ทำการบ่มโมโนซัยต์กับ pIFNγ ที่ปริมาณต่างๆ ได้แก่ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 μg หรือกับ pcDNA vector ที่ 0.4 μg นาน 4 ชั่วโมงโดยใช้ IBAfect (IBA GmbH) และ MATra-A (IBA GmbH) เป็น transfection reagents จากนั้นปิเปต media ออก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ $RPMI^{++}$ (ประกอบด้วย RPMI-1640, L-glutamine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin-amphotericin B) (Gibco) ทำการบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2) ตรวจการมีชีวิตของเซลล์ด้วยการย้อมสี trypan blue (Gibco) และทดสอบการสร้าง IFNγ mRNA และ protein ในโมโนซัยต์ด้วยวิธี real-time PCR (Royaee et al., 2004) และ ELISA (R&D systems) ตามลำดับ

การศึกษาความสามารถของ pIFNγ ในการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ IFNγ ในโมโนซัยต์ที่บ่มกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสและกระตุ้นด้วย LPS

บ่มโมโนซัยต์กับ pIFNγ หรือ pcDNA vector ที่ปริมาณ 0.4 μg นาน 4 ชั่วโมงโดยใช้ IBAfect และ MATra-A เป็น transfection reagents จากนั้นปิเปต media ออก แล้วเติมไวรัสพีอาร์อาร์เอส (10^6 $TCID_{50}$/ml) ทำการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2) จากนั้นเติมสารละลาย LPS (10 μg/ml) แล้วบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง ตรวจการมีชีวิตของเซลล์ด้วยการย้อมสี trypan blue และทดสอบการสร้าง IFNγ mRNA และ protein ในโมโนซัยต์ด้วยวิธี real-time PCR และ ELISA ตามลำดับ

การศึกษาผลของ pIFNγ ต่อการสร้างไซโตไคน์ TNFα, IL-1, IL-12p35, IL-12p40, IL-10 และ TGFβ ในโมโนซัยต์ที่บ่มกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสและกระตุ้นด้วย LPS

บ่มโมโนซัยต์กับ pIFNγ หรือ pcDNA vector ที่ 0.4 μg นาน 4 ชั่วโมงโดยใช้ IBAfect และ MATra-A เป็น transfection reagents จากนั้นปิเปต media ออก แล้วเติมไวรัสพีอาร์อาร์เอส (10^6 $TCID_{50}$/ml) ทำการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2) จากนั้นเติมสารละลาย LPS (10 μg/ml) แล้วบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง ทดสอบการสร้าง TNFα, IL-1, IL-12p35, IL-12p40, IL-10 และ TGFβ mRNA ด้วยวิธี real-time PCR (Royaee et al., 2004) และทดสอบการสร้าง TNFα และ IL-10 protein ด้วยวิธี ELISA (R&D systems) ตามลำดับ

ผลการทดลอง

การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ pIFNγ ต่อการเข้าสู่เซลล์โมโนซัยต์

pIFNγ ที่ปริมาณ 0.3 และ 0.4 µg สามารถกระตุ้นการสร้าง IFNγ mRNA และ protein ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2 และ 3) pIFNγ ที่ปริมาณ 0.1 และ 0.2 µg สามารถกระตุ้นการสร้าง IFNγ mRNA และ protein ได้ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โมโนซัยต์ที่ได้รับ pcDNA vector มีการสร้าง IFNγ mRNA และ protein เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2 และ 3) แต่ระดับที่สร้างขึ้นนั้นต่ำกว่าระดับที่สร้างจาก pIFNγ (ที่ 0.3 และ 0.4 µg)

ความสามารถของ pIFNγ ในการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ IFNγ ในโมโนซัยต์ที่บ่มกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสและกระตุ้นด้วย LPS

โมโนซัยต์ที่บ่มร่วมกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสและ LPS มีการสร้าง IFNγ mRNA และ protein ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับโมโนซัยต์ที่บ่มร่วมกับ LPS เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 4 และ 5) โมโนซัยต์ที่ได้รับการ transfect ด้วย pIFNγ (0.4 µg) ก่อนบ่มร่วมกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสและ LPS มีระดับการสร้าง IFNγ mRNA และ protein ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับโมโนซัยต์ที่ไม่ได้รับ pIFNγ (รูปที่ 4 และ 5) pcDNA vector มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของ IFNγ protein แต่ผลนั้นน้อยกว่า pIFNγ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลของ pIFNγ ต่อการสร้างไซโตไคน์ TNFα, IL-1, IL-12p35, IL-12p40, IL-10 และ TGFβ ในโมโนซัยต์ที่บ่มกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสและกระตุ้นด้วย LPS

โมโนซัยต์ที่บ่มร่วมกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสและ LPS มีการสร้าง TNFα mRNA และ protein ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีการสร้าง IL-10 mRNA และ protein เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับโมโนซัยต์ที่บ่มร่วมกับ LPS เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 4 และ 5) โมโนซัยต์ดังกล่าวไม่มีการสร้าง IL-1, IL-12p35, IL-12p40 และ TGFβ mRNA แตกต่างจากโมโนซัยต์ของกลุ่มควบคุม

โมโนซัยต์ที่ได้รับการ transfect ด้วย pIFNγ (0.4 µg) ก่อนบ่มร่วมกับไวรัสพีอาร์อาร์เอส และ LPS มีระดับการสร้าง TNFα mRNA และ protein เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีการสร้าง IL-10 mRNA และ protein ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับโมโนซัยต์ที่ไม่ได้รับ pIFNγ โมโนซัยต์ดังกล่าวไม่มีการสร้าง IL-1, IL-12p35, IL-12p40 และ TGFβ mRNA แตกต่างจากโมโนซัยต์ที่ไม่ได้รับ pIFNγ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง