

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RMU4980032

ชื่อชุดโครงการ ผลของไขมันชั้นในการเป็นสารต้านการอักเสบ สารต้านการติดเชื้อในหนูที่มีการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และสารต้านมะเร็งในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับ

ชื่อนักวิจัย รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง ดวงพร ทองงาม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address: d.thong@mailcity.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

เรื่องที่ 1

ผลของไขมันชั้นต่อการรื้อของโปรตีนในหลอดเลือดขนาดเล็กในกระเพาะอาหาร การแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-พีทกลีบหัว และการเปลี่ยนแปลงระดับวิตามินอีในหนูที่ติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร

การติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร เป็นสาเหตุของกระเพาะอาหารอักเสบ และการหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เคอร์คูมินซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ของขมิ้นมีคุณสมบัติต่อต้านการอักเสบ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลจากการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร และผลในการต่อต้านการอักเสบของเคอร์คูมินที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการรื้อของสารโมเลกุลใหญ่จากหลอดเลือดขนาดเล็กในกระเพาะอาหาร การแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-พีทกลีบหัวในเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร และการเปลี่ยนแปลงระดับวิตามินอีในซีรัมของหนู การทดลองใช้หนูเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมที่ให้เคอร์คูมิน กลุ่มติดเชื้อ กลุ่มติดเชื้อที่ได้รับการรักษาด้วยเคอร์คูมินขนาด 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และขนาด 600 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม หลังติดเชื้อนาน 2 สัปดาห์ หนูในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยเคอร์คูมินจะถูกป้อนเคอร์คูมินขนาด 200 หรือ 600 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นใช้เทคนิค intravital fluorescence microscopy ศึกษาการรื้อของสารโมเลกุลใหญ่จากหลอดเลือดขนาดเล็กในกระเพาะอาหาร ใช้วิธีทาง

immunohistochemistry ศึกษาการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-พีทกลีบห้ในเซลล์เยื่อ
กระเพาะอาหาร และใช้เทคนิค ELISA ตรวจสอบระดับของวีอีจีเอฟในซีรัม

ผลการศึกษาพบความสำเร็จต่อการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรีถึงร้อยละ 85 และการ
ติดเชื้อนำไปสู่การร่วของสารโมเลกุลใหญ่ การแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-พีทกลีบห้ และ
ระดับวีอีจีเอฟที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยค่าเฉลี่ยการร่วของสารโมเลกุล
ใหญ่คือร้อยละ 10.69 ± 1.43 และ 15.41 ± 2.83 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอ็น
เอฟแคปปาบี-พีทกลีบห้คือร้อยละ 28.58 ± 2.82 และ 44.2 ± 5.24 และ ค่าเฉลี่ยระดับวีอีจีเอฟ
ในหน่วยพิโคกรัมต่อมิลลิกรัม คือ 228.57 ± 40.41 และ 619.43 ± 145.68 เมื่อเปรียบเทียบใน
กลุ่มควบคุม และกลุ่มติดเชื้อตามลำดับ กลุ่มควบคุมที่ได้เคอร์คูมินไม่มีผลต่อตัวแปรที่ศึกษาเมื่อ
เทียบกับกลุ่มควบคุม แต่พบว่าเคอร์คูมินทั้งสองความเข้มข้นมีผลลดการร่วของสารโมเลกุลใหญ่
และการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-พีทกลีบห้ ($p \leq 0.05$) ค่าเฉลี่ยการร่วของสารโมเลกุล
ใหญ่คือร้อยละ 12.32 ± 2.13 และ 13.72 ± 2.22 และ ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ
เอ็นเอฟแคปปาบี-พีทกลีบห้คือร้อยละ 33.99 ± 4.83 และ 37.11 ± 4.34 ในกลุ่มติดเชื้อที่ได้รับ
การรักษาด้วยเคอร์คูมิน ขนาด 200 และ 600 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมตามลำดับ
ในขณะที่เคอร์คูมินไม่มีผลต่อการลดระดับวีอีจีเอฟ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อเฮลิโค
แบคเตอร์ไพโลรีเพิ่มการร่วของสารโมเลกุลใหญ่ออกจากหลอดเลือดของกระเพาะอาหาร การ
แสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-พีทกลีบห้ และระดับวีอีจีเอฟ ถึงแม้ว่าเคอร์คูมินทั้งสองความ
เข้มข้นไม่สามารถลดระดับวีอีจีเอฟได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เคอร์คูมินสามารถลดการร่ว
ของสารโมเลกุลใหญ่และการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-พีทกลีบห้ได้ซึ่งแสดงว่าเคอร์คูมินมี
คุณสมบัติต่อต้านการอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรีในหนูทดลอง

เรื่องที่ 2

ผลของว่านหางจระเข้ ขมิ้นชัน กระเทียม และเปล้าน้อยในการเป็นสารต้านการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร

เฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรี เป็นสาเหตุของกระเพาะอาหารอักเสบ และแผลกระเพาะอาหาร สมุนไพรบางชนิดมีรายงานการเป็นสารต้านการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อประเมินผลของว่านหางจระเข้ ขมิ้นชัน กระเทียม และเปล้าน้อยในการเป็นสารต้านการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร ในหลอดทดลอง โดยทำการทดลองด้วยเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรสายพันธุ์มาตรฐาน NCTC 11637 และสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อนี้ จำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยวิธี อาการไคลูชั่นที่ความเข้มข้น 0.016-512 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ ดิสก์ดิลฟิวชัน ความเข้มข้นของสมุนไพรที่ 20, 50, 100, 200 และ 400 ไมโครกรัม ผลการทดลอง พบค่าความเข้มข้นน้อยสุดที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อของว่านหางจระเข้ >512, ขมิ้นชัน =64, กระเทียม >512, และเปล้าน้อย >512 ตามลำดับ ไม่พบค่าอินฮิบิชั่นโซนในว่านหางจระเข้ กระเทียม และเปล้าน้อย แต่ขมิ้นชันมีค่าอินฮิบิชั่นโซน 6.5-8 มิลลิเมตรเมื่อความเข้มข้นขมิ้นชัน เป็น 200 และค่าอินฮิบิชั่นโซน 10-12 มิลลิเมตรเมื่อความเข้มข้นขมิ้นชันเป็น 400 ไมโครกรัม ตามลำดับ สรุปว่า ขมิ้นชันมีผลเป็นสารต้านการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรซึ่งน่าจะมีประโยชน์ในการศึกษาต่อไปทางคลินิก ไม่พบการเป็นสารต้านการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรของว่านหางจระเข้ กระเทียม และเปล้าน้อยในการทดลองนี้

เรื่องที่ 3

ผลของเจลาตินไฮโดรเจลที่ควบคุมการปล่อยสารเคอร์คูมินจากการเกิด หลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู

เพื่อศึกษาผลของเจลาตินไฮโดรเจลที่ควบคุมการปล่อยสารเคอร์คูมินจากการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู โดยแบ่งหนูทดลองเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 = กลุ่มควบคุม กลุ่ม 2 = Hep-G2 ทำการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู (2×10^6 เซลล์) ลงใน chamber และกลุ่ม 3 = Hep-G2-cur ทำการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู (2×10^6 เซลล์) ลงใน chamber และฝังเจลาตินไฮโดรเจล ที่บรรจุ curcumin 2-5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อครบกำหนด 14 วัน นำมาศึกษาผลการเกิดหลอดเลือดใหม่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ หลังการฉีด FITC-dextran-250 วิเคราะห์หาการเกิดหลอดเลือดใหม่โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Goba Lab II หลังจากนั้นนำชิ้นเนื้อบริเวณที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทูไปตัดทำการศึกษาโดยวิธี H&E เพื่อศึกษาขนาดของเซลล์มะเร็ง ผลการทดลองกลุ่ม Hep-G2 พบการเกิดหลอดเลือดใหม่ $68.69 \pm 0.9\%$ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม $32.18 \pm 3.37\%$ และเมื่อพบว่าในกลุ่ม Hep-G2-cur มีการเกิดหลอดเลือดใหม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $20.73 \pm 1.9\%$ ($p < 0.01$) ได้ และมีผลทำให้มะเร็งมีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่ม Hep-G2-cur สรุปเจลาตินไฮโดรเจลที่ควบคุมการปล่อยสารเคอร์คูมินสามารถยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู 14 วันได้ และมีผลทำให้มะเร็งมีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำหลัก Curcumin, anti-inflammatory, anti-infection, anti-cancer

Abstract

Project Code: RMU4980032

Project Title: Curcumin is effective as the anti-inflammatory, anti-infection in *Helicobacter pylori* infected rats, and anti-cancer in Hepatoma cell implanted BALB/c-nude mice model

Investigator: Associated Professor Duangporn Thong-Ngam, MD.
Chulalongkorn University

E-mail Address: d.thong@mailcity.com

Project Period: 2 Years

เรื่องที่ 1

Effects of curcumin on gastric microvascular leakage, nf-~~KB~~**κ**-p65 expression, and change in vegf level in *helicobacter pylori* infected rats

Curcumin treatment did not affect baseline of these parameters. *H. pylori* infection was 85% successful rate and led to the macromolecular leakage as well as the activation of NF-~~KB~~**κ** p65 and increase of VEGF level compared with control group. The averages percent of macromolecular leakage were $10.69\% \pm 1.43$ and $15.41\% \pm 2.83$, NF-~~KB~~**κ** p65 immunoreactive cells were $28.58\% \pm 2.82$ and $44.2\% \pm 5.24$; and the averages concentration of VEGF level (pg/ml) were 228.57 ± 40.41 and 619.43 ± 145.68 in control and *H. pylori* infected group, respectively.

There were significant decrease of macromolecular leakage and NF-~~KB~~**κ** p65 activated cells ($p \leq 0.05$) in curcumin 200 mg/kg and 600 mg/kg treated groups compared with *H. pylori* infected group. The average percents of macromolecular leakage were $12.32\% \pm 2.13$ and $13.72\% \pm 2.22$, and NF-~~KB~~**κ** p65 immunoreactive cells were $33.99\% \pm 4.83$ and $37.11\% \pm 4.34$ in curcumin 200 mg/kg and 600 mg/kg treated

groups, respectively. Whereas, the effect of curcumin on VEGF level did not significantly decrease compared with *H. pylori* infected group.

Conclusion: *H. pylori* infection increased gastric microvascular leakage, NF-~~K~~B p65 expression, and serum VEGF level. Curcumin, an anti-inflammatory agent, at the dose of 200 and 600 mg/kg reduced the leakage and NF-~~K~~B p65 expression in *H. pylori*-infected rats.

เรื่องที่ 2

Antibacterial activity of *Aloe vera*, curcumin, garlic, and plau-noi against *Helicobacter pylori*.

Background: *Helicobacter pylori* is a bacterium implicated in the etiology of gastritis and peptic ulcers. Some herbal agents have been reported to have antibacterial activity against *H. pylori*. **Aim:** To assess the in vitro anti-*H. pylori* potential of four herbal substances including *Aloe vera*, curcumin, garlic, and plau-noi. **Methods and Materials:** A standard strain (NCTC 11637) and 9 clinical isolates of *H. pylori* were used to assess antibacterial activity of *Aloe vera*, curcumin, garlic, and plau-noi by using agar dilution and disk diffusion method. The agar dilution was tested by two-fold dilution of various concentration of herbal substances, ranging 0.016-512 micrograms/mL on Columbia blood agar. The disk diffusion was tested using various amounts of herbal substance at 20, 50, 100, 200 and 400 micrograms. **Results:** The minimum inhibitory concentrations (MICs) of *Aloe vera*, curcumin, garlic, and plaunotol were >512, 64, >512, >512 micrograms/mL, respectively. There were no inhibition zones found when testing with *Aloe vera*, garlic, and plau-noi, although the inhibition zone diameters of 6.5-8 mm and 10-12 mm were detected at 200 and 400 micrograms curcumin disk, respectively. **Conclusion:** Curcumin shows potential of in vitro antibacterial activity against *H. pylori* suggesting that it may be useful for the treatment of *H. pylori* infection, whereas, *Aloe vera*, garlic, and plau-noi have no antibacterial activity against *H. pylori* in this study.

Keywords: *Aloe vera*, curcumin, garlic, plau-noi, *H.pylori*

เรื่องที่ 3

Effects of Controlled Release Curcumin from Gelatin Hydrogel on Tumor-Angiogenesis Using Hep-G2 Implanted BALB/c-nude Mice Model

Introduction: This study was aimed to evaluate the benefit of novel curcumin gelatin-hydrogel patch on tumor anti-angiogenesis using the application of cholesterol-grafted gelatin-hydrogel technology. **Methods:** Animals were divided into three groups: control, hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice (Hep-G2, 30 μ l of 2×10^6 cells), and Hep-G2 treated with curcumin gelatin-hydrogel patch (Hep-G2-cur; curcumin 2-5 mg/ml per patch). Curcumin gelatin -hydrogel patch was placed within the chamber that was inoculated by Hep-G2 cells for two days. On day 14th after the Hep-G2 inoculation, tumor neocapillary was observed using intravital fluorescence videomicroscopy. Video images of epi-illuminated fluorescein (FITC-dextran-250) labeled tumor neocapillaries were obtained and evaluated for neocapillary density (CD) by using Global Lab Image II software. At the end of each experiment, tissue specimen was collected from tumor area for further hematoxylin-eosin (H&E) examination.

Results: In Hep-G2, CD ($68.69 \pm 0.9\%$) was significantly increased as compared to controlled CD ($32.18 \pm 3.37\%$). Interestingly, the CD value of Hep-G2-cur ($20.73 \pm 1.9\%$) was significantly less than the Hep-G2-CD ($p < 0.01$). In addition, H&E demonstrated that Hep-G2-cur tumor area was significantly less than Hep-G2-area as well.

Conclusion: Our results showed that the novel controlled release curcumin-gelatin hydrogel patch could attenuate tumor angiogenesis and consequently tumor growth.