บทคัดย่อ (Abstract)

ชื่อโครงการ: การศึกษาการตอบสนองของเซลล์ keratinocyte กับเชื้อ *Propionibacterium acnes*

The response of keratinocytes upon recognizing *Propionibacterium acnes*

หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.ประทีป วรรณิสสร
ภาควิชาอายุรศาสาตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
โทรศัพท์ 055-261000 ต่อ 5043
ผู้ร่วมวิจัย นางเนตรนภิส วรรณิสสร
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศษสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
โทรศัพท์ 055-261000 ต่อ 4630
ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยสาขา วิทยาศาสตร์การแพ5ทย์
งบประมาณรายได้ประจำปี 2549 2550 และ 2551
จำนวนเงิน 6,095,795 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี 2 เดือน
ตั้งแต่ มิถุนายน 2549 ถึง สิงหาคม 2551

โรคสิวเป็นโรคที่พบได้บ่อยในช่วงวัยรุ่น กลไกการเกิดโรคสิงยังไม่ทราบแน่ชัด สาเหตุหนึ่งที่เชื่อว่าก่อให้เกิดโรคสิวคือเชื้อ *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) มีรายงานว่าเชื้อ *P. acnes* สามารถกระตุ้น Toll-like receptor (TLR) 2 บน macrophages ให้หลั่ง inflammatory cytokies แต่ ยังไม่มีการศึกษากลไกการกระตุ้น keratinocytes โดย *P. acnes* อย่างชัดเจน โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษา chemokines ที่หลั่งออกจาก keratinocytes หลังการกระตุ้นของ *P. acnes* ผ่าน TLR2 ในการดำเนินการวิจัยคณะผู้วิจัยสร้าง stable transfectant cells ให้ human embryonic kidney cells (HEK) แสดงออก TLR2 และ TLR4 โดยยืนยันด้วยการใช้ antibody ต่อ TLR2 และ TLR4 ที่ติดด้วย phycoerythrin และวัดด้วย flow cytometry ต่อมาศึกษาการทำงานของ TLRs ด้วยการวัดค่า relative luciferase assay ของ Nuclear factor-kappa B (NF-KB) และจะศึกษาการตอบสนองด้วย chemokines ของ keratinocytes ด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction และ enzyme-linked immunosorbant assay ต่อไป จากการศึกษาพบว่า primary human keratinocytes มีการแสดงออกของโปรตีน TLR2 ไม่พบ TLR4 ทั้งบนผิวเซลล์และภายในเซลล์ ผลการศึกษา relative luciferase activity ของ NF-KB พบว่า Pam_3Cys-Ser-$(Lys)_4$ เป็น ligand ของ TLR2 กระตุ้น NF-KBของ HEK-

TLR2 แต่ไม่กระตุ้น HEK-TLR4/MD2 และ ultrapure lipopolysacharide เป็น ligand ของ TLR4 กระตุ้น NF-KBของ HEK-TLR4 แต่ไม่กระตุ้น HEK-TLR2 เชื้อ *P. acnes* กระตุ้น NF-KB ของ HEK-TLR2 แบบ dose-dependent แต่ไม่กระตุ้น HEK-TLR4/MD2 ถึงแม้จะใช้ความเข้มข้นที่สูง โดยสรุป พบโปรตีน TLR2 แต่ไม่พบ TLR4 บน human keratinocytes เชื้อ *P. acnes* กระตุ้นเซลล์ที่มี TLR2 และไม่สามารถกระตุ้นเซลล์ที่มี TLR4

Propionibacterium acnes (*P.acnes*) is believed to be one of the factors that cause acne. *P.acnes* has been shown to activate Toll-like receptor (TLR) 2 present on macrophage and triggers cytokines production. However, the activation of keratinocytes by this bacterium is not clearly elucidated. We would like to investigate whether *P.acnes* can trigger chemotactic cytokines from keratinocytes via TLR2. To serve as reference, we stably expressed TLR2 and TLR4 on human embryonic kidney cells and verify their presence by flow cytometry, employing phycoerythrin labeled antibodies to TLR2 and TLR4. Examination of the TLR receptors function performed by measuring relative luciferase activity of Nuclear factor-KB. We will also study the chemokines response of keratinocytes by real-time polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. We found that primary human keratinocytes expressing TLR2 but not TLR4 were verified by conjugated anti-TLR2 and anti-TLR4 antibodies using flow cytometry. Intracellular staining of keratinocytes with anti-TLR4 antibody did not reveal any binding. The relative luciferase activity of Nuclear factor kappaB (NF-KB) activation of HEK-TLR2 showed that Pam_3Cys-Ser-$(Lys)_4$, TLR2 synthetic ligand, specifically activated NF-KB of HEK-TLR2 cells but not HEK-TLR4/MD2 cells. Ultra pure LPS, TLR4 ligand, also specifically activated NF-KB of HEK-TLR4/MD2 cells but not HEK-TLR2 cells. *P.acnes* induced NF-KB activation of HEK-TLR2 in a dose-dependent manner *P.acnes* could not induce NF-KB activation of HEK-TLR4/MD2 even at a high concentration. We conclude that TLR2 is expressed on primary human keratinocytes but not TLR4 and *P. acnes* activated cells via TLR2 but not TLR4 receptor.