



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการศึกษาการตอบสนองของ Toll-like receptor 2 บนเซลล์ keratinocyte กับเชื้อ
Propionibacterium acnes

โดย
ประทีป วรรณิสสร

กันยายน 2553

สัญญาเลขที่ MRG5080146

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการศึกษาการตอบสนองของ Toll-like receptor 2 บนเซลล์ keratinocyte กับเชื้อ
Propionibacterium acnes

ประทีป วรรณิสสร

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนโครงการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5080146

ชื่อโครงการ: การศึกษาการตอบสนองของ Toll-like receptor 2 บนเซลล์ keratinocyte กับเชื้อ *Propionibacterium acnes*

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ประทีป วรณิสสร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

อีเมล: prateepw@nu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ:

โรคผิวหนังได้บ่อยในวัยรุ่น กลไกการเกิดโรคสียังไม่ทราบแน่ชัด สาเหตุหนึ่ง que เชื่อว่าก่อให้เกิดโรคคือเชื้อ *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) มีรายงานว่าในรอยโรคสียระยะแรกพบเม็ดเลือดขาว CD4 และ macrophage โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษา การกระตุ้น keratinocytes ด้วย *P. acnes* โดยตั้งสมมุติฐานว่ากระบวนการกระตุ้นจะผ่าน Toll-like receptor (TLR) 2 และหลัง chemokines ที่จำเพาะต่อ CD4 และ macrophage ผลการศึกษายืนยันการแสดงออกของ TLR 2 บน keratinocyte และยืนยันการกระตุ้นเซลล์ของ *P. acnes* ผ่าน TLR2 ผลการทดลองเบื้องต้นสามารถวิเคราะห์การกระตุ้นของ keratinocyte ด้วยวิธี microporation และ reporter plasmid ที่เหมาะสม การศึกษาขั้นต่อไปคือการหาสภาวะการกระตุ้น keratinocyte ด้วย *P. acnes* เพื่อใช้ตรวจสอบการหลั่ง chemokine ของ keratinocyte

คำหลัก : *Propionibacterium acnes*, Toll-like receptor 2, chemokine

Abstract

Project Code : MRG5080146

Project Title : Study on the chemokine response of keratinocytes through toll-like receptor 2 upon recognizing *Propionibacterium acnes*

Investigator : Prateep Warnnissorn, Faculty of Medicine, Naresuan University

E-mail Address : prateepw@nu.ac.th

Project Period : 2 years

Abstract:

Acne is a common problem in adolescent. The pathogenesis is not fully understood.

Propionibacterium acnes (*P.acnes*) is believed to be one of the factors that cause acne. In early acne lesions CD4 and macrophages are the first group of cells found in these areas. The goal of this study is to investigate *P.acnes* stimulates keratinocyte probably through Toll-like receptor (TLR) 2 and trigger specific chemokine for CD4 and macrophage. The results verified the expression of TLR2 on keratinocytes and *P.acnes* stimulated cells through TLR2. The preliminary result showed analysis of keratinocyte stimulation by microporation using appropriate reporter plasmids. Further study will be searching for suitable condition of keratinocyte stimulation with *P.acnes* to examine the secreted chemokines

Keywords : *Propionibacterium acnes*, Toll-like receptor 2, chemokine

บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร (Executive summary)

ชื่อโครงการ: การศึกษาการตอบสนองของ Toll-like receptor 2 บนเซลล์ keratinocyte กับเชื้อ *Propionibacterium acnes*

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้จะมีศึกษาพยาธิกำเนิดของโรคสิว จากการศึกษาก่อนหน้ารอยโรคสิวที่ขึ้นใหม่พบกลุ่มเม็ดเลือดขาวกลุ่มแรกประกอบด้วย monocyte และ CD4 จึงมีสมมุติฐานว่าเชื้อ *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) ที่เชื่อว่าเป็นสาเหตุของสิวกกระตุ้น Toll-like receptor บน keratinocyte เกิดการหลั่ง chemokine ที่ดึงดูด monocyte และ CD4 เข้าสู่บริเวณที่เกิดสิวกอักเสบ

ผลการศึกษานี้ยืนยันว่า keratinocyte มีการแสดงออก TLR2 แต่ไม่มีแสดงออกของ TLR4 และยืนยันว่าเชื้อ *P. acnes* กระตุ้นเซลล์ผ่าน TLR2 แต่ไม่กระตุ้นผ่าน TLR4 วิธี transfect plasmid เข้า keratinocyte ที่ได้ผลดีคือ microporation ผลการทดลองเบื้องต้นสามารถใช้ reporter plasmid pNFkB DD tdTomato และ pSV2-Thy1.1 ตรวจสอบการกระตุ้น NFkB signaling ใน keratinocyte

การศึกษาขั้นต่อไปคือการหาสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้น keratinocyte ด้วย *P. acnes* ศึกษา MAPK signaling pathway รวมถึงการหลั่ง chemokine ของ keratinocyte

สารบัญเรื่อง

	หน้าที่
กิตติกรรมประกาศ	iii
บทคัดย่อภาษาไทย	iv
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	v
บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร	vi
สารบัญภาพ	viii
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
วิธีทดลอง	4
ผลการทดลอง	8
สรุป วิเคราะห์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต	19
ผลผลิตของโครงการวิจัย	20
เอกสารอ้างอิง	21

สารบัญภาพ

	หน้าที่
รูปที่ 1 Stable transfect HEK	8
รูปที่ 2 Stable clone ที่เลือกมีการแสดงออกของ TLR อย่างจำเพาะ	9
รูปที่ 3 Keratinocyte มีการแสดงออกของ TLR2 ไม่มีการแสดงออกของ TLR4	10
รูปที่ 4 HEK-TLR2 และ HEK-TLR4 มีความจำเพาะต่อการกระตุ้นด้วย ligand	11
รูปที่ 5 HEK-TLR2 ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อ <i>P. acnes</i>	11
รูปที่ 6 Electroporation pEGFP-N1 เข้าเซลล์ keratinocyte ด้วย MicroPorator	12
รูปที่ 7 Transfection efficiency ของ keratinocyte โดย microporator	12
รูปที่ 8 อัตรารอดของ keratinocyte ที่ 24 ชั่วโมงหลัง transfection	13
รูปที่ 9 ผลการกระตุ้น keratinocyte ที่ใช้ microporator transfect reporter plasmids	14
รูปที่ 10 pNFkB-hrGFP เป็น reporter ที่แสดงการกระตุ้น NFkB ได้ดีกับเซลล์	15
รูปที่ 11 Reporter pNFkB-hrGFP ไม่สามารถแสดงการกระตุ้น NFkB ใน keratinocyte	16
รูปที่ 12 pNFkB DD tdTomato เป็น reporter ที่แสดงการกระตุ้น NFkB ของเซลล์ HEK	17
รูปที่ 13 Reporter pNFkB DD tdTomato แสดงการกระตุ้น NFkB ใน keratinocyte	18

บทนำ

เรื่องที่มีผู้ทำวิจัยมาก่อน

สิวเป็นโรคที่พบได้บ่อย ช่วงอายุ 12 -24 ปี มีความชุกของโรคถึง 85%¹ และช่วงอายุ 25-44 ปี พบว่า ผู้หญิง 12 % และผู้ชาย 3% ยังมีอาการของโรคสิวะ² สาเหตุของโรคสิวะยังไม่ทราบแน่ชัด เชื่อว่าเกิดจาก (1) follicular epidermal hyperproliferation, (2) excess sebum production, (3) *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) และ (4) inflammation³

Follicular epidermal hyperproliferation ก่อให้เกิด microcomedo ซึ่งเป็นลักษณะเริ่มต้นของโรคสิวะ เมื่อมีการหนาขึ้นของส่วนบนของ epithelium of upper hair follicle (follicular infundibulum) จะเกิดการอุดตัน มีการสะสมของ keratin, sebum และ bacteria จนกระทั่งมีการขยายขึ้นของ follicular infundibulum จนเกิดเป็น microcomedone กลไกการหนาขึ้นของ follicular infundibulum นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด โดยอาจเกิดจาก androgen stimulation, การลดลงของ linoleic acid และ การทำงานเพิ่มขึ้นของ interleukin (IL)-1 α ³

Androgen stimulation อาจกระตุ้น follicular epidermal hyperproliferation เนื่องจาก dihydrotestosterone (DHT) เป็น potent androgen ที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคสิวะ เนื่องจาก follicular keratinocyte มีการทำงานของ 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase และ 5 α -reductase มากกว่า epidermal keratinocyte ทำให้สร้าง DHT ได้มากกว่า⁴ ประกอบกับผู้ป่วยที่มีลักษณะ complete androgen insensitivity จะไม่เกิดโรคสิวะ⁵ ช่วยยืนยันความสำคัญ ของ androgen stimulation ต่อการเกิดโรคสิวะ Linoleic acid เป็น essential fatty acid ที่ลดลง ในผู้ป่วยโรคสิวะ ระดับของ linoleic acid จะเป็นปกติหลังรักษา ได้ผลดีกับยา isotretinoin⁶ IL-1 α กระตุ้นให้เกิด hyperproliferation ของ follicular keratinocyte และ microcomedone การใช้ IL-1 receptor antagonist ยับยั้งการเกิด microcomedone สนับสนุนส่วนสำคัญของ IL-1 α ต่อโรคสิวะ^{7,8}

สาเหตุที่สองของการเกิดสิวะคือการสร้างไขมันผิวหนัง (sebum) จากต่อมไขมันมากเกินไป ผู้ป่วยโรคสิวะสร้างไขมันผิวหนัง มากกว่าผู้ที่ไม่เป็นสิวะ โดยที่ไม่มีความแตกต่างในส่วนประกอบของ ไขมันผิวหนัง ในทั้งสองกลุ่ม⁹ Triglycerides ถูกสลายโดย *P. acnes* ไปเป็น free fatty acid โดย free fatty acid นี้จะกระตุ้นให้ *P. acnes* จับกันเป็นกลุ่มๆ และอาจกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ¹⁰

P. acnes เป็นเชื้อ Gram-positive bacilli, anaerobic, and microaerobic bacterium ที่พบใน sebaceous follicle ถึงแม้จะพบว่าเชื้อ *P. acnes* เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคสิวะ แต่จำนวนของเชื้อไม่สัมพันธ์กับอาการทางคลินิก¹¹ เชื้อ *P. acnes* สามารถกระตุ้น Toll-like receptor 2 (TLR2) บน

macrophage ให้หลัง proinflammatory cytokines IL-1 α , IL-8 และ tumor necrosis factor (TNF)- α)¹² แต่ *P. acnes* ไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ keratinocyte ผลิต proinflammatory cytokines ได้¹³ จากศึกษาโดยการย้อมทาง immunohistochemistry ในสิวอักเสบน้อยกว่า 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับบริเวณที่ดูปกติของผู้ป่วยโรคสิว และผิวของอาสาสมัครปกติ พบเซลล์เม็ดเลือดขาว CD4⁺ cell จำพวก CD45RO⁺ (memory/effector T cells), CLA⁺ (skin homing T cells) และ macrophage มากในสิวอักเสบน้อยกว่า 6 ชั่วโมง¹⁴ จากข้อมูลข้างต้น จึงมีสมมุติฐานว่าเมื่อ keratinocyte ถูกกระตุ้นโดย *P. acnes* เม็ดเลือดขาวน่าจะถูกชักนำเข้าสู่ 2 บริเวณที่เกิดโรคอย่างจำเพาะโดย chemokine Chemokines เป็นโปรตีนขนาดเล็กที่มีขนาดประมาณ 8-10 kilodalton ที่ผลิตโดยเซลล์เพื่อ recruit เม็ดเลือดขาวไปบริเวณที่มี inflammation และมีส่วนเกี่ยวข้องกับ angiogenesis, cancer metastasis¹⁵

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สิวเป็นโรคที่พบได้บ่อยในวัยรุ่น ถึงแม้ว่าสิวจะไม่เป็นโรคที่เป็นอันตรายถึงชีวิต แต่มีค่าใช้จ่ายในการรักษาสูง ประเทศสหรัฐอเมริกา มีผู้ป่วยโรคสิวประมาณปีละ 40-50 ล้านคน จากประชากรทั้งหมดประมาณ 300 ล้านคน และคาดว่าจะมีค่าใช้จ่ายในการรักษาไม่ต่ำกว่า 2.5 พันล้านเหรียญสหรัฐ¹ ที่อัตราแลกเปลี่ยน 1 เหรียญสหรัฐเท่ากับ 35 บาทจะคิดเป็นเงินบาทได้ประมาณ 8.7 หมื่นล้านบาทต่อปี หรือประมาณรายละ 50 เหรียญสหรัฐต่อปี คิดเป็นเงินบาทเท่ากับ 1,750 บาท ต่อผู้ป่วย 1 คนต่อปี ในประเทศไทยข้อมูลจากสถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์ ในปีพ.ศ. 2551 จากจำนวนผู้ป่วยนอก 50,967 ราย มีผู้ที่ได้รับการรักษาด้วยโรคสิว 12,666 ราย คิดเป็นร้อยละ 24.8 หรือ 1 ใน 4 ของผู้ป่วยโรคผิวหนังที่มาพบแพทย์ที่สถาบันโรคผิวหนัง¹⁶ ช่วงอายุที่พบโรคสิวได้มากที่สุดคือ 12-24 ปี โดยคาดว่าจะสูงถึงร้อยละ 85 ร้อยละ 12 ของผู้หญิง และร้อยละ 3 ของผู้ชายจะมีอาการโรคสิวได้ถึงอายุ 44 ปี¹ ถึงแม้ว่าในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการประเมินค่าใช้จ่ายของโรคสิว แต่คาดว่าน่าจะมีมูลค่าสูง

วัตถุประสงค์

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์สี่ข้อคือ หนึ่งยืนยันการแสดงออกของ TLR2 บน keratinocyte ด้วย flow cytometry สองทดสอบการทำงานของ TLR2 และ TLR4 บน stable transfectant cells ด้วย specific ligand ต่อ TLR2, TLR4 และ heat-killed *P.acnes* ว่าส่งสัญญาณผ่าน NF-KB signaling pathway โดย luciferase assay สามทดสอบการทำงานของ TLR2 บน keratinocytes ว่าส่งสัญญาณผ่าน NF-KB signaling pathway โดย luciferase assay ด้วย specific ligand ต่อ TLR2 และ heat-killed *P.acnes* และข้อสุดท้ายคือการศึกษาการตอบสนองของ keratinocytes ที่น่าจะหลั่ง chemokine ligands เมื่อกระตุ้นด้วย heat-killed *P.acnes* โดย real-time PCR และ ELISA

วิธีทดลอง

1. เตรียม stable transfectant cells เพื่อใช้เป็น positive control

หลังจากเกิดข้อขัดข้องกับ stable transfectant cells ที่ขอจาก Professor Golenbock, University of Massachusetts Medical School, MA, ประเทศสหรัฐอเมริกา คือเซลล์ TLR2 ที่เก็บในถังไนโตรเจนเหลวเนื่องจากไนโตรเจนแห้ง และเซลล์ TLR4 ที่ได้รับเริ่มสูญเสียการแสดงออกของ TLR4 จึงต้องเตรียม stable transfectant cells ใหม่จาก plasmid ของ Professor Golenbock

เตรียม plasmid pcDNA/hTLR2/YFP, pcDNA/hTLR4/YFP และ pcDNA/YFP จาก Professor Golenbock โดย transform ในแบคทีเรีย JM109 และสกัด plasmid ด้วยวิธี Maxiprep (Quiagen, Valencia, CA)

นำ plasmid มา transfect เซลล์ Human embryonic kidney cell line (HEK) จาก American Type Culture Collection (ATCC, Manassa, VA) ที่เลี้ยงใน ร้อยละ 10 ของ Fetal bovine serum (FBS) ใน Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) จาก Thermo Scientific, Waltham, MA โดยวิธี calcium phosphate co-transfection และ ใช้ neomycin resistance selection G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA) เลือกเซลล์ stable transfect cells

คัดเลือก clone ที่รอดจาก stable transfection ด้วยวิธี limiting dilution ให้ clone ที่เพิ่มจำนวนจากเซลล์เดี่ยวมาทดสอบสารเรืองแสง yellow fluorescent protein (YFP) ด้วย flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) ต่อมาใช้ antibody ต่อ TLR2 และ TLR4 ที่ติดสารเรืองแสง phycoerythrin (PE) คือ anti-TLR2-PE, anti-TLR4-PE และ isotype control (Ebioscience, San Diego, CA) ย้อมด้วย antibodies ที่กล่าวมาข้างต้นไม่ต่ำกว่าครึ่งชั่วโมง ล้างด้วย phosphate-buffered saline (PBS) และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer เพื่อทดสอบการแสดงออกของ TLR กับ clone ที่ได้และให้ชื่อเป็น HEK-TLR2, HEK-TLR4 และ HEK

2. ยืนยันการแสดงออกของ TLR2 บน keratinocyte

หลังได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์ให้นำหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศเด็กชายมาเพาะเลี้ยง keratinocyte เพื่อการวิจัย ได้นำหนังหุ้มปลายมาตัดแต่งและแช่ใน 2.5 mg/ml dispase II (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ต่อมาแยกชั้นหนังกำพร้า แช่ใน trypsin-EDTA (0.05% trypsin, EDTA, Invitrogen) และ neutralize ด้วย 10% DMEM นำเซลล์ที่แยกได้เลี้ยงใน cell culture dishes (Corning, Ac-ton, MA) ด้วย Keratinocyte Serum-Free Medium (Ker SFM) (Invitrogen) ที่มี 25 µg/ml

bovine pituitary extract, 0.2 ng/ml epidermal growth factor และ 0.4 mM CaCl₂ เมื่อเลี้ยง
ได้ 30-40% confluence จึง detach เซลล์ด้วย trypsin/EDTA เซลล์ keratinocytes ที่ใช้ในการ
ทดลองจะใช้เพียง subculture ที่ 3 ถึง 5

เนื่องจาก cytokeratin เป็น marker ของ keratinocyte จึงนำมาวิเคราะห์เซลล์ที่เลี้ยงด้วยวิธี
flow cytometry พบว่า มากกว่าร้อยละ 95 ของเซลล์ keratinocytes ที่เลี้ยงย้อมติด monoclonal
Anti-Pan Cytokeratin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) (ข้อมูลไม่ได้แสดง)

นำ keratinocyte มาย้อมด้วย anti-TLR2-PE, anti-TLR4-PE และ isotype control ไม่ต่ำกว่า
ครึ่งชั่วโมง ล้างด้วย PBS และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer

ย้อม anti-TLR4-PE ภายใน keratinocyte หลัง fix keratinocyte ด้วย 2% paraformaldehyde
10 นาที permeabilized ด้วย 0.5% saponin (Sigma-Aldrich) ไม่ต่ำกว่า 1 ชั่วโมง ล้างด้วย
PBS และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer

3. ทดสอบการทำงานของ TLR ของ HEK-TLR2, HEK-TLR4 และ HEK ว่าส่งสัญญาณ ผ่าน NF-KB signaling pathway โดย luciferase assay

นำเซลล์ HEK-TLR2, HEK-TLR4 และ HEK 2x10⁴ เลี้ยงในจานหลุม 96 หลุมประมาณ 24
ชั่วโมง transfect plasmid pNFkB-luc (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) และ
pGL4.70[hRluc] (Promega, Madison, WI) ในอัตราส่วน 10:1 ด้วย TurboFect (Fermentas,
Glen Burnie, MD) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต 16-20 ชั่วโมงต่อมากระตุ้นด้วย tumor necrosis
factor (TNF)- α (Invivogen, San Diego, CA), Pam₃CysSK4 (Merck KGaA, Darmstadt,
Germany), Ultrapure lipopolysaccharide from E.coli K12 (ut.LPS) (Invivogen) และ heat-
killed *P.acnes* (The Van Kampen Group, Hoover, AL) ประมาณ 6 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย
PBS ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วย Dual-Luciferase Reporter Assay และ GloMax 20/20
Luminometer (Promega) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต

4. การ transfect reporter plasmid กับ keratinocyte ได้ผลดีที่สุดกับวิธี electroporation

หลังจากผล transfection efficiency กับ keratinocyte ที่ต่ำกับสาร transfection ที่ขายโดย
บริษัทต่างๆ ได้แก่ GeneJuice และ NanoJuice ของบริษัท Novagen ประเทศสหรัฐอเมริกา
GenCarrier1 และ GenCarrier2 ของ Epoch Biolabs ประเทศสหรัฐอเมริกา TransIT-
Keratinocyte Transfection Reagent ของ Mirus ประเทศสหรัฐอเมริกา TurboFect ของ
Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา และ DOTAP Liposomal Transfection Reagent ของ
Roche ประเทศเยอรมัน จึงใช้วิธี electroporation ที่เรียกว่า microporation ด้วย Neon

Transfection System (Invitrogen) โดยใช้ reporter plasmid pEGFP-N1 (ได้จาก NanoEntek, Korea) transfect ตามคำแนะนำของผู้ผลิต miroporator เพื่อหาค่า pulse voltage, pulse width และ pulse number ที่เหมาะสมกับ keratinocyte หลัง microporation 24 ชั่วโมง นำ keratinocyte วิเคราะห์ transfection efficiency ของด้วย flow cytometer และวัดอัตราการรอดของ เซลล์ด้วย MTT assay

การวัดอัตราการรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT หลัง microporation นำ keratinocyte เลี้ยงในงานหลุม 96 หลุมประมาณ 24 ชั่วโมง ใส่ MTT (Sigma-Aldrich) 5 µg/ml ในสารละลายเลี้ยงเซลล์ 100 µl เลี้ยงเซลล์ต่ออีก 3 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์ที่มีชีวิตเปลี่ยน MTT เป็นสารสีม่วง formazan ละลาย formazan ด้วย dimethyl sulfoxide (Merck) และนำไปอ่านผลด้วย microplate reader เปรียบเทียบอัตราการรอดของเซลล์ที่ทำ microporator เป็นร้อยละกับกลุ่มควบคุมที่มีอัตราการรอดเป็น ร้อยละร้อย

5. ทดสอบการทำงานของ NF-KB signaling ใน keratinocytes

Microporation keratinocyte ด้วย pNFkB -luc และ pGL4.70[hRluc] ด้วยค่า pulse voltage, pulse width และ pulse number ที่เหมาะสมประมาณ 24 ชั่วโมง กระตุ้นด้วย TNF- α , Pam₃CysSK4, ut.LPS และ *P.acnes* นำไปวิเคราะห์ด้วย Dual-Luciferase Reporter Assay

ทดสอบการทำงานของ NF-KB signaling ด้วย reporter ที่เป็นสารเรืองแสง จากการรายงานของ Ducrest และคณะ ถึงการใช้เทคนิค flow cytometry วัด reporter expression โดยใช้ GFP reporter plasmid และ pSV2 Thy1.1¹⁷ ในการศึกษา GFP reporter plasmid ที่ใช้คือ pNFkB-hrGFP (Agilent Technologies) และ pSV2 Thy1.1 เป็น transfection control คณะผู้วิจัยขอ pSV2 Thy1.1 จาก Joachim Lingner, Swiss Institute for Experimental Cancer Research, Lausanne, Switzerland หลัง transfection pSV2 Thy1.1 จะแสดงออก Thy1.1 ซึ่งเป็นโปรตีนหนู mouse ได้ใช้ allophycocyanin (APC)-labeled anti-Thy-1.1 antibody (Ebioscience) เพื่อตรวจสอบ transfection efficiency ด้วย flow cytometer หลัง microporation และกระตุ้นด้วย ligand คล้ายกับใน luciferase assay

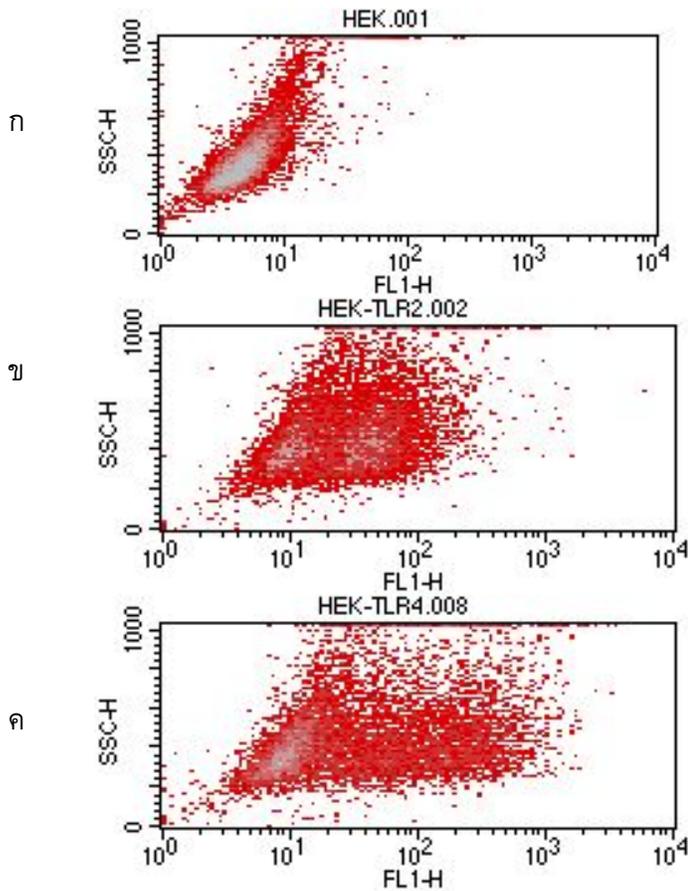
ก่อนการทดลองใช้ NFkB reporter ที่เป็นสารเรืองแสงกับ keratinocyte ได้ทดสอบเบื้องต้นกับ เซลล์ HEK ก่อน โดยใช้ GeneJuice (Merck) transfect reporter plasmid ตามคำแนะนำของผู้ผลิต กระตุ้นด้วย TNF- α 24 ชั่วโมงจึงนำเซลล์ไปวิเคราะห์ด้วย flow cytometer

นอกจาก pNF κ B-hrGFP ผู้วิจัยได้ใช้ pNF- κ B -DD-tdTomato (Clontech) และกระตุ้นด้วย TNF- α แล้วนำไปวิเคราะห์การเรืองแสงที่เป็นผลจากการกระตุ้นผ่าน NF- κ B ด้วย flow cytometer

ผลการทดลอง

1. สร้าง stable transfectant TLR2, TLR4 และ HEK

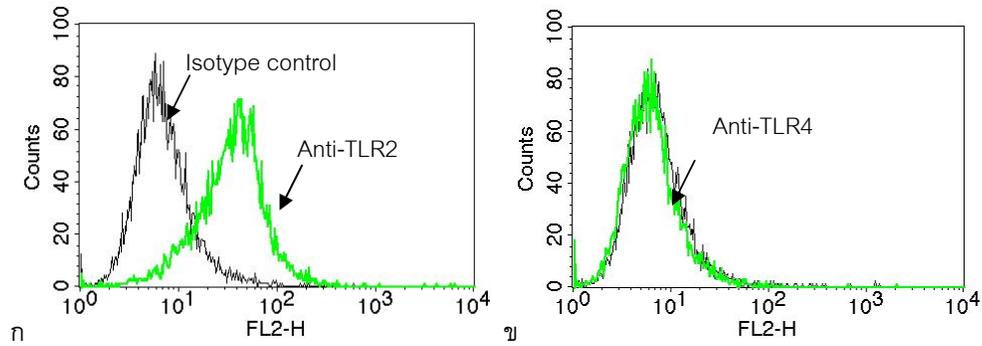
เซลล์ที่ stable transfect ด้วย TLR plasmid มีการแสดงออกของ YFP ที่ FL1 (รูปที่ 1 ก-ค)



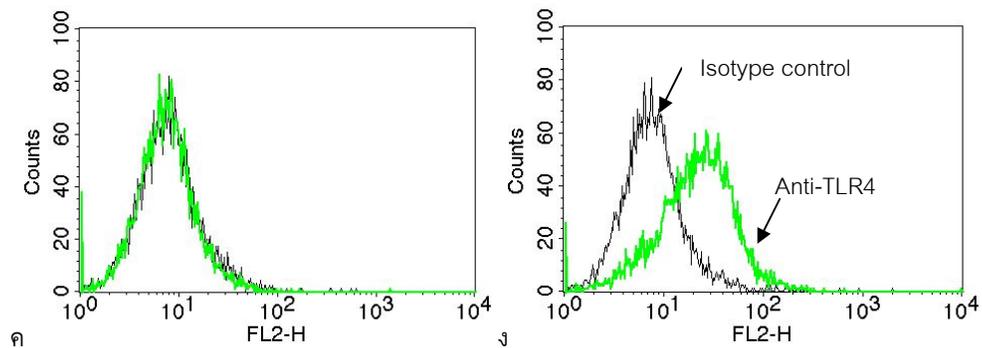
รูปที่ 1 HEK ที่ stable transfect ด้วย (ก)pcDNA/YFP (ข) pcDNA/hTLR2/YFP และ (ค) pcDNA/hTLR4/YFP มีการเรืองแสงที่ parameter FL1

2. เซลล์ที่คัดเลือกด้วยวิธี limiting dilution มีการแสดงออกของ TLR ที่จำเพาะ Clone ที่เลือกจาก stable tranfect เซลล์คือ HEK-TLR2, HEK-TLR4 และ HEK มีการแสดงออกของ TLR ที่จำเพาะเมื่อย้อมด้วย antibody ที่ติดสารเรืองแสง PE วิเคราะห์โดย flow cytometer (รูปที่ 2)

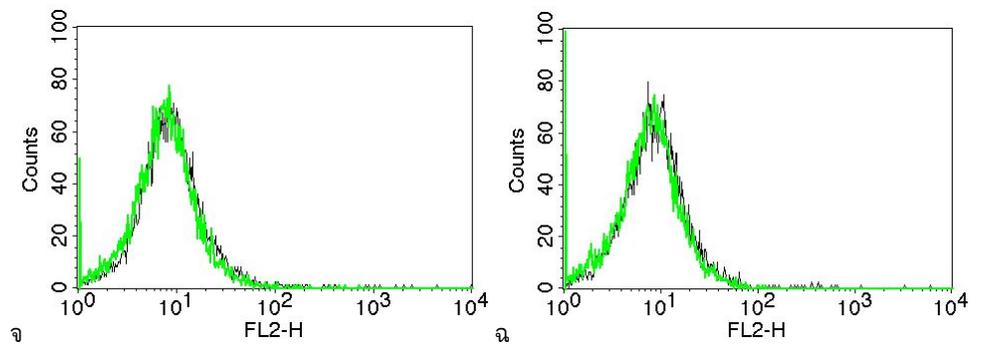
HEK-TLR2



HEK-TLR4

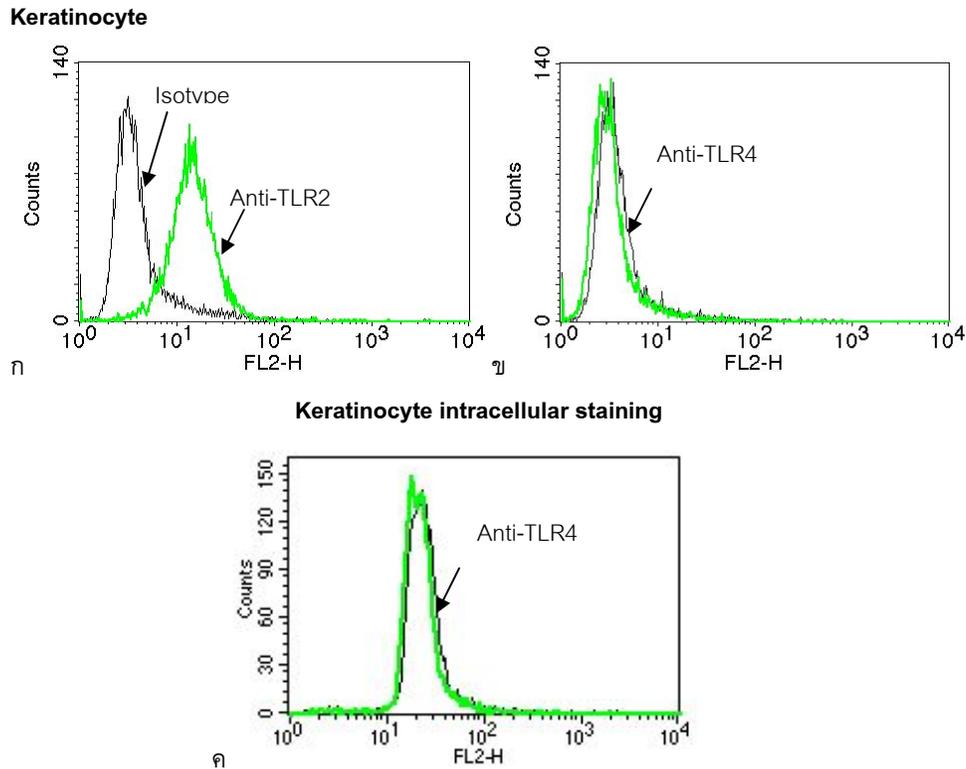


HEK



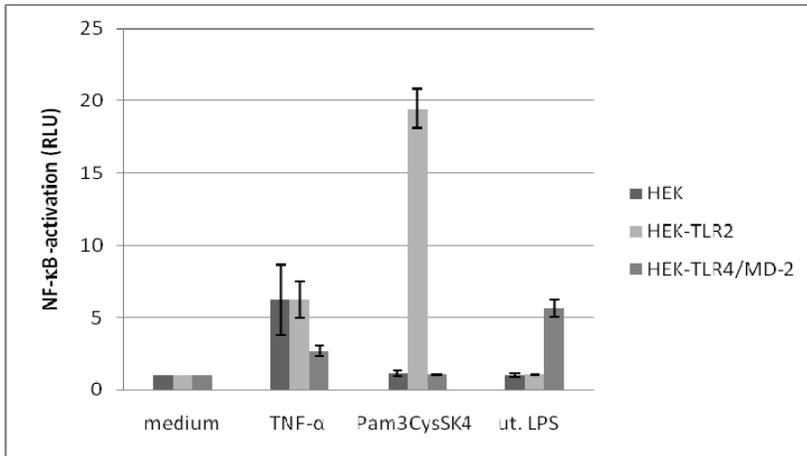
รูปที่ 2 Stable clone ที่เลือกมีการแสดงออกของ TLR อย่างจำเพาะ
Clone HEK-TLR2 มีการแสดงออกของ TLR2 (2ก) แต่ไม่มีการแสดงออกของ TLR4 (2ข)
HEK-TLR4 ไม่มีการแสดงออกของ TLR2 (2ค) มีการแสดงออกของ TLR4 และ HEK ไม่มีการ
แสดงออกของทั้ง TLR2 และ TLR4 (2จ-ฉ) (รูปที่แสดงเป็นหนึ่งในผลการทดสอบ 3 ซ้ำที่ได้ผล
คล้ายกัน)

3. Keratinocyte มีการแสดงออกของ TLR2 แต่ไม่มีการแสดงออกของ TLR4
 Keratinocyte ย้อมได้ด้วย anti-TLR2 แต่ไม่มีการแสดงออกของ TLR4 แม้จะย้อมด้วย anti-TLR4 ภายในเซลล์หลัง permeabilized (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 Keratinocyte มีการแสดงออกของ TLR2 แต่ไม่มีการแสดงออกของ TLR4
 Keratinocyte ย้อมติด anti-TLR2-PE เมื่อเทียบกับ isotype control (รูปที่ 3ก) ไม่มีความแตกต่างของ anti-TLR4-PE กับ isotype control ทั้งบนผิวของเซลล์ (รูปที่ 3ข) และ intracellular (รูปที่ 3ค)

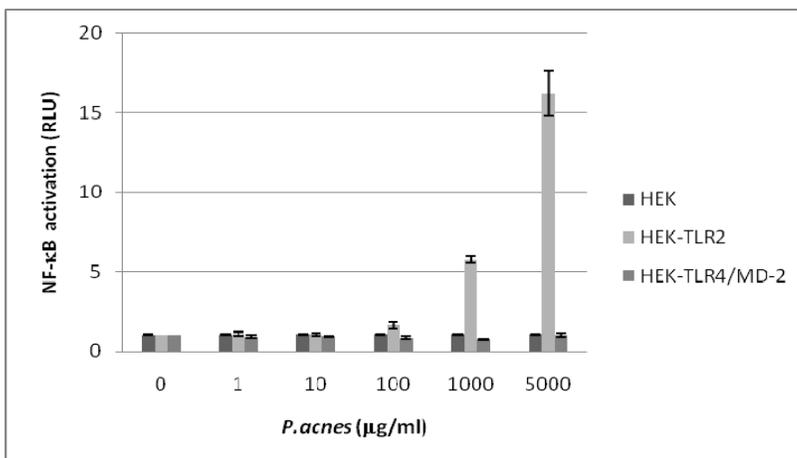
4. HEK-TLR2 และ HEK-TLR4 ตอบสนองอย่างจำเพาะต่อ ligand ของ TLR
 เซลล์ทุก clone ตอบสนองต่อ TNF- α ที่ใช้เป็น positive control สำหรับทดสอบการทำงานของ NF-KB signaling HEK-TLR2 ตอบสนองต่อ TLR2 ligand คือ Pam₃CysSK4 แต่ไม่ตอบสนองต่อ TLR4 ligand คือ ut.LPS ส่วน HEK-TLR4 ตอบสนองต่อ TLR4 ligand แต่ไม่ตอบสนองต่อ TLR2 ligand และ HEK ไม่ตอบสนองต่อทั้ง TLR2 ligand และ TLR4 ligand (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 HEK-TLR2 และ HEK-TLR4 มีความจำเพาะต่อการกระตุ้นด้วย ligand 24 ชั่วโมงหลัง transient transfect NFκB-luciferase reporter plasmid กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α 0.2 ng/ml, 100 ng/ml ของ Pam3CYSK4 และ ultrapure LPS เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ค่าการกระตุ้น NF-KB เป็น relative luciferase unit (RLU) เปรียบเทียบอัตราส่วน NFKB firefly luciferase กับ internal control renilla luciferase ของกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม

5. HEK-TLR2 ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อ *P. acnes*

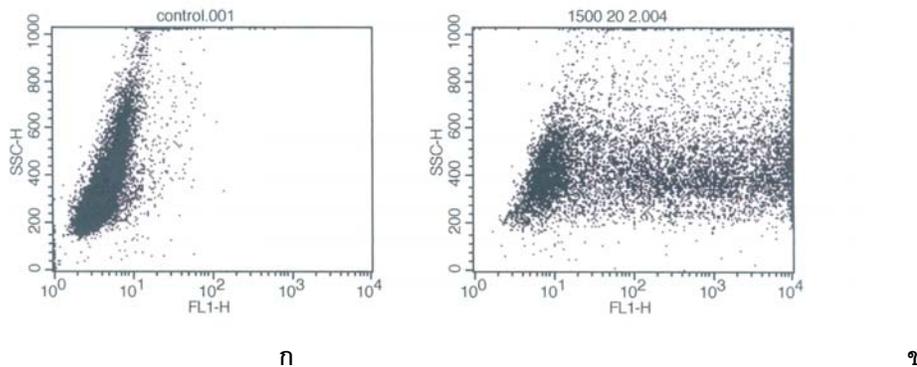
HEK-TLR2 ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อ *P. acnes* เมื่อนำ HEK และ HEK-TLR2 มากระตุ้นด้วย heat-killed *P. acnes* ที่ความเข้มข้นต่างๆพบว่าเริ่มมีการกระตุ้นเซลล์ HEK-TLR2 ตั้งแต่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ *P. acnes* จะมีการกระตุ้นมากขึ้นตามลำดับ ส่วน HEK และ HEK-TLR4 ไม่มีการตอบสนอง (รูปที่ 5) แสดงว่าเชื้อ *P. acnes* มีความจำเพาะต่อ TLR2



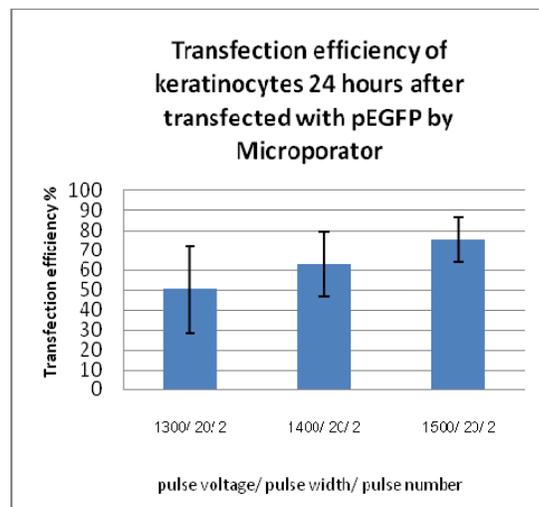
รูปที่ 5 HEK-TLR2 ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อ *P. acnes* หลัง transient transfection ตามวิธีในรูปที่ 4 ได้กระตุ้น HEK, HEK-TLR2 และ HEK-TLR4 ด้วย heat-killed *P. acnes* ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 $\mu\text{g/ml}$ ถึง 5000 $\mu\text{g/ml}$

6. วิธี electroporation ด้วย MicroPorator ให้ผล transfection efficiency ดีกับ keratinocyte

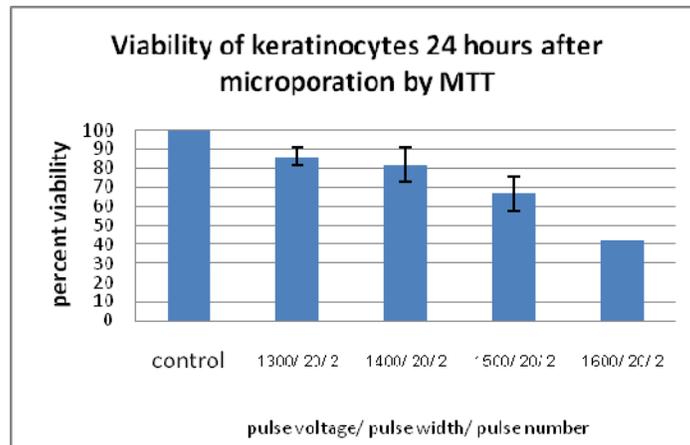
จากการหาค่า pulse voltage, pulse width และ pulse number ที่เหมาะสมกับ keratinocyte ตามคำแนะนำของผู้ผลิต MicroPorator พบว่าเมื่อมี tranfection efficiency สูงขึ้น (รูปที่ 7) อัตรารอดของ keratinocyte จะลดลง (รูปที่ 8)



รูปที่ 6 Electroporation pEGFP-N1 เข้าเซลล์ keratinocyte ด้วย MicroPorator โดยใช้ pulse voltage 1500 volts , pulse width 20 milisecond และ pulse number 2 ให้ผล การแสดงออกของ green fluorescence protein (GFP) หลัง 24 ชั่วโมง วัดการเรืองแสงโดย flow cytometry เปรียบเทียบเซลล์ที่ไม่ได้ใช้ microporation (ก) กับเซลล์ที่ใช้ microporation (ข)



รูปที่ 7 ผล Transfection efficiency ของ keratinocyte โดย microporator ด้วย pulse voltage 1500 volts , pulse width 20 milisecond และ pulse number 2 ให้ผลเฉลี่ย transfection efficiency สูงสุด โดยการวัดการเรืองแสงของเซลล์ที่ transfected ด้วย pEGFP-N1 เทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้ใช้ Microporator โดยเครื่อง flow cytometry (ข้อมูลที่แสดงเป็นการทดสอบ 3 ซ้ำ)

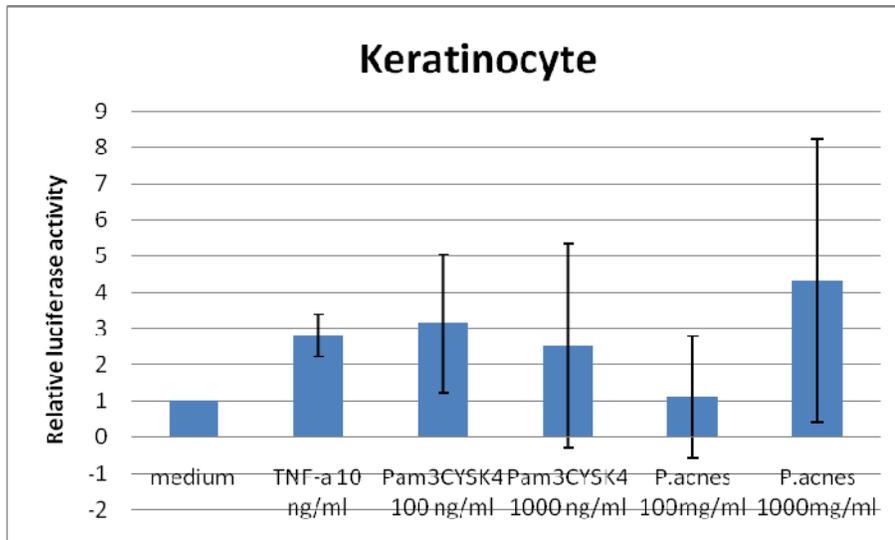


รูปที่ 8 อัตรารอดของ keratinocyte ที่ 24 ชั่วโมงหลัง transfection ด้วย microporation ที่ pulse voltage 1500 volts , pulse width 20 milisecond และ pulse number 2 มีอัตรารอดเฉลี่ยร้อยละ 67 (ข้อมูลที่แสดงเป็นการทดสอบ 3 ซ้ำ ยกเว้น 1600/20/2 ที่ทดสอบเพียง 1 ครั้ง)

- Luciferase assay ของ keratinocyte โดย microporation ด้วย reporter plasmids ที่ประกอบด้วย pNF-KB-Luc และ pGL4.70 [hRLuc] (*Renilla* reporter) ได้ผลไม่คงที่ ทำซ้ำไม่ได้

หลัง microporation keratinocyte 24 ชั่วโมงด้วย pNF-KB-Luc และ pGL4.70 [hRLuc] (*Renilla* reporter) ได้กระตุ้นด้วย ligand ต่างๆ หลายความเข้มข้น หลายระยะเวลา ปรับอัตราส่วน reporter plasmid และ ลด voltage แต่ผลการทดลองที่ได้ไม่คงที่ได้ทดลองใช้ ligand ดังนี้ TNF α 2-50 ng/ml, Pam₃CYSK4 100-1000 ng/ml ปรับเวลา incubation ตั้งแต่ 3 ชั่วโมง ถึง 24 ชั่วโมง ปรับอัตราส่วนของ reporter plasmid pNF-KB-Luc และ pGL4.70 [hRLuc] จาก 10:1 ไปจนถึง 1:1 ปรับลด voltage เหลือ 1400 เนื่องจากตอบสนองดีกว่า voltage 1500 เล็กน้อย และมีเซลล์ตายน้อยกว่า

แม้จะกระตุ้น keratinocyte ด้วย ligand ที่ความเข้มข้นสูงแต่ได้ค่า relative luciferase ต่ำ ค่าของ *Renilla* ที่ใช้เป็น internal control ของ transfection efficiency พบว่าได้ค่าต่ำมากในระดับหลักร้อยถึงหลักหมื่นหน่วย ในขณะที่ luciferase assay ของเซลล์ HEK ก่อนหน้านี้จะได้ค่าของ *Renilla* แสนหน่วยขึ้นไป และหากอ่านเพียง blank จะได้ประมาณ 50 หน่วย (ไม่ได้แสดงข้อมูล) บางครั้งค่า relative luciferase activity ของ ligand ได้ต่ำกว่า medium ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม เช่น relative luciferase activity ของ Pam3CYSK4 มีตั้งแต่ 0.66 – 9.6 (รูปที่ 9)

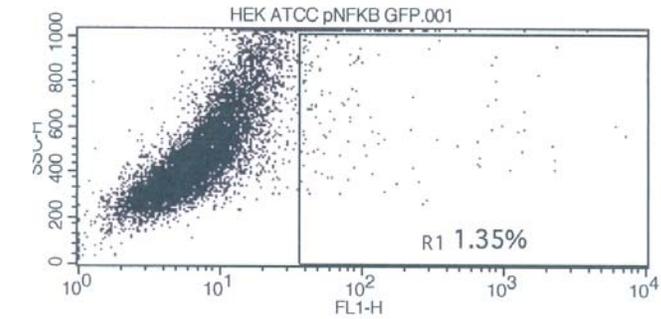


รูปที่ 9 ผลการกระตุ้น keratinocyte ที่ใช้ microporator transfect reporter plasmids ที่ประกอบด้วย pNF-KB-Luc และ pGL4.70 [hRLuc] (*Renilla* reporter) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย TNF- α , Pam₃CYSK4 และ *P.acnes* อีก 24 ชั่วโมง แสดงผลที่มีความเบี่ยงเบนสูงเนื่องจากผลการทดลองแต่ละครั้งแตกต่างกันมาก

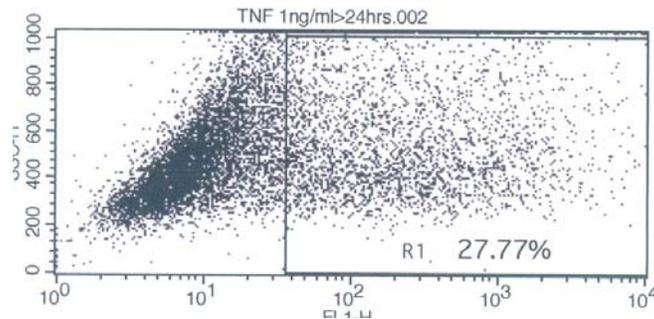
จากผลข้างต้นคณะผู้วิจัยคาดว่า *Renilla* reporter ไม่สามารถแสดงออกใน keratinocyte ได้ดี เหมือนกับเซลล์ HEK จึงได้พยายามใช้ reporter อื่นเพื่อศึกษา NF κ B signaling ใน keratinocyte

- Reporter plasmid pNF κ B-hrGFP แสดงการกระตุ้น NF κ B กับ HEK แต่ไม่สามารถแสดงการกระตุ้น NF κ B กับ keratinocyte

Reporter pNF κ B-hrGFP เมื่อนำไป transfect HEK และกระตุ้นด้วย TNF- α พบว่ามีการแสดงออกของ GFP ได้ดี (รูปที่ 10)



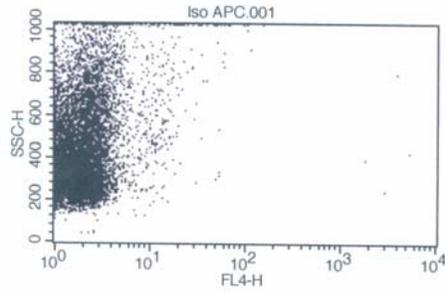
ก



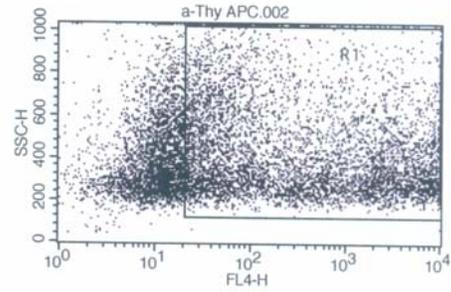
ข

รูปที่ 10 pNFkB-hrGFP เป็น reporter ที่แสดงการกระตุ้น NFkB ได้ดีกับเซลล์ HEK หลังเลี้ยงเซลล์ HEK เป็นเวลา 24 ชั่วโมง transfect pNFkB-hrGFP ด้วย transfection reagent GeneJuice วันต่อมากระตุ้นด้วย TNF- α 1ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจึงนำเซลล์ไปวิเคราะห์ด้วย flow cytometer (ก) เซลล์ควบคุมมีเพียงร้อยละ 1.35 ที่มีการแสดงออกของ GFP (ข)เซลล์ที่กระตุ้นด้วย TNF- α ร้อยละ 27.77 มีการแสดงออกของ GFP

เมื่อนำ pNFkB-hrGFP มาใช้กับ keratinocyte แล้วไม่สามารถแสดงถึงการกระตุ้น NFkB ของ keratinocyte (รูปที่ 11) การแสดงออกของ GFP ใน keratinocyte ที่กระตุ้นด้วย TNF- α ไม่ต่างจากเซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้น ต่อมาพบว่า GFP ของ plasmid นี้เป็นการนำ renilla มาปรับปรุง จึงมีความเป็นไปได้ว่า keratinocyte ไม่สามารถแสดงออกยีนของ renilla หรือ sea pansy ซึ่งเป็นปะการังอ่อนชนิดหนึ่ง

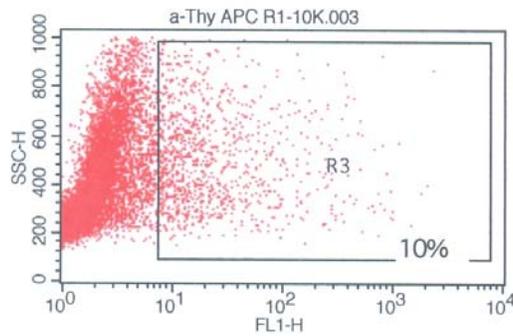


ก

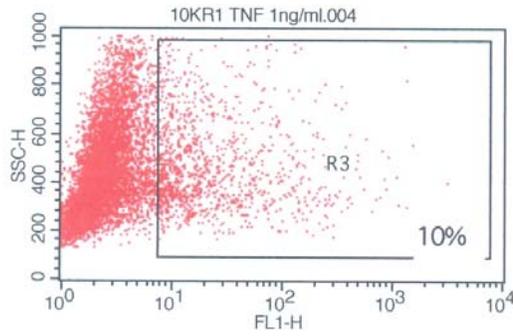


ข

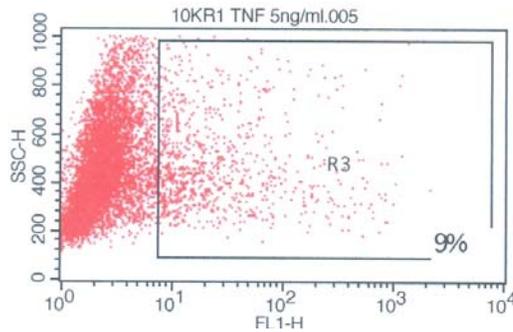
ค



ง



จ

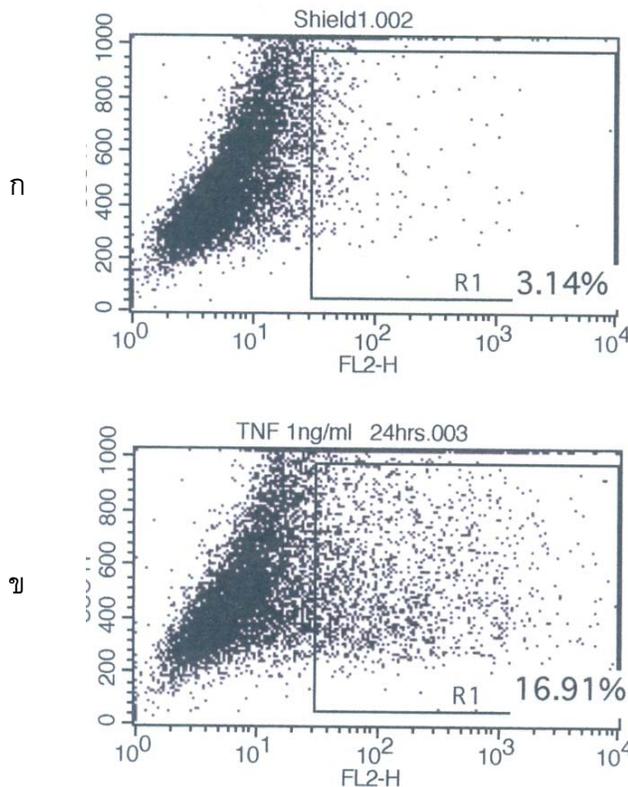


รูปที่ 11 Reporter pNFkB-hrGFP ไม่สามารถแสดงการกระตุ้น NFkB ใน keratinocyte Transfect pSV2-Thy1.1 คู่กับ pNFkB-hrGFP เข้าไปในเซลล์ keratinocyte ด้วย microporation 24 ชั่วโมงต่อมา กระตุ้นด้วย TNF- α 1 และ 5 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำเซลล์ไปย้อม anti-mouse Thy1.1-APC และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer (ก) keratinocyte ที่

ย้อมด้วย isotype control (ข) keratinocyte ที่ย้อมด้วย anti-Thy1.1-APC (ค-จ) ต่อมาเลือก เซลล์ที่มีการแสดงออก Thy1.1 ที่อยู่ใน region 1 (R1) ของ (ข) มาวิเคราะห์การแสดงออก GFP ที่ parameter FL1 จากการเปรียบเทียบ GFP ที่อยู่ใน R3 ของ keratinocyte ที่ (ค) ไม่ได้กระตุ้น พบร้อยละ 10 (ง) กระตุ้นด้วย TNF- α 1 ng/ml พบร้อยละ 10 และ (จ) กระตุ้นด้วย TNF- α 5 ng/ml มีร้อยละ 9

9. Reporter plasmid pNFKB DD tdTomato ใช้แสดงการกระตุ้น NF-KB กับ HEK และ แสดงการกระตุ้น NF-KB กับ keratinocyte ได้บ้าง

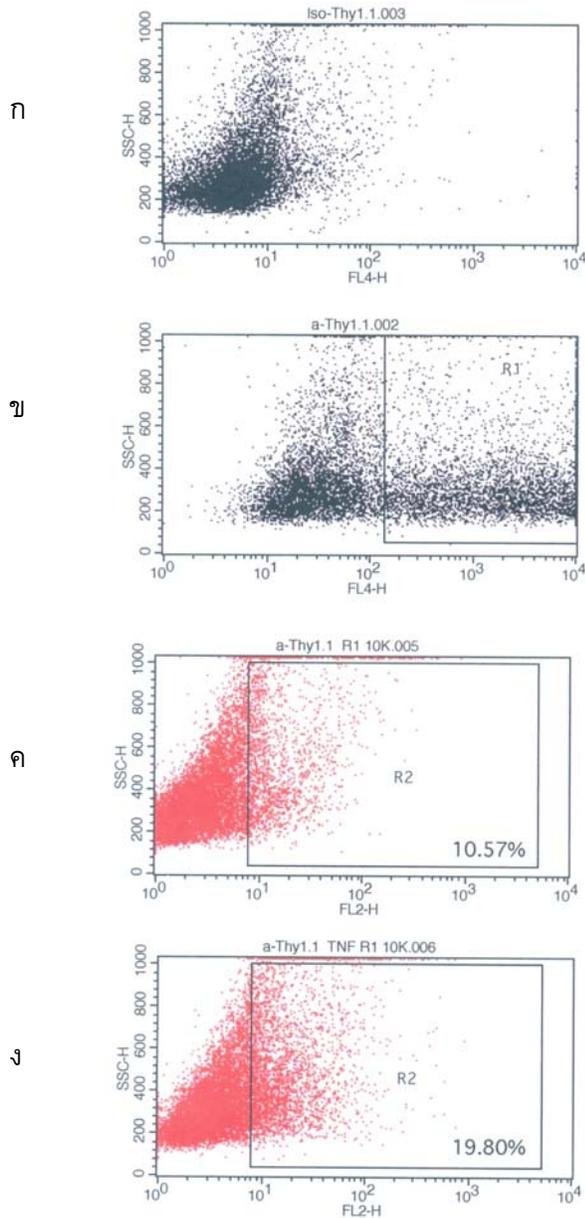
pNFKB DD tdTomato เมื่อนำไป transfect เซลล์ HEK และกระตุ้นด้วย TNF- α พบว่ามีการ แสดงออกของสารเรืองแสงมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้น (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 pNFKB DD tdTomato เป็น reporter ที่แสดงการกระตุ้น NF-KB ของเซลล์ HEK pNFKB DD tdTomato transfect และกระตุ้น HEK ด้วยวิธีเดียวกับรูปที่ 10 (ก) เซลล์ที่ไม่มีการกระตุ้นพบการเรืองแสงใน R1 ร้อยละ 3.14 (ข) เซลล์ที่กระตุ้นด้วย TNF- α 1ng/ml 24 ชั่วโมงมีการเรืองแสงใน R1 ร้อยละ 16.91

เมื่อนำ pNFKB DD tdTomato ไปทดสอบ NF-KB เบื้องต้นกับ keratinocyte พบว่าเซลล์ที่ถูก กระตุ้นด้วย TNF- α 10 ng/ml 24 ชั่วโมง มีการแสดงออกของสารเรืองแสงมากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้

กระตุ้น (รูปที่ 13) ผลการทดสอบนี้เป็น การทดสอบเบื้องต้นที่ต้องทำซ้ำและกระตุ้นด้วย Pam₃CYSK4 และ *P.acnes* ต่อไป



รูปที่ 13 Reporter pNFkB DD tdTomato แสดงการกระตุ้น NF-KB ใน keratinocyte Transfect pSV2-Thy1.1 คู่กับ pNFkB DD tdTomato เข้า keratinocyte ด้วย microporation 24 ชั่วโมงต่อมากระตุ้นด้วย TNF- α 10ng/ml อีก 24 ชั่วโมงจึงนำเซลล์มาย้อมด้วย anti-Thy1.1-APC และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer (ก) เซลล์ที่ย้อมด้วย isotype control (ข) เซลล์ที่ย้อมด้วย anti-Thy1.1 เลือกเซลล์ที่ได้รับ transfect โดยมีการแสดงออก Thy1.1 ใน R1 และนำมาวิเคราะห์ reporter plasmid tdTomato ที่ parameter FL2 (ค และ ง) (ค) เซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้นพบร้อยละ 10.57 (ง) เซลล์ที่กระตุ้นด้วย TNF- α พบร้อยละ 19.80

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. สรุป

- ยืนยันว่า keratinocyte มีการแสดงออกของ TLR2 แต่ไม่มีการแสดงออกของ TLR4
- ยืนยันว่า เชื้อ *P.acnes* สามารถกระตุ้น TLR2 โดยไม่สามารถกระตุ้น TLR4
- วิธี transfect plasmid เข้าเซลล์ keratinocyte ที่ได้ผลดีคือ microporation
- การทดสอบเบื้องต้นพบว่าวิธี microporation ด้วย reporter plasmid pNFkB DD tdTomato และ pSV2-Thy1.1 สามารถใช้ตรวจสอบการกระตุ้น NF-KB signaling ใน keratinocyte

2. วิจารณ์ผลการทดลอง

- Renilla reporter อาจจะไม่เหมาะกับเซลล์ keratinocyte
Luciferase assay ของ keratinocyte ที่ใช้ pNF-KB-Luc และ pGL4.70 [hRLuc] เป็น reporter plasmid (รูปที่ 9) ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันในแต่ละครั้งที่ทำซ้ำ อาจเป็นเพราะมีการแสดงออกที่ต่ำมากของ internal control สำหรับ transfection efficiency ซึ่งเป็น Renilla reporter ใน pGL 4.70 ประกอบกับ pNFkB-hrGFP ซึ่งเป็นยีนของสารเรืองแสงที่พัฒนามาจาก Renilla ไม่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นใน keratinocyte เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้น (รูปที่ 11) ยีนเรืองแสงของ Renilla ซึ่งมาจาก sea pansy คือปะการังอ่อนชนิดหนึ่ง อาจจะไม่สามารถแสดงออกใน keratinocyte
- การตอบสนองของ primary human cells อาจต่างกับ transformed cells ที่นิยมใช้ในการวิจัย Primary human cell ในที่นี้คือ keratinocyte อาจ会有ความแตกต่างกับ HEK ที่เป็น transformed cell line ที่นิยมใช้ในการวิจัย เนื่องจาก HEK transfect plasmid ได้ง่าย สามารถศึกษาการตอบสนองทำงานของยีนที่สนใจได้เป็นอย่างดี แต่ใน keratinocyte การ transfect ทำได้ยาก และการตอบสนองของเซลล์มองเห็นผลไม่เห็นชัดเจนเหมือนกับ HEK อาจเป็นเพราะใน primary cell มีโครงข่ายสื่อสัญญาณภายในเซลล์หลายส่วนทำงานเชื่อมโยงกัน อาจจะมีการยับยั้งการกระตุ้นที่เกินความจำเป็น หรือ keratinocyte อาจใช้สื่อสัญญาณภายในเซลล์อื่นเป็นหลักต่างจากที่พบใน HEK

3. ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

- ในการศึกษาการตอบสนองของ TLR ใน primary human keratinocyte ควรศึกษาสื่อสัญญาณภายในเซลล์อื่นนอกจาก NFkB เช่น MAPK signaling pathway

ภาคผนวก -

ผลผลิต (output) จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

เสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ 3rd Asia Pacific Dermatology Symposium, 4-5 March 2009, Pullman King Power Hotel, Bangkok, Thailand

เอกสารอ้างอิง

1. Zaenglein AL. and Thiboutot DM. Acne Vulgaris. In: Bologna JL., Jorizzo JL, Rapini RP et al. eds. *Dermatology*. Spain: Mosby Elsevier. 2008 : 495-508
2. Goulden V, Stables GI, Cunliffe WJ. Prevalence of facial acne in adults. *J Am Acad Dermatol*. 1999 Oct;41(4):577-80.
3. Zaenglein AL., Graber EM., Thiboutot DM., and Strauss JS. Acne vulgaris and acneiform eruptions. In Wolff K, Goldsmith LA., Katz SI., Gilchrist BA., Paller AS. and Leffell DJ. eds. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. New York: McGraw-Hill. 2008 :690-703
4. Thiboutot D, Knaggs H, Gilliland K, Lin G. Activity of 5-alpha-reductase and 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the infrainfundibulum of subjects with and without acne vulgaris. *Dermatology*. 1998;196:38-42.
5. Imperato-McGinley J, Gautier T, Cai LQ, Yee B, Epstein J, Pochi P. The androgen control of sebum production. Studies of subjects with dihydrotestosterone deficiency and complete androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 ;76:524-8.
6. Downing DT, Stewart ME, Wertz PW, Strauss JS. Essential fatty acids and acne. *J Am Acad Dermatol*. 1986 ;14(2 Pt 1):221-5.
7. Guy R, Green MR, Kealey T. Modeling acne in vitro. *J Invest Dermatol*. 1996;106:176-82.
8. Sanders DA, Philpott MP, Nicolle FV, Kealey T. The isolation and maintenance of the human pilosebaceous unit. *Br J Dermatol*. 1994 ;131:166-76.
9. Harris HH, Downing DT, Stewart ME, Strauss JS. Sustainable rates of sebum secretion in acne patients and matched normal control subjects. *J Am Acad Dermatol*. 1983 ;8(2):200-3.
10. Kligman AM, Wheatley VR, Mills OH. Comedogenicity of human sebum. *Arch Dermatol*. 1970 ;102(3):267-75.
11. Leyden JJ, McGinley KJ, Mills OH, Kligman AM. Propionibacterium levels in patients with and without acne vulgaris. *J Invest Dermatol*. 1975 Oct;65(4):382-4.
12. Kim J, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *J Immunol*. 2002. 169:1535-41.
13. Vowels BR, Yang S, Leyden JJ. Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*: implications for chronic inflammatory acne. *Infect Immun*. 1995 Aug;63(8):3158-65.
14. Jeremy AH, Holland DB, Roberts SG, Thomson KF, Cunliffe WJ. Inflammatory events are involved in acne lesion initiation. *J Invest Dermatol*. 2003 Jul;121(1):20-7.
15. Hwang ST. Chemonkines. In Wolff K, Goldsmith LA., Katz SI., Gilchrist BA., Paller AS. and Leffell DJ. eds. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. New York: McGraw-Hill. 2008 : 127-135
16. ข้อมูลโรคผู้ป่วยนอก 10 อันดับของสถาบันโรคผิวหนัง ปี 2550
http://inderm.go.th/nuke_802/modules.php?name=Forums&file=viewtopic&t=117
17. Ducrest AL, Amacker M, Lingner J, Nabholz M. Detection of promoter activity by flow cytometric analysis of GFP reporter expression. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jul 15;30(14):e65.