

ALTERATION OF HUMAN MICRORNA IN CELL INFECTED WITH HEPATITIS B VIRUS AND
TREATED WITH PEGYLATED INTERFERON ALPHA 2A

Miss Thananya Jinato



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

การเปลี่ยนแปลงไมโครอาร์เอ็นเอของมนุษย์ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและได้รับยาเพ็คกิเลต
อินเตอร์เฟอรอน แอลฟา ทู เอ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การเปลี่ยนแปลงไมโครอาร์เอ็นเอของมนุษย์ในเซลล์ที่ติด
เชื้อไวรัสตับอักเสบบีและได้รับยาเพ็คคิเลตอินเตอร์
เฟอรอน แอลฟา ทู เอ

โดย

นางสาวธัญญา จินาโต

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัญญา พยุงกร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ เผด็จ สิริยะเสถียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัญญา พยุงกร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐนันท์ ปัญจวรรณ ต.เทียนประเสริฐ)

ธนัญญา จินาโต : การเปลี่ยนแปลงไมโครอาร์เอ็นเอของมนุษย์ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและได้รับยาเพคิเลตอินเตอร์เฟอรอน แอลฟา ทู เอ (ALTERATION OF HUMAN MICRORNA IN CELL INFECTED WITH HEPATITIS B VIRUS AND TREATED WITH PEGYLATED INTERFERON ALPHA 2A) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.สัญญาชัย พยุภกร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. นพ.พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์, 75 หน้า.

อินเตอร์เฟอรอน (Interferons: IFNs) ถูกสร้างจากเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส เป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันประเภท innate immune system ในปัจจุบันพบว่า IFNs นั้นเป็นยามาตรฐานที่ถูกนำมาใช้ทางการแพทย์เพื่อรักษาโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดย IFNs จัดเป็นไซโตไคน์ที่มีการกระตุ้นการทำงานผ่านทางตัวรับที่มีความจำเพาะต่อตัวรับ IFNs (IFN-receptors: IFN-R) ซึ่งจะไปกระตุ้นการส่งสัญญาณของ IFNs pathways และกระตุ้นยีนที่ตอบสนองต่อ IFNs (IFN-inducible genes) และโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้อง รวมถึงไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNAs: miRNAs) ในงานวิจัยนี้จึงต้องการที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ miRNAs ในเซลล์มะเร็งตับที่ได้รับพลาสมิดไวรัสตับอักเสบบีและได้รับยาเพคิเลตอินเตอร์เฟอรอน แอลฟา ทู เอ ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาในเซลล์ Huh7 ที่ได้รับและไม่ได้รับพลาสมิดไวรัสตับอักเสบบีเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยยาเพคิเลตอินเตอร์ เฟอรอน แอลฟา ทู เอ หรือในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มียาเพคิเลตอินเตอร์ เฟอรอน แอลฟา ทู เอ หลังจาก 24 ชั่วโมงจะนำมาสกัดอาร์เอ็นเอสายสั้นๆและเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปวัดการแสดงออกของ miRNA ด้วยเทคนิค next-generation sequencing (NGS): MiSeq platform (Illumina) โดยระดับการแสดงออกของ miRNAs ที่สนใจศึกษาจะถูกวัดด้วยเทคนิค real-time PCR และวิเคราะห์ก่อนจะนำไปทำนายยีนเป้าหมายของ miRNAs ที่สนใจด้วยโปรแกรม miRTarbase และวิเคราะห์ระดับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ miRNAs โดยใช้วิธี delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ทำนาย จากผลการทดลองพบว่าในเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดไวรัสตับอักเสบบีและได้รับยาเพคิเลตอินเตอร์เฟอรอน แอลฟา ทู เอ มีระดับการแสดงออกของ miRNAs ที่เปลี่ยนแปลงไปทั้งหมด 11 miRNAs โดยมี 6 miRNAs ที่มีการแสดงออกลดลงสอดคล้องกันทั้งผลจากการทำ NGS และ real-time PCR ได้แก่ miR-128 miR-151 miR-185 miR-186 miR-425 และ miR-483 จากนั้นทำนายบทบาททางชีวภาพและภูมิคุ้มกันของยีนเป้าหมายที่อาจมีความเกี่ยวข้องกับการรักษาผู้ป่วยตับอักเสบบีเรื้อรัง งานวิจัยนี้จะทำให้เกิดความเข้าใจการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miRNAs ในสภาวะที่มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และ IFNs ได้มากขึ้น

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5674035130 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: CHRONIC HEPATITIS B VIRUS (CHB) / HEPATITIS B VIRUS (HBV) / MICRORNA (MIRNA), / NEXT-GENERATION SEQUENCING (NGS) / PEGYLATED INTERFERON ALPHA 2A (PEG-IFN ALPHA 2A)

THANANYA JINATO: ALTERATION OF HUMAN MICRORNA IN CELL INFECTED WITH HEPATITIS B VIRUS AND TREATED WITH PEGYLATED INTERFERON ALPHA 2A. ADVISOR: ASST. PROF. SUNCHAI PAYUNGPORN, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. PISIT TANGKIJVANICH, M.D., 75 pp.

Interferons (IFNs) play important roles in defense mechanisms against viral infections, thus IFNs therapy is a standard treatment in chronic hepatitis B (CHB) patients. IFNs signaling pathways promote IFN-inducible genes including microRNAs (miRNAs). In this research, we aimed to determine microRNAs expression profiles in hepatocellular carcinoma cells line (Huh7) transfected with hepatitis B virus (HBV) plasmid and treated with pegylated interferon (Peg-IFNs) alpha 2a. Huh7 cells were transfected with or without a plasmid containing HBV genome for 6 hours followed by treatment with or without Peg-IFNs alpha-2a for 24 hours. Cellular small RNAs were extracted and then followed by library preparation. To determine miRNAs expression profiles, the next-generation sequencing (NGS) was carried out on MiSeq platform (Illumina). Expression level of candidate miRNAs were confirmed by real-time PCR and the relative quantitation was calculated by delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) method. The results demonstrated that Huh7 cells transfected with HBV plasmid and treated with Peg-IFNs alpha-2a significantly down-regulated miRNAs including miR-128, miR-151, miR-185, miR-186, miR-425, and miR-483. The target genes of the candidate miRNAs were predicted in terms of roles in cellular pathways and immune response, which might be related to treatment in CHB patients. The data obtained from this study might be useful for understanding the response mechanism, after treatment with Peg-IFNs alpha-2a in HBV infected hepatocytes.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2014

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สัญญาชัย พยุงภร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้โอกาส การศึกษาต่อระดับปริญญาโท รวมถึงให้คำแนะนำ คำปรึกษา ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ศ. นพ.พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ และหน่วยวิจัยโรคตับสำหรับแนวทางในการ ทำงานวิจัยรวมถึงความอนุเคราะห์ยาเพ็คคิเลตอินเตอร์เฟอรอน แอลฟา ทู เอ ที่ใช้สำหรับ การศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ Prof. Yasuhito Tanaka สำหรับ พลาสมิดที่มีการแสดงออกของเชื้อ ไวรัสตับอักเสบบี ที่ใช้สำหรับการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาวณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ นางสาวเกษมณี ไพรอนันตถาวร และ นาย วิทยา ภูมิภักดิ์ สำหรับความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดการทำวิจัยรวมถึงคำแนะนำที่เป็น ประโยชน์อย่างยิ่ง

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงเจริญ พระชนมายุครบ 72 พรรษาที่สนับสนุนการเรียนในครั้งนี้

ขอขอบคุณสมาชิกในห้องปฏิบัติการ 724 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจ ตลอดการทำวิจัยที่ผ่านมา

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่ให้โอกาสในการศึกษา ต่อ รวมถึงกำลังใจที่เป็นแรงผลักดันจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย	1
คำถามงานวิจัย	2
วัตถุประสงค์	2
สมมติฐาน.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย.....	3
คำสำคัญ.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	5
ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B Virus).....	5
Chronic hepatitis B (CHB).....	6
การรักษาโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง	7
Interferon (IFNs).....	7
ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA).....	9
กลไกในการสร้าง microRNAs (miRNAs).....	9
miRNAs กับ HBV infection.....	11

ความสัมพันธ์ระหว่าง miRNAs และ IFNs.....	14
Real-time PCR/Quantitative PCR (qPCR).....	15
Next generation sequencing (NGS).....	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
รูปแบบการวิจัย	19
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	19
วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
การเพิ่มจำนวนพลาสมิด pUC19-HBV (genotype C) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Yasuhito Tanaka, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Japan โดยอาศัยเทคนิค Transformation	24
การสกัดพลาสมิด (Plasmid Extraction) โดยใช้ RBC Real Genomics HiYield™ Plasmid Mini Kit.....	25
การตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Colony PCR).....	26
วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell Culture)	27
วิธีการ transfection ด้วย pUC19-HBV และการบ่มด้วย Peg-IFN alpha	28
การสกัด miRNA จากเซลล์ Huh7 โดยใช้ชุดสกัด miRNA purification kit (Norgen).....	29
วัดปริมาณความเข้มข้นของ RNA ที่ได้โดยใช้ Qubit™ RNA Assay Kits.....	31
การเตรียมตัวอย่าง Small RNA (Small RNA Library Preparation)	31
ตรวจวัดปริมาณของ DNA library ที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างโดยใช้ KAPA Library Quantification Kits	35
การคำนวณความเข้มข้นของ DNA library.....	36
การเตรียมตัวอย่างก่อนลงเครื่อง Miseq (illumina®)	36
การวิเคราะห์ผลที่ได้จาก NGS.....	37
การตรวจสอบ miRNAs ที่พบจากผล NGS โดยใช้ real-time PCR.....	39

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	44
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	45
การเพิ่มจำนวนพลาสมิด pUC19-HBV (genotype C) โดยอาศัยเทคนิค transformation.....	45
การตรวจสอบพลาสมิด pUC19-HBV (genotype C) ด้วยปฏิกิริยาลูโกโซโพลิเมอเรส	45
ผลการเตรียมกลุ่มตัวอย่าง small RNA (Small RNA Library Preparation).....	46
ผลข้อมูลที่ได้จากการทำ NGS.....	47
ผลการวิเคราะห์ miRNAs ที่ได้จากการทำ NGS	48
ผลการวิเคราะห์ miRNAs ที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกมากกว่า 1.5 เท่า ด้วย NGS.....	49
ผลการวิเคราะห์ miRNAs ที่สนใจด้วยเทคนิค real-time PCR.....	52
ผลการทำนายยีนเป้าหมายของ miRNAs ที่สนใจ	53
ผลการทำนายรูปแบบการจับกันระหว่างยีนเป้าหมายของ miRNAs และ miRNA ที่สนใจ.....	54
การทำนายยีนเป้าหมายและบทบาททางชีวภาพของ miRNAs ในกลุ่มที่ได้รับ	
HBVplasmid และ Peg-IFN alpha-2a.....	55
miR-128 และยีน Wee1 kinase.....	55
miR-151a และยีน TpoR/MPL.....	56
miR-185 และยีน Mzb1 และ Btk.....	56
miR-186 และยีน AKAP12/AKAP250/Gravin	57
miR-425 และยีน PTEN	58
miR-483-3p และยีน Notch3 และ MAPK3/ERK1	59
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ.....	61
การออกแบบการทดลอง.....	61
เทคนิคที่ใช้ในการศึกษา miRNAs profiling.....	62
ข้อมูลที่ได้จากการทำ NGS.....	62

เปรียบเทียบผลที่ได้จากการทำ NGS เทียบกับ real-time PCR..... 63

การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miRNA..... 63

 การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miRNAs ในกลุ่มที่ได้รับ HBV plasmid..... 63

 การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miRNAs ในกลุ่มที่ได้รับ Peg-IFN alpha-2a 64

 การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miRNAs ในกลุ่มที่ได้รับ HBVplasmid และ
 Peg-IFN alpha-2a..... 66

รายการอ้างอิง 67

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 75



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	แสดง miRNAs ที่มีผลต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (31).....	12
ตารางที่ 2	แสดง miRNAs ที่แสดงออกแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่เป็นโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง (CHB) และกลุ่มที่ผู้ที่มีสุขภาพดี (control) (34).....	13
ตารางที่ 3	แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ colony PCR ของ pUC19-HBV genotype C.....	26
ตารางที่ 4	สารที่ใช้ในการทำ colony PCR ของ pUC19-HBV genotype C	26
ตารางที่ 5	สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ colony PCR (44)	26
ตารางที่ 6	แสดงสารเคมีที่ใช้เพื่อเตรียมเชื่อม 3' SR Adaptor กับ RNA.....	31
ตารางที่ 7	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อม 3' SR Adaptor กับ RNA	32
ตารางที่ 8	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการ hybridize reverse transcription primer.....	32
ตารางที่ 9	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อม 5' SR Adaptor กับ RNA	33
ตารางที่ 10	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการ reverse transcription	33
ตารางที่ 11	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน cDNA.....	34
ตารางที่ 12	แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน cDNA	34
ตารางที่ 13	แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของ PCR purification product	35
ตารางที่ 14	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทำ KAPA library quantification.....	35
ตารางที่ 15	แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ qPCR สำหรับ KAPA Library Quantification	36
ตารางที่ 16	แสดงสูตรการคำนวณความเข้มข้นของตัวอย่าง.....	36
ตารางที่ 17	แสดงสารที่ใช้ในการ Denature 2 nM library.....	36
ตารางที่ 18	แสดงสารที่ใช้ในการเจือจางตัวอย่างให้ได้ 10 pM.....	37
ตารางที่ 19	ตัวอย่างแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adaptor	37
ตารางที่ 20	แสดงปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการทำ Polyuridylation.....	39
ตารางที่ 21	แสดงปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการทำ Reverse transcription	40
ตารางที่ 22	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ real-time PCR.....	41

ตารางที่ 23	แสดงส่วนผสมสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี real-time PCR.....	41
ตารางที่ 24	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของ miR-186.....	42
ตารางที่ 25	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของ miR-217.....	42
ตารางที่ 26	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของ miR-23b, miR-181b, miR-128-3p, miR-151a, miR-185 และ miR-483	42
ตารางที่ 27	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของ miR-425.....	42
ตารางที่ 28	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของ miR-216a.....	43
ตารางที่ 29	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของ U6.....	43
ตารางที่ 30	แสดง miRNAs และยื่นเป้าหมายพร้อมทั้งบทบาททางชีวภาพ.....	53
ตารางที่ 31	แสดง hybridization pattern ระหว่าง miRNAs และ ยื่นเป้าหมาย	54
ตารางที่ 32	แสดงตัวอย่าง miRNAs ที่มีการแสดงออกในสภาวะที่มีไวรัสตับอักเสบบีในงานวิจัย ต่างๆ.....	65
ตารางที่ 33	แสดง miRNAs ที่พบร่วมกันระหว่างงานวิจัยก่อนหน้าและงานวิจัยนี้ในเซลล์ Huh7 ..	65

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างจีโนมของไวรัสตับอักเสบบี (12).....	6
รูปที่ 2 กลไกในการสร้างและการทำงานของ microRNAs (Payungporn S.)	10
รูปที่ 3 รูปแบบของการเข้าคู่กันระหว่าง miRNA และ mRNA เป้าหมาย (32).....	11
รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miRNAs เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี	14
รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่าง miRNAs ที่ควบคุมการแสดงออกของ IFNs receptor ทั้ง 3 กลุ่ม และโปรตีนที่เกี่ยวข้องใน IFNs pathways รวมถึง miRNAs ที่มีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจาก IFNs (42).....	15
รูปที่ 6 แสดงขั้นตอนการตรวจวัดระดับ miRNAs โดยการใช้เทคนิค RT-qPCR (43)	16
รูปที่ 7 แสดงการหาลำดับสารพันธุกรรมโดยเครื่อง Illumina.....	18
รูปที่ 8 แสดงตารางใน Hemocytometer.....	28
รูปที่ 9 แสดงลำดับการจัดการข้อมูลที่ได้จากกระบวนการ NGS (illumina).....	38
รูปที่ 10 ผลการตรวจสอบพลาสมิด pUC19-HBV (genotype C) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส..	45
รูปที่ 11 ผลการเตรียมตัวอย่าง Small RNA.....	46
รูปที่ 12 แสดง Q score distribution	47
รูปที่ 13 แสดงจำนวน read ที่พบในแต่ละตัวอย่างในรูปของร้อยละ.....	48
รูปที่ 14 Scatter plot แสดงค่า differential expression ของ miRNAs	48
รูปที่ 15 แผนภาพเวนน์ (Venn diagram) แสดง miRNAs ในเซลล์ Huh7 ที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง (-HBV/+IFN, +HBV/-IFN และ +HBV/+IFN) มากกว่า 1.5 เท่า (fold changes > 1.5) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (-HBV/-IFN).....	51
รูปที่ 16 ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปของ miRNAs ที่สนใจในเซลล์ Huh7 โดยเทคนิค NGS และ real-time PCR.....	52
รูปที่ 17 แผนภาพแสดงบทบาทของ Wee1 kinase ในการควบคุมวัฏจักรเซลล์ (61)	55
รูปที่ 18 แสดงกลไกการตอบสนองของ TpoR ต่อ TPO	56
รูปที่ 19 แสดงบทบาทของ miRNAs-185 ในการพัฒนา B cells (67).....	57

รูปที่ 20	หลักการควบคุมการแสดงออกของ β 2-adrenergic-receptor-gravin complex (68)..	58
รูปที่ 21	แสดงกลไกการทำงานของ PI3K-PTEN-Akt (73).....	58
รูปที่ 22	บทบาทของ Notch proteins ใน peripheral T cells (59).....	60
รูปที่ 23	บทบาทของ ERK proteins ใน การควบคุม transcription factor ที่มีเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงจาก Pro-B ไปเป็น Pre-B II Cell (60)	60



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
μl	Microliter
μM	Micromolar
bp	Base pair
cDNA	complementary DNA
CHB	Chronic hepatitis B
Ct	Threshold cycle
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HCC	Hepatocellular carcinoma
HBV	Hepatitis B virus
IFN	Interferon
M	Molar
miR	Micro RNA
mRNA	Messenger RNA
ml	Mililiter
mM	Milimolar
nm	Nanometer
NGS	Next-generation sequencing
PCR	Polymerase Chain Reaction
pM	Picomolar
pHBV	HBV plasmid
RNA pol II/III	RNA polymerase II/III
Rpm	Revolutions per minute
U	Unit
UTR	Untranslated region
Peg-IFN	Pegylated Interferon
Tm	Melting Temperature
v/v	Volume by volume

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B virus infection) พบว่าเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคตับอักเสบริื้อรังเรื้อรัง (chronic liver disease) (1) ร้อยละ 70-90 ของผู้ป่วยจะมีการพัฒนาของโรคไปเป็นตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma: HCC) ในที่สุด (1, 2) นอกจากนี้พบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งตับอย่างน้อยร้อยละ 50 จะมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (1) โดยปัจจุบันพบว่ามีประชากรประมาณ 360 ล้านคนที่เป็นโรคตับอักเสบริื้อรังเนื่องมาจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และพบว่าการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีนี้นำไปสู่สาเหตุการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลก 520,000 ถึง 1.2 ล้านคนต่อปี ซึ่งความชุกของการเกิดโรคจะขึ้นอยู่กับอัตราการแพร่กระจายของไวรัสตับอักเสบบีจะมีความแตกต่างกันตามภูมิภาคและเชื้อชาติของประชากร (3) การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังจะส่งผลให้เซลล์ตับเกิดการอักเสบและเสียหาย เซลล์ตับมีการเพิ่มจำนวนเพื่อทดแทนเซลล์ที่เสียหายไปจนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมภายใน ส่งผลให้กระตุ้นการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง คือ oncogenes และ tumor suppressor genes ให้มีการทำงานผิดปกติเซลล์ส่งผลให้เกิดการกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด

ในปัจจุบันยาด้านไวรัสถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคไวรัสตับอักเสบบี แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ กลุ่มแรก คือ ยากลุ่มที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย (IFN alpha และ Peg-IFN alpha) และยากลุ่มที่สอง จะไปยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยตรง (Nucleos(t)ide analogs) โดยยาในกลุ่ม Interferon (IFN) alpha จัดเป็นยากลุ่มแรกที่มีการอนุญาตให้ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านการเพิ่มจำนวนของไวรัส (4) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาในกลุ่ม IFN alpha จะมีผลข้างเคียงหลายประการ และยังพบว่ามีเพียงร้อยละ 32-36 ของผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วย Peg-IFN alpha (5, 6) นอกจากนี้การรักษาด้วย IFN alpha ยังมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง การที่สามารถทำนายการตอบสนองต่อยา Peg-IFN alpha ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีได้นั้นจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำมาเป็นแนวทางในการรักษาผู้ป่วย

microRNAs (miRNAs) ถูกนำมาใช้เป็น biomarker เพื่อใช้ในการวินิจฉัยการดำเนินของโรค เนื่องจากพบว่าในมะเร็งหลายชนิดนั้นจะมีการแสดงออกของระดับ miRNAs แตกต่างไปจากในเซลล์ปกติ นอกจากนี้ miRNAs ยังมีความเสถียรสามารถวัดได้ทั้งจากในซีรัมและพลาสมา ทำให้ผู้ป่วยเจ็บปวดน้อยที่สุดในการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ผล (7) ดังนั้นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปแบบ

การแสดงออกของ miRNAs ในเซลล์ Huh7 ที่อยู่ในสถานะติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และได้รับ Peg-IFN alpha-2a จะเป็นการจำลองสถานะของเซลล์ตับที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและได้รับการรักษาด้วย Peg-IFN alpha-2a ทำให้เกิดความเข้าใจมากขึ้นเกี่ยวกับกลไกการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีด้วย Peg-IFN alpha-2a

คำถามงานวิจัย

ในเซลล์เพาะเลี้ยง Huh7 ที่มีสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และได้รับ Peg-IFN alpha-2a จะมีรูปแบบการแสดงออกของ miRNA เปลี่ยนไปหรือไม่และแตกต่างกันอย่างไร

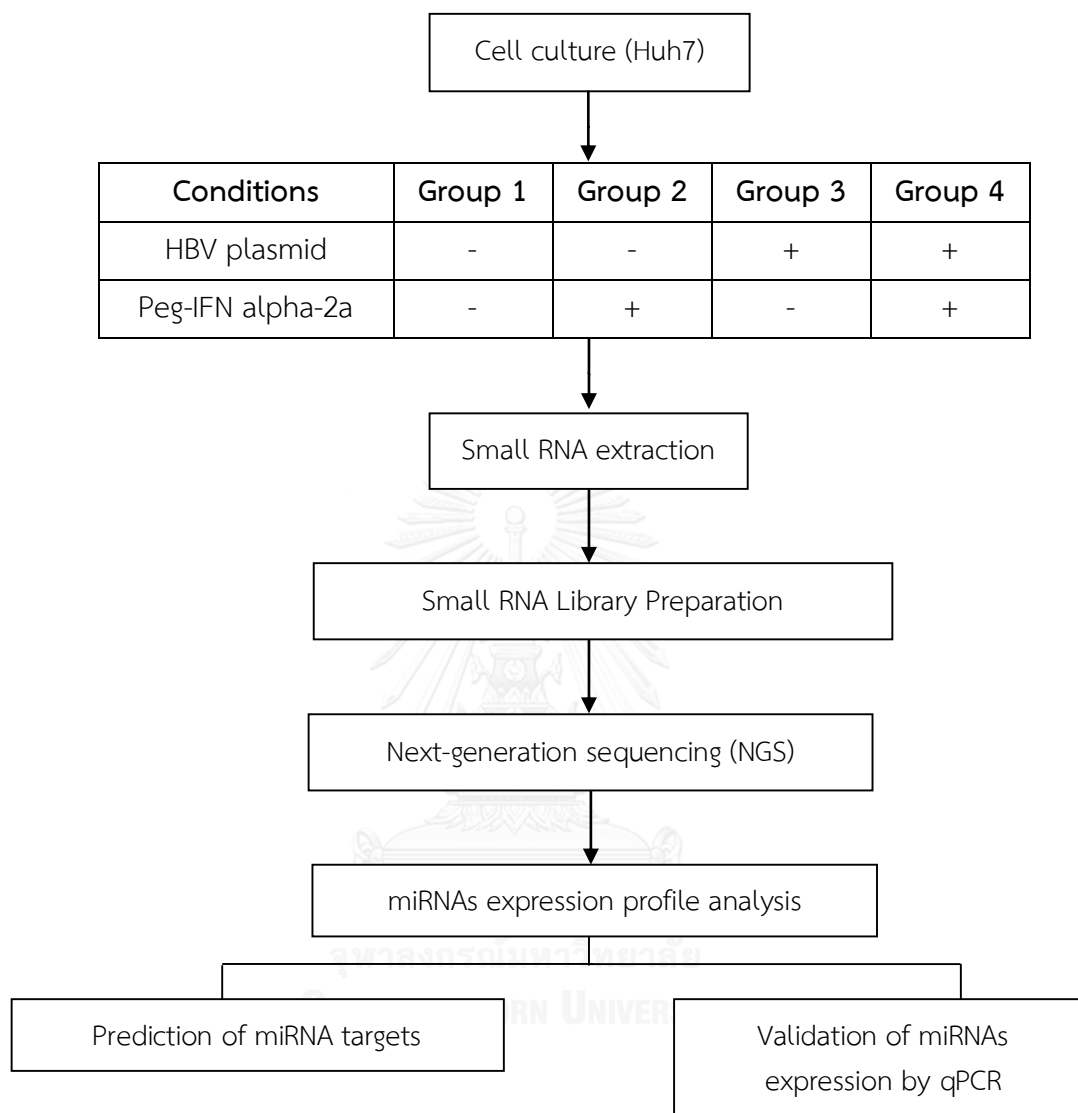
วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ในเซลล์เพาะเลี้ยง Huh7 ที่มีสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และได้รับ Peg-IFN alpha-2a

สมมติฐาน

รูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ในเซลล์เพาะเลี้ยง Huh7 จะเปลี่ยนแปลงไป เมื่อมีสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และได้รับ Peg-IFN alpha-2a

ขอบเขตของการวิจัย



คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

Hepatocellular carcinoma หมายถึง มะเร็งตับปฐมภูมิ ซึ่งเป็นมะเร็งของเซลล์ตับชนิด
Hepatocellular carcinoma

คำสำคัญ

Chronic Hepatitis B virus (CHB), Hepatitis B virus (HBV), MicroRNA (miRNA),
Next-generation sequencing (NGS), Pegylated interferon alpha-2a (PEG-IFN ALPHA-2A)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ทำให้ทราบรูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ที่เปลี่ยนแปลงไปในเซลล์ Huh7 ที่มีการตอบสนองในสถานะที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และทดสอบด้วยยา Peg-IFN alpha-2a ทำให้เกิดความเข้าใจกลไกการตอบสนองของเซลล์ Huh7 ต่อ Peg-IFN alpha-2a ได้มากขึ้น



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B virus infection) พบว่าเป็นปัจจัยหลักในการเกิดโรคมะเร็งตับ โดยประมาณร้อยละ 5 ของประชากรโลก (300-400 ล้านคน) มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ทั้งนี้พบความชุกในการติดเชื้อแถบเอเชียมากถึงร้อยละ 75 (8) และพบว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีนั้นจะมีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งตับสูงกว่าผู้ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เป็นสาเหตุให้บริเวณที่พบการแพร่กระจายของไวรัสตับอักเสบบีนั้นมีอัตราการเกิดโรคมะเร็งตับสูง (1, 9) โดย Beasley และคณะพบว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จะมีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งตับสูงถึง 1,000 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (10)

ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B Virus)

ไวรัสตับอักเสบบี เป็น enveloped DNA virus จัดอยู่ในตระกูล *Hepadnaviridae* มีความจำเพาะเจาะจงในการก่อพยาธิสภาพในเซลล์ตับ โดยไวรัสจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในไซโทพลาสซึมของเซลล์ตับ เป็น non-cytopathic virus คือ เมื่อเซลล์ตับเกิดการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากเดิม ซึ่งการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ถือเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก โดยมีประชากรมากกว่า 350 ล้านคนที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดโรคตับแข็งและสามารถพัฒนาจนกลายเป็นมะเร็งตับได้ในที่สุด (11)

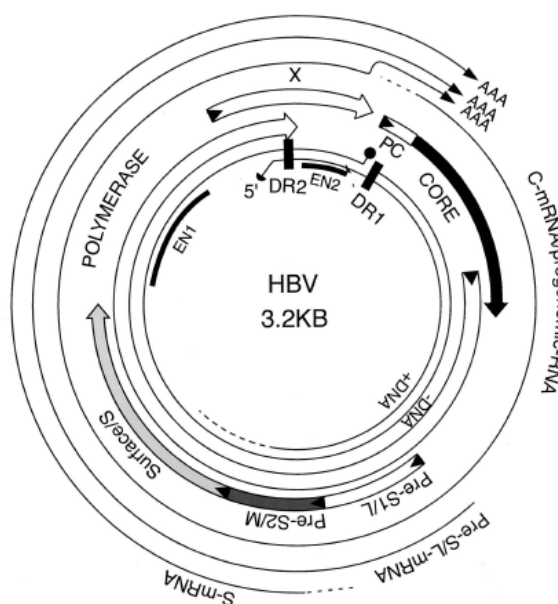
ลักษณะจีโนมของไวรัสตับอักเสบบีจะเป็น DNA วงกลมสายคู่ที่ไม่สมบูรณ์ (Partially double-stranded circular DNA) ประกอบไปด้วย DNA สายลบมีความยาวประมาณ 3,200 คู่เบส และ DNA สายบวกมีความยาวไม่แน่นอน เชื่อมต่อกันทางปลาย 5'UTR ของสาย DNA ในตำแหน่ง direct repeat (DR) พบว่ามี 2 บริเวณ คือ DR1 และ DR2 และควบคุมการสร้าง HBV mRNA โดย enhancer มี 2 บริเวณ คือ EN1 และ EN2 ซึ่งลักษณะของจีโนมแบ่งออกเป็น 4 overlapping open reading frames (ORFs) ที่ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) และ โปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (non-structural protein) ของไวรัส ดังที่ได้แสดงในรูปที่ 1 ได้แก่

(1) S ORF ประกอบด้วยยีนที่ใช้ในการสร้างโปรตีนพื้นผิว (Surface protein) หรือ HBsAg 3 ชนิด ได้แก่ small surface protein (S), medium surface protein (S+Pre-S2) และ large surface protein (S+Pre-S1+Pre-S2) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญใน envelop ของไวรัส

(2) C ORF ประกอบด้วยยีน core ที่สร้าง core protein และ HBeAg

(3) P ORF ประกอบด้วยยีน polymerase (Pol) ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการเพิ่มจำนวนของไวรัส (viral replication)

(4) X ORF ทำหน้าที่สร้างโปรตีน X หรือ hepatitis B X antigen (HBxAg) ซึ่งมีความสำคัญในการยับยั้งการทำงานของ p53 ที่สามารถต้านการเกิดมะเร็งได้



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างจีโนมของไวรัสตับอักเสบบี (12)

Chronic hepatitis B (CHB)

การเกิดโรคตับอักเสบริ้รังเนื่องมากจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีนั้น มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมานานและตรวจพบ HBsAg มานานกว่า 6 เดือน เป็นสาเหตุให้เซลล์ตับถูกทำลาย เกิดความเสียหายและมีการอักเสบของตับโดยมีค่า alanine aminotransferase (ALT) ในเลือดสูงมากกว่าระดับปกติถึง 5 เท่า

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง สามารถแบ่งระยะการดำเนินของโรคได้ 4 ระยะ (13)

1. Immune tolerance phase ในระยะนี้สามารถตรวจพบ HBeAg มีระดับของ ALT อยู่ในเกณฑ์ปกติ แต่พบว่าปริมาณของ HBV DNA ในเลือดสูงมากกว่า 2×10^6 ถึง 2×10^7 IU/mL ระยะนี้จะพบได้เป็นเวลานานหากผู้ป่วยมีการติดเชื้อในช่วงอายุน้อยกว่า 20-30 ปี แต่หากมีการติดเชื้อเมื่อผู้ป่วยมีอายุมากจะพบระยะนี้ค่อนข้างสั้น
2. Immune clearance phase ในระยะนี้สามารถตรวจพบ HBeAg และมีระดับของ ALT สูงกว่าปกติ แต่พบว่าปริมาณของ HBV DNA ในเลือดสูงมากกว่า 2×10^4 IU/mL พยาธิสภาพของตับสามารถตรวจพบการอักเสบแบบทำลายเนื้อตับ (necroinflammation) และ

การเกิดพังผืด (fibrosis) โดยทั่วไปผู้ป่วยในระยะนี้จะเกิด HBeAg seroconversion คือจะตรวจไม่พบ HBeAg แต่จะพบ HBeAb

3. Immune control ในระยะนี้จะไม่พบ HBeAg แต่จะพบ HBeAb และมีระดับของ ALT ลดลงสู่ปกติ มีปริมาณของ HBV DNA ในเลือดต่ำกว่า 2×10^3 IU/mL พยาธิสภาพของตับไม่มีการอักเสบหรือมีการอักเสบเล็กน้อย ในผู้ป่วยบางรายอาจพบ HBsAg น้อยกว่า 1000 IU/mL
4. Immune escape ในระยะนี้จะไม่พบ HBeAg แต่จะพบ HBeAb และมีระดับของ ALT เปลี่ยนแปลงไม่แน่นอน มีปริมาณของ HBV DNA ในเลือดสูงตั้งแต่ 2×10^3 IU/mL พยาธิสภาพของตับมีการอักเสบปานกลางถึงรุนแรงอาจมีการเกิดพังผืดหรือตับแข็งร่วมด้วย ในผู้ป่วยบางรายอาจพบการกลายพันธุ์ของยีนในตำแหน่ง precore หรือ basal core promoter

การรักษาโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง

การรักษาโรคไวรัสตับอักเสบบีในปัจจุบันจะรักษาโดยการให้ยาต้านไวรัสแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ nucleos(t)ide analogues (NA) ทำงานโดยการไปยับยั้งเอนไซม์ polymerase ทำให้ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส ตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ได้แก่ lamivudine, adefovir, tenofovir และ entecavir เป็นต้น กลุ่มที่ 2 คือ Interferon (IFN) alpha ทำงานโดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย และมีผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส ในการศึกษาที่ต้องการมุ่งเน้นที่จะศึกษาในกลุ่ม Interferon (IFN) alpha เนื่องจากยาในกลุ่มนี้มีระยะเวลาในการรักษาแน่นอน ไม่เกิดการดื้อยา มีผลต่อเนื่องหลังการรักษา และมีโอกาสกลับมาเป็นซ้ำน้อยกว่ายาในกลุ่ม NA อย่างไรก็ตามพบว่ามีเพียงร้อยละ 32-36 ของผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วย Peg-IFN alpha (5, 6) นอกจากนี้มีผลข้างเคียงจากการรักษาค่อนข้างมาก และเพื่อให้เกิดความเข้าใจต่อกลไกในการทำงานของยาในกลุ่มนี้ จึงต้องการศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงของ miRNAs ต่อยา Peg-IFN alpha-2a ในสถานะที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

Interferon (IFNs)

IFNs เป็นส่วนหนึ่งของ non-specific immune system ในระบบภูมิคุ้มกันก่อนเกิด (innate immune system) มีการแสดงออกเมื่อเซลล์มีการติดเชื้อไวรัส และต้านการติดเชื้อไวรัสโดยการสร้างโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการต้านไวรัส (anti-viral defenses) และกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (14) โดย IFNs จะไม่ถูกสร้างและสะสมในเซลล์ในรูป inactive form (15) แต่ IFNs

จะถูกสร้างโดยเซลล์ที่มีการตอบสนองต่อสารพันธุกรรมของไวรัส (viral nucleic acids) และชักนำให้เกิด anti-viral phase ในระยะแรกของการติดเชื้อ

IFNs สามารถแบ่งได้เป็น 3 class ตามความจำเพาะของ IFNs receptors (16) ดังนี้

1) IFNs ชนิดที่ 1 (Type I IFNs) จะถูกสร้างโดยเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสและเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocytes) ได้แก่ IFN- α (มีมากกว่า 14 subtypes), β , δ , ϵ , κ , และ ω แต่ที่ไม่พบการแสดงออกในมนุษย์คือ IFNs- δ โดยพบว่า IFNs ชนิดที่ 1 ทำงานโดยจับกับ Type I IFN receptor complex (IFNAR) (17, 18) และกระตุ้นการทำงานของ IFN signaling pathways ผ่านทาง signal transducers and activators of transcription (STATs) และ Janus kinases (JAKs) ส่งผลต่อยีนที่ตอบสนองต่อ IFNs หรือ IFN-stimulated genes (ISGs) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการทำลายไวรัสต่อไป (19)

2) IFNs ชนิดที่ 2 (Type II IFNs) จะถูกสร้างโดย activated T lymphocytes และ natural killer cells (NK cells) โดยทั้งสองเซลล์นี้จะถูกเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า “immune interferon” IFN ในกลุ่มนี้คือ IFN- γ ทำงานโดยจับกับ IFN γ R กระตุ้น JAK-STATs pathway (20)

3) IFNs ชนิดที่ 3 (Type III IFNs) คือ IFN- λ ทำงานโดยจับกับ IFN λ -specific receptor (IFN λ R) การทำงานของ IFNs ชนิดนี้จะมีลักษณะเดียวกับกับ IFNs ชนิดที่ 1 (14)

IFNs ที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง คือ IFN alpha แบ่งเป็น standard IFN และ pegylated interferon ที่ดัดแปลงโดยการติด polyethylene glycol (PEG) เข้ากับ IFNs เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการละลาย ลดโอกาสการถูกย่อยจาก proteolysis ลดปฏิกิริยาต่อต้านทางภูมิคุ้มกัน (antigenicity) และทำให้ยาสามารถหมุนเวียนภายในร่างกายได้นานขึ้น แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ pegylated interferon- α 2a (PEG-IFN- α 2a) มีโครงสร้างแบบกึ่ง น้ำหนักโมเลกุล 40 kDa และ pegylated interferon- α 2b (PEG-IFN- α 2b) มีโครงสร้างแบบเส้นตรง น้ำหนักโมเลกุล 12 kDa (21, 22)

งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงของมะเร็งตับ (HepG2) โดยนำยาในกลุ่ม PEG-IFN- α 2a มาใช้ในการกระตุ้นการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อ IFN โดยใช้ยาปริมาณ 100 ng/ml และดูการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีนที่ถูกควบคุมด้วย IFN จะพบว่าปริมาณของยา 100 ng/ml เพียงพอที่จะไปกระตุ้นการแสดงออกของยีน IFN ได้ (23) รวมถึงได้มีการศึกษาระดับการแสดงออกของ IFN- α mRNA เปรียบเทียบกันระหว่างเซลล์เพาะเลี้ยงของมะเร็งตับ 2 เซลล์ คือ HepG2 และ Huh7 จะพบว่า เซลล์ Huh7 มีระดับการแสดงออกของ IFN- α mRNA สูงกว่าในเซลล์ HepG2 (24) ดังนั้นเซลล์ Huh7 จึงมีความเหมาะสมในการนำมาศึกษาในงานวิจัยนี้

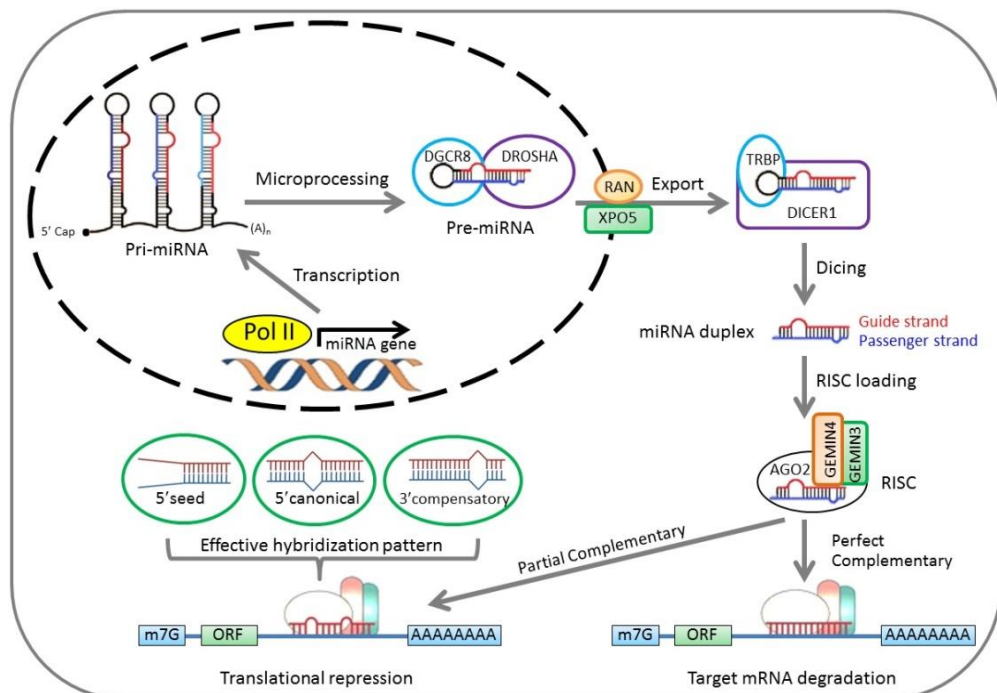
ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA)

miRNAs จัดเป็น non-coding RNAs ซึ่งเป็นโมเลกุลของ RNAs สายสั้นๆ มีขนาดประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์ มีบทบาทสำคัญทั้งในพืช สัตว์ และไวรัส ในการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยจะไปจับบริเวณ 3'-untranslated region (3'-UTR) ของ mRNA เป้าหมายทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการแปลรหัส (translational repression) หรือทำลายสาย mRNA เป้าหมาย (mRNA degradation) (25, 26)

miRNAs มีบทบาทต่อกระบวนการทางชีวภาพต่างๆ เช่น การพัฒนาของเซลล์ (development) การเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อไปทำหน้าที่จำเพาะ (differentiation) โปรแกรมการตายของเซลล์ (apoptosis) การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) และการเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration/invasion) (27, 28) โดยทั่วไป 1 สายของ miRNA จะสามารถจับกับ mRNA เป้าหมายได้โดยประมาณ 200 เป้าหมาย (26) ดังนั้นหาก miRNAs มีรูปแบบของระดับการแสดงออกแตกต่างกันไปจึงมักจะส่งผลเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด (29)

กลไกในการสร้าง microRNAs (miRNAs)

miRNAs ถูกสร้างขึ้นในนิวเคลียส โดยสังเคราะห์จาก microRNA gene โดยเอนไซม์ RNA polymerase II/III ได้เป็น primary microRNA (pri-microRNA) มีลักษณะเป็น hairpin loop ส่วนปลายด้าน 5' มีการเติม 5'cap และ poly A ที่ปลายด้าน 3' จากนั้นจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ Drosha ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม RNase III ทำงานร่วมกับโปรตีน DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8) ได้เป็น precursor microRNA (pre-microRNA) ที่มีความยาวประมาณ 70 นิวคลีโอไทด์ และถูกขนส่งออกนอกนิวเคลียสโดย exportin-5 เมื่อออกมาถึงไซโตพลาสซึมจะถูกตัดอีกครั้งด้วยเอนไซม์ Dicer ซึ่งทำงานร่วมกับโปรตีน TAR-RNA binding protein (TRBP) ได้เป็น miRNA สายคู่ (microRNA duplex) จากนั้น miRNA สายคู่นี้จะแยกจากกันเป็นสายเดี่ยวได้เป็น mature miRNA และไปรวมกับโปรตีน Argonaute (Ago) อยู่ในรูป RNA-induced silencing complex (RISC) จากนั้นจะเคลื่อนที่ไปยัง mRNA เป้าหมายเพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน ดังที่แสดงในรูปที่ 2 (29, 30)



รูปที่ 2 กลไกในการสร้างและการทำงานของ microRNAs (from this study)

ลักษณะการเข้าคู่กัน (Hybridization pattern) ระหว่าง miRNA และ mRNAs เป้าหมายนั้นพบว่าหากมีการจับกันอย่างสมบูรณ์ (perfect complementary) จะทำให้เกิดการทำลายสาย mRNAs และในกรณีที่มีการเข้าคู่กันอย่างไม่สมบูรณ์ (partial complementary) จะเกิดการยับยั้งกระบวนการแปลรหัสของสาย mRNAs แบ่งได้เป็น 3 รูปแบบ ดังรูปที่ 3 (31) คือ

- 1) 5' seed คือ การเข้าคู่กันที่บริเวณตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2-8 เฉพาะด้านปลายด้าน 5' ของสาย miRNA
- 2) 5' canonical คือ การเข้าคู่กันบริเวณบางส่วนของด้านปลาย 3' ของ miRNA และบริเวณนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2-8 จากทางด้านปลาย 5' ของสาย miRNA
- 3) 3' compensatory คือ การเข้าคู่กันบริเวณปลายด้าน 3' ของ miRNA กับ mRNAs มากกว่าครึ่งหนึ่งของสาย miRNA และมีบางส่วนของด้าน 5' ของ miRNA จับกับ mRNA

โดยพบว่าความจำเพาะในการจับกับยีนเป้าหมายของ miRNA นั้นจะขึ้นกับบริเวณที่จับกับสาย mRNA ของยีนเป้าหมาย (target binding site) ซึ่งพบว่ามีจำเพาะสูงในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2-8 จากทางด้านปลาย 5' ของ miRNA และมักมีการจับกับบริเวณปลายด้าน 3' ของ mRNA เป้าหมาย



รูปที่ 3 รูปแบบของการเข้าคู่กันระหว่าง miRNA และ mRNA เป้าหมาย (32)

- A) ลักษณะการเข้าคู่กันระหว่าง miRNA และ mRNAs เป้าหมายแบบ 5' seed
- B) ลักษณะการเข้าคู่กันระหว่าง miRNA และ mRNAs เป้าหมายแบบ 5' canonical
- C) ลักษณะการเข้าคู่กันระหว่าง miRNA และ mRNAs เป้าหมายแบบ 3' compensatory

miRNAs กับ HBV infection

ดังที่กล่าวไว้ข้างต้นจะเห็นได้ว่า miRNAs มีบทบาทอย่างมากในการควบคุมการแสดงออกของยีน และในผู้ที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเฉียบพลันและเป็นโรคไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังจะพบว่าการเปลี่ยนแปลงรูปแบบในการแสดงออกของ miRNAs แตกต่างออกไปเมื่อเทียบกับในคนปกติ โดยพบว่าไวรัสตับอักเสบบีมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ miRNAs เพื่อให้มีสถานะที่เหมาะสมกับการเพิ่มจำนวนของไวรัส การหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เป้าหมาย ส่งผลต่อกลไกภายในเซลล์ เช่น การติดเชื้อไวรัส การเหนี่ยวนำให้เกิดดับเบิลและมะเร็งตับ (33, 34) ดังที่แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง miRNAs ที่มีผลต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (33)

miRNAs	miRNA expression	Target genes	HBV or disease status
Cellular targets			
<i>miR-1</i>	up	HDAC4 (histone deacetylase 4)	HBV (↑)
<i>miR-17-92 cluster</i>	up	E2F1 (c-myc repressor)	HBV (↑?), HCC (↑)
<i>miR-155</i>	up	C/EBPβ (CCAAT/enhancer binding protein)	HCC (↑)
		SOCS1 (JAK/STAT signaling)	HBV (↓)
<i>miR-181a</i>	up	HLA-A? (MHC class I)	HBV (↑)
<i>miR-372</i>	up	NFIB (nuclear factor I/B)	HBV (↑)
<i>miR-373</i>	up	NFIB (nuclear factor I/B)	HBV (↑)
<i>miR-501</i>	up	HBIP (HBx inhibitor)	HBV (↑)
<i>mir-29 family</i>	down	collagen	Fibrosis (↑)
<i>miR-122</i>	down	cyclin G1 (p53 modulator)	HBV (↑), HCC (↑)
<i>miR-152</i>	down	DNMT1 (DNA methyltransferase 1)	HBV (↓)
<i>let-7 family</i>	down	STAT3 (transcription factor)	HBV (↑?), HCC (↑)
Viral targets			
<i>miR-122</i>	up	HBV DNA polymerase	HBV (↓)
<i>miR-125a-5p</i>	up	HBsAg (HBV surface antigen)	HBV (↓)
<i>miR-199-3p</i>	up	HBsAg	HBV (↓)
<i>miR-210</i>	up	HBV pre-S1 (pre-surface 1)	HBV (↓)

หมายเหตุ: HBV (↑): ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี; HBV (↓): ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี; HCC (↑): พัฒนาการเกิดมะเร็งตับ; Fibrosis (↑): ส่งเสริมการเกิดพังผืดในตับ

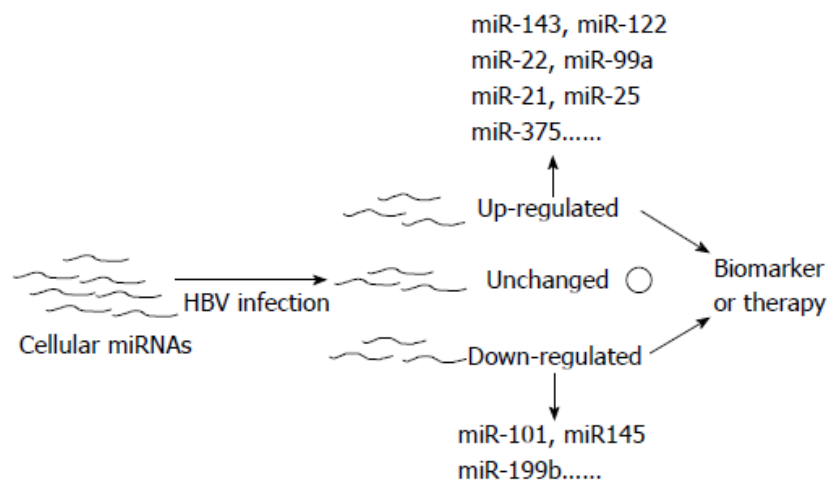
การศึกษาของ Li และคณะในปี 2010 ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ในซีรัมของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในประชากรเมืองนานจิง ประเทศจีน โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับการเป็นมะเร็งระดับพบว่า มี 13 miRNAs (*miR-375*, *miR-92a*, *miR-10a*, *miR-223*, *miR-423*, *miR-23b/a*, *miR-342-3p*, *miR-99a*, *miR-122a*, *miR-125b*, *miR-150* และ *let-7c*) ที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกโดยจะแสดงออกสูงขึ้นในกลุ่มผู้ที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี (control) (35) และจากการศึกษาของ Wojcicka และคณะ (36) ในปี 2014 ได้ศึกษารูปแบบการแสดงออกของ miRNAs โดยใช้วิธีการ next-generation sequencing พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ในเซลล์ตับทั้งหมด 374 miRNAs และพบว่าการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ในเนื้อเยื่อมะเร็งตับเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อที่ไม่เกิดมะเร็งทั้งหมด 127 miRNAs ดังที่แสดงตัวอย่างในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงตัวอย่าง miRNAs ที่มีการแสดงออกในเซลล์มะเร็งตับ (HCC) เมื่อเปรียบเทียบกับ เซลล์ปกติ (HCC-T vs. HCC-N, expression difference ≥ 2 -fold, FDR < 0.05) (36, 37)

microRNA	Mean expression (RPM) in HCC-T	Mean expression (RPM) in HCC-N	Fold change HCC-T/N	p-Value	FDR	Change direction
hsa-miR-10b-5p	5072	1312	3.87	0.0002	0.004	Up
hsa-miR-10a-5p	4945	14,090	0.35	0.0022	0.012	Down
hsa-miR-30a-5p	2623	5314	0.49	0.0006	0.006	Down
hsa-miR-199a/b-3p	1722	9049	0.19	0.0004	0.005	Down
hsa-miR-224-5p	1483	460	3.22	0.0012	0.008	Up
hsa-miR-199a-5p	859	4932	0.17	0.0002	0.004	Down
hsa-miR-182-5p	665	194	3.43	0.0005	0.005	Up
hsa-miR-142-5p	525	1099	0.48	0.0053	0.022	Down
hsa-miR-452-5p	521	165	3.16	0.0016	0.010	Up
hsa-miR-200b-3p	435	1538	0.28	0.0012	0.008	Down
hsa-miR-200a-3p	312	1220	0.26	0.0006	0.006	Down
hsa-miR-183-5p	260	56	4.63	0.0003	0.004	Up
hsa-miR-450a-5p	165	391	0.42	0.0006	0.006	Down
hsa-miR-145-3p	158	349	0.45	0.0055	0.022	Down
hsa-miR-30a-3p	120	257	0.47	0.0003	0.004	Down
hsa-miR-139-5p	114	359	0.32	0.0000	0.001	Down
hsa-miR-542-3p	100	210	0.48	0.0029	0.014	Down
hsa-miR-130b-5p	81	32	2.55	0.0002	0.004	Up
hsa-miR-381-3p	66	149	0.44	0.0016	0.010	Down
hsa-miR-223-3p	64	143	0.45	0.0002	0.004	Down

หมายเหตุ: RPM – reads per millions reads, FDR – false discovery rate

การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miRNAs เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีนั้น สามารถทำหน้าที่เป็น biomarker เพื่อนำมาวินิจฉัยโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีได้ งานวิจัยก่อนหน้านี้หลายงานพบว่า miRNAs มีความเสถียรในซีรัมและพลาสมา และมีระดับการแสดงออกที่คงที่ในสิ่งมีชีวิต species เดียวกัน (38-40) ดังแสดงในรูปที่ 4

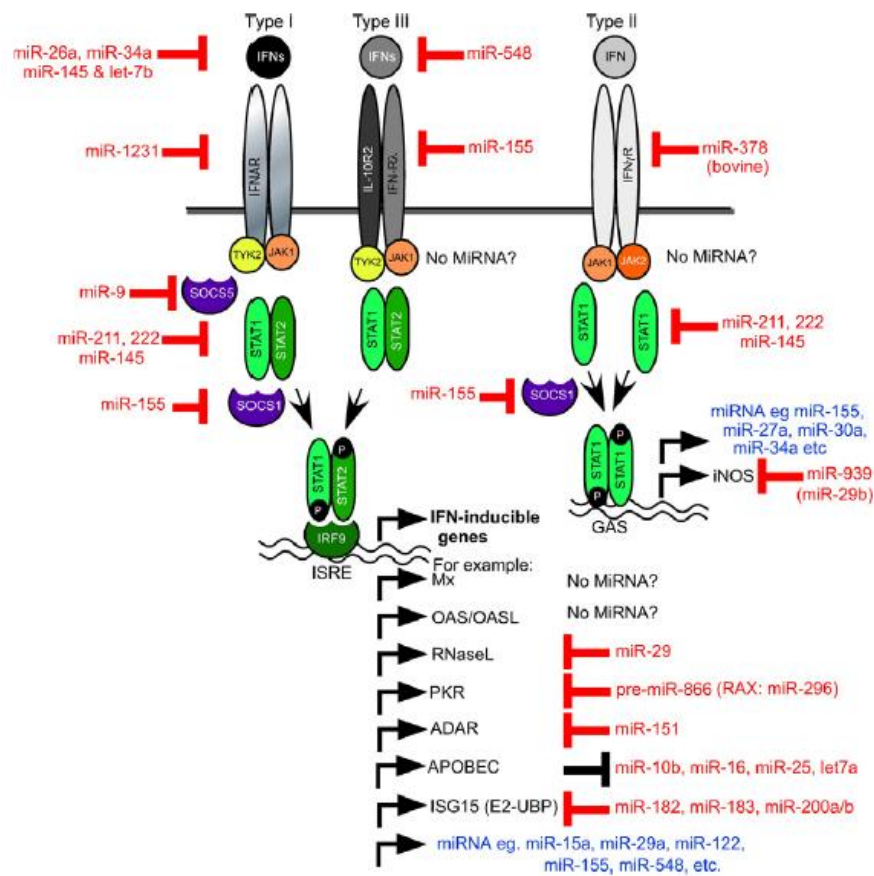


รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miRNAs เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miRNAs เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี สามารถแบ่ง miRNAs ออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (unchanged), กลุ่มที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (up-regulated) เช่น miR-143, miR-122, miR-22 เป็นต้น และกลุ่มที่มีการแสดงออกลดลง (down-regulated) เช่น miR-101, miR145, miR-199b เป็นต้น กลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงสามารถทำหน้าที่เป็น biomarker ในการวินิจฉัยโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีได้ (34)

ความสัมพันธ์ระหว่าง miRNAs และ IFNs

IFNs มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยพบว่า IFNs มีผลต่อการแสดงออกของ miRNAs และมีความเกี่ยวข้องกับกลไกการต้านไวรัสหลังจากที่เซลล์มีการติดเชื้อไวรัส ในปัจจุบันพบว่าเทคโนโลยีที่ใช้ในการหาลำดับพันธุกรรมได้เป็นจำนวนมากจึงทำให้สามารถระบุ miRNAs ที่มีการแสดงออกในสภาวะต่าง ๆ ได้มากขึ้นโดยการเปรียบเทียบระหว่าง miRNAs ที่มีการแสดงออกในเซลล์ปกติ กับกลุ่มที่มีสภาวะต่าง ๆ เช่น สภาวะที่มีการติดเชื้อไวรัส หรือได้รับ IFNs เป็นต้น การแสดงออกของ miRNAs จะแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า IFNs มีความสามารถในการควบคุมกลไกการแสดงออกของ miRNAs (14) ในทางตรงกันข้ามพบว่า miRNAs ก็มีบทบาทในการกระตุ้นระดับการแสดงออกของ IFNs เช่นกัน โดยมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ ได้แสดงให้เห็นว่าเมื่อเซลล์มีการติดเชื้อไวรัส เซลล์จะมีระดับการแสดงออกของ miRNAs ที่เปลี่ยนแปลงไป รวมถึงสารพันธุกรรมของไวรัสบางชนิดก็สามารถสร้าง viral miRNAs ได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้อาจมีบทบาทในการเพิ่มจำนวนของไวรัส (41) และส่งผลต่อการแสดงออก IFNs ในการตอบสนองต่อไวรัสได้เช่นกัน (42) ดังที่แสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่าง miRNAs ที่ควบคุมการแสดงออกของ IFNs receptor ทั้ง 3 กลุ่ม และ โปรตีนที่เกี่ยวข้องใน IFNs pathways รวมถึง miRNAs ที่มีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจาก IFNs (42)

Real-time PCR/Quantitative PCR (qPCR)

Real-time PCR เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาจาก conventional PCR โดยได้พัฒนาให้มีการตรวจวัด PCR product ได้โดยการใส่สารเรืองแสงซึ่งสามารถตรวจวัดการเพิ่มปริมาณของ PCR product ที่เกิดขึ้น ณ เวลานั้น ๆ ปริมาณของสารเรืองแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของ DNA ที่เพิ่มขึ้น จัดเป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มจำนวน DNA ได้อย่างจำเพาะ มีความไวสูง สามารถตรวจยืนยัน PCR product ที่ได้โดยการวิเคราะห์ melting point (Tm)

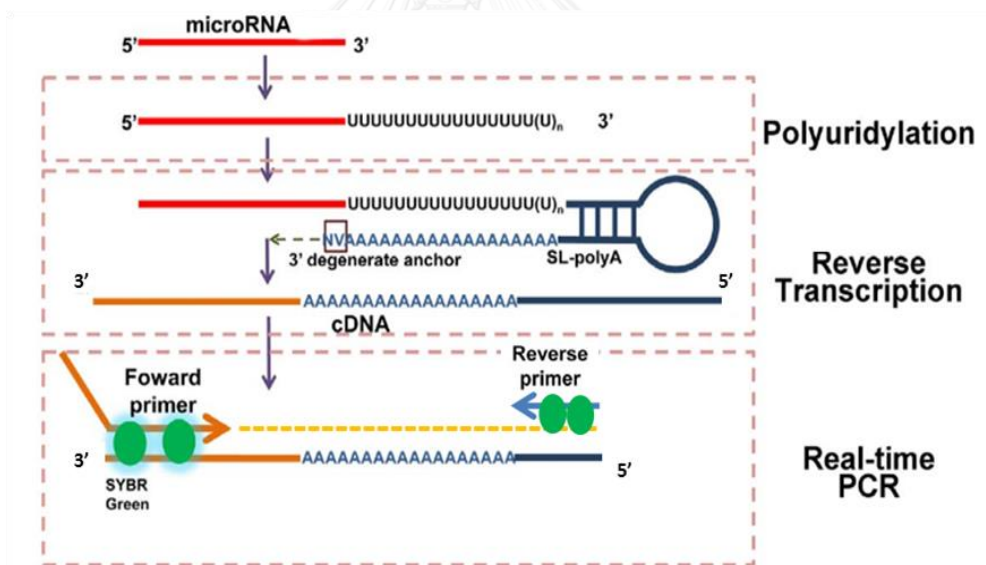
สารเรืองแสงที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR มีอยู่หลายประเภท เช่น SYBR-Green I Dye เป็นสารเรืองแสงที่จะไปแทรกตัวที่ minor groove ของ DNA สายคู่อย่างไม่จำเพาะ เมื่อถูกกระตุ้นจะมีการคายพลังงานออกมาทำให้สามารถวัดค่าได้ แต่การแทรกตัวอย่างไม่จำเพาะนี้อาจทำให้ได้ค่าของ product อื่นที่ไม่ต้องการ ดังนั้นจึงต้องเทียบค่า melting point เพื่อยืนยัน อีกชนิดหนึ่งคือ TaqMan hybridization probes เป็น Oligonucleotide เส้นเดียวมีความจำเพาะกับ DNA เป้าหมาย ประกอบด้วย reporter dye ที่จับอยู่ปลาย 5' ของ probe ส่วน quencher dye จะจับที่ปลาย 3'

อาศัยการทำงานของ *Taq* DNA polymerase ที่มี 5' exonuclease activity ตัด reporter dye ออกจาก probe ทำให้ reporter dye หลุดห่างออกจาก quencher dye และสามารถคายพลังงานออกมาในรูปของแสงฟลูออเรสเซนซ์ทำให้สามารถตรวจวัดค่าของ product ที่สนใจได้อย่างจำเพาะ

การตรวจวัดระดับ miRNAs โดยใช้เทคนิค real-time PCR with SYBR Green

เป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณ miRNA ในการตรวจวัด โดยมี 3 ขั้นตอนหลัก (รูปที่ 6) ดังนี้

1. Polyuridylation เป็นการเติมเบส U เข้าไปที่ปลาย 3' ของ RNA โดย Poly (U) Polymerase
2. Reverse Transcription เป็นการสร้าง cDNA โดยอาศัย universal poly (A) stem-loop RT primers หรือ SL-poly (A) และมีที่จับของ universal reverse primer บริเวณ 5'-stem-loop
3. Real-Time PCR โดยอาศัย miRNA-specific forward primer และ universal reverse primer

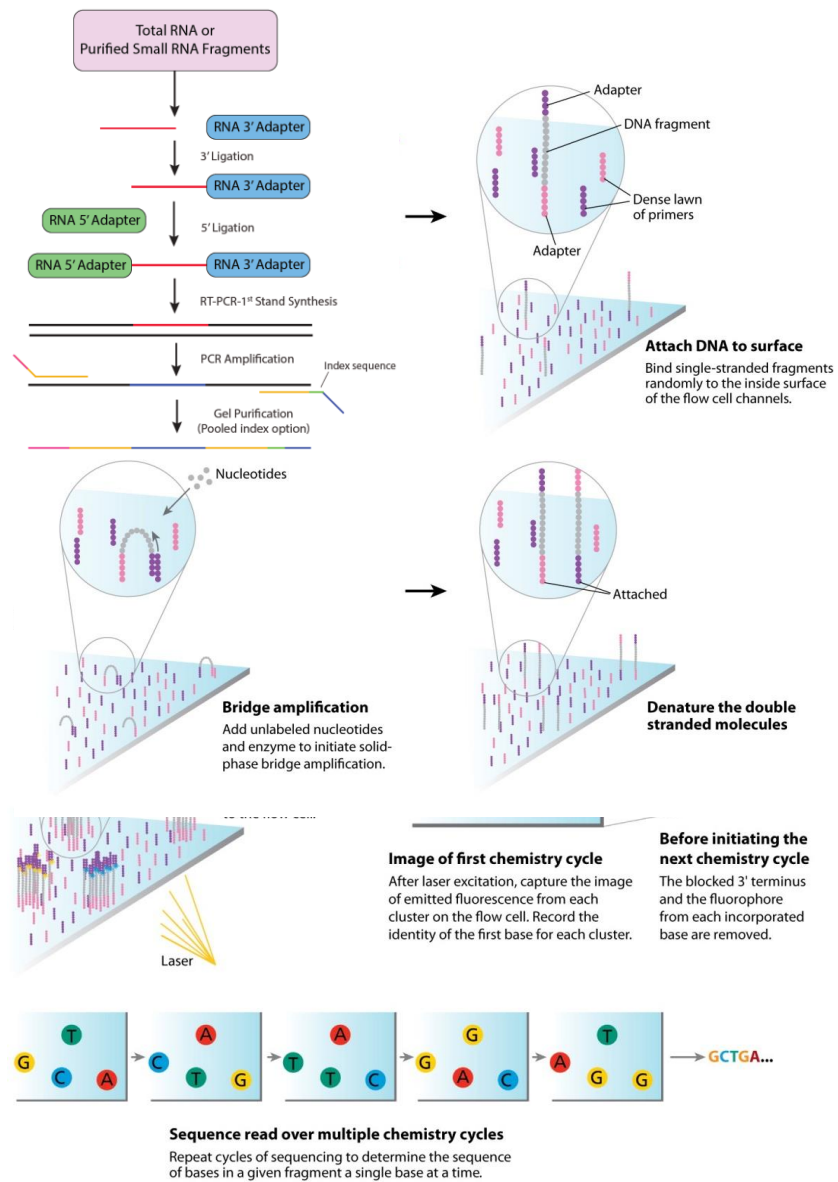


รูปที่ 6 แสดงขั้นตอนการตรวจวัดระดับ miRNAs โดยใช้เทคนิค RT-qPCR (43)

Next generation sequencing (NGS)

NGS เป็นเทคโนโลยีในการหาลำดับเบสแบบคู่ขนาน ทำให้หาลำดับเบสได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น whole genome sequencing, targeted deep sequencing, RNA sequencing (transcriptomics หรือ microRNA profiling), methylomics และ metagenomic (microbiome) ทั้งนี้งานวิจัยนี้จะเน้นในส่วนของการทำ microRNA profiling โดยใช้ NGS ซึ่งเริ่มจากการสกัด miRNAs จากนั้นนำไปเชื่อมกับ adaptor แล้วสร้างเป็น cDNA โดยวิธีการ reverse transcription แล้วเพิ่มจำนวน DNA โดยอาศัย primer ที่จับกับ adaptor ด้วย PCR แบบ clonally amplified templates ทำให้สามารถเพิ่มจำนวน DNA สายสั้น ๆ ได้พร้อม ๆ กัน (parallel) ทั้งนี้ในงานวิจัยใช้เครื่อง MiSeq (Illumina) ซึ่งมีหลักการเพิ่มปริมาณของสาย DNA แบบ solid-phase bridge amplification โดยการใส่ DNA libraries ลงไปใน flow cell channels แบบสุ่ม ซึ่งบริเวณด้านบนของ flow cell จะมีลำดับเบสคู่สมกับ adaptor ทำหน้าที่เป็น primer โดย DNA สายเดี่ยวจะจับกับ primer เป็นลักษณะสะพานโค้งและเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR จากนั้น DNA จะถูกแยกเป็นสายเดี่ยวเพื่อเป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนต่อไป ทำให้ได้กลุ่มของสายดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน การหาลำดับเบสจะใช้หลักการ sequencing ซึ่งอ่านลำดับเบสโดยอาศัยการติดฉลากเบสด้วยสารเรืองแสง (fluorescent reversible terminators) ทั้งสี่เบสแตกต่างกัน นิวคลีโอไทด์ที่ไม่เข้าคู่กับสายตั้งต้นจะถูกล้างออกไป จากนั้น fluorescent จะถูกกระตุ้นให้มีการเปล่งแสงด้วยเลเซอร์ จากนั้นภาพการเรืองแสงจะถูกบันทึกไว้ในแต่ละรอบ (cycle) ซึ่งจะนำมาใช้ในการแปลผลลำดับเบสที่อ่านได้ (44-46) ดังที่แสดงในรูปที่ 7

ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษารูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ในเซลล์เพาะเลี้ยง (Huh7) กลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับ IFNs ในสภาวะที่มีสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้อาจทำให้เกิดความเข้าใจในกลไกการตอบสนองของ IFNs มากขึ้นและอาจนำไปสู่การพัฒนาไปเป็น biomarker เพื่อพยากรณ์แนวโน้มในการตอบสนองต่อยา IFNs สำหรับผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในประเทศไทย รวมทั้งอาจเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยแนวทางในการรักษาผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในกลุ่มประชากรไทยได้ในอนาคต



AR Mardis ER. 2008. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 9:387–402

รูปที่ 7 แสดงการหาลำดับสารพันธุกรรมโดยเครื่อง Illumina

a) แสดงการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี bridge amplification

b) แสดงการอ่านลำดับเบสโดยใช้หลักการ sequencing by synthesis (44)

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

รูปแบบการวิจัยเป็นการศึกษาแบบงานวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) และได้ผ่านการพิจารณาและอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee) IRB No. 161/58

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดโดยอาศัยเทคนิค Transformation

- Agar (Becton, Dickinson and company (BD), USA; Cat No. RC013)
- Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and company (BD), USA; Cat No. 223000)
- Bacto™ Yeast Extract (Becton, Dickinson and company (BD), USA; Cat No. 210934)
- Sodium Chloride (NaCl) (Merck, Germany; Cat No. 567440)
- Ampicillin (M&H manufacturing, Thailand; Cat No. 1A 26/36)
- Glucose (Ajax Finechem, New Zealand; Cat No. 783)
- X-gal (AMESCO, USA; Cat No. 0428)
- Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (AMESCO, USA; Cat No. 0487)
- Potassium chloride (KCl) (VWR International, USA; Cat No. 71003-522)
- Distill water (DW)

2. สารเคมีสำหรับการสกัดพลาสมิด

- RBC Real Genomics HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. YPD300)

3. สารเคมีสำหรับตรวจสอบยีนด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

- Distilled water (DW)
- dNTPs ได้แก่ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP (Thermo Scientific, USA; Cat No. R0181)

- DreamTaq DNA polymerase, Recombinant (Thermo Scientific, USA; Cat No. EP0703)
- Specific primers (Integrated DNA Technologies, Singapore)
- DNA template

4. สารเคมีสำหรับเลี้ยงเซลล์

- Hyclone DMEM/HIGH GLUCOSE (Thermo Scientific, USA; Cat No. 30022)
- Fetal Bovine Serum (Thermo Scientific, USA; Cat No. SV30160)
- Antibiotic-Antimycotic (Gibco[®], USA; Cat No. 15240-062)
- Hyclone Trypsin 0.25% (1X) Solution (Thermo Scientific, USA; Cat No. SH30042)
- Phosphate buffer saline (BIO BASIC CANADA INC., Canada; Cat No. PD0100)

5. สารเคมีสำหรับ Transfection

- Lipofectamine[®] 2000 Regent (Invitrogen, USA; Cat No. 11668-027)
- Opti-MEM[®] (1X) Reduced Serum Medium (Gibco[®], USA; Cat No. 31985-070)

6. สารเคมีสำหรับป้อนด้วย Peg-IFN alpha-2a

- Pegasys[®] peginterferon alfa-2a (Hoffmann-La Roche Ltd, Switzerland)
- Phosphate buffer saline (BIO BASIC CANADA INC. Canada; Cat No. PD0100)
- Hyclone DMEM/HIGH GLUCOSE (Thermo Scientific, USA; Cat No. 30022)

7. อุปกรณ์สำหรับการทำเซลล์

- Tissue Culture Flask (TPP, Switzerland)
- Serological Pipette (TPP, Switzerland)
- Pipette tip ขนาด 10 µl, 100 µl และ 1000 µl (ExtraGene, USA)
- หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร (Thermo Scientific, USA)
- หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร (Axygen Scientific, USA)
- ตู้ป้อน 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (ESCO class II BSC Model AC2)

- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Universal 420 R, Hettich ZENTRIFUGEN)
- 60 mm Petri dish (TPP, Switzerland)

8. สารเคมีสำหรับสกัด miRNAs

- microRNA Purification kit (NORGEN BIOTEK CORP, Canada; Cat No. 21300)
- Absolute ethanol (Merck, Germany; Cat No. 1009832500)

9. สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Polyuridylation

- Poly (U) Polymerase (New England Biolabs, USA; Cat No. M0337S)
- RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific, USA; Cat No. E00381)
- UTP, Tris buffered (Thermo Scientific, USA; Cat No. R1479)

10. สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Reverse Transcription

- RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, USA; Cat No. EP0441)
- RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific, USA; Cat No. E00381)
- Stemloop Poly A (SL poly A) primer (Integrated DNA Technologies, Singapore)
- RNA template
- dNTPs ได้แก่ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP (Thermo Scientific, USA; Cat No. R0181)

11. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวัดความเข้มข้น cDNA

- Qubit[®] BR RNA Assay kit (Invitrogen, USA; Cat No. Q10210)
- Qubit[®] 2.0 fluorometer (Invitrogen, USA)

12. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Small RNA library

- NEBNext[®] Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina[®] (Set1) (New England Biolabs[®], UK; Cat No. E7300S)
- QIAQuick PCR purification kit (Qiagen, USA; Cat No. 28104)

13. สารเคมีสำหรับ Agarose Gel Electrophoresis

- Agarose (Invitrogen, USA; Cat No. 75510-019)
- 1X TBE
- Ethidium Bromide (AMRESCO, USA; Cat No. X328)
- 100 bp DNA Ladder H3 RTU (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. DM003-R500)
- Transilluminator (Biogenomed)
- Electrophoresis set (Major Science)

14. สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล (Gel extraction)

- RBC HiYield™ Gel/PCR Fragment Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. YDF300)

15. สารเคมีที่ใช้ในการวัดความเข้มข้นของ DNA library

- KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) (Kapa Biosystems, UK; Cat No. KK4600)

16. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับทำ Next generation sequencing (NGS)

- MiSeq® v2 Reagent kit (illumina®, Singapore; Cat No. 15033624)
- MiSeq Next-Generation Sequencing System (illumina®, Singapore)

17. สารเคมีสำหรับทำ Real-Time PCR

- Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA; Cat No. K0222)
- Specific Primers (Integrated DNA Technologies, Singapore)
- DNA template

18. วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

- Cylinder ขนาด 250 ml และ 1000 ml (K-EXAX, USA)
- Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml (ExtraGene, USA)
- Para film (Plastic Packaging, USA)
- PCR tube (BIOLINE, UK)
- Pipette rack (Biohit Oyi, Finland)

- Pipette tip ขนาด 100 μ l, 200 μ l และ 1000 μ l (ExtraGene, USA)
- Polypropylene conical tube ขนาด 15 ml (Gene follower, China)
- Polypropylene conical tube ขนาด 50 ml (ExtraGene, USA)
- Reagent bottle ขนาด 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1000 ml (Schott Duran, Germany)
- Real-time PCR tube (Kisker Biotech, Netherlands)
- Stirring-magnetic bar

19. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- Heater block (Bioer Technology, China)
- Microwave oven (Sharp, Japan)
- Mini Centrifuge (Eppendorf, Germany)
- Automatic adjustable micropipette ขนาด P2 (0.1-2 μ l), P10 (0.5-10 μ l), P20 (2-20 μ l), P200 (20-200 μ l) และ P1000 (100-1000 μ l) (Eppendorf, Germany)
- Balance (Precisa, UK)
- Environmental shaker-Incubator ES-20 (Biosan, UK)
- Freezer -20 °C (Sanyo, Japan)
- Freezer -80 °C (Panasonic, Japan)
- Gel Doc 1000 (Vilber Lourmat, Hong Kong)
- Electrophoresis chamber set (Major Science, USA)
- Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, USA)
- PCR cabinet
- PCR Mastercycler Gradient (Eppendorf, Germany)
- Power supply model 250 (major Science, USA)
- Refrigerator 4°C (Panasonic, Japan)
- StepOnePlus Real-time PCR System (Applied Biosystems, CA)
- UV transilluminator (Vilber Lourmat, Hong Kong)
- Vortex mixer (Scientific Industries, USA)
- Force Mini (Lio Lab International, Korea)

20. โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การทดลอง

- CLC genomic workbench 7
- miRBase (<http://www.mirbase.org/>)
- miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>)
- Panther (<http://pantherdb.org/>)
- RNA hybrid (<https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>)

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพิ่มจำนวนพลาสมิด pUC19-HBV (genotype C) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Yasuhito Tanaka, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Japan โดยอาศัยเทคนิค Transformation

1. เตรียม competent cells ปริมาตร 50 μ l และ พลาสมิด pUC19-HBV (genotype C) ปริมาตร 1 μ l
2. แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
3. บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที
4. แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที
5. เติม SOC medium ที่มี 2M Mg^{2+} และ 2M Glucose ปริมาตร 950 μ l (ผสม 2M Mg^{2+} 10 μ l และ 2M Glucose 10 μ l ลงใน SOC medium 1 ml)
6. นำมาเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยความเร็ว 200 rpm ประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที
7. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
8. เทส่วนใสทิ้งให้เหลือปริมาตรประมาณ 50 μ l
9. ใช้ pipette ดูดขึ้นลงให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน Spread ลงใน LB agar plate ที่มี Ampicillin, IPTG และ X-gal เคลือบอยู่
10. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
11. นำโคลน *E. coli* มาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 2 ml ที่มี Ampicillin ต่อ LB broth ในอัตราส่วน 1 μ l ต่อ 1 ml จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

การสกัดพลาสมิด (Plasmid Extraction) โดยใช้ RBC Real Genomics HiYield™ Plasmid Mini Kit

1. นำโคโลนี *E. coli* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 2 ml ที่ที่มี Ampicillin ต่อ LB broth ในอัตราส่วน 1 μ l ต่อ 1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
2. นำ LB broth ที่ได้มาแบ่งใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งสารละลายส่วนใส
3. นำ LB broth ส่วนที่เหลือจากข้อ 1 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที อีกรอบ แล้วทิ้งสารละลายส่วนใส
4. เติม PD1 buffer ปริมาตร 200 μ l และนำมาเขย่าด้วยเครื่อง vortex
5. เติม PD2 buffer ปริมาตร 200 μ l และกลับ microcentrifuge tube ไปมา 10 ครั้ง
6. เติม PD3 buffer ปริมาตร 300 μ l และกลับ microcentrifuge tube ไปมา 10 ครั้ง
7. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
8. เตรียม PD column ลงใน collection tube ขนาด 2 ml และถ่ายส่วนใสลงใน PD column
9. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
10. ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube แล้วใส่ PD column ใน collection tube อีกครั้ง
11. เติม W1 buffer ปริมาตร 400 μ l ลงใน PD column
12. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
13. ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube แล้วใส่ PD column ใน collection tube อีกครั้ง
14. เติม wash buffer ปริมาตร 600 μ l ลงใน PD column
15. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
16. ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube แล้วใส่ PD column ใน collection tube อีกครั้ง
17. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
18. จากนั้นใส่ PD column ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
19. เติม elution buffer ปริมาตร 30 μ l ลงไปตรงกลาง membrane
20. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
21. เก็บพลาสมิดที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Colony PCR)

นำปลายทิวแต่ละลงบนโคโลนีแบคทีเรีย (bacterial colony) ที่อยู่บน LB agar plate จากนั้นใส่ลงในสารละลาย ดังตารางที่ 4 และใช้สภาวะในการทำ PCR ดังตารางที่ 5 เพื่อตรวจสอบว่าพลาสมิดที่ได้เป็นของ pUC19-HBV genotype C โดยใช้ไพรเมอร์ ดังที่แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ colony PCR ของ pUC19-HBV genotype C

plasmid	primer	nucleotide (5' → 3')	Size (bp)	Reference
pUC19-HBV genotype C	Forward	CCGTGTGCACTTCGCTTCA	289	(47)
	Reverse	GCACAGCTTGGAGGCTTGA		

ตารางที่ 4 สารที่ใช้ในการทำ colony PCR ของ pUC19-HBV genotype C

สารที่ใช้	ปริมาตร (μL)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Distilled water	10.94	-
10X PCR buffer	1.25	1X
10 mM dNTPs mixture	0.25	0.2 mM
10 μM Forward primer	0.25	0.2 μM
10 μM Reverse primer	0.25	0.2 μM
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 units/μL)	0.06	1.25 U
Bacterial Colony	-	-
Total volume	12.5	

ตารางที่ 5 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ colony PCR (47)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	
Initial denaturation	95	3 นาที	
Denaturation	95	15 วินาที	} 50 รอบ
Annealing	60	1 นาที	
Extension	72	10 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	

หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis เป็นเวลา 40 นาที

วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell Culture)

การทดลองนี้ได้เลือกใช้ Hepatocellular carcinoma cell lines (Huh7) เนื่องจากเซลล์ Huh7 มีการตอบสนองต่อ IFN alpha สูงกว่าในเซลล์ HepG2 ตามการศึกษาของ Li และคณะในปี 2013 (24)

1. การนำเซลล์ออกมาเพาะเลี้ยง (Cell Recovery)

- นำเซลล์ Huh7 ที่ละลายอยู่ใน freezing media ปริมาตร 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง 15 ml
- เติม DMEM ปริมาตร 9 ml ผสมให้เข้ากัน
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- ทิ้งส่วนใส จากนั้นเติม DMEM ปริมาตร 5 ml ที่มี 20% FBS และ 1% (v/v) antimycotic-antibiotic เพื่อละลายตะกอนเซลล์ หลังจากนั้นดูดใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร
- บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

2. การเลี้ยงเซลล์ (Passage Cells)

- จะทำเมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 90-100% ของขวดเลี้ยงเซลล์
- เท DMEM ออกจากขวดเลี้ยงเซลล์
- ใส่ PBS (Phosphate Buffered Saline) พอท่วมผิวหน้าเซลล์และเอียงขวดไปมา และเท PBS ออก ทำขั้นตอนนี้ 2 รอบเพื่อล้าง media ออกให้หมด
- ใส่ 0.05 % Trypsin ปริมาตร 1 ml ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร หรือ 3 ml ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร
- บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ประมาณ 5 นาที
- ดูดเซลล์ลงในหลอด 15 ml และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- ทิ้งส่วนใส และเติม DMEM ประมาณ 3 ml เพื่อละลายตะกอนเซลล์
- ดูดสารละลายเซลล์ 1 ml ใส่ลงใน flask เลี้ยงเซลล์แล้วเติม DMEM ปริมาตร 9 ml ที่ประกอบด้วย 10% FBS และ 1% (v/v) antimycotic-antibiotic

3. การเก็บรักษาเซลล์ (Cells freezing)

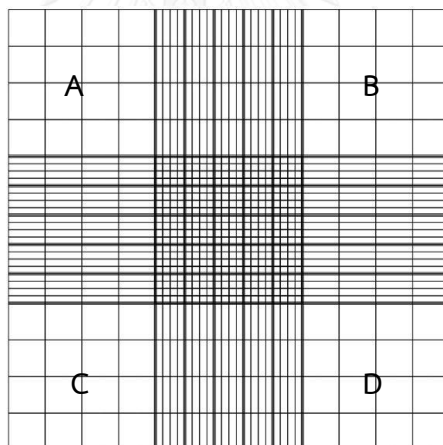
หลังจาก passage Cells แล้วให้ละลายเซลล์ด้วย freezing media 1 ml แล้วดูดใส่หลอด cryotube เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงย้ายไปยัง -80°C

วิธีการ transfection ด้วย pUC19-HBV และการบ่มด้วย Peg-IFN alpha

1. การนับปริมาณเซลล์ (Cells counting)

- หลังจากที่มีการ passage cells ปีเปตต์สารละลายเซลล์ปริมาตร 10 μl ผสมกับ bromphenol blue ปริมาตร 10 μl ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที
- นำเซลล์ที่ผสมไว้มา 10 μl ใส่ลงใน hemocytometer จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ นับเซลล์ที่ไม่ติดสีอยู่ในบริเวณทั้ง 4 ช่อง ดังรูปที่ 8 และนำมาคำนวณจากสูตร

$$\text{จำนวนเซลล์} = \frac{A+B+C+D}{4} \times 2 \times 10^4 \text{ cell/ml}$$



รูปที่ 8 แสดงตารางใน Hemocytometer

2. การเพาะเซลล์เพื่อใช้ในการทดลอง (Cells seeding)

หลังจากที่นับจำนวนเซลล์แล้วมาเจือจางให้ได้เซลล์จำนวน 7×10^5 เซลล์/dish แล้วใส่ลงใน 60 mm dish เต็ม DMEM ที่มี 10% FBS ให้ได้ปริมาตรรวม 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. Transfection

- ผสม Lipofectamine[®]2000 Reagent ปริมาตร 7.5 μ l ลงใน Opti-MEM[®]I reduced serum medium ปริมาตร 305 μ l ใน 1.5 ml centrifuge tube และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
- เจือจาง DNA ให้ได้ปริมาตร 3 μ g ของ pUC19-HBV ลงใน Opti-MEM[®]I reduced serum medium ปริมาตรรวม 312.5 μ l และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
 - ผสม DNA เจือจางลงไปในส่วนผสมของสารละลาย Lipofectamine[®]2000
 - บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
 - หยอดสารละลายผสมลงใน 60 mm dish ที่มี DMEM 5 ml
 - บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (48)
- 4. ดูด media เก่าออกให้หมด
- 5. ทดสอบด้วย Peg-IFN alpha-2a 100 ng ใน DMEM 5 ml (23)
- 6. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (48, 49)

การสกัด miRNA จากเซลล์ Huh7 โดยใช้ชุดสกัด miRNA purification kit (Norgen)

1. เก็บ RNA จาก Huh7 cells
 - 1.1 ดูด media ออกให้หมด และใส่ PBS ลงไปล้างให้ทั่ว
 - 1.2 ดูด PBS ออกให้หมด และใส่ lysis buffer ลงไป 600 μ l
 - 1.3 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube
 - 1.4 ใส่ absolute ethanol ลงไป 300 μ l
 - 1.5 ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex

2. Small RNA Capture

- 2.1 ใส่ 450 μL ของ 96 -100% ethanol ลงในของเหลวจากข้อ 2.3 แล้วผสมโดย vortex เป็นเวลา 10 วินาที
- 2.2 เตรียม microRNA enrichment column ลงบน collection tubes
- 2.3 นำ lysate ที่ผสมกับ ethanol ใส่ลงบน column แล้ว centrifuge 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- 2.4 เทของเหลวทิ้ง แล้วดูด lysate ที่ผสมกับ ethanol ที่เหลือใส่ spin column ที่อยู่บน collection tube
- 2.5 ปั่นเหวี่ยง 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาทีเพื่อให้ small RNA จับกับ column

3. Column Wash

- 3.1 เติม 400 μL wash solution ลงไปใน microRNA enrichment column และปั่นเหวี่ยง 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- 3.2 เทของเหลวทิ้ง และใส่ column ลงบน collection tube เช่นเดิม
- 3.3 ทำซ้ำ 3.1 และ 3.2 อีกครั้ง
- 3.4 wash ครั้งที่ 3 โดยเติม 400 μL ของ wash solution และปั่นเหวี่ยง 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- 3.5 เทของเหลวทิ้ง และใส่ column ลงบน collection tube ปั่นเหวี่ยง 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

4. Small RNA Elution

- 4.1 ใส่ microRNA enrichment column ไปในหลอด 1.7 mL elution tube หลอดใหม่
- 4.2 ใส่ 50 μL ของ elution solution ลงไปใน column
- 4.3 ปั่นเหวี่ยง เป็นเวลา 2 นาที ที่ 2000 rpm ตามด้วย 1 นาที ที่ความเร็ว 14,000 rpm หากสารยังเคลื่อนลงมาในหลอดไม่หมด ให้ทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- 4.4 Small RNA ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปเก็บที่ -70°C

วัดปริมาณความเข้มข้นของ RNA ที่ได้โดยใช้ Qubit™ RNA Assay Kits

1. เตรียม working solution buffer โดยการผสม Qubit™ RNA buffer 199 μl กับ Qubit™ RNA reagent 1 μl ต่อ 1 reaction
2. เตรียม standard ซึ่งประกอบด้วย low concentration และ high concentration โดยผสม Qubit™ standard (low หรือ high concentration) 10 μl กับ working solution buffer จากข้อ 1 ปริมาตร 190 μl
3. ผสมตัวอย่างที่ต้องการวัดความเข้มข้น ปริมาตร 1 μl กับ working solution buffer จากข้อ 1 ปริมาตร 199 μl
4. ก่อนนำไปวัดความเข้มข้น ต้องผสมสารแต่ละหลอดให้เข้ากันโดยการ vortex และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที
5. จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง Qubit® 2.0 fluorometer โดยเริ่มจาก Qubit™ standard เพื่อสร้าง standard curve จากนั้นจะวัดตัวอย่าง โดยค่าที่ได้จะถูกนำมาเทียบกับ standard curve เพื่อคำนวณความเข้มข้นต่อไป

การเตรียมตัวอย่าง Small RNA (Small RNA Library Preparation)

Ligate the 3' SR Adaptor

1. เจือจาง 3' SR Adaptor ต่อ nuclease free water ในอัตราส่วน 1:2 สำหรับ total RNA 100 ng
2. ใส่สารดังแสดงในตารางที่ 6 และผสมให้เข้ากัน

ตารางที่ 6 แสดงสารเคมีที่ใช้เพื่อเตรียมเชื่อม 3' SR Adaptor กับ RNA

สารเคมี	ปริมาตร (μl)
Small RNA (100 ng)	6
3' SR Adaptor for Illumina	1
Total volume	7

3. บ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปบ่มในน้ำแข็ง
4. ใส่สารเพิ่มเข้าไปดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อม 3' SR Adaptor กับ RNA

สารเคมี	ปริมาตร (μl)
สารละลายจาก ตารางที่ 6	7
3' Ligation Reaction Buffer (2X)	10
3' Ligation Enzyme Mix	3
Total volume	20

5. บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

* สามารถบ่มได้โดยใช้เวลานานขึ้นโดยลดอุณหภูมิ (บ่ม 16°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการ ligation ของ methylated RNAs

Hybridize reverse transcription primer

6. เจือจาง SR RT Primer ต่อ nuclease free water ในอัตราส่วน 1:2 สำหรับ total RNA 100 ng
7. ใส่สารดังแสดงในตารางที่ 8 และผสมให้เข้ากัน

ตารางที่ 8 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการ hybridize reverse transcription primer

สารเคมี	ปริมาตร (μl)
สารละลายจากตารางที่ 7	20
Nuclease-Free Water	4.5
SR RT Primer for Illumina	1
Total volume	25.5

8. บ่มที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 5 นาที ต่อด้วย บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที และ บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 15 นาที

Ligate the 5' SR Adaptor

9. เมื่อเหลือเวลาอีก 5 นาที ให้ผสม ใน 5' SR adaptor ใน 120 μl ของ nuclease free water โดยเจือจาง 5' SR adaptor ต่อ nuclease free water ในอัตราส่วน 1:2 สำหรับ total RNA 100 ng
10. แบ่ง 1.1 μl ต่อ 1 ตัวอย่างที่ใช้ ของ 5' SR adaptor ใน 200 μl nuclease free water
11. บ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 2 นาที และนำไปบ่มทันทีในน้ำแข็ง ใช้งานภายใน 30 นาที
12. ใส่ส่วนผสมดังตารางที่ 9 และผสมให้เข้ากันกับส่วนผสมใน ขั้นที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อม 5' SR Adaptor กับ RNA

สารเคมี	ปริมาณ (μl)
สารละลายจากตารางที่ 8	25.5
5' SR Adaptor for Illumina (denatured)	1
5' Ligation Reaction Buffer (10X)	1
5' Ligation Enzyme Mix	2.5
Total volume	30

13. บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Reverse transcription

14. ผสมส่วนผสมดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการ reverse transcription

สารเคมี	ปริมาณ (μl)
สารละลายจากตารางที่ 9	30
First Strand Synthesis Reaction Buffer (5X)	8
Murine RNase Inhibitor (40 U/μl)	1
ProtoScript II Reverse Transcriptase (200,000 U/ml)	1
Total volume	40

15. บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

16. นำไปเพิ่มจำนวนโดย PCR ทันที

*สามารถหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 15 นาทีและเก็บได้ที่ -20°C

PCR Amplification

17. เตรียมสารละลายดังตารางที่ 11 แล้วผสมให้เข้ากันกับสารในขั้นที่ 16 และใช้สภาวะดังตารางที่ 12

ตารางที่ 11 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน cDNA

สารเคมี	ปริมาตร(μl)
สารละลายจากตารางที่ 10	40
LongAmp <i>Taq</i> 2X Master Mix	50
SR Primer for Illumina	2.5
Index (X) Primer*	2.5
Nuclease free water	5
Total volume	100

* ในชุด NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set สำหรับ Illumina ชุดที่ 1 จะประกอบไปด้วย 1–12 PCR primers ซึ่งแต่ละตัวจะมี index แตกต่างกัน โดยในแต่ละปฏิกิริยาจะเลือก primer เพียง 1 ใน 12 PCR primers ที่ใช้ในขั้นตอน PCR amplification

ตารางที่ 12 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน cDNA

PCR cycle	อุณหภูมิ	เวลา	
Pre-denaturation	94°C	30 วินาที	} ทำซ้ำ 15 รอบ
Denaturation	94°C	15 วินาที	
Annealing	62°C	30 วินาที	
Extension	70°C	15 วินาที	
Post-extension	70°C	5 นาที	

18. นำไปตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยวิธี electrophoresis ใน 3% agarose gel ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 V เป็นเวลา 60 นาที

สกัดเจลโดยใช้ QIAquick gel extraction kit

1. ตัดเจลบริเวณที่มีขนาด 147-178 bp
2. ใส่ buffer QG 3 เท่าต่อ 1 gel และบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที
3. ใส่ isopropanol 100 μl ต่อ 1 mg ของ gel
4. เตรียม QIAquick spin column ลงใน collection tube
5. ใส่ 800 μl ของตัวอย่างลงใน QIAquick spin column และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

6. เทส่วนใส่ทิ้ง และใส่ QIAquick spin column กลับลงไป collection tube
7. ใส่ 750 μ l ของ buffer PE ทิ้งไว้ 2-5 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
8. เทส่วนใส่ทิ้ง และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
9. นำ QIAquick spin column มาใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube
10. ใส่ 50 μ l ของ buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
11. เก็บตัวอย่างไว้ที่ -80°C

ตรวจวัดปริมาณของ DNA library ที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างโดยใช้ KAPA Library Quantification Kits

1. เจือจางความเข้มข้นของตัวอย่างให้ได้ 1:20,000 ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์
 2. ทำ real-time PCR โดยใช้สารละลายและใช้สภาวะดังที่แสดงในตารางที่ 13-15
- ตารางที่ 13 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของ PCR purification product

plasmid	primer	nucleotide (5' \rightarrow 3')	product size (bp)
KAPA primer	Forward	AATGATACGGCGACCACCGA	147-197
	Reverse	CAAGCAGAAGACGGCATACGA	

ตารางที่ 14 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทำ KAPA library quantification

สารเคมี	ปริมาตร(μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
KAPA SYBR [®] FAST qPCR kit master mix (2X)	10	1X
10 μ M Forward primer	0.4	0.2 μ M
10 μ M Reverse primer	0.4	0.2 μ M
Distilled water	5.2	-
DNA template (dilute 1: 20,000)	4	-
Total volume	20	

โดยแต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 ครั้ง และมี standard DNA ทั้งหมด 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 20, 2, 0.2, 0.02, 0.002 และ 0.0002 pM

ตารางที่ 15 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ qPCR สำหรับ KAPA Library Quantification

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	} 35 รอบ
Initial denaturation	95	5 นาที	
Denaturation	95	30 วินาที	
Annealing/ Extension	60	45 วินาที	

การคำนวณความเข้มข้นของ DNA library

ค่า threshold cycles (Ct) ที่วัดได้จากตัวอย่างจะถูกนำมาเทียบกับค่าที่วัดได้จาก standard DNA เพื่อคำนวณความเข้มข้นดังที่แสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงสูตรการคำนวณความเข้มข้นของตัวอย่าง

Library name	Concentration in pM calculated by qPCR instrument (triplicate data points)	Average concentration (pM)	Size adjusted concentration (pM)	Concentration of undiluted library stock (pM)
Library 1:20,000	A1 A2 A3	A	$W = A \times \frac{452}{\text{Length of fragment}}$	$W \times 20,000$

หมายเหตุ: A คือ ค่า quantity (pM), W คือ Size adjusted concentration (pM)

การเตรียมตัวอย่างก่อนลงเครื่อง Miseq (illumina®)

- เตรียม 2 nM DNA library โดยการเจือจางความเข้มข้นของตัวอย่างให้ได้ 2 nM ทุกตัวอย่าง และนำมาผสมในปริมาตรเท่ากันให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 5 μ l
- Denature 2 nM DNA library โดยผสมสารดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 แสดงสารที่ใช้ในการ Denature 2 nM library

สารเคมี	ปริมาตร(μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
DNA library	5	2 nM
NaOH	5	0.2 N
Total volume	10	

- ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 280xg เป็นเวลา 1 นาที
- บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาทีเพื่อให้ DNA แยกเป็นสายเดี่ยว

5. เจือจางสารตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 pM โดยผสมสารดังแสดงในตารางที่ 18
- ตารางที่ 18** แสดงสารที่ใช้ในการเจือจางตัวอย่างให้ได้ 10 pM

สารเคมี	ปริมาตร(μ l)
Denatured DNA	10
HT1 (Hybridization Buffer)	990
Total volume	1000

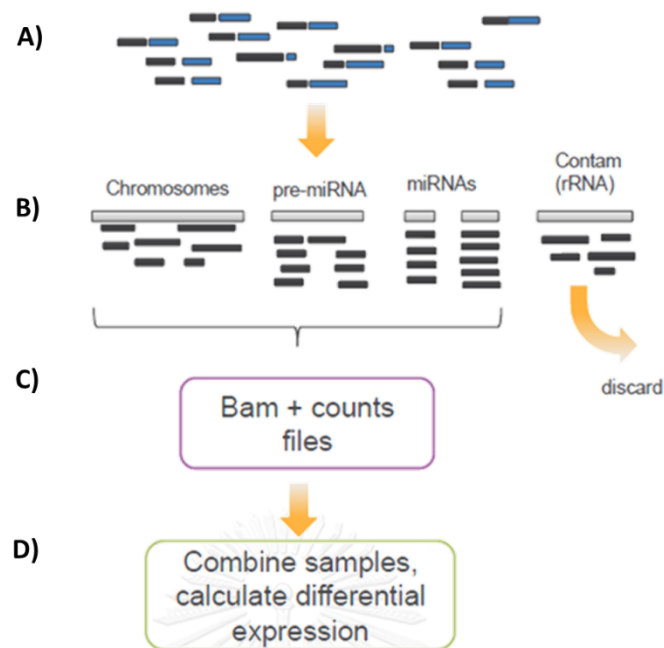
6. ผสมสารให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 280xg เป็นเวลา 1 นาที
7. ดูดสารปริมาตร 600 μ l ลงใน reagent cartridge

การวิเคราะห์ผลที่ได้จาก NGS

1. ข้อมูลที่ได้จากการทำ NGS นั้น จะออกมาในรูปแบบของ FASTQ files และคัดกรองเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีค่า Q score มากกว่าหรือเท่ากับ 30 คือ มีค่าระดับความน่าเชื่อถือของข้อมูลอย่างน้อยร้อยละ 99.9 จากนั้นจะใช้โปรแกรม CLC genomic workbench 7 ในการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วนของ adaptor ออกจากกลุ่มข้อมูลที่ต้องการ ตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 19 จากนั้นนำไปเทียบกับฐานข้อมูลจีโนมของมนุษย์ mature RNA และ miRBase (www.mirbase.org/) เพื่อระบุ miRNAs ที่พบในตัวอย่าง รวมถึงตัด RNA ชนิดอื่นๆ เช่น ribosomal RNA (rRNA) จากนั้นระบุชนิดและนับจำนวนของ miRNAs แต่ละชนิดที่พบ เพื่อนำไปคำนวณระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปของ miRNAs ในแต่ละกลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 9

ตารางที่ 19 ตัวอย่างแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adaptor

Adaptor	Nucleotide sequence (5' \rightarrow 3')
	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC



รูปที่ 9 แสดงลำดับการจัดการข้อมูลที่ได้จากกระบวนการ NGS (illumina®)

- A) คัดกรองข้อมูลที่มีค่า Q score ≥ 30 และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตัด adaptor ออก
- B) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเทียบกับฐานข้อมูลจีโนมมนุษย์และ miRbase
- C) นับความถี่ของ miRNAs แต่ละตัวที่พบ
- D) นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปของ miRNAs

2. คำนวณระดับการเปลี่ยนแปลงของ miRNAs ในกลุ่มต่าง ๆ ดังสมการ

$$\text{Normalized expression in control} = \frac{\text{miRNA of interest in control}}{\text{Total count of miRNAs in control}}$$

$$\text{Normalized expression in case} = \frac{\text{miRNA of interest in case}}{\text{Total count of miRNAs in case}}$$

$$\text{Fold changes} = \log_2 \frac{\text{Normalized expression in case}}{\text{Normalized expression in control}}$$

3. ในการหายีนเป้าหมายของ miRNAs จะใช้ฐานข้อมูล miRTarbase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php>) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่มีการรวบรวม miRNA-target interactions (MTIs) และมีหลักฐานที่น่าเชื่อถือจากงานวิจัยสนับสนุน (strong evidence support) ได้แก่ การทำ western blot, real-time PCR และ reporter assay
4. ระบุหน้าที่ของยีนเป้าหมายและ pathway ที่มีความเกี่ยวข้องโดยใช้ฐานข้อมูล PANTHER (protein annotation through evolutionary relationship) (<http://pantherdb.org/>) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่มีการรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับ gene function, ontology และ pathways ต่าง ๆ ไว้ด้วยกัน
5. ทารูปแบบการจับกันระหว่าง miRNAs และยีนเป้าหมายที่สนใจ (hybridization pattern) โดยการใช้โปรแกรม RNAhybrid (<https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการหาค่าพลังงานที่น้อยที่สุดที่ใช้ในการจับกันระหว่าง RNA สองสาย (minimum free energy: MFE)

การตรวจสอบ miRNAs ที่พบจากผล NGS โดยใช้ real-time PCR

1. คัดเลือก miRNAs ที่สนใจ
2. ตรวจสอบระดับการแสดงออกว่ามีแนวโน้มใกล้เคียงกับผลที่ได้จาก NGS หรือไม่

2.1 Polyuridylation

เป็นกระบวนการเติมเบส U ที่ปลาย 3' ของไมโครอาร์เอ็นเอ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Poly (U) polymerase รายละเอียด ดังแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 แสดงปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการทำ Polyuridylation

สารเคมี	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X NE buffer 2	2.5	1X
UTP (50 mM)	0.25	0.5 mM
Small RNA (>100 pmol)	5.0	-
RNase inhibitor (40 units/ μl)	1.0	40 Units
Poly (U) polymerase (2 units/ μl)	1.0	2 Units
Distilled water	16.2	-
Total volume	25	

บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที

2.2 Reverse transcription โดยใช้ RevertAid reverse transcriptase

1. ใส่ stem loop (SL) poly A primer (10 μ M) ปริมาตร 0.2 μ l ลงใน microcentrifuge tube
2. ใส่ Small RNA ที่เติม poly U แล้ว (จากขั้นตอน polyuridylation) ปริมาตร 12.3 μ l ผสมกับ SL poly A primer
3. บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที
4. Spin down แล้ววางบนน้ำแข็ง 2 นาที จากนั้นใส่สารเคมีดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดงปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการทำ Reverse transcription

สารเคมี	ปริมาตร (μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
5X reaction buffer	4.0	1X
RNase inhibitor (40 units/ μ l)	0.5	20 Units
dNTPs mix (10 mM)	2.0	1 mM
RevertAid Reverse Transcriptase (200U)	1.0	200 Units
Total volume	20	-

5. บ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่ 70°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงเก็บที่ -20°C

2.3 ตรวจสอบระดับการแสดงออกของ miRNAs โดยใช้ real-time PCR

เป็นการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ miRNAs ที่สนใจ โดยความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์จะเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณของผลผลิต PCR ที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับปริมาณของ DNA Template เริ่มต้นที่แตกต่างกันจะทำให้จำนวนรอบที่เริ่มต้นตรวจจับสัญญาณมีความแตกต่างกัน

งานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ U6 เป็น endogenous control เนื่องจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ทำการทดลองในเซลล์มะเร็งระดับชนิดต่าง ๆ เช่น HepG2 และ Huh7 ซึ่งนิยมใช้ในการศึกษาผลของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับผลของ IFN alpha และได้ใช้ U6 เป็น endogenous control (24, 50, 51) แสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของ U6 นั้นคงที่และไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหรือได้รับ IFN alpha-2a

ตารางที่ 22 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของ miRNA ที่มี การแสดงออกมากกว่า 1.5 เท่า ในเซลล์ที่ได้รับ HBV plasmid และยา Peg-IFN alpha-2a

Primer	Strand	Nucleotide sequence (5' → 3')
miR-23b-3p_F	Forward	ATCACATTGCCAGGGATTAC
miR-128-3p_F	Forward	CACAGTGAACCGGTCTCTT
miR-151a-5p_F	Forward	GAGGAGCTCACAGTCTAGT
miR-181b-5p_F	Forward	TTCATTGCTGTCGGTGGGT
miR-185-5p_F	Forward	TGGAGAGAAAGGCAGTTCC
miR-186-5p_F	Forward	AAAGAATTCTCCTTTTGGGCT
miR-216a-3p_F	Forward	ACAGTGGTCTCTGGGATTAT
miR-217_F	Forward	TGCATCAGGAAGTACTGATTGGA
miR-425-5p_F	Forward	AATGACACGATCACTCCCG
miR-450b-5p_F	Forward	TTTTGCAATATGTTCTGAATA
miR-483-5p_F	Forward	AAGACGGGAGGAAAGAAGG
U6	Forward	CTCGCTTCGGCAGCACA
miRNA_qPCR_R	Reverse	GCAGGGTCCGAGGTATTC

ตารางที่ 23 แสดงส่วนผสมสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี real-time PCR

สารเคมี	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Distilled water	4.4	-
2X Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	6.3	1X
10 μM Forward primer	0.4	0.32 μM
10 μM Reverse primer	0.4	0.32 μM
Template DNA	1.0	-
Total volume	12.5	

นำ PCR tube ที่ใส่ส่วนผสมของสารเคมีทั้งหมดใส่ในเครื่อง Thermal cycler (Eppendorf master cycler personal) ในสภาวะอุณหภูมิ ดังแสดงในตารางที่ 24-29

ตารางที่ 24 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของ miR-186

PCR cycle	อุณหภูมิ	เวลา	
Pre-denaturation	95°C	3 นาที	} ทำซ้ำ 50 รอบ
Denaturation	94°C	15 วินาที	
Annealing/Extension	60°C	30 วินาที	

ตารางที่ 25 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของ miR-217

PCR cycle	อุณหภูมิ	เวลา	
Pre-denaturation	95°C	3 นาที	} ทำซ้ำ 50 รอบ
Denaturation	94°C	15 วินาที	
Annealing/Extension	61°C	30 วินาที	

ตารางที่ 26 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของ miR-23b, miR-181b, miR-128-3p, miR-151a, miR-185 และ miR-483

PCR cycle	อุณหภูมิ	เวลา	
Pre-denaturation	95°C	3 นาที	} ทำซ้ำ 50 รอบ
Denaturation	94°C	15 วินาที	
Annealing/Extension	62°C	30 วินาที	

ตารางที่ 27 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของ miR-425

PCR cycle	อุณหภูมิ	เวลา	
Pre-denaturation	95°C	3 นาที	} ทำซ้ำ 50 รอบ
Denaturation	94°C	15 วินาที	
Annealing	62°C	30 วินาที	
Extension	72°C	30 วินาที	

ตารางที่ 28 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของ miR-216a

PCR cycle	อุณหภูมิ	เวลา	
Pre-denaturation	95°C	3 นาที	
Denaturation	94°C	15 วินาที	} ทำซ้ำ 50 รอบ
Annealing	59°C	30 วินาที	
Extension	60°C	30 วินาที	

ตารางที่ 29 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของ U6

PCR cycle	อุณหภูมิ	เวลา	
Pre-denaturation	94°C	3 นาที	
Denaturation	95°C	15 วินาที	} ทำซ้ำ 50 รอบ
Annealing	55°C	30 วินาที	
Extension	60°C	30 วินาที	

บันทึกค่า Threshold cycle (Ct) แล้วคำนวณหา relative quantitation ดังสมการ

$$\text{ปริมาณเชิงเปรียบเทียบ} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{sample}) - \Delta Ct (\text{calibrator})$$

$$\Delta Ct (\text{sample}) = Ct (\text{miRNA of sample}) - Ct (\text{U6 of sample})$$

$$\Delta Ct (\text{calibrator}) = Ct (\text{miRNA of calibrator}) - Ct (\text{U6 of calibrator})$$

จากนั้นวิเคราะห์และนำไปคำนวณเพื่อหาค่าทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

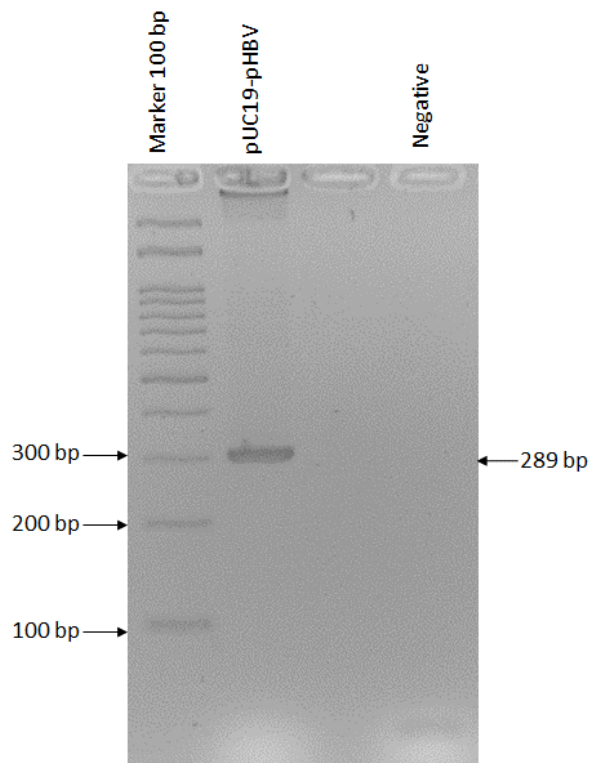
1. ระดับการแสดงออกของ miRNAs จะถูกนำเสนอสร้างเป็น scatter plot เพื่อเปรียบเทียบกลุ่มที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลง โดยใช้โปรแกรม Graphpad version 6
2. ระดับการแสดงออกของ miRNAs ที่เปลี่ยนแปลงไปนั้น พบว่าโดยมากค่าที่ใช้เป็น cut-off จะใช้ค่า fold change ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 1.5 เท่า เพื่อแสดงว่า miRNAs มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (52) ในงานวิจัยนี้จึงจะใช้เกณฑ์ดังนี้
 - ค่า fold change มากกว่า 1.5 จะถือว่า miRNAs นั้นมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในกลุ่มทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
 - ค่า fold change อยู่ในช่วง 1.5 ถึง -1.5 จะถือว่า miRNAs ไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
 - ค่า fold change น้อยกว่า -1.5 จะถือว่า miRNAs นั้นมีการแสดงออกลดลงในกลุ่มทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
3. Relative quantitation โดยวิธี Delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ใช้คำนวณหาปริมาณเชิงเปรียบเทียบของ DNA ระหว่างตัวอย่างที่สนใจกับตัวอย่างควบคุม โดยผลการเปรียบเทียบจะแสดงออกมาในรูปจำนวนเท่าที่แตกต่างกัน
4. การวิเคราะห์ทางสถิติจะใช้วิธี Student's t-test ในโปรแกรม SPSS software version 22.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($P < 0.01$)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การเพิ่มจำนวนพลาสมิด pUC19-HBV (genotype C) โดยอาศัยเทคนิค transformation

การตรวจสอบพลาสมิด pUC19-HBV (genotype C) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

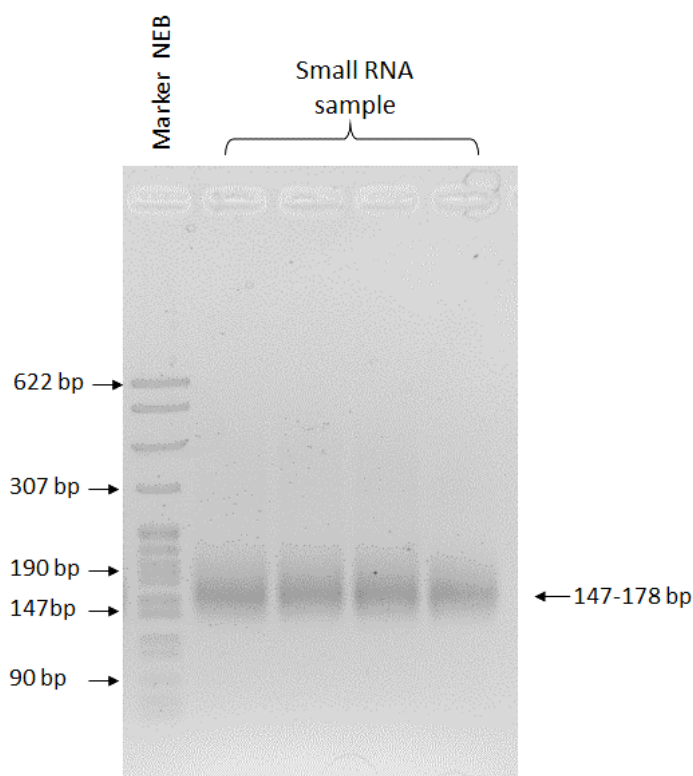
หลังจากเพิ่มจำนวนพลาสมิด pUC19-HBV (genotype C) ด้วยวิธีการ cloning จะนำโคโลนีสีมาตรวจสอบพลาสมิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อ genome ของ HBV จีโนไทป์ C



รูปที่ 10 ผลการตรวจสอบพลาสมิด pUC19-HBV (genotype C) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
ในการตรวจสอบใช้ pUC19-HBV genotype C _F และ pUC19-HBV genotype C _R primer ใน 3% agarose gel

ผลการเตรียมกลุ่มตัวอย่าง small RNA (Small RNA Library Preparation)

หลังจากบ่มเซลล์ Huh7 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะสกัด small RNA จากเซลล์ Huh7 ทั้ง 4 กลุ่ม นำมาวัดความเข้มข้นของ RNA ที่ได้ด้วย Qubit™ RNA assay kits จากนั้นจะนำมาเตรียมตัวอย่าง small RNA โดยใช้ NEBNext multiplex small RNA library preparation ก่อนจะนำลงเครื่อง Miseq (illumina®)



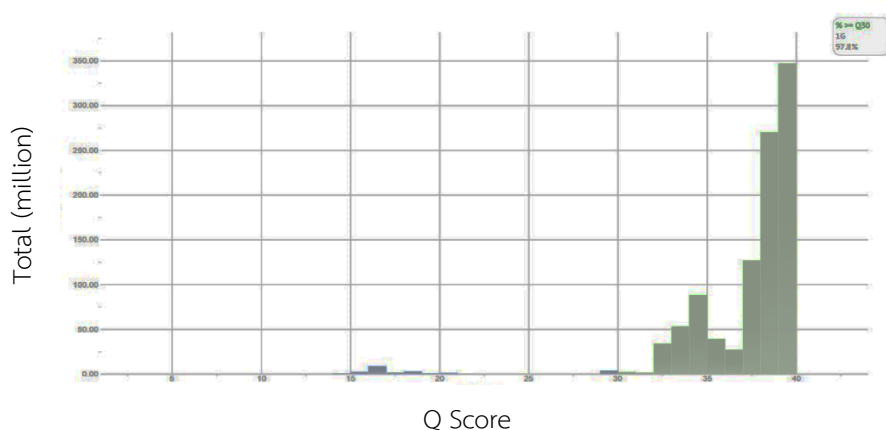
รูปที่ 11 ผลการเตรียมตัวอย่าง Small RNA

จากตัวอย่างแสดงการเตรียม small RNA ใน 3% agarose gel พบว่า small RNA หลังจากมีการติด index และ adaptor มีขนาดประมาณ 147-178 bp

ผลข้อมูลที่ได้จากการทำ NGS

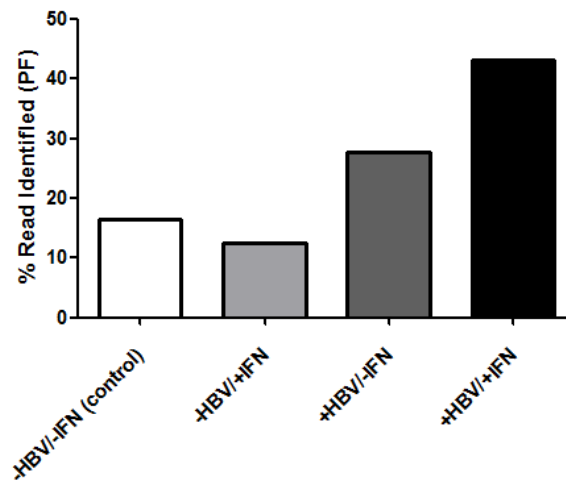
หลังจากที่ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (reads) จากเครื่อง NGS พบว่าร้อยละ 97.8 ของข้อมูลที่มีค่า Q score มากกว่าหรือเท่ากับ 30 แปลผลได้ว่าร้อยละ 97.8 ของข้อมูลที่มีระดับความความน่าเชื่อถืออยู่ที่ร้อยละ 99.9 และมีข้อมูลที่ถูกคัดออกเพียงร้อยละ 2.2 ดังที่แสดงในรูปที่ 12 และเมื่อพิจารณา miRNAs ที่พบในแต่ละกลุ่ม ดังที่แสดงในรูปที่ 13 พบว่า

- กลุ่มควบคุม (-HBV/-IFN) พบ miRNAs ทั้งหมด 149 miRNA มีจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ (reads) ทั้งหมด 615,152 คิดเป็นร้อยละ 16.41
- กลุ่มที่ได้รับยา Peg-IFN alpha-2a (-HBV/+IFN) พบ miRNAs ทั้งหมด 171 miRNA มีจำนวน reads ทั้งหมด 471,945 คิดเป็นร้อยละ 12.59
- กลุ่มที่ได้รับ HBV plasmid (+HBV/-IFN) พบ miRNAs ทั้งหมด 181 miRNA มีจำนวน reads ทั้งหมด 1,041,008 คิดเป็นร้อยละ 27.78
- กลุ่มที่ได้รับ HBV plasmid และ Peg-IFN alpha-2a (+HBV/+IFN) พบ miRNAs ทั้งหมด 201 miRNA มีจำนวน reads ทั้งหมด 1,620,550 คิดเป็นร้อยละ 43.23



รูปที่ 12 แสดง Q score distribution

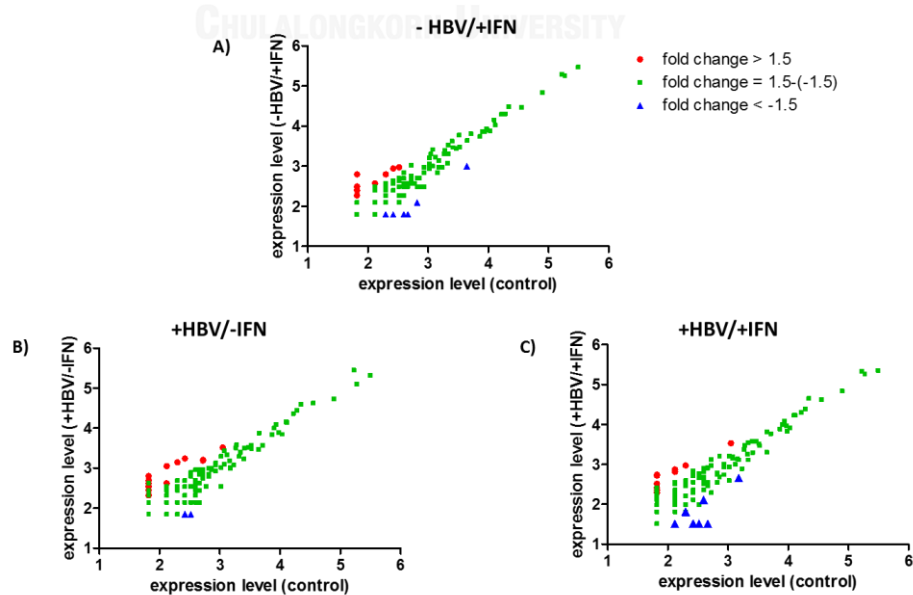
โดยแกน X เป็นค่า Q score และแกน Y เป็นจำนวนของลำดับเบสสายสั้น ๆ (reads) ที่พบ จะเห็นว่าข้อมูลโดยรวมนั้นมีค่า Q score มากกว่า 30 คิดเป็นร้อยละ 97.8



รูปที่ 13 แสดงจำนวน read ที่พบในแต่ละตัวอย่างในรูปแบบของร้อยละ โดยแกน X แสดงกลุ่มของตัวอย่างและแกน Y แสดงร้อยละของจำนวนลำดับเบสสายสั้น ๆ (reads) ที่พบในแต่ละกลุ่ม

ผลการวิเคราะห์ miRNAs ที่ได้จากการทำ NGS

นำผลที่ได้จากการทำ NGS มาวิเคราะห์เทียบกับฐานข้อมูลเพื่อหา miRNAs ที่มีการแสดงออกในเซลล์ Huh7 กลุ่มต่าง ๆ จากนั้นนำมาคำนวณเพื่อหาระดับการแสดงออกของ miRNAs ที่พบ นำมาเทียบกับกลุ่มควบคุมเพื่อดูระดับการแสดงออกของ miRNAs ที่เปลี่ยนแปลงไป จากนั้นทำ scatter plot เพื่อดูภาพรวมของ miRNAs ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปในเซลล์ Huh7 กลุ่มต่าง ๆ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 14 Scatter plot แสดงค่า differential expression ของ miRNAs

จาก scatter plot แสดงค่า differential expression ของ miRNAs ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง และกลุ่มควบคุม (-HBV/-IFN)

A) miRNAs ที่มีการแสดงออกในกลุ่มที่ได้รับยา Peg-IFN alpha-2a (-HBV/+IFN)

B) miRNAs ที่มีการแสดงออกในกลุ่มที่ได้รับ HBV plasmid (+HBV/-IFN)

C) miRNAs ที่มีการแสดงออกในกลุ่มที่ได้รับ HBV plasmid และ Peg-IFN alpha-2a (+HBV/+IFN)

หมายเหตุ: วงกลมเป็นตัวแทนของ miRNAs ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (fold changes >1.5) สีเหลี่ยมจตุรัสแสดง miRNAs ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออก และ สามเหลี่ยม แสดง miRNAs ที่มีระดับการแสดงออกลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (fold changed < -1.5)

ผลการวิเคราะห์ miRNAs ที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกมากกว่า 1.5 เท่า ด้วย NGS

miRNAs ที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปในเซลล์ Huh7 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมมากกว่า 1.5 เท่า จะถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามแผนภาพเวนน์ (Venn diagram) รูปที่ 15 เพื่อแสดงให้เห็นถึง miRNAs ที่พบร่วมกันระหว่างเซลล์ Huh7 กลุ่มต่าง ๆ และ miRNAs ที่มีความโดดเด่นเฉพาะกลุ่มที่ต้องการศึกษาเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากรูปที่ 15 ในกลุ่มที่ได้รับ HBV plasmid พบว่ามีระดับการแสดงออกของ miRNAs ที่เพิ่มสูงขึ้นทั้งหมด 22 miRNAs ได้แก่ miR-15b-5p, miR-140-3p, miR-146a-5p, miR-210-3p, miR-328-3p, miR-342-3p, miR-502-3p, miR-3607-3p, miR-19b-3p, miR-20a-5p, miR-27b-5p, miR-1180-3p, miR-1266-5p, miR-3129-3p, let-7g-5p, let-7a-5p, miR-374b-5p, miR-574-5p, miR-32-5p, miR-130b-5p, miR-378a-3p และ miR-4791 (รูปที่ 15 A) และมี 2 miRNAs ที่มีการแสดงออกลดลง ได้แก่ miR-194-3p และ miR-92b-3p (รูปที่ 15 B)

ส่วนในกลุ่มที่ได้รับยา Peg-IFN alpha-2a นั้น พบว่ามีระดับการแสดงออกของ miRNAs ที่เพิ่มสูงขึ้นทั้งหมด 20 miRNAs ได้แก่ let-7e-5p, miR-140-5p, miR-378d-3p, miR-450b-5p, miR-455-5p, miR-885-5p, miR-1304-3p, miR-1908-5p, miR-7706, miR-19b-3p, miR-20a-5p, miR-27b-5p, miR-1180-3p, miR-1266-5p, miR-3129-3p, let-7g-5p, let-7a-5p, miR-374b-5p, miR-574-5p และ miR-19a-3p (รูปที่ 15 A) และมี 8 miRNAs ที่มีการแสดงออกลดลง ได้แก่ miR-21-3p, miR-99b-3p, miR-143-3p, miR-331-3p, miR-660-5p, miR-1303, miR-16-2-3p, miR-615-3p (รูปที่ 15 B)

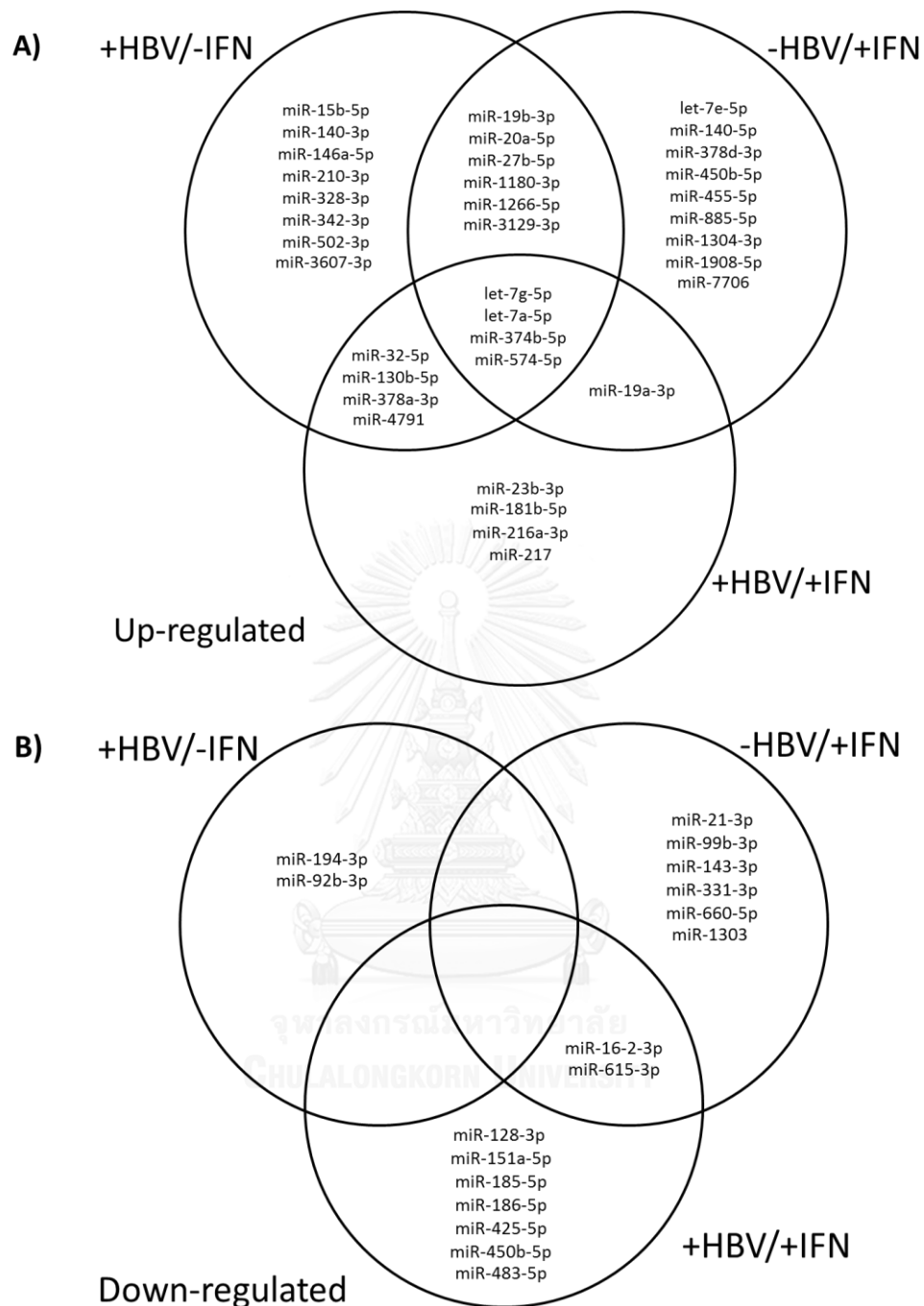
กลุ่มที่ได้รับ HBV plasmid ร่วมกับยา Peg-IFN alpha-2a นั้น พบว่ามีระดับการแสดงออกของ miRNAs ที่เพิ่มสูงขึ้นทั้งหมด 13 miRNAs ได้แก่ miR-23b-3p, miR-181b-5p, miR-216a-3p, miR-217, let-7g-5p, let-7a-5p, miR-374b-5p, miR-574-5p, miR-32-5p, miR-130b-5p, miR-

378a-3p, miR-4791 และ miR-19a-3p และมี 9 miRNAs ที่มีการแสดงออกลดลง ได้แก่ miR-128-3p, miR-151a-5p, miR-185-5p, miR-186-5p, miR-425-5p, miR-450b-5p, miR-483-5p, miR-16-2-3p และ miR-615-3p

นอกจากนี้ยังมี miRNAs บางส่วนที่มีการแสดงออกสอดคล้องกันระหว่าง 3 กลุ่มตัวอย่าง คือ กลุ่มที่ได้รับ HBV plasmid, กลุ่มที่ได้รับยา Peg-IFN alpha-2a และ กลุ่มที่ได้รับ HBV plasmid และยา Peg-IFN alpha-2a ได้แก่ let-7g-5p, let-7a-5p, miR-374b-5p และ miR-574-5p มีระดับการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น และกลุ่มของ miRNAs มีการแสดงออกสูงขึ้นสอดคล้องกันระหว่างกลุ่มที่ได้รับ HBV plasmid เพียงอย่างเดียวและยา Peg-IFN alpha-2a เพียงอย่างเดียว ได้แก่ miR-19b-3p, miR-20a-5p, miR-27b-5p, miR-1180-3p, miR-1266-5p และ miR-3129-3p รวมถึงกลุ่มที่มีการแสดงออกสูงขึ้นสอดคล้องกันระหว่างกลุ่มที่ได้รับ HBV plasmid เพียงอย่างเดียวและได้รับ HBV plasmid ร่วมกับยา Peg-IFN alpha-2a ได้แก่ miR-32-5p, miR-130b-5p, miR-378a-3p และ miR-4791 ซึ่งการแสดงออกของ miRNAs ในกลุ่มต่างๆ ที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นนั้นมีความเป็นไปได้ว่าเมื่อเซลล์มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจะไปกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ IFNs response ภายในเซลล์ (endogenous IFNs) และมีการแสดงออกของ endogenous IFNs ในระดับต่างๆ เพียงพอที่จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miRNAs ในกลุ่มดังกล่าว

ในขณะที่การแสดงออกของ miRNAs ที่สอดคล้องกันระหว่างกลุ่มที่ได้รับยา Peg-IFN alpha-2a เพียงอย่างเดียว และได้รับ HBV plasmid ร่วมกับยา Peg-IFN alpha-2a พบว่ามีเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ miR-19a-3p, miR-16-2-3p และ miR-615-3p นั้นน่าจะมีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miRNAs เมื่อเซลล์ได้รับ IFNs จากภายนอก (exogenous IFN) มากเพียงพอที่จะกระตุ้น miRNAs ในกลุ่มนี้

ในงานวิจัยนี้ต้องการที่จะศึกษารูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ในเซลล์เพาะเลี้ยง Huh7 ที่มีสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และได้รับ Peg-IFN alpha-2a จึงได้คัดเลือก miRNA ที่สนใจ คือ มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกมากกว่า 1.5 เท่าในเฉพาะกลุ่มที่มีการ transfect ด้วย HBV plasmid ร่วมกับการบ่มด้วยยา Peg-IFN alpha-2a และไม่ซ้มนับกับกลุ่มตัวอย่างอื่น ๆ มาทั้งหมด 11 miRNAs ได้แก่ miR-23b, miR-181b, miR-216a และ miR-217 ในกลุ่มที่มีระดับการแสดงออกของ miRNAs เพิ่มสูงขึ้น (รูปที่ 15 A) และ miR-128, miR-151a, miR-185, miR-186, miR-425, miR-450b และ miR-483 ในกลุ่มที่มีระดับการแสดงออกของ miRNAs ลดลง (รูปที่ 15 B) และหลังจากนี้ไปจะศึกษาเฉพาะ miRNAs ที่สนใจในกลุ่มนี้เท่านั้น แต่เนื่องจาก primer ของ miR-450b ไม่สามารถใช้ในการวัดระดับการแสดงออกของ miR-450b ได้จริง เนื่องจากเกิด primer dimer จึงไม่ได้มีการแสดงค่าระดับการแสดงออกของ miR-450b ด้วยเทคนิค real-time PCR



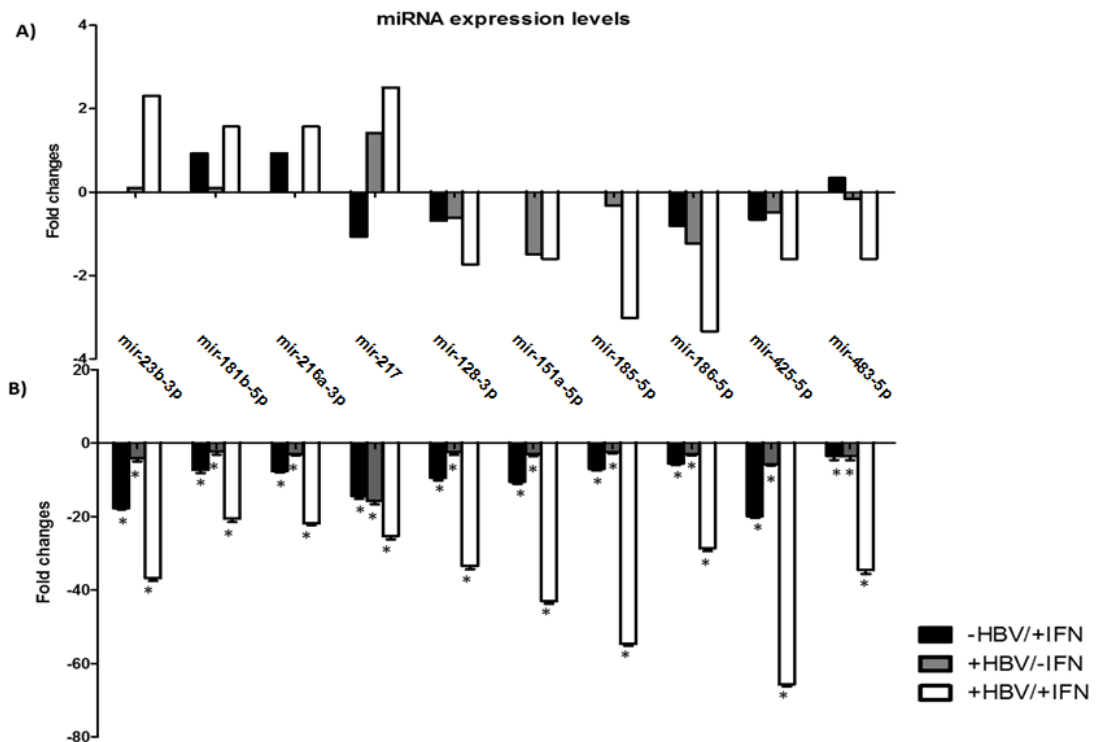
รูปที่ 15 แผนภาพเวนน์ (Venn diagram) แสดง miRNAs ในเซลล์ Huh7 ที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง (-HBV/+IFN, +HBV/-IFN และ +HBV/+IFN) มากกว่า 1.5 เท่า (fold changes > 1.5) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (-HBV/-IFN)

A) แสดง miRNAs ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในกลุ่มตัวอย่างเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

B) แสดง miRNAs ที่มีการแสดงออกลดลงในกลุ่มตัวอย่างเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการวิเคราะห์ miRNAs ที่สนใจด้วยเทคนิค real-time PCR

จากผลการทดลองพบว่ามี 6 miRNAs (miR-128, miR-151a, miR-185, miR-186, miR-425 และ miR-483) ที่มีการแสดงออกลดลงในเซลล์ Huh7 ที่มีการ transfect ด้วย HBV plasmid และได้รับยา Peg-IFN alpha-2a สอดคล้องกันทั้งผลจาก NGS และ real-time PCR ดังที่แสดงในรูปที่ 16



รูปที่ 16 ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปของ miRNAs ที่สนใจในเซลล์ Huh7 โดยเทคนิค NGS และ real-time PCR

A) การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ miRNAs ด้วยวิธี NGS ที่มีค่า fold-change มากกว่า 1.5 เท่า ในเซลล์ Huh7 ที่มีการ transfect ด้วย HBV plasmid ร่วมกับบ่มด้วย Peg-IFN alpha-2a เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

B) การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ miRNAs ด้วยวิธี real-time PCR โดยการใช้การคำนวณแบบ relative quantitation ในเซลล์ Huh7 ที่มีการ transfect ด้วย HBV plasmid ร่วมกับบ่มด้วย Peg-IFN alpha-2a เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

หมายเหตุ: * คือ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.01$)

ผลการทำนายยีนเป้าหมายของ miRNAs ที่สนใจ

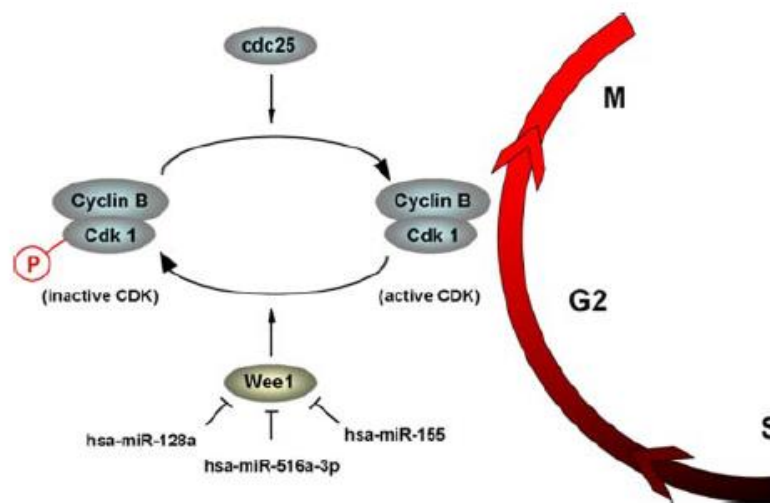
ยีนเป้าหมายของ miRNAs ที่สนใจได้มาจากการทำนายด้วยโปรแกรม miRTarbase และ Panther โดยเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกลไกทางชีวภาพ (biological process) และ ระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) ร่วมกับการทบทวนวรรณกรรมเพิ่มเติม ได้ผลดังที่แสดงในตารางที่ 30 ตารางที่ 30 แสดง miRNAs และยีนเป้าหมายพร้อมทั้งบทบาททางชีวภาพ

miRNAs	Target gene of miRNAs	Biological process	Reference
miR-128	WEE1 G2 checkpoint kinase (<i>Wee1</i>)	Cell proliferation	(53)
miR-151a	Thrombopoietin receptor (<i>TpoR</i>)	Cell proliferation Megakaryopoiesis	(54)
miR-185	Marginal zone B and B1 cell-specific protein (<i>Mzb1</i>)	T cells and B cells development	(55)
	Burton tyrosine kinase (<i>BTK</i>)		(56)
miR-186	A kinase anchor protein 12 (<i>AKAP12/ AKAP250/Gravin</i>)	Cell proliferation	(57)
miR-425	phosphatase and tensin homolog (<i>PTEN</i>)	Cell proliferation Apoptosis	(58)
miR-483	Notch Homolog 3 (<i>Notch3</i>)	T cells and B cells development	(59)
	Mitogen-Activated Protein Kinase 3 (<i>MAPK3</i>) or Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 (<i>ERK1</i>)		(60)

การทำนายยีนเป้าหมายและบทบาททางชีวภาพของ miRNAs ในกลุ่มที่ได้รับ HBVplasmid และ Peg-IFN alpha-2a

miR-128 และยีน *Wee1* kinase

จากงานวิจัยของ Butz และคณะ ในปี 2010 (61) พบว่า เมื่อมีการแสดงออกของ miR-128 เพิ่มขึ้นจะสามารถไปลดการแสดงออกของ *Wee1* kinase ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไปจับบริเวณปลายด้าน 3' ของยีน ซึ่ง *Wee1* kinase นั้นมีบทบาทสำคัญในการควบคุมวัฏจักรเซลล์ ทำหน้าที่เป็น mitotic inhibitor ยับยั้งการแบ่งเซลล์ผ่านการยับยั้งการทำงานของ Cdk1 ทำให้เซลล์ไม่สามารถเข้าสู่ระยะ G2/M checkpoint ได้ (53) ดังแสดงในรูปที่ 17 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Legrand และคณะ ในปี 2004 ที่พบว่า IFN-alpha สามารถยับยั้งวัฏจักรเซลล์ในเซลล์ Huh7 ได้ โดยพบว่าการแสดงออกลดลงของเซลล์ในระยะ G2/M (62) จากข้อมูลข้างต้นจึงอาจสรุปได้ว่า miR-128 สามารถควบคุมการแสดงออกของ *Wee1* kinase ได้ ซึ่งอาจเป็นหนึ่งในกลไกที่ควบคุมการทำงานของวัฏจักรเซลล์

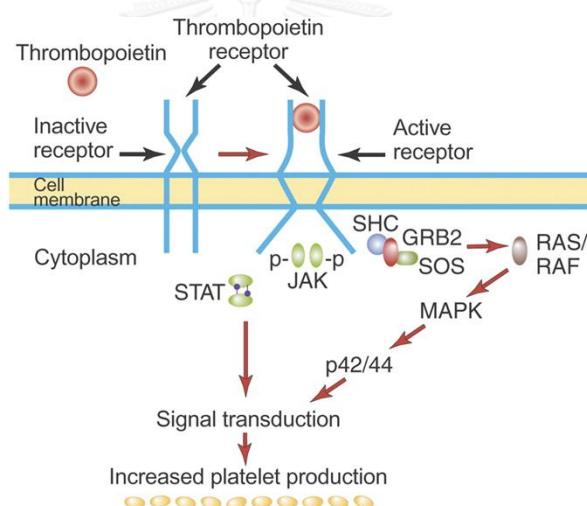


รูปที่ 17 แผนภาพแสดงบทบาทของ *Wee1* kinase ในการควบคุมวัฏจักรเซลล์ (61)

ในขณะเดียวกันงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้พบว่า IFN นั้นสามารถลดการแสดงออกของ *Wee1* kinase ใน daudi burkitt lymphoma cells แต่กลับส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ จึงมีความเป็นไปได้ว่าการควบคุมการแสดงออกของวัฏจักรเซลล์เมื่อมีการกระตุ้นด้วย IFN ใน daudi burkitt lymphoma cells นั้น ไม่ได้ถูกควบคุมโดยตรงผ่าน *Wee1* kinase แต่ถูกควบคุมผ่านทาง cyclin A และ cdk2 (63) ดังนั้นการศึกษาถึงบทบาทของ *Wee1* kinase ในการตอบสนองต่อ IFN ในเซลล์ดังนั้นก็ยังคงต้องมีการศึกษาเพื่อยืนยันต่อไปรวมถึงยังไม่พบการรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่าง miR-128 และการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

miR-151a และยีน *TpoR/MPL*

จากงานวิจัยของ Girardot และคณะในปี 2010 (54) พบว่ายีนเป้าหมายของ miR-151a คือ thrombopoietin receptor (*TpoR*, *MPL*) ซึ่งทำหน้าที่หลักในการควบคุม dimeric cytokine receptors ที่เกี่ยวข้องกับ Janus kinase (*JAK2*) มีบทบาทในการควบคุมกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โปรแกรมการตายของเซลล์ และ กระบวนการสร้างเกล็ดเลือด (megakaryopoiesis) การลดลงของ miR-151a นั้นจึงคาดว่าจะไปเพิ่มการแสดงออกของ *TpoR* และส่งผลให้มีกระบวนการสร้างเกล็ดเลือดเพิ่มสูงขึ้น แต่ในงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า IFN-alpha ไปลดการแสดงออกของ thrombopoietin (TPO) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้สร้าง megakaryocyte (MK) ส่งผลให้ไปยับยั้งกระบวนการสร้างเกล็ดเลือด (64) ดังที่แสดงในรูปที่ 18 ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ miR-151a กับระดับการแสดงออกของ *TpoR* ต่อกลไกการสร้างเกล็ดเลือดนั้น จำเป็นจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป



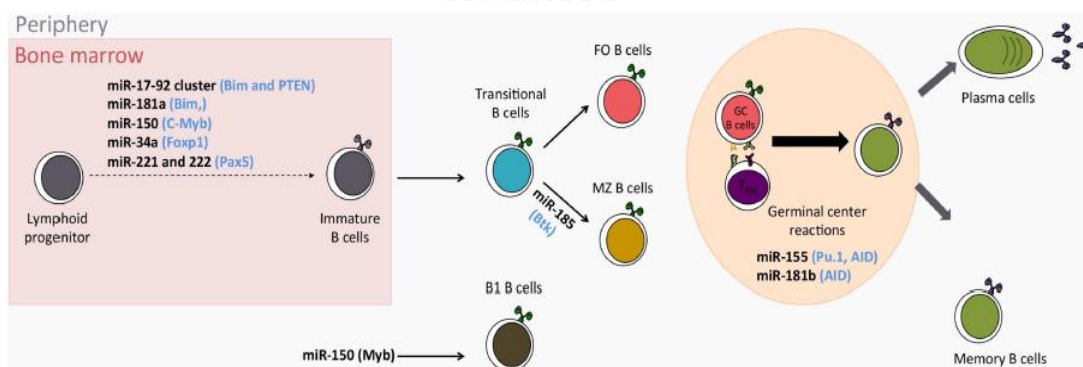
รูปที่ 18 แสดงกลไกการตอบสนองของ *TpoR* ต่อ TPO

TPO กระตุ้นให้มีการทำงานของ *TpoR* ส่งผลให้มีการกระตุ้นการทำงานของ signal transduction ต่างๆ กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์และกระบวนการสร้างเกล็ดเลือด (65)

miR-185 และยีน *Mzb1* และ *Btk*

งานวิจัยของ Belkaya และคณะในปี 2013 (55) พบว่าการแสดงออกของ miR-185 มีระดับคงที่ในหลายเนื้อเยื่อ เช่น ไทมัดส สมอง หัวใจ ไต ตับ ปอด ผิวหนัง และม้าม และยังพบว่า miR-185 ควบคุม T cell development โดยผ่านทางยีนเป้าหมาย คือ marginal zone B and B1 cell-specific protein (*Mzb1*) ที่มีระดับการแสดงออกของค่อนข้างสูงใน DN3 thymocytes และ Jurkat T cells ซึ่งการที่ระดับการแสดงออกของ miR-185 เพิ่มสูงขึ้นนั้นจะไปลดการแสดงออกของ *Mzb1*

ส่งผลต่อประสิทธิภาพของ T cell receptor (TCR) ในการควบคุมการไหลของ calcium responses ภายในเซลล์ส่งผลให้หยุดการพัฒนาของ T cell และพบว่าโปรตีน Mzb1 ยังทำหน้าที่เป็น endoplasmic reticulum (ER) ควบคุม calcium responses ของ B-cell antigen receptor (BCR) และการเปลี่ยนแปลงจาก B cell ไปเป็น plasma cell รวมถึงควบคุมการหลั่ง mature IgM อีกด้วย (56) นอกจากนี้งานวิจัยของ Belver และคณะ ในปี 2010 (66) พบว่า miR-185 สามารถควบคุมการแสดงออกของยีน burton tyrosine kinase (*BTK*) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณของ BCR โดยการไป phosphorylate Erk pathway โดยหากมีการแสดงออกของ miR-185 ในปริมาณมาก จะไปลดการพัฒนาของ BCR และระดับการส่งสัญญาณของ BCR ซึ่งมีความจำเป็นต่อการพัฒนาไปเป็น follicular B cell ต่อไป (66, 67) ดังแสดงในรูปที่ 19 จึงอาจสรุปได้ว่า miR-185 นั้น มีบทบาทในการควบคุม T cells และ B cells ของมนุษย์



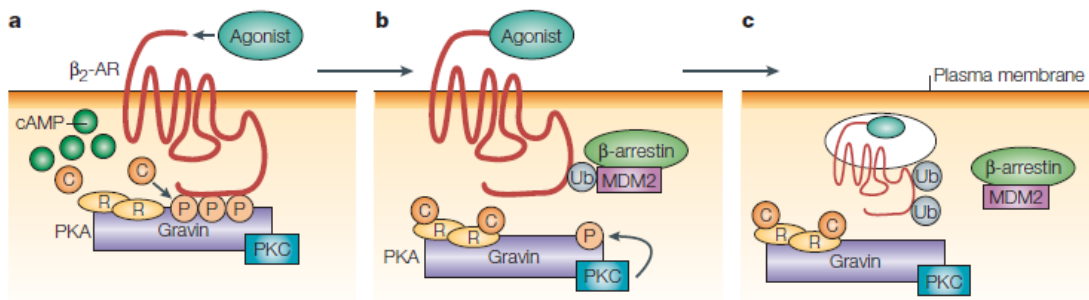
รูปที่ 19 แสดงบทบาทของ miRNAs-185 ในการพัฒนา B cells (67)

ในวงเล็บ: miRNA targets, FO: Follicular B cells, MZ: Marginal zone B cells

miR-186 และยีน *AKAP12/AKAP250/Gravin*

งานวิจัยของ Goepfert และคณะ ในปี 2010 (57) พบว่า miR-186 สามารถควบคุมการแสดงออกของยีน A kinase anchor protein 12 (*AKAP12/AKAP250/Gravin*) ทำหน้าที่เป็น tumor suppressor โดยไปลดระดับการแสดงออกของ cyclin D1 ยับยั้งการทำงานของ ERK2 และ actin cytoskeleton เป็นศูนย์กลางในการควบคุมการส่งสัญญาณของ protein kinase A (PKA) และ protein kinase C (PKC) ซึ่ง *Gravin* จะมีการทำงานเมื่อมีการกระตุ้นผ่านทาง β 2-adrenergic receptor (β 2-AR) เกิดเป็น β 2-adrenergic-receptor-gravin complex โดยเริ่มแรก PKA จะเป็นตัวกลางในการเติมฟอสเฟตให้กับ *Gravin* ทำให้เกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ β 2-AR จากนั้น PKC จะเป็นตัวกลางในการเติมฟอสเฟตให้กับ *Gravin* ส่งผลให้ protein complex หลุดออกจาก β 2-AR และเพื่อยืดระยะเวลาในการกระตุ้นการทำงาน จะมีโปรตีน β -arrestin เชื่อมกับ mouse double minute-2 (MDM2) ทำหน้าที่จับกับ E3 ubiquitin และเติม ubiquitin จากนั้น receptor

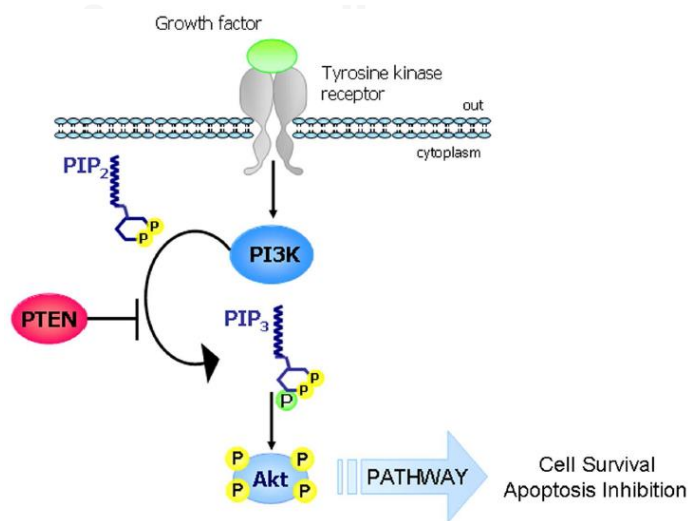
ที่ถูกเติมด้วย ubiquitin จะเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์และเกิดกระบวนการย่อยสลายโปรตีนต่อไป ดังที่แสดงในรูปที่ 20 (68) ซึ่งพบว่าการลดระดับการแสดงออกของ Gravin มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ โดยจะมีการแสดงออกลดลงตามระดับความรุนแรงของโรค ดังนี้ normal liver, non-cirrhotic, peritumorous, cirrhotic, dysplastic nodule และ HCC ตามลำดับ (57) รวมถึงมีการแสดงออกลดลงในมะเร็งหลายชนิด (69, 70) อีกทั้งในผู้ป่วยมะเร็งตับที่ได้รับการผ่าตัดแล้ว และมีการกลับมาเป็นซ้ำของโรคมะเร็งตับในระยะ late recurrent จะมีระดับการแสดงออกของ miR-186 สูงขึ้น (71)



รูปที่ 20 หลักการควบคุมการแสดงออกของ β 2-adrenergic-receptor-gravin complex (68)

miR-425 และยีน *PTEN*

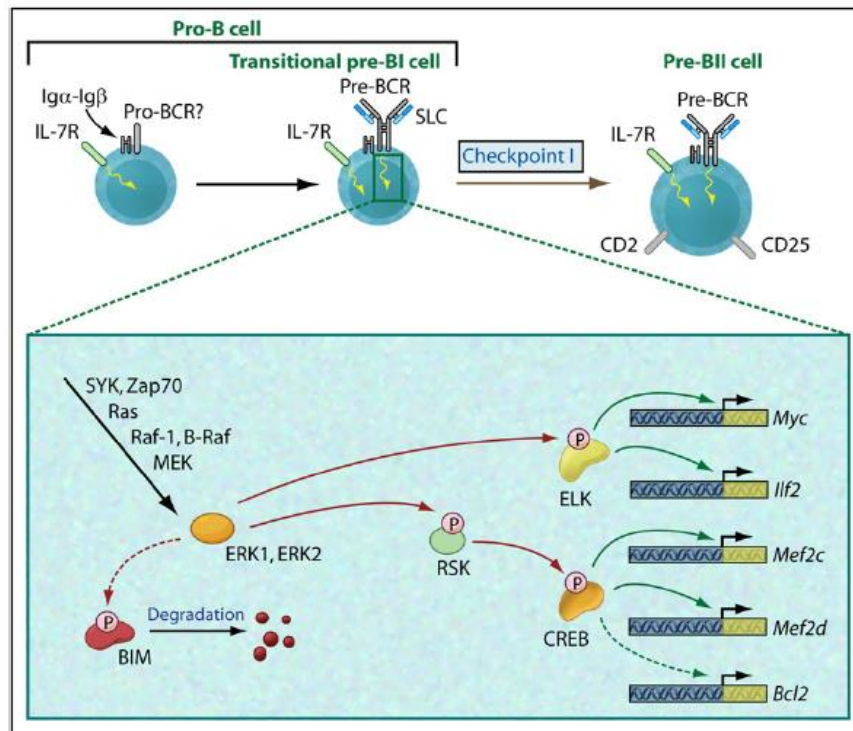
จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า miR-425 มีการแสดงออกสูงขึ้นในสถานะที่เป็นตับแข็งและมะเร็งตับ (72) สามารถยับยั้งการแสดงออกของ phosphatase and tensin homolog (*PTEN*) ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เนื่องจาก *PTEN* นั้นทำหน้าที่ไปยับยั้งการทำงานของ PI3K/Akt signaling ที่มีบทบาทไปกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์รวมถึงยับยั้งโปรแกรมการตายของเซลล์ (58) ดังที่แสดงในรูปที่ 21 ดังนั้นการแสดงออกที่ลดลงของ miR-425



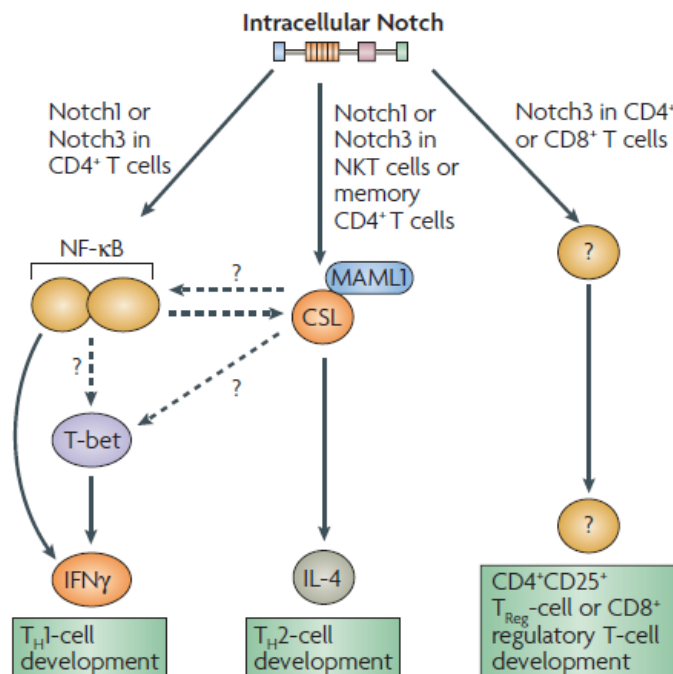
รูปที่ 21 แสดงกลไกการทำงานของ PI3K-PTEN-Akt (73)

miR-483-3p และยีน *Notch3* และ *MAPK3/ERK1*

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า miR-483-5p นั้นมีระดับการแสดงออกที่สูงในซีรัมของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับ (74) แต่พบว่ามีการแสดงออกลดลงในเนื้อเยื่อของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับเนื่องจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (75) miR-483-5p ทำหน้าที่เสมือนเป็น oncogene มียีนเป้าหมาย คือ *Notch3* และ *MAPK3/ERK1* (76) โดยพบว่า *Notch3* นั้นมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาของ T cell โดยเมื่อมีการทำงานของ *Notch* จะไปกระตุ้นการทำงานของ *NF-κB* ซึ่งไปส่งผลให้มีการแสดงออกของ T helper 1 (T_H1)-cell และยีนอื่นๆที่เกี่ยวข้อง ในขณะที่เดียวกันการแสดงออกของ *Notch3* มีการแสดงออกผ่านกระบวนการ CSL (CBF1 - suppressor of hairless-Lag1) -MAML1 (Mastermind-like 1) ส่งผลต่อกระบวนการสร้าง interleukin-4 (IL-4) และ T helper 2 (T_H2)-cell รวมถึงส่งผลต่อการพัฒนาของ $CD4^+CD25^+$ regulatory T (T_{Reg}) cells และ $CD8^+$ regulatory T cells (59, 77) มีบทบาทควบคุมการหลังของไซโตไคน์ในระบบภูมิคุ้มกัน ดังที่แสดงในรูปที่ 22 และพบว่า *MAPK3/ERK1* มีบทบาทในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงของ B- cell ซึ่งการกระตุ้นการทำงานของ *ERK1* และ *ERK2* ผ่าน pre-BCR มีความจำเป็นในการเปลี่ยนแปลงจาก pro-B cell ไปเป็น pre-B II cell รวมถึงกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ pre-B II cell โดยไป phosphorylated ELK และ CREB ซึ่งทำหน้าที่เป็น transcription factor ของยีน *c-Myc*, *Ilf2*, *Mef2C* และ *Mef2D* มีบทบาทในการเพิ่มจำนวนของ pre-B II cell และยังพบว่า *ERK* มีส่วนใน survival signals ที่จุด checkpoint I ให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ *Bcl-2* กระตุ้นการทำลายโปรตีน *Bim* ซึ่งมีบทบาทเป็น proapoptotic protein ดังที่แสดงในรูปที่ 23 (60, 78) ในงานวิจัยนี้พบว่า miR-483-5p มีการแสดงออกลดลง จึงคาดว่าส่งผลกระตุ้นให้มีการพัฒนาของ T cells และ B cells รวมถึงการเพิ่มจำนวนของ B cells



รูปที่ 22 บทบาทของ Notch proteins ใน peripheral T cells (59)



รูปที่ 23 บทบาทของ ERK proteins ในการควบคุม transcription factor ที่มีเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงจาก Pro-B ไปเป็น Pre-B II Cell (60)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ

การออกแบบการทดลอง

ในปัจจุบันเซลล์เพาะเลี้ยงที่นิยมใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาระดับได้แก่ เซลล์ HepG2, HepG2.2.15 และ Huh7 โดยเซลล์ HepG2 นั้นได้มาจากเซลล์มะเร็งตับของผู้ป่วยชาว Caucasian เพศชาย อายุ 15 ปี เซลล์ Huh7 นั้นได้จากเซลล์มะเร็งตับของผู้ป่วยชาวญี่ปุ่น เพศชาย อายุ 57 ปี และเซลล์ HepG2.2.15 นั้นเป็นเซลล์ที่มากจากจุดกำเนิดเดียวกันกับเซลล์ HepG2 แต่มีการแสดงออกของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จากงานวิจัยของ Li และคณะในปี 2013 (24) พบว่าเซลล์ Huh7 นั้นมีระดับการแสดงออกของ IFN- α mRNA สูงกว่าในเซลล์ HepG2 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ Huh7 นั้นสามารถตอบสนองต่อ IFN ได้ดีกว่าเซลล์ HepG2 และยังพบว่าเซลล์ HepG2 นั้นไม่มีการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองด้านแรกต่อ IFN (primary response genes) (79) และในงานนี้ต้องการศึกษาผลของ Peg-IFN alpha-2a และการได้รับสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี การเลือกใช้เซลล์ Huh7 ในการศึกษานี้จึงมีความเหมาะสม

ในการศึกษานี้ใช้ HBV plasmid เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่สามารถเลี้ยงและเพิ่มจำนวนไวรัสตับอักเสบบีได้ภายในห้องปฏิบัติการ อีกทั้งเซลล์ Huh7 นั้นไม่มีการแสดงออกของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ดังนั้นจึงเป็นข้อจำกัดของงานวิจัยนี้ ในงานวิจัยนี้จึงได้ transfect HBV plasmid เข้าสู่เซลล์ Huh7 เพื่อจำลองการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แต่ในการทดลองนี้ได้ transfect HBV plasmid เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ไม่สามารถเป็นตัวแทนในการจำลองการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง (CHB) ได้ แต่สามารถใช้จำลองการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเฉียบพลันได้

ตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นจะพบว่า Peg-IFN alpha นั้น มี 2 รูปแบบ คือ Peg-IFN alpha-2a และ Peg-IFN alpha-2b ซึ่งมีความแตกต่างกันที่โครงสร้างของยาและพบว่า Peg-IFN alpha-2a มีความเสถียรและมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า (80) แต่อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้มีการวัดระดับการแสดงออกของ miRNAs หลังจากได้รับยาไป 24 ชั่วโมง ซึ่งไม่ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่าง Peg-IFN alpha-2a และ Peg-IFN alpha-2b อีกทั้งในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ได้ใช้ยา Peg-IFN alpha-2a ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ Peg-IFN alpha-2a

เทคนิคที่ใช้ในการศึกษา miRNAs profiling

เทคนิคที่ใช้ในการศึกษา miRNAs profiling ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาขึ้นอย่างหลากหลาย แต่วิธีที่นิยมและเป็นที่รู้จักนั้น ได้แก่ miRNA microarray, qPCR array และ NGS โดยแต่ละวิธีนั้น จะมีหลักการที่แตกต่างกัน

miRNA microarray นั้นใช้หลักการ hybridization อาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะของ นิวคลีโอไทด์ หรือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้น ที่มีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ส่วน qPCR array นั้นใช้หลักการของ PCR อาศัยการใช้ primers ที่มีความจำเพาะกับ miRNAs ในการเพิ่มจำนวนและ ระบุความจำเพาะของ miRNAs ในขณะที่ NGS นั้นใช้หลักการ sequencing ในการระบุ miRNAs ซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่า miRNA microarray และ qPCR array เนื่องจากเป็นระบบเปิด ไม่จำเป็นต้องระบุ ชนิดของ miRNAs ที่ต้องการศึกษาก่อนที่จะเริ่มการทดลอง จึงทำให้สามารถค้นพบ miRNAs ชนิด ใหม่ (novel miRNAs) ได้ ในขณะที่ 2 วิธีการข้างต้นนั้นเป็นระบบปิด ต้องมีการระบุชนิดของ miRNAs ที่ต้องการศึกษา ทำให้เป็นข้อจำกัดของงานวิจัย ไม่สามารถพบ novel miRNAs ได้ นอกจากนี้การใช้วิธี NGS นั้นยังสามารถระบุ miRNAs family ซึ่งเป็น miRNAs ที่มีลำดับนิวคลีโอ ไทด์คล้ายคลึงกัน มีความแตกต่างกันเพียง 1-2 นิวคลีโอไทด์ ได้ดีกว่า hybridization หรือ PCR เนื่องจากการใช้หลักการ hybridization หรือ PCR นั้น อาจจะแยกความแตกต่างเพียง 1-2 นิวคลีโอ ไทด์ได้ไม่ชัดเจนทำให้เกิดผลบวกเท็จ ในขณะที่ NGS นั้นใช้หลักการ sequencing ทำให้สามารถระบุ ความแตกต่างของ miRNAs ได้ชัดเจน (81)

ในแง่ของค่าใช้จ่ายนั้นหากคิดเป็นราคาต่อหนึ่งตัวอย่างจะพบว่า NGS จะมีค่าใช้จ่ายสูงที่สุด ตามด้วย qPCR array และ miRNA microarray (81) แต่เมื่อคิดราคาต่อหนึ่งปฏิบัติการ พบว่า ทั้ง 3 วิธีการ ไม่ได้มีความแตกต่างกันมาก ขึ้นอยู่กับจำนวนตัวอย่างที่ต้องการศึกษา

ข้อมูลที่ได้จากการทำ NGS

พบว่ามีข้อมูลร้อยละ 97.8 ที่มีความน่าเชื่อถือสูง (Q score \geq 30) ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานที่ใช้ใน การคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความถูกต้อง (82) ดังนั้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นั้นมีความ น่าเชื่อถือเพียงพอที่จะนำไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไปได้ และในงานวิจัยนี้พบ miRNAs 149-201 ชนิด ใน กลุ่มต่างๆ ในขณะที่ในปัจจุบันพบว่ามี mature miRNAs ของมนุษย์นั้นมีอยู่ทั้งหมด 2588 miRNAs แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่ได้รับ HBV plasmid และ Peg-IFN alpha 2a นั้นจะมี miRNAs เพียง บางส่วนที่มีการแสดงออก

เปรียบเทียบผลที่ได้จากการทำ NGS เทียบกับ real-time PCR

จากการทดลองพบว่ามี 4 miRNAs ที่ไม่สอดคล้องกันระหว่างผลจากเทคนิค NGS และ real-time PCR ได้แก่ miR-23b-3p, miR-181b-5p, miR-216a-3p และ miR-217 พบว่ามี การแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อใช้เทคนิค NGS แต่มีการแสดงออกลดลงเมื่อใช้เทคนิค real-time PCR ซึ่งระดับการ แสดงออกที่แตกต่างกันของ miRNAs ใน 2 เทคนิคนั้น อาจเนื่องมาจาก วิธีการ normalize ที่แตกต่างกัน จุดประสงค์ของการ normalize นั้น เพื่อกำจัดตัวแปรอื่น ๆ ที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกับ ปัจจัยที่ต้องการศึกษาระหว่างกลุ่มตัวอย่าง สำหรับเทคนิค real-time PCR จะใช้ endogenous control RNA ในการ normalize กลุ่มตัวอย่าง เพื่อลดความแตกต่างของ RNAs ที่ได้ในแต่ละกลุ่ม ตัวอย่าง ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการทำ PCR ส่วนเทคนิค NGS นั้น จะ normalize โดยใช้ ระดับการแสดงออกของ miRNAs ทั้งหมดในกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการศึกษา ซึ่งค่าที่ได้นั้นจะส่งผลต่อ การนำมาคำนวณหาระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่ม ดังนั้น miRNAs ที่มีความ สอดคล้องกันในทั้ง 2 เทคนิคนั้น จึงมีความน่าเชื่อถือและแม่นยำมากกว่าการวัดการแสดงออกของ miRNAs เพียงเทคนิคเดียว

การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miRNA

จากผลการทดลองพบว่าเซลล์มะเร็งตับ Huh7 มีการตอบสนองต่อ HBV plasmid และ Peg-IFN alpha-2a แตกต่างกัน ส่งผลให้มีการแสดงออกของ miRNAs ที่เปลี่ยนแปลงไป และพบว่า miRNAs ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มนั้นจะส่งผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ เกี่ยวข้อง โดยจะไปควบคุมการแสดงออกของ mRNAs ส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางชีวภาพต่าง ๆ ภายในเซลล์

การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miRNAs ในกลุ่มที่ได้รับ HBV plasmid

กลุ่มที่จำลองการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีนั้น ในงานวิจัยนี้ขอยกตัวอย่าง miR-146a พบว่า miR-146a มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มของเซลล์ Huh7 ที่มีการ transfect ด้วย HBV plasmid สอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และคณะในปี 2015 (83) พบว่า HBV X protein (HBx) สามารถไป กระตุ้นการแสดงออกของ miR-146a ในเซลล์มะเร็งตับ ผ่านการทำงานของ nuclear factor- κ B (NF- κ B) และไปจับบริเวณปลายด้าน 3' ของยีน *CFH* (complement factor H) ส่งผลให้กระตุ้น การอักเสบของเซลล์ตับและเป็นสาเหตุนำไปสู่การเกิดโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง นอกจากนี้ยังพบว่าระดับ การแสดงออกของ miR-146a มีความสอดคล้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี โดยสามารถ ควบคุมการตอบสนองของระบบ innate immunity และ adaptive immunity (84) ผ่านทาง tumor necrosis factor (TNF) receptor รวมถึง toll-like receptor (TLR) signaling pathways

(85) และงานวิจัยของ Hou และคณะ ในปี 2014 (86) พบว่า miR-146a นั้นมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยมีเอ็นเป้าเป้าหมายคือ *STAT1* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการไปกระตุ้นการทำงานของ IFN-stimulated response element (*ISRE*) ส่งผลให้เกิดการดื้อต่อ IFN นอกจากนี้การแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของ miR-342 ในกลุ่มของเซลล์ Huh7 ที่มีการ transfect ด้วย HBV plasmid สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่ได้แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของ miR-342 เพิ่มขึ้นในซีรัมของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (35) รวมถึงการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ miR-210 นั้นสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาในเซลล์ HepG2.2.15 ที่มีการสร้าง HBV virion เทียบกับในเซลล์ HepG2 และยังพบว่า miR-210 มีบทบาทในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีผ่านทาง HBV S protein (HBsAg) (87) รวมถึงมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในซีรัมของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีตามระดับความรุนแรงของการอักเสบในตับ (88)

ในทางตรงกันข้ามการแสดงออกของ miR-15b ลดลงในเซลล์มะเร็งตับที่ได้รับพลาสมิดไวรัสตับอักเสบบี โดยพบว่า HBV X protein (HBx) มีบทบาทไปลดการแสดงออกของ miR-15b (89) ในขณะที่งานวิจัยนี้พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของ miR-15b นอกจากนี้เมื่อพิจารณาระดับการแสดงออกของ miR-194 พบว่ามีการแสดงออกที่ลดลงของ miR-194 ในขณะที่งานวิจัยก่อนหน้าพบว่า miR-194 มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นมากกว่า 10 เท่าในเซลล์ HepG2.2.15 เมื่อเทียบกับในเซลล์ HepG2 (90) และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (91)

การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miRNAs ในกลุ่มที่ได้รับ Peg-IFN alpha-2a

กลุ่มที่จำลองเซลล์ตับที่ได้รับยา IFN นั้น พบว่าในงานวิจัยของ Cheng และคณะในปี 2013 (92) ได้ศึกษาผลของ IFN- α 2b ในการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miRNAs ในเซลล์ Huh7 โดยบ่มด้วย IFN- α 2b 1 ng/ml เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นวัดระดับการแสดงออกของ miRNAs ที่เปลี่ยนแปลงไปด้วย TaqMan MicroRNA profiling โดยใช้เกณฑ์ในการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกมากกว่า 2 ขึ้นไป (fold change >2) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ miRNAs บางส่วนสอดคล้องกับในการศึกษานี้ ดังที่แสดงในตารางที่ 33

ตารางที่ 32 แสดงตัวอย่าง miRNAs ที่มีการแสดงออกในสถานะที่มีไวรัสตับอักเสบบีในงานวิจัยต่างๆ

miRNA	Experimental model	Results		Reference
		In this study	Previous study	
miR-146a	Huh7	↑	↑	(83)
miR-342	Huh7 Serum HBV infection patients	↑	↑	(35)
miR-210	HepG2.2.15/ HepG2 Serum HBV infection patients	↑	↑	(87, 88)
miR-15b	HepG2.2.15/ HepG2/ Huh7 Mouse model	↑	↓	(89)
miR-194	HepG2.2.15/ HepG2 HBV infection patients	↓	↑	(90, 91)

หมายเหตุ: (↑): up-regulation; (↓): down-regulation

ตารางที่ 33 แสดง miRNAs ที่พบร่วมกันระหว่างงานวิจัยก่อนหน้าและงานวิจัยนี้ในเซลล์ Huh7

miRNAs	Result		Reference
	In this study (Peg-IFN- α 2a)	Previous study (IFN- α 2b)	
let-7e miR-140-5p miR-450b-5p miR-455-5p miR-1304	↑	↑	(92)
miR-143 miR-21 miR-99b miR-331 miR-660	↓	↑	
miR-1303	↓	↓	
miR-885-5p	↑	↓	

หมายเหตุ: (↑): up-regulation; (↓): down-regulation

การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miRNAs ในกลุ่มที่ได้รับ HBVplasmid และ Peg-IFN alpha-2a

งานวิจัยนี้สนใจระดับการเปลี่ยนแปลงของ miRNAs ในเซลล์ Huh7 ที่ transfect ด้วย HBV plasmid และบ่มด้วย Peg-IFN alpha-2a ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้นพบ 6 miRNAs ที่มีการแสดงออกลดลงสอดคล้องกับผลจาก NGS และ real-time PCR ได้แก่ miR-128, miR-151a, miR-185, miR-186 miR-425 และ miR-483 และผลจากการทำนายเป้าหมายของ miRNAs ทั้ง 6 miRNAs ทำให้สันนิษฐานได้ว่า miRNAs ที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปมีความเกี่ยวข้องและบทบาทสำคัญทางชีวภาพและระบบภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาระดับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ miRNAs เหล่านี้ ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับการรักษาด้วยยา Peg-IFN alpha-2a รวมถึงควรมีการทำนายเป้าหมายของ miRNAs ในสภาวะดังกล่าวเพิ่มเติมต่อไป



รายการอ้างอิง

1. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2557-76.
2. Hagymasi K, Tulassay Z. [Epidemiology, risk factors and molecular pathogenesis of primary liver cancer]. *Orvosi hetilap*. 2008;149(12):541-8.
3. Kew MC. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Pathologie-biologie*. 2010;58(4):273-7.
4. Cooksley WG. Do we need to determine viral genotype in treating chronic hepatitis B? *Journal of viral hepatitis*. 2010;17(9):601-10.
5. Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, Marcellin P, Thongsawat S, Cooksley G, *et al*. Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *The New England journal of medicine*. 2005;352(26):2682-95.
6. Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, *et al*. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet*. 2005;365(9454):123-9.
7. Bihrer V, Waidmann O, Friedrich-Rust M, Forestier N, Susser S, Haupenthal J, *et al*. Serum microRNA-21 as marker for necroinflammation in hepatitis C patients with and without hepatocellular carcinoma. *PloS one*. 2011;6(10):e26971.
8. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;142(6):1264-73 e1.
9. Patel M, Shariff MI, Ladep NG, Thillainayagam AV, Thomas HC, Khan SA, *et al*. Hepatocellular carcinoma: diagnostics and screening. *Journal of evaluation in clinical practice*. 2012;18(2):335-42.
10. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet*. 1981;2(8256):1129-33.
11. Liu WH, Yeh SH, Chen PJ. Role of microRNAs in hepatitis B virus replication and pathogenesis. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1809(11-12):678-85.
12. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 2000;64(1):51-68.
13. Croagh CM, Lubel JS. Natural history of chronic hepatitis B: phases in a complex relationship. *World journal of gastroenterology* : WJG. 2014;20(30):10395-404.
14. David M. Interferons and microRNAs. *Journal of interferon & cytokine research* : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research. 2010;30(11):825-8.
15. Jensen S, Thomsen AR. Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *Journal of virology*. 2012;86(6):2900-10.
16. Katsoulidis E, Kaur S, Platanias LC. Deregulation of Interferon Signaling in Malignant Cells. *Pharmaceuticals*. 2010;3(2):406-18.
17. Fensterl V, Sen GC. Interferons and viral infections. *BioFactors*. 2009;35(1):14-20.
18. Allen G, Fantès KH. A family of structural genes for human lymphoblastoid (leukocyte-type) interferon. *Nature*. 1980;287(5781):408-11.
19. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, *et al*. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. 2006;441(7089):101-5.

20. Shuai K, Schindler C, Prezioso VR, Darnell JE, Jr. Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science*. 1992;258(5089):1808-12.
21. Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature reviews Drug discovery*. 2003;2(3):214-21.
22. Santantonio TA, Fasano M. Chronic hepatitis B: Advances in treatment. *World journal of hepatology*. 2014;6(5):284-92.
23. Thongthae N, Payungporn S, Poovorawan Y, NP TT. A rational study for identification of highly effective siRNAs against hepatitis B virus. *Experimental and molecular pathology*. 2014;97(1):120-7.
24. Li A, Qian J, He J, Zhang Q, Zhai A, Song W, *et al*. Modulation of miR122 expression affects the interferon response in human hepatoma cells. *Molecular medicine reports*. 2013;7(2):585-90.
25. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
26. Muniategui A, Nogales-Cadenas R, Vazquez M, Aranguren XL, Agirre X, Luttun A, *et al*. Quantification of miRNA-mRNA interactions. *PloS one*. 2012;7(2):e30766.
27. Uchino K, Ochiya T, Takeshita F. RNAi therapeutics and applications of microRNAs in cancer treatment. *Japanese journal of clinical oncology*. 2013;43(6):596-607.
28. Khare S, Zhang Q, Ibdah JA. Epigenetics of hepatocellular carcinoma: role of microRNA. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2013;19(33):5439-45.
29. Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Developmental cell*. 2006;11(4):441-50.
30. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*. 2004;10(12):1957-66.
31. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS biology*. 2005;3(3):e85.
32. Khlaiphuengsin A. Evolution of cellular miRNAs targeting HBV genotype A-J: Chulalongkorn university; 2012.
33. Thirion M, Ochiya T. Roles of microRNAs in the hepatitis B virus infection and related diseases. *Viruses*. 2013;5(11):2690-703.
34. Wei YF, Cui GY, Ye P, Chen JN, Diao HY. MicroRNAs may solve the mystery of chronic hepatitis B virus infection. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2013;19(30):4867-76.
35. Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, Chen X, Liu FY, Zhang JF, *et al*. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma. *Cancer research*. 2010;70(23):9798-807.
36. Wojcicka A, Swierniak M, Kornasiewicz O, Gierlikowski W, Maciag M, Kolanowska M, *et al*. Next generation sequencing reveals microRNA isoforms in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;53:208-17.
37. Zhang H, Li QY, Guo ZZ, Guan Y, Du J, Lu YY, *et al*. Serum levels of microRNAs can specifically predict liver injury of chronic hepatitis B. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(37):5188-96.
38. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(11):857-66.
39. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, *et al*. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research*. 2008;18(10):997-1006.

40. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;105(30):10513-8.
41. Gottwein E, Cullen BR. Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity. *Cell host & microbe.* 2008;3(6):375-87.
42. Sedger LM. microRNA control of interferons and interferon induced anti-viral activity. *Molecular immunology.* 2013;56(4):781-93.
43. Mei Q, Li X, Meng Y, Wu Z, Guo M, Zhao Y, *et al.* A facile and specific assay for quantifying microRNA by an optimized RT-qPCR approach. *PloS one.* 2012;7(10):e46890.
44. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annual review of genomics and human genetics.* 2008;9:387-402.
45. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annual review of analytical chemistry.* 2013;6:287-303.
46. Grada A, Weinbrecht K. Next-generation sequencing: methodology and application. *The Journal of investigative dermatology.* 2013;133(8):e11.
47. Malmstrom S, Larsson SB, Hannoun C, Lindh M. Hepatitis B viral DNA decline at loss of HBeAg is mainly explained by reduced cccDNA load--down-regulated transcription of PgRNA has limited impact. *PloS one.* 2012;7(7):e36349.
48. Zhang Y, Wu Y, Ye S, Wang T, Zhao R, Chen F, *et al.* The response to interferon is influenced by hepatitis B virus genotype in vitro and in vivo. *Virus research.* 2013;171(1):65-70.
49. Reinsbach S, Nazarov PV, Philippidou D, Schmitt M, Wienecke-Baldacchino A, Muller A, *et al.* Dynamic regulation of microRNA expression following interferon-gamma-induced gene transcription. *RNA biology.* 2012;9(7):978-89.
50. Su C, Hou Z, Zhang C, Tian Z, Zhang J. Ectopic expression of microRNA-155 enhances innate antiviral immunity against HBV infection in human hepatoma cells. *Virology journal.* 2011;8:354.
51. Hao J, Jin W, Li X, Wang S, Zhang X, Fan H, *et al.* Inhibition of alpha interferon (IFN-alpha)-induced microRNA-122 negatively affects the anti-hepatitis B virus efficiency of IFN-alpha. *Journal of virology.* 2013;87(1):137-47.
52. Leshkowitz D, Horn-Saban S, Parmet Y, Feldmesser E. Differences in microRNA detection levels are technology and sequence dependent. *Rna.* 2013;19(4):527-38.
53. McGowan CH, Russell P. Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *The EMBO journal.* 1993;12(1):75-85.
54. Girardot M, Pecquet C, Boukour S, Knoops L, Ferrant A, Vainchenker W, *et al.* miR-28 is a thrombopoietin receptor targeting microRNA detected in a fraction of myeloproliferative neoplasm patient platelets. *Blood.* 2010;116(3):437-45.
55. Belkaya S, Murray SE, Eitson JL, de la Morena MT, Forman JA, van Oers NS. Transgenic expression of microRNA-185 causes a developmental arrest of T cells by targeting multiple genes including Mzb1. *The Journal of biological chemistry.* 2013;288(42):30752-62.
56. Flach H, Rosenbaum M, Duchniewicz M, Kim S, Zhang SL, Cahalan MD, *et al.* Mzb1 protein regulates calcium homeostasis, antibody secretion, and integrin activation in innate-like B cells. *Immunity.* 2010;33(5):723-35.
57. Goepfert B, Schmezer P, Dutruel C, Oakes C, Renner M, Breinig M, *et al.* Down-regulation of tumor suppressor A kinase anchor protein 12 in human hepatocarcinogenesis by epigenetic mechanisms. *Hepatology.* 2010;52(6):2023-33.
58. Ma J, Liu J, Wang Z, Gu X, Fan Y, Zhang W, *et al.* NF-kappaB-dependent microRNA-425 upregulation promotes gastric cancer cell growth by targeting PTEN upon IL-1beta induction. *Molecular cancer.* 2014;13:40.

59. Osborne BA, Minter LM. Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(1):64-75.
60. Gold MR. B cell development: important work for ERK. *Immunity*. 2008;28(4):488-90.
61. Butz H, Liko I, Czirjak S, Igaz P, Khan MM, Zivkovic V, *et al*. Down-regulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNA in human sporadic pituitary adenomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(10):E181-91.
62. Legrand A, Vadrot N, Lardeux B, Bringuier AF, Guillot R, Feldmann G. Study of the effects of interferon a on several human hepatoma cell lines: analysis of the signalling pathway of the cytokine and of its effects on apoptosis and cell proliferation. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2004;24(2):149-60.
63. Yamada H, Ochi K, Nakada S, Nemoto T, Horiguchi-Yamada J. Changes of cell cycle-regulating genes in interferon-treated Daudi cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 1994;136(2):117-23.
64. Wang Q, Miyakawa Y, Fox N, Kaushansky K. Interferon-alpha directly represses megakaryopoiesis by inhibiting thrombopoietin-induced signaling through induction of SOCS-1. *Blood*. 2000;96(6):2093-9.
65. Kuter DJ. New thrombopoietic growth factors. *Blood*. 2007;109(11):4607-16.
66. Belder L, de Yebenes VG, Ramiro AR. MicroRNAs prevent the generation of autoreactive antibodies. *Immunity*. 2010;33(5):713-22.
67. Danger R, Braza F, Giral M, Soullillou JP, Brouard S. MicroRNAs, Major Players in B Cells Homeostasis and Function. *Frontiers in immunology*. 2014;5:98.
68. Wong W, Scott JD. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(12):959-70.
69. Choi MC, Jong HS, Kim TY, Song SH, Lee DS, Lee JW, *et al*. AKAP12/Gravin is inactivated by epigenetic mechanism in human gastric carcinoma and shows growth suppressor activity. *Oncogene*. 2004;23(42):7095-103.
70. Flotho C, Paulun A, Batz C, Niemeyer CM. AKAP12, a gene with tumour suppressor properties, is a target of promoter DNA methylation in childhood myeloid malignancies. *British journal of haematology*. 2007;138(5):644-50.
71. Yang Z, Miao R, Li G, Wu Y, Robson SC, Yang X, *et al*. Identification of Recurrence Related microRNAs in Hepatocellular Carcinoma after Surgical Resection. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(1):1105-18.
72. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, *et al*. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(1):264-9.
73. Molinari F, Frattini M. Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Frontiers in oncology*. 2013;3:326.
74. Zhang Z, Ge S, Wang X, Yuan Q, Yan Q, Ye H, *et al*. Serum miR-483-5p as a potential biomarker to detect hepatocellular carcinoma. *Hepatology Int*. 2013;7(1):199-207.
75. Wang W, Zhao LJ, Tan YX, Ren H, Qi ZT. Identification of deregulated miRNAs and their targets in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(38):5442-53.
76. Xu B, Zhang YW, Tong XH, Liu YS. Characterization of microRNA profile in human cumulus granulosa cells: Identification of microRNAs that regulate Notch signaling and are associated with PCOS. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015;404:26-36.
77. Bellavia D, Campese AF, Vacca A, Gulino A, Screpanti I. Notch3, another Notch in T cell development. *Seminars in immunology*. 2003;15(2):107-12.

78. Yasuda T, Sanjo H, Pages G, Kawano Y, Karasuyama H, Pouyssegur J, *et al.* Erk kinases link pre-B cell receptor signaling to transcriptional events required for early B cell expansion. *Immunity*. 2008;28(4):499-508.
79. Tnani M, Bayard BA. Evidence for IRF-1-dependent gene expression deficiency in interferon unresponsive HepG2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1999;1451(1):59-72.
80. Kang JS, Deluca PP, Lee KC. Emerging PEGylated drugs. Expert opinion on emerging drugs. 2009;14(2):363-80.
81. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature reviews Genetics*. 2012;13(5):358-69.
82. Rutvisuttinunt W, Chinnawirotpisan P, Simasathien S, Shrestha SK, Yoon I-K, Klungthong C, *et al.* Simultaneous and complete genome sequencing of influenza A and B with high coverage by Illumina MiSeq Platform. *Journal of Virological Methods*. 2013;193(2):394-404.
83. Li JF, Dai XP, Zhang W, Sun SH, Zeng Y, Zhao GY, *et al.* Upregulation of microRNA-146a by hepatitis B virus X protein contributes to hepatitis development by downregulating complement factor H. *mBio*. 2015;6(2).
84. Labbaye C, Testa U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *Journal of hematology & oncology*. 2012;5:13.
85. Rusca N, Monticelli S. MiR-146a in Immunity and Disease. *Molecular biology international*. 2011;2011:437301.
86. Hou ZH, Han QJ, Zhang C, Tian ZG, Zhang J. miR146a impairs the IFN-induced anti-HBV immune response by downregulating STAT1 in hepatocytes. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2014;34(1):58-68.
87. Zhang GL, Li YX, Zheng SQ, Liu M, Li X, Tang H. Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210. *Antiviral research*. 2010;88(2):169-75.
88. Song G, Jia H, Xu H, Liu W, Zhu H, Li S, *et al.* Studying the association of microRNA-210 level with chronic hepatitis B progression. *Journal of viral hepatitis*. 2014;21(4):272-80.
89. Dai X, Zhang W, Zhang H, Sun S, Yu H, Guo Y, *et al.* Modulation of HBV replication by microRNA-15b through targeting hepatocyte nuclear factor 1alpha. *Nucleic acids research*. 2014;42(10):6578-90.
90. Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamura M, Miyamura T, Nakamoto S, *et al.* Regulation of microRNA by hepatitis B virus infection and their possible association with control of innate immunity. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2014;20(23):7197-206.
91. Akamatsu S, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Abe H, *et al.* Differences in serum microRNA profiles in hepatitis B and C virus infection. *The Journal of infection*. 2015;70(3):273-87.
92. Cheng M, Si Y, Niu Y, Liu X, Li X, Zhao J, *et al.* High-throughput profiling of alpha interferon- and interleukin-28B-regulated microRNAs and identification of let-7s with anti-hepatitis C virus activity by targeting IGF2BP1. *Journal of virology*. 2013;87(17):9707-18.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารสำหรับ Cloning

1.1 LB Agar

- Agar	3.75 กรัม
- Yeast Extract	1.25 กรัม
- Tryptone	2.5 กรัม
- NaCl	1.25 กรัม
- น้ำกลั่น	250 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 LB Broth

-Yeast Extract	0.5 กรัม
-Tryptone	1.0 กรัม
-NaCl	0.5 กรัม
-น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 SOC Medium

-Yeast Extract	0.5 กรัม
-Tryptone	1.0 กรัม
-NaCl	0.5 กรัม
-น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีและใส่ 2 โมลาร์ของ Mg^{2+} , 2 โมลาร์ Glucose และ 1 โมลาร์ KCl

2. การเตรียม 5X TBE (Tris-Borate-EDTA Buffer)

- Tris	54 กรัม
- Boric Acid	27.5 กรัม
- EDTA	4.16 กรัม
-น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

3. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 45 มิลลิลิตร
- FBS (Heat Inactivated Fetal Bovine Serum) 5 มิลลิลิตร
- Antibiotic-Antimycotic 0.5 มิลลิลิตร

4. การเตรียม Freezing Media

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 8.5 มิลลิลิตร
- FBS (Heat Inactivated Fetal Bovine Serum) 5 มิลลิลิตร
- DMSO (Dimethyl Sulfoxide) 1.5 มิลลิลิตร



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นางสาว ธัญญา จินาโต

วัน เดือน ปีเกิด 2 มีนาคม 2534 สถานที่เกิด จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ 85 ซอยลาดพร้าว-วังหิน 60 ถนนลาดพร้าว-วังหิน แขวงลาดพร้าว เขตลาดพร้าว กทม.10230

E-mail: Ji.thananya@gmail.com

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปี 2555

เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) หลักสูตรวิทยาศาสตรการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนการศึกษาที่ได้รับ

พ.ศ. 2556 ได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา

ผลงานทางวิชาการ

ตีพิมพ์บทความวิจัยในเวชศาสตร์ร่วมสมัย 2558 (Health equity through innovation and collaboration) หัวข้อ ความสัมพันธ์ระหว่างอินเตอร์เฟอรอนและระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ: บริษัท พี.เอ.ลีฟวิ่ง จำกัด หน้า 517-526

การประชุมวิชาการ

- นำเสนองานวิจัยรูปแบบ oral-presentation ในหัวข้อ Effect of single nucleotide polymorphisms (SNPs) on microRNA-221 on target gene in hepatocellular carcinoma (HCC) cell line ณ งานประชุมวิชาการสหวิทยาการ ครั้งที่ 3 สถาบันเทคโนโลยีไทย-ญี่ปุ่น

- นำเสนองานวิจัยรูปแบบ electronic-Poster presentation ในหัวข้อ Analysis of microRNAs profiles in Huh7 cells line transfected with HBV and treated with pegylated interferon alpha 2a ณ งานประชุมวิชาการรวมคณะแพทยศาสตร์สามสถาบัน พ.ศ. 2558