

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA5580052
ชื่อโครงการ : การวิเคราะห์ miRNA ของเซลล์ที่แสดงออกระหว่างการติดเชื้อไวรัสเดงกี สายพันธุ์ 2 ของการติดเชื้อครั้งแรกใน *in vitro*
ชื่อนักวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัครลาภสกุล
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
E-mail Address: wanchai.a@chula.ac.th
ระยะเวลาโครงการ: 16 กรกฎาคม พ.ศ.2555 ถึง 15 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2559

การติดเชื้อไวรัสเดงกีเป็นปัญหาสาธารณสุขทั่วโลก เชื้อไวรัสเดงกีสามารถแยกได้ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ตามซีโรไทป์ เมื่อมนุษย์ที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ซีโรไทป์หนึ่ง จะสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสซีโรไทป์นั้น และมีภูมิคุ้มกันบางส่วนต่อเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์อื่น อย่างไรก็ตาม แอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นในการติดเชื้อครั้งแรกนั้น ทำให้การติดเชื้อครั้งที่สองจากเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์อื่นเป็นไปได้ง่าย และรุนแรงมากขึ้น โดยการผ่านกระบวนการที่เรียกว่า antibody dependent enhancement นอกจากนี้ จากการศึกษาการติดเชื้อไวรัสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิดพบว่ามีความสัมพันธ์กับกลไกการยับยั้งด้วยอาร์เอ็นเอสายสั้น miRNAs เป็นหนึ่งในกลุ่มอาร์เอ็นเอสายสั้นที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน และมีความเกี่ยวข้องในกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น อะพอพโทซิส หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของยีน รวมถึงบทบาทในการต้านทานการติดเชื้อไวรัส โดยทำหน้าที่ในการควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน และยังพบว่า miRNAs และส่วนประกอบอื่นในกลไกดังกล่าวนี้ สามารถที่จะเกิดปฏิสัมพันธ์กับไวรัสได้ในหลากหลายขั้นตอนซึ่งส่งผลในการจำลองตัวเองของเชื้อไวรัส โดยหลังจากที่ไวรัสเข้าสู่เซลล์ และเกิดกระบวนการ uncoating เพื่อที่จะเริ่มกระบวนการจำลองตัวเอง ไวรัสนั้นจะไปกระตุ้นหรือยับยั้งการแสดงออกของ miRNAs ดังนั้น โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของ miRNAs ของเซลล์ในระหว่างการติดเชื้อไวรัสเดงกีสายพันธุ์ 2 ของการติดเชื้อครั้งแรกใน *in vitro* ในรายงานฉบับนี้ได้แสดงถึงการติดเชื้อไวรัสเดงกีสายพันธุ์ 2 ด้วยสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกี เพื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของ miRNAs จำนวน 23 ชนิด โดยวิธี semi-quantitative RT-PCR และทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบของ miRNAs ทั้งหมด ซึ่งผลการทดลอง สามารถที่จะปรับสภาวะที่เหมาะสมและตรวจสอบการติดตามได้ 7 miRNAs และได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเซลล์ HepG2 ที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกี สายพันธุ์ 2 เป็นเวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ ผลจาก Real-time PCR แสดงให้เห็นว่า mir-21, -106b, -128, และ -148a มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นประมาณ 1 ถึง 2 เท่าหลังการติดเชื้อ 24 ชั่วโมง ในขณะที่ mir-30b และ -125a มีการแสดงออกที่ลดลงตั้งแต่ 12 ถึง 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ และ mir-146a มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญที่ 12 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ จากผลการทดลองข้างต้นจึงคาดว่า miRNAs บางชนิด เช่น mir-21, -106b, 128 และ -148a น่าจะเป็นเป้าหมายที่ดีในการที่จะควบคุมการจำลองตัวเองของเชื้อไวรัสเดงกีระหว่างการติดเชื้อครั้งแรก

คำสำคัญ : เชื้อไวรัสเดงกี สายพันธุ์ 2, การติดเชื้อครั้งแรก, เซลล์ HepG2, miRNA

Abstract

Project Code : RSA5580052
Project Title : Analysis of miRNA expression during dengue serotype 2 infection in *in vitro* model of primary infection.
Investigator : Assistant Professor Wanchai Assavalapsakul, Ph.D.
Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University
E-mail Address: wanchai.a@chula.ac.th
Project period : 16th July 2012 till 15th February 2016.

Dengue infection is a significant worldwide public health problem. The dengue virus consists of 4 closely related strain, each distinct viruses termed dengue virus serotype 1, 2,3 and 4. People infected with one of these four dengue viruses become immune to that particular serotype and also acquire transient immunity to other virus serotypes. However, specific antibodies against the first serotype can make second infections with a heterologous serotype more severe through the process termed antibody dependent enhancement of infection. Moreover, several studies have reported that there is a relationship between mammalian viruses and small RNA-induced silencing mechanisms. miRNAs are non-coding single stranded RNA molecules which are involved in many cellular biological processes such as cell apoptosis or a change in the mRNA expression profile. They also play an important role in antiviral responses by acting as immune system regulators. The cellular miRNAs and other components of the immune system can interact with viruses that can affect viral replication. After viral uncoating and the commencement of replication, the virus can induce or inhibit the expression of certain cellular miRNAs. Therefore, the objectives of this project is to focus on the expression of cellular miRNAs during Dengue-2 virus replication *in vitro* primary dengue infection. This report showed the primary infection of Dengue serotype-2 infection in cell line optimized condition. The total RNAs from uninfected and infected cells was extracted for semi-quantitative RT-PCR with 23 pairs of primers designed specifically for miRNA detection. Multiple miRNAs were screened, and the amplification conditions were optimized for 7 miRNAs. The expression level of these miRNAs was examined in DENV 2 infected HepG2 cells compared to the uninfected cells at 6, 12, 24 and 48 hours post-infection (hpi). Real-time PCR results showed that mir-21, -106b, -128, and -148a were 1- to 2-fold up-regulated at 24 hpi, whereas mir-30b and -125a were down-regulated from 12 to 48 hpi. Additionally, mir-146a showed significant change at 12 hpi. From these results, some miRNAs, i.e. mir-21, -106b, 128 and -148a, might be the candidates for controlling the DENV2 replication during primary infection.

Keywords : Dengue serotype 2, Primary infection, HepG2 cell, miRNA