

ผลของไมโครอาร์เอ็นเอ548nในเอ็กโซโซมต่อการแสดงออกของ อินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดาเอ็มอาร์เอ็นเอในผู้ป่วยโรคเอสแอลอี

Effect of Exosomal MicroRNA-548n on Interferon-lambda mRNA Expression in Systemic Lupus Erythematosus Patients

ธนวรรณ อยู่ผาสุข (Thanawan Yoophasook)* ดร.ภูริชญา สมภาร (Dr.Poorichaya Somparn)**

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการแสดงออกของ miRNA ใน exosome จากตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วย SLE เทียบกับผู้ที่ไม่มีสุขภาพดี เพื่อจะนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่นำไปสู่การพัฒนาการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคให้มีความแม่นยำและจำเพาะกับโรค โดยนำ exosome มาวิเคราะห์การแสดงออกของ miRNA ด้วย Nanostring nCounter แล้วตรวจสอบด้วย qRT-PCR ผลการวิเคราะห์ด้วย Nanostring nCounter พบว่า miR-548n มีค่านัยสำคัญทางสถิติต่ำที่สุด โดยมีการแสดงออกในกลุ่มผู้ป่วย SLE น้อยกว่ากลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับผลการศึกษาระดับการถอดรหัสด้วย qRT-PCR มีรายงานการศึกษาที่พบว่า *IFNL1* นั้นเป็น mRNA เป้าหมายของ miR-548n ผู้วิจัยจึงทำการศึกษา *IFNL1* ในระดับยีนและโปรตีน ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ *IFNL1* mRNA พบว่า กลุ่มผู้ที่เป็นโรค SLE ที่อาการสงบและอาการกำเริบมีการแสดงออกของยีน *IFNL1* มากกว่ากลุ่มผู้ที่ไม่เป็นโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.0001$ และ $p<0.0001$ ตามลำดับ) แต่ปริมาณโปรตีนของทั้งสามกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ABSTRACT

In this study, we performed differential expression profile of miRNAs in plasma from SLE patients comparing with healthy subjects for developing novel biomarkers of SLE with diagnostic and predictive/prognostic potential. MiRNA profiling was performed using NanoString nCounter and validated by qRT-PCR. miR-548n was the most significant gene that down-regulated in SLE patients versus healthy controls consistent with qRT-PCR validation. Previous study reported that *IFNL1* mRNA is target mRNA of miRNA-548n. Therefore, we measured *IFNL1* mRNA expression by qRT-PCR and protein quantification by ELISA. We found that *IFNL1* expression was significantly down-regulated in inactive and active SLE patients ($p=0.0001$ and $p<0.0001$, respectively) but in protein level was not significant.

คำสำคัญ: ไมโครอาร์เอ็นเอ-548n อินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา โรคเอสแอลอี

Keywords: microRNA-548n, Interferon lambda, SLE

*นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**อาจารย์ ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

โรคเอสแอลอี หรือ Systemic Lupus Erythematosus (SLE) เป็นโรคภูมิคุ้มกันเนื้อเยื่อตนเองที่มีอาการแสดงได้หลายระบบ เกิดความผิดปกติได้เกือบทุกอวัยวะของร่างกาย และมีความรุนแรงแตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละราย (Manson, Rahman, 2006) สำหรับความรุนแรงของโรคมีรายงานพบว่ามี ความรุนแรงในชาวเอเชียมากกว่าชาวคอเคเซียน (Thumboo, Wee, 2006) ผู้ป่วย SLE มีโอกาสเสียชีวิตมากกว่าคนทั่วไป 5 เท่า โดยสาเหตุการเสียชีวิตมักเกิดจากการอักเสบของอวัยวะสำคัญ การติดเชื้อ และโรคของระบบหัวใจและหลอดเลือด (Moulton et al., 2017) ผู้ป่วยที่โรคมีอาการกำเริบบ่อย ๆ หรือไม่สามารถเข้าสู่ภาวะอาการโรคสงบ จะดำเนินอาการนำไปสู่อวัยวะการสูญเสียหน้าที่อย่างถาวร (Adamichou, Bertias, 2017) การวินิจฉัยโรค SLE จะอาศัยอาการแสดงของโรคตามเกณฑ์ของสมาคม American College of Rheumatology ที่ได้จัดตั้งเกณฑ์ไว้ 11 ข้อ ซึ่งรวมถึงการใช้ผลตรวจทางเลือดและปัสสาวะจากห้องปฏิบัติการ (Gill et al., 2003) แต่เนื่องจากโรค SLE เป็นโรคที่ผู้ป่วยมีอาการแสดงได้หลากหลาย อีกทั้งเทคนิคที่ใช้ในการตรวจ เช่น การตรวจหาแอนตินิวเคลียร์ แอนติบอดี (Anti-nuclear antibody, ANA) และคอมพลีเมนต์ เป็นเทคนิคที่มีความไวแต่ไม่จำเพาะเฉพาะโรค จึงอาจทำให้แพทย์ไม่สามารถวินิจฉัยและพยากรณ์โรคได้อย่างแม่นยำ

ในปัจจุบันมีการศึกษา miRNA เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ในหลายโรค เช่น โรคมะเร็ง (Wang et al., 2017) โรคติดเชื้อ (Huang et al., 2019) และโรคตับอักเสบ (Momen-Heravi et al., 2015) โดย miRNA เป็นอาร์เอ็นเอสายสั้น ขนาดประมาณ 21-25 นิวคลีโอไทด์ มีโครงสร้างเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว สร้างจากบริเวณที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีน (intron) ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน และมีบทบาทในการยับยั้งการสร้างโปรตีน ในขั้นตอนหลังการสังเคราะห์ messenger RNA (mRNA) (post-transcriptional modification) (Carthew, Sontheimer, 2009) miRNA สามารถบรรจุอยู่ใน exosome ซึ่งเป็น extracellular vesicle ขนาด 30-150 nm และถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ไปยังเซลล์เป้าหมายได้อย่างจำเพาะ (Tkach, Théry, 2016) นอกจากนั้นยังช่วยป้องกันไม่ให้ miRNA ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ Rnase ได้ ดังนั้น miRNA จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็น biomarker miRNA มีหน้าที่ในการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค (Kim et al., 2015) รายงานการศึกษาหายีนเสี่ยงต่อการเกิดโรค SLE (susceptibility genes) พบว่ามี 72 ยีน โดยจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม T cell co-stimulation การอยู่รอดของเซลล์ กระบวนการ apoptosis และ tolerance control ซึ่งยีนเหล่านี้เป็นเป้าหมายของ miRNA มากกว่า 140 ชนิด จากการศึกษาข้างต้นจึงแสดงให้เห็นว่า miRNA นั้นมีบทบาทและมีส่วนในการทำให้เกิดโรค SLE (Kytтары, 2010) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาการแสดงออกของ exosomal miRNA ในพลาสมาของผู้ป่วยโรค SLE ซึ่งอาจจะนำไปสู่การวินิจฉัยและหากลไกที่เกี่ยวข้องกับโรค SLE

ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาปริมาณการแสดงออกของ miRNA ใน exosome จากตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วย SLE เทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี และศึกษาบทบาทการทำงานของยีนเป้าหมายของ miRNAs ที่สัมพันธ์กับโรค SLE เพื่อจะนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่และนำไปพัฒนาการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคให้มีความแม่นยำและจำเพาะกับโรค

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาการแสดงออกของ miRNA ใน exosome ของผู้ป่วยโรค SLE และผู้ที่มีสุขภาพดี

วิธีการวิจัย

1. เก็บเลือดจากกลุ่มตัวอย่าง แยกพลาสมาและ peripheral blood mononuclear cell (PBMC)

ทำการเจาะเลือดจากกลุ่มตัวอย่างโดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ใส่หลอดเก็บเลือดมีสารต้านการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,500g เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บส่วนพลาสมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดเศษเซลล์ จากนั้นดูดเก็บส่วน supernatant เก็บที่ -80 °C จนกว่าจะนำไปตกตะกอน exosome ในขั้นตอนถัดไป

ส่วนที่ 2 ใส่หลอดเก็บเลือดที่มีสารต้านการแข็งตัวของเลือดชนิด Heparin นำไปแยก PBMC ด้วยวิธี density gradient centrifugation โดยใช้ Ficoll-Paque™ PLUS เก็บ PBMC ที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะนำไปสกัด RNA ในขั้นตอนถัดไป

โครงการวิจัยได้รับการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย IRB No.776/63

2. ตกตะกอน exosome จากพลาสมาด้วย Exosome Precipitation Solution

ใช้ ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution เพื่อแยก exosome จากพลาสมา โดยนำตัวอย่างพลาสมาปริมาตร 250 ul มากำจัด fibrin โดยเติม 611 U/ml Thrombin 2 ul บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดเก็บส่วน supernatant เติม ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution 75 ul และเติม 4 mg/ml RNase A 0.625 ul บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน จากนั้นเติม 40,000 U/ml Rnase inhibitor ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 150 U/ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500g เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วน supernatant ที่ทิ้งแล้วละลายส่วน pellet ด้วย PBS 250 ul

3. วิเคราะห์ปริมาณและขนาดของ exosome ด้วย nanoparticle tracking analysis

เจือจาง exosome ใน PBS นำไปวิเคราะห์ขนาดและปริมาณ exosome ด้วยเครื่อง Nanosight 300 โดยตั้งค่า camera level 10 และ detection threshold 5

4. วิเคราะห์หา exosomal marker ด้วยวิธี western blot

ศึกษาการแสดงออกของ CD9 และ CD63 ซึ่งเป็น Integral membrane protein ที่อยู่บนเยื่อหุ้ม exosome โดยนำ exosome 20 ul ผสมกับ 10% Sodium dodecyl sulphate ใน 100 mM Triethylammonium bicarbonate (10% SDS in 100 mM TEAB) 80 ul นำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแบ่งตัวอย่าง 3 ul ทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ย้ายโปรตีนจาก acrylamide gel สู่ nitrocellulose membrane แล้ว block ด้วย blocking buffer (Tris-buffered saline, TBS) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS ที่ผสม 0.1% Tween 20 (TBST) เป็นเวลา 15 นาที 3 รอบ แล้วนำไปบ่มกับ primary antibody ที่ผสม blocking buffer ในอัตราส่วน 1:1000 บ่มไว้ข้ามคืน ล้างด้วย TBST เป็นเวลา 15 นาที 3 รอบ บ่มกับ secondary antibody ที่ผสม blocking buffer ในอัตราส่วน 1:10,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBST เป็นเวลา 15 นาที 3 รอบ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Odyssey® CLx Imaging System

5. สกัด miRNA ใน exosome

สกัด miRNA ใน exosome โดยใช้ชุด QIAGEN miRNeasy mini Kit miRNA ที่สกัดได้เก็บที่ -80 °C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของ miRNA ในขั้นตอนถัดไป

6. วิเคราะห์การแสดงออกของ miRNA ใน exosome ด้วย Nanostring nCounter

วิเคราะห์การแสดงออกของ miRNA ใน exosome โดยใช้ Human v3 miRNA panel

7. วิเคราะห์ mRNA ที่เป็นเป้าหมายของ miRNA ด้วยโปรแกรม Target Scan Human

วิเคราะห์ mRNA ที่เป็นเป้าหมายของ miRNA ด้วยโปรแกรม Target Scan Human 7.2

8. ตรวจสอบผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ miRNA ใน exosome ด้วย Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

สร้าง DNA (cDNA) ด้วยปฏิกิริยา reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ชุด ใช้ชุด TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit แล้วนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเครื่อง ABI QuantStudio 5 Real-Time PCR System

9. สกัด RNA จาก peripheral blood mononuclear cell (PBMC)

สกัด RNA จาก PBMC ด้วยชุด QIAGEN RNeasy Mini Kit RNA ที่สกัดได้เก็บที่ -80 °C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA ในขั้นตอนถัดไป

10. วิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA เป้าหมายของ miRNA ด้วย qRT-PCR

สร้าง complementary DNA (cDNA) โดยปฏิกิริยา reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ชุด Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit จากนั้นนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเครื่อง ABI QuantStudio 5 Real-Time PCR System

11. วัดปริมาณโปรตีนในพลาสมาด้วย enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ศึกษาระดับโปรตีนในพลาสมาของกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ชุด R&D system Human IL-29/IFN-lambda 1 DuoSet® ELISA

12. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์

ข้อมูลผลการทดลองของทุกกลุ่มได้จากการทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย(mean ± SEM) ในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่าง 2 กลุ่มทดลองจะใช้ student's t-test และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยที่มีมากกว่า 2 กลุ่มทดลอง จะใช้ Analysis of variance (ANOVA) (p< 0.05) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ GraphPad Prism 9.0

ผลการวิจัย

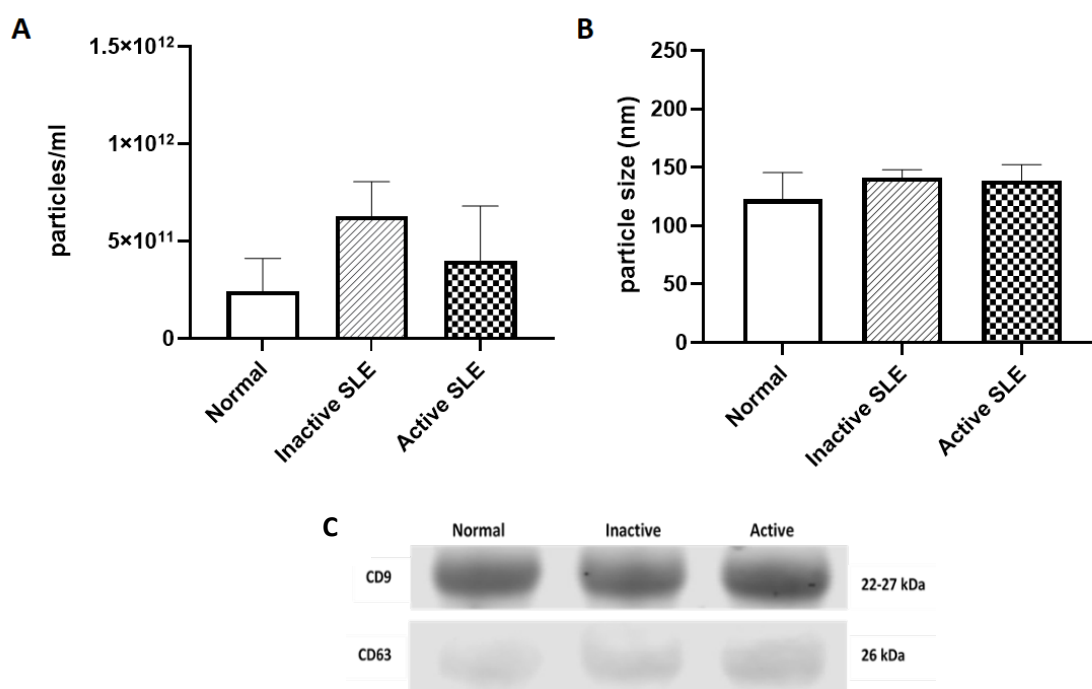
ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่าง (SLE : Systemic Lupus Erythematosus, Normal : ผู้ที่มีสุขภาพดี, Inactive SLE : ผู้ป่วย SLE ที่อาการสงบ , Active SLE : ผู้ป่วย SLE ที่อาการกำเริบ, SLEDAI : Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, RBC : red blood cell, WBC : white blood cell, ns : ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05)

clinical data	Normal	Inactive SLE	Active SLE	P-value		
				Normal vs Inactive SLE	Normal vs Active SLE	Inactive SLE vs Active SLE
SLEDAI (range)	0.00±0.00	0.00±0.00	10±4.90	ns	0.03	0.03
urine protein	0.00±0.00	0.22±0.15	1.17±0.75	ns	ns	ns
RBC in Urine	0.11±0.11	0.60±0.40	1.60±1.03	ns	ns	ns
WBC in Urine	0.00±0.00	0.50±0.50	1.50±1.19	ns	ns	ns

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ที่มีสุขภาพดีจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ป่วย SLE ที่เข้ารับการรักษาน ณ โรงพยาบาลรามาธิบดี โดยกลุ่มผู้ป่วย SLE แบ่งเป็น กลุ่มที่อาการสงบ และกลุ่มที่อาการกำเริบ ข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างแสดงในตารางที่ 1 จากตารางจะเห็นว่าค่าพารามิเตอร์ของคนไข้เทียบกับคนปกติไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นคะแนน SLEDAI ซึ่งเป็นค่าที่ประเมินจากอาการแสดงและความผิดปกติของอวัยวะต่าง ๆ

การวิเคราะห์คุณสมบัติของ exosome ในด้านปริมาณและคุณภาพ

นำตัวอย่างเลือดคนไข้จากตารางที่ 1 กลุ่มละ 4 คน นำไปแยกพลาสมาและ PBMC ทำการตกตะกอน exosome จากพลาสมา แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย nanoparticle tracking analysis (NTA) และ western blot ผลการวิเคราะห์ปริมาณและขนาดของ particle ด้วย NTA พบว่า จำนวน particle ของทั้งสามกลุ่ม คือ กลุ่มปกติ กลุ่มผู้ที่เป็นโรค SLE ที่อาการสงบ และกลุ่มผู้ที่เป็นโรค SLE ที่อาการกำเริบ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 1A) ขนาดของ particle ของทั้งสามกลุ่ม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่า particle มีขนาดอยู่ในช่วง 50-150 nm (ภาพที่ 1B) ผลการวิเคราะห์หา exosomal marker ด้วยวิธี western blot พบว่า มีการแสดงออกของ CD9 และ CD63 นั่นคือ particle ที่ได้จากการตกตะกอนด้วย ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution นั้น เป็น exosome (ภาพที่ 1C)

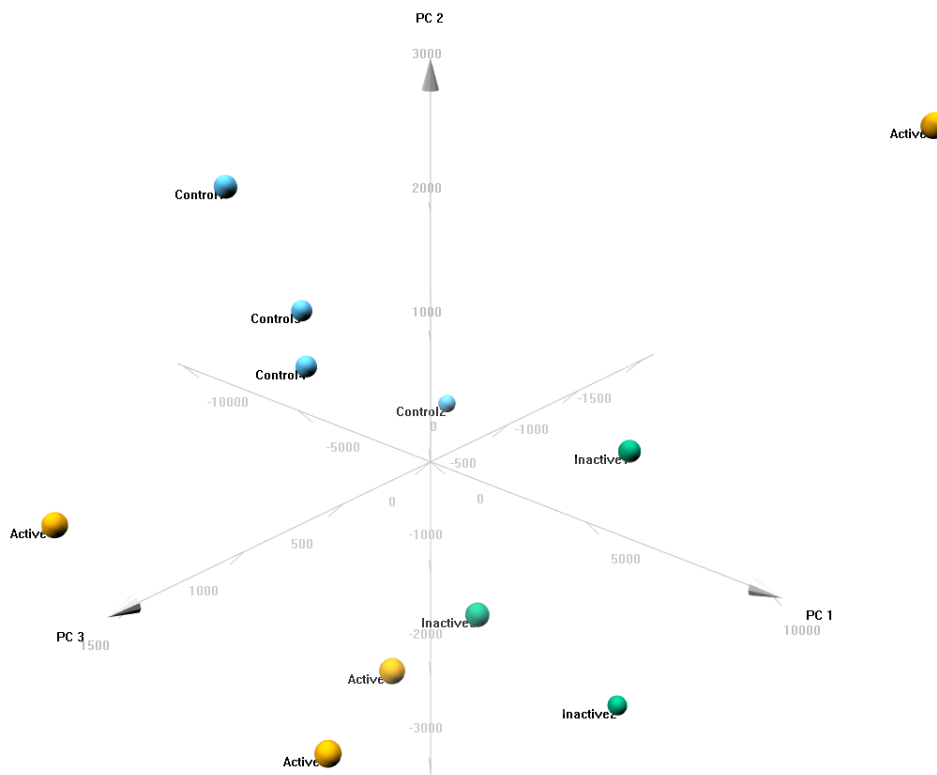


ภาพที่ 1 แสดงผลวิเคราะห์คุณสมบัติของ exosome A. ผลการวิเคราะห์จำนวน particle ด้วย NTA B. ผลการวิเคราะห์ขนาดของ particle ด้วย NTA C. การวิเคราะห์ exosomal marker ด้วยวิธี western blot

การวิเคราะห์การแสดงออก miRNA ใน exosome ด้วยวิธี nanostring nCounter

ผลวิเคราะห์การแสดงออกของ miRNA ใน exosome โดยใช้ Human v3 miRNA panel ซึ่งสามารถดูการแสดงผลการแสดงออกของ miRNA กว่า 800 ชนิด เมื่อนำค่าที่ได้ทั้งหมดไปจัดกลุ่มด้วยวิธีการของ principle component analysis แสดงในภาพที่ 2 พบว่า ค่าการแสดงผลการแสดงออกของ miRNA ทั้งหมดใน exosome สามารถจัดแยกกลุ่มตัวอย่างได้ตามลักษณะ

อาการของโรค โดยจะเห็นได้ว่า การแสดงออกของ miRNA ในกลุ่มที่เป็นโรค SLE ทั้งกลุ่มที่อาการสงบและอาการกำเริบนั้นแยกจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน



ภาพที่ 2 ผลการวิเคราะห์ด้วย principle component analysis (Control : ผู้ที่มีสุขภาพดี, Inactive : ผู้ป่วย SLE ที่อาการสงบ, Active : ผู้ป่วย SLE ที่อาการกำเริบ)

เมื่อนำ miRNA ทั้งหมดมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกในกลุ่มผู้ป่วย SLE เทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี พบว่า มี miRNA 108 ชนิดที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในกลุ่มผู้ป่วยจะมี miRNA 106 ชนิดที่การแสดงออกน้อยกว่ากลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี และมี miRNA 2 ชนิดที่การแสดงออกมากกว่ากลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี

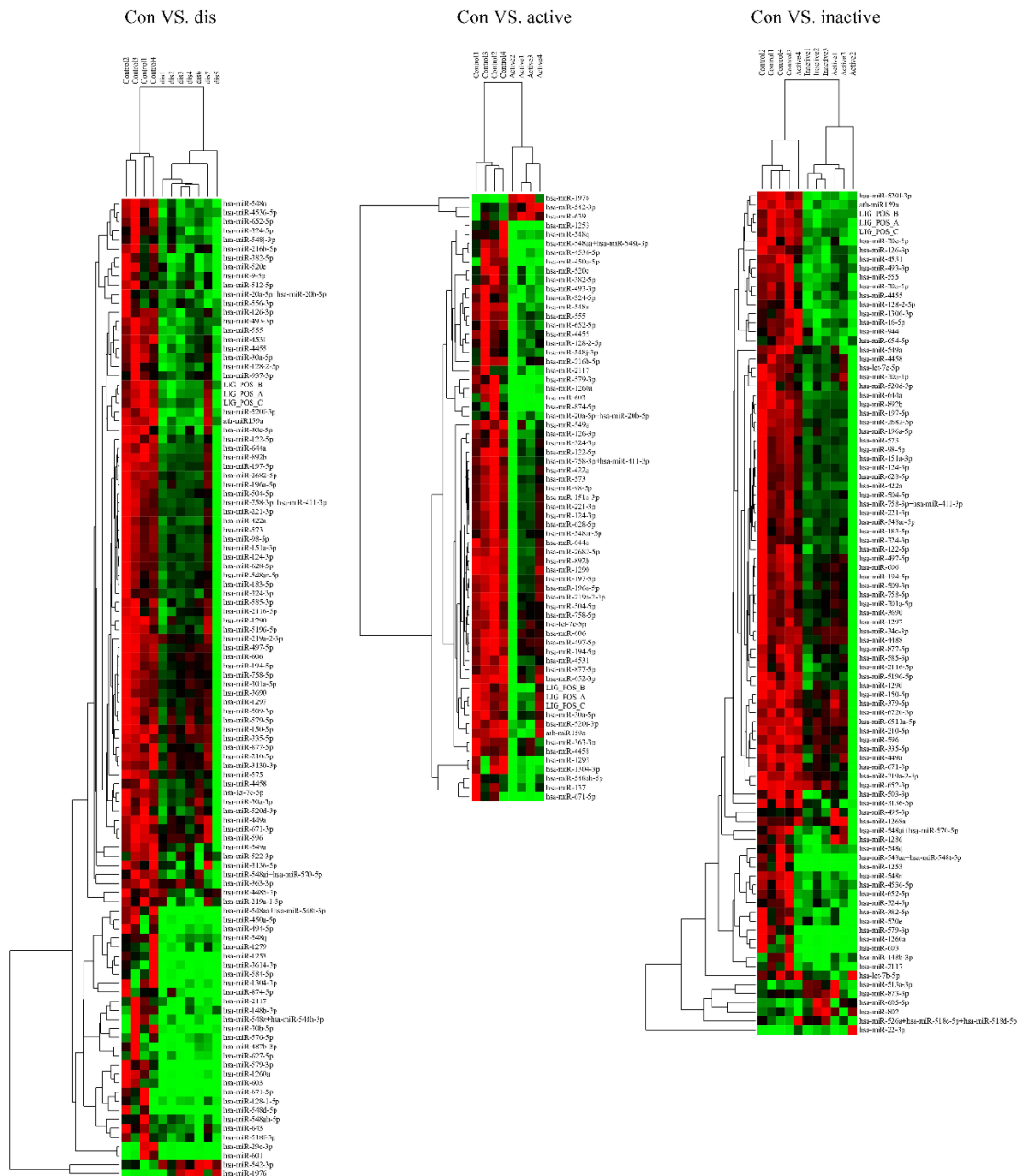
เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกในกลุ่มผู้ป่วยโรค SLE ที่อาการกำเริบเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี พบว่า มี miRNA 67 ชนิดที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในกลุ่มผู้ป่วยที่อาการกำเริบจะมี miRNA 64 ชนิดที่แสดงออกน้อยกว่ากลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี และมี miRNA 3 ชนิดที่แสดงออกมากกว่ากลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี

ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกในกลุ่มผู้ป่วยโรค SLE ที่อาการสงบเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี พบว่า มี miRNA 93 ชนิดที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในกลุ่มผู้ป่วยที่อาการสงบ มี miRNA 87 ชนิด ที่แสดงออกน้อยกว่ากลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี และมี miRNA 6 ชนิดที่การแสดงออกมากกว่ากลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพที่ 3)

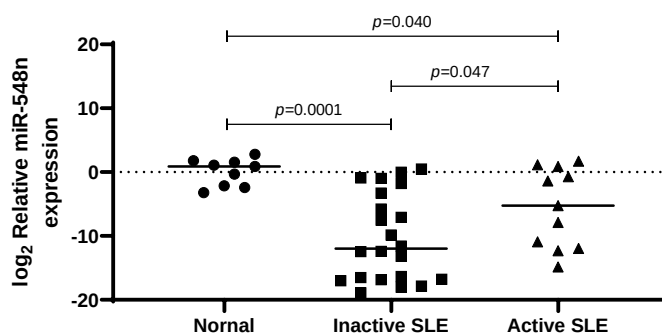
ตรวจความถูกต้องของ exosomal miRNA-548n ในพลาสมาของผู้ป่วยและผู้ที่มีสุขภาพดี

จากผลการวิเคราะห์ด้วย nanostring nCounter ซึ่งพบว่า miR-548n เป็น miRNA ที่มีค่านัยสำคัญน้อยที่สุด และยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน ดังนั้นจึงเลือก miRNA-548n มาทดสอบความถูกต้องในกลุ่มประชากรที่เพิ่มขึ้น ด้วยวิธี

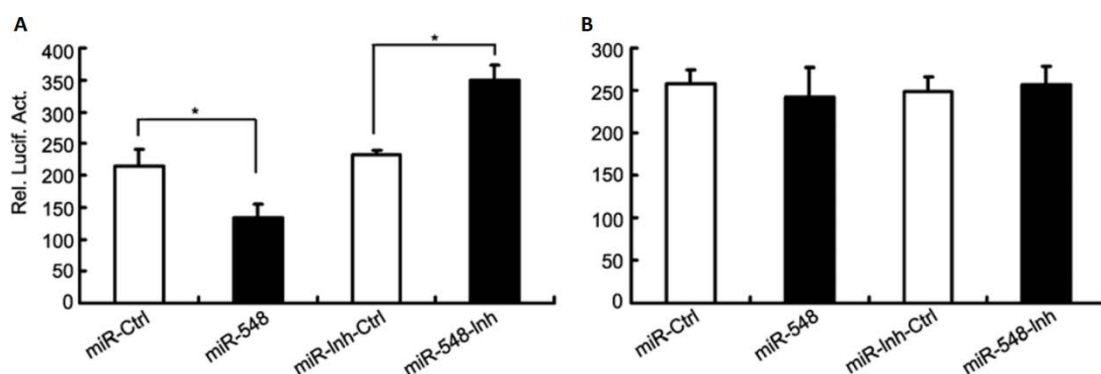
qRT-PCR โดยเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่าง (Normal=10, Inactive SLE=22, Active SLE=11) พบว่า กลุ่มผู้ที่เป็นโรค SLE ที่อาการสงบและอาการกำเริบมีการแสดงออกของยีน miR-548n น้อยกว่ากลุ่มผู้ที่ไม่เป็นโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.0001$ และ $p=0.040$ ตามลำดับ) โดยเมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มผู้ที่เป็นโรค SLE พบว่า กลุ่มที่อาการสงบมีการแสดงออกของยีน miR-548n น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.047$) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ miRNA ด้วย nanosting nCounter (Control : ผู้ที่มีสุขภาพดี, dis : ผู้ที่เป็นโรค SLE, Inactive : ผู้ป่วย SLE ที่อาการสงบ, Active : ผู้ป่วย SLE ที่อาการกำเริบ)



ภาพที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ miR-548n ใน exosome ด้วย qRT-PCR

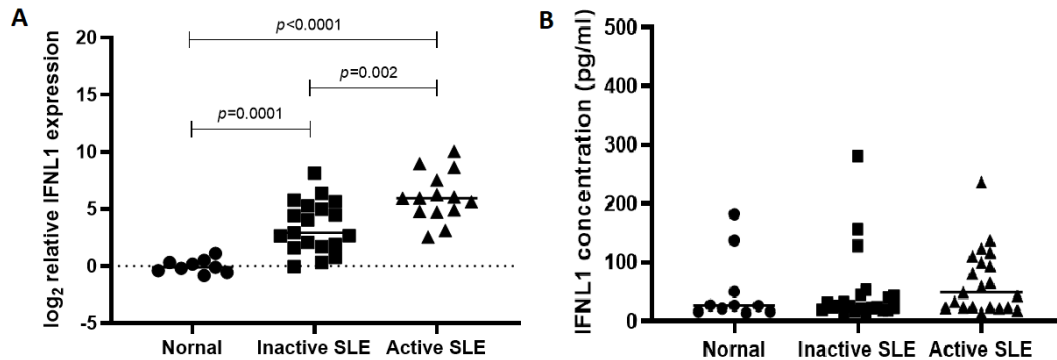


ภาพที่ 5 ผลการศึกษาของ Li และคณะ ที่ศึกษาความจำเพาะของ miR-548 ต่อ *IFNL1* ด้วยวิธี Luciferase reporter assay แสดงผลการจับของ miR-control (miR-Ctrl), miR-548, miR-inhibitor control (miR-Inh-Ctrl) และ miR-548-inhibitor (miR-548 Inh) **A.** ผลการ transfect IFN-λ1 3'UTR luciferase reporter plasmid ร่วมกับ miR-Ctrl, miR548, miR-Inh-Ctrl และ miR-548 Inh **B.** ผลการ transfect mutant IFN-λ1 3'UTR luciferase reporter plasmid ร่วมกับ miR-Ctrl, miR548, miR-Inh-Ctrl และ miR-548 Inh

ผลการวิเคราะห์ mRNA เป้าหมาย

ผลการวิเคราะห์หา mRNA เป้าหมายของ miR-548n ด้วยโปรแกรม Target Scan Human Human 7.2 พบว่ามี mRNA ที่เป็นเป้าหมายของ miR-548 หลายชนิด รวมถึง Interferon lambda1 (*IFNL1*) ซึ่งจากรายงานการศึกษาของ Li และคณะ (ภาพที่ 5) ที่ศึกษาความจำเพาะของ miR-548 ต่อ *IFNL1* ด้วยวิธี Luciferase reporter assay โดย transfect พลาสมิด 2 แบบคือ IFN-λ1 3'UTR luciferase reporter plasmid และ mutant IFN-λ1 3'UTR luciferase reporter plasmid ร่วมกับ miR-control(miR-Ctrl), miR-548, miR-inhibitor control(miR-Inh-Ctrl) และ miR-548-inhibitor (miR-548 Inh) พบว่า miR-548 สามารถจับกับลำดับบน IFN-λ1 3'UTR plasmid ได้ ทำให้ luciferase gene ไม่ถูกถอดรหัส ส่งผลให้ luciferase activity ลดลง และเมื่อใส่ miR-548-inhibitor จึงทำให้ luciferase activity สูงขึ้น แต่ miR-548 ไม่จับกับ mutant IFN-λ1 3'UTR plasmid นั่นคือ miR-548 สามารถจับกับ 3' UTR ของ *IFNL1* ได้อย่างจำเพาะ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาผลของ miRNA-548n ต่อยีน *IFNL1* และโปรตีน IFN-λ1 ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อไวรัส และกระตุ้นให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของอวัยวะในผู้ป่วย SLE ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ *IFNL1* mRNA พบว่า กลุ่มผู้ที่เป็นโรค SLE ที่อาการสงบและอาการกำเริบมีการแสดงออกของยีน *IFNL1* มากกว่ากลุ่มผู้ที่ไม่เป็นโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.0001$ และ $p<0.0001$ ตามลำดับ)

โดยกลุ่มผู้ป่วยโรค SLE ที่อาการกำเริบมีการแสดงออกของยีน *IFNL1* มากกว่ากลุ่มที่อาการสงบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.002$) (ภาพที่ 6A) ผลการวัดปริมาณโปรตีน IFN- $\lambda 1$ ด้วยวิธี ELISA พบว่าปริมาณโปรตีนของทั้งสามกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 6B)



ภาพที่ 6 A. แสดงผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ *IFNL1* ด้วย qRT-PCR B. แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน IFN- $\lambda 1$ ด้วย ELISA

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

โรค SLE เป็นโรคภูมิคุ้มกันตนเองที่เมื่อแสดงได้หลายระบบ มีการดำเนินโรคที่หลากหลาย และมีความรุนแรงแตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละราย อีกทั้งเทคนิคทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ประกอบการวินิจฉัยยังไม่มีความจำเพาะกับโรค SLE จึงทำให้แพทย์ไม่สามารถวินิจฉัยโรคได้อย่างแม่นยำ นอกจากนี้ผู้ที่ป่วยเป็นโรค SLE ที่อาการกำเริบควรได้รับการรักษาเพื่อให้อาการเข้าสู่ภาวะโรคสงบโดยเร็ว เพราะผู้ป่วยที่โรคมีอาการกำเริบบ่อย ๆ หรือไม่สามารถเข้าสู่ภาวะโรคสงบจะดำเนินไปสู่ภาวะสูญเสียหน้าที่อย่างถาวรหรือถึงขั้นเสียชีวิต การวิจัยในครั้งนี้จึงทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ miRNA ใน exosome เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ของโรค โดยองค์ความรู้จากการศึกษาจะนำไปสู่ความเข้าใจกลไกการเกิดโรคที่เพิ่มมากขึ้น สร้างเกณฑ์การจำแนกโรคที่ทำให้สามารถค้นพบผู้ป่วยได้เร็วขึ้น มีวิธีการประเมินโรคที่แม่นยำขึ้น เพื่อให้อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยสูงขึ้น รวมทั้งมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น

ผู้วิจัยทำการเก็บเลือดจากกลุ่มตัวอย่าง นำไปแยกพลาสมาและPBMC โดยส่วนพลาสมาจะนำไปแยก exosome และวัดปริมาณโปรตีนในพลาสมา ส่วน PBMC จะนำไปสกัด RNA เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA ผลการวิเคราะห์ด้วย NTA พบว่า particle มีขนาดอยู่ในช่วง 50-150 nm และเมื่อวิเคราะห์ด้วย western blot ก็พบว่ามีการแสดงออกของ exosomal marker นั่นคือ การตกตะกอนด้วย ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution สามารถแยก exosome ในพลาสมาได้ ในเบื้องต้น ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ miRNA ด้วย Nanostring nCounter โดยใช้ Human v3 miRNA panel (n Normal=4, Inactive SLE=4, Active SLE=4) เพื่อศึกษาชนิดและระดับการแสดงออกของ miRNA ใน exosome โดยเปรียบเทียบการแสดงออกในกลุ่มผู้ป่วย SLE เทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี พบว่า มี miRNA 108 ชนิดที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่ง miR-548n เป็น miRNA ที่มีค่าสำคัญต่ำที่สุด โดย miR-548n มีการแสดงออกในกลุ่มผู้ป่วย SLE น้อยกว่ากลุ่มผู้ที่ไม่เป็นโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกลุ่มที่อาการสงบมีการแสดงออกของ miR-548n น้อยกว่ากลุ่มที่อาการกำเริบแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ miR-548n ด้วยวิธี qRT-PCR โดยเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างให้มากขึ้น (Normal=10, Inactive SLE=22, Active SLE=11) พบว่า กลุ่มผู้ที่เป็นโรค SLE ที่อาการสงบและอาการกำเริบมีการแสดงออกของยีน miR-548n

น้อยกว่ากลุ่มผู้ที่ไม่เป็นโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย Nanostring nCounter แต่เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มผู้ที่เป็นโรค SLE พบว่า กลุ่มที่อาการสงบมีการแสดงออกของยีน miR-548n น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ต่างจากผลการวิเคราะห์ด้วย Nanostring nCounter ซึ่งอาจเกิดจาก primer ที่ใช้ในเทคนิค qRT-PCR นั้นมีความจำเพาะ และมีการเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษาจึงเห็นความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ได้มากกว่า จากนั้นคณะผู้วิจัยวิเคราะห์หา mRNA เป้าหมายด้วยโปรแกรม TargetScan พบว่า interferon lambda1 (*IFNL1*) mRNA เป็นเป้าหมายของ miR548n โดยมีตำแหน่งจับที่นิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 115 ถึง 122 บน *IFNL1* ซึ่งการศึกษาของ Li และคณะ ได้ทำการศึกษาความจำเพาะของ miR-548 กับ 3' UTR ของ *IFNL1* ด้วยวิธี luciferase reporter assay พบว่า miR-548 สามารถจับกับ 3' UTR ของ *IFNL1* ได้อย่างจำเพาะ นั่นคือ miR-548n นั้นควบคุมการแสดงออกของ *IFNL1* (Li et al., 2013) โดยกลไกการควบคุมของ miRNA คือไปจับกับ 3' UTR ของ mRNA แล้วทำให้ mRNA ไม่ถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีนหรือถูกย่อยสลายไป ดังนั้นในกลุ่มที่มี miRNA-548n น้อยจึงน่าจะมียกระดับการแสดงออกของ *IFNL1* mRNA สูง ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการแสดงออกของ *IFNL1* mRNA ใน PBMC พบว่า กลุ่มผู้เป็นโรค SLE ที่อาการกำเริบมีการแสดงออกของ *IFNL1* mRNA มากที่สุด รองลงมาคือ กลุ่มผู้เป็นโรค SLE ที่อาการสงบ และกลุ่มผู้ที่ไม่เป็นโรค ตามลำดับ ไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์การแสดงออก miR-548n ที่กลุ่มผู้เป็นโรค SLE ที่อาการสงบมีการแสดงออกของ miR-548n น้อยกว่ากลุ่มที่อาการกำเริบ จึงควรจะมีการแสดงออกของ *IFNL1* mRNA มากกว่ากลุ่มที่อาการกำเริบ ซึ่งอาจเป็นเพราะมีปัจจัยอื่นที่ควบคุมการแสดงออกของ *IFNL1* mRNA ร่วมด้วยนอกเหนือจาก miR-548n เช่น transcription factor, chromatin modification เป็นต้น คณะผู้วิจัยทำการศึกษาในระดับโปรตีน โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน IFN-λ1 (IL-29) ในพลาสมาของกลุ่มตัวอย่าง พบว่ากลุ่มผู้เป็นโรค SLE ที่อาการกำเริบมีระดับโปรตีน IFN-λ1 สูงที่สุด รองลงมาคือ กลุ่มผู้เป็นโรค SLE ที่อาการสงบ และกลุ่มผู้ที่ไม่เป็นโรค ตามลำดับ แต่ทั้งสามกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นคือทั้งสามกลุ่มมีระดับ *IFNL1* mRNA ต่างกัน แต่ระดับโปรตีน IFN-λ1 ไม่แตกต่างกัน อาจเกิดจาก post-transcriptional regulation เช่น polyadenylation และ mRNA stability ซึ่งมีส่วนในการควบคุมในกระบวนการการแปลรหัส *IFNL1* mRNA ไปเป็นโปรตีน

จากการศึกษานี้ ทำให้ทราบว่า ผู้ที่เป็นโรค SLE นั้น มีการแสดงออกของ miR-548n แตกต่างจากผู้ที่ไม่เป็นโรค โดย miR-548n สามารถจับกับ *IFNL1* mRNA ได้ แต่ผลการวิเคราะห์ระดับโปรตีนไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ที่เป็นโรคและไม่ใช่โรค จึงอาจมีการศึกษา miRNA ชนิดอื่นเพิ่มเติม หรือศึกษา mRNA อื่น ๆ ที่เป็นเป้าหมายของ miR-548n และศึกษาในระดับโปรตีน ซึ่งจะช่วยให้ทราบว่าโปรตีนชนิดใดที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค SLE ทำให้มีความรู้ความเข้าใจกลไกการเกิดโรค SLE เพื่อพัฒนาการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคและพัฒนาวิธีการรักษาให้มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณศูนย์ชีววิทยาเชิงระบบ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านสถานที่และเครื่องมือในงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Adamichou C, Bertias G. Flares in systemic lupus erythematosus: diagnosis, risk factors and preventive strategies. *Mediterranean Journal of Rheumatology*. 2017; 28: 4-12.

- Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009; 136(4): 642-55.
- Gill JM, Quisel AM, Rocca PV, Walters DT. Diagnosis of systemic lupus erythematosus. *American family physician*. 2003; 68(11): b2179-86.
- Huang F, Bai J, Zhang J, Yang D, Fan H, Huang L, et al. Identification of potential diagnostic biomarkers for pneumonia caused by adenovirus infection in children by screening serum exosomal microRNAs. *Mol Med Rep*. 2019; 19(5): 4306-14.
- Kim H-A, Jung J-Y, Suh C-H. Biomarkers for systemic lupus erythematosus: an update. *International Journal of Clinical Rheumatology*. 2015; 10(3): 195-204.
- Kyttaris VC. Systemic lupus erythematosus: from genes to organ damage. *Methods Mol Biol*. 2010; 662: 265-83.
- Li Y, Xie J, Xu X, Wang J, Ao F, Wan Y, et al. MicroRNA-548 down-regulates host antiviral response via direct targeting of IFN- λ 1. *Protein Cell*. 2013; 4(2): 130-41.
- Manson JJ, Rahman A. Systemic lupus erythematosus. *Orphanet J Rare Dis*. 2006; 1: 6.
- Momen-Heravi F, Saha B, Kodys K, Catalano D, Satishchandran A, Szabo G. Increased number of circulating exosomes and their microRNA cargos are potential novel biomarkers in alcoholic hepatitis. *J Transl Med*. 2015; 13: 261.
- Moulton VR, Suarez-Fueyo A, Meidan E, Li H, Mizui M, Tsokos GC. Pathogenesis of Human Systemic Lupus Erythematosus: A Cellular Perspective. *Trends Mol Med*. 2017; 23(7): 615-35.
- Thumboo J, Wee HL. Systemic lupus erythematosus in Asia: is it more common and more severe? *APLAR Journal of Rheumatology*. 2006; 9(4): 320-6.
- Tkach M, Théry C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*. 2016; 164(6): 1226-32.
- Wang J, Yan F, Zhao Q, Zhan F, Wang R, Wang L, et al. Circulating exosomal miR-125a-3p as a novel biomarker for early-stage colon cancer. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 4150.