ของโปรตีน iNOS และ COX-2 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

### 3.3 การทดสอบสาร MCD ต่อการกระตุ้นวิถี MAPKs

วิถี MAPKs เป็นวิถีที่ควบคุมการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ประกอบด้วยเอนไซม์หลัก คือ p38 MAPK, JNK, ERK เอนไซม์เหล่านี้เมื่อถูกกระตุ้นจะถูก phosphorylation ทำให้อยู่ในรูปที่ active โดยจะไปทำหน้าที่เร่งการ phosphorylation ให้กับ transcription factor เป้าหมาย เช่น NF- $\kappa$ B และ AP-1 การทดสอบให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีสาร MCD ในช่วงที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ เป็นเวลา 30 นาทีก่อนใส่ LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้บ 37 องศาเซลเซียส ต่อเป็นระยะเวลา 30 นาที ก่อนดูอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_2$ ] ที่เย็น 2 ครั้งก่อนเติม RIPA protein lysis buffer ที่มี protease inhibitor และ phosphatase inhibitor ตามวิธีที่อธิบายไว้ใน Buapool et al. (2013) จากนั้นใช้ cell scraper ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนเก็บใส่หลอดพลาสติกหลอดใหม่ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA assay และวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ต่อไปโดยวิเคราะห์โปรตีนต่างๆ ดังนี้ phospho-p38, total p38, phospho-JNK, total JNK, phospho-ERK และ total ERK ในการศึกษาจะใช้ inhibitor ของวิถี p38 MAPK, JNK, ERK เป็น positive control ร่วมด้วยการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

### 3.4 การทดสอบสาร MCD ต่อการกระตุ้น NF- $\kappa$ B

เริ่มด้วยการทดสอบผลของสาร MCD ต่อการเคลื่อนที่ของ NF- $\kappa$ B เข้าสู่นิวเคลียส NF- $\kappa$ B เป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ดังนั้นจึงทดสอบโดย โดยให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีสาร MCD ในช่วงที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ เป็นเวลา 30 นาทีก่อนใส่ LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้บ 37 องศาเซลเซียส ต่อเป็นระยะเวลา 30 นาที และวิเคราะห์ปริมาณ phospho-I $\kappa$ B ใน

โปรตีนจาก whole extract โดยวิธี Western blot analysis และวิเคราะห์ปริมาณ NF- $\kappa$ B/p65 ใน nucleus โดยเทคนิค Immunocytochemistry ภายใต confocal microscope การพบปริมาณ NF- $\kappa$ B/p65 ในโปรตีนจากนิวเคลียสมากแสดงถึงการที่เซลล์ถูกกระตุ้น ทำให้มีการกระตุ้น NF- $\kappa$ B และเคลื่อนที่เข้านิวเคลียสเพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

### 3.5 การทดสอบสาร MCD ต่อ activity ของเอนไซม์ iNOS และ COX-2

เพื่อศึกษาว่าสาร MCD สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 จะทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์สังเคราะห์เอนไซม์ iNOS และ COX-2 ด้วยการสัมผัสกับ LPS นาน 24 ชั่วโมง ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและล้างเซลล์ด้วย PBS ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร MCD ในช่วงที่มีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์โดยไม่เติม LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้บ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml และนำอาหารเลี้ยงเซลล์นี้มาวิเคราะห์ปริมาณไนโตรต์ ด้วยปฏิกิริยา Griess และ PGE<sub>2</sub> ด้วย ELISA kit ตามวิธีในข้อ 3.2.2

### 3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านการแบคทีเรีย *H.pylori* ของสาร MCD

#### 3.6.1 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี Disc diffusion

นำเชื้อ *H. pylori* สามสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง คือ *H. pylori* ATCC43579 (Amoxicillin-resistant strain), *H. pylori* ATCC43504 (Metronidazole-resistant strain) และ *H. pylori* ATCC700392 (Tetracycline-resistant strain) นำเชื้อ *H. pylori* ที่ใช้ในการทดลองมาพิสูจน์ชนิดตามคุณสมบัติชีวเคมี และการติดสีแกรมของ *H. Pylori* ทุกสายพันธุ์ โดยเซลล์จะมีรูปร่างเป็นแท่งสั้นขนาดเล็กเกือบกลม ติดแกรมลบ บางเซลล์โค้งงอ เจริญได้ในเฉพาะสภาวะ microaerobic ให้ผลบวกต่อการทดสอบ catalase oxidase และ urease test ไวต่อยา cephalothin ขนาด 30 ไมโครกรัม/disc คือต่อยา nalidixic 30 ไมโครกรัม/disc โดยมี *Staphylococcus aureus* ATCC29213 เป็นเชื้อควบคุมการทดสอบการไวต่อยา

เตรียมสารละลาย MCD ในตัวทำละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) และทำการเจือจางด้วยวิธี two fold serial dilution จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

เลี้ยงเชื้อ *H. Pylori* ในอาหาร Mueller-Hinton agar + 10% fetal bovine serum บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ microaerobic นาน 2-5 วัน นำโคโลนีที่ได้แขวนลอยในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ จากนั้นปรับความขุ่นให้มีค่าเทียบเท่าสารละลายมาตรฐาน McFarland standard แล้วป้ายเซลล์แขวนลอยของเชื้อบนผิวหน้าอาหารแข็ง Mueller-Hinton agar +10% Fetal bovine serum และวาง paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่จุ่มสารละลาย MCD hyde ความเข้มข้นที่ต้องการ โดยใช้ DMSO เป็นชุดควบคุมผลลบ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อที่วาง disc บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ microaerobic (โดยใช้ microaerophilice gas pack) เป็นเวลา 3- 5 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อที่เกิดขึ้น

### 3.6.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร MCD ในการยับยั้งการเจริญของ *H. Pylori* (Minimum inhibitory concentration; MIC) โดยวิธี agar dilution (Piccolomini *et al.*, 1997)

ทำการทดสอบโดยเจือจางสารละลาย MCD แบบ serial two fold dilution ตามความเข้มข้นที่ต้องการ ในอาหาร Mueller-Hinton agar + 10% Fetal bovine serum เตรียมจาน positive control คือ Mueller-Hinton agar ไม่เติมสารละลาย MCD และจาน diluent control (Mueller-Hinton agar + สารละลาย DMSO) จากนั้น spot เซลล์แขวนลอยเชื้อ *H. pylori* ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ  $1-5 \times 10^5$  CFU/spot (ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ) นำจานไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ microaerobic (โดยใช้ microaerophilice gas pack) เป็นเวลา 3 วันอ่านผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลาย MCD ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ และทดสอบเชื้อควบคุมระบบการทดสอบหาค่า MIC โดยการ spot เชื้อ *S. aureus* ATCC29213 ปริมาณเชื้อประมาณ  $10^4$  CFU/spot ลงบนอาหาร Mueller-Hinton agar ที่ผสมยา gentamicin ความเข้มข้นสุดท้าย 1.0, 0.5, 0.25 และ 0.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศปกติเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ อ่านผลความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

### 3.6.3 การศึกษาผลของ MCD ต่อการเปลี่ยนแปลง ลักษณะ รูปร่างเซลล์ และจำนวนเชื้อ *H. pylori*

การเตรียมเชื้อทดสอบ

1. เพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *H. pylori* ATCC 43579, *H. pylori* ATCC 43504 และ *H. pylori* ATCC 700392 บนอาหาร Helicobacter selective agar ที่เตรียมขึ้นใหม่ ๆ บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมงในสภาวะ microaerobic

2. เตรียม suspension ของ *H. pylori* โดยใช้อาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) ที่ ประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS) 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ MacFarland standard เบอร์ 3 ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียประมาณ  $1 \times 10^9$  cells/mL

การเตรียมสารสกัด

เตรียมสาร MCD ที่ได้จากเหง้าเร่วหอมให้มีความเข้มข้น 80 µg/mL (1 MIC) 40 µg/mL (1/2 MIC), 10 µg/mL (1/8 MIC) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย

การทดสอบ

ดำเนินการทดสอบในงานเลี้ยงเชื้อชนิด 6 หลุม (six well plate) โดยใช้เชื้อเริ่มต้น ประมาณ  $1 \times 10^9$  cells/ mL เพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดจากเร่วหอมที่มีความเข้มข้น 1 MIC, 1/2 MIC และ 1/8 MIC บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมงภายใต้สภาวะ microaerobic เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 6, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียโดยวิธี drop plate technique บนอาหาร Helicobacter selective agar นับจำนวนแบคทีเรียที่ระดับความเจือจางที่ให้โคโลนีระหว่าง 3-30 โคโลนี และนำไปย้อมสีแกรม (Gram' s stain) สังเกตและบันทึกรูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย

### 3.6.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลาย MCD ร่วมกับยาปฏิชีวนะ amoxicillin ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลาย MCD จากนั้นเจาะรูบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วย corkborer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร นำน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และ DMSO หยดลงในหลุมที่เจาะไว้เป็นชุดควบคุม จากนั้นนำสารละลายยาปฏิชีวนะที่ระดับความ

เข้มข้นต่างๆหยอดลงในหลุมที่เจาะไว้หลุมละ 20 ไมโครลิตร หลังจากนั้นให้นำสารละลาย MCD ระดับความเข้มข้นต่างๆปริมาตร 20 ไมโครลิตรหยอดลงซ้ำในหลุมที่ใส่ยาปฏิชีวนะตามลำดับ ทำเช่นเดียวกันในงานที่มีหลุมที่หยอดยาปฏิชีวนะ จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะ microaerobic เป็นเวลา 3 วัน ทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง (inhibition zone) โดยวัดระยะโซนใสที่เส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 0.6 เซนติเมตร และทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกผลการทดลองหาค่า MIC

### 3.7 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

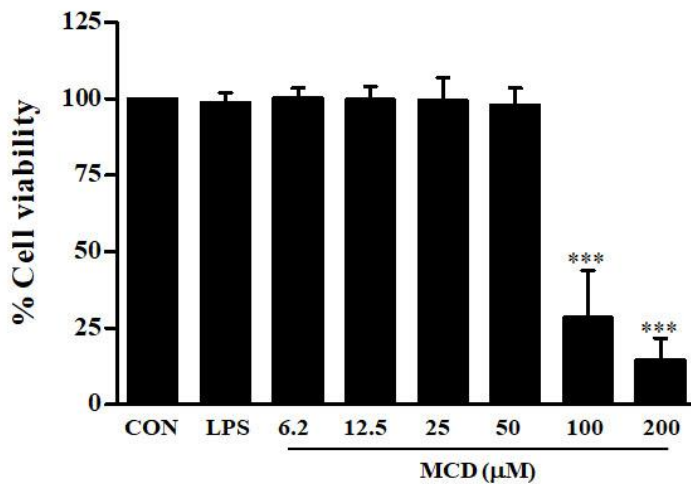
ผลการทดลองที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้ โดยเปรียบเทียบแบบ two-tailed student's t-test และ one-way ANOVA โดยกำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

#### 4.1 ผลของสารประกอบ MCD ต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7

ความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร MCD ที่ความเข้มข้น 6.2-50  $\mu\text{M}$  พบว่าเซลล์มีชีวิตรอดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ในขณะที่ความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับสารที่ 100 และ 200  $\mu\text{M}$  ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 4-1 ดังนั้นความเข้มข้นของสารทดสอบ MCD ที่ใช้ในการทดลองต่อไปทำที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 50  $\mu\text{M}$



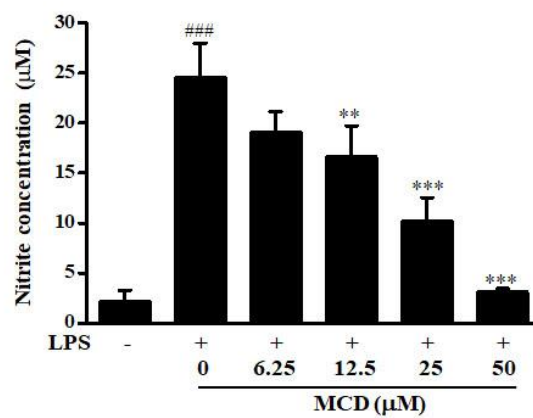
ภาพที่ 4-1 การวิเคราะห์การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCD ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งทีอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ \*\*\*  $p < 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม

#### 4.2 ผลของสาร MCD ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์, $\text{PGE}_2$ และ $\text{TNF-}\alpha$

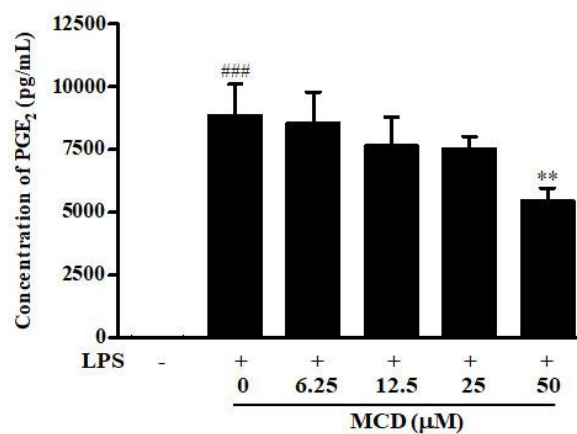
เมื่อเซลล์สัมผัสกับ LPS มีปริมาณไนตริกออกไซด์  $\text{PGE}_2$  และ  $\text{TNF-}\alpha$  เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม ในขณะที่เซลล์สัมผัสกับ LPS ร่วมกับสารประกอบ MCD ที่ความเข้มข้น 6.25-50  $\mu\text{M}$  พบว่า

เซลล์มีการผลิตไนตริกออกไซด์ PGE<sub>2</sub> และ TNF- $\alpha$  ลดลง เมื่อเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4-2A ถึงภาพที่ 4-2C) โดยสาร MCD สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ PGE<sub>2</sub> และ TNF- $\alpha$  ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากในการทดสอบเลือกใช้ความเข้มข้นของสาร MCD ในช่วงที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การลดลงของปริมาณไนตริกออกไซด์ PGE<sub>2</sub> และ TNF- $\alpha$  เป็นผลมาจากสาร MCD ไม่ได้เป็นผลจากความไม่เป็นพิษต่อเซลล์

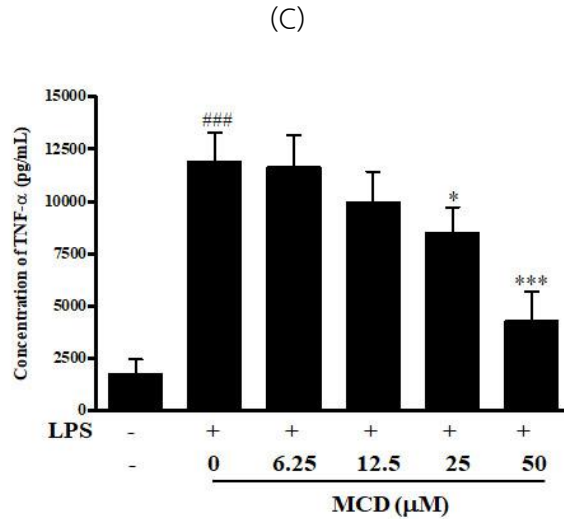
(A)



(B)







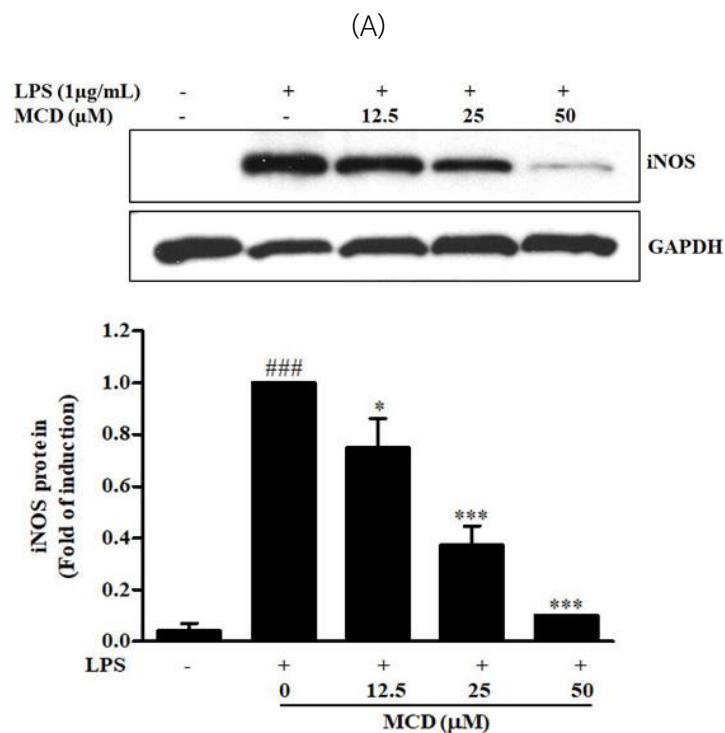
ภาพที่ 4-2 ความเข้มข้นของไนโตรท์ (A) PGE<sub>2</sub> (B) และ TNF- $\alpha$  (C) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ MCD ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มี LPS นาน 24 ชั่วโมง กราฟแต่ละแท่งแสดงค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ ###p<0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารใด \*p<0.05, \*\*p<0.01 และ \*\*\*p<0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว

#### 4.3 ผลของสาร MCD ต่อการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2

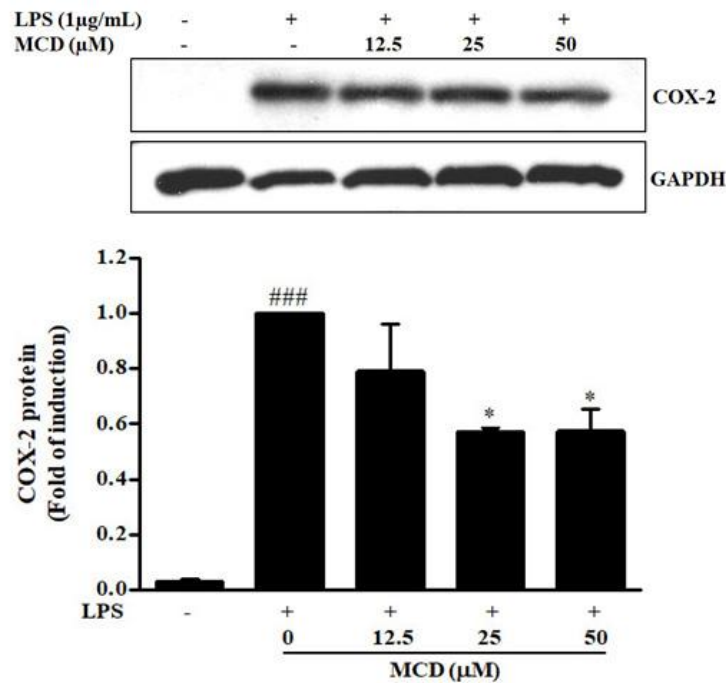
เมื่อทำการศึกษาลแล้วพบว่าสารประกอบ MCD สามารถลดปริมาณไนตริกออกไซด์ และ PGE<sub>2</sub> ได้ จึงทำการศึกษากลไกในการยับยั้งการผลิตสารดังกล่าว โดยศึกษาผลของสารประกอบ MCD ต่อการแสดงออกของ iNOS และ COX-2 ในระดับโปรตีน และ mRNA เนื่องจากการผลิตไนตริกออกไซด์ และ PGE<sub>2</sub> นั้นจะเกิดเมื่อเซลล์ถูก LPS กระตุ้นทำให้เกิดกระบวนการสร้าง mRNA ของ iNOS และ COX-2 จากนั้นจะเกิดการถอดรหัส mRNA ไปเป็นโปรตีน ทำให้ได้เอนไซม์ iNOS และ COX-2 ซึ่งเอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ และ PGE<sub>2</sub> จากการศึกษาพบว่าเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS (1  $\mu$ g/mL) เพียงอย่างเดียวจะมีปริมาณของโปรตีน iNOS และ COX-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบใด ซึ่งไม่สามารถตรวจพบโปรตีน iNOS และ COX-2 เมื่อทำการบ่มเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS ร่วมกับสารประกอบ MCD ที่ความเข้มข้น 12.5-50  $\mu$ M พบว่าสาร MCD

สามารถลดปริมาณของโปรตีน iNOS และ COX-2 ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงผลในภาพที่ 4-3

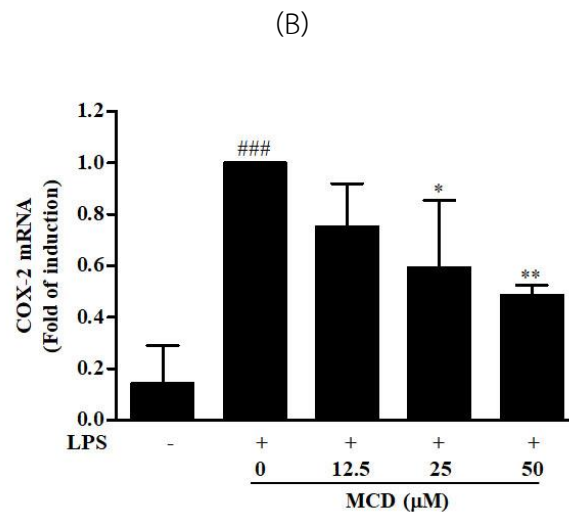
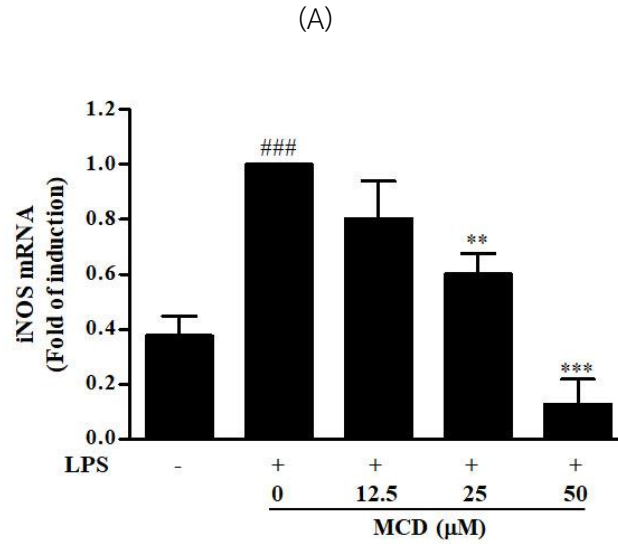
นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาระดับ mRNA ของ iNOS และ COX-2 พบว่าเซลล์แมโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS มีการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 เพิ่มขึ้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารใด และเมื่อเซลล์สัมผัส LPS ร่วมกับสารทดสอบ MCD ที่ความเข้มข้น 6.25-50  $\mu\text{M}$  พบว่าสาร MCD ลดปริมาณ mRNA ของยีน iNOS และ COX-2 ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น โดยที่สาร MCD ที่ความเข้มข้น 25 และ 50  $\mu\text{M}$  ปริมาณ mRNA ของยีน iNOS และ COX-2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในภาพที่ 4-4



(B)



ภาพที่ 4-3 ปริมาณโปรตีน iNOS (A) และ COX-2 (B) ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูก บ่มด้วยสาร MCD ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 และ 50  $\mu\text{M}$  ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน iNOS และ COX-2 ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบใด ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน, ### $p < 0.01$  เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ \* $p < 0.05$  และ \*\*\* $p < 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 4-4 ผลของสาร MCD ต่อการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCD ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ผลที่แสดงเป็นค่า fold of induction ของ relative expression ของการแสดงออกของยีน iNOS (A) และ COX-2 (B) เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารใด วิเคราะห์ผลโดยเทคนิค real time-RT-PCR ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ###  $p < 0.01$  เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  และ \*\*\* $p < 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว

#### 4.4 การทดสอบสาร MCD ต่อ activity ของเอนไซม์ iNOS และ COX-2

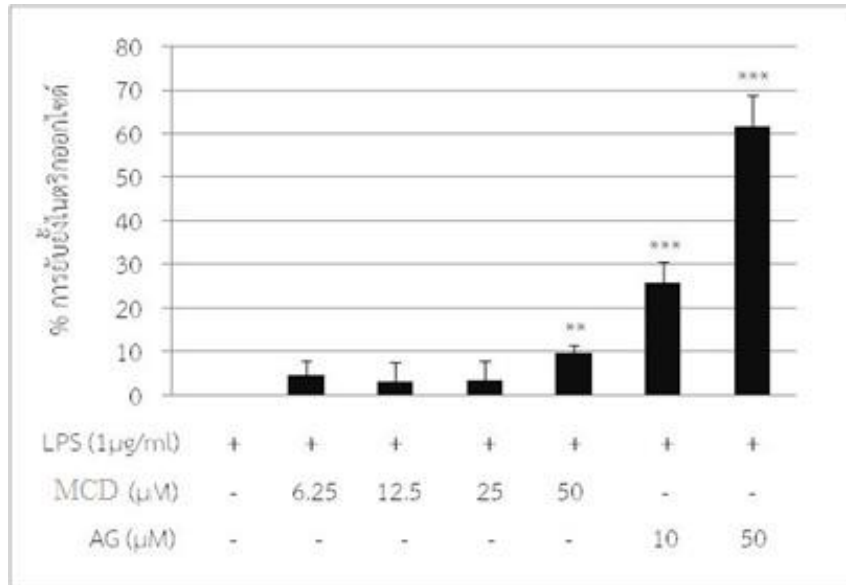
ต่อมาจึงทำการศึกษาผลของสารประกอบ MCD ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS เมื่อบ่มเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS มาแล้ว ด้วยสารประกอบ MCD ที่ความเข้มข้น 6.25-50  $\mu\text{M}$  พบว่าสารไม่สามารถลดปริมาณไนโตรท์ของเซลล์ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่าสาร MCD ไม่สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS ยกเว้นสาร MCD ที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{M}$  ที่สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{M}$  และ 50  $\mu\text{M}$  สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังภาพที่ 4-5A ในขณะที่สารประกอบ MCD ที่ความเข้มข้น 25-50  $\mu\text{M}$  พบว่าสารสามารถลดการผลิตและ  $\text{PGE}_2$  ของเซลล์ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ส่วน indomethacin ที่ความเข้มข้น 1.25  $\mu\text{M}$  สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ COX-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4-5B)

สาร aminoguanidine สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีประสิทธิภาพสูงกว่าสาร MCD ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าสารประกอบ MCD สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้สองทาง คือผ่านทางกลไกการลดการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน iNOS ส่งผลให้การผลิตไนตริกออกไซด์ลดลง และอีกทางคือผ่านทางกลไกการยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS ซึ่งแตกต่างจาก aminoguanidine ที่สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้โดยการยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS เพียงทางเดียว aminoguanidine มีลักษณะโครงสร้างที่คล้ายกับ L-arginine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ iNOS สาร aminoguanidine ยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS แบบแข่งขัน โดยแย่ง L-arginine จับกับเอนไซม์ iNOS ที่บริเวณ arginine-binding site (Alderton, Cooper and Knowles, 2001)

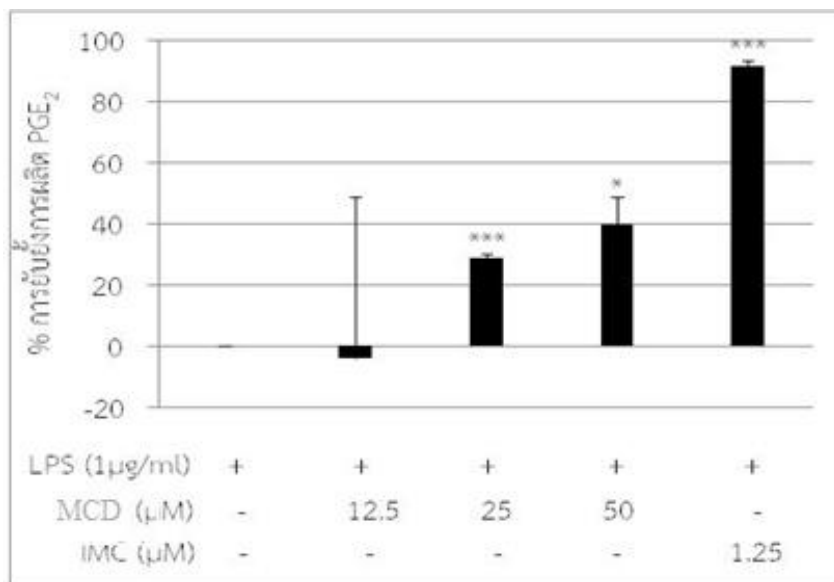
เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ COX-2 พบว่า indomethacin ซึ่งเป็นสารควบคุมแบบบวก สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ COX-2 ได้ดีกว่าสารประกอบ MCD โดยสารประกอบ MCD ที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{M}$  มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ COX-2 เท่ากับ  $39.75 \pm 9.09$  แต่ indomethacin ที่ความเข้มข้นเพียง 1.25  $\mu\text{M}$  สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ COX-2 ได้ถึง  $91.51 \pm 2.01$  เปอร์เซ็นต์ กลไกในการยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ COX-2 ของ indomethacin เป็น

ลักษณะแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible inhibitors) (Ouellet and Percival, 1995) โดยเข้าจับที่บริเวณ active site ของเอนไซม์ COX-2 อย่างแน่น จึงทำให้ arachidonic acid ไม่สามารถจับกับ active site ของเอนไซม์ COX-2 ซึ่งก็ทำให้เอนไซม์ COX-2 ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการสลาย arachidonic acid ไปเป็นพรอสตาแกลนดิน E2 ได้ (Kurumbail et al., 1996)

(A)



(B)

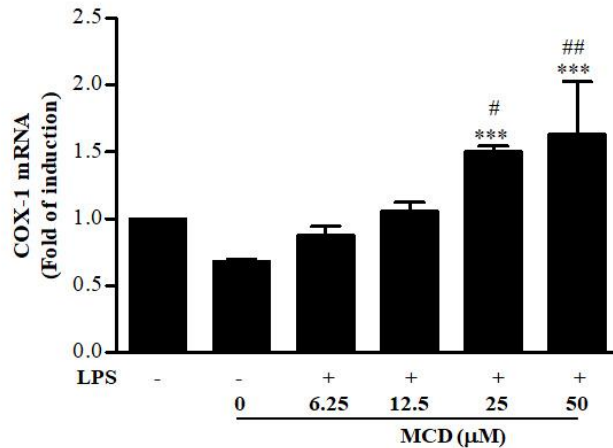


ภาพที่ 4-5 ผลการยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS (A) และ COX-2 (B) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยสาร MCD ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ก่อนนำอาหารเลี้ยงเซลล์วิเคราะห์การผลิตไนตริกออกไซด์และพรอสตาแกลนดิน E2 ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  และ \*\*\*  $p < 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว โดยให้ AG = เซลล์ที่สัมผัสกับ aminoguanidine และ IMC = เซลล์ที่สัมผัสกับ indomethacin

ผลการศึกษาสาร MCD นี้ได้ผลการศึกษาที่เป็นไปในทิศทางเดียวกับผลของสารประกอบ 4-methoxycinnamyl p-coumarate (MCC) ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากเหง้าเร่วหอมเช่นกัน ที่พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และ และ PGE<sub>2</sub> โดยสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน และ mRNA ของ iNOS และ COX-2 ตามลำดับ (Mankhong et al., 2017; 2019)

#### 4.5 ผลของสาร MCD ต่อการแสดงออกของยีน COX-1

ทำการทดสอบผลของสาร MCD ต่อการแสดงออกของยีน COX-1 ภาพที่ 4-6 แสดงให้เห็นว่า เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบใด แต่เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับสาร MCD ที่ความเข้มข้น 25 และ 50  $\mu\text{M}$  และ LPS พบว่าปริมาณ mRNA ของยีน COX-1 สูงกว่าเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามผลการที่ได้จากการศึกษานี้พบว่าสาร MCD ไม่ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ COX-1 ในขณะที่สาร IMC สามารถลดการแสดงออกของเอนไซม์ COX-1 (Kundu และ Fulton, 2002) ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนายาต้านอักเสบชนิดใหม่ที่มีความจำเพาะมากขึ้น



ภาพที่ 4-6 ปริมาณ mRNA ของ COX-1 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCD ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 และ 50 µM ในสถานะที่มี LPS เป็นเวลา 9 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลโดยเทคนิค real-time RT-PCR ปริมาณของ mRNA ของ COX-1 แสดงผล relative expression of COX-1 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสสารทดสอบ #p < 0.05 และ ##p < 0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ, \*\*\*p < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว

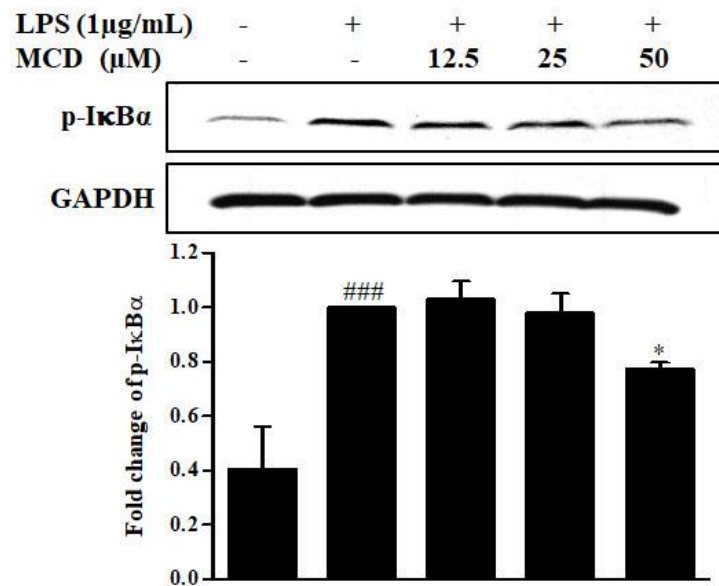
#### 4.6 ผลของสารประกอบ MCD ต่อการกระตุ้น NF-κB

การแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ถูกควบคุมด้วยวิถีสัญญาณหลัก คือ NF-κB และ MAPKs (Issa *et al.*, 2006 และ Kaminska, 2005) NF-κB เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์หลักที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น NF-κB จะอยู่ในรูปที่ไม่ทำงานและอยู่ในบริเวณไซโตพลาสซึมโดยจับอยู่กับโปรตีน IκB เมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้น จะเกิดการฟอสโฟรีเลชันบน IκB จากนั้น IκB จะถูกนำไปทำลายโดย proteasome ทำให้ NF-κB นั้นเป็นอิสระและเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสเข้าไปจับกับโปรโมเตอร์ของยีนเป้าหมาย (Surh *et al.*, 2001) ผลการศึกษาปริมาณโปรตีน p-IκB ในเซลล์โดยเทคนิค Western blot พบว่าปริมาณโปรตีน p-IκB ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่สัมผัสกับสารทดสอบใด และเมื่อเซลล์สัมผัส LPS ร่วมกับสาร

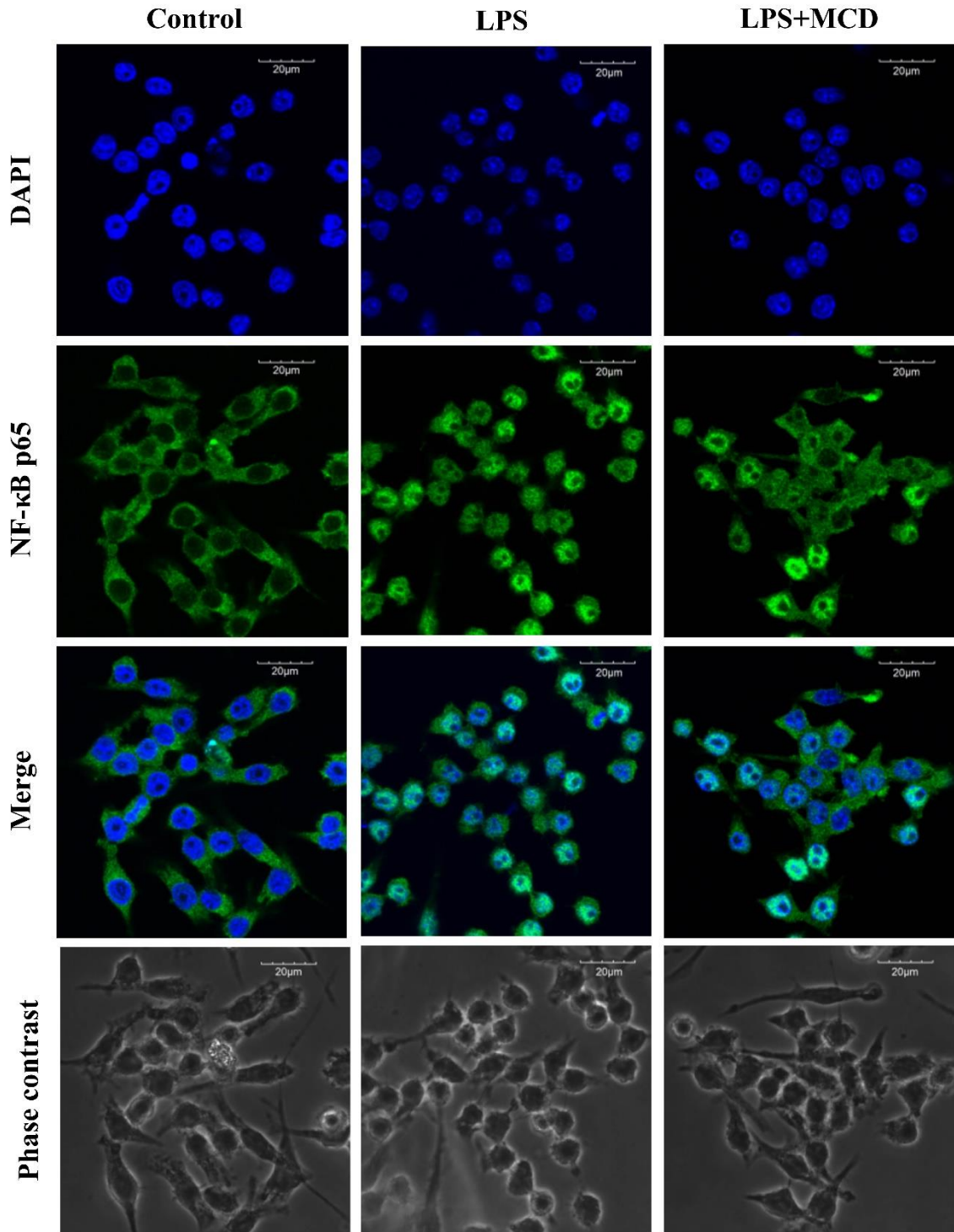


ทดสอบ MCD ที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{M}$  พบว่าปริมาณโปรตีน p-I $\kappa$ B ลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในภาพที่ 4-7

ต่อมาจึงศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ของ NF- $\kappa$ B p65 เข้าสู่นิวเคลียส พบว่าเซลล์ที่สัมผัสสาร MCD ร่วมกับ LPS ลดการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของโปรตีน NF- $\kappa$ B ผลของสาร MCD มีความคล้ายกับผลของสาร sesquiterpene lactones (SLs) ที่สกัดได้จาก *Magnolia grandiflora* โดยสาร SLs ยับยั้งการฟอสโฟรีเลชันที่ I $\kappa$ B ทำให้ปริมาณของโปรตีน NF- $\kappa$ B ในนิวเคลียสลดลง (Hehner et al., 1998 และ Koo et al., 2000) ดังแสดงในภาพที่ 4-8



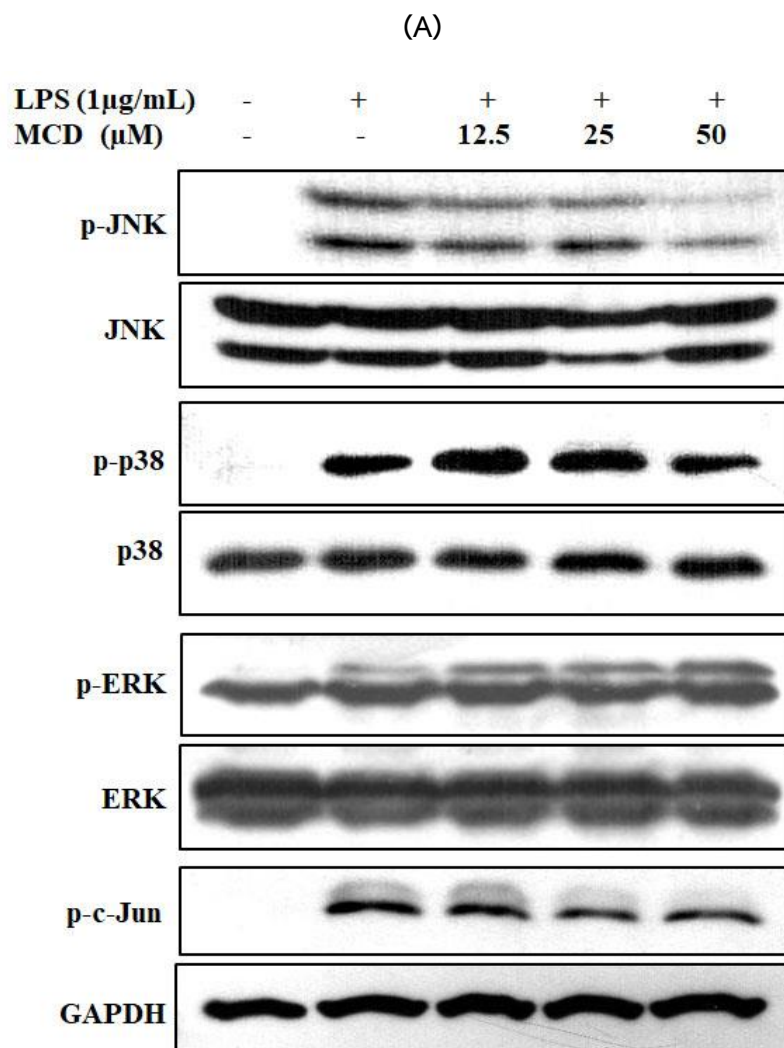
ภาพที่ 4-7 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน p-I $\kappa$ B ในเซลล์ โดยวิธี Western blot ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร MCD ที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 30 นาที หลังจากนั้นเซลล์สัมผัสกับ LPS นาน 30 นาที ภาพที่แสดงเป็นตัวแทนผลการทดลองโดยวิธี Western blot

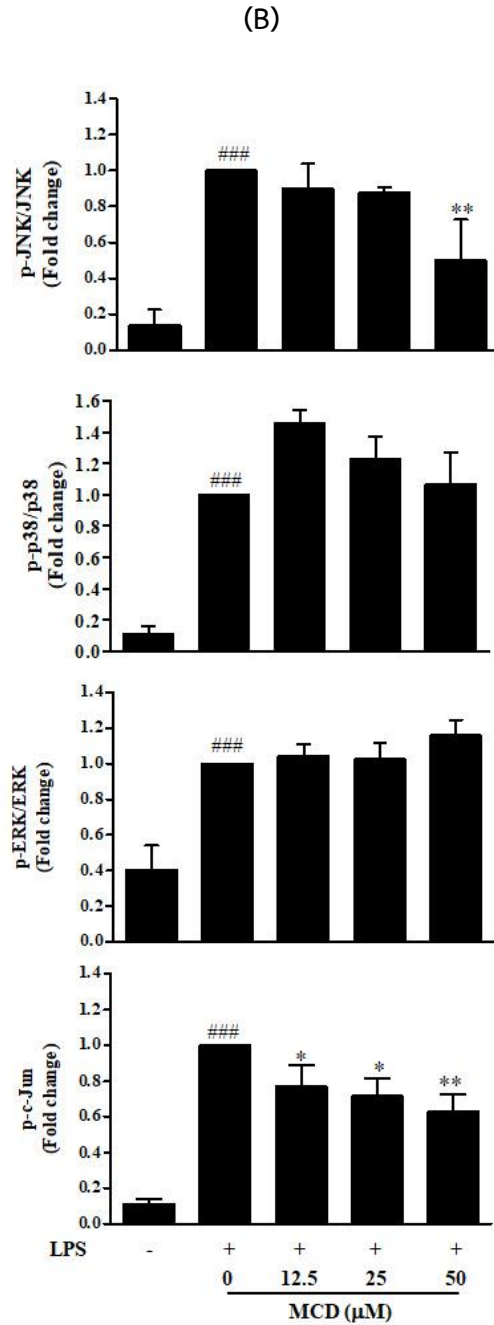


ภาพที่ 4-8 การวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของ NF-κB p65 เข้าสู่นิวเคลียส โดยเทคนิค immunocytochemistry ภายใต้กล้อง confocal เซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCD ที่ความเข้มข้น 50  $\mu$ M เป็นเวลา 30 นาที และบ่มต่อด้วย LPS เป็นเวลา 30 นาที

#### 4.7 ผลของสาร MCD ต่อการกระตุ้นวิถี MAPKs

เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS มีการฟอสโฟรีเลชันของโปรตีน p-ERK1/2, p-JNK และ p-p38 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่สัมผัสกับสารทดสอบใด และเมื่อเซลล์สัมผัส LPS ร่วมกับ สารทดสอบ MCD ที่ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50  $\mu\text{M}$  พบว่า ปริมาณโปรตีน p-ERK1/2 และ p-p38 ไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4-9) ในขณะที่สาร MCD ลดปริมาณโปรตีน p-JNK เมื่อเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว





ภาพที่ 4-9 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน MAPKs ด้วยวิธี Western blot เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร MCD ที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 30 นาที ก่อนสัมผัสกับ LPS นาน 30 นาที (A) ภาพที่แสดงเป็นตัวแทนผลการวิเคราะห์โปรตีน p-ERK1/2, p-JNK และ p-p38 (B) กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน p-ERK1/2 /total ERK1/2, p-JNK/total JNK และ p-p38/total p38 ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการ

เหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

โดยโปรตีน transcription factor เป้าหมายหลักของเอนไซม์ p-JNK คือ c-Jun (Kyriakis and Avruch, 2001) เมื่อสาร MCD ลดการฟอสโฟรีเลชันของโปรตีน JNK จึงส่งผลต่อปริมาณโปรตีน p-c-Jun (ภาพที่ 4-9) โดยโปรตีน c-Jun เป็นส่วนประกอบหลักของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ activating protein-1 (AP-1) (Kyriakis and Avruch, 2001; Issa *et al.*, 2006) ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ตัวหนึ่งที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (Martin and Martin, 2005) ผลการศึกษาคล้ายกับผลการทดลองของ Maity *et al.* (2012) ที่รายงานว่าสาร malabaricone C จาก *Myristica malabarica* ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ผ่านทางการลดการฟอสโฟรีเลชันของโปรตีน NF- $\kappa$ B p65 subunit และยับยั้งการฟอสโฟรีเลชันของ p-JNK และ p-p38 และไม่มีผลต่อการฟอสโฟรีเลชันของ p-ERK1/2 และนอกจากนี้สาร malabaricone C ลดการฟอสโฟรีเลชันของ c-Jun รายงานนี้จึงแสดงให้เห็นว่าสาร malabaricone C ลดการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบโดยผ่านทางทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF- $\kappa$ B และ AP-1 รวมทั้งรายงานวิจัยของ Hsieh *et al.* (2011) ที่รายงานว่าสาร aciculatin ที่สกัดได้จาก *Chrysopogon aciculatis* ยับยั้งการอักเสบโดยยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และ PGE<sub>2</sub> โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ผ่านทางการลดการฟอสโฟรีเลชันของโปรตีน p-JNK และ p-p38 และไม่มีผลต่อการฟอสโฟรีเลชันของ p-ERK1/2

ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่านอกจากสาร MCD ลดการผลิตไนตริกออกไซด์และ PGE<sub>2</sub> โดยผ่านทาง การยับยั้งการเคลื่อนที่ของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF- $\kappa$ B แล้ว อาจจะลดการผลิตไนตริกออกไซด์และ PGE<sub>2</sub> ผ่านทางการลดการกระตุ้นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ AP-1 อีกด้วย อย่างไรก็ตามผลของสาร MCD ต่อการฟอสโฟรีเลชัน ของ c-Jun และ ATF-2 ยังเป็นสิ่งที่ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

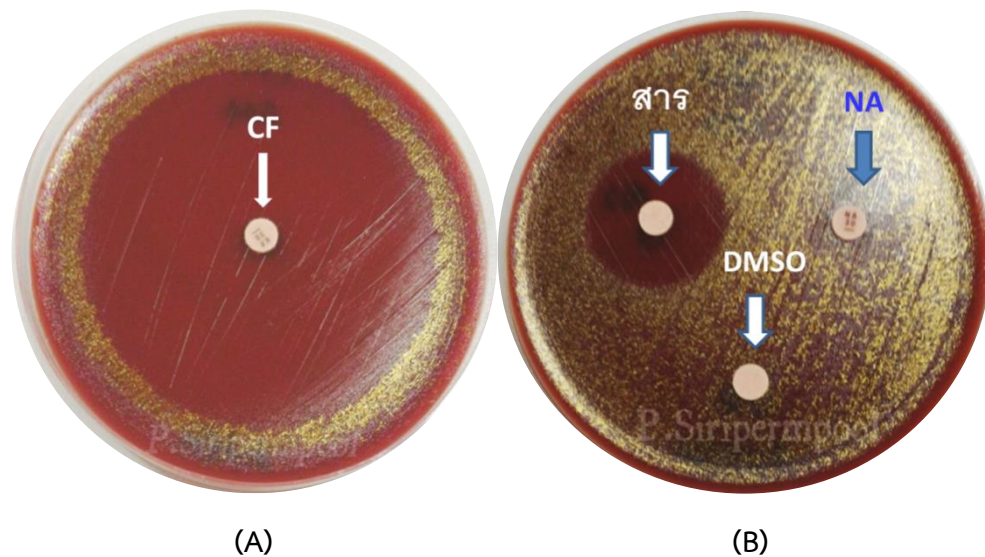
## 4.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านการแบคทีเรีย *H.pylori* ของสาร MCD

### 4.8.1 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี Disc diffusion

#### 4.8.1.1 การศึกษาลักษณะทั่วไปของเชื้อทดสอบ

นำ *H. pylori* ATCC43579, *H. pylori* ATCC43504 และ *H. pylori* ATCC700392 มาเพาะลงบน Helicobacter selective blood agar (HSBA; Blood agar+0.004% tetrazolium chloride) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ Microaerobic โดยใช้ Microaerophilic gas pack เป็นเวลานาน 3 วัน

พบว่าเชื้อทั้งสามสายพันธุ์มีลักษณะเป็น Gram-negative bacilli ขนาดเล็ก บางเซลล์โค้งงอ ให้ผลการทดสอบ Oxidase test และ Urease test เป็นบวก เจริญได้เฉพาะในสภาวะ Microaerobic เท่านั้น ไวต่อยา Cephalothin และดื้อต่อยา Nalidixic acid (ภาพที่ 4-10)



ภาพที่ 4-10 ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *H. pylori* ATCC700392 ต่อ Cephalothin (A) และ Nalidixic acid (B) (CF หมายถึง Cephalothin ที่ 30 ไมโครกรัม/disc, NA หมายถึง Nalidixic acid ที่ 30 ไมโครกรัม/disc)

4.8.1.2 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสาร MCD ในการยับยั้งเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี Disc diffusion (Mishra, *et al.*,2006)

สาร MCD สามารถยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* ทั้งสามสายพันธุ์ได้โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone เฉลี่ยอยู่ในช่วง 22-24 มิลลิเมตร ส่วนตัวทำละลายที่ใช้นั้นไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 4-1 และภาพที่ 4-10B)







ตารางที่ 4-1 ขนาด Inhibition zone ของสาร MCD ในการยับยั้งเชื้อ *H. pylori*

เชื้อทดสอบ	สาร MCD * (60µg/disc)	DMSO
<i>H. pylori</i> ATCC43504	22.00±0.00	NZ
<i>H. pylori</i> ATCC700392	24.33±0.58	NZ
<i>H. pylori</i> ATCC43579	22.33±0.58	NZ

แสดงค่า Mean±SD ของการทดสอบ 3 ครั้ง NZ = No zone

4.8.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร MCD ในการยับยั้งการเจริญของ *H. Pylori* (Minimum inhibitory concentration; MIC) โดยวิธี agar dilution (Piccolomini *et al.*, 1997)

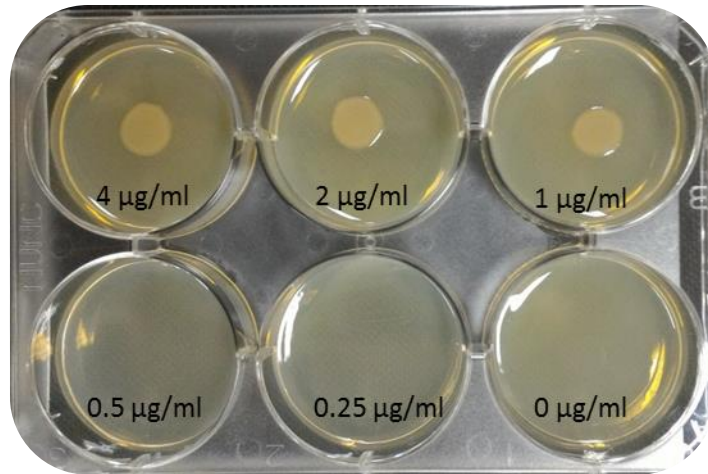
เชื้อทดสอบทั้งสามสายพันธุ์สามารถเจริญได้บนอาหารที่มี MCD ระดับความเข้มข้น 40, 20 และ 10 µg/mL และที่มีตัวทำละลาย DMSO แต่ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีสาร MCD ที่ความเข้มข้น 160 และ 80 µg/mL (ภาพที่ 4-11) ดังนั้นเชื้อทั้งสามสายพันธุ์นี้มีค่า MIC ของสาร MCD เท่ากันคือเท่ากับ 80 µg/mL โดยเชื้อ *P.aeruginosa* ATCC27853 ซึ่งเป็นชุดควบคุมคุณภาพการทดสอบมีค่า MIC ของยา Gentamicin เป็นไปตามข้อกำหนดมาตรฐานคือเท่ากับ 0.5 µg/mL (ภาพที่ 4-12) แสดงว่าผลการหาค่า MIC ของสาร MCD ในการยับยั้งเชื้อครั้งนี้เชื่อถือได้ โดย MIC หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร (หรือยา) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ (บริเวณที่ spot ไม่มีเชื้อเจริญ)

	เชื้อไม่เจริญบนอาหาร ผสมสารทดสอบ 160 µg/mL
	เชื้อไม่เจริญบนอาหาร ผสมสารทดสอบ 80 µg/mL
	เชื้อเจริญได้บนอาหาร ผสมสารทดสอบ 40 µg/mL
	เชื้อเจริญได้บนอาหาร ผสมสารทดสอบ 20 µg/mL
	เชื้อเจริญได้บนอาหาร ผสมสารทดสอบ 10 µg/mL
	เชื้อเจริญได้บนอาหาร ผสม 2.5% DMSO

ภาพที่ 4-11 ลักษณะการเจริญของ *H. pylori* ATCC700392 ในการทดสอบหาค่า MIC

ของ MCD ด้วยวิธี Agar dilution (ค่า MIC=80 µg/mL)





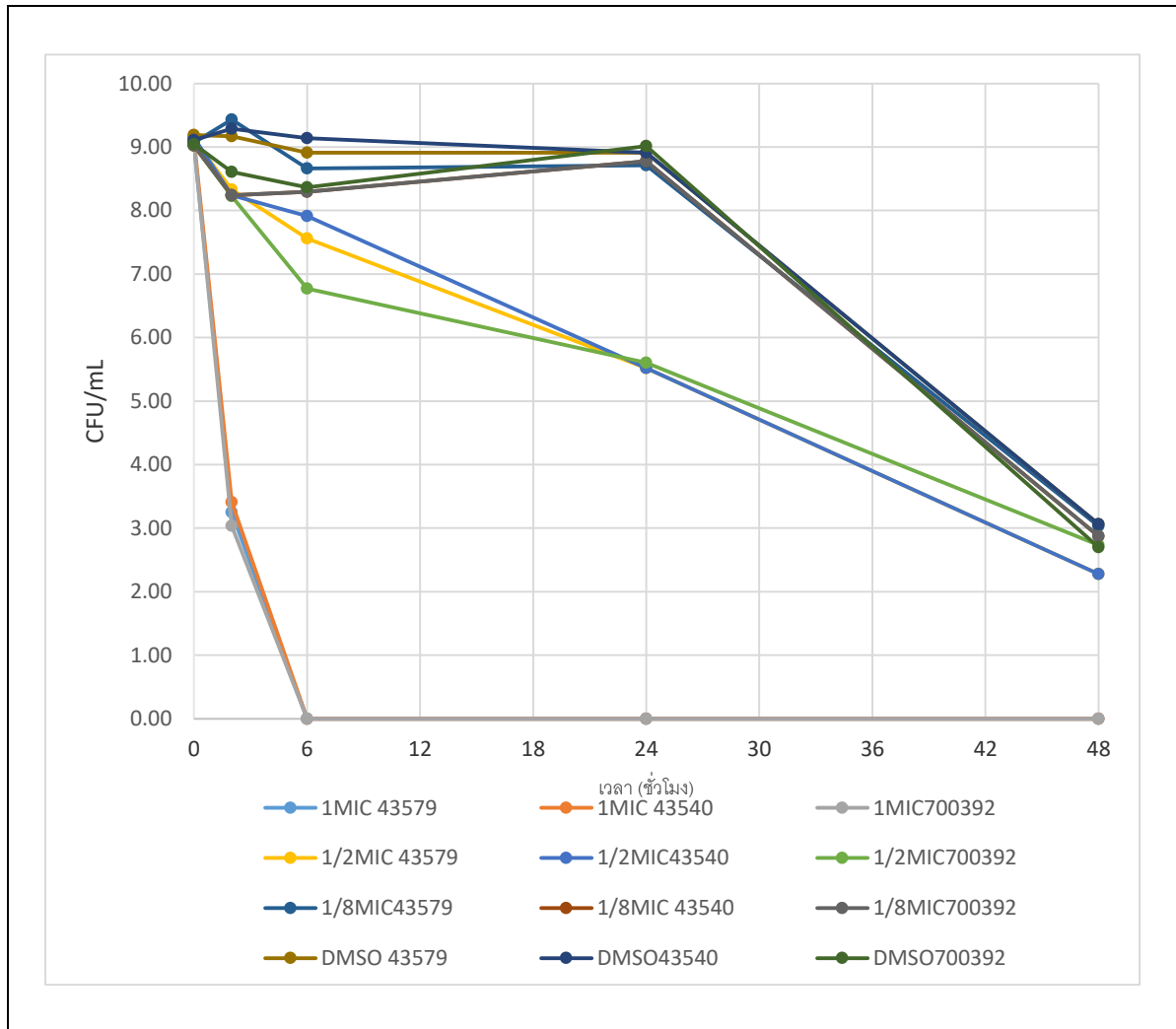
ภาพที่ 4-12 ลักษณะการเจริญของ *P.aeruginosa* ATCC27853 ในการทดสอบหาค่า MIC ของยา Gentamicin ในช่วงความเข้มข้น 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0 µg/mL (ค่า MIC = 0.5 µg/mL)

#### 4.8.3 การศึกษาผลของ MCD ต่อการเปลี่ยนแปลง ลักษณะ รูปร่างเซลล์ และจำนวนเชื้อ *H. pylori*

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *H. pylori* จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *H. pylori* ATCC 43579, *H. pylori* ATCC 43504 และ *H. pylori* ATCC 700392 ที่มีอายุ 72 ชั่วโมง โดยใช้อาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS) 10 เปอร์เซ็นต์และสารสกัดความเข้มข้น 1MIC (80 µg/mL), 1/2MIC (40 µg/mL), และ 1/8MIC (10 µg/mL) โดยใช้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียทดสอบที่มีเซลล์รูปท่อนโค้ง (ภาพที่ 4-14) ประมาณ  $1 \times 10^9$  cells/mL พบว่าแบคทีเรียในอาหารที่มีสารสกัดเข้มข้น 80 µg/mL (1MIC) เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง จำนวนแบคทีเรียลดลงประมาณ  $6 \log_{10}$  CFU/ mL และในชั่วโมงที่ 6 ไม่สามารถนับจำนวนแบคทีเรียได้อีก (ภาพที่ 4-13)

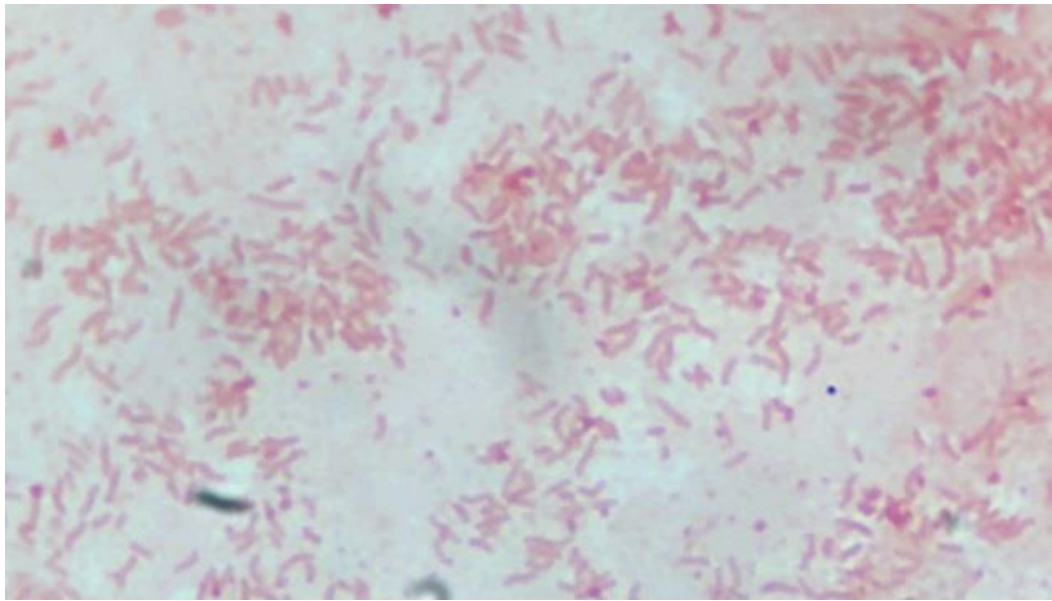
ส่วนในอาหารที่มีสารสกัดเข้มข้น 40 µg/mL (1/2MIC) พบว่าแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ลดจำนวนลงตามระยะเวลา เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง ลดลงประมาณ  $1-2 \log_{10}$  CFU/ mL เมื่อผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 6 เหลือแบคทีเรียประมาณ  $5.5 \log_{10}$  CFU/ mL (สามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้ประมาณ  $3.5 \log_{10}$  CFU/ mL) และ

เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 ยังคงเหลือเซลล์แบคทีเรียที่สามารถเจริญให้จำนวนได้มากกว่า 2 log<sub>10</sub> CFU/mL (ภาพที่ 4-13)



ภาพที่ 4-13 การเปลี่ยนแปลงของ *H. pylori* ATCC43579, *H. pylori* ATCC43504 และ *H. pylori* ATCC700392 หลังสัมผัสสาร MCD ความเข้มข้น 1MIC, 1/2MIC, 1/8MIC และ DMSO ที่เวลาต่าง ๆ (สัญลักษณ์ 1MIC 43579 หมายถึง *H. pylori* ATCC 43579 เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดเข้มข้น 1MIC, สัญลักษณ์ที่เหลือมีความหมายทำนองเดียวกัน)

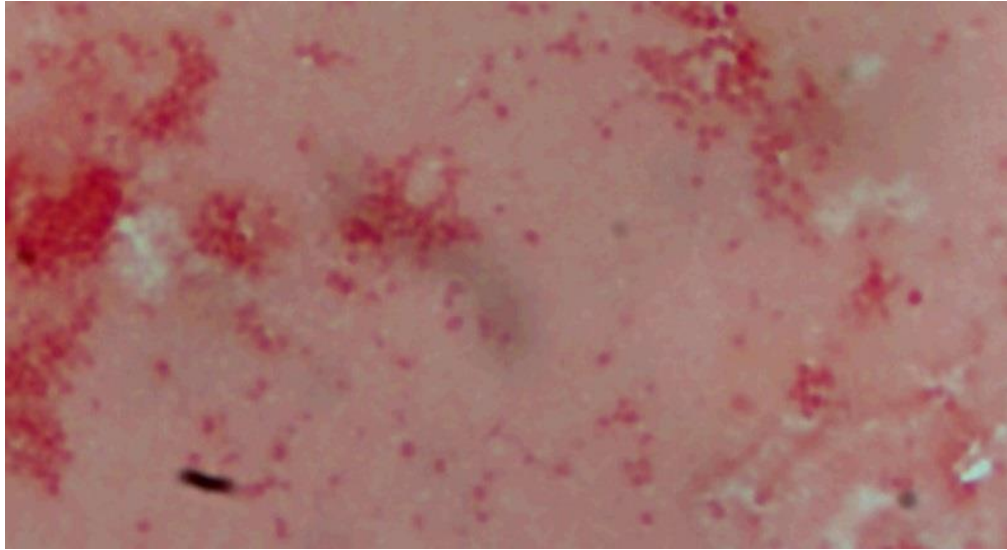
ขณะที่การเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ในอาหารที่มีสารสกัด เข้มข้น 10 µg/mL (1/8 MIC) และอาหารที่มีสารละลาย DMSO มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเป็นทำนองเดียวกัน คือ เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมงมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ไม่มากนักและรักษาจำนวนให้ใกล้เคียงปริมาณเซลล์เริ่มต้นและเพิ่มจำนวนขึ้นเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 24 เมื่อตรวจนับจำนวนเซลล์ในชั่วโมงที่ 48 พบว่าแบคทีเรียมีจำนวนลดลงและเหลือเซลล์แบคทีเรียที่แข็งแรงพอจะเจริญบนอาหารแข็งให้นับจำนวนได้ประมาณ 3 log<sub>10</sub> CFU/ mL (ภาพที่ 4-13)



ภาพที่ 4-14 เซลล์รูปท่อนโค้งของ *Helicobacter pylori* ATCC43579 ย้อมสีแบบแกรม (กำลังขยาย 100x)

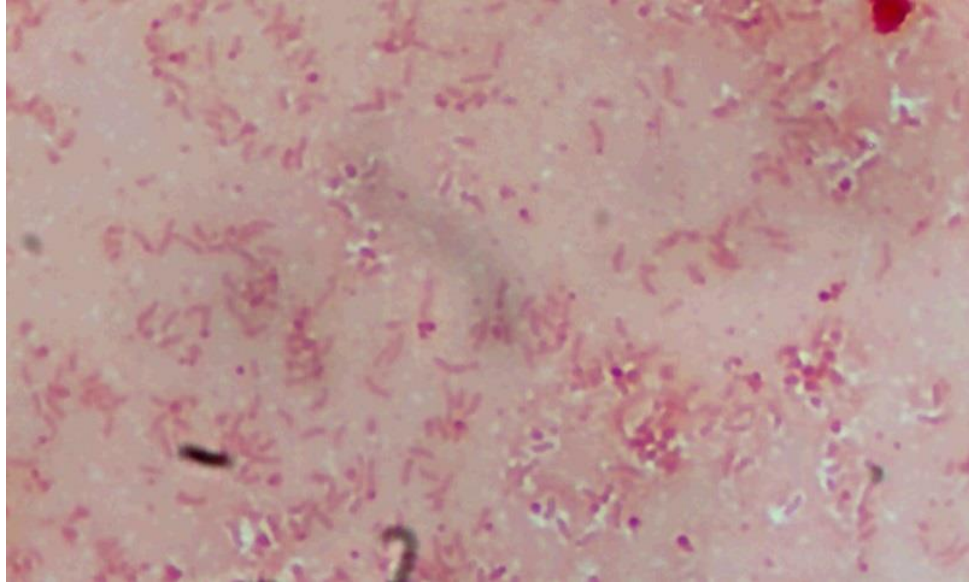
จากการเพาะเลี้ยง *H. pylori* ทั้งสามสายพันธุ์อายุ 72 ชั่วโมงซึ่งเซลล์ยังคงมีรูปร่างเป็นท่อนโค้ง (ภาพที่ 4-14) ในอาหารที่มีสาร MCD จากเร่วหอมและสังเกตรูปร่างเซลล์ *H. pylori* ทั้งสามสายพันธุ์ที่กำลังขยาย 100x และการย้อมสีแบบแกรม พบว่าหลังเพาะเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวร่วมกับอาหารที่มีสาร MCD ที่ความเข้มข้น 80 µg/mL (1MIC) นั้นพบเซลล์รูปท่อนโค้งซึ่งเป็นตัวชี้ว่าแบคทีเรียยังมีสุขภาพดีปะปนกับเซลล์รูปกลมและท่อนสั้นใน 2 ชั่วโมงแรกและเซลล์เหล่านี้บางส่วนยังเพาะเลี้ยงให้เจริญบนอาหารวุ้นเพื่อนับจำนวนได้

แต่หลังจากชั่วโมงที่ 6 พบเพียงเซลล์รูปกลมและเศษเซลล์ (ภาพที่ 4-15) และไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญบนอาหารวุ้นได้

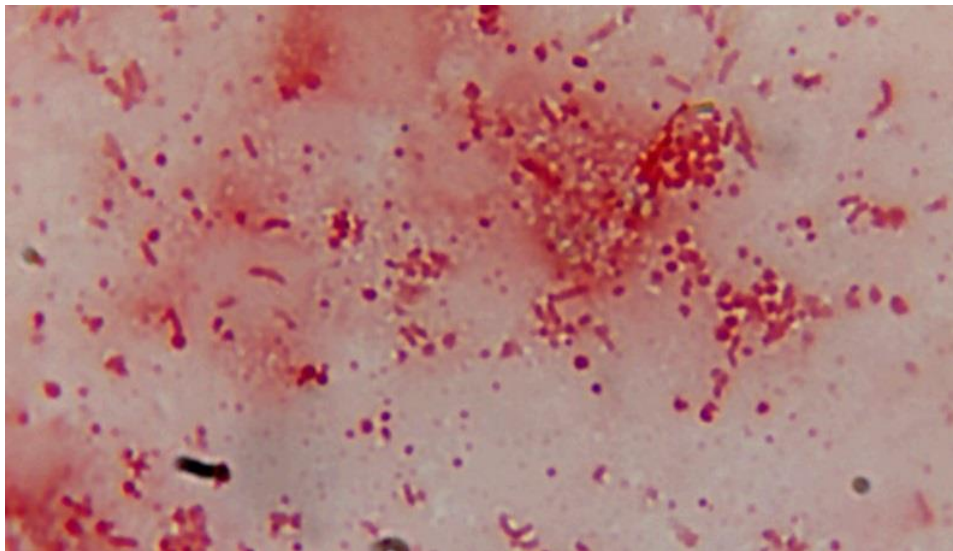


ภาพที่ 4-15 เซลล์รูปกลมปะปนกับเศษเซลล์ของ *Helicobacter pylori* ATCC43579 หลังสัมผัสสาร MCD จากเร่วหอมความเข้มข้น 1MIC เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (ย้อมสีแบบแกรม กำลังขยาย 100x)

ในขณะที่การทดลองกับสารสกัด 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1/2MIC), 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1/8MIC) และ DMSO พบทั้งเซลล์รูปท่อนโค้ง (เซลล์สมบูรณ์) รูปท่อน เซลล์รูปกลมและเศษเซลล์ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 จนถึงชั่วโมงที่ 48 ชั่วโมง และความหนาแน่นของเซลล์รูปท่อนโค้งจะลดจำนวนลงขณะที่ความหนาแน่นของเซลล์รูปกลมจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4-16 และ 4-17)



ภาพที่ 4-16 เซลล์รูปท่อนโค้งปะปนกับเซลล์รูปกลมของ *Helicobacter pylori* ATCC43579 หลังสัมผัสสาร MCD จากเรื้อร่หอมความเข้มข้น 1/8MIC เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ย้อมสีแบบแกรม กำลังขยาย 100x)



ภาพที่ 4-17 เซลล์รูปท่อนโค้ง ท่อนสั้นและรูปกลมปะปนกับเซลล์ของ *Helicobacter pylori* ATCC43579 หลังสัมผัสสาร MCD จากเรื้อร่หอมความเข้มข้น 1/8MIC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ย้อมสีแบบแกรม กำลังขยาย 100x)

#### 4.8.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลาย MCD ร่วมกับยาปฏิชีวนะ amoxicillin ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

4.8.4.1 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ Amoxicillin ในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* โดยวิธี Agar dilution

ทำการทดสอบ *H. pylori* ทั้งสามสายพันธุ์กับยา Amoxicillin ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-0.003 µg/mL โดยวิธีการเช่นเดียวกับการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร MCD ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (แต่ละเชื้อทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง) ผลการทดสอบพบว่าเชื้อทดสอบทั้งสามสายพันธุ์มีค่า MIC ของยา Amoxicillin อยู่ในช่วง 0.01-0.05 µg/mL (ตารางที่ 4-2)

ตารางที่ 4-2 ค่า MIC ของยา Amoxicillin ในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* โดยวิธี Agar dilution

เชื้อทดสอบ	MIC range (µg/mL)
<i>H. pylori</i> ATCC43504	0.025
<i>H. pylori</i> ATCC700392	0.025-0.05
<i>H. pylori</i> ATCC43579	0.01-0.025

4.8.4.2 การทดสอบฤทธิ์รวมระหว่างสาร MCD กับยา Amoxicillin ในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* โดยวิธี Checkerboard agar dilution (Koga *et al.*, 2002)

ค่า Fractional inhibitory concentration (FIC) ของสาร MCD และของยา Amoxicillin ในการทดสอบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์รวมยับยั้งเชื้อ *H. pylori* ATCC43504 เท่ากันคือเท่ากับ 0.5 ค่าดัชนีประสิทธิภาพรวมของการออกฤทธิ์ยับยั้ง (Fractional inhibitory concentration indices; FICI) เท่ากับ 1.0 ส่วนเชื้อ *H. pylori* ATCC700392 และ *H. pylori* ATCC43579 มีค่า FICI ของการทดสอบฤทธิ์รวมระหว่างสารกับยา Amoxicillin อยู่ในช่วง 1.0-1.75 รายละเอียดดังตารางที่ 4-3. แสดงว่าสาร MCD ออกฤทธิ์ร่วมกับ

Amoxicillin ในการยับยั้งเชื้อ *H.pylori* ทั้งสามสายพันธุ์นี้เป็นแบบไม่เสริมฤทธิ์และไม่ต้านฤทธิ์กัน ดังนั้นจึงน่าจะใช้สาร MCD นี้ร่วมกับ Amoxicillin ในการรักษาโรคติดเชื้อ *H. pylori* ได้อย่างปลอดภัย

ตารางที่ 4-3 Fractional inhibitory concentrations\*(FICs) และ FIC indices (FICI) ของสาร MCD กับยา Amoxicillin ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*

เชื้อทดสอบ	FIC (สาร MCD)	FIC (Amoxicillin)	FICI	การแปลผล
<i>H. pylori</i> ATCC43504	0.5	0.5	1.0	Additive
<i>H. pylori</i> ATCC700392	0.5	0.25-0.5	1.0-1.5	Indifference
<i>H. pylori</i> ATCC43579	0.5	0.5-1.25	1.0-1.75	Indifference

\*FIC of drug A = MIC of drug A in combination/MIC of drug A alone

FIC of drug B = MIC of drug B in combination/MIC of drug B alone

FICI = FIC of drug A + FIC of drug B

FICI  $\leq$ 0.5, synergy;  $>$ 0.5-1, additive;  $>$ 1-4.0, indifference;  $>$ 4, antagonism

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดสามารถสรุปได้ดังนี้

1. สาร trans-4-methoxycinnamaldehyde (MCD) ที่แยกได้จากเหง้าของเร่วหอม มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ พรอสตาแกลนดิน E2 และ TNF- $\alpha$  ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7
2. สาร MCD มีกลไกในการต้านอักเสบผ่านการยับยั้งการแสดงออก mRNA และโปรตีนของ iNOS และ COX-2 รวมทั้งมีผลต่อเอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 นอกจากนี้สาร MCD ไม่ลดการแสดงออกของเอนไซม์ COX-1 ด้วย
3. สาร MCD ลดการฟอสโฟรีเลชันของ I $\kappa$ B และการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF- $\kappa$ B p65
4. สาร MCD สามารถลดการฟอสโฟรีเลชันของโปรตีน p-JNK1/2 แต่ไม่ลดการฟอสโฟรีเลชันของโปรตีน p-ERK1/2 และ p-p38 รวมทั้งลดปริมาณ p-c-Jun
5. สาร MCD สามารถยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* สามสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง คือ *H. pylori* ATCC43579 (Amoxicillin-resistant strain), *H. pylori* ATCC43504 (Metronidazole-resistant strain) และ *H. pylori* ATCC700392 (Tetracycline-resistant strain) มีค่า MIC ของการทดสอบเท่ากับ 80  $\mu$ g/mL ในทุกสายพันธุ์
6. สาร MCD ความเข้มข้น 80  $\mu$ g/mL (1MIC) สามารถทำลาย *H. pylori* ทั้งสามสายพันธุ์อย่างสมบูรณ์ในชั่วโมงที่ 6 ซึ่งจากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่พบเซลล์รูปท่อนโค้งและรูปท่อน พบเพียงเซลล์รูปกลมและเศษเซลล์ซึ่งอาจจะหมายถึง เซลล์รูปกลมไม่มีความสามารถในการกลับมาเจริญใหม่อีก
7. สาร MCD ที่ความเข้มข้น 40  $\mu$ g/mL (1/2 MIC) สามารถลดปริมาณ *H. pylori* ทั้งสามสายพันธุ์ได้ประมาณ 6log<sub>10</sub> CFU/mL ในชั่วโมงที่ 2 แต่ยังคงตรวจพบเซลล์รูปท่อนได้จนถึงชั่วโมงที่ 48 และสามารถนับจำนวนแบคทีเรียได้ประมาณ 3log<sub>10</sub> CFU/mL



8. *H. pylori* ทั้งสามสายพันธุ์เมื่อสัมผัสกับสาร MCD ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL (1/8MIC) ยังสามารถรักษาจำนวนเซลล์ไว้ได้ใกล้เคียงกับจำนวนเริ่มต้นจนถึงชั่วโมงที่ 24 และเมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 จำนวนเซลล์ลดลงเหลือประมาณ  $3\log_{10}$  CFU/mL นั่นคือแบคทีเรียลดลงไปประมาณ  $6\log_{10}$  CFU/mL ในระหว่างชั่วโมงที่ 24 -48

9. ในการทดลองที่สามารถนับจำนวนแบคทีเรียบนอาหารแข็งได้นั้นเมื่อแบ่งตัวอย่างไปย้อมสีแบบแกรมและสังเกตรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100x จะพบว่ามีเซลล์รูปท่อนเหลืออยู่ ขณะที่การทดลองกับสาร MCD ที่ 1MIC ในชั่วโมงที่ 6, 24 และ 48 ไม่พบเซลล์รูปท่อนเลยพบเพียงเซลล์รูปกลมและทั้งไม่สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เจริญขึ้นใหม่บนอาหารวุ้นได้ แสดงว่าเซลล์รูปท่อนนี้มีโอกาสเจริญขึ้นมาใหม่บนอาหารแข็งขณะที่เซลล์รูปกลมอาจจะบาดเจ็บจนสูญเสียความสามารถในการเจริญขึ้นมาใหม่ได้ ซึ่งอาจจะเป็นแนวทางบ่งชี้ว่ากลไกการออกฤทธิ์อาจจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์

10. สาร MCD ออกฤทธิ์ร่วมกับ Amoxicillin ในการยับยั้งเชื้อ *H.pylori* ทั้งสามสายพันธุ์นี้เป็นแบบไม่เสริมฤทธิ์และไม่ต้านฤทธิ์กัน

ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสาร MCD มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาเป็นยาต้านอักเสบชนิดใหม่ ที่เป็นยาต้านเชื้อ *H.pylori* และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ COX-2 และมีผลยับยั้งเอนไซม์ COX-1 แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงฤทธิ์ต้านการอักเสบและความเป็นพิษของสาร MCD ในสัตว์ทดลองต่อไป

## บรรณานุกรม

- กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข. (2556). การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของใบเร่วหอม: มูลค่าเพิ่มจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- พงศักดิ์ พลเสนา. (2550a). พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน ฉบับสมบูรณ์. ห้างหุ้นส่วนจำกัด เจตนารมณณ์ภัณฑ์ ปราจีนบุรี. 301น.
- พงศักดิ์ พลเสนา. (2550b). เร่วหอมพันธุ์ไม้ชนิดใหม่ของไทย และรายงานการพบ “ผลเร่วหอม” ครั้งแรก. หมายเหตุนิเวศวิทยา: บันทึกรธรรมชาติหลากหลายเผ่าพันธุ์. ปีที่ 1 ฉบับที่ 4, 25-26.
- รายการเกษตรนำรัฐ. พืชสมุนไพร เร่วหอม. สถานีโทรทัศน์กองทัพบกช่อง 7. 28 ตุลาคม 2553.
- ภาณุวัฒน์ ปานเกต จุรีพร คงประเสริฐ นิตยา ภัทรกรรม นงนุช ตันติธรรม ศุภวรรณ มโนสุนทร และพัชริยา ยิ่งอินทร์ (มปป) รายงานการพยากรณ์โรคและภัยสุขภาพ สำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข.
- วารสารเคหเกษตร. เร่วหอม สมุนไพรที่ขยายพันธุ์ ปลูก และแปรรูป ไม่ยาก.  
[http://www.kehakaset.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=222:2011-04-11-02-29-41&catid=38](http://www.kehakaset.com/index.php?option=com_content&view=article&id=222:2011-04-11-02-29-41&catid=38). สืบค้นวันที่ 26 กันยายน 2554.
- ศกวรรณ แก้วกลิน และ นิตยา พันธุ์เวทย์. (มปป) ประเด็นรณรงค์วันหัวใจโลก ปี พ.ศ. ๒๕๕๔. สำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข.
- เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข. (2551). การค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในสมุนไพรจากภาคตะวันออก. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข. (2555). การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 357:593-615.
- Cardoso LS, Araujo MI, Góes AM, Pacifico LG, Oliveira RR, Oliveira SC (2007). Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb. Cell Fact*. 6: 1. doi: 10.1186/1475-2859-6-1.
- Fleming I, Busse R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 284: R1-R12.

- Forstermann U, and Sessa W. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 33, 829–837
- Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. (1986). Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther*. 237:893–900.
- Koltermann A, Hartkorn A, Koch E, Fürst R, Vollmar AM, Zahler S. (2007). Ginkgo biloba extract EGb 761 increases endothelial nitric oxide production in vitro and in vivo. *Cell Mol Life Sci*. 64(13):1715-22.
- Li, H., and Förstermann, U. (2013). Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Current Opinion in Pharmacology*. 13:161–167
- Li H, Wallerath T, Förstermann U. (2002). Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide*. 7: 132–147.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*. 15:323-350.
- Manning, B.D., Cantley, C.L. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 129, 1261-1274.
- OECD (The Organisation of Economic Co-operation and Development), 1998. The OECD guideline for Testing of Chemicals: 408 Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents.
- OECD (The Organisation of Economic Co-operation and Development), 2001. The OECD guideline for Testing of Chemicals: 420 Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure.
- Srisook, E., Palachot, M., Mankhong, S., Srisook, K. (2017). Anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. rhizomal extract and its phenolic compounds in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Pharmacogn. Mag*. 13, s230-s235.
- Steinkamp-Fenske K, Bollinger L, Völler N, Xu H, Yao Y, Bauer R, Förstermann U, Li H. (2007). Ursolic acid from the Chinese herb Danshen (*Salvia miltiorrhiza* L.) upregulates eNOS and downregulates Nox4 expression in human endothelial cells. *Atherosclerosis* 195: e104–e111.

- Stoner, L., Lucero, A.A., Palmer, B.R., Jones, L.M., Young, J.M., Faulkner, J. (2013). Inflammatory biomarkers for predicting cardiovascular disease. *Clinical Biochemistry*. 46: 1353–1371.
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 196(2):193-222.
- World Health Organization. World Health Statistics 2012. All rights reserved. Publications of the World Health Organization are available on the WHO web site ([www.who.int](http://www.who.int))
- Wattanapitayakul SK, Suwatronnakorn M, Chularojmontri L, Herunsalee A, Niumsakul S, Charuchongkolwongse S, Chansuvanich N. (2007). *Kaempferia parviflora* ethanolic extract promoted nitric oxide production in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Ethnopharmacology* 110: 559–562.
- Xia, N., Förstermann, U., Li, H. (2014). Resveratrol and endothelial nitric oxide. *Molecules* 19, 16102-16121.
- Zhang X, Xiong H, Liu L. (2012). Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 141: 206-211.
- Zou MH, Shi C, Cohen RA. (2002). Oxidation of the zinc–thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*. 109: 817–826.
- Zong, Y., Sun, L., Liu, B., Deng, Y-S., Zhan, D., Chen, Y-L., He, Y., Liu, J., Zhang, Z-J., Sun, J., Lu, D. (2012). Resveratrol Inhibits LPS-Induced MAPKs Activation via Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway in Murine RAW 264.7 Macrophage Cells. *PloS One*. 7, 1-13.

## ผลผลิตของโครงการวิจัย (Outputs):

1. โครงการวิจัยนี้ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จำนวน 4 คน คือ นางสาวสกุลรัตน์ มั่นคง นางสาวกิตติยา กองสมัคร นางสาวภัศรา ทองจรูไร และนางสาวณฐานิต กิจวิวัฒน์
2. ผลการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัยนี้บางส่วน อยู่ในระหว่างการนำไปเสนอเพื่อพิจารณาตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ “International Immunopharmacology” รายละเอียดดังนี้ Klaokwan Srisook, Sakulrat Mankhong, Natthakarn Chiranthanut, Kittiya Kongsamak, Na-thanit Kitwiwat, Patsara Tongjurai, Pornpun Aramsangtienchai. Anti-inflammatory effect of trans-4-methoxycinnamaldehyde from *Etingera pavieana* in LPS-stimulated macrophages mediated through inactivation of NF- $\kappa$ B and JNK/c-Jun signaling pathways and in rat models of acute inflammation
3. ผลการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะทำให้มีการเพิ่มมูลค่าของเร่วหอมที่เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นำไปสู่การเพิ่มรายได้ของชุมชนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย