

การตรวจวัดปริมาณของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัม
เพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการวินิจฉัยโรคตับคั่งไขมัน



นางสาวกณิศา แจ่มโกศา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Quantitation of microRNA-29 and microRNA-122 in serum as biomarkers
for diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease

Miss Kanisa Jampoka



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจวัดปริมาณของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัม เพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการวินิจฉัยโรคตับคั่งไขมัน
โดย	นางสาวกณิศา แจ่มโกคา
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัณชัย พยุงกร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัณชัย พยุงกร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สมบัติ ตรีประเสริฐสุข)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐนันท์ ปัญจวรรณ ต.เทียนประเสริฐ)

กณิศา แจ่มโสภา : การตรวจวัดปริมาณของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัม เพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการวินิจฉัยโรคตับคั่งไขมัน (Quantitation of microRNA-29 and microRNA-122 in serum as biomarkers for diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.สัญชัย พยุงภร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. นพ.พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์, 104 หน้า.

โรคตับคั่งไขมันเป็นโรคที่เกิดจากการสะสมไขมันชนิดไตรกลีเซอไรด์ในตับโดยปราศจากการสะสมของแอลกอฮอล์ที่มีสาเหตุมาจากการติดต่ออินซูลิน ผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันสามารถพัฒนาไปเป็นพังผืดในตับแข็ง และมะเร็งตับได้ ไมโครอาร์เอ็นเอ คืออาร์เอ็นเอขนาดเล็ก ที่ไม่กำหนดการสร้างโปรตีน มีขนาดประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์ มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีน ในงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอ บี และซี) และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีบทบาทสำคัญ ในการควบคุมยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะติดต่ออินซูลินที่สามารถนำไปสู่โรคตับคั่งไขมันได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัมและระดับการอักเสบของตับในผู้ป่วยตับคั่งไขมัน นอกจากนี้เพื่อศึกษาระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัม สำหรับใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับวินิจฉัยโรค NAFLD ในการวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างของซีรัมผู้ป่วยโรคตับคั่ง 58 คน และซีรัมของผู้ที่มีสุขภาพดี 34 คน เริ่มจากนำซีรัมมาสกัดไมโครอาร์เอ็นเอ ด้วยชุดสกัดไมโครอาร์เอ็นเอ จากนั้นเริ่มกระบวนการ polyuridylation ตามด้วย reverse transcription แล้วจึงวัดการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอโดยใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในซีรัมของกลุ่มผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน ขณะที่การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี และซี ไม่มีการเปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตามพบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มของผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันเมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 สัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรคโดยแบ่งตามกลุ่ม mild (NAS < 4) และกลุ่ม severe (NAS > 4) ทั้งนี้การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 อาจใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับโรคตับคั่งไขมันได้ อย่างไรก็ตามในการศึกษาต่อไป ควรที่เพิ่มขนาดของกลุ่มตัวอย่างเพื่อใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ และโรคตับคั่งไขมันต่อไป

ภาควิชา ชีวเคมี

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5674001830 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: BIOMARKERS, MICRORNA 122, MICRORNA 29, NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE (NAFLD)

KANISA JAMPOKA: Quantitation of microRNA-29 and microRNA-122 in serum as biomarkers for diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. ADVISOR: ASST. PROF. SUNCHAI PAYUNGPORN, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. PISIT TANGKIJVANICH, M.D., 104 pp.

Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is an over accumulation of triglyceride in the liver without alcohol consumption caused by insulin resistance. Patients with NAFLD are usually asymptomatic at the initial stage and then develop to be liver fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). MicroRNAs (miRNAs) are non-coding RNA about 22 nucleotides that regulate post-transcriptional gene silencing. Previous studies found that miR-29 family (a, b and c) and miR-122 have the dominant role in regulating insulin resistance that related to NAFLD. Therefore, the aim of this study was to study the correlation between miR-29 and miR-122 and level of liver inflammation in NAFLD patients. In addition to quantitate the levels of serum miR-29 and miR-122 this might be useful as possible biomarkers for non-invasive diagnosis of NAFLD. Serum samples were collected from 58 NAFLD patients and 34 healthy controls. Then miRNAs were extracted from serum by using microRNA purification kit followed by polyuridylation, reverse transcription and quantitative real-time PCR (qPCR). We found that the serum miR-29a levels in NAFLD patients were significantly lower ($P = 0.006$) than those found in control group, while miR-29b and miR-29c levels were unchanged. However, we found that serum miR-122 levels in NAFLD patients were significantly higher ($P < 0.001$) than those found in control group. The levels of serum miR-122 was significant difference between patients with mild (NAS < 4) and severe (NAS > 4), indicating that the levels of miR-122 were related with the severity of NAFLD. The levels of miR-29a and miR-122 might be useful and attractive as a possible biomarker for non-invasive diagnosis of NAFLD. However, further case-control study with larger sample size is necessary in order to confirm the association between the levels of serum miRNA and NAFLD.

Department: Biochemistry

Student's Signature

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature

Academic Year: 2014

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สัณชัย พยุงกร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่มอบโอกาส ให้ความสนับสนุน คำแนะนำ คำปรึกษา อบรมสั่งสอนวิชาความรู้ พร้อมทั้งคอยชี้แนะ แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในขณะการทำงานวิจัย การเขียนโครงร่างวิทยานิพนธ์ การเขียนวิทยานิพนธ์ ตลอดจนความช่วยเหลืออื่น ๆ ในช่วงเวลาที่ได้ทำการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ศ.นพ.พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาในการทำงานวิจัยและขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นพ.สมบัติ ตีระประเสริฐสุข และนายแพทย์พุทธ เมืองไพศาล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านการศึกษาตัวอย่างสำหรับทำงานวิจัย

ขอขอบคุณสนับสนุนการทำวิจัย และสนับสนุนการศึกษาจาก Research Unit of Hepatitis and Liver Cancer ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกตลอดงานวิจัย และขอขอบคุณสมาชิกในห้องปฏิบัติการ 724 ทุกคน ที่ให้ความสนับสนุน ความช่วยเหลือ คำปรึกษา รวมถึงกำลังใจในการทำงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อคุณแม่และครอบครัว ที่คอยสนับสนุน ให้โอกาสทางการศึกษา คำปรึกษา และเป็นกำลังใจที่สำคัญที่เป็นแรงผลักดันจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูป	ฅ
สารบัญตาราง.....	๗
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย	1
คำถามของงานวิจัย.....	2
วัตถุประสงค์การวิจัย	2
สมมติฐาน.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ขั้นตอนพัฒนาเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์สำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอาร์เอ็นเอ	3
ขั้นตอนการตรวจหาไมโครอาร์เอ็นเอในผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันและกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี	4
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	4
คำสำคัญ.....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
ตับคั่งไขมัน (NAFLD)	6
ข้อมูลของการคำนวณ NAS score	8
ไมโครอาร์เอ็นเอ (MicroRNA)	8
ไมโครอาร์เอ็นเอ 29.....	11

ไมโครอาร์เอ็นเอ 122	13
เรียลไทม์พีซีอาร์ (Real-time PCR).....	19
SYBR Green I.....	19
การใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์สำหรับตรวจวัดการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ	19
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
รูปแบบการวิจัย	21
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	21
1. สารเคมีสำหรับเตรียม Annealing Buffer	21
2. สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector.....	21
3. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดโดยอาศัยเทคนิค Transformation	21
4. สารเคมีสำหรับการสกัดพลาสมิด.....	22
5. สารเคมีสำหรับตรวจสอบป็นด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR).....	22
6. สารเคมีสำหรับ Agarose Gel Electrophoresis.....	22
7. สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล (Gel extraction)	22
8. สารเคมีสำหรับสกัด miRNAs.....	22
9. สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ <i>in vitro</i> transcription	22
10. สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Polyuridylation	23
11. สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Reverse Transcription.....	23
12. สารเคมีสำหรับทำ Real-Time PCR	23
13. วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย.....	23
14. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	24
15. โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การทดลอง	24
ระเบียบวิธีวิจัย	25

วิธีดำเนินการวิจัย	27
การสังเคราะห์ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอ บี และซี) และไมโครอาร์เอ็นเอ 122	27
การเตรียมตัวอย่าง	29
Polyuridylation	31
Reverse transcription.....	31
การเพิ่มจำนวน cDNA ของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ด้วยวิธี PCR....	32
ตรวจสอบผลการทำ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis	33
การเตรียมตัวแปรควบคุมเชิงบวกด้วยวิธี cloning.....	34
การคำนวณค่า Sensitivity ของไพรเมอร์ด้วยการทำ 10 fold serial dilution	36
Quantitative real-time PCR	36
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	37
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	38
การสร้างตัวแปรควบคุมเชิงบวกสำหรับตรวจวัดการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ	38
การตรวจ cDNA จากกระบวนการ <i>in vitro</i> transcription	38
การตรวจสอบพลาสมิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	39
การตรวจสอบพลาสมิดด้วยเทคนิค nucleotide sequencing	40
การทดสอบ Sensitivity โดยการสร้างกราฟมาตรฐานของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ไมโครอาร์เอ็นเอ 122 และ U6 โดยวิธีการเรียลไทม์พีซีอาร์	40
การตรวจสอบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอโดยใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์	44
การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัมของกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี.....	44
การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัมของกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันโดยแบ่งตามค่าความรุนแรงของโรคเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี.....	46

การแสดงผลของไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัมของกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันโดยแบ่งตามเพศเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี	49
การศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อตับของกลุ่มผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันเทียบกับในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมัน	51
การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันกับปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค	52
การศึกษาทำนายยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ บี ซี และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 โดยใช้โปรแกรม miRTarBase และ Panther	55
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ	57
การแสดงผลของไมโครอาร์เอ็นเอในกลุ่มผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันและกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี	57
ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 กับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคตับคั่งไขมัน	62
การทำนายยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122	64
รายการอ้างอิง	70
ดัชนี	81
ตารางแสดงการตรวจวัดการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ วัดปริมาณ copies/ μ l โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานและ normalize ด้วย U6	82
ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ในกลุ่มผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน	82
ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ในกลุ่มผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน	85
ไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในกลุ่มผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน	88
ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ในกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี	91
ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ในกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี	93
ไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี	95
ตารางแสดง Biological functions ของยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ	97

ตารางแสดง Biological functions ของยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ปี	99
ตารางแสดง Biological functions ของยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี	101
ตารางแสดง Biological functions ของยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 122.....	102
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	104



สารบัญรูป

รูปที่ 1	กระบวนการเกิด NAFLD	7
รูปที่ 2	กระบวนการสร้างและการทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอ	9
รูปที่ 3	microRNA ในกระบวนการ insulin signaling	10
รูปที่ 4	แสดงยื่นเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์	11
รูปที่ 5	แสดงวิถี PI3K/AKT.....	13
รูปที่ 6	แสดงการควบคุม insulin metabolic signal-transduction pathways โดย PTP1B	14
รูปที่ 7	แสดงความสัมพันธ์ของไมโครอาร์เอ็นเอที่จำเพาะกับยื่นเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพในการพัฒนาของโรคตับคั่งไขมัน	16
รูปที่ 8	เทคนิคการตรวจวัดไมโครอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์	20
รูปที่ 9	แสดงการ annealing ของ oligonucleotide สำหรับใช้ในกระบวนการ <i>In vitro</i> transcription.....	28
รูปที่ 10	ตัวอย่างการตรวจสอบ cDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	38
รูปที่ 11	การตรวจสอบพลาสมิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	39
รูปที่ 12	Chromatogram แสดงตัวอย่างผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ปี	40
รูปที่ 13	แสดงกราฟมาตรฐานของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ.....	41
รูปที่ 14	แสดงกราฟมาตรฐานของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี.....	42
รูปที่ 15	แสดงกราฟมาตรฐานของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี.....	42
รูปที่ 16	แสดงกราฟมาตรฐานของไมโครอาร์เอ็นเอ 122	43
รูปที่ 17	แสดงกราฟมาตรฐานของ U6	43
รูปที่ 18	การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี	45
รูปที่ 19	การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี	45

รูปที่ 20 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี.....	46
รูปที่ 21 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ในกลุ่ม Normal, NAS 1-3 และ NAS 4-7	47
รูปที่ 22 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ในกลุ่ม Normal, NAS 1-3 และ NAS 4-7.....	48
รูปที่ 23 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในกลุ่ม Normal, NAS 1-3 และ NAS 4-7	48
รูปที่ 24 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันโดยแบ่งตามเพศเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี	50
รูปที่ 25 ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ในกลุ่มเนื้อเยื่อตับเทียบกับในซีรัมของผู้โรคตับคั่งไขมัน.....	51
รูปที่ 26 ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ในกลุ่มเนื้อเยื่อตับเทียบกับในซีรัมของผู้โรคตับคั่งไขมัน.....	52
รูปที่ 27 ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในกลุ่มเนื้อเยื่อตับเทียบกับในซีรัมของผู้โรคตับคั่งไขมัน.....	52
รูปที่ 28 แสดงการไหลของการสร้างไขมันผ่านเข้าสู่ตับ	65
รูปที่ 29 แสดงตัวอย่างการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ กับยีนเป้าหมาย Lipoprotein lipase (LPL).....	65
รูปที่ 30 บทบาทของ free fatty acid (FFA), hypoxia, reactive oxygen species (ROS) และ PTEN ในการพัฒนาไปเป็นโรคตับคั่งไขมัน โดยผ่านทางวิถีหลัก PI3K/AKT/GSK3.....	66
รูปที่ 31 บทบาทของ CYP7A1 ในการเปลี่ยนโคเลสเตอรอลไปเป็นน้ำดี	67
รูปที่ 32 แสดงตัวอย่างการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 กับยีนเป้าหมาย CYP7A1.....	68

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	แสดงคะแนนของ NAFLD Activity Score (NAS)	8
ตารางที่ 2	การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในตับกับการพัฒนาของโรคตับ	18
ตารางที่ 3	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์.....	28
ตารางที่ 4	แสดงปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการทำ duplex template.....	28
ตารางที่ 5	แสดงปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการทำ <i>in vitro</i> transcription.....	29
ตารางที่ 6	แสดงปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการทำ polyuridylation.....	31
ตารางที่ 7	แสดงปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการทำ reverse transcription	32
ตารางที่ 8	แสดงส่วนผสมสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA	32
ตารางที่ 9	อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122	33
ตารางที่ 10	แสดงปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการ ligation	34
ตารางที่ 11	แสดงปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการทำ real-time PCR.....	36
ตารางที่ 12	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ และซี.....	37
ตารางที่ 13	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี.....	37
ตารางที่ 14	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ Real-time PCR ของไมโครอาร์เอ็นเอ 122	37
ตารางที่ 15	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ และไมโครอาร์เอ็นเอ 122ในกลุ่มผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันกับปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค	53
ตารางที่ 16	ศึกษาค่าเฉลี่ยของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันโดยแบ่งตามเพศ	54
ตารางที่ 17	แสดงความสัมพันธ์ของไมโครอาร์เอ็นเอกับยีนเป้าหมาย โดยทำนายผ่านโปรแกรม miRTarbase และ Panther	56
ตารางที่ 18	ผลการศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัมผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน	62

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) หรือโรคตับคั่งไขมันเป็นโรคที่เกิดจากการสะสมไขมันชนิดไตรกลีเซอไรด์มากเกินไปเกินเกณฑ์ปกติ โดยไม่มีสาเหตุมาจากการดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ สาเหตุส่วนใหญ่มาจากการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน ภาวะที่ร่างกายดื้อต่ออินซูลินถือเป็นปัจจัยที่สำคัญของการเกิดภาวะไขมันคั่งสะสมในตับ ในคนปกติระดับน้ำตาลจะถูกควบคุม โดยอินซูลินซึ่งผลิตมาจากตับอ่อน เมื่อน้ำตาลในเลือดสูง ตับอ่อนจะหลั่งอินซูลินออกมามากขึ้น อินซูลินจะออกฤทธิ์ที่ตับ กล้ามเนื้อ และเซลล์ไขมันเพื่อให้เกิดการใช้น้ำตาล ในภาวะที่ดื้อต่ออินซูลินซึ่งอาจจะเกิดจากพันธุกรรม หรือจากพฤติกรรม เช่น อ้วน การขาดการออกกำลังกาย รับประทานอาหารที่มีน้ำตาลหรือไขมันมาก จะทำให้เซลล์ต่างๆ ไม่ตอบสนองต่ออินซูลินในอัตราปกติ ทำให้ตับอ่อนต้องผลิตอินซูลินเพิ่มมากขึ้นเพื่อรักษาระดับน้ำตาลในเลือดให้คงที่ เมื่อภาวะดื้อต่ออินซูลินเพิ่มมากขึ้นจึงเกิดโรคเบาหวาน แต่เมื่อเติบโตขึ้นร่างกายอ้วนขึ้น รับประทานอาหารที่มีแป้งเพิ่มขึ้นรวมทั้งไม่ได้ออกกำลังกาย ยิ่งทำให้ตับมีการสะสมไขมันเพิ่มมากขึ้นสามารถนำไปสู่การเป็นโรคตับคั่งไขมันเพิ่มมากยิ่งขึ้น โรคตับคั่งไขมันเป็นโรคที่กำลังเป็นปัญหามากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากผู้ป่วยมักไม่แสดงอาการของโรค ทั้งในระยะแรกหรือแม้กระทั่งพัฒนาเป็นตับอักเสบหรือ ตับแข็งแล้ว ทำให้กว่าจะได้รับรักษาก็เข้าสู่ภาวะของโรคที่ค่อนข้างรุนแรง โดยอาการของโรคสามารถแบ่งตามพยาธิสภาพของตับได้ 4 ชนิดดังนี้

1. มีไขมันคั่งสะสมในเซลล์ตับอย่างเดียวแต่ไม่มีการอักเสบของตับร่วมด้วย
2. มีไขมันคั่งสะสมในเซลล์ตับร่วมกับมีการอักเสบของตับเล็กน้อย
3. มีไขมันคั่งสะสมในเซลล์ตับและมีการบวมโตของเซลล์ตับ
4. เป็นแบบชนิดที่ 3 แต่มีการตายของกลุ่มเซลล์ตับ และอาจมีพังผืดในตับร่วมด้วย

การตรวจผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมัน นั้นทำได้โดยการเจาะตับ แล้วนำชิ้นเนื้อมาตรวจทางพยาธิวิทยา การเจาะเลือดหาค่าสารต่างๆ การตรวจอัลตราซาวด์ หรือตรวจโดยวิธีเอ็กซ์เรย์ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามการเจาะตับเพื่อนำชิ้นเนื้อมาประเมินทางพยาธิวิทยา อาจทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ตามมาได้ ดังนั้นจึงมีการหาวิธีการใหม่ ที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้ป่วยและสามารถทำได้ง่าย เพื่อมาใช้ในการประเมินการอักเสบหรือการเกิดพังผืดในตับ ปัจจุบันจึงมีการหาสารที่สามารถใช้ตรวจวัดความรุนแรงของโรคได้ ซึ่งปัจจุบันการศึกษาไมโครอาร์เอ็นเอได้รับความนิยมมากขึ้น ไมโครอาร์เอ็นเอเป็นโมเลกุลอาร์เอ็นเอ ขนาดเล็กประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์ ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน โดยไปจับที่เอ็มอาร์เอ็นเอที่ตำแหน่งที่เป็นคู่สมกัน หากจับได้แบบสมบูรณ์จะทำให้เอ็มอาร์เอ็นเอ

เป้าหมายสลายไป แต่หากจับได้แบบไม่สมบูรณ์จะไปยับยั้งการถอดรหัสของยีน มีรายงานวิจัยพบว่า ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีบทบาทเด่นเกี่ยวกับการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน รวมถึง metabolic syndrome ซึ่งทำให้ตับมีการสะสมไขมันเพิ่มมากขึ้นสามารถนำไปสู่การเป็นโรคตับคั่งไขมันได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาาระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ว่ามีความสัมพันธ์กับโรคโรคตับคั่งไขมันหรือไม่และหากมีความสัมพันธ์ต่อกัน ก็สามารถประยุกต์ใช้ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับตรวจโรคตับคั่งไขมันได้

คำถามของงานวิจัย

1. ระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอ บี และซี) และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัม มีความสัมพันธ์กับระดับการอักเสบ ของตับในผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมัน ซึ่งประเมินโดยใช้ NAFLD Activity Score (NAS) และกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีหรือไม่ อย่างไร
2. ระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอ บี และซี) และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัม สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับวินิจฉัยโรคตับคั่งไขมันได้หรือไม่

วัตถุประสงค์การวิจัย

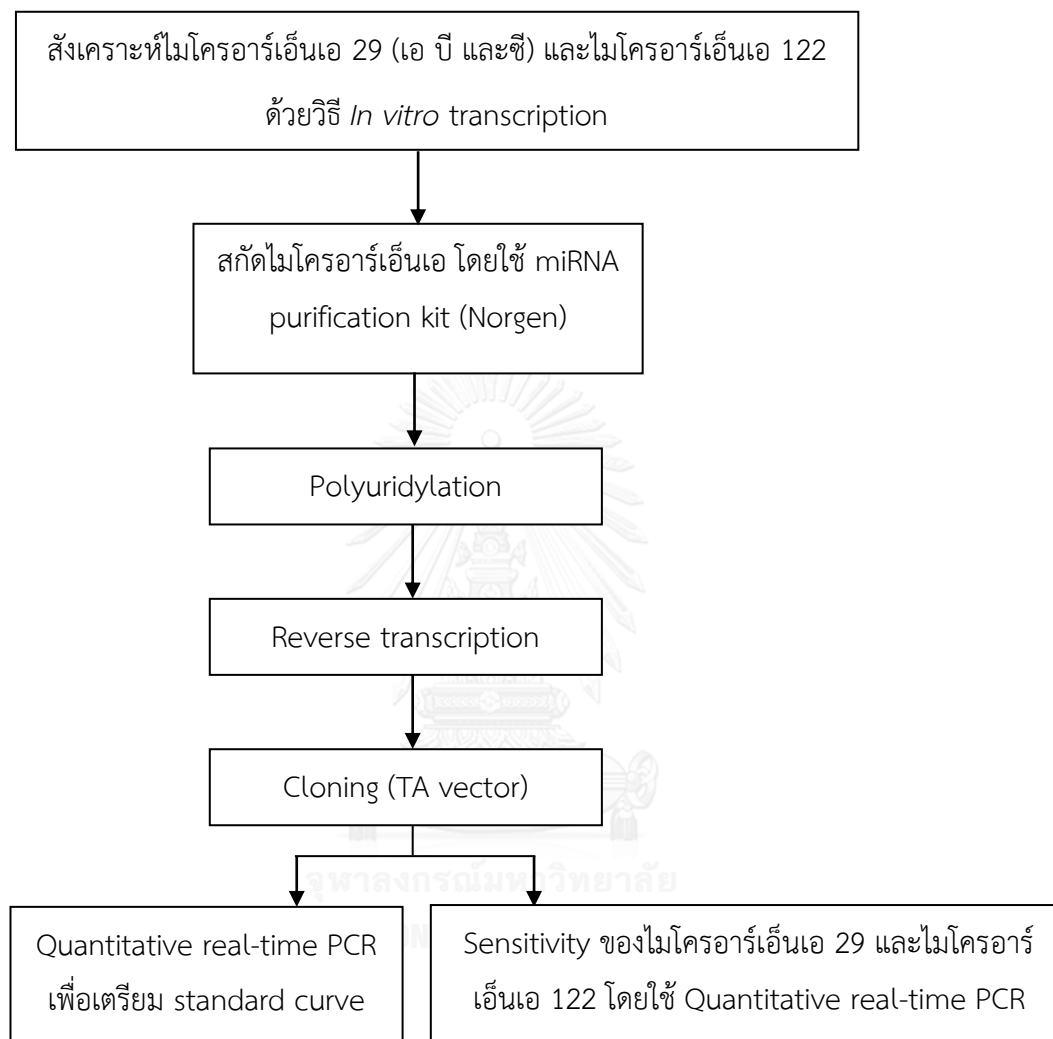
1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอ บี และซี) และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัมและระดับการอักเสบของตับในผู้ป่วยตับคั่งไขมันซึ่งประเมินโดย NAFLD Activity Score (NAS) และกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี
2. เพื่อศึกษาาระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอ บี และซี) และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัม สำหรับใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับวินิจฉัยโรคตับคั่งไขมัน

สมมติฐาน

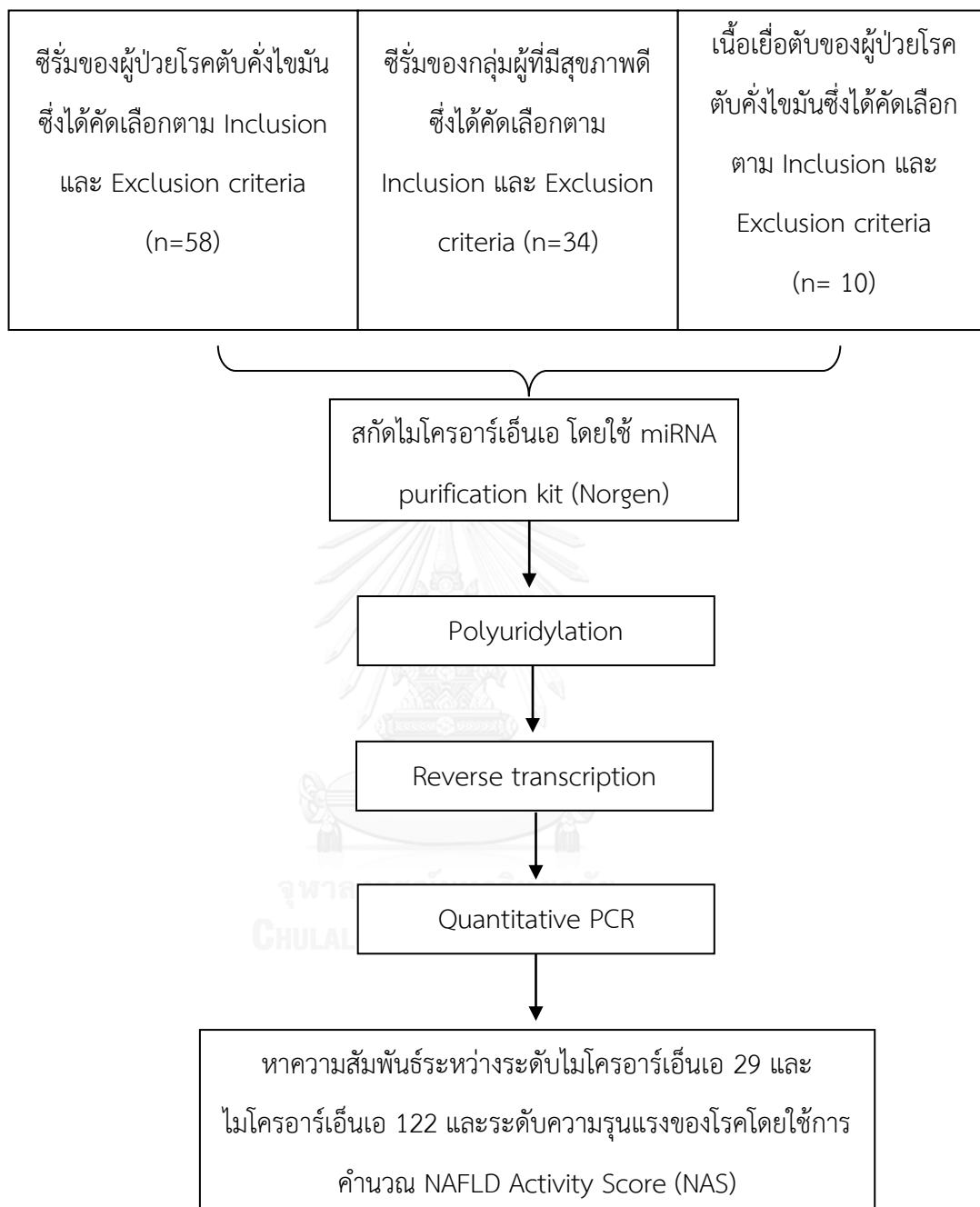
ระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัมและระดับการอักเสบของตับในผู้ป่วยตับคั่งไขมันซึ่งประเมินโดย NAFLD Activity Score (NAS) มีค่าความสัมพันธ์มากกว่า 0.5 ($r > 0.5$)

ขอบเขตของการวิจัย

ขั้นตอนพัฒนาเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์สำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอาร์เอ็นเอ



ขั้นตอนการตรวจหาไมโครอาร์เอ็นเอในผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันและกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี



คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

1. NAFLD activity score (NAS) เป็นการรวมคะแนนจากการตรวจทางพยาธิวิทยาเพื่อใช้วัดการเปลี่ยนแปลงของพยาธิสภาพในตับในผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันโดยใช้ประเมินความรุนแรงของการอักเสบหรือบาดเจ็บของเซลล์ตับได้ ซึ่งประกอบด้วยประกอบด้วยคะแนนของระดับการอักเสบ

(Lobular inflammation) การอักเสบที่เซลล์ตับมีบอลลูน (Hepatocyte ballooning) และปริมาณไขมันในตับ (Steatosis) โดยมีคะแนนรวมตั้งแต่ 0-8 คะแนน โดยที่ NAS \geq 4 แปลว่าตับมีการอักเสบ (Steatohepatitis) โดยอ้างอิงการศึกษาของ Hjelkrem และคณะ (1)

2. ไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ถูกค้นพบในปี 2002 จากการโคลนและหาลำดับเบสของเนื้อเยื่อของหนู โดยไมโครอาร์เอ็นเอ 122 สามารถพบได้ในหนู woodchuck และตับของมนุษย์ เซลล์ตับของมนุษย์ชั้นปฐมภูมิ และเซลล์ Hepa 1-6 ในหนู และ Huh 7 ในมนุษย์ ไมโครอาร์เอ็นเอ 122 เป็นไมโครอาร์เอ็นเอที่พบมากในตับ มีประมาณ 135,000 copies ต่อหนึ่งเซลล์ตับ หรือประมาณ 70% ของไมโครอาร์เอ็นเอที่พบในตับ เป็นไมโครอาร์เอ็นเอที่มีอิทธิพล และมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานที่หลากหลายของตับ ตั้งแต่เมตาบอลิซึมของโคเลสเตอรอล การสังเคราะห์ไขมัน การตอบสนองต่อความเครียด ซึ่งปัจจัยต่างๆเหล่านี้สามารถเชื่อมโยงไปยังกระบวนการต่าง ๆ ที่ไปส่งผลต่อการเกิดโรคตับคั่งไขมันได้

3. สมาชิกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ประกอบด้วย ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี และไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี สำหรับไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี มีสมาชิกสองตัวคือ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี - 1 และไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี - 2 โดย ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ถูกพบเป็นครั้งแรกใน HeLa cell โดย Lagos-Quintana หลังจากนั้นจึงพบ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี และ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ตามลำดับไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ และไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี - 1 ถูก transcribed มาจากโครโมโซม คู่ที่ 7 ตำแหน่งที่ 32 ส่วนไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี - 2 และไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ถูก transcribed มาจากโครโมโซม คู่ที่ 1 ตำแหน่งที่ 32 โดยพบว่า สมาชิกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 นี้มีบริเวณ seed sequence ที่เหมือนกัน จึงสามารถไปทำงานที่ยีนเป้าหมายใกล้เคียงกัน หรือกลุ่มของยีนเป้าหมายเดียวกันได้

คำสำคัญ

Biomarkers, MicroRNA-122, MicroRNA-29, Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

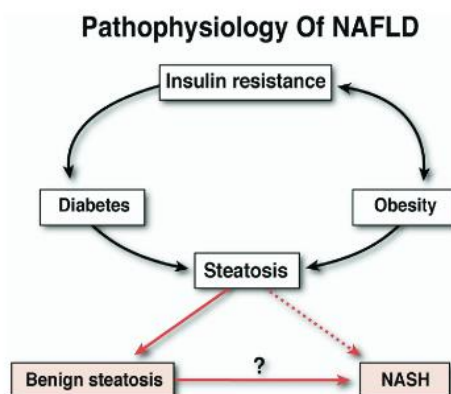
ทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอ บี และซี) และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 กับโรคตับคั่งไขมัน และสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับตรวจวินิจฉัยโรคตับคั่งไขมัน ได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตับคั่งไขมัน (NAFLD)

ภาวะตับคั่งไขมัน เกิดจากการสะสมไขมันพวกไตรกลีเซอไรด์ ในเซลล์ตับมากเกินไปผิดปกติ โดยไม่มีสาเหตุมาจากการดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ ในทางการแพทย์เรียกภาวะนี้ว่า Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) โดยโรคตับคั่งไขมันเป็นโรคที่พบบ่อยที่สุดในโลกฝั่งตะวันตก และฝั่งตะวันออก และเป็นโรคที่เป็นปัญหามากขึ้นเรื่อยๆ มีความชุกของโรคสูงถึงร้อยละ 40 ของประชากรทั่วไป (2, 3) เซลล์ไขมันนี้จะไม่ก่อให้เกิดการเสียหายหรืออักเสบกับตับในระยะแรก แต่มีผู้ป่วยบางส่วนที่ไขมันทำให้เกิดการอักเสบของตับเกิดกลุ่มอาการที่เรียกว่า Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) ในที่สุดก็จะพัฒนาเป็นตับแข็ง (Cirrhosis) ซึ่งพบได้ร้อยละ 20 และบางกรณีสามารถพัฒนาเป็นมะเร็งตับได้ (4) โรคตับคั่งไขมันมักจะตรวจพบโดยบังเอิญจากการตรวจสุขภาพ เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่ยังไม่แสดงอาการในระยะแรกหรือแม้กระทั่งพัฒนาเป็นตับอักเสบหรือตับแข็งและเป็นโรคที่มีความสัมพันธ์กับ metabolic syndrome (5) โดยเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น การสังเคราะห์ไขมันของตับผิดปกติ การเป็นโรคอ้วน (พบถึงร้อยละ 37-90) ไขมันในเลือดสูง เบาหวาน (พบร้อยละ 50-62) หรือความดันสูง เป็นต้น ซึ่งสาเหตุในการเกิดโรคดังกล่าว มีผลมาจากภาวะดื้อต่ออินซูลินร่วมด้วย การมีภาวะดื้อต่ออินซูลินทำให้เกิดความผิดปกติของการเคลื่อนย้ายกรดไขมันอิสระ ทำให้มีการนำกรดไขมันอิสระส่งไปที่ตับมากขึ้น เกิดการสะสมในรูปไตรกลีเซอไรด์ นอกจากนี้กรดไขมันอิสระที่ไปรวมกันอยู่ในตับเป็นจำนวนมากยังทำให้เกิดภาวะ intrahepatic insulin resistance ซึ่งจะยับยั้งกระบวนการ β -oxidation ของ free fatty acid ทำให้ตับย่อยสลายไขมัน ออกจากเซลล์ไม่ได้ เกิดภาวะ fatty liver ตามมา นอกจากนี้ยังทำให้เกิด oxidative stress ซึ่งนำไปสู่การอักเสบในตับ และกระตุ้น การสร้างพังพืด ในตับซึ่งนำไปสู่ภาวะตับแข็งและมะเร็งตับตามมา (6) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 กระบวนการเกิด NAFLD โดยเริ่มจากการเกิดสภาวะดื้อต่ออินซูลิน นำไปสู่โรคเบาหวานและโรคอ้วน และส่งผลต่อการเริ่มเกิดสภาวะการสะสมไขมันนำไปสู่การเกิดโรคตับคั่งไขมันได้ (6)

ปัจจุบันการเจาะตับจัดเป็นมาตรฐานการดูแลรักษาผู้ป่วย NAFLD รวมทั้งสามารถประเมินความรุนแรงของโรคได้ (7) แต่อย่างไรก็ตามการเจาะตับเพื่อนำชิ้นเนื้อมาประเมินทางพยาธิวิทยาอาจมีภาวะแทรกซ้อนได้ เช่น อาการเจ็บบริเวณรอยเข็มเมื่อเย็บแผลหายไปแล้ว หรืออาจมีอาการแน่นท้องหรือปวดร้าวไปที่หัวไหล่ขวาได้ ผู้ป่วยเกิดแผล มีเลือดออก และการเจาะถูกอวัยวะภายในข้างเคียงอื่น ๆ เช่น ถุงน้ำดี ไตขวา โอกาสที่จะเกิดผลข้างเคียงรุนแรงจนเสียชีวิต เช่น ตกเลือดภายในช่องท้อง รวมถึงต้องอาศัยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทางในการตัดชิ้นเนื้อตัวอย่าง (8) ดังนั้นจึงมีการหาวิธีการใหม่ ๆ ที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้ป่วย และสามารถทำได้ง่าย เพื่อมาใช้ในการประเมินการอักเสบหรือการเกิดพังผืดในตับ โดยปัจจุบันมีการใช้ค่าสารต่าง ๆ ในเลือด เพื่อบ่งบอกว่าผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันแต่ละรายมีอาการอักเสบมากน้อยเพียงใด แต่การตรวจหาระดับของสารในเลือดอย่างเดียวไม่สามารถยืนยันผลการวินิจฉัยว่าเป็นโรคได้ ต้องอาศัยการตรวจอย่างอื่นประกอบด้วย เช่น การตรวจทางรังสีวิทยา การตรวจอัลตราซาวด์ (จะพบว่าตับอาจมีขนาดโตขึ้น และมีลักษณะขาวขึ้นกว่าไตและม้าม) การเจาะเลือดดูการทำงานของตับที่มีการอักเสบ (ค่า AST (Aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransferase) สูงกว่าปกติ) ตรวจระดับน้ำตาล ระดับไขมันในเลือดว่าสูงกว่าปกติหรือไม่ หรือตรวจโดยวิธีเอ็กซ์เรย์ คอมพิวเตอร์ (CT SCAN) หรือเอ็กซ์เรย์ สนามแม่เหล็ก (MRI) เป็นต้น นอกจากนี้ยังไม่มีสารใดที่ได้รับการยอมรับในวงกว้างเพื่อมาใช้ในการประเมินการอักเสบในตับของโรคตับคั่งไขมันจึงทำให้มีการหาสารอื่น ๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับ การเกิดพยาธิสภาพของโรคตับคั่งไขมันโดยสารที่ได้รับความสนใจมากขึ้นคือ ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA) ซึ่งไมโครอาร์เอ็นเออาจจะสามารถนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพที่ non-invasive สำหรับการตรวจโรคได้ (9) ทำให้เข้าใจพยาธิกำเนิดของโรคตับคั่งไขมันมากขึ้น และอาจนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการวินิจฉัยการอักเสบของตับในโรคตับคั่งไขมันได้

ข้อมูลของการคำนวณ NAS score

ปัจจุบันได้ใช้ NAFLD Activity Score (NAS) (1) สำหรับการประเมินการอักเสบของตับในผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมัน โดยเกิดจากการรวมคะแนนจากการตรวจทางพยาธิวิทยา ซึ่งใช้ประเมินความรุนแรงของการอักเสบหรือบาดเจ็บของเซลล์ตับได้ ประกอบด้วยคะแนนของระดับการอักเสบ (Lobular inflammation) การที่เซลล์ตับมีบอลลูน (Hepatocyte ballooning) และปริมาณไขมันในตับ (Steatosis) ซึ่งจะมีคะแนนรวมตั้งแต่ 0-8 คะแนน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงคะแนนของ NAFLD Activity Score (NAS) (10)

Lobular inflammation	Hepatocyte Ballooning	Steatosis grade
0: none	0: none	0: <5%
1: <2 foci/20 fields	1: Few ballooned cells	1: 5%-33%
2: 2-4 foci/20 fields	2: Many ballooned cells	2: 34%-66%
3: >4 foci/20 fields		3: >66%

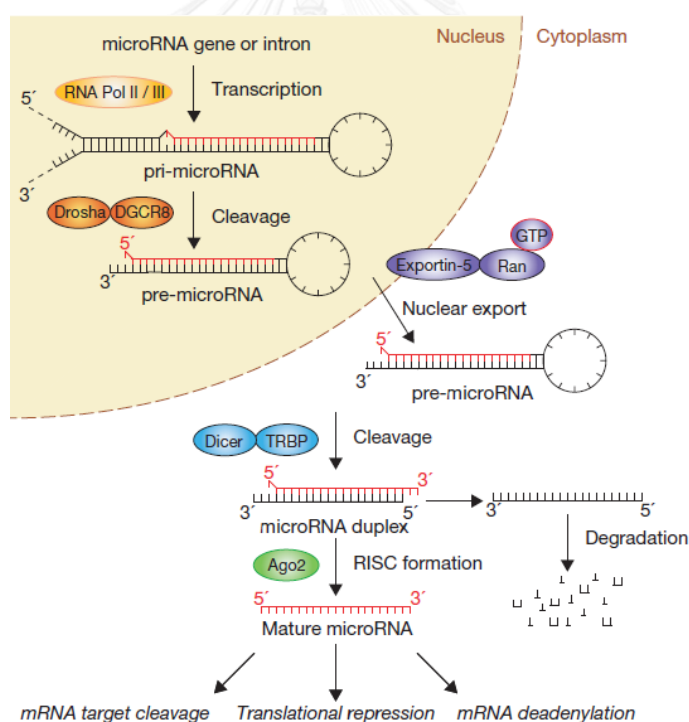
ข้อมูลของการใช้ NAFLD Activity Score (NAS) ซึ่งมีการศึกษาจาก NASH CRN (Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network) ได้กำหนดว่า $NAS \geq 4$ มีสหสัมพันธ์กับตับอักเสบจากโรคตับคั่งไขมัน (NASH) ส่วน $NAS < 4$ มีสหสัมพันธ์กับการไม่มีตับอักเสบ ซึ่งการศึกษาวิจัยต่างๆ ในภายหลัง มักนิยมใช้ค่านี้เป็นค่าอ้างอิงถึงภาวะตับอักเสบจากโรคตับคั่งไขมัน (1)

ไมโครอาร์เอ็นเอ (MicroRNA)

ไมโครอาร์เอ็นเอ (MicroRNA) เป็นโมเลกุลอาร์เอ็นเอในส่วน non-coding region มีขนาดประมาณ 20-23 นิวคลีโอไทด์ มีบทบาทสำคัญต่อพัฒนาการของสิ่งมีชีวิตและการควบคุมการทำงานของเซลล์ ในการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย (11) ทางด้านปลาย 3' หรือ 5' ตรงบริเวณที่ไม่กำหนดการสร้างโปรตีน (untranslated regions) เป็นผลทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างโปรตีน (translational repression) หรือทำให้เอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายถูกย่อยสลายไป (mRNA degradation) ไมโครอาร์เอ็นเอทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนประมาณร้อยละ 30 ของจีโนมทั้งหมด และไมโครอาร์เอ็นเอหนึ่งชนิดสามารถจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอหลายชนิดอย่างจำเพาะ

การสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอ ดังรูปที่ 2 เริ่มต้นในนิวเคลียส โดยอาศัยเอนไซม์ RNA polymerase II หรือ III สร้าง primary microRNA (pri-microRNA) ซึ่งประกอบไปด้วย cap ที่

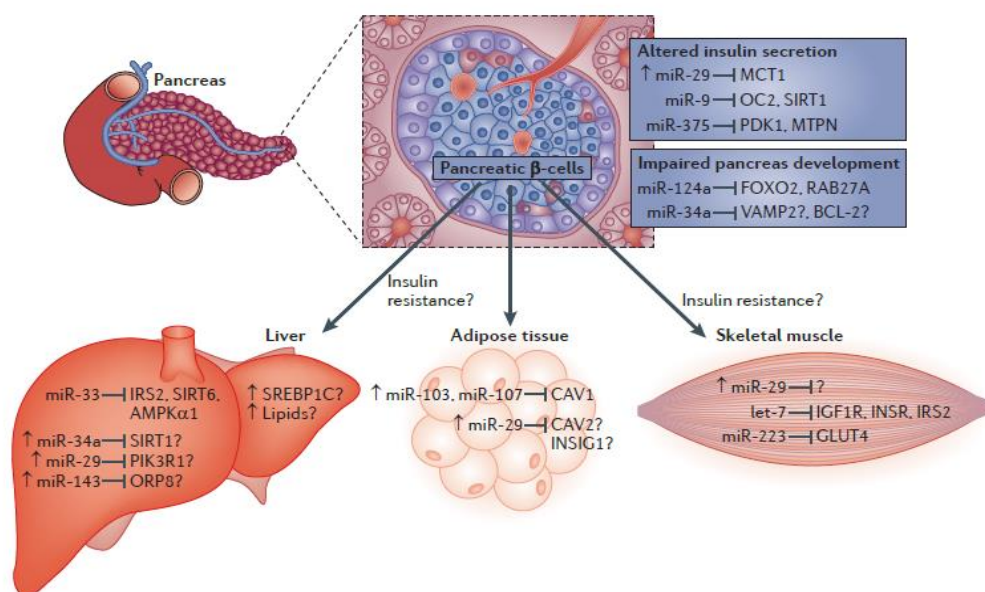
ปลายด้าน 5' และ poly A ที่ปลายด้าน 3' (12) หลังจากนั้น pri-microRNA จะถูกตัดโดยเอนไซม์ Drosha ซึ่งเป็น dsRNA-specific RNase III endonuclease ที่ทำงานร่วมกับโปรตีน DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8) ได้เป็น precursor microRNA (pre-microRNA) ที่มีความยาวประมาณ 60-100 นิวคลีโอไทด์ จากนั้น pre-microRNA จะถูกขนส่งออกมายังไซโทพลาสซึม โดยอาศัยโปรตีน exportin-5 จากนั้นเอนไซม์ Dicer เป็นเอนไซม์นิวคลีเอสในไซโทพลาสซึมจะทำหน้าที่ตัด pre-microRNA ทำงานร่วมกับโปรตีน TRBP (TAR-RNA binding protein) ทำให้ได้ไมโครอาร์เอ็นเอสายคู่ที่มีการเข้าคู่กันแบบไม่สมบูรณ์ มีความยาวประมาณ 20-23 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งไมโครอาร์เอ็นเอสายคู่ จะแยกออกจากกันโดยเอนไซม์ RNA helicase สาย RNA สายหนึ่งจะไปรวมกับโปรตีน Argonaute (Ago) ที่อยู่ในรูป RNA-induce silencing complex (RISC) ในขณะที่อีกสายหนึ่งจะถูกย่อยสลายไป หากมีการเข้าคู่กันอย่างสมบูรณ์แบบของไมโครอาร์เอ็นเอกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย จะทำให้เอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายสลายไป แต่ถ้าจับกันได้เพียงบางส่วน จะเป็นผลให้เกิดการยับยั้งการสร้างโปรตีน โดยไปยับยั้งกระบวนการแปลรหัสของเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย (13)



รูปที่ 2 กระบวนการสร้างและการทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอ (14)

ไมโครอาร์เอ็นเอมีความสำคัญเกี่ยวกับเซลล์ในด้านต่างๆ ดังนี้ การพัฒนา โปรแกรมการตาย การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะอย่าง พลังงานและหน้าที่ของตับในการควบคุม fatty acid (FA) cholesterol metabolism และการพัฒนาของอวัยวะ (2) โดยในงานวิจัยก่อนหน้านี้นี้ ศึกษา lipid metabolism ที่เกี่ยวกับการหลั่งของอินซูลินและการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน

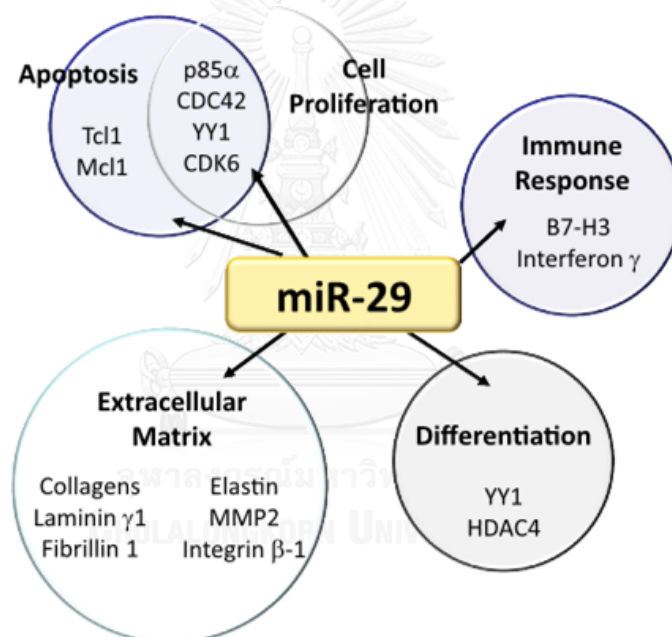
ไมโครอาร์เอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหลังของอินซูลิน ตัวอย่างเช่น ไมโครอาร์เอ็นเอ 124 เอ และ ไมโครอาร์เอ็นเอ 34 เอ เกี่ยวข้องในการพัฒนาของตับอ่อน (ซึ่งมีผลต่อยีน FOXO2 (forkhead box protein O2), RAB27A, VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2) และ BCL-2 (B cell lymphoma 2), ไมโครอาร์เอ็นเอ 29, 9 และ 375 เกี่ยวข้องกับการหลังของอินซูลิน โดย ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ไปกระตุ้นการหลังของอินซูลิน ในขณะที่ไมโครอาร์เอ็นเอ 9 และ 375 จะไปยับยั้งการหลังของอินซูลินผ่านยีน MCT1 (monocarboxylate transporter 1), OC2 (one cut homeobox 2), SIRT1 (sirtuin 1), PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) และ MTPN (myotrophin) นอกจากนี้ไมโครอาร์เอ็นเอ 34 เอ , 29 และ 143 มีบทบาทในระดับต่อยีน เป้าหมายซึ่ง เกี่ยวข้องกับการหลังของอินซูลินเช่นกัน และไปควบคุมยีนต่างๆ ดังนี้ IRS2 (insulin receptor substrate 2), SIRT6, AMPK α 1 (AMP-activated protein kinase- α subunit 1), SIRT1, PIK3R1 (phosphatidylinositol 3-kinase subunit- α) และ ORP8 (oxysterol-binding protein-related protein 8) นอกจากนี้การหลังของอินซูลินใน adipose tissue ถูกควบคุมโดยไมโครอาร์เอ็นเอ 103 และ 107 ผ่านยีน CAV1 (caveolin 1) และไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ผ่านยีน INSIG1 (insulin-induced gene 1) และยีน CAV2 รวมถึงไมโครอาร์เอ็นเอ 29, 223 และ let-7 ที่ อยู่ในเซลล์กล้ามเนื้อเนื้อที่เกี่ยวกับการหลังของอินซูลิน ผ่านยีน IGF1R (insulin-like growth factor receptor 1), INSR (insulin receptor) และ IRS2 และ glucose uptake (GLUT4 (glucose transporter type 4) (15) ดังรูปที่ 3 ซึ่งพบว่า ไมโครอาร์เอ็นเอที่มีบทบาทเด่นเกี่ยวกับกระบวนการหลังของอินซูลิน ที่น่าสนใจคือ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ที่พบทั้งใน liver และใน adipose tissue



รูปที่ 3 microRNA ในกระบวนการ insulin signaling (15)

ไมโครอาร์เอ็นเอ 29

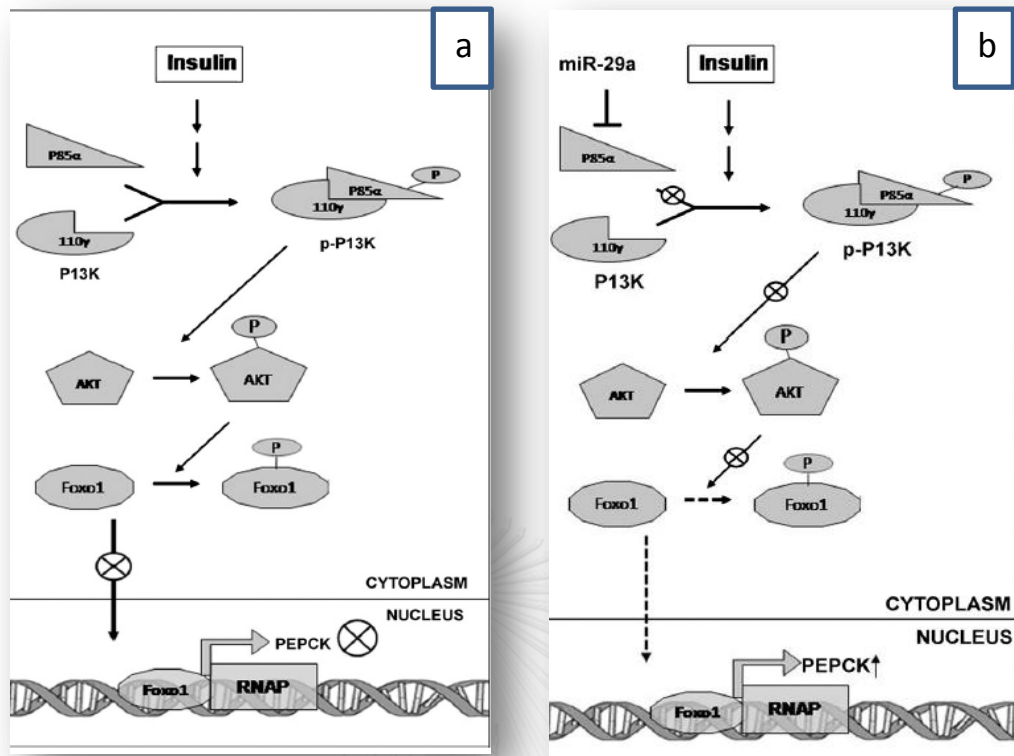
สมาชิกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ประกอบด้วย ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ, ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี และไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี สำหรับไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี มีสมาชิกสองตัวคือ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี - 1 และไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี - 2 โดย ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ถูกพบเป็นครั้งแรกใน HeLa cell โดย Lagos-Quintana (16) หลังจากนั้นจึงพบ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี และ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ตามลำดับ (17, 18) ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ และไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี - 1 ถูกถอดรหัสมาจากโครโมโซม คู่ที่ 7 ตำแหน่งที่ 32 ส่วนไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี - 2 และไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ถูกถอดรหัส มาจากโครโมโซม คู่ที่ 1 ตำแหน่งที่ 32 โดยพบว่าสมาชิกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 นี้มีบริเวณ seed sequence ที่เหมือนกัน จึงสามารถไปทำงานที่ยีนเป้าหมายใกล้เคียงกัน หรือกลุ่มของยีนเป้าหมายเดียวกันได้ (19) ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ (19)

งานวิจัยของ He และ คณะ ในปี 2007 (20) รายงานว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอ บี และซี) ในเซลล์ 3T3-L1 ของกล้ามเนื้อ ซึ่งเป็นเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาวิธีการหลังของอินซูลิน ส่งผลให้มีการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน โดยไปยับยั้งตัวรับอินซูลินที่ 1 (p85) และ down regulate วิถี Akt จากนั้นจึงทดลองยับยั้งไมโครอาร์เอ็นเอ 29 พบว่าวิถี Akt มีการทำงานที่ดีขึ้น จากการทดลองจึงสรุปได้ว่าไมโครอาร์เอ็นเอ 29 มีผลต่อการทำงานของวิถี Akt ที่เกี่ยวกับการส่งผ่านกลูโคสในเซลล์ 3T3-L1 ต่อมาในปี 2009 งานวิจัยของ Jin และคณะ (21) ได้รายงานถึงยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ที่ทำนายผ่าน อัลกอริทึมทางคอมพิวเตอร์ โดยผ่านโปรแกรม TargetScan, miRanda และ PicTar โดยดูถึงยีนเป้าหมายที่จะส่งผลต่อการเกิดของโรค

ตับคั่งไขมัน ซึ่งยื่นเป้าหมายนี้เกี่ยวกับ lipid และ glucose metabolism มีไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ โดยยื่นเป้าหมาย คือ IGF1 (Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)), LPL (Lipoprotein lipase) และ LEP (Leptin (obesity homologue, mouse)) และ inflammatory processes มียื่นเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ คือ TRAF4 (TNF receptor-associated factor 4) ต่อจากนั้นในปี 2011 งานวิจัยของ Pandey และคณะ (22) พบว่าไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ มีการแสดงออกที่มากขึ้นในเซลล์ตับของหนูที่เป็นมะเร็งซึ่งมีการควบคุมผ่านกระบวนการ transcription ต่างๆ และยื่นเป้าหมายของ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ดังแสดงในรูปที่ 5 โดยเกิดสถานะ ต่อดื้ออินซูลิน แล้วส่งผลยับยั้งกระบวนการ Gluconeogenesis มีวิถีที่สำคัญคือ PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) โดยผ่านทาง p85a subunit (22, 23) ซึ่ง PI3K เป็น lipid kinase มีความสามารถในการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับวิถี Akt เกี่ยวกับการแบ่งตัว การเพิ่มจำนวนของเซลล์ ในสภาวะปกติเมื่ออินซูลินมีการหลั่งมาจากเซลล์ของตับอ่อนมาอย่างต่อเนื่อง p85a (adaptor) จะจับเป็น complex กับ p110gamma (catalytic subunit) ของ PI3K pathway ส่งผลให้วิถี Akt (protein kinase B) เกิด phosphorylation ไปกระตุ้น FOXO1 ให้เกิด phosphorylation ทำให้ FOXO1 inactive ไม่ถูก translocate ไปในนิวเคลียสจึงไม่เกิดการ transcription ของ PEPCK (phosphoenol pyruvate carboxykinase) ในทางกลับกันหากเกิดภาวะตื้ออดื้ออินซูลินจะมีไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ มาที่ยั้งการจับของ p85a ที่จะจับเป็น complex กับ p110 gamma ของวิถี PI3K ส่งผลให้วิถี Akt (protein kinase B) ไม่เกิด phosphorylation ดังนั้น FOXO1 ไม่เกิด phosphorylation ทำให้ FOXO1 active ถูก translocate ไปในนิวเคลียสจับกับ PEPCK promoter เกิดการ transcription ของ PEPCK ดังรูปที่ 5 (22) ซึ่ง PEPCK อยู่ในวิถี Gluconeogenesis ส่งผลให้มีการกระตุ้นการสร้างกลูโคสภายในเซลล์มากยิ่งขึ้น ทั้งนี้เซลล์ตับยังสามารถเปลี่ยนกลูโคส ให้อยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์ได้ และหากมี ไตรกลีเซอไรด์ได้ สะสมในเซลล์มากขึ้นจึงอาจเกิดภาวะตับคั่งไขมัน ตามมาได้ ซึ่งทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาปริมาณของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ในซีรัมของผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมัน ว่ามีผลต่อการเพิ่มขึ้นด้วยหรือไม่ รวมถึงปริมาณของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี และ 29 ซี ซึ่งอยู่ในตระกูลเดียวกับ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ว่าจะมีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงในผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมัน



รูปที่ 5 แสดงวิถี PI3K/AKT รูป a แสดงสภาวะปกติ และรูป b แสดงสภาวะดื้อต่ออินซูลิน (22)

งานวิจัยของ Cao และคณะ ในปี 2014 (24) ศึกษาการยับยั้งและการแสดงออกของ GSK-3b บน saturated FFA sodium palmitate-induced cell lipoapoptosis ในเซลล์ตับของ คน พบว่าการควบคุม GSK-3b จะส่งผลไปกระตุ้นการแสดงออกของ JNK activation และ Bax upregulation ซึ่ง GSK-3b เป็นยีนเป้าหมายของวิถี Akt ที่อาจควบคุมผ่านไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ดังนั้นการยับยั้ง GSK-3b อาจจะมีศักยภาพในการควบคุมโรคตับคั่งไขมันได้

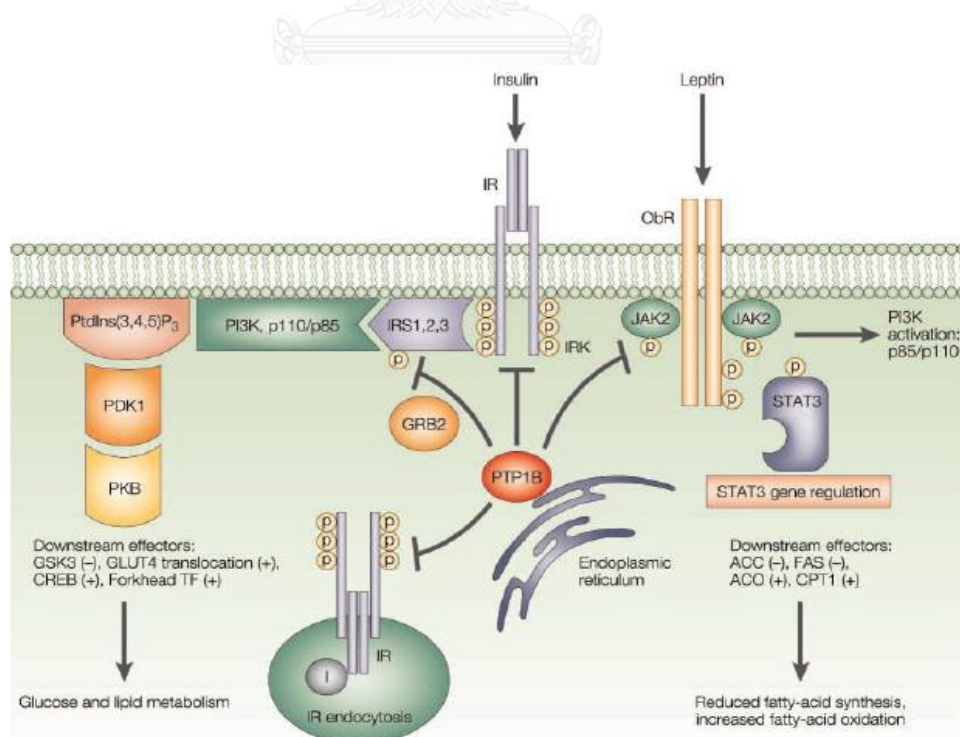
นอกจากนี้กระบวนการของโรคตับคั่งไขมัน เกี่ยวกับการสะสมของไขมัน และภาวะดื้อต่ออินซูลิน ยังมีไมโครอาร์เอ็นเอ 122 เป็นกุญแจหลักของกระบวนการเมแทบอลิซึมของไขมัน (25, 26) เมแทบอลิซึมของโคเลสเตอรอล รวมถึงการตอบสนองต่อความเครียด เป็นต้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ร่วมด้วย

ไมโครอาร์เอ็นเอ 122

ไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ถูกค้นพบในปี 2002 จากการโคลนและหาลำดับเบสของเนื้อเยื่อของหนู โดย ไมโครอาร์เอ็นเอ 122 สามารถพบได้ในหนู woodchuck และตับของมนุษย์ เซลล์ตับของมนุษย์ชั้นปฐมภูมิ และเซลล์ Hepa 1-6 ในหนู และ Huh 7 ในมนุษย์ (27, 28) ไมโครอาร์เอ็นเอ 122

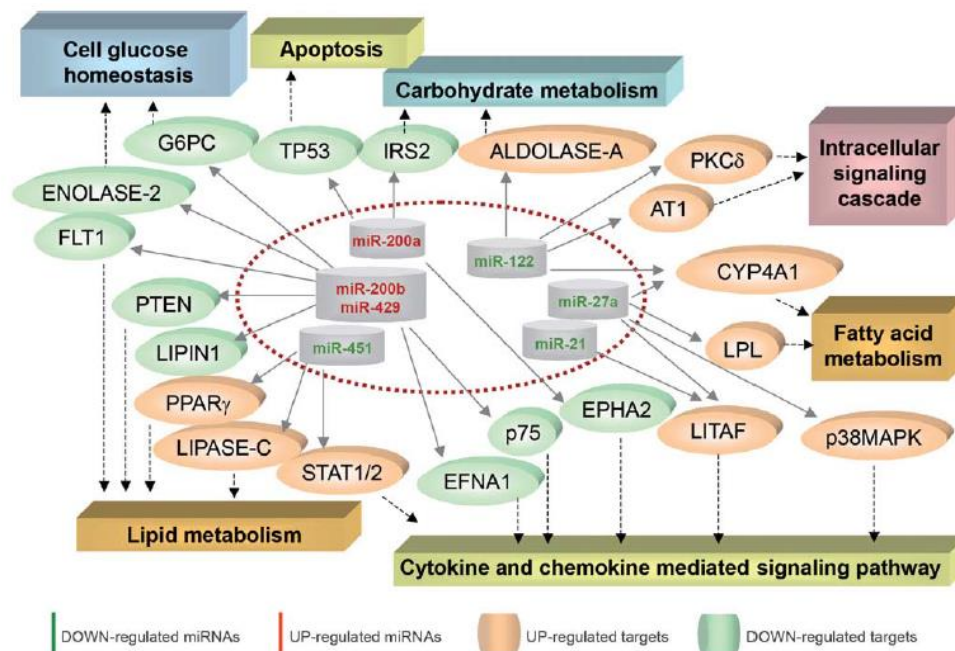
เป็นไมโครอาร์เอ็นเอที่พบมากในตับมีประมาณ 135,000 copies ต่อหนึ่งเซลล์ตับ (29) หรือประมาณ 70% ของไมโครอาร์เอ็นเอที่พบในตับ เป็นไมโครอาร์เอ็นเอที่มีอิทธิพลและมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานที่หลากหลายของตับ (27, 30, 31) ตั้งแต่เมทาบอลิซึมของโคเลสเตอรอล การสังเคราะห์ไขมัน (25) การตอบสนองต่อความเครียด ซึ่งปัจจัยต่างๆเหล่านี้สามารถเชื่อมโยงไปยังกระบวนการต่างๆที่ไปส่งผลต่อการเกิดโรคตับคั่งไขมันได้

จากการศึกษาของ Yang และคณะ ในปี 2012 (26) ศึกษาเกี่ยวกับ protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) ในตับ ซึ่ง PTP1B เป็นยีนที่มีหน้าที่ในกระบวนการส่งสัญญาณของอินซูลิน โดยเป็นยีนที่ไปยับยั้งการทำงานของทั้งตัวรับอินซูลินและซับสเตรทของตัวรับอินซูลิน-1 โดยตัดฟอสเฟตออกจากฟอสโฟไทโรซีน ส่งผลให้ตัวรับอินซูลินไม่อยู่ในรูปที่ทำงานได้ ลดการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ เกิดกระบวนการดื้อต่ออินซูลินและมีผลต่อความไวของระดับน้ำตาลในเลือด จากทำนายผ่านโปรแกรม RNA22 และ TargetScan ทำให้ทราบว่า PTP1B เป็นยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอถึง 8 ตัว (ไมโครอาร์เอ็นเอ 122, 203, 135, 29, 124, 506, 206 และ 1) จากการทดลองพบว่าระดับของเอ็มอาร์เอ็นเอ และโปรตีน PTP1B เพิ่มสูงขึ้นในหนูที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่มีไขมันสูง และมีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน แต่ระดับของไมโครอาร์เอ็นเอทั้งแปดตัวมีเพียงไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ตัวเดียวที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงทำนายว่าไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน โดยผ่านยีน PTP1B ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงการควบคุม insulin metabolic signal-transduction pathways โดย PTP1B (32)

จากการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้นี้พบว่า การไปยับยั้งยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีผลทำให้ระดับโคเลสเตอรอลในพลาสมาลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยไปลดระดับการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์โคเลสเตอรอล คือ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) ซึ่งการยับยั้งนี้เป็นการยับยั้งทางอ้อม ทำให้ไมโครอาร์เอ็นเอสูญเสียหน้าที่การทำงานจากยีนที่ไม่ได้เป็นยีนเป้าหมายโดยตรงของไมโครอาร์เอ็นเอ (33) นอกจากนี้การยับยั้งไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในตับและในเซลล์สปีพันซ์ทำให้มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของระดับโคเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในซีรัมโดยควบคุมการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล และควบคุมการหลั่งของไลโปโปรตีนในตับ (34, 35) นอกจากนี้มีการศึกษาที่ยืนยันเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 คือยีน PPAR family เป็นตัวควบคุม metabolic ของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 (36) รวมถึงมีงานวิจัยที่พบว่าระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ลดลงในผู้ป่วยที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน และมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับไขมันในตับ (37) และในปี 2006 งานวิจัยของ Esau และคณะ (38) ศึกษาทางพยาธิวิทยาเกี่ยวกับไมโครอาร์เอ็นเอ 122 กับโรคตับคั่งไขมัน โดยการยับยั้งไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ทำให้ระดับของไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาลดลงอย่างมีนัยสำคัญ รวมถึงมีการลดลงของตับอักเสบในหนูที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูง พบว่าการยับยั้งไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในหนูที่ได้รับอาหารที่เหนียวนำไปเป็นโรคอ้วน ทำให้ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ acetyl-coenzyme-A carboxylase-2, fatty acid synthetase, sterol regulatory element binding proteins 1-c, 2, stearoyl-CoA desaturase and 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase ลดลง ซึ่งเป็นยีนในการสร้างการสร้างไขมันในผู้ที่มีการอักเสบจากตับคั่งไขมัน นอกจากนี้ในปี 2011 งานวิจัยของ Alisi และคณะ (39) ศึกษาเกี่ยวกับการระบุไมโครอาร์เอ็นเอโดยอาศัยอาหารที่เหนียวนำไปเกิดโรคตับคั่งไขมันในตับของหนูพบว่า ไมโครอาร์เอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพมีไมโครอาร์เอ็นเอ 122, 27a, 451 มีปริมาณลดลงในหนูที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารดังต่อไปนี้ อาหารที่มีไขมันสูงคาร์โบไฮเดรตต่ำ (HFD) อาหารที่มีฟรุกโตสสูง (SD-HF) และอาหารที่มีทั้งไขมันและฟรุกโตสสูง (HFD-HF) นอกจากนี้ยังศึกษาเกี่ยวกับไมโครอาร์เอ็นเอและยีนเป้าหมายที่พบในตับคั่งไขมัน โดยอาศัยโปรแกรม TargetScan, miRanda และ miRecords จากนั้นแบ่งกลุ่มของยีนโดยใช้ gene ontology annotation ดังรูปที่ 7 ซึ่งพบว่า เมื่อไมโครอาร์เอ็นเอ 122 down regulate ลงจะทำให้ยีน ALDOLASE-A, PKC delta, AT1 และ CYP4A1 up regulate ซึ่งจะไปมีผลต่อ เมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต และไขมัน รวมถึงการส่งสัญญาณภายในเซลล์อีกด้วย



รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ของไมโครอาร์เอ็นเอที่จำเพาะกับยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพในการพัฒนาของโรคตับคั่งไขมัน โดยไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ควบคุมยีนผ่านกระบวนการ Carbohydrate metabolism และ Intracellular signaling cascade (39)

งานวิจัยของ Cermelli และคณะ ในปี 2011 (40) ศึกษาาระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122, 34a, 16, 21 ในผู้ป่วยที่เป็นไวรัสตับอักเสบบี และโรคตับคั่งไขมัน ในส่วนของโรคตับคั่งไขมันพบว่าระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 เพิ่มขึ้น 7.2 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.0001$) ระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 16 เพิ่มขึ้น 5.5 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.0001$) ระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 34a เพิ่มขึ้น 2.26×10^4 copies/ml และระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 21 ไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังศึกษาาระดับความรุนแรงของโรค โดยแบ่งผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่เป็นตับอักเสบบแบบไม่รุนแรง (NAS 1-4) และกลุ่มที่เป็น NASH (NAS 5-7) พบว่า กลุ่มที่เป็นตับอักเสบบแบบไม่รุนแรง ระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 เพิ่มขึ้น 5.7 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.0001$) และระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 16 เพิ่มขึ้น 5.3 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.0001$) สำหรับกลุ่มที่เป็น NASH ระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 เพิ่มขึ้น 2.0 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เป็นตับอักเสบบแบบไม่รุนแรง ($P=0.05$) และระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 34a เพิ่มขึ้น 2.8 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เป็นตับอักเสบบแบบไม่รุนแรง ($P=0.09$) รวมทั้งพิจารณาจากค่า AST, ALT, LDL และค่าอื่นๆ ประกอบด้วย จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 และ 34 เอ มีความสัมพันธ์กับระดับการอักเสบของตับและสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับโรคโรคตับคั่งไขมันได้ ในปีเดียวกันงานวิจัยของ Lakner และคณะ (31) พบว่าในสถานะของตับที่จะดำเนินเป็นโรคต่าง ๆ มีไมโครอาร์เอ็นเอต่างชนิดและปริมาณที่แตกต่างกันไป ในสถานะของ NAFLD/NASH ไมโคร

อาร์เอ็นเอที่ upregulation ประกอบไปด้วย ไมโครอาร์เอ็นเอ 34a, 146b, 200a, 224, 222, 10b, 22, 33, 31 และ 29c ส่วนไมโครอาร์เอ็นเอที่ downregulation ประกอบไปด้วยไมโครอาร์เอ็นเอ 122, 181d, 132, 150, 28-3p, 511, 517a, 671-3p, 99b และ 433 ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 2 จากงานวิจัยนี้ได้ข้อมูลที่สนับสนุนว่าไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี สามารถ up regulation และ ไมโครอาร์เอ็นเอ 122 สามารถ down regulate ในกลุ่มที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน ต่อมาในปี 2013 งานวิจัยของ Miyaaki และคณะ (25) ศึกษาเกี่ยวกับระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัมของผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมัน เทียบกับความรุนแรงของโรค โดยเมื่อเทียบระหว่างการตรวจชิ้นเนื้อตับเทียบกับซีรัม พบว่าระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในตับมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัม (Spearman correlation coefficient: 0.461; $P = 0.0005$) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในตับกับระดับการอักเสบของตับ (ชั้น ไม่รุนแรงและชั้นรุนแรง) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างชั้นไม่รุนแรง (<33%) และชั้นรุนแรง (>33%) แต่ระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัมไม่มีความสัมพันธ์กับค่าของ NAS เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัมกับระดับการอักเสบของตับ(ชั้น ไม่รุนแรงและชั้นรุนแรง) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างชั้นไม่รุนแรง (<33%) และชั้นรุนแรง (>33%) จึงสรุปได้ว่าระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในตับและในซีรัมมีความสัมพันธ์กับการเกิดตับอักเสบและการเกิดพังผืด ดังนั้นระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัมสามารถใช้ในการทำนายการเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันได้ ในปีเดียวกันนั้นงานวิจัยของ Yamada และคณะ (41) ศึกษาความสัมพันธ์ของซีรัมไมโครอาร์เอ็นเอ 21, 34a, 122 และ 451 ในผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมัน ซึ่ง เป็นเพศชาย 48 คน และเพศหญิง 44 คน เทียบกับกลุ่มตัวอย่างพบว่าระดับซีรัมไมโครอาร์เอ็นเอ 34a, 122 และ 451 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งสองเพศเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน และกลุ่มควบคุมส่วนซีรัมไมโครอาร์เอ็นเอ 21 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในเพศชาย เมื่อเทียบกับกลุ่มโรคตับคั่งไขมัน และกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังศึกษาระดับความรุนแรงของโรค โดยแบ่งผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันเป็นสองกลุ่มคือกลุ่มที่เป็นตับอักเสบแบบไม่รุนแรง 73 คน และกลุ่มที่เป็นตับอักเสบแบบรุนแรง 19 คน พบว่าระดับซีรัมไมโครอาร์เอ็นเอ 122 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งสองเพศ ดังนั้นจึงสามารถใช้ระดับซีรัมไมโครอาร์เอ็นเอ 122 เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับโรคตับคั่งไขมันได้ พบว่าระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในตับเมื่อเป็น โรคตับคั่งไขมันจะลดลงแต่ถ้าในซีรัมจะเพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะเมื่อตับมีการอักเสบได้รับความเสียหายจะหลั่งไมโครอาร์เอ็นเอจากตับเข้าสู่กระแสเลือดได้ นอกจากนี้งานวิจัยของ Ceccarelli และคณะ ในปี 2013 (2) ได้รวบรวมข้อมูลงานวิจัยต่างๆ เกี่ยวกับบทบาทของไมโครอาร์เอ็นเอในตับของผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันพบว่าระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัมจะ up regulate ในผู้ที่เป็น NAFLD/NASH แต่ระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในเนื้อเยื่อตับจะ down regulate ในผู้ที่เป็น NAFLD/NASH ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยต่างๆข้างต้น

ตารางที่ 2 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในตับกับการพัฒนาของโรคตับ (31)

Liver status	Upregulated miRs	Downregulated miRs
Development	122, 92a, 483, 486-5p, 30 family	22, let 7 family, 199a, 21
NASH/NAFLD	34a, 146b, 200a, 224, 222, 10b, 22, 33, 31, 29c	122, 181d, 132, 150, 28-3p, 511, 517a, 671-3p, 99b, 433
HCV	122, let 7f, 155, 146, 296, 351, 128, 296, 141	196, 15a, 15b, 17, 106a, 181a, 29a, 29b, 93, 310, 30a, 30c, 24, 221, 222
ALD	705, 1224, 212	182, 183, 199a-3p, 199, NSC/NPC: 9, 21, 153, 335
Fibrosis	125-5p, 199b, 221, 302c, 223, 34c, 24	29a, 29b, 29c, 30b, 30c, 183, 96, 877, 341, 193, 132
Regeneration	21, 130a, 181b, 20a, 20b	378, 689, 7

จากงานวิจัยของ Pirola และคณะ ในปี 2014 (42) ศึกษาไมโครอาร์เอ็นเอทั้งหมด 84 ไมโครอาร์เอ็นเอ ที่มีการแสดงออกในโรคตับคั่งไขมัน โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็นสามกลุ่มคือ กลุ่มควบคุม 19 คน กลุ่มที่เป็นตับอักเสบแบบไม่รุนแรง 30 คน และกลุ่ม NASH 47 คน แสดงระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัมของกลุ่ม NASH เพิ่มขึ้น 7.2 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเพิ่มขึ้น 3.1 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่ม NASH กับกลุ่มที่เป็นตับอักเสบแบบไม่รุนแรง ในปีเดียวกันนั้น Xing และคณะ (43) ศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในกลุ่มของคนไข้ที่เป็นมะเร็งตับ ตับแข็ง ไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง พาหะของไวรัสตับอักเสบบี และคนที่มีสุขภาพดี พบว่า ในไมโครอาร์เอ็นเอ 122 คนไข้ที่เป็นมะเร็งตับและไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังมีการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น และในไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ในกลุ่มของคนไข้ที่เป็นตับแข็งมีการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีสุขภาพดี และการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีความสัมพันธ์กับ ดีเอ็นเอไวรัสตับอักเสบบี ของคนไข้ที่เป็นไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง นอกจากนี้การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ยังสวนทางกับระดับของ α -fetoprotein ในคนไข้กลุ่มมะเร็งตับ และการลดลงของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 สัมพันธ์กับการเกิดพังผืดของตับ การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 สัมพันธ์กับการเกิดความเสียหายของตับในกลุ่มคนไข้ที่เป็นไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ดังนั้นการตรวจหาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 อาจจะเป็น

ประโยชน์ในการศึกษาเกี่ยวกับดับที่เสียหายจากการอักเสบและการเกิดพังผืดของดับที่เกี่ยวกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

ซึ่งจากการศึกษาทั้งหมดสนับสนุนว่า ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีบทบาทสำคัญในการควบคุมเมทาบอลิซึมของไขมัน และการพัฒนาของโรคตับคั่งไขมัน (5) ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้อาศัยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ เพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัม โดยตรวจวัดผลด้วยสารเรืองแสง คือ SYBR Green I

เรียลไทม์พีซีอาร์ (Real-time PCR)

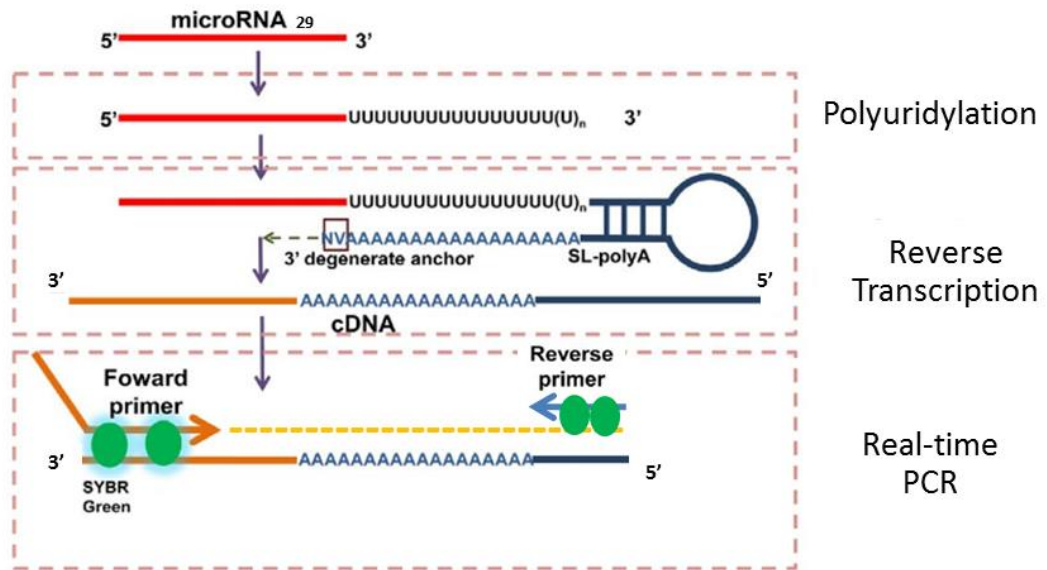
เรียลไทม์พีซีอาร์หรือรู้จักในชื่อ Quantitative PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาอย่างจำเพาะ โดยใช้การติดฉลากด้วยสารเรืองแสงประเภท fluorochrome ทำให้สามารถวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของ ดีเอ็นเอเป้าหมายได้ในทุกในช่วงเวลาที่เกิดปฏิกิริยา ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดปฏิกิริยา (Real-time detection) โดยอาศัยการตรวจวัดสัญญาณสารเรืองแสงที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาในแต่ละรอบของ exponential phase ดังนั้นเมื่อสร้างกราฟการเพิ่มจำนวน (Amplification plot) ที่มีแกน Y แสดงสัญญาณการเรืองแสง และแกน X แสดงจำนวนรอบของการเพิ่มจำนวน จะได้กราฟที่มีลักษณะเป็นรูป S (Sigmoid หรือ exponential curve) (44)

SYBR Green I

SYBR Green I เป็นสี fluorescence ซึ่งสามารถจับกับบริเวณ minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่แบบไม่จำเพาะ ซึ่งในการทำปฏิกิริยาจะใช้คู่ของไพรเมอร์ และสีย้อม SYBR green I เมื่อ SYBR green I ไปจับยังสายคู่ของดีเอ็นเอแล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเปล่งแสงที่มีความยาวคลื่นประมาณ 530 nm ดังนั้นเมื่อเกิดปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วย Real-time PCR สัญญาณของสารเรืองแสง SYBR Green ก็จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น (44, 45)

การใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์สำหรับตรวจวัดการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ

จากงานวิจัยของ Qian Mei และคณะ (2012) (46) ใช้เทคนิคการนำลำดับเบสของไมโครอาร์เอ็นเอ มาทำการเติมเบส U ซึ่งเรียกขั้นตอนนี้ว่า Polyuridylation แล้วจึง Reverse transcription โดยใช้ SL (stem loop) Poly A ได้เป็น cDNA จากนั้นจึงตรวจวัดผลด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยตรวจวัดด้วยสีย้อม SYBR Green ดังรูปที่ 9



รูปที่ 8 เทคนิคการตรวจวัดไมโครอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (46)

โดยความสัมพันธ์ดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในผู้ป่วยที่เป็นโรคตับคั่งไขมันแล้วตรวจวัดผลด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ จากนั้นจึงคำนวณ NAFLD Activity Score (NAS) สำหรับการประเมินการอักเสบของโรคตับคั่งไขมัน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยรูปแบบ Descriptive cross-sectional study และได้ผ่านการพิจารณาและอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee) IRB 357/57

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีสำหรับเตรียม Annealing Buffer

- Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane (BIO BASIC CANADA INC., Canada; Cat No. 77-86-1)
- Sodium Chloride (NaCl) (Merck, Germany; Cat No. 567440)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma, Singapore; Cat No.E5391)

2. สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector

- RBC TA cloning vector kit (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. RC013)
- T4 DNA Ligase (Thermo Scientific, USA; Cat No. EL0011)

3. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดโดยอาศัยเทคนิค Transformation

- Agar (Becton, Dickinson and company (BD), USA; Cat No. RC013)
- Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and company (BD), USA; Cat No. 223000)
- Bacto™ Yeast Extract (Becton, Dickinson and company (BD), USA; Cat No. 210934)
- Sodium Chloride (NaCl) (Merck, Germany; Cat No. 567440)
- Ampicillin (M & H manufacturing, Thailand; Cat No. 1A 26/36)
- Glucose (Ajax Finechem, NZ; Cat No. 783)
- X-gal (AMRESCO, USA; Cat No. 0428)
- Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (AMRESCO, USA; Cat No. 0487)

- Potassium chloride (KCl)

4. สารเคมีสำหรับการสกัดพลาสมิด

- RBC Real Genomics HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. YPD300)

5. สารเคมีสำหรับตรวจสอบยีนด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

- dNTPs ได้แก่ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP (Thermo Scientific, USA; Cat No. R0181)
- DreamTaq DNA polymerase, Recombinant (Thermo Scientific, USA; Cat No. EP0703)
- Specific primers (Integrated DNA Technologies, Singapore)
- DNA template

6. สารเคมีสำหรับ Agarose Gel Electrophoresis

- Agarose (Invitrogen, USA; Cat No. 75510-019)
- 1X TBE
- Ethidium Bromide (AMRESCO, USA; Cat No. X328)
- 100 Bp DNA Ladder H3 RTU (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. DM003-R500)
- Transilluminator (Biogenomed)
- Electrophoresis set (Major Science)

7. สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล (Gel extraction)

- RBC HiYield™ Gel/PCR Fragment Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. YDF300)

8. สารเคมีสำหรับสกัด miRNAs

- NORGEN microRNA Purification kit (Norgen Biotek Corp., Canada; Cat No. 21300)
- Absolute ethanol (Merck, Germany; Cat No. 1009832500)

9. สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ *in vitro* transcription

- RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 (Promega, USA; Cat No. P1300)

10. สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Polyuridylation

- Poly (U) Polymerase (New England Biolabs, USA; Cat No. M0337S)
- RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific, USA; Cat No. E00381)
- UTP, Tris buffered (Thermo Scientific, USA; Cat No. R1479)

11. สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Reverse Transcription

- RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, USA; Cat No. EP0441)
- RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific, USA; Cat No. E00381)
- Stemloop Poly A (SL poly A) primer (Integrated DNA Technologies, Singapore)
- RNA template
- dNTPs ได้แก่ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP (Thermo Scientific, USA; Cat No. R0181)

12. สารเคมีสำหรับทำ Real-Time PCR

- Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA; Cat No. K0222)
- Specific Primers (Integrated DNA Technologies, Singapore)
- DNA template

13. วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

- Cylinder ขนาด 250 ml และ 1000 ml (K-EXAX, USA)
- Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml (ExtraGene, USA)
- Para film (Plastic Packaging, USA)
- PCR tube (BIOLINE, UK)
- Pipette rack (Biohit Oyi, Finland)
- Pipette tip ขนาด 100 μ l, 200 μ l และ 1000 μ l (ExtraGene, USA)
- Polypropylene conical tube ขนาด 15 ml (Gene follower, China)
- Polypropylene conical tube ขนาด 50 ml (ExtraGene, USA)
- Reagent bottle ขนาด 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1000 ml (Schott Duran, Germany)

- Real-time PCR tube (Kisker Biotech, Netherlands)
- Stirring-magnetic bar

14. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- Heater block (Bioer Technology, China)
- Microwave oven (Sharp, Japan)
- Mini Centrifuge (Eppendorf, Germany)
- Automatic adjustable micropipette ขนาด P2 (0.1-2 μ l), P10 (0.5-10 μ l), P20 (2-20 μ l), P200 (20-200 μ l) และ P1000 (100-1000 μ l) (Eppendorf, Germany)
- Balance (Precisa, UK)
- Environmental shaker-Incubator ES-20 (Biosan, UK)
- Freezer -20 °C (Sanyo, Japan)
- Freezer -80 °C (Panasonic, Japan)
- Gel Doc 1000 (Vilber Lourmat, Hong Kong)
- Electrophoresis chamber set (Major Science, USA)
- Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, USA)
- PCR cabinet
- PCR Mastercycler Gradient (Eppendorf, Germany)
- Power supply model 250 (major Science, USA)
- Refrigerator 4 °C (Panasonic, Japan)
- StepOnePlus Real-time PCR System (Applied Biosystems, CA)
- UV transilluminator (Vilber Lourmat, Hong Kong)
- Vortex mixer (Scientific Industries, USA)
- Force Mini (Lio Lab International, Korea)

15. โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การทดลอง

- Oligos Primer Design Software (Version 9.1)
- BioEdit Sequence Alignment Editor (Version 7.0.4.1)
(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)
- miRBase (<http://www.mirbase.org/>)
- miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>)

- Panther (<http://pantherdb.org/>)

ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากรเป้าหมาย (Target Population)

1. ผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันที่มีผลการยืนยันการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา ตามมาตรฐานของเกณฑ์การวินิจฉัยที่เข้ารับการรักษา ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทยโดยเก็บตัวอย่างพร้อมกันแปดเป็น

1.1 ซีรัมที่เหลือจากงานวิจัย เรื่อง “การศึกษาสหสัมพันธ์ระหว่างระดับไมโครอาร์เอ็นเอ 34 เอในซีรัมกับการอักเสบของตับในผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมัน” ซึ่งได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมแล้ว (IRB 032/57)

1.2 ชิ้นเนื้อตับที่นำมาศึกษานั้นเป็นตัวอย่างที่เหลือจากงานวิจัยเรื่อง “การศึกษาสหสัมพันธ์ระหว่างระดับไมโครอาร์เอ็นเอ 34 เอ ในซีรัมกับการอักเสบของตับในผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมัน” ซึ่งได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยแล้ว (IRB 032/57) และได้ขออนุญาตอาสาสมัครในการนำตัวอย่างดังกล่าวมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้ เพื่อนำมาใช้ศึกษาปริมาณไมโครอาร์เอ็นเอเปรียบเทียบกับในซีรัม

2. กลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (healthy control) คือ กลุ่มประชากรสุขภาพดี ซึ่งจะได้รับ ความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

เกณฑ์การคัดเลือกประชากรกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี (Control Population)

1. ผู้ที่ไม่เป็นโรคตับ
2. ค่า ALT อยู่ในเกณฑ์ปกติ (ค่าปกติประมาณ 40 หน่วย/ลิตร)

ได้รับการตรวจคัดกรองว่าไม่มีความเสี่ยงต่อการเป็น metabolic syndrome

เกณฑ์คัดเลือกผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันเข้าร่วมการศึกษา (Inclusion criteria)

1. ประชากรเป้าหมายทุกคนที่มีผลการยืนยันการวินิจฉัยโรคตับคั่งไขมันระดับทางพยาธิวิทยา
2. อายุของทั้ง 3 กลุ่มอยู่ในช่วง 20-70 ปี

เกณฑ์ในการคัดเลืออาสาสมัครทั้งในกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันออกจาก การศึกษา (Exclusion criteria)

1. มีภาวะตับอักเสบจากสาเหตุอื่นร่วมด้วย เช่น ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบดี ตับอักเสบจากภูมิคุ้มกัน
2. ต้มแอลกอฮอล์มากกว่า 140 กรัมต่อสัปดาห์ในผู้ชาย และมากกว่า 70 กรัมต่อสัปดาห์ในผู้หญิงในช่วง 2 ปีที่ผ่านมา หรือมีประวัติติดแอลกอฮอล์

3. ตับแข็งรุนแรง (decompensated cirrhosis) โดยประเมินจาก Child Turcotte Pugh score ตั้งแต่ 7 ขึ้นไป หรือมีน้ำในช่องท้อง มีประวัติเลือดออกในทางเดินอาหารจากเส้นเลือดโป่งพอง (variceal bleeding) มีประวัติสับสนจากโรคตับ (hepatic encephalopathy)
4. รับประทานยาทำให้เกิดภาวะตับอักเสบจากตับคั่งไขมัน (steatohepatitis) ภายในช่วง 6 เดือนที่ผ่านมา ได้แก่ tamoxifen, methotrexate, amiodarone, valproic acid, glucocorticoid เป็นต้น
5. โรคติดเชื้อเอชไอวี และโรคมะเร็งต่างๆ
6. ตั้งครรภ์
7. ผู้ป่วยที่มีโรคอื่นเป็นข้อห้ามในการเจาะตับและตัดชิ้นเนื้อตับ เช่น การแข็งตัวของเลือดผิดปกติ

การคำนวณขนาดตัวอย่าง

อ้างอิงจากการศึกษาของ Cermelli และคณะ (2011) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างระดับไมโครอาร์เอ็นเอ 122 กับระดับการอักเสบของตับโดยใช้ NAS ระหว่าง ≤ 4 และ ≥ 5 นั้นมีค่าเท่ากับ 0.38 (40)

$$\text{จากสูตร} \quad n = \left[\frac{Z_{\alpha/2} + Z_{\beta}}{F_Z} \right]^2 + 3$$

$$\text{โดยที่} \quad F_Z = 0.5 \ln \left[\frac{1+\rho}{1-\rho} \right]$$

กำหนด $\alpha = 0.05$

ρ = ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่อ้างอิงจากการศึกษาก่อน

เพราะฉะนั้น $Z_{\alpha/2} = 1.96$ และ $\beta = 0.1$

เพราะฉะนั้น $Z_{\beta} = 1.28$ และ $\rho = 0.38$ จะได้ $n = 68.6$

เนื่องจากสูตรนี้ใช้ในข้อมูลที่เป็น Parametric data แต่ข้อมูลที่ใช้ในการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ในการศึกษานี้เป็น non-parametric data ดังนั้นกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการศึกษาในแต่ละกลุ่มต้องมีจำนวนอย่างน้อย 70 ราย เพื่อความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของข้อมูล โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. กลุ่มตัวอย่างที่เป็นผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันที่มีผลการยืนยันการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา โดยเป็นซีรัมที่เหลือจากงานวิจัย เรื่อง “การศึกษาสหสัมพันธ์ระหว่างระดับไมโครอาร์เอ็นเอ 34 เอในซีรัมกับการอักเสบของตับในผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมัน” ซึ่งได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมแล้ว (IRB 032/57) จำนวน 70 ราย
2. กลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (healthy control) คือ กลุ่มประชากรสุขภาพดี ซึ่งจะได้รับ ความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จำนวน 70 ราย

นอกจากนี้เพื่อเป็นการเปรียบเทียบระดับไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ระหว่างในซีรัมและในเนื้อเยื่อตับ จึงศึกษาระดับไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในเนื้อเยื่อตับด้วย โดยเป็นเนื้อเยื่อตับที่เหลือจากงานวิจัย เรื่อง “การศึกษาสหสัมพันธ์ระหว่างระดับไมโครอาร์เอ็นเอ 34 เอในซีรัมกับการอักเสบของตับในผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมัน” ซึ่งได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมแล้ว (IRB 032/57) จำนวน 10 ราย

การสังเกตและการวัด (Observation and measurement)

1. ตัวแปรอิสระคือระดับไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัมของผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันและกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีตัวแปรตามคือ NAFLD activity score (NAS) ผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมัน
2. เก็บข้อมูลและวัดผลโดยเก็บข้อมูลทั่วไปได้แก่ ส่วนสูง น้ำหนัก ดัชนีมวลกาย ประวัติการใช้ยาและการดื่มแอลกอฮอล์ ประวัติไวรัสตับอักเสบ ผลเลือดต่างๆ ผลระดับไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อตับผลการตรวจอัลตราซาวด์ และการวัดระดับพังผืดในตับด้วย Fibroscan™ (Transient elastography)

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้ใช้เทคนิค Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction ในการวัดปริมาณไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอ บี และซี) และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัมของผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมัน โดยมีวิธีการดำเนินการดังนี้

การสังเคราะห์ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอ บี และซี) และไมโครอาร์เอ็นเอ 122

1. ออกแบบลำดับเบสของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอ บี และซี) และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 โดยใช้ข้อมูลจาก miRBase (<http://www.mirbase.org>)
2. นำลำดับเบสของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอ บี และซี) และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 แต่ละตัวมาต่อกับ T7 promoter สำหรับใช้ในกระบวนการ *in vitro* transcription (เป็นกระบวนการสร้าง RNA ขึ้นมาในหลอดทดลอง) โดยอาศัย T7 promoter เป็นตัวเริ่มในกระบวนการ transcription มีรูปแบบ (รูปที่ 9 และตารางที่ 3) ดังนี้

2.1 Short oligonucleotide คือ ลำดับเบสของ T7 promoter

2.2 Long oligonucleotide คือ ลำดับเบสที่ complement กับ T7 promoter ซึ่งต่ออยู่กับ anti-sense strand ของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอ บี และซี) และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 แต่ละตัว ดังแสดงในรูปที่ 9 และตารางที่ 3



รูปที่ 9 แสดงการ annealing ของ oligonucleotide สำหรับใช้ในกระบวนการ
In vitro transcription

ตารางที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ชื่อไพรเมอร์	ชนิด	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
miR-29a	Forward	TAGCACCATCTGAAATCGG
miR-29b	Forward	GCACCATTTGAAATCAGTGT
miR-29c	Forward	TAGCACCATTTGAAATCGGT
miR-122	Forward	TGGAGTGTGACAATGGTGT
qPCR	Reverse	GCAGGGTCCGAGGTATTC
U6	Forward	CTCGCTTCGGCAGCACA
T7	Top strand	TAATACGACTCACTATAGGG
T7+miR-29a	Bottom strand	CCGATTTGAGTGGTGCTACCCTATAGTGAGTCGTATTACAA
T7+miR-29b	Bottom strand	ACACTGATTTCAAATGGTGCCCTATAGTGAGTCGTATTA
T7+miR-29c	Bottom strand	ACCGATTTCAAATGGTGCTACCCTATAGTGAGTCGTATTA
T7+miR-122	Bottom strand	ACACCATTGTCACACTCCACCCTATAGTGAGTCGTATTA
M13_F	Forward	GTTTTCCCAGTCACGAC
M13_R	Reverse	TCACACAGGAAACAGCTATGAC

3. Duplex template preparation ทำการเชื่อมสายของ Short oligonucleotide และ Long oligonucleotide ให้เป็น double strand ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการทำ duplex template

สารเคมี	ปริมาตร (μl)
Oligo T7 (10 μM)	4.35
Oligo T7 + miRNA (10 μM)	4.35
Nuclease free water	1.3

- หลังจากนั้นผสมกัน และบ่มที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 1 นาที
- บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

4. *In vitro* transcription โดยใช้ Ribomax large scale RNA production system T7 (Promega) ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการทำ *in vitro* transcription

สารเคมี	ปริมาณ (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
5x T7 transcription buffer	4.0	1x
25mM rNTPs (ATP, CTP, GTP, UTP)	6.0	7.5 mM
Linear DNA template (5-10 μg total)	5.0	-
Nuclease free water	3.0	-
10x Enzyme mix (T7 RNA polymerase)	2.0	1x
รวม	20	

- บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง
- ใส่ RQ1 RNase free DNase ปริมาตร 5 μl
- บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมตัวอย่างโดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 แบบ ดังนี้

1. ตัวอย่างจากเทคนิค *in vitro* transcription

1.1 ใส่ 150 μl of 96 – 100% ethanol ลงไปใน mixture ที่ได้จากกระบวนการ *in vitro* transcription แล้วผสมเป็นเวลา 10 วินาที

2. ตัวอย่างที่เป็นซีรัมกลุ่มผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน 58 คน และกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี 34 คน

2.1 ซีรัมจากกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีหรือผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน 100 μl ใส่ใน RNase-free microcentrifuge tube

2.2 ใส่ 100 μl ของ Lysis buffer (5% SDS) ผสมเป็นเวลา 15 วินาทีจากนั้นใส่ 500 μl ของ Lysis solution แล้วผสมเป็นเวลา 15 วินาทีจากนั้นบ่มที่ 50°C เป็นเวลา 30 นาที

2.3 ใส่ 40 μl of 96 – 100% ethanol ลงไปใน lysate แล้วผสมเป็นเวลา 10 วินาที

3. ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อตับของผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน แบ่งเป็นสองกลุ่มคือ ชั้นไม่รุนแรง (n=5) เทียบกับชั้นรุนแรง (n=5)

3.1 ตัดชิ้นเนื้อตับที่ต้องการ ปริมาณไม่เกิน 20 mg

3.2 นำเนื้อเยื่อมาบดโดยใช้เครื่องตำ ขณะบดให้ใส่ไนโตรเจนเหลว ปริมาตรเท่ากับชิ้นเนื้อ

3.3 ทิ้งให้ไนโตรเจนเหลวระเหย โดยไม่ให้เนื้อเยื่อละลาย

3.4 ใส่ 400 μl ของ lysis solution ลงไปในเนื้อเยื่อ จากนั้นบดให้ละเอียด

3.5 ใช้ปิเปตดูดมาใส่ RNase-free microcentrifuge tube

3.6 ปั่นเป็นเวลา 2 นาทีเพื่อให้เซลล์แตกตะกอน จากนั้นดูดส่วนใสมาใส่ RNase-free Microcentrifuge tube

3.7 ใส่ 96-100% ethanol ปริมาตรครึ่งหนึ่งของส่วนใส (50 μ l ของ ethanol ต่อ 100 μ l ของส่วนใส) แล้วจึงผสมให้เข้ากันโดยการ vortex จากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอนดังนี้

Large RNA Removal

1 ใส่ Large RNA Removal Column ลงใน collection tube

2 นำ lysate ที่ผสมกับ ethanol (จากการเตรียมตัวอย่างขั้นที่ 1.1 หรือ 2.3) ใส่ใน column และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

3 เก็บของเหลว หรือ ดูดของเหลวใส่ micro centrifuge tube

Small RNA Capture

1. ใส่ 350 μ l ของ 96 -100% ethanol แล้วผสมโดยผสมเป็นเวลา 10 วินาที

2. ใส่ microRNA Enrichment Column ลงบน collection tubes

3. นำ lysate ที่ผสมกับ ethanol ใส่ลงบน column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

4. เทของเหลวทิ้ง แล้วดูด lysate ที่ผสมกับ ethanol ที่เหลือใส่ spin column ที่อยู่บน collection tube

5. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีเพื่อเป็นการเก็บ small RNA ที่สมบูรณ์

Column Wash

1. เติม 400 μ l Wash Solution ลงไปใน microRNA Enrichment Column และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

2. เทของเหลวทิ้งและใส่ column ลงบน collection tube เช่นเดิม

3. ทำซ้ำในขั้นของ Column Wash ข้อที่ 1 และ 2 อีกครั้ง

4. ล้างครั้งที่ 3 โดยเติม Wash Solution 400 μ l และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

5. เทของเหลวทิ้ง และใส่ column ลงบน collection tube

6. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาทีเพื่อ dry

Small RNA Elution

1. ใส่ microRNA Enrichment Column ไปในหลอด Elution tube หลอดใหม่
2. ใส่ 50 μl ของ Elution Solution ลงไปใน column
3. ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 2 นาที ที่ 2000 รอบต่อนาที ตามด้วย ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที 1 นาที หากสารยังเคลื่อนลงมาในหลอดไม่หมด ให้ทำการปั่นอีกครั้งที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
4. เก็บ Small RNA ที่ -70°C

Polyuridylation

เป็นกระบวนการเติมเบส U ที่ปลาย 3' ของไมโครอาร์เอ็นเอ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Poly (U) polymerase รายละเอียด ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการทำ polyuridylation

สารเคมี	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10x NE buffer 2	2.5	1x
UTP (50mM)	0.3	0.5 mM
Small RNA (>100 pmol)	20.2	-
RNase inhibitor (40 units/ μl)	1.0	40 Units
Poly (U) polymerase (2 units/ μl)	1.0	2 Units
รวม	<u>25</u>	

บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที

Reverse transcription โดยใช้ RevertAid reverse transcriptase

1. ใส่ stem loop (SL) poly A primer (10 μM) ปริมาตร 0.2 μl ลงใน microcentrifuge tube
2. ใส่ Small RNA ที่เติม poly U แล้ว (จากขั้นตอน polyuridylation) ปริมาตร 12.3 μl ผสมกับ SL poly A primer
3. บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที แล้ว จึงวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที
4. Spin down แล้วจึงวางบนน้ำแข็ง 2 นาที จากนั้นใส่สารเคมีดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการทำ reverse transcription

สารเคมี	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
5x reaction buffer	4.0	1x
RNase inhibitor (40 units/ μl)	0.5	20 Units
dNTP mix (10mM)	2.0	1 mM
RevertAid Reverse Transcriptase (200U)	1.0	200 Units
รวม	<u>7.5</u>	

หลังจากนั้นปั่นที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาที่ 70°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงเก็บที่ -20°C

การเพิ่มจำนวน cDNA ของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ด้วยวิธี PCR

ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงส่วนผสมสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA

สารเคมี	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Distilled water	19.88	-
10x DreamTaq Buffer	2.5	1x
DreamTaq DNA polymerase (5 units/ μl)	0.12	0.6 Units
10 μM Forward primer	0.5	0.5 μM
10 μM Reverse primer	0.5	0.5 μM
10 mM dNTPs mixture	0.5	0.5 mM
Template DNA	1.0	-
รวม	<u>25</u>	

จากนั้นนำ PCR tube ที่ใส่ส่วนผสมของสารเคมีทั้งหมดใส่ในเครื่อง Thermal cycler (Eppendorf Master cycler personal) ในสภาวะอุณหภูมิ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122

PCR cycle	อุณหภูมิ	เวลา	ทำซ้ำ 50 รอบ
Pre-denaturation	94 °C	3 นาที	
Denaturation	95 °C	15 วินาที	
Annealing	51 °C	30 วินาที	
Extension	60 °C	30 วินาที	
Post-extension	72 °C	5 นาที	

ตรวจสอบผลการทำ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

1. นำ PCR product ที่ได้มาทำการแยกด้วย 2% Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็น marker จากนั้นย้อมดูแถบ DNA ด้วยสารละลาย Ethidium bromide เพื่อตรวจสอบขนาด DNA ที่ต้องการ
2. ตัด gel บริเวณที่มีแถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการ (80 bp) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel Extraction ด้วย HiYield™ GelExtraction Kit
 - 2.1 ตัด agarose gel ที่มี DNA ที่สนใจ โดยตัด gel ส่วนที่ไม่มี DNA ออก
 - 2.2 ใส่ชิ้น agarose gel ที่ได้ลงใน microcentrifuge tube
 - 2.3 เติม DF Buffer 500 µl ลงใน microcentrifuge tube ดังกล่าว ผสมให้เข้ากัน
 - 2.4 บ่มที่อุณหภูมิ 55 °C 10-15 นาที หรือจนกระทั่ง agarose gel ละลายหมด โดยระหว่างบ่มนั้นควรรกกลับ microcentrifuge tube ทุกๆ 2-3 นาที
 - 2.5 นำสารละลายที่ได้ในข้อ 2.4 ใส่ลงใน DF column ที่วางอยู่ใน collection tube
 - 2.6 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
 - 2.7 ถ่ายของเหลวใน collection tube ออก แล้วใส่ DF column กลับไปใน collection tube
 - 2.8 เติม Wash Buffer 600 µl ลงใน DF column
 - 2.9 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที (ทำข้อ 2.8 และ 2.9 ซ้ำอีก 1 รอบ)
 - 2.10 ถ่ายของเหลวใน collection tube ออก แล้วใส่ DF column กลับไปใน collection tube อีกครั้ง
 - 2.11 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
 - 2.12 ถ่าย DF column ไปยัง microcentrifuge หลอดใหม่
 - 2.13 เติม Elution Buffer 30 µl ลงไปใน column

2.14 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ Elution Buffer ถูกดูดซึมบนเยื่อใน DF column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

การเตรียมตัวแปรควบคุมเชิงบวกด้วยวิธี cloning

เมื่อได้ผลของยีนในส่วนที่ต้องการแล้วจะนำมาทำการโคลนเพื่อเก็บเป็นตัวแปรควบคุมเชิงบวกและเพื่อใช้ในการหาค่า specificity และ sensitivity ของไพรเมอร์ต่อไป โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. Ligation สู่ *E.coli*

เตรียมสารละลายสำหรับหารทำ Ligation ระหว่าง PCR product กับพลาสมิด T/A vector (RBC) ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการ ligation

สารเคมี	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X Ligation buffer	1.0	1x
TA cloning vector (RBC) (25 ng/µl)	2.0	5 ng/µl
T4 DNA ligase (5 units/µl)	1.0	5 Units
Purified PCR product	6.0	-
รวม	<u>10</u>	

บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2. Transformation ด้วยวิธี heat shock

2.1 เตรียม competent cell ปริมาตร 50 µl ในหลอด 1.5 ml จากนั้นเติมสารละลาย ligation 10 µl

2.2 นำหลอดไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

2.3 เพิ่มอุณหภูมิขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยการแช่หลอดใน water bath ที่อุณหภูมิ 42°C, 90 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิด้วยการบ่มบนน้ำแข็ง 2 นาที

2.4 เติม SOC medium ปริมาตร 950 µl ลงในหลอด

2.5 นำไปเขย่าด้วยความเร็วประมาณ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

2.6 จากนั้นนำไปปั่นที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

2.7 เทสารละลายทิ้ง จะเหลือตะกอนของเซลล์ที่ก้นหลอดประมาณ 50 µl ผสมให้เข้ากัน

2.8 spread บน LB agar plate ที่มี Ampicillin (Ampicillin 100 µl ต่อ media 100 ml) , X-gal 15 µl และ IPTG 5 µl

2.9 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ซ้ำมคืน เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับ recombinant plasmid ด้วยวิธี Blue/White Selection

3. Blue/White Colony selection

3.1 คัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB agar มาใส่ลงใน LB broth

3.2 นำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ที่มีพลาสมิด

4. Plasmid extraction โดยใช้ชุดสกัด HiYield™ plasmid minikit

4.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการสกัดพลาสมิดปริมาตร 1.5 ml มาใส่ลงในหลอด 2 ml

4.2 นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีเพื่อสลายเซลล์ให้แตกก่อนเซลล์ไว้

4.3 นำเซลล์ที่ได้มาละลายในสารละลาย PD 1 buffer ปริมาตร 200 μ l ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex จากนั้นใส่ PD 2 buffer 200 μ l ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex และใส่ PD 3 buffer 200 μ l ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา

4.4 นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

4.5 นำส่วนใสจากการปั่นไปใส่ PD column แล้วจึงนำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

4.6 เติม W1 buffer ปริมาตร 600 μ l แล้วจึงนำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทสารละลายด้านล่างทิ้ง

4.7 เติม wash buffer ปริมาตร 600 μ l แล้วจึงนำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทสารละลายด้านล่างทิ้ง

4.8 นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

4.9 จากนั้นนำ spin column ใส่ลงใน collection tube ใหม่และเติม elution buffer ปริมาตร 30 μ l และบ่มเป็นเวลา 2 นาที

4.10 นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

4.11 วัดค่าการดูดกลืนแสงของพลาสมิดที่สกัดได้ที่ความยาวคลื่น 260 nm (A_{260}) เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิด ความบริสุทธิ์ ของสารละลายพลาสมิด (DNA purity) คำนวณโดยอาศัยความสัมพันธ์ ของอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} โดยความบริสุทธิ์ที่คำนวณได้ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.7-2.0

คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิดในหน่วย $\mu\text{g/ml}$

$$[\text{DNA}] \mu\text{g/ml} = (A_{260} - A_{320}) \times \text{dilution factor} \times 50$$

กำหนดให้ 1 หน่วยของ $A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$ ของสารละลาย DNA บริสุทธิ์

Dilution factor = จำนวนเท่าของการเจือจาง

คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิดในหน่วย Copy/ μl

$$[\text{DNA}] \text{ Copy/ } \mu\text{l} = \frac{[\text{DNA}] (\text{g/ } \mu\text{l}) \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{Length of recombinant plasmid (nt)} \times 660}$$

การคำนวณค่า Sensitivity ของไพรเมอร์ด้วยการทำ 10 fold serial dilution

เมื่อทราบค่าความเข้มข้นของพลาสมิดสำหรับใช้ Positive control แล้ว จึงนำมาทำ serial dilution โดยกำหนดให้ dilution factor เท่ากับ 10 (10 fold serial dilution) และให้มีค่าความเข้มข้นของ พลาสมิดอยู่ระหว่าง $10^1 - 10^{10}$ copies/ μl ต่อ real-time PCR reaction ค่า sensitivity คือค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถให้ PCR product ขนาดตรงตามต้องการได้ ซึ่งค่าความเข้มข้นที่ยอมรับได้สำหรับการทำ real-time PCR คือประมาณ $10^2 - 10^8$ copies/ μl และสามารถคำนวณหาค่า efficiency ได้จาก $10^{(-1/\text{slope})}$

Quantitative real-time PCR

ตารางที่ 11 แสดงปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการทำ real-time PCR

สารเคมี	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
2x Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	6.3	1x
10 μM Forward primer	0.4	0.32 μM
10 μM Reverse primer (miRNA qPCR reverse)	0.4	0.32 μM
cDNA	1.0	-
Distilled water	4.4	-
รวม	<u>12.5</u>	

ตารางที่ 12 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ และซี

Real-time cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
Holding stage	95	3 นาที
Denaturation	95	15 วินาที
Annealing	62	30 วินาที*
Extension		

} ทำซ้ำ 50 รอบ

* หมายถึง Fluorescence detection

ตารางที่ 13 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี

Real-time cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
Holding stage	95	3 นาที
Denaturation	95	15 วินาที
Annealing	63	30 วินาที*
Extension		

} ทำซ้ำ 50 รอบ

* หมายถึง Fluorescence detection

ตารางที่ 14 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ Real-time PCR ของไมโครอาร์เอ็นเอ 122

Real-time cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
Holding stage	95	3 นาที
Denaturation	95	15 วินาที
Annealing	60	30 วินาที*
Extension		

} ทำซ้ำ 50 รอบ

* หมายถึง Fluorescence detection

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยเลือก unpaired t-test เนื่องจากตัวแปร 2 กลุ่มเป็นอิสระต่อกัน จากโปรแกรม SPSS version 22 และกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$)

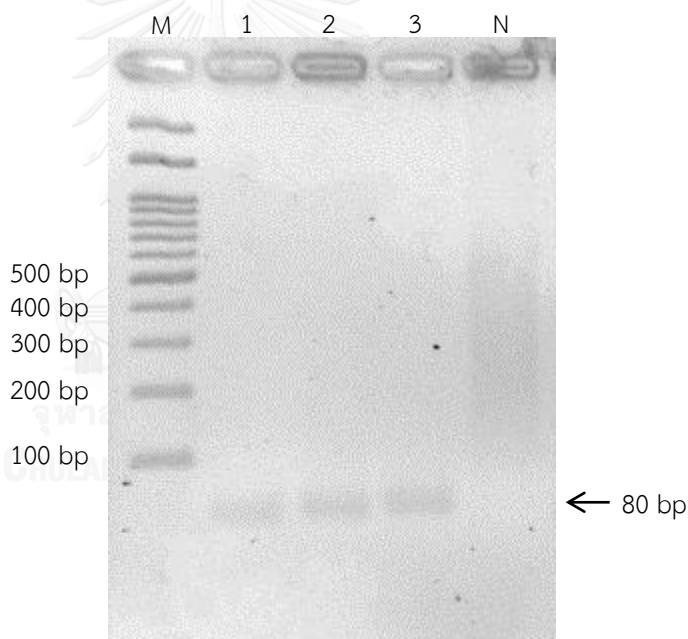
บทที่ 4

ผลการทดลอง

การสร้างตัวแปรควบคุมเชิงบวกสำหรับตรวจวัดการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ

การตรวจ cDNA จากกระบวนการ *in vitro* transcription

เมื่อออกแบบลำดับเบสของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอ บี และซี) และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 และทำให้เกิดกระบวนการ *in vitro* transcription, microRNA purification, polyuridylation และ reverse transcription ตามลำดับ หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel และใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น Marker ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 80 bp ดังรูปที่ 10

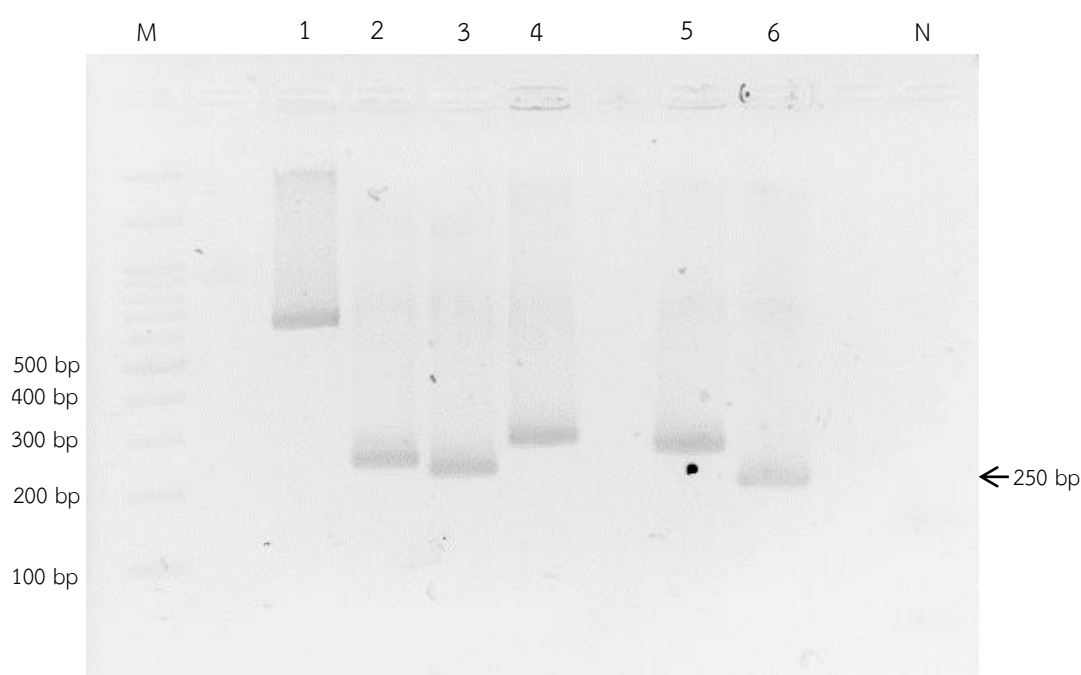


รูปที่ 10 ตัวอย่างการตรวจสอบ cDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ต้องการของไมโครอาร์เอ็นเอ

29 เอ โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel และใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น marker และมี miR-29a_F และ qPCR_R เป็นไพรเมอร์ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดประมาณ 80 bp โดย M; Marker 100 bp, 1; miR-29a-1, 2; miR-29a-2, 3; miR-29a-3, N; Negative

การตรวจสอบพลาสมิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

หลังจากนั้นทำการ cloning cDNA เพื่อเพิ่มจำนวน positive control โดยนำ cDNA ที่ได้ไป ligation เข้าสู่ TA vector แล้วนำมาโอนถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* โดยใช้ความร้อน (Heat shock) หลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง พบว่ามีโคโลนีขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar แล้วจึงเลือกโคโลนีที่สนใจมาตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ M13_F เป็น forward primer และ M13_R เป็น reverse primer เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธี 2% agarose gel electrophoresis ผลิตรหัสที่ได้ควรมีขนาดประมาณ 250 bp ดังรูปที่ 11

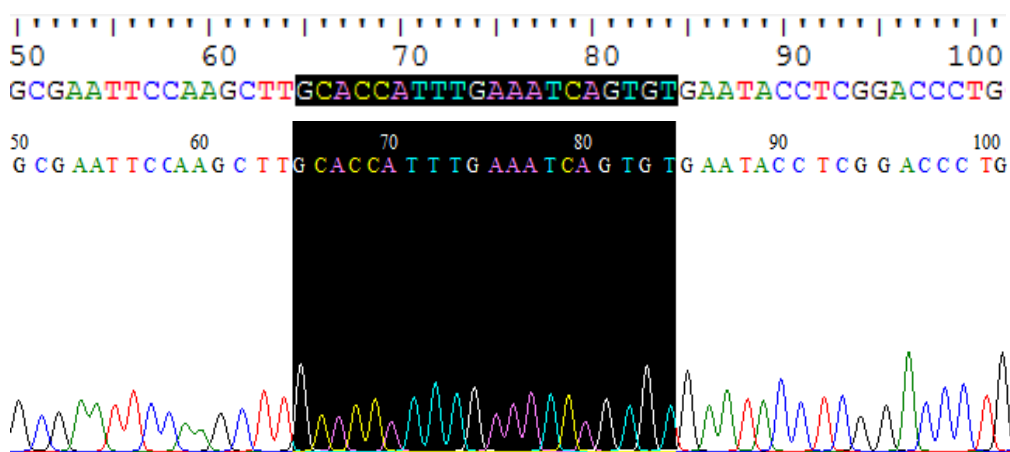


รูปที่ 11 การตรวจสอบพลาสมิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ต้องการของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ปี โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel และใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น marker และมี M13_F และ M13_R เป็นไพรเมอร์ ผลิตรหัสที่ได้มีขนาดประมาณ 250 bp โดย M; Marker 100 bp, 1-6; colony 1-6, N; Negative

จากผลการตรวจสอบด้วยวิธี 2% agarose gel electrophoresis ดังนั้นเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีขนาดประมาณ 250 bp (โคโลนีที่ 2, 3, 4, 5 และ 6) มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว LB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำพลาสมิดที่มียีนที่สนใจมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี HiYield™ Plasmid Mini Kit

การตรวจสอบพลาสมิดด้วยเทคนิค nucleotide sequencing

เมื่อได้ขนาดผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี HiYield™ Plasmid Mini Kit แล้วทำการตรวจสอบพลาสมิดต่อด้วยเทคนิค nucleotide sequencing เพื่อเป็นการยืนยันผล ดังรูปที่ 12 จากผลพบว่าใน TA vector มีชิ้นส่วนของไมโครอาร์เอ็นเอที่ต้องการแทรกอยู่และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้อง ดังนั้นในขั้นตอนนี้จะได้พลาสมิดของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอ บี และซี) ไมโครอาร์เอ็นเอ 122 และ U6 นำไปใช้เป็น positive control สำหรับการทำให้รีลไทม์พีซีอาร์ต่อไป



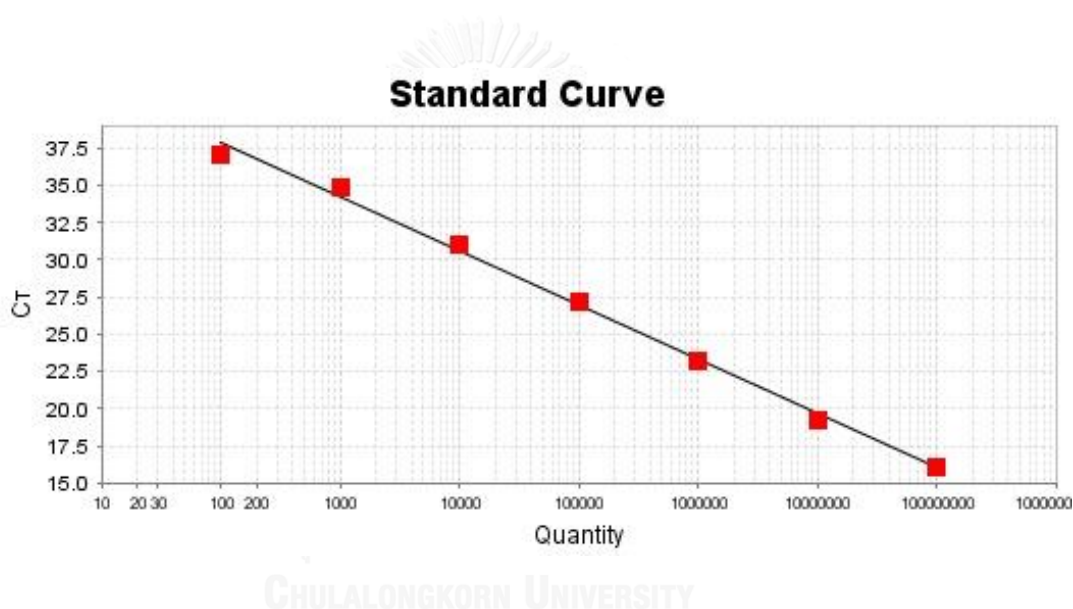
รูปที่ 12 Chromatogram แสดงตัวอย่างผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ปี การทดสอบ Sensitivity โดยการสร้างกราฟมาตรฐานของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ไมโครอาร์เอ็นเอ 122 และ U6 โดยวิธีการเรียลไทม์พีซีอาร์

การสร้างกราฟมาตรฐานของไมโครอาร์เอ็นเอแต่ละตัว โดยจะใช้พลาสมิดที่ได้มาเป็น DNA ต้นแบบ เมื่อนำพลาสมิดที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของพลาสมิดที่สกัดได้ที่ความยาวคลื่น 260 nm (A_{260}) เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิด จะทราบค่าความเข้มข้นของพลาสมิด สำหรับใช้เป็นตัวแปรควบคุมเชิงบวกแล้ว จึงนำมาทำ serial dilution โดยกำหนดให้ dilution factor เท่ากับ 10 (10 fold serial dilution) และให้มีค่าความเข้มข้นของ พลาสมิดอยู่ระหว่าง 10^1 - 10^{10} copies/ μ l ต่อ real-time PCR reaction พบว่าค่า sensitivity สำหรับการทำให้ real-time PCR เป็นดังนี้

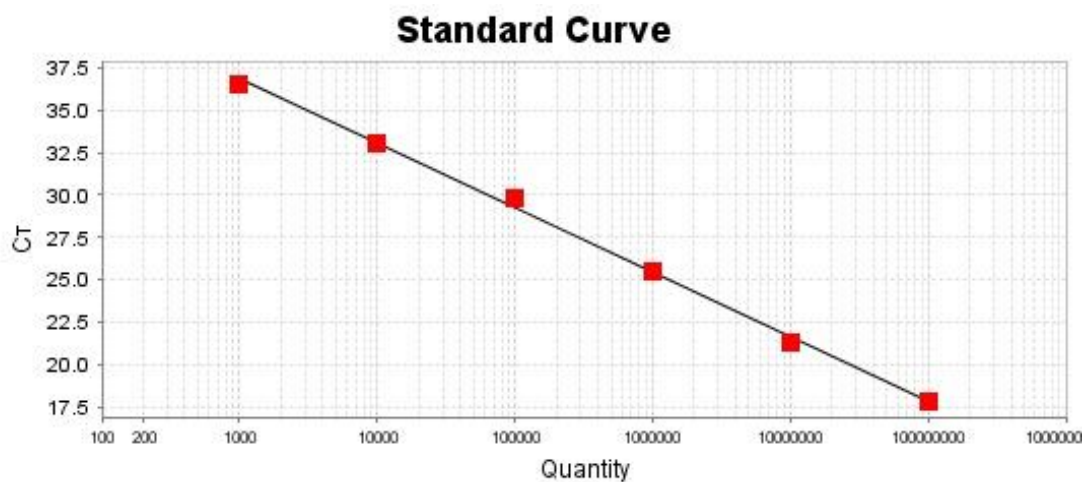
- ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ มีความจำไวอยู่ในช่วง 10^2 - 10^8 copies/ μ l efficiency เท่ากับ 97.08% (slope = -3.394 และ $R^2 = 0.994$) ดังรูปที่ 13
- ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี มีความจำไวอยู่ในช่วง 10^3 - 10^8 copies/ μ l efficiency เท่ากับ 82.833 % (slope = -3.861 และ $R^2 = 0.998$) ดังรูปที่ 14

- ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี มีความจำไวอยู่ในช่วง 10^2 - 10^8 copies/ μ l efficiency เท่ากับ 89.54% (slope = -3.601 และ $R^2 = 0.996$) ดังรูปที่ 15
- ไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีความจำไวอยู่ในช่วง 10^2 - 10^8 copies/ μ l efficiency เท่ากับ 101.06% (slope = -3.297 และ $R^2 = 0.999$) ดังรูปที่ 16
- U6 มีความจำไวอยู่ในช่วง 10^2 - 10^8 copies/ μ l efficiency เท่ากับ 105.118% (slope = -3.205 และ $R^2 = 0.991$) ดังรูปที่ 17

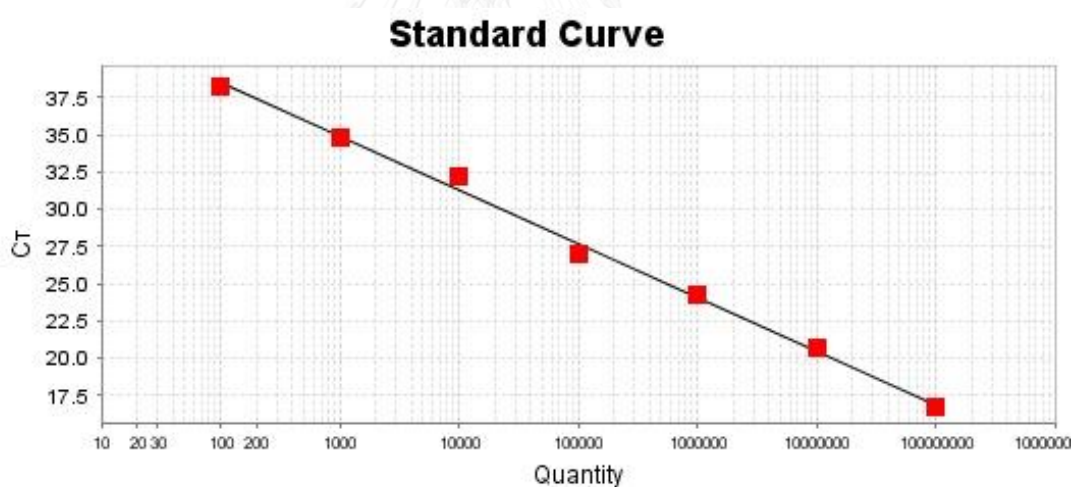
ผลที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานของทุกไมโครอาร์เอ็นเอจะนำไปคำนวณหาการ แสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในกลุ่มตัวอย่างในหน่วย copies/ μ l



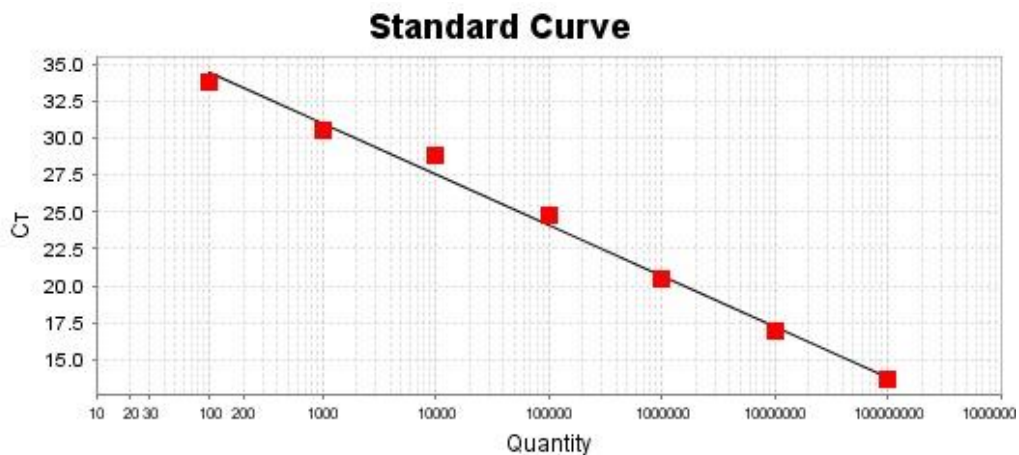
รูปที่ 13 แสดงกราฟมาตรฐานของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ โดยใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ ทำ 10 fold serial dilution พบว่ามีความไวอยู่ในช่วง 10^2 - 10^8 copies/ μ l มี efficiency เท่ากับ 97.08% (Slope = -3.394 และ $R^2 = 0.994$)



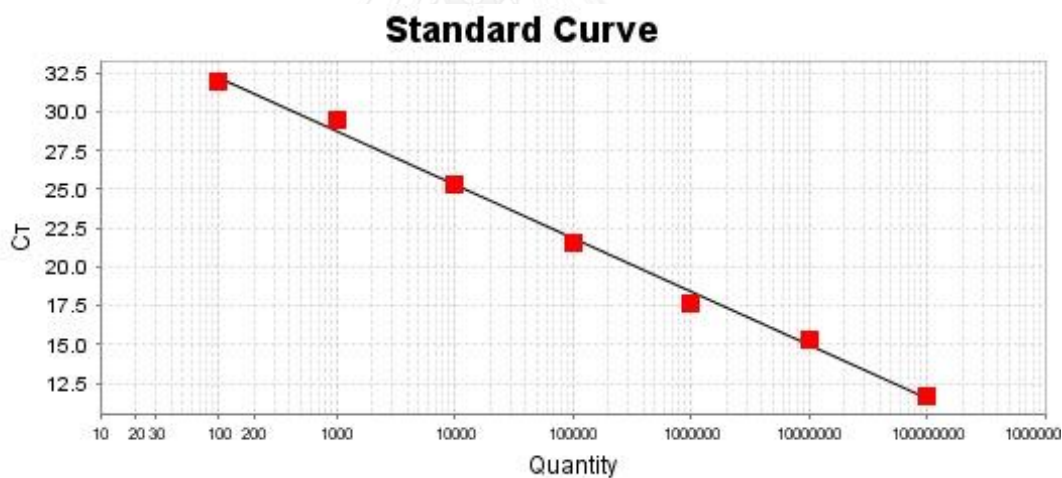
รูปที่ 14 แสดงกราฟมาตรฐานของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี โดยใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ ทำ 10 fold serial dilution บี พบว่ามีความจำไวอยู่ในช่วง $10^3 - 10^8$ copies/ μ l มี efficiency เท่ากับ 82.833 % (Slope = -3.861 และ $R^2 = 0.998$)



รูปที่ 15 แสดงกราฟมาตรฐานของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี โดยใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ ทำ 10 fold serial dilution พบว่ามีความจำไวอยู่ในช่วง $10^3 - 10^8$ copies/ μ l มี efficiency เท่ากับ 89.54% (Slope = -3.601 และ $R^2 = 0.996$)



รูปที่ 16 แสดงกราฟมาตรฐานของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 โดยใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ ทำ 10 fold serial dilution พบว่ามีความจำไว้อยู่ในช่วง 10^2 - 10^8 copies/ μ l มี efficiency เท่ากับ 101.06% (Slope = -3.297 และ $R^2 = 0.999$)



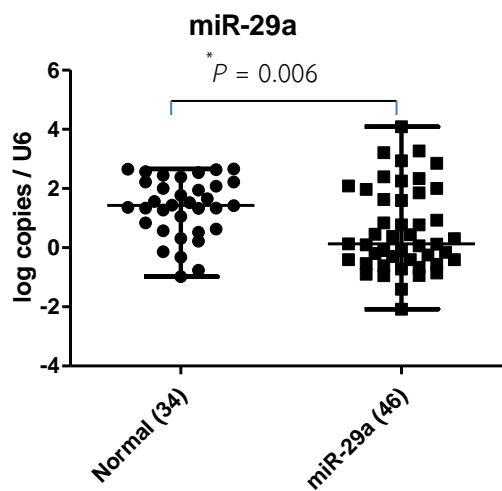
รูปที่ 17 แสดงกราฟมาตรฐานของ U6 โดยใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ ทำ 10 fold serial dilution พบว่ามีความจำไว้อยู่ในช่วง 10^2 - 10^8 copies/ μ l มี efficiency เท่ากับ 105.118% (Slope = -3.205 และ $R^2=0.991$)

การตรวจสอบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอโดยใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์

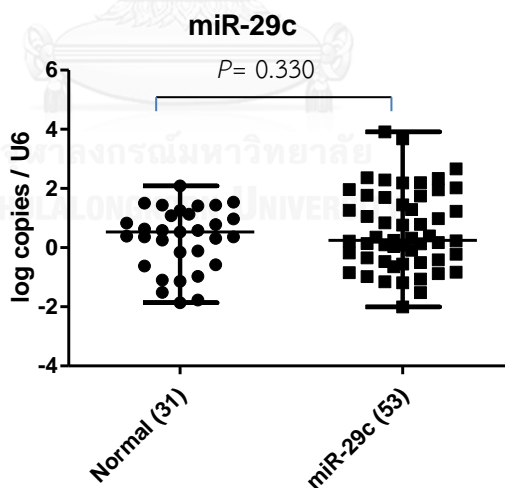
การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัมของกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี

เพื่อศึกษาความแตกต่างของไมโครอาร์เอ็นเอในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี หากไมโครอาร์เอ็นเอมีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทั้งสองกลุ่ม ไมโครอาร์เอ็นเอตัวนั้นอาจนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับโรคตับคั่งไขมันได้ เริ่มจากนำซีรัมของกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีมาสกัดด้วยชุดสกัด ไมโครอาร์เอ็นเอ ตามด้วยเทคนิค polyuridylation และ reverse transcription โดยใช้ SL poly A เป็น reverse ไพรเมอร์ได้เป็น cDNA จากนั้นใช้ cDNA ที่ได้เป็นตัวอย่างสำหรับการทำเรียลไทม์พีซีอาร์ โดยอาศัย ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไมโครอาร์เอ็นเอที่สนใจ และใช้ U6 เป็น normalize สำหรับ internal control พบว่าจากจำนวนผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันทั้งหมด 58 คน สามารถตรวจพบการแสดงออกของ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ บี ซี และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ได้ 46, 0, 53 และ 56 คนตามลำดับ และจากผู้ที่มีสุขภาพดีทั้งหมด 34 คน สามารถตรวจพบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ บี ซี และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ได้ 34, 0, 31 และ 34 คนตามลำดับ โดยการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ เป็นดังนี้

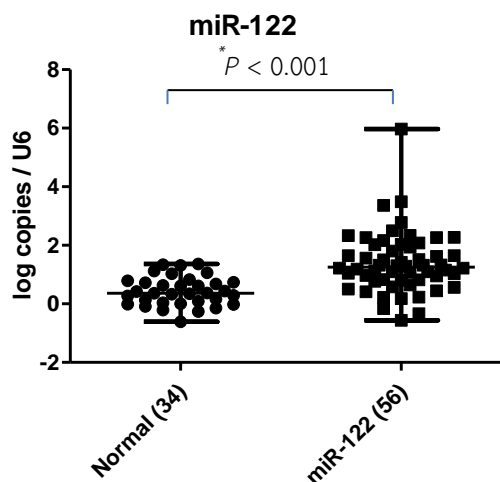
- ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ มีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.006$) ในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี ดังรูปที่ 18
- ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี ได้ซีรัมทั้งในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี (ไม่ได้แสดงผล)
- การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P = 0.330$) ในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี ดังรูปที่ 19
- การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) ในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี ดังรูปที่ 20



รูปที่ 18 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี มีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.006$) ซึ่งวัดการแสดงออกโดยเรียลไทม์พีซีอาร์ คำนวณเป็น log copies / μl เทียบกับกราฟมาตรฐาน และ normalize ด้วย U6 (internal control) (หมายเหตุ หนึ่งจุด แสดงจำนวนตัวอย่าง 1 คน และกราฟแสดงค่ามัธยฐานของข้อมูล \pm ค่าความแปรปรวนของข้อมูล)



รูปที่ 19 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P = 0.330$) ซึ่งวัดการแสดงออกโดยเรียลไทม์พีซีอาร์ คำนวณเป็น log copies / μl เทียบกับกราฟมาตรฐาน และเทียบใน U6 (internal control) (หมายเหตุ หนึ่งจุด แสดงจำนวนตัวอย่าง 1 คน และกราฟแสดงค่ามัธยฐานของข้อมูล \pm ค่าความแปรปรวนของข้อมูล)

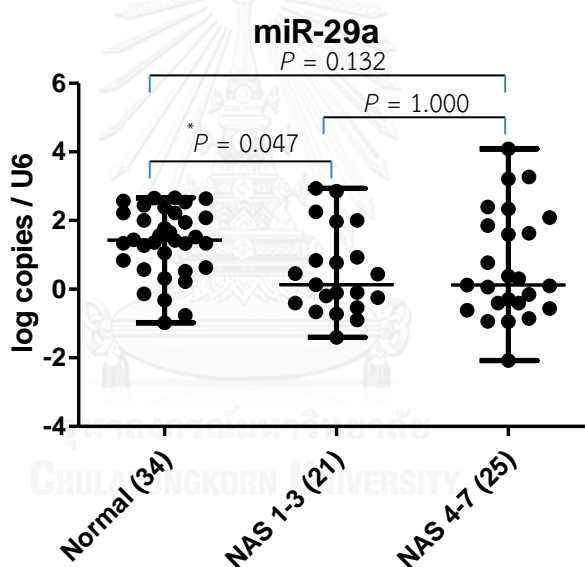


รูปที่ 20 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) ซึ่งวัดการแสดงออกโดยเรียลไทม์พีซีอาร์ ค่ารวมเป็น log copies / μ l เทียบกับกราฟมาตรฐาน และเทียบใน U6 (internal control) (หมายเหตุ หนึ่งจุด แสดงจำนวนตัวอย่าง 1 คน และกราฟแสดงค่ามัธยฐานของข้อมูล \pm ค่าความแปรปรวนของข้อมูล)

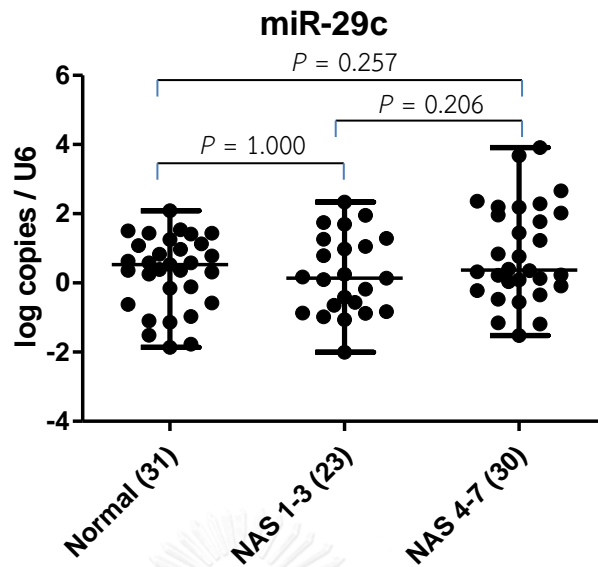
การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัมของกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันโดยแบ่งตามค่าความรุนแรงของโรคเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี

การศึกษาจาก NASH CRN ได้กำหนดว่า $NAS \geq 4$ มีสหสัมพันธ์กับตับอักเสบจากโรคตับคั่งไขมัน (NASH) ส่วน $NAS < 4$ มีสหสัมพันธ์กับการไม่มีตับอักเสบ ดังนั้นจึงตรวจหาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันโดยแบ่งตามความรุนแรงของโรคกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของไมโครอาร์เอ็นเอกับความรุนแรงของโรคตับคั่งไขมัน หากไมโครอาร์เอ็นเอมีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่ NAS 1-3 และ NAS 4-7 แสดงถึง ไมโครอาร์เอ็นเอ นั้นมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคตับคั่งไขมัน อาจใช้ทำนายขั้นของความรุนแรงของโรคได้ จากการทดลองพบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ มีค่าเฉลี่ยในกลุ่ม Normal = 1.362 ± 0.998 ($n = 34$), NAS 1-3 = 0.491 ± 1.257 ($n = 21$), NAS 4-7 = 0.678 ± 1.572 ($n = 25$) และเมื่อเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มพบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม Normal เทียบกับ NAS 1-3 ($P = 0.047$) แต่ไม่สัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรคตับคั่งไขมัน โดยเปรียบเทียบในกลุ่ม NAS 1-3 และ NAS 4-7 ($P =$

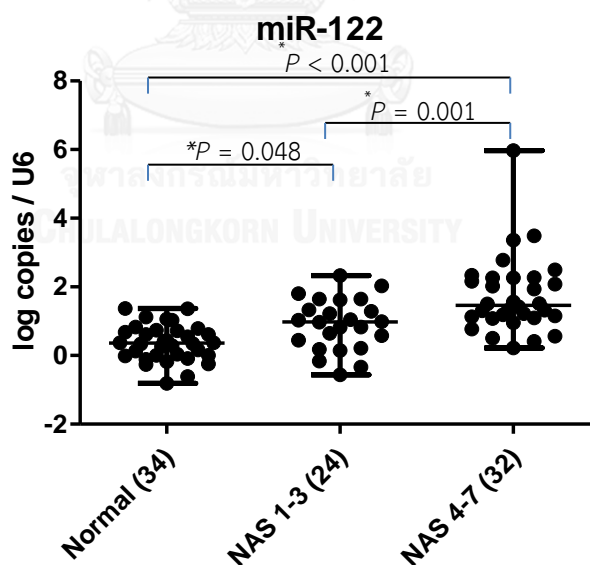
1.000) ดังรูปที่ 21 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ค่าเฉลี่ยในกลุ่ม Normal = 0.3110 ± 1.055 (n = 31), NAS 1-3 = 0.2311 ± 1.153 (n = 23), NAS 4-7 = 0.8519 ± 1.400 (n = 30) และเมื่อเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มพบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ไม่สัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรคตับคั่งไขมันโดยเปรียบเทียบในทุกกลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 22 ตามลำดับ สำหรับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีค่าเฉลี่ยในกลุ่ม Normal = 0.362 ± 0.519 (n = 34), NAS 1-3 = 0.907 ± 0.752 (n = 24), NAS 4-7 = 1.739 ± 1.112 (n = 32) และเมื่อเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มพบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในกลุ่ม NAS 4-7 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Normal และ NAS 1-3 ($P < 0.001$ และ $P = 0.001$ ตามลำดับ) ดังรูปที่ 23



รูปที่ 21 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ในกลุ่ม Normal, NAS 1-3 และ NAS 4-7 วัดการแสดงออกโดยเรียลไทม์พีซีอาร์ คำนวณเป็น log copies / μ l เทียบกับกราฟมาตรฐาน และเทียบใน U6 (internal control) (หมายเหตุ หนึ่งจุด แสดงจำนวนตัวอย่าง 1 คน และกราฟแสดงค่ามัธยฐานของข้อมูล \pm ค่าความแปรปรวนของข้อมูล)



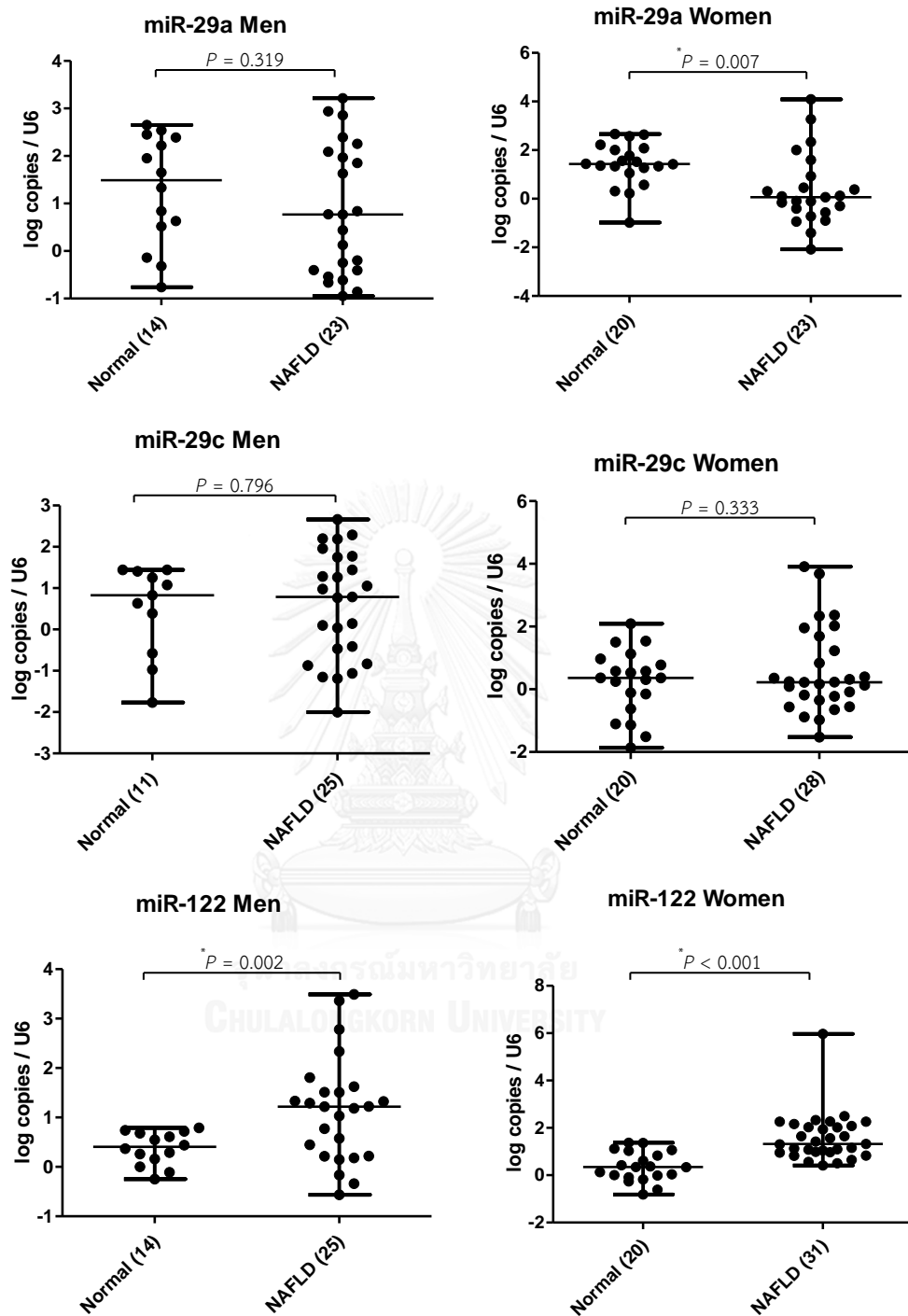
รูปที่ 22 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ในกลุ่ม Normal, NAS 1-3 และ NAS 4-7 วัดการแสดงออกโดยเรียลไทม์พีซีอาร์ คำนวณเป็น log copies / μl เทียบกับกราฟมาตรฐาน และเทียบใน U6 (internal control) (หมายเหตุ หนึ่งจุด แสดงจำนวนตัวอย่าง 1 คน และกราฟแสดง ค่ามัธยฐานของข้อมูล \pm ค่าความแปรปรวนของข้อมูล)



รูปที่ 23 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในกลุ่ม Normal, NAS 1-3 และ NAS 4-7 วัดการแสดงออกโดยเรียลไทม์พีซีอาร์ คำนวณเป็น log copies / μl เทียบกับกราฟมาตรฐาน และเทียบใน U6 (internal control) (หมายเหตุ หนึ่งจุด แสดงจำนวนตัวอย่าง 1 คน และกราฟแสดง ค่ามัธยฐานของข้อมูล \pm ค่าความแปรปรวนของข้อมูล)

การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัมของกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันโดยแบ่งตามเพศเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี

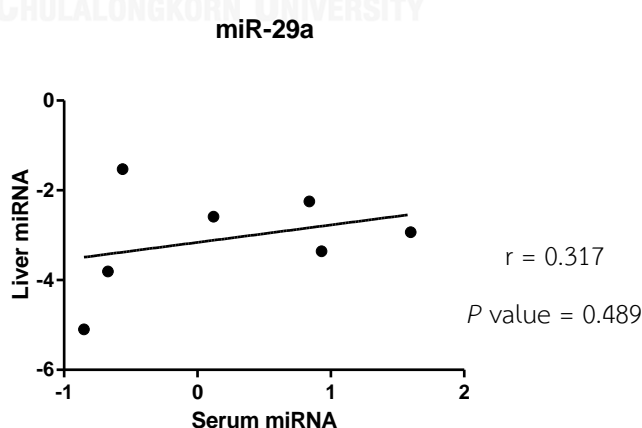
จากการศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันโดยแบ่งตามเพศ แยกเป็นกลุ่มเพศชายและกลุ่มเพศหญิง เทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี เพื่อศึกษาปัจจัยทางเพศกับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอว่ามีความสัมพันธ์กับการเป็นโรคตับคั่งไขมันหรือไม่ เนื่องจากปัจจัยการเกิดโรคตับคั่งไขมัน ประกอบด้วย อายุ เพศ ระดับของไขมัน หรือโรคทาง metabolic syndrome ต่าง ๆ ดังนั้นในงานวิจัยนี้สนใจว่าเพศอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคตับคั่งไขมันได้ ซึ่งผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ มีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเพศหญิง ($P = 0.007$) แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติในเพศชาย ($P = 0.319$) การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งในเพศชายและเพศหญิง ($P = 0.796$ และ $P = 0.333$ ตามลำดับ) และการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งในเพศชายและเพศหญิง ($P = 0.002$ และ $P < 0.001$) ดังรูปที่ 24



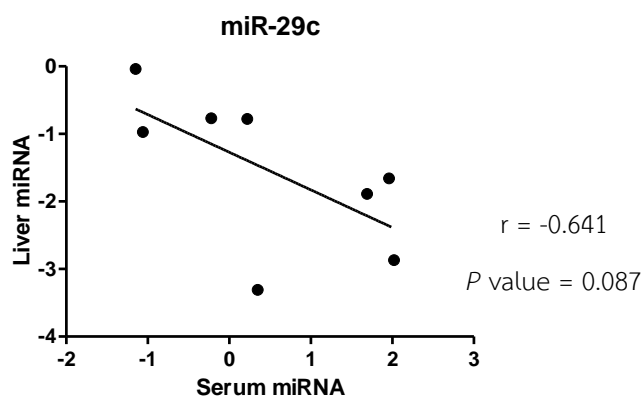
รูปที่ 24 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันโดยแบ่งตามเพศเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี วัดการแสดงออกโดยเรียลไทม์พีซีอาร์ คำนวณเป็น log copies/ μ l เทียบกับกราฟมาตรฐาน และเทียบใน U6 (internal control) (หมายเหตุ หนึ่งจุด แสดงจำนวนตัวอย่าง 1 คน และกราฟแสดงค่ามัธยฐานของข้อมูล \pm ค่าความแปรปรวนของข้อมูล)

การศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อตับของกลุ่มผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันเทียบกับในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมัน

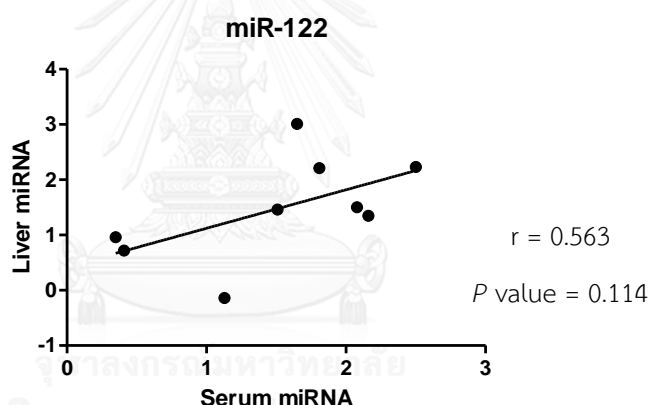
พยาธิสภาพของการเกิดโรคตับคั่งไขมันนั้น เกิดจากการที่มีไขมันสะสมในระดับมากเกินเกณฑ์ปกติและในการตรวจผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันนั้นทำได้โดยการเจาะตับ แล้วนำชิ้นเนื้อมาตรวจทางพยาธิวิทยา แต่การเจาะตับเพื่อนำชิ้นเนื้อมาประเมินทางพยาธิวิทยา อาจทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ตามมาได้ ดังนั้นจึงสนใจการตรวจหาไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัม ว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัมจะสามารถนำใช้แทนในตับได้หรือไม่ และผลการแสดงออกนั้นเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร โดยเริ่มจากนำตัวอย่างเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันมาสกัดด้วยชุดสกัดไมโครอาร์เอ็นเอ (โดยตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและซีรัมที่นำมาใช้ศึกษามาจากคนไข้คนเดียวกัน) ตามด้วยเทคนิค polyuridylation และ reverse transcription โดยใช้ SL poly A เป็น reverse ไพรเมอร์ให้เป็น cDNA จากนั้นใช้ cDNA ที่ได้เป็นตัวอย่างสำหรับการทำเรียลไทม์พีซีอาร์ โดยอาศัย primer ที่จำเพาะต่อไมโครอาร์เอ็นเอที่สนใจ และใช้ U6 เป็น normalize สำหรับ internal control เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัมและการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในตับ โดยใช้ Pearson's correlation test พบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ในเนื้อเยื่อตับและในซีรัม ไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.317$, P value = 0.489) ดังรูปที่ 25 และการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ในเนื้อเยื่อตับและในซีรัม ไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = -0.641$, P value = 0.087) ดังรูปที่ 26 สำหรับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในเนื้อเยื่อตับและในซีรัม ไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่า ($r = 0.563$, P value = 0.114) ดังรูป 27



รูปที่ 25 ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ในกลุ่มเนื้อเยื่อตับเทียบกับในซีรัมของผู้โรคตับคั่งไขมัน มีค่า $r = 0.317$ (P value = 0.489) (หมายเหตุ หนึ่งจุด แสดงจำนวนตัวอย่าง 1 คน ทั้งหมดจำนวน 7 คน)



รูปที่ 26 ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ในกลุ่มเนื้อเยื่อตับเทียบกับในซีรัมของผู้โรคตับคั่งไขมัน มีค่า $r = -0.641$ ($P \text{ value} = 0.087$) (หมายเหตุ หนึ่งจุด แสดงจำนวนตัวอย่าง 1 คน ทั้งหมดจำนวน 8 คน)



รูปที่ 27 ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในกลุ่มเนื้อเยื่อตับเทียบกับในซีรัมของผู้โรคตับคั่งไขมัน มีค่า $r = 0.563$ ($P \text{ value} = 0.114$) (หมายเหตุ หนึ่งจุด แสดงจำนวนตัวอย่าง 1 คน ทั้งหมดจำนวน 9 คน)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันกับปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค

การเกิดโรคตับคั่งไขมันนั้นมีสาเหตุมาจากหลากหลายปัจจัย อาทิ โรคอ้วน โรคเบาหวาน หรือโรคที่เกี่ยวข้องทาง metabolic อื่น ๆ ดังนั้นในการตรวจผู้ป่วยจึงมีการตรวจหาค่าสารต่าง ๆ ในเลือดเพื่อช่วยยืนยันผลการตรวจ เช่น การตรวจหาระดับ triglyceride ในเลือด การตรวจหาระดับ cholesterol ในเลือด เป็นต้น ในงานวิจัยนี้จึงหาความสัมพันธ์ของทั้งไมโครอาร์เอ็นเอกับปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเกิดโรคตับคั่งไขมัน โดยใช้ Pearson's correlation test ดังแสดงในตารางที่ 15 ซึ่ง

พบว่า การแสดงของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ มีความสัมพันธ์กับระดับของไตรกลีเซอไรด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.0473$) และการแสดงของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีความสัมพันธ์กับอายุ BMI NAS ระดับของแอลคาไรด์ฟอสฟาเทส และระดับของ fibrosis อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.0276, P = 0.0097, P = 0.0277, P = 0.0272$ และ $P = 0.0029$ ตามลำดับ)

ตารางที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันกับปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค

Correlation between miRNA and NAFLD					
Parameters	Values	miR-29a (r)	P value	miR-122 (r)	P value
Age (y)	49 (18-70) ^b	0.1003	0.5072	0.3118	0.0193*
BMI (kg/m ²)	30.45 (20.3-98.1) ^b	-0.1446	0.3375	-0.3563	0.007*
NAS <4/≥4	45/55 ^a	0.2046	0.1725	0.3057	0.022*
AST (IU/L)	43.5 (17-153) ^b	0.03989	0.7924	0.1352	0.3204
ALT (IU/L)	61.5 (18-233) ^b	-0.03248	0.8303	0.1515	0.2652
ALP (IU/L)	70.5 (16-131) ^b	-0.04059	0.7888	0.3061	0.0218*
Cholesterol (mg/dL)	192.5 (138-311) ^b	0.09095	0.5478	0.1921	0.1562
TG (mg/dL)	147 (62-271) ^b	0.1441	0.0475*	0.1709	0.2079
HDL (mg/dL)	42.5 (24-91) ^b	-0.03536	0.8155	0.2005	0.1384
LDL (mg/dL)	114.5 (71-232) ^b	-0.05135	0.7347	0.1163	0.3932
Inflammation activity: ≤1/≥2	78/22 ^a	0.1847	0.2357	0.1979	0.1554
Steatosis grade: ≤1/≥2	44/56 ^a	-0.02319	0.8827	0.1447	0.3011
Balloon hepatocytes: ≤1/≥2	76/24 ^a	0.2911	0.0582	0.2441	0.0782
Fibrosis stage: ≤1/≥2	76/24 ^a	0.1844	0.2199	0.3993	0.0023*

BMI, Body mass index; NAS, NAFLD activity score; AST, Aspartate aminotransferase; ALT, Alanine aminotransferase; ALP, Alkaline phosphatase; TG, Triglycerides; HDL, High-density lipoprotein; LDL, Low-density lipoprotein (* หมายถึง มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$); a หมายถึง เพอร์เซ็นต์; b หมายถึง ค่าเฉลี่ย (ช่วงของข้อมูล); r หมายถึง สหสัมพันธ์ของ Pearson's correlation test)

ในงานวิจัยนี้มีกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคตับคั่งไขมันทั้งหมด 58 ราย แบ่งเป็นเพศหญิง 31 คน และเพศชาย 27 คน โดยทำการหาค่าเฉลี่ย (ช่วงของข้อมูล) เพื่อใช้ในการดูความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อการเกิดโรคตับคั่งไขมัน ดังแสดงในตารางที่ 16 โดยซีรัมของกลุ่มคนที่เป็นโรคตับคั่งไขมันพบว่า ทั้งในเพศหญิงและเพศชายมีค่า BMI เกินเกณฑ์มาตรฐาน (เพศหญิง ปกติ =

19-20 (kg/m²) เพศชาย ปกติ = 22-23 (kg/m²) ค่า AST และ ALT เกินเกณฑ์มาตรฐาน (ค่าปกติ = 40 IU/L) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 16 ศึกษาค่าเฉลี่ยของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันโดยแบ่งตามเพศ

Parameters	Men (n=27)	Women (n=31)	P value
Age ^a	42.67 (18-66)	47.71 (24-70)	0.1702
BMI (kg/m ²) ^a	40.45 (21.2-91.8)	33.94 (20.3-81.3)	0.1500
AST (IU/L) ^a	50.07 (17-153)	53.94 (18-137)	0.6623
ALT (IU/L) ^a	73.37 (21-199)	72.58 (18-233)	0.9490
ALP (IU/L) ^a	67.96 (16-131)	77.52 (39-125)	0.1022
Cholesterol (mg/dL) ^a	195.74 (145-260)	199.35 (138-311)	0.7185
TG (mg/dL) ^a	162.41 (57-271)	132.06 (62-270)	0.0263
HDL (mg/dL) ^a	41.89 (24-91)	46.94 (30-68)	0.1116
LDL (mg/dL) ^a	120.89 (75-181)	126.19 (71-232)	0.5719

BMI, Body mass index; NAS, NAFLD activity score; AST, Aspartate aminotransferase; ALT, Alanine aminotransferase; ALP, Alkaline phosphatase; TG, Triglycerides; HDL, High-density lipoprotein; LDL, Low-density lipoprotein (a หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูล (ช่วงของข้อมูล))

นอกจากนี้จากงานศึกษาวิจัยก่อนหน้าได้กล่าวถึงบทบาทของไมโครอาร์เอ็นเอกับการควบคุม ยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งของอินซูลิน การควบคุมสมดุลของกลูโคสที่ส่งผลต่อการเกิดโรคทาง metabolic (15) ซึ่งถือเป็นโรคที่มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเกิดโรคตับคั่งไขมัน ดังนั้นจึงศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอกับค่า BMI ในแต่ละชั้นที่สามารถบ่งบอกถึงระดับความอ้วน โดยกำหนดเกณฑ์ ดังนี้ normal (BMI = 18.5-22.9), overweight (BMI = 23.0-24.9), obesity 1 (BMI = 25.0-29.9), obesity 2 (BMI = 30.0-34.9), morbid obesity (BMI ≥ 35) (47) ซึ่งผลที่ได้พบว่าในศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ กับลักษณะทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างเมื่อแบ่งตามค่าของ BMI ทั้งหมด 46 คน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทุกกลุ่ม (P value = 0.658) โดยกลุ่ม normal มีจำนวน 3 คน มีค่าเฉลี่ยของ BMI = 21.17 ±

0.85, overweight มีจำนวน 8 คน มีค่าเฉลี่ยของ BMI = 24.36 ± 0.50 , obesity 1 มีจำนวน 10 คน มีค่าเฉลี่ยของ BMI = 27.52 ± 1.42 , obesity 2 มีจำนวน 8 คน มีค่าเฉลี่ยของ BMI = 32.39 ± 1.84 , morbid obesity มีจำนวน 17 คน มีค่าเฉลี่ยของ BMI = 56.34 ± 19.03 และการศึกษาการ แสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 กับลักษณะทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างเมื่อแบ่งตามค่าของ BMI ทั้งหมด 56 คน พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value = 0.121) ในทุกกลุ่ม โดยกลุ่ม normal มีจำนวน 3 คน มีค่าเฉลี่ยของ BMI = 21.17 ± 0.85 , overweight มีจำนวน 9 คน มีค่าเฉลี่ยของ BMI = 24.36 ± 0.47 , obesity 1 มีจำนวน 14 คน มีค่าเฉลี่ยของ BMI = 27.41 ± 1.52 , obesity 2 มีจำนวน 12 คน มีค่าเฉลี่ยของ BMI = 32.37 ± 2.11 , morbid obesity มีจำนวน 18 คน มีค่าเฉลี่ยของ BMI = 55.81 ± 18.60

การศึกษาทำนายเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ บี ซี และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 โดยใช้โปรแกรม miRTarBase และ Panther

จากการทำนายเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ บี ซี และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 โดยใน เริ่มจากการค้นหาเป้าหมายทั้งหมดของไมโครอาร์เอ็นเอทั้งสี่ตัว โดยเลือกเป้าหมายจากการที่มี งานวิจัยสนับสนุนอย่างแน่นหนาและน่าเชื่อถือได้ใน 3 วิธีการศึกษาประกอบด้วย reporter assay, western blot และ qPCR อย่างใดอย่างหนึ่งขึ้นไป หลังจากนั้นจะเลือกยีนที่สนใจโดยเป็นยีนที่ เกี่ยวข้องทางด้าน metabolic pathway เนื่องจากโรคตับคั่งไขมัน มีปัจจัยหลักเกิดจากความผิดปกติ ทางระบบ metabolic จากขั้นตอนดังกล่าวพบเป้าหมายที่เชื่อมโยงผ่าน metabolic pathway ของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ บี ซี และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ของไมโครอาร์เอ็นเอกับยีนเป้าหมาย โดยทำนายผ่านโปรแกรม miRTarbase และ Panther

miRNAs	Target genes
miRNA-29a	CDK6, RAN, BACE1, S100B, IMPDH1, GLUL , PPM1D, PIK3R1, LPL , CPEB3, CPEB4, ADAMTS9, TRIM63, MYCN, SERPINB9, DICER1, TNFAIP3, CDC42, PXDN, ITIH5, PTEN, ABL1
miRNA-29b	HDAC4, SP1, CDK6, BACE1, SFPO, DNAJB11, S100B, ESR1, NCOA3, MMP15, Mmp24, MMP2, HMGA2, BMP1, PTEN, CDC42, GSK3B , PIK3CG, NKIRAS2, RAX, TBX21, DUSP2, FOS, IMPDH1, MYCN
miRNA-29c	GAPDH, CDK6, SRSF10, Ctsk, MMP15 , Mmp24, TFAP2C, CDC42, MYCN, BACE1
miRNA-122	CYP7A1 , SRF, RAC1, RHOA, CCNG1, GTF2B, GYS1, NFATC2IP, ENTPD4, ANXA11, FOXP1, MECP2, NCAM1, TBX19, AACS, DUSP2, ATP1A2, MAPK11, AKT3, GALNT10, G6PC3, SLC7A1, FOXJ3, SLC7A11, TRIB1, DSTYK, PRKAB1, ACVR1C, PRKRA, PTP1B, P4HA1, ZNF395, SOCS1, HMOX1, CDK4

หมายเหตุ ยีนเป้าหมายที่ทำตัวหนา หมายถึง ตัวอย่างของยีนที่อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคตับคั่งไขมัน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ

การแสดงผลของไมโครอาร์เอ็นเอในกลุ่มผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันและกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี

จากการศึกษาพบว่าระดับของไมโครอาร์เอ็นเอมีความสัมพันธ์กับโรคตับคั่งไขมัน โดยระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มของคนที่เป็นโรคตับคั่งไขมันเมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี ขณะที่ระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งสวนทางกับระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มของคนที่เป็นโรคตับคั่งไขมันเมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี นอกจากนี้ยังพบว่าการตรวจหาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี ไม่สามารถตรวจพบได้ทั้งในกลุ่มคนที่เป็นโรคตับคั่งไขมันและกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี ทั้งนี้จากการสร้างกราฟมาตรฐานพบว่า ในการตรวจหาปริมาณไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอและซี) และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีความไวอยู่ที่ 100 copies/ μ l นั้นหมายถึงว่า ใน 1 μ l ของ sample จะมีปริมาณไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอและซี) หรือไมโครอาร์เอ็นเอ 122 อย่างน้อย 100 copies และถ้าหากมีปริมาณของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอและซี) หรือไมโครอาร์เอ็นเอ 122 น้อยกว่า 100 copies จะไม่สามารถตรวจหาปริมาณของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 (เอและซี) หรือไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ได้ สำหรับไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี พบว่าความไวของการตรวจหาไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บีอยู่ที่ 1000 copies/ μ l รูปที่ 14 ซึ่งความไวในการตรวจหาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี อยู่ในเกณฑ์ที่ค่อนข้างต่ำและจากผลการทดลองที่ได้พบว่า ไม่สามารถตรวจหาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี ได้ทั้งในกลุ่มคนที่เป็นโรคตับคั่งไขมันและกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี อาจเนื่องมาจากไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี มีการแสดงออกที่น้อยมากในทั้งสองกลุ่มที่ศึกษา ซึ่งแสดงว่าถ้าไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี มีการแสดงออกที่น้อยกว่า 1000 copies/ μ l จะไม่สามารถตรวจพบระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี ได้ และถึงแม้ว่าไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ บี และซี จะอยู่ใน family เดียวกัน นั้นแสดงถึงการที่ทั้งสามไมโครอาร์เอ็นเอมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกัน แต่ทั้งสามไมโครอาร์เอ็นเอมี precursor microRNA แตกต่างกัน (19) ดังนั้นการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอทั้งสามตัวอาจแตกต่างกันได้ จึงเป็นเหตุผลสนับสนุนว่า ไม่สามารถตรวจหาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บีได้ ทั้งนี้ในการสร้างกราฟมาตรฐานของเรียลไทม์พีซีอาร์ประสิทธิภาพของกราฟมาตรฐานควรมีค่า efficiency อยู่ในช่วง 90 ถึง 110% ค่า slope อยู่ในช่วง -3.1 ถึง -3.6 และมีค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.985 ถึง 1.000 (48) ซึ่งจากการสร้างกราฟมาตรฐานในงานวิจัยนี้ ค่าต่าง ๆ เหล่านี้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม สามารถยอมรับได้ตามมาตรฐานของการสร้างกราฟมาตรฐาน และมีความน่าเชื่อถือในการแปลผลตามผลการทดลองที่ได้ รวมถึงมีการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการตรวจวัดการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ โดยทำการ

ปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมตามแต่ละไพรเมอร์ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการจับข้ามชนิดกันของไพรเมอร์ กับไมโครอาร์เอ็นเอในกลุ่มตัวอย่าง แต่อย่างไรก็ตามการที่ไม่สามารถตรวจวัดการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ปีได้นั้น ไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจน อาจขึ้นกับเทคนิคที่นำมาใช้ยังไม่มีความไวเพียงพอที่จะตรวจวัดการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ปีก็เป็นได้

ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ ในซีรัมและในเนื้อเยื่อของผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันกำลังได้รับความนิยมน้อยอย่างมา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไมโครอาร์เอ็นเอ 122 เป็นไมโครอาร์เอ็นเอที่พบในตับมากกว่าร้อยละ 70 ของไมโครอาร์เอ็นเอทั้งหมด มีความจำเพาะอย่างมากในเซลล์ตับ โดยควบคุมผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมของการสร้างไขมัน ผ่านยีนต่างๆ ตัวอย่างเช่น Acetyl-coenzyme-A carboxylase-2, fatty acid synthetase, sterol regulatory element binding proteins 1-c, 2, stearoyl-CoA desaturase และ 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase เป็นต้น (38, 41) และพยาธิสภาพของการเกิดโรคตับคั่งไขมันนั้นเกิดขึ้นภายในตับที่มีปริมาณของไขมันสะสมมากเกินไปเกินเกณฑ์ปกติ ดังนั้นไมโครอาร์เอ็นเอ 122 จึงอาจนำมาใช้ในการทำนายสภาวะโรคตับคั่งไขมันที่เกิดขึ้นภายในตับได้ และจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัมจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ที่ เป็นไวรัสตับอักเสบบี เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี รวมถึงมีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มผู้ที่เป็นไวรัสตับอักเสบบีเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีความไวและความจำเพาะที่จะทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างผู้ที่เป็นไวรัสตับอักเสบบี ผู้ที่เป็นไวรัสตับอักเสบบีและผู้ที่มีสุขภาพดี (49) นอกจากนี้ยังมีการศึกษา การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน พบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันและสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค (42) สัมพันธ์กับเพศทั้งในเพศชายและเพศหญิง (41) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ดังรูปที่ 20 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันเมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี และการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 สัมพันธ์กับเพศทั้งในเพศชายและเพศหญิง แสดงในรูปที่ 24 รวมถึงในการศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ที่แบ่งตามกลุ่ม NAS 1-3 และ NAS 4-7 ยังสนับสนุนว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค รูปที่ 23 ดังนั้นการเกิดการอักเสบของตับโดยอาศัยการแบ่งตาม NAS อาจมีความสำคัญที่จะใช้ทำนายการเกิดตับคั่งไขมันได้ แต่การศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในเนื้อเยื่อตับและในซีรัม มีค่า correlation coefficient (r) = 0.563 (P value = 0.114) ดังรูปที่ 27 หมายถึง ระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในเนื้อเยื่อตับมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัม แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้ผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับการศึกษาวิจัยก่อน

หน้า ที่กล่าวว่า การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในเนื้อเยื่อตับมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัม และมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (correlation coefficient = 0.461, P value = 0.0005) (25) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการ แสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ควบคุมผ่านทางยีน Hypoxia-inducible factor 1 α และ Vimentin ซึ่งเป็นยีนที่เหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะ fibrosis ตามมาได้ โดยพบว่าในเนื้อเยื่อตับของหนูที่ให้อาหารเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะ Steatohepatitis จะมีการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในซีรัมจะพบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจเกิดจากการรั่วของไมโครอาร์เอ็นเอออกจากตับเมื่อตับได้รับความเสียหายจากการอักเสบส่งผลให้มีไมโครอาร์เอ็นเอเข้าสู่ในระบบหมุนเวียนเลือดจึงพบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 สูงขึ้นในซีรัม (50) และยังมีงานวิจัยที่ศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในตับของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคตับคั่งไขมันที่มีการอักเสบร่วมด้วยและมะเร็งตับ ($n=14$) และในผู้ที่เป็นมะเร็งตับที่มีสาเหตุมาจากการสะสมไขมันในตับ ($n=42$) พบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ลดลง ในสภาวะที่เป็นโรคตับคั่งไขมันที่มีการอักเสบร่วมด้วย และยังลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสภาวะที่เป็นมะเร็งตับทั้งในหนูและในคน (51) จากการศึกษาในเนื้อเยื่อตับทั้งในคนและในหนูที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน พบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค เช่น การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ลดลงในผู้ที่โรคตับคั่งไขมันที่มีการอักเสบร่วมด้วย และยังลดลงในผู้ที่เป็นมะเร็งตับ รวมถึงในผู้ที่เป็นวัยรัสตับอักเสบบี นั้นแสดงให้เห็นว่าไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ถือเป็นไมโครอาร์เอ็นเอที่มีความจำเพาะในตับ และยังมีบทบาทในการควบคุมสมดุลต่าง ๆ ภายในตับอีกด้วย (52) ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้จำนวนของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อตับมีเพียง 10 คน จึงทำให้ไม่สามารถแปลผลข้อมูลให้ออกมาได้ครอบคลุมและข้อมูลยังไม่เพียงพอที่จะสรุปถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอกับเนื้อเยื่อตับของผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน

ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 มีการศึกษาวิจัยก่อนหน้าพบว่า การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญใน liver fibrosis ของคนและหนู liver cirrhosis ของคน เทียบกับกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่เป็น fibrosis ระยะเริ่มแรก โดยไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ควบคุมผ่าน ยีน TGF- β และ NF- κ B ใน hepatic stellate cells (53) รวมถึงการศึกษาของ Celikbilek และคณะ (54) ยังพบว่า การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน เทียบกับกลุ่มควบคุมในประชากรประเทศตุรกี และในงานวิจัยนี้ผลการศึกษาที่ได้ คือ การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ มีระดับที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน เทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี รูปที่ 18 และมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคตับคั่งไขมันที่ NAS 1-3 เทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี แต่ไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคตับคั่งไขมันในชั้นของ

NAS 4-7 ดังแสดงในรูปที่ 21 สรุปได้ว่าการดำเนินไปของโรคไม่มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ซึ่งไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ สามารถบอกได้ถึงความแตกต่างว่าเป็นโรคตับคั่งไขมันหรือไม่เป็นโรคตับคั่งไขมัน แต่ไม่สามารถบอกถึงความรุนแรงของโรคตับคั่งไขมันได้ นอกจากนี้ยังพบว่าในเพศหญิง มีการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ในเนื้อเยื่อตับและในซีรัม มีค่า correlation coefficient (r) = 0.317 (P value = 0.489) หมายถึง ระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ในเนื้อเยื่อตับมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ในซีรัม แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องมาจากซีรัมนั้นมาจากระบบหมุนเวียนเลือดทั่วร่างกายจึงอาจไม่จำเพาะกับเนื้อเยื่อตับ ดังนั้นไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ สามารถมาจากเซลล์อื่น ๆ ทั่วร่างกายที่ไม่ใช่เซลล์ตับได้ ตัวอย่างเช่น ในการศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อเต้านม โดยอาศัยเทคนิค next-generation sequencing และเรียลไทม์พีซีอาร์ พบว่าไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในผู้ที่เป็นมะเร็งเต้านมในกลุ่มควบคุมเทียบกับกลุ่มผู้ที่เป็นมะเร็งเต้านม (55) นั่นหมายถึงในเซลล์เต้านมของผู้ที่เป็นมะเร็งเต้านมมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ เช่นกัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ (เอ บี และซี) ในเนื้อเยื่อกระดูก พบว่าไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ (เอ บี และซี) มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในผู้ที่เป็นมะเร็งกระดูกเทียบกับผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งกระดูก (56) ทั้งนี้จำนวนของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อตับมีเพียง 10 คน จึงทำให้ไม่สามารถแปลผลข้อมูลให้ออกมาได้ครอบคลุม และข้อมูลอาจยังไม่เพียงพอที่จะสรุปถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอกับเนื้อเยื่อตับของผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน และยังมี การศึกษาผ่านยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ ผ่านงานวิจัยของ Liang และคณะ (57) พบว่ายีน PCG-1 α และ G6Pase เป็นยีนเกี่ยวกับกระบวนการ gluconeogenesis และเป็นยีนหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 โดยพบว่าไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ไปยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้งสองตัว ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการผลิตกลูโคสในตับและลดระดับกลูโคสในเลือดของหนูที่นำมาศึกษา ดังนั้นหากในสถานะของผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน มีการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ต่ำลง หมายถึงยีนทั้งสองตัวนี้ยังมีการแสดงออกที่สูงขึ้นและไม่ถูกยับยั้งการทำงานจากไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ทำให้มีการสร้างน้ำตาลเพิ่มขึ้นและส่งผลให้เกิดโรคตับคั่งไขมันตามมาได้

ปัจจุบันการศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี ในซีรัมของผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันยังคงมีจำกัดและยังไม่ชัดเจน แต่มีการศึกษา Wang และคณะ (58) การศึกษาบทบาทของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี ที่ทำหน้าที่เป็น anti-fibrotic factor ในเนื้อเยื่อตับของคนและหนูที่เกิดภาวะ fibrosis พบว่าไมโครอาร์เอ็นเอ 29 บี มีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้เกิดเอพอพอโทซิสใน hepatic stellate cell (HSCs) ผ่าน caspase-9 และ PARP รวมทั้งป้องกันการเกิด fibrosis ผ่านทางการยับยั้งยีนเป้าหมาย PI3K/AKT ด้าน 3'UTR โดยไปยับยั้ง α -SMA และ collagen-I และเหนี่ยวนำให้

เกิดเอพอพโทซิสทั้งใน HSCs และในหนู สำหรับการศึกษากการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ปี พบว่าไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ปี ในซีรัมผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน เทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี และในเนื้อเยื่อตับของผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน เทียบกับในซีรัมของผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน จึงทำให้ไม่สามารถแปลผลข้อมูลให้ออกมาได้ครอบคลุมและข้อมูลยังไม่เพียงพอที่จะสรุปถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ปี ในซีรัมและเนื้อเยื่อตับของผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน

การศึกษากการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ในตับของหนูสายพันธุ์ C57BL/6J และสายพันธุ์ DBA/2J ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาหารที่ทำให้เกิดโรคตับคั่งไขมัน พบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่ทำให้เกิดโรคตับคั่งไขมันเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (59) สอดคล้องกับการศึกษาทดลองในครั้งนี้ คือการ แสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในกลุ่มของคนไข้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน เทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี แต่มีแนวโน้มที่ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 19 และ ไม่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการเป็นโรคตับคั่งไขมัน รูปที่ 22 รวมถึงเพศไม่มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี รูปที่ 24 แต่ในการศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ในเนื้อเยื่อตับและในซีรัม มีค่า correlation coefficient (r) = -0.641 (P value = 0.087) รูปที่ 26 หมายถึง ระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ในเนื้อเยื่อตับมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางตรงข้ามกับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ในซีรัม แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องมาจากซีรัมนั้นมาจากระบบหมุนเวียนเลือดทั่วร่างกายจึงอาจไม่จำเพาะกับเนื้อเยื่อตับ และไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี สามารถมาจากเซลล์อื่น ๆ ทั่วร่างกายที่ไม่ใช่เซลล์ตับได้ ตัวอย่างเช่น ในการศึกษากการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ในผู้ที่เป็นมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก (non-small lung cancer) พบว่าทั้งในเนื้อเยื่อปอดและในซีรัม ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซีมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (60) รวมถึงยังไม่มีการศึกษาถึงการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ในซีรัมของผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมัน และจำนวนของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อตับมีเพียง 10 คน จึงทำให้ไม่สามารถแปลผลข้อมูลให้ออกมาได้ครอบคลุมและข้อมูลยังไม่เพียงพอที่จะสรุปถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอกับเนื้อเยื่อตับของผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่น ๆ ที่แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัมผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันในกลุ่มประชากรประเทศต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ผลการศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัมผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน

Study design	Source of miRNA	miRNAs	Effect	Population	Ref.
NAFLD (n=34) vs Normal (n=19)	Serum	miR-122, miR-34a, miR-16 and miR-21	Increased	USA	(40)
NAFLD (n=69) vs Normal (n=42)	Serum	miR-15b	Increased	China	(61)
NAFLD (n=51) vs Normal (n=14)	Serum	miR-122, miR-192, miR-19a, miR-19b, miR-125b and miR-375	Increased	Argentina	(42)
Mild vs Severe steatosis; Severe vs Mild fibrosis (n=52)	Serum	miR-122	Decreased	Japan	(25)
NAFLD (n=40) vs Normal (n=20)	Serum	miR-181d, miR-99a, miR-197 and miR-146b	Decreased	Turkey	(54)

ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 กับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคตับคั่งไขมัน

เนื่องจากการแสดงของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 และ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 สัมพันธ์กับการเกิดโรคตับคั่งไขมัน ดังนั้นจึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของไมโครอาร์เอ็นเอทั้งสองตัว ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคตับคั่งไขมันกับปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค ตัวอย่างเช่น ค่า ALT เป็นเอนไซม์ที่ช่วยตรวจคัดกรองหรือวินิจฉัยภาวะโรคตับ พบได้ในเซลล์ตับเป็นส่วนมาก (สามารถพบได้ในเซลล์อื่นๆ เช่น เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์กล้ามเนื้อไตในปริมาณเล็กน้อย) ดังนั้นค่าของ ALT ที่ตรวจพบในกระแสเลือดจึงเกิดจากเซลล์ตับ โดยหากเซลล์ตับถูกทำลายหรืออักเสบจะมีเอนไซม์ ALT ออกจากตับมาที่กระแสเลือดในปริมาณที่มากขึ้น แต่ในผู้ที่มีสุขภาพดี จะมีค่า ALT ในเลือดน้อยมาก นอกจากเอนไซม์ ALT ยังมีการควบคุมกับเอนไซม์อื่นๆด้วยเช่น AST และ ALP (Alkaline phosphatase) เป็นต้น ซึ่ง AST เป็นเอนไซม์ที่พบได้มากในเซลล์ตับ และกล้ามเนื้อหัวใจ รองลงมาคือ กล้ามเนื้อโครงร่าง ไต สมอง ตับอ่อน ปอด เป็นต้น ซึ่งแตกต่างจากค่าเอนไซม์ระดับ ALT ที่มีความจำเพาะมากกว่า สำหรับ ALP พบในตับเป็นส่วนมาก รองลงมาคือ กระดูก เยื่อเมือกภายในลำไส้เล็ก ตามลำดับ เนื่องจากเอนไซม์นี้มาจากตับและเป็นองค์ประกอบสำคัญ ดังนั้นโรคใด ๆ ที่กระทบต่อตับจะส่งผลให้ค่า ALP สูงขึ้นเสมอ (62, 63) จากตารางที่ 15 ค่า AST และ ALT มีค่าเฉลี่ยเกินเกณฑ์มาตรฐาน (40 IU/L) BMI มีค่าเฉลี่ยเกินเกณฑ์มาตรฐาน (ค่ามาตรฐานอยู่ที่ 22.99 kg/m² (64)) สนับสนุนข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษาว่าเป็นกลุ่มที่มีปัญหาทาง metabolic syndrome ซึ่งการแสดงของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกับอายุ NAS

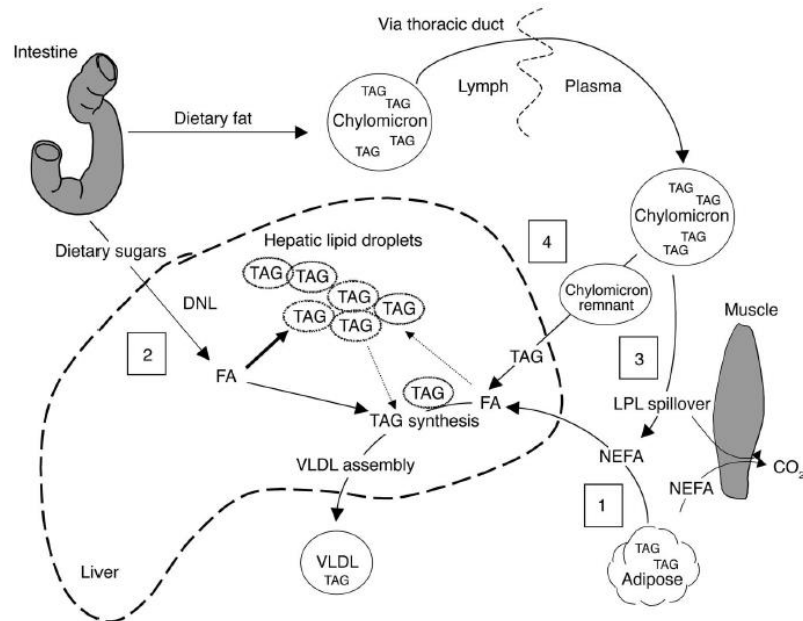
ระดับของ ALP และระดับของ fibrosis อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการแสดงของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางตรงข้ามกับระดับของ BMI อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าการแสดงของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกับระดับของไตรกลีเซอไรด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับพยาธิสภาพในการเกิดโรค จากงานวิจัยก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีความสัมพันธ์กับ ระดับของ fibrosis (40) สวนทางการศึกษาของ Miyaaki และคณะ (25) ที่พบว่าระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีความสัมพันธ์กับ ระดับของ Fibrosis แต่ไม่สัมพันธ์กับ NAS สวนทางการศึกษาของ Celikbilek และคณะ (54) ที่พบว่าระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 และไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ไม่สัมพันธ์กับ NAS-scale parameter (Steatosis, Inflammation, Ballooning, Fibrosis และ NAS) AST, ALT, Triglyceride, HDL และ LDL และจากผลการวิจัยที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 16 พบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ บี และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในเพศหญิงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องมาจากจำนวนของเพศหญิงที่นำมาศึกษามีมากกว่าเพศชาย อายุโดยเฉลี่ยของเพศหญิงมากกว่าเพศชาย ดังนั้นอาจส่งผลถึงระบบเผาผลาญ metabolism ในร่างกายที่มีการทำงานลดลง และมีการสะสมสารต่าง ๆ เพิ่มขึ้น ทำให้โอกาสในการเกิดโรคเพิ่มสูงกว่าผู้ที่มีอายุน้อยกว่า และนอกจากนั้นในเพศหญิงค่าปริมาณสารต่าง ๆ ที่เป็นปัจจัยหนึ่งในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคตับคั่งไขมันโดยเฉลี่ยค่อนข้างสูงกว่าเพศชายแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตัวอย่างเช่น AST ALP โคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ HDL และ LDL เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เป็นปัจจัยทาง metabolic syndrome ที่มีผลนำไปสู่โรคตับคั่งไขมันได้เช่นกัน จากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่ม physical activity ในเพศชายที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน สามารถลดระดับของปัจจัยเสี่ยงทาง metabolic และสามารถป้องกันการดำเนินไปของโรคตับคั่งไขมันได้ ตัวอย่างเช่น ระดับของไตรกลีเซอไรด์ น้ำหนัก HDL เป็นต้น (65) ทั้งนี้ปัจจัยเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคตับคั่งไขมันแต่ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 อาจเนื่องมาจากพยาธิสภาพของการเป็นโรคตับคั่งไขมันมาจากหลายปัจจัยโดยไม่จำเป็นต้องมีครบทุกพารามิเตอร์จึงเกิดโรค และโรคตับคั่งไขมันเป็นโรคที่เกิดจากลักษณะนิสัยในการใช้ชีวิตประจำวัน การรับประทานอาหาร รวมถึงการออกกำลังกาย ที่สะสมมาเป็นเวลาค่อนข้างนาน ดังนั้นบุคคลที่มีค่า BMI อยู่ในเกณฑ์ปกติ แต่มีปริมาณของไขมันสูงก็มีโอกาสเป็นโรคตับคั่งไขมันได้มากกว่าผู้ที่มีค่า BMI อยู่เกินเกณฑ์ปกติ และจากผลการศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ กับลักษณะทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างเมื่อแบ่งตามค่าของ BMI พบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อแบ่งตามค่าของ BMI กล่าวคือการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ไม่มีความสัมพันธ์กับค่า BMI ที่ระดับต่าง ๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ กับค่า BMI โดยรวมดังแสดงในตารางที่ 15 และการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อแบ่งตามค่าของ BMI แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ไม่สัมพันธ์กับค่าของ BMI ที่ระดับต่าง ๆ แต่จากผลการทดลองในตารางที่ 15 แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีความสัมพันธ์กับค่า BMI โดยรวม ($r = -0.3563$, $P \text{ value} = 0.007$) โดยค่าของ BMI มีความสัมพันธ์แบบสวนทางกับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระดับ BMI ที่สูงนั้นอาจมีผลโดยตรงกับโอกาสในการเป็นโรคตับคั่งไขมันอยู่แล้ว และไม่เกี่ยวเนื่องกับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ ดังนั้นการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอจึงไม่สัมพันธ์กับค่าของ BMI ที่ระดับต่าง ๆ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่าของ ALT และ AST พบว่าค่าของ ALT และ AST มีความสัมพันธ์กับการเกิด inflammation ของตับ และในงานวิจัยนี้พบว่าค่า ALT และ AST กับระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องมาจากกลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่ที่นำมาศึกษานั้นร้อยละ 78 มีระดับ inflammation ของตับ ≤ 1 จึงไม่ส่งผลต่อระดับของ ALT และ AST ที่ตรวจวัดในซีรัม นอกจากนี้การศึกษาพยาธิสภาพในการเกิดโรคตับคั่งไขมัน ปัจจัยหลักคือการมีไตรกลีเซอไรด์สะสมในระดับมากเกินเกณฑ์ปกติ ดังนั้นผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าซีรัมไมโครอาร์เอ็นเอ 122 และไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ มีความสัมพันธ์กับพารามิเตอร์ที่เป็นปัจจัยนำไปสู่โรคตับคั่งไขมัน จึงอาจนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการทำนายโรคตับคั่งไขมันได้

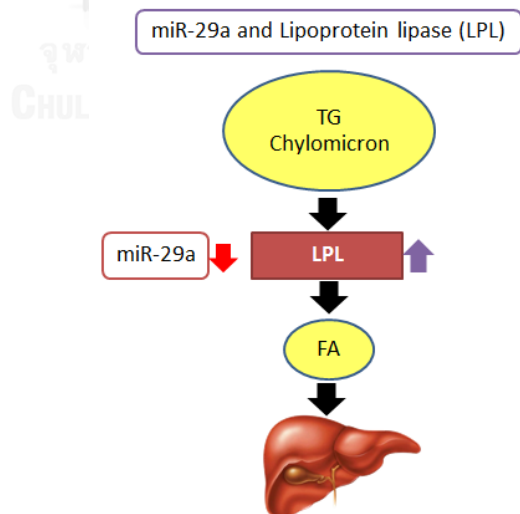
การทำนายยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122

การทำนายยีนเป้าหมายโดยผ่านโปรแกรมคอมพิวเตอร์และฐานข้อมูลงานวิจัยโดยใช้โปรแกรม miRTarbase และ Targetscan ที่จะเชื่อมโยงไปสู่วิถี metabolic ซึ่งอาจสามารถนำไปสู่โรคตับคั่งไขมันได้ พบว่า ไมโครอาร์เอ็นเอหนึ่ง ๆ สามารถควบคุมยีนได้หลากหลายยีน ที่มีหน้าที่แตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 17 ตัวอย่างเช่น ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ กับยีนเป้าหมาย LPL (Lipoprotein lipase) (66-68) โดยหน้าที่ของ LPL คือ ทำหน้าที่ย่อยสลาย ไตรกลีเซอไรด์ใน Chylomicrons ที่อยู่บริเวณ extrahepatic tissue (ปกติสามารถพบ LPL ได้ในเนื้อเยื่อทั่วไป โดยส่วนมากจะเป็นเนื้อเยื่อไขมัน กล้ามเนื้อหัวใจ และกล้ามเนื้อลาย) เมื่อย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์จะได้เป็นกรดไขมันอิสระซึ่งจะถูกส่งไปเก็บสะสมไว้ในเนื้อเยื่อไขมันและสำหรับกระบวนการ oxidation ในเนื้อเยื่อต่างๆต่อไป และหากมีภาวะของการดื้อต่ออินซูลินร่วมด้วย จะส่งผลให้มีการนำส่งกรดไขมันอิสระนี้ไปยังตับเพิ่มมากขึ้นจนเกิดการสะสมในรูปของไตรกลีเซอไรด์ ส่งผลให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินในตับ ซึ่งทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการ β -oxidation ทำให้ตับไม่สามารถย่อยสลายไขมันออกจากเซลล์ได้จึงเกิดภาวะไขมันสะสมที่ตับตามมา ดังแสดงในรูปที่ 28 (69) จากผลการทดลองพบว่าในผู้ที่ เป็นโรคตับคั่งไขมันจะมีการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ที่ลดลงส่งผลให้ยีน LPL มีการ

แสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น จึงเหนี่ยวนำให้มีการเก็บสะสมกรดไขมันอิสระไว้ในตับเพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้ตับมีไขมันสะสมสูงขึ้นจนเกินเกณฑ์ปกติ และอาจทำให้เกิดการอักเสบของตับเซลล์ตับ พังผืดในตับ พัฒนาไปเป็นตับแข็งและมะเร็งตับตามมาได้ ดังแสดงในรูปที่ 29

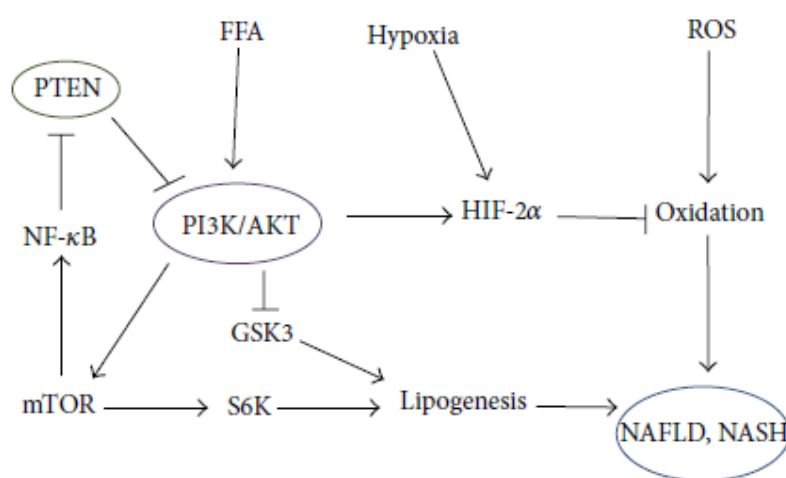


รูปที่ 28 แสดงการไหลของการสร้างไขมันผ่านเข้าสู่ตับ กรอบสี่เหลี่ยมแสดง metabolic pathway DNL; De novo lipogenesis, TAG; Triacylglycerol, FA; Fatty acid, LPL; Lipoprotein lipase, NEFA; nonesterified fatty acids (66)



รูปที่ 29 แสดงตัวอย่างการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ กับยีนเป้าหมาย Lipoprotein lipase (LPL) หมายเหตุ: TG; Triglyceride, FA; Fatty acid, LPL; Lipoprotein lipase

ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ปี กับยีนเป้าหมาย GSK3B (Glycogen synthase kinase-3 beta) เป็น serine/threonine kinase เกี่ยวข้องกับการสร้างไกลโคเจน สร้างโปรตีน gene transcription และ cell differentiation เป็นต้น โดยกรดไขมันอิสระจะไปกระตุ้นการทำงานของวิถี Akt/PI3K ซึ่งจะไปกระตุ้น downstream target คือ GSK3 ทำให้เกิดกระบวนการ Lipogenesis และเหนี่ยวนำให้เกิดตับคั่งไขมันตามมา ดังแสดงในรูปที่ 30 (70) นอกจากนี้ในสภาวะที่เป็น metabolic syndrome และเหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress พบว่ายีน GSK3 ไปยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรียแล้วเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบเอพออโทซิสตามมาได้ (71)

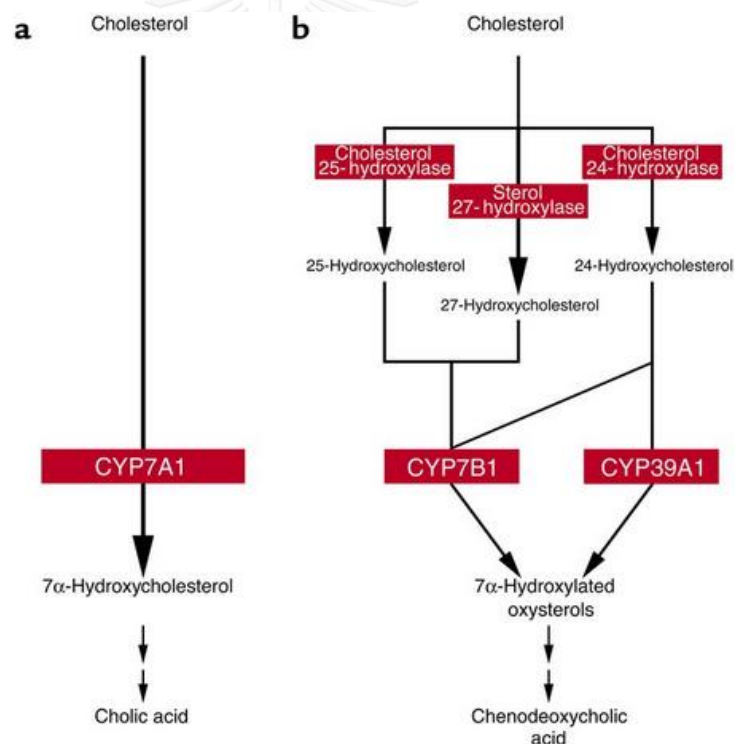


รูปที่ 30 บทบาทของ free fatty acid (FFA), hypoxia, reactive oxygen species (ROS) และ PTEN ในการพัฒนาไปเป็นโรคตับคั่งไขมัน โดยผ่านทางวิถีหลัก PI3K/AKT/GSK3 (70)

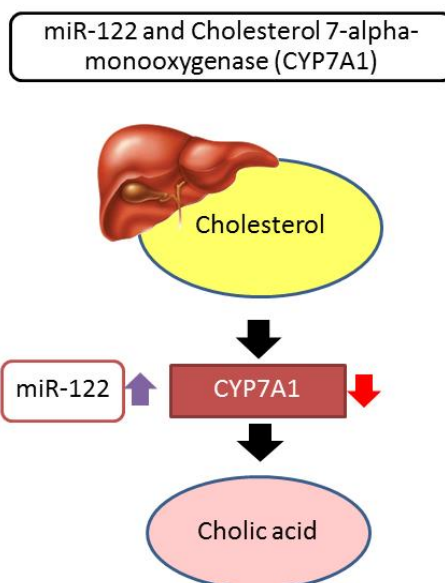
สำหรับไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี กับยีนเป้าหมาย Mmp15 (Matrix metalloproteinase-15) (72) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยโปรตีน เป็นส่วนสำคัญสำหรับ extracellular matrix เช่น embryonic development, reproduction และ tissue remodeling เช่น ในการเกิด metastasis ของโรค การเกิด invasion และกระตุ้นการเกิด cell proliferation มักเกิดได้ในช่วงต้นๆ ของโรคมะเร็งบางชนิด โดย MMPs จะช่วยในการทำลายโปรตีนที่เป็น adhesion protein ของเซลล์มะเร็งที่ยึดติดอยู่กับเซลล์มะเร็งด้วยกันเองหรือบริเวณที่เกาะติดอยู่กับส่วนของ matrix และนอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยในการปลดปล่อยสาร chemoattractants จาก extracellular matrix ทั้งหมดนี้จะเอื้อต่อการเจริญเติบโต การแพร่กระจายและการสร้างหลอดเลือดในเนื้อเยื่อสำหรับการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงอาจส่งผลให้กระตุ้นการพัฒนาและการดำเนินไปของโรคตับคั่งไขมันไปสู่โรคมะเร็งตับได้ (73) จากผลการทดลองพบว่าในผู้ที่เป็โรคตับคั่งไขมันจะมีการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี มีแนวโน้มที่ลดลง อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่สนับสนุนว่าการลดลงของไมโครอาร์เอ็นเอ

29 ซี ทำให้ Mmp15 มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น จึงเหนี่ยวนำให้เกิดการดำเนินไปของโรคตับคั่งไขมันไปสู่โรคมะเร็งตับได้

นอกจากนี้ไมโครอาร์เอ็นเอ 122 กับยีนเป้าหมาย CYP7A1 (Cholesterol 7-alpha-monooxygenase) ซึ่งยีน CYP7A1 คือเอนไซม์ที่เป็น rate-limiting enzyme ของการเปลี่ยนโคเลสเตอรอลภายในตับให้เป็นกรดน้ำดี ซึ่งกรดน้ำดีจะมีบทบาทสำคัญในการย่อยและดูดซึมไขมันและน้ำมันในลำไส้เล็กต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 31 (74-76) และจากผลการทดลองที่ได้พบว่า การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มของผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน เทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี จากหน้าที่ของยีนดังกล่าวข้างต้น อาจสรุปได้ว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ที่เพิ่มสูงขึ้นไปยับยั้งการแสดงออกของยีน CYP7A1 ทำให้มีการสะสมของโคเลสเตอรอลในตับเพิ่มสูงขึ้น เหนี่ยวนำให้เกิด liver injury โดยเป็นสาเหตุให้เกิดเอพอฟโทซิสและเนโครซิสในเซลล์ตับ ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดโรคตับคั่งไขมันตามมาได้ (77) ดังแสดงในรูปที่ 32



รูปที่ 31 บทบาทของ CYP7A1 ในการเปลี่ยนโคเลสเตอรอลไปเป็นน้ำดี รูป a แสดงกระบวนการสร้างน้ำดี โดยการเปลี่ยนโคเลสเตอรอลที่เข้าสู่ตับ ให้เป็น Cholic acid (CA) โดย CYP7A1 จัดเป็น rate-limiting enzyme และรูป b และกระบวนการเปลี่ยนโคเลสเตอรอลไปเป็น chenodeoxycholic acid (CDCA) โดยอาศัย CYP7B1 CYP39A1 (76)



รูปที่ 32 แสดงตัวอย่างการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 กับยีนเป้าหมาย CYP7A1

จากผลการทำนายยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ แสดงให้เห็นว่าถึงแม้ว่าไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ บี และซี จะมีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันแต่การไปยับยั้งยีนเป้าหมายบางตัวต่างกัน ซึ่งยีนเป้าหมายแต่ละตัวทำงานแตกต่างกัน ดังนั้นการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ บี และซี จึงอาจแตกต่างกันได้ตามผลการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอตัวเดียวยังแตกต่างกัน ในโรคตับชนิดอื่นๆ เช่น ไมโครอาร์เอ็นเอ 122 มีการแสดงออกที่สูงขึ้นในซีรัมของผู้ที่เป็นมะเร็งตับ (78, 79) ไวรัสตับอักเสบบี และตับคั่งไขมัน แต่มีการแสดงออกที่ลดลงในผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่มีระยะของ fibrosis ขั้นรุนแรง (F3, F4) (80) เป็นต้น และนอกจากการทำนายยีนเป้าหมายผ่านทางวิถี metabolic แล้ว ไมโครอาร์เอ็นเอหนึ่งตัวยังควบคุมยีนเป้าหมายได้มากมายหลากหลายชนิด และในหลายๆ กระบวนการ ขึ้นอยู่กับว่าโรคเหล่านั้นสัมพันธ์กับกระบวนการใดในร่างกาย ตัวอย่างเช่น apoptotic process, biological regulation, cellular process หรือ immune system process เป็นต้น ควบคุมผ่านยีนใด และการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอหนึ่งเป็นเช่นไร ดังนั้นการศึกษาการควบคุมแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอกับยีนเป้าหมายนั้นยังต้องมีการพัฒนาต่อไป

จากการศึกษาวิจัยนี้พบว่าการเกิดโรคตับคั่งไขมัน มีสาเหตุมาจากหลากหลายปัจจัย ตั้งแต่การดำเนินชีวิตประจำวัน อุบัติภัยการรับประทานอาหาร น้ำหนัก เพศ ภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เช่น ภาวะโรคอ้วน ภาวะดื้อต่ออินซูลิน metabolic syndrome ปัจจัยอื่นๆ เช่น ระดับของไตรกลีเซอไรด์ LDL HDL AST ALT ALP เป็นต้น นอกจากนี้เกี่ยวข้องกับควบคุมของไมโครอาร์เอ็นเอผ่านยีนเป้าหมายและหน้าที่ของยีนเป้าหมายที่สัมพันธ์ต่อการเกิดโรค ซึ่งการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัมมีความสัมพันธ์กับระดับการอักเสบของตับในผู้ป่วยโรคตับ

คั่งไขมัน ซึ่งประเมินโดยใช้ NAS โดยเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี การแสดงออกของของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในซีรัมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มของผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมันเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี จึงอาจใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับวินิจฉัยโรคตับคั่งไขมันได้ แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดในอีกหลายด้าน เช่น จำนวนกลุ่มตัวอย่างมีขนาดเล็ก ในงานวิจัยต่อไปต้องเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่าง รวมถึงยังต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างไมโครอาร์เอ็นเอกับยีนเป้าหมายที่สามารถส่งผลต่อการเกิดโรค ทั้งนี้ การศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัมและเนื้อเยื่อตับจากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการศึกษาวิจัยอื่น ๆ ซึ่งอาจมีประโยชน์ต่อไปในอนาคต



รายการอ้างอิง

1. Hjelkrem M, Stauch C, Shaw J, Harrison SA. Validation of the non-alcoholic fatty liver disease activity score. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34(2):214-8.
2. Ceccarelli S, Panera N, Gnani D, Nobili V. Dual Role of MicroRNAs in NAFLD. *Int J Mol Sci.* 2013;14(4):8437-55.
3. Kumar A, Sharma A, Duseja A, Das A, Dhiman RK, Chawla YK, et al. Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) have Higher Oxidative Stress in Comparison to Chronic Viral Hepatitis. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology.* 2013;3(1):12-8.
4. Liu Q, Bengmark S, Qu S. The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids Health Dis.* 2010;9:42.
5. Li YY. Genetic and epigenetic variants influencing the development of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG.* 2012;18(45):6546-51.
6. Parekh S, Anania FA. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2007;132(6):2191-207.
7. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, Kowdley KV, Chalasani N, Lavine JE, et al. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2011;54(1):344-53.
8. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2005;128(7):1898-906.
9. Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sultmann H. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer.* 2010;9:306.
10. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41(6):1313-21.

11. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004;14(10A):1902-10.
12. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23(20):4051-60.
13. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 2005;3(3):e85.
14. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 2009;11(3):228-34.
15. Rottiers V, Naar AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(4):239-50.
16. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001;294(5543):853-8.
17. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol.* 2002;12(9):735-9.
18. Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, Sharma A, Dreyfuss G. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA.* 2003;9(2):180-6.
19. Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics.* 2012;44(4):237-44.
20. He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol.* 2007;21(11):2785-94.
21. Jin X, Ye YF, Chen SH, Yu CH, Liu J, Li YM. MicroRNA expression pattern in different stages of nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis.* 2009;41(4):289-97.
22. Pandey AK, Verma G, Vig S, Srivastava S, Srivastava AK, Datta M. miR-29a levels are elevated in the db/db mice liver and its overexpression leads to attenuation of insulin action on PEPCK gene expression in HepG2 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;332(1-2):125-33.
23. Wang Y, Zhang X, Li H, Yu J, Ren X. The role of miRNA-29 family in cancer. *Eur J Cell Biol.* 2013;92(3):123-8.

24. Cao J, Feng XX, Yao L, Ning B, Yang ZX, Fang DL, et al. Saturated free fatty acid sodium palmitate-induced lipoapoptosis by targeting glycogen synthase kinase-3 β activation in human liver cells. *Dig Dis Sci*. 2014;59(2):346-57.
25. Miyaaki H, Ichikawa T, Kamo Y, Taura N, Honda T, Shibata H, et al. Significance of serum and hepatic microRNA-122 levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2013.
26. Yang YM, Seo SY, Kim TH, Kim SG. Decrease of microRNA-122 causes hepatic insulin resistance by inducing protein tyrosine phosphatase 1B, which is reversed by licorice flavonoid. *Hepatology*. 2012;56(6):2209-20.
27. Jopling C. Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. *RNA Biol*. 2012;9(2):137-42.
28. Girard M, Jacquemin E, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol*. 2008;48(4):648-56.
29. Fernandez-Hernando C, Ramirez CM, Goedeke L, Suarez Y. MicroRNAs in metabolic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(2):178-85.
30. Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(11):656-65.
31. Lakner AM, Bonkovsky HL, Schrum LW. microRNAs: fad or future of liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2011;17(20):2536-42.
32. Johnson TO, Ermolieff J, Jirousek MR. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(9):696-709.
33. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. 2005;438(7068):685-9.
34. Hsu SH, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, et al. Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest*. 2012;122(8):2871-83.
35. Tsai WC, Hsu SD, Hsu CS, Lai TC, Chen SJ, Shen R, et al. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest*. 2012;122(8):2884-97.

36. Gatfield D, Le Martelot G, Vejnar CE, Gerlach D, Schaad O, Fleury-Olela F, et al. Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev.* 2009;23(11):1313-26.
37. Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos MJ, Mirshahi F, Maher JW, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology.* 2008;48(6):1810-20.
38. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* 2006;3(2):87-98.
39. Alisi A, Da Sacco L, Bruscalupi G, Piemonte F, Panera N, De Vito R, et al. Mirnome analysis reveals novel molecular determinants in the pathogenesis of diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Lab Invest.* 2011;91(2):283-93.
40. Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* 2011;6(8):e23937.
41. Yamada H, Suzuki K, Ichino N, Ando Y, Sawada A, Osakabe K, et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. *Clin Chim Acta.* 2013;424:99-103.
42. Pirola CJ, Fernandez Gianotti T, Castano GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma M, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut.* 2014.
43. Xing TJ, Jiang DF, Huang JX, Xu ZL. Expression and clinical significance of miR-122 and miR-29 in hepatitis B virus-related liver disease. *Genet Mol Res.* 2014;13(3):7912-8.
44. Singh A, Pandey GK. Primer design using Primer Express(R) for SYBR Green-based quantitative PCR. *Methods Mol Biol.* 2015;1275:153-64.
45. Rodriguez A, Rodriguez M, Cordoba JJ, Andrade MJ. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods Mol Biol.* 2015;1275:31-56.

46. Mei Q, Li X, Meng Y, Wu Z, Guo M, Zhao Y, et al. A facile and specific assay for quantifying microRNA by an optimized RT-qPCR approach. *PLoS One*. 2012;7(10):e46890.
47. Temcharoen P, Kaewboonruang P, Pradipasen M, Srisorachart S. The optimal cut-off points of body mass index which reflect the risk factors of cardiovascular disease in the urban Thai male population. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 2009;92 Suppl 7:S68-74.
48. Payungporn S, Chieochansin T, Thongmee C, Panjaworayan N, Samransamruajkit R, Theamboonlers A, et al. Detection and discrimination of WU/KI polyomaviruses by real-time PCR with melting curve analysis. *J Virol Methods*. 2008;153(1):70-3.
49. Zhang H, Li QY, Guo ZZ, Guan Y, Du J, Lu YY, et al. Serum levels of microRNAs can specifically predict liver injury of chronic hepatitis B. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(37):5188-96.
50. Csak T, Bala S, Lippai D, Satishchandran A, Catalano D, Kodys K, et al. microRNA-122 regulates hypoxia-inducible factor-1 and vimentin in hepatocytes and correlates with fibrosis in diet-induced steatohepatitis. *Liver Int*. 2015;35(2):532-41.
51. Takaki Y, Saito Y, Takasugi A, Toshimitsu K, Yamada S, Muramatsu T, et al. Silencing of microRNA-122 is an early event during hepatocarcinogenesis from non-alcoholic steatohepatitis. *Cancer Sci*. 2014;105(10):1254-60.
52. Thakral S, Ghoshal K. miR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir. *Current gene therapy*. 2015;15(2):142-50.
53. Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology*. 2011;53(1):209-18.
54. Celikbilek M, Baskol M, Taheri S, Deniz K, Dogan S, Zararsiz G, et al. Circulating microRNAs in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*. 2014;6(8):613-20.
55. Wu Q, Lu Z, Li H, Lu J, Guo L, Ge Q. Next-generation sequencing of microRNAs for breast cancer detection. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:597145.

56. Hong Q, Fang J, Pang Y, Zheng J. Prognostic value of the microRNA-29 family in patients with primary osteosarcomas. *Med Oncol*. 2014;31(8):37.
57. Liang J, Liu C, Qiao A, Cui Y, Zhang H, Cui A, et al. MicroRNA-29a-c decrease fasting blood glucose levels by negatively regulating hepatic gluconeogenesis. *J Hepatol*. 2013;58(3):535-42.
58. Wang J, Chu ES, Chen HY, Man K, Go MY, Huang XR, et al. microRNA-29b prevents liver fibrosis by attenuating hepatic stellate cell activation and inducing apoptosis through targeting PI3K/AKT pathway. *Oncotarget*. 2015;6(9):7325-38.
59. Pogribny IP, Starlard-Davenport A, Tryndyak VP, Han T, Ross SA, Rusyn I, et al. Difference in expression of hepatic microRNAs miR-29c, miR-34a, miR-155, and miR-200b is associated with strain-specific susceptibility to dietary nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Lab Invest*. 2010;90(10):1437-46.
60. Zhu W, He J, Chen D, Zhang B, Xu L, Ma H, et al. Expression of miR-29c, miR-93, and miR-429 as potential biomarkers for detection of early stage non-small lung cancer. *PLoS One*. 2014;9(2):e87780.
61. Zhang Y, Cheng X, Lu Z, Wang J, Chen H, Fan W, et al. Upregulation of miR-15b in NAFLD models and in the serum of patients with fatty liver disease. *Diabetes research and clinical practice*. 2013;99(3):327-34.
62. Nannipieri M, Gonzales C, Baldi S, Posadas R, Williams K, Haffner SM, et al. Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: the Mexico City diabetes study. *Diabetes Care*. 2005;28(7):1757-62.
63. Yu AS, Keeffe EB. Elevated AST or ALT to nonalcoholic fatty liver disease: accurate predictor of disease prevalence? *Am J Gastroenterol*. 2003;98(5):955-6.
64. Consultation WHOE. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet*. 2004;363(9403):157-63.
65. Pinto CG, Marega M, Carvalho JA, Carmona FG, Lopes CE, Ceschini FL, et al. Physical activity as a protective factor for development of non-alcoholic fatty liver in men. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;13(1):34-40.
66. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1343-51.

67. Chen T, Li Z, Tu J, Zhu W, Ge J, Zheng X, et al. MicroRNA-29a regulates pro-inflammatory cytokine secretion and scavenger receptor expression by targeting LPL in oxLDL-stimulated dendritic cells. *FEBS Lett.* 2011;585(4):657-63.
68. Mattis AN, Song G, Hitchner K, Kim RY, Lee AY, Sharma AD, et al. A screen in mice uncovers repression of lipoprotein lipase by microRNA-29a as a mechanism for lipid distribution away from the liver. *Hepatology.* 2015;61(1):141-52.
69. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 2014;15(4):6184-223.
70. Matsuda S, Kobayashi M, Kitagishi Y. Roles for PI3K/AKT/PTEN Pathway in Cell Signaling of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *ISRN Endocrinol.* 2013;2013:472432.
71. Yang YM, Han CY, Kim YJ, Kim SG. AMPK-associated signaling to bridge the gap between fuel metabolism and hepatocyte viability. *World journal of gastroenterology : WJG.* 2010;16(30):3731-42.
72. Garbacki N, Di Valentin E, Huynh-Thu VA, Geurts P, Irrthum A, Crahay C, et al. MicroRNAs profiling in murine models of acute and chronic asthma: a relationship with mRNAs targets. *PLoS One.* 2011;6(1):e16509.
73. Okazaki I, Noro T, Tsutsui N, Yamanouchi E, Kuroda H, Nakano M, et al. Fibrogenesis and Carcinogenesis in Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH): Involvement of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMPs). *Cancers (Basel).* 2014;6(3):1220-55.
74. Qi Y, Jiang C, Cheng J, Krausz KW, Li T, Ferrell JM, et al. Bile acid signaling in lipid metabolism: metabolomic and lipidomic analysis of lipid and bile acid markers linked to anti-obesity and anti-diabetes in mice. *Biochimica et biophysica acta.* 2015;1851(1):19-29.
75. Song KH, Li T, Owsley E, Chiang JY. A putative role of micro RNA in regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase expression in human hepatocytes. *J Lipid Res.* 2010;51(8):2223-33.
76. Beigneux A, Hofmann AF, Young SG. Human CYP7A1 deficiency: progress and enigmas. *J Clin Invest.* 2002;110(1):29-31.

77. Arguello G, Balboa E, Arrese M, Zanlungo S. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1852(9):1765-78.
78. Li G, Shen Q, Li C, Li D, Chen J, He M. Identification of circulating MicroRNAs as novel potential biomarkers for hepatocellular carcinoma detection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Transl Oncol*. 2015.
79. Qi P, Cheng SQ, Wang H, Li N, Chen YF, Gao CF. Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *PLoS One*. 2011;6(12):e28486.
80. Trebicka J, Anadol E, Elfimova N, Strack I, Roggendorf M, Viazov S, et al. Hepatic and serum levels of miR-122 after chronic HCV-induced fibrosis. *J Hepatol*. 2013;58(2):234-9.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1. การเตรียม Annealing buffer

- Yeast extract 0.5 กรัม
- Tryptone 1.0 กรัม
- NaCl 0.5 กรัม
- น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีและใส่ 2 โมลาร์ของ Mg^{2+} , 2 โมลาร์ ของ Glucose และ 1 โมลาร์ของ KCl

2. การเตรียมสารสำหรับ Cloning

a. LB Agar

- Agar 1.5 กรัม
- Yeast Extract 0.5 กรัม
- Tryptone 1 กรัม
- NaCl 0.5 กรัม
- น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

b. LB broth

- Yeast extract 0.5 กรัม
- Tryptone 1.0 กรัม
- NaCl 0.5 กรัม
- น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

c. SOC medium

- Yeast extract 0.5 กรัม
- Tryptone 2.0 กรัม
- NaCl 0.5 กรัม
- น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติม 2 โมลาร์ของ Mg^{2+} , 2 โมลาร์ของ Glucose และ 1 โมลาร์ของ KCl

3. การเตรียม 5X TBE (Tris-Boric-EDTA Bufer)

- Tris 54 กรัม
- Boric Acid 27.5 กรัม
- EDTA 4.16 กรัม
- น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร





ดัชนี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางแสดงการตรวจวัดการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ วัดปริมาณ copies/ μl โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานและ normalize ด้วย U6

ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ในกลุ่มผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน

Serum miR-29a					
Number	Sex	Age	Ct	copies/ μl	log copies/U6
1	Male	62	41.30	11.36	-0.62
2	Female	54	25.60	234719.10	4.09
3	Male	38	43.64	2.58	0.77
4	Male	38	42.25	6.22	-0.95
5	Male	60	44.80	1.24	-0.40
6	Female	52	35.17	549.11	2.01
7	Male	30	34.73	727.88	2.09
8	Male	64	35.59	420.12	1.63
9	Female	52	35.23	528.48	1.60
10	Female	56	35.02	603.23	2.34
11	Male	57	35.98	329.44	1.97
12	Female	57	34.90	654.28	0.38
13	Male	53	undetermined	undetermined	undetermined
14	Female	63	undetermined	undetermined	undetermined
15	Male	56	40.68	16.76	1.85
16	Female	55	undetermined	undetermined	undetermined
17	Male	40	36.92	181.24	2.39
18	Male	54	undetermined	undetermined	undetermined
19	Female	40	35.49	449.80	0.93
20	Male	40	36.98	174.90	0.84
21	Male	31	40.80	15.52	-0.25
23	Female	53	undetermined	undetermined	undetermined
24	Female	31	39.20	42.90	-0.72

Number	Sex	Age	Ct	copies/ μ l	log copies/U6
26	Female	38	38.64	61.05	-0.15
27	Female	54	41.04	13.41	-0.94
29	Female	33	40.40	20.00	-1.40
30	Male	66	undetermined	undetermined	undetermined
31	Female	29	38.12	85.09	-0.41
33	Female	55	43.82	2.30	-2.08
34	Female	60	38.80	55.23	-0.90
35	Female	48	undetermined	undetermined	undetermined
36	Female	34	35.92	341.21	-0.30
37	Female	46	36.29	270.90	0.12
38	Male	58	36.24	279.79	-0.54
39	Female	60	33.57	1516.59	0.30
40	Male	41	40.88	14.80	-0.85
41	Male	24	32.91	2304.46	-0.20
42	Male	37	36.86	188.47	-0.67
45	Female	24	undetermined	undetermined	undetermined
46	Female	40	undetermined	undetermined	undetermined
47	Female	70	42.80	4.39	0.06
48	Female	57	undetermined	undetermined	undetermined
49	Female	67	34.16	1043.24	0.09
50	Female	50	undetermined	undetermined	undetermined
51	Male	25	undetermined	undetermined	undetermined
52	Female	56	38.35	73.24	-0.56
54	Female	31	36.52	234.29	-0.10
55	Male	55	35.52	441.20	0.13
56	Male	18	36.12	300.33	-0.40
57	Female	32	37.28	144.85	-0.10
59	Male	62	24.27	547376.29	3.22
60	Female	54	24.28	540887.87	3.27

Number	Sex	Age	Ct	copies/ μ l	log copies/U6
61	Male	26	22.24	1977246.91	2.26
62	Male	38	21.99	2314529.48	2.85
63	Male	34	22.61	1556694.86	2.94
64	Male	25	38.62	61.74	0.44
65	Female	28	38.30	75.60	0.46
66	Male	20	38.09	86.69	0.77



ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ในกลุ่มผู้ที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน

Serum miR-29c					
Number	Sex	Age	Ct	copies/ μ l	log copies/U6
1	Male	62	42.12	15.89	-0.47
2	Female	54	27.75	154161.49	3.91
3	Male	38	42.53	12.22	1.44
4	Male	38	44.46	3.56	-1.19
5	Male	60	40.86	35.48	1.05
6	Female	52	35.39	1171.08	2.34
7	Male	30	35.43	1142.18	2.29
8	Male	64	34.99	1512.66	2.19
9	Female	52	35.11	1398.03	2.02
10	Female	56	36.34	635.41	2.36
11	Male	57	38.17	197.38	1.75
12	Female	57	34.63	1895.13	0.84
13	Male	53	36.42	606.17	0.14
14	Female	63	37.20	367.96	0.35
15	Male	56	39.11	108.75	2.66
16	Female	55	34.45	2130.58	0.13
17	Male	40	40.55	43.26	1.77
18	Male	54	34.57	1980.08	0.77
19	Female	40	34.14	2605.23	1.69
20	Male	40	34.34	2286.79	1.96
21	Male	31	36.63	530.74	1.28
23	Female	53	44.22	4.14	-0.18
24	Female	31	40.30	50.66	-0.65
26	Female	38	38.62	148.64	0.23
27	Female	54	40.26	52.00	-0.35
29	Female	33	40.23	53.18	-0.98

Number	Sex	Age	Ct	copies/ μ l	log copies/U6
30	Male	66	undetermined	undetermined	undetermined
31	Female	29	40.03	60.13	-0.56
33	Female	55	undetermined	undetermined	undetermined
34	Female	60	38.75	57.03	-0.88
35	Female	48	undetermined	undetermined	undetermined
36	Female	34	40.38	20.26	-1.52
37	Female	46	35.94	338.50	0.22
38	Male	58	37.30	142.55	-0.83
39	Female	60	34.97	625.55	-0.08
40	Male	41	41.97	7.43	-1.15
41	Male	24	39.46	36.38	-2.00
42	Male	37	38.30	75.78	-1.06
45	Female	24	undetermined	undetermined	undetermined
46	Female	40	41.91	18.09	1.23
47	Female	70	42.93	9.45	0.39
48	Female	57	46.09	1.25	3.68
49	Female	67	34.75	1757.10	0.32
50	Female	50	45.33	2.03	0.09
51	Male	25	45.70	1.61	-0.41
52	Female	56	38.51	159.40	-0.22
54	Female	31	36.95	432.51	0.17
55	Male	55	37.02	412.71	0.10
56	Male	18	35.94	822.87	0.04
57	Female	32	37.42	319.52	0.24
59	Male	62	29.44	52477.23	2.20
60	Female	54	30.50	26595.51	1.96
61	Male	26	29.06	66726.04	0.79
62	Male	38	29.24	59567.55	1.26
63	Male	34	31.21	16933.17	0.98

Number	Sex	Age	Ct	copies/ μ l	log copies/U6
64	Male	25	44.71	3.02	-0.87
65	Female	28	43.36	7.19	-0.56
66	Male	20	undetermined	undetermined	undetermined



ไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในกลุ่มผู้ที่เป็นโรคตับแข็งไขมัน

Serum miR-122					
Number	Sex	Age	Ct	copies/ μ l	log copies/U6
1	Male	62	34.74	77.30	0.22
2	Female	54	31.97	506.01	1.42
3	Male	38	30.95	1007.51	3.36
4	Male	38	30.11	1785.64	1.51
5	Male	60	33.96	131.56	1.62
6	Female	52	31.77	579.48	2.03
7	Male	30	30.61	1272.62	2.33
8	Male	64	33.29	206.01	1.32
9	Female	52	35.95	34.01	0.41
10	Female	56	31.99	500.45	2.26
11	Male	57	34.77	75.95	1.33
12	Female	57	26.31	23536.71	1.93
13	Male	53	27.81	8503.74	1.29
14	Female	63	26.31	23531.04	2.16
15	Male	56	31.44	727.22	3.49
16	Female	55	26.65	18723.21	1.08
17	Male	40	37.59	11.20	1.18
18	Male	54	23.11	205880.19	2.78
19	Female	40	29.71	2352.44	1.65
20	Male	40	30.25	1627.73	1.81
21	Male	31	35.64	42.02	0.18
23	Female	53	30.53	1347.81	2.33
24	Female	31	27.58	9937.06	1.65
26	Female	38	26.86	16223.03	2.27
27	Female	54	29.71	2344.95	1.31
29	Female	33	28.68	4705.07	0.97

Number	Sex	Age	Ct	copies/ μ l	log copies/U6
30	Male	66	undetermined	undetermined	undetermined
31	Female	29	26.36	22807.92	2.02
33	Female	55	24.39	86429.17	2.50
34	Female	60	29.38	2930.73	0.83
35	Female	48	34.15	115.40	0.51
36	Female	34	27.06	14199.26	1.32
37	Female	46	26.24	24663.16	2.08
38	Male	58	27.52	10392.01	1.03
39	Female	60	26.07	27742.13	1.56
40	Male	41	29.16	3396.78	1.51
41	Male	24	30.21	1664.87	-0.34
42	Male	37	27.01	14594.97	1.22
45	Female	24	39.72	2.64	0.82
46	Female	40	39.15	3.88	0.56
47	Female	70	31.50	695.63	2.26
48	Female	57	33.04	244.48	5.97
49	Female	67	27.52	10390.57	1.09
50	Female	50	37.16	14.94	0.96
51	Male	25	undetermined	undetermined	undetermined
52	Female	56	29.09	3580.64	1.13
54	Female	31	29.21	3294.21	1.05
55	Male	55	30.65	1241.45	0.58
56	Male	18	27.25	12474.06	1.22
57	Female	32	31.28	805.44	0.64
59	Male	62	29.96	1976.99	0.77
60	Female	54	28.87	4145.62	1.15
61	Male	26	25.92	30768.58	0.45
62	Male	38	31.15	883.33	-0.56
63	Male	34	30.66	1230.02	-0.16

Number	Sex	Age	Ct	copies/ μ l	log copies/U6
64	Male	25	35.83	36.87	0.22
65	Female	28	32.98	254.49	0.98
66	Male	20	36.69	20.62	0.15



ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ ในกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี

Serum miR-29a					
Number	Sex	Age	Ct	copies/ μ l	log copies/U6
1	Female	55	28.78	31326.50	1.36
3	Female	37	28.18	45985.68	1.34
4	Female	48	28.27	43327.34	1.52
5	Female	31	28.36	40898.80	1.42
6	Female	38	28.35	41305.03	1.27
8	Male	41	26.41	141203.37	2.45
9	Male	26	28.04	50311.70	1.65
11	Female	57	27.99	51903.75	1.56
12	Male	62	28.91	28979.12	1.95
13	Female	50	27.57	67396.69	1.05
14	Female	75	28.35	41332.33	1.44
16	Female	59	25.89	196007.02	2.66
17	Male	48	26.59	125729.58	2.39
18	Male	65	26.94	100923.28	2.22
19	Female	58	35.49	449.08	1.34
20	Male	54	25.57	240406.55	2.65
22	Female	65	26.80	110032.00	2.00
24	Female	58	26.50	132722.16	2.64
25	Female	54	28.78	31381.63	2.22
26	Male	65	26.57	127485.89	2.54
27	Female	59	29.10	25616.63	2.57
28	Female	59	28.96	28092.37	2.08
29	Male	45	29.30	22611.57	1.33
30	Male	45	42.11	6.80	-0.14
31	Male	80	44.00	2.05	-0.76
32	Male	83	41.53	9.79	-0.32

Number	Sex	Age	Ct	copies/ μ l	log copies/U6
33	Female	70	38.56	64.32	0.22
34	Female	74	38.41	70.46	1.77
35	Female	74	39.83	28.75	0.31
36	Female	80	38.00	91.72	0.57
37	Male	70	38.65	60.74	0.63
38	Female	79	43.02	3.82	-0.98
39	Male	69	38.55	64.57	0.84
40	Male	73	36.99	174.05	0.52



ไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี ในกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี

Serum miR-29c					
Number	Sex	Age	Ct	copies/ μ l	log copies/U6
1	Female	55	37.72	109.20	-1.10
3	Female	37	35.32	500.23	-0.62
4	Female	48	32.90	2310.77	0.25
5	Female	31	31.59	5299.56	0.53
6	Female	38	31.83	4542.13	0.31
8	Male	41	31.40	5982.04	1.08
9	Male	26	32.63	2748.32	0.39
11	Female	57	31.54	5482.01	0.58
12	Male	62	32.99	2187.26	0.83
13	Female	50	31.94	4261.04	-0.15
14	Female	75	32.26	3459.41	0.36
16	Female	59	32.73	2582.72	0.78
17	Male	48	30.05	14034.74	1.44
18	Male	65	29.77	16777.51	1.44
19	Female	58	38.24	78.58	0.58
20	Male	54	30.66	9536.73	1.25
22	Female	65	30.54	10306.94	0.97
24	Female	58	30.68	9422.25	1.50
25	Female	54	32.77	2517.96	1.13
26	Male	65	30.67	9514.41	1.41
27	Female	59	30.88	8328.64	2.09
28	Female	59	30.94	8026.77	1.54
29	Male	45	31.85	4506.47	0.63
30	Male	45	45.15	0.99	-0.97
31	Male	80	43.34	3.12	-0.58
32	Male	83	undetermined	undetermined	undetermined

Number	Sex	Age	Ct	copies/ μ l	log copies/U6
33	Female	70	46.12	0.54	-1.86
34	Female	74	43.52	2.78	0.36
35	Female	74	41.34	11.05	-0.11
36	Female	80	45.56	0.76	-1.51
37	Male	70	undetermined	undetermined	undetermined
38	Female	79	43.59	2.66	-1.14
39	Male	69	48.06	0.16	-1.77
40	Male	73	undetermined	undetermined	undetermined



ไมโครอาร์เอ็นเอ 122 ในกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี

Serum miR-122					
Number	Sex	Age	Ct	copies/ μ l	log copies/U6
1	Female	55	30.51	1363.99	0.00
3	Female	37	29.89	2068.19	-0.01
4	Female	48	30.45	1416.10	0.04
5	Female	31	31.20	853.55	-0.26
6	Female	38	28.53	5204.93	0.37
8	Male	41	29.47	2764.18	0.74
9	Male	26	29.81	2196.01	0.29
11	Female	57	29.99	1932.62	0.13
12	Male	62	30.18	1699.81	0.72
13	Female	50	30.37	1495.86	-0.61
14	Female	75	30.67	1220.51	-0.09
16	Female	59	30.17	1713.60	0.61
17	Male	48	29.89	2068.05	0.61
18	Male	65	30.20	1681.46	0.44
19	Female	58	32.06	477.54	1.36
20	Male	54	29.56	2588.85	0.68
22	Female	65	29.65	2443.05	0.35
24	Female	58	29.14	3441.38	1.06
25	Female	54	30.60	1279.12	0.83
26	Male	65	29.75	2276.35	0.79
27	Female	59	31.12	898.18	1.12
28	Female	59	29.63	2483.38	1.03
29	Male	45	30.34	1524.66	0.16
30	Male	45	36.60	21.94	0.37
31	Male	80	38.36	6.63	-0.25
32	Male	83	36.67	20.81	0.00

Number	Sex	Age	Ct	copies/ μ l	log copies/U6
33	Female	70	38.53	5.89	-0.81
34	Female	74	36.22	28.39	1.37
35	Female	74	36.08	31.15	0.34
36	Female	80	37.04	16.23	-0.18
37	Male	70	36.37	25.57	0.26
38	Female	79	34.43	95.22	0.42
39	Male	69	36.01	32.66	0.55
40	Male	73	35.71	40.03	-0.11



ตารางแสดง Biological functions ของยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 เอ

Target	apoptotic process	biological adhesion	biological regulation	cellular component organization or biogenesis	cellular process	developmental process	immune system process	localization	metabolic process	reproduction	response to stimulus	multicellular organismal process	locomotion
CDK6 (Cyclin-dependent kinase 6)					✓	✓			✓			✓	
RAN(GTP-binding nuclear protein Ran)					✓			✓	✓				
BACE1 (Beta-secretase 1)									✓				
S100B (Protein S100-B)					✓		✓		✓				
IMPDH1 (Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1)									✓				
GLUL (Glutamine synthetase)									✓				
PPM1D (Protein phosphatase 1D)			✓		✓				✓				
PIK3R1 (Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha)			✓		✓				✓				
LPL (Lipoprotein lipase)								✓	✓	✓			
CPEB3 (Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 3)						✓		✓	✓				
CPEB4 (Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4)						✓		✓	✓				
ADAMTS9 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 9)		✓	✓		✓				✓				
TRIM63 (E3 ubiquitin-protein ligase TRIM63)									✓				
MYCN (N-myc proto-oncogene protein)			✓		✓				✓				
SERPINB9 (Serpins B9)			✓						✓				
DICER1 (Endoribonuclease Dicer)									✓				

Target	apoptotic process	biological adhesion	biological regulation	cellular component organization or biogenesis	cellular process	developmental process	immune system process	localization	metabolic process	reproduction	response to stimulus	multicellular organismal process	locomotion
TNFAIP3 (Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3)									✓				
CDC42 (Cell division control protein 42 homolog)					✓			✓	✓				
PXDN (Peroxisidin homolog)							✓		✓				
ITIH5 (Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H5)			✓						✓				
PTEN (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN)					✓				✓				
ABL1 (Tyrosine-protein kinase ABL1)					✓				✓				

ตารางแสดง Biological functions ของยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ปี

Target	apoptotic process	biological adhesion	biological regulation	cellular component organization or biogenesis	cellular process	developmental process	immune system process	localization	metabolic process	reproduction	response to stimulus	multicellular organismal process	locomotion
HDAC4 (Histone deacetylase 4)	✓		✓	✓	✓	✓			✓				
SP1 (Transcription factor Sp1)							✓		✓				
CDK6 (Cyclin-dependent kinase 6)					✓	✓			✓			✓	
BACE1 (Beta-secretase 1)									✓				
SFPQ (Splicing factor, proline- and glutamine-rich)			✓						✓	✓			
DNAJB11 (DnaJ homolog subfamily B member 11)									✓		✓		
S100B (Protein S100-B)					✓		✓		✓				
ESR1 (Estrogen receptor)			✓		✓				✓				
NCOA3 (Nuclear receptor coactivator 3)			✓		✓				✓				
MMP15 (Matrix metalloproteinase-15)									✓				
Mmp24 (Matrix metalloproteinase-24)									✓				
MMP2 (72 kDa type IV collagenase)									✓				
HMGA2 (High mobility group protein HMGI-C)			✓		✓				✓				
BMP1 (Bone morphogenetic protein 1)		✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	
PTEN (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN)					✓				✓				
CDC42 (Cell division control protein 42 homolog)					✓			✓	✓				
GSK3B (Glycogen synthase kinase-3 beta)					✓	✓			✓			✓	

Target	apoptotic process	biological adhesion	biological regulation	cellular component organization or biogenesis	cellular process	developmental process	immune system process	localization	metabolic process	reproduction	response to stimulus	multicellular organismal process	locomotion
PIK3CG (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma isoform)					✓				✓				
NKIRAS2 (NF-kappa-B inhibitor-interacting Ras-like protein 2)		✓			✓			✓	✓			✓	
RAX (Retinal homeobox protein Rx)			✓			✓			✓			✓	
TBX21 (T-box transcription factor TBX21)			✓			✓	✓		✓		✓		
DUSP2 (Dual specificity protein phosphatase 2)					✓	✓			✓			✓	
FOS (Proto-oncogene c-Fos)	✓		✓		✓	✓	✓		✓			✓	
IMPDH1 (Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1)									✓				
MYCN (N-myc proto-oncogene protein)			✓		✓				✓				

ตารางแสดง Biological functions ของยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 29 ซี่

Target	apoptotic process	biological adhesion	biological regulation	cellular component organization or biogenesis	cellular process	developmental process	immune system process	localization	metabolic process	reproduction	response to stimulus	multicellular organismal process	locomotion
GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)									✓				
CDK6 (Cyclin-dependent kinase 6)					✓	✓			✓			✓	
SRSF10 (Serine/arginine-rich splicing factor 10)									✓				
Ctsk (Cathepsin K)									✓				
MMP15 (Matrix metalloproteinase-15)									✓				
MMP15 (Matrix metalloproteinase-15)									✓				
Mmp24 (Matrix metalloproteinase-24)									✓				
Mmp24 (Matrix metalloproteinase-24)									✓				
TFAP2C (Transcription factor AP-2 gamma)			✓			✓			✓				
CDC42 (Cell division control protein 42 homolog)					✓			✓	✓				
MYCN (N-myc proto-oncogene protein)			✓		✓				✓				
BACE1 (Beta-secretase 1)									✓				

ตารางแสดง Biological functions ของยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอ 122

Target	apoptotic process	biological adhesion	biological regulation	cellular component organization or biogenesis	cellular process	developmental process	immune system process	localization	metabolic process	reproduction	response to stimulus	multicellular organismal process	locomotion
CYP7A1 (Cholesterol 7-alpha-monooxygenase)									✓				
SRF (Serum response factor)			✓						✓				
RAC1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)					✓			✓	✓				
RHOA (Transforming protein RhoA)					✓			✓	✓				
CCNG1 (Cyclin-G1)			✓		✓				✓	✓			
GTF2B (Transcription initiation factor IIB)			✓						✓				
GYS1 (Glycogen [starch] synthase, muscle)									✓				
NFATC2IP (NFATC2-interacting protein)	✓		✓		✓	✓			✓				
ENTPD4 (Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4)									✓				
ANXA11 (Annexin A11)									✓				
FOXP1 (Forkhead box protein P1)			✓		✓	✓	✓		✓			✓	
MECP2 (Methyl-CpG-binding protein 2)			✓						✓				
NCAM1 (Neural cell adhesion molecule 1)	✓	✓			✓	✓	✓		✓			✓	
TBX19 (T-box transcription factor TBX19)			✓			✓			✓				
AACS (Acetoacetyl-CoA synthetase)									✓				
DUSP2 (Dual specificity protein phosphatase 2)					✓	✓			✓			✓	
ATP1A2 (Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2)			✓					✓	✓				
MAPK11 (Mitogen-activated protein kinase 11)					✓		✓		✓		✓		
AKT3 (RAC-gamma serine/threonine-protein kinase)	✓		✓	✓	✓	✓			✓	✓			

Target	apoptotic process	biological adhesion	biological regulation	cellular component organization or biogenesis	cellular process	developmental process	immune system process	localization	metabolic process	reproduction	response to stimulus	multicellular organismal process	locomotion
GALNT10 (Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10)									✓				
G6PC3 (Glucose-6-phosphatase 3)									✓				
SLC7A1 (High affinity cationic amino acid transporter 1)								✓	✓				
FOXJ3 (Forkhead box protein J3)			✓		✓	✓			✓			✓	
SLC7A11 (Cystine/glutamate transporter)								✓	✓				
TRIB1 (Tribbles homolog 1)					✓				✓				
DSTYK (Dual serine/threonine and tyrosine protein kinase)									✓				
PRKAB1 (5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-1)			✓				✓		✓		✓		
ACVR1C (Activin receptor type-1C)					✓	✓			✓				
PRKRA (Interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein kinase activator A)	✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
PTPN1 (Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1)									✓				
P4HA1 (Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1)									✓				
ZNF395 (Zinc finger protein 395)									✓				
SOCS1 (Suppressor of cytokine signaling 1)	✓		✓		✓	✓		✓	✓				
HMOX1 (Heme oxygenase 1)									✓				
CDK4 (Cyclin-dependent kinase 4)					✓	✓			✓			✓	

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นางสาวกณิศา แจ่มโสภา
 วัน เดือน ปีเกิด 16 มกราคม 2534
 สถานที่เกิด จังหวัดจันทบุรี
 ที่อยู่ 98 หมู่ 3 ตำบลทุ่งเบญจา อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี รหัสไปรษณีย์ 22170
 E-mail iamfaie@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมี) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2555

ทุนการศึกษาที่ได้รับ

พ.ศ. 2556 ได้รับทุนผู้ช่วยวิจัยของหน่วยวิจัยโรคตับและมะเร็งตับ

ผลงานทางวิชาการ

หัวข้อเรื่อง DETECTION AND QUANTITATION OF MIRNA-29 BASED ON REAL-TIME PCR ASSAY

ชื่อผู้นิพนธ์ Kanisa Jampoka, Sombat Treeprasertsuk, Pisit Tangkijvanich and Sunchai Payungporn

นำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์ ของการประชุมวิชาการ ประจำปีครั้งที่ 53 วันที่ 16-20 มิถุนายน 2557 ณ อาคารแพทยพัฒน์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์ ของงาน 10 ปี ชีวเคมีทางการแพทย์ จุฬาฯ วันที่ 10 กรกฎาคม 2557 ณ อาคารแพทยพัฒน์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อเรื่อง การวัดปริมาณไมโครอาร์เอ็นเอ 29 และไมโครอาร์เอ็นเอ 122 โดยใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์

ชื่อผู้นิพนธ์ Kanisa Jampoka, Puth Muangpaisarn, Sombat Treeprasertsuk, Pisit Tangkijvanich, Jarika Makkoch and Sunchai Payungporn

ตีพิมพ์ใน Proceedings ของโครงการประชุมวิชาการเสนอผลงานระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 34 วันศุกร์ที่ 27 มีนาคม 2558 ณ อาคารเรียนรวม คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หน้า 192-193

หัวข้อเรื่อง Serum MicroRNA-29 as Biomarkers for Diagnosis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

ชื่อผู้นิพนธ์ Kanisa Jampoka, Puth Muangpaisarn, Sombat Treeprasertsuk, Pisit Tangkijvanich and Sunchai Payungporn

นำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์ ของการประชุมวิชาการร่วมคณะแพทยศาสตร์สามสถาบัน พ.ศ. 2558: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย-ศิริราช วันที่ 4-6 มิถุนายน 2558 ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์ แอท เซ็นทรัลเวิลด์ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย