

Thesis Title The Effects of Src Homology 2-containing-inositol 5'-phosphatase-1 (SHIP-1) Deficiency in Ovalbumin-induced Asthma Model

Author Mr. Sukit Roongapinun

Degree Doctor of Philosophy (Pharmacology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Ampai Panthong	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Chaichan Sangdee	Member
Assoc. Prof. Noppamas Rojanasthien, M.D.	Member
Assoc. Prof. Maleeya Manorot, M.D.	Member
Assoc. Prof. Dr. Nirush Lertprasertsuke, M.D.	Member

ABSTRACT

As the signaling mechanism in asthma development is unclear, it has been found that phosphoinositide 3-kinases in a signaling pathway are activated during allergen challenge in asthma model. Src homology 2-containing-inositol 5'-phosphatase-1 (or SHIP-1), one of a negative regulator of phosphoinositide 3-kinases is of interest in asthma development, since SHIP-1 knockout mice (S1 mice) have been reported to develop Th2 inflammation without an obvious allergen exposure. No study has described the response of S1 mice to ovalbumin in asthma model. In addition, previous studies have given unclear information about the functions of S1 T cells in response to a particular allergen. The present study then set forth to examine the development of ovalbumin (OVA)-induced asthma in S1 mice and to delineate the functional response (i.e., IL-4 production) of S1 T cells, which was primed or unprimed with the allergen. S1 or wild type mice (6-8 weeks old) on BALB/c background were immunized (day 0, day 7) and challenged (day 14 and 15) with

OVA. One day after the last challenge, mice were measured for airway hyperresponsiveness and sacrificed afterwards. Bronchoalveolar lavage fluid (BAL), lungs, and spleen cells were studied. T cells were also purified and examined their response to various stimuli including an OVA allergen. T cells were co-cultured with antigen-presenting cells (APCs) to test for the optimal interface. Their T cells were tested for Th2 differentiation potential. The results showed that S1 mice did not develop asthma upon ovalbumin induction. The asthma features were suppressed, including BAL eosinophilia, BAL Th2 cytokines, histopathology, and OVA-specific IgE. However, T cells of naïve S1 mice readily produced IL-4 after stimulating with a phorbol ester/ionomycin or anti-CD3 with/without anti-CD28. The IL-4 production from spleen cells of sensitized S1 mice was inhibited upon OVA re-exposure, whereas their T cell IL-4 production was unaffected. The co-culture of S1 T cells and wild type APCs did not reconstitute IL-4 production in S1 T cells. The S1 T cells were ambiguously differentiated to Th2 cells. These results shed some light on the role of SHIP-1 in asthma mechanism by which SHIP-1 deficiency may suppress asthma development in several ways including microanatomical changes in their lymphoid tissues, the availability of effector cells in response to exposed allergen, and the role of regulatory T cells in S1 mice.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของการขาด Src Homology 2-containing-inositol 5'-phosphatase-1 (SHIP-1) ในรูปแบบการทดลองโรคหอบหืดที่เหนี่ยวนำโดยโอวัลบูมิน

ผู้เขียน นายสุกิจ รุ่งอภิรัตน์

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. อำไพ ปั่นทอง	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. ชัยชาญ แสงดี	กรรมการ
รศ. พญ. นพมาศ โรจนเสถียร	กรรมการ
รศ. พญ. มาลีธา มโนรช	กรรมการ
รศ. ดร. พญ. นิรัชร์ เสิศประเสริฐสุข	กรรมการ

บทคัดย่อ

ถึงแม้ว่ากลไกการให้สัญญาณในโรคหอบหืดยังไม่เป็นทราบแน่ชัด แต่พบว่าฟอสโฟอินโนซิไทด์ 3-ไคนเนสซึ่งเป็นวิธีหนึ่งของการให้สัญญาณจะถูกกระตุ้นได้เมื่อได้รับสารก่อภูมิแพ้เอนไซม์ Src homology 2-containing-inositol 5'phosphatase-1 (SHIP-1) ซึ่งเป็นตัวควบคุมเชิงลบของฟอสโฟอินโนซิไทด์ 3-ไคนเนส อาจมีผลต่อการเกิดโรคหอบหืด เนื่องจากมีรายงานว่าหนูถีบจักรที่ปราศจากจากยีน SHIP-1 (หนูถีบจักร S1) สามารถเกิดการอักเสบแบบ Th2 ได้ทั้งที่ไม่มีกระตุ้นจากสารก่อภูมิแพ้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงการเกิดโรคหอบหืดของหนูถีบจักร S1 ในรูปแบบการทดลองการก่อโรคหอบหืดที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโอวัลบูมิน นอกจากนี้ การศึกษาก่อนหน้านี้ถึงหน้าที่ของเซลล์ทีลิมโฟไซต์ของหนูถีบจักร S1 ยังให้คำตอบไม่ชัดเจน การศึกษารุ่นนี้จึงตั้งวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเกิดโรคหอบหืดที่เหนี่ยวนำด้วยโอวัลบูมินในหนูถีบจักร S1 และพิสูจน์การตอบสนอง (ได้แก่ การสังเคราะห์ IL-4) ของเซลล์ทีลิมโฟไซต์ของหนูถีบจักร S1 ที่ถูกกระตุ้นหรือไม่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อภูมิแพ้ หนูถีบจักรสายพันธุ์บาล์บซิงชนิดปกติหรือชนิด S1 อายุ 6-8 สัปดาห์ได้รับการกระตุ้นด้วยโอวัลบูมินในวันที่ 0 และวันที่ 7 และได้รับการกระตุ้นทางเดิน

หายใจด้วยไอวัลบูมินในวันที่ 14 และ 15 ในวันที่ 16 ทำการวัดภาวะไวเกินของหนูถีบจักรทั้งสองกลุ่มและหลังจากนั้นหนูถีบจักรจะถูกฆ่าเพื่อเก็บตัวอย่างน้ำล้างหลอดลมและถุงลม ตัดปอดและม้ามเพื่อแยกเซลล์ชนิดต่างๆ เซลล์ทีลิมโฟไซต์จะถูกทำให้บริสุทธิ์และศึกษาการตอบสนองต่อสารกระตุ้นต่างๆรวมทั้งสารก่อภูมิแพ้เฉพาะอย่าง เซลล์ทีลิมโฟไซต์จะถูกเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์นำเสนอสารก่อภูมิแพ้ (antigen-presenting cell) เพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ที่เหมาะสมระหว่างเซลล์ทั้งสองนี้รวมทั้งการทดสอบศักยภาพในการแปรสภาพเซลล์ทีลิมโฟไซต์ให้เป็นเซลล์ทีลิมโฟไซต์ชนิดที่ 2 (Th2) ผลการศึกษาพบว่าหนูถีบจักร S1 ไม่เกิดอาการของหอบหืดจากการเหนี่ยวนำด้วยไอวัลบูมิน อาการแสดงต่างๆของหอบหืดจะถูกยับยั้ง เช่น จำนวนอีโอสิโนฟิลและปริมาณไซโตไคน์เซลล์ทีลิมโฟไซต์ชนิดที่ 2 ในน้ำล้างหลอดลมและถุงลม ลักษณะทางพยาธิวิทยาและปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินอีที่จำเพาะต่อไอวัลบูมิน อย่างไรก็ตาม เซลล์ทีลิมโฟไซต์ของหนูถีบจักร S1 ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยไอวัลบูมินจะสังเคราะห์อินเตอร์ลิวคิน-4 เพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยโพลอสเตอรอล/ไอโอโนมัยซินหรือแอนติบอดีต่อซีดี3 (anti-CD3) ที่มีหรือไม่มีแอนติบอดีต่อซีดี28 (anti-CD28) ร่วมด้วย พบว่าการสังเคราะห์อินเตอร์ลิวคิน-4 จากเซลล์ม้ามของหนูถีบจักร S1 ที่ถูกกระตุ้นมาก่อนหน้านี้จะถูกยับยั้งเมื่อกระตุ้นซ้ำด้วยไอวัลบูมิน ในขณะที่การสังเคราะห์อินเตอร์ลิวคินของเซลล์ทีลิมโฟไซต์ของหนูถีบจักรกลุ่มนี้ยังเป็นปกติ การเพาะเลี้ยงเซลล์ทีลิมโฟไซต์จากหนูถีบจักร S1 ร่วมกับเซลล์นำเสนอสารก่อภูมิแพ้จากหนูปกติไม่สามารถทำให้การสังเคราะห์อินเตอร์ลิวคินของเซลล์ทีลิมโฟไซต์ของหนูถีบจักร S1 กลับคืนสู่สภาพปกติได้ การแปรสภาพเซลล์ทีของหนูถีบจักร S1 ไปเป็นเซลล์ทีลิมโฟไซต์ชนิดที่ 2 ยังไม่แตกต่างจากหนูถีบจักรปกติ ผลจากการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ถึงบทบาทของ SHIP-1 ต่อกลไกการเกิดหอบหืดและผลของการพร่อง SHIP-1 ในการยับยั้งอาการแสดงของหอบหืด กลไกที่เป็นไปได้ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงทางด้านจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อลิมฟอยด์ การมีจำนวนเซลล์ที่พร้อมตอบสนองต่อสารก่อภูมิแพ้ที่ได้รับ และที่สำคัญบทบาทของเซลล์ทีลิมโฟไซต์ชนิดควบคุมที่มีจำนวนมากเกินปกติในหนูถีบจักร S1