

สัญญาเลขที่ MRG5680017

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษากลไกที่ทำให้เซลล์ตายในโรคติดเชื้อ
O. tsutsugamushi และความสัมพันธ์กับ type I IFNs

โดย อ.ดร.นพ.วิวิทย์ ตันติแพทยางกูร
ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์ของบุคคลหลายท่าน ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศ.ดร.โกวิท พัฒนาปัญญา
สัตย์ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ให้คำปรึกษา แนะนำในการทำวิจัยนี้ รศ.ดร. ปัทมา เอกโพธิ์ และ อ.ดร. ปฏิมาพร วงษ์พรหม
พิทักษ์ ซึ่งให้ความอนุเคราะห์ด้านเงินทุน และวัสดุในการทำวิจัยบางส่วน ศ.พญ. ยุพิน ศุภทรมงคล และบุคลากร
สาขาวิชาโรคติดเชื้อและอายุรศาสตร์เขตร้อน ภาควิชาอายุรศาสตร์ ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่ และเครื่องมือบางอย่างใน
การทำวิจัยนี้ น.ส.ณฤทัย อินตะสินี ที่มีส่วนช่วยในเทคนิคทางห้องปฏิบัติการบางอย่าง ผู้วิจัยยังขอขอบคุณ คณะ
แพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่ช่วยจัดหาครุภัณฑ์ที่จำเป็นในการทำวิจัย สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงาน
กองทุนสนับสนุนการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และมหาวิทยาลัยมหิดล ที่เล็งเห็นความสำคัญของ
งานวิจัยนี้ และให้การสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย

Abstract

Project Code : MRG5680017

Project Title : Mechanisms of Cell Death in Response to *Orientia tsutsugamushi* infection and Relationship with Type I Interferons

Investigator : Dr. Wiwit Tantibhedhyangkul, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University

E-mail Address : wiwit167@yahoo.co.th

Project Period : 3 June 2012 – 2 December 2014

Orientia tsutsugamushi (OT), the causative agent of scrub typhus, is an obligate intracellular bacterium replicating in the cytosol of host cells. OT invades a variety of cell types, particularly mononuclear phagocytes and endothelial cells. Although previous studies have demonstrated that OT induces cell death of infected cells, the mechanism of cell death in OT infection remains unclear. Therefore, this project aims to study the cell death mechanism and the caspase involved in OT infection. Using LDH release assay, the result shows that OT induces cell death of monocyte-derived macrophages after 24 hours post-infection. The cell death of macrophages can be inhibited by inflammatory caspase and cathepsin inhibitors, suggesting that cell death following OT infection is dependent on inflammatory caspase(s) and cathepsins (lysosomal enzymes). Next, this project shows that OT induces caspase-1 activation and IL-1 β secretion, which are the suggestive evidence of inflammasome activation. IL-1 β secretion is higher in LPS-primed macrophages, compared to unprimed cells. IL-1 β secretion is also inhibited by caspase-1 and cathepsin inhibitors. OT-infected cells do not die by apoptosis because caspase-3 activation (determined by indirect immunofluorescence technique) is not observed in cells with TUNEL positive nuclei. Moreover, the result shows that OT induces type I IFN response in infected cells. However, augmentation of type I IFN response by recombinant IFN- β does not increase the cell death. Taken together, this project suggests that OT infection induces inflammasome and caspase-1 activation,

subsequent IL-1 β secretion and cathepsin-dependent pyroptosis in monocyte-derived macrophages.

Further studies are required to determine the cytosolic receptors responsible for inflammasome activation and the involvement of other inflammatory caspases (caspase-4 or -5) in OT infection.

Keywords : *Orientia tsutsugamushi*, caspase-1, cathepsins, inflammasome activation

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5680017

ชื่อโครงการ : การศึกษากลไกที่ทำให้เซลล์ตายในโรคติดเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* และความสัมพันธ์กับ type I interferon

ชื่อนักวิจัย : อ.ดร.นพ.วิวิทย์ ตันติแพทยากร, ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : wiwit167@yahoo.co.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 มิถุนายน 2556 – 2 ธันวาคม 2558

Orientia tsutsugamushi (OT) ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคสครับไทฟัส เป็นแบคทีเรียที่จำเป็นต้องอาศัยอยู่ภายในเซลล์เจ้าบ้าน และแบ่งตัวในไซโทพลาซึม เชื้อ OT บุกรุกเซลล์เป้าหมายได้หลายชนิด โดยเฉพาะฟาโกไซต์ชนิดโมโนนิวเคลียร์ และเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ถึงแม้ว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า เชื้อชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ที่ติดเชื้อ แต่กลไกที่ทำให้เซลล์ตายในโรคนี้นั้นยังไม่ชัดเจน ดังนั้น โครงการนี้จึงมีจุดประสงค์ เพื่อศึกษากลไกที่ทำให้เซลล์ตาย และ caspase ที่เกี่ยวข้องในโรคติดเชื้อนี้ ผลการศึกษาด้วยการวัด LDH ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ พบว่า เชื้อ OT ทำให้เกิดการตายของเซลล์มาโครฟาจที่เปลี่ยนแปลงมาจากโมโนไซต์ ตั้งแต่ 24 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อ การตายของเซลล์ถูกยับยั้งได้ด้วยตัวยับยั้งที่จำเพาะต่อ inflammatory caspase และ cathepsin ซึ่งเป็นเอนไซม์ในไลโซโซม จึงบ่งชี้ว่า inflammatory caspase และ cathepsin มีบทบาทต่อการตายของเซลล์ การศึกษาต่อไป พบว่า เชื้อ OT ชักนำให้เกิดการกระตุ้น caspase-1 และการหลั่งฮัยโดรอน IL-1 β ได้ ซึ่งเป็นหลักฐานที่บ่งชี้ว่ามีการกระตุ้น inflammasome การหลั่ง IL-1 β มีปริมาณสูงในเซลล์มาโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS ก่อนการติดเชื้อ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย LPS การหลั่ง IL-1 β ถูกยับยั้งได้ด้วยตัวยับยั้งที่จำเพาะต่อ caspase-1 และ cathepsin เช่นเดียวกัน เซลล์ที่ติดเชื้อ OT ไม่ได้เกิดการตายแบบ apoptosis เนื่องจาก ไม่พบการกระตุ้น caspase-3 ในเซลล์ที่ติดสี TUNEL ที่นิวเคลียส นอกจากนี้ ยังพบว่า เชื้อ OT ชักนำให้เกิดการตอบสนองของ type I IFN ในเซลล์ที่ติดเชื้อ อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ recombinant IFN- β เพื่อเพิ่มการตอบสนองของ type I IFN ไม่ได้ทำให้การตายของเซลล์เกิดมากขึ้น กล่าวโดยสรุป โครงการนี้แสดงให้เห็นว่า การติดเชื้อ OT ชักนำให้เกิดการกระตุ้น inflammasome และ caspase-1 ส่งผลให้เกิดการหลั่ง IL-1 β และ

การตายของเซลล์แบบ pyroptosis ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ cathepsin การศึกษาวิจัยเพิ่มเติมจะทำให้ทราบถึงตัวรับภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น inflammasome และ บทบาทของ inflammatory caspase ชนิดอื่น ได้แก่ caspase-4 หรือ -5 ในโรคติดเชื้อ OT

คำหลัก : *Orientia tsutsugamushi*, caspase-1, cathepsins, inflammasome activation

สารบัญ

	หน้า
ปกใน	i
กิตติกรรมประกาศ	ii
Abstract ภาษาอังกฤษ	iii
บทคัดย่อ ภาษาไทย	v
สารบัญ	vii
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
วัสดุ และวิธีการวิจัย	3
ผลการทดลอง	6
สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง	20
ข้อเสนอแนะ	22
เอกสารอ้างอิง	23
Output ที่ได้จากโครงการ	25

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 การตายของเซลล์เมื่อตรวจด้วย LDH release assay	6
รูปที่ 1.2 การตายของเซลล์เมื่อตรวจด้วยการย้อมสี ethidium bromide homodimer	7
รูปที่ 2 การตายของเซลล์ในภาวะที่มี inflammatory caspase และ cathepsin inhibitor	8
รูปเสริมที่ 1 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของ FMK inhibitor	9
รูปที่ 3 การตายของเซลล์ในภาวะที่มี apoptotic caspase inhibitor	9
รูปที่ 4 การหลั่ง IL-1 β จากเซลล์ที่ได้รับ LPS/ATP ในภาวะที่มี caspase inhibitor	10
รูปที่ 5 การหลั่ง IL-1 β จาก monocyte-derived macrophage (MDM) ที่ติดเชื้อ	11
รูปที่ 6 การแสดงออกของยีนในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS หรือ เชื้อ ที่เวลา 6 ชั่วโมง	12
รูปที่ 7 การหลั่ง IL-1 β หลังจาก LPS-primed MDM ในภาวะที่มีตัวยับยั้งชนิดต่างๆ	13
รูปที่ 8 Western blot แสดงการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่างๆใน cell lysate และ supernatant	14
รูปที่ 9 การย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วยวิธี TUNEL และการย้อม active caspase-3 ด้วยวิธี Indirect immunofluorescence technique	15-16
รูปที่ 10 การหลั่ง IFN- β จากเซลล์ที่ติดเชื้อ	17
รูปที่ 11 การแสดงออกของ interferon-stimulated gene ในเซลล์ที่ได้รับแอนติบอดีต่อ IFN- β	17
รูปที่ 12 การแสดงออกของยีน AIM2 ในภาวะที่ได้รับ exogenous recombinant IFN- β	18
รูปที่ 13 การตายของเซลล์ในภาวะที่ได้รับ recombinant IFN- β	18

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษากลไกที่ทำให้เซลล์ตายในโรคติดเชื้อ *O. tsutsugamushi* และความสัมพันธ์กับ type I

IFNs

บทนำ

โรคติดเชื้อ scrub typhus ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* เป็นสาเหตุที่พบบ่อยของกลุ่มอาการไข้เฉียบพลันในประเทศไทย [1, 2] นอกจากนี้ ยังเป็นโรค systemic infection และโรคที่นำโดย arthropod vector ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ที่พบบ่อยที่สุดโรคหนึ่งในประเทศไทย โรคนี้ติดต่อสู่คนด้วยการกัดของไรอ่อน (chigger) ซึ่งเป็นตัวอ่อนของ trombiculid mite และได้รับเชื้อผ่านทางรังไข่ โรคนี้จึงพบได้บ่อยในเขตชนบทของประเทศไทย ซึ่งมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของไร และหนู ซึ่งเป็นพาหะของโรค ถึงแม้ว่าโรคนี้เป็นโรคที่พบบ่อยในประเทศไทย แต่ยังมีปัญหาในการวินิจฉัย และนำไปสู่การรักษาที่ล่าช้า และภาวะแทรกซ้อนได้ ลักษณะทางคลินิกของโรคนี้แยกไม่ได้จากโรคติดเชื้อชนิดอื่น จึงทำให้มีปัญหาในการวินิจฉัย โรคนี้จึงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในเขตชนบทของไทย ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอาการไม่รุนแรง แต่ในบางรายอาจเกิดภาวะแทรกซ้อน เช่น เยื่อหุ้มสมองอักเสบ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ ไตวายเฉียบพลัน [3] ได้ การศึกษาด้านกลไกการตอบสนองต่อการติดเชื้อจะทำให้เราเข้าใจถึงพยาธิกำเนิดของโรคได้ดีขึ้น

พยาธิกำเนิดในโรค scrub typhus ยังมีปัญหาที่น่าสนใจ และต้องการการสืบค้นเพิ่มเติมอีกมาก เชื่อก่อนโรค *O. tsutsugamushi* เป็น obligate intracellular gram-negative bacterium ซึ่งต้องแบ่งตัวเพิ่มจำนวนใน cytosol ของเซลล์เป้าหมาย แต่เชื่อนี้จะต่างจากเชื้อกรัมลบอื่นๆตรงที่จะพบเพียง outer membrane protein ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด แต่ไม่พบ peptidoglycan และ lipopolysaccharides (LPS) ในผนังเซลล์ เชื้อ *Orientia tsutsugamushi* เป็นแบคทีเรียที่สามารถบุกรุกเซลล์เป้าหมายหลายชนิด ที่สำคัญ ได้แก่ เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด และเซลล์ monocyte/ macrophage เชื้อจะหลบหนีจาก phagosome เข้าไปใน cytosol และแบ่งตัวเพิ่มจำนวน พยาธิสภาพที่สำคัญที่พบในผู้ป่วยที่เสียชีวิต คือ perivascular mononuclear cell infiltration ในอวัยวะภายใน ซึ่งสัมพันธ์กับการที่เชื้อบุกรุกเข้าเซลล์เป้าหมาย [3] ข้อมูลที่ได้จากผู้ป่วย แสดงให้เห็นว่า มีการเพิ่มขึ้นของ pro-inflammatory cytokine หลายชนิดในซีรัมผู้ป่วย บ่งชี้ว่า เชื้อนี้กระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบอย่างรุนแรง การศึกษา in vitro ในเซลล์ monocyte และ macrophage ที่ติดเชื้อ พบว่า เชื้อ *O. tsutsugamushi* กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับ type I interferon และกระบวนการอักเสบ และมีการหลั่ง IL-1 β ในปริมาณสูง ซึ่งลักษณะดังกล่าวแสดงว่า เชื้อกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของ innate immune response

อย่างมากมาย [4, 5] นอกจากนี้ยังพบว่า การติดเชื้อกระตุ้นให้มีการตายของเซลล์ (cell death) แต่กลไกที่ทำให้เกิดเซลล์ตายนี้ ยังไม่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาต่างๆ พบว่า เชื้อ *O. tsutsugamushi* อาจมีผลทั้งด้านการส่งเสริม หรือยับยั้งกระบวนการ apoptosis โดยในช่วงแรก เชื้ออาจมีกลไกบางอย่างที่ยับยั้งการตายของเซลล์ ส่วนในระยะหลัง หรือในเซลล์ที่มีเชื้ออยู่มาก เซลล์จะมีกลไกการตอบสนองทำให้เกิดการตายของเซลล์ [6]

กลไกที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์เป็นกลไกที่มีความซับซ้อน และสามารถจำแนกได้หลายประเภท เช่น necrosis, apoptosis, pyroptosis, autophagy และ necroptosis โดยที่ necrosis จัดเป็น passive mechanism ซึ่งเกิดจากสิ่งกระทำจากภายนอก ส่วน apoptosis และ pyroptosis เป็น active mechanism ซึ่งเกิดจากเซลล์ชักนำให้เกิดผ่านทางโปรตีน caspase หลายชนิด caspase ที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis ถูกจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ initiator caspase ได้แก่ caspase-2, 8, 9, 10 และ effector caspase ได้แก่ caspase-3, 6, 7 apoptosis หรือ programmed cell death ถูกชักนำให้เกิดผ่านทาง 2 pathway ได้แก่ intrinsic และ extrinsic pathway โดยที่ intrinsic family เกิดจาก stress ภายในเซลล์ และเกี่ยวข้องกับ pro-apoptotic protein ในกลุ่ม Bax/Bak ซึ่งจะช่วยให้มีการปล่อย cytochrome c จากไมโทคอนเดรีย เกิดการกระตุ้น caspase-9 เป็นหลัก ส่วน extrinsic pathway เกิดขึ้นเมื่อ death receptors บนเยื่อหุ้มเซลล์จับกับ ligand จำเพาะ เช่น Fas ligand และ TNF-released apoptosis inducing ligand (TRAIL) เกิดการส่งสัญญาณผ่าน adaptor protein และกระตุ้น caspase-8 เป็นหลัก จากนั้น initiator ทั้ง 2 ชนิดจะทำการตัดและกระตุ้น caspase-3 ทำให้เกิด apoptosis ตามมา [7-9] ในขณะการตายของเซลล์แบบ pyroptosis เกิดจาก inflammatory caspase ได้แก่ caspase-1, 4, 5 โดยที่ caspase-1 เป็นตัวที่ศึกษากันมากที่สุด มีบทบาทสำคัญในการหลั่งหัยโดไคน์ IL-1 β ส่วน caspase-4 หรือ 5 ในมนุษย์ มีความคล้ายคลึงกับ caspase-11 ในหนู มีบทบาทในการรับรู้ LPS ซึ่งอยู่ใน cytosol ของเซลล์ที่ติดเชื้อ ในปัจจุบันเชื่อกันว่า caspase-4 ในคน อาจมีบทบาทในการตายของเซลล์มากกว่า caspase-1 แต่ยังมีคนทำการศึกษาน้อยกว่า การกระตุ้น caspase-1 เกิดจากการที่ตัวรับภายในเซลล์ เช่น NLRP3 receptor ซึ่งรับรู้ ส่วนประกอบของเซลล์ที่มีการบาดเจ็บ (damage-associated molecular pattern : DAMP) เช่น cathepsin ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน lysosome, uric acid ฯลฯ และ AIM2 receptor ซึ่งรับรู้ DNA ของเชื้อโรคใน cytosol ของเซลล์ที่ติดเชื้อ สัญญาณจาก receptor ดังกล่าวจะทำให้เกิดการรวมตัวของตัวรับเหล่านี้ เกิดการสร้าง inflammasome complex ซึ่งจะให้เกิดการกระตุ้น caspase-1 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการตัด pro-IL-1 β เกิดเป็น active IL-1 β และถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ caspase-1 อาจทำให้เซลล์ตายได้เช่นกัน ซึ่งการตายของเซลล์แบบนี้ ทำให้เกิดการอักเสบร่วมด้วย จึงมีชื่อเรียกว่า inflammatory cell death หรือ pyroptosis ซึ่งที่ตายในลักษณะนี้จะทำให้มีรู (pore formation) ที่เยื่อหุ้ม

เซลล์ตั้งแต่ระยะแรก ทำให้เกิด osmotic lysis เซลล์จึงบวม มีขนาดใหญ่ขึ้น และยังมีการย่อยสลายของ DNA ในนิวเคลียสได้เช่นกัน [10]

กลไกที่ทำให้เซลล์ตายในการติดเชื้อ *O. tsutsugamushi* ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่สันนิษฐานได้ว่าเนื่องจากเชื้อ *O. tsutsugamushi* ไม่สร้าง toxin จึงไม่น่าทำให้เซลล์ตายแบบ necrosis แต่เซลล์ที่ติดเชื้ออาจมีการตอบสนองโดยกลไก pyroptosis เนื่องจากขณะที่เชื้อหลบหนีจาก phagosome อาจทำให้ cathepsin รั่วออกมาใน cytosol หรือเชื้อบางส่วนอาจมีการตาย และปล่อย DNA ออกมาใน cytosol นอกจากนี้ยังพบการหลั่ง IL-1 β ออกมาในปริมาณสูง บ่งชี้ว่ามีการกระตุ้น inflammasome และ caspase-1 ภายในเซลล์ ส่วนการตายแบบ apoptosis ก็อาจเป็นไปได้ เนื่องจาก ไซโตไคน์หลายชนิด เช่น TNF และ type I interferon กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้อง extrinsic pathway ของ apoptosis [11] ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป การศึกษาให้ทราบถึงกลไกที่ทำให้เซลล์ตายในการตอบสนองต่อ *O. tsutsugamushi* ในเซลล์ของคน จะทำให้เราทราบถึงพยาธิกำเนิดของโรคติดเชื้อชนิดนี้ ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อที่มีความสำคัญในประเทศไทย ได้ดีขึ้น

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- เพื่อศึกษากลไกที่ทำให้เซลล์ตายในการตอบสนองต่อการติดเชื้อ *O. tsutsugamushi* โดยศึกษาชนิดของ caspase ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการตายของ monocyte-derived macrophage
- ศึกษาบทบาทของ type I interferon ต่อการตายของเซลล์

วัสดุ และวิธีการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* (OT) เชื้อ OT ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็น strain Karp ถูกเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในเซลล์ L929 mouse fibroblast เมื่อเชื้อมีปริมาณมากพอ เซลล์จะถูกทำให้แตกโดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 25G ซึ่งต่อกับกระบอกฉีดยา จากนั้นเซลล์จะถูกปั่นตกด้วยความเร็ว 400g เวลา 5 นาที เชื้อ OT ที่อยู่นอกเซลล์จะถูกเก็บที่ -80 °C ปริมาณ infectivity titer ของเชื้อถูกคำนวณโดยวิธี infected cell counting unit (ICU) โดยทำการเจือจางเชื้อ OT และนำไปเพาะเลี้ยงในเซลล์ L929 ปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อได้รับการดูด้วยวิธี indirect immunofluorescence technique โดยที่ $ICU = \text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด} \times \text{เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อ} \times \text{dilution factor} / 100$ ซึ่งอัตราส่วน ของ ICU ต่อเซลล์ จะเทียบเคียงได้กับ multiplicity of infection (MOI)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ **monocyte-derived macrophages** peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

ถูกแยกจาก whole blood ด้วยวิธี density gradient centrifugation โดยใช้ lymphocyte separation medium (ficoll-hypaque) monocyte ถูกแยกจาก PBMC โดยวิธี adherence method โดยให้เกาะบน polystyrene plate monocyte ถูกเลี้ยงใน RPMI 1640 ที่มี 10% human autologous serum, 10% fetal bovine serum (FBS) และ GM-CSF 200 U/ml ครึ่งหนึ่งของมีเดียถูกเปลี่ยนเป็น RPMI1640, 10% fetal bovine serum (FBS) และ GM-CSF วันที่ 3 หลังจากวันที่ 6 เมื่อเซลล์กลายเป็น monocyte-derived macrophage (MDM) แล้ว เซลล์ถูกเลี้ยงต่อใน RPMI1640 ที่มี 10% FBS เซลล์ MDM มีขนาดใหญ่กว่า monocyte เกาะแน่นกับ plate และมี CD68 ที่ผิวเซลล์ เซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะเป็น MDM วันที่ 8-9 และใช้จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ MOI 20 : 1

การศึกษาการตายของเซลล์ เซลล์ที่ติดเชื้อถูกนำมาศึกษาการตายของเซลล์ด้วยหลายวิธี ได้แก่

- **LDH release assay** ซึ่งจะวัดปริมาณของ LDH ใน supernatant โดย LDH จะเปลี่ยน lactate เป็น pyruvate และได้ NADH ร่วมด้วย จากนั้น NADH จะทำปฏิกิริยากับ WST ได้ formazan ซึ่งเป็นสารสีเหลือง และสามารถวัดปริมาณด้วยวิธี spectrophotometry โดยมี blank เป็น media, low control เป็น uninfected cell, high control เป็น lysed cell ที่ถูกย่อยโดย lysis buffer จากนั้นจะสามารถคำนวณการตายของเซลล์ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ cell death} = (\text{OD sample} - \text{OD low control}) / (\text{OD high control} - \text{OD low control}) \times 100\%$$

- **Ethidium bromide homodimer staining** เซลล์ที่เพาะเลี้ยงอยู่ถูกนำมาย้อมดูนิวเคลียสด้วย ethidium bromide homodimer (EtBr) และ Hoechst 33342 และนำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง โดยนิวเคลียสเซลล์มีชีวิตติดสีน้ำเงินของ hoecsht อย่างเดียว ส่วนเซลล์ตายติดสีแดงของ EtBr ร่วมด้วย

- **TUNEL staining** โดย fix เซลล์ด้วย 3% paraformaldehyde เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย้อมด้วย TUNEL staining kit ซึ่งมี dUTP ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงสีเขียว CF488 จากนั้นนำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง เซลล์ตายที่มีการแตกของ DNA ในนิวเคลียส จะเห็นเป็นสีเขียว

การศึกษาผลของ **caspase inhibitor** ต่อการตายของเซลล์

Caspase inhibitor ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

- inflammatory caspase inhibitor ได้แก่ Z-YVAD-FMK, LEVD-FMK และ WEHD-FMK ซึ่งสามารถยับยั้ง caspase-1, -4 และ -5 ได้ แต่ไม่ได้มีความจำเพาะกับ caspase ชนิดเดียว
- cathepsin inhibitor ได้แก่ Z-FA-FMK และ Z-FF-FMK ซึ่งสามารถยับยั้ง cathepsin ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน lysosome
- pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK

- apoptotic caspase inhibitor ได้แก่
 - effector caspase-3, -6, -7 inhibitor : Q-DEVD-OPh
 - caspase-8 inhibitor : Q-IETD-OPh
 - caspase-9 inhibitor : Q-LEHD-OPh
 - negative control : Q-VE-OPh

Western blot

เทคนิค Western blot ถูกนำมาใช้เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ pro-caspase-1, pro-IL-1 β และ actin ใน cell lysate ในขณะที่ cleaved caspase-1 ถูกตรวจพบใน culture supernatant สำหรับการเตรียม cell lysate เซลล์จะถูกย่อยด้วย commercial caspase lysis buffer โปรตีนจำนวน 40 μ g จะถูกให้ความร้อนที่ 100 °C เวลา 5 นาที และถูกแยกด้วย 12% acrylamide gel จากนั้น โปรตีนจะถูก blot ลงบน PVDF membrane block ด้วย 5% skimmed milk และย้อมด้วย primary antibody ดังต่อไปนี้

- mouse anti-beta actin 1 : 2000
- rabbit anti-caspase-1 1 : 1000
- rabbit anti-cleaved caspase-1 1 : 500
- rabbit anti-IL-1beta 1 : 1000

จากนั้น จะย้อมด้วย secondary antibody : goat anti-mouse or anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วย HRP enzyme เจือจาง 1 : 4000 และให้ทำปฏิกิริยากับ electrochemiluminescent (ECL) substrate และอ่านผลด้วย เครื่อง ImageQuant LAS 4000

Indirect immunofluorescence technique

ใช้เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน active caspase-3 ในเซลล์ที่ตาย โดยทำหลังจากย้อม TUNEL เสร็จ โดยย้อมเซลล์ด้วย primary antibody : rabbit anti-cleaved caspase-3 1 : 100 และ secondary antibody : Cy3 labeled goat anti-rabbit IgG 1 : 50 และดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง apoptotic cells จะเห็นสีแดงของ active caspase-3 ใน cytoplasm และ สีเขียวของ TUNEL ในนิวเคลียส positive control ของ apoptotic cells จะใช้ macrophage ที่เลี้ยงใน LPS 100 ng/ml และ cycloheximide 10 μ g/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Quantitative RT-PCR

การแสดงผลของยีนถูกวัดด้วยวิธี real-time RT-PCR เพื่อคำนวณ fold change โดย RNA template ถูกสกัดโดยใช้ RNA extraction kit จากนั้น RNA ถูก reverse transcribe เป็น cDNA ด้วย MMLV-RT, oligo dT primer และ dNTP cDNA ถูกนำไปทำ PCR โดยใช้ mastermix ที่มี SYBR green และนำเข้าเครื่อง real-time PCR จากนั้นค่า threshold cycle (Ct) จะถูกนำมาคำนวณค่า fold change โดยใช้วิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ซึ่ง $\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ โดยที่ $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{GAPDH}}) \text{ of stimulated cells} - (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{GAPDH}}) \text{ of unstimulated cells}$

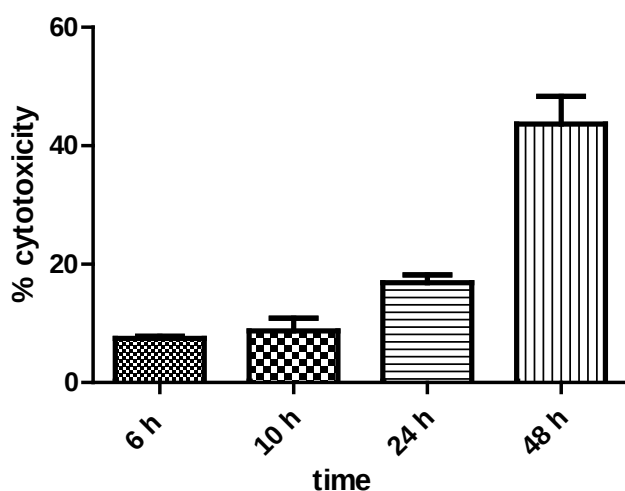
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ผลการทดลองถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี two-tailed unpaired t test ค่า p value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลอง

การศึกษาการตายของเซลล์ที่เวลาต่าง ๆ

พบว่า เซลล์ OT ทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้จริง โดยเริ่มเห็นการตายของเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง และเห็นชัดเจนมากขึ้นที่ 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจด้วยวิธี LDH release assay (รูปที่ 1.1) และด้วยการย้อมสี Ethidium Bromide homodimer (รูปที่ 1.2) นอกจากนี้ เซลล์ MDM ที่ติดเชื้อ OT บางส่วนจะหลุดจากพื้นผิว สังเกตได้ชัดที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ เซลล์ที่ตายแบบ pyroptosis จากการกระตุ้นด้วย LPS 100 ng/ml เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วตามด้วย ATP 5 mM 2 ชั่วโมง ในทางตรงกันข้าม เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ด้วย LPS + cycloheximide แม้จะมีลักษณะของเซลล์ตายอย่างชัดเจนที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่ยังคงเกาะแน่นกับพื้นผิว (ไม่ได้แสดงรูปภาพ)

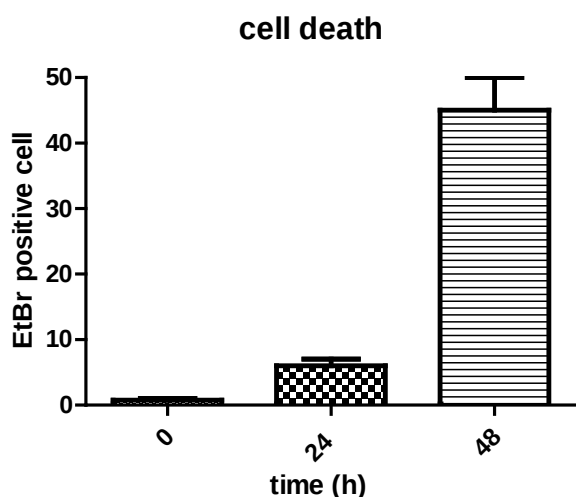


รูปที่ 1.1 การตายของเซลล์เมื่อตรวจด้วยวิธี LDH release assay

เซลล์ monocyte-derived macrophage (MDM) ถูกติดเชื้อ OT ที่ MOI 20 : 1 หลังจาก 1 ชั่วโมง เซลล์จะถูกล้างออก และการตายของเซลล์ถูกศึกษาด้วยวิธี LDH release assay ที่เวลาต่างๆ

$$\% \text{ cytotoxicity} = (\text{OD sample} - \text{OD low control}) / (\text{OD high control} - \text{OD low control}) \times 100\%$$

ข้อมูลที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM ของ triplicate samples ข้อมูลที่แสดงเป็นตัวแทนของ 3 independent experiment



รูปที่ 1.2 การตายของเซลล์เมื่อตรวจด้วยการย้อมสี Ethidium Bromide (EtBr) homodimer

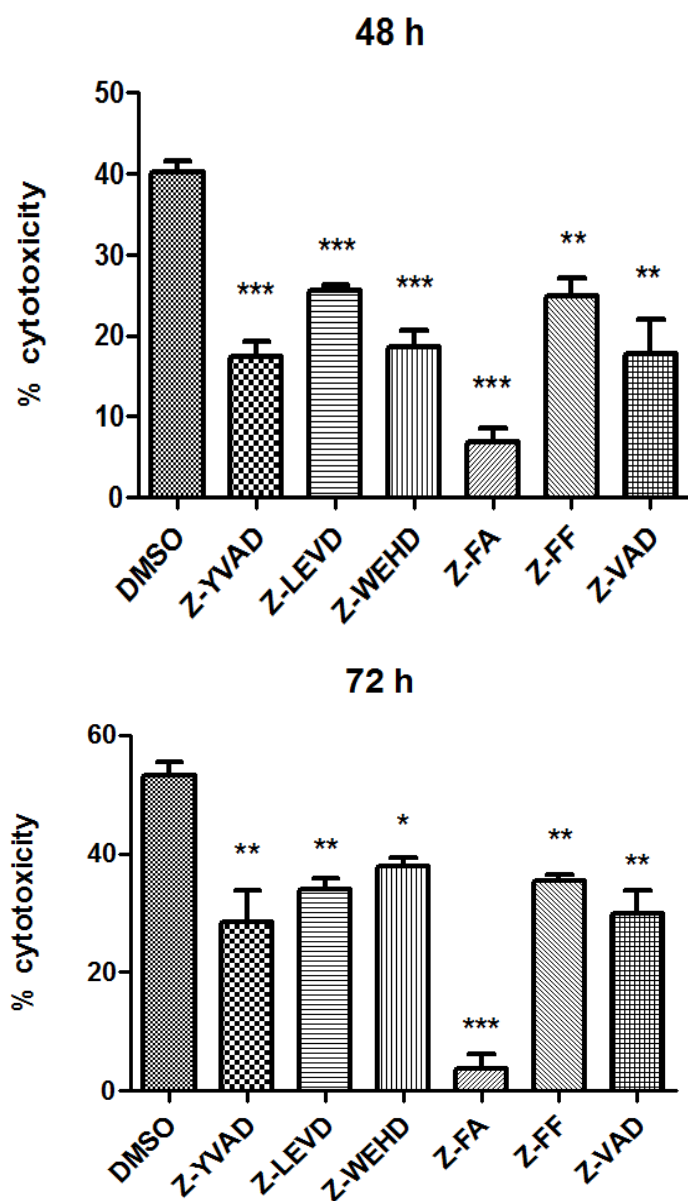
ข้อมูลแสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ติดสี EtBr homodimer ในนิวเคลียส

การตายของเซลล์ในภาวะที่มี caspase และ cathepsin inhibitor

เนื่องจาก caspase มีบทบาทสำคัญในการตายของเซลล์ โดย inflammatory caspase-1, -4, -5 และ apoptotic caspase-3, -8, -9 สัมพันธ์กับการตายแบบ pyroptosis และ apoptosis ตามลำดับ ส่วน cathepsin เป็นเอนไซม์ใน lysosome ที่จัดเป็น damage associated molecular pattern (DAMP) อย่างหนึ่งที่กระตุ้นให้เซลล์ตายแบบ pyroptosis การทดลองจึงทดสอบการตายของเซลล์ในภาวะที่มี inhibitor ชนิดต่างๆ

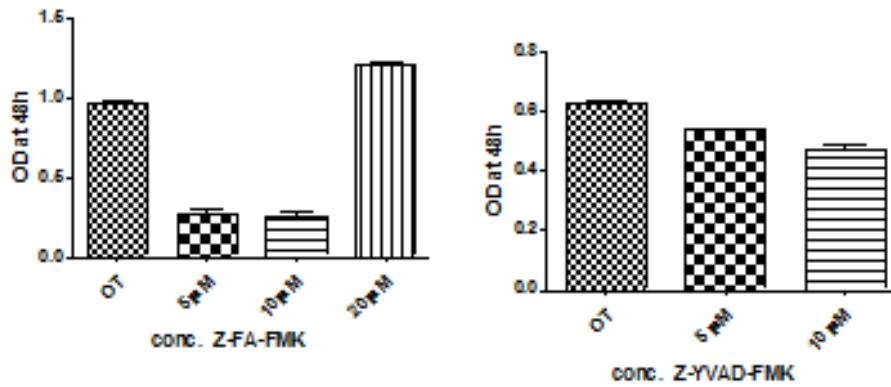
ผลการทดลองพบว่า ทั้ง inflammatory caspase inhibitor (YVAD-FMK, LEVD-FMK และ WEHD-FMK) ความเข้มข้น 10 μ M, cathepsin inhibitor (FA-FMK และ FF-FMK) และ pan-caspase inhibitor (VAD-FMK) ความเข้มข้น 5 μ M สามารถยับยั้งการตายของเซลล์ได้ (รูปที่ 2) อย่างไรก็ตาม FMK inhibitor ขนาดสูง 20 μ M จะมีพิษต่อเซลล์ (รูปเสริมที่ 1) ส่วน apoptotic caspase inhibitor ได้แก่ effector caspase-3, -6, -7 inhibitor : Q-DEVD-OPh,

caspase-8 inhibitor : Q-IETD-OPh, caspase-9 inhibitor : Q-LEHD-OPh ซึ่งเป็น caspase inhibitor รุ่นใหม่ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ไม่สามารถยับยั้งการตายของเซลล์ได้ (รูปที่ 3)



รูปที่ 2 การตายของเซลล์ที่ติดเชื้อในภาวะที่มี inflammatory caspase inhibitor (10 μ M) และ cathepsin, pan-caspase inhibitor (5 μ M) ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง เซลล์ได้รับการ pretreat ด้วย inhibitor เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการติดเชื้อ จากนั้น supernatant ถูกเก็บที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการตายของเซลล์ด้วยวิธี LDH release assay

*, **, *** : p value < 0.05, 0.01 และ 0.001 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ DMSO control

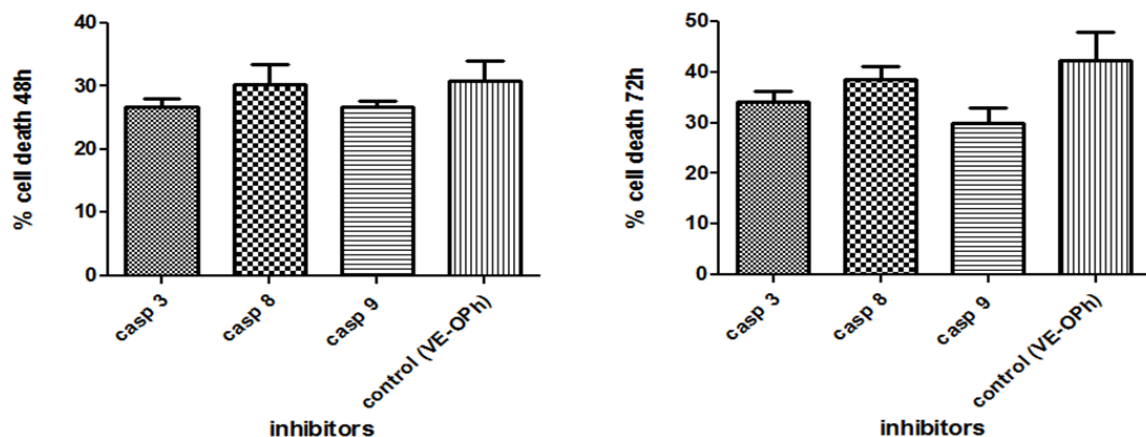


รูปเสริมที่ 1 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของ FMK inhibitor

FMK inhibitor ที่ความเข้มข้น 20 μM ทำให้เกิดการตายของเซลล์มากขึ้น

FA-FMK inhibitor ความเข้มข้น 5 และ 10 μM ยับยั้งการตายของเซลล์ได้

YVAD-FMK inhibitor 10 μM ยับยั้งการตายของเซลล์ได้ดีกว่า 5 μM เล็กน้อย

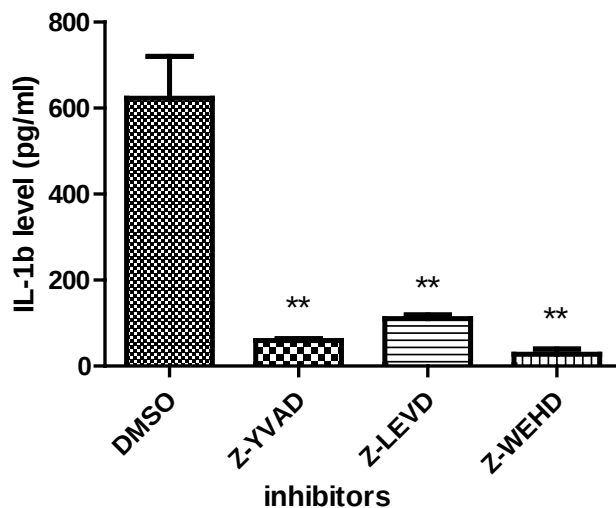


รูปที่ 3 การตายของเซลล์ในภาวะที่มี apoptotic caspase inhibitor

MDM ถูกเลี้ยงในภาวะที่มี apoptotic caspase inhibitor Q-DEVD-OPh, Q-IETD-OPh และ Q-LEHD-OPh 20 μM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนการติดเชื้อ การตายของเซลล์ถูกวัดด้วยวิธี LDH release assay ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อ

เนื่องจาก inflammatory caspase inhibitors ไม่มีความจำเพาะกับตัวใดตัวหนึ่ง สามารถยับยั้งได้ทั้ง caspase-1, -4 และ -5 โดยที่ Z-YVAD และ Z-WEHD นิยมใช้ยับยั้ง caspase-1 และ -5 ส่วน Z-LEVD นิยมใช้ยับยั้ง caspase-4 การทดลองนี้จึงต้องการทดสอบความสามารถในยับยั้ง caspase-1 ของ inhibitor ทั้ง 3 ชนิด โดยดูการ

หลัง IL-1 β จากเซลล์ที่ถูก prime ด้วย LPS 100 ng/ml 5 ชั่วโมง และกระตุ้น caspase-1 ด้วย ATP 5 mM เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้มีการหลั่ง IL-1 β ผลการทดลองพบว่า Z-YVAD และ Z-WEHD ยับยั้ง caspase-1 ได้ดีกว่า Z-LEVD สังเกตได้จากการลดลงของ IL-1 β ที่มากกว่า (รูปที่ 4) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า Z-YVAD และ Z-WEHD สามารถใช้เป็น caspase-1 inhibitor ที่ดี ส่วน Z-LEVD อาจมีความสามารถในการยับยั้ง caspase-4 ได้ดีกว่า



รูปที่ 4 การหลั่ง IL-1 β จากเซลล์ที่ได้รับ LPS/ATP ในภาวะที่มี inflammatory caspase inhibitor

เซลล์ MDM ได้รับการ prime ด้วย LPS 100 ng/ml เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ในภาวะที่มี inhibitor ชนิดต่างๆ จากนั้น ได้รับการกระตุ้นด้วย ATP 5 mM supernatant ถูกเก็บที่เวลา 1 ชั่วโมง หลังใส่ ATP

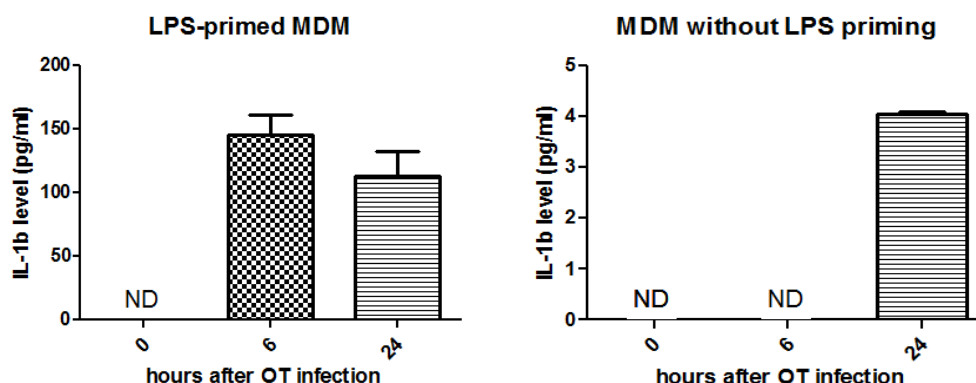
ข้อมูลแสดง mean $\pm$ SEM ของ triplicate samples

** p value < 0.01

การกระตุ้นการหลั่ง IL-1 β และ caspase-1 โดยเชื้อ OT

เนื่องจากเชื้อ OT เป็น cytosolic bacteria ดังนั้นเชื่อน่าจะชักนำให้เซลล์ตรวจพบ pattern or damage-associated molecular pattern (PAMP or DAMP) ภายใน cytosol และมีการกระตุ้น caspase-1 ทำให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์ IL-1 β และการตายของเซลล์ตามมา การทดลองต่อไปจึงต้องการทดสอบว่าเชื้อสามารถกระตุ้นให้มีการหลั่ง IL-1 β ได้หรือไม่ ผลการทดลอง พบว่า ในเซลล์ MDM ที่ถูกกระตุ้น (prime) ด้วย LPS 100 ng/ml เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จะ

มีการหลั่ง IL-1 β ในระดับสูงตั้งแต่ที่ 6 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อ ส่วนในเซลล์ที่ไม่ได้ prime ด้วย LPS มีการหลั่ง IL-1 β ในระดับต่ำๆที่ 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 การหลั่ง IL-1 β จากเซลล์ MDM ที่ติดเชื้อ OT

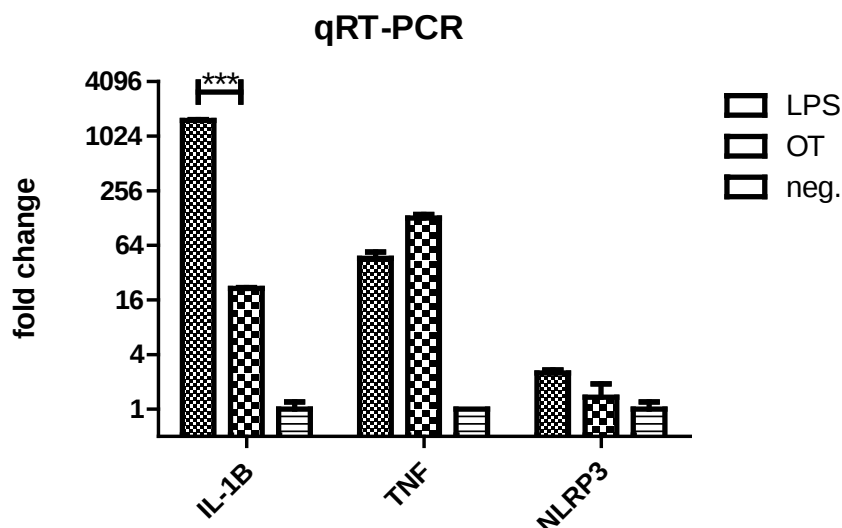
MDM ถูก prime ด้วย LPS 100 ng/ml เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (ซ้าย) หรือไม่มี LPS priming (ขวา) แล้วมีการติดเชื้อ OT ที่ MOI 20 : 1 จากนั้นเก็บ supernatant ที่เวลา 0, 6 และ 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ

ND = not detectable (< 4 pg/ml)

ข้อมูล = mean $\pm$ SEM of duplicate samples

การที่ LPS-primed MDM มีการหลั่ง IL-1 β ในระดับที่สูงกว่ามาก อาจเนื่องมาจาก การที่ LPS กระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน IL-1 β ได้มากกว่าเชื้อ OT เพราะเชื้อนี้ไม่มี TLR ligand นอกจากนี้ LPS ยังอาจมีผลเพิ่มการแสดงออกของ NLRP3 ซึ่งเป็นตัวรับที่สำคัญของการกระตุ้น inflammasome การทดลองต่อไป จึงทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *TNF*, *IL-1B* และ *NLRP3* ด้วยวิธี real-time RT-PCR

ผลการทดลอง (รูปที่ 6) พบว่า LPS (100 ng/ml) สามารถกระตุ้นให้มีการเพิ่มขึ้นของ *IL-1B* mRNA ได้สูงกว่าเชื้อ OT ประมาณ 2⁶ เท่า ในขณะที่การแสดงออกของยีน *TNF* และ *NLRP3* ไม่แตกต่างกันมาก ดังนั้น การที่ LPS primed MDM มีการหลั่ง IL-1 β ในระดับที่สูงกว่ามาก น่าจะเกิดจากการที่ LPS กระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน IL-1 β มากกว่าเชื้อ OT เพียงอย่างเดียว



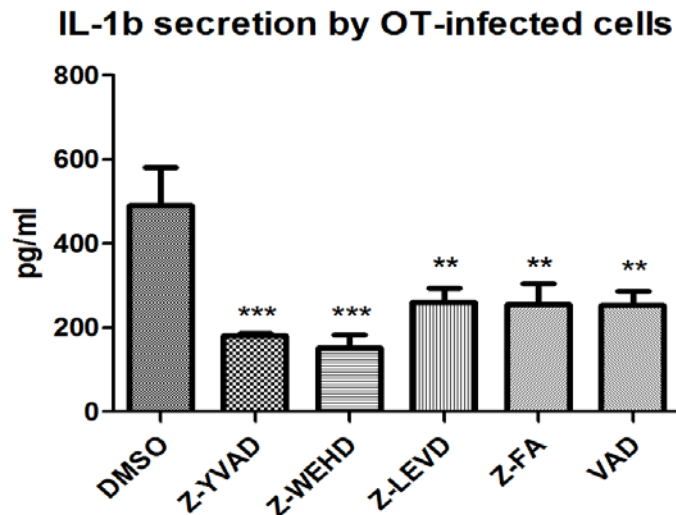
รูปที่ 6 การแสดงออกของยีนในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS หรือ OT ที่เวลา 6 ชั่วโมง

Fold change = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, ซึ่ง $\Delta\Delta Ct = (Ct_{Target} - Ct_{GAPDH})_{stimulated} - (Ct_{Target} - Ct_{GAPDH})_{unstimulated}$

ข้อมูล = mean $\pm$ SEM of duplicate samples

***p value < 0.001

การทดลองต่อไป ผู้วิจัยต้องการทดสอบว่า caspase-1 และ cathepsin มีความจำเป็นต่อการหลั่ง IL-1 β เช่นเดียวกับการตายของเซลล์ หรือไม่ จึงได้ทำการกระตุ้นเซลล์ MDM ด้วย LPS 100 ng/ml ในภาวะที่มี caspase และ cathepsin inhibitor ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทำการติดเชื้อ OT จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อในภาวะที่มีตัวยับยั้ง caspase และเก็บ supernatant ที่เวลา 6 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ เพื่อวัดปริมาณ IL-1 β (รูปที่ 7) โดยพบว่า caspase-1, -5 inhibitor (Z-YVAD และ Z-WEHD-FMK) ยับยั้งการหลั่งซัยโตไคน์นี้ได้ดีที่สุด ในขณะที่ Z-LEVD-FMK ซึ่งยับยั้ง caspase-4 ได้ดีกว่า caspase-1 ยับยั้งการหลั่งซัยโตไคน์นี้ได้น้อยลงมาก ในขณะที่ cathepsin inhibitor (Z-FA-FMK) ทำให้การหลั่ง IL-1 β ลดลงได้เช่นกัน แต่บทบาทในการยับยั้งการตายของเซลล์เด่นชัดกว่าการยับยั้งการหลั่ง IL-1 β



รูปที่ 7 ผลของ ELISA แสดงปริมาณของ IL-1 β ที่หลังจาก LPS-primed MDM ที่เวลา 6 ชั่วโมง ในภาวะที่มีตัวยับยั้งชนิดต่างๆ

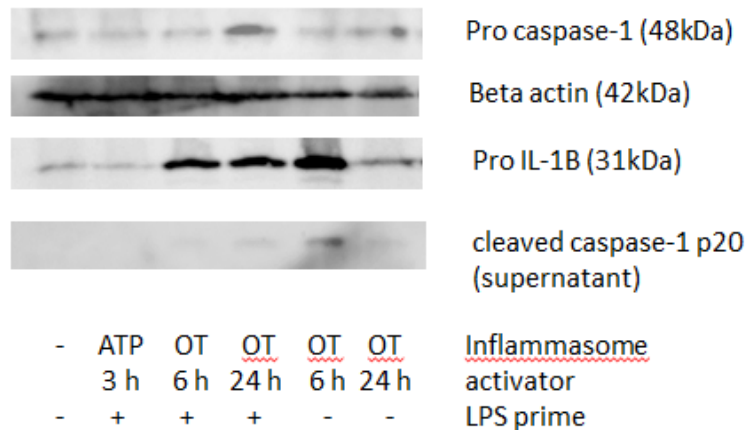
ข้อมูลแสดง mean $\pm$ SEM ของ triplicate samples

, * p value < 0.01 และ 0.001 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ DMSO control

การทดลองต่อไปเป็นการหาแสดงออกของโปรตีน pro-caspase-1 และ pro-IL-1 β ในเซลล์ และโปรตีน cleaved caspase-1 ด้วยวิธี Western blot เพื่อยืนยันว่า เชื้อ OT สามารถกระตุ้นให้เกิดการตัด (cleavage) ของ caspase-1 ได้จริง ผลการทดลอง (รูปที่ 8) โดยพบว่า เซลล์ในทุกภาวะ รวมทั้งเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น ก็มีการแสดงออกของ pro caspase-1 เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS หรือ เชื้อ OT ก็มีการเพิ่มขึ้นของ pro IL-1 β ในเซลล์ อย่างไรก็ตาม ผลของ Western blot ไม่สัมพันธ์กับผลของ RT-PCR อาจเนื่องมาจาก วิธี Western blot ไม่ได้เป็น quantitative test ที่แม่นยำเหมือน real time RT-PCR และมีปัจจัยหลายอย่างส่งผลต่อความเข้มของแสงที่เกิดขึ้น จึงไม่เห็นความแตกต่างชัดเจนระหว่างการกระตุ้นด้วย LPS กับ การกระตุ้นด้วยเชื้อ OT นอกจากนี้เซลล์อาจมีการหลั่ง mature IL-1 β ออกมานอกเซลล์ทำให้ปริมาณ IL-1 ในเซลล์ลดลง ซึ่งผู้วิจัยจะได้ทำเพิ่มในเซลล์หลังการ prime ด้วย LPS แต่ยังไม่ได้กระตุ้นด้วยเชื้อ (LPS prime +, no inflammasome activator) ในการทดลองครั้งหน้า ส่วนการหลั่งโปรตีน cleaved caspase-1 ออกมานอกเซลล์ ถูกตรวจพบได้ใน supernatant ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ OT (ทั้งที่ 6 และ 24 ชั่วโมง : lane 3-6) โดยไม่จำเป็นต้องมีการ prime ด้วย LPS ก่อน อย่างไรก็ตาม ไม่พบ cleaved caspase-1 ของเซลล์ที่ถูก prime ด้วย LPS และถูกกระตุ้นด้วย ATP 3 ชั่วโมง ซึ่งอาจเกิดจากระยะเวลาที่เก็บ

supernatant หลังใส่ ATP นานเกินไป ทำให้มีการเสื่อมสภาพของโปรตีน ซึ่งผู้วิจัยจะได้อะไรลงระยะเวลาที่กระตุ้นด้วย ATP เหลือ 1 ชั่วโมง ในการทดลองครั้งหน้า

ผลการทดลองรูปที่ 5-8 สรุปได้ว่า เชื้อ OT สามารถกระตุ้นให้เกิด caspase-1 activation และนำไปสู่การหลั่ง ซัยโตไคน์ IL-1 β ได้จริง การ prime ด้วย LPS ทำให้เซลล์หลั่ง IL-1 β ออกมาได้มากขึ้นและเร็วขึ้น ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่ LPS กระตุ้นการสร้าง pro IL-1 β ได้ดีกว่าเชื้อ OT เพียงอย่างเดียว

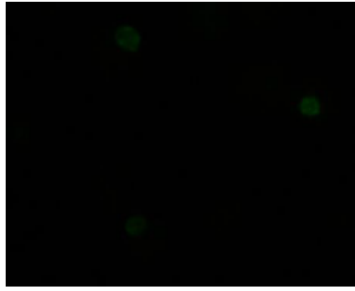


รูปที่ 8 Western blot แสดงการแสดงออกของโปรตีน pro IL-1B, pro caspase-1 และ actin (loading control) ใน cell lysate และ โปรตีน cleaved caspase-1 ใน supernatant

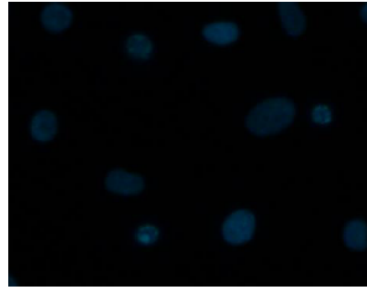
เชื้อ OT ไม่กระตุ้น caspase-3 ในเซลล์ที่ตาย

การทดลองต่อไป ผู้วิจัยต้องการศึกษาว่า เชื้อ OT กระตุ้น caspase-3 และทำให้เกิด apoptosis หรือไม่ โดยใช้วิธี TUNEL staining ซึ่งมี CF488 labeled dUTP เห็นเป็นสีเขียว ร่วมกับ indirect immunofluorescence โดยใช้ primary antibody ที่จำเพาะต่อ cleaved หรือ active caspase-3 และ secondary antibody ที่ติดฉลากด้วย Cy3 สีแดง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 9 โดยพบว่า ใน positive control ของ apoptotic cell ซึ่งเป็นเซลล์ MDM ที่ได้รับ LPS 100 ng/ml และ cycloheximide 10 μ g/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะพบลักษณะของ apoptosis ซึ่งมีการแตกของ DNA ในนิวเคลียส มี nuclear condensation เห็นการติดสีของ TUNEL assay ในนิวเคลียส ร่วมกับ การกระตุ้น caspase-3 เห็นการติดสีแดงของ active caspase-3 ใน cytoplasm ในขณะที่เซลล์ที่ติดเชื้อ OT จะพบเซลล์ที่มี TUNEL positive nuclei ได้บ้าง แต่ไม่พบการติดสีแดงของ active caspase-3 จึงสรุปได้ว่า เชื้อ OT ไม่น่ากระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis แต่จะทำให้เกิดการตายแบบ pyroptosis โดยผ่านทาง inflammatory caspase(s) เป็นสำคัญ ซึ่งการตายแบบ pyroptosis ก็ทำให้มีการแตกของ DNA ในนิวเคลียส ได้เช่นกัน

รูปที่ 9 ภาพสี แสดงการย้อมนิวเคลียสของเซลล์ที่กำลังตายด้วยวิธี TUNEL (สีเขียว) ร่วมกับการย้อม active caspase-3 (สีแดง) ใน apoptotic cell และ ในเซลล์ที่ติดเชื้อ OT



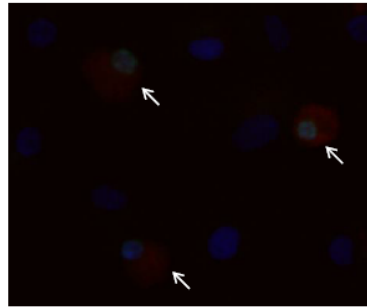
TUNEL



DAPI

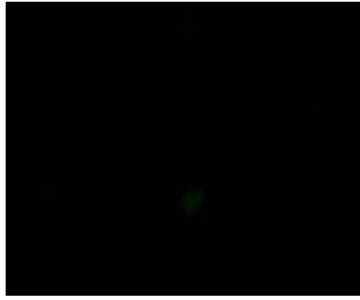


Active caspase-3

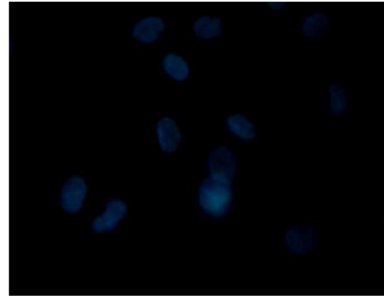


Merge

LPS + cycloheximide treated apoptotic cells (24h)



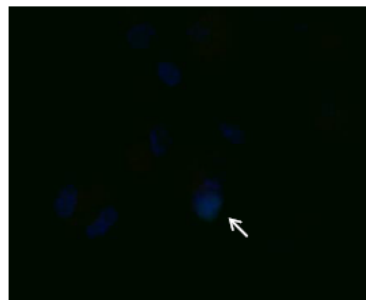
TUNEL



DAPI



Active caspase-3

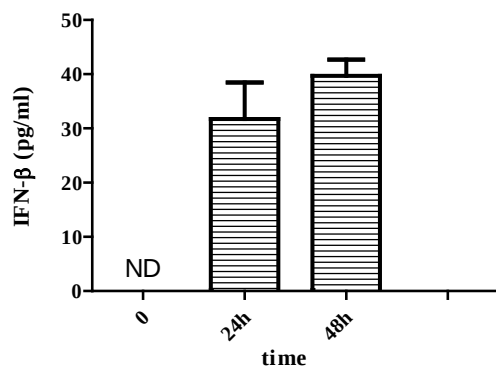


Merge

OT-infected cells (48h)

ผลของ type I interferon ต่อการตายของเซลล์ที่ติดเชื้อ

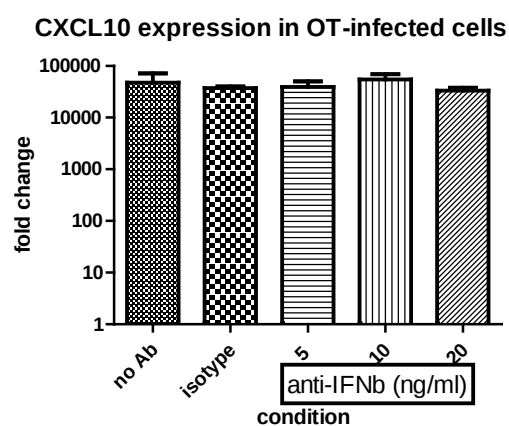
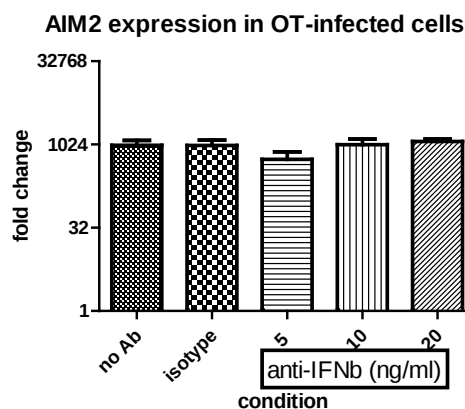
ตั้งเช่น cytosolic bacteria ชนิดอื่น เชื้อ OT กระตุ้นให้เกิดการหลั่ง IFN- β จากเซลล์ที่ติดเชื้อ ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 การหลั่ง IFN- β จากเซลล์ MDM ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

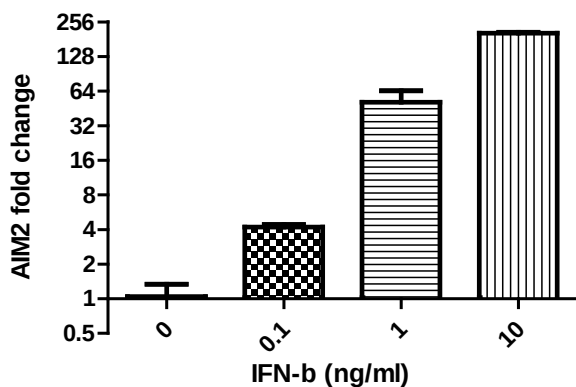
ข้อมูล แสดง mean $\pm$ SEM ของ triplicate samples

อย่างไรก็ตาม เมื่อยับยั้งผลของ IFN- β ต่อเซลล์ที่ติดเชื้อด้วย neutralizing antibody ต่อ IFN- β พบว่าแอนติบอดีไม่สามารถยับยั้งผลของ IFN- β ได้ (รูปที่ 11) โดยพบว่าแอนติบอดีไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของ interferon stimulated gene ได้แก่ AIM2 และ CXCL10 ทั้งนี้ อาจเนื่องจากแอนติบอดี อาจทำให้เกิด interferon-like response ซึ่งเป็นผลที่คาดไม่ถึง ดังจะได้กล่าวถึงในส่วนการอภิปรายผลการทดลอง



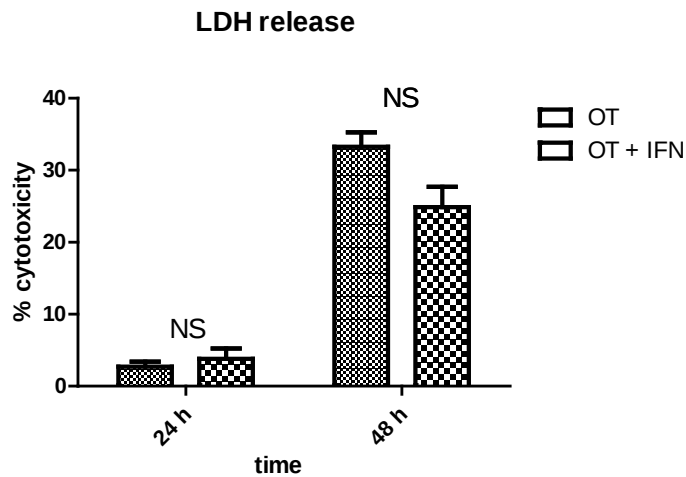
รูปที่ 11 การแสดงออกของยีนเมื่อตรวจด้วยวิธี qRT-PCR ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในเซลล์ที่ติดเชื้อ ในภาวะที่มีแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อใส่ recombinant IFN- β ในมีเดียที่เลี้ยงเซลล์ พบว่า สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน AIM2 ในเซลล์ปกติที่ไม่ติดเชื้อได้ (รูปที่ 12) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่รับรู้ DNA ใน cytoplasm และทำให้เกิดการกระตุ้น inflammasome pathway



รูปที่ 12 การแสดงออกของยีน AIM2 หลังได้รับ recombinant IFN- β ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผู้วิจัยจึงได้เลือก IFN- β ที่ความเข้มข้น 1 ng/ml สำหรับการทดลองต่อไป เนื่องจาก ความเข้มข้นนี้ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน AIM-2 ได้ ส่วนความเข้มข้น 10 ng/ml เป็นความเข้มข้นที่สูงเกินกว่าที่พบในการตอบสนองปกติของร่างกาย เมื่อทำการทดสอบการตายของเซลล์ในเซลล์ที่ได้รับ IFN- β 1 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถูกนำมาติดเชื้อ OT พบว่า การตายของเซลล์ไม่ได้เกิดมากขึ้น หรือเร็วขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในเซลล์ที่ได้รับ recombinant IFN- β เมื่อตรวจด้วยวิธี LDH release assay ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อ (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 การตายของเซลล์ที่ได้รับ recombinant IFN- β 1 ng/ml

MDM ถูกเลี้ยงในภาวะที่มี IFN- β 1 ng/ml ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงก่อนและตลอดระยะเวลาการติดเชื้อ

การตายของเซลล์ถูกวัดด้วยวิธี LDH release assay ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ

ข้อมูลแสดง mean $\pm$ SEM ของ triplicate samples

NS: not significant

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *Orientia tsutsugamushi* ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ monocyte-derived macrophage ได้จริง โดยองค์ประกอบที่มีบทบาทสำคัญทำให้เกิดการตายของเซลล์ ได้แก่ inflammatory caspases และ cathepsin ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน lysosome ดังนั้นการตายของเซลล์น่าจะเป็นแบบ pyroptosis โดยผ่านทาง inflammatory caspase ไม่ได้เกิดแบบ apoptosis เนื่องจากไม่พบการกระตุ้น caspase-3 งานวิจัยนี้ยังพบว่า เชื้อยังทำให้เกิดการกระตุ้น caspase-1 ซึ่งสัมพันธ์กับการหลั่ง IL-1 β ออกนอกเซลล์ นอกจากนี้เซลล์ที่ติดเชื้อยังมีการตอบสนองของ type I interferon โดยพบการหลั่ง IFN- β ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน interferon-stimulated genes ได้แก่ AIM2 และ CXCL10 อย่างไรก็ตาม ผลของ type I IFN ต่อการตายของเซลล์ยังไม่ชัดเจน และจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

การตายของเซลล์ในเซลล์ที่ติดเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* อาจเกิดได้หลายกลไก ดังนี้

- เกิดจาก lysosomal membrane permeabilization โดยมี cathepsin มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการตายของเซลล์ การที่มี lysosomal rupture อาจเกิดระหว่างที่เชื้อบุกรุกเข้าสู่ cytosol หรืออาจเกิดจากภาวะ oxidative stress ซึ่ง cathepsin ที่รั่วออกมา สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ pyroptosis โดยผ่านทาง inflammatory caspases หรือ ไม่ต้องอาศัย caspase ก็ได้ [12] ซึ่งจากงานวิจัยนี้ ก็แสดงให้เห็นว่า cathepsin inhibitor (Z-FA และ Z-FF-FMK) ยับยั้งการตายของเซลล์ได้ดีกว่า caspase inhibitors
- เกิดจาก caspase-1 ซึ่งถูกกระตุ้นผ่านทาง inflammasome pathway ซึ่งการกระตุ้น caspase-1 จะมีบทบาทเด่นชัดในการหลั่ง IL-1 β แต่ก็อาจทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้
- เกิดจาก caspase-4 หรือ -5 ซึ่ง caspase-4/-5 ในคน มีความคล้ายคลึงกับ caspase-11 ของหนู และข้อมูลจากการศึกษาช่วงหลัง พบว่า caspase นี้มีบทบาทสำคัญทำให้เซลล์ตายแบบ pyroptosis ซึ่ง caspase กลุ่มนี้ มีบทบาทสำคัญในการรับรู้ LPS ของแบคทีเรียที่อยู่ใน cytosol ทำให้เกิด non-canonical inflammasome activation และการตายของเซลล์ [13-15] อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* ไม่มี LPS ในผนังเซลล์ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเกี่ยวกับกลไกนี้ในโรคติดเชื้อสครับไทฟัส

เป็นที่น่าสังเกตว่า การตายของเซลล์ที่ติดเชื้อจะเริ่มสังเกตในช่วงหลังที่เวลา 24-48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ ทั้งที่พบ caspase-1 activation ตั้งแต่ 6 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ ซึ่งต่างจากการตายแบบ pyroptosis โดยทั่วไปที่มักจะเกิดเร็ว ดังนั้น การตายของเซลล์อาจจำเป็นต้องอาศัยการตอบสนองของเซลล์ระยะหลัง (late phase response) ร่วมด้วย

หรือ เชื่ออาจมีกลไกบางอย่างที่ยับยั้งการตายของเซลล์ในช่วงแรก นอกจากนี้เชื่อนี้มีการแบ่งตัวซ้ำ จึงอาจทำให้ไม่เห็นเซลล์ตายในช่วงแรก

เซลล์ที่ติดเชื้อมีการกระตุ้น caspase-1 จริง และ มีการหลั่ง IL-1 β ออกมานอกเซลล์ ซึ่งการหลั่งช่วยโตโคไนด์ถูกยับยั้งได้ด้วย caspase-1 inhibitor และ cathepsin inhibitor ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า cathepsin เป็น DAMP ชนิดหนึ่งซึ่งสามารถกระตุ้น NLRP3 inflammasome ได้ [16] ดังนั้นเชื่อนี้ น่าจะชักนำให้เกิดการรั่วของ cathepsin และกระตุ้น NLRP3 inflammasome ตามมาด้วยการหลั่ง IL-1 β ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันบทบาทของตัวรับนี้

Myeloid cell ได้แก่ monocyte และ macrophage เป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการหลั่ง IL-1 β โดยที่ monocyte จะหลั่ง IL-1 β ได้สูงกว่า macrophage [4, 5] เนื่องจากการที่มี constitutive caspase-1 activation ใน monocyte [17] แต่เนื่องจาก monocyte บางส่วนจะมีการตายแบบ apoptosis ตามธรรมชาติ งานวิจัยนี้จึงเลือกทำใน macrophage ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทนทานต่อ apoptosis ในขณะที่ endothelial cell ซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายที่สำคัญอีกชนิดของเชื่อนี้ ไม่สามารถหลั่ง IL-1 β ในปริมาณที่ตรวจพบได้ ถึงแม้ว่าจะพบการตายของเซลล์เช่นเดียวกับ macrophage (งานวิจัยที่กำลังดำเนินการอยู่) ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมา รวมทั้งงานวิจัยนี้ ชี้แนะให้เห็นว่า การติดเชื้อ *Orientia* ใน myeloid cells จะชักนำให้เกิดการหลั่งช่วยโตโคไนด์ ซึ่งอาจมีผลดีต่อการตอบสนองต่อการติดเชื้อบ้าง แต่การติดเชื้อของ endothelial cell ชักนำให้เกิดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ อันอาจจะไปสู่พยาธิสภาพที่อวัยวะภายใน โดยมีการหลั่งช่วยโตโคไนด์ในระดับที่ต่ำกว่า ถ้ามีการทำวิจัยต่อไปจะทำให้เราทราบถึงพยาธิกำเนิดของโรค scrub typhus ได้ดีขึ้น

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า neutralizing antibody ต่อ interferon-beta ไม่ได้ทำให้การแสดงออกของ interferon-stimulated gene ลดลง ซึ่งอาจเกิดจากคุณภาพของแอนติบอดีไม่ดี หรือ แอนติบอดีดังกล่าวทำให้เกิด IFN-like response ในเซลล์ได้ ซึ่งอาจเกิดจากการที่ type I interferon ซึ่งจับกับแอนติบอดี และจับกับเซลล์ผ่านทาง Fc receptor ไปกระตุ้น type I IFN receptor (IFNAR) ทำให้เกิด IFN-like response ได้ [18] ถ้าต้องการยับยั้ง type I IFN signaling อาจใช้ neutralizing antibody ต่อ IFNAR2 และ/หรือ STAT 1 inhibitor ได้แก่ ยา fludarabine ซึ่งจะยับยั้งการส่งสัญญาณจาก IFNAR นอกจากนี้ การทดลองนี้ยังพบว่า recombinant IFN- β ไม่ได้ทำให้การตายของเซลล์มากขึ้น ถึงแม้ว่าจะมีการเพิ่มขึ้นของยีน AIM2 แต่ผลของ type I IFN ต่อการหลั่งช่วยโตโคไนด์ IL-1 β จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมายังมีข้อขัดแย้งกันอยู่ โดยบางการศึกษาพบว่า type I IFN จำเป็นต่อการกระตุ้น inflammasome [19] แต่บางการศึกษากลับพบว่า type I IFN มีผลในการยับยั้งการหลั่ง IL-1 β [20, 21] นอกจากนี้ type I IFN response ยังมีบทบาทใน non-canonical inflammasome activation [22] ซึ่งทำให้เซลล์ตายแบบ pyroptosis

ข้อเสนอแนะสำหรับการทดลองต่อไป

- ตัวรับที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น inflammasome, caspase-1 และการหลั่ง IL-1 β ในโรคนี้ ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ NLRP3 และ AIM2 น่าจะมีบทบาท ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม โดยใช้ siRNA knockdown
- ปัจจุบันเริ่มมีการกล่าวถึงบทบาทของ caspase-4 ของคน ในการตายของเซลล์แบบ pyroptosis มากขึ้น เบื้องต้นอาจศึกษา การกระตุ้น caspase-4 ด้วยการดู cleaved caspase-4 ใน supernatant ด้วยวิธี Western blot
- ถึงแม้บทบาทของ type I interferon ต่อ inflammasome activation ยังมีข้อขัดแย้งกันอยู่ แต่อาจมีการศึกษาเพิ่มเติมบทบาทของ type I IFN ต่อ inflammasome โดยวัดระดับ IL-1 β ในภาวะที่มีการยับยั้งผลของ IFN ด้วย STAT 1 inhibitor และ/หรือ anti-IFNAR2 neutralizing antibody และ ภาวะที่มี recombinant IFN- β

เอกสารอ้างอิง

1. Suttinont, C., et al., *Causes of acute, undifferentiated, febrile illness in rural Thailand: results of a prospective observational study*. Ann Trop Med Parasitol, 2006. **100**(4): p. 363-70.
2. Suputtamongkol, Y., et al., *Epidemiology and clinical aspects of rickettsioses in Thailand*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1166**: p. 172-9.
3. Seong, S.Y., M.S. Choi, and I.S. Kim, *Orientia tsutsugamushi infection: overview and immune responses*. Microbes Infect, 2001. **3**(1): p. 11-21.
4. Tantibhedhyangkul, W., et al., *Orientia tsutsugamushi stimulates an original gene expression program in monocytes: relationship with gene expression in patients with scrub typhus*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(5): p. e1028.
5. Tantibhedhyangkul, W., et al., *Orientia tsutsugamushi, the causative agent of scrub typhus, induces an inflammatory program in human macrophages*. Microb Pathog, 2013. **55**: p. 55-63.
6. Tantibhedhyangkul, W., et al., *Pathogenesis of Orientia tsutsugamushi infection*, in *Pathogen Interaction : At the Frontier of the Cellular Microbiology*, E. Ghigo, G. Mottola, and J.L. Mege, Editors. 2012, Research SignPost / Transworld Research Network. p. 203-216.
7. Kumar, S., *Caspase function in programmed cell death*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 32-43.
8. Kurokawa, M. and S. Kornbluth, *Caspases and kinases in a death grip*. Cell, 2009. **138**(5): p. 838-54.
9. Wilson, N.S., V. Dixit, and A. Ashkenazi, *Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks*. Nat Immunol, 2009. **10**(4): p. 348-55.
10. Davis, B.K., H. Wen, and J.P. Ting, *The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 707-35.
11. Chawla-Sarkar, M., et al., *Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis*. Apoptosis, 2003. **8**(3): p. 237-49.
12. Serrano-Puebla, A. and P. Boya, *Lysosomal membrane permeabilization in cell death: new evidence and implications for health and disease*. Ann N Y Acad Sci, 2015: p. 1-15.
13. Casson, C.N., et al., *Human caspase-4 mediates noncanonical inflammasome activation against gram-negative bacterial pathogens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(21): p. 6688-93.
14. Yang, J., Y. Zhao, and F. Shao, *Non-canonical activation of inflammatory caspases by cytosolic LPS in innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2015. **32**: p. 78-83.
15. Shi, J., et al., *Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS*. Nature, 2014. **514**(7521): p. 187-92.
16. Orłowski, G.M., et al., *Multiple Cathepsins Promote Pro-IL-1 β Synthesis and NLRP3-Mediated IL-1 β Activation*. J Immunol. **195**(4): p. 1685-97.
17. Netea, M.G., et al., *Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages*. Blood, 2009. **113**(10): p. 2324-35.
18. Orłowski, G.M., et al., *Multiple Cathepsins Promote Pro-IL-1 β Synthesis and NLRP3-Mediated IL-1 β Activation*. J Immunol, 2015. **195**(4): p. 1685-97.

19. Henry, T. and D.M. Monack, *Activation of the inflammasome upon Francisella tularensis infection: interplay of innate immune pathways and virulence factors*. Cell Microbiol, 2007. **9**(11): p. 2543-51.
20. Novikov, A., et al., *Mycobacterium tuberculosis triggers host type I IFN signaling to regulate IL-1beta production in human macrophages*. J Immunol. **187**(5): p. 2540-7.
21. Veeranki, S., et al., *IFI16 protein mediates the anti-inflammatory actions of the type-I interferons through suppression of activation of caspase-1 by inflammasomes*. PLoS One. **6**(10): p. e27040.
22. Vanaja, S.K., V.A. Rathinam, and K.A. Fitzgerald, *Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(5): p. 308-15.

Output ที่ได้จากโครงการ

- ขณะนี้ยังไม่มีผลงานตีพิมพ์ เนื่องจากคงต้องมีการทำการทดลองเพิ่มเติม เพื่อให้ข้อมูลมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น
- ผลงานนี้คาดว่าจะมีประโยชน์ในเชิงวิชาการ โดยทำให้ทราบถึงพยาธิกำเนิดของโรคได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในการเรียนการสอน โดยเป็นโครงการในวิทยานิพนธ์ของนักศึกษาปริญญาโท ซึ่งกำลังทำการทดลองกับเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ซึ่งมีคำถามวิจัยและระเบียบวิจัยใกล้เคียงกัน