

อภิปรายและวิจารณ์ผล

คณะผู้วิจัยสามารถ amplify TSLP gene ได้จากการสกัดอาร์เอ็นเอของ Human epithelial cell line (A549) ที่ถูกกระตุ้นสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น แล้วทำการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA ทำการเพิ่มจำนวนยีน TSLP โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน โดยการออกแบบคู่ไพรเมอร์ จาก human TSLP sequences ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล โดยพบว่า PCR product มีขนาดประมาณ 489 bp และเมื่อนำ PCR product ดังกล่าวไปตรวจสอบความถูกต้องด้วยการทำ DNA sequencing ทั้งนี้เพื่อยืนยันความถูกต้องของ PCR amplified-DNA sequence ว่าเป็น sequences ของ gene เป้าหมายจริง จากการศึกษพบว่า sequences ที่ได้มีความเหมือนกับ human TSLP gene ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล คณะผู้วิจัยจึงโคลนยีนที่เป็นรหัสของ TSLP ของมนุษย์เข้าไปใน expression vector นำ recombinant vector เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* ทำการ induce ให้ transformed *E. coli* ผลิต recombinant TSLP แล้วทำการ purify recombinant TSLP ออกจากโปรตีนอื่นๆ ของแบคทีเรีย ด้วย affinity column จากนั้นคณะผู้วิจัยได้วิเคราะห์โปรตีนดังกล่าวด้วยวิธี SDS-PAGE และ LC MS/MS พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้มีขนาดประมาณ 15 KDa

คณะผู้วิจัยใช้ TSLP ที่ผลิตขึ้นเป็นแอนติเจนเป้าหมายในการทำ Bio-panning เพื่อคัดเลือก phage clones ที่ display human ScFv ที่มีความเฉพาะต่อ TSLP protein จาก human antibody phage display library ซึ่งการเลือกใช้เทคนิค phage display ในการคัดเลือก และผลิต แอนติบอดี ต่อโปรตีนต่าง ๆ นั้นมีมานานกว่า 20 ปีแล้ว (Winter G *et al.*, 1994) และเป็นเทคนิคที่ใช้เวลาไม่นานและมีราคาไม่สูงมาก จากการสุ่มคัดเลือกโคลน transfected *E. coli* จำนวน 192 โคลน ไปดำเนินการตรวจสอบ *huScFv* gene ด้วยวิธี PCR พบว่า 49 โคลนมี *huScFv* gene จากนั้นทำการกระตุ้นการสร้าง HuScFv จากเซลล์แบคทีเรียซึ่งถูก transfect ด้วย individual phage clone พบว่ามีทั้งหมด 20 โคลนสามารถสร้าง HuScFv ได้ คือ clone no. 5, 9, 10, 22, 24, 25, 34, 35, 37, 41, 44, 70, 75, 76, 79, 82, 88, 90, 94 และ 96 ซึ่ง HuScFv ที่ผลิตขึ้นมีขนาดประมาณ Mr 25-30 kDa หลังจากการวิเคราะห์ความสามารถของ selected HB2151 *E. coli* clones ในการผลิตโมเลกุล HuScFv คณะผู้วิจัยได้เปลี่ยนชื่อโคลนใหม่เป็น โคลนที่ 1-20 ตามลำดับ

เมื่อนำ crude HuScFv ทั้ง 20 clones ไปทดสอบการจับของ HuScFv ดังกล่าว ต่อ human thymic stromal lymphopoietin protein ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่ามี crude HuScFv จำนวน 10 clones คือ clones no. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 และ 16 ให้ผลบวกใน indirect ELISA คือให้ค่า OD_{405nm} ต่อโปรตีน human thymic stromal lymphopoietin สูงกว่าค่าที่ได้จาก BSA background control อย่างน้อย 2 เท่า แสดงว่าจากการผลิต human antibodies ด้วยเทคนิค phage display นั้นสามารถผลิต human antibodies ที่มีความสามารถในการจับกับ TSLP protein ได้จำนวน 10 โคลน

คณะผู้วิจัยนำ human antibodies ทั้ง 10 โคลน ไปทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งหน้าที่ของ TSLP โดยการผสม antibodies (20 µg/ml) แต่ละโคลนกับ TSLP ก่อน จากนั้นนำไปใส่ใน well ที่มี Myeloid dendritic cell อยู่ ทำการเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบ OX40L บนผิวเซลล์ที่จะแสดงออกหลังจากเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย TSLP เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น จากการทดสอบพบว่า human monoclonal antibodies โคลนที่ 5 และ 7 แสดง Percent inhibition สูงที่สุดคือ 89 และ 80%

ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มี monoclonal antibodies และโคลนที่ 2, 3, 4, 6, 8, 11, 12 และ 16 แสดง Percent inhibition เพียง 10-35% เท่านั้น จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่า human monoclonal antibodies โคลนที่ 5 และ 7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของ TSLP

จาก Human antibodies ทั้ง 10 โคลนที่จับอย่างจำเพาะกับ TSLP protein นั้นมีเพียง 2 โคลนเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของ TSLP protein ได้ซึ่งน่าจะเป็นเพราะว่า แอนติบอดีทั้ง 2 โคลนนี้เมื่อจับกับ TSLP protein แล้วมีผลทำให้ TSLP protein ไม่สามารถไปจับกับ TSLP receptor บนผิวเซลล์ได้ ทำให้ไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ OX40L บนผิวเซลล์ได้ ส่วน human antibody โคลนอื่น ๆ น่าจะจับกับส่วนอื่นของ TSLP protein และไม่มีผลในการยับยั้งหรือขัดขวางการจับกับ TSLP receptor บนผิวเซลล์

จากการทดสอบข้างต้น จะเห็นได้ว่า human monoclonal antibodies โคลนที่ 5 และ 7 แสดง Percent inhibition สูงที่สุดคือ 89 และ 80% ตามลำดับ และโคลนที่ 2, 3, 4, 6, 8, 11, 12 และ 16 แสดง Percent inhibition 10-35% ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการยับยั้งหน้าที่ของโปรตีน TSLP ให้มี Percent inhibition สูงขึ้นนั้น การใช้เป็น cocktail antibodies หรือการใช้แอนติบอดีหลายตัวร่วมทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน TSLP นั้นเป็นสิ่งที่ทำได้ โดยการศึกษา Binding epitope ของแอนติบอดีแต่ละโคลน โดยการรวมโคลนที่จับกับ epitope บนโปรตีน TSLP คนละตำแหน่งก็จะช่วยให้ส่งเสริมการยับยั้งการทำงานของโปรตีน TSLP ได้ นอกจากนี้ การใช้ epitope binning หรือการหาการส่งเสริมการทำหน้าที่ของแอนติบอดีแต่ละโคลนด้วยวิธี surface plasmon resonance จะช่วยให้สามารถเลือกจับคู่ของแอนติบอดีที่ส่งเสริมให้มี affinity ในการจับกับ target protein คือ TSLP สูงขึ้น และส่งผลให้ Percent inhibition เพิ่มมากขึ้น

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การสร้าง thymic stromal lymphopoietin (TSLP) จาก epithelial cells บริเวณทางเดินหายใจ keratinocytes และ stromal cells เมื่อได้รับสารก่อภูมิแพ้เข้ามา สามารถกระตุ้นให้เซลล์ในร่างกาย เช่น dendritic cells, T cells, mast cells และ NKT cells หลัง Th2 cytokines เช่น IL-5, IL-6, IL-10 และ IL-13 เป็นต้น รวมถึง mediators ต่างๆ ทำให้เกิด airway hyper-responsiveness (AHR), airway inflammation และ atopic dermatitis ในผู้ป่วย โรคการวิจัยนี้จึงพัฒนาวิธีการยับยั้งการทำงานของโปรตีน TSLP โดยการเตรียม recombinant TSLP เพื่อนำโปรตีนดังกล่าวมาใช้เป็นแอนติเจนในการคัดเลือก phage clones ที่ display HuScFv ที่จับกับ TSLP จาก human antibody phage display library

คณะผู้วิจัยได้ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจาก epithelial cell line ที่ถูกกระตุ้นสารก่อภูมิแพ้แล้วทำการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA ทำการเพิ่มจำนวนยีน TSLP โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน โดยพบว่า PCR product มีขนาดประมาณ 489 bp คณะผู้วิจัยจึงโคลนยีนที่เป็นรหัสของ TSLP ของมนุษย์เข้าใน expression vector นำ recombinant vector เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* ทำการ induce ให้ transformed *E. coli* ผลิต recombinant TSLP แล้วทำการ purify recombinant TSLP ออกจากโปรตีนอื่นๆของแบคทีเรีย ด้วย affinity column จากนั้นวิเคราะห์โปรตีนดังกล่าวที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE และ LC MS/MS พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้มีขนาดประมาณ 15 KDa

คณะผู้วิจัยได้เก็บกู้คลังฟาจจาก stock และเตรียมฟาจสำหรับทำ Bio-panning และทำการ bio-panning เพื่อคัดเลือก phage clones ที่ display HuScFv หลังจากการทำ Bio-panning เพื่อคัดเลือก phage clones ที่ display human ScFv ที่มีความเฉพาะต่อ TSLP protein จาก human antibody phage display library แล้ว ได้ทำการย้าย phages เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน HB2151 *E. coli* ซึ่ง transfected *E. coli* นี้สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารที่มี ampicillin ผสมอยู่ได้ ทำการสุ่มคัดเลือกโคลน transfected *E. coli* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวจำนวน 192 โคลน ไปดำเนินการตรวจสอบ huScFv gene ด้วยวิธี PCR พบว่า 49 โคลนมี huScFv gene จากนั้นทำการกระตุ้นการสร้าง HuScFv จากเซลล์แบคทีเรียซึ่งถูก transfect ด้วย individual phage clone คณะผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ความสามารถของ selected HB2151 *E. coli* clones ในการผลิตโมเลกุล HuScFv พบว่า จาก HB2151 *E. coli* จำนวน 49 clones ที่นำมาวิเคราะห์การสร้างโมเลกุล HuScFv พบว่ามีทั้งหมด 20 โคลนสามารถสร้าง HuScFv ได้ คือ clone no. 5, 9, 10, 22, 24, 25, 34, 35, 37, 41, 44, 70, 75, 76, 79, 82, 88, 90, 94 และ 96 ซึ่ง HuScFv ที่ผลิตขึ้นมีขนาดประมาณ Mr 25-30 kDa หลังจากการวิเคราะห์ความสามารถของ selected HB2151 *E. coli* clones ในการผลิตโมเลกุล HuScFv คณะผู้วิจัยได้เปลี่ยนชื่อโคลนใหม่เป็น โคลนที่ 1-20 ตามลำดับ

คณะผู้วิจัยนำ crude HuScFv ที่เตรียมจาก transformed *E. coli* clones จำนวน 20 clones ไปทดสอบการจับของ HuScFv ดังกล่าว ต่อ human thymic stromal lymphopoietin protein ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่ามี crude HuScFv ใน lysates ของ transformed *E. coli* จำนวน 10 clones คือ clones no. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 และ 16 ให้ผลบวกใน indirect

ELISA คือให้ค่า OD_{405nm} ต่อโปรตีน human thymic stromal lymphopoietin สูงกว่าค่าที่ได้จาก BSA background control อย่างน้อย 2 เท่า เพื่อตรวจสอบ sequence diversity ของ TSLP-*huscfv* คณะผู้วิจัยได้นำ *huscfv* amplicons ที่ได้ทำการ amplify จาก *E. coli* clones ทั้ง 10 clones ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MvaI* แล้วนำไปวิเคราะห์โดยการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis เพื่อดู RFLP patterns ของ *huscfv* amplicons จากแต่ละ transformed *E. coli* clones ซึ่งหาก RFLP patterns ของ *huscfv* amplicons จากแต่ละ transformed *E. coli* clones ที่ได้จากการทำ bio-panning ด้วยแอนติเจนเดียวกัน มีจำนวน RFLP patterns ยิ่งมากก็ยิ่งแสดงว่า HuScFv จาก transformed *E. coli* ที่ทดสอบมีความหลากหลายสูง และน่าจะจับกับ epitopes บน TSLP ที่ต่างกันหรืออย่างน้อยก็มี affinity ต่อ epitope ต่างกัน

จากการทำ *MvaI*-RFLP ของ TSLP-*huscfv* จากแต่ละ transformed *E. coli* clone จำนวน 10 clones พบว่าให้รูปแบบ RFLP ที่แตกต่างกันทั้งหมด 3 patterns คือ patterns 1 ได้แก่ clones no. 2, 4, 6, 8, 11, 12 และ 16 patterns 2 ได้แก่ clone no. 3 และ patterns 3 ได้แก่ clones no. 5 และ 7 แสดงว่า TSLP-*huscfv* จากแต่ละ transformed *E. coli* clone ที่ได้มีความหลากหลาย

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ human monoclonal antibodies ที่ผลิตขึ้นทั้ง 10 โคลนคือ clones no. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 และ 16 ในการยับยั้งหน้าที่ของ TSLP โดยการผสม antibodies (20 µg/ml) แต่ละโคลนกับ TSLP ก่อน จากนั้นนำไปใส่ใน well ที่มี Myeloid dendritic cell อยู่ ทำการเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบ OX40L บนผิวเซลล์ที่จะแสดงออกหลังจากเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย TSLP เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น จากการทดสอบพบว่า human monoclonal antibodies โคลนที่ 5 และ 7 แสดง Percent inhibition สูงที่สุดคือ 89 และ 80% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มี monoclonal antibodies และโคลนที่ 2, 3, 4, 6, 8, 11, 12 และ 16 แสดง Percent inhibition เพียง 10-35% เท่านั้น จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่า human monoclonal antibodies โคลนที่ 5 และ 7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของ TSLP

สำหรับ human monoclonal antibodies จากการศึกษานี้ อาจจะยับยั้งการอักเสบในทางเดินหายใจได้ แต่ต้องทำการทดลองต่อไป

สำหรับกลไกการยับยั้งการทำงานของ TSLP โดย human monoclonal antibodies โคลนที่ 5 และ 7 เป็นสิ่งที่น่าจะศึกษาต่อไปว่า molecule ของ antibody จับกับส่วนไหนของ TSLP Protein หากทราบจะเป็นประโยชน์ในการศึกษากลไกการยับยั้งการทำงานของ TSLP ได้

สำหรับ epitope ที่แอนติบอดีโคลนที่ 5 และ 7 จับบนโปรตีน TSLP น่าจะเป็น neutralization epitope ซึ่งมีความสำคัญ หากทราบ amino acid sequences ของ epitope ดังกล่าว ก็สามารถนำไป immunized ในหนูทดลองเพื่อทดสอบว่าจะสามารถผลิตแอนติบอดีที่ต้านหรือยับยั้งการทำหน้าที่ของโปรตีน TSLP ได้หรือไม่

บรรณานุกรม

- Boonyarittipong P, Tuchinda M, Balangura K, Visitsuntorn N, Vanaprapa N. Prevalence of allergic diseases in Thai children. J Pediatr Soc Thailand 1990; 29: 24-32.
- Bunnag C, Kongpatanakul S, Jaroencharsri P, Varaprayoon S, Supatchaipisit P. A Survey of allergic diseases in university students of Bangkok, Thailand. J Rhinol 1997; 4: 90-3.
- Rochman Y and Lonard JW. Thymic stromal lymphopoietin: a new cytokine in asthma. Curr Opin Pharm 2008; 8: 249-54.
- Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, *et al.* Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. Nat Immunol 2002; 3: 673-80.
- Vichyanond P, Sunthornchart S, Singhirannusorn V, Ruangrat S, Kaewsomboon S, Visitsuntorn N. Prevalence of asthma, allergic rhinitis and eczema among university students in Bangkok. Resp Med 2002; 96: 34-8.
- Vichyanond P, Jirapongsananuruk O, Visitsuntorn N, Tuchinda M. Prevalence of asthma, rhinitis and eczema in children from the Bangkok area the ISAAC (International Study for Asthma and Allergy in Children) questionnaires. J Med Assoc Thai 1998; 81: 175-84.
- Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. Annu Rev Immunol. 1994; 12: 433-55.
- Zhou B, Comeau MR, De Smedt T, *et al.* Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. Nat Immunol 2005; 6: 1047-53.