ผลของโปรทีนผนังชั้นนอกของเซลล์เลปโตสไปราต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ และทีเอ็นเอฟอัลฟาในเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่เพาะเลี้ยง

นางนงนุช ถาวร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5701-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF LEPTOSPIRA OUTER MEMBRANE PROTEIN ON PRODUCTION OF NITRIC OXIDE AND TNF-α IN CULTURED ENDOTHELIAL CELLS

Mrs Nongnuch Thaworn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-5701-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของโปรทีนผนังชั้นนอกของเซลล์เลปโตสไปราต่อการสร้างไนตริกออกไซด์และทีเอ็นเอฟอัลฟาในเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่เพาะเลี้ยง
โดย	นาง นงนุช ถาวร
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ โสภิต ธรรมอารี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง สุมนา ชมพูทวีป)

....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ โสภิต ธรรมอารี)

....กรรมการ

(ศาสตราจารย์นายแพทย์วิศิษฎ์ สิตปรีชา)

....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมหญิง ธัมวาสร)

นงนุช ถาวร : ผลของโปรทีนผนังชั้นนอกของเซลล์เลปโตสไปราต่อการสร้างไนตริกออกไซด์และทีเอ็นเอฟอัลฟาในเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่เพาะเลี้ยง (EFFECT OF LEPTOSPIRA OUTER MEMBRANE PROTEIN ON PRODUCTION OF NITRIC OXIDE AND TNF-α IN CULTURED ENDOTHELIAL CELLS) อ. ที่ปรึกษา : รศ.โสภิต ธรรมอารี, 63 หน้า. ISBN 974-17-5701-8

โรคเลปโตสไปโรซิสเกิดจากการติดเชื้อเลปโตสไปรา อาการของโรคเกิดจากหลอดเลือดอักเสบจึงเกี่ยวข้องกับหลายระบบของร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่งไต และตับ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมีประโยชน์ช่วยกำจัดเชื้อโรค แต่อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบซึ่งมีการหลั่งสารสื่อกลางหลายชนิด เซลล์บุผนังหลอดเลือด (EC) มีโอกาสสัมผัสกับเชื้อเลปโตสไปรา อาจมีบทบาทในการเกิดพยาธิสภาพของโรคเลปโตสไปโรซิส การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจระดับการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) และ ทีเอ็นเอฟ-อัลฟา (TNF-α) โดยเซลล์บุผนังหลอดเลือดสายสะดือมนุษย์ที่เพาะเลี้ยง (HUVEC) นำเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค 2 สายพันธุ์ (*Leptospira bratislava* และ *Leptospira icterohae morrhagiae)* และสายพันธุ์ไม่ก่อโรค (*Leptospira patoc*) มาเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (EMJH) สกัดโปรทีนผนังชั้นนอก (OMP) ของเชื้อด้วย 0.04% sodium dodecyl sulfate ผงแห้งที่ได้ละลายน้ำแล้ววัดปริมาณโปรทีน และแยกโปรทีนด้วยอิเลคโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) ทดสอบผลของโปรทีนผนังชั้นนอกของเชื้อกับ HUVEC ที่เพาะเลี้ยง หลังจากบ่มไว้ในตู้อบที่มีแกสคาร์บอนได ออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อชั้นบนไปตรวจวัดระดับ NO และ TNF-α ผลการทดลองแสดงว่าวิธีการสกัดที่ใช้ 0.04% sodium dodecyl sulfate จะได้ OMP ที่ไม่สามารถแยกให้เห็นแถบโปรทีนขนาดเล็กที่สัมพันธ์กับความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ OMP ที่สกัดได้ไม่สามารถกระตุ้นการสร้าง NO และ TNF-α โดย HUVEC ที่เพาะเลี้ยงยกเว้นเพียงเชื้อ *Leptospira icterohaemorrhagiae* ที่ความเข้มข้นโปรทีน 0.5 μg/ml ที่เพิ่มการสร้าง NO ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ซึ่งเป็นสารพิษของเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ ใช้เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารกระตุ้น ที่ความเข้มข้น 0.1 μg/ml ไม่เพียงพอที่จะกระตุ้นการสร้าง NO และ TNF-α โดย HUVEC เพาะเลี้ยง ส่วน HUVEC ที่ได้รับเพียงอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำกลับเพิ่มปริมาณการสร้าง NO และ TNF-α ผลผิดพลาดนี้ยังไม่ทราบสาเหตุ โดยสรุปในร่างกายจะมีเม็ดเลือดขาว (WBC) มีบทบาทสำคัญที่สุดในการกำจัดเชื้อโรค endothelial cell อาจต้องมีปฏิกิริยากับเม็ดเลือดขาว เพื่อจะเสริมการเกิดปฏิกิริยาการอักเสบ ควรปรับปรุงการสกัด OMP และตรวจหาแถบโปรทีนขนาดเล็กก่อนทำการทดสอบผลของ OMP

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต..

ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..

4 3 7 52286 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORDS : LEPTOSPIRA OUTER MEMBRANE PROTEIN/HUVEC/NITRIC OXIDE/TNF-α

NONGNUCH THAWORN : EFFECT OF LEPTOSPIRA OUTER MEMBRANE PROTEIN ON PRODUCTION OF NITRIC OXIDE AND TNF-α IN CULTURED ENDOTHELIAL CELLS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SOPIT THAMAREE, 63 pp. ISBN 974-17-5701-8

Leptospirosis is caused by pathogenic Leptospires. Vasculitis is responsible for the manifestations of the disease involving various organs especially the kidneys and liver. The systemic immune response is effective in eliminating the organisms but may also produce symptomatic inflammatory reactions. Since the endothelial cells lining all blood vessels are exposed to Leptospires and may play some roles in the pathogenesis of the leptospirosis. Therefore this study aimed at determining the production of nitric oxide (NO) and tissue necrosis factor-α (TNF-α) by the cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *Leptospira bratislava* and *Leptospira icterohaemorrhagiae*, two virulent strains, and *Leptospira patoc*, a non-virulent strain, were separately grown in liquid media (EMJH). The outer membrane proteins (OMP) were extracted using 0.04% sodium dodecyl sulfate. Lyophilized OMP solubilized in distilled water was measured for the protein content and run onto the SDS-PAGE. The solution of OMP was added to the confluent cultured HUVEC of the passages 2-3 to obtain the final protein concentrations of 0.1, 0.3 and 0.5 μg/ml. At the end of 6, 12 and 24 hours of the incubation period under 5% CO_2 at 37°C, supernatant was collected and assayed for the quantities of NO as nitrite and TNF-α. The results showed that the OMP extracted by 0.04% sodium dodecyl sulfate did not show the protein bands of low molecular weight responsible for the virulence of the Leptospira. The extracted OMP did not induce the production of NO as well as TNF-α by the cultured HUVEC except for the *Leptospira icterohaemorrhagiae* at the protein concentration of 0.5 μg/ml which has shown the significant increase of NO production. The lipopolysaccharide (LPS), an endotoxin used as the positive control, at 0.1 μg/ml did not induce the production of NO and TNF-α by the cultured HUVEC. This might be due to the insufficient amount of LPS used. The negative control using EC medium and water showed the increased production of NO and TNF-α by the cultured HUVEC. This result seemed to be the error of unknown causes. In conclusion, In the body, white blood cells (WBC) play the most important role in eliminating the pathogens, the EC possibly interacts with the WBC and potentiate the inflamatory reactions. Extraction of the OMP should be modified and examination of the proteins should be performed prior to conduct the study of OMP effects.

Field of studty Medical Science Student's signature.......................................

Acedemic year 2003 Advisor's signature.......................................

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ทุกท่านของห้องคลอดและห้องผ่าตัดสูติ-นรีเวช โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่กรุณาช่วยเหลือในการเก็บสายสะดือ

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่กรุณาอนุเคราะห์เชื้อ *Leptospira* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณพิมพ์ใจ นัยโกวิท นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 10 ชช. ที่ให้ความเอื้อเฟื้อเป็นอย่างดี รวมทั้งน้องๆ ห้อง EN 308 ที่น่ารักทุกคน

ขอขอบพระคุณ รศ.พญ.วรนุช ธนากิจ ที่กรุณาทำการตรวจ histology ของหลอดเลือด

ขอขอบพระคุณ รศ.โสภิต ธรรมอารี อาจารย์ที่ปรึกษา ที่คอยช่วยเหลือและให้คำปรึกษา

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ทุกท่าน ที่คอยเป็นกำลังใจ ดูแลและช่วยเหลือ

ขอขอบพระคุณ มารดา และสามีที่เป็นแรงใจที่สำคัญ ในการศึกษาและทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ ระดับปริญญาโท–เอก ในสถาบันอุดมศึกษาของรัฐทบวงมหาวิทยาลัย และ ทุนอุดหนุนโครงการวิจัยหรือค้นคว้าเพื่อทำวิทยานิพนธ์ของบัณฑิตวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูปภาพ	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
คำสำคัญ	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
โรคเลปโตสไปโรซิส	5
กลไกการเกิดโรค	10
Endothelial cell	17
Nitric oxide	19
Tumor necrosis factor	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	23
วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา	23
เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	23
สารเคมี	23
วิธีดำเนินงานวิจัย	24
การวัดผลและการเสนอผลการวิจัย	33
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	33

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลอง.. 34

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.. 48

รายการอ้างอิง.. 51

ภาคผนวก.. 56

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.. 63

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. Classification of Leptospira species.. 7
2. ปริมาณโปรทีนของ OMP ของเชื้อ *Leptospira bratislava, Leptospira icterohaemorrhagiae* และ *Leptospira patoc*…….................................. 35
3. แสดงค่าเปอร์เซนต์ cell viability ของ HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง.................................... 40
4. การสร้าง nitric oxide โดย HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ใช้วิธีการวัด nitrite..................... 43
5. แสดงผล TNF-α ของ HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง.. 46

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. แสดงลักษณะของเชื้อ *Leptospira* 5
2. โครงสร้างภายนอกของเชื้อ *Leptospira* 6
3. โครงสร้างภายในของเชื้อ *Leptospira* 6
4. แสดงการแพร่กระจายของโรค 9
5. โครงสร้างของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย 14
6. แสดงการสังเคราะห์ nitric oxide 21
7. แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดโปรีทีนผนังชั้นนอก (OMP) ของเชื้อ Leptospira... 26
8. ลักษณะ extension tube 29
9. การ incubate สายสะดือ เพื่อแยก endothelial cell 29
10. Standard curve ของ bovine serum albumin (BSA) ค่า absorbance วัดที่ wavelength 600 nm 35
11. ผลของการทำ SDS-PAGE เพื่อดูองค์ประกอบของ OMP Lane MW เป็น molecular weight standard, Lane 1; *L.patoc*, Lane 2; *L.icterohaemorrhagiae*, Lane 3; *L.bratislava* 35
12. Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) ที่เพาะเลี้ยง อายุ 7 วัน (กำลังขยาย x 100) 37
13. Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) ที่เพาะเลี้ยง อายุ 7 วัน (กำลังขยาย x 200) 37
14. Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) ที่ตรวจด้วย ABC method 38
15. กราฟแสดงค่าเปอร์เซนต์ cell viability ของ HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 6 ชั่วโมง 41
16. กราฟแสดงค่าเปอร์เซนต์ cell viability ของ HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 12 ชั่วโมง 41
17. กราฟแสดงค่าเปอร์เซนต์ cell viability ของ HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง 41

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

18. Standard curve ของการวัดปริมาณ $NaNO_3$.. 42

19. การสร้าง nitric oxide โดย HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 6 ชั่วโมง ใช้วิธีการวัด nitrite.................................. 44

20. การสร้าง nitric oxide โดย HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 12 ชั่วโมง ใช้วิธีการวัด nitrite.................................. 44

21. การสร้าง nitric oxide โดย HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง ใช้วิธีการวัด nitrite.................................. 44

22. กราฟแสดงผล TNF-α ของ HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 6 ชั่วโมง.. 47

23. กราฟแสดงผล TNF-α ของ HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 12 ชั่วโมง.. 47

24. กราฟแสดงผล TNF-α ของ HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง.. 47

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

$^{\circ}C$	degree Celcius
μg	microgram
μl	microlitre
μM	micromolar
ADP	adenosine diphosphate
ATP	adenosine triphosphate
Ca^{2+}	calcium ion
cGMP	3',5'-guanosine monophosphate
DMSO	dimethyl sulfoxide
EC	endothelial cell
EDCF	endothelium-derived constricting factor
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
eNOS	endothelial NOS (NOS-3)
ET	endothelin
FAD	flavin adenine dinucleotide
FMN	flavin mononucleotide
g	gram
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
iNOS	inducible NOS (NOS-2)
KCl	potassium chloride
KH_2PO_4	potassium phosphate
LPS	lipopolysaccharide, endotoxin
M	molar
MAT	microscopic agglutination test
mg	milligram
ml	milliliter
mM	millimolar
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

Na^+	sodium ion
NaCl	sodium chloride
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
nNOS	neuronal NOS (NOS-1)
NO	nitric oxide
NO_2^-	nitrite
NO_3^-	nitrate
NOS	nitric oxide synthase
OD	optical density
OMP	outer membrane protein
PBS	phosphate buffer saline
PGI_2	prostacyclin
TNF-α	tumor necrosis factor-α
TXA_2	thromboxane A_2
U	unit
UTP	uridine triphosphate