



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทของยีนवासคูลาร์เอนโดทีเลียลโกรฟแฟกเตอร์และตัวตอบรับ ที่มีผลต่อ
การเกิดโรคและการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยโรคไตอักเสบเรื้อรัง

โดย ผศ.นพ. ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์

พฤษภาคม 2550

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทของยีนवासคูลาร์เอนโดทีเลียลโกรฟแฟกเตอร์และตัวดอรับ ที่มีผลต่อ
การเกิดโรคและการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยโรคไตอักเสบเรื้อรัง

โดย ผศ.นพ. ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รหัสโครงการ : MRG4880103

ชื่อโครงการ : บทบาทของยีน วาสคิวลาร์เอนโดทีเลียลโกรฟแฟกเตอร์และตัวตอบรับ ที่มีผลต่อการเกิดโรคและการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยโรคไตอักเสบลูปัส

ชื่อนักวิจัย : ผศ.นพ. ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address: yingyos@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (1 มิถุนายน 2548 - 31 พฤษภาคม 2550)

โรค Lupus Nephritis (LN) หรือภาวะไตอักเสบลูปัส เป็นโรคที่เกิดจากภูมิคุ้มกันเนื้อเยื่อตนเองรวมไปถึงการอักเสบของไต ทำให้การทำงานของไตเสื่อมลงและมีการพัฒนาของโรคไปสู่ภาวะไตวายระยะสุดท้าย (end-stage renal disease; ESRD) ยีน Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดความผิดปกติของไตในโรคไตหลายชนิด มีส่วนในการป้องกันการตายของเซลล์ที่หลอดเลือดและ endothelial เซลล์ภายในไต โดยมีส่วนป้องกันเซลล์ไตจากภาวะการขาดออกซิเจน ผู้วิจัยได้ศึกษาความแตกต่างของการแสดงออกของยีน VEGF ภายในไตของผู้ป่วย Lupus Nephritis เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (kidney transplant donor) รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนดังกล่าวกับพยาธิสภาพภายในไตของผู้ป่วย โดยวิธี Real-Time PCR และ Immunohistochemistry โดยใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยทั้งหมด 41 ชิ้น โดยที่ผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้รับการวินิจฉัยว่าจัดอยู่ในกลุ่มที่มีอาการของโรครุนแรง (Class IV LN) และชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยบริจาคไตเพื่อปลูกถ่ายไตจำนวน 6 ชิ้น พบว่าในผู้ป่วยมีการแสดงออกของ VEGF mRNA และโปรตีนลดลงกว่าคนปกติ (-0.83 ± 0.7 vs. -0.001 ± 0.39 log copies; $p=0.002$) นอกจากนี้ยังพบว่าการลดลงของ VEGF mRNA มีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงของไต ได้แก่ endocapillary proliferation, crescent formation และ activity score โดยผู้ป่วยที่มีระดับการแสดงออกของ VEGF mRNA ต่ำกว่าจะมีพยาธิสภาพของไตดังกล่าวมากกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ VEGF mRNA สูง (p -value = 0.01, 0.04 และ 0.03 ตามลำดับ) นอกจากนั้นการแสดงออกของ VEGF mRNA ที่ลดต่ำลงยังสามารถใช้ในการทำนายการเกิด doubling serum creatinine หรือ ESRD หรือทั้งสองอย่างร่วมกัน เมื่อติดตามผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือนได้อีกด้วย (p -value = 0.04, 0.01 และ 0.005, ตามลำดับ) จากความสัมพันธ์ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการแสดงออก

ของ VEGF สามารถใช้ในการวินิจฉัยความรุนแรงของโรคและทำนายการเกิดไตวายเรื้อรังใน
ระยะเวลาอันใกล้ได้อีกด้วย

คำหลัก : โรคไตอักเสบเรื้อรัง, ยีนวาสคูลาร์เอนโดทีเลียลโกรทแฟกเตอร์, การแสดงออกของยีน,
Real-Time PCR

Abstract

Project Code: MRG4880103

Project Title: Role of vascular endothelial growth factor and its receptors in susceptibility and prognosis of lupus nephritis patient

Investigator: Asst. Prof. Yingyos Avihingsanon
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

E-mail Address: yingyos@hotmail.com, yingyos.a@gmail.com

Project Period: 2 years (1 June 2005 – 31 May 2007)

Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a pivotal role in delayed progression of renal diseases such as remnant kidney model and thrombotic microangiopathy. It protects vascular endothelial and tubular epithelial cells from apoptosis, hypoxia and inflammation. This study determines an association between intra-renal VEGF gene expression and short-term renal outcome in SLE patient with active lupus nephritis. Forty-one renal biopsy samples from lupus nephritis patients were studied by real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry. The same renal biopsy core was used to study both VEGF expression and histopathology. Most patients had received the standard immunosuppressive treatment. The VEGF gene expression was normalized by 18s rRNA. Receiver operating characteristic (ROC) curves analysis was used to define the cutoff level of VEGF. The outcomes at 6-month post-treatment were doubling serum creatinine and end-stage renal disease (ESRD). All data were expressed as median and inter-quartile range (IQR). The median age (IQR) of patients was 29.5 (34-23) years. The 24-hour urinary protein excretion was 2.0 (3.61-1.11) gram/day and erythrocyturia was 12 (40-1) cell/HPF. The serum creatinine was 1.0 (2.2-0.7) mg/dl. Eighty percent biopsy samples were classified in focal or diffuse proliferative lupus nephritis. The activity and chronicity indices were 5 (11-0.5) and 2 (6-1), respectively. VEGF gene expression was significantly decreased as compared to kidney control (kidney transplant donors) (-0.83 ± 0.7 vs. -0.001 ± 0.39 log copies; $p=0.002$). VEGF gene expression was inversely associated with high percentage

($\geq 19\%$) of glomerular endocapillary proliferation ($p=0.01$), crescentic formation ($p=0.04$) and high activity index ($p=0.03$). The levels of intra-renal VEGF mRNAs at biopsy could predict ESRD, doubling serum creatinine or combination of both outcomes (p -value = 0.01, 0.04 and 0.005, respectively). In conclusion, intra-renal expression of VEGF is inversely associated with severe pathologic changes of lupus nephritis. The decreased VEGF levels were associated with poor renal outcomes. This may lead to the novel molecular classification which may be complement to the current diagnostic method of renal biopsy.

Keywords: Vascular endothelial growth factor, VEGF mRNA, Lupus nephritis, Real-Time PCR

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) บทบาทของยีน วาสคิวลาร์เอนโดทีเลียลโกรทแฟกเตอร์และตัว
ตอบรับที่มีผลต่อการเกิดโรคและการพยากรณ์โรคของผู้ป่วย
โรคไตอักเสบเรื้อรัง

(ภาษาอังกฤษ) Role of vascular endothelial growth factor and its
receptors in susceptibility and prognosis of lupus
nephritis patient

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ

ชื่อ-นามสกุล	ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์
คุณวุฒิ	พ.บ.
ตำแหน่ง	ผู้ช่วยศาสตราจารย์
โทรศัพท์	02-256-4251 ต่อ 204
e-mail	fmedyah@md.chula.ac.th

3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย

อณูชีวโมเลกุลของโรคไตอักเสบเรื้อรัง
Molecular biology of lupus nephritis

5. ระยะเวลาดำเนินงาน 2...ปี

6. ได้เสนอโครงการนี้ หรือโครงการที่มีส่วนเหมือนกับเรื่องนี้บางส่วนเพื่อขอทุนต่อแหล่ง ทุนอื่นที่ใดบ้าง

✓ ไม่ได้เสนอต่อแหล่งทุนอื่น

☐ เสนอต่อ

ชื่อโครงการที่เสนอ

กำหนดทราบผล (หรือสถานภาพที่ทราบ)

7. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

Systemic lupus erythematosus (SLE) เป็นปัญหาสำคัญที่พบได้บ่อยในประเทศไทย
รายงานต่าง ๆ แสดงถึงบทบาทของความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อการเกิดโรคและการ
ดำเนินโรค โดยพบว่าผู้ป่วย SLE ที่เป็นชาวเอเชียมีโอกาสเกิด lupus nephritis ได้รวดเร็วและ
มีแนวโน้มที่รุนแรงกว่าชาวตะวันตก รายงานในประเทศไทยพบว่ามีอัตราการตายของผู้ป่วย

Lupus nephritis สูงกว่าประเทศทางตะวันตก ปัจจัยที่เชื่อน่าจะมีบทบาทสำคัญ ได้แก่ ปัจจัยทางพันธุกรรมและเชื้อชาติ

Lupus nephritis เป็นภาวะไตอักเสบในผู้ป่วย SLE ซึ่งเป็นอาการแสดงที่พบได้บ่อยและสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของอัตราการเจ็บป่วยและเสียชีวิต (morbidity and mortality) ยังไม่ทราบปัจจัยที่กำหนดการเกิดโรคและความรุนแรงของโรค lupus nephritis เชื่อว่าบทบาทของพันธุกรรมและปัจจัยแวดล้อมน่าจะมีความสำคัญ

การศึกษานี้มีสมมุติฐานว่าปัจจัยที่ควบคุมการเกิดโรครวมทั้งความรุนแรงของโรคส่วนหนึ่งถูกกำหนดโดยผ่านการแสดงออกของยีนบางกลุ่มภายในเนื้อไต (intrarenal gene expression) โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนในเนื้อไต (intrarenal gene expression) มีความสัมพันธ์กับหน้าที่และการทำงานของเซลล์ภายในไต สิ่งที่น่าสนใจกว่านั้นคือการแสดงออกของยีนเหล่านี้มักเกิดขึ้นก่อนอาการแสดงทางคลินิก หรือแม้แต่การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา การศึกษาในหนูซึ่งเป็น lupus model สนับสนุนสมมุติฐานข้างต้น โดยพบการเพิ่มขึ้น (Up-regulation) ของยีนหลายตัวในกลุ่ม Cytokine และ Chemokine ก่อนที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของไตเสียอีก

ยีน vascular endothelial growth factor (VEGF) และ VEGF receptor (VEGFR) เป็นกลุ่มยีนที่มีบทบาทสำคัญในการเกิด proteinuria และ renal failure VEGF เป็นยีนที่มีหน้าที่ดูแลรักษา (cytoprotection) glomerular endothelial cell และ epithelial cell การแสดงออกของยีนมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคไตหลายชนิด ยิ่งกว่านั้นมีรายงานการให้ anti-VEGF antibody กระตุ้นการเกิดโปรตีนในปัสสาวะ (proteinuria) ในผู้ป่วยโรคมะเร็ง เชื่อว่ารูปแบบของยีน (genotype) และการแสดงออกของยีน (gene expression) ที่มีความแตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละรายมีส่วนกำหนดการเกิดโรคและพยากรณ์โรคได้ในผู้ป่วย lupus nephritis

โครงการวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนและโปรตีนในเนื้อไตกับลักษณะความรุนแรงและพยากรณ์ของโรค lupus nephritis โดยมีสมมุติฐานว่าการวัดระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนในเนื้อไต นอกเหนือจากการจัดแบ่งตามลักษณะทางพยาธิสภาพ (pathological classification) จะสามารถทำให้แพทย์จัดกลุ่มโรคเพิ่มเติมตามลักษณะทางอณูชีวโมเลกุล (molecular classification) นอกจากนี้ ยังพบว่าปัจจัยทางพันธุกรรมในโรค SLE ก็มีส่วนเกี่ยวข้องด้วย โดยพบว่ายีน VEGF ตั้งอยู่ใน chromosome 6p21 ซึ่งเป็นตำแหน่ง major locus หรือ significant linkage ต่อโรค SLE การศึกษาความหลากหลายของรูปแบบของยีน (single nucleotide polymorphism) ของ VEGF จึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง

8. วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง การแสดงออกของยีน (gene expression) ของ VEGF และ VEGFR ในเนื้อไต กับลักษณะทางพยาธิสภาพ, ลักษณะความรุนแรงของโรค รวมทั้งพยากรณ์โรคของผู้ป่วย lupus nephritis
2. เพื่อศึกษา การแสดงออกของโปรตีน VEGF และ VEGFR ในเนื้อไตและหาตำแหน่งของเซลล์เฉพาะ (specific cell type) ที่มีบทบาทในการเกิดโรค lupus nephritis
3. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ของ VEGF กับ expression profile ของ VEGF ทั้งในเลือด, เนื้อไตและเซลล์ปัสสาวะของผู้ป่วย Lupus nephritis

9. ระเบียบวิธีวิจัย

แบ่งโครงการออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

- 8.1 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน (gene expression) และโปรตีนในเนื้อเยื่อไต (Kidney biopsy) กับความรุนแรงของพยาธิสภาพ และพยากรณ์โรคในผู้ป่วย Lupus nephritis
- 8.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีน VEGF และ VEGFR ในเลือดกับการแสดงออกของยีนและโปรตีนในเนื้อเยื่อไต รวมถึงความรุนแรงของพยาธิสภาพของไต
- 8.3 ศึกษารูปแบบของ SNP ในยีน VEGF

I. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน (gene expression) และโปรตีนในเนื้อเยื่อไต (Kidney biopsy) กับความรุนแรงของพยาธิสภาพ และพยากรณ์โรคในผู้ป่วย Lupus nephritis

การศึกษานี้เป็นแบบ Observational study โดยแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 3 กลุ่ม

- กลุ่มที่ 1 กลุ่ม Active lupus nephritis
- กลุ่มที่ 2 กลุ่ม Remission lupus nephritis
- กลุ่มที่ 3 กลุ่ม Normal tissue control จากไตของผู้บริจาคไต

ลำดับขั้นตอนการทำวิจัย มีดังนี้

- 1.1 ผู้ป่วยยินยอมเข้าร่วมการศึกษาโดยลงนามในใบยินยอม
- 1.2 บันทึกข้อมูลที่สำคัญทางคลินิกของผู้ป่วย(ดูแบบฟอร์มการเก็บข้อมูลในภาคผนวก)
- 1.3 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อและสกัด RNA
- 1.4 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนโดยวิธี Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

II. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีน VEGF และ VEGFR ในเลือดกับการแสดงออกของยีนและโปรตีนในเนื้อเยื่อไต รวมถึงความรุนแรงของพยาธิสภาพของไต

เจาะเลือดเก็บในวันเดียวกันกับการทำการเจาะไต

เพื่อตรวจหาระดับ Serum VEGF โดยวิธี ELISA

เก็บตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาว (Peripheral blood mononuclear cell; PBMC) เพื่อตรวจหาระดับ VEGF mRNA โดยวิธี real – time PCR

III. การหารูปแบบของยีน VEGF โดยวิธี PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

10. จำนวนโครงการที่ผู้สมัครกำลังดำเนินการอยู่

1). ชื่อโครงการ การศึกษาปริมาณสารถ่ายทอดพันธุกรรมในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตอักเสบ-ลูโปส

ระยะเวลาโครงการ1.....ปี ตั้งแต่ ...2547...ถึง ...2548

แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน...งบประมาณแผ่นดิน

.....

สถานะผู้สมัคร ☒ หัวหน้าโครงการ

☐ ผู้ร่วมโครงการ

เวลาที่ใช้ทำวิจัยในโครงการนี้กี่ชั่วโมงต่อสัปดาห์...8 ชั่วโมง.....

2). ชื่อโครงการบทบาทของกลุ่มยีนอินเดอเพรอนชนิดที่1 และทรานส์ฟอร์มโกรฟีแฟกเตอร์เบต้าในโรคเอสแอลอี- ความสัมพันธ์ระหว่างเวชพันธุศาสตร์ต่อลักษณะแสดงออกทางคลินิกพยาธิสภาพ และ ภาวะภูมิคุ้มกันโรคเอสแอลอี

ระยะเวลาโครงการ5.....ปี ตั้งแต่ ...2547...ถึง ...2551

แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน...ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

.....

สถานะผู้สมัคร ☒ หัวหน้าโครงการร่วม (มีหัวหน้าโครงการทั้งหมด 3 คน)

☐ ผู้ร่วมโครงการ

เวลาที่ใช้ทำวิจัยในโครงการนี้กี่ชั่วโมงต่อสัปดาห์.....5...ชั่วโมง.....

คำชี้แจง โครงการที่ผู้วิจัยเข้าร่วมทั้งหมดนี้อยู่ภายใต้การทำงานร่วมกันของหน่วยวิจัยโรคลูโปส ซึ่งมีสมาชิกกลุ่มที่มีความเชี่ยวชาญแตกต่างกันเข้ามาร่วมทำงาน เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด การบริหารงบประมาณเป็นไปโดยผู้วิจัยหลักของกลุ่ม 3 คน

11. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

วัตถุประสงค์	แผนงานวิจัย	ปีที่ 1		ปีที่ 2	
		เดือนที่ 1 - 6	เดือนที่ 7 - 12	เดือนที่ 1 - 6	เดือนที่ 7 - 12
1. Gene expression study	1.1 Sample collection & clinical database 1.2 extract RNA & perform cDNA 1.3 Renal-time PCR 1.4 data analysis	✓ ✓	 ✓	 ✓	
2. Protein expression study	1.1 anti – VEGF Ab immunostaining 1.2 anti – VEGFR Ab immunostaining 1.3 data analysis		✓	✓	✓
3. polymorphism study	ดำเนินการโดย ดร.พญ. จงกลณี วงศ์ปิยะบวร	✓	✓	✓	✓

12. ผลงานที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติในแต่ละปี

ปีที่ 1 : ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์

: Tissue and urinary VEGF gene expression in lupus nephritis

: ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์

: *Lupus*

impact factor 1.77

ปีที่ 2 : ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์

: Role of VEGF and its receptors in susceptibility and prognosis of

lupus nephritis

: ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์

: *American Journal of Kidney Diseases*

impact factor 3.68

บทนำ

ความสำคัญของ Lupus nephritis ในประเทศไทย

โรค Systemic lupus erythematosus หรือโรค SLE หรือโรคภูมิคุ้มกันต้านทานต่อเนื้อเยื่อตนเอง เป็นปัญหาที่พบได้บ่อยในประเทศไทย อาการของโรคจะเกิดขึ้นกับอวัยวะที่สำคัญ (vital organ) เช่น ผิวหนัง หัวใจ ระบบเลือด ข้อต่อและกล้ามเนื้อ รวมถึงไต โดยภาวะไตอักเสบในผู้ป่วย SLE (Lupus Nephritis) เป็นภาวะที่พบได้บ่อยเกือบร้อยละ 60 ของผู้ป่วย SLE และสัมพันธ์กับอัตราการบาดเจ็บและเสียชีวิตของผู้ป่วย (morbidity and mortality) (1) จากการศึกษาพบความแตกต่างของอุบัติการณ์ในการเกิดโรคของชาว African-American สูงกว่าคนผิวขาว (Caucasian) (2) นอกจากนี้ยังพบว่าในผู้ป่วย SLE ชาวเอเชีย (Asian-America) จะมีการพัฒนาของโรคไปสู่การเกิดภาวะไตอักเสบ (development of nephritis) ได้เร็วกว่าผู้ป่วยชาวยุโรป (European-American) (3) ในปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุของโรคแน่ชัด แต่จากการศึกษาต่างๆเชื่อว่าสาเหตุของการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคอาจเป็นได้ทั้งปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผู้ป่วยแต่ละกลุ่มมีปัจจัยที่ต่างกันหลายประการเช่น เชื้อชาติ เศรษฐฐานะ ลักษณะการดำเนินชีวิต และการสาธารณสุข เป็นต้น

โรค Lupus Nephritis (LN) หรือภาวะไตอักเสบในผู้ป่วย SLE เป็นโรคที่เชื่อว่าเกิดจากความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน โดยที่ผู้ป่วยจะมีการสร้าง autoantibody ต่อ antigen ของตนเอง (self-antigen) และสร้างเป็น immune complex ไปสะสมในไตชักนำให้มีการเข้ามาของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและเกิดการอักเสบของไต (4) องค์การอนามัยโลกหรือ WHO ได้แบ่งระดับความรุนแรงของโรคออกเป็น 6 ระดับ (class I – class VI) ตามพยาธิสภาพของไต โดยผู้ป่วยที่ถูกจัดอยู่ในระดับที่ 4 (class IV) เป็นกลุ่มที่มีอาการของโรครุนแรงกว่าระดับอื่นๆ และยังมีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีด้วย (5) สำหรับการศึกษาในประชากรไทยโดย P. Parichatikanond และคณะ ปี 1986 พบว่าผู้ป่วย SLE ของไทยส่วนใหญ่จะมีอาการไตอักเสบร่วมด้วย โดยมีความรุนแรงจัดอยู่ใน class IV และมีสัดส่วนของการเกิด class IV ต่อ class อื่นมากกว่าชาวอเมริกันและอังกฤษ (Caucasians) อีกด้วย (6)

จากการศึกษาพบว่าในเลือดของผู้ป่วย LN มีปริมาณ plasmacytoid dendritic cells ลดลง แต่ในชั้นเนื้อไตของผู้ป่วย LN กลับมีการเข้ามาชุมนุมกันของเซลล์ดังกล่าวและ macrophage cells เพิ่มมากขึ้น สัมพันธ์กับการศึกษาที่พบว่าการเพิ่มมากขึ้นของโมเลกุลที่ชักนำให้มีการเคลื่อนที่เข้ามาชุมนุมกันของ inflammatory cells (chemotaxis cytokine) และสารที่ช่วยในการยึดเกาะของเซลล์ (adhesion molecule) เช่น Monocytes chemoattractant protein-1 (MCP-1) และ VCAM-1 (7, 8) ทำให้เชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของไตมีส่วนช่วยในการเข้ามาของเซลล์ต่างๆ อาการแสดงของโรคที่ตรวจพบได้ทางห้องปฏิบัติการคือมี proteinuria สูงในปัสสาวะของผู้ป่วยเนื่องจากไตสูญเสียความสามารถในการกรอง มีการศึกษา

พบว่า ยีน Transforming growth factor- β (TGF- β) มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น (up-regulation) สัมพันธ์กับการสูญเสียการกรองของไตในผู้ป่วยที่เป็นโรคไตชนิดต่างๆ และการเกิด renal fibrosis (9) ซึ่งสามารถใช้ในการทำนายโรคไต (biomarker) นอกจากนั้น ยีน Vascular endothelial growth factor (VEGF) เป็นยีนอีกกลุ่มหนึ่งที่มีการศึกษาในโรคไตหลายชนิด เนื่องจากเป็นยีนที่มีหน้าที่หลากหลาย (multipotent cytokines) รวมถึงมีบทบาทที่สำคัญในการกรองของไต (permeability) โดยมีการศึกษาพบว่าหนูที่ขาด VEGF จะเกิด proteinuria และมีการเพิ่มจำนวน endothelial cell ที่ผิดปกติ (endotheliosis) และสูญเสียการสร้างช่องว่างที่ใช้ในการกรองระหว่าง endothelial cell (endothelial fenestration) และตายภายใน 2.5 สัปดาห์ (10) และจากการทดลองฉีด anti-VEGF antibody ให้หนูพบว่าหนูจะมี glomerular endothelial cells มีขนาดใหญ่ขึ้น (hypertrophy) และเกิดการบวมและ/หรือสูญเสียการสร้างช่องว่างที่ใช้ในการกรองระหว่าง endothelial cell เป็นผลให้เกิด proteinuria เพิ่มขึ้นเช่นกัน (11) และนอกจากนี้ พบว่าการสร้าง VEGF protein/mRNA และ receptor จะเพิ่มมากขึ้นทั้งในสัตว์ทดลองและผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน (diabetes type 1 and type 2) (12) อีกทั้งจะเห็นว่าการแสดงออกของ VEGF mRNA/protein กับความผิดปกติของไตแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงให้ความสนใจในการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน VEGF ภายในไตของผู้ป่วย LN ซึ่งอาจจะมีประโยชน์ในการนำไปใช้เพื่อทำนายการเกิดโรคต่อไป

บททบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โรค SLE เป็นโรคทางภูมิคุ้มกันที่สามารถพบได้ทั่วโลก อาการของโรคเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของอวัยวะสำคัญในร่างกายหลายที่ (multisystem disease) เช่น ระบบเลือด กระดูกและข้อ หัวใจ ผิวหนัง รวมถึงไต ลักษณะเด่นคือมีการสร้าง autoantibody ต่อ antigen ของตนเอง (self-antigen) ทั้งนี้สาเหตุของการเกิดโรคมียังไม่ทราบแน่นอน เชื่อว่าเป็นได้ทั้งปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ภาวะไตอักเสบในผู้ป่วย SLE (Lupus Nephritis; LN) เป็นอาการที่พบได้บ่อยประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ในผู้ป่วย SLE และมีความสำคัญเนื่องจากเป็นสาเหตุสำคัญของอัตราการป่วยเป็นโรคและเสียชีวิตในผู้ป่วย SLE (morbidity and mortality) (2) ลักษณะเด่นของโรคจะมีการสร้าง immune complex ของ auto-antibody กับ self antigen แล้วไปจับที่ basement membrane ของ glomerulus ทำให้เกิดอาการไตอักเสบและมีความผิดปกติของการทำงานของไต และอาจมีการพัฒนาของโรคจนถึงขั้น end-stage renal disease อีกด้วย ตาม American College of Rheumatology กำหนดเกณฑ์ในการระบุว่าผู้ป่วยมีอาการ LN เมื่อตรวจพบว่า 1) มีโปรตีนรั่วออกมาในปัสสาวะ (proteinuria) เกินกว่า 0.5 กรัมต่อวัน และ 2) ตรวจพบเซลล์ต่างๆหลุดปนออกมาในปัสสาวะ (cellular cast) อย่างไรก็ตามมีผู้ป่วย LN บางรายที่ไม่ปรากฏความผิดปกติของการทำงานของไต (normal renal function) แต่ผลการตรวจ

ชั้นเนื้อไตพบการสะสมของ immune complex ใน glomerulus ซึ่งผู้ป่วยในกลุ่มนี้ถือว่าเป็น "silencing lupus nephritis" (13)

การเกิดภาวะไตอักเสบในแต่ละชนชาติจะมีความรุนแรงของโรคจะต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบเอเชียจะมีความรุนแรงของโรคมกกว่าชาติตะวันตก (3) ในประเทศไทยมีการศึกษาพบว่าผู้ป่วย SLE ของไทยส่วนใหญ่จะมีอาการไตอักเสบร่วมด้วย โดยมีอาการจัดอยู่ในขั้นรุนแรง (class IV) และมีสัดส่วนของการเกิด class IV ต่อ class อื่นมากกว่าชาวอเมริกาและอังกฤษ (Caucasians) อีกด้วย (6)

Lupus Nephritis (LN)

สาเหตุของการเกิด LN ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษาเชื่อว่าเกี่ยวกับปัจจัย 2 อย่าง คือ ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและปัจจัยทางพันธุกรรม และยังพบว่าในเพศหญิงมีความเสี่ยงในการเกิดโรคมกกว่าเพศชาย (2:1) ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับระดับฮอร์โมนในร่างกายของเพศหญิงเช่น estrogen (14) นอกจากนี้ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่นๆที่มีผลต่อการเกิดโรค ได้แก่ การติดเชื้อ ลักษณะการประกอบอาชีพ การได้รับยา พฤติกรรมการกินอาหาร และการสูบบุหรี่ หรือได้รับแสง UV เป็นต้น (15) สำหรับสาเหตุทางด้านพันธุกรรม เนื่องจากโรคนี้เป็นโรคที่เกิดความผิดปกติในระบบภูมิคุ้มกัน การศึกษาส่วนใหญ่จะศึกษาโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

สำหรับการรักษาผู้ป่วย SLE จะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยแต่ละราย ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะได้รับยากดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive) เช่น steroids อาจต้องใช้เวลา 5-20 ปี อาการของโรคจึงจะสงบลงและสามารถหยุดการให้ยาได้ ซึ่งต้องมีการทำการเจาะชิ้นเนื้อไต (renal biopsy) เพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการอีกครั้งยืนยันว่าการรักษาได้ผล (14) ปริมาณของยาที่ได้รับในผู้ป่วยแต่ละรายแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรคในผู้ป่วย

การทำงานของไตที่ผิดปกติในผู้ป่วย Lupus nephritis เกิดมาจากความผิดปกติของพยาธิสภาพในไต (morphologic changes) ไม่ว่าจะเป็นหลอดเลือด (vascular) กลุ่มของเส้นเลือดที่ทำหน้าที่ในการกรองของเสีย (glomerulus) และท่อต่างๆ (tubulointerstitial) ผู้ป่วยแต่ละรายจะมีการเปลี่ยนแปลงที่ต่างกัน ดังนั้นเพื่อเป็นประโยชน์ในการทำนายโรคและการรักษา จึงมีการจัดจำแนกกลุ่มของความผิดปกติของโรคเป็น class ต่างๆโดยองค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ตั้งแต่ปี คศ.1974 และมีการทบทวนแก้ไขใหม่เรื่อยมา (5, 16) และในปี คศ.1995 Pirani และคณะ แบ่งผู้ป่วย SLE ที่มีไตอักเสบออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่กลุ่มที่มีอาการอักเสบของไตที่รุนแรง เรียกว่ากลุ่ม Active lesions และกลุ่มที่การอักเสบหายแล้วแต่มีร่องรอยเดิมอยู่ (end-stage scar) เรียกว่ากลุ่ม Inactive lesions ซึ่งทั้งสองกลุ่มมีความผิดปกติที่ส่วนต่างๆของไตดังตารางที่ 1 ซึ่งเป็นที่มาของการจัดกลุ่ม (class) Lupus Nephritis ออกเป็น 6 class โดย World Health Organization และ International Study of Kidney Disease in Childhood (ISKDC/WHO) ดังตารางที่ 2 (17)

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าลักษณะเด่นของโรคจะมีการสร้าง immune complex ของ auto-antibody กับ self antigen แล้วไปจับที่ basement membrane ของ glomerulus ทำให้เกิดอาการไตอักเสบและมีความผิดปกติของการทำงานของไต ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการมักจะอาศัยการตรวจหาระดับ Autoantibody ในซีรัมของผู้ป่วย ที่สำคัญได้แก่ Anti-ds(native)DNA, Anti-Smith antigen และ Anti-C1q ควบคู่กับการวัดระดับการทำงานของไต (renal function) (14) และนอกจากนี้การเจาะชิ้นเนื้อไต (renal biopsy) ก็ยังคงเป็น "gold standard" ที่สำคัญในกลุ่มที่อาจมี silence lupus ได้ (13)

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงภายในไต (Histological change) ในผู้ป่วย Lupus Nephritis

Active lesions	Inactive lesions
<i>Glomeruli</i>	
Local necrosis	Basement membrane thickening
Cellular Proliferation	Fibrosis
Karyorrhexis	Adhesion
Fibrinoid	Fibrous crescent
Wire loops	
Hematoxyphil bodies	
Hyaline thrombi (rare)	
Cellular crescent	
<i>Interstitium and tubules</i>	
Infiltration by plasma cells and lymphocytes	Infiltration by lymphocytes
	Fibrosis
Edema	Tubular atrophy
Acute tubular injury	TBM thickening
<i>Arteries and arterioles</i>	
Fibrinoid necrosis	Subintimal fibrosis
Leukocytic infiltration	Hyalinization

ตารางที่ 2 Lupus Nephritis Classification โดย World Health Organization และ International Study of Kidney Disease in Childhood (ISKDC/WHO)

I. Normal glomeruli

- (a) Nil (by all techniques)
- (b) Normal by light microscopy, but deposits by electron or immunofluorescence microscopy

II. Pure mesangial alterations (mesangiopathy)

- (a) Mesangial widening and/or mild hypercellularity (+)
- (b) Moderate hypercellularity (++)

III. Focal segmental glomerulonephritis (associated with mild or moderate mesangial alterations)

- (a) 'Active' necrotizing lesions
- (b) 'Active' and sclerosing lesions
- (c) Sclerosing lesions

IV. Diffuse glomerulonephritis (severe mesangial, endocapillary, or mesangiocapillary proliferation and/or extensive subendothelial deposits)

- (a) Without segmental lesions
- (b) With 'active' necrotizing lesions
- (c) With 'active' and sclerosing lesions
- (d) With sclerosing lesions

V. Diffuse membranous glomerulonephritis

- (a) Pure membranous glomerulonephritis
- (b) Associated with lesions of Category II (a or b)
- (c) Associated with lesions of Category III (a-c)
- (d) Associated with lesions of Category IV (a-d)

VI. Advanced sclerosing glomerulonephritis

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Vascular endothelial growth factor (VEGF) หรือ Vascular permeability factor (VPF) เป็นโปรตีนในกลุ่ม multipotent cytokines ซึ่ง cytokine ในกลุ่มนี้ VEGF family (18) ประกอบด้วย VEGF-A (VEGF), -B, -C, -D, -E และ Placenta growth factor (PlGF) (19) สำหรับ VEGF-A (VEGF) gene จะประกอบด้วย 8 exons และสามารถแบ่งได้เป็น 6 isoforms โดยแต่ละ isoform มีความแตกต่างกันที่จำนวน amino acid ซึ่งเกิดขึ้นในขั้นตอนการ splicing ของ VEGF mRNA สำหรับในมนุษย์ได้แก่ VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ และ VEGF₂₀₆ แต่สำหรับในหนูจำนวน amino acid จะน้อยกว่าในมนุษย์หนึ่ง amino acid (18) นอกจากนี้ isoforms ต่างๆยังมีการแสดงออกที่ต่างกันอีกด้วย โดยที่ VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁ และ VEGF₁₈₉ เป็น isoform ที่พบมากที่สุด ส่วน VEGF₁₄₅ และ VEGF₂₀₆ พบได้น้อยกว่า (20, 21)

ปัจจัยสำคัญที่กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ VEGF ได้แก่ สภาวะการขาดออกซิเจน (Oxygen tension) หรือที่เรียกว่าสภาวะ Hypoxia และสภาวะที่มีการแสดงออกของ growth factors, hormones และ oncogene บางตัว เช่น epithelial growth factor, transforming growth factor- β (TGF- β), keratinocyte growth factor, insulin-like growth factor-1, fibroblast growth factor และ platelet-derived growth factor ซึ่งเป็น molecule ในกลุ่ม growth factor (22, 23)

สำหรับ receptors ของ VEGF ที่สำคัญมี 2 ตัว ได้แก่ VEGFR-1 (Flt-1) และ VEGFR-2 (Flk-1/KDR) ซึ่งเป็น transmembrane receptor tyrosine kinases พบอยู่บริเวณ endothelial cells นอกจากนี้ยังมี neuropilin 1 และ 2 เป็น co-receptors อีกด้วย (21) บทบาทที่สำคัญของ VEGF ได้แก่ กระตุ้นให้ endothelial cells เกิดการเพิ่มจำนวน (proliferation) และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiation) และช่วยส่งเสริมการมีชีวิตอยู่ของ endothelial cells โดยทำหน้าที่เป็น anti-apoptotic protein อีกทั้งยังมีผลให้เกิดการชักนำให้มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว (monocytes chemotaxis) และสนับสนุนการแสดงออกของ adhesion molecules ต่างๆ นอกจากนี้ VEGF ยังมีส่วนสำคัญในการขยายหลอดเลือด (vasodilation) และเพิ่มความสามารถในการแพร่ผ่านของ molecules ต่างๆผ่านหลอดเลือดอีกด้วย (vascular permeability) (12)

บทบาทและการแสดงออกของ Vascular Endothelial Growth Factor ในไต

Vascular Endothelial growth factor (VEGF) มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาของไต การศึกษาในไตหนูและไตคนพบ VEGF mRNA และ/หรือโปรตีนแสดงออกอยู่บริเวณเซลล์ glomerular podocytes, distal tubules, collecting ducts และพบเล็กน้อยใน proximal tubules และมีความหลากหลายของ isoforms ที่แสดงออกแตกต่างกันไป (24) การศึกษาในไตคนปกติพบว่า VEGF จะไม่ถูกแสดงออกในส่วนของ mesangial cell แต่จะพบการแสดงออกในเซลล์

ดังกล่าวของคนที่มีความผิดปกติที่ไตโดยจะได้รับการกระตุ้นจาก angiopoietin II หรือ growth factor อื่นๆร่วมด้วย (25) สำหรับการแสดงออกของ VEGF receptor (VEGFR-1 และ VEGFR-2) จะพบมากที่บริเวณ preglomerular, glomerular และ peritubular endothelial cells (12)

หน้าที่และการทำงานของ VEGF ในไตปกติจะยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จะเห็นได้ว่าการแสดงออกของ VEGF และ receptor ของมันอยู่คนละบริเวณกัน ทำให้การเคลื่อนที่ของโมเลกุลของ VEGF ไปจับยัง receptor มีทิศทางสวนทางกับทิศทางการกรองของเสียของไต ซึ่งเชื่อว่าการส่งสัญญาณภายใน glomerulus จะเป็นแบบ juxtacrine/paracrine signal (12, 26) นอกจากนี้การศึกษาใน in vitro แสดงให้เห็นว่า VEGF มีบทบาทในการรักษาสมดุลของแคลเซียมและช่วยในการดำรงอยู่ของ human podocytes cell ซึ่งถือว่าเป็น autocrine function (27) ดังจะเห็นได้จากในหนูที่ไม่มีการแสดงออกของ VEGF จาก podocytes จะเกิด proteinuria และมีการเพิ่มจำนวน endothelial cell ที่ผิดปกติ (endotheliosis) สูญเสียการสร้างช่องว่างที่ใช้ในการกรองระหว่าง endothelial cell (endothelial fenestration) จนเป็นผลให้ตายภายใน 2.5 สัปดาห์ (10) นอกจากนี้การศึกษาค้นสมบัติในการป้องกันการเกิดการเสียหายของ glomerular endothelial cell ในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดสภาวะ glomerular injury พบว่าหลังจากหนูได้รับการฉีด VEGF₁₆₅ และ VEGF₁₂₁ สามารถช่วยในการซ่อมแซมและป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ดังกล่าวได้ (28) แต่ในทางกลับกัน podocytes ที่มีการแสดงออกของ VEGF₁₆₅ มากเกินไปก็จะมีผลให้เกิดสภาวะ glomerulopathy ที่รุนแรงได้ (10) การศึกษาบทบาทของ VEGF และ glomerular filtration barrier ส่วนใหญ่ยังคงศึกษาในหนูทดลอง ดังเช่นการศึกษาในหนูที่ไม่มีการสร้าง VEGF ทุก isoforms จาก podocytes จะทำให้หนูนั้นตายเนื่องจากเกิด hydrops และ renal failure เพราะขาดการทำงานของ glomerular filtration barrier (26)

สำหรับความผิดปกติในการควบคุมการแสดงออกของ VEGF ในไตจะสัมพันธ์กับการเกิดโรคทางไตต่างๆ เช่น diabetic nephropathy, thrombotic thrombocytopenic purpura และ glomerulonephritides เป็นต้น (29, 30) พบว่าในผู้ป่วยเบาหวาน (type 1 Diabetic) มีปริมาณ VEGF ใน plasma สูงขึ้นเมื่อเทียบกับคนปกติ แต่ปริมาณ Urinary VEGF ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (12) Navarro และคณะ พบว่าในผู้ป่วย SLE ที่มีอาการไตวาย (renal failure) จะมีการเพิ่มขึ้นของ VEGF ใน plasma สัมพันธ์กับอาการทางคลินิก (clinical manifestations) และมีปริมาณ plasma VEGF แตกต่างผู้ป่วยจากคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) (31) นอกจากนี้การศึกษาปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของ growth factor และ chemokine ในเซลล์ในปัสสาวะ (urinary sediment) ของผู้ป่วย LN พบว่า VEGF mRNA มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วย LN ที่มีอาการของโรคอยู่ใน class IV เมื่อเทียบกับ class อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) (32) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาปริมาณของเซลล์ podocytes ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้าง VEGF ในไตคนปกติที่หลุดออกมาพร้อมกับปัสสาวะ พบว่าในผู้ป่วย LN ที่มีอาการรุนแรงจะมีปริมาณเซลล์ podocytes หลุดออกมาในปัสสาวะสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค (Disease Activity) (33) และจากการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ดังกล่าวในปัสสาวะของ

ผู้ป่วยที่มีอาการทางไตรุนแรง (active glomerular disease) และคนปกติ (healthy control) พบว่าในปัสสาวะของผู้ป่วยมีเซลล์ podocytes ที่ยังมีชีวิตอยู่ (viable podocytes) มากกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.003$) (34)

การศึกษานี้มีสมมุติฐานว่าปัจจัยที่ควบคุมการเกิดโรครวมทั้งความรุนแรงของโรคส่วนหนึ่งถูกกำหนดโดยผ่านการแสดงออกของยีนบางกลุ่มภายในเนื้อไต (intrarenal gene expression) ได้แก่ (1) Chemokine and cytokine genes เช่น Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) และ Transforming growth factor-beta ($TGF-\beta$) (2) Adhesion molecules เช่น ICAM-1 และ (3) Cytoprotective genes เช่น VEGF เป็นต้น โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนในเนื้อไต (intrarenal gene expression) มีความสัมพันธ์กับหน้าที่และการทำงานของเซลล์ภายในไต สิ่งที่น่าสนใจกว่านั้นคือการแสดงออกของยีนเหล่านี้มักเกิดขึ้นก่อนอาการแสดงทางคลินิก หรือแม้แต่การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา การศึกษาในหนูซึ่งเป็น lupus model สนับสนุนสมมุติฐานข้างต้น โดยพบการเพิ่มขึ้น (Up-regulation) ของยีนหลายตัวในกลุ่ม Cytokine และ Chemokine ก่อนที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของไตเสียอีก ในผู้ป่วยโรคมะเร็ง เชื่อว่ารูปแบบของยีน (genotype) และการแสดงออกของยีน (gene expression) ที่มีความแตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละรายมีส่วนกำหนดการเกิดโรคและพยากรณ์โรคได้ในผู้ป่วย lupus nephritis

นอกเหนือจากการศึกษาในโรคไตชนิดต่างๆที่สนับสนุนว่า VEGF และ VEGFR มีบทบาทในการควบคุมการรั่วของโปรตีนในปัสสาวะ (glomerular permeability) ยังพบว่าปัจจัยทางพันธุกรรมในโรค SLE ก็มีส่วนเกี่ยวข้องด้วย โดยพบว่ายีน VEGF ตั้งอยู่ใน chromosome 6p21 ซึ่งเป็นตำแหน่ง major locus หรือ significant linkage ต่อโรค SLE การศึกษาความหลากหลายของรูปแบบของยีน (single nucleotide polymorphism) ของ VEGF จึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากเหตุผลหลายประการได้แก่ 1) ยีน VEGF และ VEGFR เป็นยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับกลไกการเกิดโปรตีนรั่วในปัสสาวะ (proteinuria) 2) ในการศึกษา SNP ของ VEGF ในโรคไตชนิดต่างๆ เช่นโรคไตจากเบาหวาน พบว่า SNP ที่อยู่บน promoter สัมพันธ์กับการเกิด nephropathy และยังพบว่า SNP ที่ตำแหน่งดังกล่าวทำให้มีการสร้างโปรตีน VEGF เพิ่มขึ้นอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เน้นศึกษาบทบาทของยีน VEGF ต่อการเกิด และความรุนแรงของโรค lupus nephritis โดยจำแนกเป็นหัวข้อดังนี้

1. เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง การแสดงออกของยีน (gene expression) ของ VEGF ในเนื้อไต กับลักษณะทางพยาธิสภาพ,ลักษณะความรุนแรงของโรค รวมทั้งพยากรณ์โรคของผู้ป่วย lupus nephritis
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน VEGF ในเนื้อไตและหาดำแหน่งของเซลล์เฉพาะ (specific cell type) ที่มีบทบาทในการเกิดโรค lupus nephritis
3. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ของ VEGF กับ expression profile ของ VEGF ทั้งในเลือด, เนื้อไตและเซลล์ปัสสาวะของผู้ป่วย Lupus nephritis

ในระหว่างที่ดำเนินการวิจัยได้ทำการทบทวนวรรณกรรมเพิ่มเติม จึงพบว่ายีนกลุ่มที่มีความสัมพันธ์กับ VEGF ได้แก่ยีนที่เกี่ยวข้องกับ angiogenesis และ fibrosis ได้แก่ angiotensin-1, transforming growth factor-beta (TGF-beta) เป็นต้น ผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนการศึกษาจาก VEGFR นั้นเป็น angiotensin-1 และ TGF-beta แทนดังรายงานผลข้างล่าง

วิธีการทดลอง

โครงการวิจัยนี้แบ่งระเบียบวิธีวิจัยออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. การศึกษาเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน (gene expression) ในเนื้อเยื่อไต (Kidney biopsy) ของผู้ป่วย Lupus nephritis และ กลุ่มควบคุม รวมถึงความรุนแรงของพยาธิสภาพของไตในผู้ป่วย

การศึกษานี้แบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 กลุ่ม Active lupus nephritis โดยผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น SLE ตาม American College of Rheumatology criteria ร่วมกับมีลักษณะของไตอักเสบ (โปรตีนในปัสสาวะ ≥ 300 มก. ต่อวัน, มีเม็ดเลือดแดงและ/หรือเม็ดเลือดขาวในปัสสาวะ ≥ 10 เซลล์/พื้นที่กำลังขยายสูง, ระดับ creatinine ในเลือดเพิ่มขึ้นร้อยละ 50) จำนวน 41 คน

กลุ่มที่ 2 กลุ่ม Normal tissue control จากไตของผู้บริจาคไต ซึ่งได้รับการตัดชิ้นเนื้อไต ก่อนการผ่าตัดปลูกถ่ายไต โดยมีข้อบ่งชี้ได้แก่เพื่อใช้เป็นชิ้นเนื้อสำหรับเปรียบเทียบ (baseline zero-time biopsy) ภายหลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไต กลุ่มนี้ประมาณ 6 คน

ลำดับขั้นตอนการทำวิจัย มีดังนี้

1.3 ผู้ป่วยยินยอมเข้าร่วมการศึกษาโดยลงนามในใบยินยอม

1.4 บันทึกข้อมูลที่สำคัญทางคลินิกของผู้ป่วย(รูปแบบฟอร์มการเก็บข้อมูลในภาคผนวก)

โดยแบ่งเป็นหัวข้อหลัก 3 ข้อ ได้แก่

ข้อมูลพื้นฐานต่างๆ (Demographic data)

การประเมินระบบอวัยวะต่างๆ รวมถึง Severity score เช่น SLEDAI

การตอบสนองต่อการรักษา เช่น Corticosteroids

1.3 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อและสกัด RNA

ตัวอย่างชิ้นเนื้อไตจากการทำการเจาะไต (Renal biopsy) ในผู้ป่วยและผู้บริจาคไต เพื่อใช้ในการปลูกถ่ายไต ส่วนหนึ่งจะถูกนำมาเก็บไว้หาลอดเก็บชิ้นเนื้อที่มีสารละลายรักษาสภาพ RNA (RNA later) และถูกแช่ในภาชนะที่บรรจุน้ำแข็งแห้ง แล้วนำมาเก็บที่ตู้แช่ -70°C เพื่อใช้ในการสกัด RNA และศึกษาการแสดงออกของยีน (gene expression) นอกจากนี้ ตัวอย่างชิ้นเนื้ออีกส่วนหนึ่งซึ่งไม่ได้ใส่ในสารละลายรักษาสภาพ RNA จะถูกนำไปศึกษาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการย้อม Immunohistochemistry (IHC)

ผู้ป่วยทุกรายที่ได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตจะถูกเก็บตัวอย่างปัสสาวะเพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์ในปัสสาวะด้วย

1.4 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนโดยวิธี Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

การตรวจหาปริมาณ RNA โดยวิธี real-time PCR เป็นวิธีการตรวจซึ่งผสมผสานข้อเด่นของ PCR เข้ากับการใช้ Hybridization probe ซึ่งสามารถเพิ่มความจำเพาะของการตรวจ การส่งสัญญาณอาศัยการตรวจหา Fluorescence จาก probe ซึ่งปริมาณสัญญาณ Fluorescence แปรผันตรงกับปริมาณ cDNA ที่ถูกสร้างขึ้นในปฏิกิริยา PCR

โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1) การสกัดแยก total RNA (RNeasy Mini kit, Qiagen, Canada)

หลักการ : สกัด total RNA โดยใช้อาศัยหลักการของ silica-gel-based membrane และขั้นตอนตามชุดสกัดดังนี้

- ขั้นตอน 1. ตัวอย่างชิ้นเนื้อจะถูกย่อยด้วยสารละลาย RLT buffer ที่ประกอบด้วย guanidine-isothiocyanate (GITC) และ β -mercaptoethanol
2. นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัด genomic DNA และโปรตีน จากนั้นสารละลายที่มี RNA อยู่จะถูกผสมด้วย 70 % เอทานอลแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้โมเลกุลของ RNA จับกับ silica-gel-based membrane
3. ใช้ washing buffer (RW1 และ RPE) ล้าง silica-gel-based membrane ที่มี RNA จับอยู่นั้นเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ และให้ได้ RNA ที่มีคุณภาพ
4. ชะ (Elute) สารละลายของ RNA ออกจาก membrane ด้วยน้ำที่ปราศจากการปนเปื้อนของ RNase

2) วัดปริมาณ RNA ที่ได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง spectrophotometer

หลักการ : อาศัยคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของ RNA ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดย $A_{260} = 1 = 40 \text{ ug/ul RNA}$

- ขั้นตอน 1. แบ่ง RNA ตัวอย่างมาเจือจาง (dilute) ด้วยน้ำที่ปราศจากการปนเปื้อนของ RNase ด้วยสัดส่วน 1:20
2. วัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร
3. คำนวณหาปริมาณ total RNA โดย $A_{260} = 1 = 40 \text{ ug/ul RNA}$ นอกจากนี้ยังสามารถวัดคุณภาพ RNA ได้โดยใช้ค่าสัดส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 ซึ่ง RNA ที่มีคุณภาพจะต้องมี ค่าสัดส่วนนี้ในช่วง 1.9-2.3

3) สร้าง complementary DNA (cDNA) โดยปฏิกิริยา reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

หลักการ : ปฏิบัติการการสร้าง cDNA จะอาศัยความสามารถของเอนไซม์ reverse transcriptase (TaqMan[®] RT-PCR, Applied Biosystem, CA., USA.)

ขั้นตอน 1. คำนวณปริมาณตัวอย่าง RNA ให้ได้ 0.5 ug โดยที่ปริมาตรต้องไม่เกิน 11.5 ul หากปริมาตรน้อยกว่านั้นให้ปรับปริมาตรให้เป็น 11.5 ul โดยใช้น้ำที่ปราศจากการปนเปื้อนของ RNase

2. เตรียม master mix ซึ่งใช้ random primer และเอนไซม์ Multiscribe[®] reverse transcriptase เพื่อสร้างสาย cDNA โดยใช้สาย RNA เป็นแม่แบบ เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนในขั้นตอนต่อไป (Condition: 25°C 10 min, 48°C 30 min, 95°C 5 min)

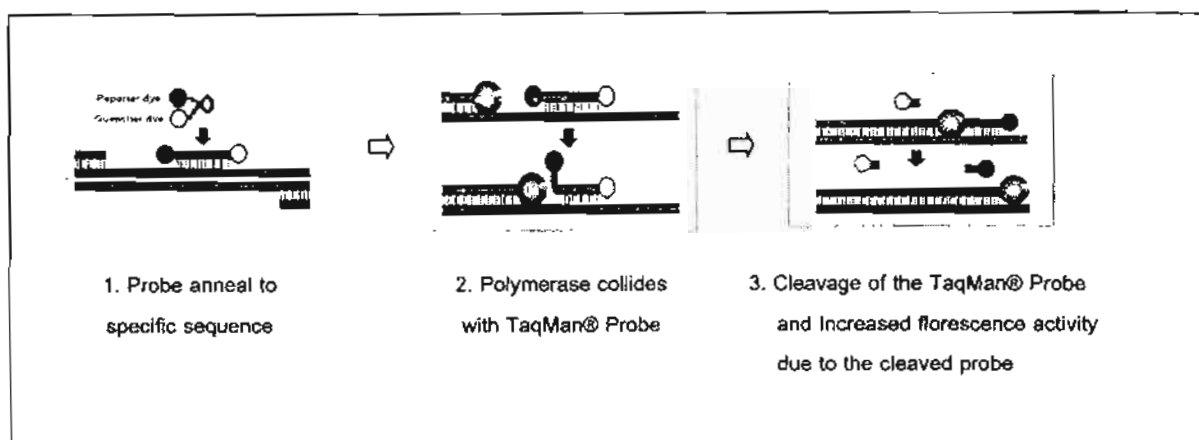
4) วัดปริมาณการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วยเทคนิค Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

หลักการ : เทคนิค real-time PCR เป็นเทคนิคการหาปริมาณการแสดงออกของยีนที่สนใจโดยผสมผสานข้อเด่นของ PCR เข้ากับการใช้ Hybridization probe ซึ่งสามารถเพิ่มความจำเพาะของการตรวจ การส่งสัญญาณอาศัยการตรวจหา Fluorescence จาก probe ซึ่งปริมาณสัญญาณ Fluorescence แปรผันตรงกับปริมาณ cDNA ที่ถูกสร้างขึ้นในปฏิกิริยา PCR ดังรูปที่ 1

ขั้นตอน 1. เตรียม PCR master mix (QuantiTech Probe PCR, Qiagen, Canada) ปริมาตรรวม 18 ul ซึ่งประกอบไปด้วย 2xQuantiTech probe PCR , primer forward, primer reverse, probe และ RNase free water)

2. เติม cDNA template ของแต่ละตัวอย่างลงใน PCR master mix ตัวอย่างละ 2 ul นำไปวัดปริมาณการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วยเครื่อง LightCycler[®] machine (Roche Molecular Biochemical, Indianapolis, IN, USA). Condition: denature 95°C 0 sec, annealing/extension 60°C 1 min, 40 cycles

3. หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุดลงจะได้ผลการทดลองเป็นค่า crossing pointใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่สนใจ



รูปที่ 1 หลักการเบื้องต้นในการทำ Real-time PCR โดยใช้ TaqMan® Probe

1.5 วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ด้วยหลักการทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS version 11.5

ใช้โปรแกรม SPSS version 11.5 เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลระดับการแสดงออกของยีนระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับกลุ่มคนปกติ และภายในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคต่างกัน โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (means) และค่ามัธยฐาน (median) ของระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจ และใช้ Mann-Whitney U-test ในประชากร 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน (Two independent groups)

2. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีน VEGF และการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อไต รวมถึงความรุนแรงของพยาธิสภาพของไต

หลักการ : เทคนิค Immunohistochemistry เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการการจับกันระหว่างโปรตีน (antigen) ภายในชิ้นเนื้อกับ antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนนั้นๆ

ขั้นตอน : 1. Deparaffinized เพื่อให้ตัวอย่างสามารถทำปฏิกิริยากับสารเคมีในขั้นตอนต่อไปได้

2. Blocking endogenous peroxidase ด้วย 0.6% H_2O_2 in Methanol เป็นเวลา 25 นาที และล้างสไลด์ด้วยน้ำเป็นเวลา 3 min

3. Antigen retrieval โดยการ Microwave ตัวอย่างใน TE buffer pH 9.0 (Power High 3 นาที, 30% Power High 10 นาที) หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที

4. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น และวงรอบชิ้นเนื้อตัวอย่างด้วย DAKO pen แล้วแช่สไลด์ใน Phosphate buffer saline (PBS) 5 นาที

5. Blocking non-specific โดยหยด 3% Normal horse serum ให้ท่วม ตัวอย่างที่วางไว้แล้วตั้งทิ้ง 20 นาที
6. Antigen-antibody complexes formation โดยหยด Primary anti-VEGF antibody (1:75) และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา antigen และ antibody 60 นาที
7. ล้างสไลด์โดยแช่ใน PBS 3 นาที, 2 ครั้ง แล้วหยด Secondary Antibody (DAKO Envision[®] : Labeled HRP) 40 นาที แล้วล้างสไลด์ใน PBS 3 นาที, 2 ครั้ง
8. Color development โดยใช้ 3,3' Diaminobenzidine Tetra-hydrochloride (DAB) 10 นาที แล้ว counterstaining ด้วย Hematoxylin และ Mount slide

3. การหารูปแบบของยีน VEGF โดยวิธี PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (35)

หลักการ : DNA ที่สกัดจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยจะถูกเพิ่มจำนวนยีน VEGF ที่สนใจ ด้วยวิธี PCR แล้วใช้ Restriction enzyme มาตัด PCR product ในตำแหน่งที่จำเพาะเพื่อหาความหลากหลายของยีน จากนั้นตรวจหาชิ้น PCR product โดยวิธี Agarose gel electrophoresis

ขั้นตอนการดำเนินการ

1. เลือกใช้ primer (ดังแสดงในตารางที่ 1) และทำ PCR DNA Amplification โดยอาจจะมีการปรับเปลี่ยนสภาวะ PCR ให้เหมาะสมต่อไป
2. การตัด PCR product ด้วย Restriction enzyme
3. การตรวจสอบผล PCR Product และแปลผลการศึกษา

ตารางที่ 3 Identification of 2 bialleleic VEGF gene polymorphisms by PCR amplification and Restriction enzyme digest

	VEGF polymorphisms (bp.from transcription initiation site)	
Position	-460 (C/T)	+405 (G/C)
PCR primers	5'-TGT GCG TGT GGG GTT GAG CG-3' 5'-TAC CTG CGG ACA GGG CCT GA-3'	5'-ATT TAT TTT TGC TTG CCA TT-3' 5'-GTC TGT CTG TCT GTC CGT CA- 3'
PCR product (bp.)	175	304
Restriction enzyme	<i>Bst</i> <i>UI</i>	<i>Bsm</i> <i>FI</i>

(หมายเหตุ: สำหรับการศึกษาในส่วนนี้ดำเนินการขอทุนวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมี ผศ.พญ.ดร.จงกลณี วงศ์ปิยะบวร เป็นผู้วิจัยหลักและ ผศ.นพ.
ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์ เป็นผู้วิจัยร่วม)

ผลการทดลอง

1. Samples Characteristics

ในการศึกษานี้ได้เก็บรวบรวมชิ้นเนื้อไตจากผู้ป่วย Lupus nephritis (LN) ทั้งหมด 41 ชิ้น โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้รับการวินิจฉัยว่าจัดอยู่ในกลุ่มที่มีอาการของโรครุนแรง (Class IV LN) และชิ้นเนื้อจากผู้บริจาคไตเพื่อปลูกถ่ายไตจำนวน 6 ชิ้น ตัวอย่างชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยทุกรายจะได้รับการศึกษาลักษณะและวิเคราะห์ผลทางพยาธิสภาพโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางด้านพยาธิวิทยา (V.K.) นอกจากนี้ตัวอย่างชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยที่มีจำนวน glomerulus น้อยกว่า 5 glomerulus จะไม่ถูกนำมาวิเคราะห์ผล เนื่องจากอาจจะมีผลทำให้การวิเคราะห์ผิดพลาดได้ ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ผลการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วย 32 ราย และกลุ่มควบคุมจำนวน 6 ราย โดยเพศ, อายุ, ค่าแสดงการทำงานของไต และความรุนแรงของโรคได้ถูกวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 Samples Characteristic

Characteristics	LN	Kidney donor
Number	32	6
Gender (F/M)	32/0	3/3
Age (year)	29.5 (34-23) [*]	48.5 (55.3-36.50) [*]
Serum Creatinine (mg/dl)	1.0 (2.2-0.7) [*]	1.0 (1.1-0.7) [*]
Protienuria (g/day)	2.0 (3.61-1.11) [*]	0
Urinary erythrocyte count (per high power)	12 (40 -1) [*]	0
Activity score	5 (11-0.5) [*]	N/A
Chronicity score	2 (6-1) [*]	N/A

^{*} Inter-quartile range (Q₃-Q₁)

2. การศึกษาปริมาณของ mRNA ของ VEGF และ Growth factor และ Chemokine อื่น ๆ

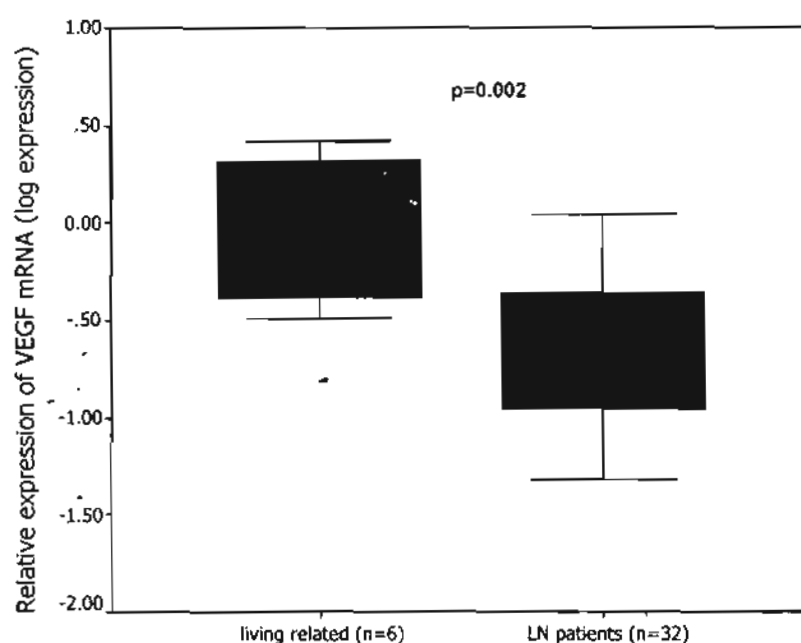
การศึกษาปริมาณของ mRNA ของ VEGF และ Growth factor รวมทั้ง Chemokine อื่น ๆ อีก 3 ชนิดในเซลล์ปัสสาวะ พบว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพภายในไตของผู้ป่วย ซึ่งสามารถใช้ปริมาณ mRNA ในการตรวจวินิจฉัยภาวะการกำเริบของไตอักเสบเรื้อรังได้ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ mRNA ของยีนดังกล่าวใน

ปัสสาวะ (urinary mRNA) ยังสามารถใช้ในการพยากรณ์โรค (prognostic test) ได้อีกด้วย ซึ่งผลงานดังกล่าวได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ตามที่ได้รายงานไว้แล้วในรายงานโครงการวิจัยประจำปีที่ 1 (ดังเอกสารแนบในภาคผนวก)

3. การศึกษาเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน VEGF (intra-renal VEGF) ในเนื้อเยื่อไต (Kidney biopsy) ของผู้ป่วย Lupus nephritis และ กลุ่มควบคุม (Kidney transplant donor) รวมถึงความรุนแรงของพยาธิสภาพของไตในผู้ป่วย

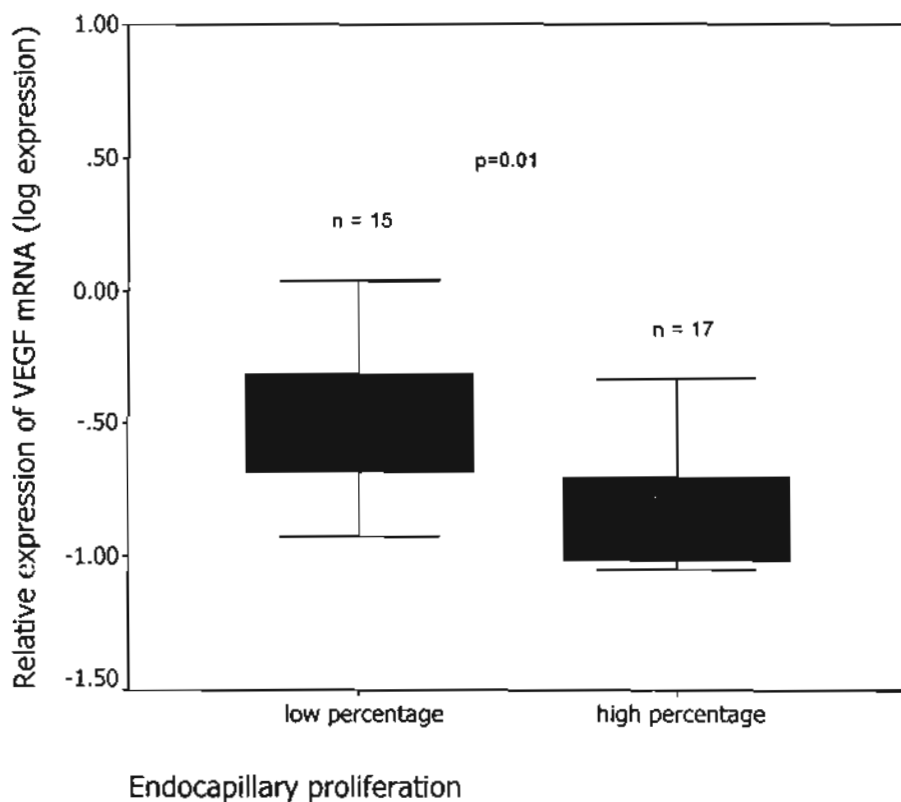
สืบเนื่องจากการศึกษาการแสดงออกของยีน VEGF ในเซลล์ปัสสาวะที่แสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพภายในไตตามที่ได้ตีพิมพ์ไปแล้วนั้น ทำให้มีสมมติฐานที่เป็นไปได้ 2 อย่าง คือ intra-renal VEGF gene expression เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับในปัสสาวะ หรือไม่ได้เพิ่มขึ้นหรืออาจจะลดลงเนื่องจากเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้าง VEGF หลุดออกมาในปัสสาวะก็เป็นได้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเนื้อไตด้วยวิธี Real-Time Polymerase Chain Reaction

ผลการทดลองพบว่ากลุ่มผู้ป่วย lupus nephritis มีการแสดงออกของยีนลดต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (Kidney transplant donor) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ Relative Quantitation (36) พบว่าในผู้ป่วยมีระดับการแสดงออกของยีน VEGF อยู่ที่ -0.83 ± 0.7 log copies ส่วนกลุ่มควบคุมมีระดับการแสดงออกของ VEGF อยู่ที่ -0.001 ± 0.39 log copies ซึ่งค่า p value ของทั้งสองกลุ่มอยู่ที่ $p = 0.002$ ดังแสดงในรูปที่ 2

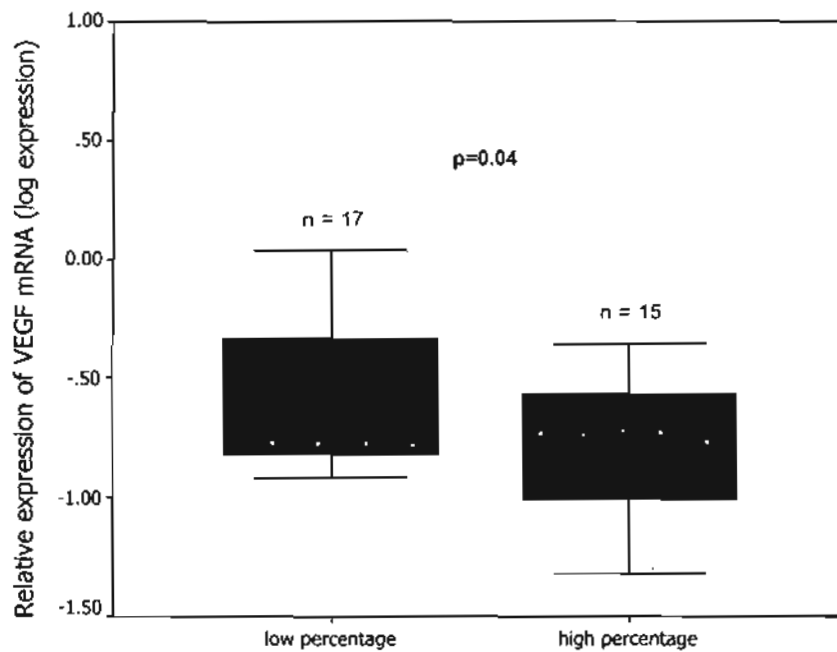


รูปที่ 2 ระดับการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเนื้อไต Boxplot แสดงการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน VEGF ในผู้ป่วย lupus nephritis-จำนวน 32 คน และ กลุ่มควบคุม (living related kidney transplant donor) จำนวน 6 คน

นอกจากนี้ยังพบว่าการลดลงของ VEGF mRNA มีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงของไต ได้แก่ endocapillary proliferation, crescent formation และ activity index โดยผู้ป่วยที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มพยาธิสภาพดังกล่าวรุนแรง (high percentage; endocapillary proliferation ≥ 19 , crescent formation ≥ 1 และ activity index ≥ 2.5) จะมียกระดับการแสดงออกของ VEGF mRNA ต่ำกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของไตรุนแรงน้อยกว่า (low percentage) p-value = 0.01, 0.04 และ 0.03 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3-5

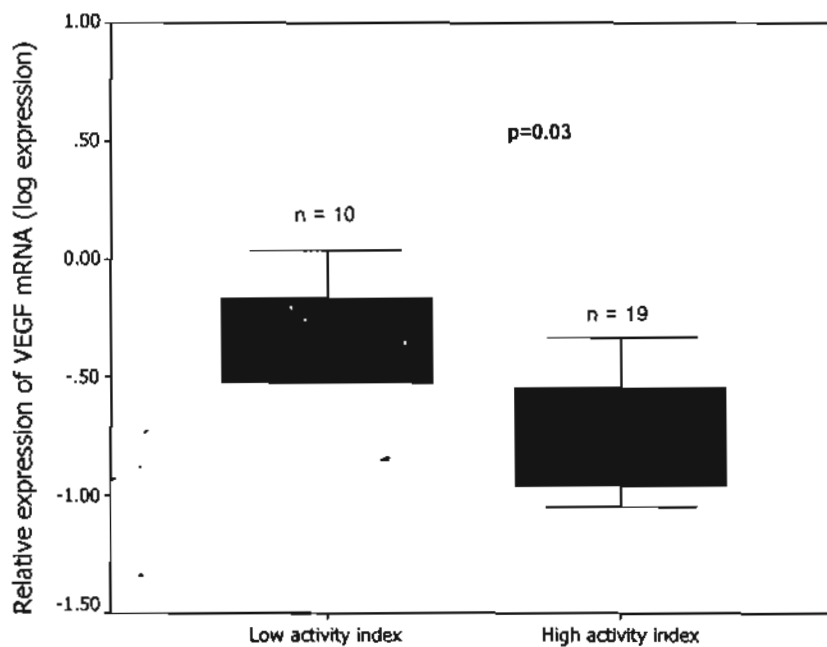


รูปที่ 3 การแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วย lupus nephritis ที่มีพยาธิสภาพแบบ glomerular endocapillary proliferation Boxplot แสดงการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน VEGF ในผู้ป่วยที่มีเปอร์เซ็นต์ glomerular endocapillary proliferation สูงและต่ำ



Crescent formation

รูปที่ 4 การแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วย lupus nephritis ที่มีพยาธิสภาพแบบ crescent formation Boxplot แสดงการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน VEGF ในผู้ป่วยที่มีเปอร์เซ็นต์ crescent formation สูงและต่ำ



Activity index

รูปที่ 5 การแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วย lupus nephritis ที่มีความรุนแรงของโรค (activity index) ต่างกัน Boxplot แสดงการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน VEGF ในผู้ป่วยที่มี activity index สูงและต่ำ