



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

พบบาง Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus
(PRRSV) ต่อการสร้าง cytokines ใน peripheral blood
mononuclear cells (PBMC) ของสุกร

โดย

สันนิภา สุรทัตต์ และคณะ

สิงหาคม ๒๕๔๕



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

พบบาง Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ต่อการสร้าง cytokines ใน peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ของสุกร

โดย

สันนิภา สุรภักดิ์ และคณะ

รับที่.....	
เลขทะเบียน.....	๒๕-00015
เลขเรียกหนังสือ.....	๔๔
.....	๐๐๑๖

สำนักงาน สวอ
สำนักงานวิจัย (สวอ)
ชั้น 13 อาคาร เกษตรกรรม มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์ 17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน
เขตพญาไท กรุงเทพมหานคร 10400
โทร. 298-0455 โทรสาร 298-0476
Homepage: <http://www.trf.or.th>
E-mail: trfinfo@trf.or.th



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

พบบาง Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus
(PRRSV) ต่อการสร้าง cytokines ใน peripheral blood
mononuclear cells (PBMC) ของสุกร

คณะผู้วิจัย

สันนิภา สุภักดิ์ดี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ยง ภู่วรรณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดย
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

บทคัดย่อ	1
ABSTRACT	2
หน้าสรุปโครงการ (EXECUTIVE SUMMARY)	3
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	3
2. วัตถุประสงค์	4
3. ระเบียบวิธีวิจัย	4
4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในช่วงแต่ละ 6 เดือน	5
5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ	5
6. งบประมาณโครงการ (ตามระยะเวลาโครงการที่ได้เสนอรับทุน)	5
บทนำ	6
อุปกรณ์และวิธีการ	8
1. ไวรัส	8
2. สุกרתดลอง	8
3. การปั่นแยกและเพาะเลี้ยง PBMC	8
4. การสกัด RNA และ Reverse transcription	8
5. Multiplex PCR	9
6. การวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของ cytokine gene โดยวิธี densitometric analysis	9
7. การวิเคราะห์ลำดับเบสของ PCR product ที่ได้	9
ผลการวิจัย	11
1. การพัฒนาเทคนิค multiplex polymerase chain reaction (MPCR)	11
2. อิทธิพลของ PRRSV ต่อการแสดงออกของ cytokine gene ของ porcine PBMC	13
วิจารณ์	16
OUTPUT ที่ได้จากโครงการ	19
REFERENCES	20
ภาคผนวก	23

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการพัฒนาเทคนิค multiplex polymerase chain reaction (MPCR) เพื่อนำมาใช้ศึกษาบทบาทของเชื้อไวรัส porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) ต่อระดับการแสดงออกของ gene ที่สร้างไซโตไคน์ชนิดต่างๆ ได้แก่ interferon- γ (IFN- γ), Interleukin 2 (IL-2), IL-4 และ IL-10 ใน peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ของสุกร ผลจากการศึกษาผู้วิจัยสามารถพัฒนาเทคนิค MPCR ได้เป็นผลสำเร็จ และแสดงให้เห็นว่าเชื้อ PRRSV มีอิทธิพลต่อการเพิ่มการแสดงออกของ IL-10 gene จาก PBMC ของสุกรได้อย่างเด่นชัดเมื่อเทียบกับ cytokine gene ชนิดอื่นๆ นอกจากนี้เชื้อ PRRSV ยังมีผลรบกวนการตอบสนองต่อ recall antigen โดยเมื่อนำ PBMC ที่แยกได้จากสุกรที่เคยได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรมา culture ร่วมกับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (recall antigen) และ PRRSV จะพบว่าการแสดงออกของ IFN- γ gene ที่ต่ำลง และมีการแสดงออกของ IL-10 gene ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ PBMC จากสุกรตัวเดียวกันที่นำมา culture ร่วมกับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรเพียงอย่างเดียว จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าเชื้อ PRRSV มีผลน้อยมากต่อการแสดงออกของ IL-2 และ IL-4 gene ผลจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการกระตุ้นการสร้าง IL-10 อาจเป็นกลไกหนึ่งซึ่งเชื้อ PRRSV ใช้ในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรที่ติดเชื้อ

ABSTRACT

The objective of this work is to establish the multiplex polymerase chain reaction (MPCR) assay, which allowed a semi-quantitative analysis of porcine cytokine, IFN- γ , IL-2, IL-4, and IL-10 gene expressions simultaneously from porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Once established, the assay was used to study the role of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) on porcine cytokine gene expression. In the presence of PRRSV, the IL-10 gene expression in porcine PBMC was prominently upregulated. In a separate experiment, in which PBMC from pigs previously vaccinated with the classical swine fever virus (CSFV) vaccine were used in the study, *in vitro* stimulation with CSFV enhanced the IFN- γ gene expression in the primed PBMC. However, significant reduction of IFN- γ and upregulation of IL-10 gene expression were observed when PRRSV were co-cultured with CSFV. This finding indicated that the presence of PRRSV enhanced the IL-10 gene expression in porcine PBMC, and could significantly interfere with the recall antigen response. In both experiments, the changes in IL-2 and IL-4 gene expression were minimal. Our results implied that enhanced IL-10 production might be one of the strategies used by PRRSV to regulate the host immune system.

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรค Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) เป็นโรคระบาดที่ก่อความสูญเสียแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทยในช่วง 10 กว่าปีที่ผ่านมา จนกระทั่งเมื่อปี พ.ศ. 2534 ได้มีรายงานการแยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคเป็นผลสำเร็จครั้งแรก โดยกลุ่มนักวิจัยในประเทศเนเธอร์แลนด์ (Wensvoort et al., 1991) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการแยกเชื้อครั้งแรกในปี พ.ศ. 2539 (Damrongwatanapokin et al., 1996) สาเหตุของ PRRS เกิดจากเชื้อไวรัสชื่อ Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Arterivirus แฟมิลี Arteriviridae เนื่องจากเป็นเชื้อที่เพิ่งค้นพบใหม่ การศึกษาเกี่ยวกับ PRRSV จึงมักเป็นการศึกษาข้อมูลในด้านระบาดวิทยาและไวรัสวิทยาเป็นส่วนใหญ่ ส่วนข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคและความสัมพันธ์ของเชื้อ PRRSV กับการทำงานของระบบภูมิคุ้มโรคของสุกร (viral-host relationship) มีอยู่จำกัดและยังไม่เป็นที่เข้าใจกันดีนัก จากรายงานการศึกษาที่มีอยู่พบว่า PRRSV จะสามารถติดเชื้อและเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์กลุ่ม monocyte และ macrophage (Duan et al., 1997) ภายหลังจากการติดเชื้อ PRRSV สามารถคงอยู่ในตัวสัตว์ได้เป็นระยะเวลานานแม้ว่าสัตว์จะไม่แสดงอาการของโรคแล้ว (persistent infection) และมีการตั้งข้อสังเกตว่า PRRSV อาจมีผลในการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรที่ติดเชื้อได้ โดยการมีอิทธิพลต่อการทำงานของ cytokine network ของสุกร (Lager and Mengeling, 2000) แต่อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานโดยตรงถึงอิทธิพลของ PRRSV ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันผ่านทาง cytokine network แต่อย่างใด

สาเหตุที่การศึกษาด้านวิทยาการภูมิคุ้มโรคในสุกรที่เกี่ยวข้องกับ PRRSV ยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก แม้แต่ในต่างประเทศ อาจเนื่องมาจาก 1) ความยุ่งยากในการเลี้ยงเชื้อ PRRSV ในห้องปฏิบัติการและ 2) ความจำกัดของ reagent และ monoclonal antibody สำหรับที่จะใช้ในการศึกษา อย่างไรก็ตามในช่วงปีที่ผ่านมาได้มีการจัดตั้งห้องปฏิบัติการที่สามารถแยกและเพาะเลี้ยง PRRSV สายพันธุ์ที่แยกได้จากภายในประเทศ ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นผลสำเร็จ (รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช, ข้อมูลส่วนตัว) และเป็นที่มาของการวางแผนงานวิจัยเพื่อพัฒนาองค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับ PRRSV ในครั้งนี้

ในปัจจุบันความเข้าใจด้านวิทยาการภูมิคุ้มกันระดับเซลล์และ cytokine ได้เข้ามามีบทบาทเป็นอย่างมากในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อโรคกับตัวสัตว์ เนื่องจากการทำงานของระบบ ภูมิคุ้มโรคมีพื้นฐานมาจากการทำงานร่วมกันของเซลล์ชนิดต่าง ๆ โดยอาศัยการสร้าง protein mediator ที่เรียกโดยรวมว่า cytokine เป็นตัวเชื่อมการสื่อสารระหว่างเซลล์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีบทบาทโดยตรงต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มโรค cytokine จะถูกสร้างขึ้นเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นเท่านั้น และ cytokine แต่ละชนิดก็จะมีฤทธิ์ในการกระตุ้นหรือกดการทำงานของเซลล์ต่างชนิดกันไป cytokine ที่สร้างจาก antigen-specific T lymphocyte จัดเป็น cytokine กลุ่มที่สำคัญที่สุดกลุ่มหนึ่งในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มโรคโดยรวม ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงระดับและแบบแผน (pattern) ของการสร้าง cytokine ในกลุ่มนี้เพื่อนำมาใช้ในการอธิบายถึงพยาธิกำเนิดของโรคต่าง ๆ อย่างแพร่หลายในคนและสัตว์ทดลอง สำหรับการตรวจวัดปริมาณของ cytokine ที่สร้างจาก antigen-specific T-lymphocyte ในสุกรก็เริ่มมีการรายงานบ้างในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา (Zuckermann et al., 1999; Suradhat and Damrongwatanapokin, 2000) แต่อย่างไรก็ตามก็ไม่สามารถศึกษาถึงระดับ cytokine ได้ทีละหลายชนิด เนื่องจากขาด monoclonal antibody ซึ่งมีราคาแพงและมีอยู่อย่างจำกัด นอกจากการตรวจวัดปริมาณโปรตีนแล้ว ในปัจจุบันมีการใช้ความรู้ทางอณูชีววิทยาเข้ามาประยุกต์ใช้โดยการนำเทคนิค RT-PCR เข้ามาใช้ตรวจวัดระดับ mRNA ของ cytokine ของ gene ช่วยให้ผู้วิจัยสามารถศึกษาถึง cytokine profile ที่สร้างขึ้นได้ (Dozois et al., 1997) โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาอิทธิพลของเชื้อ PRRSV ต่อการทำงานของเซลล์ในระบบ

ภูมิคุ้มกันโดยอาศัยการตรวจวัดการสร้าง cytokine ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี multiplex RT-PCR คณะผู้วิจัยเชื่อว่าข้อมูลเบื้องต้นจากงานวิจัยนี้จะเป็นพื้นฐานสำคัญต่อการทำความเข้าใจในด้านพยาธิกำเนิดของโรค PRRS และเป็นพื้นฐานไปสู่งานวิจัยในแนวทางที่เกี่ยวข้องกับวิทยาการภูมิคุ้มกันต่อโรค PRRS ในลำดับต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิค multiplex RT-PCR ไปประยุกต์ใช้กับโรคอื่น ๆ ในสุกรที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงสุกรในประเทศไทยอีกด้วย

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาอิทธิพลของเชื้อ PRRSV ต่อการสร้าง cytokine ชนิดต่าง ๆ ของ peripheral blood mononuclear cell (PBMC) ที่แยกได้จากสุกร โดยวิธี multiplex RT-PCR

3. ระเบียบวิธีวิจัย

- 1) คัดเลือกเชื้อ PRRSV สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย และทำการเพิ่มจำนวน เพื่อใช้สำหรับการกระตุ้นเซลล์ PBMC (ณ ห้องปฏิบัติการของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
- 2) คัดเลือก primer ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของ cytokine genes ได้แก่ IL-2, IFN-gamma, IL-4 และ IL-10 ของสุกร (โดยทั่วไป cytokine เหล่านี้จะถูกสร้างโดยเซลล์กลุ่ม T lymphocyte) เนื่องจากผู้วิจัยต้องการใช้เทคนิค multiplex PCR เพื่อให้สามารถวิเคราะห์เปรียบเทียบการ express ของ cytokine genes ทั้ง 4 ชนิดภายใต้ condition เดียวกัน ซึ่งจำเป็นต้องใช้ชุด primer ที่มีการ optimize ให้สามารถใช้ร่วมกันในสภาวะเดียวกัน และมี positive control ที่เหมาะสม ในการทดลองเบื้องต้นนี้ ผู้วิจัยจะเลือกใช้ commercial multiplex RT-PCR set ที่ได้มีการ optimize primer set ไว้แล้วโดยบริษัทผู้ผลิต
- 3) คัดเลือกสุกรที่ปลอดจากเชื้อ PRRSV (seronegative) และเก็บตัวอย่างเลือด (heparinized whole blood) เพื่อนำมาปั่นแยก PBMC ด้วยวิธี density gradient centrifugation
- 4) นำ PBMC ที่ได้มา culture ร่วมกับ PRRSV (*in vitro* stimulation) ในระยะเวลาที่เหมาะสมแล้วนำเซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาตรวจหา cytokine gene expression โดยวิธี multiplex RT-PCR (โดยใช้ห้องปฏิบัติการวิจัยไวรัสตับอักเสบ ร่วมกับห้องปฏิบัติการที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) โดยสามารถแยกเป็นขั้นตอนได้ดังนี้
 - *In vitro* culture and RNA extraction: ทำการ culture PBMC ร่วมกับ PRRSV ที่เวลาและขนาด (multiplicity of infection) ต่าง ๆ กัน จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปสกัดแยก mRNA
 - Production of cDNA: นำ RNA ที่ได้มาเปลี่ยนให้เป็น cDNA โดย reverse transcriptase
 - PCR amplification: ทำการเพิ่มจำนวนของ cytokine gene จาก cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยาข้างต้น โดยวิธี multiplex PCR เพื่อเพิ่มจำนวนของ cytokine gene ได้แก่ IL-2, IFN-gamma, IL-4 และ IL-10 ;
 - ตรวจสอบ PCR product โดย agarose gel electrophoresis และเนื่องจาก amplification efficiency ของ primer ทุกคู่มีค่าเท่ากัน ดังนั้นความเข้มของ band ของแต่ละ amplicon จึงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณความเข้มข้นของ cDNA ในตัวอย่าง ซึ่งสามารถนำมาใช้ประเมินความแตกต่างของระดับการสร้าง mRNA ของแต่ละยีนได้
- 5) วิเคราะห์ข้อมูล สรุปและรายงานผลการทดลอง รวมระยะเวลาทั้งสิ้นประมาณ 1 ปี

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในช่วงแต่ละ 6 เดือน

กิจกรรมการดำเนินงาน	เดือนที่											
	1					6						12
1) คัดเลือก primer และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธี multiplex PCR และเตรียมพร้อมในห้องปฏิบัติการ	←		→									
2) เตรียม PRRSV สำหรับนำมาใช้ในการกระตุ้น PBMC			←		→							
3) พัฒนาและปรับปรุง multiplex PCR				←		→						
4) ส่งรายงานความก้าวหน้า						★						
5) ศึกษาผลของ PRRSV ต่อการสร้าง cytokine และ PBMC						←					→	
6) สรุป วิเคราะห์และรายงานผล										←		★

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: An *in vitro* effect of PRRSV on the level of cytokine production by porcine PBMC

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Veterinary Immunology and Immunopathology หรือ Viral immunology

6. งบประมาณโครงการ (ตามระยะเวลาโครงการที่ได้เสนอรับทุน)

1) ค่าตอบแทน (10,000 บาทต่อเดือน)	120,000 บาท
2) ค่าวัสดุ (72,000 บาท)	
- วัสดุและสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับ multiplex RT-PCR และ gel electrophoresis	65,000 บาท
- วัสดุและสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับ PBMC isolation และ tissue culture อื่น ๆ	7,000 บาท
3) ค่าใช้สอย (3,000 บาท)	
- ค่าถ่ายเอกสารและจัดทำรายงาน	2,000 บาท
- ค่าพาหนะและน้ำมัน เพื่อเก็บตัวอย่าง	1,000 บาท
4) ค่าสุกรทดลอง 5,000 บาท	
รวม	<u>200,000 บาท</u>

บทนำ

โรค Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) เป็นโรคระบาดที่ก่อความสูญเสียแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทยในช่วง 10 กว่าปีที่ผ่านมา โดยมีรายงานการแยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคเป็นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2534 โดยกลุ่มนักวิจัยในประเทศเนเธอร์แลนด์ (Wensvoort et al., 1991) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการแยกเชื้อครั้งแรกในปี พ.ศ. 2539 (Damrongwatanapokin et al., 1996) สาเหตุของ PRRS เกิดจากเชื้อไวรัสชื่อ Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Arterivirus แฟมิลี Arteriviridae

PRRSV ติดเข้าสู่สุกรโดยการหายใจผ่านเข้าทาง nasal epithelial cells จากนั้นเข้าสู่ต่อมทอนซิล และปอด แล้วกระจายไปทั่วร่างกาย แม้ว่า PRRSV จะเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการ infect สุกรที่มีประสิทธิภาพสูงมาก กล่าวคือต้องการเชื้อปริมาณน้อยมากในการที่จะทำให้สัตว์เป็นโรค แต่จากการศึกษาที่มีอยู่พบว่า PRRSV จะสามารถเพิ่มจำนวนได้เฉพาะในเซลล์กลุ่ม monocyte และ macrophage (Duan et al., 1997) แต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์กลุ่ม lymphocytes ได้ (Molitor et al., 1997) เชื้อ PRRSV ก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ทั่วร่างกาย อาทิเช่น pneumonia, myocarditis, encephalitis, vasculitis (Rossow et al., 1995) พยาธิสภาพสำคัญที่เกิดอย่างหนึ่งหลังการติดเชื้อ PRRSV คือ พยาธิสภาพของต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกาย (generalized lymphadenopathy) โดยจะพบ follicular hypertrophy และ hyperplasia ตั้งแต่วันที่ 10-14 หลังการติดเชื้อและจะปรากฏอาการอยู่ต่อไปนานหลายสัปดาห์ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าความรุนแรงของพยาธิสภาพนั้นมักไม่สอดคล้องกับปริมาณ viral antigen ที่ตรวจพบในบริเวณนั้น (reviewed in Lager and Mengeling, 2000) โดยทั่วไปอาการของ PRRS จะเริ่มปรากฏขึ้นในช่วง 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ และอาการจะค่อย ๆ หายไปภายในเวลา 1 เดือน จากนั้นเชื้อ PRRSV จะยังคงสามารถอยู่ในตัวสัตว์ที่หายป่วยแล้วได้เป็นเวลานานถึง 4 เดือน (persistent infection) โดยพบว่าสัตว์ที่มีการติดเชื้อจะสามารถปล่อยเชื้อออกสู่ภายนอกและแพร่กระจายไปสู่สัตว์ตัวอื่นในระยะนี้ได้ (Meng, 2000) การติดเชื้อ PRRSV ถือเป็นสาเหตุหลักสาเหตุหนึ่ง ซึ่งนำไปสู่การติดเชื้อแทรกซ้อนภายในปอด นำไปสู่ปัญหา porcine respiratory disease complex (PRDC) ซึ่งเป็นปัญหาสุขภาพที่ก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก (Halbur, 1998) และถือเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญในลำดับต้นๆ ของการเลี้ยงสุกรในประเทศไทย

PRRSV เป็นเชื้อที่เชื่อว่ามีวิวัฒนาการขึ้นมาในช่วงระยะเวลาไม่กี่สิบปีที่ผ่านมา และที่มีความหลากหลายในระหว่างสายพันธุ์สูงมาก PRRSV มักก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรัง ซึ่งนำไปสู่การติดเชื้ออื่นแทรกซ้อนในระยะหลัง จนบางครั้งมีผู้เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันกันของลักษณะของเชื้อและการเกิดโรคกับ human immunodeficiency virus ในมนุษย์ (Wardley et al., 1996) จากข้อมูลการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มต่อ PRRSV มีการยืนยันว่าสัตว์ที่ติดเชื้อสามารถสร้างภูมิคุ้มกันชนิดพิษเซลล์ได้หลากหลายรูปแบบ เช่น lymphoproliferation cytotoxic activity หากแต่เป็นที่น่าสังเกตว่าจะสามารถตรวจพบภูมิคุ้มกันเหล่านี้ภายหลังสัตว์ได้รับเชื้อไปแล้วอย่างน้อย 4 สัปดาห์ (Bautista and Molitor, 1997; Lopez Fuertes et al., 1999) ซึ่งโดยทฤษฎีแล้วการทำงานของภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อเชื้อ จะเกิดขึ้นในภายในระยะเวลาอันสั้น และมักจะสามารถตรวจวัดได้ตั้งแต่ 1 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ (Janeway et al., 1999) นอกจากนี้เมื่อศึกษาการสร้างแอนติบอดีต่อ PRRSV ในสัตว์ที่ได้รับเชื้อ พบว่าแม้ว่าสัตว์จะมีการสร้างแอนติบอดีภายในสัปดาห์แรกแต่จะสามารถตรวจวัด neutralizing antibody ได้ก็ต่อเมื่อ 4 สัปดาห์หลังได้รับเชื้อไปแล้ว (Yoon et al., 1995) ซึ่งสอดคล้องกับเวลาที่สามารถตรวจพบการทำงานของเซลล์ นอกจากนี้มีการตั้งข้อสังเกตว่า การสร้างแอนติบอดีในระยะแรกน่าจะเป็นประโยชน์ต่อเชื้อ PRRSV มากกว่า โดยการใช้ immune complex พาไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมายทาง Fc receptor โดยเรียกกระบวนการดังกล่าวว่า Antibody-dependent enhancement (Yoon et al., 1996)

จากการประมวลข้อมูลเบื้องต้นทั้งในแง่กลุ่มเซลล์เป้าหมายของ PRRSV ซึ่งจัดเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อและยังมีความสำคัญในการกระตุ้นการทำงานของ specific immunity ในแง่การเป็น antigen presenting cell พยาธิสภาพของต่อมน้ำเหลืองที่พบทั่วร่างกาย ความล่าช้าของการสร้างภูมิคุ้มโรคในตัวสุกรที่ติดเชื้อ ความสามารถของเชื้อ PRRSV ที่คงอยู่ในร่างกายสัตว์ได้เป็นเวลานาน และจากรายงานที่มักพบการติดเชื้ออื่นๆแทรกซ้อนภายหลังการได้รับเชื้อ PRRSV อยู่เสมอ ทำให้อาจเชื่อได้ว่า PRRSV น่าจะมีบทบาทและความสัมพันธ์ (interaction) ใกล้ชิดกับในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระดับเซลล์ เพื่อประโยชน์ต่อการอยู่รอดของเชื้อในตัวสัตว์ ซึ่งสอดคล้องกับการตั้งข้อสังเกตว่า PRRSV อาจมีผลในการกีดขวางการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรที่ติดเชื้อได้ โดยการมีอิทธิพลต่อการทำงานของ cytokine network ของสุกร (Lager and Mengeling, 2000)

ในปัจจุบันความเข้าใจด้านวิทยาการภูมิคุ้มกันระดับเซลล์และ cytokine ได้เข้ามามีบทบาทเป็นอย่างมากในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อโรคกับตัวสัตว์ เนื่องจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมีพื้นฐานมาจากการทำงานร่วมกันของเซลล์ชนิดต่างๆ โดยอาศัยการสร้าง protein mediator ที่เรียกโดยรวมว่า cytokine เป็นตัวเชื่อมการสื่อสารระหว่างเซลล์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีบทบาทโดยตรงต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยทั่วไป cytokine จะถูกสร้างขึ้นเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นเท่านั้น และ cytokine แต่ละชนิดก็จะมีฤทธิ์ในการกระตุ้นหรือกีดขวางการทำงานของเซลล์ต่างชนิดกันไป cytokine ที่สร้างจาก antigen-specific T lymphocyte จัดเป็น cytokine กลุ่มที่สำคัญที่สุดกลุ่มหนึ่งในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มโรคโดยรวม ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงระดับและแบบแผน (pattern) ของการสร้าง cytokine ในกลุ่มนี้เพื่อนำมาใช้ในการอธิบายถึงพยาธิกำเนิดของโรคต่าง ๆ อย่างแพร่หลายในคนและสัตว์ทดลอง สำหรับการตรวจวัดปริมาณของ cytokine ที่สร้างจาก antigen-specific T-lymphocyte ในสุกรก็เริ่มมีการรายงานบ้างในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา (Zuckermann et al., 1999; Suradhat and Damrongwatanapokin, 2000) แต่อย่างไรก็ตามก็ไม่สามารถศึกษาถึงระดับ cytokine ได้ทีละหลายชนิด เนื่องจากขาด monoclonal antibody ซึ่งมีราคาแพงและมีอยู่อย่างจำกัด นอกจากการตรวจวัดปริมาณโปรตีนแล้ว ในปัจจุบันมีการใช้ความรู้ทางอณูชีววิทยาเข้ามาประยุกต์ใช้โดยการนำเทคนิค RT-PCR เข้ามาใช้ตรวจวัดระดับ mRNA ของ cytokine ของ gene ช่วยให้ผู้วิจัยสามารถศึกษาถึง cytokine profile ที่สร้างขึ้นได้ (Dozois et al., 1997) โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาอิทธิพลของเชื้อ PRRSV ต่อการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันโดยอาศัยการตรวจวัดการสร้าง cytokine ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี multiplex RT-PCR คณะผู้วิจัยเชื่อว่าข้อมูลเบื้องต้นจากงานวิจัยนี้จะเป็นพื้นฐานสำคัญต่อการทำความเข้าใจในด้านพยาธิกำเนิดของโรค PRRS และเป็นพื้นฐานไปสู่งานวิจัยในแนวทางที่เกี่ยวข้งกับวิทยาการภูมิคุ้มกันต่อโรค PRRS ในลำดับต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิค multiplex RT-PCR ไปประยุกต์ใช้กับโรคอื่น ๆ ในสุกรที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยอีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ไวรัส

เชื้อไวรัส PRRSV (wild-type US strain) และเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (ALD strain) ได้รับอนุญาตจากการจาก สพ.ญ.ดร.สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโกสิน (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์)

2. สุกรทดลอง

การทดลองที่ 1 เก็บตัวอย่างเลือดจากสุกรจากฟาร์มที่ไม่มีประวัติของการได้รับเชื้อ PRRSV อายุ 5 สัปดาห์ จำนวน 3 ตัว สุกรดังกล่าวยังไม่เคยได้รับวัคซีนใดๆ ในวันที่เก็บตัวอย่างเลือด

การทดลองที่ 2 เก็บตัวอย่างเลือดจากสุกรอายุ 16 สัปดาห์ จำนวน 4 ตัว จากศูนย์ฝึก คณะสัตวแพทย-ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม ซึ่งไม่มีประวัติของการได้รับเชื้อ PRRSV ในฝูงมาก่อน สุกรดังกล่าวเคยได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรมาแล้วเมื่ออายุ 5 และ 7 สัปดาห์

3. การปั่นแยกและเพาะเลี้ยง PBMC

การปั่นแยก PBMC จากตัวอย่าง heparinized blood ใช้หลักการ gradient centrifugation ตามวิธีและขั้นตอนที่เคยรายงานไว้ก่อนแล้ว (Suradhat et al., 2001) ในชั้นสุดท้ายเตรียมเซลล์ที่มีความเข้มข้น 1×10^6 cells/ml เพื่อทำการ *in vitro* stimulation ร่วมกับไวรัส หรือ Con A ภายใน 24-well-tissue cultured plate ที่ 37°C ภายใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 24 หรือ 48 ชั่วโมง สำหรับปริมาณของ antigen ที่ใช้สำหรับ *in vitro* stimulation ได้แก่ ConA ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ เชื้อ PRRSV ที่ 0.01 multiplicity of infection (m.o.i.) และเชื้อ CSFV ที่ 1 m.o.i. ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นพิเศษในรูปประกอบ ภายหลัง incubating period ทำการ harvest เซลล์โดยการปั่นให้ตกตะกอน ที่ 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้าง cell pellet 1 ครั้งด้วย phosphate-buffered saline แบ่งตัวอย่าง เป็น 3 microcentrifuge tube ปั่นแยกและเก็บ cell pellet โดยเติมสาร RNAlater (Ambion, Austin, TX) จำนวน 200 μl /หลอด เก็บ pellet ไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้ต่อไป

4. การสกัด RNA และ reverse transcription

นำตัวอย่างเซลล์มาสกัดแยก total RNA โดยใช้ Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel, Easton, PA) ตามคู่มือของผู้ผลิต ปริมาณ PBMC ตั้งต้นต่อการสกัดแต่ละครั้งจะมีประมาณ 2×10^6 เซลล์ โดยระหว่างขั้นตอนการสกัด จะมีการกำจัด DNA ที่ปนมากับตัวอย่างโดย Dnase I enzyme อยู่ด้วย ในขั้นตอนสุดท้าย elute RNA ที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างด้วย 60 μl Rnase-free water เก็บตัวอย่าง total RNA ที่ -80°C จนกว่าจะนำมาสังเคราะห์ cDNA ต่อไป

นำตัวอย่าง total RNA ที่ได้จำนวน 10 μl มาทำการสังเคราะห์ cDNA โดยขบวนการ reverse transcription (RT) โดยใช้ Omniscript RT kit (Qiagen, Hilden, Germany) ซึ่งมีส่วนประกอบของ reverse transcriptase enzyme reaction buffer และ dNTPs ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ร่วมกับ random hexamer primer (Promega, Madison, WI) จำนวน 0.5 μg และ ribonuclease inhibitor (RNaseOUT, Invitrogen, Carlsbad, CA) จำนวน 40 U ในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรรวม 20 μl นำตัวอย่างไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที ตามด้วยการหยุดปฏิกิริยาของ reverse transcriptase enzyme ที่ 93°C เป็นเวลา 5 นาที

5. Multiplex PCR

Primer ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยา MPCR แสดงไว้ในตารางที่ 1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา MPCR ที่มีปริมาตรรวม 50 μ l ได้แก่ cDNA template 2 μ l primer mix 10 μ l dNTPs (Biobasic, Ont., Canada) ในความเข้มข้น 10mM Taq DNA polymerase 2.5 U (HotstarTaq DNA polymerase, Qiagen) 1.5x PCR buffer (Qiagen) การเพิ่มความเข้มข้นของ buffer ในปฏิกิริยา มีจุดประสงค์เพื่อปรับปริมาณของ $MgCl_2$ ให้เหมาะสมตามที่ได้มีการ optimize ไว้ก่อนหน้านี้ โดยใน 1.5x buffer มี $MgCl_2$ เป็นส่วนประกอบเท่ากับ 2.25 mM สำหรับความเข้มข้น (final concentration) ของ primer ได้แก่ 0.05 μ M สำหรับ GAPDH primer 0.2 μ M สำหรับ IL-10 primer และ 0.6 μ M สำหรับ IL-2 และ IL-4 primer กำหนดอุณหภูมิและขั้นตอนของปฏิกิริยา MPCR ดังนี้

- | | | |
|--------------------|-----------|--------|
| 1) Hotstart | 95°C | 15 min |
| 2) Denaturation | 94°C | 30 sec |
| 3) Annealing | 55°C | 45 sec |
| 4) Extension | 72°C | 45 sec |
| 5) Repeat 2-4 | 33 cycles | |
| 6) Final extension | 72°C | 5 min |
| 7) Cooling | 4°C | |

สำหรับจำนวนรอบของ PCR reaction ได้มีการ optimize มาก่อนล่วงหน้าเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มี amplicon ใดๆ ที่เข้าสู่ plateau phase ในระหว่างการปฏิกิริยา MPCR

ภายหลังปฏิกิริยา นำ PCR product ปริมาณ 10 μ l มาตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2.5% Agarose gel ใน TBE buffer (GIBCO/BRL) ที่มีส่วนผสมของ ethidium bromide (Research Organics, Cleveland, OH) 0.5 μ g/ml โดยทุกครั้งจะ run DNA molecular weight marker (100 bp ladder, GIBCO/BRL) ร่วมด้วยเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของขนาดของ product ตรวจสอบผลด้วยแสง ultraviolet และทำการบันทึกภาพด้วย Photo Documentation System (Vilber Lourmat, France)

6. การวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของ cytokine gene โดยวิธี densitometric analysis

นำภาพ (digital image) ของ gel ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณของ product โดยใช้ Scion Image software (Scion Corporation, USA) ซึ่งใช้หลักการของ densitometry ในการคำนวณปริมาณของ PCR product โดยแสดงผลเป็นปริมาณ pixel ที่อ่านได้ของแต่ละ peak (product) จากนั้นนำค่า pixel value ที่อ่านได้ของ cytokine transcript มาทำการ normalize กับปริมาณของ Housekeeping gene transcript (GAPDH) จากตัวอย่างเดียวกัน เพื่อตัดปัญหาความไม่สม่ำเสมอของปริมาณ template ตั้งต้นในแต่ละปฏิกิริยา โดยใช้สูตร

$$\% \text{ expression level} = (\text{sample pixel value} / \text{GAPDH pixel value}) \times 100$$

7. การวิเคราะห์ลำดับเบสของ PCR product ที่ได้

PCR product ที่ได้จาก MPCR จะถูกนำมาวิเคราะห์ความถูกต้องของลำดับเบส โดยวิธี sequencing โดยตัด product จาก agarose gel แล้ว purify โดยใช้ Nucleospin[®] Extract kit (Mancherey-Nagel) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต จากนั้นนำ product ที่ได้มาใช้เป็น template สำหรับปฏิกิริยา sequencing (DNA sequencing kit, Big dye terminator cycle sequencing, ABI Prism PE Applied Biosystems, USA) และอ่านวิเคราะห์ลำดับเบสด้วย ABI prism 310 genetic analyser จากนั้นทำการวิเคราะห์ sequence identity โดยใช้ NCBI Blast software

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของ primer ข้อมูลอ้างอิง และขนาดของ PCR product ที่ได้จาก primer แต่ละคู่ที่ใช้ในการศึกษา

Gene specificity	Oligonucleotide sequences (5'-3')	GenBank Acc. No.	Product (bp)
GAPDH	F-TTCCACGGCACAGTCAA R-GCAGGTCAGGTCCACAA	AF017079	576
IFN- γ	F-CTCTCCGAAACAATGAGTTATACAA R-GCTCTCTGGCCTTGGA	X53085	503
IL-10	F- AGCCAGCATTAAAGTCTGAGAA R-CCTCTCTTGGAGCTTGCTAA	L20001	394
IL-2	F-TCTTGTTGTTGCATTGCACTAA R-TCAGAGTTTTTGCTTTGACCTAA	X56750	280
IL-4	F- GGACACAAGTGCGACATCA R- GCACGTGTGGTGTCTGTA	X68330	186

F = forward, R=reverse

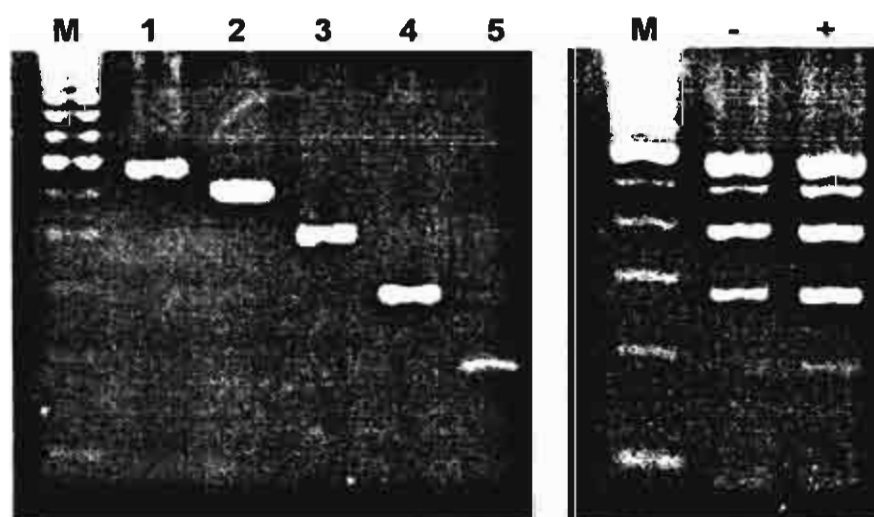
ผลการวิจัย

1. การพัฒนาเทคนิค multiplex polymerase chain reaction (MPCR)

ตามข้อเสนอโครงการที่ได้เสนอในระเบียบวิธีวิจัยเดิมไว้ว่า "...เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยต้องการใช้เทคนิค multiplex PCR เพื่อให้สามารถวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออก ของ cytokine genes ทั้ง 4 ชนิด รวมทั้ง reference gene (GAPDH) ภายใต้ condition เดียวกัน ซึ่งจำเป็นต้องใช้ชุด primer ที่มีการออกแบบให้สามารถใช้ร่วมกันในสภาวะเดียวกัน และมี positive control ที่เหมาะสม..." ในการทดลองเบื้องต้นนี้ผู้วิจัยจะเลือกใช้ commercial multiplex RT-PCR set (Cytoexpress™ Multiplex PCR Swine Th1/Th2 switch cytokine) ของบริษัท Biosource (Camarillo, CA) ที่ได้มีการ optimize primer set ไว้แล้วโดยบริษัทผู้ผลิต และผู้วิจัยได้เสนอผลการวิจัยไปบ้างแล้วในช่วงรายงานความก้าวหน้า 6 เดือน โดยพบว่าชุด primer set นี้มีปัญหาในแง่ที่ว่าไม่สามารถทำการ amplify housekeeping gene (GAPDH) จากตัวอย่างจริงได้ แม้จะได้มีการปรับ condition ให้สามารถเพิ่มจำนวนของ product ทั้ง 5 ชนิดจาก positive control ที่ให้มาพร้อมกับชุด primer ได้ ต่อมาภายหลังเมื่อผู้วิจัยไม่สามารถแก้ปัญหาได้และได้ติดต่อสอบถามกลับไปยังส่วน technical service ของบริษัท Biosource ได้มีการตอบกลับมาโดยทางบริษัทยอมรับว่าชุดผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีปัญหาจริง และได้มีการร้องเรียนปัญหาเช่นเดียวกันนี้จากผู้ซื้อหลายๆราย และในขณะที่ตอบจดหมายนั้นทางบริษัทยังไม่ทราบสาเหตุและวิธีการแก้ไข ดังนั้นจึงเป็นอันสรุปว่าไม่สามารถใช้ primer set ดังกล่าวในการศึกษาครั้งนี้ได้

แม้ว่าจะมีรายงานลำดับเบสของ primer สำหรับใช้ในการศึกษาที่เกี่ยวกับการแสดงออกของ cytokine gene ของสุกรอยู่บ้าง (Dozois et al., 1997; Thanawongnuwech et al., 2001) แต่ primer เหล่านี้ได้รับการออกแบบมาสำหรับการใช้งานในเทคนิค PCR สำหรับการตรวจหา product เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งและมีค่า melting temperature (Tm) ที่แตกต่างกันอยู่ค่อนข้างมาก จึงไม่เหมาะสมกับเทคนิค multiplex PCR ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการออกแบบ primer ทั้งหมดใหม่เพื่อที่จะใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ โดยใช้ sequence อ้างอิง ที่ได้จาก GenBank และได้ออกแบบโดยมุ่งเน้นให้ primer ทุกสายมี Tm เท่ากัน (ในที่นี้เท่ากับ 60°C) เพื่อลดปัญหาความแตกต่างกันของ amplification efficiency ของแต่ละ primer และนอกจากนี้ primer เหล่านี้จะต้องให้ PCR product ที่มีขนาดที่แตกต่างกัน และสามารถมองเห็นแยกออกจากกันได้ชัดเจนเมื่อทำการตรวจสอบปริมาณของ product โดยวิธี agarose gel electrophoresis และ densitometry ต่อไป จากการศึกษาผู้วิจัยได้ออกแบบ primer set ที่สามารถใช้สำหรับ MPCR (ตารางที่ 1) ทำการปรับองค์ประกอบที่จำเป็นสำหรับของ PCR reaction ได้แก่ ปริมาณความเข้มข้นของ primer template และ $MgCl_2$ จำนวนรอบและอุณหภูมิของ MPCR จนในที่สุดสามารถพัฒนาเทคนิค multiplex PCR ได้เป็นผลสำเร็จ โดยในช่วงของการ optimization นี้ได้ใช้ตัวอย่าง total RNA ที่สกัดจาก PBMC ของสุกรที่ culture ร่วมกับ 10 $\mu g/ml$ ConA มาใช้เป็น positive control เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ cytokine gene ได้ (รูปประกอบที่ 1) นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบความถูกต้องของ PCR product ที่ได้จาก MPCR โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง automated sequencer โดยได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิจัยไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และพบว่า product ที่ได้มีความถูกต้องของลำดับเบสตามที่ควรจะเป็น

อนึ่งเมื่อวิเคราะห์ค่า % expression level จากตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาเบื้องต้นนี้ ผู้วิจัยพบว่าในเซลล์ปกติ ที่ culture โดยไม่เติม mitogen ก็สามารถพบการแสดงออกของ cytokine gene (background expression) ได้อยู่ในระดับหนึ่ง (รูปประกอบที่ 1) และนอกจากนี้สุกรแต่ละตัวจะมีค่า background expression ที่ค่อนข้างหลากหลาย ดังนั้นในการแสดงผลในลำดับถัดไป จะใช้ค่า % expression level ที่ได้ทำการหักลบ background expression ของสุกรตัวเดียวกันออกไปแล้ว ก่อนที่จะนำมาคำนวณค่า mean $\pm$ SEM ต่อไป ดังนั้นจะเห็นได้ว่าในบางครั้งค่า % expression level มีค่าเป็นลบ ซึ่งหมายความว่า การแสดงออกของ cytokine gene ในตัวอย่างนั้นมี



รูปประกอบที่ 1 รูปซ้าย) แสดง product ของcytokine gene แต่ละชนิด ได้แก่ 1) GAPDH 2) IFN- γ . 3) IL-10, 4) IL-2, 5) IL-4 ที่ได้จาก PCR จากตัวอย่าง PBMC ที่ culture ร่วมกับ ConA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รูปขวา) แสดงผลของ MPCR จากตัวอย่าง PBMC control (-) และ PBMC ที่ culture ร่วมกับ ConA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (+) lane M คือ 100 bp molecular weight DNA ladder

ค่าต่ำกว่าการแสดงออกของ cytokine gene เดียวกันใน control PBMC จากสุกรตัวเดียวกัน

2. อิทธิพลของ PRRSV ต่อการแสดงออกของ cytokine gene ของ porcine PBMC

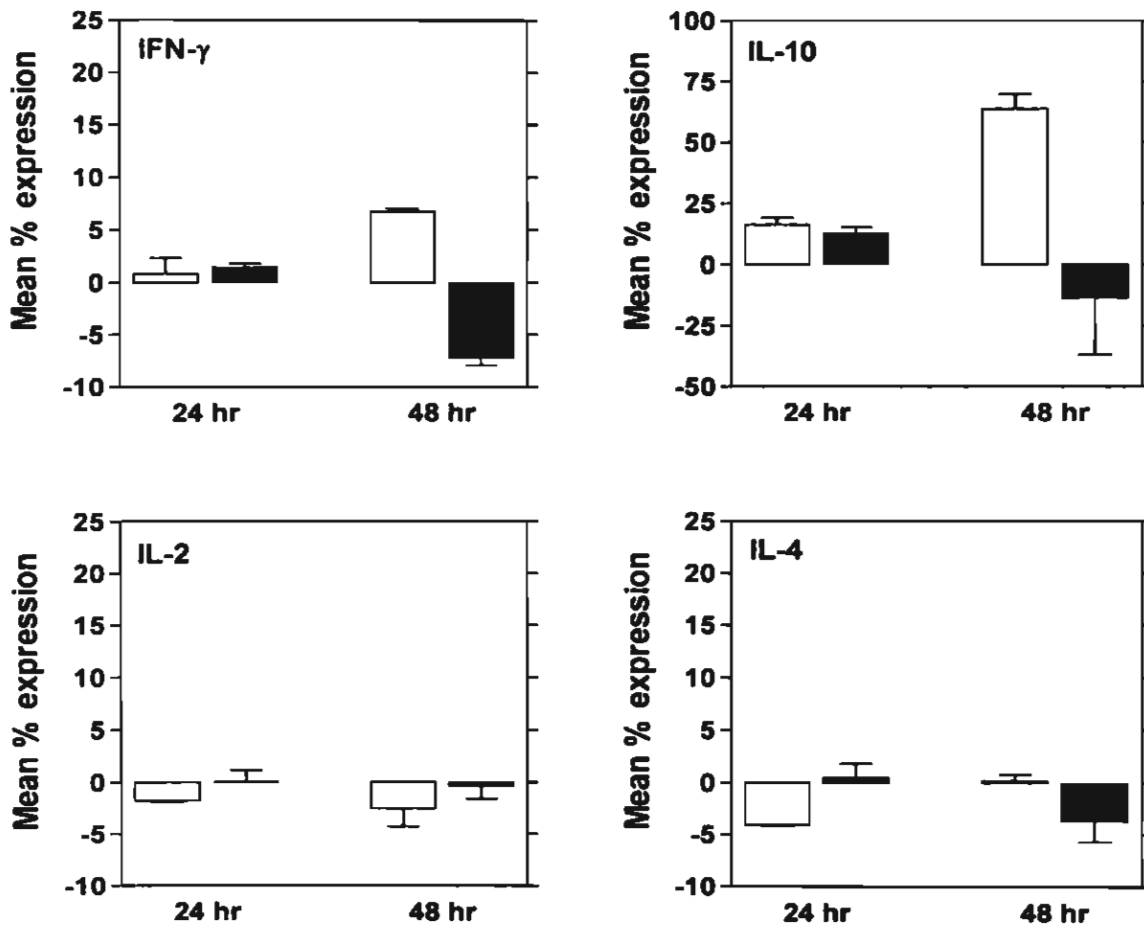
ตามที่ได้วิจัยได้เสนอไว้ในข้อเสนอโครงการว่าจะใช้ PRRSV สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย อย่างไรก็ตามในระหว่างช่วงที่ดำเนินการศึกษาได้เกิดปัญหาตู้แช่แข็งขัดข้อง และมีการสูญเสียของ PRRSV สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย รวมทั้งเซลล์ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยง จนทำให้ไม่สามารถจัดหา และเพิ่มจำนวนเชื้อได้ทันก่อนสิ้นสุดโครงการ ในการนี้ผู้วิจัยจึงต้องใช้เชื้อ reference strain ซึ่งเป็นสายพันธุ์ US จากต่างประเทศ ที่มีความรุนแรงสูง ซึ่งก็พบว่ามีระดับอยู่ในประเทศไทยเช่นเดียวกัน (รุ่งโรจน์ ธนาวงศ์นุเวช ข้อมูลส่วนตัว) มาใช้ในการทดลองนี้แทน

ผลจากการศึกษาในการทดลองที่ 1 เมื่อทำการ culture เชื้อร่วมกับ PBMC ที่แยกได้จาก naïve pig เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ PRRSV ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ IL-10 gene อย่างเห็นเด่นชัดเมื่อเทียบกับ cytokine gene อื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่ามี การเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ IL-10 gene อย่างต่อเนื่องเมื่อทำการ culture เซลล์กับไวรัสต่อไปถึง 48 ชั่วโมง โดยพบว่าเชื้อที่ระดับ 0.01 m.o.i. มีผลต่อการสร้าง IL-10 transcript ที่ดีกว่าที่ระดับ 0.001 m.o.i. (รูปประกอบที่ 2) นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มการแสดงออกของ IFN- γ gene อยู่ในระดับที่ต่ำกว่า IL-10 ส่วน IL-2 และ IL-4 gene นั้นพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของ gene ที่น้อยมากหรือไม่มีเลย ส่วนสาเหตุที่ใช้ปริมาณของไวรัสที่ระดับสูงสุดแค่ 0.01 m.o.i. ก็เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่อง titer ของไวรัสที่ได้จากการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่มักจะได้ไม่สูงนัก โดยทั่วไปอยู่ในระดับ 10^6 TCID₅₀/ml (รุ่งโรจน์ ธนาวงศ์นุเวช, ข้อมูลส่วนตัว) อย่างไรก็ตามจากรายงานที่ผ่านมา ปริมาณไวรัสที่ 0.01 m.o.i. นั้น เพียงพอที่จะใช้สำหรับการศึกษาผลของไวรัสต่อการสร้าง cytokine (Thanawongnuwech et al., 2001)

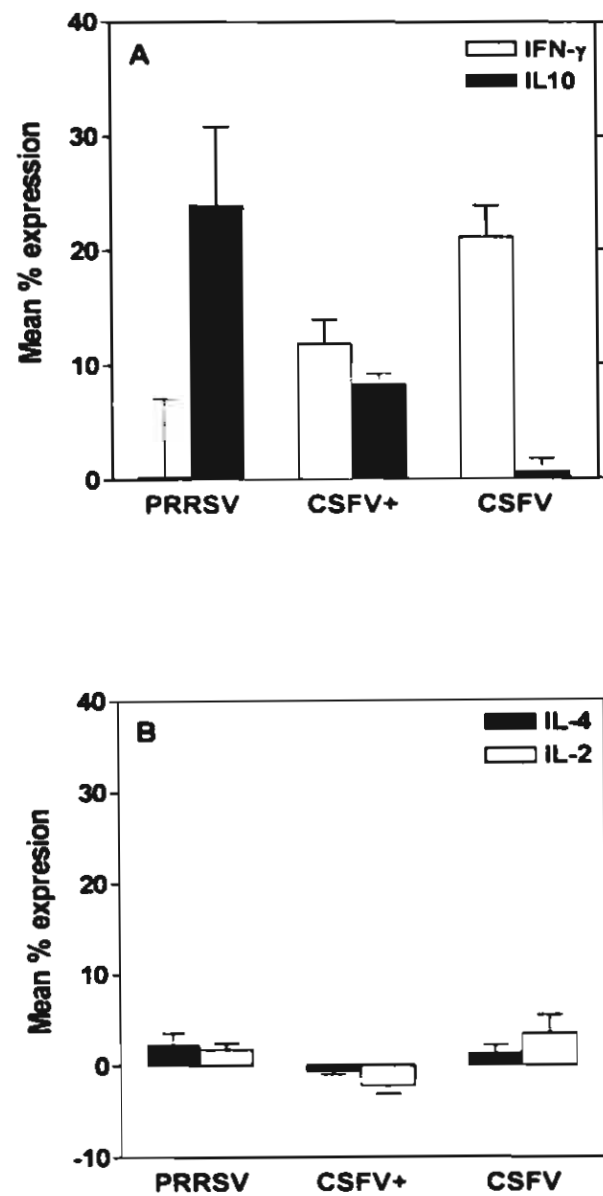
ผลจากการทดลองในการศึกษาแรก แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของเชื้อ PRRSV ต่อระดับการแสดงออกของ cytokine gene โดยเฉพาะอย่างยิ่ง IL-10 gene ถือเป็นการค้นพบที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน อย่างไรก็ตามผู้วิจัยตระหนักดีว่า เทคนิค MPCR นั้นเป็นเทคนิคที่เริ่มพัฒนาขึ้นใหม่ ซึ่งถึงแม้ว่าจะ optimize จนเป็นผลสำเร็จในระดับหนึ่ง แต่ก็อาจเป็นไปได้ว่าอาจมีการ bias ของการ amplify ในระหว่างปฏิกิริยา MPCR และน่าที่จะมีการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้ ในการทดลองต่อมาผู้วิจัยจึงได้เลือกที่จะเก็บตัวอย่างเลือดจากสุกรที่เคยได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรมาแล้ว (รายละเอียดอยู่ในอุปกรณ์และวิธีการ) ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า เมื่อนำ PBMC ของสุกรที่เคยได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรมาก่อนมา culture ร่วมกับเชื้ออหิวาต์สุกร (recall antigen) จะมีการสร้าง IFN- γ ขึ้นและสามารถตรวจวัดการสร้างโปรตีนได้โดยเทคนิค ELISPOT (Suradhat et al., 2001) ดังนั้นการใช้เซลล์จากสุกรที่เคยได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรมาก่อน จะเป็น positive control ที่ดีสำหรับการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ IFN- γ gene โดยเทคนิค MPCR นอกจากนี้ยังจะได้รับข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับอิทธิพลของเชื้อ PRRSV ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนชนิดอื่น ซึ่งอาจสามารถนำไปใช้อธิบายปรากฏการณ์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นในสภาพการเลี้ยงจริงอีกด้วย

ผลจากการทดลองในช่วงที่ 2 นี้พบว่าสามารถยืนยันผลของ PRRSV ต่อการเพิ่มการแสดงออกของ IL-10 gene ที่ใกล้เคียงกับการทดลองแรก นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า PBMC ที่ culture ร่วมกับเชื้ออหิวาต์สุกร มีการเพิ่มการแสดงออกของ IFN- γ gene อย่างชัดเจนตามที่คาดไว้ ซึ่งเป็นการยืนยันประสิทธิภาพของเทคนิค MPCR ในการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ cytokine gene นอกจากนี้ผลการทดลองยังชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่า การมีเชื้อ PRRSV ร่วมอยู่ในการ culture ระหว่างเซลล์ primed PBMC กับเชื้ออหิวาต์สุกร จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของการแสดงออกของ cytokine gene อย่างชัดเจน กล่าวคือจะมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ IL-10 transcript และลดลงของปริมาณ IFN- γ transcript อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (paired t-test, $p < 0.05$) เมื่อเทียบกับเซลล์จากสุกรตัวเดียวกันที่ culture กับเชื้ออหิวาต์สุกร เพียงอย่างเดียว จากการศึกษาครั้งนี้พบการ

เปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของ IL-2 และ IL-4 gene น้อยมาก ซึ่งคล้ายคลึงกับผลที่ได้จากการทดลองที่ 1 (รูปประกอบที่ 3)



รูปประกอบที่ 2 ค่าเฉลี่ยของ % expression ของ cytokine gene จาก PBMC ที่ culture ร่วมกับเชื้อ PRRSV เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (การทดลองที่ 1)



รูปประกอบที่ 3 ค่าเฉลี่ย % expression ของ A) IFN- γ และ IL-10 B) IL-2 และ IL-4 gene จาก PBMC ของสุกร ที่เคยได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกร และนำมา culture ร่วมกับ PRRSV หรือ CSFV หรือ PRRSV ร่วมกับ CSFV (CSFV+) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (การทดลองที่ 2)

วิจารณ์

โดยธรรมชาติแล้ว cytokine เป็นสารที่ไม่มีการสะสมภายในเซลล์ cytokine จะถูกสร้างขึ้นก็ต่อเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสม การสร้าง mRNA ของ cytokine โดยส่วนมากแล้วจะมีความสัมพันธ์เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณโปรตีน อย่างไรก็ตามก็ถือว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ของการศึกษาการ mRNA expression ก็คือ ระดับ mRNA นั้นอาจไม่สามารถบ่งบอกปริมาณโปรตีนที่สร้างขึ้นอย่างแท้จริงได้ ซึ่งโดยทางปฏิบัติแล้วควรมีการศึกษาในระดับการสร้างของทั้ง mRNA และ protein ควบคู่กันไปเพื่อหาความสัมพันธ์ของ parameter ทั้ง 2 ชนิด อย่างไรก็ตามการตรวจวัดการสร้าง cytokine ในสุกรก็ยังมีข้อจำกัดอยู่อย่างมาก โดยเฉพาะในเรื่อง monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ porcine cytokine ที่จำเป็นต่อการตรวจวัดซึ่งยังมีราคาสูงมาก และในบางกรณียังไม่สามารถผลิตได้ นอกจากนี้ cytokine ที่สร้างขึ้นแม้ว่าจะเป็นปริมาณมากอาจถูกจับโดย receptor บนผิวของ target cell อื่นๆ และทำให้ไม่สามารถตรวจวัดได้โดยใช้ protein assay ปัญหาสำคัญอีกประการหนึ่งของการใช้ protein assay ก็คือค่า half-life ของ cytokine แต่ละชนิดนั้นมีค่าไม่เท่ากันและเป็นอุปสรรคสำคัญในการตรวจวัดโดยเฉพาะในการศึกษาทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันที่ต้องการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับของการสร้าง cytokine หลายชนิดในเวลาเดียวกัน จากเหตุผลข้างต้น รวมถึงการคำนึงในด้านต้นทุนของการตรวจวัดและความเป็นไปได้ของโครงการ ผู้วิจัยจึงเห็นว่าการใช้ multiplex RT-PCR จะเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ และเนื่องจากห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยยังไม่มีอุปกรณ์ อาทิเช่น light thermocycler หรืองบประมาณเพียงพอสำหรับการตรวจวัดปริมาณของ mRNA ที่แท้จริง การศึกษาในครั้งนี้มุ่งเน้นถึงการเปรียบเทียบในเชิงปริมาณ (semi-quantitative) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของ mRNA ที่สร้างจากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดย PRRSV กับเซลล์ในภาวะปกติ (negative control) เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะต้องนำไปประกอบกับข้อมูลในด้านอื่น เช่น clinical sign และ ผลของ PRRSV ที่มีต่อ effector mechanism ชนิดต่างๆของระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อทำความเข้าใจระหว่างความสัมพันธ์ระหว่าง PRRSV และสุกรที่ติดเชื้อ อันจะเป็นประโยชน์ต่อการทำความเข้าใจกับพยาธิกำเนิดของโรคต่อไป

ผลจากการศึกษานี้ผู้วิจัยสามารถพัฒนาเทคนิค multiplex PCR เพื่อตรวจวัดการแสดงออกของ cytokine gene ได้แก่ IFN- γ IL-10 IL-2 และ IL-4 ได้เป็นผลสำเร็จ โดยการออกแบบ primer ใหม่ทั้งหมดเพื่อให้มีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษานี้ ผลจากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเทคนิค MPCR เป็นเทคนิคที่มีความเป็นไปได้และเมื่อนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี densitometric analysis จะสามารถนำมาใช้ในการศึกษาด้านวิทยาภูมิคุ้มกันในสุกรที่มีประสิทธิภาพสูงและต้นทุนต่ำได้เป็นอย่างดี

ในการศึกษานี้แม้ว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย ConA จะมีการเพิ่มของการแสดงออกของ cytokine gene อย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตามก็เป็นที่น่าสังเกตว่า เซลล์ที่ culture ร่วมกับ control medium จะมีการแสดงออกของ gene อยู่ในระดับหนึ่ง ปรากฏการณ์นี้สามารถพบได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำเซลล์มาศึกษาออกตัวสัตว์นั้นมันขึ้นตอนมากมาย ซึ่งอาจส่งผลการทบทวนภาวะ homeostasis ของเซลล์ ที่มีผลต่อการแสดงออกของ gene ต่างๆ โดยเฉพาะ IL-10 gene การพบการแสดงออกของ IL-10 gene ใน unstimulated cells ก็เป็นข้อมูลที่ถือเป็นเรื่องปกติ และในสุกรเองก็เคยมีการรายงานไว้แล้วโดยคณะผู้วิจัยหลายกลุ่ม (Dozois et al., 1997; Thanawongnuwech et al., 2001) โดยปกติการแสดงออกของ IL-10 gene นั้นสามารถทำได้จากกลไกในเซลล์ที่หลากหลาย (reviewed in Moore et al., 2001) และอาจเป็นไปได้ว่า IL-10 อาจเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมสถานะสมดุลในการทำงานของเซลล์ การรายงานผลการทดลองในครั้งนี้ผู้วิจัยจึงทำการตัดผลของ background expression ออกก่อน โดยรายงานค่า % expression level ที่ได้ทำการหักลบค่า background expression ของสุกรแต่ละตัวออกก่อนที่จะทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มต่อไป จากการวิเคราะห์ผลการทดลองพบว่าเทคนิค MPCR สามารถตรวจเปรียบเทียบการแสดงออกของ cytokine gene ชนิดต่างๆได้โดยเฉพาะอย่างยิ่ง IL-10 และ IFN- γ ในขณะที่การแสดงออกของ housekeeping gene, GAPDH นั้นมีปริมาณที่ใกล้เคียงกันในทุกตัวอย่าง ซึ่งแสดงว่าสามารถใช้ GAPDH เป็น reference gene ที่ดีในสุกรได้ เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณการแสดงออกของ IL-4