MRG4680101 นพ.ดร.วีรพันธุ์ โชวิฑูรกิจ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ high-density lipoproteins ในภาวะตอบสนอง acute-phase

(Antimicrobial activity of high-density lipoproteins (HDL) during the acute-phase response)

โดย วีรพันธุ์ โชวิฑูรกิจ และคณะ

30 มิถุนายน 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ high-density lipoproteins ในภาวะตอบสนอง acute-phase

(Antimicrobial activity of high-density lipoproteins (HDL) during the acute-phase response)

โดย วีรพันธุ์ โชวิฑูรกิจ และคณะ

30 มิถุนายน 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ high-density lipoproteins ในภาวะตอบสนอง acute-phase

(Antimicrobial activity of high-density lipoproteins (HDL) during the acute-phase response)

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. นายแพทย์ วีรพันธุ์ โชควิฑูรกิจ	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. รองศาสตราจารย์ ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. นางสาวเปรมทิพย์ ทวีรติธรรม	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. นางสาววรกมล แน่นอุดร	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยทบวงมหาวิทยาลัย และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ทบวงฯ และสกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

HDL (High-density lipoprotein) เป็นกลุ่มของ lipoprotein ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการลำเลียงคอเลสเตอรอลส่วนเกินออกจากเซลล์และป้องกันปฏิกิริยา oxidation ของ LDL ในขณะที่ร่างกายมีการอักเสบติดเชื้อ HDL มีส่วนประกอบและหน้าที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อร่างกายเกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย พบว่า endotoxin หรือ lipopolysaccharide (LPS) ของเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ และ lipoteichoic acid (LTA) ของเชื้อแบคทีเรียกรัมบวก สามารถกระตุ้นร่างกายให้เกิดการหลั่ง cytokines ต่างๆและมีผลก่อให้เกิด septic shock ในคนไข้ติดเชื้อดังกล่าวได้ การศึกษาที่ผ่านมา พบว่า HDL ยังมีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน โดย HDL สามารถจับกับ LPS และ LTA รวมทั้งลดพิษที่เกิดขึ้นกับร่างกาย ทำให้เซลล์หลั่ง cytokines ออกมาน้อยลงได้ โครงการวิจัยนี้ทำขึ้นเพื่อศึกษาว่า HDL มีบทบาทอย่างไรในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย HDL ถูกปั่นแยกจากซีรัมของหนูทดลองปกติ และหนูทดลองที่มีการกระตุ้นด้วย LPS จากนั้นนำ HDL มาทดสอบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือไม่ ผลการทดลองพบว่า ทั้ง HDL ปกติและ HDL ที่เกิดขึ้นเมื่อร่างกายถูกกระตุ้น ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งเชื้อกรัมบวกและเชื้อกรัมลบ ที่ความเข้มข้นต่างๆกันและที่ช่วงเวลาต่างๆกัน อย่างไรก็ตาม พบว่า apo A-I ซึ่งเป็นโปรตีนหลักของ HDL มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกรัมกรัมลบ คือ Escherichia coli ได้ แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกรัมกรัมบวก Staphylococcus epidermidis ผลการศึกษานี้ แสดงถึงบทบาทของ apo A-I ในกระบวนการของร่างกายเมื่อมีการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ และควรที่จะมีการศึกษาต่อถึงประโยชน์ของ apo A-I ในสัตว์ทดลองต่อไป

Abstract

HDL is a group of lipoproteins which play an important role in removing excess cholesterol from cells and in preventing oxidation of LDL. During infection and inflammation, there are changes in the composition and function of HDL. During bacterial infection, endotoxin or lipopolysaccharide (LPS) from gram-negative bacteria and lipoteichoic acid (LTA) from gram-positive bacteria can induce cytokine release causing septic shock in infected patients. Previous studies have shown that HDL, as part of innate immunity, can bind both LPS and LTA and ameliorate their toxic effects, resulting in decreased cytokine release. This study was performed to examine the effect of HDL on the growth of bacteria. HDL was isolated from sera of normal hamsters and LPS-injected hamsters, and subsequently incubated with bacteria to assess bacterial growth. The results show that both normal HDL and acute-phase HDL (from LPS-injected animals) could not inhibit the growth of either gram-negative or gram-positive bacteria. Similarly, apo HDL, the protein portion of HDL, could not inhibit the growth, whereas apolipoprotein A-I (apo A-I), the main protein of HDL, significantly inhibited the growth of gram-negative Escherichia coli, but not gram-positive Staphylococcus epidermidis. Our result suggests an important role of apo A-I in the host defense against gram-negative bacterial infection. Further study in in vivo models is warranted.

Executive Summary

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ high-density lipoproteins ในภาวะตอบสนอง acute-phase

วีรพันธุ์ โชควิฑูรกิจ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคติดเชื้อจากแบคทีเรียเป็นโรคที่พบบ่อย และเป็นสาเหตุสำคัญอันดับต้นๆของการตายของผู้ป่วยในโรงพยาบาล ยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน สามารถรักษาการติดเชื้อจากแบคทีเรียได้ส่วนหนึ่ง แต่เมื่อใช้ในระยะยาว เชื้อแบคทีเรียจะเกิดการดื้อยา ทำให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะนั้นไม่ได้ผล การคิดค้นหายาปฏิชีวนะกลุ่มใหม่หรือสารใหม่ๆที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการรักษาการติดเชื้อดังกล่าว

ในระหว่างที่ร่างกายมีการติดเชื้อแบคทีเรีย ร่างกายมีการตอบสนองที่เรียกรวมว่า acute-phase response ซึ่งช่วยป้องกันร่างกายไม่ให้มีการบาดเจ็บเพิ่มขึ้น และช่วยในกระบวนการซ่อมแซมของร่างกาย [1] ปฏิกิริยาตอบสนองนี้เห็นได้จากการที่มีการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีนที่เป็น acute-phase reactant ในเลือด เช่น C-reactive protein, fibrinogen และ serum amyloid A ในขณะเดียวกัน ระดับไขมันในเลือดมีการเปลี่ยนแปลงในหลายๆด้าน เช่น มีการเพิ่มขึ้นของระดับไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) และ การลดลงของคอเลสเตอรอล (cholesterol) [2] การเปลี่ยนแปลงทางไขมันดังกล่าวจะมีผลดีต่อร่างกายโดยรวมอย่างไร ยังไม่เป็นที่ทราบอย่างแน่ชัด

ไขมันชนิดต่างๆที่อยู่ในเลือดนั้น เกาะรวมกลุ่มอยู่กับโปรตีนในรูปของ lipoproteins ซึ่งเป็นอนุภาคขนาดเล็ก Lipoproteins สามารถแบ่งออกได้เป็นหลายประเภทตามความหนาแน่น (density) และโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบหลัก Very low-density lipoprotein (VLDL) และ Low-density lipoprotein (LDL) ซึ่งมี apolipoprotein B-100 เป็นโปรตีนสำคัญ ทำหน้าที่ลำเลียงกรดไขมันและคอเลสเตอรอลไปยังเนื้อเยื่อ เพื่อใช้เป็นพลังงานและส่วนประกอบของผนังเซลล์ สำหรับ High-density lipoproteins หรือ HDL นั้น มีขนาดเล็กกว่า แต่มีความหนาแน่นมากกว่า VLDL และ LDL ไขมันที่เป็นส่วนประกอบหลักของ HDL คือ คอเลสเตอรอลและฟอสโฟลิปิด สำหรับไตรกลีเซอไรด์นั้นมีเป็นส่วนน้อย โปรตีนที่พบบน HDL มีมากกว่า 30 ชนิด ซึ่งโปรตีนแต่ละชนิดมีหน้าที่ต่างๆกันไป โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบสำคัญและเป็นโครงสร้างหลักของ HDL คือ apolipoprotein A-I หรือ apo A-I

การศึกษาทางระบาดวิทยา และการวิจัยทางคลินิก แสดงให้เห็นว่า ระดับของ lipoproteins ชนิดต่างๆ มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) [3] โดยที่ ระดับ LDL ที่สูง

และระดับ HDL ที่ต่ำเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็ง ผลของการศึกษาวิจัยสนับสนุนสมมติฐานที่เชื่อว่า HDL ป้องกันโรคหลอดเลือดแดงแข็งได้ โดยการนำคอเลสเตอรอลส่วนเกินออกจากเซลล์เพื่อขับออกจากร่างกาย [4]

ในระหว่างที่ร่างกายมีการติดเชื้อ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับไตรกลีเซอไรด์ จากการเพิ่มการสร้าง VLDL จากตับ และ มีการลดลงของระดับ LDL และ HDL cholesterol [2] นอกจากนี้ส่วนประกอบของ lipoproteins ยังมีการเปลี่ยนแปลงไปทั้งในส่วนของไขมันและโปรตีน การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ยังผลให้หน้าที่การทำงานของ lipoproteins เปลี่ยนแปลงไปด้วย

งานวิจัยของข้าพเจ้าในช่วง 3-4 ปีที่ผ่านมา ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของ HDL ในระหว่างที่ร่างกายมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อการติดเชื้อ โดยฉีด endotoxin เข้าไปในหนูทดลอง (Syrian hamsters) เพื่อกระตุ้นให้เกิด acute-phase response แล้วทำการปั่นแยก HDL ออกมา งานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า HDL ซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างที่ร่างกายมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อการติดเชื้อ ที่เรียกกันว่า acute-phase HDL นั้น มีส่วนประกอบที่แตกต่างจาก HDL ปกติ ทั้งในด้านของไขมันและโปรตีน การเปลี่ยนแปลงในส่วนประกอบของ acute-phase HDL นี้ ยังผลให้หน้าที่การทำงานของ acute-phase HDL แตกต่างไปจาก HDL ปกติด้วย [5] ดังจะเห็นได้จากการที่ acute-phase HDL มีความบกพร่องในการลำเลียงคอเลสเตอรอลออกมาภายนอกเซลล์ อันเนื่องจากการลดลงของเอนไซม์ lecithin:cholesterol acyltransferase ใน acute-phase HDL [5] การเปลี่ยนแปลงนี้อาจมีผลต่อการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งในระยะยาว อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงของ HDL ในระหว่างที่ร่างกายมีการติดเชื้อ จะมีผลต่อร่างกายในด้านอื่นๆอย่างไร ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

นอกเหนือไปจากหน้าที่ของ HDL ในการลำเลียงคอเลสเตอรอลส่วนเกินออกจากเซลล์แล้ว HDL ยังมีคุณสมบัติอื่นๆที่บ่งชี้ว่ามีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันสืบทอด (innate immunity) ด้วย การศึกษาวิจัยทั้งนอกร่างกาย (in vitro) และในสัตว์ทดลอง พบว่า HDL มีบทบาทในการจับกับ endotoxin (หรือ lipopolysaccharide-LPS) จากเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ และ lipoteichoic acid (LTA) ของเชื้อแบคทีเรียกรัมบวก รวมทั้ง สามารถลดพิษของทั้ง endotoxin และ lipoteichoic acid ได้ [6-18] การศึกษาเพิ่มเติม พบว่า endotoxin ที่จับอยู่กับ HDL นี้ มีฤทธิ์ลดลงกว่า endotoxin ในภาวะอิสระ [6-16] การใช้ HDL สังเคราะห์ในผู้ป่วย endotoxemia พบว่าสามารถลดการหลั่ง cytokines และลดอาการของผู้ป่วยได้เช่นกัน [19]

นอกจากผลของ HDL ที่มีต่อ endotoxin แล้ว การศึกษาจากประเทศญี่ปุ่น พบว่าในภาวะปกติ HDL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย Staphylococcus epidermidis ภายนอกร่างกายได้ [20] หลังจากที่มีการตีพิมพ์ผลงานดังกล่าว ยังไม่มีการศึกษาเพิ่มเติมว่า HDL มีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่

ก่อให้เกิดโรคได้หรือไม่ รวมทั้งยังไม่มีการศึกษาว่าส่วนประกอบใดของ HDL ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โครงการวิจัยนี้ได้ทำขึ้นเพื่อศึกษาฤทธิ์ของ HDL ปกติและ acute-phase HDL ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดต่างๆทั้งกรัมบวก และกรัมลบ รวมทั้งจะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อค้นหาส่วนประกอบของ HDL ซึ่งเป็นกลไกในการออกฤทธิ์ดังกล่าว สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ ประกอบไปด้วยเชื้อแบคทีเรียกรัมบวก เช่น Staphylococcus epidermidis และ Staphylococcus aureus และ เชื้อแบคทีเรียกรัมลบ เช่น Escherichia coli และ Pseudomonas aeruginosa เชื้อแบคทีเรียกรัมลบเหล่านี้เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อแบคทีเรียในเลือด (septicemia) และ พบได้บ่อยในทางคลินิก

โครงการศึกษาวิจัยที่เสนอมานี้ จะก่อให้เกิดความรู้ใหม่และความเข้าใจในบทบาทของ HDL ในระบบภูมิคุ้มกันสืบทอด และจะเป็นพื้นฐานในการศึกษาวิจัยต่อเพื่อค้นคว้าและดัดแปลงหาส่วนประกอบของ HDL ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย อันจะก่อให้เกิดประโยชน์ในการนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการออกแบบหาสารที่สามารถรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียต่อไป

2. วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์ที่ 1 : ศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของ acute-phase HDL กับ HDL ในภาวะปกติ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ทั้งกรัมบวก และ กรัมลบ

วัตถุประสงค์ที่ 2 : ศึกษาหาส่วนประกอบของ HDL ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

3. ระเบียบวิธีการวิจัย

<u>สารเคมีที่ใช้</u>

Endotoxin (Lipopolysaccharide) จาก Escherichia coli serotype 055:B5 สั่งมาจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา แบคทีเรียกรัมบวก Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus และแบคทีเรียกรัมลบ Escherichia coli และ Pseudomonas aeruginosa สั่งมาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข อาหารเลี้ยงเชื้อสั่งจากบริษัท Sanofi ประเทศฝรั่งเศส และบริษัท Oxoid ประเทศอังกฤษ การวัดความเข้มข้นของโปรตีน ใช้วิธี modified Lowry assay สารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในการทดลองสั่งมาจากบริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals ประเทศออสเตรเลีย

<u>สัตว์ทดลอง</u>

สัตว์ทดลองที่ใช้สำหรับแยก HDL คือหนู Syrian hamsters เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าเมตะบอลิสมของ HDL ของ Syrian hamster ใกล้เคียงกับของคน และการเปลี่ยนแปลงของ HDL ที่

เกิดขึ้นจากการกระตุ้น acute-phase response ด้วย endotoxin มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง [21-22]
โครงการวิจัยนี้ ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว

Syrian hamsters เพศเมีย อายุ 6-12 สัปดาห์ สั่งมาจากศูนย์สัตว์ทดลอง ศาลายา และเลี้ยงด้วยอาหารและน้ำตามปกติ อย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง หนูกลุ่มหนึ่งได้รับการฉีดด้วย endotoxin ทางหน้าท้อง (intraperitoneal) ในขนาด 100 ไมโครกรัม/100 กรัมของน้ำหนักตัว ส่วนหนูอีกกลุ่มหนึ่งได้รับการฉีดด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ (sterile normal saline solution) หลังจากการฉีดดังกล่าว 16 ชั่วโมง มีการเก็บเลือดของหนูทดลองอย่างปราศจากเชื้อ เพื่อให้ได้ซีรั่ม

<u>การปั่นแยก HDL</u>

Acute-phase HDL และ HDL ปกติ ถูกปั่นแยกโดยวิธี ultracentrifugation จากซีรั่มของหนูทดลองซึ่งได้รับการฉีด endotoxin หรือ น้ำเกลือปราศจากเชื้อ ตามลำดับ Potassium bromide (KBr) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใช้เป็นตัวปรับให้ได้ความหนาแน่นของสารละลายในการปั่นแยกตามต้องการ โดยมีการปั่นแยกเอา VLDL และ LDL ออกจากซีรั่มออกไปก่อน จากนั้น ในการปั่นแยก HDL ใช้เครื่อง L8-70M ultracentrifuge ของบริษัท Beckman โดยปั่นที่ 100,000 g ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง HDL ที่ได้ถูกนำมาเปลี่ยนสารละลาย (dialysis) ในน้ำเกลือปราศจากเชื้อที่ประกอบด้วย 0.01% EDTA ก่อนที่จะนำมาผ่าน filter ขนาด 0.45 ไมครอนและใช้ในการทดลองภายใน 2 สัปดาห์ ระหว่างการปั่นแยก HDL ได้ใช้วิธีการที่ปราศจากเชื้อ เพื่อไม่ให้มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียหรือ endotoxin ใน HDL ดังกล่าว โดยสารเคมีหรือวัสดุที่ใช้ในการปั่นแยก HDL ถูกทำให้ปราศจากเชื้อด้วย autoclave ถ้าไม่ได้ในรูปที่ปราศจากเชื้อมาก่อน[23]

<u>การสกัด apoHDL</u>

Apo HDL คือ HDL ที่มีเฉพาะโปรตีน แต่ไม่มีไขมันเป็นส่วนประกอบ การสกัด apo HDL ทำได้โดยใช้ ethanol และ ether [24]

<u>การสกัด apo A-I</u>

Apo A-I เป็นโปรตีนหลักของ HDL ในการสกัด apo A-I ออกมาจาก HDL นั้น ทำโดยใช้ HDL ที่แยกได้มาผ่าน SDS gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย copper staining เพื่อให้ได้ apo A-I band จากนั้นจึงตัดเอา apo A-I band ออกมา หั่น gel เป็นชิ้นเล็กๆ และนำมาแยกโปรตีน apo A-I ออกจาก gel ด้วยวิธี electroelution ด้วยเครื่อง electroeluter ของบริษัท Bio-Rad จากนั้น apo A-I ที่ได้ถูกนำมาละลายใน 1X phosphate buffered saline และวัดความเข้มข้น [25]

<u>การทดลองเกี่ยวกับแบคทีเรีย</u>

แบคทีเรียที่ได้มา ถูกนำมาเลี้ยงเป็น stock และเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส ในแต่ละการทดลองจะนำแบคทีเรียที่เก็บไว้นี้มาทำการทดลอง เพื่อให้ได้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกการทดลอง

HDL, apo HDL หรือ apo A-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ จะถูกนำไป incubate กับ liquid cultures ของเชื้อแบคทีเรีย การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจะถูกประเมินที่ระยะเวลาต่างๆกัน ตั้งแต่ 0 ถึง 24 ชั่วโมง การประเมินการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียนั้น กระทำโดยการเจือจางเชื้อและเพาะลงในจานเพาะเชื้อ จำนวน colony ของแบคทีเรียที่ขึ้นจะบ่งถึงจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่มีใน liquid cultures

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

ในช่วง 6 เดือนแรก ได้ดำเนินการพัฒนาวิธีการทดลองทางห้องปฏิบัติการเพื่อปรับสภาพการทดลองให้เหมาะสม ระหว่างนั้นได้สั่งสัตว์ทดลอง โดยใช้สัตว์ทดลองประมาณ 6 ชุดๆละ 12 ตัว ในระยะเวลา 2 ปีที่ทำการวิจัย

ปีที่ 1 (6 เดือนหลัง)

สัตว์ทดลองชุดที่ 1 และ 2: ทำการศึกษา dose response และ time course ของการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของ HDL ทั้ง Acute-phase HDL และ HDL ปกติ

สัตว์ทดลองชุดที่ 3 และ 4: ทำการศึกษาเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคชนิดต่างๆ ทั้งกรัมบวก และกรัมลบ โดย Acute-phase HDL และ HDL ปกติ

ปีที่ 2

สัตว์ทดลองชุดที่ 5: เปรียบเทียบระหว่าง HDL กับ apo HDL (HDL ที่สกัดเอาไขมันออก)

สัตว์ทดลองชุดที่ 6: ทำการศึกษา dose response และ time course ของการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของ apo A-I

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี

ปีที่ 1: ชื่อเรื่องที่ตีพิมพ์ Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host

ชื่อวารสารที่ตีพิมพ์ Journal of lipid research (Impact factor 4.139)

ปีที่ 2: ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ Antibacterial activity of native and recontituted high-density lipoprotein: modulation by types of phospholipids and apolipoproteins

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ Journal of lipid research (Impact factor 4.139), Atherosclerosis (Impact factor 3.469), หรือ Lipids (Impact factor 2.117)

6. งบประมาณโครงการ

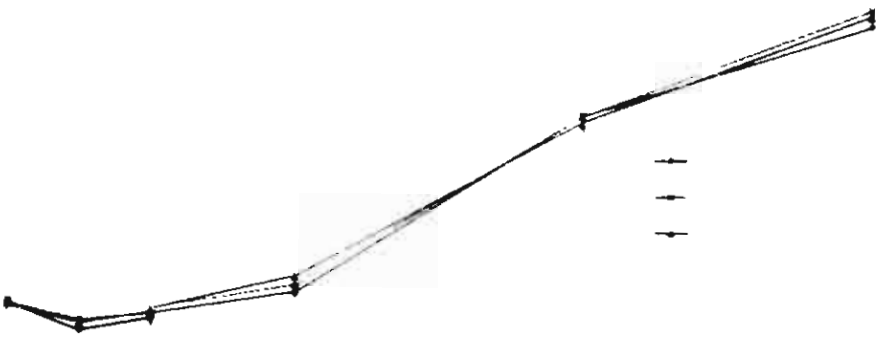
	ปีที่ 1	ปีที่ 2	รวม
1. หมวดค่าตอบแทน			
- ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ	120,000	120,000	240,000
2. **หมวดค่าวัสดุ**			
- ค่าวัสดุสารเคมี	55,000	67,000	122,000
- ค่าชุดวัดระดับไขมันและโปรตีน	20,000	20,000	40,000
- ค่าสัตว์ทดลอง	24,000	12,000	36,000
- ค่าเชื้อแบคทีเรีย	2,000	2,000	4,000
- ค่าหลอดและจานเพาะเชื้อ	3,000	3,000	6,000
- ค่าสารอาหารเพาะเชื้อ	10,000	10,000	20,000
3. หมวดค่าใช้สอย			
- ค่าจ้างเหมาบริการ	6,000	6,000	12,000
รวมงบประมาณโครงการ	240,000	240,000	480,000

ผลการทดลอง

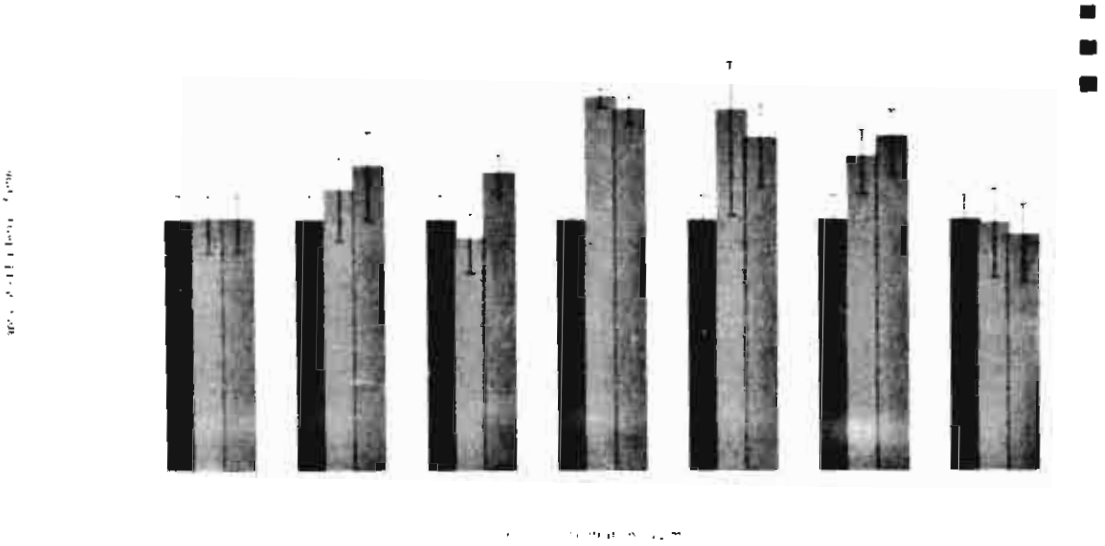
HDL กับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ

ผลการทดลองแสดงว่า HDL ปกติที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0- 1,670 ไมโครกรัม มิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย Escherichia coli ได้อย่างมีนัยสำคัญ ที่ช่วงเวลาต่างๆกัน ตั้งแต่ 0.5, 1, 2, 4, 6 และ 24 ชั่วโมง ในทางตรงกันข้าม acute-phase HDL ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย Escherichia coli ได้เช่นเดียวกับรูปที่ 1 และ 2) สามารถยับยั้งความเข้มข้นของ HDL ที่ใช้นี้อยู่ในช่วง physiologic range ที่จะพบได้ใน interstitial fluid และที่อยู่ในกระแสเลือด

ในการทดลอง Escherichia coli ดังกล่าวได้ทำการทดลองในเชื้อแบคทีเรียกรัมลบอีกชนิดหนึ่ง คือ Pseudomonas aeruginosa ผลการทดลองที่ได้ไม่ต่างจากการทดลอง Escherichia coli ดังแสดงในรูป



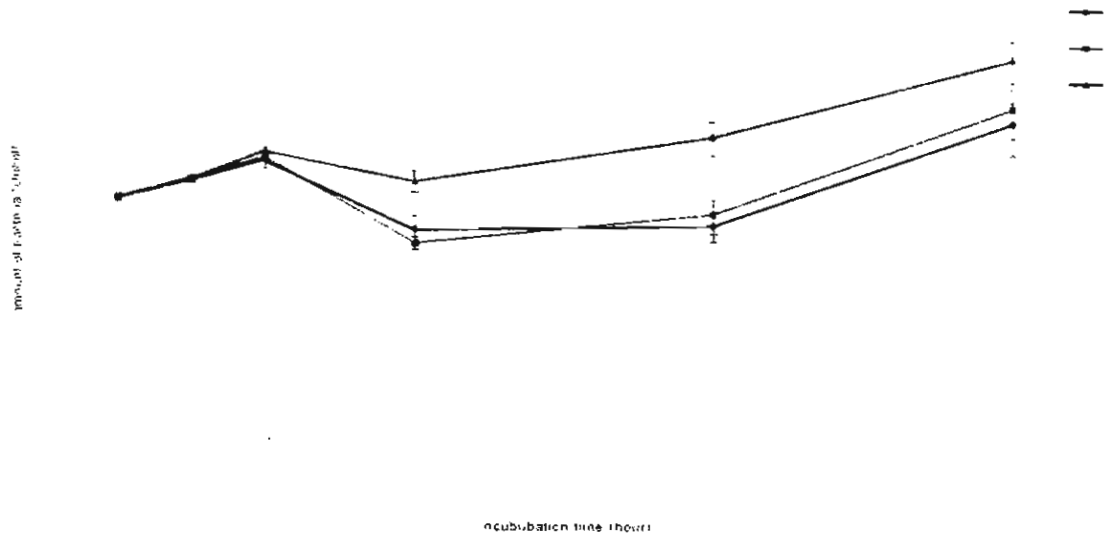
รูปที่ 1 Effect of HDL (500ug/ml) on the growth of E.coli at various timepoints



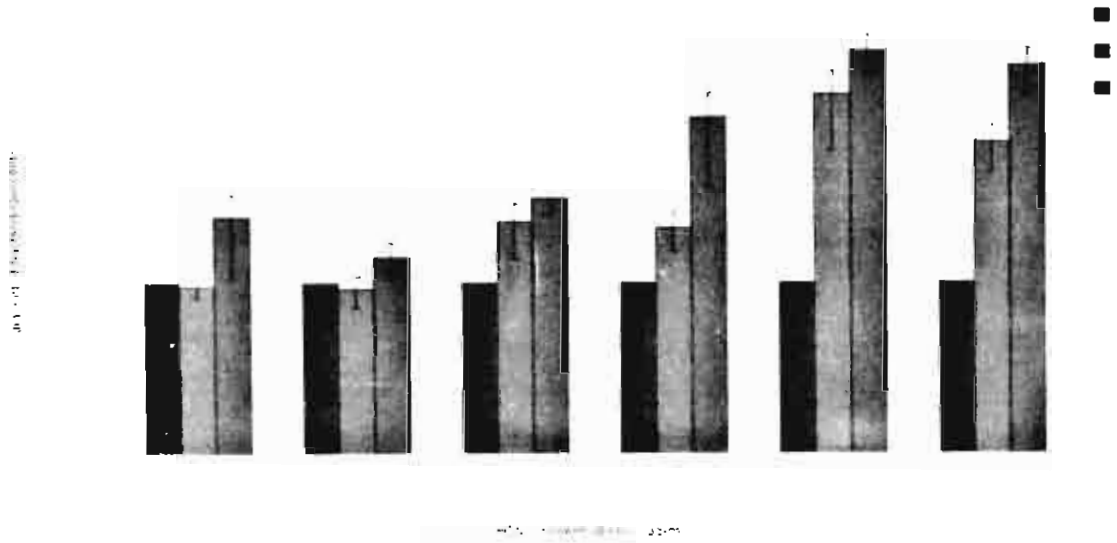
รูปที่ 2. Effect of [illegible] concentrations of HDL on E. coli growth at incubation time [illegible] h

HDL กับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกรัมบวก

ผลการทดลองในเชื้อแบคทีเรียกรัมบวก ทั้ง Staphylococcus epidermidis และ Staphylococcus aureus พบว่าผลที่ได้คล้ายคลึงกับผลที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ นั่นคือ ทั้ง HDL ปกติ และ acute-phase HDL ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้ ในช่วงความเข้มข้นของ HDL ต่างกัน และในช่วงเวลาต่างกัน (รูปที่ 3 และ 4)



รูปที่ 3. Effect of 200ug/ml protein of HDL on S epidermidis growth at various timepoints



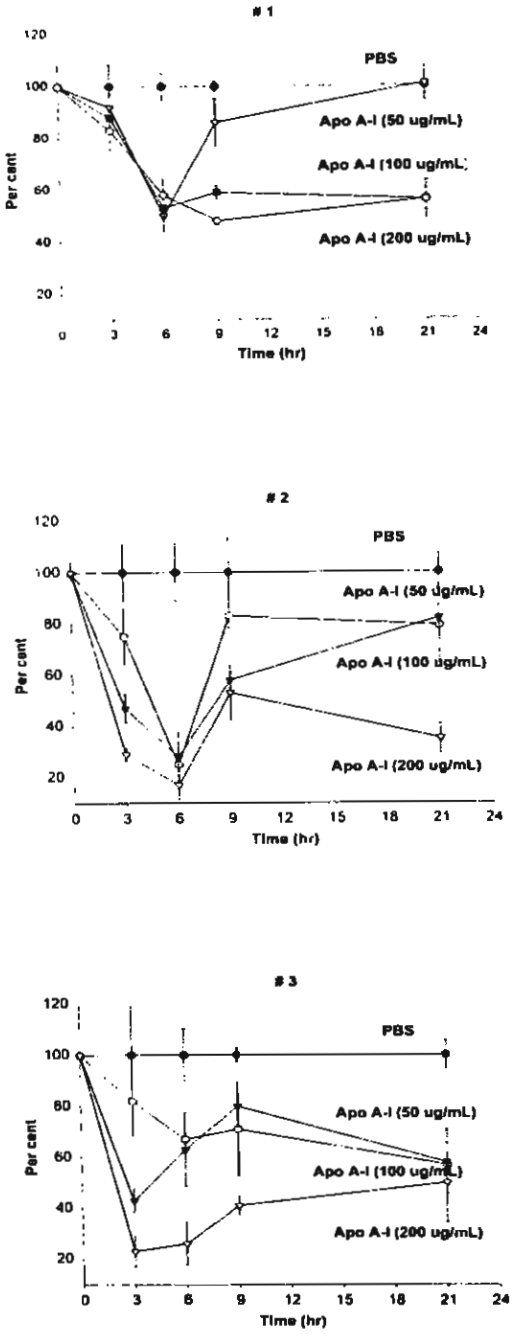
รูปที่ 4 Effect of various concentrations of HDL on S epidermidis growth

Apo HDL กับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

เนื่องจาก HDL ประกอบด้วยส่วนที่เป็นไขมันและโปรตีนรวมกัน การทดลองพบว่า HDL ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ อาจเป็นจากการที่เชื้อแบคทีเรียนำไขมันใน HDL ไปใช้ ซึ่งมีรายงานว่าสารอาหารจากไขมันชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากไตรกลีเซอไรด์ สามารถส่งเสริมการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ [ ] จึงมีการสกัดเอาส่วนที่เป็นไขมันของ HDL ออก เพื่อให้เหลือเฉพาะส่วนที่เป็นโปรตีนที่เรียกว่า apo HDL แล้วนำมาทดสอบ อย่างไรก็ตาม พบว่า apo HDL ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งกรัมลบและกรัมบวกได้เช่นกัน (data not shown)

Apo A-I กับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

เพื่อศึกษาว่า apo A-I ซึ่งเป็นโปรตีนหลักของ HDL มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือไม่ ได้มีการแยก apo A-I ออกมาจาก HDL มาทำการศึกษา พบว่า apo A-I ที่ความเข้มข้น 100 – 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรัมลบ Escherichia coli ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ 6 และ 9 ชั่วโมง (รูปที่ 5) แต่ไม่มีผลชัดเจนต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรัมบวก Staphylococcus epidermidis (data not shown)



รูปที่ 5. Effect of apo A-I on the growth of Escherichia coli at various time points (These 3 graphs represent 3 different experiments)

วิจารณ์ผล

ผลที่ได้จากการศึกษานี้ พบว่า HDL ทั้ง HDL ปกติ และ acute-phase HDL ไม่ได้มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งกรัมลบและกรัมบวก ซึ่งผลดังกล่าวนี้แตกต่างจากผลการศึกษาของ Tada et al. ที่พบว่า HDL ปกติ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ Staphylococcus epidermidis ได้ [20] สาเหตุของความแตกต่างนี้ คาดว่าเกิดจากการที่ Tada et al. ใช้ phosphate-buffered saline (PBS) ในการเพาะเชื้อ ในขณะที่การทดลองนี้ใช้ Tryptic soy broth ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ในการใช้ PBS เพาะเลี้ยงเชื้อนั้น พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานจึงใช้ Tryptic soy broth เพื่อการเจริญเติบโต

HDL พบอยู่ในทั้งในกระแสเลือด และใน interstitial space ความเข้มข้นของ HDL ในกระแสเลือด พบว่าสูงกว่าใน interstitial fluid ประมาณ 10 เท่า การศึกษานี้ ใช้ความเข้มข้นของ HDL อยู่ในช่วง physiologic range ซึ่งรวมความเข้มข้นที่พบใน interstitial space (~ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ ในเลือด(~ 1,670 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แล้ว อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ไม่ได้ใช้ความเข้มข้นที่เป็น supraphysiologic dose เนื่องจากถูกจำกัดด้วยปริมาณของ HDL ที่แยกออกมาได้

ใน HDL มีโปรตีนหลายชนิดที่พบว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อโรค Lipopolysaccharide binding protein (LBP) เป็นโปรตีนตัวหนึ่งของ HDL ที่พบว่าเมื่อฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลอง สามารถลดอัตราการตายเมื่อสัตว์ทดลองนั้นกระตุ้นให้เกิดการติดเชื้อด้วยการฉีดแบคทีเรียเข้าไป [28] นอกจากนี้ HDL ยังมีโปรตีนอีกตัวหนึ่งที่เรียกว่า Parotid secretory protein (PSP) ซึ่งพบว่ามีบทบาทยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา Candida albicans ได้ [25]

Apo A-I เป็นโปรตีนอีกตัวหนึ่งของ HDL ซึ่งเป็นโปรตีนหลักที่มีปริมาณมากที่สุดใน HDL และเป็นโครงสร้างของ HDL ด้วย แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาผลของ apo A-I ต่อเชื้อแบคทีเรียมาก่อน การศึกษานี้ พบว่า HDL ซึ่งมี apo A-I อยู่ร่วมกับโปรตีนและไขมันอื่นๆอีกหลายชนิด ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ในขณะที่ apo A-I อย่างเดียว สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรัมลบได้ ซึ่งความเข้มข้นของ apo A-I ที่ใช้ในการทดลองนี้ (50 – 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) อยู่ในช่วงที่พบได้ในกระแสเลือด สำหรับสาเหตุของความแตกต่างระหว่าง HDL กับ apo A-I ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียนั้น ยังไม่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตาม เป็นที่ทราบกันดีว่า apo A-I ที่อยู่ในสภาพอิสระ (free form) มี conformation ของโปรตีนที่ต่างไปจาก apo A-I ที่อยู่รวมกับไขมันอื่นๆ ใน HDL ซึ่ง conformation ที่ต่างกันนี้ อาจมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โปรตีน apo A-I มีโครงสร้างที่เป็น amphipathic helices ซึ่งใช้เป็นส่วนที่ associate อยู่กับไขมันต่างๆใน HDL ส่วน

ของ amphipathic helices ของ apo A-I นี้อาจถูกบดบังด้วยไขมันใน HDL ทำให้ไม่สามารถไป associate กับ LPS ในแบคทีเรียได้ แต่เมื่อ apo A-I อยู่ในสภาพอิสระ จึงมี amphipathic helices ที่สามารถไปจับกับ LPS ในแบคทีเรียและส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตได้ มีการศึกษาที่พบว่า apo L-I ซึ่งเป็นโปรตีนอีกตัวหนึ่งของ HDL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ trypanosome ได้ โดยใช้ส่วนที่เป็น amphipathic helix ในการจับกับโปรตีนของเชื้อ trypanosome [29]

เป็นที่น่าสังเกตว่า มีหลายการศึกษาที่บ่งว่า apo A-I เป็นโปรตีนที่มีส่วนในการลดพิษของ LPS [11-13] โดยพบว่า LPS ที่ incubate กับ apo A-I in vitro สามารถลดการเกิดไข้ที่เกิดจาก LPS ได้เมื่อฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลอง [11] สำหรับ in vivo พบว่าหนูทดลองที่มีการแสดงออกของ apo A-I มากกว่าปกติ (transgenic mice overexpressing apo A-I) มีโอกาสรอดชีวิตหลังจากฉีด LPS เข้าไปในร่างกายมากขึ้นกว่าหนูทดลองปกติ [13] การศึกษาที่ผ่านมาทั้งหมด เป็นการศึกษาระหว่าง apo A-I กับ LPS ของแบคทีเรีย แต่การศึกษานี้ *เป็นการศึกษาแรก* ที่พบว่า apo A-I มีผลต่อ*แบคทีเรีย*โดยตรง โดยมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ สำหรับผลของ apo A-I ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกรัมบวกนั้น ได้ผลไม่ชัดเจน ซึ่งอาจเป็นจากลักษณะส่วนประกอบที่ต่างกันระหว่าง LPS ของเชื้อแบคทีเรียกรัมลบกับ LTA ของเชื้อแบคทีเรียกรัมบวก

โดยสรุป การศึกษานี้พบว่า apo A-I สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกรัมลบในหลอดทดลองได้ ในขณะที่ HDL ไม่มีฤทธิ์ดังกล่าว จึงสมควรที่จะมีการศึกษาเพิ่มเติมของฤทธิ์ของ apo A-I ในสัตว์ทดลอง รวมทั้งค้นคว้าหากลไกการออกฤทธิ์ต่อไป

สรุป

แม้ว่า HDL จะสามารถลดพิษของ LPS และ LTA จากแบคทีเรียได้ ผลการศึกษานี้ พบว่า HDL ทั้งในภาวะปกติและภาวะที่มีการกระตุ้น ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม apo A-I ซึ่งเป็นโปรตีนหลักของ HDL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรัมลบได้ จึงควรที่จะมีการค้นคว้าวิจัยเพิ่มเติมในสัตว์ทดลอง รวมทั้งกลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Gabay, C., and I. Kushner. 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* **340**: 448-454.

2. Khovidhunkit, W., R. A. Memon, K. R. Feingold, and C. Grunfeld. 2000. Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J. Infect. Dis.* **181**: S462-S472.

3. Lusis, A.J. 2000. Atherosclerosis. *Nature.* **407**: 233-241.

4. Fielding, C.J., and P. E. Fielding. 1995. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* **36**: 211-228.

5. Khovidhunkit, W., J. K. Shigenaga, A. H. Moser, K. R. Feingold, and C. Grunfeld. 2001. Cholesterol efflux by acute-phase high-density lipoprotein: role of lecithin:cholesterol acyltransferase. *J. Lipid Res.* **42**: 967-975.

6. Ulevitch, R.J., A.R. Johnston, and D.B. Weinstein. 1979. New function for high density lipoproteins: their participation in intravascular reactions of bacterial lipopolysaccharides. *J. Clin. Invest.* **64**: 1516-1524.

7. Ulevitch, R.J., A.R. Johnston, and D.B. Weinstein. 1981. New function for high density lipoproteins: isolation and characterization of a bacterial lipopolysaccharide-high density lipoprotein complex formed in rabbit plasma. *J. Clin. Invest.* **67**; 827-837.

8. Munford, R.S., C.L. Hall, and J.M. Dietschy. 1981. Binding of Salmonella typhimurium lipopolysaccharides to rat high-density lipoproteins. *Infect. Immun.* **34**: 835-843.

9. Cavaillon, J.-M., C. Fitting, N. Haeffner-Cavaillon, S. J. Kirsch, and H. S. Warren. 1990. Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **58**: 2375-2382.

10. Baumberger, C., R. J. Ulevitch, and J.-M. Dayer. 1991. Modulation of endotoxic activity of lipopolysaccharide by high-density lipoprotein. *Pathobiology.* **59**: 378-383.

11. Emancipator, K., G. Csako, and R. J. Elin. 1992. In vitro inactivation of bacterial endotoxin by human lipoproteins and apolipoproteins. *Infect. Immun.* **60**: 596-601.

12. Flegel, W. A., M. W. Baumstark, C. Weinstock, A. Berg, and H. Northhoff. 1993. Prevention of endotoxin-induced monokine release by human low- and high-density lipoproteins and by apolipoprotein A-I. *Infect. Immun.* **61**: 5140-5146.

13. Levine, D.M., T. S. Parker, T.M. Donnelly, A. Walsh, and A.L. Rubin. 1993. In vivo protection against endotoxin by plasma high-density lipoprotein. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 12040-12044.

14. Parker, T. S. D. M. Levine, J. C. C. Chang, J. Baxter, C. C. Coffin, and A. L. Rubin. 1995. Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood. *Infect. Immun.* **63**: 253-258.

15. Hubsch, A. P. A. T. Casas, and J. E. Doran. 1995. Protective effects of reconstituted high-density lipoprotein in rabbit gram-negative bacteremia models. *J. Lab. Clin. Med.* **126**: 548-558.

16. Levels, J. H. M., P. R. Abraham, A. Van den Ende, and S. J. H. Van Deventer. 2001. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin. *Infect. Immun.* **69**: 2821-2828.

17. Grunfeld, C., M. Marshall M, J.K. Shigenaga, A.H. Moser, P. Tobias, K. R. Feingold. 1999. Lipoproteins inhibit macrophage activation by lipoteichoic acid. *J Lipid Res.* **40**: 245-252.

18. Levels, J.H., P.R. Abraham, E.P. van Barreveld, J.C. Meijers, S.J. van Deventer. 2003. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound lipoteichoic acid. *Infect Immun.* **71**: 3280-3284.

19. Pajkrt, D., J. E. Doran, F. Koster, P. G. Lerch, B. Arnet, T. van der Poll, J. W. ten Cate, and S. J. van Deventer. 1996. Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *J. Exp. Med.* **184**: 1601-1608.

20. Tada, N., T. Sakamoto, A. Kagami, K. Mochizuki, and K. Kurosaka. 1993. Antimicrobial activity of lipoprotein particles containing apolipoprotein A-I. *Mol. Cell. Biochem.* **119**: 171-178.

21. Wollett, L.A., D.K. Spady. 1997. Kinetic parameters for high density lipoprotein apoprotein AI and cholesteryl ester transport in the hamster. *J. Clin. Invest.* **99**: 1704-1713.

22. Feingold, K.R., I. Hardardottir, R. Memon, et al. 1993. Effect of endotoxin on cholesterol biosynthesis and distribution in serum lipoproteins in Syrian hamsters. *J. Lipid Res.* **34**: 2147-2158.

23. Khovidhunkit, W., J.K. Shigenaga, A.H. Moser, K.R. Feingold, C. Grunfeld. 2001. Cholesterol Efflux by Acute Phase High Density Lipoprotein: Role of Lecithin:cholesterol Acyltransferase. *J. Lipid Res.* **42**: 967-75.

24. Bergeron, N., L. Kotite, R.J. Havel. 1996. Simultaneous quantification of apolipoproteins B-100, B-48, and E separated by SDS-PAGE. *Methods Enzymol.* **263**: 82-94.

25. Khovidhunkit, W., J.P. Hachem, K.F. Medzihradszky, P.N. Duchateau, J.K. Shigenaga,

A.H. Moser, I. Movsesyan, J. Naya-Vigne, J.P. Kane, K.R. Feingold, C. Grunfeld. Parotid secretory protein is an HDL-associated protein with anticandidal activity. 2005. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **288**: R1306-R1315.

26. Deitel, M., V.M. Kaminsky, M. Fuksa. Growth of common bacteria and Candida albicans in 10% soybean oil emulsion. 1975. *Can. J. Surg.* **18**: 531-535.

27. Melly, M.A., H.C. Meng, W. Schaffner. Microbial growth in lipid emulsions used in parenteral nutrition. 1975. *Arch. Surg.* **110**: 1479-1481.

28. Lamping, N., R. Dettmer, N.W. Schroder, D. Pfeil, W. Hallatschek, R. Burger, R.R. Schumann. LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. 1998. *J Clin Invest.* **101**: 2065-2071.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. การเสนอผลงานโปสเตอร์ในการประชุม "นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. 2548" วันที่ 14-16 มกราคม 2548 โรงแรมฟีลิกซ์ ริเวอร์แคว กาญจนบุรี

2. Manuscript อยู่ในระหว่างการจัดทำ เรื่อง "Effect of apo A-I and HDL on bacterial growth"

3. **Khovidhunkit W**, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. Effects of Infection and Inflammation on Lipid and Lipoprotein Metabolism: Mechanisms and Consequences to the Host. *Journal of Lipid Research*. 2004;45:1169-96. Impact factor 4.159

ภาคผนวก

Reprint บทความเรื่อง "Effects of Infection and Inflammation on Lipid and Lipoprotein Metabolism: Mechanisms and Consequences to the Host" ในวารสาร Journal of Lipid Research. ปี ค.ศ. 2004 volume 45 หน้า 1169-96. Impact factor 4.159

thematic review

Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis

Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host[1]

Weerapan Khovidhunkit,* Min-Sun Kim,† Riaz A. Memon,[1,†] Judy K. Shigenaga,† Arthur H. Moser,† Kenneth R. Feingold,[2,†] and Carl Grunfeld[2,†]

Division of Endocrinology and Metabolism,* Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand; and Department of Medicine,† University of California, San Francisco, and Metabolism Section, Medical Service, Department of Veterans Affairs Medical Center, San Francisco, CA

Abstract Infection and inflammation induce the acute-phase response (APR), leading to multiple alterations in lipid and lipoprotein metabolism. Plasma triglyceride levels increase from increased VLDL secretion as a result of adipose tissue lipolysis, increased de novo hepatic fatty acid synthesis, and suppression of fatty acid oxidation. With more severe infection, VLDL clearance decreases secondary to decreased lipoprotein lipase and apolipoprotein E in VLDL. In rodents, hypercholesterolemia occurs attributable to increased hepatic cholesterol synthesis and decreased LDL clearance, conversion of cholesterol to bile acids, and secretion of cholesterol into the bile. Marked alterations in proteins important in HDL metabolism lead to decreased reverse cholesterol transport and increased cholesterol delivery to immune cells. Oxidation of LDL and VLDL increases, whereas HDL becomes a proinflammatory molecule. Lipoproteins become enriched in ceramide, glucosylceramide, and sphingomyelin, enhancing uptake by macrophages. Thus, many of the changes in lipoproteins are proatherogenic. The molecular mechanisms underlying the decrease in many of the proteins during the APR involve coordinated decreases in several nuclear hormone receptors, including peroxisome proliferator-activated receptor, liver X receptor, farnesoid X receptor, and retinoid X receptor. APR-induced alterations initially protect the host from the harmful effects of bacteria, viruses, and parasites. However, if prolonged, these changes in the structure and function of lipoproteins will contribute to atherogenesis. Khovidhunkit, W., M-S. Kim, R. A. Memon, J. K. Shigenaga, A. H. Moser, K. R. Feingold, and C. Grunfeld. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J. Lipid Res.* 2004. 45: 1169–1196.

Supplementary key words acute-phase response • endotoxin • lipopolysaccharide • cytokine • atherosclerosis

Manuscript received 25 November 2003. Accepted in revised form 12 March 2004.

Published, *JLR Papers in Press*, April 21, 2004.
DOI 10.1194/jlr.R300019-JLR200

The acute-phase response (APR), an early, highly complex reaction of the host, is induced by injurious stimuli including infection and inflammation, trauma, burns, ischemic necrosis, and malignant growth (1). The APR is

Abbreviations: ABC, ATP binding cassette; ACC, acetyl CoA carboxylase; ACS, acyl-CoA synthetase; AIDS, acquired immune deficiency syndrome; AP2, adipocyte P2; apoE, apolipoprotein E; APR, acute-phase response; BSEP, bile salt export pump; CAD, coronary artery disease; CAR, constitutive androstane receptor; CETP, cholesteryl ester transfer protein; CNTF, ciliary neurotropic factor; CPT, carnitine palmitoyl transferase; CRP, C-reactive protein; CYP7A1, cholesterol 7α-hydroxylase; CYP7B1, oxysterol 7α-hydroxylase; CYP8B1, sterol 12α hydroxylase; CYP27A1, sterol 27-hydroxylase; DR, direct repeat; ERK, extracellular signal-related kinase; EL, endothelial lipase; FABP, fatty acid binding protein; FAS, fatty acid synthase; FAT, fatty acid translocase; FATP, fatty acid transport protein; FXR, farnesoid X receptor; GlcCer, glucosylceramide; GSL, glycosphingolipid; HIV, human immunodeficiency virus; HNF, hepatocyte nuclear factor; HSL, hormone-sensitive lipase; IL, interleukin; KB, ketone body; KGF, keratinocyte growth factor; LBP, lipopolysaccharide binding protein; LIF, leukemia inhibitory factor; Lp[a], lipoprotein [a]; LPC, lysophosphatidylcholine; LPL, lipoprotein lipase; LPS, lipopolysaccharide; LRH-1, liver receptor homolog-1; LTA, lipoteichoic acid; LXR, liver X receptor; MDR3, multidrug resistance-3; MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; MRP2, multidrug resistance-associated protein-2; NF-κB, nuclear factor κB; NF-IL-6, nuclear factor interleukin-6; NGF, nerve growth factor; OATP, organic anion transporting protein; oxPAPC, oxidized 1 palmitoyl 2 arachidonoyl sn-glycero 3 phosphorylcholine; PAF, platelet-activating factor; PAF-AH, platelet activating factor acetylhydrolase; PKA, protein kinase A; PLTP, phospholipid transfer protein; PON1, paraoxonase 1; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PTHrP, parathyroid hormone-related protein; PXR, pregnane X receptor; RCT, reverse cholesterol transport; RXR, retinoid X receptor; SAA, serum amyloid A; SHP, small heterodimer partner; sPLA$_2$, secretory phospholipase A$_2$; SPT, serine palmitoyltransferase; SR-BI, scavenger receptor class B type I; TG, triglyceride; TLF, trypanosome lytic factor; TNF, tumor necrosis factor; TR, thyroid hormone receptor.

This paper is dedicated to the memory of Dr. Riaz A. Memon, deceased.

[1] To whom correspondence should be addressed.
e-mail: grunfeld@itsa.ucsf.edu (C.G.)
kfeingold@itsa.ucsf.edu (K.R.F.)

This article is available online at http://www.jlr.org

accompanied by specific changes in the concentration of plasma proteins. Proteins that increase by at least 25% during the APR are positive acute-phase proteins [e.g., C-reactive protein (CRP), serum amyloid A (SAA), and fibrinogen], whereas proteins that decrease are negative acute-phase proteins (e.g., albumin, transferrin, and α-fetoprotein) (1). Changes in acute-phase protein concentrations are largely attributable to alterations in their rate of synthesis in the liver, although similar changes occur in extrahepatic tissues. Microarrays of mouse liver after endotoxin treatment demonstrate that ~7% of the genes respond to endotoxin challenge (2). These changes in acute-phase proteins are often species specific with regard to the magnitude and direction of change.

The APR induced during infection/inflammation protects the host from further injury (1). Changes in acute-phase proteins neutralize invading microorganisms, minimize the extent of tissue damage, participate in the local immune response and tissue regeneration, and replenish proteins used in the inflammatory process. These changes, if present for a prolonged period of time, can lead to detrimental consequences to the host, such as the development of systemic amyloidosis after chronic infection or inflammation.

Changes in acute-phase protein synthesis are mediated by cytokines produced in response to a variety of stimuli in multiple cell types, including macrophages, monocytes, T-lymphocytes, and endothelial cells (1). Key cytokines responsible for the coordination of both immune and inflammatory responses include tumor necrosis factors (TNF-α and TNF-β), interleukins (ILs), and interferons (IFN-α, -β, and -γ) (1). Redundancy classically occurs in essential parts of the host response, as several structurally different cytokines may exert similar biological effects even though they bind to different receptors. Combinations of certain cytokines produce additive or synergistic effects, whereas other cytokines may have inhibitory effects, indicating the complex nature of the host response (3–5).

Infection and inflammation are accompanied by similar cytokine-induced alterations in lipid and lipoprotein metabolism. Of note, inflammatory cytokines are increased and play a pathogenic role in a variety of very common disorders, such as diabetes, obesity, metabolic syndrome, hypertension, chronic heart failure, chronic renal failure, and atherosclerosis (6–12). Many of these disorders display abnormalities in lipid metabolism that are similar to those that occur during infection and inflammation.

This review summarizes the changes in lipid and lipoprotein during infection/inflammation and their molecular mechanisms. Most mechanistic studies were carried out in animal models of infection using endotoxin [lipopolysaccharide (LPS)], a well-characterized inducer of cytokines and the APR, or the proinflammatory cytokines (TNF and IL-1), which mediate the APR. We describe the role of transcription factors in regulating lipid metabolism during infection/inflammation. Finally, we discuss both the beneficial effects and deleterious consequences to the host of APR-induced changes in lipid and lipoprotein metabolism.

CHANGES IN LIPID AND LIPOPROTEIN METABOLISM DURING INFECTION AND INFLAMMATION

An early and consistent metabolic alteration during infection/inflammation is increased serum triglyceride (TG) levels, characterized by an increase in VLDL levels (13). Multiple mechanisms produce hypertriglyceridemia during the APR; several cytokines are capable of producing these changes. Whether an increase in glucocorticoid levels during infection plays a role in lipid metabolism is unclear.

The effects of infection and inflammation on TG metabolism are similar in all species, whereas changes in cholesterol metabolism differ between rodents and primates. In rodents, there is an increase in serum total cholesterol levels and hepatic cholesterol synthesis, whereas nonhuman primates and humans have either no change or a decrease in serum cholesterol and LDL levels (13). The mechanisms underlying this species difference is not known. HDL levels are decreased in both rodents and primates during the APR, and there are marked changes in proteins associated with HDL metabolism (14). Finally, infection produces alterations in the composition and function of lipoproteins, including changes in sphingolipid concentrations, decreased reverse cholesterol transport (RCT), and increased oxidation of lipids.

TG metabolism

Patients with gram-negative or gram-positive bacterial infections and viral infections have increased serum TG levels (15–17). In animals, administration of LPS, a major component of the cell wall of gram-negative bacteria, or lipoteichoic acid (LTA), a component of the cell wall of gram-positive bacteria, produces hypertriglyceridemia (18–28) (**Table 1**). Multiple cytokines increase serum TG levels in rodents and in humans (29–40). The hypertriglyceridemic effect of LPS and cytokines is rapid, occurring within 2 h after administration, and is sustained for at least 24 h (26, 29). The doses of LPS or cytokines that produce hypertriglyceridemia in rodents are similar to those that produce fever, anorexia, and changes in acute-phase protein synthesis, suggesting that hypertriglyceridemia is a very sensitive, physiological part of the host response to infection rather than a manifestation of toxicity (26).

The increased VLDL is secondary to either increased VLDL production or decreased VLDL clearance, depending upon the dose of LPS (26). At low doses, VLDL production increases as a result of increased hepatic FA synthesis, activation of adipose tissue lipolysis, and suppression of FA oxidation and ketogenesis. All of these mechanisms provide more FA substrate in the liver for esterification into TG and secretion as VLDL. At higher doses of LPS, VLDL clearance is decreased as a result of decreases in the activity of lipoprotein lipase (LPL), the enzyme responsible for the catabolism of TG-rich lipoproteins, and decrease in levels of apolipoprotein E (apoE).

Serum TG levels are increased by multiple cytokines, including TNF, IL-1, IL-2, IL-6, leukemia inhibitory factor

TABLE 1. Effects of LPS, LTA, and cytokines on TG metabolism in intact animals

Variable	LPS	LTA	TNF	IL-1	IL-6	IFN-α	IFN-γ
Serum TG	↑	↑	↑	↑	↑	↔	↔
Hepatic FA synthesis	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↔
TG secretion	↑	↑	↑	↑	↑	ND	ND
Lipolysis	↑	↑	↑	↔	↑	↑	↑
FA oxidation	↓	ND	↓	↓	ND	ND	ND
Serum ketone body	↓	ND	↓	↓	↔	↑[a], ↔[b]	↑
TG clearance	↔[a], ↓[b]	↔	↔	↔	↔	ND	ND
LPL activity	↓	↔	↓, ↔[c]	↓	↓	↓	↓

IL, interleukin; LPL, lipoprotein lipase; LPS, lipopolysaccharide; LTA, lipoteichoic acid; ND, not determined; TG, triglyceride; TNF, tumor necrosis factor.

[a] Low doses.

[b] High doses.

[c] Some but not most tissues.

(LIF), ciliary neurotropic factor (CNTF), nerve growth factor (NGF), keratinocyte growth factor (KGF), platelet-activating factor (PAF), and parathyroid hormone-related protein (PTHrP) (30, 32–39, 41–47) (Table 1), suggesting redundancy. IL-4, an anti-inflammatory cytokine, opposes the action of some, but not all, of these cytokines (48). The effects of cytokines on TG metabolism are likely direct and not mediated by hormones such as insulin, cortisol, or catecholamines, as TNF increases serum TG levels in insulinopenic diabetic animals and adrenalectomized rats (49, 50). Moreover, TNF also increases serum TG levels under various dietary conditions from high sucrose, which stimulates endogenous FA synthesis, to high fat, which suppresses endogenous FA synthesis (51, 52).

Increased VLDL production. INCREASED DE NOVO FA AND TG SYNTHESIS. LPS and several cytokines, including TNF-α, TNF-β (lymphotoxin), IL-1, IL-6, IFN-α, LIF, CNTF, NGF, PAF, and PTHrP, rapidly induce de novo FA synthesis and hepatic TG synthesis in rodents (26, 29, 31, 32, 34, 43, 44, 47, 50, 53) (Table 1). Hepatic secretion of apoB also increases (54), resulting in an increased number of VLDL particles secreted. In contrast, other cytokines, such as IL-2, IL-4, and IFN-γ, do not stimulate hepatic FA synthesis (31, 48).

TNF rapidly increases hepatic FA synthesis within 1 h after administration, which is sustained for at least 17 h (29). The time course for stimulation of hepatic FA synthesis and VLDL secretion is consistent with the time course for TNF-induced hypertriglyceridemia (29, 55). However, TNF does not acutely increase the total activity of the rate-limiting enzymes of FA synthesis [i.e., acetyl CoA carboxylase (ACC) and FA synthase (FAS)] or alter the phosphorylation state of ACC, a mechanism that regulates ACC activity (56). Instead, TNF acutely increases intracellular concentrations of citrate, an allosteric activator of ACC (56) (Fig. 1). IL-1 and IL-6 increase hepatic FA synthesis by increasing hepatic citrate levels, whereas IFN-α, which also increases hepatic FA synthesis, has no effect on citrate levels, suggesting a different mechanism (53). The stimulatory effects of TNF or IL-1 and IFN-α on hepatic FA synthesis are additive or synergistic, whereas there is no such synergy between TNF and IL-1 or TNF and IL-6 (53). Finally, IL-4, an anti-inflammatory cytokine, inhibits the stimulatory effects of TNF, IL-1, and IL-6 on hepatic FA synthesis by blocking the increase in hepatic citrate levels (48). In contrast, IL-4 does not block the stimulatory effect of IFN-α on FA synthesis in liver (48). Thus, analogous to cytokine regulation of the immune response, there are complex interactions among the metabolic effects of cytokines that may be additive, synergistic, or antagonistic.

The late effects of TNF on hepatic FA synthesis are accompanied by modest increases in hepatic ACC and FAS activities (56). Late increases in ACC activity in rat liver occur in a sepsis model induced by cecal ligation and puncture (57). Whether gene expression of ACC and/or FAS increases in the liver is currently not known.

INCREASED ADIPOSE TISSUE LIPOLYSIS. Adipose tissue lipolysis also provides FAs for increased hepatic TG synthesis during infection. The mobilized FAs are delivered to the liver and, instead of being oxidized, become reesterified into TGs and secreted into the circulation as VLDL.

LPS, LTA, and several cytokines induce adipose tissue lipolysis in both intact animals and 3T3-L1 adipocytes (26,

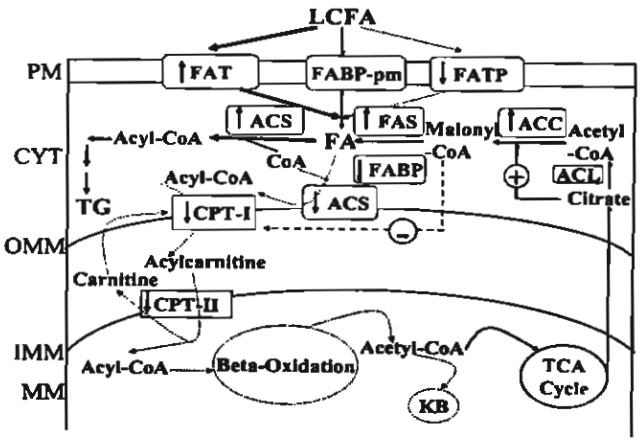


Fig. 1. Changes in hepatic FA metabolism during the acute-phase response (APR). Lipopolysaccharide (LPS) and cytokines increase CD36/fatty acid translocase (FAT) while decreasing fatty acid-transport protein (FATP) in the liver. CD36/FAT may transport long chain FA (LCFA) to cytosol for reesterification, which is enhanced during infection and inflammation, whereas FATP may transport FA toward mitochondria for oxidation, which is suppressed during infection. Cytokines, such as tumor necrosis factor and interleukin-1, increase hepatic FA synthesis by increasing hepatic citrate levels. Modest increases in acetyl CoA carboxylase (ACC) and FA synthase (FAS) are also observed. The expression of carnitine palmitoyl transferase-I (CPT-I) and CPT-II is decreased during sepsis. In addition, LPS and cytokines increase the levels of hepatic malonyl CoA, which further inhibits CPT-I, the rate-limiting enzyme in FA oxidation, resulting in decreased FA oxidation and suppressed ketone body (KB) production in the liver. ACS, acyl-CoA synthetase; CYT, cytosol; IMM, inner mitochondrial membrane; MM, mitochondrial matrix; OMM, outer mitochondrial membrane; PM, plasma membrane; TG, triglyceride.

28, 34, 37, 43, 45, 52, 58–63). The effects of different cytokines are specific and dependent upon the nutritional status of the host (Table 1). TNF acutely induces lipolysis in chow-fed but not in sucrose-fed animals (52). IL-1 does not stimulate lipolysis; its effect on serum TG levels is attributable to enhanced hepatic FA synthesis and TG secretion (32). IL-6, LIF, and CNTF, which act through the same receptor transducer (gp130), stimulate both hepatic FA synthesis and adipose tissue lipolysis (34, 43). On the other hand, KGF stimulates lipolysis but has no effect on hepatic FA synthesis (45). Finally, both IFN-α and IFN-γ stimulate lipolysis, but those peripherally derived FAs do not contribute to increased TG synthesis in the liver because they are oxidized, producing ketone bodies (KBs) (63).

Lipolysis in adipose tissue is primarily driven by hormone-sensitive lipase (HSL), which is regulated either by alteration in its phosphorylation state or by induction of gene expression. Several cytokines that induce lipolysis, including TNF, IFN-α, and IFN-γ, produce a marked decrease in HSL mRNA (64), indicating that gene regulation of HSL does not play a role in cytokine-induced lipolysis. Rather, lipolysis is likely attributable to phosphorylation of HSL or its associated proteins. TNF-induced lipolysis in cultured human adipocytes is associated with the activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)-extracellular signal-related kinase (ERK) (65), leading to decreases in cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B, an enzyme that hydrolyzes cAMP. Increased intracellular cAMP consequently activates cAMP-dependent protein kinase A (PKA), which phosphorylates perilipins, phosphoproteins located at the surface of lipid droplets in adipocytes. Phosphorylation of perilipin A or B modifies lipid surfaces, allowing access of lipases to the lipid droplets, promoting lipolysis. Activation of the MEK-ERK pathway and PKA has also been shown to phosphorylate HSL and increase its lipolytic activity (65, 66).

LPS and cytokines may also induce lipolysis by decreasing the expression of acyl-CoA synthetase (ACS) in adipose tissue (64). ACS catalyzes the activation of long-chain FAs to acyl-CoA esters that are subsequently metabolized in anabolic or catabolic pathways depending on the type of tissue, the nutritional status, and the hormonal milieu of the host. Although FA transport across biological membranes is a bidirectional process, activation of FAs to acyl-CoA esters prevents the efflux of FAs from cells and hence renders FA transport unidirectional. In adipose tissue, ACS is primarily associated with microsomes to support the synthesis of TG for storage of energy. During the APR, there is a coordinated decrease in the mRNA expression of fatty acid transport proteins (FATPs) and ACS mRNA and activity in adipose tissue (67, 68) that likely prevents the activation and storage of FAs and may promote the mobilization of FAs.

DECREASED HEPATIC FA OXIDATION AND KETOGENESIS. Bacterial infections are accompanied by the suppression of hepatic FA oxidation (69, 70). Increased FA substrate provided by increased hepatic FA synthesis and adipose tissue lipolysis is then directed away from oxidation and channeled toward reesterification. This concept is supported by the demonstration that LPS, TNF, and IL-1 decrease mitochondrial but increase microsomal ACS activity in the liver (68). Decreased mitochondrial ACS prevents the activation of FA for entry into mitochondria for oxidation, whereas increased microsomal ACS enhances the reesterification of FAs for TG synthesis.

LPS and cytokines differentially regulate the hepatic mRNA expression of membrane-associated FATPs involved in the uptake of peripherally derived FAs. LPS and cytokines increase the expression of CD36/fatty acid translocase (FAT) while decreasing the mRNA levels of FATP in the liver, suggesting that these proteins may be involved in directing FAs to different intracellular locations (67) (Fig. 1). We propose that CD36/FAT transports FAs to cytosol for reesterification, which is enhanced during the APR, whereas FATP transports FAs toward mitochondria for oxidation, which is suppressed during the APR. LPS also decreases the mRNA and protein levels of cytosolic fatty acid binding protein (FABP) in liver, heart, and muscle (71). Because FABPs are thought to facilitate the transport of FAs to the site of utilization in the cell, the decrease in FABP may also contribute to decreased FA oxidation during infection. The fact that TNF does not acutely increase the activities of regulatory enzymes of TG synthesis, such as glycerol phosphate acyltransferase and diacylglycerol acyltransferase (52), also suggests that the acute increase in TG synthesis is driven by increased FA substrate.

Mitochondrial ACS converts FA into fatty acyl-CoA, which is subsequently metabolized by mitochondrial carnitine palmitoyl transferase-I (CPT-I) into acylcarnitine. CPT-II subsequently metabolizes acylcarnitine into acyl-CoA, which allows FA entrance into the mitochondria, where it undergoes β-oxidation. Hepatic expression of both CPT-I, the rate-limiting enzyme for mitochondrial FA oxidation, and CPT-II is decreased during sepsis (72, 73) (Fig. 1). LPS, IL-1, and TNF increase levels of hepatic malonyl-CoA, an allosteric inhibitor of CPT-I, which inhibits the remaining CPT-I, decreasing FA oxidation (74) (Table 1). IFN-α at high doses increases hepatic malonyl-CoA levels (63), whereas IFN-γ does not affect hepatic malonyl-CoA levels (63).

Given the decrease in FA oxidation, infection is associated with the suppression of hepatic KB production (69, 70). Serum KB levels are regulated by their rates of synthesis in the liver and utilization in peripheral tissues. Infection decreases KB production through the inhibition of FA oxidation but also likely by increased peripheral KB utilization.

Various cytokines have different effects on KB metabolism (Table 1). Both TNF and IL-1 acutely decrease serum KB levels in mice (30, 74). In the fed state, IL-1 increases hepatic malonyl-CoA levels, inhibiting CPT-I and preventing KB production. During fasting, IL-1 inhibits lipolysis, reducing FA substrate to the liver for KB synthesis (74). Although TNF increases hepatic malonyl-CoA levels, it stimulates peripheral lipolysis, increasing the flux of FA substrate to the liver, with no net effect on hepatic KB levels (74), suggesting that TNF decreases serum KB through