

บทบาทของเอนไซม์แลคเคสของเชื้อ *Penicillium marneffei* ต่อการสร้างไซโตไคน์ของมาโครฟาจ
The Role of Laccase Enzymes of *Penicillium marneffei* on Cytokine Production in Macrophage

จุติกุล แก้วมาลากุล (Jutikul Kaewmalakul)* สิริดา ยังนิม (Sirida Youngchim)**

นงนุช วนิตยธนาคม (Nongnuch Vanittanakom)***

บทคัดย่อ

แลคเคสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อราหลายชนิด และเพื่อเข้าใจถึงบทบาทของแลคเคสในเชื้อ *Penicillium marneffei* มากขึ้น จึงได้นำ conidia ของสายพันธุ์ที่มีการขาดหายไปของยีนที่กำหนดการสร้างแลคเคสกับเชื้อปกติไปเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ THP-1 ซึ่งเป็น monocyte ของคน ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ผลการทดลองพบว่าเชื้อที่มีการขาดหายไปของยีนที่กำหนดการสร้างแลคเคสทั้งสี่ยีนมีเปอร์เซ็นต์ phagocytosis สูงกว่าเชื้อปกติอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 60 และ 120 นาที และมีค่า phagocytic index สูงกว่าเชื้อปกติอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 15, 30, 60 และ 120 นาที นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การถูกทำลายของเชื้อ *P. marneffei* ที่มีการขาดหายไปของยีนที่กำหนดการสร้างแลคเคสทั้งสี่ยีนภายในมาโครฟาจ โดยการนับโคโลนีของเชื้อรา พบว่ามีจำนวนสูงกว่าเชื้อปกติอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 2 และ 4 ชั่วโมง และในการศึกษาบทบาทของแลคเคสที่มีผลต่อการสร้างไซโตไคน์ของ THP-1 พบว่าเชื้อที่มีการขาดหายไปของยีนที่กำหนดการสร้างแลคเคสทั้งสี่ยีนมีการสร้าง TNF- α สูงกว่าเชื้อปกติอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 2, 8 และ 24 ชั่วโมง

ABSTRACT

Laccase enzyme has been found to associate with virulence in several pathogenic fungi. To obtain a better understanding of the role of laccase in *P. marneffei*, conidia of laccase mutant strains and wild type were co-cultured with THP-1, human monocyte leukemia cell line in different incubation time. The percentage of phagocytosis of quadruple *lac* gene deletion strain at 60 and 120 minutes of infection were significantly higher than wild type and phagocytic index at 15, 30, 60 and 120 minutes were significantly higher when compared with wild type. In addition, the significantly higher percentage of intracellular killing of the quadruple *lac* gene deletion strain at 2 and 4 hours detected by viable colony plate counting was observed when compared with wild type. To study the effect of laccase on cytokine production, TNF- α secreted from THP-1 infected with the quadruple *lac* gene deletion strain was significantly increased in comparing with wild type after incubated for 2, 8 and 24 hours.

คำสำคัญ: เพนิซิลเลียม มาร์เนฟเฟีย มาโครฟาจ แลคเคส

Key Words: *Penicillium marneffei*, Macrophage, Laccase

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

*** ศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทนำ

เชื้อ *Penicillium marneffei* เป็นราสองรูป (dimorphic fungi) คือ มีรูปเป็นราสาย (mycelial form) ในธรรมชาติและมีรูปเป็นยีสต์ (yeast form) ขณะก่อโรค (Segretain, 1959) เป็นเชื้อราก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่สำคัญในผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี (Supparatpinyo *et al.*, 1994) พบผู้ติดเชื้อมากในประเทศทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ไทยและเวียดนาม และยังพบในประเทศอื่นในทวีปเอเชีย ได้แก่ ประเทศจีน อินเดียฮ่องกง และไต้หวัน (Deng *et al.*, 1988; Tsang *et al.*, 1991; Supparatpinyo *et al.*, 1994; Duong *et al.*, 1996; Wong, 1998) การติดเชื้อคาดว่าน่าจะเกิดจากการที่ผู้ป่วยหายใจเอาสปอร์หรือชิ้นส่วนของเชื้อราที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมเข้าไป (Cooper and McGinnis, 1997) หลังจากนั้น phagocytic cells ซึ่ง ได้แก่ มาโครฟาจและนิวโทรฟิล จะเป็นด่านแรกที่มีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อ โดยผ่านขบวนการ phagocytosis (Viviani *et al.*, 1993)

จากการศึกษาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของ host ต่อการติดเชื้อ *P. marneffei* พบว่า peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ของคนที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *P. marneffei* ที่อยู่ในรูปยีสต์มีการหลั่ง proinflammatory cytokine ชนิด tumor necrosis factor- α (TNF- α) ปริมาณสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ PBMC ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ (Rongrungruang and Levitz, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่า macrophage ที่อยู่ในเนื้อเยื่อของม้ามและตับของหนูที่ติดเชื้อ มีการสร้าง proinflammatory cytokines หลายชนิดในปริมาณสูง ได้แก่ TNF- α , Interleukin-12 (IL-12) และ Interferon gamma (IFN- γ) (Sisto *et al.*, 2003) รวมทั้งยังพบว่า เชื้อที่อยู่ในรูปราสาสามารถกระตุ้นให้โมโนไซต์ของคนสร้าง TNF- α และ IL-1 β (Srinoulprasert *et al.*, 2009)

แลคเคสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในเชื้อรา มีบทบาทในการเจริญ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเชื้อ ขบวนการกำจัดสารพิษและการก่อโรคของเชื้อรา

(Thurston, 1994) รวมทั้งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์เมลานินของเชื้อ *P. marneffei* (Youngchim *et al.*, 2005) โดยพบว่ามี 4 ยีนที่กำหนดการสร้างแลคเคส ได้แก่ *lac1*, *lac2*, *lac3* และ *arb2* โดยยีน *lac1* และ *lac3* มีการแสดงออกในระดับต่ำๆ ในสภาวะการเจริญปกติ ขณะที่ยีน *lac1* และ *lac2* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในสภาวะเครียดจากอนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species) และ *arb2* มีการแสดงออกในช่วงที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (conidia) และมีบทบาทในการสร้างสีของโคโลนี จากการศึกษาพบว่า เมื่อมีการขาดหายไปถึง 4 ยีน จะทำให้สีของ conidia เปลี่ยนไปจากสีเขียวแกมเทาเป็นสีน้ำตาล ทำให้เชื้อมีความไวเพิ่มขึ้นต่อสภาวะเครียดจากอนุมูลอิสระของออกซิเจน สภาวะเครียดที่ผนังเซลล์ รวมทั้งยาด้านเชื้อรา (Sapmak, 2012) มีการศึกษาบทบาทของเมลานินกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของ host ในเชื้อ *Cryptococcus neoformans* พบว่า เซลล์ปอดของหนูที่ติดเชื้อ *C. neoformans* wild-type ที่มีเอนไซม์แลคเคส ซึ่งสามารถสร้างเมลานินได้ จะมีการสร้าง monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) และ IL-4 ในระดับที่สูงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูที่ติดเชื้อ *C. neoformans* laccase mutant ที่ไม่มีเอนไซม์แลคเคส และไม่สามารถสร้างเมลานินได้ (Mednick *et al.*, 2005) ส่วนในเชื้อ *Aspergillus fumigatus* พบว่า conidia ที่ไม่สามารถสร้างเมลานินได้ (albino conidia) จะไปเหนี่ยวนำให้ PBMC ของคนมีการสร้าง proinflammatory cytokine ได้แก่ TNF- α และ IL-6 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ conidia ของเชื้อ wild-type ที่มีการสร้างเมลานินได้ (Chai *et al.*, 2010)

ในปัจจุบันนี้ ยังไม่มีการศึกษาบทบาทของเอนไซม์แลคเคสในเชื้อ *P. marneffei* ที่เกี่ยวข้องต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงบทบาทของเอนไซม์แลคเคสในการปกป้องตัวเชื้อราต่อการถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และการกระตุ้น

ให้มาโครฟาจสร้างไซโตไคน์ในการตอบสนองต่อการติดเชื้อ *P. marneffei* ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ทำให้เข้าใจเกี่ยวกับการก่อโรคของเชื้อเมื่อมีการติดเชื้อภายในร่างกาย ผลจากการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการศึกษากลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อเชื้อ *P. marneffei*

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาถึงบทบาทของเอนไซม์แลคเคสในการปกป้องตัวเชื้อ *P. marneffei* ต่อการถูกทำลายด้วยมาโครฟาจ และการกระตุ้นให้มาโครฟาจสร้างไซโตไคน์ในการตอบสนองต่อการติดเชื้อ *P. marneffei* โดยเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่มีการหายไปของยีนที่กำหนดการสร้างแลคเคสกับเชื้อปกติ

วิธีการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเชื้อและเซลล์มาโครฟาจ

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *P. marneffei* Wild-type ($\Delta pkuA$ $\Delta pyrG^+$), Quadruple *lac* gene deletion strain ($\Delta lac1$ $\Delta lac2$ $\Delta lac3$ $\Delta arb2$) และ Single *lac* gene deletion strains ($\Delta lac1$, $\Delta lac2$, $\Delta lac3$, $\Delta arb2$) บนอาหาร *Aspergillus nidulans* synthetic medium (ANM) แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทำการเก็บ conidia โดยใช้ swab ขูด normal saline solution (NSS) ที่ผสม 0.01% tween 80 เก็บ conidia แล้วนำไปกรองผ่าน glass wool เพื่อเอา hyphae ออก หลังจากนั้นปรับปริมาณ conidia ให้ได้ประมาณ $1-5 \times 10^8$ cells/ml

เซลล์มาโครฟาจที่ใช้ในการศึกษานี้คือ THP-1 cell line (human monocyte leukemia cell line) โดยทำการเลี้ยงในอาหาร RPMI-1640 medium ที่มี 2-mecaptoethanol 0.05 mM และ fetal bovine serum 10% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 3-4 วัน หลังจากนั้นนำเซลล์มาโครฟาจมากระตุ้นด้วย Phorbol myristate

acetate (PMA) 100 ng/ml เลี้ยงใน 24 well plate เป็นเวลา 72 ชั่วโมงก่อนนำมาเติม conidia

การตรวจวัดเปอร์เซ็นต์ phagocytosis และ phagocytic index ของมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ wild-type และ laccase mutant strains

นำเซลล์มาโครฟาจที่เลี้ยงใน 24 well plate มาเติม conidia ในอัตราส่วนระหว่างเซลล์ต่อ conidia เท่ากับ 1:2 จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ 15, 30, 60 และ 120 นาที หลังจากนั้นดูด supernatant ทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง เพื่อกำจัด conidia ที่ไม่ถูก phagocytosis ออกไป แล้วทำการ trypsinize เซลล์ด้วย 0.25% trypsin-EDTA 500 μ l เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์ macrophage หลุดออกจาก plate กลายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ หลังจากนั้นเติม RPMI-1640 medium ที่มี fetal bovine serum 10% ลงไป 500 μ l แล้วนำไปปั่นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้น fix ด้วย 0.5% paraformaldehyde แล้วนำไปตรวจวัดหาเปอร์เซ็นต์ phagocytosis โดยนับจาก macrophage 100 เซลล์ ว่ามีกี่เซลล์ที่สามารถ phagocytosis conidia ส่วนค่า phagocytic index คือ ค่าเฉลี่ยของจำนวน conidia ที่อยู่ใน macrophage 1 เซลล์ คำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวน conidia ทั้งหมดภายในเซลล์}}{\text{จำนวนเซลล์มาโครฟาจ}}$$

ซึ่งการทดลอง มีการทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

การตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การทำลายเชื้อภายในมาโครฟาจโดยวิธี dilution plate count

นำเซลล์มาโครฟาจที่เลี้ยงใน 24 well plate มาเติม conidia ในอัตราส่วนระหว่างเซลล์ต่อ conidia เท่ากับ 1:2 จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูด supernatant ทิ้งแล้วล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง เพื่อกำจัด conidia ที่ไม่ถูก phagocytosis ออกไป แล้วเติม RPMI-1640 medium ที่

มี 2-mecaptoethanol 0.05 mM และ fetal bovine serum 10% เข้าไปใหม่ หลังจากนั้น incubate ต่อไปเป็นระยะเวลา 2, 4 และ 8 ชั่วโมง เพื่อให้มาโครฟาจทำลาย conidia ที่อยู่ภายในเซลล์ แล้วทำการแตกเซลล์ มาโครฟาจด้วย 1% Triton X-100 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงลงบน potato dextrose agar (PDA) เพื่อบันทึกจำนวน conidia ที่อยู่ภายในเซลล์มาโครฟาจ โดยเปอร์เซ็นต์การทำลายเชื้อภายในมาโครฟาจ จะคำนวณจาก

$$\left\{ \frac{1 - \text{CFU* ของเชื้อที่ทำการทดสอบ}}{\text{CFU control}} \right\} \times 100$$

ซึ่งการทดลอง มีการทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

* CFU= Colony forming unit

การตรวจวัดการสร้างไซโตไคน์ของมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ Wild-type และ laccase mutant strains โดยวิธี ELISA

นำ culture supernatant มาตรวจวัดระดับของ proinflammatory cytokines ได้แก่ TNF- α , IL-1 β , IL-6 และ IL-12 โดยใช้ชุด ELISA kits (ELISA MAX™ BioLegend, CA) ซึ่งพื้นหลุมของ 96 well plate จะถูกเคลือบด้วย monoclonal antibody (MAb) ที่จำเพาะต่อ cytokine แต่ละชนิด จากนั้นทำการเติม culture supernatant ปริมาตร 100 μ l นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS-0.05% Tween 20 จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นเติม Ab ที่จำเพาะต่อ cytokine แต่ละชนิดที่ติดฉลากด้วย biotin ปริมาตร 100 μ l นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS-0.05% Tween 20 จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นเติม avidin ที่ติดฉลากด้วย เอนไซม์ horseradish peroxidase ปริมาตร 100 μ l นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS-0.05% Tween 20 จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นเติม substrate solution ปริมาตร 100 μ l นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติม stop

solution ปริมาตร 100 μ l เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm และ 570 nm

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA) มาใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง

ผลการวิจัย

การตรวจวัดเปอร์เซ็นต์ phagocytosis และ phagocytic index

ผลการตรวจวัดเปอร์เซ็นต์ phagocytosis ของเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ Wild-type และ laccase mutant strains พบว่ามาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ Wild-type, Quadruple lac gene deletion strain, Δ lac1, Δ lac2, Δ lac3 และ Δ arb2 มีเปอร์เซ็นต์ phagocytosis ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1 ซึ่งจะพบว่าเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ Wild type, Quadruple lac gene deletion strain, Δ lac1, Δ lac2, Δ lac3 และ Δ arb2 เป็นระยะเวลา 15 และ 30 นาที มีเปอร์เซ็นต์ phagocytosis ใกล้เคียงกันส่วนที่ระยะเวลา 60 และ 120 นาที เซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ Quadruple lac gene deletion strain มีเปอร์เซ็นต์ phagocytosis สูงกว่าเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ Wild-type และ Single lac gene deletion strain โดยมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ Quadruple lac gene deletion strain มีเปอร์เซ็นต์ phagocytosis สูงกว่าเชื้อ Wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการคำนวณค่า phagocytic index พบว่าเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ Wild-type, Quadruple lac gene deletion strain, Δ lac1, Δ lac2, Δ lac3 และ Δ arb2 มี phagocytic index ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 2 ซึ่งจะพบว่าเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ Quadruple

lac gene deletion strain เป็นระยะเวลา 15, 30, 60 และ 120 นาที มี phagocytic index สูงกว่าเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ Wild-type และ Single *lac* gene deletion strain โดยมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย

เชื้อ Quadruple *lac* gene deletion strain มี phagocytic index สูงกว่าเชื้อ Wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ phagocytosis ของเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ *P. marneffei* ทั้ง Wild-type, Quadruple *lac* gene deletion strain, $\Delta lac1$, $\Delta lac2$, $\Delta lac3$ และ $\Delta arb2$ ที่ระยะเวลาต่างๆ

Time of incubation (minute)	Strains of <i>P. marneffei</i>					
	Wild-type	Quadruple <i>lac</i> gene deletion	$\Delta lac1$	$\Delta lac2$	$\Delta lac3$	$\Delta arb2$
15	6.50	6.00	4.50	4.50	7.00	4.00
30	14.00	12.00	8.00	13.00	16.00	8.00
60	15.00	25.50	14.00	12.00	17.50	12.00
120	25.50	31.00	21.50	22.00	20.50	19.50

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่า phagocytic index ของมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ *P. marneffei* ทั้ง Wild-type, Quadruple *lac* gene deletion strain, $\Delta lac1$, $\Delta lac2$, $\Delta lac3$ และ $\Delta arb2$ ที่ระยะเวลาต่างๆ

Time of incubation (minute)	Strains of <i>P. marneffei</i>					
	Wild-type	Quadruple <i>lac</i> gene deletion	$\Delta lac1$	$\Delta lac2$	$\Delta lac3$	$\Delta arb2$
15	1.00	2.07	1.12	1.35	1.35	1.25
30	1.25	1.98	1.14	1.31	1.31	1.69
60	1.25	2.09	1.04	1.38	1.31	1.12
120	1.11	2.34	1.02	1.18	1.46	1.03

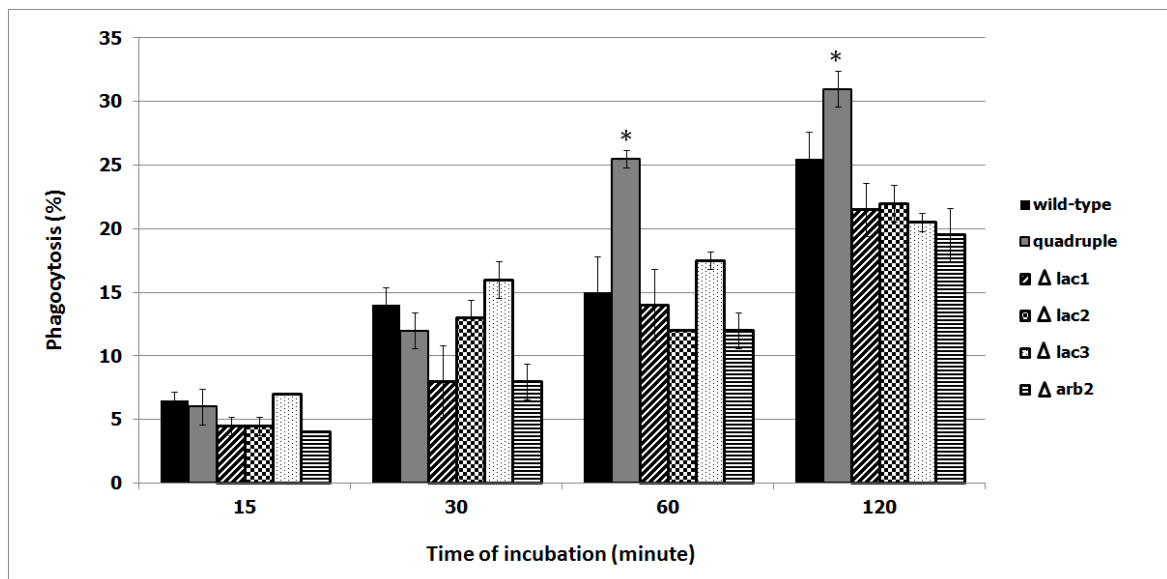
การตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การทำลายเชื้อภายในมาโครฟาจ
ผลการตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การทำลายเชื้อภายในมาโครฟาจโดยวิธี dilution plate count พบว่าเชื้อ Wild-type, Quadruple *lac* gene deletion strain, $\Delta lac1$, $\Delta lac2$, $\Delta lac3$ และ $\Delta arb2$ ถูกทำลายภายในมาโครฟาจ ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 3 โดยพบว่าเชื้อ

Quadruple *lac* gene deletion strain ถูกทำลายภายในมาโครฟาจในระยะเวลา 2, 4 และ 8 ชั่วโมง สูงกว่าเชื้อ Wild-type และ Single *lac* gene deletion strain โดยเชื้อ Quadruple *lac* gene deletion strain ถูกทำลายภายในมาโครฟาจในระยะเวลา 2 และ 4 ชั่วโมง สูงกว่าเชื้อ Wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

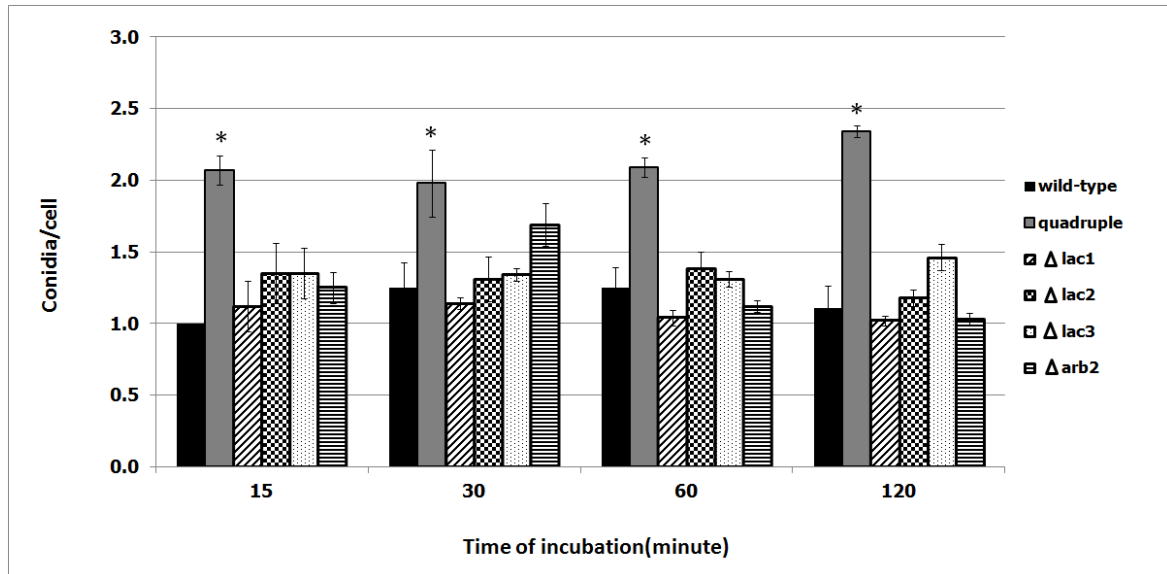
การตรวจวัดการสร้างไซโตไคน์ของมาโครฟาจ

ผลการตรวจวัดการสร้างไซโตไคน์ของมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ Wild-type และ laccase mutant strains โดยวิธี ELISA พบว่าเชื้อ Wild-type และ Quadruple *lac* gene deletion strain มีการกระตุ้นให้มาโครฟาจหลั่ง TNF- α ซึ่งจะพบว่าเชื้อ

Quadruple *lac* gene deletion strain สามารถกระตุ้นให้มาโครฟาจหลั่ง TNF- α สูงกว่าเชื้อ Wild-type อย่างมีนัยสำคัญในระยะเวลา 2, 8 และ 24 ชั่วโมง ($p < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4



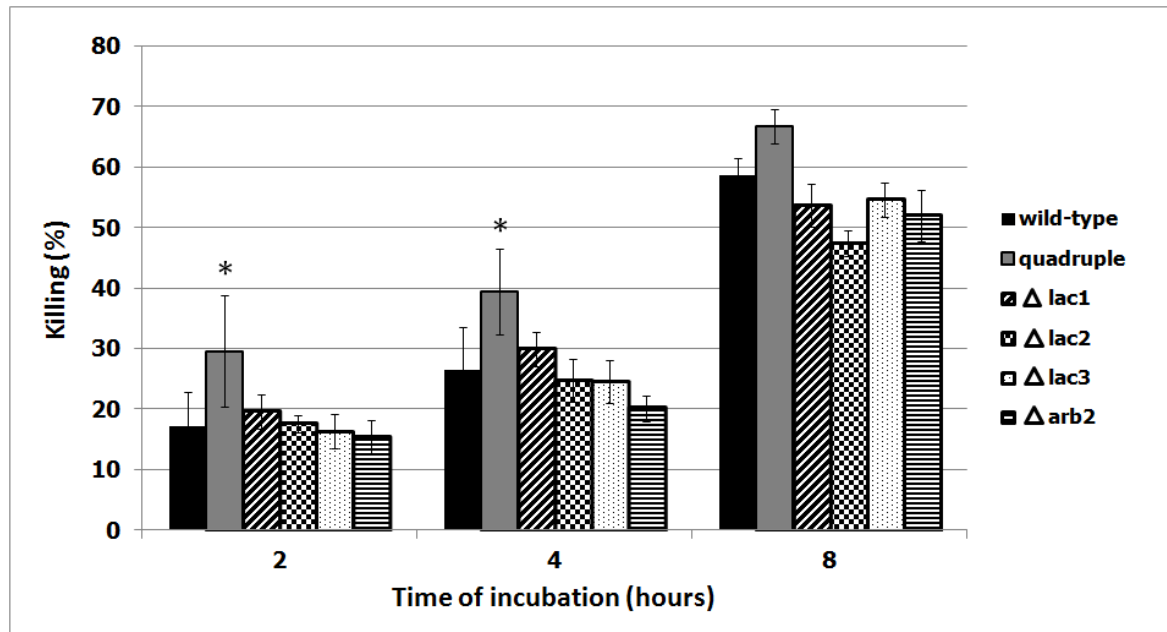
รูปที่ 1 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ phagocytosis ของเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ *P. marneffei* ทั้งชนิด Wild-type, Quadruple *lac* gene deletion strain, $\Delta lac1$, $\Delta lac2$, $\Delta lac3$ และ $\Delta arb2$ (ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD) * $p < 0.05$



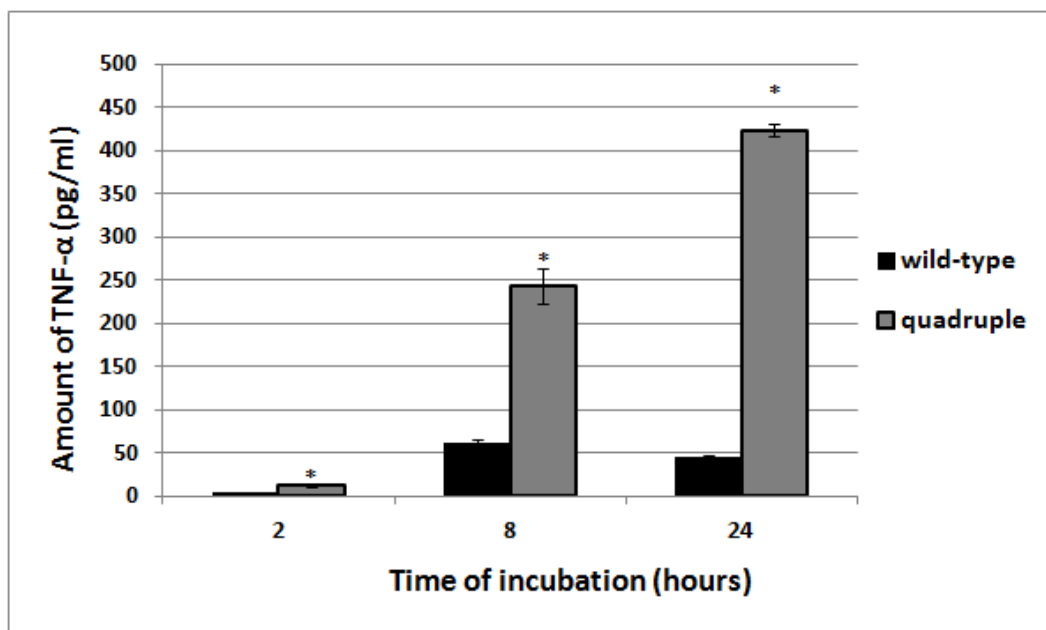
รูปที่ 2 เปรียบเทียบค่า phagocytic index ของเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ *P. marneffei* ทั้งชนิด Wild-type, Quadruple *lac* gene deletion strain, $\Delta lac1$, $\Delta lac2$, $\Delta lac3$ และ $\Delta arb2$ (ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD) * $p < 0.05$

ตารางที่ 3 เปอร์เซนต์การทำลายเชื้อ *P. marneffei* ทั้งชนิด Wild-type, Quadruple *lac* gene deletion strain, $\Delta lac1$, $\Delta lac2$, $\Delta lac3$ และ $\Delta arb2$ ภายในเซลล์มาโครฟาจที่ระยะเวลาต่างๆ

Time of incubation (hours)	Strains of <i>P. marneffei</i>					
	Wild-type	Quadruple <i>lac</i> gene deletion	$\Delta lac1$	$\Delta lac2$	$\Delta lac3$	$\Delta arb2$
2	17.24	29.54	19.59	17.52	16.36	15.38
4	26.44	39.39	29.90	24.74	24.54	20.19
8	58.62	66.67	53.61	47.42	54.54	51.92



รูปที่ 3 เปรียบเทียบการทำลายเชื้อ *P. marneffei* ทั้งชนิด Wild-type, Quadruple *lac* gene deletion strain, $\Delta lac1$, $\Delta lac2$, $\Delta lac3$ และ $\Delta arb2$ ภายในมาโครฟาจ โดยวิธี dilution plate count *p<0.05



รูปที่ 4 เปรียบเทียบปริมาณ TNF- α ที่หลั่งจากเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ *P. marneffei* ชนิด Wild-type และ Quadruple *lac* gene deletion strain ที่ตรวจวัดโดยวิธี ELISA *p<0.05

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาถึงบทบาทของเอนไซม์แลคเคสของเชื้อ *P. marneffei* ต่อการตอบสนองของเซลล์มาโครฟาจ (THP-1 cell line) โดยได้ตรวจวัดเปอร์เซ็นต์ phagocytosis และ phagocytic index ของมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ Wild-type เปรียบเทียบกับเชื้อ *laccase* mutant strains จากกล้องจุลทรรศน์ และวัดเปอร์เซ็นต์การทำลายของเชื้อภายในมาโครฟาจโดยวิธี dilution plate count และการกระตุ้นให้มาโครฟาจสร้างไซโตไคน์ ตรวจวัดโดยวิธี ELISA โดยพบว่ามาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ Quadruple *lac* gene deletion strain เป็นระยะเวลา 60 และ 120 นาที มีเปอร์เซ็นต์ phagocytosis สูงกว่ามาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ Wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ Quadruple *lac* gene deletion strain เป็นระยะเวลา 15, 30, 60 และ 120 นาที มี phagocytic index สูงกว่ามาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย conidia ของเชื้อ Wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าเชื้อ Quadruple *lac* gene deletion strain ถูกทำลายภายในเซลล์มาโครฟาจในระยะเวลา 2 และ 4 ชั่วโมง สูงกว่าเชื้อ Wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแลคเคสมีบทบาทในการปกป้องเชื้อจากการถูก phagocytosis และการทำลายของมาโครฟาจ และต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของแลคเคสทั้งสี่ชิ้น

นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อ Quadruple *lac* gene deletion strain มีการกระตุ้นให้เซลล์มาโครฟาจหลั่ง TNF- α สูงกว่าเชื้อ Wild-type อย่างมีนัยสำคัญในระยะเวลา 2, 8 และ 24 ชั่วโมง ซึ่งผลจากการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Chai และคณะ (2010) ที่ได้ทำการศึกษายาทบาทของเมลานินของเชื้อ *A. fumigatus* ต่อการสร้าง proinflammatory cytokines ของ PBMC โดยพบว่า conidia ที่ไม่สามารถสร้างเมลานินได้ (albino conidia) จะไปเหนี่ยวนำให้ PBMC

ของคนที่มีการสร้าง proinflammatory cytokine ได้แก่ TNF- α และ IL-6 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ conidia ของเชื้อ Wild-type ที่มีการสร้างเมลานินได้

ผลการศึกษาจึงสามารถสรุปได้ว่า เอนไซม์แลคเคสสามารถป้องกันเชื้อจากการถูกทำลายจากเซลล์มาโครฟาจ และต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของแลคเคสทั้งสี่ชิ้น ซึ่งแลคเคสน่าจะเป็นเป้าหมายในการพัฒนายาต้านเชื้อราต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ. ดร. สิริดา ยังฉิม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆ ในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนการวิจัย และสถานที่ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Chai L, Netea MG, Sugui J, Vonk AG, Van de sande W, Warris A, et al. 2010. *Aspergillus fumigatus* conidial melanin modulates host cytokine response. *Immunobiology*. 215(11): 915–920.
- Cooper C and McGinnis MR. 1997. Pathology of *Penicillium marneffei*. *Arch Pathol Lab Med*. 121: 798–804.
- Deng Z, Ribas JL, Gibson DW, Connor DH. 1988. Infections caused by *Penicillium marneffei* in China and Southeast Asia: review of eighteen published cases and report of four more Chinese cases. *Rev Infect Dis*. 10(3): 640–652.
- Duong TA. 1996. Infection due to *Penicillium marneffei*, an emerging pathogen: review of 155 reported cases. *Clin Infect Dis*. 23(1): 125–130.

- Mednick AJ, Nosanchuk JD, Casadevall A. 2005. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during Cryptococcal infection. *Infect Immun.* 73(4): 2012-2019.
- Rongrungruang Y, Levitz SM. 1999. Interactions of *Penicillium marneffei* with human leukocytes *in vitro*. *Infect Immun.* 67(9): 4732-4736.
- Sapmak A. 2012. The role of *Penicillium marneffei* Laccases against stress conditions, Thesis for Doctor of Philosophy in Microbiology, Chiang Mai University.
- Segretain G. 1959. *Penicillium marneffei* n. sp., agent d'unemycose du systeme reticulo-endothelial. *Mycopathologia et Mycologia.* 11(4): 327-353.
- Sisto F, Miluzio A, Leopardi O, Mirra M, Boelaert JR, Taramelli D. 2003. Differential cytokine pattern in the spleens and livers of BALB/c mice infected with *Penicillium marneffei*: protective role of gamma interferon. *Infect Immun.* 71(1): 465-473.
- Srinoulprasert Y, Pongtanalert P, Chawengkirtikul R, Chaiyaroj SC. 2009. Engagement of *Penicillium marneffei* conidia with multiple pattern recognition receptors on human monocytes. *Microbiol Immunol.* 53(3): 162-172.
- Supparatpinyo K, Kwamwan C, Baosoung V, Nelson KE, Sirisanthana T. 1994. Disseminated *Penicillium marneffei* infection in Southeast Asia. *Lancet.* 344(8915): 1739-1743.
- Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology.* 140: 19-26.
- Tsang DNC, Li PC, Tsui MS, Lau YT, Ma KF, Yeoh EK. 1991. *Penicillium marneffei* : another pathogen to consider in patients infected with human immunodeficiency virus. *Rev of Infect Dis.* 13: 766.
- Viviani MA, Tortorano AM, Rizzardini G, Quirino T, Kaufman L, Padhye AA, *et al.* 1993. Treatment and serological studies of an Italian case of Penicilliosis marneffei contracted in Thailand by a drug addict infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Epidemiol.* 9(1): 79-85.
- Wong KH, Lee SS, Chan KC, Choi T. 1998. Redefining AIDS: case exemplified by *Penicillium marneffei* infection in HIV-infected people in Hong Kong. *Int J STD AIDS.* 9(9): 555-556.
- Youngchim S, Hay RJ, Hamilton AJ. 2005. Melanization of *Penicillium marneffei* *in vitro* and *in vivo*. *Microbiol.* 151: 291-299.