29 MAR 2002

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

DEVELOPMENT OF A NEW TECHNIQUE FOR NATURAL KILLER (NK) CELL ACTIVITY ASSAY USING NON-RADIOACTIVE MATERIAL

JIRAPORN JAROENPOOL

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2001

TH
J61de
2001
c. 2

ISBN 974-04-1154-1

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY
Copyright by Mahidol University

4136452 SIMI / M : MAJOR : MICROBIOLOGY ; M.Sc. (MICROBIOLOGY)
KEY WORDS : NATURAL KILLER (NK) CELLS / CYTOTOXICITY / GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) / FLOW CYTOMETRY

JIRAPORN JAROENPOOL : DEVELOPMENT OF A NEW TECHNIQUE FOR NATURAL KILLER (NK) CELL ACTIVITY ASSAY USING NON-RADIOACTIVE MATERIAL. THESIS ADVISORS : WANNEE KANTAKAMALAKUL, Ph.D., KOVIT PATTANAPANYASAT, Ph.D., PRASERT AUEWARAKUL, M.D., Dr.Med., CHITRAPORN KARNASUTA, Ph.D. 125 p. ISBN 974-04-1154-1.

Natural killer (NK) cells are a subset of peripheral blood lymphocytes that mediate non-major histocompatibility complex-restricted cytotoxicity against viral infection and tumor cells. In addition, NK cells can lyse target cells in the presence of specific antibody by mechanism of antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC). The ^{51}Cr-release assay has been recommended as the gold standard method for examining NK cytotoxic activity. Although this method is reliable, the problems of health risks and radioactive waste disposal due to ^{51}Cr still exist. This present study proposed a novel non-radioactive method for evaluating NK cytotoxic activity by using green fluorescent protein (GFP) and propidium iodide (PI) as indicators measured by two-color flow cytometry.

At first, stable expressing GFP in K562 and CEM-NK^r cell lines for use as target cells to examine NK cytotoxic activity and ADCC activity, respectively was planned. K562 cell line was transfected with pEGFP-N1 plasmid by lipofectamine transfection and was successfully selected as a stable cell line by limiting dilution technique using G418 antibiotic containing medium. CEM-NK^r cell line was also transfected with pEGFP-N1 plasmid despite using electroporation technique. Unfortunately, establishment of GFP-CEM-NK^r stable cell line has not been fully successful.

Kinetic study of NK cytotoxic activity by flow cytometric assay was determined in 10 subjects (5 males and 5 females) to obtain an optimal incubation time for the new flow cytometric method. The result suggested that a 4 h incubation period has the highest agreement measurement (Intraclass correlation; ICC = 0.948) with standard ^{51}Cr-release assay. However, a 2 h incubation period also showed a high agreement measurement (ICC = 0.901). Thus NK cytotoxic activity assay at both incubation times were determined in additional twenty subjects (10 males and 10 females). Agreement measurement of NK cytotoxic activity between flow cytometric assay at 2 h and 4 h incubation time comparing with that of ^{51}Cr-release assay in 30 subjects (15 males and 15 females) were similar (ICC = 0.917 and 0.936, respectively). In addition, correlation coefficient (r) of NK cytotoxic activity of both incubation times comparing with that of ^{51}Cr-release assay were also similar ($r = 0.87$ at $p < 0.001$ and 0.89 at $p < 0.001$). Determination of NK cell number in all 30 subjects showed that the mean percentage of NK in total lymphocyte of males and females were 20.30% and 15.96%, respectively. NK cytotoxic activity at both 2 h and 4 h incubation times of 8 subjects whose NK cell numbers were less than 10% were similar to that of standard method. However, agreement measurement of NK cytotoxic activity at 2 h incubation time (ICC = 0.973; $r = 0.95$ at $p < 0.001$) was higher than that of 4 h incubation time (ICC = 0.903; $r = 0.91$ at $p < 0.001$). On the other hand, agreement measurement of NK cytotoxic activity at 2 h incubation time (ICC = 0.897; $r = 0.85$ at $p < 0.001$) of 22 subjects with normal NK cell numbers was slightly lower than that of 4 h incubation time (ICC = 0.944; $r = 0.89$ at $p < 0.001$) when compared with the standard method.

The standard ^{51}Cr-release assay for ADCC activity has been successfully set up in this study. PBMCs from 4 subjects were screened for high ADCC activity in order to be used as effectors for the flow cytometry assay in the future. One out of these 4 subjects showed high ADCC activity. Comparison of ADCC activity by flow cytometric assay and standard method will be investigated if the GFP-CEM-NK^r stable cell line is successfully established.

The present study provides a new assay for evaluating NK cytotoxic activity by GFP-K562-NK flow cytometry. This new alternative approach could be applied to patients with viral infection or cancer, in the near future, due to its simple, rapid and safe procedure.

Copyright by Mahidol University

4136452 SIMI/M : สาขาวิชา :จุลชีววิทยา ; วทม. (จุลชีววิทยา)

จิราพร เจริญพูล : การพัฒนาเทคนิค natural killer (NK) cell activity assay ชนิดไม่ใช้สารกัมมันตรังสี (DEVELOPMENT OF A NEW TECHNIQUE FOR NATURAL KILLER (NK) CELL ACTIVITY ASSAY USING NON-RADIOACTIVE MATERIAL). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วรรณี กัณฐกมาลากุล, Ph.D., โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์, Ph.D., ประเสริฐ เอื้อวรากุล, M.D., Dr.Med., จิตรพร กรรณสูต, Ph.D. 125 หน้า. ISBN 974-04-1154-1.

Natural killer (NK) cell เป็นเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ที่มีบทบาทสำคัญในการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสและเซลล์มะเร็ง ด้วยกลไกแบบไม่จำเพาะต่อแอนติเจนและไม่ต้องอาศัย MHC Class I โดยวิธี NK cytotoxicity นอกจากนี้ NK cell ยังสามารถทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสโดยมีแอนติบอดีร่วมด้วย โดยกระบวนการ antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) การประเมินค่า activity ของ NK cell ในปัจจุบันใช้วิธีมาตรฐานที่เรียกว่า Chromium (^{51}Cr)-release assay ซึ่งต้องใช้สารกัมมันตรังสี แม้ว่าวิธีมาตรฐานเป็นวิธีที่เชื่อถือได้แต่มีปัญหาเรื่องความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานและการกำจัดกากรังสี ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้จึงได้พัฒนาเทคนิคการประเมินค่า NK activity โดยใช้สารเรืองแสง Green Fluorescent Protein (GFP) และ Propidium Iodide (PI) ซึ่งวัดได้ด้วยเครื่องโฟลซัยโตมิเตอร์เป็นตัวชี้วัดค่า NK activity แทนการใช้สารกัมมันตรังสี

K562 และ CEM-NK^r cell lines ได้ถูกวางแผนที่จะนำมาสร้างเป็นเซลล์เป้าหมายที่เรืองแสง GFP ได้ เพื่อใช้ทดสอบ NK cytotoxic activity และ ADCC activity ตามลำดับ โดย K562 cell line ถูก transfected ด้วย พลาสมิด pEGFP-N1 ด้วยวิธี lipofectamine transfection และคัดเลือก stable cell line จนสำเร็จด้วยวิธี limiting dilution โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะชื่อ G418 ขณะเดียวกัน CEM-NK^r cell line ถูก transfected ด้วยพลาสมิด pEGFP-N1 เช่นเดียวกันแต่ด้วยวิธี electroporation แต่การคัดเลือก stable cell line ยังไม่ประสบความสำเร็จ

NK cytotoxic activity ได้ถูกศึกษาโดยวิธี Flow cytometry ที่เวลาต่างๆกัน (kinetic study) เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบใหม่นี้โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ในอาสาสมัคร 10 ราย (ชาย 5 ราย หญิง 5 ราย) พบว่า ที่เวลา 4 ชม. แสดงความสัมพันธ์สูงสุดโดยมีค่า Intraclass correlation; ICC = 0.948 อย่างไรก็ดีที่เวลา 2 ชม. ก็พบว่ามีความสัมพันธ์สูงเช่นกัน (ICC = 0.901) ดังนั้นจึงเลือกเวลาที่ 2 ชม. และ 4 ชม. มาทดสอบเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานในอาสาสมัครเพิ่มอีก 20 ราย (ชาย 10 ราย หญิง 10 ราย) ผลการเปรียบเทียบในอาสาสมัครทั้งหมด 30 ราย (ชาย 15 ราย หญิง 15 ราย) พบว่า ICC ของวิธี Flow cytometry ที่ 2 และ 4 ชม. มีค่าใกล้เคียงกันมากขึ้น (ICC = 0.917 และ 0.936 ตามลำดับ) นอกจากนี้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; r) ของวิธี Flow cytometry ที่ 2 และ 4 ชม. กับวิธีมาตรฐานก็มีค่าใกล้เคียงกันคือ 0.87 ($p < 0.001$) และ 0.89 ($p < 0.001$) ตามลำดับ การศึกษาจำนวนของ NK cell ในอาสาสมัครกลุ่มเดียวกัน พบว่าค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ NK cell ในลิมโฟซัยต์ทั้งหมดในผู้ชายและผู้หญิงเป็น 20.30% และ 15.96% ตามลำดับ เมื่อศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลของ NK cytotoxic activity ในอาสาสมัครที่มีจำนวน NK cell ต่ำกว่าปกติ คือ น้อยกว่า 10 % จำนวน 8 ราย พบว่ามีค่า NK cytotoxic activity ที่ 2 และ 4 ชม. สัมพันธ์กับวิธีมาตรฐาน โดยที่ 2 ชม. มีค่าความสัมพันธ์ (ICC = 0.973; r = 0.95, $p < 0.001$) สูงกว่าที่ 4 ชม. (ICC = 0.903; r = 0.91, $p < 0.001$) ส่วนกลุ่มที่มีจำนวน NK cell ปกติ จำนวน 22 ราย เมื่อเปรียบเทียบค่า NK activity ที่ 2 และ 4 ชม. กับวิธีมาตรฐาน พบว่าค่า NK activity ที่ 2 ชม. มีความสัมพันธ์กับวิธีมาตรฐาน (ICC = 0.897; r =0.85, $p < 0.001$) ต่ำกว่าที่ 4 ชม. (ICC = 0.944; r = 0.89, $p < 0.001$)

สำหรับการศึกษา ADCC activity ด้วยวิธีมาตรฐานนั้น ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดีสามารถใช้ในการคัดเลือกตัวอย่างตรวจที่มีเม็ดเลือดขาวที่แสดงค่า ADCC activity สูง เพื่อเตรียมสำหรับใช้เป็น effector cells ในการทดสอบ ADCC activity ด้วยวิธี Flow cytometry ต่อไป โดยพบว่าอาสาสมัครหนึ่งรายจากการตรวจกรองอาสาสมัครทั้งหมด 4 ราย มีค่า ADCC activity สูง อย่างไรก็ดีการเปรียบเทียบ ADCC assay โดยวิธีมาตรฐานและวิธี Flow cytometry จะทำการศึกษาในอนาคตเมื่อการพัฒนา GFP-CEM-NK^r stable cell line ประสบความสำเร็จ

การศึกษาครั้งนี้พบว่าการตรวจหา NK cytotoxic activity โดยวิธี GFP-K562-NK Flow cytometry น่าจะเป็นทางเลือกใหม่สำหรับใช้ตรวจ NK cytotoxic activity ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสหรือผู้ป่วยมะเร็งในอนาคต เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และปลอดภัย

Copyright by Mahidol University