กระตุ้น THP-1 แล้วดูการกระตุ้นการสร้าง cytokine ในระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0, 2, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

ผลการทดลอง

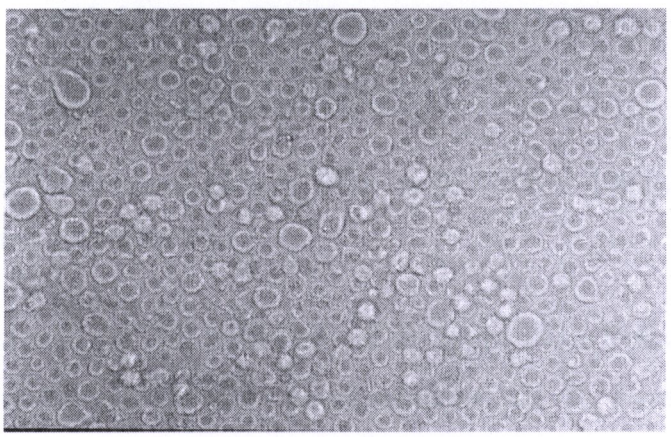
การศึกษาผลของตัวเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ต่อเซลล์ THP-1

ได้สรุปแผนการทดลองที่ได้ดำเนินการดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง experimental plan ของการศึกษา IL-6 และ IL-12 ใน THP-1 cell

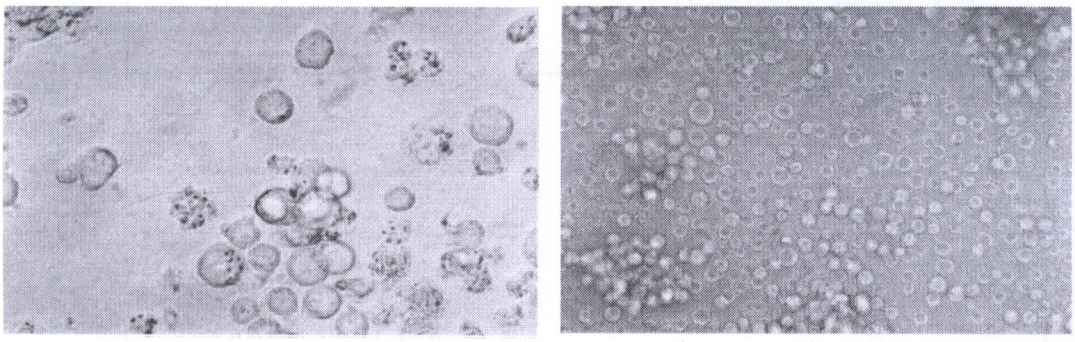
Type of bacteria	- *B.pseudomallei* และ *B. thailandensis* - Live and killed bacteria
Ratio of bacterial cell: THP1	- 1:1 - 100:1
Incubation periodic	0-48 hrs.
Time for IL-6 and IL-12 assay by ELISA	0, 2, 6,8,12,24,48 hrs

เมื่อเลี้ยง THP-1 cell ให้ได้ปริมาณเซลล์ที่ต้องการ (รูปที่ 1) และนำไปกระตุ้นด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* (แยกจากผู้ป่วย) และ *B. thailandensis* (แยกได้จากดิน) ในอัตราส่วน Bact : cell THP-1 = 1:1 และ 100:1 โดยใช้ live bacteria กับ heat killed bacteria ผลการศึกษาพบว่า เชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* กระตุ้น THP-1 ให้สร้าง IL-6 ไม่แตกต่างกัน และจะตรวจพบ IL-6 ได้อย่างชัดเจนเมื่อได้รับการกระตุ้นจากเชื้อแล้วไม่น้อยกว่า 24 hrs (ซึ่งแตกต่างจาก gram negative bacteria ชนิดอื่นจะกระตุ้นให้เกิด peak ภายใน 4 hr (200-300 pg/ml) (ดูตารางที่ 2 และรูปที่ 4 ประกอบ)



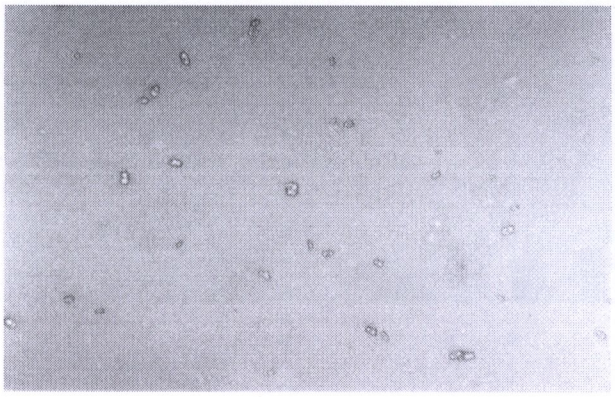
รูปที่ 1 Normal THP-1 cell มีลักษณะกลมวาว และไม่เกาะติดกับภาชนะที่เลี้ยง (100x)

หลังการกระตุ้น 6ชม. จะเริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงของ THP-1 โดยเกิดการเกาะกลุ่มกัน เซลล์บางส่วนเริ่มเกาะติดภาชนะ ทั้งที่ถูกกระตุ้นด้วย *B.pseudomallei* และ *B. thailandensis* ชนิด killed ratio 100:1 ส่วนชนิด live ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงชัดเจนนัก



รูปที่ 2 1:1 live *B. pseudomallei* ที่ 24 ชั่วโมง (200x)(ซ้าย) และ 1:1 killed *B. pseudomallei* ที่ 24 ชั่วโมง (100x) (ขวา)

หลังการกระตุ้น 24 ชม. THP-1 ที่กระตุ้นด้วย live bacteria ทั้ง 100:1 และ 1:1 เริ่มตายอย่างชัดเจนและพบ bacteria อยู่ใน cell ในขณะที่กลุ่ม killed bacteria พบ THP-1 ตายบ้างแต่เป็นส่วนน้อยและไม่ค่อยพบว่ามี bacteria อยู่ใน cell THP-1 แต่มีการเกาะกลุ่มของ cell มากขึ้น

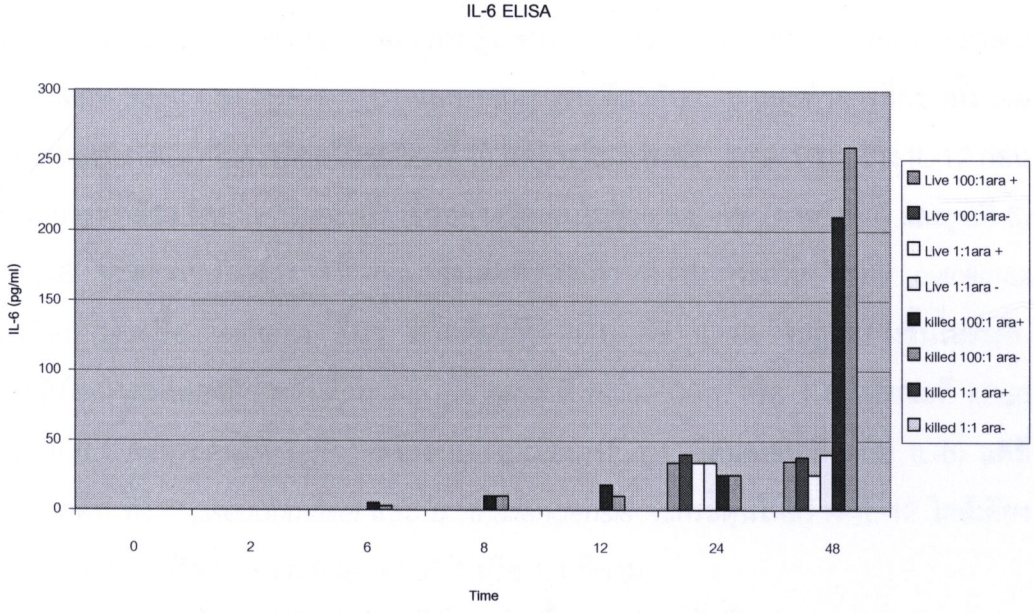


รูปที่ 3 หลังการกระตุ้นด้วย *B. pseudomallei* เป็นเวลา 48 ชม. THP-1 ตายเกือบหมด ใน live bacteria ทั้ง 100:1 และ 1:1 (100x)

ส่วนใน killed bacteria THP-1 เริ่มตายไป 40% ในกลุ่ม 100:1 ข้อสังเกตคือ ทุกกลุ่มไม่พบความแตกต่างชัดเจนระหว่างกลุ่มที่ใช้เชื้อ *B.pseudomallei* และ *B. thailandensis* แต่การได้รับการกระตุ้นจาก killed จะเห็นการเปลี่ยนแปลงเร็วกว่าแต่ก็จะไม่เปลี่ยนแปลงเพิ่มเติมมากนักในช่วง 24 ชั่วโมงในขณะที่ live ในช่วงนี้จะเห็นเซลล์ตายอย่างรวดเร็ว

ตารางที่ 2 แสดงผลของ IL-6 ที่สร้างโดย THP-1 เมื่อได้รับการกระตุ้นจากเชื้อ *B.pseudomallei* และ *B. thailandensis* ทั้งชนิดเป็นและตัวตาย

Time	IL - 6 (pg/ml) Live 100:1		IL 6 (pg/ml) Live1:1		IL - 6 (pg/ml) Killed 100:1		IL - 6 (pg/ml) Killed 1:1	
	Live 100:1 ara^+	Live 100:1 ara^-	Live 1:1 ara^+	Live 1:1 ara^-	killed 100:1 ara^+	killed 100:1 ara^-	killed 1:1 ara^+	killed 1:1 ara^-
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	5	3	0	0
8	0	0	0	0	10	10	0	0
12	0	0	0	0	18	10	0	0
24	34	40	34	34	25	25	0	0
48	35	38	25	40	210	260	0	0



รูปที่ 4 การสร้าง IL-6 โดย THP-1 cell เมื่อกระตุ้นด้วย live หรือ heat-killed *B.pseudomallei* และ *B. thailandensis* ที่ 1:1 หรือ 1:100

และเมื่อเปรียบเทียบเฉพาะ live bacteria จะพบว่า ratio ของ bacteria : cell ไม่ว่าจะเป็น 1:1 หรือ100:1 จะกระตุ้นให้เกิด IL-6 ใกล้เคียงกัน ในขณะที่ในกลุ่มของ killed bacteria นั้น ratio ของ bacteria: cell ในกลุ่ม 100:1 เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นให้เกิด IL-6 ได้ และกระตุ้นได้มากกว่า 100:1 ในกลุ่ม live bacteria (อาจเนื่องมาจากกลุ่ม 100:1 ของ live bacteria ทำให้

THP-1 ตาย) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้น IL-6 ใน THP-1 (ซึ่งเป็น human monocyte cell line) อาจจะเกี่ยวข้องกับ viable ของเชื้อโดยเฉพาะในกรณีที่เป็น low grade of infection (1:1)

ผลการศึกษา IL-12 ที่สร้างจาก THP-1 เมื่อได้รับเชื้อ *B.pseudomallei* และ *B. thailandensis* ทั้งตัวเป็นและตัวตาย

ตารางที่ 3 แสดง experimental plan ของการศึกษา IL-12 ใน THP-1 cell

Type of bacteria	- *B.pseudomallei* และ *B. thailandensis* - Live and killed bacteria
Ratio of bacterial cell: THP1	- 1:1 - 100:1
Incubation periodic	0-48 hrs.
Time for IL-12 assay by ELISA	0, 2, 6,8,12,24,48 hrs

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ทำการศึกษาเลี้ยง cell THP-1 และกระตุ้นด้วย *B.pseudomallei* และ *B. thailandensis* โดยใช้อัตราส่วน Bact: cell THP-1 = 1:1 และ 100:1 เช่นเดียวกับ IL-6 และทำการศึกษาทั้ง live และ killed bacteria (ดูรายละเอียดใน ตารางที่ 3) ผลการศึกษาพบว่า THP-1 จะสร้าง IL-12 ก่อน IL-6 ในทุกการทดลอง โดย IL-12 จะสร้างขึ้นอย่างชัดเจนในช่วง 6-8 hrs (ตารางที่ 4 และรูปที่ 5) ขณะที่ IL-6 จะสร้างขึ้นในช่วง 12 hrs ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว IL-12 จะเป็น early cytokines เช่นเดียวกับการติดเชื้อ bacteria อื่นๆ เช่นเดียวกับ IL-6 คือ IL-12 จะถูกสร้างขึ้นในระดับใกล้เคียงกันในการทดลองที่กระตุ้นด้วย live bacteria ที่ ratio 100:1 หรือ 1:1 ในขณะที่ killed bacteria 100:1 จะกระตุ้นให้ THP-1 สร้าง IL-12 มากกว่า 1:1 (ได้ผลเช่นเดียวกับ IL-6) แต่ที่น่าสนใจมากคือ ทั้ง *B.pseudomallei* และ *B. thailandensis* จะกระตุ้นให้สร้าง IL-12 ใกล้เคียงกันไม่ว่าจะเป็น live หรือ killed bacteria 100:1 หรือ 1:1 ก็ตาม

ผลการทดลองทำให้เกิดคำถามที่น่าสนใจขึ้นมาหลายข้อคือ

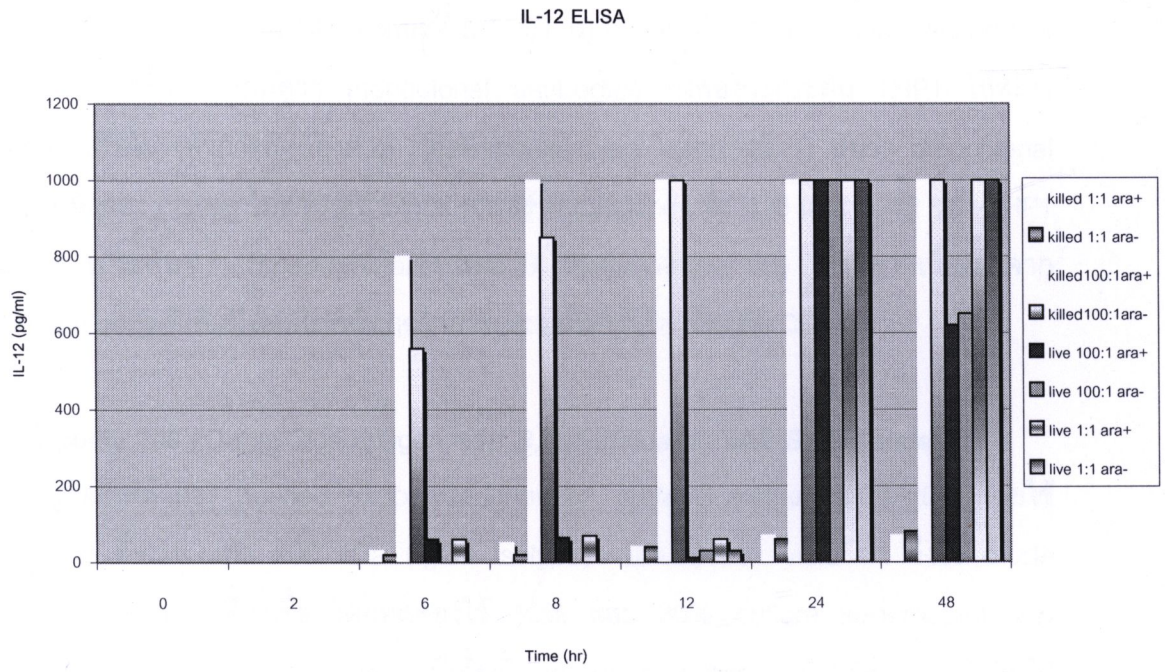
- อะไรคือ molecule หลักในการกระตุ้น cytokines ทั้งสองตัว (LPS ใช่หรือไม่เนื่องจาก heat killed bacteria ยังสามารถกระตุ้น cytokines ได้ดี)
- ทั้ง *B.pseudomallei* และ *B. thailandensis* ให้ผลการกระตุ้น cytokines ไม่แตกต่างกัน แสดงว่า molecules ที่พบบนผิวเซลล์ของ bacteria ทั้งสองชนิด (รวมถึง 200 kDa ซึ่งพบเฉพาะใน *B. pseudomallei* ไม่น่าจะเกี่ยวข้องในการกระตุ้น cytokines ทั้งคู่ใช่หรือไม่
- กลไกการกระตุ้น cytokines (ถ้าเป็น LPS) จะใช้กลไกเช่นเดียวกับ Gram-negative อื่นหรือไม่

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 31 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 250337

- Virulence ของ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* น่าจะเป็นความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ ไม่ใช่สิ่งที่เซลล์สร้างได้ เช่น toxin

ตารางที่ 4 แสดงผลของ IL-12 ที่สร้างโดย THP-1 เมื่อได้รับการกระตุ้นจากเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ทั้งชนิดเป็นและตัวตาย

Time	IL-12 killed 1:1		IL-12 killed 100:1		IL-12 live 100:1		IL-12 live 1:1	
	killed 1:1 ara+	killed 1:1 ara-	killed100:1 ara+	killed100:1 ara-	live 100:1 ara+	live 100:1 ara-	live 1:1 ara+	live 1:1 ara-
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
6	30	20	800	560	60	0	60	0
8	50	20	1000	850	64	0	70	0
12	40	40	1000	1000	12	30	60	30
24	70	60	1000	1000	1000	1000	1000	1000
48	70	80	1000	1000	620	650	1000	1000



รูปที่ 5 การสร้าง IL-12 โดย THP-1 cell เมื่อกระตุ้นด้วย live หรือ heat-killed *B.pseudomallei* และ *B. thailandensis* ที่ 1:1 หรือ 1:100

การศึกษาบทบาทของ LPS (Lipopolysaccharide)

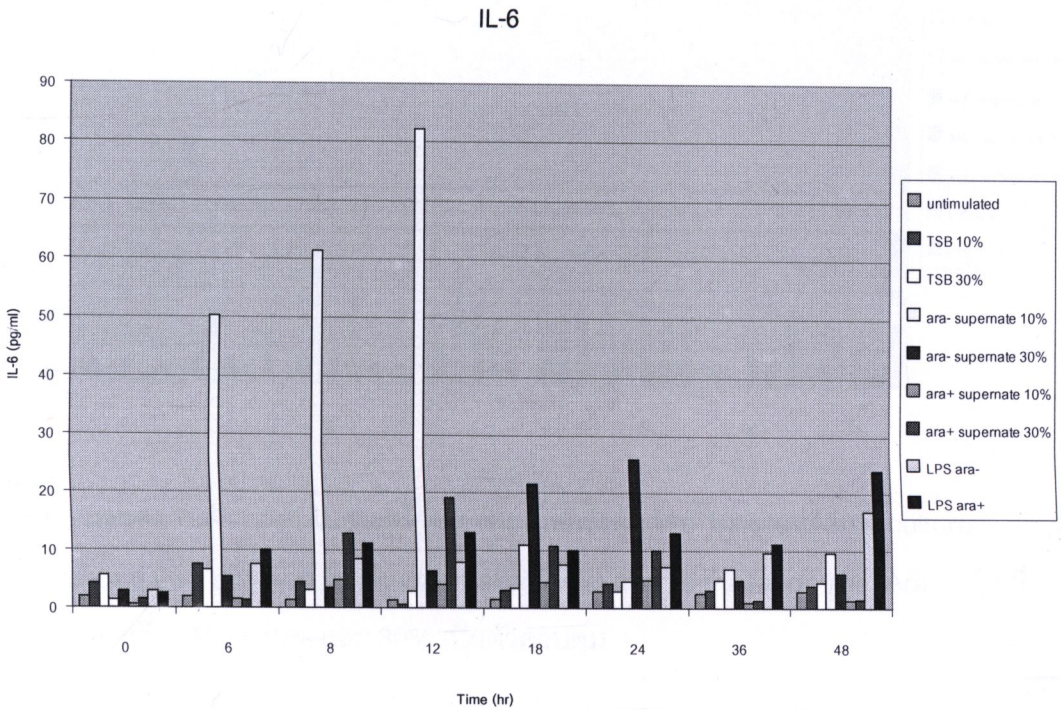
บทบาทของ LPS ต่อการสร้าง IL-6 และ IL-12 ของ cell THP1 จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่า killed bacteria จะกระตุ้นให้ THP-1 สร้าง IL-6 และ IL-12 มากกว่า live bacteria (ที่ Bacteria: THP1 ratio = 100:1) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า LPS จะเป็นโมเลกุลที่สำคัญในการกระตุ้นนี้ (ถึงแม้ว่า profile ของการสร้าง IL-6 และ IL-12 ที่สร้างจาก THP-1 เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย killed bacteria จะแตกต่างจาก Gram-negative อื่นๆ ก็ตาม) ผู้วิจัยได้ทำการสกัด LPS จากเชื้อ *B.pseudomallei* และ *B. thailandensis* และนำมากระตุ้น THP1 เพื่อดู profile ของ IL-6 และ IL-12 ในระยะเวลาต่างๆ กัน ตั้งแต่ 0-24 hrs และความเข้มข้นของ LPS ต่างกัน โดยเทียบกับ LPS ของ *E.coli* เป็นหลัก

การศึกษากลไกการกระตุ้น IL-6 และ IL-12 โดยใช้ monoclonal antibody ต่อ CD 14 จากการทำลองที่ผ่านมาพบว่า profile ของการสร้าง IL-6 และ IL-12 จะต่างจาก Gram-negative อื่นๆ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษากลไกการกระตุ้น cytokines ทั้งสองว่าจะใช่กลไกเช่นเดียวกับ LPS ของ gram negative bacteria อื่นๆ ที่เกิดขึ้นโดย LPS จะไปจับกับ LBP (LBS binding proteins) และจึงไปจับกับ CD14 บน monocytes เพื่อกระตุ้นการสร้าง cytokines ผู้วิจัยจึงได้ใช้ monoclonal antibody ที่จับกับ CD14 2 clones (โดยได้รับ monoclonal antibody จาก รศ.ดร. วัชรา กษิณฤกษ์ จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่) ชื่อ MT 14/1 และ MT14/3 โดย clone MT14/3 จะ block ตรง LPS epitope บน CD14 ขณะที่ MT14/1 ไม่ block เมื่อนำ monoclonal antibodies ทั้งสองมาทำการศึกษา โดยดูว่า monoclonal antibodies ทั้งสองจะกระตุ้น THP1 ให้สร้าง cytokines หรือไม่ (ทำการทดลองตาม experimental plan ในตารางที่ 1) พบว่า monoclonal antibody ทั้งสอง clones ไม่สามารถ block การสร้าง cytokines ทั้ง IL-6 และ IL-12 ของ THP1 เมื่อได้รับการกระตุ้นจาก *B.pseudomallei* และ *B. thailandensis* เลย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณ antibody ที่เติมมีน้อยไป หรือกลไกการกระตุ้นไม่ได้เกี่ยวข้องกับ CD14

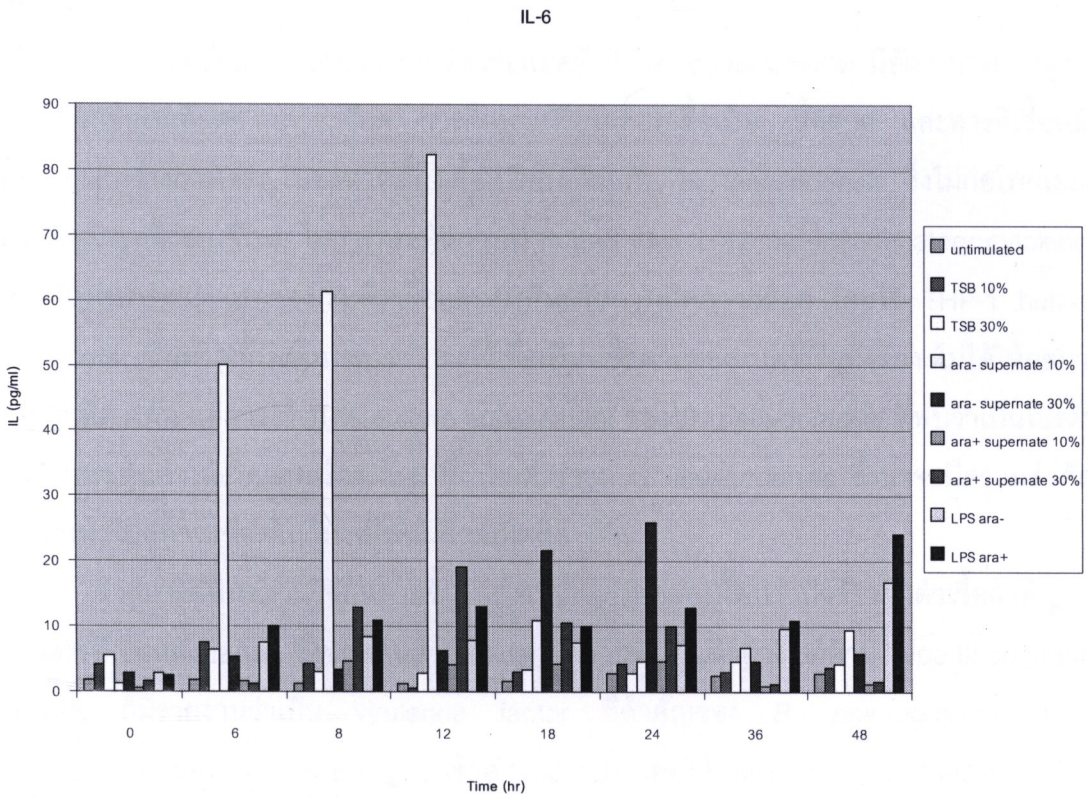
การ purify 200 kDa surface antigen จาก *B.pseudomallei* และ *B. thailandensis*

ผู้วิจัยได้ทำการ purified exopolysaccharide surface antigen (200 kDa) โดยใช้ monoclonal ที่จะเพาะต่อ 200 kDa (IgG3 Isolype) แต่เนื่องจาก yield ต่ำ จึงใช้ crude supernatant จากการเลี้ยงเชื้อ โดยทดลองใช้ 10% และ 30% culture supernatant ของ *B.pseudomallei* และ *B. thailandensis* ที่เลี้ยงใน log phase มาทดสอบกับ THP-1 cell โดยใช้ 10% และ 30% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (TSB) เป็น control และเปรียบเทียบกับ LPS ของเชื้อที่ 1 ไมโครกรัม พบว่าเมื่อใช้ 10% of culture supernatant จาก *B. pseudomallei* ที่มี 200 kDa LPS สามารถกระตุ้น IL-6 production ใน 6 hr โดยที่ *B. thailandensis* ไม่สามารถกระตุ้นได้

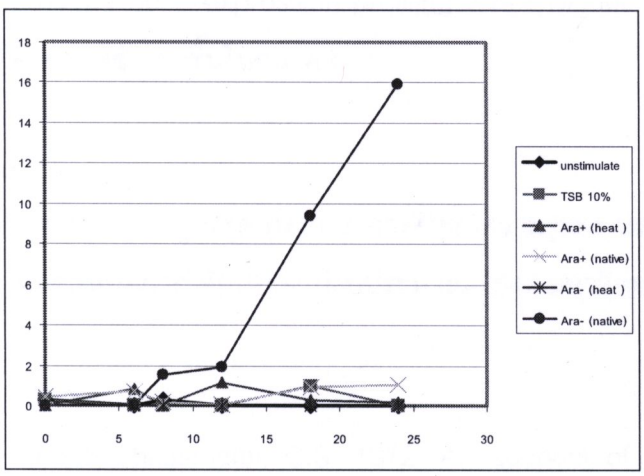
เนื่องจากคาดว่าจะเป็นผลมาจาก 200 kDa LPS จึงทดสอบโดยการ heat inactivation culture supernatant แต่พบว่าไม่เกิดการกระตุ้น IL-6 induction (รูปที่ 5) แสดงว่า component ที่มีบทบาทน่าจะเป็นโปรตีน ส่วนการกระตุ้น IL-12 นั้นเกิดจากผลของ LPS ที่ทั้ง *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ให้ผลใกล้เคียงกัน (รูปที่ 6 และ 7)



รูปที่ 5 ผลของ THP-1 cell ในการสร้าง IL-6 เมื่อกระตุ้นด้วย 10% และ 30% culture supernatant และ LPS จาก *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อ (TSB) 10% และ 30% เป็นตัวควบคุม



รูปที่ 6 ผลของ THP-1 cell ในการสร้าง IL-12 เมื่อกระตุ้นด้วย 10% และ 30% culture supernatant และ LPS จาก *B. pseudomallei* (Ara-) และ *B. thailandensis* (Ara+) โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อ (TSB) 10% และ 30% เป็นตัวควบคุม



รูปที่ 7 ผลของ culture supernatant จาก *B. pseudomallei* (Ara-)และ *B. thailandensis* (Ara+) ต่อ THP-1 cell ในการกระตุ้น IL-6 โดยเส้นสีน้ำตาลแสดงการกระตุ้น IL-6 จาก native supernatant และสี ม่วง X คือเมื่อนำ supernatant ไปให้ความร้อนจนเสียสภาพ