

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RDG3/05/2544

ชื่อโครงการ: การศึกษาการตอบสนองของเซลล์ phagocytic และ nonphagocytic เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

ชื่อนักวิจัย: พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ¹, สถิตย สิริสิงห์¹, นริศรา อนันตกุล² และ กรแก้ว ลิมโพธิ์สุวรรณ¹
¹คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, ² The SE Asia Wellcome Trust Unit คณะเวช
ศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

email address: scput@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: พฤษภาคม 2544 – พฤษภาคม 2547

เมล็อยโดซิสเป็นโรคที่เกิดขึ้นจากการได้รับเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* โรคนี้มีการระบาดมากบริเวณพื้นที่เขตร้อนเช่นประเทศไทย ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อชนิดนี้เข้าไปจะเสียชีวิตในระยะเวลาอันสั้น จากการศึกษาพบว่าเซลล์แมคโครฟาจที่รับเชื้อนี้เข้าไปจะไม่มีการสร้าง Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์ เพื่อแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. pseudomallei* มีความสามารถในการกระตุ้นการสร้าง IFN- β และ Interferon regulating factor-1 (IRF-1) ในระดับที่น้อยกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิด ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยจึงได้ใส่ exogenous IFN- β เข้าไปในระบบ พบว่า IFN- β สามารถ upregulate การสร้าง IRF-1 ซึ่งมีผลทำให้มีการสร้าง iNOS โดยเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* มีผลไปสู่การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียภายในเซลล์แมคโครฟาจ แสดงให้เห็นว่า IFN- β มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตและความอยู่รอดของเชื้อ *B. pseudomallei* ในเซลล์แมคโครฟาจ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความแตกต่างของ type I IFN (IFN- β) และ type II IFN (IFN- γ) ในการควบคุมการทำลายเชื้อแบคทีเรียในเซลล์แมคโครฟาจที่รับเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่าเมื่อใส่ IFN- β พร้อมกับการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณการสร้าง iNOS และมีผลทำให้เชื้อแบคทีเรียถูกทำลาย อย่างไรก็ตามการใส่ IFN- β ก่อนการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* ไม่สามารถทำให้เกิดการสร้าง iNOS และการทำลายเชื้อแบคทีเรียขึ้น ในทางตรงกันข้าม ระยะเวลาในการใส่ type II IFN (IFN- γ) ไม่ว่าจะก่อนหรือพร้อมกับการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจไม่มีความสำคัญต่อการสร้าง iNOS และการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สำหรับความแตกต่างของกลไกในการควบคุมการสร้าง iNOS ของ IFN ทั้งสองชนิดนี้อาจเกี่ยวข้องกับการสร้าง IRF-1 เนื่องจาก IFN- γ สามารถรักษาระดับการสร้าง IRF-1 ให้อยู่ในระดับคงที่ได้นานกว่า IFN- β

นอกเซลล์แมคโครฟาจ *B. pseudomallei* ยังมีความสามารถในการเข้าไปอาศัยและเพิ่มจำนวนในเซลล์ nonphagocytic ที่บริเวณอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะที่ปอดซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดฝีในผู้ป่วยที่เป็นโรคเมล็อยโดซิสเรื้อรัง คณะผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. pseudomallei* มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้าง IL-8 โดย human alveolar lung epithelial cell line (A549) อย่างไรก็ตามปริมาณการสร้าง IL-8 ที่สร้างขึ้นจากการกระตุ้นของเชื้อ *B. pseudomallei* มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น เช่น *Salmonella enterica* serovar typhi (*S. typhi*) อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ระดับการสลายตัวของ I κ B α ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* ยังต่ำกว่าในเซลล์ที่ถูก

กระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น จะเห็นได้ว่าเชื้อ *B. pseudomallei* เป็นตัวกระตุ้นเซลล์ที่มีความสามารถต่ำกว่าเชื้อชนิดอื่น การยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยการใช้สาร cytochalasin D ไม่มีผลเกี่ยวข้องกับการสร้าง IL-8 หรือระดับการสลายตัวของ I κ B α chemokine เหล่านี้ไม่มีความจำเป็นในกระบวนการการเข้าสู่เซลล์ การสัมผัสระหว่างเชื้อ *B. pseudomallei* กับผิวเซลล์เพียงพอต่อการสร้างสัญญาณเพื่อใช้ในการกระตุ้นเซลล์ จากการทำ Immunoblotting analysis แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. pseudomallei* กระตุ้นให้เกิดการ phosphorylation ของ p38 ซึ่งช่วยในการเข้าสู่ lung epithelial cells การยับยั้งโปรตีน p38 มีผลทำให้เชื้อ *B. pseudomallei* ไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้

คำหลัก: *Burkholderia pseudomallei*, melioidosis, phagocytic cells, nonphagocytic cells

Abstract

Project Code: RDG3/05/2544

Project Title: Pathogenesis of *Burkholderia pseudomallei*: *in vitro* study of the host cells modulated bacteria.

Investigators: Utaisincharoen P.¹, Sirisinha S.¹, Anuntagool N.², and Limposuwan K.¹

¹Faculty of Science, Mahidol University, ²The SE Asia Wellcome Trust Unit, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University.

Email address: scput@mahidol.ac.th

Project Duration: May 2001 - May 2004

Burkholderia pseudomallei is a causative agent of melioidosis, a life threatening disease which affects both humans and animals. We recently reported that mouse macrophages infected with *B. pseudomallei* fail to produce significant level of inducible nitric oxide synthase (iNOS), a crucial enzyme needed for the cells to control intracellular growth of this bacterium. In this study, to demonstrate that, unlike other gram-negative bacteria that have been investigated, *B. pseudomallei* only minimally activate IFN- β production which leads to the low level of interferon regulating factor-1 (IRF-1) in the mouse macrophages cell line (RAW 264.7) and this paralleled with poor iNOS expression. Adding exogenous IFN- β to the system could upregulate IRF-1 production which in turn enhances iNOS expression in the *B. pseudomallei*-infected macrophages leading to suppression of intracellular growth of this bacterium. It appears that the failure of macrophages to successfully control growth and survival of intracellular *B. pseudomallei* is related, at least in part, to the defective production of IFN- β which modulates the ability of macrophages to synthesize iNOS. In this study, we also extended our investigation, analysing the mechanism(s) by which the two types of interferons (IFNs) regulate antimicrobial activity in the *B. pseudomallei*-infected macrophages. The macrophages that were simultaneously exposed to *B. pseudomallei* and type I IFN (IFN- β) expressed high level of iNOS, leading to enhanced intracellular killing of the bacteria. However, neither enhanced iNOS expression nor intracellular bacterial killing was observed when the macrophages were preactivated with IFN- β prior to being infected with *B. pseudomallei*. On the contrary, the timing of exposure was not critical for the type II IFN (IFN- γ) because when the cells were either prestimulated or costimulated with IFN- γ , both iNOS expression and intracellular killing capacity were enhanced. The differences by which these 2 IFNs regulate antimicrobial activity may be related to the fact that IFN- γ was able to induce more sustained Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1) expression compared with the cells activated with IFN- β .

Besides phagocytic cells, *B. pseudomallei* has ability to invade and multiply inside nonphagocytic cells in various organs. Among them, lung is the most commonly affected organ resulting in abscess formation in the patients with chronic melioidosis. We demonstrated that *B. pseudomallei* was able to stimulate IL-8 production from human alveolar lung epithelium cell line (A549). However, the level of IL-8 production was significantly lower than the cells infected with other gram-negative bacteria such as *Salmonella enterica* serovar typhi (*S. typhi*). The degree of I κ B α degradation in the *B. pseudomallei*-infected cells was also lower than that of the *S. typhi*-infected cells, suggesting that *B. pseudomallei* is a poorer cell activator. Inhibition of *B. pseudomallei* invasion by cytochalasin D did not interfere with either the IL-8 production or I κ B α degradation, indicating that bacterial uptake is not required for the production of this chemokine. The signaling which initiated by the interaction of *B. pseudomallei* with the epithelial cell surface is sufficient for cells activation. Immunoblotting analysis indicated that *B. pseudomallei* triggered the phosphorylation of p38 of the cells to facilitate the invasion into the lung epithelial cells. Inhibition of p38 protein by specific inhibitor resulted in the inability of the bacteria to invade the cells.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*, melioidosis, phagocytic cells, nonphagocytic cells