



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเซลล์สุกรที่ติดเชื้อ
porcine circovirus type 2 ผ่านระบบสื่อสาร ERK MAPK

โดย อ.น.สพ.ดร.วิน สุรเชษฐพงษ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ กรกฎาคม 2557

สัญญาเลขที่ MRG5580180

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเซลล์สุกรที่ติดเชื้อ porcine circovirus type 2 ผ่านระบบสื่อสาร ERK MAPK

ผู้วิจัย

- 1) อ.น.สพ.ดร.วิน สุระเชษฐพงษ์
- 2) รศ.สพ.ญ.ดร.พรทิพภา เล็กเจริญสุข

สังกัด

คณะสัตวแพทยศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5580180

ชื่อโครงการ: การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเซลล์สุกรที่ติดเชื้อ porcine circovirus type 2
ผ่านระบบสื่อสาร ERK MAPK

ชื่อนักวิจัย: หัวหน้าโครงการวิจัย อ.น.สพ.ดร.วิน สุระเชษฐพงษ์
นักวิจัยที่ปรึกษา รศ.สพ.ญ.ดร.พรทิพา เล็กเจริญสุข

อีเมลล์ : fvetwsp@ku.ac.th
fvetptn@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (กรกฎาคม 2555 ถึง กรกฎาคม 2557)

บทคัดย่อ:

เชื้อเซอร์โคไวรัสในสุกรจัดเป็นโรคติดเชื้อไวรัสที่สำคัญในประเทศไทย ถึงแม้การศึกษาเกี่ยวกับ ปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสและระบบภูมิคุ้มกันสุกรจะมีรายงานจำนวนมาก การศึกษาเกี่ยวกับกลไกที่ไวรัสเพิ่ม จำนวนในเซลล์ภูมิคุ้มกันสุกร และการเปลี่ยนแปลงของการสื่อสารภายในเซลล์เหล่านี้ยังมีจำกัด ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยพบว่าเซอร์โคไวรัส 2 กระตุ้นระบบ ERK MAPK phosphorylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวสุกร polymorphonuclear cells (PBMC) ที่ 48 ชั่วโมงภายหลังการติดเชื้อ ระดับ ERK MAPK phosphorylation เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ผลของการยับยั้ง ERK MAPK ในเซลล์ PBMC ด้วยสาร MEK inhibitor (U0126) ที่ระดับ 10 ไมโครโมลสามารถยับยั้ง ERK MAPK ได้อย่างสมบูรณ์ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง การยับยั้ง ERK MAPK ช่วยลดการเพิ่มจำนวนของเซอร์โคไวรัส 2 ในเซลล์ PBMC โดยสรุปผลการศึกษานี้แสดงถึงบทบาทของ ERK MAPK ต่อการเพิ่มจำนวนของเซอร์โคไวรัส 2 ในเซลล์ PBMC สุกร และแสดงให้เห็นถึงปฏิสัมพันธ์ ระหว่างเชื้อเซอร์โคไวรัส 2 และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเซลล์สุกร

คำหลัก : การสื่อสาร MAPK, เซอร์โคไวรัส 2, การแบ่งตัว, เซลล์เม็ดเลือดขาว

Abstract

Project Code : MRG5580180

**Project Title : ERK MAPK signaling pathway regulates porcine circovirus type 2 replication
in peripheral blood mononuclear cells**

Investigator : Principle investigator: Win Surachetpong

Mentor: Associate Professor Porntippa Lekcharoensuk

E-mail Address : fvetwsp@ku.ac.th

fvetptn@ku.ac.th

Project Period : July 2012 – July 2014

Abstract:

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is one of the most important swine viral diseases in Thailand. While the interaction between PCV2 and pig immune system have been largely explored, the mechanisms by which PCV2 replicate in porcine immune cells and alter host cellular signaling pathways remain incomplete. In this study, we showed that PCV2 activates ERK MAPK phosphorylation in porcine peripheral blood mononuclear (PBMC) cells. At 48 hour post infection, ERK phosphorylation slightly increase in PCV2-infected cells. To demonstrate the role of ERK MAPK signaling, we used a MEK specific inhibitor, U0126 to prevent ERK phosphorylation. As expected, 10 μ M U0126 completely inhibited ERK activation in porcine PBMC cells at 48 and 72 hours. Interestingly, inhibition of ERK MAPK significantly impaired PCV2 replication in PBMC cells. In summary, our results unravel the role of ERK MAPK signaling during PCV2 replication in porcine PBMC cells. These findings provide important information how PCV2 interact with host cells and influence host immune response.

Keywords : MAPK signaling, porcine circovirus type 2, replication
peripheral blood mononuclear cells

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเป็นธุรกิจการเกษตรที่ครบวงจรมีจำนวนสุกรประมาณ 10 ล้านตัวทั่วประเทศ ประเทศไทย โดยมีเกษตรกรกว่าสองแสนครัวเรือนเกี่ยวข้องกับธุรกิจนี้ ในปัจจุบันปัญหาสำคัญที่นำมาซึ่งความสูญเสียต่อธุรกิจนี้คือ โรคติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย หนึ่งในนั้นได้แก่ กลุ่มอาการ porcine respiratory disease complex (PRDC) และ post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อไวรัสหลายชนิดร่วมกัน เชื้อ porcine circovirus type 2 (PCV2) เป็นเชื้อไวรัสที่พบได้บ่อยในสุกรที่มีปัญหา PRDC หรือ PMWS โดยเชื้อ PCV2 เป็นดีเอ็นเอไวรัสขนาดเล็ก เริ่มมีรายงานการค้นพบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1974 ในสุกรป่วยจะมีไข้ น้ำหนักลด ไอ หายใจลำบาก ต่อมามีการขยายใหญ่ แต่มีปริมาณเม็ดเลือดขาวต่ำ อัตราการตายอยู่ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ จนถึง 30 เปอร์เซ็นต์ (ในกรณีที่มีการติดเชื้อชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย) การป้องกันเชื้อ PCV2 ทำโดยการฉีดวัคซีนป้องกันโรค แม้วัคซีนจะมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรค แต่สุกรยังมีความเสี่ยงติดเชื้อในน้ำนมและออกสู่สิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดการติดเชื้อซ้ำในฝูงสุกรได้

จากการศึกษาพบว่าระบบภูมิคุ้มกันมีบทบาทสำคัญในการควบคุมเชื้อ PCV2 มีรายงานหลายฉบับแสดงให้เห็นว่า ส่วนประกอบของเชื้อไวรัสทั้งโปรตีน และสารพันธุกรรมสามารถกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและส่งผลต่อปริมาณเชื้อในสุกร อย่างไรก็ตามกลไกที่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันควบคุมปริมาณเชื้อยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด หนึ่งในกลไกสื่อสารภายในเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันคือ โปรตีนในกลุ่ม MAPK signaling ซึ่งประกอบด้วย ERK, p38 และ JNK สัญญาณจาก MAPK เหล่านี้ควบคุมการแสดงออกของไซโตไคน์หลายชนิดที่จำเป็นต่อภูมิคุ้มกันแบบทั่วไปและแบบจำเพาะ (innate and adaptive immunity) บทบาทของ MAPK ต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ PCV2 ได้มีรายงานในเซลล์เพาะเลี้ยง porcine kidney (PK15) cells โดย PK15 ที่ติดเชื้อ PCV2 จะมีระดับ MAPK phosphorylation ทั้ง 3 ชนิดเพิ่มมากขึ้น เมื่อยับยั้ง MAPK signaling พบว่าเชื้อ PCV2 มีปริมาณลดลง อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับหน้าที่ของ MAPK signaling ในเซลล์ porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันสุกร

ในการศึกษานี้ทางคณะผู้วิจัยได้ศึกษาหน้าที่ของ ERK MAPK ต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส PCV2 ในเซลล์ PBMC เซลล์ที่ติดเชื้อ PCV2 พบการเพิ่มขึ้นของระดับ ERK MAPK phosphorylation ที่ 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อไวรัสกระตุ้นสัญญาณนี้ในเซลล์สุกร ผลการยับยั้ง ERK MAPK signaling พบว่าไวรัส PCV2 มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม ผลการศึกษานี้ยังสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าในเซลล์ไตสุกร (Porcine Kidney cells PK-15) ซึ่งช่วยยืนยันบทบาทของ ERK MAPK ต่อการติดเชื้อไวรัส PCV2 ความเข้าใจเกี่ยวกับการทำงานของเซลล์หลังจากติดเชื้อไวรัสจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญเพื่ออธิบายกลไกก่อโรคของเชื้อ PCV2 รวมถึงความรู้ที่จะนำไปสู่การพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการกระตุ้น ERK MAPK ในเซลล์เม็ดเลือดขาวสุกร (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) ที่ติดเชื้อไวรัส PCV2
2. เพื่อศึกษาบทบาทของสัญญาณ ERK MAPK ต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ PCV2 ในเซลล์ PBMC
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัสและการทำงานของภูมิคุ้มกันสุกร รวมทั้งปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นผ่านทางสัญญาณ ERK MAPK

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสัตว์ทดลอง

สุกรอายุ 60 วัน สุขภาพดี ปลอดโรคติดเชื้อสำคัญชนิดต่างๆ ได้แก่ Porcine circovirus type 2, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Foot and mouth disease virus, Swine fever virus สัตว์ทดลองถูกเลี้ยงที่หน่วยสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน การเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองปฏิบัติตามจรรยาบรรณและได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการการสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ แอนติบอดีและสารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการสั่งซื้อจากบริษัทที่ได้มาตรฐาน

3.2 การเลี้ยงเชื้อ PCV2

การทดลองครั้งนี้ใช้ infectious clone ที่สร้างจากเชื้อไวรัส Porcine circovirus type 2 สายพันธุ์ ISU 31 แยกได้จากสุกรป่วยในปี ค.ศ.1988 เชื้อถูกเลี้ยงในเซลล์ PK15 ซึ่งมีอาหารชนิด minimal essential medium ร่วมกับ fetal bovine serum ผสมอยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์

3.3 การแยกและกระตุ้นเซลล์ PBMC

เก็บเลือดสุกรแล้วนำมาแยกเฉพาะส่วนเม็ดเลือดขาวด้วยวิธีปั่นเหวี่ยงในสารละลาย Ficall-Hypaque gradient เซลล์ PBMC ที่เก็บได้นำไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI ที่มีปริมาณ fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์ ในอัตรา 6×10^6 เซลล์ต่อหลุม การกระตุ้นเซลล์ใช้สาร concanavalin A ในปริมาณ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง เซลล์ที่ถูกกระตุ้นแล้วนำไปใช้เพื่อศึกษาสัญญาณ ERK MAPK และหาระดับไซโตไคน์ต่อไป

3.4 ผลของสาร MAPK inhibitor ต่อเซลล์ PBMC และเชื้อไวรัส PCV2

ทดสอบความเป็นพิษของสาร U0126 (MAPK inhibitor) ต่อเซลล์ PBMC โดยเลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงที่มีส่วนผสมของ U0126 ในปริมาณ 1 ถึง 40 μM หรือ DMSO ซึ่งเป็นสารที่ใช้ละลาย U0126 จากนั้นวัดอัตราการตายของเซลล์ที่ 1, 3, 6, 24 และ 48 ชั่วโมงด้วยวิธี trypan blue exclusion assay ส่วนการวัดความเป็นพิษของ U0126 ต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ PCV2 ทำโดยตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสในเซลล์ PBMC ด้วยวิธี real time PCR ที่ระยะเวลา 1, 3, 6, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากเซลล์สัมผัส U0126 หรือ DMSO

3.5 การวัดปริมาณ phospho-ERK ด้วยวิธี immunoblotting

หาระดับของ phospho-ERK ในเซลล์ PBMC ที่ติดเชื้อ PCV2 ร่วมกับสัมผัสสาร U0126 หรือ DMSO โดยแยกโปรตีนบน SDS-PAGE polyacrylamide gel จากนั้นถ่ายโปรตีนไปสู่แผ่น nitrocellulose membrane ก่อนนำไปทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีตัวแรกที่จำเพาะกับ phospho-ERK (Cell Signaling, USA) และใช้แอนติบอดีที่สองที่ติดฉลากไว้ด้วยเอนไซม์ horse radish peroxidase ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นตรวจสอบด้วยสาร chemiluminescent และแถบที่จำเพาะบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์

3.6 การวัดปริมาณไวรัสและผลที่เกิดกับเซลล์ PBMC

นำเซลล์ PBMC มาทำให้ติดเชื้อ PCV2 ด้วยปริมาณ infectious clone ของเชื้อไวรัสที่ 0.1 MOI เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส เติมสาร U0126 หรือ DMSO ลงในหลุมทดลองแล้วบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์เพื่อกำจัดสาร U0126 และ DMSO ที่อยู่ในหลุมทดลอง ทำการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างเซลล์ด้วยชุดทดสอบ DNA

extraction kit (QIAGEN) ตัวอย่างที่ได้นำไปเพิ่มจำนวนด้วยวิธี real time PCR เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ PCV2 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่สัมผัส U0126 และ DMSO

3.7 การวัดปริมาณการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ด้วยวิธี real time PCR

วัดระดับของ mRNA ของยีนไซโตไคน์ ได้แก่ IFN-gamma, IL-10 และ IL-2 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ PBMC ที่ติดเชื้อ PCV2 และสัมผัสสาร U0126 หรือ DMSO (กลุ่มควบคุม) โดยแยกสารพันธุกรรมและสกัด RNA ด้วยสารเคมี Trizol และสร้างสาย cDNA ด้วยชุด iScript kit (BioRad) การวัดปริมาณไซโตไคน์แต่ละชนิดใช้เทคนิค real time PCR นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับ U0126 หรือ DMSO

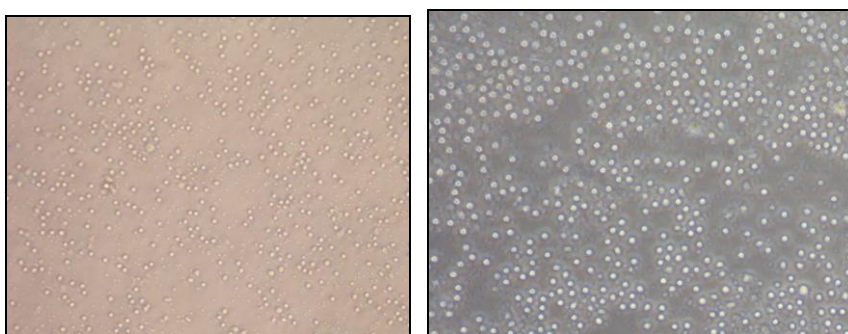
3.8 การวัดผลทางสถิติ

ผลการทดลองทั้งระดับของโปรตีน ERK MAPK ปริมาณเชื้อไวรัส PCV2 นำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Student's *t* test หรือวิธี one-way analysis of variance (ANOVA) และ Bonferroni multiple comparison test การวิเคราะห์ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Prism software เวอร์ชัน 5.0.2 (GrapPad, San Diego)

4. ผลการวิจัย

4.1 การแยกเซลล์ PBMC จากเลือดสุกร

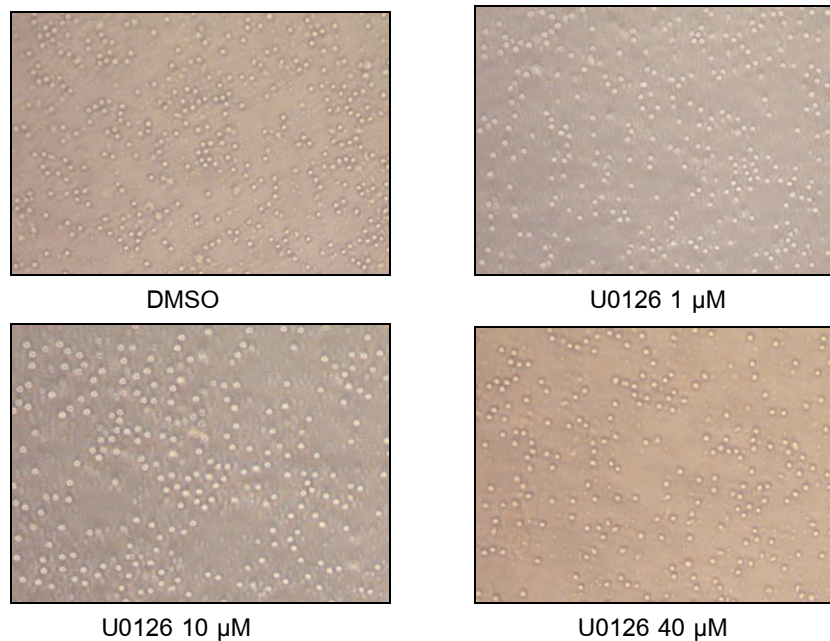
เก็บตัวอย่างเลือดจากสุกรที่มีสุขภาพปกติ ในหลอดที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว heparin นำมาแยกเฉพาะส่วนเม็ดเลือดขาวด้วยวิธีปั่นเหวี่ยงในสารละลาย Ficall-Hypaque gradient หลังจากปั่นด้วยความเร็วสูง สามารถแยกเซลล์ PBMC ได้เฉลี่ย 1×10^6 เซลล์ต่อเลือด 1 มิลลิลิตร นำเซลล์ที่เก็บได้ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI ที่มีปริมาณ fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใส่เซลล์ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม แต่ละหลุมมีปริมาณเซลล์ PBMC 1×10^6 เซลล์ ลักษณะของเซลล์ที่แยกได้เป็นลักษณะของเซลล์ monocytes หรือ lymphocytes โดยไม่มีเม็ดเลือดแดงปน (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ลักษณะของเซลล์ที่แยกได้จากเลือดสุกรด้วยวิธี Ficall-Hypaque

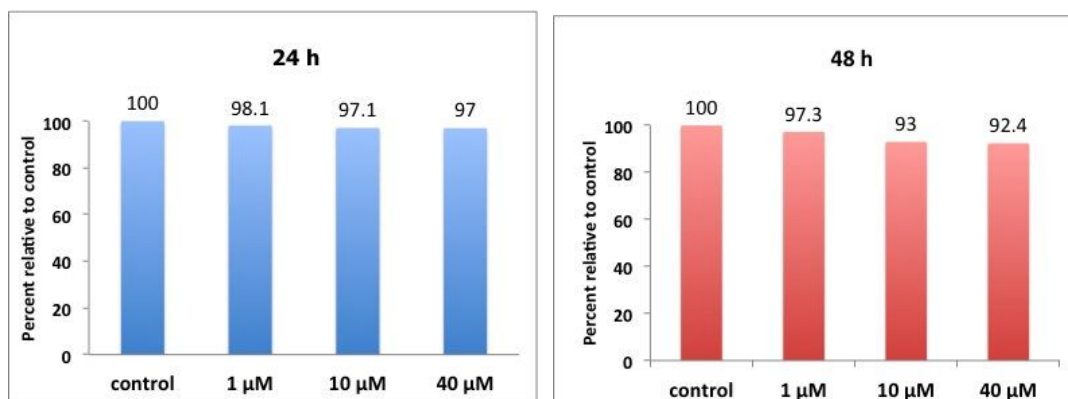
4.2 ผลของสาร MAPK inhibitor ต่อเซลล์ PBMC

ทดสอบความเป็นพิษของสาร U0126 (MAPK inhibitor) ต่อเซลล์ PBMC โดยเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงที่มีส่วนผสมของ U0126 ในปริมาณ 1, 10 และ 40 μ M หรือ DMSO ซึ่งเป็นสารที่ละลาย U0126 ที่ความเข้มข้นเท่ากับที่ใช้ใน U0126 40 μ M จากนั้นวัดอัตราการตายของเซลล์ที่ 1, 3, 6, 24 และ 48 ชั่วโมงด้วยวิธี trypan blue exclusion assay



รูปที่ 2 ลักษณะของเซลล์ที่สัมผัส U0126 ขนาด 1, 10 และ 40 μM
เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ DMSO (กลุ่มควบคุม) ที่ 48 ชั่วโมง

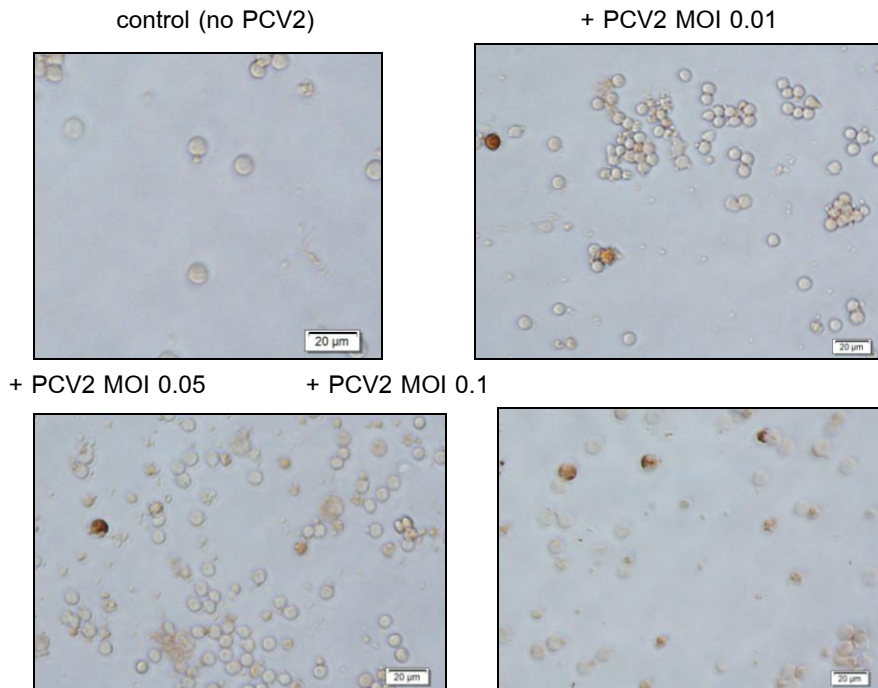
ปริมาณ live-dead cells นำมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ U0126 ในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน จากการศึกษพบว่า U0126 ที่ระดับความเข้มข้น 1, 10 และ 40 μM ซึ่งเป็นระดับที่ยับยั้งการทำงานของ MEK-ERK activation มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่ 24 และ 48 ชั่วโมง (รูปที่ 2 และรูปที่ 3)



รูปที่ 3 กราฟเปรียบเทียบความเป็นพิษของ U0126 เทียบกับกลุ่มควบคุม

4.3 การทำให้เซลล์ PBMC ติดเชื้อไวรัส PCV2

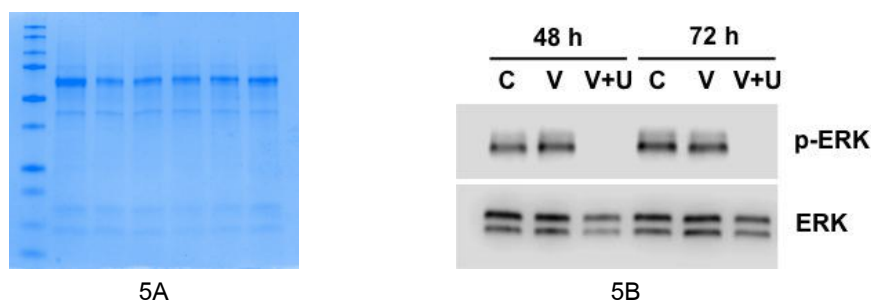
เริ่มจากหาปริมาณเชื้อไวรัสที่เหมาะสมสำหรับทำให้เซลล์ PBMC ติดเชื้อ ด้วยปริมาณไวรัสตั้งแต่ MOI 0.01-0.1 จากนั้นตรวจสอบการติดเชื้อ PCV2 ในเซลล์ PBMC โดยใช้เทคนิค Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ ORF2 ของเชื้อ PCV2 ผลที่ได้พบการติดเชื้อไวรัสในทุกกลุ่มการทดลอง ซึ่งกลุ่มที่ใช้ MOI 0.1 มีระดับการติดเชื้อมากที่สุด (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงเซลล์ PBMC ที่ติดเชื้อไวรัส PCV2 ที่ระดับ MOI 0.01 – 0.1

4.4 ศึกษาการระดับ ERK MAPK phosphorylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ติดเชื้อ PCV2 ร่วมกับการยับยั้งด้วย U0126

จากการแยกโปรตีนจากเม็ดเลือดขาวตัวอย่างแล้วย้อมด้วยสี Coomassie blue พบปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกัน ในตัวอย่างทั้งหมด (รูปที่ 5A) การศึกษาปริมาณ ERK MAPK phosphorylation ด้วยเทคนิค western blot โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ phospho-ERK และ total-ERK พบลักษณะแถบที่จำเพาะบริเวณขนาดโปรตีน 42-44 KDa (รูปที่ 5B) ผลจากการศึกษาพบว่าเซลล์ที่ติดเชื้อ PCV2 มีระดับของ ERK MAPK เพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ 48 ชั่วโมงภายหลังการติดเชื้อ อย่างไรก็ตามระดับของ phospho-ERK ไม่แตกต่างกันระหว่างเซลล์ที่ติดเชื้อ PCV2 และกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ผลของการใช้สาร MEK inhibitors U0126 ที่ระดับ 10 µM สามารถยับยั้ง ERK phosphorylation ได้อย่างสมบูรณ์ทั้งที่ 48 และ 72 ชั่วโมง ทั้งนี้ U0126 ไม่ส่งผลต่อระดับ total ERK ในทุกกลุ่มการทดลอง (รูปที่ 5B)



รูปที่ 5 แสดงระดับของ ERK MAPK phosphorylation ใน PBMC ที่ติดเชื้อไวรัส PCV2

5A แสดงปริมาณโปรตีนที่แยกได้จากตัวอย่างเม็ดเลือดขาว PBMC ย้อมด้วยสี Coomassie blue

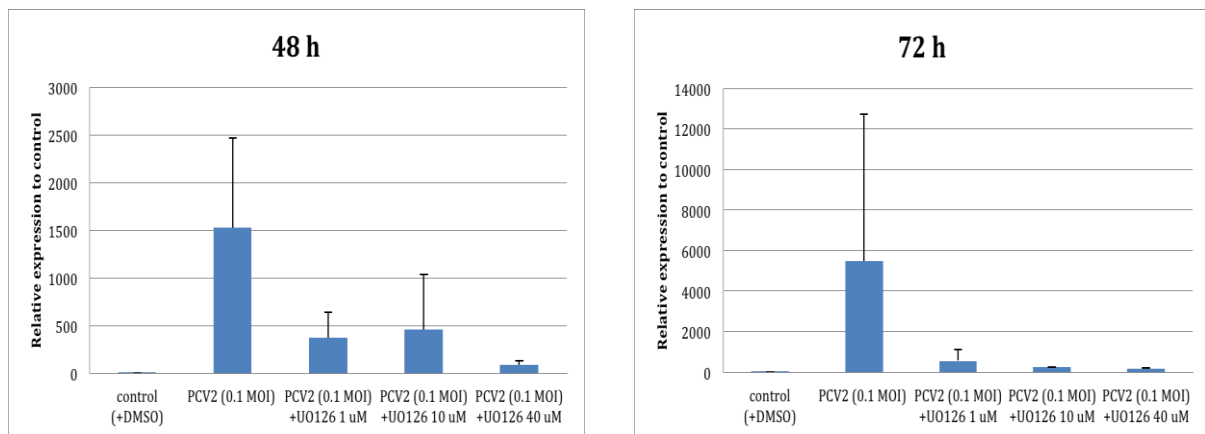
5B ระดับของ p42/44 ERK MAPK ด้วยวิธี western blotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะ

p-ERK = phospho-ERK, ERK = total ERK

(C = control, V = PCV2 infection, V+U = PCV2 infection + U0126 treatment)

4.5 การวัดปริมาณเชื้อไวรัส PCV2 ในเซลล์ PBMC ที่ถูกยับยั้งกลไก ERK MAPK

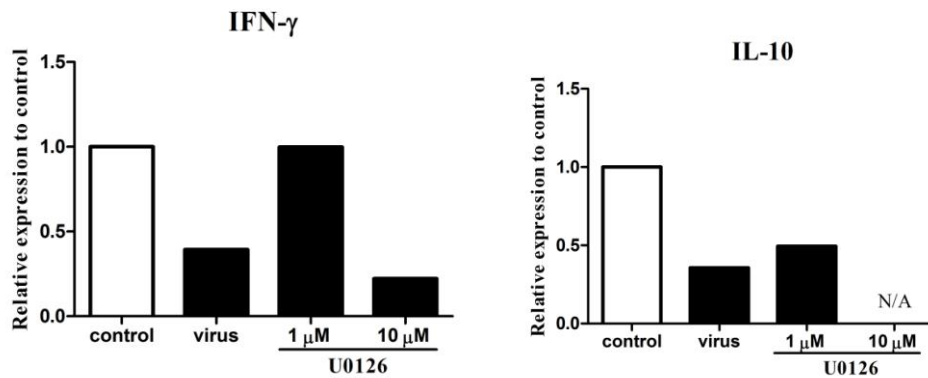
การทดสอบผลของการยับยั้ง ERK MAPK ต่อการเพิ่มจำนวนเชื้อ PCV2 โดยทำให้เซลล์ PBMC ติดเชื้อไวรัสในปริมาณ MOI 0.1 การทดลองนี้แบ่งเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 2 replications คือกลุ่มที่ไม่มีเชื้อ PCV2 กลุ่มที่มีเชื้อ PCV2 พร้อมกับใส่ DMSO, U0126 ขนาด 1, 10 และ 40 μM ตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จึงแยกสกัด DNA จากเซลล์แต่ละกลุ่ม ด้วยชุด DNA extraction kit (ThermoScientific, USA) แล้วนำไปหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer จากนั้นตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสด้วยวิธี realtime PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ PCV2 (Kekarainen et al., 2008 J Gen Virol.) จากผลการศึกษาพบว่า การยับยั้ง ERK MAPK ไม่มีผลต่อปริมาณเชื้อ PCV2 ในเซลล์ PBMC ที่ 24 ชั่วโมง แต่การยับยั้ง ERK MAPK signaling ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสที่ 48 และ 72 ชั่วโมง โดยเริ่มเห็นผลของ U0126 ทั้งที่ระดับความเข้มข้น 1, 10 และ 40 μM ที่ 48 ชั่วโมง การยับยั้ง ERK MAPK ทำให้ปริมาณเชื้อไวรัส PCV2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ 72 ชั่วโมง ทั้งระดับความเข้มข้น 1, 10 และ 40 μM (รูปที่ 6) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานในเซลล์ PK-15 ที่การยับยั้ง ERK MAPK ส่งผลให้ไวรัสเพิ่มจำนวนลดลง (Wei and Liu 2009 Virology 386(1): 203-209)



รูปที่ 6 ผลของการยับยั้ง ERK MAPK ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส PCV2 ในเซลล์ PBMC วัดปริมาณไวรัสที่ 48 และ 72 ชั่วโมงภายหลังจากการติดเชื้อ

4.6 ระดับไซโตไคน์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ติดเชื้อ PCV2 ร่วมกับการยับยั้ง ERK MAPK

การศึกษาเบื้องต้นในเซลล์ PBMC ที่มีการติดเชื้อ PCV2 พบว่าระดับ IFN-gamma และ IL-10 มีปริมาณลดลง (รูปที่ 7) ที่น่าสนใจคือในกลุ่มที่ยับยั้ง ERK MAPK ด้วย U0126 ที่ระดับความเข้มข้น 1 μM พบว่าระดับ IFN-gamma มีการแสดงออกใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการติดเชื้อ PCV2 อย่างไรก็ตามทางคณะผู้วิจัยพบปัญหาระดับการแสดงออกของ internal control gene ที่มีระดับการแสดงออกไม่คงที่ โดยยีนที่ผู้วิจัยเลือกนำมาเปรียบเทียบคือ GAPDH มีการเปลี่ยนแปลงตามการกระตุ้นด้วยสาร concanavalin A ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการวิเคราะห์ ด้วยเหตุนี้การเลือกใช้ internal control gene ตัวอื่นเพื่อศึกษาผลของไวรัสและ U0126 จะได้ดำเนินการเพิ่มเติมต่อไป



รูป 7 แสดงระดับไซโตไคน์ IFN-gamma และ IL-10 ในเซลล์ PBMC ที่ติดเชื้อไวรัส PCV2 แล้วถูกยับยั้ง ERK MAPK ด้วยสาร U0126

5. สรุปผลและอภิปรายผล

จากผลการศึกษาพบว่าทางคณะผู้วิจัยสามารถแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวสุกรชนิด peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ซึ่งมีลักษณะตรงตามที่ต้องการจากตัวอย่างเลือดสุกร เซลล์ที่ได้ถูกนำมาเลี้ยงและทำให้ติดเชื้อ PCV2 ด้วยปริมาณไวรัส MOI 0.01-0.1 โดยยืนยันการติดเชื้อด้วยเทคนิค immunoperoxidase monolayer assay พบปริมาณไวรัส MOI 0.1 เหมาะสมต่อการนำไปศึกษาทดลองต่อไป การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ PBMC ทั้งที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตมีปริมาณใกล้เคียงกันทุกกลุ่ม การศึกษาระดับของ ERK phosphorylation ในเซลล์ที่ติดเชื้อ PCV2 พบปริมาณ ERK phosphorylation เพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ 48 ชั่วโมงภายหลังจากการติดเชื้อ แต่ไม่พบความแตกต่างที่ 72 ชั่วโมง ทั้งนี้ระดับของ ERK phosphorylation อาจเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 12 และ 24 ชั่วโมง ซึ่งจะต้องดำเนินการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับระยะเวลาที่เหมาะสมของการกระตุ้น ERK MAPK ในเซลล์ PBMC ต่อไป สาร MEK inhibitor U 0126 ยับยั้ง ERK activation ในเซลล์ PBMC อย่างได้ผลดี การใช้ U0126 ที่ความเข้มข้น 10 μM สามารถยับยั้ง ERK phosphorylation ได้อย่างสมบูรณ์ โดยไม่มีผลต่อปริมาณ total protein ทั้งนี้การใช้สาร U0126 ในเซลล์ PBMC ยังจัดเป็นรายงานการศึกษาครั้งแรกในสุกร ซึ่งจะทำงานวิจัยขั้นนี้มีความน่าสนใจมากยิ่งขึ้น และยังเป็นเครื่องมือสำหรับการศึกษาทบทวนของ ERK MAPK pathway ในอนาคตต่อไป

ผลจากการยับยั้ง ERK phosphorylation พบว่าปริมาณไวรัส PCV2 ลดลงที่ 48 ชั่วโมงทั้งที่ระดับความเข้มข้นของ U0126 1, 10 และ 40 μM ในขณะที่ผลของ U0126 ต่อปริมาณ PCV2 ชัดเจนมากขึ้นที่ 72 ชั่วโมงภายหลังการติดเชื้อ ผลการค้นพบนี้ยังสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้า โดย Wei และคณะ (2009) (Virology 386(1): 203-209) ที่พบว่าการยับยั้ง ERK MAPK ทำให้เชื้อไวรัส PCV2 แบ่งตัวลดลงในเซลล์ PK-15 เนื่องจาก PBMC เป็นเซลล์กลุ่มเม็ดเลือดขาวที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันสุกร และเป็นหนึ่งในเซลล์เป้าหมายของการติดเชื้อ PCV2 ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส PCV2 ในเซลล์กลุ่มนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่นำไปประกอบการวิจัยเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัสและเซลล์สุกร

6. ภาคผนวก ประกอบด้วย reprint หรือ manuscript และบทความสำหรับการเผยแพร่กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

6.1 International Journal Publication (major publication of this project)

Topic: ERK MAPK signaling pathway regulates porcine circovirus type 2 replication in peripheral blood mononuclear cells. Manuscript in preparation. To be submitted to Research in Veterinary Science. ISI, Scopus. Impact factor: 1.511

6.2 International Journal Publication

Topic: Molecular Characterization and Expression Analysis of miR-29a in Porcine Cells and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infected Peripheral Blood Mononuclear Cells. Thai Journal of Veterinary Medicine. 44(1): 125-132. ISI, Scopus. Impact factor: 0.148

7. Output ที่ได้จากโครงการ (Acknowledge the Thailand Research Fund: MRG5580180)

- International Journal Publication จำนวน 2 ผลงาน

7.1 ERK MAPK signaling pathway regulates porcine circovirus type 2 replication in peripheral blood mononuclear cells. Manuscript in preparation. To be submitted to Research in Veterinary Science. ISI, Scopus. Impact factor: 1.511

7.2 Molecular Characterization and Expression Analysis of miR-29a in Porcine Cells and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infected Peripheral Blood Mononuclear Cells. Thai Journal of Veterinary Medicine. 44(1): 125-132. ISI, Scopus. Impact factor: 0.148

8. รายงานการเงิน พร้อมสำเนาสมุดบัญชีเงินฝาก (แยกจากรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์)

Molecular Characterization and Expression Analysis of miR-29a in Porcine Cells and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infected Peripheral Blood Mononuclear Cells

Win Surachetpong* Sunaree Nantakhruea Porntippa Lekcharoensuk

Abstract

MicroRNAs are a group of small non-coding RNA that are involved in posttranscriptional regulation through target mRNA degradation or inhibition of protein synthesis. The objective of this present study was to characterize and determine expression level of porcine miR-29a in various tissues. Our results indicated that porcine miR-29a shared high conserved sequence with miR-29a from other organisms. Furthermore, *in silico* analysis suggested that the seed region of porcine miR-29a partially matched IFN- γ mRNA. RT-PCR analysis indicated that miR-29a expressed in various tissues including lymph node, spleen, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and PK-15 cells. Expression profiling of miR-29a in PRRSV-infected PBMCs *in vitro* revealed an upregulation at 24 and 48 h. Moreover, expression analysis of miR-29a showed higher transcripts in both low pathogenic and highly pathogenic-PRRSV infected pigs. Together, all of these results revealed that porcine miR-29a was highly conserved with miR-29a from other organisms and miR-29a transcripts increased in PRRSV-infected PBMCs both *in vitro* and *in vivo*. Additional studies of the role of miR-29a will provide valuable information on virus: host interaction and could be applied for PRRS control in the future.

Keywords: immunity, miR-29a, porcine, PRRSV

Department of Veterinary Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

*Correspondence: fvetwsp@ku.ac.th

Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is an important viral disease affecting pigs worldwide. The causative agent is PRRS virus, which is a single stranded, positive sense RNA virus in the family of *Arteriviridae* (Frossard et al., 2013). Presently, two different genotypes of PRRSV, genotype I (European) and genotype II (North American), have been characterized since its initial outbreak. To avoid host immune response, PRRSV employs multiple strategies to inhibit host innate and adaptive immune response. For example, PRRSV non-structural proteins can interfere with type I IFN production (Sun et al., 2012^b). Moreover, the virus nucleocapsid protein can stimulate regulatory T cell differentiation and IL-10 production (Wongyanin et al., 2012). All of these mechanisms are responsible for poor adaptive immune response as suggested by delay neutralizing antibody production and less IFN- γ secreting cells in PRRSV-infected pigs (Labarque et al., 2000; Díaz et al., 2005). Such an inefficient immune response allows viral persistent in pigs up to 251 days (Wills et al., 2003).

MicroRNAs are a group of conserved small RNA with 22 nucleotide lengths that participate in the process of posttranscriptional regulation. MiRNAs have been identified across multiple organisms including plants, animals, human as well as viruses (Bartel, 2009). MiRNAs have been associated with a wide variety of biological processes such as oncogenesis, organ development, and host pathogen interaction (Krol et al., 2010). To regulate gene expression, specific sequence located within 5' untranslated region (UTR) of miRNA binds to target mRNA, leading to mRNA degradation or inhibition protein translation (Bartel, 2009). Recent studies clearly suggested that both innate and adaptive immunity were finely regulated by multiple miRNAs (Chen et al., 2013). Among these, members of the miR-29 family have been shown as important regulators of diverse immunological pathways (Liston et al., 2012; Brain et al., 2013). In particular, miR-29 targeted IFN- γ production by directly inhibiting IFN- γ mRNA (Ma et al., 2011; Savan et al., 2011) or indirectly regulating two transcription factors Eomes and T-bet (Steiner et al., 2011).

To date, there is no available information on miR-29a expression during viral infection in porcine cells. Based on the conserved sequence of miR-29a among different species and its critical role in immune system, it is interesting to characterize porcine miR-29a and determine expression level of miR-29a in normal porcine tissues and cell lines. In addition, analysis of miR-29a expression in PBMCs was investigated during PRRSV infection both *in vitro* and *in vivo*. Distinct expression pattern of miR-29a may provide valuable information to the role of this microRNA in pig.

Materials and Methods

Characterization of porcine miR-29a: To characterize porcine miR-29a, sequences of miR-29a were retrieved from miRbase (www.miRbase.org) and NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). The *Sus scrofa* miR-29a (NR_038524) sequence was compared with miR-29a from other organisms including *Homo sapiens* (NR_029503), *Rattus norvegicus* (NR_031836), *Mus musculus* (NR_029744), *Bos taurus* (NR_031267), *Danio rerio* (NR_030039), and *Gallus gallus* (NR_031391). The secondary structure of precursor miRNA was predicted by RNA Folding Form, Mfold program (Zuker, 2003). Comparisons of miR-29a precursor and mature sequence among species were examined by multiple sequences alignment using ClustalW2 program, European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI).

PBMC preparation and expression of miR-29 in normal cells and tissues: Tissues including spleen and mesenteric lymph nodes were collected from three healthy pigs. PBMC were isolated from heparinized whole blood samples using Ficoll-Hypaque Plus (GE healthcare, USA) density gradient centrifugation. Blood samples were initially diluted in sterile 1X phosphate buffer saline (PBS) (PBS : whole blood = 1 : 1). The diluted blood was overlaid on Ficoll-Hypaque Plus (diluted blood : Ficoll = 10 : 3) in 15 ml conical tube and centrifuged at 2500 rpm for 20 min at 20°C. After centrifugation, PBMCs layer was carefully collected into a new conical tube. To remove contaminated red blood cells, samples were incubated with 5 ml of sterile Red Blood cell (RBC) lysis solution

Table 1 All Primers used in this study

Target	Primer name	Primer sequence (5' - 3')	Tm (°C)	Size (bp)	GenBank Accession number
miR-29a	miR29A_F	CCCCTTAGAGGATGACTGAT	57.3	86	NR_038524.1
	miR29A_R	CCCCAATCATTATAACCGAT	53.2		
GAPDH	GAPDH_F	AGGTCATCCATGACAACCTCGGCA	72.5	155	AF017079
	GAPDH_R	AGCACCAGTAGAAGCAGGGATGAT	67.9		
β -actin	ACTB_F	GGACTTCGAGCAGGAGATGG	66.2	233	AY550069.1
	ACTB_R	GCACCGTGTGGCGTAGAGG	70.1		

on ice for 3 min. The reaction was terminated by filling PBS and centrifuged at 2500 rpm for 5 min at 4°C. PBMCs were collected and resuspended with RPMI medium for further experiment.

Total RNA extraction and cDNA synthesis: Porcine cells and tissues were harvested from healthy pigs. The animal use protocol was approved by Chulalongkorn University Animal Care and Use committee, approval number 13310019. Total RNA was extracted by using Trizol solution (Invitrogen, USA) following manufacturer's instructions. Subsequently, RNA was treated with DNase I (Promega) to remove contaminated DNA. Total RNA concentration and quality were examined by NanoDrop spectrophotometer 2000 (Thermo Scientific, USA). To synthesize the first strand cDNA, five hundred nanogram of total RNA in each group was reverse transcribed by Superscript III (Invitrogen, USA) and Oligo dT primer (Promega, USA).

Polymerase Chain Reaction (PCR): To study miR-29a expression in porcine tissues and cells, 2 μ l of cDNA was amplified with Taq DNA polymerase (Thermo scientific, USA) with 0.2 μ M of forward and reverse primers, 2 mM MgCl₂ and 0.2 mM of each dNTP in 20 μ l reaction. The PCR conditions included initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles (for miR-29a) or 30 cycles (for β -actin) of 95°C for 30 sec, annealing at 55°C (for miR-29a) or 58°C (for β -actin) for 30 sec and then extension at 72°C for 30 sec. The final extension was performed at 72°C for 7 min. The specific PCR products were determined on low melting temperature Nusieve® 3 : 1 agarosegel (Lonza, USA). Primer sequences including GAPDH (Zhang et al., 2012), β -actin (Sun et al., 2012^a) and miR-29a are shown in Table 1. For qRT-PCR, 2 μ l of cDNA was amplified in 20 μ l reaction with iTaq Universal SYBR green master mix (Biorad, USA). The qRT-PCR protocol was performed according to our recent publication (Nantakhruea et al., 2013). Expression level of miR-29a and β -actin was calculated by 2^{- $\Delta\Delta C_q$} method for relative quantification (Livak and Schmittgen, 2001).

Expression of miR-29a in PRRSV-infected PBMCs: In this study, PBMCs were plated in RPMI medium at concentration of 1×10^6 cells per well in 96 well plate. After plating, the cells were incubated with low pathogenic local Thai PRRSV isolates, 01NP1 (North American genotype, GenBank accession number: DQ056373.1) at 0.1 multiplicity of infection (MOI). PBMCs were maintained at 37°C with 5% CO₂ for 24 and 48 h. To determine miR-29a expression, total RNA was collected and processed for qRT-PCR as previously described (Nantakhruea et al., 2013).

Expression of miR-29a in PRRSV-infected pigs: Piglets were divided into three groups including control, pigs challenged with low pathogenic PRRSV (LP-PRRSV) strain 01NP1, and pigs challenged with highly pathogenic PRRSV (HP-PRRSV) strain 10PN01 at concentration of 10^5 TCID₅₀/ml. All piglets were inoculated via intranasal route with either cell culture medium, LP-PRRSV or HP-PRRSV. After 10 days post

PRRSV inoculation, heparinized whole blood was collected from PRRSV-infected and non-infected pigs. PBMCs were separated from each blood sample by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Expression of miR-29a was examined using RT-PCR. Plasmid containing miR-29a fragment (pGEM-miR29a) was used as a positive control in the PCR reaction (Nantakhruea et al., 2013).

Statistical analysis: The paired sample *t* test was used for statistical analysis. Data were analyzed with GraphPad Prism software version 5.01 (GraphPad, San Diego, CA). A *p*-value ($p < 0.05$) indicated statistical significance.

Results

Secondary structure and multiple sequence alignments of miR-29a: Sequences of precursor and mature miR-29a from each species including pig (*Sus scrofa*), human (*Homo sapiens*), rat (*Rattus norvegicus*), mouse (*Mus musculus*), cow (*Bos taurus*), zebra fish (*Danio rerio*) and chicken (*Gallus gallus*) were compared. In Table 2, the predicted secondary structure of miR-29a demonstrated that the pig miR-29a contained similar hairpin conformation with miR-29a from the other species. Furthermore, the analysis of mature miR-29a sequence indicated that the porcine mature miR-29a shared more than 95% sequence similarity with the other species (data not shown). Intriguingly, the seed region at the end of 5' UTR of porcine mature miR-29a contained conserved 7 nucleotide sequences of AGCACCA which is similar to the seed region of mature miR-29a from the other species (Fig 1a). In addition, comparison of the porcine miR-29a with IFN- γ mRNA indicated 7 bases complementary binding on IFN- γ mRNA with one mismatch (Fig 1b).

Expression of miR-29a in normal porcine cells and tissues: To determine expression level of miR-29a in normal porcine tissues, total RNA were extracted

a

<i>Sus scrofa</i>	3' - AUUGGCUAAAGUCU <u>ACCACGAUC</u> - 5'
<i>Homo sapiens</i>	3' - AUUGGCUAAAGUCU <u>ACCACGAU</u> - - 5'
<i>Rattus norvegicus</i>	3' - AUUGGCUAAAGUCU <u>ACCACGAU</u> - - 5'
<i>Mus musculus</i>	3' - AUUGGCUAAAGUCU <u>ACCACGAU</u> - - 5'
<i>Bos taurus</i>	3' - AUUGGCUAAAGUCU <u>ACCACGAUC</u> - 5'
<i>Danio rerio</i>	3' - AUUGGCUAAAGUUU <u>ACCACGAU</u> - - 5'
<i>Gallus gallus</i>	3' - - UUGGCUAAAGUUU <u>ACCACGAU</u> - - 5'

b

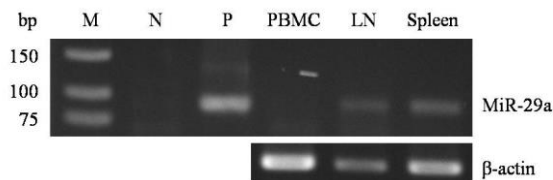
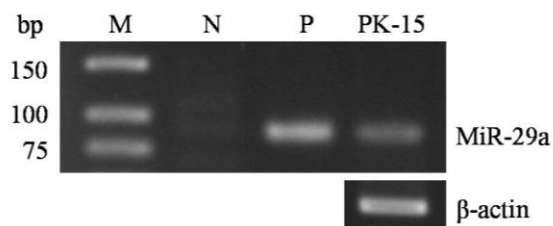
MiR-29a 3' - AUUGGCUAAAAGUCUACCA CGAUC - 5'

IFN- γ mRNA 5' - CAGAGGTTCCTAAATGGTAGCTCT - 3'

Figure 1 Comparison of mature miR-29a from pig and other species. Underlines indicated conserved seed region that binds complementary to target mRNA (Fig 1a). Partial alignment of the seed region of porcine miR-29a with mRNA sequence of IFN- γ (accession number NM_213948.1) (Fig 1b)

Table 2 Secondary structure of precursor miR-29a from various organisms

Species	Secondary structure of miR-29a					
<i>Sus scrofa</i>	UUAGAGG	UUU	C	UCAAU		
	CCCC	AUGACUGAUUUC	UGGUGUU	AGAG	\	
	GGGG	UAUUGGCUAAAG	<u>ACCACGA</u>	UCUU	A	
	UUAGUAA	UCU	-	UUAUU		
<i>Homo sapiens</i>	UUU	C	UCAAU			
	AUGACUGAUUUC	UGGUGUU	AGAG	\		
	UAUUGGCUAAAG	<u>ACCACGA</u>	UCUU	A		
	UCU	-	UUAUU			
<i>Rattus norvegicus</i>	A	UUAGAGG	UUU	C	UCAAU	
	CCCC	AUGACUGAUUUC	UGGUGUU	AGAG	\	
	GGGG	UAUUGGCUAAAG	<u>ACCACGA</u>	UCUU	A	
	A	UUAGUAA	UCU	-	UUAAG	
<i>Mus musculus</i>	A	UUAGAGG	UUU	C	UCAAU	
	CCCC	AUGACUGAUUUC	UGGUGUU	AGAG	\	
	GGGG	UAUUGGCUAAAG	<u>ACCACGA</u>	UCUU	A	
	A	UUAGUAA	UCU	-	UUAAG	
<i>Bos taurus</i>	UUU	C	UCAAU			
	AUGACUGAUUUC	UGGUGUU	AGAG	\		
	UAUUGGCUAAAG	<u>ACCACGA</u>	UCUU	A		
	UCU	-	UUAUU			
<i>Danio rerio</i>	U	CCCUCaucucucucucucuc	CCAAACG	CUU	U	GUCCCA
	GAAGA		UCCCCA	AUGACUGAUUUC	UGGUGCU	AGA
	CUUCU		AGGGGU	UAUUGGCUAAAG	<u>ACCACGA</u>	UCU
	A	UAACU	-----	CAGUAA-	UUU	-
						ACUGUC
<i>Gallus gallus</i>	A	UUUAGAGG	UUU	C	UCAAU	
	CCCC	AUGACUGAUUUC	UGGUGUU	AGAG	\	
	GGGG	UAUUGGCUAAAG	<u>ACCACGA</u>	UCUU	A	
	A	UUAGUGA	-	UUU	-	UUAUA

**Figure 2** Expression of miR-29a in normal porcine tissues including PBMCs, mesenteric lymph nodes and spleen. β -actin was used as internal control gene. M: 10 bp marker, N: no template control, P: positive control (pGEM-miR29a), PBMC: peripheral blood mononuclear cells, LN: mesenteric lymph nodes**Figure 3** RT-PCR analysis of miR-29a expression in PK-15 cell line. M: 10 bp marker, N: no template control and P: positive control (pGEM-miR29a)

from mesenteric lymph nodes, spleen and PBMCs. RT-PCR analysis revealed a single specific product of miR-29a at 86 bp. Interestingly, miR-29a was highly expressed in mesenteric lymph nodes and spleen, whereas the expression of miR-29a was low in PBMCs (Fig 2). In addition to the porcine tissues, we examined miR-29a expression in porcine kidney cell line (PK-15). As shown in Figure 3, miR-29a transcript could be detected in normal PK-15 cells. These findings indicated that miR-29a was expressed in both porcine immune and non-immune cells.

Expression of miR-29a in PRRSV-infected PBMCs: To determine the expression pattern of miR-29a during PRRSV infection, PBMCs were isolated from PRRSV-free pigs and plated in 96 well plate. The cells were then inoculated with LP-PRRSV at MOI 0.1 for 24 and 48 h. Expression of miR-29a was investigated by qRT-PCR method and normalized against GAPDH control gene. After PRRSV infection, we found that the expression of miR-29a increased 5.2 and 4.1 folds at 24 and 48 h, respectively, with higher expression at 24 h post infection (Fig 4). However, there was no statistical significant between control and PRRSV-infected groups ($p < 0.05$).

Expression of miR-29a in PRRSV-infected pigs: Based on the expression of miR-29a in PRRSV-

infected PBMCs *in vitro*, it is interesting to investigate level of miR-29a in PBMCs from PRRSV-infected animals ($p < 0.05$), we observed an increasing trend of miR-29a in both LP-PRRSV and HP-PRRSV infected pigs (Fig 5a). Specifically, the pigs infected with LP-PRRSV and HP-PRRSV has miR-29a transcript increase at 2.2 and 1.8 folds, respectively (Fig 5b).

Discussion

MicroRNAs are evolutionary conserved, non-coding RNAs that negatively regulates target gene expression at posttranscriptional process. To date, hundreds of microRNAs have been characterized in pigs during normal biological process and pathogen response (Xie et al., 2011; Podolska et al., 2012). In this study, we characterized porcine miR-29a and determined its expression level during normal condition and viral infection. Our results showed that porcine miR-29a shared high conserved sequence with miR-29a from other organisms (Xie et al., 2011; Chen et al., 2012). Furthermore, the sequence of porcine miR-29a seed region shared 100% sequence similarity to miR-29a seed region from human, mouse, rat, cow, chicken and fish. In human and mice, the seed region of miR-29a directly targeted 3'UTR of IFN- γ mRNA, leading to low IFN- γ production (Ma et al., 2011; Savan et al., 2011). Moreover, miR-29a regulated IFN- γ production in helper T cells through indirectly targeting two transcription factors Eomes and T-bet (Steiner et al., 2011).

Following the characterization of porcine miR-29a, the expression pattern of miR-29a was investigated in various porcine tissues (mesenteric lymph nodes, spleen and PBMCs) and PK-15 cell line. Our findings suggested that miRNA-29a expressed in all normal porcine tissues and cell lines with higher expression in spleen and lymph nodes than PBMCs. Similar to this finding, different expression patterns of miRNA in mice and human were reported in various tissues and correlated with function and disease pathogenesis (Lagos-Quintana et al., 2002; Liang et al., 2007).

One of the important viral diseases affecting pig production is PRRS (Neumann et al., 2005). To establish infection, PRRSV uses multiple strategies to suppress pig immune response including the delayed and weak IFN- γ production (Dotti et al., 2013). Based on the sequence similarity with other organisms and expression pattern of porcine miR-29a in stimulated PBMC (Nantakhruea et al., 2013), it is interesting to examine miR-29a transcripts in PBMC inoculated with PRRSV. At 24 and 48 h post infection, we found an upregulation of miR-29a in PRRSV-infected PBMC relative to uninfected control. Similar to *in vitro* observation, expression analysis of miR-29a showed higher miR-29a transcript in both LP and HP-PRRSV infected animals. Although both *in vitro* and *in vivo* data did not provide any statistical significance, we still observed similar trend of upregulation of miR-29a in both studies. In addition, our results revealed higher expression of miR-29a in pigs infected with LP-

animals. At 10 days post challenged, PBMCs were isolated from pigs. Although there is no PRRSV than pigs infected with HP-PRRSV. Therefore, it is intriguing to note that different patterns of

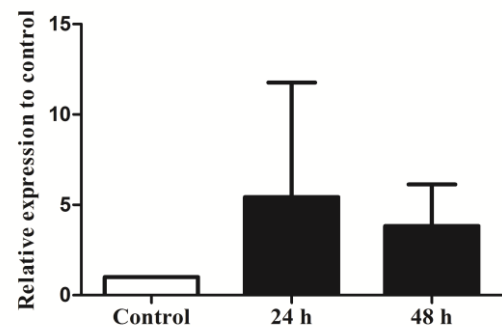


Figure 4 MiR-29a expression in PRRSV-infected PBMCs. PBMCs were incubated with PRRSV for 24 and 48 h. Expression of miR-29a was determined by qRT-PCR and normalized to GAPDH gene. The relative fold change of miR-29a in PRRSV-infected cells was shown as the relative to control

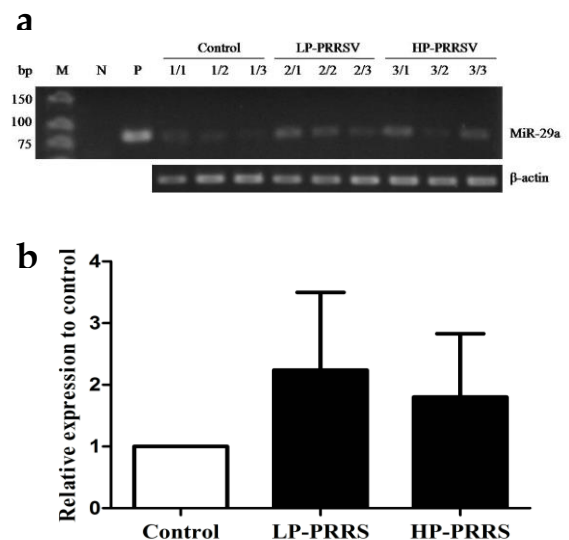


Figure 5 Expression of miR-29a in PBMCs isolated from PRRSV-infected pigs (Fig 5a). Relative fold change of miR-29a was normalized to β -actin gene (Fig 5b). LP-PRRS : low pathogenic PRRS virus infection, HP-PRRS : highly pathogenic PRRS virus infection, control : non-infected PBMC. The β -actin gene was used as an internal control. M : 10 bp marker, N : no template control, P : positive control (pGEM-miR29a)

miR-29a might lead to different immunological outcome between diverse strains of PRRSV infection (Han et al., 2013; Zhang et al., 2013). In conclusion, our results revealed that porcine miR-29a was highly conserved with miR-29a from other organisms and miR-29a transcripts were expressed in normal porcine cells and tissues. Moreover, expression analysis of miR-29a suggested that miR-29a increased in PRRSV-infected PBMCs both *in vitro* and *in vivo*. A more detailed analysis of target gene expression should be examined to better understand the role of miR-29 during PRRSV infection. These data provide valuable information on PRRS virus: host interaction and could be applied for PRRSV control in the future.

Acknowledgements

This project was partially funded by the Kasetsart University Research and Development Institute, the Thailand Research Fund (Grant no. MRG5580180), the National Research Council of Thailand, and Graduate Study Research Scholarship for International Publication, the Graduate School of Kasetsart University. The authors would like to thank Professor Roongroje Thanawongnuwech (Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University), Dr. Susichol Sitthinan and Betagro hybrid farm, Nakorn Prathom for providing pig tissues and blood samples.

References

- Bartel DP 2009. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*. 136(2): 215-233.
- Brain O, Owens Benjamin MJ, Pichulik T, Allan P, Khatamzas E, Leslie A, Steevens T, Sharma S, Mayer A, Catuneanu Ana M, Morton V, Sun MY, Jewell D, Coccia M, Harrison O, Maloy K, Schönefeldt S, Bornschein S, Liston A and Simmons A 2013. The intracellular sensor NOD2 induces microRNA-29 expression in human dendritic cells to limit IL-23 release. *Immunity*. 39(3): 521-536.
- Chen CZ, Schaffert S, Fragoso R and Loh C 2013. Regulation of immune responses and tolerance: the microRNA perspective. *Immunol Rev*. 253(1): 112-128.
- Chen C, Deng B, Qiao M, Zheng R, Chai J, Ding Y, Peng J and Jiang S 2012. Solexa sequencing identification of conserved and novel microRNAs in backfat of large white and Chinese Meishan pigs. *PLoS ONE*. 7(2): e31426.
- Díaz I, Darwich L, Pappaterra G, Pujols J and Mateu E 2005. Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*. 86(7): 1943-1951.
- Dotti S, Guadagnini G, Salvini F, Razzuoli E, Ferrari M, Alborali GL and Amadori M 2013. Time-course of antibody and cell-mediated immune responses to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus under field conditions. *Res Vet Sci*. 94(3): 510-517.
- Frossard JP, Hughes GJ, Westcott DG, Naidu B, Williamson S, Woodger NGA, Steinbach F and Drew TW 2013. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Genetic diversity of recent British isolates. *Vet Microbiol*. 162(2-4): 507-518.
- Han Z, Liu Y, Wang G, He Y, Hu S, Li Y, Shi W, Wu J, Wang S, Liu H and Cai X 2013. Comparative analysis of immune responses in pigs to high and low pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in China. *Transbound Emerg Dis*. 6(10): 12190.
- Krol J, Loedige I and Filipowicz W 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 11(9): 597-610.
- Labarque GG, Nauwynck HJ, Van Reeth K and Pensaert MB 2000. Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs. *J Gen Virol*. 81(5): 1327-1334.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W and Tuschl T 2002. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*. 12(9): 735-739.
- Liang Y, Ridzon D, Wong L and Chen C 2007. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*. 8(1): 166.
- Liston A, Papadopoulou A, Danso-Abeam D and Dooley J 2012. MicroRNA-29 in the adaptive immune system: setting the threshold. *Cell Mol Life Sci*. 69(21): 3533-3541.
- Livak KJ and Schmittgen TD 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*. 25(4): 402-408.
- Ma F, Xu S, Liu X, Zhang Q, Xu X, Liu M, Hua M, Li N, Yao H and Cao X 2011. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ . *Nat Immunol*. 12(9): 861-869.
- Nantakhruea S, Lekcharoensuk P and Surachetpong W 2013. Analysis of miRNA-29a expression in porcine peripheral blood mononuclear cells using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. *Thai J Vet Med*. 43(4): 595-600.
- Neumann E, Kliebenstein J, Johnson C, Mabry J, Bush E, Seitzinger A, Green A and Zimmerman J 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc*. 227(3): 385-392.
- Podolska A, Anthon C, Bak M, Tommerup N, Skovgaard K, Heegaard P, Gorodkin J, Cirera S and Fredholm M 2012. Profiling microRNAs in lung tissue from pigs infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *BMC Genomics*. 13(1): 459.
- Savan R, Legiewicz M, McFarland A, Schwerk J, Bindewald E, Orr S, Ramakrishnan K, Yalamanchili R, Kronfli A, McVicar D, Carrington M, Anderson S, Shapiro B, LeGrice S and Young H 2011. MicroRNA-29 stabilizes interferon-gamma mRNA by antagonizing AU-rich element-mediated decay. *J Immunol*. 186(57): 53.
- Steiner DF, Thomas MF, Hu JK, Yang Z, Babiarz JE, Allen CDC, Matloubian M, Blelloch R and Ansel KM 2011. MicroRNA-29 regulates T-Box transcription factors and interferon- γ production in helper T cells. *Immunity*. 35(2): 169-181.

- Sun N, Liu D, Chen H, Liu X, Meng F, Zhang X, Chen H, Xie S, Li X and Wu Z 2012^a. Localization, expression change in PRRSV infection and association analysis of the porcine TAP1 gene. *Int J Biol Sci.* 8(1): 10.
- Sun Y, Han M, Kim C, Calvert JG and Yoo D 2012^b. Interplay between interferon-mediated innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viruses.* 4(4): 424-446.
- Wills RW, Doster AR, Galeota JA, Sur JH and Osorio FA 2003. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Clin Microbiol.* 41(1): 58-62.
- Wongyanin P, Buranapraditkul S, Yoo D, Thanawongnuwech R, Roth JA and Suradhat S 2012. Role of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein in induction of interleukin-10 and regulatory T-lymphocytes (Treg). *J Gen Virol.* 93(Pt 6): 1236-1246.
- Xie SS, Li XY, Liu T, Cao JH, Zhong Q and Zhao SH 2011. Discovery of porcine microRNAs in multiple tissues by a Solexa deep sequencing approach. *PLoS ONE.* 6(1): e16235.
- Zhang H, Guo X, Nelson E, Christopher-Hennings J and Wang X 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus activates the transcription of interferon alpha/beta (IFN- α/β) in monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC). *Vet Microbiol.* 159(3-4): 494-498.
- Zhang L, Liu J, Bai J, Wang X, Li Y and Jiang P 2013. Comparative expression of Toll-like receptors and inflammatory cytokines in pigs infected with different virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Virol J.* 10(1): 135.
- Zuker M 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31(13): 3406-3415.

บทคัดย่อ

ลักษณะทางโมเลกุลและระดับการแสดงออกของ miR-29a ในเซลล์สุกร และเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส

วิน สุรเชษฐพงษ์ * สุนารี นันตะเครือ พรทิพภา เล็กเจริญสุข

ไมโครอาร์เอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่ควบคุมการแสดงออกของยีนผ่านการทำลายเอ็มอาร์เอ็นเอหรือยับยั้งการสร้างโปรตีน วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาลักษณะทางโมเลกุลและระดับการแสดงออกของ miR-29a ในเนื้อเยื่อสุกร การศึกษาพบว่าลำดับเบสของ miR-29a สุกรมีความเหมือนในระดับที่สูงกับ miR-29a ในสิ่งมีชีวิตอื่น นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์พบว่าลำดับเบสบริเวณ seed region ของ miR-29a สุกรสามารถจับได้บางส่วนกับอินเตอร์เฟอรอนแกมมาเอ็มอาร์เอ็นเอ การศึกษาด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์พบว่า miR-29a มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อ ต่อม้ำเหลือง มะม เม็ดเลือดขาว และเซลล์ PK-15 การแสดงออกของ miR-29a ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสมีปริมาณเพิ่มขึ้นที่ 24 และ 48 ชั่วโมง การแสดงออกยังเพิ่มขึ้นในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสทั้งสายพันธุ์ไม่รุนแรงและสายพันธุ์รุนแรง จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า miR-29a สุกรมีความคล้ายคลึงกับ miR-29a ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น และระดับการแสดงออกของ miR-29a มีปริมาณเพิ่มขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ติดเชื้อพาร์อาร์เอสในหลอดทดลองและในสุกรมีชีวิต การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับหน้าที่ของ miR-29a จะช่วยอธิบายปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสและโฮสต์ ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาวิธีป้องกันโรคพาร์อาร์เอสในอนาคต

คำสำคัญ: ภูมิคุ้มกัน miR-29a สุกร ไวรัสพาร์อาร์เอส

ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

* ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail: fvetwsp@ku.ac.th