# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

# โครงการ “การศึกษาผลไม้ไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและลดการเกาะติดเซลล์กระเพาะอาหาร ของเชื้อ Helicobacter pylori”

โดย ผศ.ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ และคณะ

มกราคม พ.ศ.2554

# แบบสรุปโครงการวิจัย

สัญญาเลขที่ RDG 5220042 ชื่อโครงการ การศึกษาผลไม้ไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและลดการเกาะติดเซลล์กระเพาะอาหาร ของเชื้อ *Helicobacter pylori*

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์
โทรศัพท์ 02-218-1084 โทรสาร 02-218-1083 อีเมล์ nuntaree@gmail.com

ความสำคัญ/ความเป็นมา

มะเร็งกระเพาะอาหารเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับที่สองของการเสียชีวิตจากมะเร็งทั้งหมดทั่วโลก สาเหตุของการเกิดโรคอันหนึ่งพบว่าเกิดจากการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* โดยพบอัตราการติดเชื้อนี้ในประชากรกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรทั้งหมดในโลก และพบอัตราการติดเชื้อสูงมากถึง 90% ในประเทศกำลังพัฒนาเช่นแอฟริกา และ เอเชีย ในประเทศไทยพบอัตราการติดเชื้อสูงถึงเกือบ 55-70 %ในประชากร เชื้อสามารถติดต่อจากคนสู่คนโดยทางการกิน ทางน้ำลาย และ อุจจาระจาก oral-oral, gastro-oral หรือ fecal-oral routes จึงมีโอกาสติดต่อกันได้ง่าย ปัจจัยในการเกิดโรคและพยาธิสภาพการเกิดโรคจะเริ่มจากเชื้อเข้าไปเกาะติด (adherance) บริเวณไมโครวิลไลของเซลล์เยื่อบุในกระเพาะอาหาร และมีการทำลายบริเวณดังกล่าว จากนั้นเชื้อจะบุกรุกเข้าไปยังภายในเซลล์ (invasion และ internallization) โดยกลไกที่ยังไม่ทราบแน่ชัด โปรตีน cytotoxin associated antigen (CagA) ที่เชื้อสร้างขึ้นจะtranslocateเข้าไปในเซลล์ซึ่งจะไปทำให้เกิดผลทางชีวภาพหลายอย่างต่อเซลล์ เช่น กระตุ้นให้เกิดขบวนการอักเสบโดย neutrophil activation NF-kB activation IL-8 induction กระตุ้นให้เกิดการ oxidation มีNitric oxide และ cyclooxygenase induction และทำให้เซลล์เกิดapoptosisในที่สุด อย่างไรก็ตามพบว่าปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคที่สำคัญที่สุดคือการเกาะติดของเชื้อบนผิวเซลล์มากกว่าการทำลายเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งพบว่าเชื้อนี้สามารถอาศัยอยู่ในกระเพาะอาหารได้เป็นเวลาหลายสิบปี ในขณะที่เชื้อจุลชีพอื่นมักจะถูกทำลายจากกรดในกระเพาะหรือถูกขจัดผ่านจากกระเพาะไปอยู่ในลำไส้ การรักษาโรคในปัจจุบัน จะใช้ยาลดกรดร่วมกับยาปฏิชีวนะ ซึ่งมีราคาแพง บางครั้งมีผลข้างเคียง และพบว่าเชื้อมีการดื้อยา การใช้สมุนไพรในการรักษาจึงเป็นการแพทย์ทางเลือกอีกทางหนึ่ง โดยมีการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ในหลายๆประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยด้วย อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ดังกล่าวในผลไม้ไทยมาก่อน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าผลไม้มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายประการ อาทิเช่นยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหลายๆชนิด ต้านการเกิดมะเร็ง ต้านการอักเสบ ตัวอย่างเช่น แอปเปิลมีฤทธิ์ในการต้านการเกิดมะเร็ง มังคุดมีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ ต้านโรคมะเร็ง ภูมิแพ้ ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัส เม็ดมะละกอมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่แยกจากปัสสาวะ แผล และ อุจจาระ กล้วย (*Musa sapientum*) มีฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์ในเยื่อบุกระเพาะหลั่งสารพวก mucin ออกมาเคลือบกระเพาะ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าสารสกัดmethanolของกล้วย มีฤทธิ์ทาง antiulcer และantioxidant ซึ่งช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งได้ การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดผลไม้ต่อการเจริญและการเกาะติดเซลล์เยื่อบุ HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคได้ ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารโดยใช้สารสกัดจากผลไม้ หรือ การบริโภคผลไม้ในชีวิตประจำวันได้

**วัตถุประสงค์ของโครงการ**

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของผลไม้ไทยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ*H. pylori*
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของผลไม้ไทยในการลดการเกาะติดเซลล์เยื่อบุHEp-2 ของเชื้อ *H.pylori*
3. เพื่อให้ได้หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ประกอบการส่งเสริมการบริโภคผลไม้ไทยในระดับประเทศ และระดับสากล

**ผลการวิจัย**

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผลไม้ไทยต่อการเจริญของเชื้อ *H. pylori* พบว่าน้ำจากเนื้อเงาะ และมะม่วง มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยมีค่า $MIC_{40}$ เท่ากับ 20 mg/ml ส่วนน้ำจาก ส้มโอ มะละกอ มังคุด ส้ม สับปะรด ฝรั่ง ลองกอง ทุเรียน พุทรา มะพร้าว ชมพู่ ละมุด น้อยหน่า แตงโม และลางสาด ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ในขณะที่ สารสกัดจากผลไม้ด้วยตัวทำละลายเอทานอลนั้น พบว่า น้อยหน่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีค่า $MIC_{50}$ เท่ากับ 20 mg/ml รองลงมาคือ มังคุด ทุเรียน พุทรา และ มะละกอ โดยมีค่า $MIC_{40}$ เท่ากับ 20 mg/ml ส่วนสารสกัดเอทานอลของ ส้มโอ ส้ม สับปะรด ฝรั่ง ลองกอง มะพร้าว ชมพู่ ละมุด แตงโม เงาะ มะม่วง และ ลางสาด ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเกาะติดของเชื้อกับเซลล์เยื่อบุ HEp-2 พบว่าสารสกัดเอทานอลของน้อยหน่ามีฤทธิ์ดีที่สุด มี% anti-adhesion เท่ากับ 76.3% รองลงมาคือ น้ำมะม่วง มี% anti- adhesion เท่ากับ 70% ผลไม้ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะของเชื้อได้ดีปานกลาง คือ สารสกัดเอทานอลของ มังคุด มะม่วง ฝรั่งแป้น ฝรั่งกลมสาลี่ ละมุด ชมพู่ น้ำฝรั่งแป้น และ น้ำฝรั่งกลมสาลี่ ถึงแม้ว่าสารสกัดมังคุดจะมีฤทธิ์ที่ดีแต่พบว่ามีผลต่อเซลล์HEp-2รวมทั้งการเรืองแสงของสารสกัดมังคุดเองทำให้มีผลต่อการวิเคราะห์ด้วยวิธีSpectrofluorometry ซึ่งต้องทำการศึกษาและทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมต่อไป

**การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์**

1. ทราบฤทธิ์ของผลไม้เศรษฐกิจของไทยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ*H. pylori* และ ต่อการต้านการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* ต่อ เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร เพื่อใช้ในการป้องกันการติดเชื้อและรักษาการติดเชื้อ *H. pylori*
2. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 1-2 เรื่อง
3. ผลิตบัณฑิตในระดับปริญญาโทที่มีความรู้ความเชี่ยวชาญในงานวิจัยระดับสูง

**หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์** ไม่มี

**การประชาสัมพันธ์**

1. ได้นำเสนอผลงานในรูปแบบPoster presentation at Federation of European Microbiological Society 2011 (FEMS 2011) วันที่ 26-30 มิถุนายน 2011 ที่เมืองเจนีวา สวิตเซอร์แลนด์
2. จะนำเสนอผลงานในรูปแบบนิพนธ์ต้นฉบับในวารสาร African Journal of Microbiology Research (Impact factor 0.528)

**บทคัดย่อ**

การเพิ่มขึ้นของการดื้อยาปฏิชีวนะเป็นปัญหาสำคัญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่รวมทั้งเชื้อ *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง แผลในกระเพาะอาหาร มะเร็งกระเพาะอาหาร และ MALT-lymphoma การรักษาทางเลือกใหม่โดยใช้พืชสมุนไพรโบราณมีข้อดีในด้านไม่มีความเป็นพิษหรือเป็นพิษน้อย ราคาถูก หาได้ง่ายในชนบท ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเนื้อผลไม้ไทย 19 ชนิด ต่อการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี agar dilution และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะของเชื้อ *H. pylori* ATCC43504 ต่อเซลล์ HEp-2 ด้วยเครื่อง spectrofluorometry ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอลของน้อยหน่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีค่า $MIC_{50}$ เท่ากับ 20 mg/ml รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านการเกาะติดของเชื้อต่อเซลล์เยื่อบุ HEp-2 ได้ดีที่สุด โดยมี% anti-adhesion เท่ากับ 76.3 รองลงมาคือน้ำมะม่วง มีค่า $MIC_{40}$ เท่ากับ 20 mg/ml และ% anti- adhesion เท่ากับ 70 ผลไม้ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้บ้าง คือ สารสกัดเอทานอลของ มังคุด ทุเรียน พุทรา และ มะละกอ น้ำเงาะ และ น้ำมะม่วง ในขณะที่ผลไม้ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะของเชื้อได้ดีปานกลาง คือ สารสกัดเอทานอลของ มังคุด มะม่วง ฝรั่งแป้น ฝรั่งกลมสาลี่ ละมุด ชมพู่ น้ำฝรั่งแป้น และ น้ำฝรั่งกลมสาลี่ ถึงแม้ว่าฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจากส่วนของเนื้อผลไม้จะด้อยกว่า ส่วน เปลือก ใบ และ เมล็ด แต่เป็นส่วนที่ใช้บริโภคได้โดยตรงหรือแปรในรูปของไวน์ผลไม้ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าอีกทั้งได้รับประโยชน์จากสารพฤกษเคมีในผลไม้ด้วย

**Abstract**

The increasing of antibiotic resistance is the serious problem of most pathogenic bacteria including *Helicobacter pylori* which is the etiologic agent of chronic gastritis, peptic ulceration, gastric carcinoma and gastric MALT-lymphoma. An alternative treatment using traditional plants is advantageous in less or nontoxic, cheap and availability in rural areas. In this study, we examined the activities of 19 Thai fruit mesocarp extracts on growth of *H. pylori* by agar dilution method and anti-adhesion activities of *H. pylori* ATCC43504 against HEp-2 cells by spectrofluorometry. The ethanolic extract of sugar apple (*Annona squamosa* L.) showed the most potent with $MIC_{50}$ of 20 mg/ml and superior anti-adhesion activity of 76.3% against HEp-2 cells. The potential anti-*H.pylori* activities were observed from ethanolic extracts of mangosteen, durian, common jujube, papaya, rambutan juice, mango juice. While, potential anti-adhesion activities were derived from ethanolic extracts of mangosteen, mango, sapodilla, rose apple and both ethanolic and aqueous extracts of guava (pan srithong) and guava (kom sali). Although, pharmacological activities of mesocarp of fruits are lower than exocarp (peel), endocarp (seed) leaf and other parts, people could eat fruits directly or process as wine. Fruit processing could increase more value and also obtain the pharmacochemical substances in fruits.

**บทนำ**

มะเร็งกระเพาะอาหารเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับที่สองของการเสียชีวิตจากมะเร็งทั้งหมดทั่วโลก รองจากมะเร็งปอด จึงนับเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญที่ต้องตะหนักในการหาวิธีป้องกันและรักษาที่มีประสิทธิภาพ ในประเทศไทยพบว่ามะเร็งกระเพาะอาหารเป็นสาเหตุอันดับที่ 6 ของมะเร็งในผู้ชาย และอันดับที่ 9 ของมะเร็งในผู้หญิง และมีความชุกประมาณ 3.9:100,000 คน และมีอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี ค่อนข้างต่ำ คือ 5-15% เท่านั้น (1, 2) สาเหตุของการเกิดโรคอันหนึ่งพบว่าเกิดจากการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* (3) โดยพบอัตราการติดเชื้อนี้ในประชากรกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรทั้งหมดในโลก และพบอัตราการติดเชื้อสูงมากถึง 90% ในประเทศกำลังพัฒนาเช่นแอฟริกา และ เอเชีย (4) ในประเทศไทยพบอัตราการติดเชื้อสูงถึงเกือบ 55-70 %ในประชากร (5) เชื้อสามารถติดต่อจากคนสู่คนโดยทางการกิน ทางน้ำลาย และ อุจจาระจาก oral-oral, gastro-oral หรือ fecal-oral routes จึงมีโอกาสติดต่อกันได้ง่าย (5) ปัจจัยในการเกิดโรคและพยาธิสภาพการเกิดโรคจะเริ่มจากเชื้อเข้าไปเกาะติด (adherance) บริเวณไมโครวิลไลของเซลล์เยื่อบุในกระเพาะอาหาร และมีการทำลายบริเวณดังกล่าว จากนั้นเชื้อจะบุกรุกเข้าไปยังภายในเซลล์ (invasion และ internallization) โดยกลไกที่ยังไม่ทราบแน่ชัด โปรตีน cytotoxin associated antigen (CagA) ที่เชื้อสร้างขึ้นจะtranslocateเข้าไปในเซลล์ซึ่งจะไปทำให้เกิดผลทางชีวภาพหลายอย่างต่อเซลล์ เช่น กระตุ้นให้เกิดขบวนการอักเสบโดย neutrophil activation NF-kB activation IL-8 induction (7) กระตุ้นให้เกิดการ oxidation มีNitric oxide และ cyclooxygenase induction และทำให้เซลล์เกิดapoptosisในที่สุด การติดเชื้อ *H. pylori* สายพันธ์ที่มียีน *cagA*+ จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งในกระเพาะอาหารมากกว่าการติดเชื้อสายพันธ์ *cag*A- (8) อย่างไรก็ตามพบว่าปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคที่สำคัญที่สุดคือการเกาะติดของเชื้อบนผิวเซลล์มากกว่าการทำลายเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งพบว่าเชื้อนี้สามารถอาศัยอยู่ในกระเพาะอาหารได้เป็นเวลาหลายสิบปี ในขณะที่เชื้อจุลชีพอื่นมักจะถูกทำลายจากกรดในกระเพาะหรือถูกขจัดผ่านจากกระเพาะไปอยู่ในลำไส้ จากการศึกษาพบว่ายีน *AlpA AlpB* และ *BabA*เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการเกาะติดของเชื้อ (10, 11, 12) โดยเฉพาะโปรตีน *BabA* พบว่าน่าจะใช้เป็นวัคซีนในการป้องกันและรักษาการติดเชื้อได้ (13)

การรักษาโรคในปัจจุบัน จะใช้ยาลดกรดร่วมกับยาปฏิชีวนะ ซึ่งมีราคาแพง บางครั้งมีผลข้างเคียง และพบว่าเชื้อมีการดื้อยา การใช้สมุนไพรในการรักษาจึงเป็นการแพทย์ทางเลือกอีกทางหนึ่ง ยาสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคกระเพาะสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐานได้แก่ ขมิ้นชัน กล้วย ขิง กานพลู กระเทียม กะเพรา ตะไคร้ พริกไทยดำ ดีปลี ข่า กระชาย แห้วหมู กระวานไทย เร่ว และ มะนาว (14) แต่สมุนไพรชนิดที่เป็นที่นิยมนำมาใช้ในการรักษาในปัจจุบันและมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *H. pylori* มีเพียง ขมิ้นชัน กระเทียม และ ขิง จะเห็นได้ว่าสมุนไพรหลายชนิดที่ใช้ในการรักษาโรคกระเพาะอาหารนั้นเป็นพืชผักสวนครัว หรือ เครื่องเทศที่ใช้ในการปรุงอาหาร การบริโภคพืชเหล่านี้น่าจะมีส่วนช่วยในการป้องกันและรักษาโรคได้ ผลไม้เป็นอาหารอีกกลุ่มหนึ่งที่เป็นที่นิยมในการบริโภค ซึ่งมีการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของผลไม้หลายๆชนิด เช่น ฤทธิ์ในการต้านการเกิดมะเร็งของแอปเปิล (15) มังคุดใช้ในการรักษาอาการปวดท้อง ท้องเดิน โรคบิด แผลติดเชื้อ และ โรคมะเร็ง ซึ่งจากการศึกษาพบว่ามังคุดมีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ ต้านโรคมะเร็ง ภูมิแพ้ ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัส (16) เม็ดมะละกอมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่แยกจากปัสสาวะ แผล และอุจจาระ (17) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* มาก่อน ยกเว้นกล้วย (*Musa sapientum*) ซึ่งพบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* (18) แต่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์ในเยื่อบุกระเพาะหลั่งสารพวก mucin ออกมาเคลือบกระเพาะ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าสารสกัดmethanol

ของกล้วย มีฤทธิ์ทาง antiulcer และantioxidant ซึ่งช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งได้ จากงานวิจัยที่ผ่านมาของผู้วิจัยพบว่ากล้วยน้ำว้า ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* แต่มีฤทธิ์ในการลดการบุกรุกของเชื้อต่อเซลล์เยื่อบุ HEp-2ได้ (19) ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจกรองฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ของผลไม้เศรษฐกิจของไทย เช่น มะม่วง ส้มโอ มะละกอ มังคุด ส้ม สับปะรด ฝรั่ง และลองกอง และทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเกาะติดของเชื้อต่อเซลล์เยื่อบุ HEp-2 เนื่องจากกลไกในการเกิดพยาธิสภาพที่สำคัญเริ่มจากการเกาะติดของเชื้อต่อเซลล์เยื่อบุ ผลจากการศึกษาสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *H. pylori* และลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารโดยใช้สารสกัดจากผลไม้ หรือ การบริโภคผลไม้ในชีวิตประจำวันได้

**วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**

ลักษณะและคุณสมบัติโดยทั่วไปของเชื้อ *H. pylori*

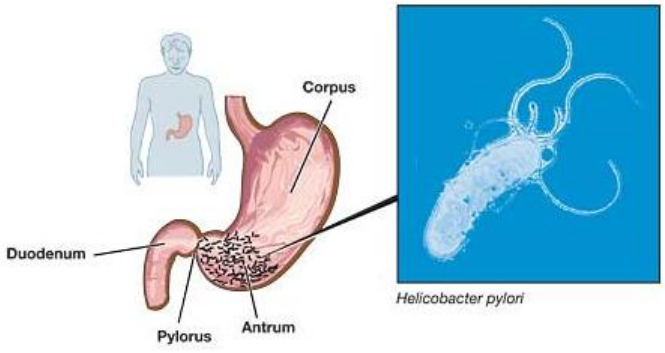
*H. pylori* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นเกลียว มีลักษณะคล้ายกับเชื้อ *Campylobacter*ขนาดจากการส่องกล้องจุลทรรศน์มีความยาว 2.5-5 μm กว้าง 0.5-1 μm มีflagella ประมาณ4-6 เส้น ลักษณะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและเหลวจากการส่องกล้องจุลทรรศน์สามารถเห็นเป็นรูปร่างแท่ง(rod) แต่ถ้าหากเลี้ยงไว้เป็นเวลานานจะพบว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น Coccoid forms คือ จะเห็นรูปร่างเป็นตัวU ที่เกิดจากการจับกันของปลายทั้งสองข้างของ *H. pylori* (20) การเคลื่อนที่คล้ายเกลียวสว่าน เจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีอากาศน้อย (microaerophilic) ต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ในการเจริญ สร้างเอมไซม์ยูรีเอส (Urease)ได้ดี สร้างเอมไซม์ oxidase catalase และ alkaline phosphatase ได้

ระบาดวิทยาและการแพร่กระจายของเชื้อ

เชื้อนี้มีอัตราการติดเชื้อในประชากรกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรโลก โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนามีอัตราการติดเชื้อนี้สูงถึง 70-90% ในประเทศไทยพบอัตราการติดเชื้อประมาณ 55% ในประชากรเด็กถึงผู้ใหญ่อายุ 30 ปี และ ในผู้ใหญ่อายุ 30 ปี ขึ้นไปพบอัตราการติดเชื้อสูงถึง 55-70% กลไกการแพร่ระบาดของเชื้อเกิดจากการติดต่อจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่งโดยผ่านทาง Fecal-oral transmission เป็นหลัก พบการติดเชื้อในครอบครัว (intrafamilial transmission) สูง ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการแพร่ระบาด เช่น สภาวะทางเศรษฐกิจและสังคม ประเทศที่ยากจน หรือ ประเทศกำลังพัฒนาพบว่ามีอัตราการติดเชื้อสูงกว่าประเทศที่พัฒนา สุขลักษณะและความสะอาดที่ไม่ดี ที่อยู่อาศัยที่แออัด และระดับการศึกษาที่น้อย เหล่านี้พบว่ามีผลทำให้อัตราเกิดการระบาดของเชื้อสูง (4, 5)

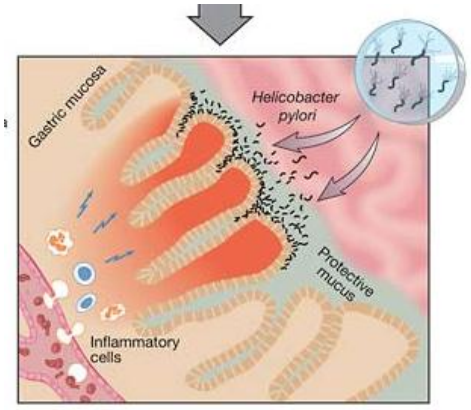
พยาธิสภาพการก่อโรคของเชื้อ *H. pylori*

พยาธิสภาพการเกิดโรคเริ่มต้นเมื่อได้รับเชื้อ *H. pylori* เชื้อจะผ่านเข้าไปในกระเพาะอาหาร และเชื้อส่วนใหญ่จะรวมตัวกันอยู่ในส่วน Antrum ของกระเพาะอาหาร ดังรูปที่ 1




รูปที่ 1 บริเวณที่พบเชื้อ *H. pylori* มากที่สุดในกระเพาะอาหาร

เชื้อ *H. pylori* มีความสามารถในการหลบหลีกสภาวะที่ไม่เหมาะสมในกระเพาะอาหารด้วยการสร้างเอนไซม์ Urease ซึ่งเปลี่ยน urea เป็น ammonia ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่างจึงไปลดความเป็นกรดของกรดในกระเพาะอาหารทำให้เชื้อไม่ถูกทำลาย เมื่อเชื้อ *H. pylori* มาถึงบริเวณ Antrum ของกระเพาะอาหารก็จะมีการเคลื่อนที่ผ่านเยื่อเมือก(mucus)ที่ปกป้องเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร(gastric mucosa)โดยอาศัยการสร้างเอนไซม์ mucinase ทำให้เชื้อเคลื่อนที่ผ่านชั้นเยื่อเมือกได้รวดเร็ว ในกระเพาะอาหารเชื้อจะเกาะติดอยู่กับเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร(gastric mucosa) ดังรูปที่ 2 flagella ของเชื้อยังสามารถจับกับช่องเว้าระหว่างเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร(gastric niche)ทำให้เชื้อสามารถเกาะติดอยู่กับเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารได้ดียิ่งขึ้น




รูปที่ 2 การเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* ที่เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร

พยาธิสภาพที่เกิดตามมาคือ เชื้อ *H. pylori* จะกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ มารวมกันบริเวณใต้เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร(gastric mucosa)เม็ดเลือดขาวเหล่านี้จะหลั่งสารไซโตไคน์(cytokine)ทำให้เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร(gastric mucosa)เกิดการอักเสบ(inflammatory)เป็นเหตุให้เกิดเป็นโรคเพาะอาหารอักเสบ เมื่อผ่านไประยะหนึ่งเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร(gastric mucosa)ที่เกิดการอักเสบจะเกิดการตาย(apoptosis)ทำให้พยาธิสภาพพัฒนาไปเป็นโรคแผลในกระเพาะอาหาร ในคนไข้ที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง(chronic gastritis)ที่มีปัจจัยทั้งภายในและภายนอกที่เหมาะสม พยาธิสภาพสามารถพัฒนาไปเป็นมะเร็งในกระเพาะอาหาร(gastric cancer)ได้ ปัจจัยความรุนแรงของโรคดังสรุปในตารางที่ 1 (7, 20, 22)

| Virulence Factor | Effect |
|---|---|
| Colonizing | |
| Flagella | Active movement through mucin |
| Urease | Neutralization of acid |
| Adhesins | Anchoring *H. pylori* to epithelium |
| Tissue damaging | |
| Proteolytic enzymes | Glucosulfatase degrades mucin |
| 120-k Da cytotoxin (Gac A) | Related to lucer and severe gastriris |
| Vacuolating cytotoxin (Vac A) | Damage of the epithelium |
| Urease | Toxic effect on epithelial cells, disrupting cell tight junctions |
| Phospholipase A | Digest phospholipids in cell membranes |
| Alcohol dehydrogenase | Gastric mucosal injury |
| Survival | |
| Intercellular surveillance | Prevent killing in phagocytes |
| Superoxide dismutase | Prevent phagocytosis and killing |
| Catalase | Prevent phagocytosis and killing |
| Coccoid forms | Dormant form |
| Heat shock proteins | |
| Urease | Sheathing antigen |
| Other | |
| Lipopolysaccharide | Low biological activity |
| Lewis X/Y blood group homology | Autoimmunity |

ตารางที่ 1 ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคของเชื้อ *H. pylori* (20).

<u>การเกาะติด(adherence) ของเชื้อ *H. pylori* กับเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร</u>

การเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* เป็นขั้นตอนสำคัญขั้นตอนแรกของการเกิดพยาธิสภาพ เชื้อจะมีการบุกรุกผ่านชั้นเยื่อเมือกของกระเพาะและไปเกาะที่เซลล์เยื่อบุ จากนั้นเชื้อบางส่วนจะโคโลไนส์ที่บริเวณเซลล์เยื่อบุและบางส่วนจะมีการบุกรุกเข้าไปในเซลล์และกระตุ้นให้เกิดพยาธิสภาพตามมา(20) การเกาะติดและการบุกรุกของเชื้อทำให้เชื้ออยู่ในเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารได้เป็นระยะเวลายาวนาน และยังเป็นปัจจัยทำให้เกิดการกลับเป็นซ้ำได้ นอกจากนั้นยังพบว่าการเกาะติดเป็นขั้นตอนที่สำคัญของการสร้างไบโอฟิลม์ของเชื้อ ซึ่งเชื้อที่สร้างไบโอฟิลม์จะสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมได้ดี มีการสำรวจพบเชื้อจากแหล่งน้ำเช่น แม่น้ำ น้ำประปา

แหล่งบำบัดน้ำเสีย ภาชนะเก็บน้ำ ในหลายๆประเทศ (23, 24) ซึ่งคาดว่าแหล่งน้ำน่าจะเป็นปัจจัยในการระบาดของเชื้อที่สำคัญอีกทางหนึ่ง พบโปรตีนadhesinหลายชนิดเกี่ยวข้องกับการเกาะของเชื้อดังสรุปในตารางที่ 2 (20)

เนื่องจากปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียที่เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้นจึงได้มีการหาแนวทางใหม่ในการรักษา การหาวิธีต้านการเกาะติดของเชื้อเป็นวิธีการหนึ่งที่เป็นที่สนใจ เนื่องจากการเกาะเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญในการเกิดพยาธิสภาพของโรค ดังนั้นการป้องกันไม่ให้เชื้อเกาะกับเซลล์เจ้าบ้าน นอกจากจะเป็นการป้องกันและรักษาโรคแล้ว ยังลดการสร้างไบโอฟิลม์ของเชื้อได้ ทำให้เชื้อไม่ทนต่อสภาวะแวดล้อม ยาปฏิชีวนะและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสามารถเข้าถึงตัวเชื้อได้ง่ายขึ้น ทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อมากขึ้น (26)

| *H. pylori* adhesin | Host cell receptor |
|---|---|
| AlpA, AlpB | Unknown |
| BabA | Lewis b |
| HopZ | Unknown |
| HpaA, Nap; 64 kDa, 62 kDa, 56 kDa, 20 kDa | N-acetlyneuraminyllactose (sialic acid) |
| Hsp60, Hsp70 | Lactosylceramide sulfate, galactosylceramide sulfate (sulfatides) |
| LPS | 97-kDa mucin receptor |
| LPS core | Laminin |
| LPS O antigen (Lewis X); Nap | Lewis X |
| Nap | Gastric mucin |
| 19.6 kDa (ferritin) | Laminin |
| 25 kDa | Laminin |
| 61-kDa protein | H type 2 (O antigen), Lewis b, Lewis a |
| 63 kDa (Exoenzyme S-like adhesin) -catalase; Nap | Heparan sulfate and other sulfated polysaccharides; phosphatidylethanolamine, gangliotriaosylceramide (GM3), gangliotetraosylceramide (GM2), gangliotriaosylceramide; gangliotetraosylceramide |
| Unknown | Class II MHC |
| Unknown | beta-1 integrins |

ตารางที่ 2 โปรตีน adhesin ของเชื้อ *H. pylori* และ receptorของเซลล์เจ้าบ้าน (10).

การรักษา

การรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหาร ในปัจจุบันใช้เคมีบำบัดเป็นหลัก โดยใช้ยา 3 ชนิด (Triple therapy) ซึ่งประกอบไปด้วย ยาลดกรดในกระเพาะอาหาร (gastric acid inhibitor) 1 ชนิด และยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด เช่น metronidazole, amoxicillinหรือ clarithromycin แต่ในปัจจุบันเชื้อ *H. pylori* มีการดื้อต่อยา metronidazole, clarithromycin และ tetracycline เพิ่มขึ้น (27) พบการดื้อยา nitronidazole ประมาณร้อยละ 35 (28) สาเหตุการดื้อยาที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดมาจากการใช้ยา metronidazole เป็นจำนวนมากทำให้เกิดผลต่อการดื้อยา nitronidazole ปรากฏการณ์ของการดื้อยาของเชื้อ *H. pylori* ในยากลุ่ม macrolide เช่น clarithromycim และ erythromycin พบว่ามีต่ำกว่า คือมีการดื้อยาอยู่ที่ร้อยละ 10 (29) ส่วนการดื้อยา amoxicillin และ tetracycline พบได้น้อยมาก อย่างไรก็ตามปรากฏการณ์ของการดื้อยา amoxicillin และ tetracycline มีแนวโน้มสูงขึ้นในหลายๆประเทศ เช่น อิตาลี, บราซิล และอินเดีย เป็นต้น มีรายงานอัตราการดื้อของยาทั้ง 2 ชนิดนี้ถึงร้อยละ 72 (30)

สมุนไพรกับการรักษาการติดเชื้อ *Helicobacter pylori*

เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* เป็นการรักษาที่มีค่าใช้จ่ายสูง และยังพบการดื้อยาของเชื้อ ทำให้การรักษาไม่ประสบผลสำเร็จ จึงมีความสนใจในการศึกษาผลของสมุนไพรต่อการรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* เนื่องจากสมุนไพรเป็นพืชที่ใช้ในชีวิตประจำวัน มีราคาถูก และไม่เกิดผลข้างเคียงในการใช้ ทำให้มีการศึกษาถึงผลของสมุนไพรต่อเชื้อ *H. pylori* เป็นจำนวนมากในหลายๆด้านด้วยกัน ได้แก่ การศึกษาพืชที่ใช้ในการปรุงอาหารของประเทศอังกฤษ (31) พบว่า columbo weed, ดีปลี, ผักชีฝรั่ง, tarragon, ลูกจันท์เทศ, yellow-berried nightshade, threadstem carpetweed, sage และ อบเชย สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ การศึกษาสารสกัดจากผลแอพริคอทของประเทศญี่ปุ่นในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* (32) พบว่าสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* ได้มากกว่า 90% ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml, การศึกษาสารประกอบใน cranberry (33) พบว่าที่ความเข้มข้น 0.2 mg/ml สารสามารถยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* ได้ การศึกษาสาร pectin-like acidic polysaccharide จากโสมเกาหลี (34) ในการยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียชนิดต่างๆ พบว่าสารนี้ไม่มีผลต่อการเกาะติดของเชื้อแบคทีเรีย แต่ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*, การศึกษาสาร plumbagin ที่สกัดได้จากสมุนไพรเจตมูลเพลิงขาวในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* (35) พบว่าสารนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้น 0.02-0.16 mg/ml และ การศึกษาสาร curcumin จากขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* (36) พบว่าสารนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้น 6.25-50 µg/ml เครื่องเทศและพืชที่ใช้เป็นอาหารของคนไทย พบว่า ดอกจันทน์เทศ, ใบต้นจิก, เปราะหอม และ กานพลู สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* โดยดอกจันทน์เทศมีค่า MIC สูงที่สุดที่ 12.5µg/ml (37), การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสมุนไพรสมอไทยพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้น 1-2.5 mg/ml (38), การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ของกระเทียมพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้น 8-32 µg/ml (39) ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากกระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้น 250-500 µg/ml, การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ของกล้วยพบว่ากล้วยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ที่ความเข้มข้น 0.32-1000 µg/ml (18) เป็นต้น

ฤทธิ์ทางชีวภาพของผลไม้ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ผลไม้สามารถใช้เป็นยาสมุนไพรได้ ผลไม้นอกจากจะอุดมไปด้วยวิตะมินและแร่ธาตุที่เป็นประโยชน์กับร่างกายแล้ว ยังมีส่วนประกอบของเส้นใยอาหารและสารพฤกษเคมีที่สำคัญหลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระ ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านมะเร็ง ชะลอความชรา ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีผลไม้มากมายหลายชนิดให้เลือกรับประทานแทบทุกฤดูกาลจากทุกภูมิภาค ผลไม้ไทยหลายชนิดมีสรรพคุณทางยาที่สามารถนำมาใช้รักษาโรคต่างๆ นับแต่อดีตกาล ผลไม้หลายชนิดให้สรรพคุณในการรักษาโรคทางเดินอาหาร เช่น ส้มโอ มังคุด ทับทิม มะขามป้อม ฝรั่ง กล้วย ขนุน ชมพู่ น้อยหน่า มะละกอ สับปะรด จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าผลไม้หลายชนิดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น ฝรั่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาแบบ multidrug (43) ต้านเชื้อที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ เช่น *E. coli, Salmonella enteritidis, Vibrio parahaemolyticus, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes* และต้านเชื้อที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Pseudomonas aeruginosa, P. putida, Alcaligenes faecalis, Aeromonas hydrophila, Clostidium perfingen* (44) มะละกอมีฤทธิ์ต้านเชื้อที่แยกจากปัสสาวะ อุจจาระ แผล หนอง ของผู้ป่วย เช่น *E. coli S. aureus S. typhi* (17) การรับประทานผักผลไม้ยังช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารได้ (46)

**วัตถุประสงค์**

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของผลไม้ไทยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ*H. pylori*
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของผลไม้ไทยในการลดการเกาะติดเซลล์เยื่อบุHEp-2 ของเชื้อ *H. pylori*
3. เพื่อให้ได้หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ประกอบการส่งเสริมการบริโภคผลไม้ไทยในระดับประเทศ และระดับสากล

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1. ทราบฤทธิ์ของผลไม้เศรษฐกิจของไทยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ*H. pylori* และ ต่อการต้านการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* ต่อ เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร
2. นำไปใช้ประโยชน์ในการนำสารสกัดจากผลไม้ไปใช้ในการป้องกันการติดเชื้อและรักษาการติดเชื้อ *H. pylori*
3. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 1-2 เรื่อง
4. ผลิตบัณฑิตในระดับปริญญาโทที่มีความรู้ความเชี่ยวชาญในงานวิจัยระดับสูง

## วิธีวิจัย

1. เชื้อ *H. pylori* และ วิธีการเพาะเลี้ยง

เชื้อที่ใช้มีดังนี้ เชื้อสายพันธ์มาตรฐาน 2 สายพันธุ์ คือ *H.pylori* ATCC 43504 ATCC 43526 และเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยประมาณ 17 สายพันธุ์ รวม 19 สายพันธุ์ เพาะเลี้ยงบน Brain heart infusion agar ที่เติม 5% เลือดแกะ บ่มที่ 37องศาเซลเซียส ในสภาวะ microaerophilic เป็นเวลา 3 วัน

2. การเตรียมผลไม้สำหรับสกัด

ซื้อผลไม้ชนิดต่างๆ ดังนี้ มะม่วง ส้มโอ มะละกอ มังคุด ส้ม สับปะรด ฝรั่ง ลองกอง ทุเรียน เงาะ พุทรา มะพร้าว ชมพู่ ละมุด น้อยหน่า แตงโม และ ลางสาด จากตลาดสดและซุปเปอร์มาร์เก็ต ปริมาณ 1.5 กิโลกรัม บันทึกรายละเอียดต่อไปนี้ ชนิดผลไม้ พันธุ์ แหล่งปลูก แหล่งที่ซื้อ วันที่ซื้อ ล้างผลไม้ที่ซื้อมาด้วยน้ำให้สะอาด ทำการแกะเปลือกทิ้ง ชิมว่ามีรสชาติอย่างไร แยกเฉพาะส่วนเนื้อมาอบที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชม (ยกเว้นผลไม้ที่มีน้ำมา เช่น แตงโม ส้ม เป็นต้น จะนำมาสกัดสด) ชั่งน้ำหนักผลไม้ที่อบแห้ง แบ่งเป็น 2 ส่วนเท่าๆกัน ส่วนที่ 1 สกัดด้วยน้ำ โดยนำเนื้อผลไม้ที่อบแห้ง บดหรือปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น มูลิเน็ก (Moulinex) กรองเอาแต่น้ำด้วยผ้าขาวบาง หลายๆชั้น ปั่นที่ 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที กรองน้ำส่วนใสผ่านกระดาษ whatman No1 นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilize ละลายสารสกัดที่แห้งแล้วด้วย DMSO เก็บที่-20 องศาเซลเซียส สำหรับการสกัดด้วยเอทานอล ให้นำเนื้อผลไม้ที่อบแห้ง บดหรือปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น มูลิเน็ก (Moulinex) หมักใน95% เอทานอล ปริมาณเท่าตัว ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง กรองผ่านกระดาษ whatman No1 นำสกัดเอทานอลไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ตามด้วย lyophilization ละลายสารสกัดที่แห้งแล้วด้วย DMSO เก็บที่-20 องศาเซลเซียส

3. การทดสอบฤทธิ์ของผลไม้ไทยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*

นำสารสกัดจากผลไม้ที่เตรียมไว้มาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) โดยวิธี agar dilution method โดยเจือจางสารสกัดผลไม้ใน Muller Hinton broth ให้ความเข้มข้นของสารลดลงทีละครึ่งตามลำดับ (2-folds dilution) ผสมสารที่เจือจางแล้วกับ Mueller Hinton agar ที่ผสมเลือดแกะ5% เทลงในจานอาหาร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดผลไม้ตั้งแต่ 0.625 ถึง 20 mg/ml (รายละเอียดการเจือจาง แสดงในภาคผนวก) positive control จะใช้ Mueller Hinton agar (ที่ผสมเลือดแกะ5%) ที่ไม่มีสารสกัด และ Mueller Hinton agar (ที่ผสมเลือดแกะ 5%) ที่ผสม DMSO ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้เจือจางสารสกัด จากนั้นจุดเชื้อ *H. pylori* สายพันธ์ต่างๆที่ความเข้มข้น McFarland standard 2 ($10^7$-$10^8$ CFU/มล) ลงบนอาหาร เพาะเลี้ยงในตู้บ่ม ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ในmicroaerophilic ค่า MIC คือค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ ในการทดสอบขั้นตอนนี้จะทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

4. การเพาะเลี้ยงเซลล์ HEp-2

เซลล์เยื่อบุ Human larynx carcinoma (HEp-2) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.พรเทพ เทียนสิวากุล ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพาะเลี้ยงเซลล์ HEp-2 ใน RPMI1640 ที่ผสม10% fetal bovine serum และ 1% antibiotic-antimycotic solution บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% $CO_2$ ความชื้น 80% ล้างเซลล์ด้วย Dulbecco's phosphate buffered saline

(DPBS) 2 ครั้ง และ trypsinized เซลล์ นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงใน six wells tissue culture plates หลุมละ $1X10^6$ cells ข้ามคืนที่สภาวะข้างต้น

5. การทดสอบสารสกัดผลไม้ต่อการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* บนเซลล์เยื่อบุHEp-2

นำเชื้อ *H. pylori* ที่เพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 3 วัน มาresuspended ใน RPMI1640 ปริมาตร 1 ml ให้ได้ความเข้มข้นที่ $OD_{600}$ = 2.0 บ่มกับ 10 µl 0.1% FITCที่ละลายใน DMSO ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในที่มืด ล้าง 3 ครั้ง ใน RPMI 1640 ที่ผสม0.1% Tween 20 นำเซลล์ HEp-2 ที่เพาะเลี้ยงใน 6 wells plate มาล้างด้วย RPMI 1640 และเติมเชื้อ *H. pylori* ที่ติดฉลากด้วย FITC หลุมละ 100 µl หลุมควบคุมที่ 1ไม่มีสารสกัด, หลุมควบคุมที่ 2 มี DMSO ความเข้มข้นสูงสุดที่ละลายสารสกัด และหลุมทดสอบมีสารสกัดผลไม้ บ่มเป็นเวลา 2 ชม ที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% $CO_2$ ความชื้น 80% จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้ง และวัดปริมาณเชื้อที่เกาะด้วยเครื่อง Microplate reader (Biotek Synergy Mx, USA) (excite ที่ 485 nm และ detect ที่ 528 nm) และดูลักษณะของการเกาะติดด้วยกล้อง Fluorescence (Olympus BX50, Japan) บันทึกภาพ

สำหรับการศึกษาลักษณะของการเกาะติดด้วยกล้องConfocal laser scanning microscope (Carl Zeiss, Germany) จะนำเซลล์ที่ทดสอบการเกาะติดข้างต้นมาย้อมด้วย DAPI เป็นเวลา 15 นาที บันทึกภาพ

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองจะแสดงเป็น Mean±SE ของอย่างน้อยสองการทดลอง การเปรียบเทียบทางสถิติของระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดผลไม้กับกลุ่มทดลองที่เติมสารสกัดจากผลไม้ใช้ one-way anova โดยใช้โปรแกรม SPSS ค่า P ที่ $\leq 0.05$ จะสันนิษฐานว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

## ผลการวิจัยและอภิปรายผล

### 1. ผลผลิตจากการสกัดเนื้อผลไม้

จากการสกัดเนื้อผลไม้19 ชนิด ด้วยน้ำ พบว่าส้มโอ พันธุ์ ขาวแป้น รองลงมาคือ มะละกอ พันธุ์แขกดำ โดยให้ผลผลิตสูงสุดคือ 19.3% และ 14.37 ตามลำดับ ขณะที่ ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ให้ผลผลิตต่ำสุดเพียง 0.68% และ การสกัดเนื้อผลไม้19 ชนิด ด้วยเอทานอล พบว่า เงาะพันธุ์โรงเรียนนาสาร และ แตงโมพันธุ์กินรี ให้ผลลิตสูงสุดใกล้เคียงกัน คือ 30.59% และ 30.56% ตามลำดับ ส่วนละมุดพันธุ์มาเลย์ ให้ผลผลิตต่ำสุดคือ 1.9% ผลดังแสดงใน ตารางที่ 1

### 2. ฤทธิ์ของสารสกัดผลไม้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผลไม้ไทย ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Helicobacter pylori* ทั้งหมด 19 สายพันธุ์ เป็นสายพันธ์มาตรฐาน ATCC 2 สายพันธุ์ และ สายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้ 17 สายพันธุ์ ผลเป็นดังตารางที่ 2 และ 3 พบว่าสารสกัดจากผลไม้ด้วยน้ำมีเพียง เงาะ และ มะม่วง ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยมีค่า $MIC_{40}$ (คือความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 40%) เท่ากับ 20 mg/ml ส่วนน้ำจาก ส้มโอ มะละกอ มังคุด ส้ม สับปะรด ฝรั่ง ลองกอง ทุเรียน พุทรา มะพร้าว ชมพู่ ละมุด น้อยหน่า แตงโม และ ลางสาด ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ในขณะที่ สารสกัดจากผลไม้ด้วยตัวทำละลายเอทานอลนั้น ผลที่ได้พบว่า น้อยหน่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีค่า $MIC_{50}$ (คือความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 50%) เท่ากับ 20 mg/ml รองลงมาคือ มังคุด ทุเรียน พุทรา และ มะละกอ โดยมีค่า $MIC_{40}$ เท่ากับ 20 mg/ml ส่วนสารสกัดเอทานอลของ ส้มโอ ส้ม สับปะรด ฝรั่ง ลองกอง มะพร้าว ชมพู่ ละมุด แตงโม เงาะ มะม่วง และ ลางสาด ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ DMSO ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ละลายสารสกัดแต่ละชนิด (4-25% v/v) พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ

จะเห็นได้ว่าระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อผลไม้ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* (MIC) มีระดับค่อนข้างค่าสูงมาก เมื่อเทียบกับสมุนไพร หรือสารสกัดจากส่วนเปลือก ใบ และเมล็ด ของผลไม้ ฤทธิ์ของสมุนไพรที่มีการศึกษาที่ผ่านมาจะมีความเข้มข้นอยู่ในระดับไมโครกรัม ตัวอย่างเช่น สารสกัดเอทานอลของสมุนไพรจีน *Abrus cantoniensis* (Fabaceae), *Saussurea lappa* (Asteraceae) และ *Eugenia caryophyllata* (Myrtaceae) มีฤทธิ์ดีที่สุด โดยมีค่า MIC = 40 μg/ml รองลงมา คือ *Hippophae rhamnoides*, *Fritillaria thunbergii* (Liliaceae), *Magnolia officinalis* และ *Schisandra chinensis*, *Corydalis yanhusuo*, *Citrus reticulata*, *Bupleurum chinense* และ *Ligusticum chuanxiong* มีค่า MIC = 60 μg/ml (47) การศึกษาสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรประเทศไต้หวัน 50 ชนิด พบว่า *Paederia scandens* (Lour.) Merr. , *Plumbago zeylanica L.*, *Anisomeles indica (L.)*, *Bombax malabaricum* และ *Alpinia speciosa* และ *Bombax malabaricum* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* โดยมีค่า MIC ตั้งแต่ 0.64-10.24 mg/ml (48) การศึกษาสมุนไพร 53 ชนิดของเม็กซิโก พบว่า น้ำสมุนไพรจาก *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*, *Cuphea aequipetala*, *Ludwigia repens* และ *Mentha x piperita* มี MIC ต่อ *H. pylori* ที่ 125 ถึง <250 μg/ml ขณะที่ สารสกัดเมทานอลจาก *Persea americana*, *Annona cherimola*, *Guaiacum coulteri*, และ *Moussonia deppeana* มี MIC ต่อ *H. pylori* ที่ <7.5 ถึง 15.6 μg /ml (49) สารสกัดเมทานอลของสมุนไพร 10 ชนิด ของประเทศคาเมรูน พบว่า *A. conyzoides*, *S. striatinux* และ *L. cernua* มี MIC ต่อ *H. pylori* ที่ 0.32-1 mg/ml (50) ในประเทศไทยมีการศึกษาเครื่องเทศและพืชสมุนไพร 20 ชนิด พบว่า *Myristica fragrans* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ดีที่สุดโดยมีค่า MIC =12.5 μg/ml *Barringtonia acutangula* (ใบ) และ *Kaempferia galangal* (ราก) มีค่า MIC = 25 μg/ml ขณะที่ *Cassia grandis* (ใบ),

*Cleome viscosa* (ใบ), *Myristica fragrans* (ใบ) และ *Syzygium aromaticum* (ใบ) มีค่า MIC = 50 μg/ml (37) นอกจากการศึกษาฤทธิ์จากสารสกัดสมุนไพรชนิดต่างๆ ผลไม้พบว่าเป็นอาหารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายอย่าง เป็นต้นว่า มีสารต้านอนุมูลอิสระ (54, 55) ฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง (58, 59) ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (54, 60) รวมทั้งมีคุณค่าทางโภชนาการเป็นแหล่งของวิตะมินนานาชนิด การศึกษาสารสกัดจากเมล็ดมะม่วงไทย พบว่าสายพันธุ์ฟ้าลั่นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุดเมื่อเทียบกับน้ำดอกไม้ และ โชคอนันต์ และมีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ดีที่สุด (54) มังคุดเป็นผลไม้ที่มีฤทธิ์ทางพฤกษเคมีและเภสัชวิทยาที่ใช้เป็นสมุนไพรในประเทศเอเชียตะออกเฉียงใต้มาแต่อดีต ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดีและนิยมใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่ผิวหนังและแผลฝีหนอง สารสกัดน้ำจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดด้วยเมทานอลและเฮกเซน (56, 57) สารxanthone ในเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งสำไส้ ทำให้เซลล์ตาย (apoptosis) ผ่านกลไกcaspase (58) สำหรับการศึกษาฤทธิ์ของผลไม้ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านมา พบว่า ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษของฝรั่งอยู่ระหว่าง 0.1-6.5 mg/ml (44) ผนังผล (pericarps) มังคุดพบว่ามีค่า MIC ต่อเชื้อ *Candida albicans* เท่ากับ 1 mg/ml และต่อเชื้อรา ที่ 2 mg/ml (61) ผลไม้ตระกูลส้มและมะนาวในส่วนของน้ำและสารสกัดจากเอทานอลมีฤทธิ์ต่อเชื้อanaerobes และ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และเชื้อแกรมลบโดยค่า MIC อยู่ระหว่าง 64-512 mg/ml (62) สารสกัดจากเมล็ดมะละกอด้วยเมทานอล มีค่า $MIC_{50}$ ต่อเชื้อ *Salmonella* Typhi เท่ากับ 18.38 mg/ml (17) การศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรในประเทศอินเดียพบว่า มะม่วง มีค่า MIC ต่อ methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) อยู่ระหว่าง 0.31-6.25 mg/ml และ MIC ต่อ extended spectrum beta lactamases (ESBL) อยู่ระหว่าง 0.32-7.5 mg/ml (64) ผลไม้ในตระกูลน้อยหน่าของประเทศยูกานดา มีค่า MIC ต่อ *S. aureus* เท่ากับ 62.5 mg/ml (65) สารสกัดของใบฝรั่งมี MIC ต่อ multidrug-resistant *Vibrio cholerae* O1 ที่ 1.25 mg/mL (66) และ MIC ต่อ multidrug resistant *S. aureus* ที่ 7.5 mg/mL (43) จะเห็นได้ว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของผลไม้ต่อเชื้อแบคทีเรียจะด้อยกว่าพืชสมุนไพร อาจเนื่องจากองค์ประกอบทางพฤกษเคมีที่แตกต่างกัน

**3. ฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลของผลไม้ไทยชนิดต่าง ๆในการต้านการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 ต่อเซลล์เยื่อบุ HEp-2**

เนื่องจากการเกาะของเชื้อเป็นกลไกที่สำคัญของการติดเชื้อซึ่งนำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพของโรค การหาสารที่มีฤทธิ์ต้านการเกาะติดของเชื้อจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เริ่มมีการศึกษากันมากขึ้น ในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเกาะติดของเชื้อกับเซลล์เยื่อบุ HEp-2 โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละชนิดเท่ากับ 20 mg/ml เปรียบเทียบกับ หลุมควบคุมที่ไม่มีสารสกัด และหลุมควบคุมที่มี DMSO ที่ความเข้มข้นสูงที่สุดที่ใช้ละลายสารสกัดคือ 4-25% v/v บ่มกับเชื้อที่ติดฉลากด้วยFITC เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยวัดปริมาณสารเรืองแสง เปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์กับหลุมควบคุมที่ไม่มีสารสกัด ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 1 พบว่าสารสกัดเอทานอลของน้อยหน่ามีฤทธิ์ดีที่สุด มี% adhesion เท่ากับ 23.7% รองลงมาคือ มังคุด มี% adhesion เท่ากับ 25.7% ผลไม้ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะของเชื้ออยู่ระหว่าง 37.3-56.1% คือ มะม่วง ฝรั่งแป้น ฝรั่งกลมสาลี่ ละมุด และ ชมพู่ ในขณะที่สารสกัดจากน้ำผลไม้ พบว่าน้ำมะม่วงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะได้ดีที่สุด มี% adhesion เท่ากับ 30% รองลงมาคือฝรั่งแป้น และ ฝรั่งกลมสาลี่ โดยมี% adhesion เท่ากับ 55.4 และ 61.5 % ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารสกัดเอทานอลของมังคุดมีผลทำให้เซลล์หลุดลอกจากพื้นผิวขณะทำการทดสอบทำให้ไม่สามารถวัดฤทธิ์ได้อย่างแท้จริงเนื่องจากปริมาณสารเรืองแสงที่ต่ำลงมากนั้นอาจเกิดจากผล

ของการหลุดของเซลล์ และยังพบว่าสารสกัดมังคุดสามารถเรืองแสงได้ทำให้รบกวนการวัด จากการทดสอบเบื้องต้นโดยการบ่มเชื้อกับสารสกัดมังคุดพร้อมกับสารที่ใช้ติดฉลากก่อนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และล้างสารสกัดออกก่อนนำมาทดสอบการเกาะติดกับเซลล์ พบว่าสารสกัดมีแนวโน้มในการลดการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* กับเซลล์เยื่อบุ HEp-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ซึ่งต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป การศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรต่อการเกาะของเชื้อ*H. pylori* ต่อเซลล์เยื่อบุ ยังมีไม่มากนัก ที่มีรายงานได้แก่ สารสกัด Eps7630 (*Pelargonium sidoides*) มีผลต้านการเกาะของเชื้อ *H. pylori* โดยขัดขวางปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโปรตีน 16moxicil ของเชื้อกับไกลโคโปรตีนและmucinบนเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร (53) สาร acidic polysaccharide จากพืชหลายชนิด เช่นใบชาเขียว (*Camellia sinensis*) ราก *Panex ginseng* ใบ *Artemisia capillaries* พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะของเชื้อ *H. pylori* กับเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารได้ (63)

เนื่องจากพบว่าสารสกัดเอทานอลของน้อยหน่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะของเชื้อกับเซลล์ HEp-2 ได้ดีที่สุด จึงทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอลของน้อยหน่า ที่ MIC, 2MIC, 4 MIC และ 8 MIC หรือ ความเข้มข้นที่ 20, 40, 80, 160 mg/ml ตามลำดับต่อความสามารถในการเกาะของเชื้อ *H. pylori* กับเซลล์เยื่อบุHEp-2 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value < 0.05) และแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัด คือ สารสกัดเข้มข้นมากจะมีฤทธิ์ยับยั้งได้มาก แต่อย่างไรก็ตามต้องมีการทดสอบDMSO ที่ความเข้มข้นที่2MIC, 4 MIC และ 8 MIC ด้วยว่า DMSO ที่อยู่ในสารสกัดความเข้มข้นดังกล่าวว่ามีผลกับเชื้อและกับเซลล์หรือไม่ ซึ่งจะทำการทดสอบเพิ่มเติมต่อไป

จากการศึกษาการเกาะของเชื้อกับเซลล์เยื่อบุ HEp-2 ในสภาวะที่มีสารสกัดเอทานอลขอลน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 20 mg/ml เปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีสารสกัด ด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์และกล้อง Confocal laser scanning พบว่าเชื้อมีการเกาะติดทั้งในสภาวะที่มีสารสกัดเอทานอลของน้อยหน่าและสภาวะที่ไม่มีสารสกัด ดังรูปที่ 3 และ รูปที่ 4 จากภาพดูเหมือนว่าปริมาณเชื้อในสภาวะที่มีสารสกัดจะเกาะน้อยกว่าในสภาวะที่ไม่มีสารสกัด ซึ่งยังไม่สามารถบอกความแตกต่างเชิงปริมาณด้วยภาพจากกล้องทั้งสองชนิดอย่างมีนัยสำคัญได้ เนื่องจากขึ้นอยู่กับบริเวณของภาพที่เลือก อาจต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมเช่นเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้นจนไม่พบการเกาะของเชื้อ หรือการนับจำนวนเชื้อเฉลี่ยต่อfield ซึ่งค่าที่ได้อาจมีความคลาดเคลื่อนเนื่องจากเชื้อมีขนาดเล็ก นับยาก โดยเฉพาะถ้าเชื้อเกาะกลุ่มจะทำให้เกิดความผิดพลาดในการนับได้สูง จากการวิจัยที่ผ่านมามีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดน้อยหน่าในด้านต่างๆ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงกันปล่อง ยุงลาย และ เชื้อมาเลเรีย (9, 69) และเมื่อเร็วๆนี้มีการศึกษาพบว่าสารสกัดจากใบน้อยหน่ามีฤทธิ์ป้องกันและรักษาโรคกระเพาะอาหารอักเสบได้ โดยลดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร ลด pepsin และ plasma gastrin และเพิ่มปริมาณ mucin ในผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบที่มีสาเหตุจาก pyloric ligation ได้ (42) สารสกัดจากเมล็ดน้อยหน่ายังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ดีโดยมี ค่า MIC อยู่ในช่วง 53-380 μg/ml (68)

**ตารางที่ 1 ปริมาณผลผลิตจากการสกัดผลไม้ด้วยน้ำและเอทานอล**

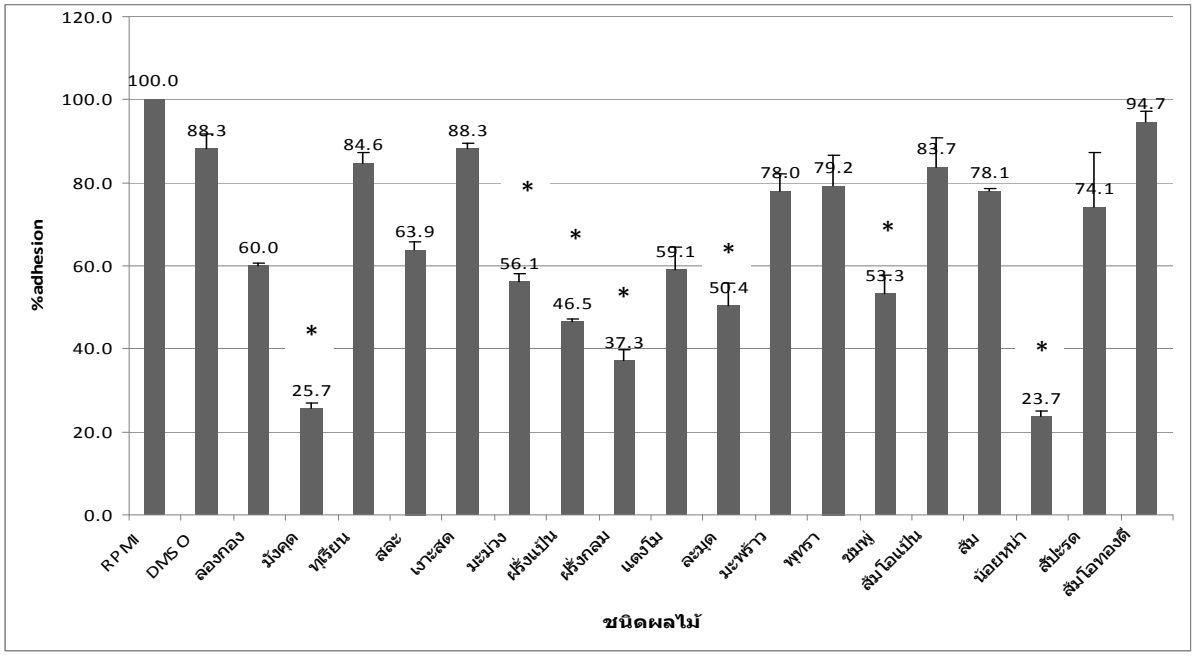
| NO | ชนิดผลไม้ | พันธุ์ | แหล่งปลูก | แหล่งที่ซื้อ | % yield การสกัดด้วยน้ำ | % yield การสกัดด้วยเอทานอล |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | มังคุด | - | ชุมพร | TOP | 5.6 | 18.43 |
| 2 | เงาะ | โรงเรียนนาสาร | ชุมพร | TOP | 7.6 | 30.59 |
| 3 | น้อยหน่า | - | โคราช | ตลาดมีนบุรี | 6.5 | 6.93 |
| 4 | ทุเรียน | หมอนทอง | สุราษฯ | ตลาดมีนบุรี | 2.16 | 7.35 |
| 5 | ลองกอง | ตันหยงมัส | ยะลา | ตลาดมีนบุรี | 11.6 | 11.58 |
| 6 | พุทรา | นมสด | มหาชัย | ตลาดมีนบุรี | 9.32 | 10.04 |
| 7 | สละ | - | จันทบุรี | ตลาดมีนบุรี | 7.7 | 9.66 |
| 8 | ส้มโอ | ขาวแป้น | นครปฐม | ตลาดดอนหวาย | 19.3 | 8.07 |
| 9 | ส้มโอ | ทองดี | นครปฐม | ตลาดดอนหวาย | 12 | 14.25 |
| 10 | ฝรั่ง | กลมสาลี่ | ฉะเชิงเทรา | คาร์ฟู | 2.36 | 12.34 |
| 11 | ฝรั่ง | แป้นสีทอง | ฉะเชิงเทรา | คาร์ฟู | 2.2 | 17.77 |
| 12 | สับปะรด | ศรีราชา | ชลบุรี | คาร์ฟู | 5.74 | 13.46 |
| 13 | แตงโม | กินรี | สุพรรณ | ตลาดมีนบุรี | 8.46 | 30.56 |
| 14 | ส้ม | สายน้ำผึ้ง | ฝาง | ตลาดมีนบุรี | 0.68 | 12.31 |
| 15 | ละมุด | มาเลย์ | สุราษฯ | ตลาดหทัยราษฎร์ | 11.42 | 1.9 |
| 16 | ชมพู่ | ทับทิมจันทร์ | แม่กลอง | โลตัส | 6.5 | 12.67 |
| 17 | น้ำ/เนื้อมะพร้าว | - | แม่กลอง | โลตัส | 10.37 | 2.7 |
| 18 | มะละกอ | แขกดำ | นครปฐม | โลตัส | 14.37 | 4.89 |
| 19 | มะม่วง | น้ำดอกไม้ | | ตลาดมีนบุรี | 2.7 | 8.13 |

**ตารางที่ 2** ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (MIC) ของสารสกัดผลไม้ไทยด้วยน้ำต่อการเจริญของเชื้อ *Helicobacter pylori* 19 สายพันธุ์

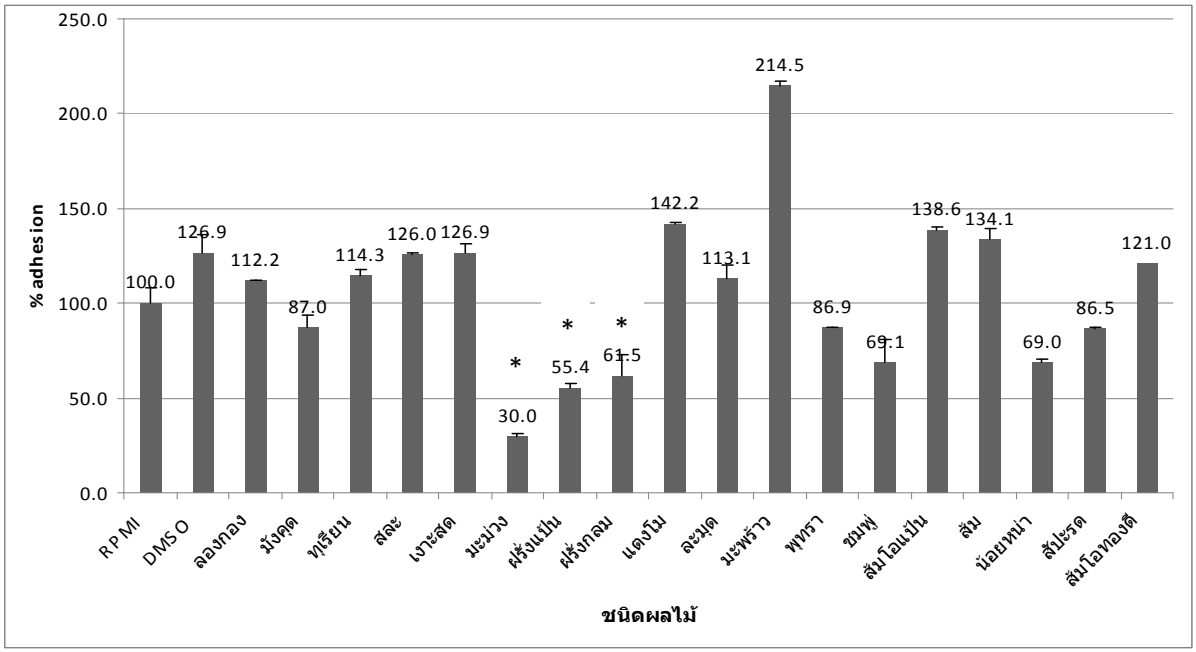
| NO | ชนิดผลไม้ | ชื่อวิทยาศาสตร์ | ชื่อสามัญ | MIC 50 | MIC 40 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | มังคุด | *Garcinia mangostana* L. | Mangosteen | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 2 | เงาะ | *Nephelium lappaceum* L. | Rambutan | > 20 mg/ml | **20 mg/ml** |
| 3 | น้อยหน่า | *Annona squamosa* L. | Sugar Apple | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 4 | ทุเรียน | *Durio zibethinus* L. | Durian | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 5 | ลองกอง | *Lansium domesticum* | longkong | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 6 | พุทรา | *Zizyphus mauritiana* Lamk. | Common Jujube | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 7 | สละ | *Salacca edulis* Reinw. | salak pulm | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 8 | ส้มโอ (ทองดี) | *Citrus maxima* (Burm.) Merr. | Pummelo, Shaddock | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 9 | ส้มโอ (ขาวแป้น) | *Citrus maxima* (Burm.) Merr. | Pummelo, Shaddock | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 10 | ฝรั่ง (แป้นสีทอง) | *Psidium guajava* L. | Guava | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 11 | ฝรั่ง (กลมสาลี่) | *Psidium guajava* L. | Guava | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 12 | สับปะรด | Ananas comosus (Linn.) Merr. | Pineapple | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 13 | แตงโม | Citrullus lanatus Mats & Nakai | Water melon | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 14 | ส้มเขียวหวาน | *Citrus reticulata* Blanco | Tangerine | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 15 | ละมุด | *Manilkara achras* Fosberg | Spodilla | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 16 | ชมพู่ | *Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & Perry | Rose apple | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 17 | น้ำ/เนื้อมะพร้าว | Cocos nucifera Linn. | Coconut | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 18 | มะละกอ | Carica papaya Linn | Papaya | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 19 | มะม่วง | *Mangifera indica* L. | Mango | > 20 mg/ml | **20 mg/ml** |

**ตารางที่ 3** ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (MIC) ของสารสกัดผลไม้ไทยด้วยเอทานอลต่อการเจริญของเชื้อ *Helicobacter pylori* 19 สายพันธุ์

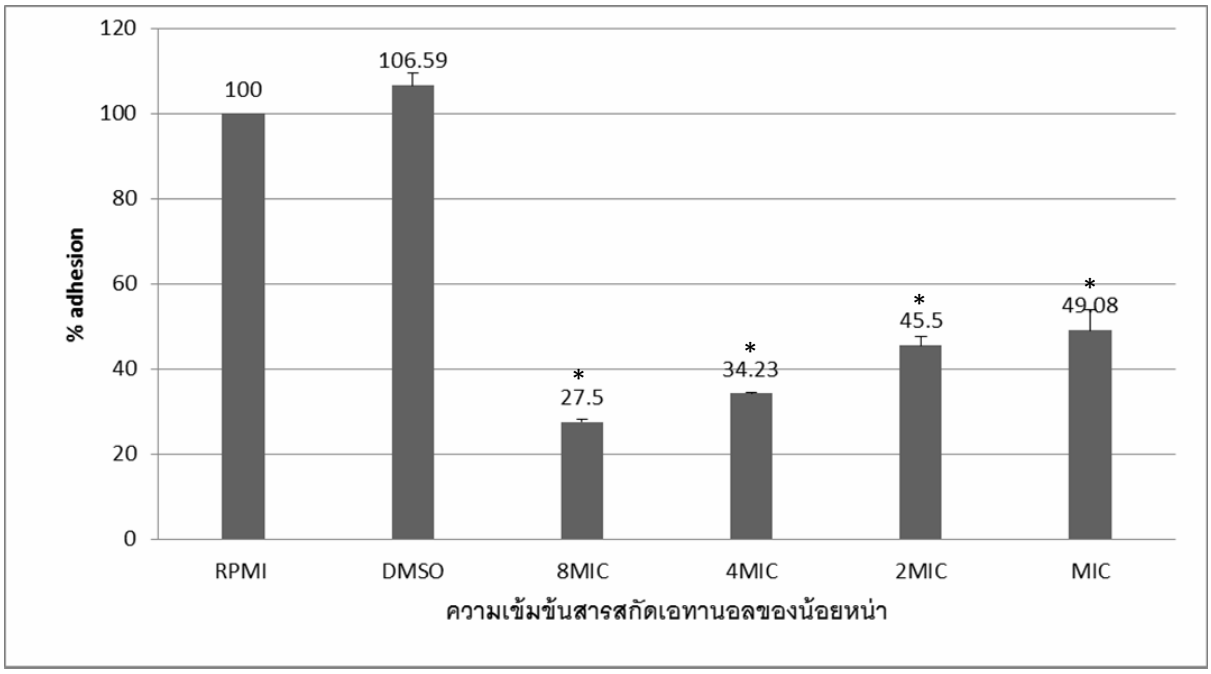
| NO | ชนิดผลไม้ | MIC 50 | MIC 40 |
|---|---|---|---|
| 1 | มังคุด | > 20 mg/ml | **20 mg/ml** |
| 2 | เงาะ | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 3 | น้อยหน่า | **20 mg/ml** | **20 mg/ml** |
| 4 | ทุเรียน | > 20 mg/ml | **20 mg/ml** |
| 5 | ลองกอง | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 6 | พุทรา | > 20 mg/ml | **20 mg/ml** |
| 7 | สละ | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 8 | ส้มโอ (ทองดี) | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 9 | ส้มโอ (ขาวแป้น) | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 10 | ฝรั่ง (แป้นสีทอง) | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 11 | ฝรั่ง (กลมสาลี่) | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 12 | สับปะรด | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 13 | แตงโม | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 14 | ส้ม | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 15 | ละมุด | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 16 | ชมพู่ | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 17 | น้ำ/เนื้อมะพร้าว | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 18 | มะละกอ | > 20 mg/ml | **20 mg/ml** |
| 19 | มะม่วง | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |



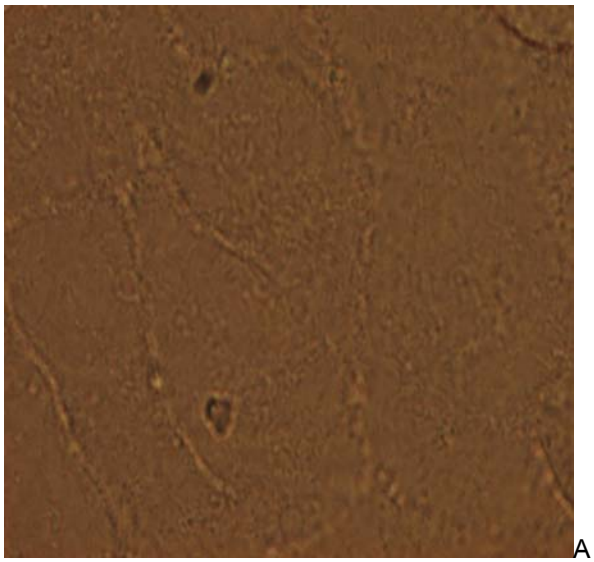

รูปที่ 1 ฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลของผลไม้ไทย 18 ชนิด ต่อการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* กับเซลล์เยื่อบุ HEp-2 บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลการทดสอบแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับหลุมควบคุมที่ไม่มีสารสกัด, DMSO ที่ใช้ความเข้มข้น เท่ากับ 4% (mean±SE ของอย่างน้อย 2 การทดลอง) * P<0.05 vs control

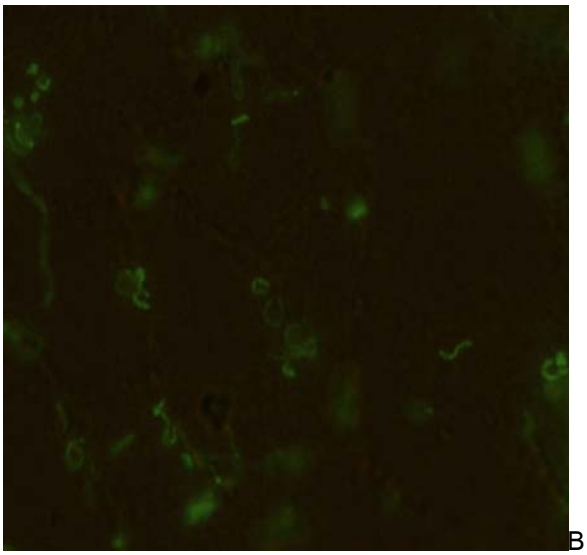


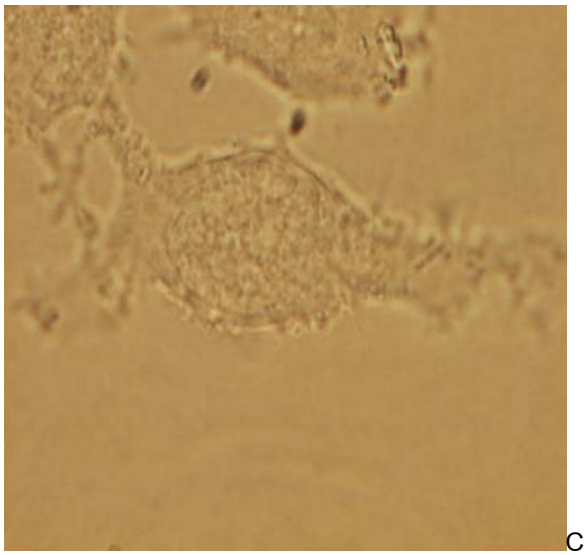

รูปที่ 2 ฤทธิ์ของสารสกัดน้ำของผลไม้ไทย 18 ชนิด ต่อการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* กับเซลล์เยื่อบุ HEp-2 บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลการทดสอบแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับหลุมควบคุมที่ไม่มีสารสกัด, DMSOที่ใช้ความเข้มข้น เท่ากับ 4% (% adhesion แสดงในรูป mean±SE ของอย่างน้อย 2 การทดลอง) * P<0.05 vs control

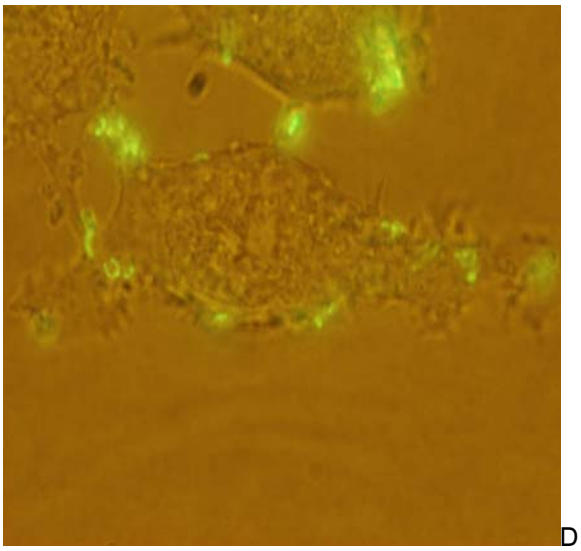



รูปที่ 3 ฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลของน้อยหน่าต่อการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* กับเซลล์เยื่อบุ HEp-2 บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่ MIC, 2 MIC, 4MIC, 8 MIC ผลการทดสอบแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับหลุมควบคุมที่ไม่มีสารสกัด, DMSOที่ใช้ความเข้มข้น เท่ากับ 4 % (% adhesion แสดงในรูป mean±SE ของอย่างน้อย 2 การทดลอง) * P<0.05 vs control

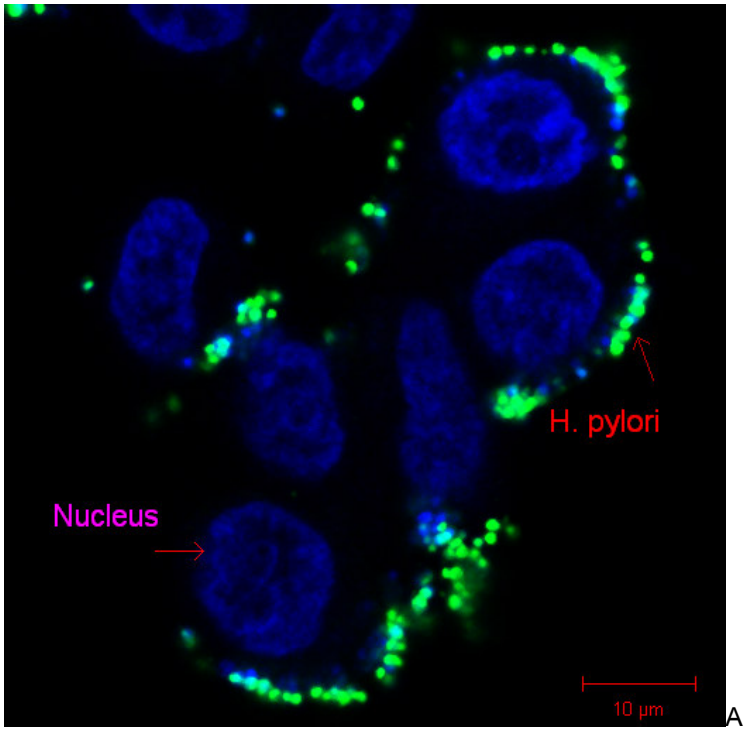

A


B

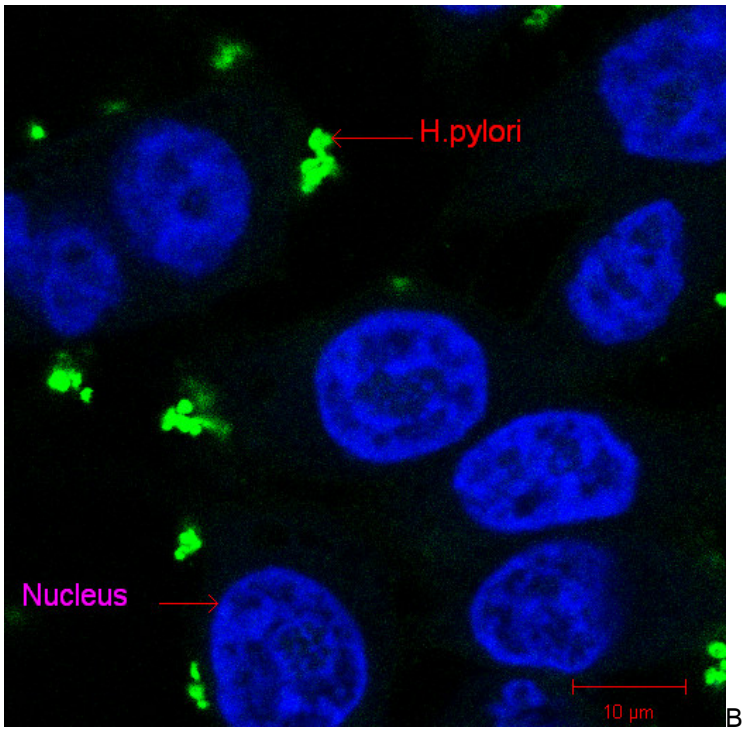

C


D

รูปที่ 3 ภาพถ่ายจากกล้องฟลูออเรสเซ็นต์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า **A.** FITC-*H. pylori* treated HEp-2 (bright field) **B.** FITC-*H. pylori* treated HEp-2 (fluorescense) **C.** FITC-*H. pylori* treated HEp-2 ในสภาวะที่มีสารสกัดน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 20 mg/ml (bright field) D. FITC-*H. pylori* treated HEp-2 ในสภาวะที่มีสารสกัดน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 20 mg/ml (fluorescense)



A



B

**รูปที่ 4** ภาพถ่ายจากกล้องConfocal laser scanning ที่กำลังขยาย 100 เท่า **A.** FITC-*H. pylori* treated HEp-2 **B.** FITC-*H. pylori* treated HEp-2ในสภาวะที่มีสารสกัดน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 20 mg/ml

## สรุปผลการทดลอง

ในปัจจุบันพบว่าเชื้อ *H. pylori* มีอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะหลายๆชนิด เพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อความสำเร็จของการรักษา จึงมีความพยายามในการค้นหาสารชีวภาพจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ดี ไม่มีผลข้างเคียง ไม่เป็นพิษต่อร่างกายมาใช้เป็นการรักษาทางเลือกใหม่ จากการศึกษาพบว่าสมุนไพรหลายชนิดในหลายๆประเทศมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ดี โดยมีค่า MIC ประมาณ 7.5-320 μg/ml ผลไม้เป็นอาหารที่น่าสนใจอีกประเภทหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อหลายๆชนิดมาแต่โบราณ แต่มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดของผลไม้ต่อเชื้อ *H. pylori* ไม่มากนัก ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเนื้อผลไม้ไทย 19 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* และยับยั้งการเกาะติดของเชื้อต่อเซลล์เยื่อบุ HEp-2 พบว่า สารสกัดเอทานอลจากเนื้อน้อยหน่ามีฤทธิ์ทั้งยับยั้งการเจริญและยับยั้งการเกาะติดของเชื้อได้ดีที่สุด รองลงมาคือน้ำมะม่วง ถึงแม้ว่าสารสกัดจากเนื้อผลไม้มีฤทธิ์ไม่ดีเมื่อเทียบกับสารสกัดจากส่วนของเปลือก (67) ใบ (40) เมล็ด (45) รวมทั้งมีฤทธ์ด้อยกว่าพืชสมุนไพรมาก แต่ผลไม้ยังคงเป็นเป็นอาหารที่มีคุณประโยชน์หลากหลาย ทั้งการป้องกันมะเร็ง ต้านการอักเสบ ต้านการติดเชื้อหลายๆชนิด รวมทั้ง เชื้อ *H. pylori* ที่เป็นผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ด้วย

## เอกสารอ้างอิง


1. Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in moxicill gerbils. Gastroenterology. 1998;115:642-8.
2. Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, Nishizono A, Nasu M. Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. Cancer Res. 1998; 58:4255-9.
3. Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. IARC Sci Publ. 2004; 157: 327-349.
4. Yamaoka Y, Kato M, Asaka M. Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. Intern Med. 2008; 47:1077-83.
5. Perez-Perez GI, Taylor DN, Bodhidatta L, Wongsrichanalai J, Baze WB, Dunn BE, et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infections in Thailand. J Infect Dis. 1990; 161:1237-41.
6. Bruce MG, Maaroos HI. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 2008; 13 Suppl 1:1-6.
7. Shimada T, Watanabe N, Ohtsuka Y, Endoh M, Kojima K, Hiraishi H, et al. Polaprezinc down-regulates proinflammatory cytokine-induced nuclear factor-kappaB activiation and interleukin-8 expression in gastric epithelial cells. J Pharmacol Exp Ther. 1999; 291:345-52.
8. Al-Marhoon MS, Nunn S, Soames RW. The association between cagA+ *H. pylori* infection and distal gastric cancer: a proposed model. Dig Dis Sci. 2004; 49:1116-22.
9. Baskar R, Rajeswari V, Kumar TS. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. Indian J Exp Biol. 2007; 45:480-5.
10. de Jonge R, Durrani Z, Rijpkema SG, Kuipers EJ, van Vliet AH, Kusters JG. Role of the *Helicobacter pylori* outer-membrane proteins AlpA and AlpB in colonization of the guinea pig stomach. J Med Microbiol. 2004; 53:375-79.
11. Odenbreit S, Faller G, Haas R. Role of the alpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. Int J Med Microbiol. 2002; 292:247-56.
12. Rokbi B, Seguin D, Guy B, Mazarin V, Vidor E, Mion F, et al. Assessment of *Helicobacter pylori* gene expression within mouse and human gastric mucosae by real-time reverse transcriptase PCR. Infect Immun. 2001; 69:4759-66.
13. Bai Y, Zhang YL, Chen Y, Jin JF, Zhang ZS, Zhou DY. Cloning and expression and immunogenicity of *Helicobacter pylori* BabA2 gene. World J Gastroenterol. 2004; 10:2560-62.
14. มาโนช วามานนท์, เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. ยาสมุนไพรสำหรับรักษาโรคกระเพาะอาหาร. ใน: ยาสมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน กรุงเทพมหานคร; โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2537. หน้า 29-45.
15. Gerhauser C. Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. Planta Med. 2008; 74:1608-24.

16. Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Orozco-Ibarra M, Pérez-Rojas JM. Medicinal properties of mangosteen (Garcinia mangostana). Food Chem Toxicol. 2008; 46:3227-39.
17. Yismaw G, Tessema B, Mulu A, Tiruneh M. The in vitro assessment of antibacterial effect of papaya seed extract against bacterial pathogens isolated from urine, wound and stool. Ethiop Med J. 2008; 46:71-7.
18. Goel RK, Sairam K, Rao CV. Role of gastric antioxidant and anti-*Helicobactor pylori* activities in antiulcerogenic activity of plantain banana (*Musa sapientum* var. *26moxicillin26*). Indian J Exp Biol. 2001; 39:719-22.
19. Chaichanawongsaroj N, AmornyingjareanS, Pattiyathanee P, Vilaichone R, Poovorawan Y. Anti-*Helicobacter pylori* and anti-internalization activities of Thai folk remedies used to treat gastric ailments. (Accepted by Journal of Medicinal Plants Research in July, 2011)
20. Andersen LP, Wadstrom T. Basic Bacteriology and Culture. In Mobley HL, Mendz GL, Hazell SL, (editors). *Helicobacter pylori* Physiology and Genetics. Washington: ASM Press; 2011. P. 27-38.
21. Menaker RJ, Ceponis PJ, Jones NL. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of macrophages in association with alterations in the mitochondrial pathway. Infect Immune. 2004; 72:2889-98.
22. Figueiredo C, Machado JC, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. Helicobacter. 2005; 10:14-20.
23. Park SR, Mackay WG, Reid DC. *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. Water Res. 2001; 35**:**1624-6.
24. Enroth H, Engstrand L. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. J Clin Microbiol. 1995; 33:2162-5.
25. Nishihara K, Nozawa Y, Nomura S, Kitazato K, Miyake H. Analysis of *Helicobacter pylori* binding site on Hep-2 cells and three cell lines from human gastric carcinoma. Fundam Clin Pharmacol. 1999;13:555-61.
26. Ofek I, Hasty DL, Sharon N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003; 38:181-91.
27. Jonkers D, van den Broek E, van Dooren I, Thijs C, Dorant E, Hageman G. Antibacterial effect of garlic and omeprazole on *Helicobacter pylori*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1999; 43:837-9.
28. Meyer JM, Silliman NP, Wang W. Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: the surveillance of *H. pylori* antimicrobial resistance partnership (SHARP) study, 1993-1999. Annals Internal Medicine. 2002; 13:613-24.
29. Fallone CA. Epidemiology of the antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Canada. Canadian Journal of Gastroenterology. 2004; 14:879-82.

30. Wu H, Shi XD, Wang HT, Liu JX. Resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole, tetracycline and 27moxicillin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2000; 46:121-3.
31. O'Mahony R, Al-Khtheeri H, Weerasekera D, Fernando N, Vaira D, Holton J. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. World Journal of Gastroenterology. 2005; 117:7499-507.
32. Miyazawa M, Utsunomiya H, Inada K, Yamada T, Okuno Y, Tanaka H. Inhibition of *Helicobacter pylori* Motility by (+)-Syringaresinol from Unripe Japanese Apricot. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 2006; 29:172-3.
33. Shmuely H, Burger O, Neeman I, Yahav J, Samra Z, Niv Y. Susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates to the antiadhesion activity of a high-molecular-weight constituent of cranberry. Diagnostic Microbiology & Infectious Disease. 2004; 50:231-5.
34. Lee JH, Shim JS, Lee JS, Kim MK, Chung MS, Kim KH. Pectin-like acidic polysaccharide from *Panax ginseng* with selective antiadhesive activity against pathogenic bacteria. Carbohydrate Research. 2006; 341:1154-63.
35. Wang YC, Huang TL. High-performance liquid chromatography for quantification of plumbagin, an anti-*Helicobacter pylori* compound of *Plumbago zeylanica* L. Journal of Chromatography. 2005; 1094:99-104.
36. Mahady GB, Pendland SL, Yun G, Lu ZZ. Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. Anticancer Research. 2002; 22:4179-81.
37. Bhamarapravati S, Pendland SL, Mahady GB. Extracts of spice and food plants from Thai traditional medicine inhibit the growth of the human carcinogen *Helicobacter pylori*. In Vivo. 2007; 17:541-4.
38. Malekzadeh F, Ehsanifar H, Shahamat M, Levin M, Colwell RR. Antibacterial activity of black myrobalan (Terminalia chebula Retz) against *Helicobacter pylori*. International Journal of Antimicrobial Agents. 2001; 18:85-8.
39. O'Gara EA, Hill DJ, Maslin DJ. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. Applied and Environmental Microbiology. 2000; 66: 2269-73.
40. Lu WB, Zhang BE, Wang J, Lu RX, Li RL, Chen WW. Screening of anti-diarrhea effective fractions from guava leaf. Zhong Yao Cai. 2010; 33:732-5.
41. Pastene E, Speisky H, Troncoso M, Alarcón J, Figueroa G. In vitro inhibitory effect of apple peel extract on the growth of Helicobacter pylori and respiratory burst induced on human neutrophils. J Agric Food Chem. 2009; 57:7743-9.
42. Yadav DK, Singh N, Dev K, Sharma R, Sahai M, Palit G, et al. Anti-ulcer constituents of *Annona squamosa* twigs. Fitoterapia. 2011; 82:666-75.

43. Anas K, Jayasree PR, Vijayakumar T, Manish PR. In vitro antibacterial activity of *Psidium guajava* Linn. Leaf extract on clinical isolates of multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. Indian J Exp Biol. 2008; 46:41-6.
44. Mahfuzul MD, Bari ML, Inatsu Y, Juneja VK, Kawamoto S. Antibacterial activity of guava *(Psidium guajava* L.) and Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) extracts against foodborne pathogens and spoilage bacteria. Foodborne Pathog Dis. 2007; 4:481-8.
45. Joseph CB, Guohui H, Vivian HZ, Xiuping J. Antibacterial Effects of Grape Extracts on *Helicobacter pylori*. Appl Environ Microbiol. 2009; 75:848-52.
46. Binici DN, Koca T, Dursun H. Dietary habits, demographical, and socio-economical risk factors of the newly diagnosed gastric cancers in the eastern anatolia region of Turkey: an endemic upper gastrointestinal cancer region. Dig Dis Sci. 2009; 54(12):2629-33.
47. Li Y, Xu C, Zhang Q, Liu JY, Tan RX. In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. J Ethnopharmacol. 2005; 98:329-33.
48. Wang YC, Huang TL. Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005; 43:295-300.
49. Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares E, Bye R, et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. J Ethnopharmacol. 2009;122:402-5.
50. Ndip RN, Malange AE, Mbullah SM, Luma HN, Malongue A, Ndip LM, et al. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. J Ethnopharmacol. 2007; 114:452-7.
51. Clinical and Laboratory standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 2010; 30:107
52. Stamatis G, Kyriazopoulos P, Golegou S, Basayiannis A, Skaltsas S, Skaltsa H. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. J Ethnopharmacol. 2003; 88:175-9.
53. Wittschier N, Faller G, Hensel A. An extract of Pelargonium sidoides (Eps 7630) inhibits in situ adhesion of *Helicobacter pylori* to human stomach. Phytomedicine. 2007;14:285-8.
54. Khammuang S, Sarnthima R. Antioxidant and antibacterial activities of selected varieties of thai mango seed extract. Pak J Pharm Sci. 2011; 24:37-42.
55. Prasad S, Kalra N, Singh M, Shukla Y. Protective effects of lupeol and mango extract against androgen induced oxidative stress in Swiss albino mice. Asian J Androl. 2008; 10:313-8.
56. Ngawhirunpat T, Opanasopi P, Sukma M, Sittisombut C, Kat A, Adachi I. Antioxidant, free radical-scavenging activity and cytotoxicity of different solvent extracts and their phenolic constituents from the fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana*). Pharm Biol. 2010; 48: 55-2.

57. Obolskiy D, Pischel I, Siriwatanametanon N, Heinrich M. *Garcinia mangostana* L.: a phytochemical and pharmacological review. Phytother Res. 2009; 23:1047-65.
58. Watanapokasin R, Jarinthanan F, Jerusalmi A, Suksamrarn S, Nakamura Y, Sukseree S, et al. Potential of xanthones from tropical fruit mangosteen as anti-cancer agents: caspase-dependent apoptosis induction in vitro and in mice. Appl Biochem Biotechnol. 2010; 162: 1080-94.
59. Báez R, Lopes MT, Salas CE, Hernández M. In vivo antitumoral activity of stem pineapple (*Ananas comosus*) bromelain. Planta Med. 2007;73:1377-83.
60. Kothari V, Seshadri S. In vitro antibacterial activity in seed extracts of *Manilkara zapota*, *Anona squamosa*, and *Tamarindus indica*. Biol Res. 2010; 43:165-68.
61. Kaomongkolgit R, Jamdee K, Chaisomboon N.J Antifungal activity of alpha-mangostin against *Candida albicans*. Oral Sci. 2009;5:401-406.
62. Aibinu I, Adenipekun T, Adelowotan T, Ogunsanya T, Odugbemi T. Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of citrus aurantifolia (lime fruit) as used locally. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2006; 4: 185-90.
63. Lee JH, Shim JS, Lee JS, Kim JK, Yang IS, Chung MS, Kim KH. Inhibition of pathogenic bacterial adhesion by acidic polysaccharide from green tea (*Camellia sinensis*). J Agric Food Chem. 2006; 54:8717-23.
64. Aqil F, Ahmad I.Antibacterial properties of traditionally used Indian medicinal plants. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2007; 29:79-92.
65. Lino A, Deogracious O. The in-vitro antibacterial activity of *Annona senegalensis*, *Securidacca longipendiculata* and *Steganotaenia araliacea* – Ugandan medicinal plants. Afr Health Sci. 2006; 6:31-5.
66. Rahim N, Gomes DJ, Watanabe H, Rahman SR, Chomvarin C, Endtz HP, Alam M. Antibacterial activity of *Psidium guajava* leaf and bark against multidrug-resistant *Vibrio cholerae*: implication for cholera control. Jpn J Infect Dis. 2010; 63:271-4.
67. Pothitirat W, Chomnawang MT, Gritsanapan W. Anti-acne-inducing bacterial activity of mangosteen fruit rind extracts. Med Princ Pract. 2010; 19:281-6.
68. Kothari V, Seshadri S. In vitro antibacterial activity in seed extracts of *Manilkara zapota*, *Anona squamosa*, and *Tamarindus indica*. Biol Res. 2010; 43:165-8.
69. Kamaraj C, Bagavan A, Elango G, Zahir AA, Rajakumar G, Marimuthu S, et al. Larvicidal activity of medicinal plant extracts against *Anopheles subpictus* & *Culex tritaeniorhynchus*. Indian J Med Res. 2011; 134:101-6.

**ภาคผนวก**

1. <u>การทดสอบฤทธิ์ของผลไม้ไทยในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของเชื้อ *H. pylori*</u>

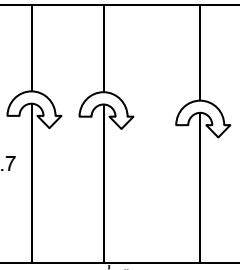
1.1 การเจือจางสารสกัดผลไม้

นำสารสกัดจากเนื้อผลไม้ด้วยเอทานอลและสารสกัดด้วยน้ำมากรองผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นทำการเจือจางสารเป็นลำดับ (2-folds dilution) จาก 20-0.625 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังตัวอย่าง ถ้าความเข้มข้นของสารตั้งต้นเท่ากับ 0.5 กรัม/มิลลิลิตร ให้ดูดสารตั้งต้น 5 มิลลิลิตร ผสมกับ Mueller Hinton broth 5 มิลลิลิตร ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางเป็นลำดับ 2 เท่า ให้ได้ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 0.625 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับสารสกัดความเข้มข้นตั้งต้นอื่นๆ ให้เจือจางดังตารางที่4 และ 5

ตารางที่4 การเจือจางสารสกัดผลไม้ด้วยเอทานอล

| | ชนิดผลไม้ | Filter sterile Stock (g/ml) | Final MIC (mg/ml) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 20 | 10 | 5 | 2.5 | 1.25 | 0.625 |
| 1 | มังคุด | 0.5 | | Stock 5ml +MH broth 5 ml | 2 folds 5 ml+MH 5 ml | | | |
| | | | Stock1 ml+MH agar 24 ml | 1 ml +MH agar 24 ml | 1 ml +MH agar 24 ml | 1 ml +MH agar 24 ml | 1 ml +MH agar 24 ml | 1 ml +MH agar 24 ml |
| 2 | เงาะ | 0.5 | เจือจางเหมือนสารสกัดมังคุด | | | | | |
| 3 | น้อยหน่า | 0.5 | | | | | | |
| 4 | ทุเรียน | 0.5 | | | | | | |
| 5 | พุทรา | 0.5 | | | | | | |
| 6 | ลองกอง | 0.5 | | | | | | |
| 7 | สละ | 0.5 | | | | | | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 8 | ส้มโอทองดี | 0.5 | | | |
| 9 | สับปะรด | 0.5 | | | |
| 10 | ฝรั่งกลมสาลี่ | 0.5 | | | |
| 11 | ฝรั่งแป้นสีทอง | 0.5 | | | |
| 12 | มะม่วงน้ำดอกไม้ | 0.5 | | | |
| 13 | แตงโม | 0.5 | | | |
| 14 | ส้ม | 0.5 | | | |
| 15 | ส้มโอแป้น | 0.3 | | Stock 8.3 ml+MH broth 1.7 ml | 2 folds 5 ml+MH 5 ml |
| | | | Stock1.7 ml +MH agar 23.3 ml | นำแต่ละสารที่เจือจาง 1 ml +MH agar 24 ml | |
| 16 | ชมพู่ | 0.3 | เจือจางเหมือนสารสกัดส้มโอแป้น | | |
| 17 | มะละกอ | 0.2 | | | Stock 6.25 ml +MH broth 3.75 ml 2 folds 5 ml+MH 5 m |
| | | | Stock2.5 ml +MH agar 22.5 ml | Stock 1.25 ml +MH broth 23.75 ml | นำแต่ละสารที่เจือจาง 1 ml +MH agar 24 ml |
| 18 | มะพร้าวอ่อน | 0.15 | | | Stock 8.3 ml +MH 1.7 ml |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Stock 3.3 ml +MH agar 21.7 ml | Stock1.7 ml +MH agar 23.3 ml | นำแต่ละสารที่เจือจาง 1 ml<br>+MH agar 24 ml |
| 19 | ละมุด | 0.15 | | | Stock 8.3 ml+MH broth 1.7 ml  |
| | | | Stock3.3 ml +MH agar 21.7 ml | Stock1.7 ml +MH agar 23.3 ml | นำแต่ละสารที่เจือจาง 1 ml<br>+MH agar 24 ml |

ตารางที่ 5 การเจือจางสารสกัดผลไม้ด้วยน้ำ

| | ชนิดผลไม้ | Filter sterile Stock (g/ml) | Final MIC (mg/ml) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 20 | 10 | 5 | 2.5 | 1.25 | 0.625 |
| 1 | มังคุด | 0.5 | | Stock 5ml +MH 5 ml | 2 folds 5 ml+MH 5 ml | | | |
| | | | Stock1 ml+MH agar 24 ml | 1 ml +MH agar 24 ml | 1 ml +MH agar 24 ml | 1 ml +MH agar 24 ml | 1 ml +MH agar 24 ml | 1 ml +MH agar 24 ml |
| 2 | ทุเรียน | 0.5 | เจือจางเหมือนสารสกัดมังคุด | | | | | |
| 3 | ลองกอง | 0.5 | | | | | | |
| 4 | สละ | 0.5 | | | | | | |
| 5 | ส้มโอแป้น | 0.5 | | | | | | |
| 6 | มะพร้างอ่อน | 0.5 | | | | | | |
| 7 | มะละกอ | 0.5 | | | | | | |
| 8 | ละมุด | 0.5 | | | | | | |
| 9 | พุทรา | 0.3 | | Stock 8.3 ml+MH 1.7 ml | 2 folds 5 ml+MH 5 ml | | | |
| | | | Stock1.7 ml ml+MH agar 23.3 ml | นำแต่ละสารที่เจือจาง 1 ml+MH agar 24 ml | | | | |
| 10 | ส้มโอทองดี | 0.2 | | | Stock 6.25 ml+MH 3.75 ml | 2 folds 5 ml+MH 5 r | | |

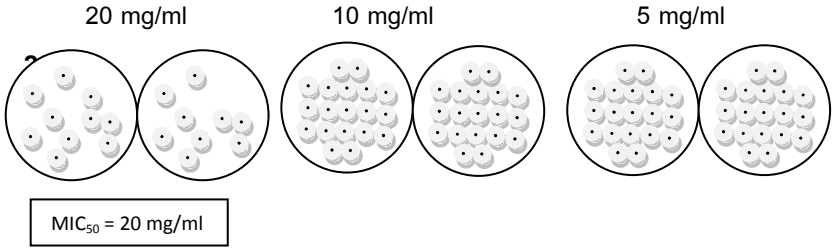
| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Stock2.5 ml +media 22.5 ml | Stock1.25 ml +media 23.75 ml | นำแต่ละสารที่เจือจาง 1 ml+MH agar 24 ml | |
| 11 | สับปะรด | 0.2 | เจือจางเหมือนสารสกัดส้มโอทองดี | | | |
| 12 | แตงโม | 1 | Stock 5ml +MH broth 5 ml | 2 folds 5 ml+MH 5 r | | |
| | | | นำแต่ละสารที่เจือจาง 1 ml+MH agar 24 ml | | | |
| 13 | เงาะ | 0.9 | Stock 5.6 ml+MH 4.4 ml | 2 folds 5 ml+MH 5 ml | | |
| | | | นำแต่ละสารที่เจือจาง 1 ml+MH agar 24 ml | | | |
| 14 | ชมพู่ | 0.7 | Stock 7.1 ml+MH 2.9 ml | 2 folds 5 ml+MH 5 ml | | |
| | | | นำแต่ละสารที่เจือจาง 1 ml+MH agar 24 ml | | | |
| 15 | น้อยหน่า | 0.4 | | Stock 6.25 ml+MH 3.75 ml | 2 folds 5 ml+MH 5 ml | |
| | | | Stock1.25 ml +MH agar 23.75 ml | นำแต่ละสารที่เจือจาง 1 ml+MH agar 24 ml | | |
| 16 | ฝรั่งกลมสาลี่ | 0.1 | | | | Stock 6.25 ml+MH 3.75 ml 2-folds 5 ml+MH 5ml |
| | | | Stock5 ml +MH agar 20 ml | Stock2.5 ml +MH agar 22.5 ml | Stock1.25 ml +MH agar | นำแต่ละสารที่เจือจาง 1 ml+MH agar 24 ml |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | 23.75 ml | | |
| 17 | ฝรั่งแป้นสีทอง | 0.1 | เจือจางเหมือนสารสกัดฝรั่งกลมสาลี่ | | | | |
| 18 | มะม่วง | 0.1 | | | | | |
| 19 | ส้ม | 0.05 | | | | | Stock 6.25 ml+MH 3.75 ml → 2-folds 5 ml+MH 3 ml |
| | | | Stock10 ml +MH agar15 ml | Stock5 ml + MH agar 20 ml | Stock2.5 ml + MH agar 22.5 ml | Stock1.25 ml + MH agar 23.75 ml | นำแต่ละสารที่เจือจาง 1 ml+MH agar 24 ml |

**1.2 วิธีการทดสอบ MIC**

1. subculture เชื้อ *Helicobacter pylori* ประมาณ 19 สายพันธ์ บ่มที่ microaerophilic, 37 องศาเซลเซียส, เป็นเวลา 3 วัน
2. เจือจางสารสกัดผลไม้ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ความเข้มข้นละ 2 plate) ปิเปตต์สารสกัดผลไม้จากstockตั้งต้น หรือสารสกัดที่เจือจางดังตารางที่ 4 และ 5 อย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Flask ขนาด 125 มิลลิลิตร
3. เท Mueller Hinton agar ที่เติม 5% sheep blood ลงไปใน flask ของสารสกัดที่ dilute ไว้แล้ว ปริมาณ 24 มิลลิลิตร เขย่า ให้ agar และสารสกัดสมุนไพร ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เทลงในจานอาหาร ทิ้งให้อาหารแข็งตัว
4. นำเชื้อแต่ละสายพันธุ์ มาใส่ลงใน 0.85% NSS ให้มีความขุ่น 2.0 McFarland standard ($1x10^7$ ถึง $1x10^8$ CFU/ml)
5. จุดเชื้อลงไปบน อาหารที่แข็งแล้ว จุดละ 3 ไมโครลิตร จานควบคุมจะใช้อาหารที่ไม่ใส่สารสกัด และจานอาหารที่ผสม DMSO ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้เจือจางสารสกัด มาจุดเชื้อลงไป
6. นำจานอาหารใส่ลงใน anaerobic jar ใส่ GasPak ลงไป ปิดฝา นำเข้าตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน

7. นำมาอ่านค่า MIC โดยสังเกตว่าที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่เท่าใดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ ดังตัวอย่าง ทดสอบเชื้อทั้งหมด19 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้นสารสกัดตั้งแต่ 5, 10, 20 mg/ml พบว่าความเข้มข้นที่ 20 mg/ml เชื้อไม่เจริญ 10 ชนิด และ 9 ชนิด ดังนั้น $MIC_{50}$ คือ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้50% = 20 mg/ml




$MIC_{50}$ = 20 mg/ml

## วิธีและเกณฑ์มาตรฐานในการทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Helicobacter pylori* (51)

**Testing Conditions**

**Medium:** Agar dilution: MHA and aged (≥ 2-week-old) sheep blood (5% v/v)

**Inoculum:** A saline suspension equivalent to a 2.0 McFarland standard (containing $1 \times 10^7$ to $1 \times 10^8$ CFU/mL), to be prepared from a 72-hour-old subculture from a BAP. The inoculum (1 to 3 µL per spot) is replicated directly onto the antimicrobial agent-containing agar dilution plates.

**Incubation:** 35 ± 2 °C; 72 hours; microaerobic atmosphere produced by a gas-generating system suitable for campylobacters

**Minimal QC Recommendations** (See Table 18C for acceptable QC ranges.)

*Helicobacter pylori* ATCC® 43504

| Test/Report Group | Antimicrobial Agent | MIC Interpretive Standard (µg/mL) | | | Comments |
|---|---|---|---|---|---|
| | | S | I | R | |
| A | Clarithromycin | ≤ 0.25 | 0.5 | ≥ 1.0 | (1) These breakpoints presume that clarithromycin will be used in an approved regimen that includes a proton-pump inhibitor and possibly one or more additional antimicrobial agents. |

การเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

| **วัตถุประสงค์** | **กิจกรรมที่วางแผนไว้** | **กิจกรรมที่ดำเนินการ** | ผลงานที่คาดว่าจะได้รับ (outputs) |
|---|---|---|---|
| 1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของผลไม้ไทยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* | 1.1 เตรียมสารสกัดจากผลไม้ด้วยน้ำและเมทานอล | 1.1เตรียมสารสกัดจากผลไม้17 ชนิดด้วยน้ำและเอทานอล | ได้สารสกัดจากผลไม้17 ชนิด ในตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำ และ เอทานอล |
| | 1.2 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญ(MIC) ของเชื้อ *H. pylori* | 1.2 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญ(MIC) ของเชื้อ *H. pylori* กับเชื้อATCC 2 สายพันธุ์ และเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย 10 สายพันธุ์ | ได้ค่า MIC ของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลของผลไม้ไทยทั้ง 17 ชนิด |
| 2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของผลไม้ไทยในการลดการเกาะติดเซลล์เยื่อบุHEp-2ของเชื้อ *H.pylori* | ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผลไม้ต่อการเกาะติดเซลล์ เยื่อบุ AGS | ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผลไม้น้อยหน่า มังคุด พุทรา ทุเรียน มะละกอ และ เงาะ ต่อการเกาะติดเซลล์ เยื่อบุ HEp-2 | ได้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ *H. pylori* ต่อเซลล์ HEp-2 ของสารสกัดผลไม้เปรียบเทียบกับในภาวะที่ไม่มีสารสกัด |

**กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์**

1. การนำเสนอผลงานในรูปแบบPoster presentation at Federation of European Microbiological Society 2011 (FEMS 2011) วันที่ 26-30 มิถุนายน 2011 ที่เมืองเจนีวา สวิตเซอร์แลนด์
2. การนำเสนอผลงานในรูปแบบนิพนธ์ต้นฉบับในวารสาร African Journal of Microbiology Research (Impact factor 0.528)

บทคัดย่อและโปสเตอร์ที่เผยแพร่ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ **4th Congress of European Microbiologist FEMS 2011 ระหว่างวันที่ 26-30 มิถุนายน 2554 ณ เมือง Geneva ประเทศสวิตเซอร์แลนด์**

**Screening of Thai Fruit mesocarp extracts for**

**anti-*Helicobacter pylori* and anti-adhesion to HEp-2 cells activities**

*N. chaichanawongsaroj* and P. pattiyathanee*

*Innovation Center for Research and Development of Medical Diagnostic Technology Project, Department of Transfusion Medicine, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand,10330*

ABSTRACT

The increasing of antibiotic resistance is the serious problem of most pathogenic bacteria including *Helicobacter pylori* which is the etiologic agent of chronic gastritis, peptic ulceration, gastric carcinoma and gastric MALT-lymphoma. An alternative treatment using traditional plants is advantageous in less or nontoxic, cheap and availability in rural areas. We examined the effects of several Thai fruit mesocarp extracts on growth of *H. pylori* by agar dilution method. The prominent fruit extract was further investigated for the inhibitory activity on the *H. pylori* adhesion to HEp-2 cells by spectrofluorometry. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of ethanolic extracts of nine tropical Thai fruits were higher than 20 mg/ml. The sugar apple (*Annona squamosa* L.) showed the most potent with MIC of 20 mg/ml and superior anti-adhesion activity against HEp-2 cells. While, rambutan, durian, salak pulm, pomelo, sapodilla, longkong, mango and rose apple possessed lower anti-*H.pylori* and anti-adhesion effects. Although, the biological activities of mesocarp part of fruits are lower than exocarp (peel), endocarp (seed) leaf and other parts, people could directly gain the nutritional and pharmacological values from daily consumption

Posterที่เผยแพร่ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ **4th Congress of European Microbiologist FEMS 2011**

**ระหว่างวันที่ 26-30 มิถุนายน 2554**

**ณ เมือง Geneva ประเทศสวิตเซอร์แลนด์**

# Screening of Thai fruit mesocarp extracts for anti-*Helicobacter pylori* and anti-adhesion to HEp-2 cells activities

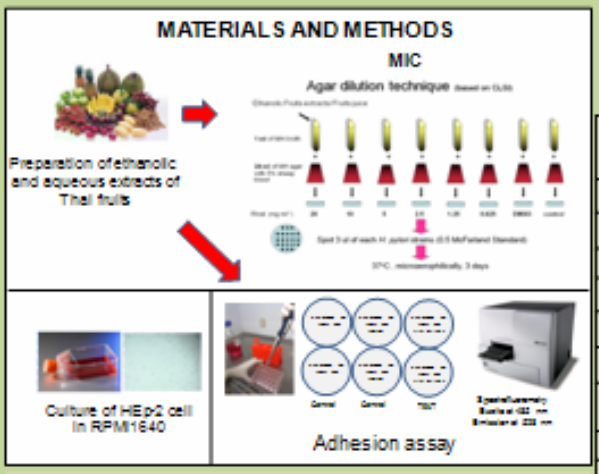
*N. chaichanawongsaroj* and P. pattiyathanee*

*Innovation Center for Research and Development of Medical Diagnostic Technology Project, Department of Transfusion Medicine, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*

## INTRODUCTION

The incidence of gastric cancer is the second leading cause of cancer death worldwide. *H. pylori* associated diseases also included peptic ulcer, gastritis, gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma. Approximately half of the world population becomes infected. The prevalence of *H. pylori* infection varied between geographical area, ethnic, social and age groups which associated with socioeconomic status, educational level and hygiene. The pathogenesis of *H. pylori* infection starts from the bacterium adhesion to stomach microvilli and CagA translocation into the cells which triggers the inflammation and apoptosis process . The first line of treatment is standard triple therapy with a proton pump inhibitor (PPI) and two antibiotics of clarithromycin, amoxicillin, or metronidazole. However, the problems of stains resistant to these antibiotics are rising in many countries rendering the failure of eradication. The alternative approaches of natural products have been extensively studied worldwide to explore novel anti-*Helicobacter pylori* agents. Anti-adhesion agents are also the attractive therapy due to adhesion is the critical step of infection. Fruits are the valuable food for cancer prevention according to their anti-oxidation, anti-inflammation and anti-cancer action. Thus, this study aimed to screen the anti-*Helicobacter pylori* and anti-adhesion of nine Thai fruits. Only the mesocarp part of fruits were screened which advantageous for daily consumption.

## MATERIALS AND METHODS

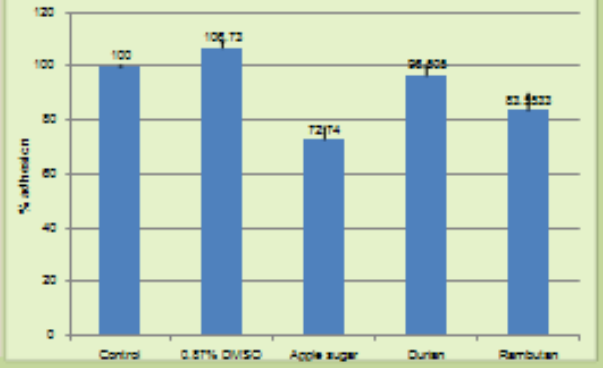



## RESULT

**Table 1.** Minimum inhibitory concentrations (MICs) of Thai fruit extracts against 11 *Helicobacter pylori* strains.

| NO | Scientific Name | Common Name | Aqueous extracts | | Ethanolic extracts | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | MIC 50 | MIC 90 | MIC 50 | MIC 90 |
| 1 | *Nephelium lappaceum L.* | Rambutan | > 20 mg/ml | 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 2 | *Annona squamosa L.* | Sugar Apple | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | 20 mg/ml | 20 mg/ml |
| 3 | *Durio zibethinus L.* | Durian | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | 20 mg/ml |
| 4 | *Salacca edulis Reinw.* | salak pulm | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 5 | *Citrus maxima (Burm.) Merr.* | Pomelo | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 6 | *Manilkara achras Forberg* | Sapodilla | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 7 | *Syzygium samarangense (Blume) Merr. & Perry* | Rose apple | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 8 | *Mangifera indica L.* | Mango | > 20 mg/ml | 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 9 | *Lansium domesticum* | Longkong | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |

**Figure 1.** Adhesion assay of *H. pylori*-infected HEp-2 cells in the absence or presence of ethanolic fruit extracts at 2 h of incubation. The extracts were added at the concentration of the MIC. Data are presented as mean ±SE. The significant difference from control without the extract was set at $p<0.05$.




## DISCUSSION

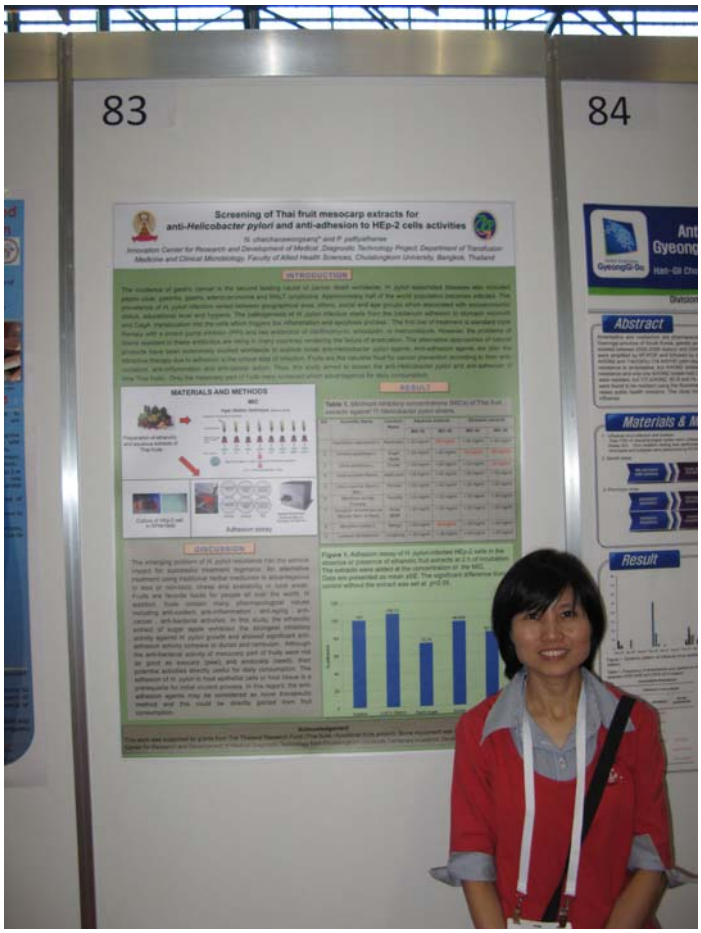
The emerging problem of *H. pylori* resistance has the serious impact for successful treatment regimens. An alternative treatment using traditional herbal medicines is advantageous in less or non-toxic, cheap and availability in rural areas. Fruits are favorite foods for people all over the world. In addition, fruits contain many pharmacological values including anti-oxidant, anti-inflammation , anti-aging , anti-cancer , anti-bacterial activities. In this study, the ethanolic extract of sugar apple exhibited the strongest inhibitory activity against *H. pylori* growth and showed significant anti-adhesion activity compare to durian and rambutan. Although the anti-bacterial activity of mesocarp part of fruits were not as good as exocarp (peel) and endocarp (seed), their potential activities directly useful for daily consumption. The adhesion of *H. pylori* to host epithelial cells or host tissue is a prerequisite for initial virulent process. In this regard, the anti-adhesion agents may be considered as novel therapeutic method and this could be directly gained from fruit consumption.

**Acknowledgement**

This work was supported by grants from The Thailand Research Fund (Thai fruits –functional fruits project). Some equipment was support by The Innovation Center for Research and Development of Medical Diagnostic Technology from Chulalongkorn University Centenary Academic Development Project.

**การนำเสนอผลงาน ในงานประชุม 4th Congress of European Microbiologist FEMS 2011 ระหว่าง วันที่ 26-30 มิถุนายน 2554**

**ณ เมือง Geneva ประเทศสวิตเซอร์แลนด์**



นิพนธ์ต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสาร African Journal of Microbiology

# Screening of Thai Fruit mesocarp extracts for anti-*Helicobacter pylori* and anti-adhesion to HEp-2 cells activities

*N. chaichanawongsaroj* and P. pattiyathanee*

*Innovation Center for Research and Development of Medical Diagnostic Technology Project, Department of Transfusion Medicine, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*

The increasing of antibiotic resistance is the serious problem of most pathogenic bacteria including *Helicobacter pylori* which is the etiologic agent of chronic gastritis, peptic ulceration, gastric carcinoma and gastric MALT-lymphoma. An alternative treatment using traditional plants is advantageous in less or nontoxic, cheap and availability in rural areas. In this study, we examined the activities of 19 Thai fruit mesocarp extracts on growth of *H. pylori* by agar dilution method and anti-adhesion activities of *H. pylori* ATCC43504 against HEp-2 cells by spectrofluorometry. The ethanolic extract of sugar apple (*Annona squamosa* L.) showed the most potent with $MIC_{50}$ of 20 mg/ml and superior anti-adhesion activity of 76.3% against HEp-2 cells. The potential anti-*H.pylori* activities were observed from ethanolic extracts of mangosteen, durian, common jujube, papaya, rambutan juice, mango juice. While, potential anti-adhesion activities were derived from ethanolic extracts of mangosteen, mango, sapodilla, rose apple and both ethanolic and aqueous extracts of guava (pan srithong) and guava (kom sali). Although, pharmacological activities of mesocarp of fruits are lower than exocarp (peel), endocarp (seed) leaf and other parts, people could eat fruits directly or process as wine. Fruit processing could increase more value and also obtain the pharmacochemical substances in fruits.

## Introduction

The incidence of gastric cancer is the second leading cause of cancer death worldwide. For primary prevention, it is important to combine *Helicobacter pylori* eradication with other medical and laboratory screening in order to reduce the mortality in risk population (1). *H. pylori* associated diseases also included peptic ulcer, gastritis, gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma. Approximately half of the world population becomes infected. The prevalence of *H. pylori* infection varied between geographical area, ethnic, social and age groups which associated with socioeconomic status, educational level and hygiene. Transmission is via person-to-person contact by oral-oral, gastro-oral and fecal-oral. The major source of spreading is from contaminated water and food (2, 3). The pathogenesis of *H. pylori* infection starts from the bacterium adhesion to stomach microvilli and CagA translocation into the cells which triggers the inflammation and apoptosis process (4, 5). The first line of treatment is standard triple therapy with a proton pump inhibitor (PPI) and two antibiotics of clarithromycin, amoxicillin, or metronidazole for 7 days (6). However, the problems of stains resistant to these antibiotics are rising in many countries rendering the failure of eradication. The alternative approaches of natural products have been extensively studied worldwide to explore novel anti-*Helicobacter pylori* agents (7, 8, 9). Anti-adhesion agents are also the attractive therapy due to adhesion is the critical step of infection. Several herbal medicines, spice and food plants had been screened for their anti-*Helicobacter pylori* activities including garlic, cinnamon, tea catechins, wasabi and honey (10, 11, 12, 13, 14). Cranberry juice and *Pelargonium sidoides* (ZEPs7630) exhibited good anti adhesion activities (15, 16). Fruits are the valuable food for cancer prevention according to their anti-oxidation, anti-inflammation and anti-cancer action. Thus, this study aimed to screen the anti-*Helicobacter pylori* and anti-adhesion of nineteen Thai fruits. Only the mesocarp part of fruits were screened which advantageous for daily consumption.

## Material and Methods

### Bacterial strains and cultivation

Two *H. pylori* standard strains (ATCC 43504 and ATCC 43526) were used in this study. Seventeen clinical isolates were obtained from Division of Gastroenterology, Department of Medicine, Thammasat University Hospital, Pathumthani, Thailand. All bacterial strains were cultured on brain heart infusion agar containing 7% (v/v) sheep blood and were incubated at 37°C for 3-5 days in a microaerophilic jar system with gas generating kit (Mitsubishi, Japan).

### Preparation of fruits extracts

Nineteen Thai fruits were purchased from local markets including sugar apple, mangosteen, rambutan, durian, longkong, common jujube, salak pulm, pummelo (Thong dee), pummelo (Kao pan), guava (Pan srithong), guava (Kom sali), pineapple, water melon, tangerine, sapodilla, mango, rose apple, papaya and coconut. Only the mesocarp parts were subjected to aqueous and ethanolic extractions. Briefly, 1.5 kilograms of fresh fruits were washed and processed the uneaten parts away. The mesocarp parts were cut into small pieces and dried in an oven at 50 ºC for 24-48 h. For aqueous extraction, one half of the dehydrated fruits was mechanically crushed in small volume of water, squeeze through gauze cloth,

centrifuged at 5,000 rpm for 10 min, and filtered through Whatman Grade No. 1 filter paper. The supernatant was lyophilized until dryness. For ethanolic extraction, another half of the dehydrated fruits were mechanically crushed, extracted twice with 95% ethanol and dried by rotary evaporator at 60 ºC followed by lyophilization until dryness. All extracts were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20°C until use.

**Minimum inhibitory concentration (MIC) determinations**

An agar dilution method was used according to the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) guideline. A two folded serially diluted extracts were mixed with Mueller-Hinton agar supplemented with 5% sheep blood to give a final concentration of 1.25-20 mg/ml. A volume of three microlitres *H. pylori* ($10^7$-$10^8$ CFU/ml) was spotted on each diluted plate and incubated for 3 days as previously described. Growth control plates were performed in each experiment. The MIC was determined from the lowest concentration of each extract with no visible growth.

**Adhesion assay of *H. pylori* to Hep-2 cells**

The HEp-2 cells from a patient with human larynx carcinoma were plated at a density of $10^5$ cells in 24-well-plates in 0.5 ml RPMI 1640 with 10% FBS and 1% antibiotic-antimycotic solution. The cells were left to adhere at 37°C in a humidified atmosphere of 5% $CO_2$ for overnight to obtain 80% confluency which further used for *H. pylori* adhesion assay.

Adhesion and antiadhesion tests were performed by resuspend *H. pylori* ATCC43504 (OD: 2.0) in 1 ml RPMI. The bacterial suspension was incubated with 10 μl 0.1% FITC in DMSO for 1 h at room temperature in the dark. The FITC-labelled bacteria were washed three times in RPMI containing 0.1% Tween 20. HEp-2 monolayers were washed twice in RPMI 1640 and were infected with 100 μl FITC-labelled *H. pylori* in the absent and presence of the extracts. After incubation at 37°C for 2 h, nonadherent bacteria were washed off. The bacterial adherence was quantified by fluorescence microplate reader (excited at 485 nm and detected at 528 nm).

**Statistical analysis**

All experiments were carried out independently in at least duplicate experiments. The levels of adhesion were expressed as mean±SE by compared to the untreated control (100% adhesion). One way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluated the significance at the probability values < 0.05.

## Results

**Effects of fruit extracts on growth of *H. pylori***

The MICs of 19 Thai fruit extracts against *H. pylori* was shown in Table 1. The ethanolic extract of sugar apple exhibited the highest anti-*H. pylori* activity with $MIC_{50}$ = 20 mg/ml. The potential growth inhibition were demonstrated in ethanolic extracts

of mangosteen, durian, pudsa and papaya and aqueous extracts of rambutan and mango with $MIC_{40}$ = 20 mg/ml.

**Anti-adhesion activities of the ethanolic extracts of Thai fruits**

The extracts from mesocarp of all 18 fruits were compared for their anti-adhesion activity against HEp-2 cells using the concentration at 20 mg/ml of each. The result was shown in Figure 1. The ethanolic extract of sugar apple and aqueous extract of mango exhibited the most potent anti-adhesion activity at 76.3 % and 70%, respectively ($p < 0.05$). The potential anti-adhesion activities were observed from ethanolic extracts of mangosteen, guava, sapodilla, rose apple and guava juice with 44.9- 63.7% anti-adhesion activities. Although mangosteen seemed to have superior inhibitory activity against *H. pylori* adhesion, it also affected the adherence of HEp-2 cells. The preliminary study by incubation of the mangosteen extracts with *H. pylori* prior to adding to the HEp-2 cells demonstrated the potential anti-adhesion activity (data not shown).

**Discussion**

The emerging problem of *H. pylori* resistance has the serious impact for successful treatment regimens. An alternative treatment using traditional herbal medicines is advantageous in less or non-toxic, cheap and availability in rural areas. Several studies of anti *H. pylori* activities have been reported in numerous countries such as china (17), Taiwan (18), Mexican (19), Cameroon (8), Iran (21) Greek (7) and Thailand (20). Fruits are favorite foods for people all over the world. Both fiber and vitamins are important for good health. In addition, fruits contain many pharmacological values including anti-oxidant (24, 25, 26), anti-inflammation (27), anti-aging (30), anti-cancer (28, 29), anti-bacterial activities (31). In this study the ethanolic extract of sugar apple exhibited the strongest inhibitory activity against *H. pylori* growth and showed highest anti-adhesion activity compare to other fruits. Although the anti-bacterial activity of mesocarp part of fruits were not as good as exocarp (peel) and endocarp (seed), their potential activities directly useful for daily consumption. The MIC of pericarps of mangosteen against *Candida albicans* was 1 mg/ml (32). The MIC of mango against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and extended spectrum beta lactamase (ESBL) were 0.31-6.25 mg/ml and 0.32-7.5 mg/ml, respectively (33). The MIC of guava leave against multidrug-resistant *Vibrio cholera*e O1 and multidrug resistant *S. aureus* was 1.25 mg/ml (34) and 7.5 mg/ml (23), respectively. The adhesion of *H. pylori* to host epithelial cells or host tissue is a prerequisite for initial virulent process. In this regard, the anti-adhesion agents may be considered as novel therapeutic method, for example cranberry juice (15) *Pelargonium sidoides* root extract (16) and green tea leaf (22). Thus, prevention and treatment of *H. pylori* infection could be directly gained from fruit consumption.

Table 1. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of Thai fruit extracts against 19 *Helicobacter pylori* strains.

| NO | Scientific Name | Common Name | Aqueous extracts | | Ethanolic extracts | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | MIC 50 | MIC 40 | MIC 50 | MIC 40 |
| 1 | *Garcinia mangostana* L. | Mangosteen | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | **20 mg/ml** |
| 2 | *Nephelium lappaceum* L. | Rambutan | > 20 mg/ml | **20 mg/ml** | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 3 | *Annona squamosa* L. | Sugar Apple | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | **20 mg/ml** | **20 mg/ml** |
| 4 | *Durio zibethinus* L. | Durian | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | **20 mg/ml** |
| 5 | *Lansium domesticum* | - | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 6 | *Zizyphus mauritiana* Lamk. | - | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | **20 mg/ml** |
| 7 | *Salacca edulis* Reinw. | salak pulm | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 8 | *Citrus maxima* (Burm.) Merr. | Pomelo | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 9 | *Citrus maxima* (Burm.) Merr. | Pomelo, | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 10 | *Psidium guajava* L. | Guava | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 11 | *Psidium guajava* L. | Guava | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 12 | Ananas comosus (Linn.) Merr. | Pineapple | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 13 | Citrullus lanatus Mats & Nakai | Water melon | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 14 | *Citrus reticulata* Blanco | Tangerine | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 15 | *Manilkara achras* Fosberg | Spodilla | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 16 | *Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & Perry | Rose apple | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 17 | Cocos nucifera Linn. | Coconut | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |
| 18 | Carica papaya Linn | Papaya | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml | **20 mg/ml** |
| 19 | *Mangifera indica* L. | Mango | > 20 mg/ml | **20 mg/ml** | > 20 mg/ml | > 20 mg/ml |

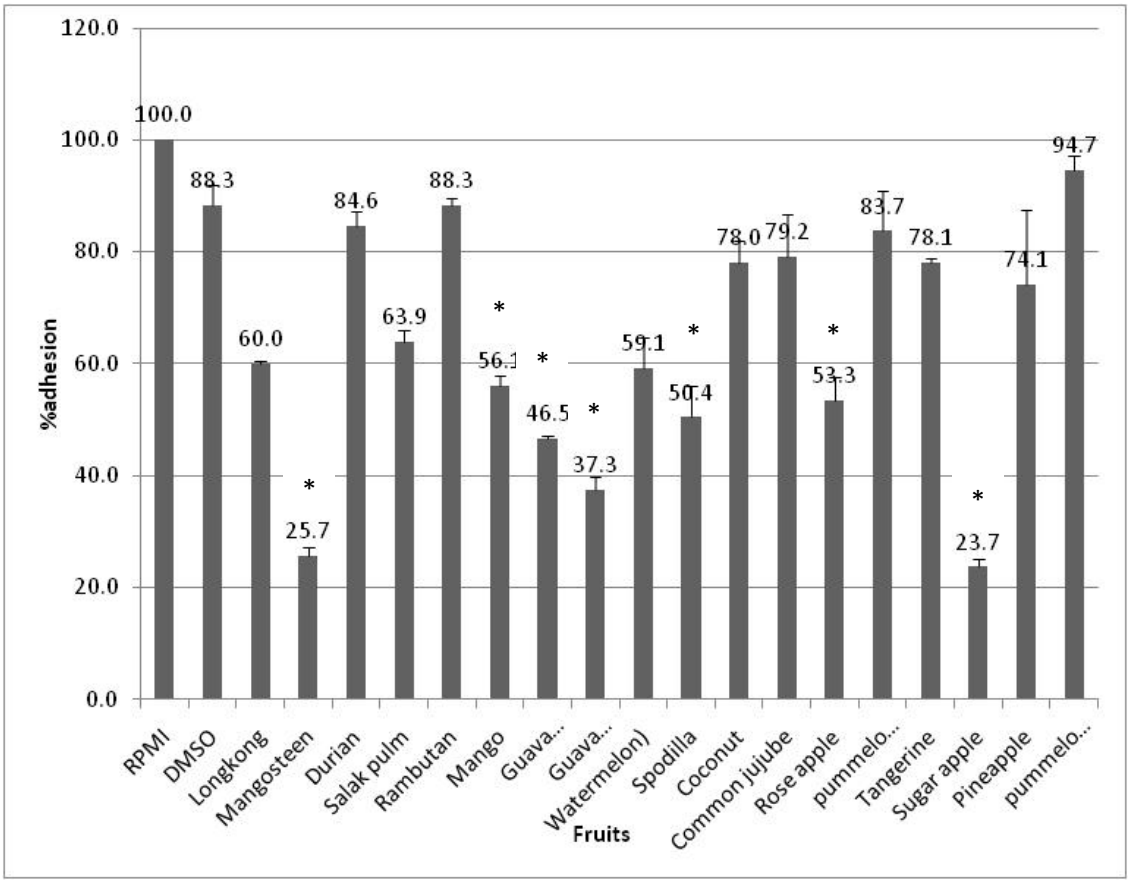



Figure 1. Adhesion assay of *H. pylori*-infected HEp-2 cells in the absence or presence of 18 ethanolic fruit extracts at 2 h of incubation. The extracts were added at the concentration of the MIC. Data are presented as mean ±SE. The significant difference from control without the extract was set at $p<0.05$.

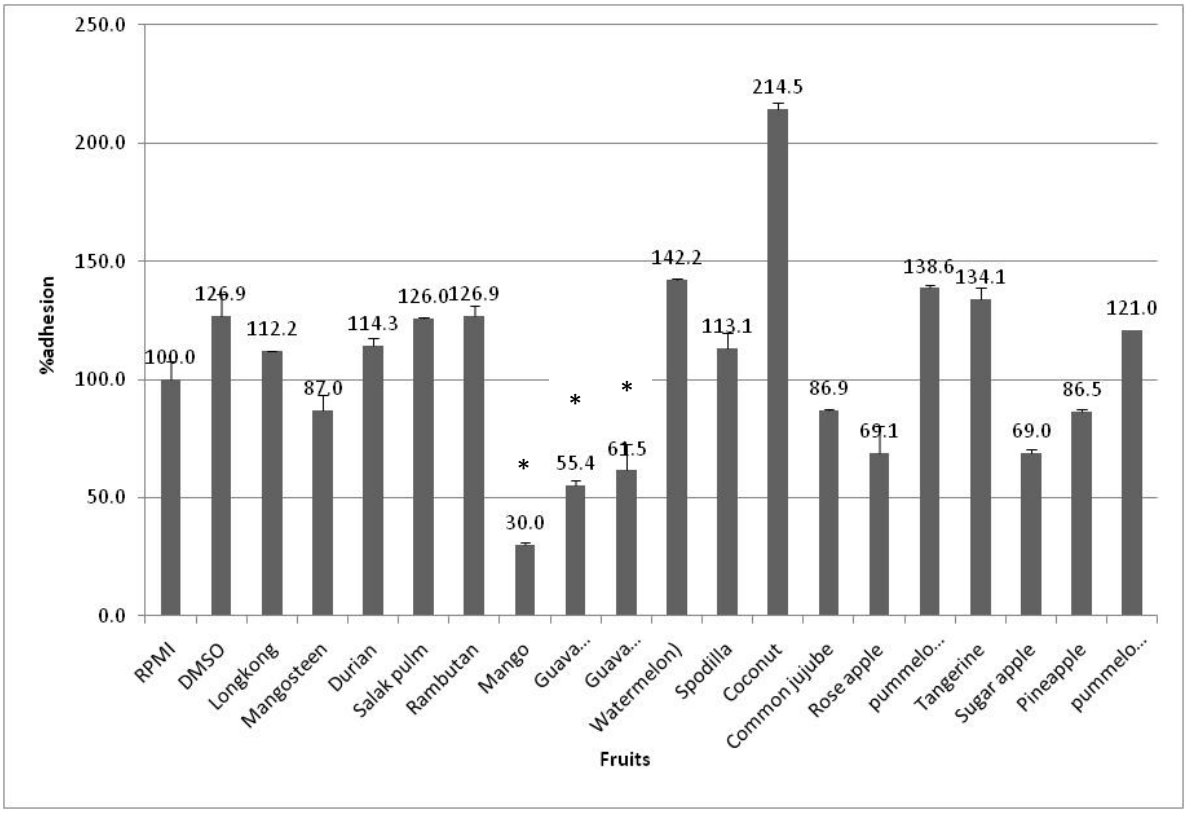



Figure 2. Adhesion assay of *H. pylori*-infected HEp-2 cells in the absence or presence of 18 aqueous fruit extracts at 2 h of incubation. The extracts were added at the concentration of the MIC. Data are presented as mean ±SE. The significant difference from control without the extract was set at $p<0.05$.

## Acknowledgement

This work was supported by grants from The Thailand Research Fund (Thai fruits – functional fruits project). Some equipment was support by Innovation Center for Research and Development of Medical Diagnostic Technology from Chulalongkorn University Centenary Academic Development Project.

References


1. Asaka M (2011). Strategies for extermination of gastric cancer from Japan. Nippon Rinsho. 69:173-182.
2. Ford AC, Axon AT (2010). Epidemiology of Helicobacter pylori infection and public health implications.Helicobacter. 15 Suppl 1:1-6.
3. Khalifa MM, Sharaf RR, Aziz RK (2010). *Helicobacter pylori*: a poor man's gut pathogen? Gut Pathog. 2:2.
4. Shimada T, Watanabe N, Ohtsuka Y, Endoh M, Kojima K, Hiraishi H, Terano A (1999). Polaprezinc down-regulates proinflammatory cytokine-induced nuclear factor-kappaB activiation and interleukin-8 expression in gastric epithelial cells. J Pharmacol Exp Ther. 291: 345-352.
5. Al-Marhoon MS, Nunn S, Soames RW (2004). The association between cagA+ *H. pylori* infection and distal gastric cancer: a proposed model. Dig Dis Sci. 49:1116-1122.
6. Cavallaro LG, Egan B, O'Morain C, Di Mario F (2006). Treatment of *Helicobacter pylori infection*. Helicobacter. 11 Suppl 1, 36-39.
7. Stamatis G, Kyriazopoulos P, Golegou S, Basayiannis A, Skaltsas S, Skaltsa H (2003). *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. J. Ethnopharmacol. 88:175-179.
8. Ndip RN, Malange Tarkang AE, Mbullah SM, Luma HN, Malongue A, Ndip LM, Nyongbela K, Wirmum C, Efange SM (2007). *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. J. Ethnopharmacol. 114: 452-457.
9. Shih YT, Wu DC, Liu CM, Yang YC, Chen IJ, Lo YC (2007). San-Huang-Xie-Xin-Tang inhibits *Helicobacter pylori*-induced inflammation in human gastric epithelial AGS cells. J. Ethnopharmacol. 112: 537-544.
10. Mabe K, Yamada M, Oguni I, Takahashi T (1999). *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. Antimicrob. Agents. Chemother. 43: 1788-1791.
11. Ohta R, Yamada N, Kaneko H, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T, Suzuki A (1999). *In vitro* inhibition of the growth of *Helicobacter pylori* by oil-macerated garlic constituents. Antimicrob. Agents. Chemother. 43:1811-1812.
12. Osato MS, Reddy SG, Graham DY (1999). Osmotic effect of honey on growth and viability of *Helicobacter pylori.* Dig. Dis. Sci. 44: 462-464.
13. Tabak M, Armon R, Neeman I (1999). Cinnamon extracts' inhibitory effect on *Helicobacter pylori*. J. Ethnopharmacol. 67: 269-277.
14. Shin IS, Masuda H, Naohide K (2004). Bactericidal activity of wasabi (Wasabia japonica) against *Helicobacter pylori*. Int. J. Food. Microbiol. 94: 255-261.
15. Shmuely H, Burger O, Neeman I, Yahav J, Samra Z, Niv Y, Sharon N, Weiss E, Athamna A, Tabak M, Ofek I (2004). Susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates to the antiadhesion activity of a high-molecular-weight constituent of cranberry. Diagn Microbiol Infect Dis. 50:231-235.
16. Beil W, Kilian P (2007). EPs 7630, an extract from Pelargonium sidoides roots inhibits adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. Phytomedicine.14 Suppl 6:5-8.
17. Li Y, Xu C, Zhang Q, Liu JY, Tan RX (2005). In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. J Ethnopharmacol. 98: 329-333.

18. Wang YC, Huang TL (2005). Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. FEMS Immunol Med Microbiol. 43: 295-300.
19. Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares E, Bye R, Romero I (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. J Ethnopharmacol.122: 402-405.
20. Bhamarapravati, S.; Pendland, S. L.; Mahady, G. B. Extracts of spice and food plants from Thai traditional medicine inhibit the growth of the human carcinogen *Helicobacter pylori*. In Vivo. 2007; 17: 541-544.
21. Nariman F, Eftekhar F, Habibi Z, Falsafi T (2004). Anti-*Helicobacter pylori* activities of six Iranian plants. Helicobacter. 9:146-151.
22. Lee JH, Shim JS, Chung MS, Lim ST, Kim KH (2009). In vitro anti-adhesive activity of green tea extract against pathogen adhesion. Phytother Res. 23:460-466.
23. Anas K, Jayasree PR, Vijayakumar T, Manish Kumar PR (2008). In vitro antibacterial activity of *Psidium guajava* Linn. Leaf extract on clinical isolates of multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. Indian J Exp Biol. 46:41-46.
24. Khammuang S, Sarnthima R (2011). Antioxidant and antibacterial activities of selected varieties of thai mango seed extract. Pak J Pharm Sci. 24:37-42.
25. Prasad S, Kalra N, Singh M, Shukla Y (2008). Protective effects of lupeol and mango extract against androgen induced oxidative stress in Swiss albino mice. Asian J Androl.10:313-318.
26. Ngawhirunpat T, Opanasopi P, Sukma M, Sittisombut C, Kat A, Adachi I (2010). Antioxidant, free radical-scavenging activity and cytotoxicity of different solvent extracts and their phenolic constituents from the fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana*). Pharm Biol. 48: 55-62.
27. Obolskiy D, Pischel I, Siriwatanametanon N, Heinrich M (2009). *Garcinia mangostana* L.: a phytochemical and pharmacological review. Phytother Res. 23: 1047-1065.
28. Watanapokasin R, Jarinthanan F, Jerusalmi A, Suksamrarn S, Nakamura Y, Sukseree S, Uthaisang-Tanethpongtamb W, Ratananukul P, Sano T (2010). Potential of xanthones from tropical fruit mangosteen as anti-cancer agents: caspase-dependent apoptosis induction in vitro and in mice. Appl Biochem Biotechnol. 162:1080-1094.
29. Báez R, Lopes MT, Salas CE, Hernández M (2007). In vivo antitumoral activity of stem pineapple (*Ananas comosus*) bromelain. Planta Med. 73:1377-1383.
30. Unno K, Sugiura M, Ogawa K, Takabayashi F, Toda M, Sakuma M, Maeda K, Fujitani K, Miyazaki H, Yamamoto H, Hoshino M (2011). Beta-cryptoxanthin, plentiful in Japanese mandarin orange, prevents age-related cognitive dysfunction and oxidative damage in senescence-accelerated mouse brain. Biol Pharm Bull. 34:311-317.
31. Kothari V, Seshadri S (2010). In vitro antibacterial activity in seed extracts of *Manilkara zapota*, *Anona squamosa*, and *Tamarindus indica*. Biol Res.43:165-168.
32. Kaomongkolgit R, Jamdee K, Chaisomboon NJ (2009). Antifungal activity of alpha-mangostin against *Candida albicans*. Oral Sci. 5:401-406.
33. Aqil F, Ahmad I (2007). Antibacterial properties of traditionally used Indian medicinal plants. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 29:79-92.

34. Rahim N, Gomes DJ, Watanabe H, Rahman SR, Chomvarin C, Endtz HP, Alam M (2010). Antibacterial activity of *Psidium guajava* leaf and bark against multidrug-resistant *Vibrio cholerae*: implication for cholera control. Jpn J Infect Dis.63: 271-274.