



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

STUDY OF PATHOGENIC MECHANISMS IN LUNG-DERIVED CELL LINE
INFECTED WITH AVIAN INFLUENZA H5N1 COMPARING WITH H1N1 VIRUSES

โดย ทิษฏญา เสมาเงิน และคณะ

7 กุมภาพันธ์ 2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

STUDY OF PATHOGENIC MECHANISMS IN LUNG-DERIVED CELL LINE INFECTED WITH AVIAN INFLUENZA H5N1 COMPARING WITH H1N1 VIRUSES

คณะผู้วิจัย

1. ดร.พิษญา เสงมาเงิน
2. ศ.ดร.นพ. ประเสริฐ เอื้อวรากุล
3. ดร.ภัทรอร หาวนพันธ์

สังกัด

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

และมหาวิทยาลัยบูรพา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

โรคไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล (seasonal flu) เกิดจากเชื้อไวรัส influenza A H1N1 เป็นสาเหตุสำคัญ มักพบระบาดในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาวของทุกปี ก่อให้เกิดความผิดปกติของระบบทางเดินหายใจ ในปี ค.ศ. 2009 มีการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ influenza A H1N1 / ไข้หวัดหมู/ ไข้หวัดใหญ่ 2009 (influenza 2009) เกิดจากการผสมยีนข้ามสายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ของหมู ก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจชนิดเฉียบพลัน อาการแทรกซ้อนที่สำคัญคือภาวะปอดอักเสบนำไปสู่การเสียชีวิตในคน

อย่างไรก็ตามกลไกในการก่อพยาธิสภาพของเชื้อไวรัส seasonal flu และ influenza 2009 ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่ามีความแตกต่างกันอย่างไร ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาโดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ติดเชื้อไวรัส seasonal flu (A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1)) และ influenza 2009 (A/Nonthaburi/104/2009 (H1N1)) ทำการเก็บอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ IL-6 ด้วยวิธี ELISA วัดปริมาณเซลล์ตายด้วย Flow cytometry ทำการวิเคราะห์การตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงปอด A549 ด้วยวิธี 2-DE analysis และ mass spectrometry ผลการทดลองพบว่ามีโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อติดเชื้อไวรัส seasonal flu จำนวน 19 ชนิด มีโปรตีน 5 ชนิดที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น โปรตีน 14 ชนิดมีการแสดงออกลดลง เช่น cytokeratin 8, heat shock protein 90 และ vimentin เป็นต้น เซลล์ปอดที่ติดเชื้อไวรัส influenza 2009 พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงทั้งหมด 7 ชนิด มีจำนวน 4 ชนิดที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ได้แก่ Lamin A/C, Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase, Alpha-actinin-4 และ Aldehyde dehydrogenase มีโปรตีนจำนวน 3 ชนิดที่มีการแสดงออกลดลง ได้แก่ Receptor of activated protein C kinase 1, Proteasome subunit HsN3 และ Chain A, Three-Dimensional Structure of Human Electron Transfer Flavoprotein โปรตีนเหล่านี้มีหน้าที่ทางชีวภาพที่หลากหลาย บางชนิดเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัส ทำการยืนยันผลการแสดงออกของโปรตีน vimentin และ lamin A/C ด้วยวิธี 2DE-western blot ศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อติดเชื้อไวรัสด้วยโปรแกรม String 10.0

การศึกษาในครั้งนี้ช่วยเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับการเกิดพยาธิสภาพที่เซลล์ปอดเมื่อมีการติดเชื้อไวรัส seasonal flu และ influenza 2009 มากขึ้น การหลังไซโตไคน์ระหว่างที่มีการติดเชื้อไวรัสซึ่งช่วยบอกถึงความรุนแรงของโรค ยิ่งกว่านั้นการศึกษาในครั้งนี้จะช่วยเพิ่มข้อมูลกลไกระดับโมเลกุลซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาการป้องกันหรือการรักษาในอนาคต

คำสำคัญ: โรคไข้หวัดใหญ่, ไวรัสไข้หวัดใหญ่, กลไกก่อโรค, เซลล์เพาะเลี้ยงปอด, โปรตีนโอมิคส์

Abstract

The seasonal influenza H1N1 virus can cause local inflammation at the upper respiratory tract. It happens annually and usually peaks in rainy and winter season. It can cause mild or severe illness. In 2009, there was a new emerging virus influenza A/ swine flu/ influenza 2009 which is a combination of swine-lineage influenza virus genes.

However, some pathogenic difference between seasonal flu and influenza 2009 in human lung remains unclear and largely unknown. The alveolar epithelial cells (A549) were infected with seasonal flu (A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1)) and influenza 2009 (A/Nonthaburi/104/2009 (H1N1)). The IL-6 cytokine in culture supernatant was determined by ELISA assay. Cell pellet was collected and quantitated cell death by Flow cytometry. The cellular responses of A549 by comparing between seasonal flu and influenza 2009 infection were performed by 2-DE analysis. Uninfected cells were incubated in cultured media as a mock-infected control. The changes in global protein profile will be evaluated by Image master 2D platinum software and further identified by mass spectrometry. The results showed that there are 19 proteins expression changed after seasonal flu infections. Five proteins were up-regulated whereas fourteen proteins were down-regulated including, Cytokeratin 8, Heat shock protein 90 and Vimentin. Interestingly, there are 7 proteins expression changed in influenza 2009 -infected A549. Four proteins were increased such as lamin A/C, Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase, Alpha-actinin-4 and Aldehyde dehydrogenase. Three proteins were decreased, Receptor of activated protein C kinase 1, Proteasome subunit HsN3 and Chain A, Three-Dimensional Structure of Human Electron Transfer Flavoprotein. These proteins play important roles in several pathways, especially in viral infection processes. Confirmation of vimentin and lamin A/C expression were performed by 2DE-western blot analysis. The analysis of protein-protein interaction network was predicted using String 10.0 biological database.

This study will enhance the understanding of lung pathogenesis from seasonal flu and influenza 2009 infection, as well as the secretion of cytokines during viral infection which may contribute the severity of tissue pathology. Moreover, these findings may provide the information of molecular mechanisms which leading to the development of new therapeutic targets and strategies.

Keywords; Influenza, Influenza virus, pathogenesis, Lung cell line, Proteomics

สรุปงานวิจัย

1. บทนำและปัญหาการวิจัย

โรคไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลหรือ seasonal flu มีการระบาดทุกปีช่วงฤดูฝนและฤดูหนาว เกิดจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่กลุ่มเอ (Influenza A virus) เป็นส่วนใหญ่ สามารถแพร่กระจายอย่างรวดเร็วจากคนสู่คน จัดเป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญของประชากรทำให้เกิดการเจ็บป่วยในระบบทางเดินหายใจ ผู้ป่วยมีอาการไข้สูงแบบเฉียบพลัน ปวดศีรษะ น้ำมูกไหล ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ อาจมีคลื่นไส้ อาเจียน และท้องเสียร่วมด้วย (3) ผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัว ผู้สูงอายุ เด็กเล็ก สตรีมีครรภ์ อาการอาจรุนแรงจนถึงเสียชีวิตได้ (5) ภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญ คือโรคปอดอักเสบซึ่งพบได้บ่อยและเป็นสาเหตุที่สำคัญของการเสียชีวิต (1) ในปี ค.ศ. 2009 มีการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ ที่เรียกว่า pandemic influenza 2009 หรือ swine flu เริ่มระบาดที่ประเทศเม็กซิโก และกระจายไปยังประเทศต่างๆในทวีปยุโรป และทวีปเอเชีย รวมถึงประเทศไทย (1) องค์การอนามัยโลกได้กำหนดให้มีการรายงานติดตามเฝ้าระวังอย่างใกล้ชิด

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จัดอยู่ในตระกูล Orthomyxoviridae จีนัส Influenza virus A มีสารพันธุกรรม RNA สายลบแบบสายเดี่ยวจำนวน 8 ชิ้น และมีไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์ที่ล้อมรอบอนุภาคไวรัส ได้แก่ hemagglutinin และ neuraminidase (3) เป็นโมเลกุลสำคัญในการเข้าสู่เซลล์ปอดและก่อพยาธิสภาพ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 เป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ เกิดจากการผสมสารพันธุกรรมระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร สัตว์ปีกและคน การติดเชื้อของไวรัสในเซลล์ปอดทำให้มีการขัดขวางการสร้างโปรตีน เซลล์ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ และตายในที่สุด การตายของเซลล์เกิดขึ้นทั้งแบบ necrosis และ apoptosis (7) ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 มีอาการปอดอักเสบ พบเม็ดเลือดขาวแทรกอยู่ในเนื้อปอดเป็นจำนวนมาก (6) สันนิษฐานว่าไวรัสกระตุ้นการสร้างและหลั่งสารที่ส่งเสริมการอักเสบออกมาปริมาณมาก ทำให้ปอดเกิดปฏิกิริยาอักเสบเฉียบพลันรุนแรงจนเสียชีวิต (12) จากการศึกษาของ Coombs และคณะ ในเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส Influenza A/PR/8/34 (H1N1) โดยใช้วิธี stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) ร่วมกับ 2D-LC-MS/MS พบว่าโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น มีหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน การขนส่ง โปรตีนที่ตอบสนองต่อความเครียดและไวรัส พบโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลง มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ การขนส่ง และการตายของเซลล์แบบ apoptosis (9) การแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นขึ้นกับชนิดของเซลล์ และวงจรชีวิตของไวรัส ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงที่จำเพาะต่อการติดเชื้อไวรัส

อย่างไรก็ตาม รายงานการศึกษเกี่ยวกับการตอบสนองของเซลล์ปอดต่อการติดเชื้อไวรัส seasonal flu และ influenza 2009 ยังมีไม่มากนัก ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษการตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงปอด A549 ต่อการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล (influenza A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1)) เปรียบเทียบกับการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 (influenza A/Nonthaburi/104/2009 (H1N1))

ด้วยวิธีโปรตีนโอมิกส์และ mass spectrometry ทำการวิเคราะห์ปริมาณไซโตไคน์ IL-6 และศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีนที่บ่งชี้ได้โดยใช้ String 10.0

การศึกษาในครั้งนี้ช่วยเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับการเกิดพยาธิสภาพที่เซลล์ปอดเมื่อมีการติดเชื้อไวรัส seasonal flu และ influenza 2009 มากขึ้น การหลั่งไซโตไคน์ระหว่างที่มีการติดเชื้อไวรัสซึ่งช่วยบอกถึงความรุนแรงของโรค ยิ่งกว่านั้นการศึกษาในครั้งนี้จะช่วยเพิ่มข้อมูลกลไกระดับโมเลกุลซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาการป้องกันหรือการรักษาในอนาคต

2. วัตถุประสงค์

2.1 เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล (A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1)) และไข้หวัดใหญ่ 2009 (A/Nonthaburi/ 104/2009 (H1N1))

2.2 ศึกษาปริมาณไซโตไคน์ IL-6 ที่หลั่งจากเซลล์เพาะเลี้ยงปอดที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล (A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1)) และไข้หวัดใหญ่ 2009 (A/Nonthaburi/ 104/2009 (H1N1))

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลและไข้หวัดใหญ่ 2009

การศึกษาในครั้งนี้ใช้ไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล สายพันธุ์ A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1)) และใช้ไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 สายพันธุ์ A/Nonthaburi/ 104/2009 (H1N1) ทำการเพาะเลี้ยงไวรัสในห้อง Bio-safety level 2 หรือ BSL-2 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล เติมไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C ดูด Supernatant ที่และเติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) ยา Penicillin G/Streptomycin 1.2% และ 2 mM glutamine ใส่ตู้บ่ม 37°C ที่มี 5% CO₂ สังเกตการณ์เกิด cytopathic effect หรือ CPE ของ MDCK cells ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast ทำการเก็บ medium ที่เวลา 12 - 96 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ (hour post infection (h.p.i.)) เก็บห่ากันทุก 12 ชั่วโมง นำ culture supernatantปั่นเหวี่ยงที่ 1500 rpm, 4°C, เป็นเวลา 5 นาที ทำการไตเตรตไวรัสเพื่อหาค่า tissue culture infectious dose 50% (TCID₅₀) โดยใช้ MDCK cells เก็บไวรัสที่ -80°C จนกว่าจะทำการทดลองต่อไป

3.2 TCID₅₀ assay

นำไวรัสที่เก็บมาทำ 10-fold serial dilution ด้วย PBS จากนั้นเติมไวรัสลงใน 2.5×10^4 MDCK cells/well ของ 96-well plate ($n=3$) นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย PBS และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 ที่มี 0.2% FBS และ trypsin (5 µg/ml) เมื่อครบเวลา 4 วันนำมาคำนวณ TCID₅₀ ด้วยวิธี Reed-Muench method.

3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ A549

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ human lung adenocarcinoma cell line (A549) ใน 75 cm^2 flask โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ Minimal Essential Medium (MEM) ที่มี 10% FBS มียา Penicillin G/Streptomycin 1.2% และ 2 mM L-glutamine นำเซลล์ใส่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเตรียมเซลล์จำนวน 15 semiconfluent flasks แบ่งเป็น 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมี 5 flasks ได้แก่ กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัส A/Thailand/Siriraj-3/06 (H1N1) กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัส A/Nonthaburi/ 104/2009 (H1N1) และกลุ่มควบคุม (mock control)

3.4 Virus Infection

ทำการล้างเซลล์ A549 จำนวน 2 ครั้งด้วย PBS และทำการติดเชื้อไวรัส A/Thailand/Siriraj-3/06 (H1N1) และไวรัส A/Nonthaburi/ 104/2009 (H1N1) โดยทำการ vary ความเข้มข้นของไวรัส MOI 0.01, 0.1, 1 และ 10 นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการล้างสองครั้งด้วย PBS และเติมอาหาร MEM ที่มี 10% FBS มียา Penicillin G/Streptomycin 1.2% และ 2 mM L-glutamine ทำการเก็บ supernatants ที่เวลา 12, 24, 48 และ 72 h.p.i. นำไปวัดปริมาณ IL-6 cytokine ด้วยวิธี ELISA เก็บเซลล์นำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ตายด้วยวิธี Flow cytometry โดยใช้ annexin V/propidium iodide double staining เตรียม Uninfected cells เป็นกลุ่มควบคุม

3.5 Flow Cytometric Analysis of Cell Death

ทำการเก็บเซลล์โดยใช้ 0.25% trypsin/0.25 mM EDTA in PBS นำไปปั่นที่ 2000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และปั่นล้างสองครั้งด้วย ice-cold PBS และล้างด้วย ice-cold annexin V buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂·2H₂O; pH 7.4) และทำการผสมเซลล์ให้เข้ากับ annexin V buffer เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 5×10^5 cells/mL เติม FITC-conjugated annexin V (BD Biosciences) บ่มบนน้ำแข็งที่มีดเป็นเวลา 15 นาที เติม Propidium iodide (BD Biosciences) ความเข้มข้น 0.2 µg/mL ก่อนการวิเคราะห์ ร้อยละของเซลล์ตายวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACScan และใช้ CellQuest software (BD Biosciences) ในการวิเคราะห์ข้อมูล ใช้เซลล์ที่ fixed ด้วย 2% formaldehyde และ permeabilized ด้วย 0.2% Triton X-100 เป็น positive control ใช้ untreated cells เป็น negative control

3.6 Protein Extraction

นำ cell pellet มาแตกออกด้วย Lysis buffer ปริมาตร 150 μ l จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultrasonic bath นาน 15 นาที และ vortex เป็นเวลา 30 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm, 4°C เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสในหลอดใหม่ เติม Methanol ปริมาตร 600 μ l นำไป vortex เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเติม Chloroform ปริมาตร 150 μ l และ vortex เป็นเวลา 30 วินาที เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 450 μ l และ vortex เป็นเวลา 30 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm, 4°C เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง เก็บเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนสีขาว จากนั้นล้างตะกอนด้วย Methanol ปริมาตร 1 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm, 4°C เป็นเวลา 5 นาที เท Methanol ทิ้ง และเปิดฝาทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที จากนั้นเติม Lysis buffer ปริมาตร 50 μ l นำไป vortex และแช่ใน Ultrasonic bath 30 นาที เมื่อครบเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm, 4°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บ supernatant ที่ -20°C เพื่อทำการทดลองต่อไป

3.7 วัดความเข้มข้นของโปรตีน

ทำการพลาตมาตรฐานโดยเตรียม BSA ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 mg/ml ปริมาตร 10 μ l, Milli Q water ปริมาตร 48 μ l, Lysis buffer ปริมาตร 2 μ l และ Bradford reagent ปริมาตร 300 μ l ลงใน microcentrifuge tube เตรียม Blank โดยใช้ Milli Q water ปริมาตร 58 μ l, Lysis buffer ปริมาตร 2 μ l และ Bradford reagent ปริมาตร 300 μ l ลงใน microcentrifuge tube เตรียมตัวอย่างโปรตีนโดยใช้ตัวอย่างปริมาตร 2 μ l, Milli Q water ปริมาตร 48 μ l, Lysis buffer ปริมาตร 2 μ l และ Bradford reagent ปริมาตร 300 μ l ลงใน microcentrifuge tube (ทำ 3 ซ้ำ) จากนั้นดูดสารปริมาตร 180 μ l ลง 96-well plate วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร โดยเครื่อง Spectra Max spectrophotometer หาความเข้มข้นของโปรตีนโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานและคำนวณความเข้มข้นของตัวอย่างโปรตีนจากสมการ

3.8 2-DE Separation and Staining

นำตัวอย่างโปรตีนความเข้มข้น 150 μ g ผสมกับ IPG buffer ปริมาตร 1.5 μ l, 1% Bromophenol blue ปริมาตร 0.75 μ l และ Lysis buffer เติมจนได้ปริมาตรสุทธิ 130 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 4°C เป็นเวลา 5 นาที และเติมลงใน 7 cm strip holder จากนั้นวาง Immobiline DryStrip (nonlinear pH gradient of 3–10, 7 cm long; GE Healthcare, Uppsala, Sweden) เติม cover fluid ปริมาตร 700 μ l ปิดฝา นำไปแยกโปรตีนตาม pI ด้วยเครื่อง Ettan IPGphor II isoelectric Focusing System

นำ strip แช่ลงใน 2.5 ml SDS-PAGE equilibration buffer ที่มี 6 M urea, 25 mM DTT, 112 mM Tris-base, 4% SDS, 30% glycerol, และ 0.002% bromophenol blue แช่เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำ strip แช่ลงใน 2.5 ml SDS-PAGE equilibration buffer ที่มี 60 mg IAA แช่เป็นเวลา 15 นาที ครบเวลาดังด้วย SDS-PAGE running buffer 2 ครั้ง นำ strip มาทำ SDS-PAGE ใช้ความต่างศักย์ที่ 120 volt เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เตรียม SDS-PAGE 12.5% polyacrylamide gel หนา 1 mm โดย Milli Q water ปริมาตร 3.2 ml, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 ปริมาตร 2.5 ml, Acrylamide stock solution (30% acrylamide, 0.8% bis-acrylamide) ปริมาตร 4.2 ml, 10% SDS ปริมาตร 100 μ l, 10% APS ปริมาตร 70 μ l และ TEMED ปริมาตร 5 μ l ผสมให้เข้ากัน

นำเจลที่ผ่านการทำ SDS-PAGE แช่ใน fixation solution (10% methanol, 7% acetic acid) ปริมาตร 100 ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเจลด้วย Milli Q water 1-2 ครั้ง และย้อมด้วยสี Colloidal Coomassie Blue G-250 ปริมาตร 100 ml บ่มอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน

3.9 Matching and Analysis of Protein Spots

บันทึกภาพ 2DE gels ด้วย image scanner โดยใช้ LABSCAN application software ทำการวิเคราะห์รูปภาพด้วย Image Master 2D Platinum software โดยใช้ Parameters spot detection (i) minimal area = 10 pixels; (ii) smooth factor = 2.0; and (iii) saliency = 2.0 กำหนด reference gel และเทียบตำแหน่งของจุดโปรตีนบน reference gel กับเจลอื่นๆ ทำ Background subtraction โดยใช้ค่า intensity volume ของแต่ละจุดโปรตีนเทียบกับ total intensity volume (summation of the intensity volumes obtained from all spots within the same 2-D gel) นำค่า intensity volumes ของแต่ละจุดโปรตีน ตำแหน่งเดียวกัน นำมาคำนวณทางสถิติเพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากนั้นทำการตัดจุดโปรตีนนั้นไปทำการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินและวิเคราะห์ด้วยเครื่อง mass spectrometer เพื่อป้อนข้อมูลต่อไป

4.0 In-Gel Tryptic Digestion

ทำการตัดจุดโปรตีนที่ต้องการด้วยปลายเข็มฉีดยาให้มีขนาด 1×1 มิลลิเมตร ใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube ล้างด้วย methanol 1 ครั้ง และ Milli Q water ปริมาตร 200 μ l 2-3 ครั้ง ตามลำดับ ทำการดูด Milli Q water ออกให้หมด เติม 25 mM ammonium bicarbonate buffer ที่มี 50% acetonitrile ปริมาตร 100 μ l แช่ไว้ 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000g 1 นาที และดูด buffer ออกให้หมด (ทำซ้ำ 2 ครั้งหรือจนกว่าสีจะออกหมด) เมื่อขึ้นเจลทำการเติม 100% acetonitrile ปริมาตร 100 μ l แช่ไว้ประมาณ 5 นาที ให้ขึ้น gel กลายเป็นสีขาวขุ่น นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000g เป็นเวลา 1 นาที ดูด acetonitrile ออกให้หมด จากนั้นเติม 10 μ l ของ 25 mM ammonium bicarbonate buffer ที่มี 0.1 μ g trypsin นำไปปั่นเหวี่ยง และ

บ่มที่ 37°C ประมาณ 16 ชั่วโมง เติม 5% trifluoroacetic acid ที่มี 50% acetonitrile ปริมาตร 50 µl นำไป vortex เป็นเวลา 10 วินาที พัก 10 วินาที (ทำซ้ำ 10 ครั้ง) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดูด supernatant ลงใน 1.5 ml microcentrifuge (ทำซ้ำ 2-3 ครั้ง โดยนำส่วน supernatant รวมกัน) และทำตัวอย่างให้แห้งด้วย Speed-vac concentrator

4.1 Protein Identification by LC-MS/MS

ละลายตะกอนเปปไทด์ด้วย 1% formic acid ปริมาตร 1 µl และเติม 50% acetonitrile ใน 0.1% formic acid ปริมาตร 9 µl นำไป vortex เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเติมสารละลายเปปไทด์เข้าไปใน vial ของเครื่องและปิดฝา ตั้งค่าเครื่อง LC-MS/MS เริ่มการวิเคราะห์ตัวอย่าง บันทึกผลสำหรับนำไปสืบค้นฐานข้อมูลต่อไป โดยใช้ MASCOT (www.matrixscience.com) และสืบค้นกระบวนการทางชีววิทยา โดย www.uniprot.org จากฐานข้อมูล UniProt (www.uniprot.org) และสืบค้นความสัมพันธ์ของโปรตีนจากฐานข้อมูล String (<http://string-db.org/>)

4.2 2-D Western Blot Analysis

ทำ 2-DE western blot ต่อโปรตีน 2 ชนิดคือ lamin A/C และ vimentin โดยใช้ Primary antibody rabbit anti- Lamin A/C ความเข้มข้น 1:5,000 (abcam) และ rabbit anti-vimentin 1:5,000 (abcam) ใน 2.5% skim milk ใน 0.1% TBST บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติม Second antibody goat anti-rabbit 1:10,000 ใน 2.5% skim milk ใน 0.1% TBST บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบโดยวิธี chemiluminescent และประกบฟิล์มในห้องมืด

4. ระยะเวลาการดำเนินงานวิจัย

Research Plans	Schedule (months)							
	ปีที่ 1				ปีที่ 2			
	1 - 3	4 - 6	7 - 9	10 - 12	1 - 3	4 - 6	7 - 9	10 - 12
1. Production and titration of viruses	↔							
2. Infection of A549 cells with seasonal H1N1 and influenza 2009 viruses		↔						
3. Quantitative analysis of cell death by flow cytometry		↔						
4. Cytokine and chemokine production assay			↔					
5. 2-DE analysis				↔				
6. Matching protein spots with Image master 2D platinum software				↔				
7. Mass spectrometric analysis					↔			
8. Bioinformatics analysis						↔		
9. 2-D western blot analysis							↔	
10. Manuscript preparation								↔

5. ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบกลไกในการก่อพยาธิสภาพภายในเซลล์ปอดที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลและไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 ทั้งนี้จะช่วยเพิ่มความรู้ความเข้าใจมากขึ้นและอาจนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาต่อไปในอนาคต

การทบทวนวรรณกรรม

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus) เป็น RNA ไวรัส อยู่ในตระกูล *Orthomyxoviridae* ประกอบด้วย 5 genus ได้แก่ Influenza virus A, Influenza virus B, Influenza virus C, Thogotovirus และ Isavirus มีรายละเอียดดังนี้

1. Influenza virus A สามารถแบ่งกลุ่มตามประเภทของ hemagglutinin และ neuraminidase โดย hemagglutinin แบ่งได้ 16 ชนิด (H1-H16 subtype) และ neuraminidase แบ่งได้ 9 ชนิด (N1-N9 subtype) Influenza virus A เป็นไวรัสที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นสาเหตุสำคัญของโรคไข้หวัดใหญ่ที่เกิดการแพร่ระบาดทั่วโลก สามารถแพร่ระบาดได้ทั้งในคนและสัตว์หลายชนิด ได้แก่ นก ไก่ เป็ด สุกร ม้า แมว สุนัข เป็นต้น (1)

2. Influenza virus B เป็นสาเหตุของการเกิดโรคไข้หวัดใหญ่เฉพาะในคนเท่านั้น มี hemagglutinin และ neuraminidase เพียงชนิดเดียว มักก่อการระบาดบางพื้นที่

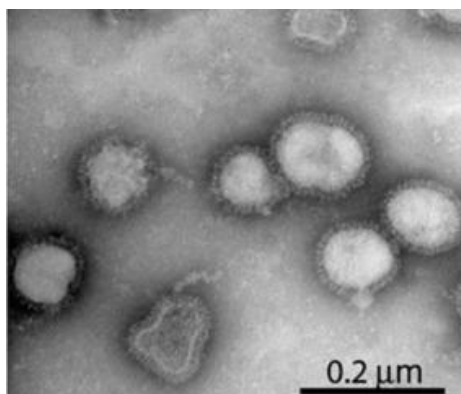
3. Influenza virus C แพร่ระบาดในคนและสุกร อาการของโรคไม่รุนแรง ผู้ติดเชื้ออาจไม่แสดงอาการหรือแสดงอาการไม่รุนแรง

4. Thogotovirus เป็นไวรัสที่มีเห็บเป็นพาหะ ทำให้เกิดการติดเชื้อในปศุสัตว์และมนุษย์ในทวีปแอฟริกา ยุโรปและเอเชีย (2)

5. Isavirus เป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคโลหิตจางในปลาแซลมอน เป็นโรครุนแรงต่อการเพาะเลี้ยงปลาแซลมอนในทะเลแอตแลนติก (2)

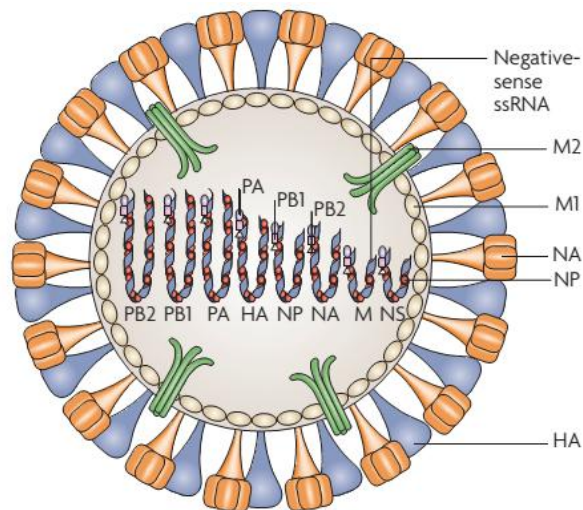
ลักษณะของไวรัสไข้หวัดใหญ่

ไวรัสมีอนุภาคกลม (spherical) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 80-100 นาโนเมตร เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 รูปร่างของ Influenza virus มีลักษณะกลม มีเปลือกหุ้มด้านนอก เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (3)

ไวรัสไข้หวัดใหญ่มีสารพันธุกรรม RNA แบบสายเดี่ยวชนิดขั้วลบ (single-stranded, negative-sense RNA genomes) จำนวน 8 ท่อน (ภาพที่ 2) แต่ละท่อนทำหน้าที่ในการผลิตโปรตีนที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของไวรัส (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของอนุภาคไวรัส Influenza A (4)

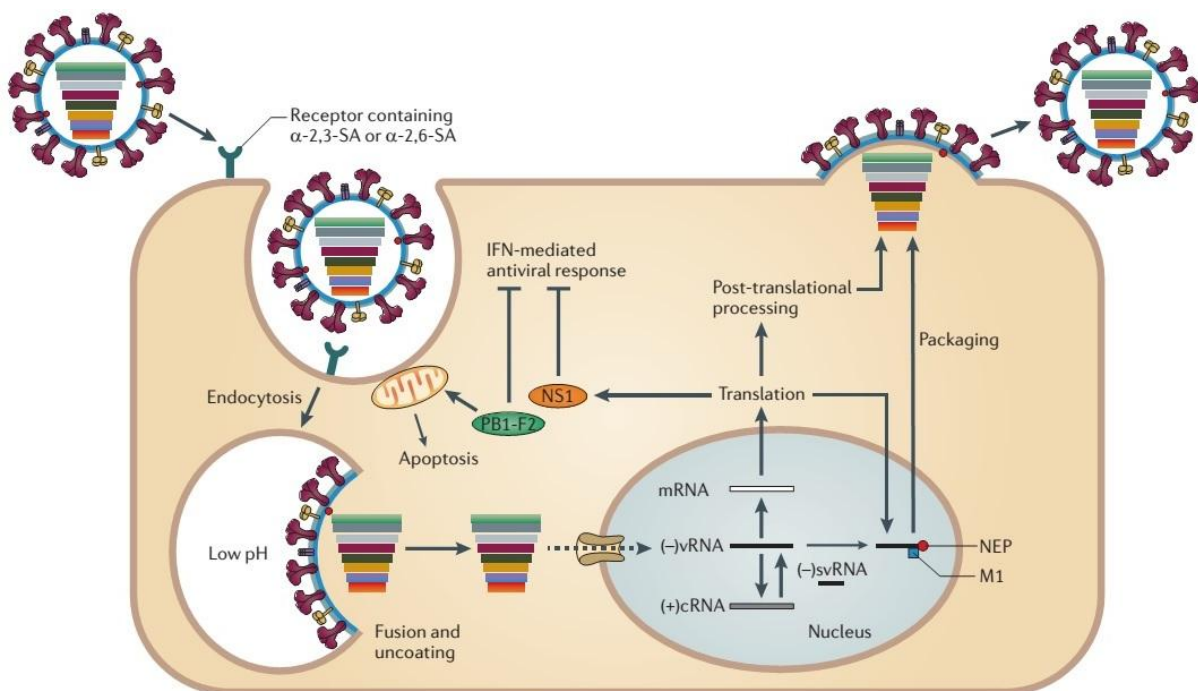
ตารางที่ 1 แสดงจีโนมและหน้าที่ของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ Influenza A (5)

Segment	Segment length in nucleotides	Encoded Protein(s)	Protein length in amino acids	Protein function
1	2341	PB2	759	Polymerase subunit; mRNA cap recognition
2	2341	PB1	757	Polymerase subunit; RNA elongation, endonuclease activity
		PB1-F2	87	Pro-apoptotic activity
3	2233	PA	716	Polymerase subunit; protease activity
4	1778	HA	550	Surface glycoprotein; major antigen, receptor binding and fusion activities
5	1565	NP	498	RNA binding protein; nuclear import regulation
6	1413	NA	454	Surface glycoprotein; sialidase activity, virus release
7	1027	M1	252	Matrix protein; vRNP interaction, RNA nuclear export regulation, viral budding
		M2	97	Ion channel; virus uncoating and assembly
8	890	NS1	230	Interferon antagonist protein; regulation of host gene expression
		NEP/NS2	121	Nuclear export of RNA

การเพิ่มจำนวนของไวรัส

อนุภาคของไวรัสเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยตัวรับจำเพาะ คือ sialic acid ที่เชื่อมอยู่กับ galactose ที่ปลายสายของ glycoprotein หรือ glycolipid ด้วยพันธะ $\alpha 2, 6$ หรือ $\alpha, 3$ linkage ซึ่งพบกระจายอยู่บนผิวเซลล์เยื่อของระบบทางเดินหายใจของคนและสัตว์ หลังจากไวรัสใช้ hemagglutinin จับกับตัวรับบนผิวเซลล์จะเกิดกระบวนการ endocytosis นำอนุภาคไวรัสเข้าสู่เซลล์อยู่ใน endosomal vesicle จากนั้น เกิดการ fusion ของ envelope ของไวรัสกับเยื่อหุ้ม vesicle เกิดกระบวนการ uncoating ปลดปล่อย RNP ออกสู่ไซ

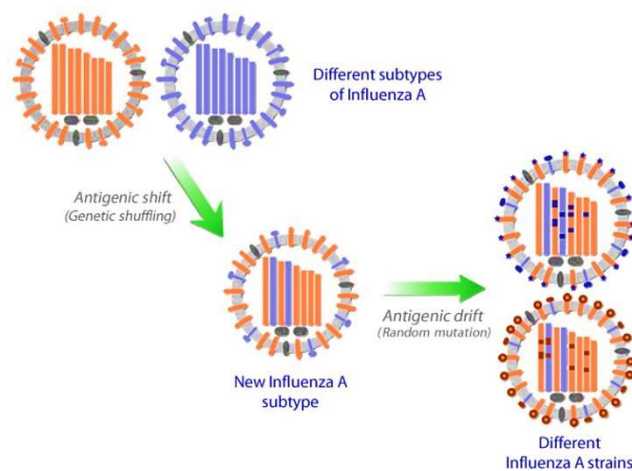
โตพลาซึม เนื่องจากสารพันธุกรรมของไวรัสเป็น RNA สายลบ จะเกิดการสร้าง RNA สายบวกโดยอาศัย เอนไซม์ RNA polymerase มี mRNA สองชนิด คือ 1.mRNA ที่มี 5'cap และ poly A tail 2.Template RNA ซึ่งมีความยาวเต็มสายใช้เป็นแม่แบบของการสร้าง genomic RNA ซึ่งกลไกการเติม 5'cap เป็นกลไก พิเศษแตกต่างไปจาก mRNA ทั่วไป โดย polymerase complex ของไวรัสจะตัดส่วน 5' ของ mRNA ของ เซลล์ที่มี cap อยู่แล้วออกมาเป็น RNA สายสั้น ๆ และนำมาทำเป็น primer สำหรับการสร้าง mRNA ของ ไวรัสด้วยการต่อสายยาวออกไป ดังนั้น mRNA ที่สร้างขึ้นจึงมี cap มาแต่เริ่มโดยไม่ต้องมาเติมอีกใน ภายหลัง โดยการสร้าง RNA ของไวรัสใช้หัตถ์ใหญ่ทั้งหมดมักเกิดในนิวเคลียส โปรตีนจะถูกสร้างจากสาย พันธุกรรมทั้ง 8 สาย ได้โปรตีนที่ทำหน้าที่ต่างๆ รวมทั้งนำมาเป็นโครงสร้างของอนุภาคไวรัสใหม่ด้วย อย่างไรก็ตามการสร้างสายพันธุกรรมชนิด RNA สายลบ อาศัย RNA สายบวกที่เกิดจากขบวนการ transcription เป็นต้นแบบ หลังจากนั้นจึงมีการรวมส่วนประกอบต่าง ๆ ของ RNP ขึ้นในนิวเคลียส ก่อนถูก ส่งผ่านออกมาจากนิวเคลียสสู่ไซโตพลาสซึมด้วยการทำงานของโปรตีน NS2 และ M1 ในขณะที่โปรตีน envelope ถูกสร้างขึ้นใน endoplasmic reticulum และผ่านทาง golgi apparatus สู่ผิวเซลล์ จากนั้น RNP ที่เคลื่อนออกมาจากนิวเคลียสสามารถกันใต้ผิวเซลล์เกิด assembly และ budding ผ่าน cytoplasmic membrane ซึ่งมี HA และ NA spike แทรกอยู่ (6) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงกระบวนการเพิ่มจำนวนของ Influenza A ภายในโฮสต์เซลล์ (7)

การกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัส Influenza A

การมีสารพันธุกรรมชนิด RNA สายลบ จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ RNA polymerase ที่ขาดคุณสมบัติในการตรวจความถูกต้อง (proof reading) ระหว่างจำลองสายพันธุกรรม ทำให้ระหว่างการเพิ่มจำนวนสายพันธุกรรมอาจเกิดการกลายพันธุ์ด้วยขบวนการ mutation ได้ง่าย การกลายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ถ้าเกิดขึ้นในส่วนของ HA, NA สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางแอนติเจน ทำให้ภูมิคุ้มกันจำเพาะที่มีคุณสมบัติป้องกันการติดเชื้อ (neutralizing antibody) ต่อเชื้อชนิดเดิม ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ การเปลี่ยนแปลงแบบนี้จะเกิดขึ้นอย่างค่อยเป็นค่อยไป เรียกว่า antigenic drift ทำให้เกิดการระบาดเป็นครั้งคราว (sporadic) หรืออาจเกิดระบาดแบบ epidemic ได้ นอกจากนี้การ mutation นี้แล้วพบว่า ถ้ามีการติดเชื้อไวรัสอย่างน้อย 2 สายพันธุ์อยู่ภายในเซลล์เดียวกัน ไวรัสสามารถเกิดการกลายพันธุ์ โดยการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างไวรัสแต่ละสายพันธุ์ (genetic reassortment) ทำให้เกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งหากเป็นการแลกเปลี่ยนที่ทำให้ได้ HA และ NA ชนิดใหม่จะทำให้ไวรัสที่เกิดขึ้นมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะแอนติเจนไปอย่างมาก เรียกว่า antigenic shift และอาจทำให้ไวรัสมีความรุนแรงหรือคุณสมบัติในการก่อโรคเปลี่ยนแปลง ผลของการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์แบบ antigenic shift จะทำให้เกิดการระบาดของไวรัสแบบรุนแรง กระจายไปทั่วโลก (pandemic) (6) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 การกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัส Influenza A (8)

กลไกการก่อโรค

ไวรัสใช้หัววัดใหญ่ติดเชื้อในเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจ การติดเชื้อในเซลล์เหล่านี้ทำให้มีการขัดขวางการสร้างโปรตีนของเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ และตายในที่สุด การตายของเซลล์เกิดขึ้นทั้งแบบ necrosis และ apoptosis การตายของเซลล์เยื่อบุทำให้เกิดการอักเสบของเยื่อบุทางเดินหายใจ หลังจากนั้นจะเริ่มมีการซ่อมแซมเซลล์ที่ถูกทำลายไป โดยพบการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ในชั้น basal cell ซึ่งในระยะนี้จะพบทั้งการทำลายและการซ่อมแซมเนื้อเยื่อไปพร้อมๆกัน เมื่อผู้ป่วยหายจากโรค

การซ่อมแซมจะเพิ่มมากขึ้น ประมาณ 1 เดือนจึงจะสมบูรณ์ โดยการฟื้นตัวอย่างช้าๆนี้จะพบได้ว่า pulmonary function ยังไม่กลับคืนเป็นปกติ แม้ผู้ป่วยจะไม่มีอาการแล้วก็ตาม (6)

พยาธิสภาพ

โรคใช้หวัดใหญ่ทั่วไปจะมีการติดเชื้อแบบเฉียบพลันและเฉพาะที่ ไม่พบพยาธิสภาพขยายกว้างมาก อาจพบการอักเสบหรือการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจส่วนต้นจนถึงหลอดลม โดยเฉพาะเซลล์เยื่อบุที่มี cilia เซลล์ที่ติดเชื้อจะพบการบวม มี vacuole ในไซโตพลาสซึมและพบ pyknotic nucleus เซลล์จะตายและหลุดออกจนเหลือแต่ basal cell ชั้นเดียวหรือเหลือแต่ basement membrane ที่หนาขึ้นและมีลักษณะ hyalinize และในชั้น submucosa จะพบการบวม, hyperemia และมีเซลล์อักเสบทั้ง neutrophils และ mononuclear cells พบแอนติเจนของไวรัสได้ในทั้งเซลล์เยื่อบุและ mononuclear cells ในรายที่รุนแรงอาจพบปอดบวม ซึ่งจะเป็น interstitial pneumonitis มี hyperemia และพบผนังของถุงลมปอดหนาขึ้นโดยมีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cells แทรกอยู่ และเซลล์บุถุงลมจะหลุดลอกออกเหลือเพียง hyaline membrane และภายในถุงลมพบ exudates จะตรวจพบแอนติเจนของไวรัสได้ในเซลล์บุถุงลมและ intraalveolar macrophage ในเนื้อเยื่อปอดที่อักเสบรุนแรง (6)

ผลการทดลอง

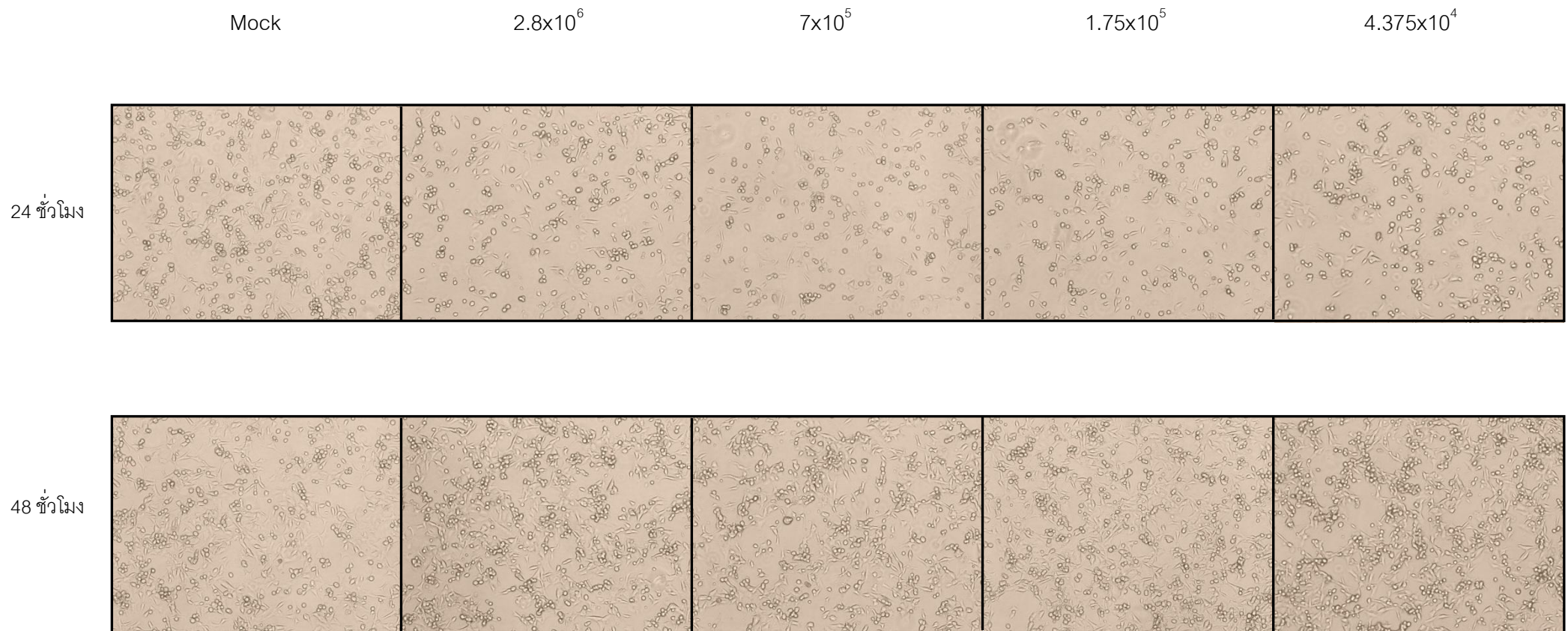
1. การเพาะเลี้ยง และหา TCID₅₀ ของไวรัส

ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณไวรัสใช้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล สายพันธุ์ A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) ซึ่งมีความรุนแรงต่ำ และเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณไวรัสใช้หวัดใหญ่อุบัติใหม่ 2009 สายพันธุ์ A/Nonthaburi/104/2009 (H1N1) ซึ่งมีความรุนแรงสูง โดยทำการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงไตสุนัข Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells สังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์หรือการเกิด cytopathic effect (CPE) หลังการติดเชื้อไวรัสที่เวลา 12 ถึง 96 ชั่วโมง ทำการเก็บ culture supernatant ที่มีไวรัสแต่ละชนิดไปทดสอบความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) โดยวิธี titration of tissue culture infectious dose 50% (TCID₅₀) ใน MDCK cells พบว่า TCID₅₀ ของ seasonal flu H1N1 และ influenza H1N1 2009 มีค่าเท่ากับ 5623.41 TCID 50 / 50 µl และ 213796.21 TCID 50 / 50 µl ตามลำดับ

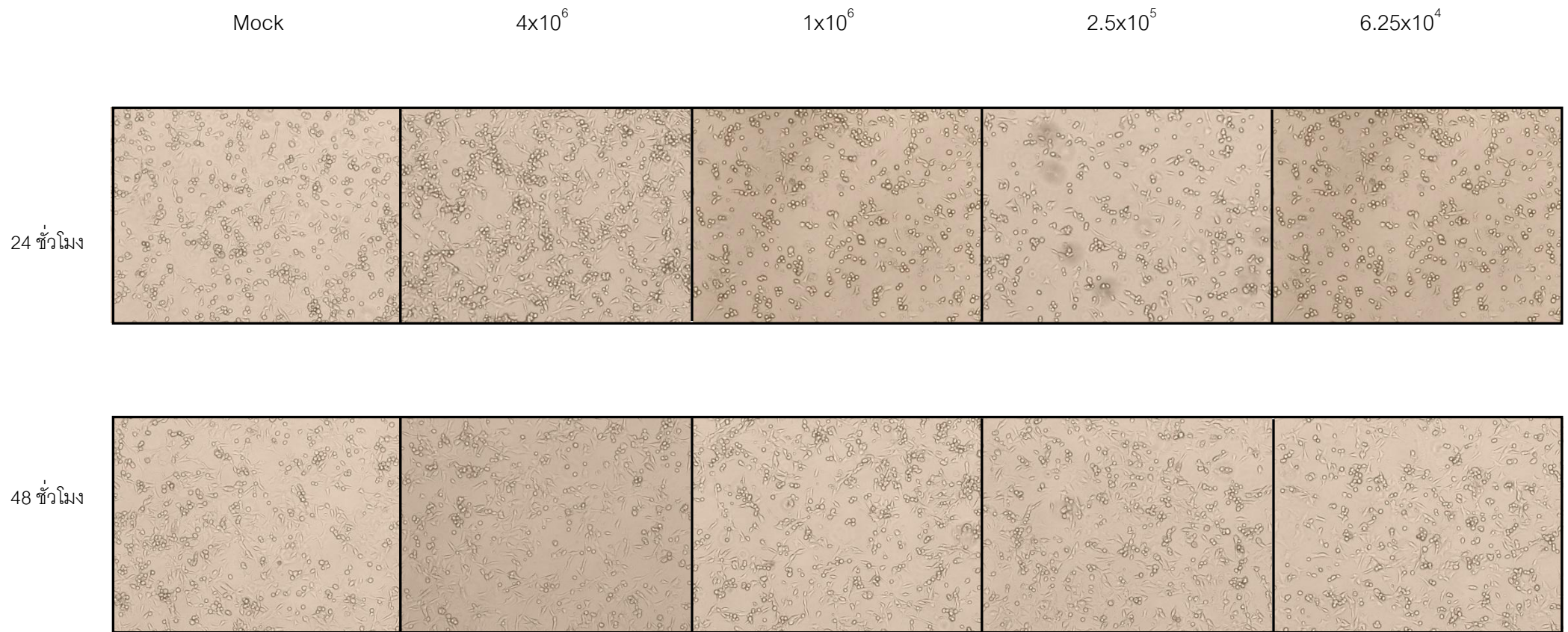
2. ศึกษาการเกิด CPE ของเซลล์ปอด A549 จากการติดเชื้อไวรัส

ทำการติดเชื้อไวรัสความเข้มข้นต่างๆ เข้าสู่เซลล์ปอดเพาะเลี้ยงที่มีต้นกำเนิดจากมนุษย์ adenocarcinoma human alveolar basal epithelial cells (A549 cells) ซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายของไวรัส

ใช้หัดใหญ่ทั้งสองชนิดเมื่อติดเชื้อเข้าสู่มนุษย์และก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคในระบบทางเดินหายใจ ในการทดลองใช้ไวรัส A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) ที่ความเข้มข้น 2.8×10^6 , 7×10^5 , 1.75×10^5 และ 4.375×10^4 TCID₅₀ (รูปที่ 5) และไวรัส A/ Nonthaburi/104/2009 (H1N1) ที่ความเข้มข้น 4×10^6 , 1×10^6 , 2.5×10^5 และ 6.25×10^4 TCID₅₀ (รูปที่ 6) ทำการบ่มเซลล์ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C ที่มี 5%CO₂ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ A549 เมื่อติดเชื้อไวรัสแต่ละชนิดจะเกิด CPE ขึ้น เซลล์มีลักษณะกลมขึ้นและหลุดลอยจากพื้นผิว พบ vacuole ภายใน cytoplasm ขนาดใหญ่ ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ A549 ปกติ (mock control) ที่มีลักษณะรูปร่างเซลล์ยาวเรียวยาวบนพื้นผิวเมื่อดูด้วย phase contrast microscope กำลังขยาย 100 เท่า โดยพบการเกิด CPE เพิ่มมากขึ้นเมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 5 แสดงการเกิด CPE ของเซลล์ปอดเพาะเลี้ยง A549 ที่มีการติดเชื้อไวรัส A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เทียบกับเซลล์ A549 ปกติ (Mock control) เมื่อศึกษาด้วย phase contrast microscope กำลังขยาย 100 เท่า

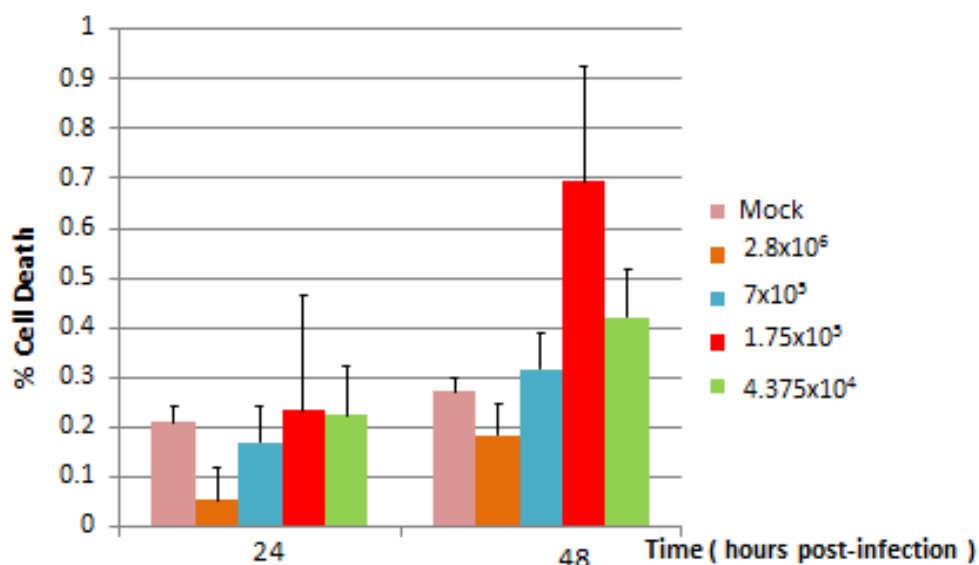


รูปที่ 6 แสดงการเกิด CPE ของเซลล์ปอดเพาะเลี้ยง A549 ที่มีการติดเชื้อไวรัส A/ Nonthaburi/104/2009 (H1N1) ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

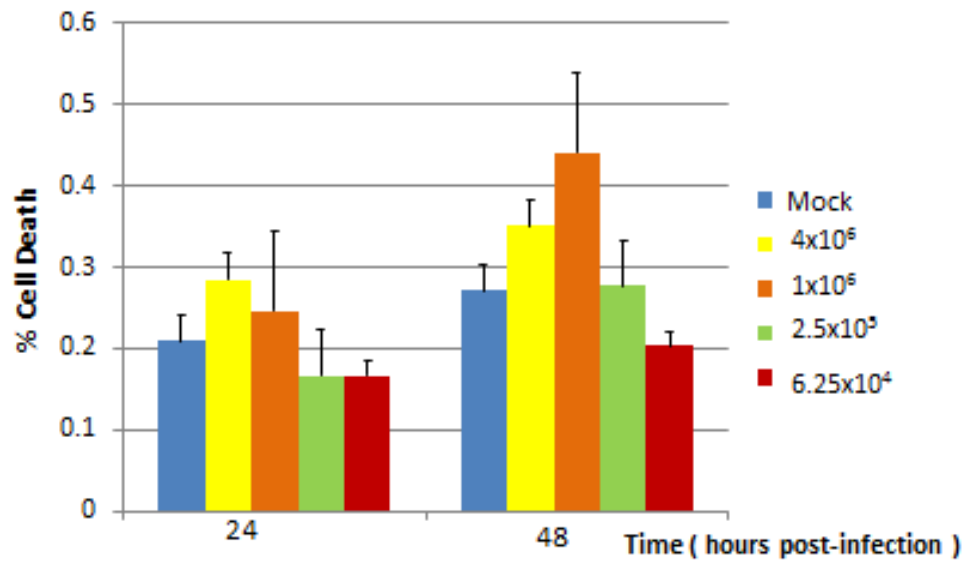
เทียบกับเซลล์ปกติ Mock เมื่อศึกษาด้วย phase contrast microscope กำลังขยาย 100 เท่า

3. ศึกษาปริมาณเซลล์ปอด A549 ที่ตายจากการติดเชื้อไวรัสด้วยวิธี Flow cytometry

ทำการศึกษาปริมาณเซลล์ตายซึ่งเกิดจากการติดเชื้อไวรัส seasonal influenza และ influenza 2009 ด้วยวิธีการย้อม Annexin V (AnxV) และ propidium iodide (PI) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer จากการศึกษาปริมาณเซลล์ตายจากการติดเชื้อไวรัส โดยคำนวณเป็นร้อยละพบว่าจำนวนเซลล์ A549 ที่ตายจากการติดเชื้อไวรัส A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) ความเข้มข้นต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (mock) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (รูปที่ 7) เช่นเดียวกันกับผลการศึกษาปริมาณเซลล์ปอด A549 ที่ตายจากการติดเชื้อไวรัส A/ Nonthaburi/104/2009 (H1N1) ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (รูปที่ 8)



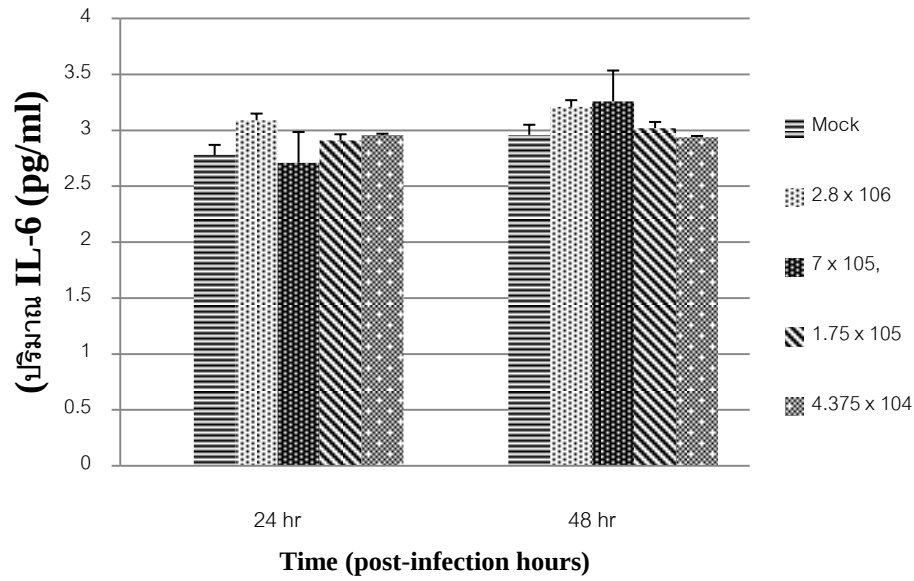
รูปที่ 7 แสดงร้อยละของจำนวนเซลล์ A549 ที่ตายจากการติดเชื้อไวรัส A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (mock) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง



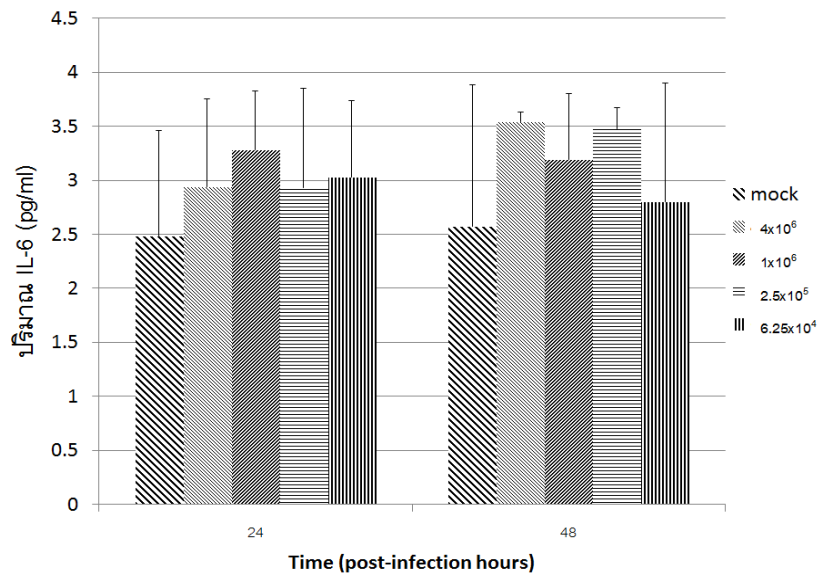
รูปที่ 8 แสดงร้อยละของจำนวนเซลล์ A549 ที่ตายจากการติดเชื้อไวรัส A/ Nonthaburi/104/2009 (H1N1) ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (mock) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

4. ศึกษาปริมาณ IL-6 cytokine ด้วย LEGEND MAX™ Human IL-6 ELISA Kit

เก็บ culture supernatant ของเซลล์เพาะเลี้ยงปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) ความเข้มข้น 2.8×10^6 , 7×10^5 , 1.75×10^5 และ 4.375×10^4 TCID₅₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง นำมาวัดปริมาณ IL-6 เปรียบเทียบกับเซลล์ A549 ปกติ (mock) (รูปที่ 9) ผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณ IL-6 ที่หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) และ mock control ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ทั้งที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อศึกษาปริมาณไซโตไคน์ IL-6 จากเซลล์ปอดที่ติดเชื้อไวรัส A/ Nonthaburi/104/2009 (H1N1) ที่ความเข้มข้น 4×10^6 , 1×10^6 , 2.5×10^5 และ 6.25×10^4 TCID₅₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์ A549 ปกติ (mock control) (รูปที่ 10) ผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณ IL-6 ที่หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส A/ Nonthaburi/104/2009 (H1N1) และ mock control ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เช่นเดียวกัน



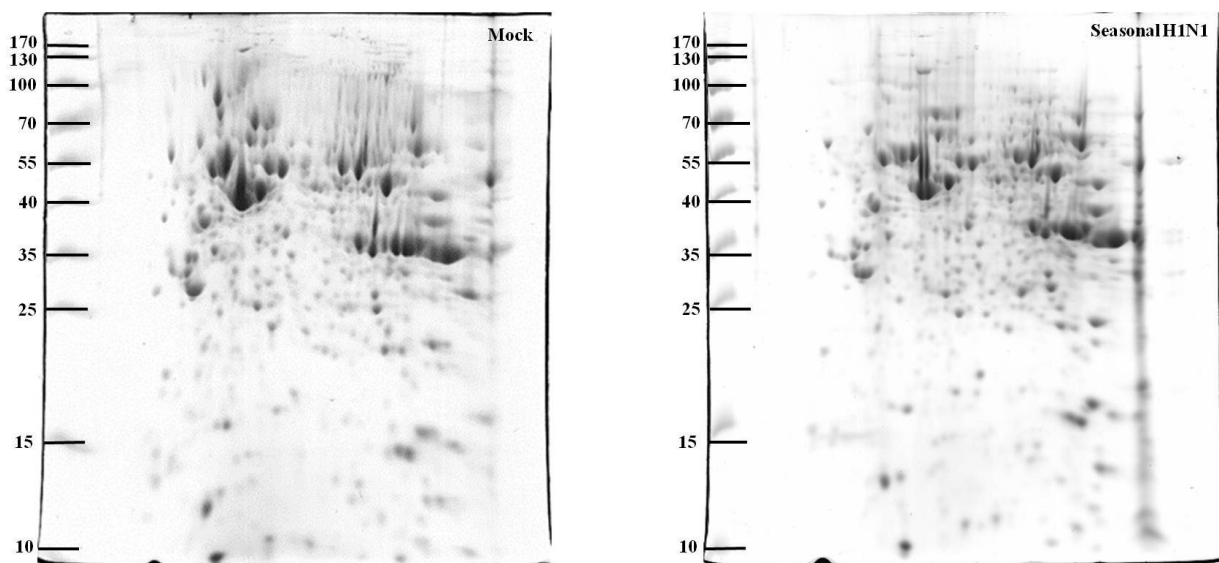
รูปที่ 9 ปริมาณ IL-6 ที่หลั่งจากเซลล์ A549 ที่ติดเชื้อไวรัส A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (mock) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง



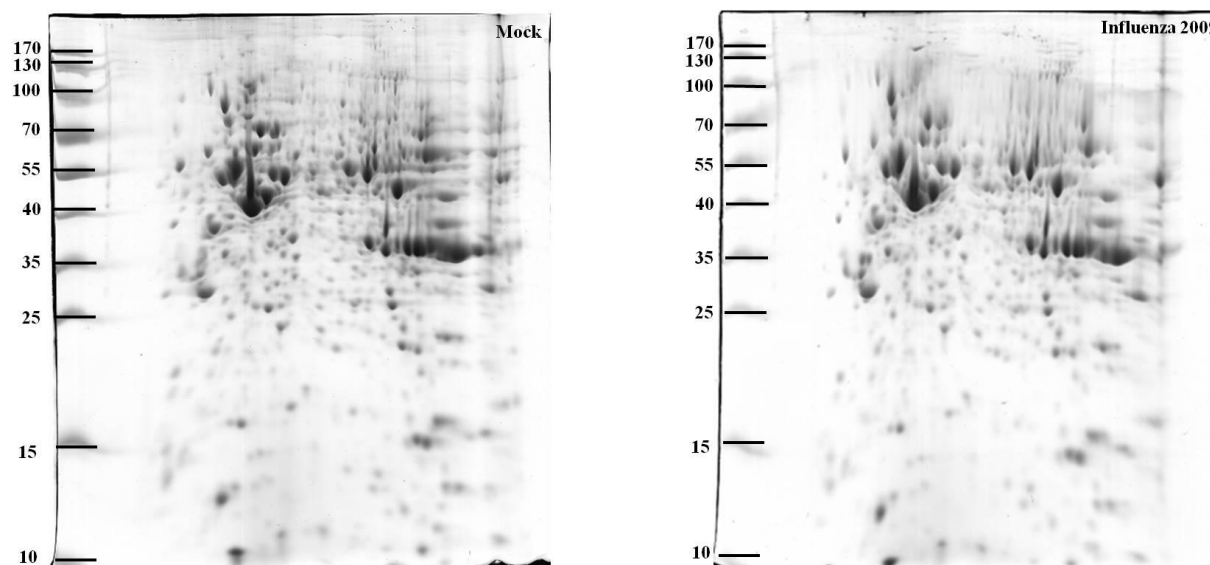
รูปที่ 10 ปริมาณ IL-6 ที่หลั่งจากเซลล์ A549 ที่ติดเชื้อไวรัส A/ Nonthaburi/104/2009 (H1N1) ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (mock) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

5. 2-DE analysis และ Mass spectrometry

นำเซลล์เพาะเลี้ยงปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส seasonal H1N1 และ influenza 2009 ความเข้มข้น 1×10^6 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาศึกษาการตอบสนองของเซลล์ต่อการติดเชื้อไวรัสด้วยวิธี 2-DE analysis โดยนำโปรตีนที่สกัดจาก cell pellet ความเข้มข้น 150 μg มาวิเคราะห์ด้วย 2-DE analysis จำนวน 5 gels ในแต่ละกลุ่ม โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงปอด A549 ปกติ เป็นกลุ่มควบคุม ใช้ non-linear pH gradient strip pH 3-10 ขนาด 7 เซนติเมตร ผลการทดลองพบว่าในแต่ละ 2-DE gel มีการแสดงออกของจุดโปรตีนเฉลี่ยทั้งหมดประมาณ 1000-1200 จุด กระจายตั้งแต่ช่วง p/ 3 -10 ตัวอย่างของ 2-DE gel ในกลุ่ม mock กลุ่มเซลล์ปอดที่ติดเชื้อไวรัส seasonal influenza (รูปที่ 11) และเซลล์ปอดที่ติดเชื้อไวรัส A/Nonthaburi/104/2009 (H1N1) (รูปที่ 12)



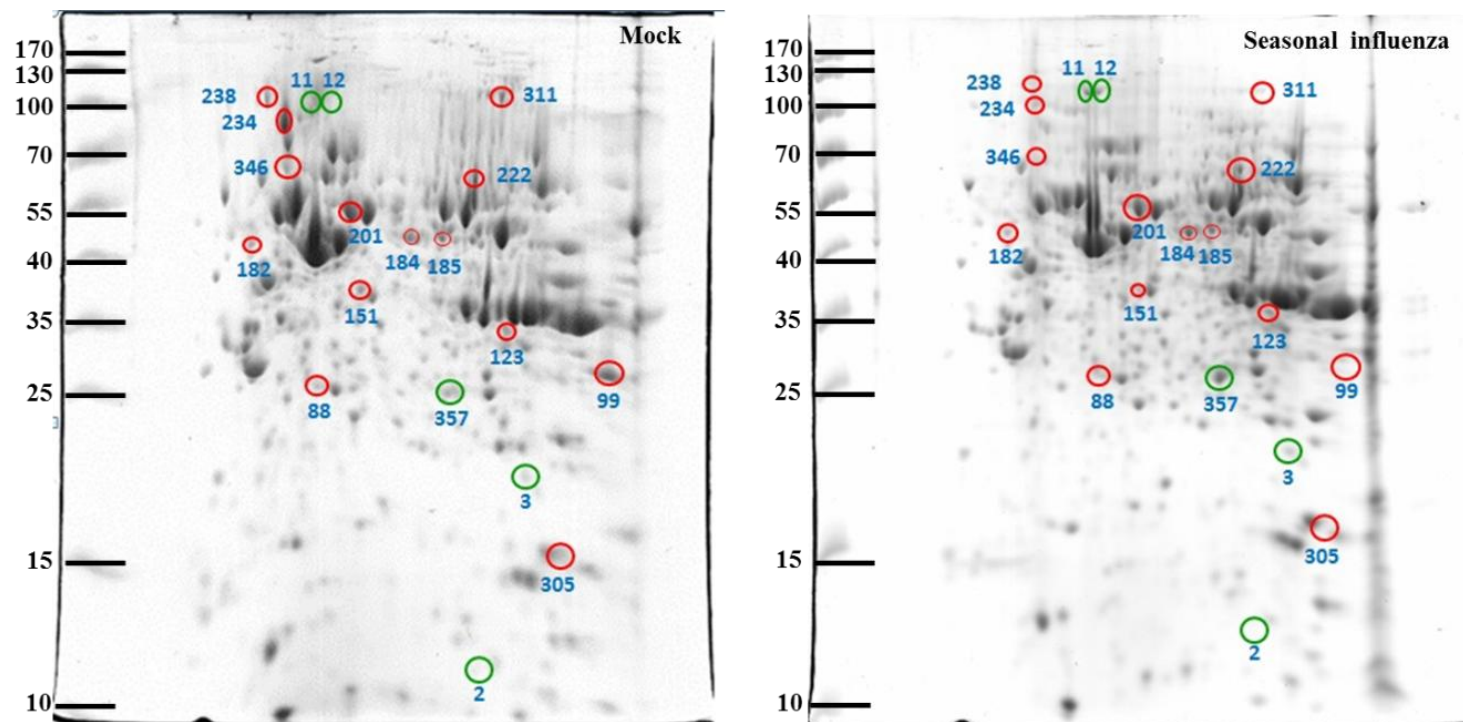
รูปที่ 11 ตัวอย่างการแสดงออกของโปรตีนบน 2-DE gel ระหว่างกลุ่มเซลล์ปอดปกติ A549 (mock) และเซลล์ปอดที่ติดเชื้อไวรัส A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1)



รูปที่ 12 ตัวอย่างการแสดงผลของโปรตีนบน 2-DE gel ระหว่างเซลล์ปกติ A549 (mock) และเซลล์ปกติที่ติดเชื้อไวรัส A/Nonthaburi/104/2009 (H1N1)

นำ 2-DE gels ระหว่าง mock (n=5) และเซลล์ปกติที่ติดเชื้อไวรัส seasonal H1N1 (n=5) มาทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบจุดโปรตีนด้วย Image master 2DE platinum software และนำค่า spot intensity ไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ unpaired student's t test ผลการทดลองพบว่า มีจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน ระหว่างกลุ่ม mock กับ เซลล์ปกติที่ติดเชื้อไวรัส seasonal H1N1 จำนวน 19 จุด (รูปที่ 13) ทำการตัดจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน ไปย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin และนำไปวิเคราะห์ด้วย Liquid chromatography mass spectrometry (LCMS) จากนั้นนำผลที่ได้ไปบ่งชี้โปรตีนด้วย MASCOT search engine (www.matrixscience.com) ผลการบ่งชี้ของโปรตีน ดังแสดงใน ตารางที่ 2

เมื่อเปรียบเทียบ 2-DE gels ระหว่าง mock (n=5) กับเซลล์ปกติที่ติดเชื้อไวรัส influenza 2009 (n=5) พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนแตกต่างกันจำนวน 11 จุด (รูปที่ 14) ทำการบ่งชี้ได้ดัง ตารางที่ 3



รูปที่ 13 แสดงจุดโปรตีนจากเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ปกติ (mock) และเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส seasonal influenza ด้วยเทคนิค 2D-PAGE (วงกลมสีเขียว คือ จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อติดเชื้อไวรัส influenza A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) เทียบกับเซลล์ปกติ, วงกลมสีแดง คือ จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงเมื่อติดเชื้อไวรัส influenza A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) เทียบกับเซลล์ปกติ)

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไประหว่างเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ปกติ กับเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส seasonal influenza

Spot No. ^a	GI no. ^b	Protein name	MW (KDa)	pI	Ion score	Sequence coverage (%) ^c	Ratio (infection /mock) ^d	Biological process
2	gi 435376	Cytokeratin 9	62.32	5.19	481	21	6.477	Intermediate filament organization
3	gi 913159	Neuropolypeptide h3	21.03	7.42	115	13	1.750	MAPK cascade
11	gi 595763314	Beta actin	42.13	5.21	277	17	2.670	Cell junction assembly, Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis, positive regulation of gene expression
12	gi 28336	Beta actin	42.13	5.22	239	21	2.670	Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis, cell junction assembly, positive regulation of gene expression
88	gi 375314771	Keratin 1	66.18	8.15	550	32	0.133	Negative regulation of inflammatory response, response to oxidative stress
99	gi 4505415	NAD(P)H dehydrogenase	30.91	8.91	631	45	0.313	negative regulation of apoptotic process
123	gi 31645	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36.20	8.26	119	22	0.531	regulation of macroautophagy negative regulation of translation, cellular response to interferon-gamma

^a Labels of protein spots in Fig.9

^b GI no. is the MASCOT result of MALDI-TOF-MS/MS searched from the NCBI database

^c Sequence coverage (%): Number of amino acids spanned by the assigned peptides divided by the sequence of length

^d Level of protein expression in infected cells relative to that of uninfected cells

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไประหว่างเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ปกติ กับเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส seasonal influenza (ต่อ)

Spot No. ^a	GI no. ^b	Protein name	MW (KDa)	pI	Ion score	Sequence coverage (%) ^c	Ratio (infection /mock) ^d	Biological process
151	gi 4506667	60S acidic ribosomal phosphoprotein P0	34.42	5.17	407	30	0.442	viral transcription, cellular response to interleukin-4, translational initiation
182	gi 4506455	Reticulocalbin-1	38.87	4.86	355	22	0.486	in utero embryonic development
184	gi 18379349	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	42.12	5.88	356	26	0.435	negative regulation of mitochondrial fusion
185	gi 2697005	Cell cycle protein p38-2G4 homolog	44.13	6.13	537	40	0.605	cell proliferation, negative regulation of apoptotic process, rRNA processing
201	gi 181573	Cytokeratin 8	53.53	5.52	877	46	0.472	viral process, tumor necrosis factor-mediated signaling pathway, response to other organism
222	gi 26224870	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	55.19	6.66	920	51	0.455	glutathione metabolic process, cellular response to oxidative stress
234	gi 154146191	Heat shock protein HSP 90-beta	85.01	4.94	1071	38	0.379	virion attachment to host cell, innate immune response

^a Labels of protein spots in Fig.9

^b GI no. is the MASCOT result of MALDI-TOF-MS/MS searched from the NCBI nr database

^c Sequence coverage (%): Number of amino acids spanned by the assigned peptides divided by the sequence of length

^d Level of protein expression in infected cells relative to that of uninfected cells

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไประหว่างเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ปกติ กับเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส seasonal influenza (ต่อ)

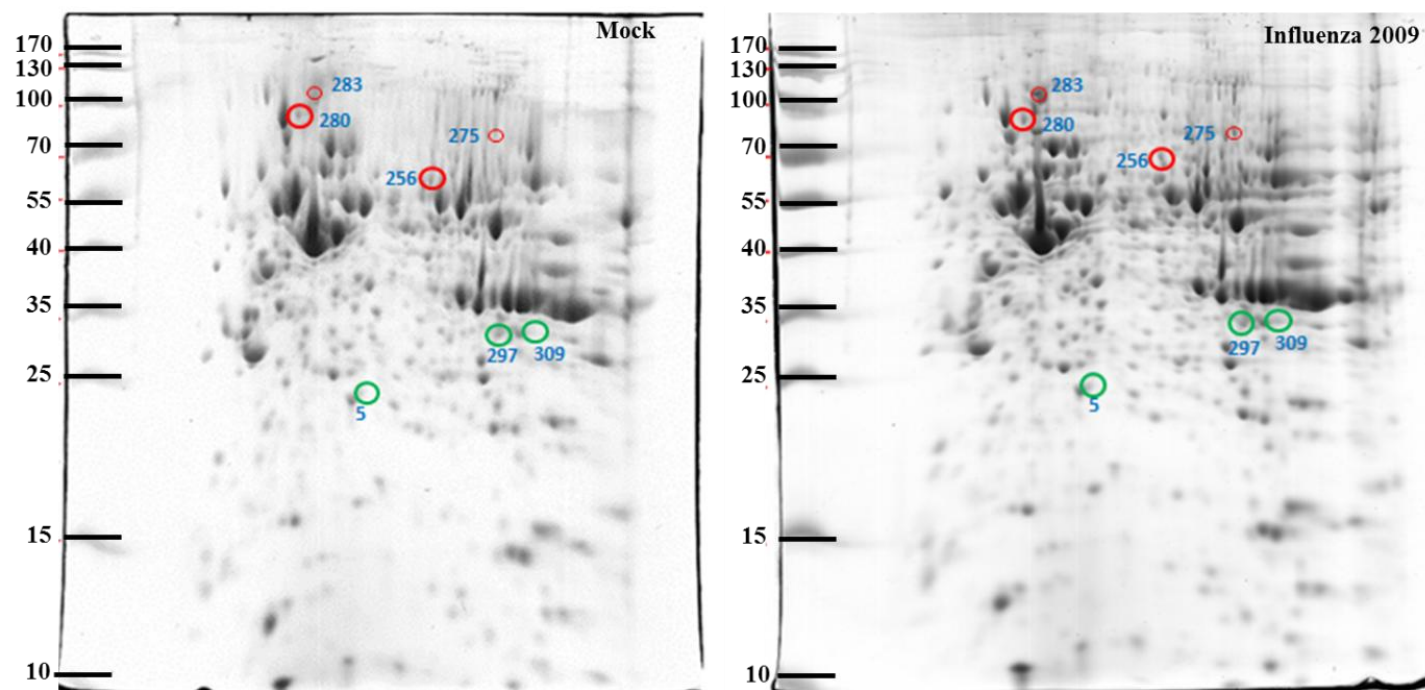
Spot No. ^a	GI no. ^b	Protein name	MW (KDa)	pI	Ion score	Sequence coverage (%) ^c	Ratio (infection /mock) ^d	Biological process
238	gi 4507677	Endoplasmin precursor	92.7	4.76	970	23	0.353	protein transport, receptor-mediated endocytosis
305	gi 1025735596	Chain B, Crystal Structure of Limk1 Mutant D460n In Complex With Full-length Cofilin-1	18.64	8.26	352	43	0.537	response to virus, positive regulation by host of viral process, negative regulation of apoptotic process
311	gi 4503483	Elongation factor 2	96.25	6.41	765	27	0.557	positive regulation of translation, translational elongation
346	gi 62414289	Vimentin	53.68	5.06	231	27	0.256	viral process, programmed cell death
357	gi 4758638	Peroxiredoxin-6	25.13	6.00	395	38	1.625	cell redox homeostasis, response to ROS

^a Labels of protein spots in Fig.9

^b GI no. is the MASCOT result of MALDI-TOF-MS/MS searched from the NCBI nr database

^c Sequence coverage (%): Number of amino acids spanned by the assigned peptides divided by the sequence of length

^d Level of protein expression in infected cells relative to that of uninfected cells



รูปที่ 14 แสดงจุดโปรตีนจากเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ปกติ (mock) และเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส influenza 2009 ด้วยเทคนิค 2D-PAGE (วงกลมสีเขียว คือ จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อติดเชื้อไวรัส influenza A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) เทียบกับเซลล์ปกติ, วงกลมสีแดง คือ จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงเมื่อติดเชื้อไวรัส influenza A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) เทียบกับเซลล์ปกติ)

ตารางที่ 3 แสดงชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไประหว่างเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ปกติ กับเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส Influenza 2009

Spot No. ^a	GI no. ^b	Protein name	MW (KDa)	pI	Ion score	Sequence coverage (%) ^c	Ratio (infection /mock) ^d	Biological process
5	gil565651	Proteasome subunit HsN3	29.17	5.72	90	12	0.403	viral process, T cell receptor signaling pathway, negative regulation of inflammatory response to antigenic stimulus
256	gil178375	Aldehyde dehydrogenase	50.70	5.99	434	26	2.353	small molecule metabolic process , positive regulation of cell proliferation
275	gil119573383	Lamin A/C, isoform CRA_c	87.83	8.91	872	29	1.500	apoptotic process , cellular protein metabolic process
280	gil39777597	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase	78.42	5.11	488	19	1.595	positive regulation of cell adhesion , positive regulation of apoptotic process
283	gil556724777	Alpha-actinin-4	102.66	5.27	215	17	1.544	positive regulation of cell migration , regulation of apoptotic process

^a Labels of protein spots in Fig.9

^b GI no. is the MASCOT result of MALDI-TOF-MS/MS searched from the NCBI database

^c Sequence coverage (%): Number of amino acids spanned by the assigned peptides divided by the sequence of length

^d Level of protein expression in infected cells relative to that of uninfected cells

ตารางที่ 3 แสดงชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไประหว่างเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ปกติ กับเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส Influenza 2009 (ต่อ)

Spot No. ^a	GI no. ^b	Protein name	MW (KDa)	pI	Ion score	Sequence coverage (%) ^c	Ratio (infection /mock) ^d	Biological process
297	gi 2781202	Chain A, Three-Dimensional Structure Of Human Electron Transfer Flavoprotein To 2.1 Å Resolution	33.42	6.95	389	39	0.385	small molecule metabolic process , respiratory electron transport chain
309	gi 5174447	Receptor of activated protein C kinase 1	35.51	7.60	396	43	0.450	viral process, regulation of cell cycle, positive regulation of apoptotic process, negative regulation of phagocytosis

^a Labels of protein spots in Fig.9

^b GI no. is the MASCOT result of MALDI-TOF-MS/MS searched from the NCBI nr database

^c Sequence coverage (%): Number of amino acids spanned by the assigned peptides divided by the sequence of length

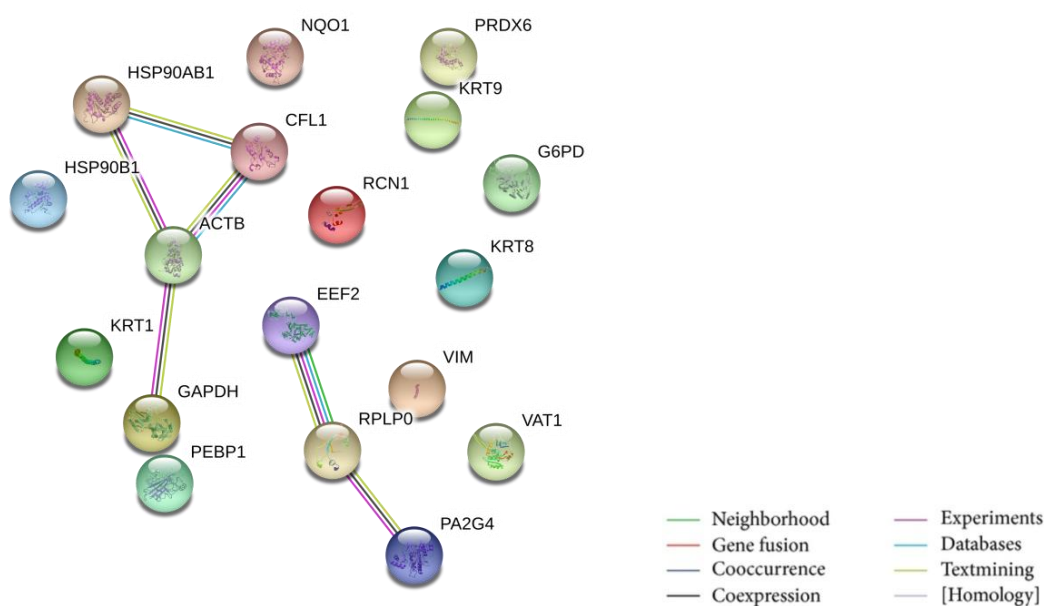
^d Level of protein expression in infected cells relative to that of uninfected cells

6. ศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีนที่บ่งชนิดได้

6.1 ความสัมพันธ์ของโปรตีนที่บ่งชนิดได้จากเซลล์เนื้อเยื่อปอดที่ติดเชื้อไวรัส seasonal influenza

นำโปรตีนที่ได้จากการบ่งชนิดทั้ง 19 ชนิดมาทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม String 10.0 (<http://string-db.org/>) (ตารางที่ 4) โดยสามารถทำนายความสัมพันธ์ของโปรตีนได้ 7 รูปแบบ คือ Neighborhood, Gene Fusion, Cooccurrence, Coexpression, Experiments, Databases และ Text mining พบว่าโปรตีนมีรูปแบบความสัมพันธ์กัน 2 กลุ่ม ได้แก่ โปรตีนเกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน คือ EEF2, RPLP0 และ PA2G4 ซึ่งโปรตีนทั้ง 3 ชนิด มีการแสดงออกลดลงเมื่อมีการติดเชื้อไวรัส

โปรตีนกลุ่มที่สองเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและไวรัส ได้แก่ HSP90AB1, ACTB, CFL1 และ GAPDH โดยโปรตีน ACTB มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อติดเชื้อไวรัส ส่วนโปรตีน HSP90AB1, CFL1 และ GAPDH มีการแสดงออกลดลงเมื่อติดเชื้อไวรัส (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ของโปรตีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปในเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 เมื่อมีการติดเชื้อไวรัส seasonal influenza วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม String 10.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 90%

ตารางที่ 4 โปรตีนที่แสดงออกในเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล String 10.0

โปรตีนจากฐานข้อมูล String 10.0	โปรตีนที่แสดงออกในเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549
RCN1	Reticulocalbin 1
KRT9	Keratin 9
KRT8	Keratin 8
KRT1	Keratin 1
PEBP1	Phosphatidylethanolamine binding protein 1 (Neuropolypeptide h3)
VAT1	Vesicle amine transport protein 1 homolog
ACTB	Actin, beta
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
RPLP0	Ribosomal protein P0
PA2G4	Proliferation-associated 2G4
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
HSP90AB1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1 (Endoplasmin precursor)
HSP90B1	Heat shock protein 90kDa beta
CFL1	Cofilin 1
EEF2	Eukaryotic translation elongation factor 2
VIM	Vimentin
PRDX6	Peroxiredoxin 6

6.2 ความสัมพันธ์ของโปรตีนที่บ่งชี้ได้จากเซลล์เนื้อเยื่อปอดที่ติดเชื้อไวรัส influenza 2009

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโปรตีนที่บ่งชี้ได้ในเซลล์ติดเชื้อ influenza 2009 ด้วยโปรแกรม String 10.0 (<http://string-db.org/>) พบว่าโปรตีนทั้ง 7 ชนิด ไม่มีความสัมพันธ์กัน

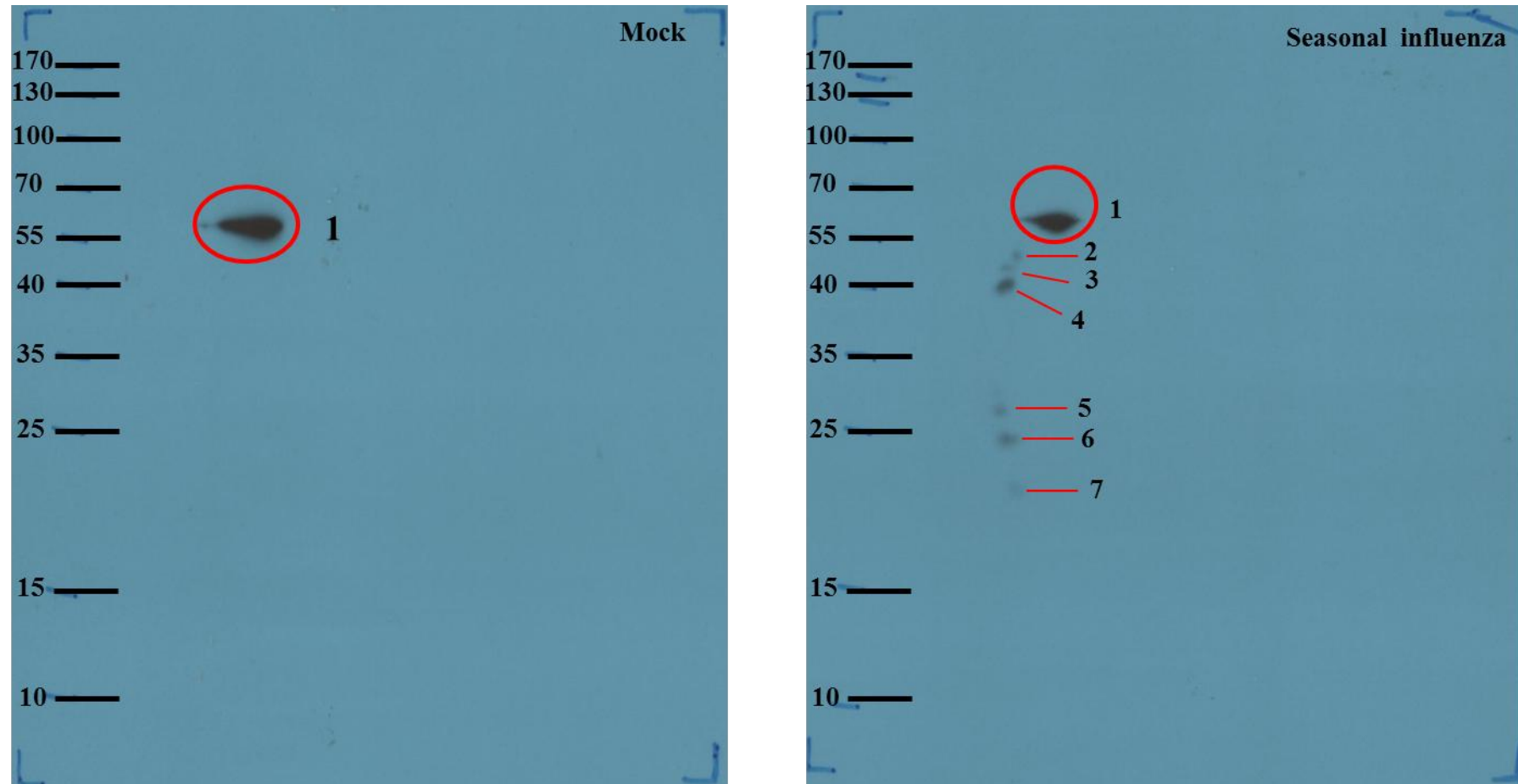
7. ยืนยันผลการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกันระหว่าง mock กับเซลล์ปอดติดเชื้อไวรัส

7.1 การแสดงออกของโปรตีน vimentin ระหว่าง mock กับเซลล์ปอดติดเชื้อ seasonal influenza

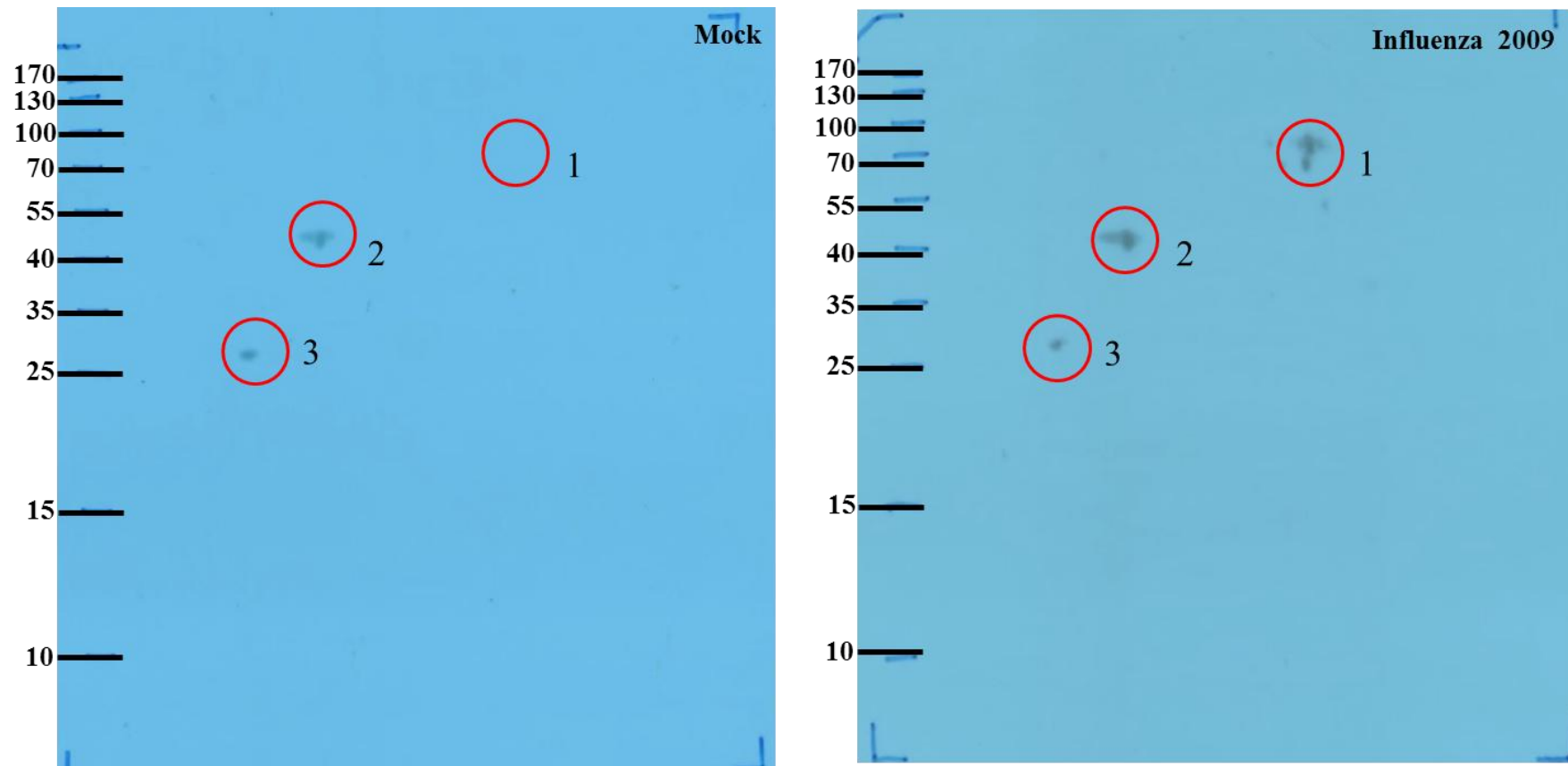
ทำการยืนยันผลการแสดงออกของโปรตีน vimentin ที่แตกต่างกันระหว่าง mock กับเซลล์ปอดติดเชื้อไวรัส seasonal influenza ด้วยวิธี 2D-western blot โดยโปรตีน vimentin มีการแสดงออกลดลงเมื่อติดเชื้อไวรัส influenza A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) ในการทดสอบใช้ Primary antibody คือ rabbit anti-vimentin ความเข้มข้น 1:5,000 (abcam) และ Secondary antibody คือ goat anti-rabbit ความเข้มข้น 1:10,000 (abcam) ผลการทดลองพบว่า mock มีการแสดงออก 1 จุดของ vimentin ที่ขนาดโมเลกุลประมาณ 54 kDa ค่า pI ประมาณ 5 ในขณะที่เซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส influenza A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) พบ 7 จุดของ vimentin โดยจุดที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 54, 50, 47, 40, 27, 23 และ 20 kDa ตามลำดับ และค่า pI อยู่ในช่วงประมาณ 5 โดยตำแหน่งที่ 1 ของ vimentin ใน mock มีการแสดงออกของโปรตีนมากกว่าเซลล์ปอดที่ติดเชื้อไวรัส seasonal influenza ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย 2-DE analysis (รูปที่ 16) Vimentin เป็นโปรตีนในไซโตพลาสซึมของเซลล์ จัดเป็น class-III intermediate filaments พบได้ใน non-epithelial cells หลายชนิด เช่น mesenchymal cells โดย vimentin จะเกาะกับ nucleus, endoplasmic reticulum และ mitochondria

7.2 การแสดงออกของโปรตีน LaminA/C ระหว่าง mock กับเซลล์ปอดติดเชื้อ influenza 2009

ทำการยืนยันผลการแสดงออกของโปรตีน Lamin A/C ที่แตกต่างกันระหว่าง mock กับเซลล์ปอดติดเชื้อไวรัส influenza 2009 ด้วยวิธี 2D-western blot โดยโปรตีน Lamin A/C มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส โดยใช้ Primary antibody คือ rabbit anti-lamin A/C ความเข้มข้น 1:1,000 (abcam) และ Secondary antibody คือ goat anti-rabbit ความเข้มข้น 1:10,000 พบว่ากลุ่มควบคุม พบจุดโปรตีน จำนวน 2 จุด ได้แก่ จุดหมายเลข 1 และ 2 (รูปที่ 17) โดยจุดหมายเลข 1 มีค่า pI อยู่ในช่วงประมาณ 4.8 ขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 28 kDa และจุดหมายเลข 2 มีค่า pI อยู่ในช่วงประมาณ 5.8 ขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 48 kDa ในขณะที่เซลล์ติดเชื้อไวรัส influenza A/Nonthaburi/104/2009 (H1N1) พบจุดโปรตีน จำนวน 3 จุด โดยพบจุดหมายเลข 2 และ 3 เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม และจุดหมายเลข 1 ที่พบเฉพาะในกลุ่มที่ติดเชื้อเท่านั้น จุดหมายเลข 1 มีค่า pI ประมาณ 6.7 และขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 85 kDa สอดคล้องกับผล 2-DE analysis



รูปที่ 16 ยืนยันผลการแสดงออกของโปรตีน vimentin ของเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ปกติ (mock) กับเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส influenza A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) ด้วยเทคนิค 2D-Western blot



รูปที่ 17 ยืนยันผลการแสดงออกของโปรตีน Lamin A/C ของเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ปกติ (mock) กับเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส influenza A/Nonhaburi/104/2009 (H1N1) ด้วยเทคนิค 2D-Western blot

อภิปรายผลการทดลอง

ผลการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ปอดที่ติดเชื้อไวรัส seasonal influenza

การติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ก่อให้เกิดความผิดปกติของระบบทางเดินหายใจ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ทำให้การสร้างโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป ทำให้เซลล์ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ และเกิดเซลล์ตาย เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่อาศัยองค์ประกอบของเซลล์โฮสต์ในการจำลองแบบตัวเอง การศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส influenza A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ จากการศึกษาพบว่า เมื่อเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ติดเชื้อไวรัส influenza A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) ความเข้มข้น 1×10^6 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนทั้งหมด 19 ชนิด โดยมีโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 5 ชนิด และโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลง 14 ชนิด โดยโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัส ได้แก่ cytokeratin 8 (spot 201), heat shock protein 90 (spot 234), Chain B, Crystal Structure Of Limk1 Mutant D460n In Complex With Full-length Cofilin-1 (spot 305) และ vimentin (spot 346) โปรตีนเหล่านี้มีการแสดงออกลดลงเมื่อติดเชื้อไวรัส จากการศึกษาของ Haibao Zhao และคณะ ศึกษาเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส influenza A/jingfang/1/86 (H1N1) ที่ MOI 1.38 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS พบโปรตีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปจำนวน 112 ชนิด โดยพบ proliferation-associated 2G4, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, elongation factor 2 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อติดเชื้อไวรัส และโปรตีน peroxiredoxin-6, actin beta มีการแสดงออกลดลงเมื่อติดเชื้อไวรัส (9) การศึกษาของ Coomb และคณะ ศึกษาเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส Influenza A/PR/8/34 (H1N1) ที่ MOI 7 PFU per cell เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้วิธี stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) และทำการยืนยันการแสดงออกของโปรตีน พบว่าเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัสจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีน vimentin, actin และ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (10) จะเห็นได้ว่าการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นมีหลายปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อไวรัส ปริมาณไวรัส และเวลาในการติดเชื้อ

จากการศึกษาหน้าที่ทางชีววิทยาของโปรตีน vimentin และ Heat shock protein 90 (HSP90) พบว่าโปรตีนทั้งสองชนิดมีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัส (viral process) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wei Wu และคณะ พบว่า vimentin เป็นโมเลกุลสำคัญในการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่โดย vimentin มีบทบาทในการ

ปล่อย genome ของเชื้อไวรัสจาก endosomal เข้าไปในนิวเคลียส อีกทั้งการสูญเสีย vimentin เป็นผลให้มีการลดลงของ RNA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (11) จากการศึกษาของ Catherine Su Hui Teo และคณะ พบว่าเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก (DENV) โปรตีน vimentin มีปฏิสัมพันธ์กับ DENV nonstructural 4A (NS4A) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ replication complex ของไวรัส มีการ reorganization และ phosphorylation ของ vimentin ในระหว่างที่มีการติดเชื้อ DENV แสดงว่า vimentin ช่วยในการคงสภาพของ replication complex ของ DENV ทำให้เกิดการจำลองแบบ RNA อย่างมีประสิทธิภาพ (12) vimentin ยังมีปฏิสัมพันธ์กับ NS1 โดยส่งผลต่อการเจริญและการออกจากเซลล์ของไวรัส (13) จะเห็นได้ว่า โปรตีน vimentin มีความสำคัญในการเพิ่มจำนวน RNA ของไวรัสและออกจากเซลล์

จากการศึกษาของ Naito และคณะ พบว่า Heat Shock Protein 90 (HSP90) ช่วยในการขนส่ง RNA polymerase subunit ของไวรัสไข้หวัดใหญ่เข้าสู่นิวเคลียส โดย HSP90 จับกับ PB2 หรือ PB1-PB2 เพื่อขนส่ง viral RNA polymerase subunit เข้าสู่นิวเคลียส และประกอบกันเป็น viral RNA polymerase complex เป็นผลให้มีการสะสม HSP90 ที่นิวเคลียสหลังจากการติดเชื้อไวรัส ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมการสังเคราะห์ RNA ไวรัส (14) มีรายงานว่า HSP90 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น เมื่อติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก (15) โดย HSP90 ทำหน้าที่เป็น receptor complex ทำให้เชื้อไวรัสไข้เลือดออกเข้าสู่เซลล์โฮสต์ (16) HSP90 มีส่วนช่วยกระบวนการต่างๆ ของไวรัส เช่น การแยกส่วนประกอบของ capsid การประกอบของ viral replication complex การประกอบอนุภาคของไวรัสและออกนอกเซลล์ หรือในระหว่างการจำลองตัวเองของไวรัส (17) นอกจากนี้พบว่า การยับยั้ง HSP90 ทำให้การแพร่กระจายของเชื้อไวรัสช้าลงและลดการเพิ่มจำนวนของไวรัส (18) โปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์ปอดที่ติดเชื้อไวรัส seasonal influenza ได้แก่ Actin มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน โดยสามารถควบคุมการถอดรหัสจากการส่งสัญญาณเหนี่ยวนำของไวรัส (19) มีส่วนร่วมในการทำลายเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียระหว่างการ apoptosis ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส (20) มี interaction กับ NP และ M1 ทำให้การขนส่ง viral ribonucleoprotein (vRNP) เร็วขึ้น (21)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโปรตีนที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากเซลล์เนื้อเยื่อปอดที่ติดเชื้อไวรัส influenza A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) เมื่อนำมาศึกษาความสัมพันธ์โดยโปรแกรม String 10.0 พบโปรตีน ทั้ง 19 ชนิด สามารถแสดงรูปแบบความสัมพันธ์โปรตีนได้ 2 กลุ่ม โดยโปรตีนกลุ่มแรกเกี่ยวกับการแปลรหัส ได้แก่ Elongation factor 2, Proliferation-associated protein 2G4 และ 60S acidic

ribosomal protein P0 โปรตีนเหล่านี้มีการแสดงออกลดลงเมื่อติดเชื้อไวรัส ส่วนโปรตีนกลุ่มที่ 2 เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน และไวรัส ได้แก่ Actin beta, Cofilin-1, HSP 90-beta และ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase โดย Actin beta มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อติดเชื้อไวรัส โดยโปรตีน Cofilin-1, HSP 90-beta และ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase มีการแสดงออกลดลงเมื่อติดเชื้อไวรัส จากการศึกษาของ Ge Liu และคณะ พบว่าในช่วงท้ายของการจำลองตัวเองของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จะมีการปรับโครงสร้างของ actin ซึ่งสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกและ phosphorylation ของ cofilin 1 โดย cofilin 1 มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการ reorganization ของ actin ในระหว่างการ assembly และ budding ของเชื้อไวรัส influenza (22) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Megan L. และคณะ พบว่า actin และ cofilin ช่วยในการ assembly ของเชื้อไวรัส influenza (3)

การแสดงออกของโปรตีน vimentin จากเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ด้วยวิธี 2D-Western blot เซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ปกติ พบโปรตีน vimentin มีขนาดโมเลกุล 62 kDa ส่วนเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส influenza A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1) มีขนาดโมเลกุล 62, 50, 47, 40, 27, 23 และ 20 kDa ตามลำดับ จากการศึกษาของ Karin Muller พบว่าในระหว่างการตายของเซลล์แบบ apoptosis โปรตีน vimentin จะถูกตัดด้วย caspase-3 และ caspase-6 เป็นขนาดต่างๆ ได้แก่ ขนาด 48–50, 46, 29 และ 26 kDa (23) แสดงว่าเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส influenza A/Thailand/Siriraj-03/2006 มีการแสดงออกของโปรตีน vimentin ลดลง อาจเนื่องจากการเกิด apoptosis

ผลการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ปอดที่ติดเชื้อไวรัส Influenza 2009

การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจชนิดเฉียบพลัน (6) ผู้ป่วยบางรายมีอาการปอดอักเสบรุนแรงทำให้เสียชีวิตได้ กลไกการเกิดพยาธิสภาพยังไม่แน่ชัด การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยใช้เทคนิค 2-DE analysis และ mass spectrometry ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ที่ติดเชื้อไวรัส influenza A/Nonthaburi/104/2009 (H1N1) เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ ผลการศึกษาพบว่ามีโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อติดเชื้อไวรัส 4 ชนิด แสดงให้เห็นว่าเซลล์ปอดมีการเพิ่มปริมาณการสร้างโปรตีน และเมื่อศึกษาข้อมูลทางชีววิทยาจากฐานข้อมูลพบว่าโปรตีนทั้ง 4 ชนิดมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส โดยโปรตีน Lamin A/C (spot 275), Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase (spot 280) และ Alpha-actinin-4 (spot 283) มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการ

apoptosis สอดคล้องกับผลการศึกษาเซลล์ตายด้วย Annexin V/PI double staining เช่นเดียวกับการทดลองของ Yang และคณะ ศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงปอด A549 ที่ติดเชื้อ H1N1 2009 (A/Wenshan H1N1 virus) พบว่าเชื้อไวรัสทำให้เซลล์เกิดการ apoptosis (24) เนื่องจากการทำงานของยีนต้านไวรัส สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส เช่น การยับยั้งการสร้างโปรตีนของไวรัส การย่อยสลาย RNA และการชักนำให้เกิด Apoptosis การทดลองครั้งนี้พบโปรตีน Lamin A/C เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Xiaoman Ding และคณะ ที่ศึกษาเซลล์ปอด A549 ที่ติดเชื้อ H1N1 influenza A virus ด้วยวิธี 2D-DIGE ร่วมกับ MALDI-TOF-MS/MS (25) Lamin A/C มีบทบาทในการตอบสนองต่อความเครียดที่ก่อให้เกิดความเสียหายภายในเซลล์ รวมทั้งมีส่วนช่วยในการระงับการจำลองตัวเอง (26) และการออกจากเซลล์ของเชื้อไวรัส (27)

โปรตีน Aldehyde dehydrogenase (spot 256) มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับการทดลองของ Kevin M. และคณะ ที่พบ Aldehyde dehydrogenase ในเซลล์เพาะเลี้ยงปอดที่ติดเชื้อ Influenza virus strain A/PR/8/34 (H1N1) ด้วยวิธี Isotope labeling by amino acid in cell culture (SILAC) ร่วมกับ 2D-LC-MS/MS (10) โดย Aldehyde dehydrogenase ที่มีหน้าที่กระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) เพื่อซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เกิดบาดแผลหรือทดแทนเซลล์ที่เสื่อมสภาพ

โปรตีน Actinin (Spot 283) มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 1.5 เท่าในเซลล์ติดเชื้อ มีรายงานว่า Actinin มีหน้าที่ควบคุม cell migration มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ Leukocyte extravasation ที่ทำให้เม็ดเลือดขาวเดินทางไปยังบริเวณเนื้อเยื่อที่มีการอักเสบ เพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม และเก็บทำลายเซลล์ตาย สอดคล้องกับการศึกษาของ Jeffrey Taubenberger ที่พบเม็ดเลือดขาวจำนวนมากบริเวณเนื้อเยื่อปอดที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

โปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงเมื่อมีการติดเชื้อไวรัส influenza 2009 ได้แก่ โปรตีน Receptor of activated protein C kinase 1 (RACK1) (spot 309) จากการศึกษานี้ของ Dimiter Demirov และคณะ พบว่า RACK 1 เป็นโปรตีนตัวรับที่อยู่ภายในเซลล์โดยจับกับ protein kinase C (PKC) ที่ผิวเซลล์ ในขณะที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ RACK 1 จะจับกับ matrix protein 1 (M1) ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ assembly และ budding ของไวรัสออกจากเซลล์ (26) โปรตีน Proteasome subunit HsN3 (spot 5) มีการแสดงออกลดลงในเซลล์ติดเชื้อ จากการศึกษานี้ของ Emanuel Haasbach และคณะ พบว่าการยับยั้งการทำงานของ proteasome ทำให้การจำลองตัวเองของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในเซลล์เนื้อเยื่อปอด A549 ลดลง และสามารถลดการหลั่ง cytokine ที่เหนี่ยวนำโดย LPS (28) เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สามารถจำลองตัวเองได้อย่างมีประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับการทำงานของ proteasome ดังนั้นการที่ proteasome มีการแสดงออกลดลง อาจเกิดจาก NF- κ B pathway ในการยับยั้ง proteasome เพื่อป้องกันการจำลองตัวของไวรัส (29) เมื่อทำการทดสอบความสัมพันธ์ของโปรตีนที่บ่งชี้ได้ทั้ง 7 ชนิด ด้วยโปรแกรม string 10.0 พบว่าโปรตีนทั้ง 7 ชนิดไม่มีความสัมพันธ์กัน

จากการทดลอง 2D-western blot เพื่อยืนยันการแสดงออกของโปรตีน Lamin A/C พบว่าเซลล์ปกติพบโปรตีนขนาดมวโมเลกุลประมาณ 28 kDa และ 48 kDa เซลล์ที่ติดเชื้อ influenza A/Nonthaburi/104/2009 (H1N1) พบโปรตีนขนาดมวโมเลกุลประมาณ 28 kDa, 48 kDa และ 85 kDa การศึกษาของ Oberhammer, F.A. และ Rao, L. พบว่าโปรตีน Lamin A/C สามารถถูกตัดโดย caspase-6 กลายเป็นโปรตีนขนาด 40-45 kDa และขนาด 28 kDa โดยเกิดขึ้นเมื่อการรักษาสมดุลในร่างกายผิดปกติ หรือ เกิดการตายของเซลล์ (30) การพบชิ้นส่วนโปรตีน Lamin A/C ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสมากกว่าอาจเกิดจากการตอบสนองของเซลล์ต่อการติดเชื้อไวรัส influenza A/Nonthaburi/104/2009 (H1N1) ทำให้พบการแสดงออกของโปรตีน Lamin A/C มากขึ้น สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย 2-DE analysis

เอกสารอ้างอิง

1. ศุภกาญจน์ ชานี. ไวรัสไข้หวัดใหญ่และยาต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ในปัจจุบัน. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2557;22(2):258-71.
2. MacLachlan, N. James. Chapter 21 - Orthomyxoviridae A2 - MacLachlan, N. James. In: Dubovi EJ, editor. Fenner's Veterinary Virology (Fourth Edition). San Diego: Academic Press; 2011. p. 353-70.
3. Shaw ML, Stone KL, Colangelo CM, Gulcicek EE, Palese P. Cellular Proteins in Influenza Virus Particles. PLoS Pathogens. 2008;4(6):e1000085.
4. Nelson MI, Holmes EC. The evolution of epidemic influenza. Nat Rev Genet. 2007;8(3):196-205.
5. Bouvier NM, Palese P. The Biology Of Influenza Viruses. Vaccine. 2008;26:D49-D53.
6. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล, ประเสริฐ เอื้อวรากุล. ไข้หวัดใหญ่/ไข้หวัดนก. กรุงเทพมหานคร: สมาคมไวรัสวิทยา; 2549.
7. Medina RA, García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. Nat Rev Micro. 2011;9(8):590-603.
8. About Influenza [Internet]. ม.ป.ป. [สืบค้นเมื่อ 20 สิงหาคม 2559]. แหล่งเข้าถึง: [http://www. Influenza-centre .org/aboutinfluenza.htm](http://www.Influenza-centre.org/aboutinfluenza.htm).
9. Zhao H, Yang J, Li K, Ding X, Lin R, Ma Y, et al. Proteomic analysis at the subcellular level for host targets against influenza A virus (H1N1). Antiviral Research. 2013;100(3):673-87.
10. Coombs KM, Berard A, Xu W, Krokhin O, Meng X, Cortens JP, et al. Quantitative proteomic analyses of influenza virus-infected cultured human lung cells. Journal of virology. ;84(20):10888-906.
11. Wu W, Panté N. Vimentin plays a role in the release of the influenza A viral genome from endosomes. Virology. 2016;497:41-52.
12. Teo CSH, Chu JJH. Cellular Vimentin Regulates Construction of Dengue Virus Replication Complexes through Interaction with NS4A Protein. Journal of virology. 2014;88(4):1897-913.
13. Salazar MI, del Angel RM, Lanz-Mendoza H, Ludert JE, Pando-Robles V. The role of cell proteins in dengue virus infection. Journal of Proteomics. 2014;111:6-15.

14. Naito T, Momose F, Kawaguchi A, Nagata K. Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits. *Journal of virology*. 2007;81(3):1339-49.
15. Martínez-Betancur V, Martínez-Gutierrez M. Proteomic profile of human monocytic cells infected with dengue virus. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016;6(11):914-23.
16. Chavez-Salinas S, Ceballos-Olvera I, Reyes-del Valle J, Medina F, del Angel RM. Heat shock effect upon dengue virus replication into U937 cells. *Virus Research*. 2008;138(1–2):111-8.
17. Geller R, Taguwa S, Frydman J. Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2012;1823(3):698-706.
18. Chase G, Deng T, Fodor E, Leung BW, Mayer D, Schwemmle M, et al. Hsp90 inhibitors reduce influenza virus replication in cell culture. *Virology*. 2008;377(2):431-9.
19. Zhu J, Zou W, Jia G, Zhou H, Hu Y, Peng M, et al. Analysis of cellular proteome alterations in porcine alveolar macrophage cells infected with 2009 (H1N1) and classical swine H1N1 influenza viruses. *Journal of Proteomics*. 2012;75(6):1732-41.
20. Zhang L, Zhang X, Ma Q, Ma F, Zhou H. Transcriptomics and Proteomics in the Study of H1N1 2009. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 2010;8(3):139-44.
21. Watanabe T, Watanabe S, Kawaoka Y. Cellular Networks Involved in the Influenza Virus Life Cycle. *Cell Host & Microbe*. 2010;7(6):427-39.
22. Liu G, Xiang Y, Guo C, Pei Y, Wang Y, Kitazato K. Cofilin-1 is involved in regulation of actin reorganization during influenza A virus assembly and budding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014;453(4):821-5.
23. Müller K, Dulku S, Hardwick SJ, Skepper JN, Mitchinson MJ. Changes in vimentin in human macrophages during apoptosis induced by oxidised low density lipoprotein. *Atherosclerosis*. 2001;156(1):133-44.
24. Angela van Diepena, H. Kim Branda, Iziah Samab, Lambert H.J. Lambooya,c, Lambert P. van den Heuvelc, Leontine van der Welld, *et al.* Quantitative proteome profiling of respiratory virus-infected lung epithelial cells. *Proteomics*. 2010:1680–1693

25. Xiaoman Ding, Jiahai Lu, Ruoxi Yu, Xin Wang, Ting Wang, Fangyuan Dong, *et al.* Preliminary Proteomic Analysis of A549 Cells Infected with Avian Influenza Virus H7N9 and Influenza A Virus H1N1. PLoS One. 2016; 11(5):1-14
26. Jakub Cibulka, Martin Fraiberk and Jitka Forstova. Nuclear Actin and Lamins in Viral Infections. Viruses. 2012; 4: 325-347
27. Dimiter Demirov, Gülsah Gabriel, Carola Schneider, Heinrich Hohenberg and Stephan Ludwig. Interaction of influenza A virus matrix protein with RACK1 is required for virus release. Cellular Microbiology. 2012;14(5):774–789
28. Emanuel Haasbach, Eva-Katharina Pauli, Robert Spranger, David Mitzner, Ulrich Schubert and Ralf Kircheis, Oliver Planz. Antiviral activity of the proteasome inhibitor VL-01 against influenza A viruses. Antiviral Research. 2011;91(3):304–313
29. Ivy Widjaja, Erik de Vries, Donna M. Tscherne, Adolfo García-Sastre, Peter J. M. Rottier and Cornelis A. M. de Haan. Inhibition of the Ubiquitin-Proteasome System Affects Influenza A Virus Infection at a Postfusion Step. J. Virol. 2010;84(18):9625-9631
30. Lamin A/C antibody [Online]. 2015 [สืบค้นข้อมูลเมื่อ 16 มกราคม 2560]. แหล่งเข้าถึงข้อมูล: <https://media.cellsignal.com/pdf/2032.pdf>

ภาคผนวก



**Title: PATHOGENIC MECHANISMS IN LUNG-DERIVED CELL LINE
INFECTED WITH SEASONAL H1N1 COMPARING WITH
INFLUENZA H1N1 2009 VIRUSES**

Name: Dr. TISTAYA SEMANGOEN

Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chonburi, Thailand, 20131

The seasonal influenza virus can cause local inflammation at the upper respiratory tract. It can cause mild or severe illness. In 2009, there was a new emerging virus influenza A /swine flu/ influenza 2009 which is a combination of swine-lineage influenza virus genes.

However, some pathogenic difference between seasonal flu and influenza 2009 in human lung remains unclear and largely unknown. The alveolar epithelial cells (A549) were infected with seasonal flu (A/Thailand/Siriraj-03/2006 (H1N1)) and influenza 2009 (A/Nonthaburi/104/2009 (H1N1)). The IL-6 cytokine in culture supernatant was determined by ELISA. Cell pellet were quantitated cell death by Flow cytometry. The cellular responses of viruses-infected A549 were performed by 2-DE analysis and mass spectrometry. The results showed that there are 19 proteins expression changed after seasonal flu infections. Five proteins were up-regulated whereas fourteen proteins were down-regulated including, Cytokeratin 8, Heat shock protein 90 and Vimentin. Interestingly, there are 7 proteins expression changed in influenza 2009-infected A549. Four proteins were increased such as lamin A/C. Three proteins were decreased, Receptor of activated protein C kinase 1 and Proteasome subunit HsN3. These proteins play important roles in several pathways, especially in viral infection processes. Confirmation of vimentin and lamin A/C expression were performed by 2DE-western blot. This study will enhance the understanding of lung pathogenesis from seasonal flu and influenza 2009 infection, as well as the secretion of cytokines during viral infection which may contribute the severity of tissue pathology. Moreover, these findings may provide the information of molecular mechanisms which leading to the development of new therapeutic targets and strategies.

Biography

Ms. Tistaya Semangoen has completed PhD in 2009 from Department of Immunology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University and postdoctoral studies from Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital. She is the lecturer at Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Thailand. She is the Assistant Dean of Student Affairs of the organization.

Presenting author details

Full name: Ms. TISTAYA SEMANGOEN

Contact number: +66 624601392

Twitter account: -

Linked In account: -

Session name/ number: Protein expression and analysis

Category: Poster presentation