



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ PD-1 ในมอโนไซต์ และแมโครฟาจ และวิธีสัญญาณที่ควบคุม
การแสดงออก

ชื่อบิสิต นายพุทธวรรณ ศุภพฤษพงษ์ รหัสประจำตัว 5932340923

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ PD-1 ในมอโนไซต์ และแมโครฟาจ และวิถีสัญญาณที่ควบคุมการแสดงออก
PD-1 in monocytes and macrophages and its regulatory pathways

ชื่อนิสิต นายพุทธวรรณ ศุภฤกษ์พงศ์

เลขประจำตัว 5932340923


ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


หัวข้อโครงการ PD-1 ในมอโนไซต์ และแมโครฟาจ และวิธีสัญญาหน้าที่ควบคุมการ
แสดงออก
โดย นายพุทธวรรณ ศุภพฤกษ์พงศ์ เลขประจำตัวนิสิต 5932340923
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ
ปีการศึกษา 2562

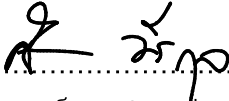
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์


..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงการ


..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชุติ ยมกัถี)


..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ศิตา วรรณกุล)

รายงานโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์

ชื่อโครงการ

PD-1 ในมอโนไซต์ และแมโครฟาจ และวิถีสัญญาณที่ควบคุมการแสดงออก
(PD-1 in monocytes and macrophages and its regulatory pathways)

นิสิตในโครงการ

นาย พุทธวรรณ ศุภพฤษพงษ์

รหัสประจำตัวนิสิต 5932340923

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	PD-1 ในมอโนไซต์ และแมโครฟาจ และวิถีสัญญาณที่ควบคุมการแสดงออก
นิสิตเสนอโครงการ	นายพุทธรธรรม์ ศุภฤกษ์พงค์ รหัสนิสิต 5932340923
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ
ภาควิชา	จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

Programed cell death 1 (PD-1) เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกในเซลล์ภูมิคุ้มกันหลายชนิด ทั้งเซลล์ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ และเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด โปรตีน PD-1 มีบทบาทสำคัญ คือการกวดการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน บทบาทของโปรตีน PD-1 มีการศึกษาอย่างมากในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที โดยเฉพะอย่างยิ่งการตอบสนองในสภาวะมะเร็ง แต่การศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์มอโนไซต์ และแมโครฟาจ ซึ่งเป็นเซลล์กลุ่มมัยอีลอยด์ ยังมีการศึกษาไม่มาก โดยมีรายงานการแสดงออกของโปรตีน PD-1 และโปรตีนตัวรับของ PD-1 คือ PD-L1 ในสภาวะโรคติดเชื้อ ทำให้องค์ความรู้เกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 และวิถีสัญญาณที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว ในเซลล์มอโนไซต์ และแมโครฟาจต้องการการศึกษาเพิ่มเติม ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 และแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจาก THP-1 ในสภาวะต่าง ๆ ได้แก่ การเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจากเซลล์ไลน์มะเร็ง การกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ ผลที่ได้พบว่าเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 มีการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในสภาวะปกติ แต่เมื่อเหนี่ยวนำให้เป็นแมโครฟาจด้วย phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) พบว่าการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ลดลง นอกจากนี้ในสภาวะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจากเซลล์ไลน์มะเร็ง พบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งไม่ส่งผลโดยตรงต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 เมื่อกระตุ้นโดยไซโตไคน์ พบว่า M-CSF และ TGF- β ทำให้การแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ลดลง ซึ่งในประเด็นดังกล่าวยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน ซึ่งองค์ความรู้นี้จะช่วยให้เข้าใจวิถีสัญญาณต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ได้มากขึ้น อีกทั้งการยับยั้งวิถีสัญญาณ PD-1/PD-L1 ด้วย BMS-1166 ไม่พบผลของการขัดขวางวิถีสัญญาณต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ผลการศึกษาที่รายงานไปข้างต้น สามารถต่อยอดในการศึกษาหน้าที่ของ PD-1/PD-L1 และการควบคุมวิถีสัญญาณ PD-1/PD-L1 ในเซลล์มอโนไซต์ และแมโครฟาจในภาวะโรคต่าง ๆ ต่อไป

Project title PD-1 in monocytes and macrophages and its regulatory pathways
Name of student Puttawat Suphaprueksapong ID No. 5932340923
Advisor Professor Tanapat Palaga
Department Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Programmed cell death 1 (PD-1) protein is expressed in many immune cells, both adaptive and innate immune cells. It is well known that PD-1 plays an important role in suppressing the function of the immune cells. Especially in T-lymphocytes, in responding to cancer cells. But the investigation of PD-1 expression in monocytes and macrophages has not yet been reported. Previous studies focused on the expression of PD-1 and its ligand, PD-L1, in infectious disease condition or cancer. However, the studies about the expression of PD-1 and its regulatory pathways in monocytes and macrophages have not been documented. Here we aimed to study the expression of PD-1 in THP-1, a human monocyte cell line, and THP-1 derived macrophage in various culture conditions including cancer conditioned mediums (CMs) and cytokine treated conditions. We found that THP-1 constitutively expressed PD-1. But when THP-1 was induced to be macrophages by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), the expression of PD-1 protein was dramatically decreased. In CMs culture condition, PD-1 expression level was not affected. Treating of THP-1 with macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and transforming growth factor beta (TGF- β) decreased PD-1 protein level which have not been reported before. Taken together, this finding revealed that PD-1 expression in THP-1 is regulated by different stimuli. Inhibition of PD-1/PD-L1 pathway by BMS-1166 inhibitor was not affected THP-1 survivability. According to our results, functional study and regulation of PD-1/PD-L1 pathway on monocytes and macrophages can be done in many disease conditions in the future.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดีเนื่องด้วยความกรุณาของ ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ผู้ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะต่าง ๆ ตลอดจนการกระตุ้นเตือนให้มีความกระตือรือร้นในการทำวิจัย ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างสูง รวมถึงคำสั่งสอนและคำแนะนำในการนำเสนอและวิธีการการถามตอบคำถาม และยังช่วยปรับปรุงแก้ไขโครงการวิจัยมาตลอดจนสำเร็จ ลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา ที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการนี้ และตัวผู้วิจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อาจารย์ ดร. ศิตา วีรกุล ที่ได้คำปรึกษาเพิ่มเติมในด้านความคิดต่อยอด ที่ได้จากการเรียนการสอนในรายวิชา 2312594 TRN TECH IMMU DIS และ อาจารย์ ดร. ธัญช ุเกรียงไกรพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาตลอด 4 ปี และเป็นผู้ให้คำแนะนำ ในการเลือกอาจารย์ที่ปรึกษาประจำโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ เครื่องมือต่าง ๆ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณเงินทุนสนับสนุนงานวิจัย ในโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ที่ได้รับจาก งบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณ พี่ ๆ และน้อง ๆ ห้องวิจัย 2015 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่สอนตั้งแต่เทคนิคเบื้องต้นในการทำปฏิบัติการวิจัย ไปจนถึงสอน และแนะนำวิธีการทำวิจัย ที่แม้จะยุ่งยากบ้าง ก็ยังให้ความช่วยเหลือเสมอมา รวมถึงการให้ความช่วยเหลืออื่น ๆ ในการทำวิจัย คำปรึกษา คำแนะนำต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้น รวมไปถึงสมาชิกห้องวิจัยอื่น ๆ ในชั้น 20 ที่เสนอความคิดเห็นช่วยเหลือในด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และเป็นกำลังใจในการทำวิจัยเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัวและเพื่อนๆ ที่ให้กำลังใจ และการสนับสนุนแก่ผู้วิจัยเสมอมา ตลอดจนถึงสุดโครงการ

พุทธวรรธน์ ศุภพลกษพงศ์

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	7
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
อุปกรณ์ที่ใช้และเคมีภัณฑ์	8
วิธีดำเนินการทดลอง	10
ผลการทดลอง	12
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	26
ภาคผนวก	30
เอกสารอ้างอิง	32

บทที่ 1

บทนำ

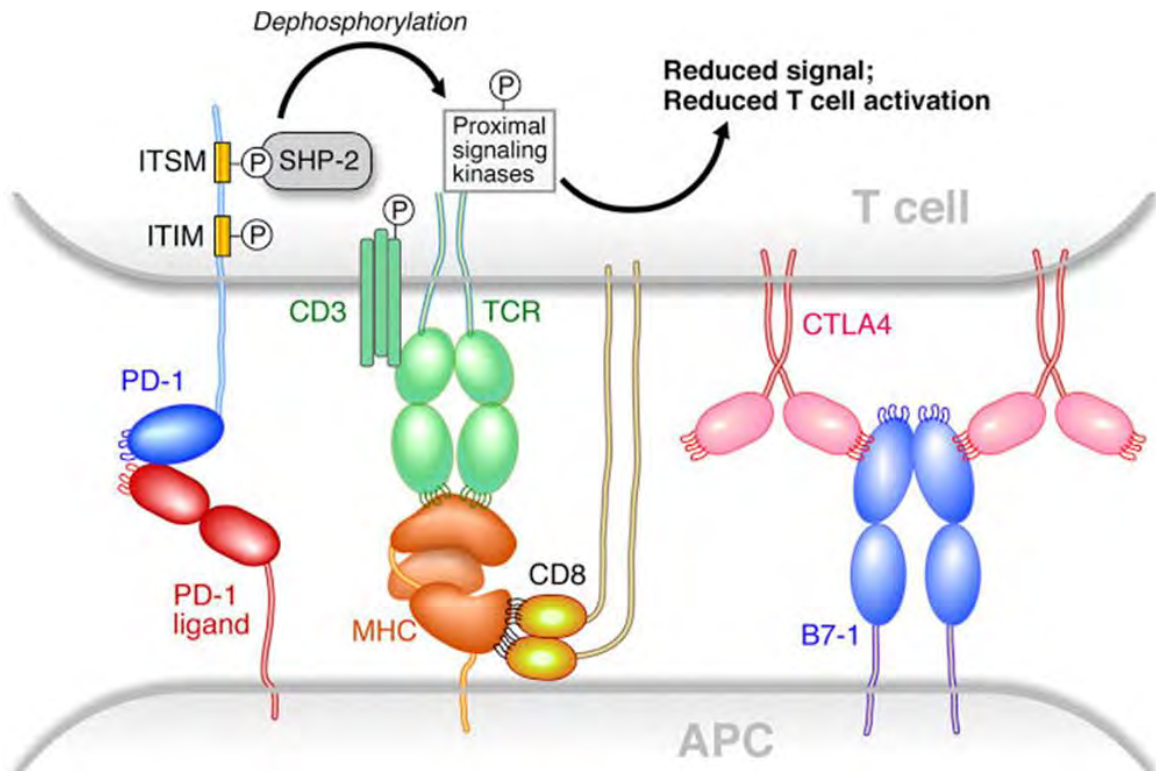
Programed cell death 1 (PD-1) และ Programed cell death 1 ligand (PD-L1)

เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะเม็ดเลือดขาวชนิดที (T lymphocyte; T cell) มีความจำเพาะต่อการทำลายสิ่งแปลกปลอม หมายถึงรวมถึงแบคทีเรีย รา ไวรัส รวมทั้งมะเร็ง กลไกการกระตุ้นการตอบสนองของเม็ดเลือดขาวชนิดที เริ่มจากการเสนอแอนติเจนโดยเซลล์เสนอแอนติเจน (antigen presenting cells; APCs) ผ่านโมเลกุล major histocompatibility complex (MHC) บน APCs ให้กับเม็ดเลือดขาวชนิดที ที่ไม่เคยเจอแอนติเจนมาก่อน (naïve T cell) จากนั้นแอนติเจนที่อยู่บน MHC จะจับกับตัวรับแอนติเจนบนเม็ดเลือดขาวชนิดที เรียกว่า T cell receptor (TCR) เรียกสัญญาณการกระตุ้นระหว่างแอนติเจนบน MHC กับ TCR ว่าสัญญาณกระตุ้นแรก โดยอาศัยโมเลกุลบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที ที่เรียกว่า CD4 หรือ CD8 เป็นตัวรับร่วม (co-receptor) แต่การกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดทีทำงานได้ ต้องอาศัยสัญญาณช่วยกระตุ้น (co-stimulatory signal) อีกสัญญาณหนึ่ง โดยสัญญาณดังกล่าวคือการจับกันระหว่างโมเลกุล B7 บน APCs กับ CD28 บนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดทีสามารถตอบสนองต่อแอนติเจนได้ (1) โดยการทำลายเซลล์เป้าหมาย หรือช่วยกระตุ้นเซลล์อื่น ๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อตอบสนองต่อแอนติเจน นั้น ๆ

ภายหลังการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดทีต่อแอนติเจน พบว่า 90-95 % ของเม็ดเลือดขาวชนิดทีที่ถูกกระตุ้นสมบูรณ์ (effector T cell) จะถูกเหนี่ยวนำให้ตายแบบ apoptosis และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดทีบางกลุ่มจะพัฒนาเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที ที่มีความทรงจำ (memory T cell) แต่ในสภาพการติดเชื้อเรื้อรัง (2) รวมไปถึงในจุลภาวะมะเร็ง (tumor microenvironment) ที่พบการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที ที่แตกต่างจากสภาพอื่น โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที มีความสามารถในการกำจัดเซลล์เป้าหมาย และกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันอื่น ๆ ต่ำลง ลดการหลั่งไซโตไคน์ที่สำคัญต่อการกำจัดสิ่งแปลกปลอม รวมทั้งภาวะพิษต่อเซลล์เอง (3, 4) เรียกภาวะดังกล่าวว่า T cell exhaustion ซึ่งภาวะดังกล่าวพบได้ในจุลภาวะมะเร็ง โดยแอนติเจนของเซลล์มะเร็งมีสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่ำ และจากปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ เช่นการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์ในจุลภาวะมะเร็ง รวมไปถึงการแสดงออกของลิแกนด์บางชนิดของเซลล์มะเร็ง (5) ที่รบกวนการส่งสัญญาณกระตุ้น ระหว่างแอนติเจนบน MHC กับ TCR เช่น การแสดงออกของ CTLA-4 ของเซลล์มะเร็ง ที่มีโครงสร้างคล้ายกับ B7 จึงสามารถจับกับ CD28 บนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที ส่งผลต่อการขาดสัญญาณช่วยกระตุ้น เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดทีจึงไม่ตอบสนองต่อแอนติเจน (6) รวมไปถึงการจับกันของ programmed cell death 1 (PD-1) บนผิว T cell ที่มีแสดงออกมากขึ้นในสภาวะ T cell exhaustion กับ programmed cell death ligand 1 (PD-L1) ส่งผลต่อการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ของ T cell ทำให้ประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันในการกำจัดเซลล์มะเร็งในร่างกายไม่ดีพอ (7)

PD-1 ประกอบด้วยส่วนนอกเซลล์ (extracellular IgV domain) บริเวณที่ยึดกับเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane region) และบริเวณภายในเซลล์ (cytoplasmic domain) ที่มี immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM) และ immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) โดยในมนุษย์ PD-1 มีความคล้ายคลึงกันในลำดับกรดอะมิโนเพียง 21 % และ 16 % เมื่อเทียบกับ CD28 และ CTLA4 ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มเดียวกัน (8) ตามลำดับ จึงอาจกล่าวได้ว่า PD-1 น่าจะเป็นโปรตีนสำคัญในกลุ่มดังกล่าว และทำหน้าที่บางอย่างแตกต่างจากโปรตีนอื่น ๆ ในกลุ่มเดียวกัน

PD-1 จัดเป็นโปรตีนในกลุ่ม CD28/B7 ที่ส่งสัญญาณลบต่อการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที เพื่อควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยการกระตุ้นสัญญาณการยับยั้งผ่านการทำงานของเอนไซม์กลุ่ม phosphatases เช่น SHP-2 แล้วจึงส่งสัญญาณผ่านบริเวณภายในเซลล์ของโปรตีน PD-1 ที่อยู่ในเซลล์ โดยใช้ ITSM ทำให้เกิดการนำหมู่ฟอสเฟตออกจากโมเลกุลตอบสนอง ในสัญญาณปลายน้ำของวิถีการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที (6)



ภาพที่ 1.1 องค์ประกอบของตัวรับ และลิแกนด์ที่เกี่ยวข้องกับสัญญาณกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที สัญญาณบวกที่กระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที คือ TCR/MHC complex และสัญญาณลบได้แก่ CTLA4/B7-1 และ PD-1/PD-L1 ซึ่งส่งสัญญาณผ่านปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟตที่ ITIM และ ITSM กระตุ้นให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตที่โปรตีนปลายน้ำในวิถีสัญญาณ ส่งผลต่อการลดการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที (9)

กลุ่มเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ที่ผิวเซลล์ นอกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที่แล้ว ยังพบการแสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบี (B lymphocytes; B cell) รวมทั้งเซลล์กลุ่มมััยอีลอยด์หลาย ๆ ชนิด เช่น แมโครฟาจ (macrophage) ซึ่งบทบาทของ PD-1 ในเซลล์ต่าง ๆ จะแตกต่างกันออกไป เช่น ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบี ที่มีการแสดงออกของ PD-1 สูง และอยู่ในบริเวณจุลภาวะมะเร็ง (tumor microenvironment) จะส่งผลต่อการกระตุ้นการเกิดมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) รวมทั้งกีดการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที่ ผ่าน IL-10-dependent pathways (10) ในส่วนของแมโครฟาจที่อยู่ร่วมกับก้อนมะเร็ง (tumor-associated macrophage; TAMs) จะมีการแสดงออกของ PD-1 สูง และส่งผลต่อประสิทธิภาพของการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) (11)

ตัวรับของโปรตีน PD-1 คือ PD-L1 และ PD-L2 โดยมีการแสดงออกที่แตกต่างกันไป PD-L1 มักมีการแสดงออกในเซลล์มะเร็ง ในขณะที่ PD-L2 มีการแสดงออกมากในเดนไดรติกเซลล์ การแสดงออกของ PD-L1 จึงถูกสนใจศึกษามากกว่า PD-L1 เดิมเชื่อว่ามีลักษณะเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ แต่ปัจจุบันมีรายงานการพบรูปแบบของ PD-L1 ในรูปนอกเซลล์ (soluble PD-L1) และรูปในเซลล์ (intracellular PD-L1) ซึ่งทำให้โครงสร้างของโปรตีน และอันตรกิริยาแตกต่างกันไป (12) เช่น soluble PD-L1 ที่มักพบในเซรัมของผู้ป่วยมะเร็ง โครงสร้างแบบดังกล่าวอาจเกิดจากการหลั่งของเซลล์มะเร็ง หรือเซลล์เสนอแอนติเจน รวมไปถึงปฏิกิริยาการตัดของเอนไซม์ที่ทำให้ส่วนของโปรตีนที่ยึดเกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ขาดออกไป (13)

มอโนไซต์ และแมโครฟาจ และการแสดงออกของ PD-1 ในมอโนไซต์ และแมโครฟาจ

มอโนไซต์ และแมโครฟาจ จัดเป็นเซลล์ในกลุ่มโมโนนิวเคลียฟาโกไซด์ หรือเรียกว่า เซลล์กลุ่มมััยอีลอยด์ ซึ่งประกอบด้วย มอโนไซต์ แมโครฟาจ และเดนไดรติกเซลล์ (dendritic cells) มอโนไซต์ พัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดในไขกระดูก (haematological precursors) จากนั้นเคลื่อนที่สู่กระแสเลือด (14) โดยทั่วไปสามารถแบ่งกลุ่มมอโนไซต์ ในเลือดออกเป็น 2 กลุ่มหลัก คือมอโนไซต์ ที่เคลื่อนที่ (patrol) ในหลอดเลือด และมีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (15) มอโนไซต์ อีกกลุ่มหนึ่ง คือกลุ่มที่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อ (16) ในมนุษย์ ปริมาณมอโนไซต์ ที่พบมีประมาณ 10 % ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด บทบาทหลักของมอโนไซต์ เกี่ยวข้องกับการเกิดฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) การเสนอแอนติเจน (antigen presentation) และการผลิตไซโตไคน์ อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นการเกิดการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) อีกด้วย (17) นอกเหนือจากหน้าที่ข้างต้น มอโนไซต์ สามารถพัฒนาไปเป็นแมโครฟาจ และเดนไดรติกเซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อได้ จึงจัดได้ว่ามอโนไซต์ เป็นที่มาที่สำคัญหนึ่งของโมโนนิวเคลียฟาโกไซด์ในเนื้อเยื่อ (18)

แมโครฟาจ เป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune cells) หน้าที่หลักของแมโครฟาจ คล้ายกับมอโนไซต์ ดังที่กล่าวไปข้างต้น โดยแมโครฟาจที่พัฒนามาจากมอโนไซต์ ในเลือดจะมีการเปลี่ยนแปลงสภาพในช่วงการอักเสบ ที่เรียกว่า inflammatory macrophages รวมไปถึงแมโครฟาจที่อยู่ในก้อนมะเร็ง (tumor associated

macrophages; TAM) ซึ่งมีที่มาจากการพัฒนาของมอโนไซต์ เช่นเดียวกัน (19) ในปัจจุบันพบว่าต้นกำเนิดของแมโครฟาจในเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ ไม่ได้มีที่มาจากการพัฒนาจากมอโนไซต์ ในเลือด อาจเรียกแมโครฟาจที่อยู่ในเนื้อเยื่อจำเพาะต่าง ๆ ว่า tissue resident macrophages ซึ่งพบว่าที่มาของแมโครฟาจในเนื้อเยื่อ พัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดในตัวอ่อน (embryonic progenitors) และจะรักษาปริมาณในเนื้อเยื่อนั้น ๆ โดยไม่ได้รับผลกระทบจากการพัฒนาของแมโครฟาจจากไขกระดูก และแมโครฟาจที่พัฒนาจากมอโนไซต์ (18) นอกจากนี้ แมโครฟาจยังเป็นเซลล์ที่มีกลุ่มประชากรย่อย โดยอาจแบ่งเป็น 2 กลุ่มหลัก คือแมโครฟาจกลุ่ม M1 และแมโครฟาจกลุ่ม M2 โดยการตอบสนองของแมโครฟาจกลุ่ม M1 ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการอักเสบ ส่วนการตอบสนองของแมโครฟาจ กลุ่ม M2 จะเกี่ยวข้องกับการต้านการอักเสบ (20)

ปัจจุบันมีการศึกษาความเกี่ยวข้องระหว่างโปรตีน PD-1 กับการทำงานของมอโนไซต์ และแมโครฟาจ ในหลายโรคติดเชื้อ เช่น จากการศึกษาในปี 2018 ของ Xia และคณะ ที่ศึกษาผลของการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) พบว่า เมื่อเทียบกับคนปกติ ผู้ป่วยมีการแสดงออกของ PD-1 ในมอโนไซต์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และการทำให้ไม่มีการส่งสัญญาณผ่านวิถีสัญญาณ PD-1 ส่งผลต่อการแสดงออกของ IL-10 และ TNF- α ในมอโนไซต์ ที่เปลี่ยนแปลงไป (21) นอกจากนี้งานวิจัยของ Pan และคณะ ในปี 2015 ยังกล่าวถึงการใช้การแสดงออกของ PD-1 ในเซลล์มอโนไซต์ เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) สำหรับทำนายการพัฒนาอาการของผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือด (22)

การแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในแมโครฟาจ มีการศึกษามาในลักษณะที่เกี่ยวข้องกับโรคติดเชื้อ เช่นเดียวกับการแสดงออกในมอโนไซต์ เนื่องจาก PD-1 มีบทบาทสำคัญในการเป็น inhibitory receptor ของเซลล์ภูมิคุ้มกัน เพื่อลดการตอบสนองที่มากเกินไป จากการศึกษาของ Hunegnaw พบว่าในผู้ป่วย HIV มักมีการติดเชื้อที่ปอดร่วมด้วย ถึงแม้จะมีการให้ยาต้านไวรัสอยู่ และแมโครฟาจในถุงลมปอด (alveolar macrophages; AMs) น่าจะมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการติดเชื้อดังกล่าว จึงมีการศึกษาในแบบจำลองการติดเชื้อ SIV ในลิง พบว่า AMs มีการแสดงออกของ PD-1 และสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณไวรัสที่เพิ่มขึ้นในเลือด และยังพบว่า AMs มีการแสดงออกของ PD-L2 ซึ่งเป็นลิแกนด์หนึ่งของ PD-1 ในระดับคงที่ตลอดช่วงการติดเชื้อ การยับยั้งวิถีสัญญาณ PD-1/PD-L2 ให้ผลลัพธ์ในการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ AMs ได้ (23)

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างมะเร็งและเซลล์ภูมิคุ้มกันในจุลภาวะมะเร็ง

มะเร็งเป็นหนึ่งในสภาวะที่แสดงถึงการกีดกันการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันอย่างชัดเจน เนื่องจากเมื่อมีการเพิ่มจำนวน หรือการแสดงออกของเซลล์ร่างกายที่ผิดปกติไป เซลล์ภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ควรจะทำหน้าที่ในการทำลายเซลล์ผิดปกติเหล่านั้น แต่เนื่องจากมะเร็งมีกลไกหลายแบบในการกีดกันการทำงาน หรือลดการตอบสนอง ของเซลล์ภูมิคุ้มกัน (24) เช่น การขาดสัญญาณกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที การมีโครงสร้างกายภาพขัดขวางการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาว การส่งสัญญาณเพื่อกีดการทำงาน และทำให้การแสดงออกของเซลล์กลุ่มต่าง ๆ เปลี่ยนไป

อาทิ การเปลี่ยนเซลล์กลุ่มมัยอีลอยด์ เป็นเซลล์กลุ่มมัยอีลอยด์ที่กดการทำงาน (myeloid-derived suppressor cells) รวมไปถึงการเพิ่มการแสดงออกของตัวรับ หรือลิแกนด์ชนิดต่าง ๆ ที่ส่งสัญญาณลบต่อการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำให้สภาวะรอบก้อนมะเร็งไม่ได้มีองค์ประกอบเพียงแค่เซลล์มะเร็งเท่านั้น แต่ประกอบด้วยเซลล์อื่น ๆ เช่น เซลล์ไฟโบรบลาสต์ รวมไปถึงเซลล์ภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ด้วย ซึ่งสภาวะดังกล่าวเรียกว่า จุลภาวะมะเร็ง (25) จุลภาวะมะเร็งนี้จะส่งเสริมการเจริญของมะเร็ง ทั้งในด้านเมตาบอลิซึม การสร้างหลอดเลือด รวมไปถึงการแพร่กระจาย และการรุกรานของมะเร็ง ในขณะที่กดการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันที่จะทำหน้าที่ทำลายก้อนมะเร็ง

โดยทั่วไปเซลล์มะเร็งมักมีการแสดงออกของลิแกนด์ของ PD-1 คือ PD-L1 ซึ่งส่งผลกับสัญญาณเชิงลบต่อเซลล์ภูมิคุ้มกัน ใน tumor microenvironment ทำให้มีการหลบหลีกจากการถูกทำลายจากระบบภูมิคุ้มกัน แต่นอกเหนือจากการแสดงออกของ PD-L1 ในมะเร็งที่ส่งผลต่อการรักษามะเร็งแล้ว เซลล์มะเร็งบางกลุ่มมีการแสดงออกของ PD-1 ซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของมะเร็งในหนูทดลองที่ไม่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive (26) ซึ่งการแสดงออกของ PD-1 และ PD-L1 ในจุลภาวะมะเร็งเหล่านี้ถูกนำไปเป็นเป้าหมายสำคัญในการรักษามะเร็งด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด (immunotherapy) โดยใช้สารยับยั้งตัวรับสัญญาณลบ (immune checkpoint inhibitors) แต่มีงานวิจัยโดย Huber และคณะ พบว่าเซลล์มะเร็งผิวหนัง มีกลไกในการกดการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันบำบัด โดยอาศัยการหลั่ง extracellular vesicles ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเซลล์กลุ่มมัยอีลอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์มอโนไซต์ เพื่อทำให้มอโนไซต์ เพิ่มการทำงานในการส่งเสริมการพัฒนาของมะเร็ง (27)

ไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของมอโนไซต์ และแมโครฟาจ และความเกี่ยวข้องกับโปรตีน PD-1

ไซโตไคน์มีความเกี่ยวข้องกับการบวกรวมการพัฒนา และการทำงานของเซลล์มอโนไซต์ และแมโครฟาจ ตั้งแต่ในอวัยวะสร้างเซลล์ภูมิคุ้มกัน โดยเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์กลุ่มมัยอีลอยด์จะถูกกระตุ้นด้วย granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) และ interleukin-3 (IL-3) หรือการกระตุ้นการทำงานของแมโครฟาจโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที่ 3 ก็อาศัยผลของ Interferon gamma (IFN- γ) โดยไซโตไคน์ที่จะกล่าวถึงต่อไปนี้เป็นกลุ่มไซโตไคน์ที่ใช้ในการทดลอง และมีความสัมพันธ์กับการพัฒนาของเซลล์มอโนไซต์ และแมโครฟาจ ประกอบด้วย IFN- γ และ macrophage colony stimulating factor (M-CSF) ส่งผลต่อการพัฒนาของมอโนไซต์ เป็นแมโครฟาจกลุ่ม M1 ในขณะที่ Interleukin-4 (IL-4) และ Interleukin-13 (IL-13) ที่ทำให้มอโนไซต์ พัฒนาเป็นเซลล์แมโครฟาจกลุ่ม M2 (28) นอกจากนี้ Transforming growth factor beta (TGF- β) ซึ่งเป็นไซโตไคน์กลุ่มด้านการอักเสบ จะให้ผลการกดการทำงานของมอโนไซต์ และทำให้มีการพัฒนาเป็นแมโครฟาจกลุ่ม M2 ด้วยเช่นกัน (29)

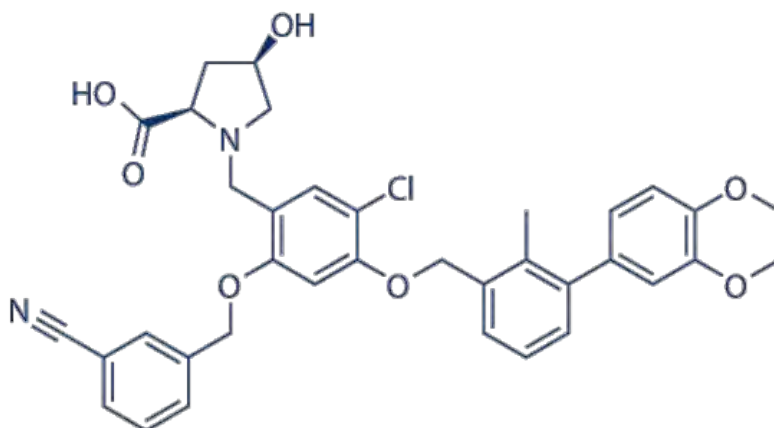
นอกจากความเกี่ยวข้องของไซโตไคน์กับการควบคุมการทำงานของพื้นฐานของมอโนไซต์ และแมโครฟาจ ยังมีงานวิจัยกล่าวถึงความเกี่ยวข้องของไซโตไคน์ต่อวิถีสัญญาณ และการแสดงออกของโปรตีน PD-1 เช่นงานวิจัยของ Audrey L. Kinter กล่าวถึงผลของไซโตไคน์กลุ่ม gamma chain โดยไซโตไคน์กลุ่มดังกล่าวมีบทบาทในการ

เพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที แต่ในขณะเดียวกันก็ทำให้การแสดงออกของ PD-1 เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ไซโตไคน์กลุ่มดังกล่าวยังมีผลทางอ้อม ทำให้เพิ่มการแสดงออกของ PD-L1 และ PD-L2 ในเซลล์กลุ่มมัยอีลอยด์อีกด้วย (30) แต่ไซโตไคน์กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของมอโนไซต์ และแมโครฟาจที่กล่าวไปข้างต้น ยังไม่มีการศึกษาผลต่อการแสดงออกของ PD-1 และ PD-L1 อย่างชัดเจน

สารยับยั้งวิถีสัญญาณ PD-1/PD-L1

แนวคิดเบื้องต้นของการใช้สารยับยั้งวิถีสัญญาณ PD-1/PD-L1 เริ่มต้นในการใช้รักษามะเร็งโดยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด ดังที่กล่าวไปข้างต้น การใช้แอนติบอดีต่อ PD-1 หรือ PD-L1 เพื่อทำให้การส่งสัญญาณระหว่างเซลล์มะเร็งกับเซลล์ภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ในมะเร็งเป็นไปตามปกติ และเซลล์ภูมิคุ้มกันสามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ การศึกษาผลของการยับยั้งการทำงานของ PD-1 และ PD-L1 ในหนูเมาส์ พบว่าการยับยั้งโปรตีนดังกล่าวส่งผลต่อการควบคุมการเจริญของมะเร็งหลายชนิด เช่นในหนูที่เป็นมะเร็งชนิด squamous cell carcinoma เมื่อได้รับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที ที่จำเพาะกับมะเร็ง และตามด้วยการฉีดมอโนโคลนอลแอนติบอดี (mAb) ต่อ PD-L1 สามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดของหนูได้ รวมทั้งในหนูที่เป็นมะเร็งผิวหนังชนิด B16 การให้แอนติบอดีที่ยับยั้ง PD-1 และ CTLA-4 ร่วมกัน ทำให้อัตราการรอดของหนูเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (31) นอกจากรายงานการให้ mAbs ต่อ PD-1 ที่มุ่งเป้าต่อการขัดขวางการจับกันของ PD-1 จากเซลล์เม็ดเลือดขาว กับ PD-L1 ในเซลล์มะเร็งแล้ว ยังพบว่าในผู้ป่วยที่มะเร็งมีความสามารถในการแสดงแอนติเจนต่ำ ซึ่งโดยทั่วไปมักไม่ตอบสนองต่อการรักษาแบบภูมิคุ้มกันบำบัด การให้ mAbs ต่อ PD-1 ให้ผลการรักษาที่ดี ซึ่งเกิดจากผลการทำงานในการกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที ทำงานปกติ และการยับยั้งกระบวนการพัฒนาของเซลล์มะเร็งด้วยกลไกภายในของมะเร็งเอง (26) ปัจจุบันมีการพัฒนาสารยับยั้งวิถีสัญญาณ PD-1/PD-L1 อีกหลายชนิด โดยเฉพาะการพัฒนาสารยับยั้งที่เป็นสารเคมีขนาดเล็ก (small molecule drug) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสารยับยั้งวิถีสัญญาณให้ดีขึ้น ตัวอย่างสารประเภทดังกล่าว อาจจัดแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ตามโครงสร้างทางเคมี อาทิ สารกลุ่มเปปไทด์ และอนุพันธ์ของสารกลุ่มเปปไทด์ (peptidomimetics) เช่น AUNP-12 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด B16-F10 นอกจากนี้มีการพัฒนาสารยับยั้งโดยการปรับโครงสร้างทางเคมีของ AUNP-12 เพื่อหาสารที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัดมากขึ้น สารยับยั้งอีกกลุ่มหนึ่ง คือสารยับยั้งที่ไม่มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ สารกลุ่มดังกล่าวเริ่มถูกพัฒนาโดย Sharpe และคณะ ในปี 2011 ประกอบด้วย sulfamonomethoxines และ

sulfamethizoles ซึ่งแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งไวรัสสัญญาณได้ อีกทั้งไม่แสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ และมีการพัฒนาต่อโดยบริษัทต่าง ๆ จนถึงปัจจุบัน (32)



ภาพที่ 1.2 โครงสร้างทางเคมีของ BMS-1166 (Selleckchem, USA)

สารยับยั้งไวรัสสัญญาณที่สนใจในงานวิจัยชิ้นนี้คือ BMS-1166 โดยบริษัท Bristol-Myers Squibb ที่จะจับกับ PD-L1 และขัดขวางการจับกับ PD-1 ผลการศึกษาเบื้องต้นของการใช้ยาดังกล่าว สามารถเพิ่มการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที ที่มีการแสดงออกของโปรตีน PD-1 แบบ in vitro อีกทั้งยังสามารถจับกับ PD-L1 บนที่แสดงออกบนผิวเซลล์ได้ ซึ่งสารดังกล่าวอาจสามารถใช้ในการเป็นยาใช้ทางปาก สำหรับภูมิคุ้มกันบำบัดได้ (33)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 และแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจาก THP-1
2. เพื่อศึกษาผลของการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ต่อการทำงานของเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 และแมโครฟาจ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

รู้กลไกการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์มอโนไซต์ และแมโครฟาจ เพื่อประยุกต์ใช้ในการหาทกลไกการก่อโรค และการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับไวรัสสัญญาณของ PD-1/PD-L1

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ทิวป์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 0.5, 1.5 มิลลิลิตร
2. หลอด falcon ขนาด 15, 50 มิลลิลิตร
3. ไมโครปิเปต ขนาด 2, 20, 200, 1,000 ไมโครลิตร
4. ปิเปตทิป (pipette tips) ขนาด 0.5-10, 200, 1,000 ไมโครลิตร
5. จานเพาะเชื้อ
6. เครื่องซังสาร รุ่น L2220 P (Scientific promotion)
7. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 (Tomy, Japan)
8. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น BV-124 (ISSCO)
9. ตู้เย็น (refrigerator) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (MITSUBISHI, Japan)
10. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (SHARP, Japan)
11. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
12. เครื่องทำน้ำแข็ง รุ่น OF 146 (Newton, Thailand)
13. หลอด cryovial (SPL Life Sciences, Korea)
14. ฮีโมไซโตมิเตอร์ (ISOLAB Laborgerate GmbH, Germany)
15. ที่วางหลอดทดลอง (test tube rack)
16. เครื่องอ่านไมโครเพลท รุ่น Anthos 2010 (Biochrom Ltd, England)
17. เครื่องชั่งรุ่น PG6002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
18. อ่างควบคุมอุณหภูมิ บริษัท memmert, Germany
19. กล้องจุลทรรศน์รุ่น OLYMPUS CKX3-SLP (OLYMPUS, Japan)
20. ขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีฝาปิดตัวกรองขนาด 25 ซม² (Thermo Fisher Scientific, USA)
21. จานเลี้ยงเซลล์ขนาด 12 และ 24 หลุม บริษัท
22. ตู้บ่มเซลล์ที่มีการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide incubator) รุ่น 311 (Thermo Electron Corporation, USA)
23. ชุดเครื่องมือทำ SDS-PAGE
24. ชุดเครื่องมือทำ semi-dry electrophoretic transfer
25. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane
26. เครื่องอ่านแถบโปรตีน

27. กระบอกลดขนาดยา ขนาด 10 มิลลิลิตร บริษัท

28. แผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร บริษัท

เคมีภัณฑ์

1. Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High glucose medium (DMEM) บริษัท Hyclone, USA
2. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium บริษัท Hyclone, USA
3. Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) บริษัท ATCC, USA
4. Fetal Bovine Serum (FBS) บริษัท Gibco Laboratories, USA
5. Gentamycin บริษัท Gibco Laboratories, USA
6. Sodium pyruvate บริษัท Hyclone, USA
7. HEPES บริษัท Hyclone, USA
8. 2-Mercaptoethanol สำหรับเลี้ยงเซลล์
9. Dimethylsulfoxide (DMSO) บริษัท Sigma-Aldrich, England
10. MTT reagent บริษัท Sigma-Aldrich, England
11. เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethanol) บริษัท Merck KGaA, Germany
12. เมทิลแอลกอฮอล์ (Methanol) บริษัท Merck KGaA, Germany
13. Trypsin-EDTA บริษัท Gibco Laboratories, USA
14. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride; NaCl) EMSURE® บริษัท Merck KGaA, Germany
15. โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride; KCl) EMSURE® บริษัท Merck KGaA, Germany
16. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-Sodium hydrogen phosphate; Na₂HPO₄) EMSURE® บริษัท Merck KGaA, Germany
17. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate; KH₂PO₄) EMSURE® ของบริษัท Merck KGaA, Germany
18. สีย้อมทริปแพนบลู 0.4% (Trypan blue) บริษัท Gibco™ Laboratories, USA
19. Cumeric บริษัท Sigma-Aldrich, England
20. Luminol บริษัท Sigma-Aldrich, England

วิธีดำเนินการทดลอง

การเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ในอาหาร Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium ที่เติม 10% Fetal Bovine Serum (FBS) ในภาชนะ T25 Flask ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และทำให้เป็นแมโครฟาจ โดยการกระตุ้นเซลล์ THP-1 ด้วย phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) ความเข้มข้น 185 ng/mL (34) ในอาหาร RPMI medium ที่เติม 10% Fetal Bovine Serum (FBS) ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 12 หลุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การตรวจสอบการแสดงออกของ PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 และแมโครฟาจ โดยวิธี Western blot

เลี้ยงเซลล์ THP-1 และเซลล์แมโครฟาจ ในอาหาร RPMI medium ที่เติม 10% Fetal Bovine Serum (FBS) ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 12 หลุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นสกัดโปรตีนจากเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ RIPA วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA นำโปรตีนที่ได้มาทำ SDS-PAGE จากนั้นย้ายโปรตีนลงบนแผ่นเมมเบรนด้วยการใช้ไฟฟ้า แล้วทำ Western blot โดยใช้แอนติบอดีปฐุมภูมิ คือ purified anti-human CD279 (PD-1) antibody (BioRad) และใช้แอนติบอดีทุติยภูมิ Rabbit anti mouse antibody ติดฉลาก HRP จากนั้นตรวจสอบสัญญาณของโปรตีนโดยวิธี chemiluminescence โดยการใช้ beta-actin เป็นโปรตีนมาตรฐาน

การตรวจสอบผลของอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ต่อการแสดงออกของ PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 และแมโครฟาจ โดยวิธี Western blot

เลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็ง 4 ชนิด ประกอบด้วย HepG2, MDA-MB-231, A549 และ HeLa ในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่เติม 10% FBS สำหรับ HepG2 และ MDA-MB-231 และ Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ที่เติม 10% FBS สำหรับ A549 และ HeLa ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (Conditioned medium) มากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 um และนำอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็งที่กรองแล้ว มาเลี้ยงเซลล์ THP-1 และแมโครฟาจ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นสกัดโปรตีน และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ด้วยวิธี Western blot

การตรวจสอบผลของไซโตไคน์ ต่อการแสดงออกของ PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 และแมโครฟาจ โดยวิธี Western blot

กระตุ้นเซลล์ THP-1 และแมโครฟาจ ด้วย Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-13 (IL-13), Interferon gamma (IFN- γ), Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) และ Transforming growth factor

beta (TGF- β) ที่ความเข้มข้น 100 ng/mL สำหรับ IL-4 และ IL-13 ความเข้มข้น 10 ng/mL สำหรับ IFN- γ และ TGF- β และความเข้มข้น 50 ng/mL สำหรับ M-CSF ภายหลังกระตุ้นเซลล์ 48 ชั่วโมง แล้วสกัดโปรตีน และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ด้วยวิธี Western blot

การคำนวณความเข้มเชิงปริมาณของแถบโปรตีนในวิธี Western blot

การคำนวณความเข้มของแถบโปรตีนเชิงปริมาณ ที่ได้จากวิธี Western blot เป็นไปตามวิธีอ้างอิงของ Diamantina Institute ของ The University of Queensland ในหัวข้อ Using ImageJ to quantify blots (35) โดยมีวิธีการคำนวณที่ผู้วิจัยใช้คือ ใช้โปรแกรม ImageJ (NIH, USA) สร้างพื้นที่ปิดล้อมแถบโปรตีนที่สนใจ จากนั้นโปรแกรมแสดงภาพแท่งความถี่ (histogram) ที่สร้างจากความแตกต่างความเข้มของแถบโปรตีนกับพื้นที่ว่างในพื้นที่ปิดล้อมที่สร้างขึ้น จากนั้นโปรแกรมคำนวณพื้นที่ใต้กราฟของภาพแท่งความถี่ นำพื้นที่ใต้กราฟของแถบโปรตีนแต่ละแถบที่สนใจ หาค่าด้วยพื้นที่ใต้กราฟของแถบโปรตีนควบคุมของชุดการทดลองเดียวกัน และคำนวณให้สัดส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของโปรตีนที่สนใจต่อโปรตีนควบคุมของชุดการทดลองควบคุม นั่นคือไม่ถูกกระตุ้นหรือไม่ถูกเหนี่ยวนำ มีค่าเท่ากับ 1 ค่าสัดส่วนของพื้นที่ใต้กราฟแถบโปรตีนที่สนใจต่อแถบโปรตีนควบคุมของชุดการทดลองอื่น ๆ จะนำมาคำนวณเทียบกับชุดการทดลองควบคุม

การทดสอบความเป็นพิษของ PMA และ BMS-1166 ด้วยวิธี MTT

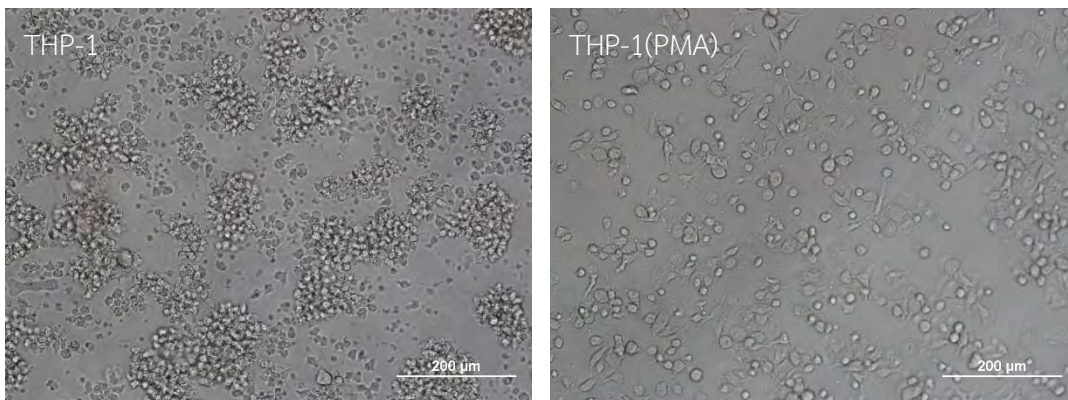
หยอดเซลล์ใน 96-well plate ปริมาณ 10^3 เซลล์ต่อ 100 μ l ในอาหาร RPMI/10% FBS/1% Gentamycin พร้อมกับเติม PMA ที่ความเข้มข้นต่าง (5, 10, 50, 100 และ 200 ng/ μ l) หรือ BMS-1166 ที่ความเข้มข้นต่าง (2, 6.33, 20, 63.25 และ 200 nM) โดยมี DMSO เป็นชุดควบคุม หลังจากบ่มไว้ 24 และ 48 ชั่วโมง จึงจะนำเซลล์มาตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี MTT assay โดยการนำเพลทที่ต้องการทดสอบมาเติมสาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (5 mg/ml) ลงไป 10 μ l ต่อหลุม หลังจากนั้นบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO 100 μ l หลังจากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วยเครื่อง MULTISKAN FC microplate reader (Thermo Fisher scientific, Massachusetts, USA) แล้วนำไปหาค่า cell viability โดยใช้อาหารเปล่าเป็น blank ด้วยสูตร (% cell viability = ((abs. of treated cells) - (abs. of blank)) / ((abs. of vehicle cells) - (abs. of blank)) \times 100))

บทที่ 3

ผลการทดลอง

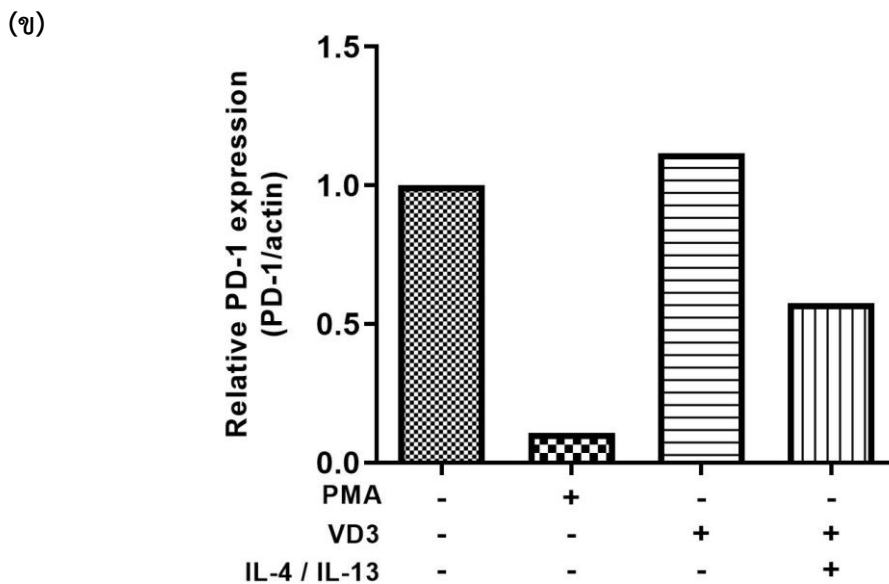
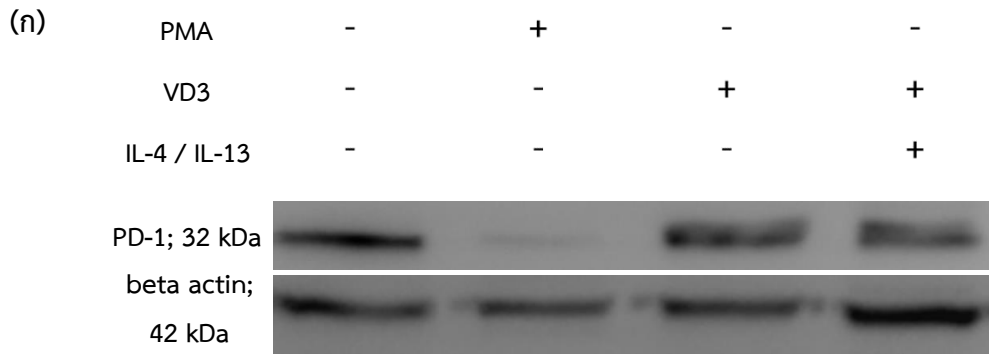
3.1 การแสดงออกของ PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 และแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจากมอโนไซต์ THP-1

เลี้ยงเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 และแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจากมอโนไซต์ THP-1 ด้วย PMA (185 ng/mL) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (34) แสดงลักษณะทางสัณฐานของเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 และแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจากมอโนไซต์ THP-1 ด้วย PMA ลักษณะเซลล์เป็นดังภาพที่ 3.1.1 กล่าวคือเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 มีลักษณะเซลล์กลม ลอย อยู่รวมกันเป็นกลุ่มเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในส่วนของแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจากมอโนไซต์ THP-1 มีริยางค์รอบเซลล์ และเกาะติดกับจานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเก็บโปรตีนจากเซลล์หลังจากเหนี่ยวนำเพื่อศึกษาการแสดงออกของ PD-1 พบว่าแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจากมอโนไซต์ THP-1 ด้วย PMA มีการแสดงออกของ PD-1 ลดลง เมื่อเทียบกับเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำ THP-1 ที่ถูกเหนี่ยวนำเป็นแมโครฟาจด้วย VD3 หรือ VD3 และ IL-4 และ IL-13 อย่างชัดเจน แต่แมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจากมอโนไซต์ THP-1 ด้วย VD3 พบว่าไม่มีความแตกต่างของระดับโปรตีน PD-1 กับเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ส่วนในชุดการทดลองที่เหนี่ยวนำ THP-1 เป็นแมโครฟาจด้วย VD3 ที่กระตุ้นด้วย IL-4 และ IL-13 พบว่ามีการแสดงออกของ PD-1 ลดลงเล็กน้อย ดังภาพที่ 3.1.2



ภาพที่ 3.1.1 ลักษณะทางสัณฐานที่แตกต่างกันของเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 และแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจากมอโนไซต์ THP-1

แสดงลักษณะทางสัณฐานของเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 โดยเซลล์ลอย อยู่รวมเป็นกลุ่มหลายกลุ่ม (ภาพซ้าย) และแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจากมอโนไซต์ THP-1 ด้วย PMA (185 ng/mL) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์มีริยางค์เกาะติดกับจานเลี้ยงเชื้อ ไม่รวมกันเป็นกลุ่ม (ภาพขวา)

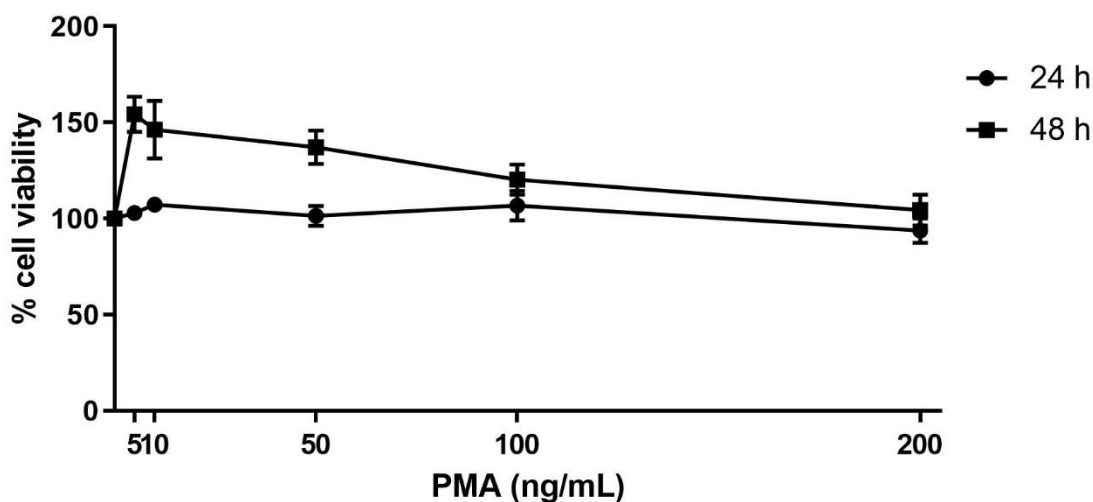


ภาพที่ 3.1.2 ระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจากมอโนไซต์ THP-1

(ก) แสดงแถบโปรตีน PD-1 ขนาด 32 kDa ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 และแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจากมอโนไซต์ด้วยวิธีต่าง ๆ และโปรตีน beta actin ขนาด 42 kDa (โปรตีนควบคุม; loading control) (ข) แสดงปริมาณการแสดงออกของโปรตีน PD-1 แบบสัมพันธ์ โดยเทียบความเข้มของแถบโปรตีน PD-1 กับ beta actin ในชุดการทดลองเดียวกัน คำนวณด้วยโปรแกรม ImageJ และ GraphPad Prism 5.03 และกำหนดให้การแสดงออกของโปรตีน PD-1 ใน THP-1 ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำเป็นแมโครฟาจมีค่าการแสดงออกสัมพันธ์เท่ากับ 1

3.2 ผลของ PMA ต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1

จากผลการทดลองก่อนหน้าซึ่งพบว่าการเหนี่ยวนำเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ให้เป็นแมโครฟาจด้วย PMA ทำให้ระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ลดลง เพื่อตรวจสอบว่าการลดลงของโปรตีน PD-1 ไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการอยู่รอดของเซลล์ที่ได้รับ PMA จึงทดสอบผลของ PMA ต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ด้วยวิธี MTT โดยเลี้ยงเซลล์ THP-1 แล้วกระตุ้นด้วย PMA ที่ความเข้มข้น 5, 10, 50, 100 และ 200 ng/mL เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากผล MTT พบว่า PMA ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ และไม่ทำให้เซลล์ตาย และพบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ด้วย PMA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการอยู่รอดของเซลล์ที่ได้รับ PMA ความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่แตกต่างจากที่ไม่ได้รับ PMA มากนัก และไม่ทำให้การอยู่รอดของเซลล์ลดลง ดังเส้นผ่านจุดในภาพที่ 3.2.1 และเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย PMA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่กระตุ้นด้วย PMA ที่ทุกความเข้มข้น ทำให้เซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 มีการอยู่รอดสูงกว่าเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ที่ไม่ได้รับ PMA แสดงด้วยเส้นผ่านสี่เหลี่ยมดังภาพที่ 3.2.1 การที่เซลล์มีการอยู่รอดสูงขึ้น

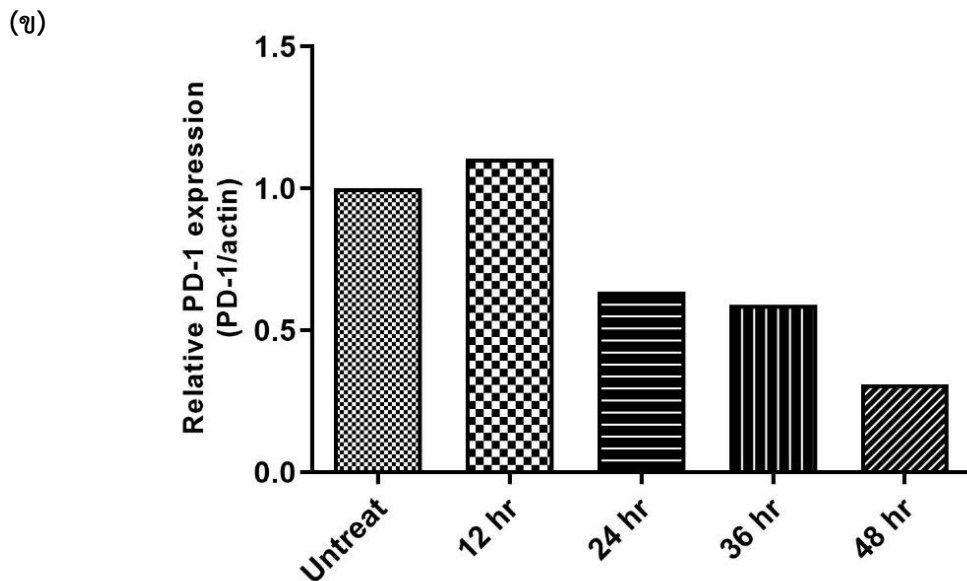
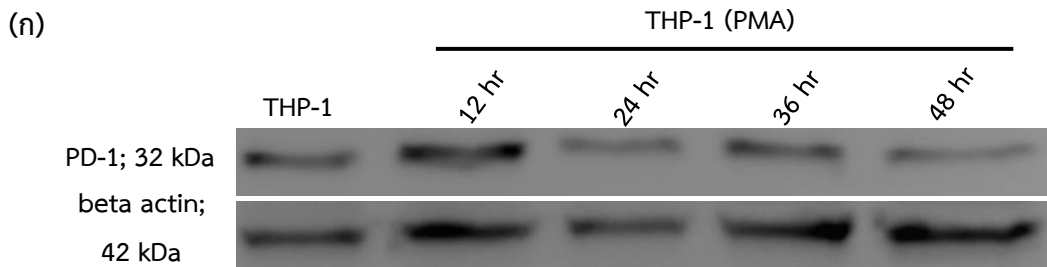


ภาพที่ 3.2.1 การอยู่รอดของเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA

แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ THP-1 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay คำนวณด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.03 โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ (technical replicate)

3.3 ระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ที่เปลี่ยนแปลงไปตามเวลาเมื่อได้รับ PMA

ระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ที่ลดลงหลังจากเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ถูกกระตุ้นด้วย PMA ตามการทดลองที่ 3.1 พิจารณาที่ 1 ช่วงเวลา คือ 48 ชั่วโมง ผู้วิจัยจึงสนใจการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ที่ช่วงเวลาอื่น ๆ เพื่อระบุว่าการลดลงของระดับโปรตีน PD-1 ขึ้นกับเวลาหรือไม่ จึงเลี้ยงเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 และกระตุ้นด้วย PMA (185 ng/mL) เป็นเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน PD-1 พบว่า โปรตีน PD-1 เริ่มมีการแสดงออกลดลงเมื่อเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ถูกกระตุ้นด้วย PMA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเวลา 48 ชั่วโมงหลังจากกระตุ้นเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ด้วย PMA จะพบระดับการแสดงออกของ PD-1 ที่ต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับเวลาอื่น ๆ จึงอาจสรุปว่าการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ลดลงตามเวลา ดังภาพที่ 3.3.1



ภาพที่ 3.3.1 การแสดงออกของ PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA

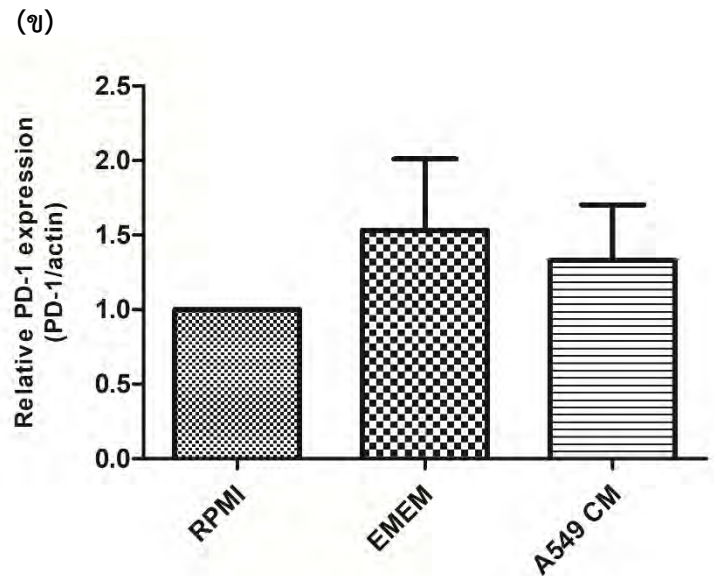
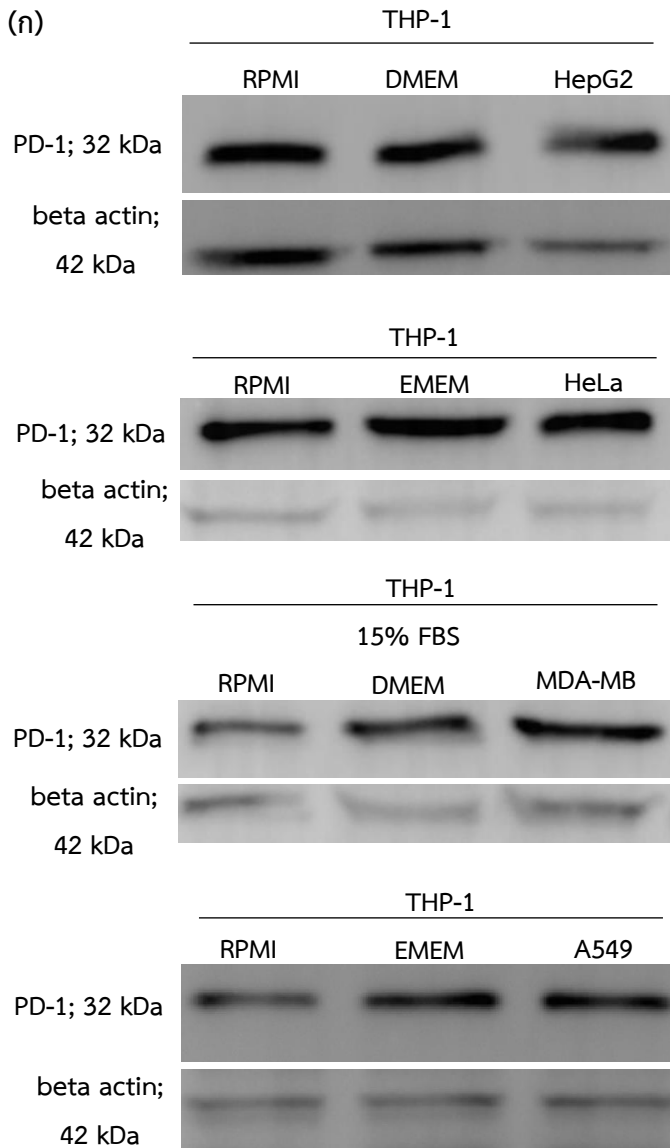
(ก) แสดงแถบโปรตีน PD-1 ขนาด 32 kDa ใน THP-1 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA (185 ng/mL) เป็นเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง และโปรตีน beta actin ขนาด 42 kDa (loading control) (ข) แสดงปริมาณการแสดงออกของโปรตีน PD-1 แบบสัมพัทธ์ โดยเทียบความเข้มของแถบโปรตีน PD-1 กับ beta actin ในชุดการทดลองเดียวกัน คำนวณด้วยโปรแกรม ImageJ และ GraphPad Prism 5.03 และกำหนดให้การแสดงออกของโปรตีน PD-1 ใน THP-1 ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำเป็นแมโครฟาจมีค่าการแสดงออกสัมพัทธ์เท่ากับ 1

3.4 การแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 และแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจากมอโนไซต์ด้วย PMA ภายใต้การมีอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

3.4.1 การแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ภายใต้การมีอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

จากงานวิจัยก่อนหน้าของ Huber และคณะ ซึ่งพบว่าเซลล์มะเร็งอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์มอโนไซต์ ผ่านสารต่าง ๆ ที่เซลล์มะเร็งหลั่งออกมา ผู้วิจัยจึงสนใจผลของอาหารที่เก็บได้จากการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (cancer-conditioned media) โดยมุ่งศึกษาที่ระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ซึ่งเดิมเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 มีการแสดงออกอยู่แล้ว จึงเลี้ยงเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ในอาหารที่เก็บได้จากการเลี้ยงเซลล์มะเร็งจากเซลล์ไลน์มะเร็ง 4 ชนิด คือ HepG2 (มะเร็งตับ), HeLa (มะเร็งปากมดลูก), MDA-MB-231 (มะเร็งเต้านม) และ A549 (มะเร็งปอด) พบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็งที่เก็บได้จากการเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็ง HepG2 และ MDA-MB ทำให้การแสดงออกของ PD-1 ใน THP-1 เพิ่มขึ้น และผลเป็นเช่นเดียวกับระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 เมื่อเลี้ยงเซลล์ไลน์ THP-1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ A549 ซึ่งระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ใน THP-1 ที่เลี้ยงในอาหารที่เก็บได้จากการเลี้ยงเซลล์ไลน์ A549 สูงกว่าในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ซึ่งระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 แบบสัมพัทธ์ แสดงดังภาพที่ 3.4.1.1 (ข) แต่เมื่อพิจารณาระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ใน THP-1 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็ง HeLa ไม่พบความแตกต่างของระดับการแสดงออกโปรตีน PD-1 ในทุกชุดการทดลอง ดังภาพที่ 3.4.1.1

เมื่อพิจารณาระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์มะเร็ง (culture media) พบว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์มะเร็ง คือ 10% FBS DMEM (สำหรับเซลล์ไลน์มะเร็ง HepG2) 15% FBS DMEM (สำหรับเซลล์ไลน์มะเร็ง MDA-MB) และ 10% FBS EMEM (สำหรับเซลล์ไลน์มะเร็ง A549) พบการแสดงออกของ PD-1 สูงกว่าในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 เช่นเดียวกับระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้จากการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ในภาพที่ 3.4.1.1 จึงอาจสรุปได้ว่าการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ไม่ได้เกิดจากผลของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้จากการเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งโดยตรง



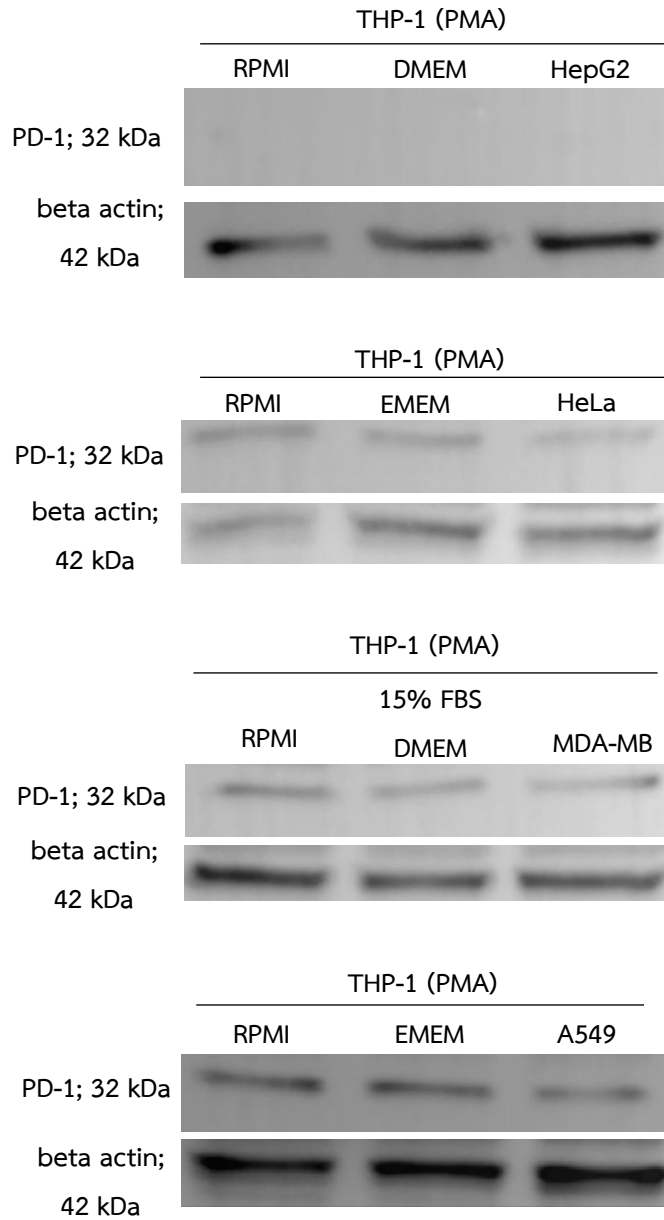
ภาพที่ 3.4.1.1 ระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ที่เลี้ยงในอาหารที่เก็บได้จากการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

(ก) แสดงแถบโปรตีน PD-1 ขนาด 32 kDa ใน THP-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เก็บได้จากการเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด คือ HepG2, HeLa, MDA-MB และ A549 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และโปรตีน beta actin ขนาด 42 kDa (loading control) (ข) แสดงปริมาณการแสดงออกของโปรตีน PD-1 แบบสัมพัทธ์ โดยเทียบความเข้มของแถบโปรตีน PD-1 กับ beta actin ในการเลี้ยงเซลล์ไลน์ THP-1 กับอาหารที่เก็บได้จากการเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็ง A549 คำนวณด้วยโปรแกรม ImageJ และ GraphPad Prism 5.03 และกำหนดให้การแสดงออกของโปรตีน PD-1 ใน

THP-1 ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำเป็นแมโครฟาจมีค่าการแสดงออกสัมพัทธ์เท่ากับ 1 (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ กราฟแสดงค่าเฉลี่ย +/- ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

3.4.2 การแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจากมอโนไซต์ด้วย PMA ภายใต้การมีอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

นอกจากการศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ที่อาจเปลี่ยนแปลงไปในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ที่เลี้ยงในอาหารที่เก็บได้จากการเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็ง จากงานวิจัยก่อนหน้าของ Gordon และคณะ พบว่าแมโครฟาจที่อยู่ร่วมกับเซลล์มะเร็ง จะมีประชากรที่มีการแสดงออกของ PD-1 เพิ่มขึ้น (11) ผู้วิจัยจึงสนใจผลของอาหารที่เก็บได้จากการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำด้วย PMA จึงเลี้ยงเซลล์ไลน์ THP-1 แล้วเหนี่ยวนำเป็นแมโครฟาจด้วย PMA (185 ng/mL) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเลี้ยงเซลล์แมโครฟาจต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้จากเซลล์ไลน์มะเร็งที่กล่าวไปข้างต้น พบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด ไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในแมโครฟาจ กล่าวคือระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในชุดการทดลองที่เลี้ยงเซลล์แมโครฟาจในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้จากการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ไม่แตกต่างจากระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในแมโครฟาจที่เลี้ยงใน 10% FBS RPMI ซึ่งเป็นชุดควบคุม ดังภาพที่ 3.4.2.1 จึงอาจสรุปได้ว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้จากการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ไม่ส่งผลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ที่เปลี่ยนแปลงไปในแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำด้วย PMA จากเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1

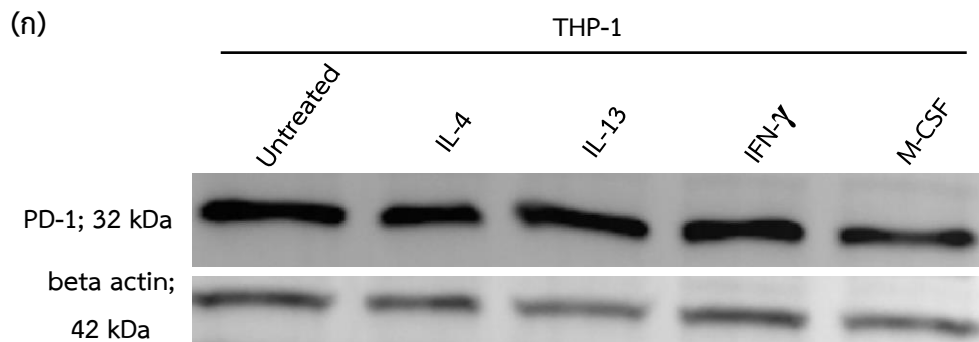


ภาพที่ 3.4.2.1 ระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 เมื่อเลี้ยงแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจากเซลล์ไลน์มอโนไซต์ด้วย PMA ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้จากเซลล์มะเร็ง

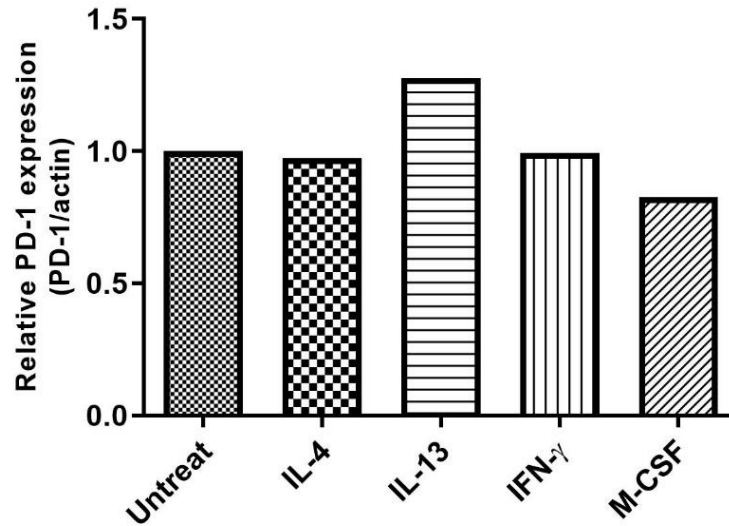
แสดงแถบโปรตีน PD-1 ขนาด 32 kDa ใน THP-1 ที่เหนี่ยวนำเป็นแมโครฟาจด้วย PMA และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด คือ HepG2, HeLa, MDA-MB และ A549 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และโปรตีน beta actin ขนาด 42 kDa (loading control)

3.5 การแสดงออกของ PD-1 ในเซลล์ไลน์ THP-1 และแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำด้วย PMA ภายใต้การกระตุ้นด้วยไซโตไคน์

ไซโตไคน์เป็นสารเคมีที่เซลล์สร้างขึ้น และมีผลต่อการแสดงออกของยีน และโปรตีนต่าง ๆ มีการรายงาน ว่าไซโตไคน์เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที (30) แต่การศึกษา ผลของไซโตไคน์ต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์มอโนไซต์ และแมโครฟาจ ยังไม่มีการศึกษามากนัก จึงสนใจผลของไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 (ภาพที่ 3.5.1) และแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจากมอโนไซต์ด้วย PMA (ภาพที่ 3.5.3) เลี้ยงเซลล์ THP-1 ในสภาวะที่ กระตุ้นด้วยไซโตไคน์ ได้แก่ IL-4 (100 ng/mL), IL-13 (100 ng/mL), IFN- γ (20 ng/mL) และ M-CSF (50 ng/mL) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ที่ถูก กระตุ้นด้วย IL-13 สูงขึ้น และระดับการแสดงออกของ PD-1 ใน THP-1 ที่กระตุ้นด้วย M-CSF ลดลง ส่วนไซโต ไคน์อื่น ๆ ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ THP-1 แสดงผลดังภาพที่ 3.5.1



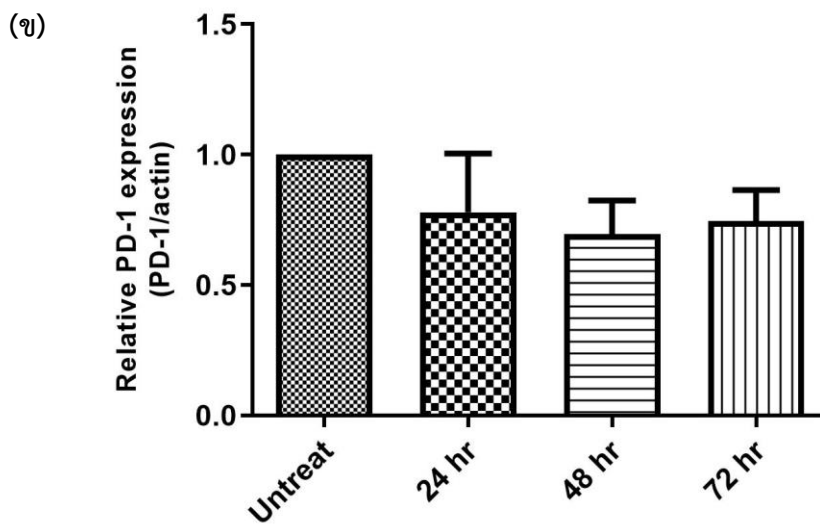
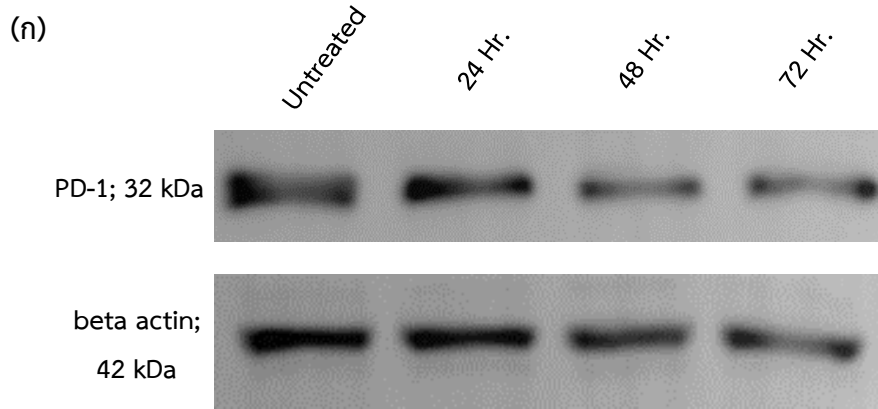
(ข)



ภาพที่ 3.5.1 ระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 เมื่อกระตุ้นเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ด้วยไซโตไคน์

(ก) แสดงแถบโปรตีน PD-1 ขนาด 32 kDa ใน THP-1 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ 4 ชนิด คือ IL-4, IL-13, IFN- γ และ M-CSF เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และโปรตีน beta actin ขนาด 42 kDa (loading control) (ข) แสดงปริมาณการแสดงออกของโปรตีน PD-1 แบบสัมพัทธ์ โดยเทียบความเข้มของแถบโปรตีน PD-1 กับ beta actin ในชุดการทดลองเดียวกัน คำนวณด้วยโปรแกรม ImageJ และ GraphPad Prism 5.03 และกำหนดให้การแสดงออกของโปรตีน PD-1 ใน THP-1 ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำเป็นแมโครฟาจมีค่าการแสดงออกสัมพัทธ์เท่ากับ 1

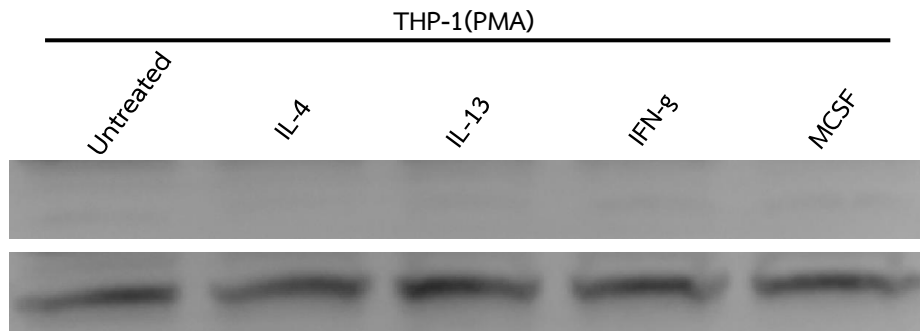
จากผลการทดลองเบื้องต้นดังภาพที่ 3.5.1 ที่แสดงถึงการลดลงของโปรตีน PD-1 เมื่อกระตุ้นเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ด้วย M-CSF จึงต้องการทราบผลของ M-CSF ต่อการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ที่เปลี่ยนแปลงไปตามเวลา เนื่องจาก M-CSF ให้ผลในการเหนี่ยวนำเซลล์ปฐมภูมิโมโนไซต์ ให้เป็นแมโครฟาจได้ จึงคาดการณ์ผลเชิงเปรียบเทียบระหว่างการลดลงของการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เป็นแมโครฟาจด้วย PMA และการลดลงของระดับโปรตีน PD-1 ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย M-CSF เมื่อทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ โดยเพิ่มช่วงเวลากระตุ้นเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ด้วย M-CSF เป็น 24, 48 และ 72 ชั่วโมงพบว่า เซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 มีระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ลดลงตามเวลาที่ถูกกระตุ้น โดยการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ที่กระตุ้นด้วย M-CSF เริ่มลดลง เมื่อถูกกระตุ้นครบ 24 ชั่วโมง ดังภาพที่ 3.5.2



ภาพที่ 3.5.2 ระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 เมื่อเซลล์ไลน์โมโนไซต์ THP-1 ถูกกระตุ้นด้วย M-CSF

(ก) แสดงแถบโปรตีน PD-1 ขนาด 32 kDa ใน THP-1 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย M-CSF 50 ng/mL เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และโปรตีน beta actin ขนาด 42 kDa (loading control) ตัวอย่างแถบโปรตีนจากการทดลอง 1 ซ้ำ (ข) แสดงปริมาณการแสดงออกของโปรตีน PD-1 แบบสัมพันธ์ โดยเทียบความเข้มของแถบโปรตีน PD-1 กับ beta actin ในชุดการทดลองเดียวกัน คำนวณด้วยโปรแกรม ImageJ และ GraphPad Prism 5.03 และกำหนดให้การแสดงออกของโปรตีน PD-1 ใน THP-1 ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำเป็นแอมโครฟามีค่าการแสดงออกสัมพันธ์เท่ากับ 1 (คำนวณจากการทดลอง 3 ซ้ำ กราฟแสดงค่าเฉลี่ย +/- ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

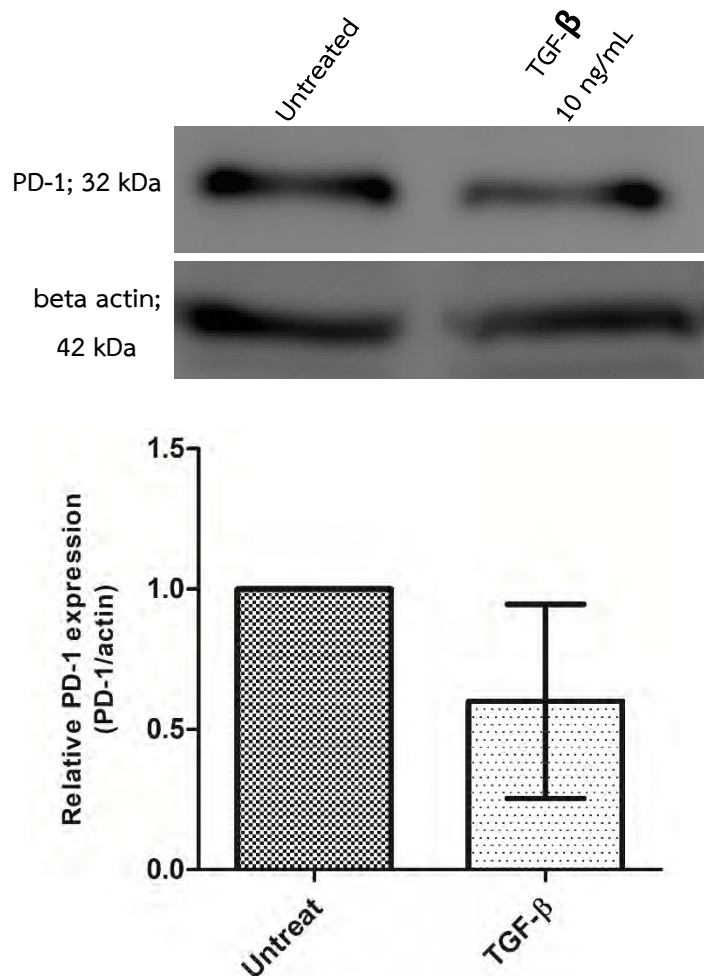
จากการทดลองก่อนหน้านี้ที่ทราบผลของไซโตไคน์ต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ไลม์โม่โนไซต์ THP-1 แล้ว ผู้วิจัยจึงสนใจผลของไซโตไคน์ต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์แมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจาก THP-1 จึงเลี้ยงเซลล์ THP-1 แล้วเหนี่ยวนำเป็นแมโครฟาจด้วย PMA (185 ng/mL) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นกระตุ้นเซลล์แมโครฟาจด้วยไซโตไคน์ที่กล่าวไปข้างต้น พบว่าไซโตไคน์ทุกชนิด ไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในแมโครฟาจ ดังภาพที่ 3.5.3



ภาพที่ 3.5.3 ระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 เมื่อกระตุ้นแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจากโมโนไซต์ THP-1 ด้วยไซโตไคน์ต่าง ๆ

แสดงแถบโปรตีน PD-1 ขนาด 32 kDa ใน THP-1 ที่เหนี่ยวนำเป็นแมโครฟาจด้วย PMA จากนั้นกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ 4 ชนิด คือ IL-4, IL-13, IFN- γ และ M-CSF เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และโปรตีน beta actin ขนาด 42 kDa (loading control)

นอกจากไซโตไคน์ข้างต้น ยังมีไซโตไคน์อีกชนิดหนึ่ง ที่มีบทบาทสำคัญต่อการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ภูมิคุ้มกันหลายชนิด คือ TGF- β โดยมีการรายงานบทบาทของไซโตไคน์ดังกล่าว ต่อการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที (36) แต่ยังไม่มียางานเกี่ยวกับผลของ TGF- β ต่อการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์โมโนไซต์ จึงเลี้ยงเซลล์ THP-1 ในที่กระตุ้นด้วยไซโตไคน์ TGF- β (10 ng/mL) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β มีปริมาณการแสดงออกของ PD-1 ต่ำกว่า THP-1 ที่ไม่ถูกกระตุ้น แสดงดังภาพที่ 3.5.4

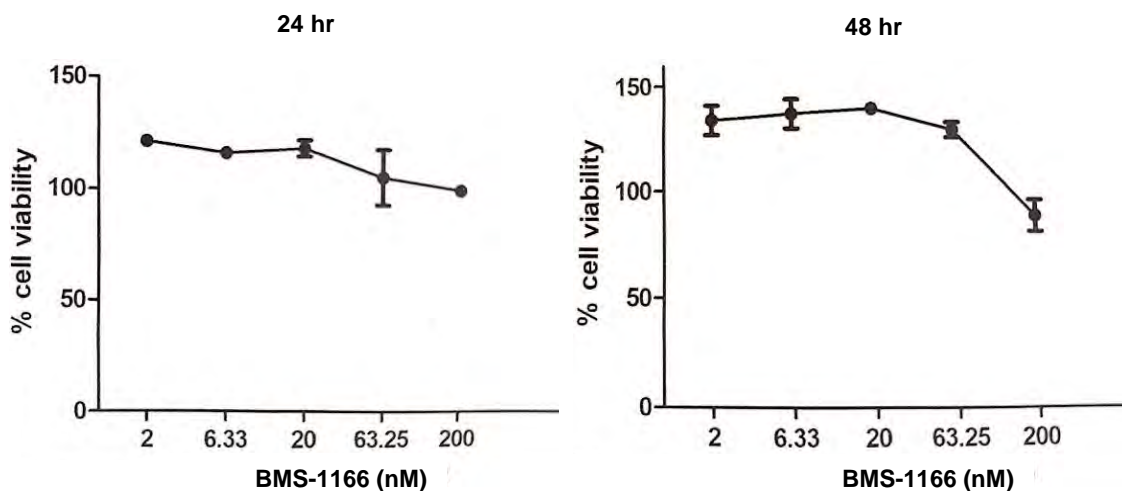


ภาพที่ 3.5.4 ระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 เมื่อเซลล์ไลน่มอนไซต์ THP-1 ถูกกระตุ้นด้วย TGF-β

(ก) แสดงแถบโปรตีน PD-1 ขนาด 32 kDa ใน THP-1 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF-β (10 ng/mL) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และโปรตีน beta actin ขนาด 42 kDa (loading control) ตัวอย่างแถบโปรตีนจากการทดลอง 1 ซ้ำ (ข) แสดงปริมาณการแสดงออกของโปรตีน PD-1 แบบสัมพันธ์ โดยเทียบความเข้มของแถบโปรตีน PD-1 กับ beta actin ในชุดการทดลองเดียวกัน คำนวณด้วยโปรแกรม ImageJ และ GraphPad Prism 5.03 และกำหนดให้การแสดงออกของโปรตีน PD-1 ใน THP-1 ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำเป็นแมโครฟาจมีค่าการแสดงออกสัมพันธ์เท่ากับ 1 (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ กราฟแสดงค่าเฉลี่ย +/- ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

3.6 ผลของ BMS-1166 ต่อการอยู่รอดของเซลล์ THP-1

จากการทดลองที่ผ่านมาเป็นการศึกษาผลโดยตรงของปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 และแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจาก THP-1 ทั้งปัจจัยที่เกี่ยวกับผลของอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็ง และปัจจัยเกี่ยวกับไซโตไคน์ต่าง ๆ แต่ผลการศึกษาดังกล่าวไม่ทำให้ทราบถึงผลลัพธ์ของการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ต่อการทำงานของเซลล์ไลน์ THP-1 ผู้วิจัยจึงใช้การยับยั้งวิถีสัญญาณ PD-1/PD-L1 ด้วยตัวยับยั้ง BMS-1166 เพื่อทราบผลของวิถีสัญญาณดังกล่าวต่อเซลล์มอโนไซต์ โดยเบื้องต้นผู้วิจัยต้องการสังเกตผลของการยับยั้งวิถีสัญญาณ PD-1/PD-L1 ต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 จึงเลี้ยงเซลล์ไลน์ THP-1 แล้วกระตุ้นด้วย BMS-1166 ที่ความเข้มข้น 2, 6.33, 20, 63.25 และ 200 nM เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นหาผลของ BMS-1166 ต่อการอยู่รอดของเซลล์ THP-1 ด้วยวิธี MTT จากผล MTT พบว่า BMS-1166 ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ และไม่ทำให้เซลล์ตาย ดังแสดงในภาพที่ 3.6.1



ภาพที่ 3.6.1 BMS-1166 ต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1

แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ THP-1 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย BMS-1166 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (แกน X; log scale) เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay คำนวณด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.03 โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ (technical replicate)

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

มอโนไซต์เป็นเซลล์ในกลุ่มมัยอีลอยด์ ซึ่งในสิ่งมีชีวิตจะทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันผ่านการกำจัดสิ่งแปลกปลอมด้วยการฟาโกไซโทซิส และมีแหล่งอาศัยในระบบเลือด และน้ำเหลือง แต่จะพบได้ในเนื้อเยื่อในปริมาณน้อย หากมอโนไซต์ถูกชักนำด้วยสัญญาณกระตุ้นต่าง ๆ อาจทำให้พัฒนาเป็นเซลล์แมโครฟาจ (14) ซึ่งเป็นเซลล์กลุ่มฟาโกไซด์เช่นกัน แต่มีบทบาทเพิ่มเติมในการสร้างไซโตไคน์สำคัญต่าง ๆ ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน วิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ THP-1 ให้เป็นแมโครฟาจ อาจทำได้โดยใช้สารกระตุ้นหลายชนิด จากงานวิจัยก่อนหน้าของ Tedesco และคณะ พบว่าการใช้ PMA ที่ความเข้มข้น 185 ng/mL (34) หรือจากงานวิจัยของ Daigneault และคณะ การใช้ VD3 ที่ความเข้มข้น 100 nM สามารถเหนี่ยวนำให้ THP-1 เป็นแมโครฟาจได้ (37) จากผลการทดลองของผู้วิจัย พบว่าการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์แมโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย PMA จะลดลงตามเวลาที่ถูกเหนี่ยวนำ แต่ VD3 ไม่ทำให้การแสดงออกของโปรตีน PD-1 เปลี่ยนแปลงไป เมื่อพิจารณาเพิ่มเติมด้านสัญญาณวิทยาของเซลล์ พบว่าเซลล์แมโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย PMA มีลักษณะคล้ายแมโครฟาจจากงานวิจัยอ้างอิง กล่าวคือเซลล์ยึดเกาะกับจานเลี้ยงเซลล์ และมีรยางค์ยื่นออกรอบเซลล์ แต่แมโครฟาจที่เหนี่ยวนำด้วย VD3 ไม่มีลักษณะดังกล่าว จึงอาจเป็นไปได้ว่า VD3 ที่ความเข้มข้นดังกล่าว ไม่สามารถเปลี่ยนให้ THP-1 เป็นแมโครฟาจได้ ซึ่งการทดลองดังกล่าวอาจต้องยืนยันผลว่าเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำแล้ว มีลักษณะของแมโครฟาจจริง ทั้งในด้านลักษณะของเซลล์ และการแสดงออกของยีน หรือโปรตีนที่เป็นเอกลักษณ์ของแมโครฟาจของมนุษย์ ก่อนจะนำมาพิจารณาการแสดงออกของโปรตีน PD-1

วิธีการเหนี่ยวนำ THP-1 ให้เป็นแมโครฟาจดังกล่าว จะทำให้ได้เซลล์แมโครฟาจที่มีลักษณะการแสดงออกของยีนแบบ M1 หากต้องการเหนี่ยวนำ THP-1 เป็นแมโครฟาจแบบ M2 จากงานวิจัยของ Genin และคณะ กล่าวว่าต้องใช้การกระตุ้นเหนี่ยวนำพร้อมกับไซโตไคน์ IL-4 และ IL-13 ที่ความเข้มข้น 20 ng/mL (38) ซึ่งผู้วิจัยได้ตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์แมโครฟาจที่คาดว่าจะจะเป็น M2 พบว่า ระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ไม่แตกต่างจาก THP-1 ที่ไม่ถูกกระตุ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ตามสมมติฐานเบื้องต้นคือ การกระตุ้นด้วย VD3 ในกรณีของผู้วิจัย ไม่สามารถเหนี่ยวนำ THP-1 ให้เป็นแมโครฟาจได้ เนื่องจากลักษณะของเซลล์แมโครฟาจที่คาดว่าจะจะเป็น M2 ไม่แตกต่างจากเซลล์ THP-1 ที่กระตุ้นด้วย VD3 เท่านั้น และไม่แตกต่างจาก THP-1 ที่ไม่ถูกกระตุ้น จึงเสนอแนะแนวทางเพิ่มเติมว่า ควรยืนยันผลการเป็นแมโครฟาจของ THP-1 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย VD3 ก่อนที่จะทำการศึกษาต่อไป โดยอาจพิจารณาการแสดงออกของยีน iNOS, IL-6, IL-1 β สำหรับแมโครฟาจชนิด M1 และการแสดงออกของยีน CD206, CD209 สำหรับแมโครฟาจชนิด M2 (39)

จากผลการทดลองพบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ไล่นมอโนไซต์ THP-1 ในสภาวะปกติ จากงานวิจัยก่อนหน้าพบว่า มีการรายงานการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์มอโนไซต์ในสิ่งมีชีวิต จาก

งานวิจัยของ Xia และคณะ พบว่าการแสดงออกของโปรตีน PD-1 มีการแสดงออกในเซลล์มอโนไซต์ของมนุษย์ (21) นอกจากนี้ งานวิจัยของ Pan และคณะ กล่าวว่า การแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ไลน์ THP-1 ที่ติดต่อกับ LPS (LPS-tolerant) ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด พบว่าเซลล์ THP-1 มีการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ที่เพิ่มขึ้น (22) นอกจากนี้โปรตีน PD-1 แล้ว ในงานวิจัยของ Host และคณะ รายงานว่าเซลล์มอโนไซต์ที่ติดเชื้อไวรัสก่อมะเร็ง Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) มีการแสดงออกของโปรตีน PD-L1 ด้วย (40) จึงอาจอนุมานได้ว่าในกลุ่มประชากรของเซลล์ THP-1 จะมีทั้งการแสดงออกของโปรตีน PD-1 และ PD-L1 ซึ่งสามารถจับกันได้ และทำให้เกิดการส่งสัญญาณ ที่ส่งผลต่อการทำงานของเซลล์ ซึ่งจากผลการทดลองของผู้วิจัยที่กล่าวไปข้างต้น พบว่ามีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า คือเซลล์มอโนไซต์มีการแสดงออกของโปรตีน PD-1 เช่นกัน แต่ในรายงานวิจัยชิ้นนี้ ผู้วิจัยยังไม่ได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน PD-L1 และบทบาทของเซลล์ไลน์ THP-1 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน PD-1 โดยจากการทดลองเบื้องต้น ในการยับยั้งการจับกันของ PD-1 และ PD-L1 ด้วยสารยับยั้ง BMS-1166 พบว่าสารดังกล่าวไม่ส่งผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ THP-1 แสดงให้เห็นว่าสารดังกล่าวในปริมาณที่ใช้ทดสอบ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ อีกทั้งแสดงผลว่าการจับกันของโปรตีน PD-1 และ PD-L1 ไม่เกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ ดังเช่นงานวิจัยก่อนหน้าที่กล่าวถึงบทบาทของวิถีสัญญาณ PD-1/PD-L1 ต่อการเกิดการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิสของเซลล์ภูมิคุ้มกัน (41, 42)

จากงานวิจัยก่อนหน้าของ Hunegnaw และคณะ พบว่าแมโครฟาจมีการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในกรณีการติดเชื้อเรื้อรัง เช่นเดียวกับมอโนไซต์ อีกทั้งยังพบว่าแมโครฟาจที่มีการแสดงออกของโปรตีน PD-1 และอาศัยอยู่ร่วมกับมะเร็ง จะมีลักษณะเป็นแมโครฟาจชนิด M2 แมโครฟาจดังกล่าวจะมีความสามารถในการเกิดฟาโกไซโทซิสลดลง รวมทั้งสัมพันธ์กับระยะของโรคมะเร็งที่รุนแรงขึ้นด้วย (11) จากผลการศึกษาของผู้วิจัยที่กล่าวไปข้างต้น การแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำด้วย PMA จาก THP-1 แตกต่างจากงานวิจัยก่อนหน้า โดยอาจเกิดจากปัจจัยของเซลล์ไลน์ THP-1 และสภาวะที่ใช้ในการเหนี่ยวนำ เนื่องด้วยแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำจากมอโนไซต์ในร่างกายมนุษย์เกิดจากปัจจัยร่วมหลายภาวะ เช่น ในภาวะโรคติดเชื้อ บริเวณที่ติดเชื้อมีการหลั่งไซโตไคน์ที่ชักนำให้มอโนไซต์ออกจากหลอดเลือด และมีการพัฒนาเป็นแมโครฟาจ หรือในภาวะมะเร็ง ซึ่งมีความซับซ้อนของสารที่มะเร็งสามารถหลั่งออกมา และควบคุมการแสดงออกของเซลล์ที่อยู่โดยรอบ (43) ความซับซ้อนของสัญญาณ และวิถีสัญญาณเหล่านี้ ทำให้การใช้เซลล์ไลน์ และการกระตุ้นด้วยสารหนึ่งชนิด อาจเป็นตัวแทนที่ไม่ดีนักของสภาวะจริง มีงานวิจัยก่อนหน้าที่กล่าวถึงการเหนี่ยวนำจาก THP-1 ว่าอาจเป็นตัวแทนที่ไม่ดีนักของแมโครฟาจในมนุษย์ (34, 44) การศึกษาเรื่องการแสดงออกของโปรตีน PD-1 นี้จึงจำเป็นต้องศึกษาในเซลล์มนุษย์ทั้งมอโนไซต์ และแมโครฟาจต่อไป

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ดังที่กล่าวไปข้างต้น จำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในบทบาทของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ทั้งในมอโนไซต์ และแมโครฟาจต่อไป โดยการศึกษาอาจมุ่งเน้นไปใน

บทบาทที่เคยมีการรายงานก่อนหน้านี้ และยังไม่ได้ศึกษาในงานวิจัยชิ้นนี้ กล่าวคือ กระบวนการฟาโกไซโทซิส การผลิตไซโตไคน์ รวมถึงการแสดงออกของโปรตีนผิวเซลล์ที่อาจเป็นตัวบ่งชี้ลักษณะจำเพาะอื่น ๆ ของเซลล์ การใช้ตัวยับยั้งการจับกันของ PD-1/PD-L1 ในงานวิจัยนี้คือ BMS-1166 อาจเป็นตัวแทนหนึ่งของการขัดขวางวิถีสัญญาณ หากต้องการศึกษาเพิ่มเติม อาจใช้วิธีที่เป็นที่นิยม และมีการทดสอบในระดับคลินิก คือการใช้แอนติบอดีต่อ PD-1 รวมไปถึงการใช้วิธีทางพันธุกรรม โดยการ Knock out ของโปรตีน PD-1 (45) ซึ่งอาจให้ผลลัพธ์ที่ชัดเจนขึ้น ในด้านของบทบาทของโปรตีน PD-1 ในเซลล์มอโนไซต์ และแมโครฟาจ

จากที่กล่าวไปว่ามะเร็งอาจมีบทบาทต่อการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ผู้วิจัยพบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ในงานวิจัยชิ้นนี้ คือ A549, HepG2, HeLa และ MDA-MB 231 ซึ่งเป็นมะเร็งระยะรุกราน และมาจากอวัยวะที่ต่างกัน ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในแมโครฟาจ ส่วนในมอโนไซต์พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน PD-1 เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็ง A549, HepG2 และ MDA-MB แต่ระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ที่เพิ่มขึ้นนี้ มีการเพิ่มทั้งในชุดการทดลองที่เลี้ยงเซลล์ THP-1 ในอาหารของเซลล์มะเร็ง ซึ่งอาจสรุปได้ว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ที่เพิ่มขึ้นใน THP-1 ที่เลี้ยงในเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด น่าจะเป็นผลของความแตกต่างของอาหารเลี้ยงเซลล์ การศึกษาในเชิงลึกเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของเซลล์มะเร็งต่อการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์มอโนไซต์ และแมโครฟาจ อาจต้องศึกษาในระบบเลี้ยงร่วม (co-culture) หรืออาจทำในลักษณะการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ ซึ่งอาจให้ผลที่แตกต่างไป และใกล้เคียงกับสภาวะจริงในก้อนมะเร็งมากขึ้น

สภาวะที่นอกเหนือจากมะเร็งที่มีการศึกษาว่าเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของอิน หรือโปรตีนต่าง ๆ ในเซลล์ภูมิคุ้มกัน คือสภาวะกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ ซึ่งผู้วิจัยพบว่าไซโตไคน์ M-CSF และ TGF- β ส่งผลต่อการลดการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์ THP-1 โดย M-CSF ทำให้การแสดงออกของโปรตีน PD-1 ลดลงตามเวลาที่ถูกกระตุ้น ส่วน TGF- β ทำให้โปรตีน PD-1 ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อกระตุ้นเซลล์ THP-1 ไป 48 ชั่วโมง จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ยังไม่มีผู้ศึกษาผลโดยตรงของไซโตไคน์ 2 ชนิดดังกล่าว ต่อการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์มอโนไซต์ แต่ผลของ M-CSF ต่อเซลล์มอโนไซต์ของมนุษย์ คือการเหนี่ยวนำให้เป็นแมโครฟาจ (46) จึงอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ PD-1 ที่ลดลง ในส่วนของ TGF- β ไซโตไคน์ดังกล่าวมีผลต่อการกดการทำงานของเซลล์มอโนไซต์ และมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที (36) ซึ่งจากบทบาทดังกล่าวผู้วิจัยจึงตั้งข้อสันนิษฐานว่า TGF- β น่าจะทำให้การแสดงออกของ PD-1 ในเซลล์ THP-1 เพิ่มขึ้น หากแต่ผลการทดลองเป็นไปในทางตรงกันข้าม ซึ่งต้องศึกษาผลของการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์มอโนไซต์ THP-1 ต่อไป เพื่อหาผลที่แท้จริงของ TGF- β ต่อ PD-1 อีกทั้งอาจต้องศึกษาการทำงานของเซลล์ THP-1 ที่มีการแสดงออกของ PD-1 ลดลงจากผลของไซโตไคน์ เพื่อทราบการทำงานต่อไป

การศึกษากการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์มอโนไซต์ และแมโครฟาจ เพื่อหาวิถีสัญญาณที่ควบคุมการแสดงออก ในเบื้องต้นพบการแสดงออกในมอโนไซต์ THP-1 และพบการแสดงออกที่ลดลงในแมโครฟาจที่

เหนี่ยวนำด้วย PMA จาก THP-1 อีกทั้งยังพบการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ที่ลดลงในมอโนไซต์ที่กระตุ้นด้วยไซโตไคน์ 2 ชนิด คือ M-CSF และ TGF- β การศึกษาดังกล่าวจำเป็นต้องทำเพิ่มเติมในด้านบทบาทของการแสดงออกของโปรตีน PD-1 ในเซลล์มอโนไซต์ และแมโครฟาจ ทั้งในเซลล์ไล่น์ และในเซลล์มนุษย์ ซึ่งจะช่วยให้พบแนวทางการรักษาโรคต่าง ๆ ที่เซลล์ภูมิคุ้มกันเกี่ยวข้องผ่านวิถีสัญญาณ PD-1 ในอนาคต

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS RPMI (ปริมาตรทั้งหมด 50 ml)		
RPMI 1640	43.45	ml
ฟีตัล โบวีน ซีรัม (Fetal Bovine Serum)	5	ml
ยาปฏิชีวนะ เจนตามัยซิน (Gen)	0.5	ml
Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	0.5	ml
โซเดียม ไพรูเวท (Sodium pyruvate)	0.5	ml
2-Mercaptoethanol	0.045	ml
2. อาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS DMEM (ปริมาตรทั้งหมด 50 ml)		
DMEM	43.5	ml
ฟีตัล โบวีน ซีรัม (Fetal Bovine Serum)	5	ml
ยาปฏิชีวนะ เจนตามัยซิน (Gen)	0.5	ml
Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	0.5	ml
โซเดียม ไพรูเวท (Sodium pyruvate)	0.5	ml
3. อาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS EMEM (ทั้งหมด 50 ml)		
EMEM	44	ml
ฟีตัล โบวีน ซีรัม (Fetal Bovine Serum)	5	ml
ยาปฏิชีวนะ เจนตามัยซิน (Gen)	0.5	ml
Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	0.5	ml
4. ฟอสเฟส บัฟเฟอร์ ซาลีน (phosphate buffer saline; PBS) ความเป็นกรด-ด่าง 7.4)		
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8	g
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	g
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (Na_2HPO_4)	3.63	g
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.24	g
น้ำกลั่น	1	L
5. Freezing media (ทั้งหมด 1000 μl)		
ฟีตัล โบวีน ซีรัม (Fetal Bovine Serum)	900	μl
DMSO	100	μl

6. 95% Ethanol (ทั้งหมด 100 ml)

Absolute ethanol

95 ml

น้ำกลั่น

5 ml

เอกสารอ้างอิง

1. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:591-619.
2. Saeidi A, Zandi K, Cheok YY, Saeidi H, Wong WF, Lee CYQ, et al. T-Cell Exhaustion in Chronic Infections: Reversing the State of Exhaustion and Reinvigorating Optimal Protective Immune Responses. *Front Immunol.* 2018;9:2569.
3. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nature Immunology.* 2011;12(6):492-9.
4. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology.* 2010;129(4):474-81.
5. Jiang Y, Li Y, Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1792.
6. Lázár-Molnár E, Yan Q, Cao E, Ramagopal U, Nathenson SG, Almo SC. Crystal structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) and its ligand PD-L2. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2008;105(30):10483-8.
7. Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell.* 2015;161(2):205-14.
8. Ostrand-Rosenberg S, Horn LA, Haile ST. The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity. *J Immunol.* 2014;193(8):3835-41.
9. Freeman GJ. Structures of PD-1 with its ligands: Sideways and dancing cheek to cheek. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2008;105(30):10275-6.
10. Ren Z, Peng H, Fu YX. PD-1 Shapes B Cells as Evildoers in the Tumor Microenvironment. *Cancer Discov.* 2016;6(5):477-8.
11. Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, Hutter G, George BM, McCracken MN, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature.* 2017;545(7655):495-9.
12. Wu Y, Chen W, Xu ZP, Gu W. PD-L1 Distribution and Perspective for Cancer Immunotherapy-Blockade, Knockdown, or Inhibition. *Front Immunol.* 2019;10:2022.
13. Zhu X, Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget.* 2017;8(57):97671-82.

14. Jakubzick CV, Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(6):349-62.
15. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007;317(5838):666-70.
16. Jakubzick C, Gautier EL, Gibbings SL, Sojka DK, Schlitzer A, Johnson TE, et al. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity*. 2013;39(3):599-610.
17. Avraham-Davidi I, Yona S, Grunewald M, Landsman L, Cochain C, Silvestre JS, et al. On-site education of VEGF-recruited monocytes improves their performance as angiogenic and arteriogenic accessory cells. *J Exp Med*. 2013;210(12):2611-25.
18. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(6):392-404.
19. Liu Y, Cao X. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(1):1-4.
20. Ley K. M1 Means Kill; M2 Means Heal. *The Journal of Immunology*. 2017;199(7):2191-3.
21. Xia Q, Wei L, Zhang Y, Sheng J, Wu W, Zhang Y. Immune Checkpoint Receptors Tim-3 and PD-1 Regulate Monocyte and T Lymphocyte Function in Septic Patients. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:1632902.
22. Pan T, Liu Z, Yin J, Zhou T, Liu J, Qu H. Notch Signaling Pathway Was Involved in Regulating Programmed Cell Death 1 Expression during Sepsis-Induced Immunosuppression. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:539841.
23. Hunegnaw R, Mushtaq Z, Enyindah-Asonye G, Hoang T, Robert-Guroff M. Alveolar Macrophage Dysfunction and Increased PD-1 Expression During Chronic SIV Infection of Rhesus Macaques. *Front Immunol*. 2019;10:1537.
24. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 2017;541(7637):321-30.
25. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19(11):1423-37.

26. Kleffel S, Posch C, Barthel SR, Mueller H, Schlapbach C, Guenova E, et al. Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth. *Cell*. 2015;162(6):1242-56.
27. Huber V, Vallacchi V, Fleming V, Hu X, Cova A, Dugo M, et al. Tumor-derived microRNAs induce myeloid suppressor cells and predict immunotherapy resistance in melanoma. *J Clin Invest*. 2018;128(12):5505-16.
28. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*. 2010;11(10):889-96.
29. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*. 2014;5:491.
30. Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, Sereti I, Roby GA, O'Shea MA, et al. The Common γ -Chain Cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 Induce the Expression of Programmed Death-1 and Its Ligands. *The Journal of Immunology*. 2008;181(10):6738-46.
31. Strome SE, Dong H, Tamura H, Voss SG, Flies DB, Tamada K, et al. B7-H1 Blockade Augments Adoptive T-Cell Immunotherapy for Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research*. 2003;63(19):6501-5.
32. Guzik K, Tomala M, Muszak D, Konieczny M, Hec A, Blaszkiewicz U, et al. Development of the Inhibitors that Target the PD-1/PD-L1 Interaction-A Brief Look at Progress on Small Molecules, Peptides and Macrocycles. *Molecules*. 2019;24(11).
33. Skalniak L, Zak KM, Guzik K, Magiera K, Musielak B, Pachota M, et al. Small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 immune checkpoint alleviate the PD-L1-induced exhaustion of T-cells. *Oncotarget*. 2017;8(42):72167-81.
34. Tedesco S, De Majo F, Kim J, Trenti A, Trevisi L, Fadini GP, et al. Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization? *Front Pharmacol*. 2018;9:71.
35. Diamantina Institute TUoQ. Using ImageJ to quantify blots 2017 [updated Apr 27, 2020]. Available from: <https://di.uq.edu.au/community-and-alumni/sparq-ed/sparq-ed-services/using-imagej-quantify-blots>.
36. Park BV, Freeman ZT, Ghasemzadeh A, Chattergoon MA, Rutebemberwa A, Steigner J, et al. TGF β 1-Mediated SMAD3 Enhances PD-1 Expression on Antigen-Specific T Cells in Cancer. *Cancer Discov*. 2016;6(12):1366-81.

37. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. 2010;5(1):e8668.
38. Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*. 2015;15:577.
39. Zong Z, Zou J, Mao R, Ma C, Li N, Wang J, et al. M1 Macrophages Induce PD-L1 Expression in Hepatocellular Carcinoma Cells Through IL-1beta Signaling. *Front Immunol*. 2019;10:1643.
40. Host KM, Jacobs SR, West JA, Zhang Z, Costantini LM, Stopford CM, et al. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Increases PD-L1 and Proinflammatory Cytokine Expression in Human Monocytes. *mBio*. 2017;8(5).
41. Zhang Y, Zhou Y, Lou J, Li J, Bo L, Zhu K, et al. PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Critical Care*. 2010;14(6):R220.
42. Shi F, Shi M, Zeng Z, Qi R-Z, Liu Z-W, Zhang J-Y, et al. PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8+ T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *International Journal of Cancer*. 2011;128(4):887-96.
43. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):253-68.
44. Shiratori H, Feinweber C, Luckhardt S, Linke B, Resch E, Geisslinger G, et al. THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro. *Mol Immunol*. 2017;88:58-68.
45. Strauss L, Mahmoud MAA, Weaver JD, Tijaro-Ovalle NM, Christofides A, Wang Q, et al. Targeted deletion of PD-1 in myeloid cells induces antitumor immunity. *Science Immunology*. 2020;5(43):eaay1863.
46. Bender AT, Ostenson CL, Giordano D, Beavo JA. Differentiation of human monocytes in vitro with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor produces distinct changes in cGMP phosphodiesterase expression. *Cell Signal*. 2004;16(3):365-74.