

Abstract

Classical complement component C4 deficiency is the high risk factor for autoimmune disease including systemic lupus erythematosus (SLE) in Anglo-Irish, North American, and Japanese including Thai populations. Our previous study, 5.93% of C4 null genes (C4A/C4B) were found in Thai patients by touchdown PCR, and its C4 deletion and/or point mutations have been revealed by the single specific primer-PCR (SSP-PCR). In all SLE patients who had C4A and/or C4B deficiencies exhibited more than 5 of American College of Rheumatology (ACR) criteria's including malar rash, oral ulcers, renal disorder, immunological disorder and antinuclear antibodies. Most studies have shown that thymus-derived $CD4^+CD25^+$ regulatory T cell (Treg) are essential for the maintenance of immunological self-tolerance. To study the correlation of Treg cells and autoimmune disease, we used C4 knockout (C4KO) mice and C57BL/6J mice as animal model and control, respectively. We quantified the amount of Treg cells in blood circulation including in secondary lymphoid tissues *e.g.* spleen and bone marrow. The result from Fluorescence-activated cell sorting (FACS) showed that percentage of Treg cells in C4KO mice were lower than normal mice in all age groups and were highest found in bone marrow compared with spleen and blood in both C4KO mice and normal mice. Furthermore, the expression of FoxP3 and TGF- β were predominant found in normal mice than in C4KO mice in all kinds of tissue ($n=10$; $P<0.05$). The results of antinuclear antibodies (ANA) showed that the titers from C4KO mice were higher than that of normal mice. Moreover, antinuclear antibodies were significantly found in old age mice (6-8 months) in both C4KO and normal mice.

บทคัดย่อ

งานวิจัยหลายชิ้นสรุปว่าภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 (C4Q0) นั้นเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อภาวะการเกิดโรคเอสแอลอี ซึ่งพบได้ในกลุ่มชาวไอริช อเมริกัน ออสเตรเลียน ญี่ปุ่น รวมทั้งในคนไทย นอกจากนี้การศึกษาในกลุ่มคนอเมริกันพบว่า ภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4A (C4AQ0) และ C4B (C4BQ0) นั้นจะสามารถพบได้ในกลุ่มประชากรปกติประมาณ 10% และ 16% ตามลำดับ การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง regulatory T cell (Treg) กับ โรคอโตอิมมูน โดยทำการทดลองในหนูที่มีภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 (C4KO) เทียบกับหนูปกติ ที่ช่วงอายุต่างๆ คือ 2, 4, 6 และ 8 เดือน โดยศึกษาปริมาณของ Treg population ด้วยวิธี Flow cytometry จากเซลล์เม็ดเลือด ไขกระดูก และ ม้าม ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเปรียบเทียบหนู C4KO และ หนูปกติในช่วงอายุที่เท่ากัน ปริมาณ Treg population ในหนูปกติ มีค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ $CD4^+ CD25^+$ สูงกว่าหนู C4KO ในทุกช่วงอายุ และเมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่าง ระหว่างอวัยวะต่างๆ พบว่าในไขกระดูกมีค่าของ $CD4^+ CD25^+$ สูงกว่าที่พบได้ในม้าม และเลือด ทั้งในหนู C4KO และหนูปกติ เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน transcription factor และ cytokines ด้วยวิธี Real time-PCR พบว่าใน ม้าม ไขกระดูก และ เลือด ของหนูปกติ ที่ทุกช่วงอายุ มีการแสดงออกของ TGF- β และ FoxP3 มากกว่าหนู C4KO อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในแต่ละช่วงอายุเลือดของหนู และศึกษาภาวะการมีอโตแอนติบอดีในกระแสเลือดของหนู C4KO เทียบกับหนูปกติ ผลการทดลองพบว่าหนูในกลุ่ม C4KO มีจำนวนหนูที่มีผลเป็นบวกมากกว่ากลุ่มหนูปกติและพบว่า Antinuclear antibodies (ANA) ของหนูที่มีอายุมากคือ มีอายุ 6 และ 8 เดือน จะมี titer และจำนวนหนูที่มีผลเป็นบวกมากกว่าหนูที่มีอายุน้อยอย่างมีนัยสำคัญ ผลการวิจัยสรุปได้ว่าแม้ ANA อาจจะตรวจพบได้ในหนูปกติ (42.5%) แต่ หนู C4KO ซึ่งเป็นหนูที่มีภาวะอโตอิมมูน จะสามารถตรวจพบ ANA ได้มากกว่า (62.5%) นอกจากนี้พบว่าจำนวนหนูที่มีผลของ ANA เป็นบวกและ titer ของ ANA ที่สูง จะพบได้ในหนูที่มีอายุมากอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเนื่องมาจากหนูที่มีอายุมาก การควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันอาจจะไม่ดีเท่าหนูอายุน้อย จนมีผลไปถึงการสร้าง autoantibodies ซึ่งทำปฏิกิริยากับ nuclear antigens ของร่างกายตนเอง สำหรับผลจาก Flow cytometry จะพบ $CD4^+ CD25^+$ T cells (Treg), ได้ในหนูปกติมากกว่าหนู C4KO

อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะพบได้มากในไขกระดูก สำหรับการแสดงออกของ TGF- β และ FoxP3 พบว่ามีความสัมพันธ์กับการทำงานของ Treg อย่างมีนัยสำคัญ โดยการตรวจหา mRNA ด้วยวิธี real time PCR พบว่าในหนูปกติซึ่งมีการทำงานของ Treg ที่ดีกว่ามีระดับ mRNA ของ TGF- β และ FoxP3 ที่สูงกว่าหนู C4KO และนอกจากนี้ยังพบว่าไขกระดูกเป็นส่วนที่มีการสะสมของ Treg ได้มากที่สุด ซึ่งผลจากการวิจัยครั้งนี้จะทำให้สามารถเข้าใจถึงกลไกของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ต่อภาวะการเกิด autoimmune ได้ดีขึ้นอันจะนำมาซึ่งแนวทางในการรักษาโรค เช่น immunotherapy และ/ หรือ stem cell transplantation ในอนาคตต่อไป