

เอนไซม์แกมมา-กลูตามิลทรานส์เปปติเดสของเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร มีบทบาทในการทำลายพิษของอีพิแกลโลคาเทชิน แกลเลท *Helicobacter pylori* γ -Glutamyl Transpeptidase Plays a Role in Detoxification of Epigallocatechin Gallate

ภัสนันท์วรรณ เจนนุวัต, จารุณี ควรวชิบูลย์, ศศิชัย กังสดาลอำไพ*

สาขาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จังหวัดปทุมธานี 12120

Patsayawan Jennuwat, Jarunee Kaulpiboon, Sasichai Kangsadalampai*

Division of Biochemistry, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120

Received 5 June 2023; Received in revised 28 June 2023; Accepted 6 July 2023

บทคัดย่อ

อุบัติการณ์ของการดื้อยาปฏิชีวนะของ *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุหลักของโรคกระเพาะอาหารและเป็นปัจจัยก่อมะเร็งในกระเพาะอาหาร นำไปสู่การค้นหาสารต้านแบคทีเรียตามธรรมชาติชนิดใหม่ มีรายงานว่า อีพิแกลโลคาเทชินแกลเลท (epigallocatechin gallate หรือ EGCG) ซึ่งเป็นสารคาเทชินที่มีศักยภาพมากที่สุดที่พบในชาเขียว (*Camellia sinensis* L.) มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้ง *H. pylori* เมื่อเร็วๆ นี้ มีการรายงานถึงการยับยั้งเอนไซม์แกมมา-กลูตามิลทรานส์เปปติเดส (γ -glutamyl transpeptidase หรือ GGT) ในเซลล์ตับของมนุษย์โดย EGCG อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับผลของ EGCG ต่อ GGT ของ *H. pylori* ซึ่งเป็นหนึ่งในโปรตีนก่อความรุนแรงโรคของแบคทีเรีย จากข้อมูลการยับยั้ง GGT ของมนุษย์ จึงสันนิษฐานว่า EGCG สามารถยับยั้ง GGT ของเชื้อ *H. pylori* ได้เช่นกัน โดยผ่านกลไกบางอย่างซึ่งรวมถึงการลดลงของการแสดงออกของ *ggt* gene ของแบคทีเรีย เพื่อต่อยอดความรู้จึงได้ทำการศึกษากลไกของ EGCG ต่อระดับ *ggt* mRNA ของ *H. pylori* จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของ EGCG ในการยับยั้ง *H. pylori* เท่ากับ 250 $\mu\text{g/ml}$ จากนั้นทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ *ggt* gene ของ *H. pylori* ที่เติบโตบนอาหารที่มี EGCG ที่ sub-MIC (125 $\mu\text{g/ml}$) และไม่มี EGCG โดยใช้ quantitative RT-PCR ด้วยวิธี SYBR green fluorescein จากการทดลองพบว่า การแสดงออกของ *ggt* gene ของ *H. pylori* ที่สัมผัสกับ EGCG มีการเพิ่มขึ้น (up-regulation) มากกว่า 12 เท่า ($p < 0.01$) ซึ่งข้อมูลนี้ตรงกันข้ามกับที่คาดการณ์ไว้ว่าน่าจะมีแนวโน้มลดลง การเพิ่มขึ้นของระดับการถอดรหัสของ *ggt* gene ในการศึกษาที่บ่งชี้ว่า นอกจาก GGT จะจำเป็นในการอยู่อาศัยในโฮสต์ของแบคทีเรียแล้ว เอนไซม์นี้ยังถูกผลิตขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการได้รับ EGCG ซึ่งเป็นเพราะ GGT มีอีกบทบาทหนึ่งคือเป็นเอนไซม์ในกระบวนการทำลายสารพิษของเชื้อแบคทีเรีย

คำสำคัญ: เฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร; แกมมา-กลูตามิล ทรานส์เปปติเดส; การทำลายพิษ; อีพิแกลโลคาเทชินแกลเลท

*ผู้รับผิดชอบบทความ: sasichai.613@gmail.com

doi:

Abstract

The emergence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*, a major cause of dyspepsia and a carcinogenic agent of gastric cancer, has led to the search for new natural antibacterial compounds. It has been reported that epigallocatechin gallate (EGCG), the most potent catechin found in green tea (*Camellia sinensis* L.), exhibits antibacterial activity against several bacteria, including *H. pylori*. Recently, the inhibition of the human liver cell γ -glutamyl transpeptidase (GGT) by EGCG has been demonstrated. However, there have been no reports on the effect of EGCG on *H. pylori* GGT, which is one of the bacterial virulence factors. Based on the evidence of human GGT inhibition, it is assumed that the EGCG can also inhibit *H. pylori* GGT through mechanisms that may include a reduction in the bacterial *ggt* gene expression. To extend our knowledge, the effect of EGCG on the *H. pylori* *ggt* mRNA level was examined. The minimal inhibitory concentration (MIC) of EGCG against *H. pylori* was determined and found to be 250 $\mu\text{g/ml}$. Subsequently, the *ggt* gene expression level of the *H. pylori* grown on a media containing EGCG at sub-MIC (125 $\mu\text{g/ml}$) and no EGCG was studied using the quantitative RT-PCR with SYBR green fluorescein method. The result showed that the *ggt* gene expression of *H. pylori* exposed to EGCG was up-regulated by over 12 fold ($p < 0.01$). This finding contradicts the expected reduction in gene expression. The observed increase in transcriptional level of the bacterial *ggt* gene in this study indicates that, besides its role in bacterial colonization, the *H. pylori* GGT is produced as a respond to EGCG exposure, possibly due to the fact that the enzyme involves the detoxification of toxic substances.

Keywords: *Helicobacter pylori*; γ -glutamyl transpeptidase; Detoxification; Epigallocatechin gallate

1. บทนำ

Helicobacter pylori ถูกพบครั้งแรกโดย Prof. J. Robin Warren และ Prof. Barry James Marshall ในปี ค.ศ. 1982 ที่ประเทศออสเตรเลีย [1-2] *H. pylori* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นเกลียว (spiral) สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophilic) ในกระเพาะอาหารมนุษย์ซึ่งเป็นโฮสต์ชนิดเดียวตามธรรมชาติในสภาวะที่มีความเป็นกรดมาก [3] เพราะเชื้อสามารถสร้างแอมโมเนียมาลดความเป็นกรดของน้ำย่อยที่ถูกปล่อยออกมาในกระเพาะอาหาร

เชื้อนี้ก่อโรคได้เนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนก่อความรุนแรงโรค (virulence factors) ซึ่งจำเป็นสำหรับการอยู่รอดของเชื้อและก่อให้เกิดโรคในกระเพาะอาหารของโฮสต์ โดยโปรตีนก่อความรุนแรงโรคที่เชื้อสร้างจะทำลายเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร ทำให้เกิดโรคของกระเพาะอาหารและลำไส้ ได้แก่ โรคกระเพาะอาหารอักเสบ (gastritis) โรคแผลในกระเพาะอาหาร (peptic ulcer) รวมถึงอาจก่อให้เกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหารได้ (gastric cancer) [4] ปัจจุบันพบการอุบัติของโรคมากกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรโลก [5] การรักษาอาการ

ติดเชื้อ *H. pylori* โดยทั่วไปใช้วิธี triple therapy ซึ่งเป็นการใช้ยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดร่วมกับยายับยั้งการหลั่งกรด (proton-pump inhibitor) 1 ชนิด [6] แต่ปัจจุบันเกิดปัญหาหลายประการที่ทำให้การรักษาไม่ได้ผล ได้แก่ การเกิดผลข้างเคียงจากการใช้ยา การที่ผู้ป่วยใช้ยาไม่ถูกต้องหรือผู้ป่วยไม่ให้ความร่วมมือในการรับประทานยา ค่าใช้จ่ายที่สูงเนื่องจากการใช้ยาหลายตัว รวมถึงการดื้อยาในผู้ป่วย [7-8] จากปัญหาที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้เกิดการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับผลในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชทั่วโลกมากขึ้น และพบว่า มีพืชหลายชนิดที่อาจนำมาใช้เป็นยาทางเลือกทดแทนยาปฏิชีวนะได้ [9]

ชา (*Camellia sinensis*) ถูกนำมาเป็นเครื่องดื่มและได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในหลายประเทศทั่วโลก [10] โดยส่วนของชาที่นิยมใช้ดื่มกันเป็นส่วนชงของยอดใบชา ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่เป็นสารประกอบพอลิฟีนอล (polyphenols) ที่เป็นสารที่มีศักยภาพมากสุดในการใช้รักษาอาการต่างๆ สารประกอบพอลิฟีนอลในใบชาที่พบส่วนใหญ่จะเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งที่พบมากในยอดใบชาคือฟลาโวนอล (flavanols) ชาเมื่อแบ่งตามกระบวนการผลิตสามารถแบ่งได้ 3 ประเภท คือ ชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ ชาเขียวเป็นชาที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก ชาอู่หลงเป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักเพียงบางส่วน และชาดำเป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักอย่างสมบูรณ์ ระดับการหมักที่ต่างกันทำให้ชาแต่ละชนิดมีองค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกัน ส่งผลให้ชามีสี กลิ่น และรสชาติที่แตกต่างกัน ในการผลิตชาเขียว ยอดใบชาสดที่เก็บมาจะถูกนำไปนึ่ง หรือคั่วด้วยเตาไฟเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดกระบวนการหมัก ผลผลิตกันชาเขียวจึงมีปริมาณของสารพอลิฟีนอลสูงในระดับใกล้เคียงกับยอดใบชาสด [11]

สารคาเทชินเป็นสารพอลิฟีนอลกลุ่มฟลาโวนอลที่พบมากถึง 75% ของพอลิฟีนอลทั้งหมดในยอดใบชา เป็นสารที่ไม่มีสี ละลายในน้ำ และมีรสฝาด ในใบชาประกอบด้วยคาเทชินจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ คาเทชิน (catechin), อีพิคาเทชิน (epicatechin), แกลโลคาเทชิน (gallocatechin), อีพิแกลโลคาเทชิน (epigallocatechin),

คาเทชินแกลเลท (catechin gallate), อีพิคาเทชินแกลเลท (epicatechin gallate), แกลโลคาเทชิน (gallocatechin gallate), อีพิแกลโลคาเทชินแกลเลท (epigallocatechin gallate) จากการศึกษพบว่า สารคาเทชินมีสรรพคุณหลายอย่าง เช่น ด้านอนุมูลอิสระ [12] ด้านมะเร็ง [13-15] ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและโรคหลอดเลือด [16] ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดในโรคเบาหวาน [17] และต้านจุลชีพทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ เชื้อรา และไวรัส [18-21] มีรายงานว่าสารคาเทชินมีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียโดยอาศัยกลไกที่แตกต่างกัน เช่น ลดการเกาะติดโฮสต์เซลล์ [22] ลดการสร้างเอนไซม์ที่เป็นโปรตีนก่อความรุนแรงโรค [23] มีรายงานความสามารถของสารสกัดจากชาเขียวในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *H. pylori* [24-25] หนึ่งในกลไกที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องคือ การยับยั้งการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส [23] นอกจากนี้พบว่า อีพิแกลโลคาเทชินแกลเลท (EGCG) ยังสามารถยับยั้งเอนไซม์แกมมา-กลูตาไมลทรานส์เปปติเดส (γ -glutamyl transpeptidase หรือ GGT) ในเซลล์ตับของมนุษย์ทั้งเซลล์ที่ปกติซึ่งมีระดับของ GGT ปกติ และเซลล์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษโดยแอลกอฮอล์ซึ่งมีระดับของ GGT สูงกว่าปกติ [26] อย่างไรก็ตาม จนถึงปัจจุบันนี้ยังไม่มีการรายงานถึงผลการยับยั้งของ EGCG ต่อ GGT ของ *H. pylori* ซึ่งเป็นเอนไซม์หนึ่งในโปรตีนก่อความรุนแรงโรคของเชื้อ จากข้อมูลการยับยั้ง GGT ของมนุษย์โดย EGCG ดังที่กล่าวข้างต้น จึงสันนิษฐานว่า EGCG สามารถยับยั้ง GGT ของเชื้อ *H. pylori* ได้เช่นกัน

GGT เป็นเอนไซม์ที่พบได้ใน *H. pylori* ทุกสายพันธุ์ เอนไซม์ดังกล่าวเป็นหนึ่งในโปรตีนก่อความรุนแรงโรคที่สำคัญ โดย GGT ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่แกมมา-กลูตาไมล จากซับสเตรตตัวให้ (donor substrate) ให้แก่ ซับสเตรตตัวรับ (acceptor substrate) โดยถ้าซับสเตรตตัวให้คือกลูตามีนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูตาเมตและแอมโมเนีย ถ้าซับสเตรตตัวให้คือ กลูตาไธโอนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูตาเมต และซิสทีนิลไกลซีน (cysteinylglycine) จากการที่ *H. pylori* ไม่สามารถสังเคราะห์กลูตาเมตได้เอง จึงนำกลูตาเมตจากภายนอก

เซลล์เข้ามาใช้ในเซลล์ ส่งผลให้กลูตามีนและกลูตาไธโอนของโฮสต์ลดลง ทำให้เซลล์กระเพาะอาหารมีความไวต่อสารพิษต่างๆ และสูญเสียสมดุลรีดอกซ์ซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์ [27-29] โดยก่อนหน้านี้นี้ มีรายงานที่ GGT มีความเกี่ยวข้องกับการเข้าอยู่อาศัยในโฮสต์ (colonization) ของ *H. pylori* และการตายของเซลล์กระเพาะอาหาร (gastric cell apoptosis) [30] รวมทั้งยังมีรายงานว่า การเลี้ยง *H. pylori* ในอาหารที่มี L-serine sodium borate complex ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ GGT ส่งผลชะลอการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งบ่งชี้ถึงบทบาทสำคัญของ GGT ต่อการเจริญเติบโตของ *H. pylori* [31] อย่างไรก็ตาม ในรายงานดังกล่าวมิได้แสดงถึงผลต่อการแสดงออกของ *ggt* gene นอกจากนี้ มีการพบว่า *H. pylori* ภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจนที่ไม่เหมาะสมจะเปลี่ยนจากรูปร่างจากแบบเกลียวไปเป็นแบบกลม (coccoïd) ซึ่งไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในห้องปฏิบัติการ แต่ยังคงมีการแสดงออกของ *ggt* gene ช่วยให้แบคทีเรียสามารถคงอยู่ในกระเพาะอาหารของโฮสต์ได้ [32]

จากข้อมูลที่ว่า EGCG สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *H. pylori* ได้ ในงานวิจัยนี้ได้ตั้งสมมติฐานว่า เอนไซม์ GGT ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของ *H. pylori* เป็นหนึ่งในเป้าหมายการออกฤทธิ์ของ EGCG โดยผ่านการลดระดับการแสดงออกของ *ggt* gene (down-regulation) ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาลักษณะของ EGCG ต่อระดับการแสดงออกของ *ggt* gene ของ *H. pylori*

2. วิธีการ

2.1 การเลี้ยง *H. pylori*

H. pylori สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 : CagA, VacA, UreC positive strain ถูกนำมาเลี้ยงบน Brain Heart Infusion Agar (BHI; Difco, MD, USA) ซึ่งเติมเลือด 7% ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂, 95% Humidity) เป็นเวลา 3-5 วัน และทำการทดสอบเพื่อยืนยันโดยดูลักษณะโคโลนี การย้อมสีแกรม (Gram stain) และทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีเพื่อหา

เอนไซม์ของเชื้อ ได้แก่ ยูรีเอส คาตาเลส และออกซิเดส

2.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ EGCG ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *H. pylori* (minimum inhibition concentration หรือ MIC)

ทำการทดสอบความไวต่อ EGCG ของ *H. pylori* โดยดูจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ ซึ่งเรียกว่า minimum inhibition concentration (MIC) ขั้นแรกทำการละลาย EGCG (Sigma-Aldrich, Inc. MO, USA) ใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 µg/ml จากนั้นทำการเจือจางแบบ 2-fold serial dilution ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI blood agar ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500, 250, 125, 62.5 31.25 และ 15.625 µg/ml ตามลำดับ โดยในการหาค่า MIC นี้ใช้ 250 µg/ml Metronidazole (Sigma-Aldrich, Inc. MO, USA) เป็น positive control และ 2% DMSO เป็น diluent control

ทำการเลี้ยง *H. pylori* บน BHI blood agar เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นขูดเอาโคโลนีของเชื้อมาละลายใน BHI broth จนมีความขุ่นที่ McFarland no.2 หรือ 10⁸ Colony Forming Unit: CFU/ml (วัดความขุ่นเชื้อด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ปรับความขุ่นจนได้ค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง 0.38-0.4) ทำการปิเปต *H. pylori* ปริมาตร 5 µl ลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI blood agar ที่มี EGCG ความเข้มข้นต่างๆ และบ่มเชื้อที่ 37°C ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเป็นเวลา 3 วัน สังเกตการเจริญเติบโตของ *H. pylori* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการหาค่า MIC ซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อความถูกต้องของค่า MIC ที่ได้

2.3 การเลี้ยง *H. pylori* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี EGCG

ทำการเลี้ยง *H. pylori* บน BHI blood agar ที่มี EGCG ความเข้มข้น 1/2 ของค่า MIC บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการเก็บเซลล์แบคทีเรีย นำบางส่วนมาย้อมสีแกรมเพื่อดูรูปร่างของเซลล์ จากนั้นละลายเซลล์ส่วนหนึ่งใน BHI broth วัดความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ 550 nm ปรับให้มีความเข้มข้น

ของเซลล์ 2×10^8 cells/ml จากนั้นปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอนเซลล์ที่ -80°C สำหรับสกัด RNA เพื่อทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ก่อความรุนแรงโรคต่อไป การเก็บตะกอนของเชื้อที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี EGCG สำหรับการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป ทำแบบซ้ำ 3 ครั้ง

2.4 การสกัด RNA และการสังเคราะห์สาย cDNA

นำตะกอนเซลล์ *H. pylori* ที่ได้มาสกัด RNA ด้วยน้ำยา TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method [33] วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย RNA ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm โดยสารละลาย RNA ที่บริสุทธิ์จะมีค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{280} ประมาณ 1.8-2.1 และตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส จากนั้นนำสารละลาย RNA มากำจัด DNA ที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNase I (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) ปริมาณ 5 Units / สารละลาย RNA 1 μg แล้วตรวจสอบเพื่อยืนยันว่าสารละลาย RNA ที่ได้ไม่มี DNA ปนเปื้อนอยู่ โดยนำ RNA ที่ได้ไปเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ *16s rRNA* gene ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส และตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส หากมี DNA ปนเปื้อนจะพบแถบ DNA ของ *16s rRNA* gene ที่ถูกเพิ่มจำนวนเพียงบางส่วนขนาด 172 bp ปรากฏอยู่ นำสารละลาย RNA ที่กำจัด DNA แล้วมาสังเคราะห์สาย cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase ด้วยชุดน้ำยา SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, MA, USA) โดยใช้ random hexamer

2.5 การประเมินการแสดงออกของยีนด้วย real-time PCR

ประเมินการแสดงออกของ *ggt* gene ด้วยวิธี relative quantitation โดยใช้ *16S rRNA* gene เป็น reference gene ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 2x QPCR Green Master Mix HRox (Biotechrabbit, Germany) ปริมาตร 10 μl , 100 ng cDNA, 400 nM

ggt forward (5'-CAG CCA GAT ACG GTT ACG C-3') และ reverse (5'-CCA CCT GTC CGC TAC AGA AT-3') primers [27], 16S rRNA forward (5'-GCT CTT TAC GCC CAG TGA TTC-3') และ reverse (5'-GCC TGG AGG ATG AAG GTT TT-3') primers [34] และเติม nuclease-free water จนปริมาตรครบ 20 μl จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง StepOnePlus[™] Real-time PCR system (Applied Biosystems, California) โดยมีขั้นตอนดังนี้ initial activation ที่ 95°C , 2 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 95°C , 15 วินาที และ annealing/extension ที่ 60°C , 30 วินาที (ทำซ้ำ denaturation และ annealing/extension 40 รอบ) และขั้นตอนสุดท้าย 72°C , 5 นาที เพื่อการวิเคราะห์ melting curve โดยที่ในแต่ละครั้งของการทดสอบข้างต้นจะทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ปริมาณ amplified DNA ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบนั้นจะแสดงผลออกมาในรูปของค่า cycle threshold (Ct) การคำนวณการแสดงออกสัมพัทธ์ของ target gene (fold change) ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ หาได้จากสูตร $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ตามวิธีของ Pfaffl [35]

2.6 การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาความแตกต่างการแสดงออกสัมพัทธ์ของยีนเป้าหมาย (fold change) ของ *H. pylori* ระหว่างกลุ่มควบคุม (การเลี้ยงโดยไม่มี EGCG) และกลุ่มทดลอง (การเลี้ยงโดยมี EGCG) ใช้การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วยการทดสอบแบบ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ด้วยโปรแกรม SPSS

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

จากการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ EGCG ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *H. pylori* พบว่ามีค่า MIC 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (โดยทำการยืนยันมากกว่า 3 ครั้ง) ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ค่าความเข้มข้นของ EGCG ที่ sub-MIC (หรือ 1/2 MIC) ที่ 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ เพราะเป็นความเข้มข้น EGCG ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเพียงบางส่วนแต่ไม่ถึงขั้นทำให้เชื้อตาย

ผลการคำนวณ PCR efficiency ของชุดไพรเมอร์สำหรับ *ggt* gene ที่ใช้ พบว่า อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (ไม่ได้แสดงข้อมูลในที่นี้) บ่งชี้ว่า จำนวนโมเลกุล DNA ที่เพิ่มจำนวนได้มีการเพิ่มขึ้นประมาณสองเท่าในแต่ละรอบของการเพิ่มจำนวน DNA การวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงผลของ *ggt* gene ของ *H. pylori* เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี EGCG ความเข้มข้น 125 µg/ml (1/2 MIC) และไม่มี EGCG แสดงดัง Table 1

ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค real-time PCR ระดับการแสดงออกของ *ggt* gene แปรผกผันกับค่า normalized threshold cycle (ΔC_T) กล่าวคือ ระดับการแสดงออกของ *ggt* gene ที่มากแสดงโดยค่า ΔC_T ที่น้อย และในทางกลับกัน ระดับการแสดงออกของ *ggt* gene ที่น้อยแสดงโดยค่า ΔC_T ที่มาก จากการศึกษาพบว่า ค่า ΔC_T ของตัวอย่างที่เลี้ยงบนอาหารที่มี EGCG บ่งชี้ว่า มีค่าการแสดงออกของ *ggt* gene สูงกว่าตัวอย่างที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่มี EGCG

การแสดงออกสัมพันธ์ของ *ggt* gene ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายสามารถคำนวณได้โดยการใช้ค่า normalized C_T ของ test และ control ในการศึกษาพบว่า ตัวอย่างที่เลี้ยงบนอาหารที่มี EGCG มีค่าการแสดงออกสัมพันธ์ของ *ggt* gene สูงกว่าตัวอย่างที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่มี EGCG ถึง 12.56 เท่า (Figure 1) ซึ่งบ่งชี้ถึงการเพิ่มการสร้าง GGT (up-regulation) เมื่อเชื้อต้องเจริญเติบโต

ในสภาวะที่มี EGCG ซึ่งตรงข้ามกับสมมติฐานที่คาดว่า EGCG ซึ่งมีบทบาทเป็น anti *H. pylori* อาจส่งผลต่อการสร้าง GGT (down-regulation) ของเชื้อ การเพิ่มการแสดงออกของ *ggt* gene ของ *H. pylori* เมื่อได้รับสารบางชนิดนั้นยังพบได้ในกรณีอื่น มีรายงานว่า กลูตามีนสามารถกระตุ้นให้ *H. pylori* สร้าง GGT มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาพแวดล้อมเป็นกรด [36]

การแสดงออกของ *ggt* gene ของ *H. pylori* ที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเชื้อเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี EGCG อย่างมีนัยสำคัญนี้ คาดว่าเป็นการตอบสนองจากการที่เอนไซม์ถูกยับยั้ง กล่าวคือ การยับยั้ง GGT โดย EGCG ส่งผลกระทบต่อการทำงานของแบคทีเรีย เช่น การขนส่งกลูตามาเข้าเซลล์ การทำงานของยูรีเอสในการสลายยูเรียได้ผลผลิตเป็น NH_3 ดังนั้น เพื่อเป็นการทดแทนเอนไซม์ส่วนที่ถูกยับยั้งโดย EGCG แบคทีเรียจึงเพิ่มการแสดงออกของ *ggt* gene นอกจากนี้ มีความเป็นไปได้ว่า *H. pylori* มีการสร้าง GGT มากขึ้นเพื่อกำจัด EGCG ซึ่งเป็นพิษต่อแบคทีเรีย โดยหน้าที่ดังกล่าวนี้เป็นอีกบทบาทหนึ่งของ *H. pylori* GGT ในกระบวนการทำลายสารพิษ (ในที่นี้คือ EGCG) ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้สอดคล้องกับที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ถึงบทบาทของ GGT ในกระบวนการทำลายสารพิษในเซลล์ของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น [37-39] รวมทั้งในยีสต์ *H. polymorpha* และ *S. cerevisiae* [40]

Table 1 Data analysis of *H. pylori ggt* gene expression after bacterial growth with EGCG

Samples	Genes	C_T Mean	ΔC_T Mean	ΔC_T SD	$\Delta\Delta C_T$ Mean	$\Delta\Delta C_T$ SD	Fold change
Control (- EGCG)	<i>16S rRNA</i>	8.89					
	<i>ggt</i>	24.6	15.71	1.22			
Test (+ EGCG)	<i>16S rRNA</i>	12.93					
	<i>ggt</i>	24.99	12.06	1.03	-3.65	1.03	12.56

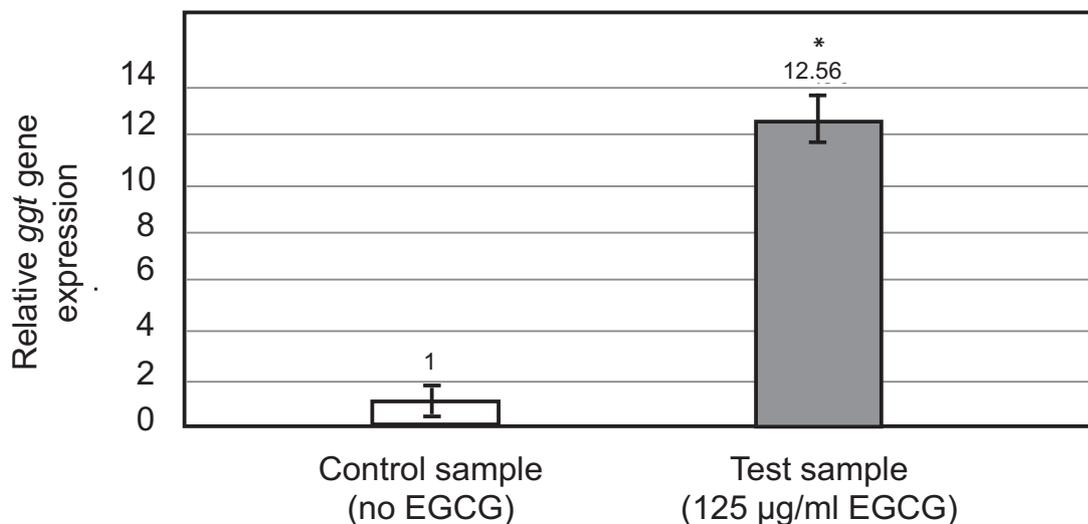


Figure 1 The relative expression of the *H. pylori ggt* gene after bacterial growth with EGCG. Data is presented as mean ± standard deviation of triplicate samples. *p < 0.01.

4. สรุป

เอนไซม์แกมมา-กลูตามิลทรานส์เปปติเดสของ *H. pylori* เป็นเอนไซม์ที่เชื่อใ้ใช้นำกลูตามิตจากภายนอกเซลล์เข้ามาใช้ในเซลล์ของแบคทีเรีย เพราะเชื่อกันว่าไม่สามารถสังเคราะห์กลูตามิตได้เอง อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาผลของ EGCG จากชาเขียวต่อการแสดงออกของ *ggt* gene ของ *H. pylori* ในครั้งนี้ ให้ข้อมูลถึงอีกบทบาทหนึ่งของ GGT ของ *H. pylori* ในการทำหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำลายสารพิษ (detoxification process) ซึ่งยังไม่เคยมีการรายงานถึงบทบาทนี้ของ GGT ใน *H. pylori* มาก่อน

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.รัฐกร วิไลชนม์ ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อเชื้อ *H. pylori* (สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504: CagA, VacA, UreC positive) ในรูปแช่แข็งในกลีเซอรอลเพื่อใช้ในการวิจัยนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกตลอดโครงการวิจัยนี้

6. References

- [1] Warren, J.R. and Marshall, B., 1983, Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, *Lancet*. 1: 1273-1275.
- [2] Marshall, B. and Warren, J.R., 1984, Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration, *The lancet*. 323: 1311-1315.
- [3] Owen, R.J., 1998, *Helicobacter*-species classification and identification, *Br. Med. Bull.* 54: 17-30.
- [4] Cover, T.L., 2016, *Helicobacter pylori* diversity and gastric cancer risk, *MBio*. 7: e01869-15.
- [5] Hooi, J.K.Y., Lai, W.Y., Ng, W.K., Suen, M.M.Y., Underwood, F.E., Tanyingoh, D., et al., 2017, Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection:

- Systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 153: 420-429.
- [6] Gatta, L., Vakil, N., Vaura, D. and Scapignato, C., 2013, Global eradication rates for *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis of sequential therapy, *BMJ*. 347: f4587.
- [7] Mégraud, F., 2004, *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing, *Gut*. 53: 1374–1384.
- [8] Alba, C., Blanco, A. and Alarcon T., 2017, Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*, *Curr. Opin. Infect. Dis.* 30: 489–497.
- [9] Abreu, A.C., McBain, A.J. and Simões M., 2012, Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents, *Nat. Prod. Rep.* 29: 1007.
- [10] Pezeshki, A., Safi, S., Feizi, A., Askari, G. and Karami, F., 2016, The effect of green tea extract supplementation on liver enzymes in patients with nonalcoholic fatty liver disease, *Int. J. Prev. Med.* 7: 28
- [11] Chen C.N., Liang, C.M., Lai, J.R., Tsai, Y.J., Tsay, J.S. and Lin, J.K., 2003, Capillary electrophoretic determination of theanine, caffeine, and catechins in fresh tea leaves and oolong tea and their effects on rat neurosphere adhesion and migration, *J. Agric. Food Chem.* 51: 7495–7503.
- [12] Cabrera, C., Giménez, R. and López M.C., 2003, Determination of tea components with antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.* 51: 4427-4435.
- [13] Ogunleye, A.A., Xue, F. and Michels, K.B., 2010, Green tea consumption and breast cancer risk or recurrence: a meta-analysis, *Breast Cancer Res Treat.* 119: 477-484.
- [14] Kurahashi, N., Sasazuki, S., Iwasaki, M., Inoue, M. and Tsugane, S., 2008, Green tea consumption and prostate cancer risk in Japanese men: a prospective study, *JPHC Study Group, Am J Epidemiol.* 167: 71-77.
- [15] Yuan, J.M., Sun, C. and Butler, L.M., 2011, Tea and cancer prevention: epidemiological studies, *Pharmacol. Res.* 64: 123-135.
- [16] Hirano, R., Momiyama, Y., Takahashi, R., Taniguchi, H., Kondo, K., Nakamura, H. and Ohsuzu, F., 2002, Comparison of green tea intake in Japanese patients with and without angiographic coronary artery disease, *Am. J. Cardiol.* 90: 1150-1153.
- [17] Kao, Y.H., Chang, H.H., Lee, M.J. and Chen, C.L., 2006, Tea, obesity, and diabetes, *Mol. Nutr Food Res.* 50: 188-210.
- [18] Li, S., Hattori, T. and Kodama, E.N., 2011, Epigallocatechin gallate inhibits the HIV reverse transcription step, *Antivir. Chem. Chemother.* 21: 239-243.
- [19] Yanagawa, Y., Yamamoto, Y., Hara, Y. and Shimamura, T., 2003, A combination effect of epigallocatechin gallate, a major compound of green tea catechins, with antibiotics on

- Helicobacter pylori* growth *in vitro*, Curr. Microbiol. 47: 244-249.
- [20] Taylor, P.W., Hamilton-Miller, J.M. and Stapleton, P.D., 2005, Antimicrobial properties of green tea catechins, Food Sci Technol Bull. 2: 71-81.
- [21] Okubo, S., Toda, M., Hara, Y. and Shimamura, T., 1991, Antifungal and fungicidal activities of tea extract and catechin against Trichophyton, Nihon Saikingaku Zasshi. 46: 509-514.
- [22] Vance, S.H., Tucci, M. and Benghuzzi, H., 2011, Evaluation of the antimicrobial efficacy of green tea extract (egcg) against *streptococcus pyogenes in vitro*-biomed 2011, Biomed Sci Instrum. 47: 177-182.
- [23] Hassani, A.R., Ordouzadeh, N., Ghaemi, A., Amirmozafari, N., Hamdi, K. and Nazari, R., 2009, *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* urease with non and semi fermented *Camellia sinensis*, Indian J. Med. Microbiol. 27: 30-34.
- [24] Mabe, K., Yamada, M., Oguni, I and Takahashi, T., 1999, *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*, Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1788-1791.
- [25] Stoicov, C., Saffari, R. and Houghton, J., 2009, Green tea inhibits *Helicobacter* growth *in vivo* and *in vitro*, Int. J. Antimicrob. Agents. 33: 473-478.
- [26] Lee, S.I., Kim, H.J. and Boo, Y.C., 2008, Effect of green tea and (-)-epigallocatechin gallate on ethanol-induced toxicity in HepG2 cells, Phytother. Res. 22: 669-674.
- [27] Leduc, D., Gallaud, J., Stingl, K. and de Reuse, H., 2010, Coupled amino acid deamidase transport systems essential for *Helicobacter pylori* colonization, Infect. Immun. 78: 2782-2792.
- [28] Shibayama, K., Wachino, J., Arakawa, Y., Saidijam, M., Rutherford, N.G. and Henderson, P.J., 2007, Metabolism of glutamine and glutathione via gamma-glutamyltranspeptidase and glutamate transport in *Helicobacter pylori*: Possible significance in the pathophysiology of the organism, Mol. Microbiol. 64: 396-406.
- [29] Stark, R.M., Suleiman, M.S., Hassan, I.J., Greenman, J. and Millar, M.R., 1997, Amino acid utilization and deamination of glutamine and asparagine by *Helicobacter pylori*, J. Med. Microbiol. 46: 793-800.
- [30] Chevalier, C., Thiberge, J., Ferrero, R.L. and Labigne, A., 1999, Essential role of *Helicobacter pylori* γ -glutamyl trans-peptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice, Mol. Microbiol. 31: 1359- 1372.
- [31] Gong, M. and Ho, B., 2004, Prominent role of γ -glutamyl-transpeptidase on the growth of *Helicobacter pylori*, World J Gastroenterol. 10: 2994-2996.
- [32] Ritdet, N., Rojpiulstitt, P. and Kangsadalampai, S., 2021, Expression of *Helicobacter pylori* virulence genes under atmospheric condition, Sci. Tech. Asia. 26: 210-219.
- [33] Chomczynski, P. and Sacchi, N., 1987, Single-step method of RNA isolation

- by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- [34] Shao, C., Sun, Y., Wang, N., Yu, H., Zhou, Y., Chen, C. and Jia, J., 2013, Change of proteome components of *Helicobacter pylori* biofilms induced by serum starvation, *Mol. Med. Rep.* 8: 1761-1766.
- [35] Pfaffl, M.W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucl. Acids Res.* 29: e45.
- [36] Ki, MR., Yun, N.R. and Hwang, S.Y., 2013, Glutamine-induced production and secretion of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase at low pH and its putative role in glutathione transport, *J. Microbiol. Biotechnol.* 23:467-472.
- [37] Paolicchi, A., Sotiropoulou, M., Perego, P., Daubeuf, S., Visvikis, A., Lorenzini, E., Franzini, M., Romiti, N., Chieli, E., Leone, R., Apostoli, P., Colangelo, D., Zunino, F., Pompella, A., 2003, γ -glutamyl transpeptidase catalyses the extracellular detoxification of cisplatin in a human cell line derived from the proximal convoluted tubule of the kidney, *Eur. J. Cancer.* 39: 996-1003.
- [38] Keillor, J.W., Castonguay, R. and Lherbet, C., 2005, Gamma-glutamyl transpeptidase substrate specificity and catalytic mechanism, *Methods Enzymol.* 401: 449-467.
- [39] Zhang, H. and Forman, H.J., 2009, Redox regulation of γ -glutamyl transpeptidase, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 41: 509-515.
- [40] Ubiyovk, V.M., Blazhenko, O.V., Gigot, D., Penninckx, M., Sibirny, A.A., 2006, Role of γ -glutamyltranspeptidase in detoxification of xenobiotics in the yeasts *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell Biol. Int.* 30: 665-671.