

Complement Receptor Ig Expression in Human Monocyte-Derived Macrophages

Kanokwan Lunwongsa, Tunyaluk Youngsawang, Savitri Boonsri,
Chatuporn Wanitthanakhom, Jittipan Chanpaen, Watunyoo Buakaew,
Nateelak Kooltheat, Pachuen Potup, Yordhathai Thongsri and Kanchana Usuwanthim*

*Cellular and Molecular Immunology Research Unit, Faculty of Allied Health Sciences
Naresuan University, Phitsanulok Province, Thailand*

Abstract

Complement receptor of the immunoglobulin superfamily (CRIg) is specifically expressed on macrophages which enhance phagocytosis of the innate immune system. Previous study found that dexamethasone can activate the expression of CRIg on macrophages. Macrophage polarization has different functions. However, the association of those expressions on each stage of macrophage has not been reported. Thus, the objective of this study was to observe CRIg expression on M0, M1 and M2 human macrophages. Monocyte-derived macrophages were cultured and the differentiation of macrophages M0, M1 and M2 were observed by inverted microscope, flow cytometry and quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). Cells were treated with low and high concentrations of dexamethasone for 24 hours. Then, the treated cells were harvested for *VSIG4* expression analysis by qRT-PCR. The results showed that dexamethasone stimulated M0 macrophages significantly increased the *VSIG4* expression compared to the untreated control ($p < 0.05$). Moreover, M2 macrophages treated with low concentration of dexamethasone had significantly higher *VSIG4* expression than the untreated cells ($p < 0.05$). The results suggested that *VSIG4* are differently expressed in macrophages polarization. M2 macrophage has high *VSIG4* expressions that mediate anti-inflammation and wound healing.

Keywords: Macrophage, Complement receptor of the immunoglobulin superfamily (CRIg), Flow cytometry

*Corresponding author E-mail address: kanchanau@nu.ac.th

การแสดงออกของคอมพลีเมนต์รีเซปเตอร์อิมมูโนโกลบูลิน ในเซลล์แมคโครฟาจที่พัฒนามาจากโมโนไซต์

กนกวรรณ ถิ่นวงษา รัชฎ์ลักษณ์ ยังสว่าง สาวิตรี บุญศรี จตุพร วณิชย์ธนาคม
จิตติพันธ์ จันทรแป้น วรัญญ บัวแก้ว นทีลักษณ์ กุลเทศ พาชื่น โพทัพ
ยอดหทัย ทองศรี และ กาญจนา อู่สุวรรณทิมา*

หน่วยวิจัยภูมิคุ้มกันระดับเซลล์และโมเลกุล คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

บทคัดย่อ

คอมพลีเมนต์รีเซปเตอร์อิมมูโนโกลบูลิน (complement receptor of the immunoglobulin superfamily, CRIg) เป็นโมเลกุลที่แสดงออกบนเซลล์แมคโครฟาจ มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน โดยกำเนิด ทำหน้าที่ส่งเสริมกระบวนการฟาโกไซโทซิสของเซลล์แมคโครฟาจ จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ CRIg ด้วยยา dexamethasone แต่เนื่องจากเซลล์แมคโครฟาจมีหลายระยะและมีหน้าที่แตกต่างกันอีกทั้งยังไม่มีมีการรายงานการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของโมเลกุล CRIg ในระยะต่าง ๆ ของเซลล์แมคโครฟาจ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ CRIg ในเซลล์แมคโครฟาจระยะต่าง ๆ ซึ่งพัฒนามาจากเม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ของคน โดยงานวิจัยนี้ใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์เพาะเลี้ยงให้เป็นเซลล์แมคโครฟาจ M0, M1 และ M2 โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์ด้วย inverted microscope การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ด้วยฟลูออโรสโคป และการแสดงออกของยีนจำเพาะด้วยวิธี quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียา dexamethasone ความเข้มข้นต่ำและสูงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วศึกษาการแสดงออกของยีน VSIG4 ซึ่งเป็นยีนควบคุมการแสดงออกของ CRIg ด้วยวิธี qRT-PCR ผลการวิจัยพบว่าการแสดงออกของยีน VSIG4 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในเซลล์แมคโครฟาจ M0 ในสภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยยา dexamethasone เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่ยา นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของยีน VSIG4 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในแมคโครฟาจ M2 ที่กระตุ้นด้วยยาระดับความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่ยา จึงสรุปผลการวิจัยได้ว่าในแต่ละระยะของเซลล์แมคโครฟาจจะมีการแสดงออกของยีน VSIG4 ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยพบการแสดงออกปริมาณสูงในเซลล์แมคโครฟาจ M2 ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ด้านการอักเสบและซ่อมแซมเนื้อเยื่อเมื่อเกิดการบาดเจ็บในร่างกาย

คำสำคัญ: แมคโครฟาจ คอมพลีเมนต์รีเซปเตอร์อิมมูโนโกลบูลิน ฟลูออโรสโคป

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: kanchanau@nu.ac.th

บทนำ

ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) เป็นการตอบสนองของร่างกายต่อสิ่งแปลกปลอมและเป็นด่านแรกในการต่อสู้และป้องกันเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย โดยใช้ตัวรับ (receptor) ที่มีอยู่บนเซลล์ต่างๆ ในการรับรู้ส่วนประกอบทางเคมีของเชื้อโรค แมโครฟาจเป็นเซลล์หลักในกระบวนการ opsonization เมื่อมี IgG และชิ้นส่วนคอมพลีเมนต์เช่น C3b จับอยู่บนผิวเชื้อโรคเซลล์แมโครฟาจซึ่งมี Fcγ receptor และ C3b receptor จึงสามารถจับกินเชื้อโรคได้⁽¹⁾ ปัจจุบันได้มีการค้นพบตัวรับของคอมพลีเมนต์ชนิดใหม่บนแมโครฟาจเรียกว่า complement receptor of the immunoglobulin superfamily (CRIg) หรือ V-set และ Ig domain-containing 4 (VSIG4) หรือ Z39Ig⁽²⁾ ซึ่งมีโครงสร้างและสมบัติที่แตกต่างจากตัวรับของคอมพลีเมนต์ทั่วไป⁽³⁾ CRIg มีหน้าที่หลัก คือ ช่วยกำจัดเชื้อโรค แอนติเจน เศษเซลล์ และ immune complex ด้วยการส่งเสริมให้เกิดกระบวนการฟาโกไซโทซิส และยังช่วยยับยั้งการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ใน alternative pathway โดยสามารถจับกับ C3b ทำให้ไม่เกิด C3 convertase และ C5 convertase ส่งผลให้ไม่เกิด C3a และ C5a ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการอักเสบ ดังนั้น จึงลดการอักเสบของเซลล์และไม่เกิดการแตกของเซลล์เป้าหมาย (membrane attack complex)⁽⁴⁾ CRIg ยังมีหน้าที่ในการลดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ T-cell ทั้งในหลอดทดลองและภายในร่างกายของหนู จึงมีประโยชน์ในการป้องกันการพัฒนาของโรคภูมิคุ้มกันตนเอง (autoimmune disease)⁽⁵⁾

แมโครฟาจเป็นเซลล์ที่เจริญมาจากโมโนไซต์ โดยการเจริญพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโมโนไซต์จากไขกระดูกออกสู่กระแสเลือดต้องอาศัย hematopoietic growth factors ที่สำคัญได้แก่ macrophages colony-stimulating factor

(M-CSF) และ granulocyte-macrophages colony-stimulating factor (GM-CSF) การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างและหน้าที่ของแมโครฟาจสามารถเกิดขึ้นได้เมื่อมีการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นที่แตกต่างกัน โดยกลไกการกระตุ้นของแมโครฟาจแบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ classical และ alternative โดย IFN-γ สามารถกระตุ้นแมโครฟาจ M0 ให้เป็น M1 (classical activated macrophages) ซึ่งมีบทบาทในการกระตุ้นกระบวนการอักเสบโดยหลั่งไซโตไคน์ เช่น TNF-α, IL-6 และหลั่งสารจำพวก reactive oxygen species (ROS) และ nitric oxide (NO) จึงช่วยกำจัดเชื้อโรค อีกทั้งยังส่งเสริมกระบวนการตอบสนองของเซลล์ Th1 และเกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์มะเร็ง ส่วนแมโครฟาจ M2 (alternative activated of macrophages) เกิดจากการกระตุ้นด้วย IL-4 และ IL-13 โดย M2 จะหลั่ง arginase 1 ซึ่งจะทำให้ลดการหลั่งไซโตไคน์ชนิด TNF-α, IL-6, IL-12 รวมทั้งสาร NO ซึ่งลดกระบวนการอักเสบ ส่งเสริมการตอบสนองของเซลล์ Th2 และซ่อมแซมเนื้อเยื่อ^(6, 7) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่า CRIg เป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่สำคัญและพบอยู่ในเซลล์แมโครฟาจ โดยแมโครฟาจยังมีหลายระยะและทำหน้าที่แตกต่างกันในระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดและยังส่งผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระยะของแมโครฟาจและการส่งออกของ CRIg ในแมโครฟาจระยะต่างๆ

วัสดุและวิธีการ

1. วิธีการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างเม็ดเลือดขาว (buffy coat) จากผู้บริจาคโลหิต ณ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก โดยโครงการวิจัยได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร (IRB No.331/58) นำ buffy coat มาเจือจางด้วย Hanks' balanced salt solution (HBSS) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำมาปั่นแยกโดยใช้ยา Lymphoprep (density = 1.077 g/mL) (Axis-Shield PoC AS, Norway) ด้วยความเร็ว $600 \times g$ เป็นเวลา 30 นาที ที่ 25°C จะได้ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ได้แก่ ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ จากนั้นนำ PBMCs มาปั่นล้าง 1 ครั้งด้วย HBSS ปริมาตร 30 mL ที่ความเร็ว $300 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม RPMI 1640 ลงไปและนำไปปั่นแยกด้วยน้ำยา hyperosmotic Percoll (density = 1.064 g/mL) (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) ที่ $400 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแยกชั้นของโมโนไซต์ซึ่งอยู่บนชั้นของสารละลาย hyperosmotic Percoll นำมาปั่นล้างด้วย HBSS ที่ $300 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที จะได้ตะกอนชั้นสุดท้ายที่เป็นเซลล์โมโนไซต์ นับจำนวนเซลล์และทดสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยผสมเซลล์ที่แยกได้กับสารละลาย 0.4% trypan blue ในอัตราส่วน 1:1 และนำไปนับเซลล์ด้วย hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์⁽⁸⁾

2. วิธีการเพาะเลี้ยงโมโนไซต์และแมคโครฟาจ

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วย RPMI 1640, 10% fetal bovine serum, penicillin streptomycin (Thermo Fisher Scientific USA) และ ciprofloxacin (Favorex Ltd, Switzerland) สำหรับเพาะเลี้ยงโมโนไซต์ ในสภาวะอุณหภูมิ 37°C , 5% CO_2 โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน

การกระตุ้นโมโนไซต์ให้เป็นแมคโครฟาจ M0

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วย RPMI-1640, fetal bovine serum, penicillin streptomycin, ciprofloxacin, M-CSF, MgSO_4

และ CaCO_3 สำหรับกระตุ้นโมโนไซต์ให้เป็นแมคโครฟาจ (M0) ในสภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน จนกระทั่งโมโนไซต์เปลี่ยนเป็นแมคโครฟาจ โดยสังเกตลักษณะอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 14 วัน

การกระตุ้นแมคโครฟาจ M0 เป็น M1

นำแมคโครฟาจ M0 มาเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของ TNF- α (BioLegend, USA) ความเข้มข้น 0.020-0.10 ng/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เพื่อกระตุ้นให้แมคโครฟาจ M0 กลายเป็น M1⁽⁹⁾

การกระตุ้นแมคโครฟาจจาก M0 เป็น M2

นำแมคโครฟาจ M0 มาเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของ IL-10 (BioLegend, USA) ความเข้มข้น 0.8-1.5 ng/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในสภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เพื่อกระตุ้นให้แมคโครฟาจ M0 กลายเป็น M2⁽⁹⁾

จากนั้นนำเซลล์ระยะต่างๆ ที่ได้มาทดสอบด้วยยา dexamethasone (United States Biological, USA) โดยเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของยาเข้มข้น 12.5 ng/mL (DEX-L), 150 ng/mL (DEX-H) และสภาวะควบคุมซึ่งไม่มียา (CTRL) นำไป incubate ที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการแสดงออกของ CRIg

3. วิธีการสกัด RNA ด้วย Trizol[®] reagent

เติม Trizol[®] reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) และผสมให้เข้ากันดีเพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นเติม chloroform ปริมาตร 100 μL เขย่าให้เข้ากัน และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว $12,000 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อให้ของเหลวในหลอดทดลองแยกเป็น phenol-chloroform phase, interphase และ aqueous phase แล้วดูดชั้น

aqueous phase ที่มี RNA มาใส่ใน centrifuge tube เพื่อทำการแยก RNA อีกครั้ง และเติม isopropanol ปริมาตร 100 μ L ลงในหลอดทดลองเพื่อตกตะกอน RNA แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว $12000 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกตะกอน RNA คูดส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอน RNA ด้วย 75% ethanol ปริมาตร 500 μ L จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว $7500 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วนำมาละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำปราศจาก RNase แล้วเก็บที่ 55°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บตัวอย่าง RNA ไว้ที่ -70°C

4. Quantitative Reverse Transcription PCR

เตรียม cDNA solution (Bioline Reagents Limited, UK) โดย reverse transcription ทำได้โดย incubate RNA solution ที่ 65°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเตรียม reaction solution ซึ่งเป็นการวิเคราะห์โดยมีส่วนประกอบ 5 $\times$ RT master mix ปริมาตร 2 μ L และ RNA template ปริมาตร 8 μ L ผสมเข้าด้วยกัน จากนั้น incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 15 นาที แล้ว incubate ที่ 50°C เป็นเวลา 5 นาที และที่ 98°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเตรียม reaction solution ของ qRT-PCR โดยใช้ SYBR Green RT-PCR master mix (Bioline Reagents Limited, UK) ปริมาตร 10 μ L, cDNA solution ปริมาตร 2 μ L, 1 μ M forward และ reverse primer (Table 1) ปริมาตรอย่างละ 4 μ L มาผสมเข้าด้วยกัน จากนั้น incubate ที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที แล้ว incubate ที่ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที หลังจากนั้น incubate ที่ 60°C เป็นเวลา 1 นาที โดยกำหนดจำนวนรอบทั้งหมด 45 รอบ ด้วยเครื่อง CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories,

USA) โดยวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (10)

Table 1 Oligonucleotide sequences

Gene	Sequence (5' $\rightarrow$ 3')
NOS2	F: TTCAGTATCACACAACCTCAGCAAG R: TGGACCTGCAAGTTAAATCCC
ARG1	F: TGGACAGACTAGGAATTGGCA R: CCAGTCCGTCAACATCAAACT
VSIG4	F: TCCTGGAAGTGCCAGAGAGT R: TGTACCAGCCACTTCACCAA
ACTB	F: CATGTACGTTGCTATCCAGGC R: CTCCTTAATGTACGCACGAT

5. โฟลไซโตเมตรี

นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมาปั่นล้างด้วย staining buffer ที่ความเร็ว $600 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมแอนติบอดีที่จำเพาะ ได้แก่ anti-CD14-PE (BioLegend, USA), anti-CD16-FITC (BD Biosciences, USA), anti-human CD80 PE/CY5 conjugated (BioLegend, USA), และ anti-CD163 PE/CY7 conjugated (BioLegend, USA) โดย incubate ที่ 4°C เป็นเวลา 20 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วย staining buffer ที่ความเร็ว $600 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเซลล์ไปวิเคราะห์การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ด้วยโฟลไซโตเมตรี

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

งานวิจัยนี้ได้ออกแบบการทดลองเป็น 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน ใช้สถิติวิเคราะห์ one way ANOVA เปรียบเทียบผลการทดลองในแต่ละสภาวะ โดยใช้

ซอฟต์แวร์คอมพิวเตอร์ GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) และกำหนดช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% (p - value = 0.05)

ผลการวิจัย

1. การทดสอบหาร้อยละของโมโนไซต์

จากการนำ buffy coat จากผู้บริจาค 1 ราย มาปั่นแยกส่วนของ PBMCs ออกด้วยน้ำยา Lymphoprep และนำมาหาปริมาณของ PBMCs ที่แยกได้พบว่าปริมาณเซลล์เฉลี่ยอยู่ที่ 3.24×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงนำ PBMCs มาปั่นแยกเซลล์โมโนไซต์ด้วยน้ำยา Percoll พบว่าได้ปริมาณเซลล์เฉลี่ยอยู่ที่ 2.50×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร และเมื่อคำนวณร้อยละของโมโนไซต์ที่แยกได้พบว่ามีค่าอยู่ที่ร้อยละ 7.71

จากการคำนวณร้อยละความบริสุทธิ์ของโมโนไซต์ที่แยกได้ นำมาขย้อมด้วย monoclonal antibody mti_CD14/CD16 ซึ่ง CD14 เป็น marker ของโมโนไซต์และวิเคราะห์ผลด้วยโฟลไซโตเมตรีพบว่าค่าความบริสุทธิ์ของโมโนไซต์เป็นร้อยละ 100 (Fig. 1)

2. การศึกษารูปร่างของเซลล์

2.1 การเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์

จากการเพาะเลี้ยงโมโนไซต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย RPMI-1640, fetal bovine serum, streptomycin, ciprofloxacin, M-CSF และ CaCO_3 เป็นระยะเวลา 14 วัน เพื่อเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นแมโครฟาจ M0 พบว่าเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากลักษณะกลม เป็นลักษณะเรียวยาวหรือรูปร่างไม่แน่นอน และเกาะติดพื้นผิวของภาชนะ โดยหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน เซลล์เริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีการเปลี่ยนแปลง บางเซลล์มีรูปร่างไม่แน่นอน หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะ

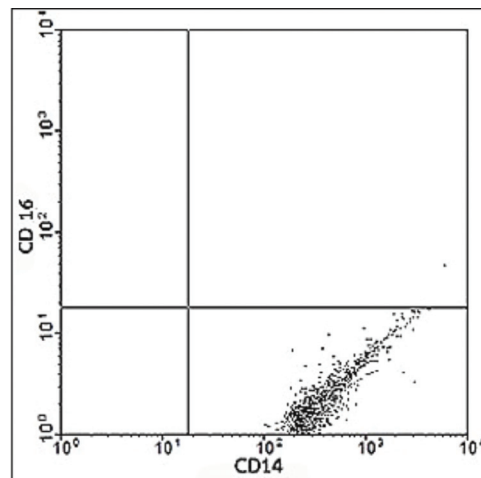


Fig. 1 Flow-cytometric analysis of monocytes with anti-CD14/CD16 antibody
Monocytes were isolated from buffy coat of healthy donor. Expression of cell surface markers on human monocytes was investigated by flow cytometry using anti-CD14/CD16 antibody. Expression of CD14 cell surface marker on human monocytes was 100%.

เวลา 14 วัน โมโนไซต์ได้กลายเป็นแมโครฟาจ M0 ซึ่งมีลักษณะเซลล์เรียวยาวและมีรูปร่างไม่แน่นอน เมื่อส่องดูด้วยกล้อง inverted microscope ที่กำลังขยาย 400 เท่า (Fig. 2 - Fig. 4)

จากนั้น ตรวจสอบการพัฒนาเป็นเซลล์แมโครฟาจ M0 ด้วยโฟลไซโตเมตรีโดยนำมาขย้อมด้วย monoclonal antibody anti-CD14/CD16 ซึ่งพบว่า M0 ให้ค่าร้อยละ 89.69 ของ CD14^+ และร้อยละ 95.77 ของ CD16^+ (Fig. 5)

2.2 การศึกษารูปร่างของแมโครฟาจ M1

หลังจากเลี้ยงโมโนไซต์เป็นเวลา 14 วัน เซลล์ที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นแมโครฟาจ M0 สามารถพัฒนาไปเป็นแมโครฟาจ M1 ซึ่งมีลักษณะ

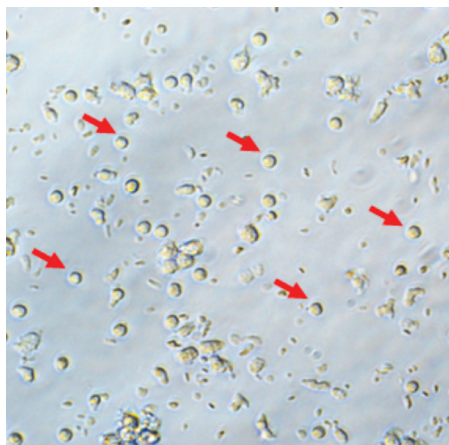


Fig. 2 Morphology of monocytes
Monocytes were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS at 37°C in humidified incubator with 5% CO₂. Cells were round and attached to plastic surface.

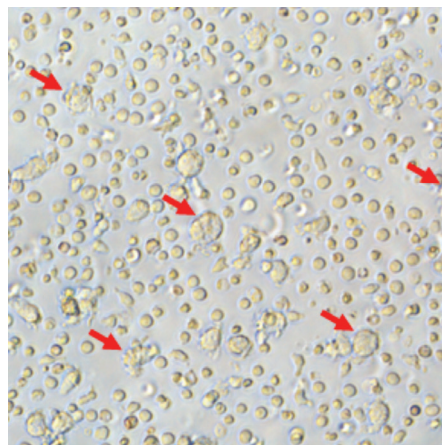


Fig. 3 Morphology of monocytes in culture medium at 7 days
Monocytes were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS at 37°C in humidified incubator with 5% CO₂ for 7 days. The cultured cells were increased in size and appeared as irregular round shape.

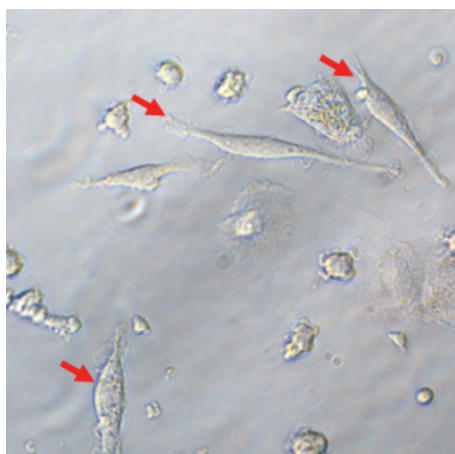


Fig. 4 Morphology of monocyte-derived macrophage (M0)
Cultured monocytes at fourteen days were differentiated into macrophages (M0) which showed the irregular morphology of size and long shape.

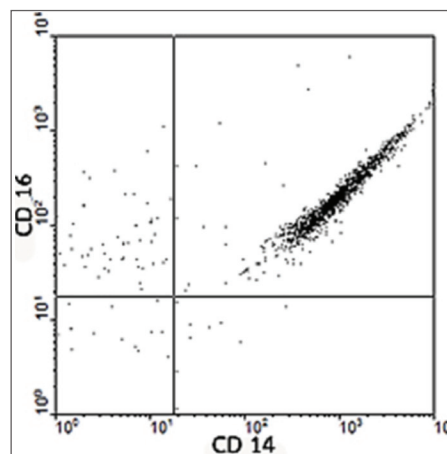


Fig. 5 Flow-cytometric analysis of macrophages with anti-CD14/CD16 antibody
Human monocytes were allowed to differentiate for 14 days. Expression of cell surface markers on human monocyte-derived macrophages was investigated by flow-cytometric analysis. Expression of CD14 and CD16 cell surface markers was 89.69% and 95.77%, respectively.

กลม ขนาดใหญ่ (Fig. 6) โดยการกระตุ้นด้วย TNF- α ในสภาวะ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อตรวจสอบการพัฒนามาเป็นแมคโครฟาจ M1 ด้วยโฟลไซโทเมตรีโดยใช้

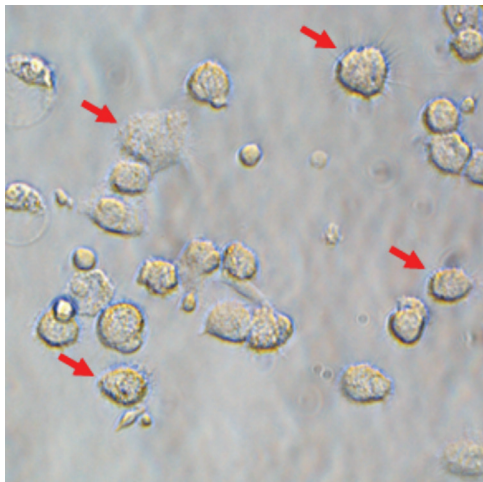


Fig. 6 Morphology of macrophages M1 activated with TNF- α in culture medium for 24 hours

Human monocyte-derived macrophages (M0) were polarized to M1 by activated with TNF- α for 24 hours. M1 morphology showed irregular size and shape.

2.3 การศึกษารูปร่างของแมคโครฟาจ M2

หลังจากการเลี้ยงโมโนไซต์เป็นเวลา 14 วัน เซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นแมคโครฟาจ M0 ยังสามารถพัฒนาไปเป็น M2 โดยการกระตุ้นด้วย IL-10 ในสภาวะ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเซลล์ M2 มีลักษณะเรียวยาวและมีรูปร่างไม่แน่นอนเมื่อส่องดูด้วยกล้อง inverted microscope ที่กำลังขยาย 400 เท่า (Fig. 8) เมื่อตรวจสอบการพัฒนามาเป็น M2 ด้วยโฟลไซโทเมตรีโดยใช้

monoclonal antibody anti-CD80/ CD163 พบว่าแมคโครฟาจ M1 ให้ค่าร้อยละ 85.11 ของ CD80⁺ และร้อยละ 82.39 ของ CD163⁺ (Fig. 7)

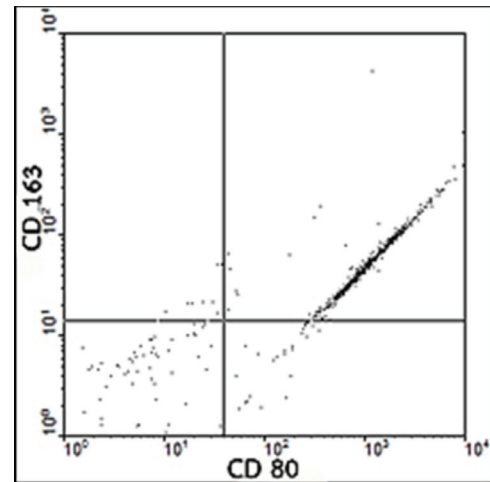


Fig. 7 Flow-cytometric analysis of macrophages

M1 with anti-CD80/CD163 antibody. M0 macrophages were polarized to M1 by activated with TNF- α in culture medium for 24 hours. Expression of cell surface markers on M1 was investigated by flow-cytometric analysis. Expression of CD80 and CD163 cell surface markers was 85.11% and 82.39%, respectively.

ใช้ monoclonal antibody anti-CD80/ CD163 พบว่าแมคโครฟาจ M2 ให้ค่าร้อยละ 67.19 ของ CD80⁺ และร้อยละ 96.63 ของ CD163⁺ (Fig. 9)

3. การยืนยัน M1 และ M2 ด้วย NOS2 และ Arg1

ผลการทดสอบการแสดงออกของ NOS2 (nitric oxide synthase 2) และ Arg1 (arginase 1) บนเซลล์โมโนไซต์แมคโครฟาจ M0, M1 และ M2 ในระยะเวลา 24 ชั่วโมงด้วย qRT-PCR พบว่า

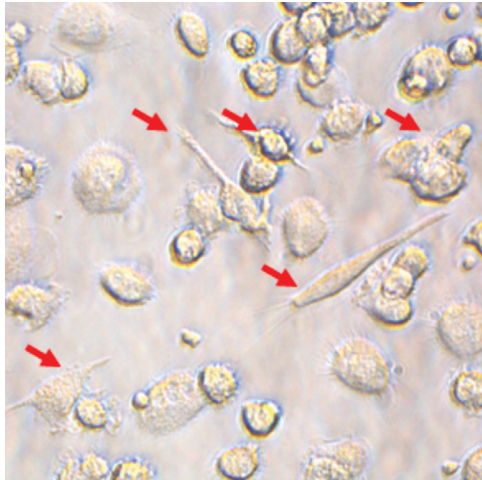


Fig. 8 Morphology of activated macrophages M2 with IL-10 in culture medium for 24 hours

Human monocyte-derived macrophages (M0) were polarized to M2 by activated with IL-10 for 24 hours. M2 morphology showed irregular size and shape.

NOS2 ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกใน M1 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นใน M1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับโมโนไซต์ แสดงว่า $TNF-\alpha$ สามารถกระตุ้น M0 ให้กลายเป็น M1 ได้ (Fig. 10) ส่วน *Arg1* ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกใน M2 พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นใน M2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับโมโนไซต์ แสดงว่า IL-10 สามารถกระตุ้น M0 ให้กลายเป็น M2 ได้ (Fig. 11)

4. การแสดงออกของ CRIg บนแมโครฟาจเมื่อกระตุ้นด้วย dexamethasone โดยวิธี qRT-PCR

ผลการทดสอบการแสดงออกของ CRIg บนเซลล์โมโนไซต์แมโครฟาจ M0, M1 และ M2 ใน 3 สถานะคือ สถานะที่ไม่ได้กระตุ้นด้วย dexamethasone (Control CTRL) สถานะที่กระตุ้น

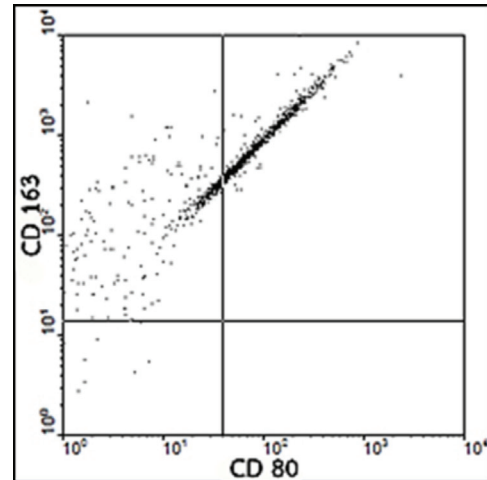


Fig. 9 Flow-cytometric analysis of IL-10 activated macrophages M2 with anti-CD80/CD163 antibody

M0 macrophages were polarized to M2 by activated with IL-10 in culture medium for 24 hours. Expression of cell surface markers on M2 was investigated by flow-cytometric analysis. Expression of CD80 and CD163 cell surface markers was 67.19% and 96.63%, respectively.

ด้วย dexamethasone ความเข้มข้น 12.5 ng/mL (DEX-L) และสถานะที่กระตุ้นด้วย dexamethasone ความเข้มข้น 150 ng/mL (DEX-H) ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี qRT-PCR พบว่ามีการแสดงออกของ CRIg เพิ่มขึ้นใน M0-DEX-L และ M0-DEX-H อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ Mono-CTRL และ M0-CTRL นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของ CRIg เพิ่มขึ้นใน M2-DEX-L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ Mono-CTRL และ M2-CTRL ส่วนใน M1 พบว่าการแสดงออกของ CRIg ในปริมาณเพียงเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

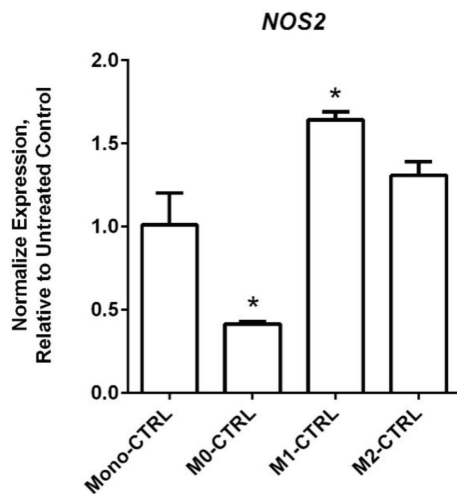


Fig. 10 Expression of *NOS2* gene in mono cytes, macrophages M0, M1 and M2. Fourteen days monocyte cultures were differentiated into Macrophages (M0). M0 were stimulated with TNF- α and IL-10 for 24 hours to allow polarizing of M1 and M2, respectively. Expression of *NOS2* gene was measured by RT-qPCR. Data were analyzed by normalized gene expression and presented as mean $\pm$ SD of 3 experiments.

Statistical analyses: *NOS2* expression in M0, M1 and M2 versus monocytes; * $p < 0.05$

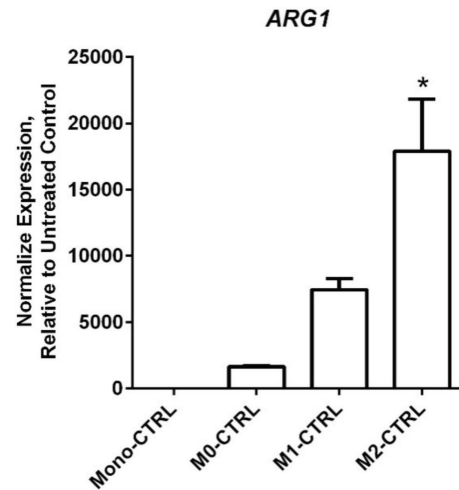


Fig. 11 Expression of *ARG1* gene in monocytes, macrophages M0, M1 and M2

Expression of *ARG1* gene was measured by RT-qPCR. Data were analyzed by normalized gene expression and presented as mean $\pm$ SD of 3 experiments.

Statistical analyses: *ARG1* expression in M0, M1 and M2 versus monocytes; * $p < 0.05$

ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า dexamethasone ความเข้มข้น 12.5 ng/mL (DEX-L) สามารถกระตุ้นเซลล์ M0 macrophage และ M2 macrophage ให้มีการแสดงออกของ CRIg เพิ่มขึ้น และ dexamethasone

ความเข้มข้น 150 ng/mL (DEX-H) สามารถกระตุ้นเซลล์ M0 ให้มีการแสดงออกของ CRIg เพิ่มขึ้น (Fig. 12)

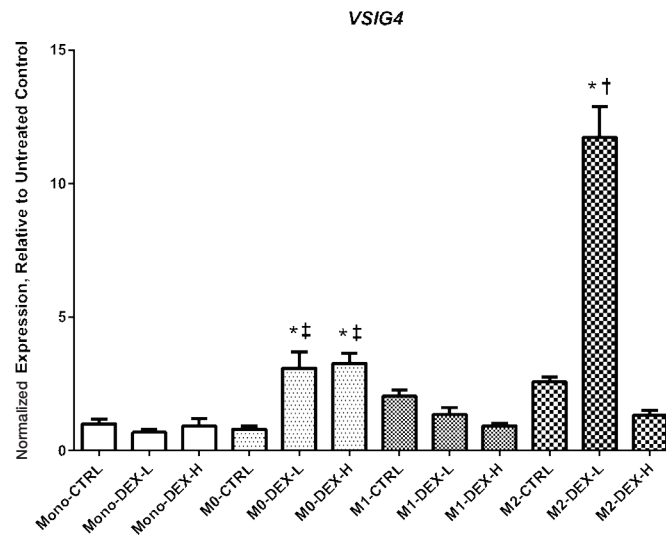


Fig. 12 Expression of CRlg in Monocytes, Macrophages M0, M1 and M2

The cells were stimulated with different concentrations of dexamethasone for 24 hours. Expression of CRlg was measured by RT-qPCR. Data were analyzed by normalized gene expression and presented as mean $\pm$ SD of 3 experiments.

Statistical analyses: CRlg expression in M0, M1 and M2 versus monocytes; * $p < 0.05$

วิจารณ์

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการแสดงออกของ CRlg บนเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ แมโครฟาจ M0, M1 และ M2 ของมนุษย์ในสภาวะที่กระตุ้นด้วยยา dexamethasone ความเข้มข้น 12.5 ng/mL (DEX-L) และความเข้มข้น 150 ng/mL (DEX-H) ซึ่งเป็นยาที่สังเคราะห์ขึ้นมาคล้ายกับ glucocorticoids ส่วนใหญ่ใช้เป็นยาด้านการอักเสบ จากงานวิจัยของ Gorgani และคณะ ในปี พ.ศ. 2554 ซึ่งศึกษาผลของ dexamethasone ต่อการแสดงออกของ CRlg บนแมโครฟาจ โดยไม่ได้ศึกษาระยะของแมโครฟาจ พบว่า dexamethasone สามารถกระตุ้นให้แมโครฟาจมีการแสดงออกของ CRlg ในระดับยีนและโปรตีนเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)⁽¹¹⁾ แต่เนื่องจากยังไม่มีงานวิจัยใดที่ศึกษาการแสดงออก

ของ CRlg บนแมโครฟาจ M1 และ M2 ซึ่งเป็นเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างและหน้าที่มาจากเซลล์แมโครฟาจ M0 โดยหากกระตุ้นด้วย LPS, IFN- γ หรือ TNF- α แมโครฟาจ M0 จะเปลี่ยนแปลงเป็นแมโครฟาจ M1 ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นกระบวนการอักเสบโดยการหลั่ง pro-inflammatory cytokines เช่น TNF- α , IL-6 หลั่ง reactive oxygen species และ nitric oxide ในการกำจัดเชื้อโรค อีกทั้งยังส่งเสริมกระบวนการตอบสนองของ Th1 และเกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์มะเร็ง หากกระตุ้นแมโครฟาจ M0 ด้วย IL-10 หรือ TGF- β จะทำให้แมโครฟาจ M0 เปลี่ยนแปลงเป็นแมโครฟาจ M2 ซึ่งมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องในกระบวนการ anti-inflammation และกดการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines^(9, 12-14) การตรวจสอบ

ยืนยันว่าแมโครฟาจ M0 มีการเปลี่ยนแปลงเป็น M1 และ M2 ทำได้โดยการศึกษารูปร่างของ M1 และ M2 ที่มีความแตกต่างกัน โดย M1 มีรูปร่างแบนถึงกลมลักษณะคล้ายแพนเค้ก ส่วน M2 มีรูปร่างยืดยาว⁽⁹⁾ แต่จากการพิจารณารูปร่างของเซลล์ในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่าไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าเซลล์นั้นเป็น M0, M1 หรือ M2 เนื่องจากรูปร่างของเซลล์ทั้ง 3 ชนิดมีความคล้ายคลึงกันมากต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญและประสบการณ์ งานวิจัยครั้งนี้จึงได้ยืนยันจากการแสดงออกของยีน *NOS2* และ *ARG1* ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกต่างกัน ใน M1 และ M2 ตามลำดับ⁽¹³⁾ พบว่าการแสดงออกของ *NOS2* เพิ่มขึ้นใน M1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Fig. 10) เมื่อเทียบกับโมโนไซท์ ดังนั้น TNF- α สามารถกระตุ้นแมโครฟาจให้ กลายเป็น M1 ได้ ส่วนการแสดงออกของ *Arg1* พบเพิ่มขึ้นใน M2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Fig. 11) เมื่อเทียบกับโมโนไซท์ ดังนั้น IL-10 สามารถกระตุ้นแมโครฟาจให้กลายเป็น M2^(9, 15, 16) แต่การแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นนี้อาจไม่สัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีน ดังนั้นควรศึกษาการแสดงออกของ markers ที่แสดงออกอยู่บนผิวเซลล์ M1 คือ CD68⁺/CD80⁺ และ markers ที่แสดงออกอยู่บนผิวเซลล์ M2 คือ CD68⁺/CD163⁺⁽¹⁶⁾ ด้วยวิธีฟลูออไรสเซนซ์จะทำให้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้นซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง (Fig. 7, Fig. 9)

สำหรับการศึกษาการแสดงออกของ CRIG ในระดับยีนด้วยวิธี qRT-PCR โดยศึกษาในเซลล์ M0, M1 และ M2 สภาวะที่กระตุ้นด้วย dexamethasone ความเข้มข้น 12.5 ng/mL (DEX-L) และ 150 ng/mL (DEX-H) เทียบกับสภาวะที่ไม่ได้กระตุ้นด้วย dexamethasone (CTRL) ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าใน M0-CTRL, M1-CTRL และ M2-CTRL มีการแสดงออกของยีน *VSIG4* แตกต่าง

จากกลุ่มโมโนไซท์ที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยยา (Mono-CTRL) อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อกระตุ้นด้วยยา dexamethasone ที่ระดับ 12.5 ng/mL และ 150 ng/mL พบว่าใน M0-DEX-L และ M0-DEX-H มีการแสดงออกของยีน *VSIG4* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Fig. 12) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่ยา (M0-CTRL) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา^(11, 17) ในงานวิจัยครั้งนี้ยังพบว่า M1 ที่กระตุ้นด้วยยา dexamethasone 12.5 ng/mL (M1-DEX-L) และ 150 ng/mL (M1-DEX-H) มีการแสดงออกของยีน *VSIG4* แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่ยา (M1-CTRL) ซึ่งสอดคล้องกับหน้าที่ของ M1 ที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ทำหน้าที่ตรงข้ามกับการทำงานของยา dexamethasone ซึ่งเป็นยาต้านการอักเสบ ในขณะที่ M2 กระตุ้นด้วยยา dexamethasone 12.5 ng/mL (M2-DEX-L) มีการแสดงออกของยีน *VSIG4* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีการแสดงออกมากที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มไม่ใส่ยา (M2-CTRL) ซึ่งสอดคล้องกับหน้าที่ของ M2 ที่เกี่ยวข้องกับการต้านการอักเสบในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ส่วน M2 ที่กระตุ้นด้วยยา dexamethasone 150 ng/mL (M2-DEX-H) มีการแสดงออกของยีน *VSIG4* แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (Fig. 12) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า dexamethasone ที่ความเข้มข้นสูงมีความไม่สอดคล้องกับตัวรับยาภายในเซลล์ จึงไม่ส่งเสริมการแสดงออกของยีน *VSIG4* แต่การศึกษาการแสดงออกของยีน *VSIG4* อาจไม่สัมพันธ์กับการแสดงออกเป็นโปรตีน ดังนั้น จึงควรยืนยันการแสดงออกของ CRIG บนผิวเซลล์ด้วยวิธีฟลูออไรสเซนซ์โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CRIG หรือด้วยวิธี Western blot เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CRIG ที่มีขนาด

45 kDa และ 55 kDa และวัดปริมาณของโปรตีนดังกล่าวด้วยเครื่อง densitometer เพื่อการแปลผลที่ถูกต้อง

สรุป

การแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของโมเลกุล CRIg ในแต่ละระยะของเซลล์แมโครฟาจจะมีการแสดงออกของยีน VSIG4 ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยพบการแสดงออกปริมาณสูงในเซลล์แมโครฟาจ M2 ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ด้านการอักเสบและซ่อมแซมเนื้อเยื่อในร่างกายเมื่อเกิดการบาดเจ็บ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณงานธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ที่ให้ออกอนุเคราะห์ buffy coat จากผู้บริจาคโลหิต และงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยนเรศวร R2559C238

เอกสารอ้างอิง

1. Abul K. Abbas. Basic Immunology: Functions and disorders of the immune system, 7th ed. Missouri: Elsevier; 2014: 27.
2. Van Lookeren Campagne M, Wiesmann C, Brown EJ. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. Cellular microbiology 2007; 9: 2095-102.
3. Ma Y, Usuwanthim K, Munawara U, *et al.* Protein kinase C- α regulates the expression of complement receptor Ig in human monocyte-derived macrophages. J Immunol (Baltimore, Md: 1950). 2015; 194: 2855-61.
4. Guo S, Yang C, Mei F, *et al.* Down-regulation of Z39Ig on macrophages by IFN- γ in patients with chronic HBV infection. Clin Immunol (Orlando, Fla) 2010; 136: 282-91.
5. Vogt L, Schmitz N, Kurrer MO, *et al.* VSIG4, a B7 family-related protein, is a negative regulator of T cell activation. J Clin Invest 2006; 116: 2817-26.
6. Odegaard JI, Chawla A. Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2008; 4: 619-26.
7. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol 2008; 8: 958-69.
8. Kooltheat N, Pankla Sranujit R, Chumark P, Potup P, Laytragoon-Lewin N, Usuwanthim K. An ethyl acetate fraction of *Moringa oleifera* Lam. inhibits human macrophage cytokine production induced by cigarette smoke. Nutrients 2014; 6: 697-710.
9. McWhorter FY, Wang T, Nguyen P, Chung T, Liu WF. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. Proc Natl Acad Sci 2013; 110: 17253-8.
10. Van Peer G, Mestdagh P, Vandesompele J. Accurate RT-qPCR gene expression analysis on cell culture lysates. Scientific Reports 2012; 2: 222.
11. Gorgani NN, Thathaisong U, Mukaro VR, *et al.* Regulation of CRIg expression and phagocytosis in human macrophages by arachidonate, dexamethasone, and cytokines. Am J Pathol 2011; 179: 1310-8.

12. Williams LM, Ricchetti G, Sarma U, Smallie T, Foxwell BM. Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle. *Immunology* 2004; 113: 281-92.
13. Odegaard JI, Chawla A. Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4: 619-26.
14. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*. 2014; 6: 13.
15. Mia S, Warnecke A, Zhang XM, Malmstrom V, Harris RA. An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF-beta yields a dominant immunosuppressive phenotype. *Scand J Immunol* 2014; 79: 305-14.
16. Khramtsova G, Liao C, Khramtsov A, *et al.* The M2 Alternatively Activated Macrophage Phenotype Correlates with Aggressive Histopathologic Features and Poor Clinical Outcome in Early Stage Breast Cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 107.
17. Kooltheat N, Jatturat N, Liamcharoen U, *et al.* The effect of anti-inflammation drugs on complement receptor Ig expression and phagocytosis in human monocyte-derived macrophages. *J Med Tech Assoc Thailand* 2015; 43: 5397-5408.