

เฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร รูปร่างทรงกลม ซึ่งมีชีวิต  
แต่ไม่เจริญเติบโต ยังคงสร้างกลูตามิลทรานส์เพปติเดส  
ที่เป็นปัจจัยก่อความรุนแรงโรค

Viable but Non-Culturable (VBNC) Coccoid

*Helicobacter pylori* Still Produces Virulence Factor

$\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase

เพชร มณีชร, ปนัดดา โรจน์พิบูลสถิตย์, รัฎฐกร วิลัยชนม์

และศศิชัย กังสดาลอำไพ\*

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Petcharee Maneethorn, Panadda Rojpibulstit, Ratha-korn Vilaichone

and Sasichai Kangsadalampai \*

Faculty of Medicine, Thammasat University, Rangsit Centre,

Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

*Helicobacter pylori* ในสภาวะปกติมีรูปร่างแบบเกลียว (spiral) แต่ในสภาวะที่ได้รับความเครียดจะปรับตัวให้อยู่ในรูปร่างทรงกลม (coccoid) เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ แต่จะไม่เจริญเติบโต (viable but non-culturable, VBNC) การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าแบคทีเรียระยะ VBNC ยังมีการสร้าง mRNA ของ virulence factors บางชนิดอยู่ จากการที่เอนไซม์  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการ colonization ของ *H. pylori* ยังไม่เคยมีการศึกษาเมื่อแบคทีเรียอยู่ในรูปร่าง coccoid มาก่อน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *ggt* ของ *H. pylori* ในสภาพ coccoid โดยการทำให้ *H. pylori* ที่มีรูปร่างเป็น spiral ซึ่งต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเปลี่ยนไปเป็นรูปร่าง coccoid โดยการเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนบรรยากาศในช่วงระยะเวลาหนึ่ง และศึกษาเปรียบเทียบการถอดรหัสของยีน *ggt* ระหว่างแบคทีเรียรูปร่าง coccoid และรูปร่าง spiral จากการทดลองพบว่าหลังจากแบคทีเรียได้สัมผัสออกซิเจนบรรยากาศนาน 9 ชั่วโมง แบคทีเรียจะเปลี่ยนไปเป็นรูปร่าง coccoid อย่างสมบูรณ์ และยังคงมีการสร้าง mRNA ของยีน *ggt* อย่างต่อเนื่อง แสดงว่าแม้ *H. pylori* จะอยู่ในระยะ VBNC ก็ยังสามารถสร้าง virulence factor ที่เกี่ยวข้องกับการ colonization ได้ เหตุการณ์ดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้ในชีวิตประจำวัน เมื่อ *H. pylori* เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยไม่ได้ตั้งใจ และนำไปสู่การติดเชื้อที่ไม่สามารถควบคุมได้

คำสำคัญ : เฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร; กลูตามิลทรานส์เพปทิเดส; แบคทีเรียรูปทรงกลม

## Abstract

*Helicobacter pylori* usually presents in a spiral-shape, but in a stress condition, it adapts to a coccoid form which is viable but non-culturable (VBNC). Previous studies reported that the VBNC coccoids still produce mRNAs of some virulence factors.  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase (GGT) is an enzyme involving in the bacterial colonization and has not been studied in the coccoid form of the bacteria. This study aims to investigate the expression of *ggt* gene of the coccoids. The spiral *H. pylori* required low level of oxygen was transformed into the coccoid form by an exposure to the ambient oxygen for a period of time and the transcriptional level of the coccoid *ggt* gene was compared to that of the spiral bacteria. After 9 hours of the oxygen exposure, it was observed that the spiral-shape bacteria changed into the full coccoids and continuously expressed *ggt* mRNA. It revealed that even in the VBNC coccoid form, the *H. pylori* still produce its virulence factor that is important for the bacterial colonization. This situation can occur when the bacteria are accidentally contaminated to the environment and, therefore, the bacterial infection would be critically uncontrollable.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*;  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase; coccoid

## 1. คำนำ

เฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร (*Helicobacter pylori*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเกลียว (spiral) สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ (microaerophilic) จากการศึกษาท่อนหน้าพบว่า แบคทีเรียชนิดนี้เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคแผลในกระเพาะอาหาร (peptic ulcer) และกระเพาะอาหารอักเสบ (gastritis) ผู้ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ยังมีแนวโน้มที่จะเป็นมะเร็งกระเพาะอาหารมากกว่าคนปกติอีกด้วย (Cover, 2016) จากผลการสำรวจพบว่ามากกว่าร้อยละ 50 ของประชากรโลกมีการติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว (Romano *et al.*, 2006) นอกจากนี้ *H. pylori* มีการปรับตัวได้ในกระเพาะอาหาร โดยในสภาวะที่เหมาะสมจะพบแบคทีเรียชนิดนี้รูปร่าง spiral แต่เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น ได้รับยาปฏิชีวนะ ความเป็นกรดต่างที่มากหรือน้อยเกินไป หรืออยู่ใต้ภาวะที่มี

ออกซิเจนที่ไม่เหมาะสม แบคทีเรียชนิดนี้สามารถปรับตัวให้มีชีวิตอยู่ได้โดยเปลี่ยนรูปร่าง spiral ไปเป็นรูป coccoid โดยในระบายนี้อาจไม่สามารถเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวให้เจริญได้ในห้องปฏิบัติการ โดยเรียกกระบายนี้ออกซิเจนของ *H. pylori* ว่า viable but non-culturable (VBNC) อย่างไรก็ตามมีหลายงานวิจัยท่อนหน้านี้ได้ศึกษาพบว่า ในระบายนี้ออกซิเจน *H. pylori* ยังมีการสร้าง mRNA และโปรตีน เช่น virulence factor บางชนิด (Monstein and Jonasson, 2001; Nilsson *et al.*, 2002; Poursina *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังมีผู้วิจัยบางกลุ่มพบว่าหนูทดลองติดเชื้อ *H. pylori* ที่อยู่ใ้ในสภาวะ VBNC นี้ได้ (Cellini *et al.*, 1994; She *et al.*, 2003)

$\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ใน *H. pylori* ทุกสายพันธุ์ อีกทั้งยังเป็นหนึ่งใน virulence factor ที่สำคัญ โดยเอนไซม์ GGT ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่  $\gamma$ -glutamyl

จากสารตั้งต้นตัวให้ (donor substrate) ให้แก่สารตั้งต้นตัวรับ (acceptor substrate) โดยถ้าสารตั้งต้นตัวให้ คือ glutamine ได้ผลิตภัณฑ์เป็น glutamate และ ammonia ถ้าสารตั้งต้นตัวให้ คือ glutathione จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น glutamate และ cysteinyl glycine โดย *H. pylori* ไม่สามารถสังเคราะห์ glutamate ได้เอง จึงจำเป็นต้องนำ glutamate จากภายนอกเซลล์เข้ามาใช้ในเซลล์ ส่งผลให้ glutamine และ glutathione ของ host ลดลง ทำให้เซลล์กระเพาะอาหารมีความไวต่อสารพิษต่าง ๆ และสูญเสียสมดุล redox ซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์ (cell death) (Leduc *et al.*, 2010; Shibayama *et al.*, 2003; Stark *et al.*, 1997) ก่อนหน้านั้น Chevalier และคณะ (1999) รายงานว่า GGT นั้นมีความเกี่ยวข้องกับการ colonization ของ *H. pylori* และ gastric cell apoptosis

*H. pylori* เป็นแบคทีเรียที่มีความไวต่อออกซิเจนในสิ่งแวดล้อม โดยเมื่ออยู่ภายนอกร่างกายของ host และได้รับออกซิเจนความเข้มข้นสูงจะเปลี่ยนจากรูปแบบ spiral ไปเป็น coccoid และเข้าสู่ระยะ VBNC (Donelli *et al.*, 1998, Tominaga *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตาม จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ายังไม่มีรายงานการศึกษาการแสดงออกของยีน *ggt* ของ *H. pylori* ในสภาพ coccoid มาก่อน ดังนั้นหากผู้ป่วยได้รับ *H. pylori* ที่อยู่ในสภาวะ VBNC ซึ่งปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและยังสามารถผลิตโปรตีนที่เป็น virulence factor ที่เกี่ยวข้องกับการ colonization ได้ ก็สามารถนำไปสู่การเกิดโรคของกระเพาะอาหารได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *ggt* ของ *H. pylori* ในสภาพ coccoid หลังจากได้รับออกซิเจนบรรยากาศ (atmospheric condition) ด้วยเทคนิค real-time PCR เพื่อให้ตระหนักถึงความสำคัญและอันตรายจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้ในสิ่งแวดล้อม

## 2. อุปกรณ์และวิธีการ

### 2.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *H. pylori*

การศึกษานี้ใช้แบคทีเรีย *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง brain heart infusion (BHI; Difco, USA) ที่มีเลือด 7 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาชนะควบคุมปริมาณออกซิเจน (anaerobic chamber) ให้แบคทีเรียนี้เจริญอยู่ใน microaerobic condition (ออกซิเจน 5 %, คาร์บอนไดออกไซด์ 10 % และไนโตรเจน 85 %) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มทดสอบออกมาจาก chamber และบ่มต่อในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 และ 9 ชั่วโมง ในขณะที่กลุ่มควบคุมถูกเลี้ยงต่อใน microaerobic condition อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 และ 9 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน เมื่อครบแต่ละช่วงเวลา จึงเก็บเซลล์ทั้งจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ และนำมาย้อมสีแกรม (Gram stain) เพื่อดูรูปร่างของเซลล์ (cell morphology) จากนั้นละลายเซลล์ส่วนหนึ่งในอาหารเหลว BHI วัดความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 550 นาโนเมตร โดยปรับให้แต่ละหลอดมีความเข้มข้นของเซลล์  $1 \times 10^9$  cells/ml จากนั้นหมุนเหวี่ยงตกเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอนเซลล์ (cell pellet) ที่ -80 องศาเซลเซียส สำหรับสกัด RNA ต่อไป สำหรับเซลล์ที่เหลือนั้นปรับให้มีความเข้มข้นเซลล์  $1 \times 10^7$  cells/ml เพื่อการประเมิน cell viability

### 2.2 การประเมิน cell viability

การตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ หรือ cell viability ด้วย alamarBlue™ cell viability assay reagent (Thermo scientific, USA) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Obonyo *et al.*, (2012) โดยผสมน้ำยา alamarBlue™ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรให้เข้ากันดีกับเซลล์ที่เก็บได้ในแต่ละช่วงเวลา (ความเข้มข้น  $1 \times 10^7$  cells/ml) ปริมาตร 100  $\mu$ l บ่ม

ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน anaerobic chamber เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 และ 600 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่า cell viability จากค่า % reduction of alamarBlue™ reagent ตามวิธีในคู่มือ

### 2.3 การสกัด RNA และการสังเคราะห์สาย cDNA

นำตะกอนเซลล์ของ *H. pylori* ที่ได้มาสกัด RNA ด้วยน้ำยา TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Chomczynski และ Sacchi (1987) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย RNA ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยสารละลาย RNA ที่บริสุทธิ์จะมีค่าอัตราส่วน  $A_{260}/A_{280}$  ประมาณ 1.8-2.1 และตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วยวิธีอิเล็กโทร-โฟเรซิสในเจลอะกาโรส (agarose gel electro-phoresis) จากนั้นนำสารละลาย RNA มากำจัด DNA ที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNase I (Thermo scientific, USA) ปริมาณ 5 Units ต่อสารละลาย RNA 1 µg แล้วตรวจสอบเพื่อยืนยันว่าสารละลาย RNA ที่ได้ไม่มี DNA ปนเปื้อนอยู่ โดยนำ RNA ที่ได้ไปเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน *ggt* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน และตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทร-โฟเรซิสในเจลอะกาโรส หากมี DNA ปนเปื้อนจะพบแถบของ amplified DNA ปรากฏอยู่ นำสารละลาย RNA ที่กำจัด DNA แล้วมาสังเคราะห์สาย cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase ด้วยชุดน้ำยา SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) โดยใช้ random hexamer ตามวิธีในคู่มือ

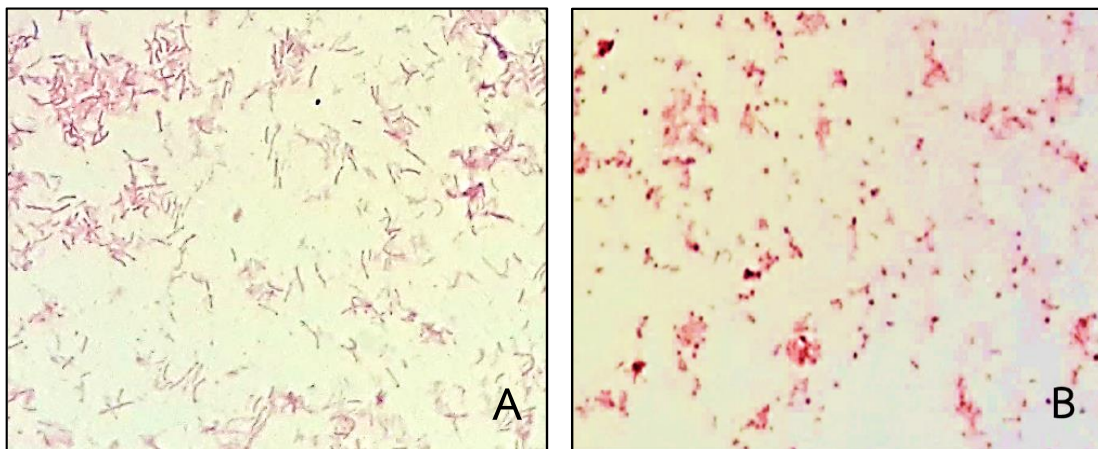
### 2.5 การประเมินการแสดงออกของยีนด้วย real-time PCR

ประเมินการแสดงออกของยีน *ggt* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมาย (target gene) ด้วยวิธี relative

quantitation โดยใช้ยีน *16S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 100 ng cDNA, 400 nM forward and reverse primers [*ggt* primers: 5'-CAGCCAGATACGGTTACGC-3' และ 5'-CCACCTGTCCGCTACAGAA T-3' (Leduc *et al.*, 2010), *16S rRNA* primers: 5'-GCTCTTTACGCCAGTGATTC-3' และ 5'-GCG TGGAGGATGAAGGTTTT-3' (Shao *et al.*, 2013)], 2x QPCR Green Master Mix HRox (biotech rabbit, Germany) ปริมาตร 10 µl และเติม nuclease-free water จนปริมาตรครบ 20 µl นำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง StepOnePlus™ Real-time PCR system (Applied Biosystems, California) โดยมีขั้นตอนดังนี้ initial activation ที่ 95 °C นาน 2 นาที, ตามด้วย denaturation ที่ 95 °C นาน 15 วินาที และ annealing/extension ที่ 60 °C นาน 30 วินาที (ทำซ้ำ denaturation และ annealing/extension 40 รอบ) โดยปริมาณ amplified DNA ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบนั้นจะแสดงผลออกมาในรูปของค่า cycle threshold (Ct) การคำนวณการแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *ggt* (fold change) ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบในช่วงเวลาต่าง ๆ หาได้จากวิธี  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Pfaff, 2001)

การตรวจสอบประสิทธิภาพของแต่ละไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (amplification efficiency, E) ทำได้โดยเจือจาง cDNA template 10 เท่า (100, 10, 1, 0.1, 0.01 ng cDNA) และนำไปทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง real-time PCR ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น จากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่า Ct (แกน Y) และ Log ของ cDNA template (แกน X) คำนวณค่า PCR efficiency จากสูตร % E =  $(10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$

### 2.6 การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ



รูปที่ 1 รูปร่างของ *H. pylori* ที่เปลี่ยนแปลงไปจากรูปร่างเกลียวที่เวลาเริ่มต้น (A) ไปเป็นรูปร่างกลม เมื่อได้รับออกซิเจนบรรยากาศนาน 9 ชั่วโมง (B)

การศึกษาความแตกต่างระหว่าง cell viability และการแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *ggt* ของ *H. pylori* กลุ่มควบคุม (microaerobic condition) และกลุ่มทดสอบที่ได้รับออกซิเจนบรรยากาศ (atmospheric condition) ในแต่ละช่วงเวลา ใช้การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วยการทดสอบแบบ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ( $p < 0.05$ ) ด้วยโปรแกรม SPSS

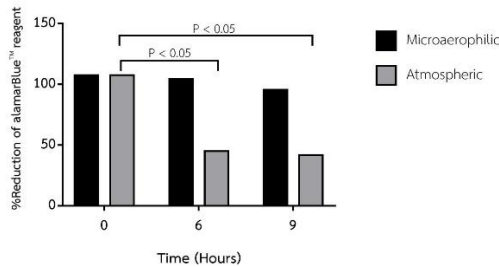
### 3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

การดูลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าแบคทีเรียติดสีแดงของ safranin O รูปร่างของแบคทีเรียในกลุ่มควบคุม (microaerophilic condition) ทั้งในช่วงเวลาเริ่มต้น 6 ชั่วโมงและ 9 ชั่วโมง แบคทีเรียมีรูปร่าง spiral แต่ในกลุ่มทดสอบที่เลี้ยงต่อใน atmospheric condition พบว่าที่ 6 ชั่วโมง แบคทีเรียเริ่มมีรูปร่างงอ (U shape) (ข้อมูลไม่ได้แสดงในที่นี้) และเปลี่ยนเป็นสภาพ coccoid อย่างสมบูรณ์ที่ 9 ชั่วโมง (รูปที่ 1)

การตรวจสอบ cell viability ของแบคทีเรียในแต่ละช่วงเวลา คือ 0 (เวลาเริ่มต้น), 6 และ 9 ชั่วโมง ทั้งใน microaerophilic และ atmospheric

condition พบว่าเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะสามารถออกซิไดซ์สาร resazurin ในน้ำยา alamarBlue™ reagent ที่มีสีฟ้าไปเป็น resorufin ที่มีสีชมพูหรือแดง และสามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ที่ 570 และ 600 นาโนเมตร เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณ % reduction of alamarBlue™ reagent พบว่าในกลุ่มควบคุมที่เลี้ยง *H. pylori* ใน microaerophilic condition ที่ 0, 6 และ 9 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 107, 104 และ 95 % ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.1845$ ) (รูปที่ 2) กล่าวได้ว่าเมื่อเลี้ยง *H. pylori* เป็นเวลานานขึ้น แม้ว่าอาจมีแบคทีเรียตายไปบ้าง แต่ส่วนใหญ่ยังมีชีวิตอยู่ไม่แตกต่างกับช่วงเวลาเริ่มต้น อย่างไรก็ตาม ในกลุ่มทดสอบที่เลี้ยงใน atmospheric condition พบว่าที่ 6 และ 9 ชั่วโมง มีค่า % reduction of alamarBlue reagent เท่ากับ 45.05 และ 41.65 % ตามลำดับ ซึ่งลดลงจากเวลาเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า *H. pylori* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อย (microaerophilic bacteria) นั้น เมื่อได้รับออกซิเจนระยะเวลาหนึ่ง เซลล์จะมีการตายลงอย่างเห็นได้ชัด

อย่างไรก็ตาม พบว่าที่เวลา 9 ชั่วโมง เซลล์ซึ่งได้เปลี่ยนรูปร่างเป็น coccoid อย่างสมบูรณ์ยังมีชีวิตอยู่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ *H. pylori* จะเปลี่ยนรูปร่างเป็น coccoid เมื่อเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ โดยแบคทีเรียจะไม่เจริญเติบโตแล้ว แต่ยังมีชีวิตอยู่ (Sisto *et al.*, 2000; Poursina *et al.*, 2013)



**รูปที่ 2** การประเมินการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ (cell viability) ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในกลุ่มควบคุม (microaerophilic) และกลุ่มทดสอบ (atmospheric) ช่วงเวลาต่าง ๆ ด้วย alamarBlue™ cell viability assay

สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน *ggt* ด้วย real-time PCR โดยวิธี  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  และใช้ SYBR green นั้น จำเป็นจะต้องคำนวณหา PCR efficiency ก่อน โดยค่า PCR amplification efficiency (E) สามารถคำนวณได้จากสมการ  $E = (10^{(-1/\text{slope})} - 1)$  จากกราฟระหว่างค่า Ct และ Log ของความเข้มข้นของ cDNA ตั้งแต่ 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 ng สำหรับไพรเมอร์ 16S *rRNA* พบว่าค่าความชันมีค่าเท่ากับ -3.368 นำค่าความชันที่ได้ไปคำนวณหาค่า E จากสมการข้างต้น ได้ค่า E เท่ากับ 0.9811 (98.11 %) สำหรับไพรเมอร์ *ggt* พบว่าค่าความชันมีค่าเท่ากับ -3.358 และคำนวณค่า E เท่ากับ 0.9852 (98.52 %) หากค่า E มีค่าใกล้เคียง 1 นั่นคือ เมื่อจำนวนรอบของ PCR ที่เพิ่มขึ้น สามารถเพิ่มปริมาณ cDNA ได้เป็น 2 เท่าในทุก ๆ รอบ โดย

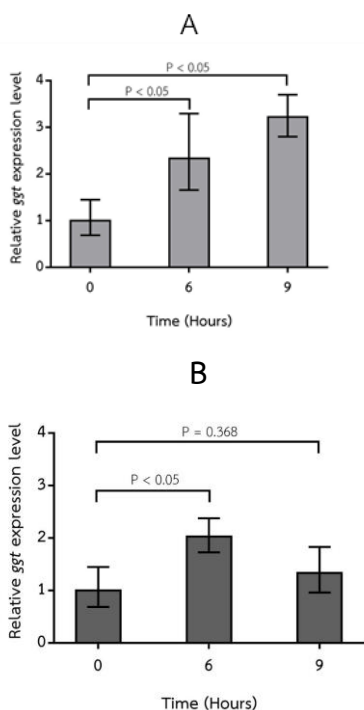
ค่าที่ยอมรับได้ของ PCR efficiency จะอยู่ในช่วงระหว่าง 90-110 % ( $-3.6 \geq \text{slope} \geq -3.3$ ) (Rogers-broadway and Karteris, 2015) จากการทดลองนี้พบว่า PCR efficiency ของไพรเมอร์ทั้งสองอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

การศึกษากการแสดงออกของยีน *ggt* ด้วยวิธี relative quantification real-time PCR ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (ยีน *ggt*) กับยีนอ้างอิง (ยีน 16S *rRNA*) ในกลุ่มควบคุม (microaerophilic condition) และกลุ่มทดสอบ (atmospheric condition) ในช่วงเวลาต่าง ๆ จากการทดลองพบว่าในแบคทีเรียกลุ่มควบคุมเมื่อเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้นเป็น 6 และ 9 ชั่วโมง ให้ผลการแสดงออกของยีน *ggt* มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น คือ 2.34 และ 3.22 เท่า ตามลำดับ ( $p < 0.05$ ) ส่วนในกลุ่มทดสอบพบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีน *ggt* มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น 2.03 เท่า ( $p < 0.05$ ) สอดคล้องกับรูปร่างของแบคทีเรียที่เวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งยังไม่เป็น coccoid ขณะที่เวลา 9 ชั่วโมง การแสดงออกของยีน *ggt* ลดลงแต่ยังมีค่ามากกว่าที่เวลาเริ่มต้น (รูปที่ 3) เป็นไปได้ว่าที่เวลา 9 ชั่วโมง *H. pylori* เข้าสู่ระยะ VBNC อย่างสมบูรณ์ จึงลดกิจกรรมต่าง ๆ ในเซลล์ลง รวมทั้งการ transcription ของยีน *ggt* ด้วย

#### 4. สรุป

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *ggt* ซึ่งมีรายงานว่า เป็น virulence factor ที่สำคัญชนิดหนึ่งของ *H. pylori* ในสภาวะที่แบคทีเรียได้รับออกซิเจนบรรยากาศนาน 9 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่า *H. pylori* จำนวนหนึ่งตายไปเนื่องจากปริมาณของก๊าซต่าง ๆ ในบรรยากาศไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามแบคทีเรียบางส่วนได้เปลี่ยนแปลงรูปร่างจาก spiral

ไปเป็น coccoid เพื่อการอยู่รอดในสภาวะที่ไม่เหมาะสม โดยยังมีชีวิตอยู่ แต่ไม่เจริญเติบโต และยังคงมีการแสดงออกของยีน *ggt* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการ colonization ในกระเพาะอาหาร จากข้อมูลดังกล่าว เราจึงควรตระหนักถึงเหตุการณ์ที่เราสามารถพบเจอได้ในชีวิตประจำวันที่แบคทีเรียอาจมีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะเปลี่ยนรูปร่างไปเป็น VBNC หากเมื่อเราได้รับ *H. pylori* ในระยะนี้เข้าสู่ร่างกาย แบคทีเรียจะมีชีวิตอยู่ได้ในกระเพาะอาหารและมีการสร้าง virulence factor ส่งผลให้มีการติดเชื้อ รวมทั้งเกิดแผลในกระเพาะอาหารได้



**รูปที่ 3** การแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *ggt* ของ *H. pylori* ช่วงระยะเวลา 6 และ 9 ชั่วโมง เทียบกับเวลาเริ่มต้นของแบคทีเรียกลุ่มควมคุม ซึ่งเลี้ยงในสภาวะ microaerophilic (A) และแบคทีเรียกลุ่มทดสอบที่เลี้ยงในสภาวะ atmospheric (B) โดยใช้ 16S *rRNA* เป็นยีนอ้างอิง

### 5. รายการอ้างอิง

Cellini, L., Allocati, N., Angelucci, D., Iezzi, T., Dicampoli, E., Marzio, L. and Dainelli, B., 1994. Coccoid *Helicobacter pylori* not culturable *in vitro* reverts in mice, *Microbiol. Immunol.* 38: 843-850.

Chevalier, C., Thiberge, J., Ferrero, R.L. and Labigne, A., 1999, Essential role of *Helicobacter pylori*  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice, *Mol. Microbiol.* 31: 1359-1372.

Chomczynski, P. and Sacchi, N., 1987, Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162: 156-159.

Cover, T.L., 2016, *Helicobacter pylori* diversity and gastric cancer risk, *MBio* 7(1): e01869-15.

Donelli, G., Matarrese, P., Fiorentini, C., Dainelli, B., Taraborelli, T., Campli, E., Bartolomeo, S. and Cellini, L., 1998, The effect of oxygen on the growth and cell morphology of *Helicobacter pylori*, *FEMS Microbiol. Lett.* 168: 9-15.

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.

Monstein, H.J. and Jonasson, J., 2001, Differential virulence-gene mRNA expression in coccoid forms of *Helicobacter pylori*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285: 530-536.

- Nilsson, H.O., Blom, J., Al-Soud, W.A., Ljungh, A., Andersen, L.P. and Wadstrom, T., 2002, Effect of cold starvation, acid stress, and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter pylori*, Appl. Environ. Microbiol. 68: 11-19.
- Obonyo, M., Zhang, L., Thamphiwatana, S., Pornpattananankul, D., Fu, V. and Zhang, L., 2012, Antibacterial activities of liposomal linolenic acids against antibiotic-resistant *Helicobacter pylori*, Mol. Pharm. 9: 2677-2685.
- Pfaffl, M.W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, Nucl. Acids Res. 29: e45.
- Poursina, F., Faghri, J., Moghim, S., Zarkesh-Esfahani, H., Nasr-Esfahani, B., Fazeli, H., Hasanzadeh, A.V. and Safaei, H.G., 2013, Assessment of *cagE* and *babA* mRNA expression during morphological conversion of *Helicobacter pylori* from spiral to coccoid, Curr. Microbiol. 66: 406-413.
- Shao, C., Sun, Y., Wang, N., Yu, H., Zhou, Y., Chen, C. and Jia, J., 2013, Changes of proteome components of *Helicobacter pylori* biofilms induced by serum starvation, Mol. Med. Rep. 8: 1761-1766.
- She, F.F., Lin, J.Y., Liu, J.Y., Huang, C. and Su, D.H., 2003, Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice, World J. Gastroenterol. 9: 516-520.
- 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.
- Sisto, F., Brenciaglia, M.I., Scaltrito, M.M. and Dubini, F., 2000, *Helicobacter pylori*: *ureA*, *cagA* and *vacA* expression during conversion to the coccoid form, Int. J. Antimicrob. Agents 15: 277-282.
- 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.
- Roger-Broadway, K.R. and Karteris, E., 2015, Amplification efficiency and thermal stability of qPCR instrumentation: Current landscape and future perspectives, Exp. Ther. Med. 10: 1261-1264.
- Romano, M., Ricci, V. and Zarrilli, R., 2006, Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori*-related gastric carcinogenesis implications for chemoprevention, Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol. 3: 622-632.
- Tominaga, K., Hamasaki, N., Watanabe, T., Uchida, T., Fujiwara, Y., Takaishi, O., Higuchi, K., Arakawa, T., Ishii, E., Kobayashi, K., Yano, I. and Kuroki, T., 1999, Effect of culture conditions on morphological changes of *Helicobacter pylori*, J. Gastroenterol. 11: 28-31.
- Zeng, H., Guo, G., Mao, X.H., Tong, W.D. and Zou, Q.M., 2008, Proteomic insights into *Helicobacter pylori* coccoid forms under oxidative stress, Curr. Microbiol. 57: 281-286.