



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การกระตุ้นซ้ำด้วยลิแกนด์ของ Toll-like receptor ชนิดต่างๆ
ต่อการตอบสนองของแมโครฟาจ

ชื่อบิลิต นางสาววรัทยา แสงชัยสุนทรกิจ รหัสประจำตัว 6032347823

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์

ชื่อโครงการ

การกระตุ้นซ้ำด้วยลิแกนด์ของ Toll-like receptor ชนิดต่างๆ ต่อการ
ตอบสนองของแมโครฟาจ
Repeated stimulation by various Toll-like receptors drive
specific Patterns of Tolerance on Macrophage response

ชื่อนิสิต

นางสาววรัทยา แสงชัยสุคนธ์กิจ เลขประจำตัว 6032347823

ภาควิชา

จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา

2563

รายงานโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์

ชื่อโครงการ

การกระตุ้นซ้ำด้วยลิแกนด์ของ Toll-like receptor ชนิดต่างๆ ต่อการตอบสนองของแมโครฟาจ

(Repeated stimulation by various Toll-like receptors

drive specific Patterns of Tolerance on Macrophage response)

อาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ

นิสิตหัวหน้าโครงการ

นางสาววรัทยา แสงชัยสุนทรกิจ

รหัสประจำตัวนิสิต 6032347823

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ปีการศึกษา 2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การกระตุ้นซ้ำด้วยลิแกนด์ของ Toll-like receptor ชนิดต่างๆ ต่อการตอบสนองของแมโครฟาจ	
ชื่อนิสิต	นางสาววรัทยา แสงชัยสุนทรกิจ	รหัสนิสิต 6032347823
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ	
ภาควิชา	จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563	

บทคัดย่อ

ภาวะ tolerance เป็นภาวะความทรงจำที่พบได้ในแมโครฟาจ ซึ่งนำไปสู่การตอบสนองที่เปลี่ยนแปลงไปต่อการได้รับเอ็นโดท็อกซิน (endotoxin) ซ้ำๆ หรือเป็นเวลานาน โดยภาวะ tolerance จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยลิแกนด์ของ Toll-like receptor (TLR) ชนิดต่างๆ ดังนั้นภาวะ tolerance จึงมีบทบาทในการจำกัดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อของเจ้าบ้าน ซึ่งเป็นผลมาจาก pro-inflammatory cytokine ที่ผลิตขึ้น ปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่ได้ศึกษาผลของภาวะ tolerance ที่เกิดจากการที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยลิแกนด์ TLR4 แต่ยังไม่มียงานวิจัยที่ศึกษาผลของภาวะ tolerance ที่เกิดจากการที่เซลล์ถูกกระตุ้นซ้ำด้วยลิแกนด์ TLRs ชนิดต่างๆ งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของการกระตุ้นซ้ำด้วยลิแกนด์ TLRs ชนิดต่างๆ ได้แก่ TLR4 ที่มีลิแกนด์เป็น Lipopolysaccharides (LPS), TLR2 ที่มีลิแกนด์เป็น Pam3CysSerLys4 (Pam3CSK4), TLR3 ที่มีลิแกนด์เป็น Polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)) และ TLR9 ที่มีลิแกนด์เป็น CpG Oligodeoxynucleotide (CpG) ต่อการผลิตไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะ tolerance ใน Hoxb8 แมโครฟาจ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นแมโครฟาจซ้ำด้วยลิแกนด์ TLRs ชนิดต่างๆ ได้แก่ TLR2, TLR3, TLR4 และ TLR9 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลให้มีการผลิต TNF- α และ IL-6 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นเฉียบพลัน ยกเว้นการกระตุ้นแมโครฟาจครั้งที่ 1 ด้วย CpG แล้วกระตุ้นครั้งที่ 2 ด้วย LPS ที่ส่งผลให้มีการผลิต IL-6 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าภาวะ tolerance ในแมโครฟาจเกิดขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นซ้ำด้วยลิแกนด์ของ TLRs ชนิดต่างๆ ได้แก่ TLR2, TLR3, TLR4 และ TLR9 ยกเว้นการกระตุ้นด้วย TLR9 แล้วตามด้วย TLR4 ที่ส่งผลให้มีการผลิตไซโตไคน์เพิ่มขึ้นหรือไม่เกิดภาวะ tolerance งานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่าแม้ว่าโดยทั่วไปการกระตุ้นซ้ำด้วยลิแกนด์ TLRs ชนิดต่างๆ จะสามารถลดระดับการแสดงออกของไซโตไคน์ที่ทำให้เกิดการอักเสบในเซลล์ที่เกิดภาวะ tolerance ได้ แต่ไม่ใช่ไซโตไคน์ทุกชนิดที่จะถูกลดการแสดงออก และยังมีรูปแบบการแสดงออกของไซโตไคน์ที่หลากหลายผ่านการถูกกระตุ้นด้วย TLRs ชนิดต่างๆ อย่างจำเพาะในภาวะ tolerance ข้อมูลในงานวิจัยนี้จึงอาจเป็นพื้นฐานสำหรับการใช้ประโยชน์ในอนาคตเพื่อพัฒนาแนวทางการรักษาโรคที่เกิดจากภาวะ tolerance ที่เกิดจากการกระตุ้นโดย TLR จำเพาะต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

Project title Repeated stimulation by various Toll-like receptors drive specific Patterns of Tolerance on Macrophage response

Investigator Varattaya Saengchaisukhonkit ID No. 6032347823

Project advisor Prof. Tanapat Palaga

Department of Microbiology Faculty of Science, Chulalongkorn University

ABSTRACT

Tolerance is an immunological memory of macrophages that leads to an altered response to repeated or chronic exposure to endotoxin. Tolerance is induced by all toll-like receptor (TLR) ligands which induce a multi-component inflammatory response. The physiological role of tolerance is to limit the potential damage to host tissue that may otherwise result from prolonged production of pro-inflammatory cytokines. However, tolerance induced by the TLR4 ligand lipopolysaccharide (LPS) is by far the best studied. Remarkably, a comparative analysis of tolerance induced by different TLR ligands has not previously been reported. Here, this study shows a comparative analysis of TLR tolerance by investigating cytokine secretion and gene expression of Hoxb8 mouse macrophages tolerized with TLR4 ligand Lipopolysaccharides (LPS), TLR2 ligand Pam3CysSerLys4 (Pam3CSK4), TLR3 ligand Polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)) and TLR9 ligand CpG Oligodeoxynucleotide (CpG). This study identifies that repetitive stimulation of Hoxb8 mouse macrophages with TLR2, TLR3, TLR4 and TLR9 for both 24-hour periods caused a reduction in TNF- α and IL-6 production compared to cells that were not exposed initially to any TLR ligands. Only TLR9 followed by TLR4 stimulation increased the level of IL-6. Thus, TLR tolerance in Hoxb8 mouse macrophages occurs after repetitive stimulation with TLR2, TLR3, TLR4 and TLR9 except from TLR9 followed by TLR4 stimulation which does not cause tolerance, but enhances cytokine production. However, our analysis demonstrates that although each TLR ligand generally represses pro-inflammatory cytokine expression in tolerant cells, all cytokines are not universally tolerized and there is a highly diverse patterns of cytokine expression distinguished TLR-specific tolerance. These data provide a basis for the future exploitation of TLR-specific tolerant states to achieve therapeutic re-programming of the innate immune response.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดีเนื่องจากความกรุณาของอาจารย์ ศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะต่างๆ ตลอดจนการช่วยปรับปรุงแก้ไขโครงการวิจัยมาตลอดจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณเงินทุนสนับสนุนงานวิจัย ที่ได้รับจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการ 2015 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สอนและให้คำแนะนำในการทำปฏิบัติการ รวมถึงการให้ความช่วยเหลืออื่นๆ ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และกำลังใจต่างๆ ตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา ที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการนี้และตัวผู้วิจัยเอง

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ เครื่องมือต่างๆ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว และเพื่อนๆ ที่ให้กำลังใจ และคอยสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา ตลอดจนถึงสิ้นสุดโครงการ

วรัทยา แสงชัยสุนทรกิจ

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	4
อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์	5
วิธีการดำเนินการทดลอง	9
ผลการทดลอง	16
อภิปรายผลการทดลอง	23
ภาคผนวก	26
เอกสารอ้างอิง	28

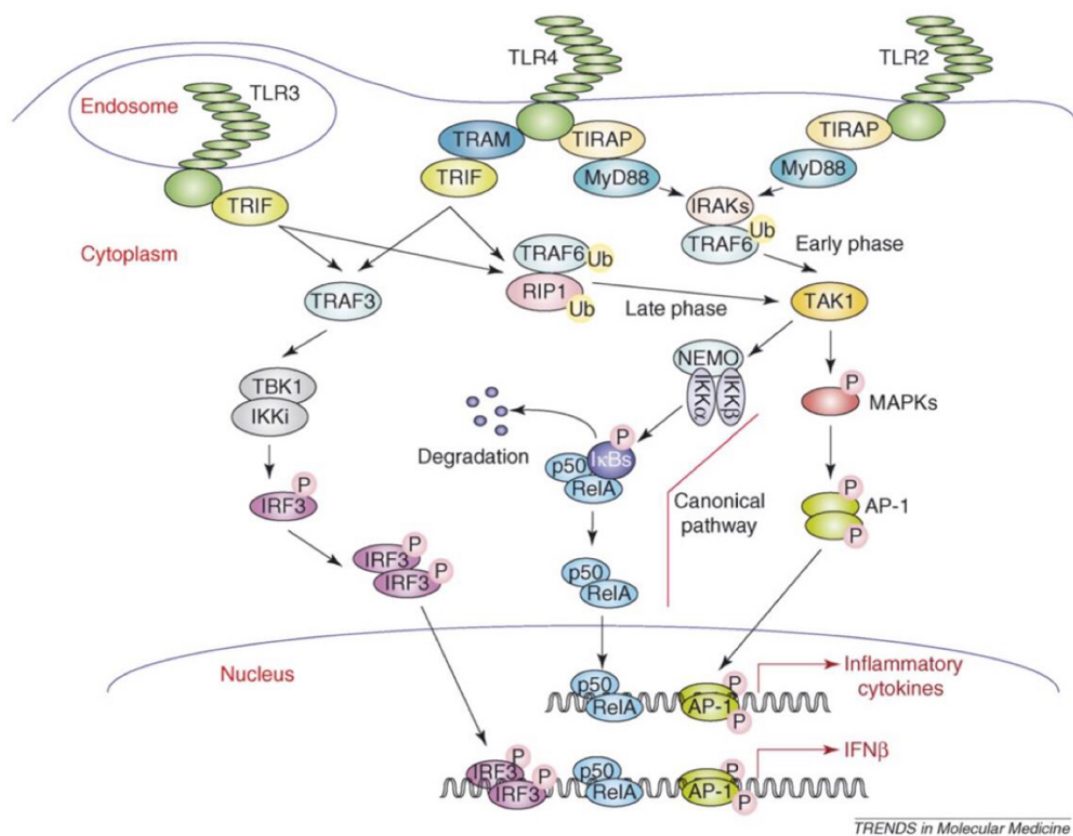
บทที่ 1

บทนำ

1. ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Innate immunity)

ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด หรือภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะ เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาจากแม่หรือติดตัวมาตั้งแต่เกิดเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่พร้อมทำงานได้ทันที ซึ่งจะเป็นด่านแรกในการต่อสู้และป้องกันเชื้อโรคที่เข้ามาในร่างกาย กลไกนี้ไม่มีความจำเพาะเจาะจง (Specificity) กับเชื้อโรคชนิดใดชนิดหนึ่ง และไม่มีความจดจำเชื้อโรค (Memory) (23) ภูมิคุ้มกันระบบนี้จะสามารถป้องกันการบุกรุกของเชื้อก่อโรคและสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ด้วยการจับกินและย่อยทำลาย โดยอาศัยการทำงานของเม็ดเลือดขาวกลุ่มฟาโกไซต์ (phagocyte) เช่น นิวโทรฟิล (neutrophil), แมโครฟาจ (macrophage) และโมโนไซต์ (monocyte) เป็นต้น ด้านการตอบสนองต่อเซลล์ที่มีความผิดปกติของร่างกาย จะอาศัยเซลล์ชนิดเอ็นเค (NK cell) ทำหน้าที่กำจัดและรักษาสมดุลของร่างกาย นอกจากนี้ยังมีระบบป้องกันการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์หรือแอนติเจนที่เกิดขึ้นจากสารออกฤทธิ์ของเซลล์ ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันจากกระแสเลือดและสารคัดหลั่ง ก่อให้เกิดการอักเสบ มีอาการปวด บวม แดง และร้อน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาของระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดยังมีความสำคัญสำหรับการกำหนดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Acquired Immunity) (21)

Toll-like receptors (TLRs) เป็นกุญแจสำคัญในภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด และสามารถจดจำโครงสร้างของ microbial-derived molecules หรือ pathogen associated molecular patterns (PAMPs) เช่น TLR4 ที่มีลิแกนด์เป็น Lipopolysaccharides (LPS), TLR9 ที่มีลิแกนด์เป็น CpG Oligodeoxynucleotide (CpG), TLR2 ที่มีลิแกนด์เป็น Pam3CysSerLys4 (Pam3CSK4) และ TLR3 ที่มีลิแกนด์เป็น Polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)) เป็นต้น การกระตุ้นการทำงานของ TLRs จะชักนำการแสดงออกของยีนนับร้อยที่ถอดรหัสให้ inflammatory cytokines, type I interferons, antimicrobial proteins และตัวควบคุมวิธิเมทาบอลิซึม (metabolism) (3) การกระตุ้นการทำงานของ TLRs ที่แตกต่างกัน จะนำไปสู่การตอบสนองต่อการถอดรหัสอย่างจำเพาะ ผ่านวิถีการส่งสัญญาณแบบอนุรักษ์วิวัฒนาการสูง ได้แก่ NF- κ B และ MAPK pathway เป็นต้น ซึ่งทั้ง NF- κ B (nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cell) และ MAPK (Mitogen activated protein kinase) pathway มีความสำคัญสำหรับการกระตุ้นการตอบสนองเฉียบพลันของ cytokine ได้แก่ TNF- α , IL-6 และ IL-1 β เป็นต้น โดย cytokine ที่ได้กล่าวไปข้างต้นไม่ได้เป็นสารสื่อกลางการตอบสนองในการอักเสบเพียงอย่างเดียว แต่ยังเป็นสารสื่อกลางในกระบวนการอื่นๆ เช่น (1) การเพิ่มจำนวนหรือการเจริญเติบโตของเซลล์ (Proliferation) ผ่านทาง NF- κ B pathway หรือ MAPK pathway (2) การตายของเซลล์ (5)



Kawai, T., & Akira, S. (2007). Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors.

Trends in molecular medicine, 13(11), 460-469.

รูปที่ 1 แสดงวิถีสัญญาณของ TLRs

2. สารสื่อกลางในการอักเสบ (Inflammatory mediators)

สารสื่อกลาง หรือ mediator ในการอักเสบมีแหล่งที่มาจากพลาสมา (plasma) โดยอยู่ในรูปของสารตั้งต้น (precursor) หรือหลั่งออกมาโดยเซลล์บางชนิด สารสื่อกลางเหล่านี้จะไปจับกับ receptor ซึ่งมีความจำเพาะต่อกันบนเซลล์ต่างๆ ที่มีบทบาทในการอักเสบ ซึ่งจะถูกระตุ้นให้มีปฏิกิริยาเกี่ยว ข้องกับกระบวนการอักเสบได้แตกต่างกันไปตามชนิดของสารสื่อกลาง และชนิดของเซลล์ที่เป็นเป้าหมาย pro-inflammatory cytokines เป็นไซโตไคน์ที่มีการเหนี่ยวนำให้มีการหลั่งในภาวะที่มีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ภาวะที่มีการติดเชื้อ เช่น TNF- α , IL-6 และ IL-1 β เป็นต้น (2) anti-inflammatory cytokine เป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทในการยับยั้งการอักเสบ เป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็น negative feedback ของแอมโครฟาจ เช่น IL-10 เป็นต้น (3) chemokines เป็นกลุ่มของไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ไปยังบริเวณเนื้อเยื่อเป้าหมาย เช่น CCL5, CXCL8 เป็นต้น (22)

3. ภาวะ Tolerance

กลไกสำคัญที่สุดในการควบคุมการกระตุ้น TLR ซึ่งเป็นรูปแบบหนึ่งของ tolerance ในการแสดงออก ฆ่าต่อ TLR ligand โดย tolerance เป็นรูปแบบความทรงจำของ macrophage ที่จะนำไปสู่การตอบสนองที่เปลี่ยนแปลงไปต่อการกระตุ้นในรอบถัดไป บทบาทของ tolerance คือการจำกัดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อของเจ้าบ้าน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการผลิต pro-inflammatory cytokines เป็นเวลานาน โดย Tolerance ถูกเหนี่ยวนำโดย toll-like receptor (TLR) ligands (2)

TLR-tolerance เป็นสภาวะของการตอบสนองที่เปลี่ยนแปลงไปของเซลล์ต่อการถูกกระตุ้นด้วย TLR ฆ่าๆ หรือเป็นเวลานาน โดยจะสังเกตได้จากจำนวนชนิดเซลล์ ได้แก่ monocytes, macrophages และ dendritic cells เป็นต้น โดย LPS Tolerance เกิดขึ้นจากการที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ (LPS) ในปริมาณต่ำและลิแกนด์ TLRs ชนิดอื่นๆ ที่สามารถทำให้เกิดการปรับตัวของการตอบสนองระดับเซลล์ต่อสิ่งกระตุ้นภายนอก และนำไปสู่การตอบสนองต่อการอักเสบที่ลดลงเมื่อถูกกระตุ้นซ้ำครั้งที่สอง (15)

ปัจจุบันมีการรายงานถึงกลไกมากมายที่มีส่วนในการควบคุมภาวะ tolerance โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กลไกของวิถีสัญญาณ TLR ที่มีบทบาทในการยับยั้งการตอบสนองต่อการอักเสบ เมื่อพิจารณาถึงความหลากหลายในการทำงานของยีนที่เกิดจาก TLR จึงมีงานวิจัยที่จำแนกยีนเหล่านี้ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1. กลุ่มยีน tolerizable คือกลุ่มของยีนที่ไม่พบการแสดงออกหรือพบในระดับที่ลดลงในแมโครฟาจเมื่อเกิดภาวะ tolerance เช่น *Serpine1*, *CD40* และ *IL-1 β* เป็นต้น และ 2. กลุ่มยีน non-tolerizable คือกลุ่มของยีนที่พบการแสดงออกในระดับเท่าเดิมหรือมากขึ้นในแมโครฟาจเมื่อเกิดภาวะ tolerance เช่น *Marco*, *Camp* และ *IRAK-3* เป็นต้น (7)

ตัวอย่างทางคลินิกของภาวะ tolerance ต่อ endotoxin ในปัจจุบันไม่เพียงแต่มีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) แต่ยังรวมถึงโรคอื่นๆ เช่น โรคปอดเรื้อรัง (cystic fibrosis) และภาวะหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (acute coronary syndrome) (13) ซึ่งมีอัตราการป่วยและการเสียชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากการอักเสบที่ไม่สามารถควบคุมได้ร่วมกับการถูกกดภูมิคุ้มกัน และปัจจุบันทางเลือกในการรักษายังคงมีน้อย สำหรับภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดการสร้างภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยติดเชื้อนับเป็นจุดสำคัญของงานวิจัยในปัจจุบัน จนถึงตอนนี้มีการเสนอกลไกมากมายเพื่ออธิบายภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องที่เกิดจากการติดเชื้อ ซึ่งหนึ่งในนั้นคือภาวะ tolerance ต่อ endotoxin (11)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาผลของการถูกกระตุ้นซ้ำด้วยลิแกนด์ของ Toll-like receptors (TLRs) ชนิดต่างๆ ต่อการผลิตและการหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ
2. เพื่อตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะ tolerance

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบผลของการตอบสนองต่อการกระตุ้นซ้ำโดยลิแกนด์ของ TLRs ชนิดต่างๆ ในแมโครฟาจ

บทที่ 2

เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์

2.1 อุปกรณ์

- ตู้บ่มเซลล์ควบคุมอุณหภูมิ 37 °C และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% รุ่น New Brunswick Galaxy 170s incubator (Eppendorf, Germany)
- ตู้ปลอดเชื้อ biological safety cabinets ของบริษัท แล็บ ไมโคร จากัด ประเทศไทย
- กล้องจุลทรรศน์ รุ่น OLYMPUS CKX3-SLP (OLYMPUS, Japan)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Mettler, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงสารแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 5804 R (Eppendorf, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร รุ่น 5424 (Eppendorf, Germany)
- เครื่องอ่านไมโครเพลท รุ่น Anthos 2010 (Biochrom Ltd., England)
- เครื่องผสมสาร รุ่น G560E Vortex Mixer Genie 2 (Scientific Industries Inc., USA)
- ฮีมาไซโตมิเตอร์ (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Germany)
- ขวดดูแรน ขนาด 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร SCHOTT DURAN[®] (Duran group, Germany)
- ไมโครเพลท 48 หลุม และ 96 หลุม cell culture plate Nunclon[™] Delta Surface (Thermo Fisher Scientific, China)
- หลอดเซนติฟิวจ์พลาสติก ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร (Thermo Fisher Scientific, Korea)
- หลอดไมโครเซนติฟิวจ์พลาสติก (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Axygen, USA)
- เซอโรโลจิคัลปิเปตต์ ขนาด 50 มิลลิลิตร (Thermo Fisher Scientific, Korea)
- ไมโครปิเปตต์ ขนาด P2, P20, P200, P1000 (Eppendorf, Germany)

- ไมโครปิเปตต์ ทิป แบบมีตัวกรองและไม่มีตัวกรอง ขนาด 2 μl , 20 μl , 200 μl , 1000 μl (Thermo Fisher Scientific, USA)
- เครื่อง Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000 Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Eppendorf ThermoMixer C (Eppendorf, Germany)
- จานเพาะเชื้อ
- Ultra-Low Attachment 96-well plate (Corning Inc., USA)
- เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 (Tomy, Japan)
- ตู้เย็น (refrigerator) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (MITSUBISHI, Japan)
- ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (SHARP, Japan)
- ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
- เครื่องทำน้ำแข็ง รุ่น OF 146 (Newton, Thailand)
- ที่วางหลอดทดลอง (test tube rack)
- ชุดเครื่องมือทำ agarose gel electrophoresis
- เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA
- ทิปปลอด RNase (RNase-free tip) ปริมาตร 2, 20, 200 ไมโครลิตร
- Heat block

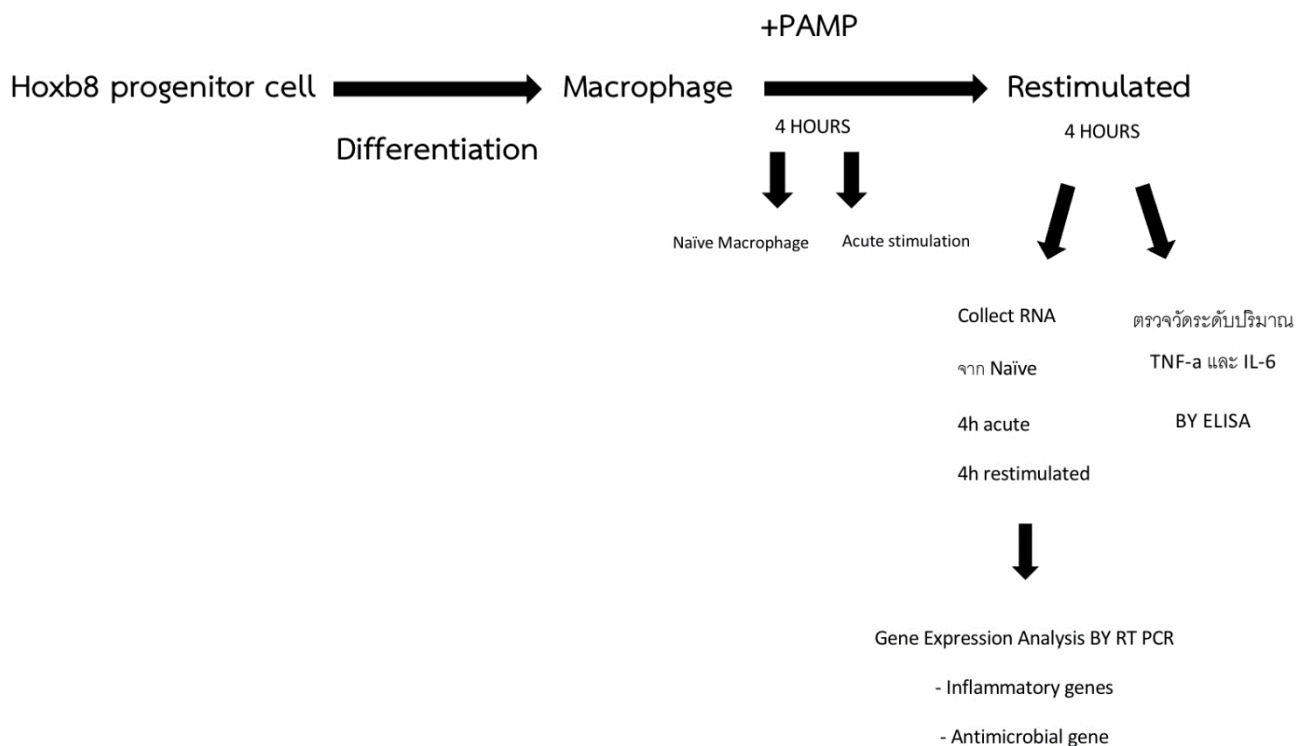
2.2 เคมีภัณฑ์

- อาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose medium (DMEM) (Hyclone, USA)
- ฟีตัลโบไวน์ซีรัม (Fetal Bovine serum; FBS) (Gibco, USA)
- ทริปซิน/อีดีทีเอ (Trypsin/EDTA) (Gibco, USA)
- สีย้อมทริปแฟนบลู 0.4% (Trypan blue) ของบริษัท Gibco™ Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Sodium Pyruvate (Hyclone, USA)
- HEPES (Hyclone, USA)
- Dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA)
- Ethanol
- DEPC water
- Hypure water
- Random hexamer
- 5x Reverse transcriptase buffer (Thermo Fisher Scientific, USA)
- dNTP mix (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Reverse transcriptase
- RNase inhibitor
- Chloroform
- Isopropanol (Merck, Germany)

- Agarose
- RPMI 1640 medium + L-Glutamine (Hyclone)
- FBS qualified grade (Gibco)
- 2-mercaptoethanol 1000x 55 mM (Gibco)
- DMEM media high glucose + L-Glutamine (Hyclone)
- β -estradiol 10 mM (Sigma)
- Horse serum
- Trizol reagent (Life Technologies, USA)
- Lipopolysaccharide (LPS) (Invivogen, Hongkong)
- CpG Oligodeoxynucleotide (Invivogen, Hongkong)
- Pam3CSK4 Lot No. PMS-39-03, Cat No. tlr-pms (Invivogen, Hongkong)
- Poly(I:C) Lot No. PIC-39-03, Cat No. tlr-pic (Invivogen, Hongkong)
- Trizol reagent (Life Technologies, USA)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง



รูปที่ 1 Flow Chart แสดงขั้นตอนการทดลอง

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเลี้ยง Hoxb8 แมโครฟาจ

Hoxb8 macrophage เป็นแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำการเปลี่ยนสภาพจาก progenitor cell โดยมีการตัดต่อพันธุกรรมเพื่อให้คงสภาพความเป็น progenitor cell ไว้ เพื่อนำมาใช้เป็นเซลล์ตั้งต้นในการเปลี่ยนสภาพเป็นแมโครฟาจ (17)

เพาะเลี้ยง Hoxb8 progenitors cell $0.5-1 \times 10^6$ เซลล์ ใน 10 cm non-tissue culture-treated petri dish ด้วย 12 มิลลิลิตร POM media ที่มี RP-10 media, GM-CSF conditioned medium 5% และ β -estradiol 10 mM (2.72 mg/ml in absolute ethanol) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยจะต้องพาสเซลล์ทุก ๆ 2-3 วัน โดยลอกเซลล์ด้วย 1x PBS เย็น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 500-700 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วส่งนับเซลล์ (18)

หมายเหตุ การเตรียม GM-CSF conditioned medium ทำได้โดยเลี้ยง B16-GMCSF ใน 10cm tissue culture plate ในอาหาร 10 ml DMEM complete medium ให้ได้จำนวนเซลล์ $0.5-1 \times 10^6$ เซลล์ (ประมาณ 1-2 วัน) จากนั้นเก็บส่วน supernatant โดยกรองด้วย $0.2 \mu\text{m}$ พร้อมกับเปลี่ยน media บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บส่วน supernatant อีกครั้ง

การเปลี่ยนสภาพของแมโครฟาจ

นำ Hoxb8 progenitors cell ใน 10 cm non-tissue culture-treated petri dish มาลอกเซลล์ด้วย 1x PBS เย็น แล้วปั่นเหวี่ยง 500-700 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น seed 1×10^6 เซลล์ลงใน 10 cm non-tissue culture-treated petri dish ที่มี 12 ml M diff media (RP-10 medium, M-CSF conditioned medium 10%, Horse serum) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นเปลี่ยน media อีกครั้ง แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน Hoxb8 progenitors cell จะ differentiation เป็น macrophage และพร้อมใช้งานหลังจากผ่านไป 8 วัน (18)

หมายเหตุ การเตรียม M-CSF conditioned medium ทำโดยเลี้ยงเซลล์ L929 ใน 10cm tissue culture plate ในอาหาร 10 ml DMEM complete medium ให้ได้จำนวนเซลล์ 3×10^6 เซลล์ (ประมาณ 4 วัน) จากนั้นเก็บส่วน supernatant โดยกรองด้วย $0.2 \mu\text{m}$ พร้อมกับเปลี่ยน media บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บส่วน supernatant อีกครั้ง

2. การกระตุ้นแมโครฟาจด้วย PAMPs โดยใช้ Toll-like receptor (TLRs) ชนิดต่างๆ

กระตุ้นแมโครฟาจที่ differentiation แล้วด้วย PAMPs โดยใช้ Toll-like receptor (TLRs) ชนิดต่างๆ โดยแบ่งเซลล์ออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นเฉียบพลัน (Acute stimulated macrophage), ได้รับการกระตุ้นซ้ำ (Restimulated macrophage) และไม่ได้รับการกระตุ้น (Naïve Macrophage) โดยกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำ (Restimulated macrophage) ครั้งที่ 1 จะเป็นการกระตุ้นเฉียบพลัน (Acute stimulation) และครั้งที่ 2 เป็นการกระตุ้นซ้ำอีกครั้ง (Restimulation) ซึ่งจะกระตุ้นด้วย TLRs ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ Lipopolysaccharides (LPS), CpG Oligodeoxynucleotide (CpG), Pam3CysSerLys4 (Pam3CSK4) และ Polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)) ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การกระตุ้นแมโครฟาจดด้วย PAMPs โดยใช้ Toll-like receptor (TLRs) ชนิดต่างๆ

การทดลอง	กระตุ้นครั้งที่ 1	กระตุ้นครั้งที่ 2
1	LPS (100 ng/ml)	LPS (10 ng/ml)
2	LPS (100 ng/ml)	CpG (500 ng/ml)
3	LPS (100 ng/ml)	Pam3CSK4 (1 μ g/ml)
4	LPS (100 ng/ml)	poly(I:C) (100 μ g/ml)
5	CpG (500 ng/ml)	LPS (10 ng/ml)
6	CpG (500 ng/ml)	CpG (500 ng/ml)
7	CpG (500 ng/ml)	Pam3CSK4 (1 μ g/ml)
8	CpG (500 ng/ml)	poly(I:C) (100 μ g/ml)
9	poly(I:C) (100 μ g/ml)	LPS (10 ng/ml)
10	poly(I:C) (100 μ g/ml)	CpG (500 ng/ml)
11	poly(I:C) (100 μ g/ml)	Pam3CSK4 (1 μ g/ml)
12	poly(I:C) (100 μ g/ml)	poly(I:C) (100 μ g/ml)
13	Pam3CSK4 (1 μ g/ml)	LPS (10 ng/ml)
14	Pam3CSK4 (1 μ g/ml)	CpG (500 ng/ml)
15	Pam3CSK4 (1 μ g/ml)	Pam3CSK4 (1 μ g/ml)
16	Pam3CSK4 (1 μ g/ml)	poly(I:C) (100 μ g/ml)

หลังจาก 24 ชั่วโมงจากการกระตุ้นครั้งที่ 1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากรั้วเซลล์ 2 ครั้งด้วย sterile PBS พักเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะกระตุ้นครั้งที่ 2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เก็บ culture supernatant และนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 1000 rpm จากนั้นเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การสกัด RNA, การสร้าง cDNA และตรวจวัดการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT PCR

นำเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นเฉียบพลัน หรือได้รับการกระตุ้นซ้ำ และไม่ได้รับการกระตุ้น มาตรวจการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ได้แก่ Inflammatory gene คือ IL-1 β และ antimicrobial gene คือ Marco และ Serpine1 ด้วยวิธี RT-PCR

การสกัด RNA

นำเซลล์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 มาสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ Trizol reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลอด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม Chloroform ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2-3 นาที จนแยกชั้น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที ถ่ายส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของอาร์เอ็นเอไปยังหลอดไมโครเซนติพิวจ์ใหม่ เติม isopropanol 200 ไมโครลิตรต่อหลอดไมโครเซนติพิวจ์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที จะเห็นตะกอนอาร์เอ็นเอเป็นลักษณะคล้ายเจลใสอยู่ใต้หลอดไมโครเซนติพิวจ์ นำส่วน supernatant ที่ทิ้ง แล้วซับด้วยกระดาษให้แห้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% เอทานอล 400 ไมโครลิตรต่อหลอดไมโครเซนติพิวจ์ นำไป vortex แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที ทิ้งส่วน supernatant ซับด้วยกระดาษแล้วปล่อยให้แห้ง 5-10 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำ DEPC 20 ไมโครลิตร ตีตุกให้อาร์เอ็นเอผสมกัน แล้วนำไปบ่มใน heat block ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การสร้าง cDNA

นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปทำปฏิกิริยา reverse transcription เพื่อเปลี่ยนเป็น cDNA โดยนำอาร์เอ็นเอมาวัดความเข้มข้นด้วย Nanodrop และคำนวณเพื่อให้ได้ปริมาณสำหรับอาร์เอ็นเอ 500 นาโนกรัม จากนั้นผสมกับ random hexamer 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำ DEPC ให้ได้ปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นเติม 5x Reverse transcriptase buffer, 10mM dNTP, เอนไซม์ reverse transcriptase (RTase) และสารยับยั้งเอนไซม์ RNase ตามตารางที่ 3.1 จากนั้นดำเนินปฏิกิริยา Reverse transcription และนำ cDNA ที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในตารางที่ 3.2 และไพรเมอร์ต่อยีน *IL-1 β* , *Marco* และ *Serpine1* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและภาวะ tolerance ตามที่ได้แสดงในตารางที่ 3.3 จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาทำ agarose gel electrophoresis โดยนำ cDNA 3 ไมโครลิตร มาผสมกับ Gel red 1 ไมโครลิตร และ Hypure water 2 ไมโครลิตร และหยอดลงใน 2% agarose gel และแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าคงที่ 100 มิลลิโวลต์ 30 นาที และนำไปตรวจสอบด้วยการส่องกับ UV

ตารางที่ 3.1 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา Reverse transcription

ส่วนประกอบ	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
5x Reverse transcriptase buffer	4
10 mM dNTP mix	2
Reverse transcriptase	1
RNase inhibitor	0.5

ตารางที่ 3.2 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
Emerald	12.5
10 mM Forward primer	0.5
10 mM Reverse primer	0.5
Hypure water	10.5
cDNA	1.0

ตารางที่ 3.3 โพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3') F: Forward, R: Reverse	Annealing temperature (องศา เซลเซียส)	ขนาดของ ผลิตภัณฑ์ PCR (bp)
<i>β-actin</i>	F: ACCAACTGGGACGACATGGAG R: GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC	55.0	385
<i>IL-1β</i>	F: AACAGATGAAGTGCTCCTTCCAGG R: TGGAGAACACCACTTGTGCTCCA	53.0	198
<i>Marco</i>	F: GAAGACTTCTTGGGCAGCAC R: CTTCTTGGGCACTGGATCAT	62.0	295
<i>Serpine1</i>	F: TCATCAATGACTGGGTGGAA R: TGCTGGCCTCTAAGAAAGGA	62.0	492

การคำนวณความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR

ความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR จากการทำ gel electrophoresis จะถูกวัดโดยใช้โปรแกรม ImageJ (NIH, USA) ตามวิธีอ้างอิงจาก Diamantina Institute ของ The University of Queensland (20) โดยสร้างพื้นที่ปิดรอบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่สนใจ จากนั้นวัดความเข้มของแถบโดยโปรแกรมจะแสดงผลในรูปแบบฮิสโตแกรม (Histogram) โดยอ้างอิงจากจำนวนพิกเซล (pixel) ที่อยู่ภายในพื้นที่ปิดล้อมที่สร้างขึ้น คำนวณพื้นที่ใต้กราฟของฮิสโตแกรม และนำพื้นที่ใต้กราฟของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่สนใจหารด้วยพื้นที่ใต้กราฟของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ควบคุมของชุดการทดลองเดียวกัน จะได้สัดส่วนความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ในชุดการทดลองเดียวกัน จากนั้นนำสัดส่วนที่ได้จากแต่ละชุดการทดลองหารด้วยสัดส่วนความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของชุดการทดลองควบคุม

วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

ผลการทดลองถูกแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน นำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ unpaired t-test ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, USA) โดย * แทนข้อมูลของชุดทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$, ** แทน $p < 0.01$ และ *** แทน $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

4. ตรวจวัดระดับปริมาณ TNF- α และ IL-6 โดยวิธี ELISA

ตรวจวัดระดับปริมาณ TNF- α และ IL-6 โดยใช้ 96-well plate และให้แต่ละหลุมมีเซลล์ประมาณ 200,000 เซลล์ มาบ่มรวมกับตัวกระตุ้นเซลล์ PAMPs โดยใช้ Toll-like receptor (TLRs) ชนิดต่างๆ ได้แก่ LPS, CpG DNA, Pam3CSK4 และ Poly(I:C) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทำ ELISA เพื่อตรวจวัดระดับปริมาณ TNF- α โดย Mouse TNF- α ELISA Max Deluxe (Biolegend, San Diego, CA, USA) และตรวจวัดระดับปริมาณ IL-6 โดย Mouse IL-6 ELISA MAX Deluxe (Biolegend, San Diego, CA, USA) แล้ววัดค่า absorbance ด้วย microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ที่ความยาวคลื่น 450 nm และ 620 nm ค่า absorbance ที่ได้จะสามารถนำไปคำนวณหาระดับปริมาณ TNF- α และ IL-6 โดยคำนวณจาก standard curve ที่ทราบความเข้มข้น

วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

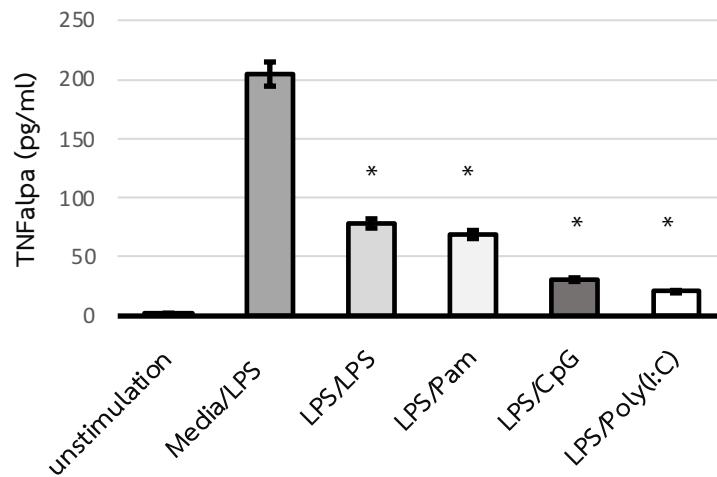
ใช้วิธีวิเคราะห์แบบ paired t-test เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับชุดควบคุมผลลบ วิเคราะห์ทางสถิติแบบ Spearman's correlation และพิจารณาผลการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ * แทนข้อมูลของชุดทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$, ** แทน $p < 0.01$ และ *** แทน $p < 0.001$

บทที่ 4

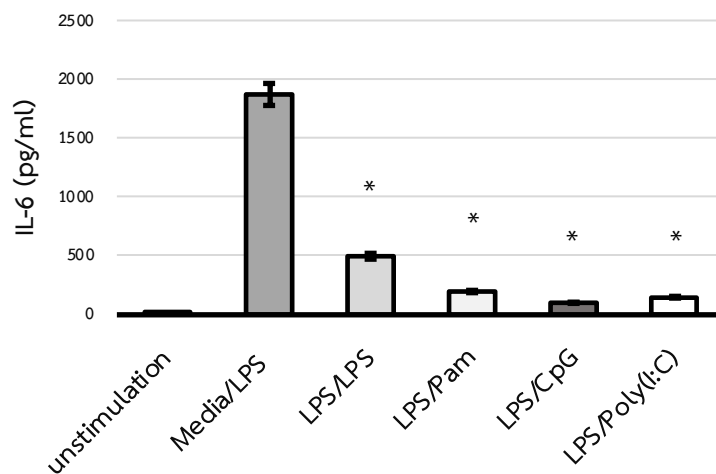
ผลการทดลอง

- ผลของการกระตุ้นแมโครฟาจด้วยลิแกนด์ของ Toll-like receptor ชนิดต่างๆ ต่อการผลิต TNF- α และ IL-6

A

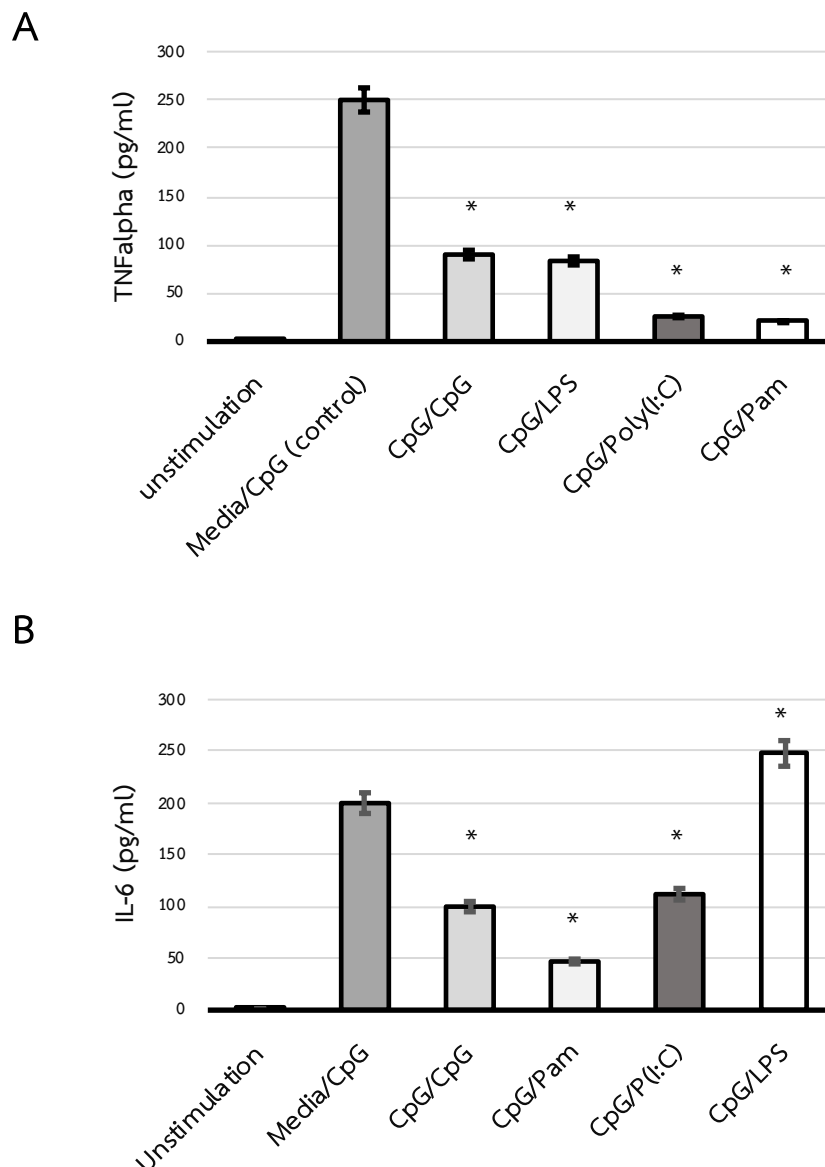


B



รูปที่ 1 ผลของการผลิต TNF- α และ IL-6 เมื่อกระตุ้นครั้งแรกด้วย LPS (100 ng/ml) (A) ระดับปริมาณ TNF- α ที่ผลิตจาก Hoxb8 แมโครฟาจ (B) ระดับปริมาณ IL-6 ที่ผลิตจาก Hoxb8 แมโครฟาจ

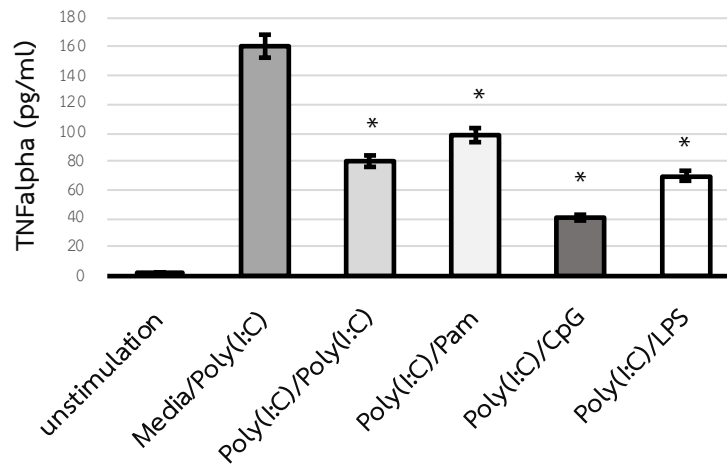
เมื่อกระตุ้นแมโครฟาจด้วยลิแกนด์ของ Toll-like receptor (TLR) ชนิดต่างๆ แล้วตรวจวัดระดับ ปริมาณ TNF- α และ IL-6 ด้วย ELISA จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแมโครฟาจไม่ได้รับ การกระตุ้น แมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นเฉียบพลันด้วย LPS (100 ng/ml) กระตุ้นการผลิต TNF- α และ IL-6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูป 1A,1B) แมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำโดยครั้งที่ 1 กระตุ้น ด้วย LPS (100 ng/ml) และครั้งที่ 2 กระตุ้นด้วย TLRs ที่แตกต่างกัน (ดังตารางที่ 2.1 การทดลอง 1-4) ส่งผลให้มีการผลิต TNF- α และ IL-6 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูป 1A,1B) แสดงให้เห็นว่า เกิดภาวะ tolerance จากการกระตุ้นด้วย LPS สำหรับ TNF- α และ IL-6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



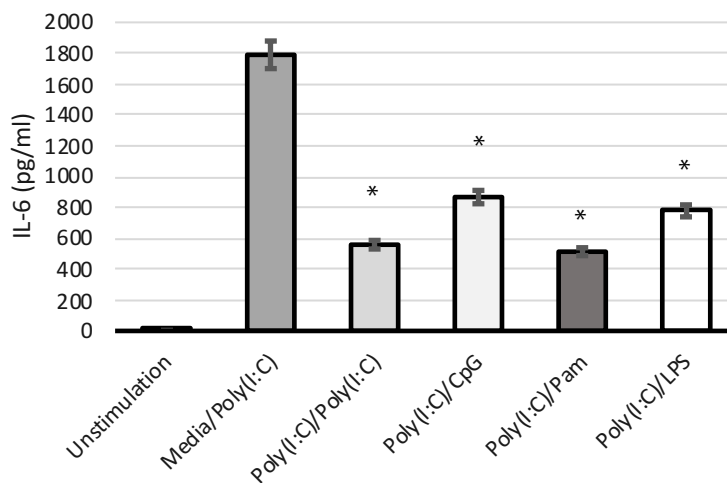
รูปที่ 2 ผลของการผลิต TNF- α และ IL-6 เมื่อกระตุ้นครั้งแรกด้วย CpG (500 ng/ml) (A) ระดับ ปริมาณ TNF- α ที่ผลิตจาก Hoxb8 แมโครฟาจ (B) ระดับปริมาณ IL-6 ที่ผลิตจาก Hoxb8 แมโครฟาจ

เมื่อเปรียบเทียบกับแมโครฟาจที่ไม่ได้รับการกระตุ้น แมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นเฉียบพลันด้วย CpG (500 ng/ml) กระตุ้นการผลิต TNF- α และ IL-6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูป 2A,2B) แมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำโดยครั้งที่ 1 กระตุ้นด้วย CpG (500 ng/ml) และครั้งที่ 2 กระตุ้นด้วย TLRs ที่แตกต่างกัน (ดังตารางที่ 2.1 การทดลอง 5-8) ส่งผลให้มีการผลิต TNF- α ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูป 2A) แสดงให้เห็นว่าเกิดภาวะ tolerance จากการกระตุ้นด้วย CpG สำหรับ TNF- α อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่แมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำโดยครั้งที่ 1 กระตุ้นด้วย CpG (500 ng/ml) และครั้งที่ 2 กระตุ้นด้วย TLRs ที่แตกต่างกัน (ดังตารางที่ 2.1 การทดลอง 5-8) ส่งผลให้มีการผลิต IL-6 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูป 2A) ยกเว้นแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำโดยครั้งที่ 1 กระตุ้นด้วย CpG (500 ng/ml) และครั้งที่ 2 กระตุ้นด้วย LPS (10 ng/ml) ส่งผลให้มีการผลิต IL-6 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูป 2B) แสดงให้เห็นว่าไม่เกิดภาวะ tolerance จากการกระตุ้นครั้งที่ 1 ด้วย CpG และครั้งที่ 2 กระตุ้นด้วย LPS สำหรับ IL-6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

A

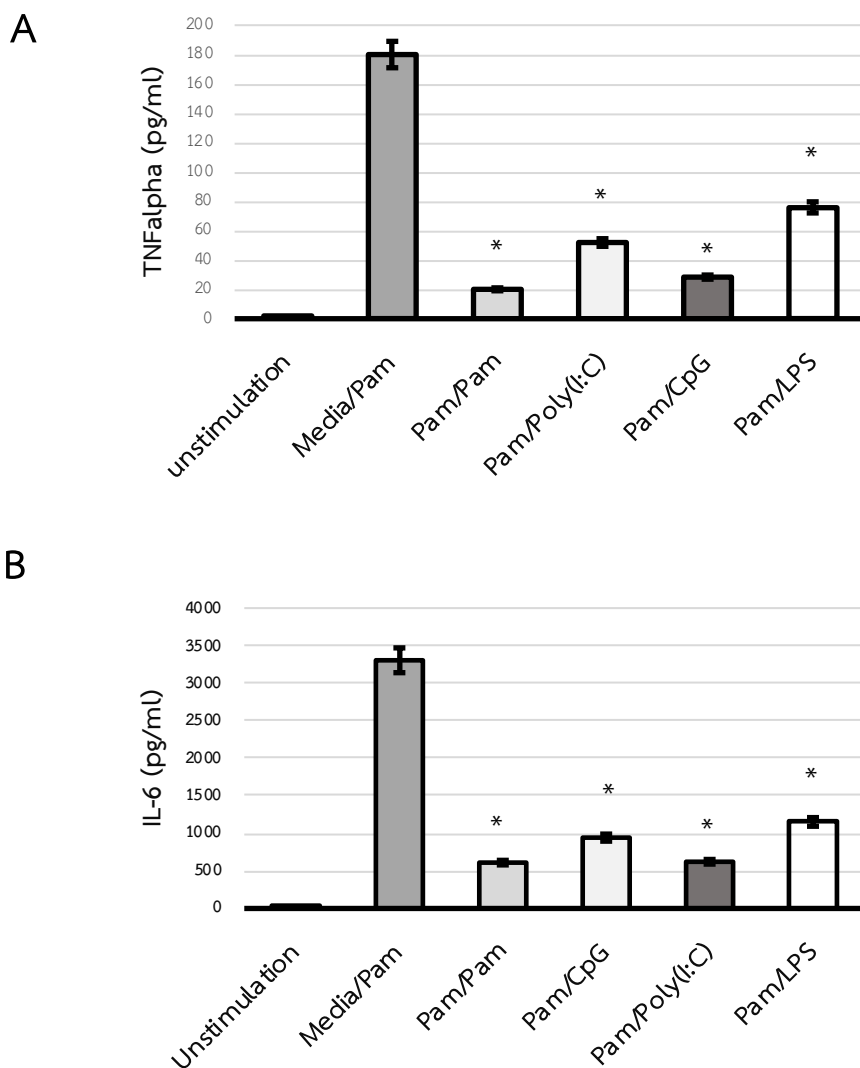


B



รูปที่ 3 ผลของการผลิต TNF- α และ IL-6 เมื่อกระตุ้นครั้งแรกด้วย Poly(I:C) (100 μ g/ml) (A) ระดับปริมาณ TNF- α ที่ผลิตจาก Hoxb8 แมโครฟาจ (B) ระดับปริมาณ IL-6 ที่ผลิตจาก Hoxb8 แมโครฟาจ

เมื่อเปรียบเทียบกับแมโครฟาจไม่ได้รับการกระตุ้น แมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Poly(I:C) (100 μ g/ml) กระตุ้นการผลิต TNF- α และ IL-6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูป 3A,3B) แมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำโดยครั้งที่ 1 กระตุ้นด้วย Poly(I:C) (100 μ g/ml) และครั้งที่ 2 กระตุ้นด้วย TLRs ที่แตกต่างกัน (ดังตารางที่ 2.1 การทดลอง 9-12) ส่งผลให้มีการผลิต TNF- α และ IL-6 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูป 3A,3B) แสดงให้เห็นว่าเกิดภาวะ tolerance จากการกระตุ้นด้วย Poly(I:C) สำหรับ TNF- α และ IL-6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่4 ผลของการผลิต TNF- α และ IL-6 เมื่อกระตุ้นครั้งแรกด้วย Poly(I:C) (100 μ g/ml) (A) ระดับปริมาณ TNF- α ที่ผลิตจาก Hoxb8 แมโครฟาจ (B) ระดับปริมาณ IL-6 ที่ผลิตจาก Hoxb8 แมโครฟาจ

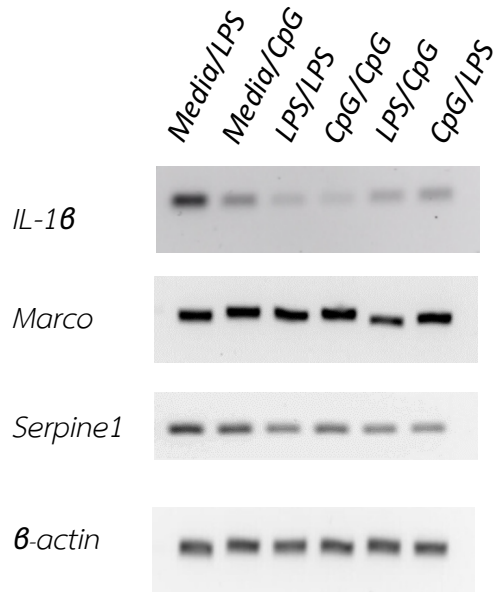
เมื่อเปรียบเทียบกับแมโครฟาจไม่ได้รับการกระตุ้น แมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นเฉียบพลันด้วย Pam3CSK4 (1 μ g/ml) กระตุ้นการผลิต TNF- α และ IL-6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูป 4A,4B) แมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำโดยครั้งที่ 1 กระตุ้นด้วย Pam3CSK4 (1 μ g/ml) และครั้งที่ 2 กระตุ้นด้วย TLRs ที่แตกต่างกัน (ดังตารางที่ 2.1 การทดลอง 13-16) ส่งผลให้มีการผลิต TNF- α และ IL-6 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูป 4A,4B) แสดงให้เห็นว่าเกิดภาวะ tolerance จากการกระตุ้นด้วย Pam3CSK4 สำหรับ TNF- α และ IL-6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. ผลของภาวะ tolerance ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และการต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี RT-PCR

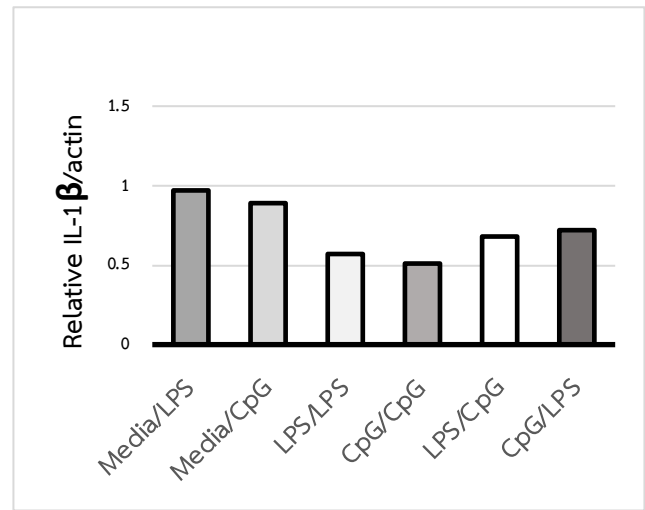
จากผลการทดลองที่ 1 ที่แสดงผลของการกระตุ้นแมโครฟาจด้วยลิแกนด์ของ Toll-like receptor (TLR) ชนิดต่างๆ ต่อการผลิต TNF- α และ IL-6 พบว่าการกระตุ้นแมโครฟาจด้วยลิแกนด์ของ TLRs ทุกชนิด ได้แก่ TLR2, TLR3, TLR4 และ TLR9 ส่งผลให้มีการผลิต TNF- α และ IL-6 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าเกิดภาวะ tolerance จากการกระตุ้นด้วย TLRs ทุกชนิด ยกเว้นแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำโดยครั้งที่ 1 กระตุ้นด้วย CpG (500 ng/ml) และครั้งที่ 2 กระตุ้นด้วย LPS (10 ng/ml) ส่งผลให้มีการผลิต IL-6 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูป 2B) แสดงให้เห็นว่าไม่เกิดภาวะ tolerance จากการกระตุ้นครั้งที่ 1 ด้วย CpG และครั้งที่ 2 กระตุ้นด้วย LPS สำหรับ IL-6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

นำแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำโดยครั้งที่ 1 กระตุ้นด้วย CpG (500 ng/ml) และครั้งที่ 2 กระตุ้นด้วย LPS (10 ng/ml) ที่แสดงให้เห็นว่าไม่เกิดภาวะ tolerance มาเปรียบเทียบกับแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำโดยครั้งที่ 1 กระตุ้นด้วย LPS (100 ng/ml) และครั้งที่ 2 กระตุ้นด้วย CpG (500 ng/ml) ที่แสดงให้เห็นว่าเกิดภาวะ tolerance โดยนำแมโครฟาจจากทั้ง 2 การทดลอง มาสกัด RNA นำไปผ่านกระบวนการ reverse transcription และ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ต่อยีน *IL-1 β* , *Marco* และ *Serpine1* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการต้านจุลินทรีย์ พบว่ายีน *IL-1 β* และ *Serpine1* มีการแสดงออกที่ลดลงทั้งในแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำโดยครั้งที่ 1 กระตุ้นด้วย LPS (100 ng/ml) และครั้งที่ 2 กระตุ้นด้วย CpG (500 ng/ml) และแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำโดยครั้งที่ 1 กระตุ้นด้วย CpG (500 ng/ml) และครั้งที่ 2 กระตุ้นด้วย LPS (10 ng/ml) (รูป 5B, 5D) ในขณะที่ยีน *Marco* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำโดยครั้งที่ 1 กระตุ้นด้วย CpG (500 ng/ml) และครั้งที่ 2 กระตุ้นด้วย LPS (10 ng/ml) (รูป 5C)

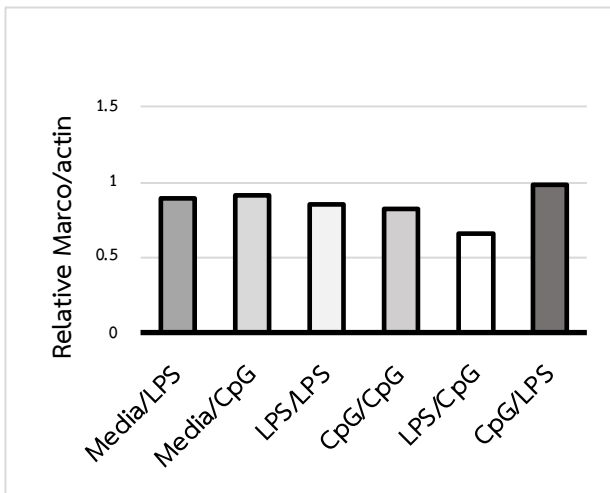
A



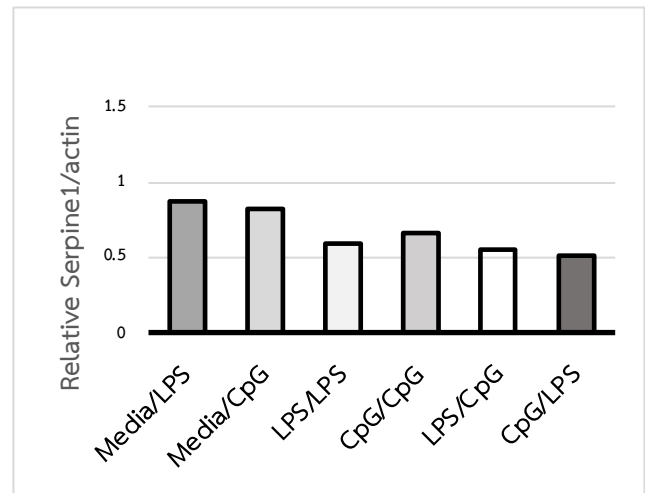
B



C



D



รูปที่5 การแสดงออกของยีน *IL-1 β* , *Marco* และ *Serpine1* ในแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำ
 (A) วัดระดับการแสดงออกของยีน *IL-1 β* , *Marco* และ *Serpine1* ในแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำด้วยวิธี PCR เทียบกับแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นเฉียบพลัน โดยแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ สัดส่วนความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR เฉลี่ยของยีน (B) *IL-1 β* , (C) *Marco* และ (D) *Serpine1* ต่อยีน β -*actin*

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

ในอดีตงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับภาวะ tolerance ต่อเอ็นโดท็อกซิน (endotoxin) ส่วนใหญ่ใช้ LPS ในการดำเนินการทดลอง โดยงานวิจัยในช่วงแรกได้ศึกษาผลของภาวะ tolerance ต่อเอ็นโดท็อกซินภายในร่างกาย (in vivo) และอาศัยการตอบสนองของผู้ป่วยเป็นข้อมูลสำหรับการตอบสนองต่อเอ็นโดท็อกซิน จึงนำไปสู่แนวคิดที่ว่าภาวะ tolerance เป็นภาวะที่ร่างกายมีการตอบสนองน้อยลงเนื่องจากความไวต่อเอ็นโดท็อกซิน อย่างไรก็ตามได้มีรายงานระบุว่าเนื่องจากปัจจัยที่เป็นสื่อกลางในการตอบสนองต่อการอักเสบโดยธรรมชาติทำให้ภาวะ tolerance เป็นภาวะของการตอบสนองที่เปลี่ยนแปลงไปต่อการถูกกระตุ้น มากกว่าการตอบสนองที่ลดลงต่อสิ่งเร้าเพียงอย่างเดียว โดยการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในเบื้องต้นของภาวะ tolerance ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในแมโครฟาจพบว่า LPS-inducible gene ส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านการอักเสบและการต่อต้านจุลินทรีย์ ไม่ถูกยับยั้งในภาวะ LPS tolerance (13) จึงเป็นที่น่าสังเกตว่าการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนแบบเดียวกันไม่ได้ถูกนำไปใช้ในภาวะ tolerance ที่เกิดจากการที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยลิแกนด์ TLRs ชนิดอื่นๆ ดังนั้นข้อมูลของภาวะ tolerance ที่เกิดจากการกระตุ้นโดยลิแกนด์ TLR จำเพาะจึงยังคงไม่ชัดเจน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการกระตุ้นซ้ำด้วยลิแกนด์ TLRs ชนิดต่างๆ ได้แก่ TLR4 ที่มีลิแกนด์เป็น Lipopolysaccharides (LPS), TLR9 ที่มีลิแกนด์เป็น CpG Oligodeoxynucleotide (CpG), TLR2 ที่มีลิแกนด์เป็น Pam3CysSerLys4 (Pam3CSK4) และ TLR3 ที่มีลิแกนด์เป็น Polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)) ต่อการผลิตและการหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และเพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะ tolerance ใน Hoxb8 แมโครฟาจ ซึ่งข้อมูลจากงานวิจัยนี้จะแสดงให้เห็นถึงภาวะ tolerance ที่เกิดจากการกระตุ้นซ้ำด้วยลิแกนด์ TLRs ชนิดต่างๆ ได้แก่ TLR2, TLR3, TLR4 และ TLR9 นั้นมีรูปแบบการแสดงออกของไซโตไคน์ที่หลากหลายและแตกต่างกัน

งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการทดลองโดยใช้แมโครฟาจของหนู (Hoxb8 macrophage) ซึ่งเป็นแมโครฟาจที่เหนี่ยวนำการเปลี่ยนสภาพจาก progenitor cell โดยมีการตัดต่อพันธุกรรมเพื่อให้คงสภาพความเป็น progenitor cell ไว้ เพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อนำมาใช้เป็นเซลล์ตั้งต้นในการเปลี่ยนสภาพเป็นแมโครฟาจ (17) จากนั้นเปลี่ยนสภาพเซลล์ให้เป็นแมโครฟาจโดยใช้ M-CSF conditioned medium (18) แล้วกระตุ้นให้เกิดภาวะ tolerance ด้วย TLRs ชนิดต่างๆ โดยการกระตุ้นเซลล์ควรเกิดขึ้นโดยปราศจากปัจจัยการเจริญเติบโต (growth factor) และบ่งชี้ให้เห็นว่าแมโครฟาจไม่เคยได้รับการกระตุ้น และแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้น

เฉียบพลัน ไม่เคยถูกลดการแสดงออกของการตอบสนองมาก่อน จากนั้นตรวจวัดระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบโดย ELISA และตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค RT-PCR

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้มีการอธิบายถึงบทบาทความสำคัญของปัจจัยในการถอดรหัส NF- κ B เป็นตัวขับเคลื่อนยีนที่ทำให้เกิดการอักเสบที่ลดลงของ TLRs ทุกชนิด (5) และได้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ NF- κ B ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ tolerance (19) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจากงานวิจัยนี้ที่แสดงให้เห็นว่ายีนที่ถูกลดการแสดงออกระหว่างภาวะ tolerance เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณ NF- κ B การแสดงออกที่ลดลงของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เป็นคุณลักษณะเฉพาะอย่างหนึ่งของภาวะ tolerance ที่เกิดจากการถูกกระตุ้นด้วย LPS อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าแมโครฟาจที่เกิดภาวะ tolerance จะมีการผลิต TNF- α ลดลงจากการถูกกระตุ้นซ้ำตามลำดับด้วยทุกลิแกนด์ TLRs ในขณะที่ไซโตไคน์ที่มีความสำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ IL-6 จะเห็นว่ามีระดับการผลิตที่ลดลงจากการถูกกระตุ้นซ้ำตามลำดับด้วยทุกลิแกนด์ TLRs ยกเว้นการกระตุ้นครั้งที่ 1 ด้วย TLR9 ที่มีลิแกนด์เป็น CpG Oligodeoxynucleotide (CpG) แล้วกระตุ้นครั้งที่ 2 ด้วย TLR4 ที่มีลิแกนด์เป็น Lipopolysaccharides (LPS) ที่มีระดับ IL-6 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น แม้ว่าโดยทั่วไปลิแกนด์ TLRs แต่ละชนิดจะสามารถลดระดับการแสดงออกของไซโตไคน์ที่ทำให้เกิดการอักเสบในเซลล์ที่เกิดภาวะ tolerance ได้ แต่ไม่ใช่ไซโตไคน์ทุกชนิดที่จะถูกลดการแสดงออก นอกจากนี้ยังมีรูปแบบการแสดงออกของไซโตไคน์ที่หลากหลายผ่านการถูกกระตุ้นด้วย TLRs ชนิดต่างๆ ในภาวะ tolerance ซึ่งปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจนถึงการควบคุมรูปแบบการแสดงออกของไซโตไคน์ ที่จำเพาะต่อ TLRs แต่ละชนิด อย่างไรก็ตามการเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองที่แตกต่างกันต่อ TLRs แต่ละชนิดอาจแสดงถึงกลไกที่เป็นไปได้ต่อไป ดังนั้นข้อมูลจากงานวิจัยนี้จึงแสดงถึงผลที่จำเพาะของภาวะ tolerance ต่อ TLRs ชนิดต่างๆ ได้แก่ TLR2, TLR3, TLR4 และ TLR9 โดยผลทางภูมิคุ้มกันวิทยาต่อรูปแบบการแสดงออกที่จำเพาะของระดับไซโตไคน์ยังคงต้องการการศึกษาและวิจัยเพิ่มเติม

รูปแบบที่แตกต่างกันของการแสดงออกของไซโตไคน์ในแมโครฟาจที่เกิดภาวะ tolerance ต่อลิแกนด์ TLRs ชนิดต่างๆ ที่พบในงานวิจัยนี้อาจสอดคล้องกับปรากฏการณ์ที่ได้มีการกำหนดไว้เมื่อไม่นานมานี้คือการฝึกภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune training) การฝึกภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดได้รับการนิยามว่าเป็นการเพิ่มความสามารถในการป้องกันตัวเองของเจ้าบ้านโดยกำเนิดเมื่อมีการติดเชื้อซ้ำด้วยเชื้อชนิดเดียวกันหรือต่างกัน การฝึกภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดถูกมองว่าเป็นภาวะที่แยกกันกับภาวะ tolerance ที่มีความเกี่ยวข้องกับการกดการตอบสนองต่อการอักเสบ (3) โดยงานวิจัยนี้อาจชี้ให้เห็นว่าการศึกษาผลของการกระตุ้นซ้ำด้วยลิแกนด์

TLRs ที่แตกต่างกันเพียงอย่างเดียวอาจเรียบง่ายเกินไปสำหรับการจัดหมวดหมู่ภาวะของแมโครฟาจ ข้อมูลจากงานวิจัยนี้สามารถอธิบายถึงคุณสมบัติของภาวะ tolerance ได้เพียงเบื้องต้น เนื่องจากมีการใช้จำนวนพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ที่จำกัด ดังนั้นควรพิจารณาถึงบทบาทและคุณสมบัติของภาวะ tolerance เพิ่มเติมในระดับยีนที่มีความจำเพาะ ซึ่งน่าจะสะท้อนให้เห็นถึงผลลัพธ์ที่ซับซ้อนของภาวะ tolerance ในแมโครฟาจต่อการถูกกระตุ้นด้วย TLRs แต่ละชนิดเพิ่มเติมจากงานวิจัยนี้ได้ดียิ่งขึ้น

โดยสรุปงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของการถูกกระตุ้นซ้ำด้วยลิแกนด์ของ Toll-like receptors (TLRs) ชนิดต่างๆ ได้แก่ TLR2, TLR3, TLR4 และ TLR9 ต่อการผลิตและการหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะ tolerance ซึ่งแสดงให้เห็นถึงรูปแบบการแสดงออกของระดับไซโตไคน์ที่แตกต่างกันในแมโครฟาจที่ถูกกระตุ้นอย่างจำเพาะด้วย TLRs ชนิดต่างๆ และระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะ tolerance ที่แตกต่างกัน ซึ่งรูปแบบการแสดงออกที่ต่างกันเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการตอบสนองอย่างจำเพาะต่อการถูกกระตุ้น และอาจมีความเกี่ยวเนื่องกับการฝึกภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดที่ยังต้องศึกษาและพัฒนาต่อไปในอนาคต

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS DMEM (40 ml)		
DMEM	40	มิลลิลิตร
Fetal Bovine Serum	4	มิลลิลิตร
Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	0.4	มิลลิลิตร
Sodium pyruvate	0.4	มิลลิลิตร
ยาปฏิชีวนะ Penicillin/Streptomycin	0.4	มิลลิลิตร
2. อาหารเลี้ยงเซลล์ RP-10		
RPMI 1640 medium + L-Glutamine	40	มิลลิลิตร
FBS qualified grade	4	มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol 1000x 55 mM	0.0363	มิลลิลิตร
DMEM media high glucose + L-Glutamine	0.4	มิลลิลิตร
3. อาหารเลี้ยงเซลล์ Progenitor Outgrowth (POM)		
RP-10 media	40	มิลลิลิตร
GM-CSF conditioned medium	2	มิลลิลิตร
β -estradiol 10 mM (2.72 mg/ml in absolute ethanol)	0.004	มิลลิลิตร
4. Phosphate Buffer Saline (PBS) ความเป็นกรด-ด่าง 7.4		
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
ไดโซไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.44	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.24	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

*ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์
นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Freezing media (1,000 μ l)

10% FBS DMEM	900	ไมโครลิตร
DMSO	100	ไมโครลิตร

6. 95% Ethanol (100 ml)

Absolute ethanol	95	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	5	มิลลิลิตร

เอกสารอ้างอิง

1. Aurélien, Poincloux, Renaud, Maridonneau-Parini, Isabelle & Le Cabec, Véronique. 2020. Genetic engineering of Hoxb8-immortalized hematopoietic progenitors—a potent tool to study macrophage tissue migration. *Journal of Cell Science* 133:
2. Bottero, Virginie, Imbert, Véronique, Freiin, Catherine, Formento, Jean-Louis & Peyron, Jean-François. 2003. Monitoring NF-**κ**B transactivation potential via real-time PCR quantification of **IKB-α** gene expression. 7: 187-194.
3. Bundschuh DS, Barsig J, Hartung T, Randow F, Docke WD, Volk HD, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma restore the systemic TNF-alpha response to endotoxin in lipopolysaccharide- desensitized mice. (1997) 158(6):2862–71.
4. Butcher, Suzanne K, O’Carroll, Christine E, Wells, Christine A & Carmody, Ruaidhrí J. 2018. Toll-like receptors drive specific patterns of tolerance and training on restimulation of macrophages. *Frontiers in immunology* 9: 933.
5. Carmody, Ruaidhrí J, Ruan, Qingguo, Palmer, Scott, Hilliard, Brendan & Chen, Youhai H. 2007. Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF-**κ**B p50 ubiquitination blockade. *Science* 317: 675-678.
6. Collins, Patricia E & Carmody, Ruaidhri J. 2015. The regulation of endotoxin tolerance and its impact on macrophage activation. *Immunology* 35:
7. Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* (2007) 447(7147):972. doi:10.1038/nature05836
8. Huang, Edward & Wells, Christine Anne. 2014. The ground state of innate immune responsiveness is determined at the interface of genetic, epigenetic, and environmental influences. 193: 13-19.
9. Kawai, T., & Akira, S. (2007). Signaling to NF-**κ**B by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine*, 13(11), 460-469.

10. Kobayashi, Koichi, Hernandez, Lorraine D, Galán, Jorge E, Janeway Jr, Charles A, Medzhitov, Ruslan & Flavell, Richard A. 2002. A negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 110: 191-202.
11. Leifer, Cynthia A & Medvedev, Andrei E. 2016. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. *100*: 927-941.
12. Livak, Kenneth J & Schmittgen, Thomas D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR. *25*: 402-408.
13. López-Collazo, Eduardo & del Fresno, Carlos. 2013. Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences. *Critical care* 17: 242.
14. May, Michael J & Ghosh, Sankar. 1998. Signal transduction through NF- κ B. *Immunology today* 19: 80-88.
15. Netea, M. G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L. B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., Latz, E. (2020). Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 20(6), 375-388.
16. Queensland TUo. Using ImageJ to quantify blots 2017 [updated Apr 27, 2017]. Available from: <https://di.uq.edu.au/community-and-alumni/sparq-ed/sparq-ed-services/using-imagej-quantify-blots>.
17. Redecke, V., Wu, R., Zhou, J., Finkelstein, D., Chaturvedi, V., High, A. A., & Häcker, H. (2013). Hematopoietic progenitor cell lines with myeloid and lymphoid potential. *10*(8), 795-803.
18. Wang, G. G., Calvo, K. R., Pasillas, M. P., Sykes, D. B., Häcker, H., & Kamps, M. P. (2006). Quantitative production of macrophages or neutrophils ex vivo using conditional Hoxb8. *Nature methods*, 3(4), 287-293.
19. Yan Q, Carmody RJ, Qu Z, Ruan Q, Jager J, Mullican SE, et al. Nuclear factor- κ B binding motifs specify toll-like receptor-induced gene repression through an inducible repressosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) 109(35):14140–5.
doi:10.1073/pnas.1119842109

20. Zach, F., Mueller, A., & Gessner, A. (2015). Production and functional characterization of murine osteoclasts differentiated from ER-Hoxb8-immortalized myeloid progenitor cells. PLoS One, 10(11), e0142211.
21. ดร.ฤทธิ วัฒนชัยยิ่งเจริญ . ชีวิตกับสิ่งแวดล้อมสิ่งมีชีวิตกับกระบวนการดำรงชีวิต . พิมพ์ครั้งที่ 1 .
กรุงเทพฯ ฯ : อักษรเจริญทัศน์ .
http://www.trueplookpanya.com/new/cms_detail/knowledge/2882-00/
22. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. การอักเสบ (Inflammation). [ออนไลน์].
https://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2551/phars0351sk_ch2.pdf
23. นพ.ชนินันท์ สนธิไชย. ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา
gurutvaccine.com/elearn/1-3- innate- immunity