



รายงานการวิจัย

ผลทางจลศาสตร์ของอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดาสามต่อซัพเซลล์ลาร์โปรตีนโปรไฟล์
ในเซลล์ที่ถูกทรานสเฟคด้วยไวรัสตับอักเสบบี

Kinetic effect of IFN- λ 3 on subcellular protein profiling in Hepatitis B
Virus transfected-cells

โดย

ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร.ณัฐฐิยา หิรัญกาญจน์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2558

ผู้วิจัยขอขอบคุณอาจารย์ นายแพทย์ไทรรักษ์ พิสิษฐ์กุล หัวหน้าศูนย์ชีววิทยาเชิงระบบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และดร. ภูริชญา สมภาร และดร. ธรรมกร แซ่ตั้ง นักวิจัยประจำศูนย์ชีววิทยาเชิงระบบที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์, สอนเทคนิคต่างๆ และการวิเคราะห์ผลในการศึกษาโปรตีโอมิกส์ และ Professor Antonio Bertolotti จาก Singapore Institute for Clinical Sciences (A*Star) ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ HepG2.2.15 ตลอดจนสอนเทคนิคต่างๆ ในการเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณนายจิราเดช มักเจริญ นิสิตของผู้วิจัย ที่มีส่วยช่วยในการทำการทดลอง และวิเคราะห์ผล และทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ของนิสิตของผู้วิจัย โดยวิทยานิพนธ์ดังกล่าวเป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบคุณทีมวิจัยทุกคนในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาและโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังสัมพันธ์กับการเกิดโรคตับที่รุนแรง เช่นตับแข็ง และมะเร็งตับ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้มีผู้เสียชีวิตประมาณ 600,000 คนในแต่ละปี ปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังยังคงมีข้อจำกัดในการใช้ อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาเป็นไฮโดรโคโรนที่มีคุณสมบัติในการต้านไวรัสและคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันคล้ายกับอินเตอร์เฟียรอนแอลฟา อย่างไรก็ตามการแสดงออกของตัวรับสัญญาณที่จำเพาะกับไฮโดรโคโรนชนิดนี้มีการแสดงออกที่จำกัด ดังนั้นอาการข้างเคียงจากการใช้ไฮโดรโคโรนชนิดนี้ จึงน้อยกว่าอินเตอร์เฟียรอนแอลฟา ด้วยเหตุนี้อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาอาจจะเป็นยาใหม่ที่จะใช้รักษาผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยแสดงให้เห็นว่าอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาสามซึ่งเป็นซับไทป์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนต่างๆ ในกลุ่มของโอเอสจีอิน และสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการแสดงออกของยีนไวรัสตับอักเสบบีในเซลล์ที่ถูกทรานสเฟกต์ด้วยไวรัสตับอักเสบบีที่มีชื่อว่าเฮปจีสองจุดสองจุดหนึ่งห้า โดยความสามารถดังกล่าวนี้จะแปรผันตามความเข้มข้นของยา ยิ่งไปกว่านั้นในการศึกษานี้ได้ศึกษากลไกในระดับโมเลกุลเพื่อตรวจสอบของโปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาสามในเซลล์เฮปจีสองจุดสองจุดหนึ่งห้าโดยใช้วิธีโปรตีโอมิกส์ โดยพบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ที่ตอบสนองต่ออินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาสามเกี่ยวข้องกับการกำจัดโปรตีน, การเพิ่มจำนวนของเซลล์, ฮีทช็อกโปรตีน เป็นต้น และผู้วิจัยเลือกโปรตีนบางตัวมาทำการยืนยันด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต จากผลการทดลองทั้งหมดในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้เสนอว่าอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาสามแสดงคุณสมบัติในการต้านไวรัสและคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อควบคุมการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ดังนั้นอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาสาม จึงเป็นอีกหนึ่งตัวเลือกใหม่ที่น่าสนใจที่จะนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงหลังได้รับยา อาจจะเป็นเป้าหมายใหม่ในการรักษา อย่างไรก็ตาม การศึกษาประสิทธิภาพของอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาสามในร่างกายของสิ่งมีชีวิต และการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนอื่นๆ ที่มีการเปลี่ยนแปลงยังคงจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

Abstract

Chronic HBV infection can develop severe and mortal liver diseases such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) causing 600,000 deaths annually. The current anti-HBV treatments have some limitations. Therefore, the novel drugs overcoming these restrictions are still needed. Interferon- λ (IFN- λ) is a cytokine with activities like type I IFN but it has less unfavorable side effects than IFN- α because of the restriction of its receptor expression. With these reasons, IFN- λ might be a novel drug for treating patients with CHB. In this study, we demonstrated that IFN- $\lambda 3$, the most potent subtypes, could induce the expression of ISGs and suppress HBV replication and HBV gene expression in a dose-dependent manner in HBV-transfected HepG2.2.15 cells. To investigate the molecular mechanism of IFN- $\lambda 3$, proteomics were performed to study the global proteome responses between HepG2.2.15 and HepG2.2.15 treated with IFN- $\lambda 3$. The differentially expressed proteins identified by MS were involved in proteolysis pathway, cell proliferation, heat shock proteins, etc. We selected some important proteins to confirm their expression by WB. Based on our results, we proposed that IFN- $\lambda 3$ exhibited both antiviral and immunomodulatory effects to control HBV infection. Therefore, IFN- $\lambda 3$ is an attractive novel candidate for CHB treatment and the altered proteins might be new therapeutic target in CHB infection. However, further studies on IFN- $\lambda 3$ itself and the functional studies of altered proteins are needed.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญตาราง	viii
สารบัญภาพ	ix
คำย่อที่ใช้ในการวิจัย	x
บทนำ	1
บทนำ, ระบาดวิทยาของไวรัสตับอักเสบบี และการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี	1
ลักษณะและอนุไวรัสวิทยาของไวรัสตับอักเสบบี	1
วงชีวิตของไวรัสตับอักเสบบี	2
ลักษณะและการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในช่วงแรก	3
การตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี	4
พยาธิกำเนิดการอักเสบของตับจากไวรัสตับอักเสบบี	5
การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง	6
การดำเนินโรคไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง	7
การรักษาไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในปัจจุบัน	9
อินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา (Interferon lambda, IFN- λ)	14
โครงสร้างยีนของอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา	14
การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของอินเตอร์เฟียร์อนชนิดที่ 3	14
วิถีสัญญาณของอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา	15
อินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดาขับไทป์	16

หน้า

ฤทธิ์ทางชีวภาพของอินเตอร์เฟียร์รอนแลมปดา	17
อินเตอร์เฟียร์รอนแลมปดาและไวรัสตับอักเสบบ	18
เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษากลไกระดับโมเลกุล	19
การแยกโปรตีนด้วย (2-Dimensional gel electrophoresis, 2-DE)	20
การศึกษา Non-gel based Quantitative Proteomics	21
วิธีการดำเนินการวิจัย	23
ผลของอินเตอร์เฟียร์รอนแลมปดา 3 ต่อ HBV-transfected HepG2.2.15 cells	23
การเลี้ยงเซลล์, trypsinization และการนับเซลล์	23
การกระตุ้นเซลล์ด้วยความเข้มข้นต่างๆของอินเตอร์เฟียร์รอนแลมปดาสาม	23
การสกัดและวัดปริมาณ RNA	24
การทำ Reverse transcription	24
การทำ Relative qPCR	24
การสกัด DNA	26
การทำ Absolute qPCR	26
การทำ MTT assay	27
การกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์รอนแลมปดาสามและการสกัดแยกโปรตีนจากแต่ละออร์แกนเซลล์	27
การนำเกลือออก, การเพิ่มความเข้มข้นโปรตีน และการวัดปริมาณโปรตีน	28
การทำ Western blot analysis	28
การทำ 2-Dimensional gel electrophoresis	29
การวิเคราะห์ Image analysis	29
การทำ In-gel digestion	30
การทำ In-solution digestion	30
การทำ In-solution dimethyl labeling	31
การทำ fractionation	31

หน้า

การระบุเอกลักษณ์โปรตีนด้วยเครื่อง LC-ESI-MS/MS สำหรับโปรตีนจาก 2-DE	31
การระบุเอกลักษณ์โปรตีนด้วยเครื่อง Orbitrap LC-MS/MS สำหรับโปรตีนที่ทำ In-solution digestion และการวิเคราะห์ quantitative data	32
การใช้ชีวสารสนเทศ	32
ผลการวิจัย	33
ผลของอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 3 ต่อเซลล์ HepG2.2.15	33
อินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 3 เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ ISGs ในเซลล์ HepG2.2.15	33
อินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 3 ยับยั้งการแสดงออกของ HBV RNA และ RNA intermediate	34
อินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 3 ลดการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี	34
ความเป็นพิษของอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 3 ต่อเซลล์ HepG2.2.15	35
วิธีที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากออร์แกเนลล์ต่างๆ ให้ผลที่บริสุทธิ์	36
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ 2-DE	37
การทำ 2-DE และ การวิเคราะห์ MS ของโปรตีนที่ตอบสนองต่อ อินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 3 ในเซลล์ HepG2.2.15	39
การศึกษาโปรตีนในไซโตพลาสซึมของเซลล์ HepG2.2.15 ก่อนและหลัง ได้รับอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 3	39
การศึกษาโปรตีนในเมมเบรนของเซลล์ HepG2.2.15 ก่อนและหลัง ได้รับอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 3	39
การศึกษาโปรตีนในนิวเคลียสของเซลล์ HepG2.2.15 ก่อนและหลัง ได้รับอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 3	40
การทดสอบประสิทธิภาพในการติดฉลากของ Dimethyl labeling	55

หน้า

การวิเคราะห์ quantitative data จากโปรตีนที่ตอบสนองต่ออินเตอร์เฟียร์อนแลมปดา 3 ในเซลล์ HepG2.2.15	56
การใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศในการสืบค้นหน้าที่และปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน	68
การยืนยันผลโปรตีนด้วยวิธี western blotting	93
อภิปรายผลการทดลอง	94
บรรณานุกรม	100
ภาคผนวก	106
ประวัตินักวิจัยและคณะ	112

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ลักษณะของแต่ละระยะในภาวะติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง	7
ตารางที่ 2 ข้อบ่งชี้ในการรักษาด้วยยาต้านไวรัสแต่ละชนิด	9
ตารางที่ 3 ยาที่ใช้ในการรักษาไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง	9
ตารางที่ 4 กลไกการออกฤทธิ์ของนิวคลีโอไซด์อะนาล็อก	11
ตารางที่ 5 เปรียบเทียบข้อดีและข้อด้อยของการรักษาไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแบบต่างๆ	13
ตารางที่ 6 เปรียบเทียบลักษณะของสีย้อมโปรตีนในเจล	20
ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบข้อดีและข้อด้อยการแต่ละเทคนิค labeling	22
ตารางที่ 8 Sequence ของ primers and probe	25
ตารางที่ 9 จำนวนจุดโปรตีนจากการวิเคราะห์ภาพทั้งกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับอินเตอร์เฟียร์รอนแลมปดา	339
ตารางที่ 10 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในไซโตพลาสซึม	43
ตารางที่ 12 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในเมมเบรน	44
ตารางที่ 14 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในนิวเคลียส	47
ตารางที่ 11 โปรตีนในไซโตพลาสซึมที่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้	48
ตารางที่ 13 โปรตีนในเมมเบรนที่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้	52
ตารางที่ 15 โปรตีนในนิวเคลียสที่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้	54
ตารางที่ 16 แสดงประสิทธิภาพการติดฉลากของ Dimethyl labeling	55
ตารางที่ 17 โปรตีนที่ได้จากการทำโปรตีโอมิกส์โดยไม่ใช้เจล	56
ตารางที่ 18 หน้าของโปรตีนจากโปรแกรม Proteome Discoverer	69

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ปฏิกริยา Dimethyl labeling	21
รูปที่ 2 การแสดงออกของ ISGs	33
รูปที่ 3 ผลของอินเตอร์เฟียร์อนแลมปดา 3 ต่อการแสดงออกของ HBV RNA และ RNA	34
รูปที่ 4 การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีโดยอินเตอร์เฟียร์อนแลมปดา 3	35
รูปที่ 5 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของอินเตอร์เฟียร์อนแลมปดา 3	36
รูปที่ 6 ความบริสุทธิ์ของโปรตีนจากทั้ง 3 ออร์แกเนลล์	37
รูปที่ 7 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ 2-DE	38
รูปที่ 8 เปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนระหว่างโปรตีนทั้งเซลล์และ โปรตีนจากออร์แกเนลล์ต่างๆ	38
รูปที่ 9 2-DE เจลของโปรตีนในไซโตพลาสซึม	41
รูปที่ 10 จุดโปรตีนในไซโตพลาสซึมที่ถูกระบุเอกลักษณ์ได้	42
รูปที่ 11 2-DE เจลของโปรตีนในเมมเบรน	45
รูปที่ 12 จุดโปรตีนในเมมเบรนที่ถูกระบุเอกลักษณ์ได้	46
รูปที่ 13 2-DE เจลของโปรตีนในนิวเคลียส	50
รูปที่ 14 จุดโปรตีนในนิวเคลียสที่ถูกระบุเอกลักษณ์ได้	51
รูปที่ 15 การจัดกลุ่มหน้าที่ของโปรตีนในเซลล์ HepG2.2.15 ที่ตอบสนองต่ออินเตอร์เฟียร์อนแลมปดา 3	87
รูปที่ 16 Proteasome pathway	88
รูปที่ 17 Antigen processing and presentation	89
รูปที่ 18 Protein processing in ER	90
รูปที่ 19 Phagosome	91
รูปที่ 20 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน	92
รูปที่ 21 การยืนยันผลโปรตีโอมิกส์ด้วยวิธี WB	93

คำย่อที่ใช้ในการวิจัย

2'-5'-OAS	2'-5'-oligoadenylate synthetase
2-DE	2-Dimensional gel electrophoresis
AASLD	The American Association for the Study of Liver Disease
ALT	Alanine aminotransferase
APCs	Antigen presenting cells
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3G
BCP	Basic core promoter
BCP	Bromochloropropane
bp	base pair
BSA	Bovine serum albumin
CAN	Acetonitrile
cccDNA	Covalently closed circular DNA
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CEB	Cytoplasmic extraction buffer
CECAM1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
CHB	Chronic hepatitis B
CMV	Cytomegalovirus
CO ₂	Carbon dioxide
C _t	Cycle threshold
CTLs	Cytotoxic T lymphocytes
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DCs	Dendritic cells
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DR	Direct repeat
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	The half maximal effective concentration
ECL	Enhanced chemiluminescent substrate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMCV	Encephalomyocarditis virus
ER	Endoplasmic reticulum
FA	Formic acid

FBS	Fetal Bovine Serum
g	Grams
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Gly95	Glycine residue in position 95
GWAS	Genome-wide association studies
HBcAg	Hepatitis B core antigen
HBeAg	Hepatitis B early antigen
HBsAb	Hepatitis B surface antibody
HBsAg	Hepatitis B surface antigen
HBV	Hepatitis B virus
HBx	Hepatitis B x protein
HCC	Hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis C virus
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human leukocyte antigen
HMGB1	High-mobility group box 1
HRP	Horseradish peroxidase
HSV	Herpes simplex virus
IA	Iodoacetamide
IAV	Influenza A virus
IEF	Isoelectric focusing
IFN- α	Interferon- α
IFN- γ	Interferon- γ
IFN- β	Interferon- β
IFN- λ	Interferon- λ
IL-2	Interleukin-2
Imp- β /Imp- α	Importin- β /Importin- α
IPG	Immobilized pH gradient
IRF3	Interferon regulatory factor 3
ISGF3	IFN-stimulated gene factor 3
ISGs	Interferon-stimulating genes
ISRE	IFN-stimulated response elements
Jak1	Janus kinase 1
KCs	Kupffer cells
kDa	kilo Dalton
LC-ESI MS/MS	Liquid chromatography-Electrospray ionization MS/MS
M	Molar
mA	Milliamps

MDA5	Melanoma differentiation-associated protein 5
MEB	Membrane extraction buffer
mg	Milligrams
MHC	Major histocompatibility complex
ml	Milliliters
mM	Millimolar
MMp	Matrix metalloproteinase
MS	Mass spectrometry
MTT	MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolinm bromide
Mx1	Myxovirus resistance-1
MyD88	Myeloid differentiation primary response protein
NA	Nucleos (t)ide analogues
NEAA	Non-Essential Amino Acid
NEB	Nuclear extraction buffer
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
ng	Nanograms
NK cells	Natural killer cells
NKT cells	Natural killer T cells
°C	Celsius degree
ORFs	Open reading frames
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PD-1	Programed cell death-1
pDCs	plasmacytoid DCs
PD-L1	Programed cell death-ligand 1
pegIFN- α	Pegylated Interferon- α
pgRNA	Pregenomic RNA
pI	Isoelectric point
PKR	Protein kinase R
PRRs	Pattern recognition receptors
PTM	Post-translational modification
qPCR	quantitative real-time PCR
RBV	Ribavirin
rcDNA	relaxed circular DNA
RIG-1	Retinoic acid-inducible gene 1
RNase H	Ribonuclease H
rRNA	ribosomal RNA
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction

s	Svedberg units
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
sgRNA	Subgenomic RNA
SH2	Src homology 2
SNP	Single nucleotide polymorphism
STAT	Signal transducers and activators of transcription
SVR	Sustained virological response
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline and Tween 20
TEAB	Triethylammonium bicarbonate buffer
Th1 cells	Type 1 T helper cells
Th2 cells	Type 2 T helper cells
TLRs	Toll-like receptors
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
Treg cells	Regulatory T cells
Tyk2	Tyrosine kinase 2
Tyr	Tyrosine
ULN	Upper limits of normal
UPLC	Ultra-performance liquid chromatography
UV light	Ultraviolet light
Val95	Valine residue in position 95
VSV	Vesicular stomatitis virus
VV	Vaccinia virus
WB	Western blotting
WHO	World Health Organization
WHV	Woodchuck hepatitis virus
xg	Relative centrifugal force
μ A	Microamps
μ g	Micrograms
μ l	Microliters

บทนำ

บทนำ, ระบาดวิทยาของไวรัสตับอักเสบบี และการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบของตับทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง โดยผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังนี้มีโอกาสที่จะเกิดตับแข็ง และมะเร็งตับซึ่งเป็นสาเหตุการตายอันดับต้นๆ ของโลก แม้ว่าในปัจจุบันจะมีวัคซีนที่มีประสิทธิภาพร่วมกับมาตรการในการป้องกัน (1) องค์การอนามัยโลกได้รายงานว่ามีประชากรทั่วโลกประมาณ 2 พันล้านคนที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ โดยพบว่าประชากรที่อาศัยอยู่ในทวีปแอฟริกา และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีความชุกต่อการติดเชื้อสูง โดยการติดเชื้อส่วนใหญ่ของคนกลุ่มนี้จะเกิดขึ้นในวัยเด็ก โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากทารกที่เกิดจากแม่ที่มีเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในขณะที่การติดเชื้อของประชากรในแถบอเมริกาเหนือและยุโรปจะมีความชุกต่อการติดเชื้อค่อนข้างต่ำ โดยการติดเชื้อส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นในช่วงวัยผู้ใหญ่จากการมีเพศสัมพันธ์กับผู้ติดเชื้อโดยไม่มีการป้องกันหรือจากการได้รับเลือดจากผู้ติดเชื้อ (2, 3) มีรายงานว่าประมาณ 95% ของผู้ที่ติดเชื้อในวัยผู้ใหญ่ จะสามารถควบคุม, กำจัดไวรัส และสามารถหายได้เองโดยอาจจะไม่มีอาการของตับอักเสบบี (อ่อนแรง, ไข้ต่ำ, คลื่นไส้, อาเจียน, ปวดข้อ และอาการดีซ่าน) ในขณะที่ผู้ที่ได้รับเชื้อในวัยเด็ก ประมาณ 90% ของคนกลุ่มนี้จะไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสและมีการดำเนินโรคต่อไปเป็นตับอักเสบบีอย่างเรื้อรัง และเป็นมะเร็งตับในที่สุด (3, 4) จากรายงานนี้ชี้ให้เห็นว่า ภูมิคุ้มกันที่มีการพัฒนาอย่างเต็มที่ที่มีส่วนสำคัญในการกำจัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในปี ค.ศ. 2013 องค์การอนามัยโลกรายงานว่า มีผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังจำนวน 240 ล้านคน โดยในแต่ละปีจะมีผู้ที่เสียชีวิตจากโรคที่เกี่ยวข้องกับไวรัสตับอักเสบบี เช่น พังผืดในตับ, ตับแข็ง และมะเร็งตับจำนวน 6 แสนคน ดังนั้นการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบียังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก (1, 3)

ลักษณะและอนุไวรัสวิทยาของไวรัสตับอักเสบบี

ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B Virus, HBV) เป็นไวรัสขนาดเล็กที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอโดยไวรัสชนิดนี้อยู่ในวงศ์ *Hepadnaviridae* และอยู่ในสกุล *Orthohepadnavirus* นอกจากจะมีโครงสร้างสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่แบบไม่เต็มวง (relaxed-circular DNA, rcDNA) ไวรัสตับอักเสบบียังต่างจากดีเอ็นเอไวรัสชนิดอื่นๆ คือ ไวรัสตับอักเสบบีมีกระบวนการ Reverse transcription ซึ่งเป็นกระบวนการหนึ่งที่สำคัญในการเพิ่มจำนวนของไวรัสชนิดนี้ (5) ลักษณะเด่นอีกประการของไวรัสตับอักเสบบีคือมีความจำเพาะกับเซลล์ตับและสปีชีส์ของโฮสต์ค่อนข้างสูง ไวรัสตับอักเสบบีมีอย่างน้อย 8 จีโนไทป์ (A-H) โดยพิจารณาจากความแตกต่างในลำดับเบสทั้งจีโนมมากกว่า 8% การกระจายตัวของไวรัสแต่ละจีโนไทป์จะมีการกระจายตัวที่แตกต่างกัน เช่น จีโนไทป์ A และจีโนไทป์ D จะมีการกระจายตัวเป็นส่วนมากในแถบอเมริกาและยุโรป ในขณะที่ประเทศที่มีความชุกของไวรัสตับอักเสบบีค่อนข้างสูงซึ่งได้แก่ประเทศในแถบแอฟริกา และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จะมีการกระจายตัวของไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ B และ จีโนไทป์ C (1, 6) โครงสร้างของไวรัสตับอักเสบบีจะถูกห่อหุ้มด้วยส่วนที่เป็นเปลือกหรือที่เรียกว่า HBsAg ซึ่งเป็นอนุภาคกลมขนาดประมาณ 42 นาโน

เมตร ภายในเปลือกหุ้มนี้จะมี nucleocapsid ซึ่งประกอบไปด้วย HBcAg ที่ทำหน้าที่ป้องกันสารพันธุกรรมของไวรัสจากการถูกทำลายจาก exogenous nuclease ภายใน capsid นี้จะมี viral polymerase เชื่อมต่อกับสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี โดยจีโนมของไวรัสตับอักเสบบีประกอบไปด้วยสายดีเอ็นเอ 2 เส้น โดยสายลบจะมีความยาวประมาณ 3.2 กิโลเบส และสายบวกซึ่งเป็นสายที่ไม่เต็มวงจะมีความยาวประมาณ 20-80% ของสายลบ(7) โดยสายพันธุกรรมทั้งสองสายจะเชื่อมกัน 2 บริเวณด้วยลำดับเบสที่มีชื่อว่า direct repeat (DR) 1 และ DR2 สายพันธุกรรมสายลบจะประกอบไปด้วย Open Reading Frames (ORFs) 4 ส่วน ได้แก่ preS/S ORF จะเป็นส่วนที่สร้างโปรตีนที่ผิว (surface protein หรือ HBsAg) ซึ่งมีทั้ง โปรตีนขนาดใหญ่, ขนาดกลาง และขนาดเล็ก, PC/C ORF จะเป็นส่วนที่สร้างโปรตีน HBcAg และ HBeAg, P ORF จะเป็นส่วนที่สร้างเอนไซม์ polymerase ต่างๆ ของไวรัส เช่น reverse transcriptase, DNA polymerase และ RNase H, และส่วนสุดท้ายคือ X ORF จะเป็นส่วนที่สร้างโปรตีน HBx โดยโปรตีนตัวนี้จะเกี่ยวข้องกับวงจรชีวิตของเซลล์, การซ่อมแซมสารพันธุกรรมที่เสียหาย, การส่งสัญญาณ, การตายแบบ apoptosis, และการเพิ่มการแสดงออกของยีนของไวรัสตับอักเสบบี นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า HBx มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ โดยยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เป็น tumor suppressor ของโฮสต์(8, 9)

วงชีวิตของไวรัสตับอักเสบบี

ไวรัสตับอักเสบบีเมื่อเข้าสู่ร่างกายของโฮสต์แล้ว จะใช้ส่วน preS1 domain ซึ่งอยู่ที่โปรตีนผิวของไวรัสจับกับตัวรับสัญญาณ Sodium taurocholate cotransporting polypeptide บนผิวของเซลล์ตับ (hepatocytes)(10) และทำการแทรกตัวเข้ามาในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับ(11, 12) จากนั้น nucleocapsid จะเคลื่อนที่ไปยังเยื่อหุ้มนิวเคลียสและปล่อยสารพันธุกรรมเข้าไปในนิวเคลียสผ่านทาง nuclear transport receptors (Imp- β /Imp- α) มีรายงานว่า การเคลื่อนที่ของ capsid นี้เป็นผลมาจากการส่งสัญญาณของ HBcAg ที่อยู่บน capsid(12) ภายในนิวเคลียสเอนไซม์ polymerase ของไวรัสจะถูกใช้เพื่อซ่อมแซมสายบวกของ rcDNA ให้เป็นสายที่มีความยาวเต็มวง เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนนี้ สารพันธุกรรมทั้ง 2 สายจะเชื่อมเข้าด้วยกันและเปลี่ยนรูปร่างไปมีลักษณะคล้ายกับขดลวดหรือที่เรียกว่า covalently closed circular DNA (cccDNA) โดยในโครงสร้างนี้จะมีโปรตีนที่เป็นพวกฮิสโตนและไม่ใช่ฮิสโตนรวมอยู่ด้วยมีลักษณะคล้ายโครโมโซมขนาดเล็ก โดย cccDNA นี้จะทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีโดยสังเคราะห์ HBV RNA ซึ่งจะใช้ RNA polymerase II ของโฮสต์(7, 13) โดยยีนของไวรัสตับอักเสบบีที่ถูกสร้างขึ้นนี้จะใช้กระบวนการต่างๆ ของโฮสต์ เช่น capping และ polyadenylation ที่ปลาย 5' และ 3' กระบวนการแปลรหัสจะเกิดขึ้นในไซโตพลาสซึม โดยโปรตีน HBx จะถูกสร้างมาจากอาร์เอ็นเอมีความยาวขนาด 0.7 กิโลเบส ในขณะที่อาร์เอ็นเอ ขนาด 2.4 และ 2.1 กิโลเบสจะถูกแปลรหัสมาเป็นโปรตีนที่ผิวของไวรัสตับอักเสบบี ส่วนอาร์เอ็นเอที่มีขนาดความยาว 3.5 กิโลเบส หรือที่เรียกว่า pregenomic RNA (pgRNA) จะถูกแปลรหัสเป็นเอนไซม์ของไวรัส, HBcAg และ HBeAg อนึ่งในกระบวนการ reverse transcription จำเป็นต้องใช้ pgRNA เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายลบ การเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีจะเริ่มจากการจับกันระหว่างส่วนปลายของ viral polymerase และส่วน epsilon stem-loop ของ pgRNA จากนั้นจะถูกส่งเข้าไปใน nucleocapsid กระบวนการนี้จะถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase

ภายใน capsid นี้ pgRNA จะถูกแปลงมาเป็นดีเอ็นเอสายลบและจะเป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายบวกต่อไป จากนั้น pgRNA จะถูกย่อยสลายไปโดยเอนไซม์ RNaseH เมื่อกระบวนการสังเคราะห์ rcDNA เสร็จสิ้นแล้ว rcDNA ส่วนหนึ่งจะถูกส่งเข้าไปในนิวเคลียสเพื่อเป็นการรักษาระดับของ cccDNA ให้มีปริมาณคงที่ โดยมีการประมาณการกันว่าเซลล์ตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี 1 เซลล์จะมี cccDNA ประมาณ 1-50 copies(5) ในขณะที่อีกส่วนหนึ่งจะถูกส่งไปยัง endoplasmic reticulum (ER) เพื่อรวมกับโปรตีนผิว และออกสู่กระแสเลือด นอกจากอนุภาคที่สมบูรณ์ของไวรัส (มีสารพันธุกรรม) หรือที่เรียกว่า Dane particles ยังมีโปรตีนผิว (HBsAg) ที่สามารถถูกหลั่งออกมาในกระแสเลือดได้เช่นกัน โดยอนุภาคเหล่านี้ถูกหลั่งออกมาได้มากกว่าอนุภาคที่สมบูรณ์ของไวรัสสูงถึง 1,000,000 เท่า นอกจากนี้ HBeAg ยังถูกหลั่งออกมาสู่กระแสเลือดได้เช่นเดียวกัน แม้ว่า HBeAg จะไม่มีความสำคัญในกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส แต่ทว่ามันมีบทบาทสำคัญต่อการติดเชื้อแบบเรื้อรัง(5, 7, 12, 13)

ลักษณะและการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในช่วงแรก

รูปแบบที่เด่นชัดของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ต่างจากไวรัสชนิดอื่นคือการเพิ่มจำนวนของไวรัสที่ล่าช้า และไม่มีอาการในระยะแรกหลังการติดเชื้อ(14, 15) การศึกษาในมนุษย์และในชิมแปนซีแสดงให้เห็นว่าหลังจากติดเชื้อหรือได้รับเชื้อ ไวรัสตับอักเสบบีจะไม่เพิ่มจำนวนและแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว เนื่องจากตรวจไม่พบ HBsAg, HBeAg และ HBV-DNA ทั้งในตับและในซีรัม แม้ว่าชิมแปนซีจะได้รับเชื้อไวรัสเข้าไปในปริมาณที่สูง แต่ก็ไม่ได้ทำให้ไวรัสชนิดนี้เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งผ่านไป 4-7 สัปดาห์หลังได้รับเชื้อ(16) ซึ่งต่างจากชิมแปนซีที่ได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis C Virus, HCV) ที่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสชนิดนี้ ได้ภายใน 1 สัปดาห์หลังได้รับเชื้อ และปริมาณของไวรัสจะเพิ่มสูงขึ้นหลังจากที่ชิมแปนซีมีอาการของโรคแรกแล้ว มีหลายการศึกษาในสัตว์ทดลองที่แสดงให้เห็นว่า การไม่พบไวรัสตับอักเสบบีในช่วงสัปดาห์แรกๆ ของการติดเชื้อ ไม่ได้เป็นผลจากระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด เนื่องจากว่า interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α และ interleukin (IL)-2 ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่สำคัญในการกำจัดเชื้อไวรัส ที่เกิดขึ้น และการข่มขู่กันของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายๆ ชนิดจะเกิดขึ้นหลังจากที่ไวรัสมีการเพิ่มจำนวนแล้ว นอกจากนี้ ผลการศึกษาจาก microarray เพื่อการแสดงออกของยีนทั้งจีโนม พบว่าในช่วงระยะพักตัวของไวรัสตับอักเสบบี ไม่มียีนที่ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกในขึ้นเนื่อตับของชิมแปนซีที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี(16) ผลการศึกษาเหล่านี้ยืนยันได้ว่าภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดไม่ได้มีผลต่อการเพิ่มจำนวนและการแพร่กระจายของไวรัสตับอักเสบบีในช่วงแรก(15, 17) อย่างไรก็ตามสาเหตุที่แท้จริงของการตรวจไม่พบสารพันธุกรรมและแอนติเจนของไวรัสตับอักเสบบียังไม่เป็นที่เข้าใจนัก แม้ว่าหลายการศึกษาจะแสดงให้เห็นว่าอินเตอร์เฟียร์อนชนิดที่ 1 (Type I Interferon, IFN) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่การที่ตรวจไม่พบ type I IFN ก็เป็นอีกหนึ่งลักษณะเด่นของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในระยะแรก โดยการศึกษาเหล่านี้ได้รับการยืนยันจากการศึกษาของคณะผู้วิจัยของ Wieland ที่แสดงให้เห็นว่า ในระยะแรกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีไม่มี type I IFN เกิดขึ้นรวมทั้ง ยีนที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อน (Interferon-stimulating genes, ISGs) ก็ไม่มีการแสดงออกในช่วงนี้ด้วย(16) เป็นไปได้ว่าไวรัสชนิดนี้จะมีการหลบหลีกตัวตรวจจับ (Sensor) สิ่งแปลกปลอมในระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดในช่วงแรกของการติดเชื้อ โดยมีข้อ

สมมติฐาน ดังนี้ 1.) cccDNA ซึ่งเป็นแม่แบบในการสร้างยีนต่างๆ ของไวรัสอยู่ภายในนิวเคลียส 2.) เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของไวรัสเกิดขึ้นภายใน nucleocapsid ทำให้สารพันธุกรรมของไวรัสทั้งที่เป็นดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอซึ่งเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างดีที่ทำให้เกิดการสร้างอินเตอร์เฟียร์อนชนิดที่ 1 ไม่ถูกตรวจพบโดยตัวรับในระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด(14, 15, 17-19)

การตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

เมื่อมาถึงระยะที่มีการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี พบว่าเซลล์ตับส่วนมากจะมีการติดเชื้อชนิดนี้แล้ว และจีโนมของไวรัสชนิดนี้จะสามารถตรวจพบได้ทั้งในตับและในซีรัมสูงถึง 10^9 - 10^{10} copies/ml(2) ในระยะนี้ภูมิคุ้มกันที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจะแสดงอาการตับอักเสบแบบเฉียบพลัน และยีนในเซลล์ตับหลายยีนจะถูกกระตุ้นซึ่งเป็นการตอบสนองต่อการติดเชื้อ(16) นอกจากนี้ยังมีหลักฐานทั้งในคนและในสัตว์ทดลองพบว่า Natural killer (NK) cells มีบทบาทในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีในระยะแรก โดยหลั่ง IFN- γ และ TNF- α ออกมาเป็นจำนวนมาก เมื่อมีการกระตุ้น NKT cells ด้วย α -galactoceramide หรือ แอนติเจนของไวรัสตับอักเสบบี ในโมเดล HBV-transgenic mouse พบว่าการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีสามารถถูกยับยั้งได้ IFN- γ ซึ่งถูกสร้างมาจาก NKT cells(15, 17) อีกรงานวิจัยที่ศึกษาในคนที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและสามารถหายได้เองพบว่า ปริมาณของไวรัสตับอักเสบบีจำนวนมากจะเกิดขึ้นพร้อมๆ กับจำนวนของ NK cells ที่มากขึ้นในกระแสเลือดของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และหลังจากนั้นจะมีการตรวจพบ IFN- γ เป็นจำนวนมาก ประมาณ 2-4 สัปดาห์หลังจากนี้ $CD4^+$ และ $CD8^+$ T cells ที่จำเพาะกับไวรัสตับอักเสบบี จำนวนมากจะถูกดึงดูดให้เข้าไปในตับ ในขณะที่การเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ลดลงแล้ว(14, 18) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจะเริ่มขึ้นเมื่อมีการนำเสนอแอนติเจนของไวรัสต่อ $CD4^+$ และ $CD8^+$ T cells โดย antigen-presenting cells (APCs) ได้แก่ dendritic cells (DCs) และ kupffer cells (KCs) ซึ่งเป็น macrophages ในเซลล์ตับ นอกจากจะทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจนแล้ว APCs เหล่านี้ยังสร้างและหลั่งไซโตไคน์ IL-12 และ TNF- α ได้ โดยไซโตไคน์ทั้ง 2 ชนิดนี้จำเป็นสำหรับการพัฒนาและการสร้าง IFN- γ ของ $CD8^+$ T cells ในขณะที่ naïve $CD4^+$ T cells ต้องการเพียงแค่ IL-12 เท่านั้นสำหรับการพัฒนาไปเป็น T helper (Th) 1 cells โดยหลังจากที่ถูกกระตุ้น naïve $CD4^+$ T cells จะเพิ่มจำนวนและพัฒนาไปเป็นทั้ง Th1 และ Th2 โดยแบ่งตามชนิดของไซโตไคน์ที่เซลล์เหล่านี้สร้าง ในขณะที่ naïve $CD8^+$ T cells จะกลายมาเป็น cytotoxic T cells (CTLs) ไซโตไคน์ที่สร้างมาจาก Th1 cells ได้แก่ IFN- γ , IL-2 และ TNF- α จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการกระตุ้น $CD8^+$ T cells ในทางตรงกันข้ามไซโตไคน์ที่หลั่งมาจาก Th2 cells ซึ่งได้แก่ IL-4 และ IL-10 เป็นไซโตไคน์ที่จำเป็นสำหรับการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนของไวรัสตับอักเสบบี เช่น HBsAg, HBeAg และ HBeAg โดยแอนติบอดีเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการ neutralization พวกอนุภาคไวรัสอิสระ อย่างไรก็ตามแอนติบอดีต่อ HBsAg เท่านั้นที่เป็นภูมิคุ้มกันระยะยาวที่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ซ้ำ แอนติบอดีต่อส่วนผิวของไวรัสตับอักเสบบีจะถูกสร้างขึ้นมาตั้งแต่ช่วงแรกของการติดเชื้อแต่ไม่สามารถตรวจพบได้ เนื่องจากว่าแอนติบอดีชนิดนี้จะรวมตัวกับ HBsAg ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากในระยะที่มีการเพิ่มจำนวนของไวรัส พวก CTLs เองก็มีบทบาทต่อการควบคุมและกำจัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี พบว่าถ้ามีการลดลงของ CTLs ในภูมิคุ้มกันที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จะทำให้ภูมิคุ้มกันไม่

สามารถควบคุมการเพิ่มจำนวนของไวรัสเข้าไปสู่การติดเชื้อแบบเรื้อรัง อีกการศึกษาหนึ่งใน woodchucks ให้ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับการศึกษาดังกล่าวข้างต้น โดย CTLs สามารถควบคุมการเพิ่มจำนวนของไวรัส ด้วยกลไกที่ทำลายเซลล์และไม่ทำลายเซลล์ โดยกลไกแรกนั้น จะเกิดขึ้นหลังจากที่ CTLs ถูกกระตุ้น โดย CTLs จะทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อโดยกระตุ้นให้เกิด program cell death ผ่าน perforin และ Fas/Fas-ligand ทำให้ไวรัสถูกปล่อยออกมา และไวรัสเหล่านี้จะถูกกำจัดด้วยแอนติบอดีที่ถูกสร้างมาจาก B cells อีกกลไกหนึ่งก็คือ การสร้างและการหลั่ง IFN- γ และ TNF- α เพื่อกำจัดเชื้อไวรัส โดยการยับยั้งการสังเคราะห์ pgRNA, การลดสเกลียวของ capsid ผ่านทางวิถีสัญญาณ NF- κ B pathway และการทำลายโปรตีนของไวรัสผ่านทาง proteasome-dependent และ kinase dependent pathway และ nitric oxide ถึงแม้องค์ประกอบของไวรัสตับอักเสบบีหลายๆ ส่วนจะเป็นเป้าหมายของ CTLs แต่โปรตีน core โดยเฉพาะอย่างยิ่ง HBc ตรงลำดับเบสที่ 18-27 จะเป็น epitope ที่ชักนำให้เกิดการตอบสนองได้ดีที่สุด แม้จะเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางว่า CTLs มีบทบาทในการกำจัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แต่อย่างไรก็ตามความร่วมมือของ helper T cells, CTLs และ B cells ก็จำเป็นอย่างยิ่งในการกำจัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น(14, 15, 17, 18)

พยาธิกำเนิดการอักเสบของตับจากไวรัสตับอักเสบบี

ไวรัสตับอักเสบบีเป็นไวรัสที่ไม่ทำลายเซลล์ในวงจรชีวิตของมัน โดยมีหลักฐานต่างๆ สนับสนุนที่ชี้ให้เห็นว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจะไม่แสดงอาการใดๆ และตับของคนกลุ่มนี้จะมีการอักเสบเพียงเล็กน้อยแม้ว่าจะมีการเพิ่มจำนวนของไวรัสเป็นจำนวนมากที่เซลล์ตับก็ตาม(4) จากการศึกษาในชิมแปนซีและใน transgenic mice พบว่าไม่พบการเปลี่ยนแปลงในตับจนกระทั่งเกิดภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ดังนั้นจึงเชื่อว่าการตอบสนองของโฮสต์ต่อไวรัสตับอักเสบบีไม่เพียงแต่กำจัดเชื้อไวรัส แต่ยังทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ตับด้วยเช่นกัน การศึกษาใน transgenic mice แสดงให้เห็นว่า พยาธิสภาพที่ตับส่วนใหญ่เป็นผลมาจาก CTLs อย่างไรก็ตาม เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบแบบไม่จำเพาะ เช่น neutrophils, NK cells และ monocytes รวมทั้งเกล็ดเลือด ก็ยังมีบทบาททำให้เกิดการบาดเจ็บของตับอย่างรุนแรง(14, 17) เช่น 1.) นอกจากจะหลั่งไซโตไคน์ที่มีฤทธิ์ในการต้านไวรัสเช่น IFN- γ แล้ว CTLs ยังสามารถทำลายเซลล์ตับที่ติดเชื้อได้โดยตรง ผ่านทาง programmed cell death 2.) การชุมนุมของ neutrophils ในตับถูกเหนี่ยวนำโดย high-mobility group box 1 (HMGB1) ซึ่งเป็นสารที่หลั่งมาจากเซลล์ที่ตายแล้ว โดย neutrophils เหล่านี้จะสร้างและหลั่ง matrix metalloproteinase (MMP) ที่ทำลาย extracellular matrix ของตับ ส่งผลให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบมีการเข้ามาในเซลล์ตับเพิ่มมากขึ้น 3.) parenchymal และ non-parenchymal cells ในตับตอบสนองต่อ IFN- γ ที่เกิดขึ้นโดยหลัง CXCL9 และ CXCL10 ซึ่ง chemokines เหล่านี้ช่วยให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเข้ามาในตับได้มากขึ้นอีกด้วย 4.) เกล็ดเลือดหลั่งโปรตีนบางชนิด เช่น P-selectin ซึ่งสามารถจับกับ CD8⁺ T cells และช่วยให้เซลล์เหล่านี้เข้ามายังตับผ่านทาง sinusoids ได้อีกด้วย และเมื่อเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบทั้งแบบจำเพาะและแบบไม่จำเพาะเข้ามาชุมนุมที่ตับมากขึ้น ส่งผลให้ตับมีการอักเสบอย่างรุนแรงด้วยกลไกต่างๆ ตามที่ได้กล่าวมาข้างต้น(1, 2, 15, 19)

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

ความรุนแรงและอาการทางคลินิกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจะมีความหลากหลายในแต่ละบุคคลโดยขึ้นอยู่กับทั้งปัจจัยจากไวรัสและจากโฮสต์ การตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมนำไปสู่การกำจัดเชื้อไวรัสและหายจากการติดเชื้อซึ่งจะพบได้ในผู้ที่ได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในช่วงวัยรุ่นหรือวัยผู้ใหญ่ซึ่งเป็นวัยที่มีภูมิคุ้มกันเจริญเต็มที่แล้ว อย่างไรก็ตามในผู้ที่มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันมากกว่าปกติจะทำให้เกิดการอักเสบของตับอย่างรุนแรงนำไปสู่การเกิดภาวะตับวายเฉียบพลัน(20) ในทางตรงกันข้ามหากบุคคลที่มีภูมิคุ้มกันไม่เพียงพอหรือไม่เหมาะสมจะทำให้เกิดความล้มเหลวในการกำจัดเชื้อไวรัส นำไปสู่การติดเชื้อแบบเรื้อรัง ซึ่งบุคคลเหล่านี้ส่วนใหญ่จะเป็นผู้ที่ได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีตั้งแต่แรกเกิด (ประมาณ 90%) หรือได้รับเชื้อในช่วงแรกๆ ของวัยเด็ก (ประมาณ 30%) การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง คือภาวะที่มี HBsAg ในซีรัมยาวนานมากกว่า 6 เดือน เนื่องจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันไม่สามารถที่จะควบคุมและกำจัดเชื้อไวรัสได้ กลไกที่ทำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังยังไม่เป็นที่เข้าใจนัก อาจจะเป็นผลมาจากทั้งไวรัสและจากโฮสต์(4) ปัจจัยจากไวรัสได้แก่การที่ไวรัสตับอักเสบบีมีวิวัฒนาการในการหลบหลีกภูมิคุ้มกันของโฮสต์เช่น การกลายพันธุ์ของโปรตีน core เพื่อหลบหลีกการตอบสนองของ CTLs ปัจจัยอื่นของไวรัสที่เป็นไปได้คือโปรตีน HBx และ HBeAg โดยโปรตีน HBx สามารถเปลี่ยนแปลงกระบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์โฮสต์ได้ เช่นส่งผลกระทบต่อตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน(21) นอกจากนี้ HBx ยังเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ human leukocyte antigen (HLA) class I บนผิวเซลล์ของเซลล์ตับซึ่งช่วยให้เกิดการนำเสนอแอนติเจน นำไปสู่การชุมนุมของ CTLs อย่างไรก็ตามการเพิ่มจำนวนของ CD8⁺ T cells นี้ไม่สามารถควบคุมไวรัสได้เนื่องจากว่าเซลล์เหล่านี้ขาดประสิทธิภาพ แต่ CTLs เหล่านี้จะทำให้เกิดการทำลายตับอย่างรุนแรง นอกจากนี้ยังพบว่า HBeAg มีบทบาทเป็น immune tolerogen เนื่องจากมีโครงสร้างที่เหมือนกับ HBcAg ซึ่งเป็นเป้าหมายที่สำคัญของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้เกิดการลดการตอบสนองของไวรัสตับอักเสบบี นอกจาก HBeAg จะลดจำนวน HBV-specific T cells แล้ว HBeAg ยังลดการแสดงออกของ TLR2 บน monocytes ทำให้มีการสร้าง TNF- α ลดลง ซึ่งการลดลงของ TNF- α นี้ทำให้เกิดความไม่สมดุลของการตอบสนองระหว่าง Th1 และ Th2 ส่งผลให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ เช่น IL-4 และ IL-10 โดยไซโตไคน์เหล่านี้จะไปลดการตอบสนองของ HBV-specific CD4⁺T cells และ CTLs อย่างไรก็ตามสัดส่วน Th1/Th2 จะเพิ่มขึ้นหลังจากมี HBeAb (HBeAg seroconversion) และนำไปสู่การตอบสนองของ CTLs อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งเป็นผลจากการสร้างและหลั่ง IL-2 และ IFN- γ นอกจากนี้การสร้าง non-infectious particles หรือ HBsAg จำนวนมากยังทำให้มีการตอบสนองต่อ specific-T cells ที่ค่อนข้างต่ำ ในขณะที่ปัจจัยจากโฮสต์นั้น มีทั้งพันธุกรรมและสถานะของภูมิคุ้มกันของโฮสต์ มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง HLA-DRB และความสามารถในการกำจัดไวรัสตับอักเสบบีในคนที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในประเทศไทย, เกาหลี, ญี่ปุ่น, เกาหลี และอีกหลายประเทศในแถบตะวันตก ในการศึกษาเหล่านี้ให้ผลที่สอดคล้องกันคือ HLA-DRB1*1301-2 สัมพันธ์กับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ไม่ทำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง(4) ในทางตรงกันข้ามกับผู้ที่ติดเชื้อและสามารถหายได้เอง HBV-specific T cells ในผู้ที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง จะมีการตอบสนองที่น้อยลง และการลดจำนวนของ core-specific CTLs และความสามารถในการสร้าง IFN- γ ที่ลดลงจะพบได้ในกลุ่มคนที่เป็น HBeAg-positive chronic carriers แม้ว่า HBV-specific CTLs ยังคงตรวจพบได้ในระดับในกลุ่มพาหะเหล่านี้ แต่ CTLs เหล่านี้ไม่สามารถที่จะกำจัดเชื้อได้เนื่องจากมีประสิทธิภาพต่ำ

และเซลล์เหล่านี้ยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดตับอักเสบ กลไกอื่นที่เป็นไปได้ที่สามารถอธิบายความผิดปกติในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในคนที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรังคือ ไวรัสตับอักเสบบีสามารถยับยั้งหน้าที่ของ DCs ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการนำเสนอแอนติเจนให้กับ T cells แต่สมมติฐานข้อนี้ยังคงเป็นข้อถกเถียงกันอยู่ในปัจจุบัน การแสดงออกที่มากขึ้นของ programmed cell death (PD)-1 บน HBV-specific T cells อาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้เกิดการคงอยู่ของไวรัส โดยปกติ PD-1 และ ligands ของมัน เช่น PD-L1 และ PD-L2 เป็นกลไกที่สำคัญในการลดการอักเสบที่เกิดขึ้นในตับ แต่การเพิ่มการแสดงออกนี้นำไปสู่ exhaustion ของ HBV-specific CTL activity และเมื่อขัดขวางโมเลกุล PD-1 หรือ ligands ของมัน พบว่าประสิทธิภาพของ CD8⁺ T cells จะกลับมาดีเช่นเดิม สาเหตุข้อสุดท้ายที่เป็นไปได้คือ บทบาทของ regulatory T cells (Treg) พบว่าเซลล์ชนิดนี้จะมีการแสดงออกของ CD4⁺CD25⁺ บนผิวเซลล์ โดยเซลล์เหล่านี้เป็น negative regulator ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยการยับยั้งการตอบสนองต่อการอักเสบ นอกจากนี้ Treg cells ยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวน, ยับยั้งหน้าที่ของ CTL และลดการสร้าง IFN- γ และ TNF- α มีรายงานว่าจำนวนของ Treg cells ที่พบในผู้ป่วยตับอักเสบบีแบบเรื้อรังมีจำนวนสูงกว่าคนปกติหรือคนที่ติดเชื้อแต่สามารถหายได้เอง อย่างไรก็ตามการลดจำนวนเซลล์เหล่านี้หรือยับยั้งหน้าที่ของมันทำให้ CD8⁺ T cells มีการสร้างและหลั่งไซโตไคน์มากขึ้น(15, 20, 22)

การดำเนินโรคไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

ในปัจจุบัน ไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่ ระยะ immune tolerance, ระยะ immune clearance (HBeAg-positive (e+) chronic hepatitis), ระยะ low replicative (inactive HBV carrier state) and ระยะ re-activation phase (HBeAg-negative (e-) chronic hepatitis) โดยสถานะของ HBeAg และ anti-HBe ของ 2 ระยะแรกจะเป็นบวกและลบตามลำดับ ในขณะที่ 2 ระยะสุดท้ายจะมีให้ผลลบและผลบวกต่อสถานะของ HBeAg และ anti-HBe ตามลำดับ ทั้งนี้ลักษณะทางไวรัสวิทยา, การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และหลักฐานทางพยาธิ ของแต่ละระยะได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะของแต่ละระยะในภาวะติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

Phase	HBeAg	Anti-HBe	HBV DNA (IU/ml)	ALT*	Histological activity
Immune tolerance	Positive	Negative	Very high ($>2 \times 10^7$)	Normal	Normal/ minimal change
Immune clearance	Positive	Negative	High ($>2 \times 10^4$)	Elevated	Hepatic necroinflammation with variable fibrosis level
Low replicative	Negative	Positive	Low ($<2 \times 10^3$)	Normal	Inactive and minimal fibrosis
Re-activation	Negative	Positive	Moderate ($> 2 \times 10^3$)	Elevated	Hepatic necroinflammation with variable fibrosis level

*ALT referred to alanine aminotransferase, the marker for liver injury

ระยะ immune tolerance phase เป็นระยะที่ใช้เวลาค่อนข้างยาวนานมากกว่า 10 ปีโดยเฉพาะอย่างยิ่งในทารกที่เกิดจากแม่ที่เป็นไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง หรือเป็นผู้ที่ได้รับไวรัสตับอักเสบบีในช่วงวัยเด็ก อย่างไรก็ตามระยะนี้อาจจะไม่พบหรือพบได้ในระยะสั้นๆ ในผู้ที่ติดเชื้อในวัยรุ่นหรือวัยผู้ใหญ่ซึ่งส่วนใหญ่ได้รับเชื้อจากการมีเพศสัมพันธ์แบบไม่ป้องกันกับผู้ติดเชื้อหรือได้รับเลือดจากผู้ติดเชื้อ แม้ว่าจะมีปริมาณไวรัสที่สูงในกระแสเลือด แต่ผู้ติดเชื้อจะไม่แสดงอาการใดๆ ของภาวะตับอักเสบ เนื่องจาก HBeAg จะชักนำให้เกิดการไม่ตอบสนองของ HBV core-specific T cells โดยทั่วไปจะไม่แนะนำให้รักษาผู้ป่วยในระยะนี้ด้วยยาต้านไวรัสเพราะว่าการดำเนินโรคยังไม่รุนแรงและการตอบสนองต่อการรักษายังค่อนข้างต่ำ อีกทั้งในแต่ละปีจะมี anti-HBe เกิดขึ้นเพียง 5% กลไกที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนระยะจาก immune tolerance phase ไปเป็นระยะ immune clearance phase ยังไม่ทราบแน่ชัด ระยะเวลาในช่วง immune clearance phase มีความหลากหลายตั้งแต่หลายเดือนจนกระทั่งหลายปี ในระยะนี้ระดับของ HBV DNA จะต่ำกว่าระยะ immune tolerance phase ซึ่งเป็นผลมาจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไวรัสตับอักเสบบี แต่อย่างไรก็ตามในระยะนี้พบว่ามีการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสผ่านการ apoptosis ทำให้เกิดการอักเสบของตับ โดยพบว่าระดับเอนไซม์ ALT มีปริมาณที่สูงขึ้น ประมาณ 90% ของผู้ป่วยจะเกิด HBeAg seroconversion และในจำนวนนี้ 80-90% ของผู้ป่วยจะเข้าสู่ระยะ low replication phase ในขณะที่ 10-20% จะข้ามไปยังระยะ re-activation phase โดยในแต่ละปีจะมีอัตราการเกิด HBeAg ประมาณ 8-12% โดยขึ้นอยู่กับอายุของผู้ป่วย ขณะติดเชื้อ, เส้นทางการติดต่อ, ระดับเอนไซม์ ALT ในซีรัม, สภาพของภูมิคุ้มกัน และจีโนไทป์ของไวรัส มีหลายการศึกษารายงานว่าการพยากรณ์โรคที่ดีจะพบในผู้ป่วยที่มี HBeAg seroconversion ก่อนอายุ 40 ปี หรือมีระยะ immune clearance ที่สั้นร่วมกับมีระดับเอนไซม์ ALT ที่สูง ในทางตรงกันข้ามผู้ป่วยที่อยู่ในระยะนี้นานหรือมีการกำเริบ (hepatic flare) บ่อยครั้ง โดยไม่มีการเพิ่มขึ้นของ HBeAg seroconversion จะเพิ่มความเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็นตับแข็งและมะเร็งตับในอนาคต ในระยะ low replicative phase นี้จะเกิดขึ้นหลังจากการมี HBeAg seroconversion แล้ว นอกจากปริมาณไวรัสและระดับเอนไซม์ ALT ที่ลดลง แอนติบอดีต่อ HBsAg ก็สามารถพบได้ในระยะนี้ แม้ว่าผู้ป่วยส่วนมากจะมีระยะโรคสงบที่ยาวนาน ผู้ป่วยบางคนอาจจะเกิด HBeAg reversion และกลับเข้าสู่ระยะ immune clearance phase อีกครั้ง หรือจะเข้าสู่ระยะ re-activation phase ก็ได้ แม้ว่าผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่มีสถานะ HBeAg เป็นลบและมี anti-HBe แต่จะมีปริมาณไวรัสที่สูงกว่าผู้ป่วยที่อยู่ในระยะ low-replicative phase นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงที่ไม่แน่นอนของระดับเอนไซม์ ALT สะท้อนให้เห็นว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันพยายามที่จะควบคุมไวรัส แต่การตอบสนองนี้ยังไม่เพียงพอที่จะยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส ผลการศึกษาทางอนุชีววิทยาพบว่าไวรัสตับอักเสบบีจากเลือดของผู้ป่วยในระยะนี้มีการกลายพันธุ์ในบริเวณที่เรียกว่า basic core promoter (BCP) ทำให้การสร้าง HBeAg ลดลง (สถานะ HBeAg เป็นลบ) นอกจากนี้การศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ในส่วน of precore gene ทำให้เกิด stop codon จึงไม่เกิดการสร้าง HBeAg (สถานะ HBeAg เป็นลบ)(4, 15, 19, 20, 22)

การรักษาไวรัสตับอักเสบแบบเรื้อรังในปัจจุบัน

การรักษาไวรัสตับอักเสบบีในปัจจุบันยังไม่มีการรักษาใดที่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากยังคงมี cccDNA อยู่ในเซลล์ตับ ดังนั้นวัตถุประสงค์ระยะสั้นในการรักษาคือการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสและการทำให้เกิดแอนติบอดีต่อทั้ง HBeAg และ HBsAg ในขณะที่วัตถุประสงค์ระยะยาวคือการรักษาเพื่อชะลอระยะเวลาในการพัฒนาไปเป็นตับแข็งและมะเร็งตับ ก่อนที่จะให้การรักษาแก่ผู้ป่วย ปัจจัยต่างๆ ที่ต้องคำนึงถึงได้แก่ ระดับเอนไซม์ ALT, ปริมาณไวรัส และระดับพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อตับ ซึ่งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ได้แสดงในตารางที่ 2(13)

ตารางที่ 2 ข้อบ่งชี้ในการรักษาด้วยยาด้านไวรัสแต่ละชนิด

	IFN	NA
Age	Less than 60 and healthy	Any
Baseline HBV DNA level	Low	Any
Baseline ALT (X ULN)	More than 2-3	Any
HBV genotype	A or B	Any
Cirrhosis	No	With or without decompensation

ULN = Upper limits of normal

ยกตัวอย่างเช่น The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) แนะนำว่าผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่มีสถานะ HBeAg เป็นบวกและเป็นลบ และมีปริมาณไวรัสที่สูงกว่าหรือเท่ากับ 20,000 IU/ml หรือ มีระดับเอนไซม์ ALT สูงกว่า 2 เท่าของค่า ULN ควรได้รับการรักษาด้วยยาด้านไวรัส ในปัจจุบันมียาด้านไวรัสจำนวน 7 ชนิดที่ได้รับการรับรองจาก FDA เพื่อใช้ในการรักษาไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง โดยยาเหล่านี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ interferon และ nucleoside analogue ซึ่งเป็นการแบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์ของยา ดังแสดงในตารางที่ 3(13)

ตารางที่ 3 ยาที่ใช้ในการรักษาไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

Interferon-based therapy	NA-based therapy	
	Nucleoside analogue-based therapy	Nucleotide analogue-based therapy
IFN- α 2a and α 2b	Lamivudine	Adefovir
Pegylated IFN- α 2a and α 2b	Entecavir	Tenofovir
	Telbivudine	

อินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาเป็นไซโตไคน์ชนิดหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกัน มีบทบาทในการต้านไวรัสและมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยหน้าที่แรกนี้อินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ในหลายๆ ขั้นตอนในวงจรชีวิตของไวรัส โดยการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ ISGs ต่างๆ ที่มีบทบาทในการต้านไวรัส เช่น myxovirus resistance-1 (Mx1), 2'-5'-oligoadenylate synthetase (2'-5'-OAS), protein kinase R (PKR) และ ISG15 การกระตุ้นยีนเหล่านี้ส่งผลให้การเพิ่มจำนวนไวรัสลดลง ผ่านทางการยับยั้งกระบวนการถอดรหัสและแปลรหัสของไวรัส และช่วยให้เกิดการทำลายสารพันธุกรรมที่เป็นอาร์เอเอของไวรัส(23) อีกบทบาทหนึ่งของอินเตอร์เฟียร์อนคือช่วยให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันมีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากไซโตไคน์ชนิดนี้ช่วยให้มีการแสดงออกของ HLA class I และ co-stimulatory molecules บน DCs เพิ่มมากขึ้น, เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ CTLs และ NK cells และยังช่วยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจาก naïve T cells ไปเป็น Th1 cells(24) ด้วยเหตุนี้ อินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาจึงถูกใช้เป็นยาในการต้านมะเร็งหลายชนิด เช่น AIDS-related Kaposi's sarcoma, malignant melanoma และ hairy cell leukemia และยังใช้เป็นยาด้านไวรัสอีกหลายชนิด เช่น rhinovirus infection, CHC และ CHB ทั้งนี้ อินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาได้รับการยอมรับให้ใช้รักษาไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังตั้งแต่ปี ค.ศ. 1991 ซึ่งวิธีการใช้ยาคือการฉีดเข้าผิวหนังอาทิตย์ละ 3 ครั้ง เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 3 เดือน โดยพบว่าผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังทั้งกลุ่มที่สถานะ HBeAg เป็นบวกและกลุ่มที่สถานะ HBeAg เป็นลบจะตอบสนองต่อการรักษาประมาณ 33% โดยมีระดับเอนไซม์ ALT และปริมาณ HBeAg ลดลง รวมทั้งเกิด HBeAg seroconversion(25) การตอบสนองเหล่านี้จะคงอยู่ได้นานแม้ว่าจะหยุดการรักษาแล้วก็ตาม ดังนั้นการให้การรักษาด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาอาจจะป้องกันหรือชะลอการเกิดตับแข็งและมะเร็งตับได้ ข้อจำกัดของการรักษาด้วยวิธีนี้คือการบริหารยาด้วยการฉีดได้ผิวหนังหลายครั้งต่อสัปดาห์ ด้วยเหตุนี้ แพ็คอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาจึงเข้ามามีบทบาทแทนอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟา โดยยาตัวใหม่นี้เป็นการเอาโมเลกุลโพลีเอธิลีนไกลคอลติดเข้ากับโมเลกุลของอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาเพื่อทำให้พาร์มาโคไคเนติกและพาร์มาโคไดนามิกของอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาดีขึ้น เนื่องจากขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ของเพ็คจะช่วยเพิ่มค่าครึ่งชีวิตของอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาโดยลดการขับออกทางไตแล้ว โมเลกุลของเพ็คยังช่วยยืดระยะเวลาการกำจัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยลด immunogenicity ของรีคอมบิแนนท์อินเตอร์เฟียร์อนแอลฟา ด้วยเหตุผลเหล่านี้ แพ็คอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาจึงใช้แค่อาทิตย์ละ 1 ครั้ง ในปัจจุบันยาแพ็คอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟานี้มี 2 รูปแบบคือ แพ็คอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาทูเอ (peg IFN- α 2a) ซึ่งมีโมเลกุลของเพ็คเป็นกิ่งขนาด 40 กิโลดาลตัน และแพ็คอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาทูบี (peg IFN- α 2b) ซึ่งมีโมเลกุลของเพ็คเป็นเส้นตรงขนาด 12 กิโลดาลตัน(26) ขนาดยาที่แนะนำของยาแพ็คอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาทูเอ และยาแพ็คอินเตอร์เฟียร์แอลฟาทูบีสำหรับผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังทั้งกลุ่มที่สถานะของ HBeAg เป็นบวกและกลุ่มที่สถานะของ HBeAg เป็นลบคือ 180 ไมโครกรัม และ 1.5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 48 สัปดาห์ หลังจากครบคอร์สที่รักษาด้วยแพ็คอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาแล้ว พบว่า 30-40% ของผู้ป่วยในกลุ่มที่สถานะของ HBeAg เป็นบวกจะมี HBeAg seroconversion เกิดขึ้น และมากกว่า 80% ของผู้ป่วยกลุ่มนี้จะมีการตอบสนองที่ยาวนานและมีการลดลงของ HBsAg ในขณะที่ผู้ป่วยในกลุ่มที่มีสถานะของ HBeAg เป็นลบ เมื่อครบระยะเวลาที่รักษาจะมีการตอบสนองต่อการรักษาประมาณ 36% โดยพบว่าปริมาณไวรัสลดลงน้อยกว่า 20,000 copies/ml และมีระดับเอนไซม์ ALT ในระดับปกติ ยิ่งไปกว่านั้นการลดลงของ HBsAg ยังพบได้ประมาณ 3% ของผู้ป่วยกลุ่มนี้(27)

แม้ว่าการรักษาด้วยอินเตอร์เฟียร์อนจะมีประโยชน์ทั้งเพิ่มการเกิด HBeAg และ HBsAg seroconversion, ชะลอการเกิดตับแข็งและมะเร็งตับ, มีระยะเวลาในการรักษาที่แน่นอนและไม่มีเชื้อดื้อยาเกิดขึ้นในระหว่างการรักษา แต่อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยยาชนิดนี้ก็ยังมีความซับซ้อนอีกหลายประการ เช่น ต้องมีการบริหารยาโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง, ลดการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ในระดับหนึ่ง และมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์จากการรักษาเช่น อาการไข้ (influenza-like symptoms), น้ำหนักลด, ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดลดลง, ซึมเศร้า, วิดกกังวล และการทำงานของต่อมไทรอยด์ผิดปกติ เป็นต้น(25) ในทางตรงกันข้ามกับอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาที่ไม่ได้มีผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยตรง นิวคลีโอไซด์อะนาล็อกนั้นมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยตรงโดยทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ polymerase ต่างๆ ที่อยู่ในวงจรชีวิตของเชื้อไวรัสดังแสดงให้เห็นในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 กลไกการออกฤทธิ์ของนิวคลีโอไซด์อะนาล็อก

Structure	Drug	Polymerase function		
		Priming	Minus strand synthesis	Plus strand synthesis
L-nucleosides	Lamivudine (CA)		x	x
	Telbivudine (TA)			x
Deoxyguanosine analogue	Entecavir (GA)	x	x	x
Acyclic nucleotide phosphate's	Adefovir (AA)		x	x
	Tenofovir (AA)		x	x

CA = Cytidine analogue, TA = Thymidine analogue, GA = Guanosine analogue and AA = Adenosine analogue

ยาเหล่านี้สามารถแทรกตัวเข้าไปในจีโนมของไวรัสได้ในระหว่างที่มีการเพิ่มจำนวนของไวรัส เนื่องจากโครงสร้างของยามีความเหมือนกับโครงสร้างของนิวคลีโอไซด์ในธรรมชาติ โดยกลไกการทำงานคือเมื่อยานี้ได้แทรกเข้าไปในจีโนมของไวรัสแล้วเบสนิวคลีโอไทด์ตัวถัดไปจะไม่สามารถมาจับต่อได้เนื่องจากยาเหล่านี้ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของมัน ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดการหยุดการเพิ่มจำนวนของไวรัส(13) นอกจากนี้ยาในกลุ่มนิวคลีโอไซด์อะนาล็อกยังลดประสิทธิภาพของเอนไซม์โพลีเมอเรสของไวรัสตัวอักเสบบีโดยยับยั้งการไพร้มิ่งในขั้นตอน reverse transcription, ยับยั้งการทำงานของ RNA polymerase หรือ reverse transcriptase ในขั้นตอนการต่อสายลบ และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ในขั้นตอนการสร้างสายบวก แม้ว่านิวคลีโอไซด์อะนาล็อกจะยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยตรง ส่งผลให้เกิดการลดลงของปริมาณ HBV DNA ทั้งในตับและในกระแสเลือด แต่กระนั้นนิวคลีโอไซด์อะนาล็อกก็ไม่สามารถที่จะกำจัด cccDNA ในตับได้ อย่างไรก็ตามยาชนิดนี้สามารถลดการส่งไวรัสกลับเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ตับได้ ส่งผลให้เกิดการลดลงของ cccDNA ในตับ และยังไปกว่านั้นนิวคลีโอไซด์อะนาล็อกสามารถป้องกันและชะลอ

การพัฒนาไปเป็นตับแข็ง, ภาวะการทำงานของตับล้มเหลว และรวมไปถึงการเกิดมะเร็งตับได้อีกด้วย(25) มียานิวคลีโอไทด์อะนาล็อก 5 ชนิด ที่ได้รับการรับรองให้ใช้เป็นยาที่ใช้รักษาไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังซึ่งได้แก่ lamivudine, adefovir, entecavir, telbivudine และ tenofovir(13) การรักษาด้วยยา lamivudine แก่ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและมีสถานะของ HBeAg เป็นบวกทำให้เกิดการลดลงของ HBV DNA, มีระดับเอนไซม์ ALT ในเกณฑ์ปกติ และมี HBeAg seroconversion เกิดขึ้น ประมาณ 15-20% และประมาณ 25-30% หลังได้รับการรักษาเป็นระยะเวลา 1 ปีและ 2 ปี ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการรักษาด้วย lamivudine เป็นระยะเวลานานจะทำให้มีเชื้อดื้อยาเกิดขึ้นประมาณ 14-24% และสูงถึง 76% เมื่อได้รับการรักษาต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 1 ปีและ 5 ปีตามลำดับ นี่จึงเป็นข้อจำกัดในการใช้ยา lamivudine ในปัจจุบัน เนื่องจากอัตราการเกิดเชื้อดื้อยาสูง จึงไม่แนะนำให้ใช้ lamivudine เป็นยาตัวแรกที่ใช้รักษาไวรัสตับอักเสบบี ถึงแม้ว่า lamivudine ที่ให้การรักษาพร้อมกับอินเตอร์เฟียรอนจะสามารถลดการเกิดเชื้อดื้อยาได้ แต่การตอบสนองต่อการรักษาก็ไม่ได้เพิ่มขึ้นขึ้น(28, 29) ยาด้านไวรัสตับอักเสบบีตัวที่สองคือ adefovir dipivoxil ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับ guanosine nucleotide แม้ว่าประสิทธิภาพของยา adefovir ต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสจะน้อยกว่า lamivudine แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเกิดเชื้อดื้อยาจะน้อยกว่า lamivudine ประมาณ 2% และ 29% เมื่อได้รับการรักษาต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 1 ปีและ 5 ปีตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าหลังได้รับการรักษาด้วยยา adefovir เป็นเวลา 1 ปี ผู้ป่วยที่เป็นไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่มีสถานะของ HBeAg เป็นบวก จะมี HBeAg seroconversion เกิดขึ้นประมาณ 12-18% และจะตรวจไม่พบระดับ HBV DNA ในกระแสเลือดประมาณ 13-21% ในขณะที่ระดับ HBV DNA จะตรวจไม่พบในกระแสเลือดประมาณ 51-63% ในผู้ที่เป็ไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและมีสถานะของ HBeAg เป็นลบ ยา Adefovir เหมาะสำหรับผู้ที่ติดเชื้อดื้อยาต่อ lamivudine เพราะว่ายา 2 ชนิดนี้ไม่เกิดการดื้อยาค้างกลุ่มกัน เนื่องจาก adefovir มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสได้ในระดับปานกลาง ยานี้จึงไม่แนะนำให้ใช้รักษาผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่มีสถานะ HBeAg เป็นบวก เนื่องจากว่าคนกลุ่มนี้จะมีปริมาณไวรัสที่ค่อนข้างสูงในกระแสเลือด ยิ่งไปกว่านั้นยานี้ยังไม่แนะนำให้เป็ยาตัวแรกที่ใช้ในการรักษาไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง เนื่องจากมีพิษต่อไต ดังนั้นการใช้ยา adefovir จึงมีข้อจำกัดและจะใช้ในกรณีที่ผู้ป่วยมีเชื้อดื้อยา lamivudine เท่านั้น(25, 29, 30) ยาดัวที่สามคือ Entecavir ซึ่งเป็นยาตัวแรกที่ไม่แนะนำให้ใช้ในการรักษาไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง เนื่องจากสามารถลดปริมาณไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังทั้งกลุ่มที่มีสถานะของ HBeAg เป็นบวก (67%) และ สถานะของ HBeAg เป็นลบ (90%) หลังจากได้รับการรักษาเป็นระยะเวลา 1 ปี และผลของการรักษายังคงอยู่ได้อีก 5 เดือนเมื่อได้รับการรักษาอย่างต่อเนื่องด้วยยา entecavir ประสิทธิภาพของ entecavir ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสจะสูงกว่า lamivudine และ adefovir เพราะว่า entecavir สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ polymerase ของไวรัสตับอักเสบบีได้ 3 ขั้นตอนในวงจรชีวิตของไวรัสชนิดนี้ อย่างไรก็ตามอัตราการเกิด HBeAg seroconversion นั้นไม่แตกต่างจากการรักษาด้วย lamivudine และ adefovir นั่นคือ มีการลดลงของ HBeAg ประมาณ 20% และ 30% ของผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและมีสถานะของ HBeAg ที่เป็นบวก หลังจากได้รับการรักษาด้วยยา entecavir เป็นเวลา 1 ปีและ 2 ปีตามลำดับ การเกิดเชื้อดื้อยาหลังการรักษาด้วยยา entecavir ค่อนข้างต่ำประมาณ 1.2% หลังจากรักษาด้วยยาชนิดนี้เป็นเวลา 5 ปี อย่างไรก็ตามอัตราการเกิดเชื้อดื้อยานี้อาจสูงถึง 51% ในผู้ที่ติดเชื้อดื้อยา lamivudine หลังจากได้รับการรักษาด้วย entecavir เป็นระยะเวลา 5 ปี เหตุผลที่ entecavir มีอัตราการเกิดเชื้อดื้อยาที่

ต่ำเพราะว่ายานี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส และการดื้อยาชนิดนี้จำเป็นจะต้องเกิดการกลายพันธุ์อย่างน้อย 3 บริเวณ(25, 31, 32) ยาตัวที่ 4 คือ telbivudine พบว่าผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่มีสถานะของ HBeAg เป็นบวก และเป็นลบ จะมีปริมาณไวรัสที่ลดลงประมาณ 60% และ 88% ตามลำดับหลังได้รับการรักษาด้วยยา telbivudine เป็นระยะเวลา 1 ปี โดยมีอัตราการเกิด HBeAg seroconversion ประมาณ 22.5% และ 29.6% หลังได้รับการรักษาเป็นเวลา 1 ปี และ 2 ปี ตามลำดับ การเกิดเชื้อดื้อยาเมื่อได้รับการรักษาด้วยยาชนิดนี้ค่อนข้างต่ำ ประมาณ 5% และ 25% หลังได้รับการรักษาต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ปี และ 2 ปี ตามลำดับ เชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ดื้อยา telbivudine จะสามารถดื้อต่อยา lamivudine และ entecavir ได้ ข้อจำกัดหลักๆ ของยานี้ก็คือ อาการข้างเคียงจากการใช้ยาได้แก่ myalgia และ peripheral neuropathy(28) ยาตัวสุดท้ายในกลุ่มนี้คือ tenofovir disoproxil fumarate ซึ่งเป็นยาที่สามารถลดระดับไวรัสตับอักเสบบีได้ค่อนข้างดีเทียบเท่ากับ entecavir และ telbivudine อย่างไรก็ตามจะไม่พบเชื้อที่ดื้อต่อยา tenofovir หลังจากรักษาเป็นระยะเวลา 4 ปี และยานี้ยังใช้รักษาผู้ป่วยที่มีเชื้อดื้อต่อยา lamivudine ปริมาณของ HBV DNA จะไม่สามารถตรวจพบได้ประมาณ 76% ของผู้ป่วย และการเกิด HBeAg และ HBsAg seroconversion คือ 21% และ 2% ของผู้ป่วยหลังได้รับการรักษาต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ปี และ 27% และ 6% ของผู้ป่วยหลังได้รับการรักษาเป็นระยะเวลา 2 ปีในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่มีสถานะของ HBeAg เป็นบวก สำหรับผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่มีสถานะของ HBeAg เป็นลบ จะมีการลดลงของปริมาณไวรัสตับอักเสบบีประมาณ 93% ด้วยเหตุผลเหล่านี้ ยา tenofovir จึงได้รับการแนะนำให้ใช้เป็นยาตัวแรกในการรักษาคนไข้ไวรัสตับอักเสบบีทั้งกลุ่มที่มีสถานะของ HBeAg เป็นบวกและกลุ่มที่มีสถานะของ HBeAg เป็นลบ(25) แม้ว่าการรักษาด้วยยาต้านไวรัสในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในปัจจุบันจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสและทำให้เกิด HBeAg seroconversion ซึ่งเป็นวัตถุประสงค์ของการรักษา แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดอยู่ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5 ดังนั้นยาตัวใหม่ ที่สามารถเอาชนะข้อจำกัดเหล่านี้ได้ ยังคงเป็นที่ต้องการอยู่ในปัจจุบัน(2, 25, 28-31)

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบข้อดีและข้อด้อยของการรักษาไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแบบต่างๆ

	IFN	NA
Advantages	No drug resistance	Oral administration
	Increased HBsAg seroconversion	More potent HBV DNA suppression
	More durable off-treatment	Minimal side effects
	Finite therapy duration	
Limitations	Subcutaneous injection	Risk of resistance on prolonged therapy
	Less potent HBV DNA suppression	No increase in HBsAg seroconversion
	Frequent side effects	Less durable off-treatment response
		Long-term therapy

อินเทอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา (Interferon lambda, IFN- λ)

อินเทอร์เฟียร์อนถูกแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งแบ่งตามโครงสร้าง, การใช้ตัวรับสัญญาณ (receptor) และหน้าที่ โดยอินเทอร์เฟียร์อนชนิดที่ 3 หรือ อินเทอร์เฟียร์อนแลมบ์ดาเป็นไซโตไคน์ตัวใหม่ในกลุ่ม class II cytokine family ซึ่งไซโตไคน์ตัวอื่นๆ ที่อยู่ในกลุ่มนี้คือ IL-10 family, type I IFN และ type II IFN ไซโตไคน์ชนิดใหม่นี้ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 2003 โดยนักวิจัย 2 กลุ่ม โดยพบว่า อินเทอร์เฟียร์อนแลมบ์ดามี 3 ชนิด คือ IFN- λ 1, IFN- λ 2 และ IFN- λ 3 หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า IL-29, IL-28A และ IL-28B ตามลำดับ แม้ว่าโครงสร้างของอินเทอร์เฟียร์อนแลมบ์ดาจะคล้ายกับไซโตไคน์ในกลุ่ม IL-10 family แต่อินเทอร์เฟียร์อนแลมบ์ดามีหน้าที่คล้ายกับอินเทอร์เฟียร์อนชนิดที่ 1 โดยอินเทอร์เฟียร์อนชนิดที่ 3 นี้จะออกฤทธิ์ได้ก็ต่อเมื่อจับกับตัวรับสัญญาณของมันซึ่งได้แก่ IFN- λ R1 และ IL-10R2(33, 34)

โครงสร้างยีนของอินเทอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา

ยีนอินเทอร์เฟียร์อนแลมบ์ดาจะอยู่ที่ตำแหน่ง 19q13.3 บนโครโมโซมคู่ที่ 19 โดยยีนของอินเทอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 1 จะมี 5 exon ในขณะที่ยีนของอินเทอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 2 และอินเทอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 จะมี 6 exon ในขณะที่อินเทอร์เฟียร์อนชนิดที่ 1 นั้นไม่มี intron โดยลักษณะการจัดเรียงตัวของ exon-intron ของอินเทอร์เฟียร์อนแลมบ์ดานี้จะมีลักษณะเหมือนกับยีนในกลุ่ม IL-10-like cytokines ในระหว่างที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ชิ้นส่วนที่มียีนของ IL-29 และ IL-28A จะถูกคัดลอกและแทรกตัวกลับเข้าไปในจีโนมอีกครั้ง ในทิศทางแบบ mirror-inversion กับชิ้นส่วนแรกที่เป็น parent fragment ทำให้เกิดการสร้าง IL-28B และ non-functional pseudogene IFN- λ 4 Ψ บนสายลบ ขณะที่ยีนของ IL-29 และ IL-28A จะอยู่บนสายบวก ด้วยเหตุนี้ยีนของ IL-28B จึงถูกถอดรหัสในทิศทางตรงกันข้ามกับยีนของ IL-29 และยีน IL-28A ในหลายๆ ส่วนของยีน IL-28B มีความคล้ายคลึงกับยีน IL-28A เช่น downstream และ upstream flanking sequences และรวมถึง encoding region ดังนั้น อินเทอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 และ อินเทอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 2 จึงมีความเหมือนซึ่งกันและกันมากกว่าอินเทอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 1 อย่างไรก็ตามส่วน promoter ของทั้ง 3 ยีนนั้นมีความเหมือนกัน และมี binding regions หลายบริเวณสำหรับ interferon regulatory factor (IRF) 3 และ 7 และ NF- κ B ซึ่งบริเวณเหล่านี้สามารถพบได้ในอินเทอร์เฟียร์อนชนิดที่ 1 เช่นเดียวกัน ดังนั้นเป็นไปได้ที่ตัวกระตุ้นที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของอินเทอร์เฟียร์อนชนิดที่ 1 จะสามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของอินเทอร์เฟียร์อนชนิดที่ 3 ได้เช่นเดียวกัน(35-37)

การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของอินเทอร์เฟียร์อนชนิดที่ 3

เพื่อเป็นการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส เซลล์หลายชนิดสามารถสร้างอินเทอร์เฟียร์อนแลมบ์ดาได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง plasmacytoid dendritic cells (pDCs) แต่อย่างไรก็ตาม macrophages ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างอินเทอร์เฟียร์อนแอลฟาได้เป็นจำนวนมาก แต่กลับไม่สร้างอินเทอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา เช่นเดียวกับอินเทอร์เฟียร์อนชนิดที่ 1 อินเทอร์เฟียร์อนแลมบ์ดาส่วนใหญ่จะถูกกระตุ้นเมื่อมีการติดเชื้อไวรัส

โดยสารพันธุกรรมของไวรัสเป็นหนึ่งใน pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) ที่สามารถชักนำให้เกิดการสร้างอินเตอร์เฟียรอน โดยจะมีโมเลกุลที่คอยตรวจจับสิ่งแปลกปลอมที่เรียกว่า pattern recognition receptors (PRRs) เช่น RIG-1 และ MDA5 ที่จะคอยตรวจจับ PAMPs ในไซโตพลาสซึม ส่วน sensors ที่ตรวจจับ PAMPs ภายใน endosome ได้แก่ TLR-3, -7/8 และ -9 หลังจากการจับกันของ PAMPs และ PRRs วิธีสัญญาณจะถูกสร้างขึ้นผ่าน adaptor molecules และ kinases ต่างๆ นำไปสู่การกระตุ้น transcription factors เช่น NF- κ B, IRF3 และ IRF7 ซึ่ง transcription factors เหล่านี้จะไปจับบริเวณ promoter ของอินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 1 และอินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 3 ทำให้เกิดการแสดงออกและสร้างโปรตีนอินเตอร์เฟียรอนออกมา อย่างไรก็ตามอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 2/3 จะถูกกระตุ้นผ่านทาง IRF-7 เป็นส่วนใหญ่ เช่นเดียวกับอินเตอร์เฟียรอนแอลฟา ในขณะที่ IRF3 ส่วนใหญ่จะเหนี่ยวนำให้เกิดอินเตอร์เฟียรอนเบต้าและอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 1 สำหรับ NF- κ B เป็นตัวหลักที่ทำให้เกิดการแสดงออกของอินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 3 เพราะว่าการยับยั้งวิธีสัญญาณนี้ใน DCs ทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาทั้ง 3 ชนิด ในขณะที่การสร้างอินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 1 มีผลกระทบเพียงเล็กน้อย(35, 38)

วิธีสัญญาณของอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา

อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาทั้ง 3 ชนิดจะออกฤทธิ์โดยการกระตุ้นวิธีสัญญาณผ่านตัวรับสัญญาณได้แก่ IFN- λ R1 และ IL-10R2 โดยเป็นยีนที่อยู่ตำแหน่ง 1p36.11 บนโครโมโซมคู่ที่ 1 และตำแหน่ง 21q22.11 บนโครโมโซมคู่ที่ 21 ตามลำดับ(33, 34) IFN- λ R1 ไม่เพียงแต่มีความสำคัญในวิธีสัญญาณของอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาเนื่องจากเป็นตัวที่ให้ binding energy แต่ยังมีเฉพาะกับอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาและมีการแสดงออกในอวัยวะที่จำเพาะเช่น อวัยวะที่มาจาก epithelial cell เช่น ตับ, ไทรอยด์, กล้ามเนื้อลาย, ตับอ่อน และอวัยวะอื่น ๆ ในขณะที่ IL-10R2 จะมีการกระจายตัวในหลายๆ อวัยวะ และ ตัวรับสัญญาณตัวนี้ยังถูกใช้ร่วมกับไซโตไคน์ตัวอื่นๆ เช่น IL-10 และ IL-22 นอกจากนี้ IL-10R2 ยังมีความจำเป็นสำหรับอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา เพื่อทำให้เกิดการส่งสัญญาณได้อย่างเหมาะสม(33, 34, 39) หลังจากการจับกันของอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาและตัวรับสัญญาณ Janus kinase 1 (Jak1) และ Tyrosine kinase 2 (Tyk2) ซึ่งเป็นเอนไซม์ไคเนสจะถูกกระตุ้นเพื่อให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ tyrosines ตำแหน่งที่ Tyr313 และ Tyr517 ในส่วนของ intracellular domain ของ IFN- λ R1 ทำให้เกิด docking site สำหรับ Src homology 2 (SH2) สำหรับ STAT จากนั้นโปรตีน STAT จะเข้าใกล้กับเอนไซม์ไคเนสเหล่านี้และถูกเติมหมู่ฟอสเฟตที่ tyrosine เพื่อสร้างเป็น docking site ที่ปลาย C-terminal ของ STAT เพื่อทำหน้าที่เป็น SH2 domain สำหรับ STAT ตัวอื่นๆ ต่อไป ในกรณีนี้ โปรตีน STAT-1 จะรวมกับโปรตีน STAT-2 และมีการชักนำให้ IRF-9 มารวมตัวกันเป็น IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น transcription factor โดย transcription factor นี้จะเคลื่อนที่เข้าไปในนิวเคลียสและจับบริเวณ promoter ที่มีชื่อว่า IFN-stimulated response elements (ISRE) ของ ISG ต่างๆ(35, 37-39) จากการศึกษาของ Zhang และคณะ แสดงให้เห็นว่า IL-28B เหนี่ยวนำให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน STAT-1 และโปรตีน STAT-2 เช่นเดียวกับอินเตอร์เฟียรอนแอลฟา ซึ่งให้เห็นว่า IL-28B ส่งสัญญาณผ่านวิธีสัญญาณ Jak-STAT pathway เพื่อเป็นการยืนยันการศึกษานี้ คณะผู้วิจัยได้ใส่สาร Jak inhibitor 1 ซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ Jak1 และ Tyk2 ในเซลล์มะเร็งตับที่มี

HCV RNA ในหลอดทดลอง ก่อนจะให้ยา IL-28B เพื่อยับยั้งวิถีสัญญาณของ Jak-STAT pathway ผลการทดลองพบว่า MxA และ ISG15 ซึ่งเป็น ISGs มีการแสดงออกที่ลดลง และพบว่าการแสดงออกของ HCV core protein ไม่ถูกยับยั้งด้วย IL-28B(40) แม้ว่าวิถีสัญญาณ Jak-STAT pathway จะเป็นวิถีสัญญาณหลักของทั้งอินเตอร์เฟียรอนแอลฟาและอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา แต่ว่าอินเตอร์เฟียรอนทั้ง 2 ชนิดนี้ใช้ตัวรับสัญญาณที่แตกต่างกัน ดังนั้นเป็นไปได้ที่ว่าอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาสามารถส่งสัญญาณผ่านวิถีสัญญาณอื่นได้เช่นกัน จากการศึกษาโดยใช้ microarray แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการแสดงออกของยีนที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาค่อนข้างเหมือนกับยีนที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียรอนแอลฟาแต่ต่างกันที่เวลาที่มีการแสดงออกของยีน โดยพบว่าการแสดงออกของยีนที่ถูกกระตุ้นอินเตอร์เฟียรอนแอลฟาสามารถพบได้ที่ 3 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นและจะลดการแสดงออกที่เวลา 24 ชั่วโมง ในทางกลับกัน การแสดงออกของยีนที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาจะมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ หลังจากได้รับการกระตุ้น ยิ่งไปกว่านั้นพบว่าบางยีนถูกกระตุ้นโดยอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาแต่ไม่ถูกกระตุ้นโดยอินเตอร์เฟียรอนแอลฟา จึงเป็นข้อยืนยันได้ว่าอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาน่าจะกระตุ้นยีนเหล่านี้ผ่านวิถีสัญญาณอื่น(41)

อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาซับไทป์

อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาทั้ง 3 ซับไทป์จัดอยู่ใน class II cytokine family ลักษณะเด่นของ family นี้คือลักษณะโครงสร้างและรูปแบบของพันธะไดซัลไฟด์ โครงสร้างผลึกของอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาสามแสดงให้เห็นว่า อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดามีโครงสร้างเป็น α -helical structure ร่วมกับ 6 secondary elements ซึ่งจะคล้ายกับไซโตไคน์อื่นๆ ใน family นี้ ไซโตไคน์เหล่านี้มีรูปแบบของพันธะไดซัลไฟด์ที่จำเพาะ โดยอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 1 มี cysteines เพียง 5 ตัวในขณะที่อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาซับไทป์อื่นๆ มี cysteines 7 ตัว การศึกษาโครงสร้างทางผลึกของอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 3 ยังแสดงให้เห็นอีกว่าอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 2/3 มีพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะในโครงสร้าง อย่างไรก็ตาม มีเพียง 2 พันธะไดซัลไฟด์เท่านั้นที่พบได้ในอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 1 นอกจากพันธะไดซัลไฟด์แล้ว ความแตกต่างระหว่างอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 1 และอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 2/3 คือ glycosylation จากการสังเกตการสร้างโปรตีนเหล่านี้ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่า อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 1 มี 1 N-linked และ 6 O-linked ที่เกิด glycosylation ในขณะที่อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 2/3 ไม่พบการเกิด glycosylation อย่างไรก็ตามการเติมน้ำตาลให้กับโปรตีนนี้ดูเหมือนว่าจะไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาทั้ง 3 ซับไทป์ ยิ่งไปกว่านั้นพบว่าเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนมาเรียงต่อกันพบว่า อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 2 มีความเหมือนกับอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 3 ถึง 97% ในขณะที่อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 2/3 มีความเหมือนกับอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 1 เพียง 81% เมื่อเปรียบเทียบลำดับความเหมือนกับไซโตไคน์อื่นๆ ในกลุ่มนี้กับอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 3 พบว่า ลำดับความเหมือนระหว่างอินเตอร์เฟียรอนแอลฟา 2 และอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 3 หรืออินเตอร์ลิวคิน 19 และอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 3 คือ 31% และ 21% ตามลำดับ เมื่อพิจารณาตามความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนแล้ว อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาจึงมีความสัมพันธ์กับอินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 1 มากกว่าไซโตไคน์ในกลุ่มอินเตอร์ลิวคิน 10(35-37) ประสิทธิภาพของอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาทั้ง 3 ซับไทป์เมื่อพิจารณาจากความสามารถของแต่ละซับไทป์ในการป้องกันเซลล์แตกจากเชื้อไวรัส

encephalomyocarditis virus (EMCV) ผลการทดลองถูกทดสอบโดยพิจารณาจากค่า EC50 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 3 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการป้องกันเซลล์แตกโดยสูงถึง 16 เท่า และ 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 2 และอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 1 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพของอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 3 ยังน้อยกว่าอินเตอร์เฟียรอนแอลฟาประมาณ 10 เท่า(42) อีกการศึกษาหนึ่งที่สอดคล้องกับการศึกษานี้โดย Leiliang Zhang และคณะสาธิตให้เห็นว่าการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบซีจะถูกยับยั้งด้วยอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาทั้ง 3 ซับไทป์และพบว่า IL-28B มีประสิทธิภาพในการลดการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ดีกว่าซับไทป์อื่นๆ ($IL28B > IL29 > IL28A$) อย่างไรก็ตาม อินเตอร์เฟียรอนแอลฟายังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบซีได้ดีกว่าอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 3(40) ผลการศึกษาจากงานวิจัยของ Man-Qing Liu และคณะซึ่งเป็นการศึกษาที่ดูการออกฤทธิ์ของอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสเอชไอวีก็ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาดังกล่าวข้างต้น(43) ฤทธิ์ที่อ่อนของอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดานี้ น่าจะเป็นผลมาจากการแสดงออกของตัวรับสัญญาณที่มีจำกัดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวรับสัญญาณของอินเตอร์เฟียรอนแอลฟาที่มีการแสดงออกในทุกๆ เซลล์ ฤทธิ์ของอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 2 และ อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 3 จะแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด แม้ว่าไซโตไคน์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีกรดอะมิโนที่แตกต่างกันเพียง 7 ตัวเท่านั้น และยังมีระดับความเหมือนกันที่ค่อนข้างสูง สาเหตุที่ทำให้อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 2 มีฤทธิ์อ่อนลงนี้ยังไม่ทราบแน่ชัดในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามมีสมมติฐานที่ว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ของ Val95 บนอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 2 (Gly 95 ใน อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาสาม) ซึ่งอยู่บน helix D domain จะไปรบกวนการจับกันของโดเมนนี้กับ IL-10R2 ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ 2 ลดลง(37)

ฤทธิ์ทางชีวภาพของอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา

แม้ว่าการใช้ตัวรับสัญญาณของอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาจะแตกต่างจากตัวรับสัญญาณของอินเตอร์เฟียรอนแอลฟา แต่อย่างไรก็ตามการส่งสัญญาณของไซโตไคน์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ยังคงส่งผ่านวิถีสัญญาณ Jak-STAT pathway ยิ่งไปกว่านั้นรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดายังค่อนข้างเหมือนกับยีนที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียรอนแอลฟา ดังนั้นอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาจึงมีฤทธิ์ต้านไวรัส, ต้านมะเร็ง และมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเช่นเดียวกับอินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 1(33, 34, 39, 44) โดยอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดานี้มีฤทธิ์ต้านไวรัสหลายชนิดเช่น HIV, CMV, HCV, EMCV, VSV, IAV และ HBV ในหลายๆ โมเดล นอกจากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ vaccinia virus (VV) และ herpes simplex virus (HSV) ในสัตว์ทดลองได้ โดยสอดคล้องกับบทบาทในการต้านไวรัส อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาสามารถชักนำให้ OAS1 และ MxA มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น ซึ่งทั้ง 2 ยีนนี้เป็นลักษณะที่สำคัญของการต้านไวรัส(45) นอกจากจะมีฤทธิ์ต้านไวรัสแล้ว อินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดายังมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง โดยมีการศึกษาหนึ่งที่ศึกษาฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของไซโตไคน์ชนิดนี้ โดยแสดงให้เห็นว่าขนาดของก้อนมะเร็งในหนูที่ถูกชักนำให้เกิดมะเร็งที่ได้รับการฉีดพลาสมิดที่มีอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดาจะมีขนาดก้อนมะเร็งเล็กลงเมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา โดยขนาดที่ลดลงก้อนมะเร็งนี้อาจจะเป็นผลมาจากการมีประสิทธิภาพของ NK cells ที่เพิ่มมากขึ้น และเซลล์มะเร็งเกิดการตาย

เนื่องจากการเหนี่ยวนำของอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา ยิ่งไปกว่านั้นบางหลักฐานแสดงให้เห็นว่าอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดาสามารถเพิ่มการแสดงออกของ MHC class I ได้ ซึ่งให้เห็นว่าอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดาช่วยให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ(35, 37)

อินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดาและไวรัสตับอักเสบ

มีหลายการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีถูกยับยั้งด้วยอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา โดยพิจารณาจากการลดลงของ HCV RNA หรือการแสดงออกที่ลดลงของโปรตีนของไวรัสตับอักเสบบี(40, 45-47) การให้การรักษาร่วมกันระหว่างอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 1 และอินเตอร์เฟียร์รอนแอลฟา หรือระหว่างอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 1 และอินเตอร์เฟียร์รอนแกมมาแก่เซลล์ไลน์ดับที่มีไวรัสตับอักเสบบี แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกที่ลดลงของ HCV RNA หลังจากได้รับการรักษาด้วยการรักษาแบบผสมให้ผลดีกว่าการรักษาแบบเดี่ยว โดยการให้การรักษาร่วมกันระหว่างอินเตอร์เฟียร์รอนแอลฟา/อินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 1 และอินเตอร์เฟียร์รอนแกมมา/อินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 1 จะลดการแสดงออกของ HCV RNA ได้ 92% และ 98% ตามลำดับ(45) เมื่อไม่นานมานี้ การศึกษา genome-wide association studies (GWAS) ซึ่งให้เห็นว่าอัตราการเกิดการตอบสนองทางไวรัสวิทยาที่สูงขึ้นต่อการรักษาด้วย peg IFN- α ร่วมกับ ribavirin (RBV) และการกำจัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีได้เองในคนไข้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีความสัมพันธ์กับ SNP (rs12979860) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่อยู่เหนือยีนของ IFN- λ 3 ขึ้นไป 3 กิโลเบส หลังจากได้รับการรักษาด้วย peg IFN- α และ RBV ผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่มีจีโนไทป์ CC จะมีอัตราการเกิดการตอบสนองทางไวรัสวิทยาที่สูงกว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น CT หรือ TT(48-50) อย่างไรก็ตาม SNP นี้ไม่สัมพันธ์กับการกำจัด HBsAg, HBeAg และ HBV DNA(43, 51, 52) แม้ว่า SNP ใน ยีน IL28B จะไม่สัมพันธ์กับอาการทางคลินิกของไวรัสตับอักเสบบี แต่อินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดาก็มีฤทธิ์ในการต้านไวรัสชนิดนี้เช่นกัน ในปี ค.ศ. 2005 คณะผู้วิจัยนำโดย Robek ได้ศึกษาฤทธิ์ในการต้านไวรัสของอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 2 ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี โดยใช้ murine liver cell line harboring HBV (HBV-Met) เป็นโมเดลในการศึกษา ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า murine IFN- λ 2 ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้มากกว่า 90% ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังได้รับการกระตุ้น และผลการทดลองนี้ยังพบใน HBV-Met cells ที่กระตุ้นด้วย IFN- β 200 U/ml ที่ระยะเวลาเดียวกัน(47) อีกการศึกษาหนึ่งที่สอดคล้องกับการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 1 ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีใน human hepatocyte containing HBV cell line ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังได้รับการกระตุ้น(53) จากที่ได้กล่าวมาทั้งหมด แม้ว่าฤทธิ์ในการต้านไวรัสของอินเตอร์เฟียร์รอนชนิดที่ 3 จะอ่อนกว่าฤทธิ์ในการต้านไวรัสของอินเตอร์เฟียร์รอนแอลฟา แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของตัวรับที่จำกัดในบางอวัยวะทำให้ผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาลดน้อยลง และการตอบสนองต่ออินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดาที่ให้ผลยาวนาน จึงทำให้ไซโตไคน์ชนิดนี้น่าจะเป็นยาตัวใหม่ที่จะใช้รักษาไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ในปัจจุบัน pegIFN- λ 1 ได้ถูกนำมาศึกษาใน clinical trials study ระยะที่ 3 สำหรับรักษาผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง ผลจากการศึกษาในระยะที่ 2 แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองทางไวรัสวิทยาของผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่ได้รับการรักษาด้วย pegIFN- λ 1 ร่วมกับ ribavirin เป็นระยะเวลา 24 สัปดาห์ เหมือนกับผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีมาตรฐาน แต่การลดลงอย่าง

รวดเร็วของระดับ HCV RNA จะพบได้ในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย pegIFN- λ 1 อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย pegIFN- λ 1 จะมีการไม่พึงประสงค์จากการใช้น้อยกว่า และมีระดับเอนไซม์ ALT ที่สูงขึ้นน้อยกว่าผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีมาตรฐาน(54) สำหรับการรักษาในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบ บีแบบเรื้อรัง peg IFN- λ 1 อยู่ในระยะ phase 2b โดยเปรียบเทียบกับ peg IFN- α ผลการทดลองบางส่วนจากการศึกษาในระยะนี้แสดงให้เห็นว่าการลดลงของ HBV DNA, HBsAg และ HBeAg ซึ่งเป็นผลมาจาก pegIFN- λ 1 ดูเหมือนว่าจะสูงกว่าในคนที่ได้รับการรักษาด้วย peg IFN- α อาการไม่พึงประสงค์หลังจากการใช้ยาสามารถพบได้เล็กน้อยในผู้ป่วยที่ได้รับ pegIFN- λ 1 ข้อมูลเหล่านี้ได้รับมาจากการประชุม 23rd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) ซึ่งจัดขึ้นในวันที่ 6th-9th June 2013 ที่ประเทศสิงคโปร์

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษากลไกระดับโมเลกุล

เป็นที่ทราบกันดีว่าอินเตอร์เฟียร์อนยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบ บีโดยป้องกันการรวมตัวของ viral RNA กับ immature nucleocapsids ซึ่งเกิดขึ้นในไซโตพลาสซึม(55) แม้ว่าจะมีหลายการศึกษาที่เสนอโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการต้านไวรัสของอินเตอร์เฟียร์อน เช่น MxA, APOBEC3G และ MyD88 แต่ภาพรวมของการตอบสนองต่ออินเตอร์เฟียร์อนยังไม่เป็นที่เข้าใจนัก(56-58) การศึกษาโดยใช้ microarray เป็นการศึกษาที่ให้ข้อมูลในระดับ mRNA คณะผู้วิจัยของ XIONG Wei ได้ใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาภาพรวมของผลของอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟา และอินเตอร์เฟียร์อนเบต้าต่อเซลล์ HepG2 และ HepG2.2.15 (HBV-transfected cells) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ายีนที่ตอบสนองต่ออินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาจะเกี่ยวข้องกับ cell cycle, apoptosis, extracellular matrix, signal transduction, interferon inducible and proteasome components จากการศึกษา คณะผู้วิจัยได้สนใจโมเลกุล MyD88 ซึ่งเป็นโมเลกุลหนึ่งในการส่งสัญญาณที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟา และคณะผู้วิจัยได้ทำการยืนยันบทบาทของยีนนี้ว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการต้านไวรัสหรือไหม โดยผู้วิจัยได้ทำการโคลนยีนนี้เข้าสู่พลาสมิดและทรานสเฟกต์เข้าสู่ HBV replicative cell line(59) พบว่า MyD88 สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบ บีและลดการสร้าง HBeAg และ HBsAg ได้ นอกจาก microarray การศึกษาแบบองค์รวมอีกการศึกษาหนึ่งคือ โปรตีโอมิกส์ (proteomics) ซึ่งเป็นการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน เนื่องจากความจริงที่ว่าโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตซึ่งจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต อีกทั้งการแสดงออกของ mRNA และโปรตีนไม่ค่อยมีความสัมพันธ์ไปด้วยกัน ซึ่งเป็นผลมาจาก alternative splicing, proteolysis และ post-translational modification (PTM) ดังนั้นการศึกษาในระดับโปรตีนอาจจะให้ข้อมูลเพิ่มเติมและทำให้เข้าใจกลไกในระดับโมเลกุลได้ดียิ่งขึ้น(60, 61) ยกตัวอย่างเช่น Jianhua Wang ได้ศึกษาโปรตีนโปรไฟล์ของ HBV-transfected cell ที่ตอบสนองต่ออินเตอร์เฟียร์อนแอลฟา ด้วยวิธีทางโปรตีโอมิกส์ ซึ่งได้แก่ การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าใน 2 มิติ (2-DE) และ แมสสเปกโตรมิเตอร์ (MS) คณะผู้วิจัยพบว่าโปรตีนที่ตอบสนองต่ออินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาจะเกี่ยวข้องกับ ATP binding, cell cycle, apoptosis, ATPase activity และ electron transport จากการศึกษา พวกเขาสนใจโปรตีน prohibitin ซึ่งหน้าที่ของโปรตีนนี้เกี่ยวข้องกับ cell cycle, apoptosis และ proliferation โดยโปรตีน prohibitin สามารถจับและมี

ปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน p53 ซึ่งจะทำให้เกิดความสามารถในการต้านไวรัสและความสามารถในการต้านมะเร็ง อย่างไรก็ตาม p53 และ caspase7 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis และเป็นโมเลกุล downstream ของ p53 ไม่พบใน 2-DE นี้เป็นผลมาจากปริมาณการส่งออกที่ต่ำของโปรตีนทั้ง 2 ตัวนี้และ sensitivity ที่ไม่มากพอของสียที่ใช้ย้อมเจล อย่างไรก็ตาม การแสดงออกในระดับ mRNA ของ prohibitin, p53 และ caspase7 สามารถพบได้เมื่อใช้เทคนิค RT-PCR เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองนี้ annexin V-FITC/PI assay แสดงให้เห็นว่าอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยคณะผู้วิจัยได้สรุปว่าอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาชักนำให้ prohibitin จับกับโปรตีน p53 และเหนี่ยวนำให้เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเกิดการตายแบบ apoptosis(62)

การแยกโปรตีนด้วย (2-Dimensional gel electrophoresis, 2-DE)

เทคนิค 2-DE เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีนก่อนที่จะมีการระบุเอกลักษณ์โปรตีนด้วย MS หลักการของเทคนิคคือการแยกโปรตีนใน 2 มิติตามคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยโปรตีนจะถูกแยกในมิติแรกตาม isoelectric points (pI) โดยใช้ isoelectric focusing (IEF) และจะแยกโปรตีนในมิติที่สองโดยใช้ sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งเป็นการแยกโปรตีนตามขนาดมวลโมเลกุล(60, 63) อย่างไรก็ตามโปรตีนที่มีปริมาณน้อยบ่อยครั้งที่จะไม่สามารถตรวจพบได้ 2-DE เพื่อแก้ปัญหานี้ เทคนิคที่จะช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนที่มีการแสดงออกน้อย และ sensitivity ของสียย้อมจึงเป็นสิ่งสำคัญ มีหลายวิธีที่จะเพิ่ม protein coverage(64, 65) ในระดับ subcellular compartment เช่น การทำ subcellular fractionation ไม่เพียงแต่จะเพิ่มปริมาณ low-abundant proteins แต่เทคนิคนี้ยังให้ข้อมูลเกี่ยวกับออร์แกเนลล์ที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งออร์แกเนลล์นี้จะถูกแยกตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพ (ความหนาแน่นและน้ำหนักโมเลกุล)(66) การย้อมสีเจลก็เป็นอีกขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญของเทคนิค 2-DE แม้ว่าจะมีสียย้อมหลายชนิด แต่ sensitivity และ compatibility กับ MS ก็ยังมีความแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 6(67, 68)

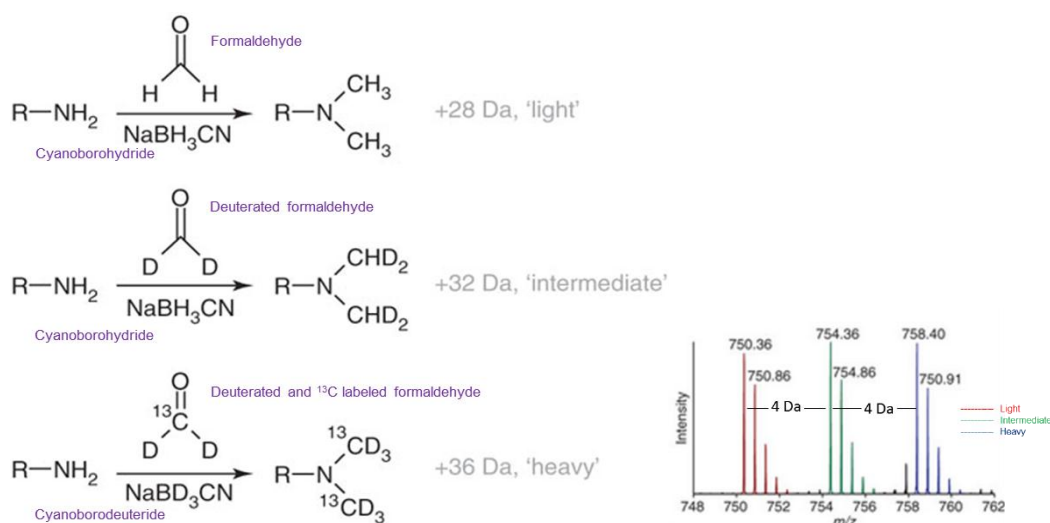
ตารางที่ 6 เปรียบเทียบลักษณะของสียย้อมโปรตีนในเจล (ดัดแปลงจาก François Chevalier)

	CCB	SN	SR	DP
Type of dye staining	Visible	Visible	Fluorescent	Fluorescent
Sensitivity	+	++	++	++
Compatibility with MS	+++	+	+++	++
Reproducibility	++	+	++	++
Cost	Cheap	Cheap	Expensive	expensive

*CCB = Colloidal coomassie blue, SN = Silver nitrate, SR = Sypro ruby and DP = Deep purple

การศึกษา Non-gel based Quantitative Proteomics

แม้ว่าเทคนิค 2-DE จะเป็นเทคนิคที่นิยมทำก่อนการวิเคราะห์ด้วย MS แต่เทคนิคนี้ก็มีข้อจำกัดอยู่หลายประการเช่น โปรตีนที่มีการแสดงออกน้อยและโปรตีนจำพวก hydrophobic จะไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิคนี้ อีกทั้งโปรตีนที่ได้จากการใช้เทคนิคนี้ ยังจำกัดแค่โปรตีนที่มีค่า pH 3-10 เท่านั้น ในขณะที่โปรตีนที่มีค่า pH สูงกว่าหรือต่ำกว่านี้ จะไม่สามารถพบได้ อีกทั้งในขั้นตอนการวิเคราะห์ภาพเจลแม้ว่าจะใช้โปรแกรมในการวิเคราะห์ แต่ก็จำเป็นต้องใช้คนในการแก้ไขเพิ่มเติมทำให้เกิดการผิดพลาดได้ นอกจากนี้จุดโปรตีนที่เห็นในเจลอาจจะได้มีแค่โปรตีนก็ได้ (69, 70) ดังนั้นการศึกษาโปรตีโอมแบบไม่ใช้เจลจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ดี และเนื่องจากว่าโปรตีนมีความซับซ้อนค่อนข้างสูง จึงจำเป็นที่จะต้องลดความซับซ้อนนี้ลงเพื่อให้โปรตีนที่มีการแสดงออกต่ำ สามารถถูกระบุเอกลักษณ์ได้ ซึ่งวิธีที่นิยมคือการทำ fractionation เช่น SCX และ HPLC นอกจากนี้การศึกษากการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนระหว่างตัวอย่างไปพร้อมๆ กัน เพื่อลดความผิดพลาดก็เป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน มีหลายเทคนิคที่ใช้ไอโซโทปของสารในการติดตามเพื่อหาปริมาณโปรตีนก่อนทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MS ได้แก่ metabolic labeling เช่น stable isotope labeling by amino acids in culture (SILAC) และ chemical labeling เช่น dimethyl labeling และ isobaric tag labeling (e.g. TMT and iTRAQ) ประโยชน์และข้อจำกัดของแต่ละเทคนิคได้แสดงในตารางที่ 7 โดยเทคนิค dimethyl labeling เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันมากวิธีหนึ่ง เนื่องจากมีขั้นตอนการทำที่ง่าย ราคาถูก และสามารถติดตามในสิ่งตัวอย่างได้มากถึง 3 สภาวะ โดยหลักการของเทคนิคนี้คือปฏิกิริยาการรีดิวซ์หมู่เอมีน โดยฟอร์มาดีไฮด์และไซยาโนโบโรไฮไดรด์จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนที่ปลายเอ็นเทอมีนอลและหมู่เอมีนของกรดอะมิโนไลซีนเกิดเป็นแซคัลดาร์เอมีนหรือไดเมทิล การใช้ไอโซโทปที่ต่างกันของฟอร์มาดีไฮด์และไซยาโนโบโรไฮไดรด์มาทำปฏิกิริยา จะทำให้ได้ผลึกที่มีมวลต่างกันดังแสดงในรูปที่ 1(71)



รูปที่ 1 ปฏิกิริยา Dimethyl labeling

ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบข้อดีและข้อด้อยการแต่ละเทคนิค labeling

	ข้อดี	ข้อด้อย
SILAC	สามารถติดตามไอโซโทปได้ทั้งในเซลล์ และในสิ่งมีชีวิต ไม่จำกัดปริมาณตัวอย่างที่จะใช้ติดตาม	ไม่เหมาะกับสิ่งตัวอย่างจากสิ่งมีชีวิต แพง เนื่องจากต้องเลี้ยงเซลล์จนกว่าไอโซโทปจะติดตามอย่างสมบูรณ์ กรดอะมิโน arginine ที่ถูกติดตาม อาจจะเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน proline
Dimethyl labeling	เป็นสารเคมีราคาถูก ปฏิกิริยาเกิดขึ้นเร็ว เหมาะสำหรับทุกตัวอย่าง (ตัวอย่างขึ้นเนื่องจากคน/สัตว์) สามารถติดตามตัวอย่างตั้งแต่ระดับไมโครกรัมจนถึงมิลลิกรัม	การติดตามสามารถทำได้เมื่อตัวอย่างถูกย่อยให้เป็นเปปไทด์แล้ว ไอโซโทปมีผลต่อ LC separation เล็กน้อย
iTRAQ	สามารถติดตามตัวอย่างได้มากถึง 10 ตัวอย่าง ไม่เพิ่มความซับซ้อนในระดับ MS เหมาะสำหรับทุกตัวอย่าง (ตัวอย่างขึ้นเนื่องจากคน/สัตว์)	การติดตามสามารถทำได้เมื่อตัวอย่างถูกย่อยให้เป็นเปปไทด์แล้ว น้ำยาเป็นสารเคมีจึงไม่ค่อยคงสภาพ น้ำยาราคาแพง ตัวเครื่องของเครื่อง MS ที่สามารถทำเทคนิคนี้ได้ค่อนข้างจำกัด เนื่องจากต้องสามารถวัดปริมาณ m/z ต่ำๆ ได้ การวัดปริมาณเปปไทด์ขึ้นอยู่กับการ single tandem mass spectrum

วิธีการดำเนินการวิจัย

ผลของอินเตอร์เฟียร์รอนแลมปต้า 3 ต่อ HBV-transfected HepG2.2.15 cells

การเลี้ยงเซลล์, trypsinization และการนับเซลล์

HepG2.2.15 cells เป็น HBV-transfected hepatoblastoma cell line เซลล์เหล่านี้จะมีจีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีทั้งจีโนมและจะแทรกตัวอยู่ในโครโมโซมของโฮสต์ เนื่องจากว่าเซลล์ชนิดนี้ช่วยให้ไวรัสตับอักเสบบีมีการเพิ่มจำนวนและหลั่ง HBsAg, HBeAg และ HBV DNA ออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ ดังนั้น HepG2.2.15 จึงถูกนำมาใช้เป็นโมเดลในการศึกษาไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง โดย HepG2.2.15 cell line นี้ได้รับความอนุเคราะห์มาจาก Professor Antonio Bertolotti (Singapore Institute for Clinical Sciences (A*Star) เซลล์เหล่านี้จะถูกเลี้ยงใน Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco) ที่มี 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Gibco), 1% MEM Non-Essential Amino Acid (MEM-NEAA; Gibco), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) และ Geneticin (G418; Gibco) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 150 µg/ml จากนั้นเซลล์จะถูกเลี้ยงให้เจริญเติบโตใน humidified incubator (Thermo SCIENTIFIC) ที่ 37°C และมี CO₂ 5% ในขั้นตอนการเก็บเซลล์ เซลล์เหล่านี้จะทำให้หลุดจากผิวเกาะโดยใช้ 0.25% trypsin-EDTA (Gibco) ขั้นตอนในการทำคือ นำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์และล้างด้วย Phosphate Buffered Saline (PBS; pH 7.4, SIGMA) เพื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ตกค้างออกก่อนที่จะทำการ trypsinization หลังจากใส่เอนไซม์และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 นาทีแล้ว อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS เป็นส่วนประกอบจะถูกใส่เข้าไปอย่างรวดเร็วเพื่อทำการหยุดปฏิกิริยา และตามด้วยการไปเปิดตู้ขึ้น-ลงหลายๆ ครั้งเพื่อลดการจับกลุ่มเป็นก้อนของเซลล์ จากนั้น cell suspension ปริมาตร 10 µl จะถูกนำมาเจือจางด้วย 90 µl ของ 0.4% trypan blue solution (SIGMA) และผสมให้เข้ากันเบาๆ ด้วยไปเปิดตู้ จากนั้นนำ solution นี้มาใส่ใน hemocytometer (BOECO) และทำการนับเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ microscope (OLYMPUS CH20)

การกระตุ้นเซลล์ด้วยความเข้มข้นต่างๆของอินเตอร์เฟียร์รอนแลมปต้าสาม

Recombinant IFN- λ 3 (25 µg) ซื้อมาจาก R&D Systems ในรูปแบบ lyophilized form โดยโปรตีนนี้จะละลายใน sterile PBS ที่มี 0.1% BSA เป็นองค์ประกอบ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 100 µg/ml และเก็บที่อุณหภูมิ -80°C จะกระทั้งนำออกมาใช้ HepG2.2.15 cells จำนวน 1 ล้านเซลล์จะถูกเลี้ยงในหลุมของ 6-well plate และเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 ml ในแต่ละหลุม และบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกนำออกและแทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ของอินเตอร์เฟียร์รอนแลมปต้า 3 ตั้งแต่ 0, 1, 10, 100 และ 1,000 ng/ml และทำการเลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง โดยที่เลือกระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นมาศึกษาเพราะว่าจากการศึกษาทางจุลศาสตร์ด้วยวิธี microarray พบว่าจำนวนและระดับการแสดงออกที่สูงที่สุดของยีนที่ตอบสนองต่ออินเตอร์เฟียร์รอนแลมปต้า 1

จะพบที่ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นยังเป็นระยะเวลาที่ใช้เพื่อผลของอินเตอร์เฟียร์รอนต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสหลายๆ ชนิดอีกด้วย

การสกัดและวัดปริมาณ RNA

TRIzol Reagent (Invitrogen) เป็นน้ำยาที่ใช้สกัด RNA โดยขั้นตอนในการสกัดได้ทำตามคู่มือที่ให้มา กับน้ำยา กล่าวคืออาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกนำออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์และ TRIzol Reagent ปริมาตร 1 ml จะใส่เข้าไปในแต่ละหลุมเลี้ยงเซลล์ จากนั้นผสมให้เข้ากันเพื่อทำการย่อยเซลล์และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อให้เซลล์ถูกย่อยโดยสมบูรณ์ จากนั้นจึงใส่ Bromochloropropane (BCP, MRC) ปริมาตร 100 μ l และเขย่า เพื่อทำให้เกิด phase separation โดย BCP นี้ถูกเอามาใช้แทน chloroform จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 $\times$ g เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C ชั้นของเหลวที่ไม่มีสีจะเป็นส่วนที่มี RNA จะถูกย้ายมายังหลอดทดลองอันใหม่ และตกตะกอน RNA ด้วย absolute isopropanol ร่วมกับการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาทีและปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 $\times$ g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C หลังจากนั้นตะกอน RNA จะถูกล้างด้วย 75% ethanol ร่วมกับการปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 $\times$ g เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อกำจัดเกลือออก ตะกอน RNA ที่แห้งแล้วจะถูกละลายด้วย RNase-free water และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 10 นาที ความเข้มข้นของ RNA จะถูกวัดปริมาณด้วยเครื่อง spectrophotometer (Nanodrop, Thermo SCIENTIFIC) และความบริสุทธิ์ของ RNA พิจารณาจากอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ต่อ 280 nm จากนั้น RNA จะถูกเก็บที่อุณหภูมิ -80°C จนกระทั่งนำออกมาใช้

การทำ Reverse transcription

การสังเคราะห์สาย complementary DNA (cDNA) สามารถทำได้โดยใช้ Reverse transcription reagents kit (Applied Biosystem) ปริมาณของ RNA จะถูกปรับเป็น 200 μ g ด้วย RNase-free water และ RNA นี้จะทำหน้าที่เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา reverse transcription การเตรียม master mix จะเตรียมตามคู่มือที่ให้มากับชุดน้ำยา ซึ่งได้เขียนอธิบายไว้ในส่วนของภาคผนวก สภาวะที่ใช้ในการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA คือ 25°C เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย 48°C เป็นเวลา 30 นาทีและ 95°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น cDNA จะเก็บที่อุณหภูมิ -20°C จนกระทั่งนำออกมาใช้

การทำ Relative qPCR

การดูการแสดงออกของยีน (relative gene expression) สามารถทำได้ด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้เครื่อง ABI Prism 7500 sequence detection system (Applied Biosystem) โปรแกรม primer express 3 (Applied Biosystem) เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการออกแบบ primers และ probe ดังแสดงในตารางที่ 8 ส่วนประกอบของ master mix ในปฏิกิริยานี้จะประกอบไปด้วย RNase-free water, 20 μ M ของ

forward primers, 20 μ M ของ reverse primers และ Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI) สำหรับ housekeeping gene 18s rRNA นั้น ส่วนประกอบของ master mix จะคล้ายกับ master mix ของ target genes แต่ว่าจะใช้ probe เพื่อติดตามการเพิ่มจำนวนของยีนแทนน้ำยา SYBR green dye โดยสถานะที่ใช้เพิ่มจำนวนของทั้ง target และ housekeeping genes คือ 1 cycle ของ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 40 cycles ของ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที และ 60°C เป็นเวลา 1 นาที การทำ Melting curve analysis จะทำในกรณีที่ปฏิกิริยานั้นๆ ใช้น้ำยา SYBR green เป็นตัวติดตามเพื่อให้แน่ใจว่า primer ที่ใช้มีความจำเพาะกับ target gene นั้นจริงๆ ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่เกิดจาก SYBR green หรือ probe ที่สูงเกินกว่าค่า threshold จะถูกวัดปริมาณเป็นค่า C_t value จากนั้นจะถูกแปลงมาเป็นค่า relative gene expression โดยคำนวณจากสูตร 2^{-ddCt} สถิติ student t -test และ One-way ANOVA จะถูกใช้เพื่อเปรียบเทียบค่า relative expression ของ target genes ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมปดา 3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยค่า p -values ที่น้อยกว่า 0.05 จะถือว่ามีความสำคัญ

ตารางที่ 8 Sequence ของ primers and probe

Primer	Sequence
PreS1	F: 5'-CCTGAGCCTGAGGGCTCCAC-3' R: 5'-CCTGAGCCTGAGGGCTCCAC-3'
pgRNA	F: 5'-CTCAATCTCGGGAACCTCAATGT-3' R: 5'-TGGATAAAACCTAGCAGGCATAAT-3'
OAS1	F: 5'-CCTCGTCCCAAGCATAGAC-3' R: 5'-CCTCGTCCCAAGCATAGAC-3'
Mx1	F: 5'-CCTTGCATGAGAGCAGTGATG-3' R: 5'-AGCCTCATCCGCCTAGTCAA-3'
ISG15	F: 5'-CCGCTCACTTGCTGCTTCA-3' R: 5'-TGGTGTGACATACCGGAAGA-3'
18s rRNA	F: 5'-GCCCCAAGCGTTTACTTTGA-3' R: 5'-TCCATTATTCCTAGCTGCGGTATC-3' Probe: 5'-FAM-AAAGCAGGCCCGAGCCGCC-TAMRA3'

การสกัด DNA

หลังจากที่ทำ trypsinization แล้ว เซลล์จะถูกล้าง 2 ครั้งด้วย PBS และเซลล์จะถูกปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 x g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น cellular DNA จะถูกสกัดโดยใช้ QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) และวิธีการสกัดจะทำตามคู่มือที่แนบมากับชุดสกัดนี้ กล่าวคือ ตะกอนเซลล์จะถูกละลายกลับด้วย PBS และเติม QIAGEN proteinase และ AL buffer หลังจาก vortex-mixing แล้วจะบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น absolute ethanol จะถูกเติมเข้าไปในส่วนผสมนี้ก่อนที่ส่วนผสมจะถูกย้ายไปใส่ใน QIAamp Spin columns และปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 x rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม Buffer AW1 เข้าไปในคอลัมน์และปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 x rpm เป็นเวลา 1 นาที ก่อนที่จะทำการชะล้าง DNA ออกจากคอลัมน์ นั้น Buffer AW2 จะถูกใส่เข้าไปในคอลัมน์และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 x rpm เป็นเวลา 3 นาที ก่อน และ nuclease-free water จะใช้เป็นตัวชะล้างเพื่อเอา DNA ออกจากคอลัมน์ จากนั้น DNA จะถูกเก็บที่อุณหภูมิ -20°C จนกระทั่งนำออกมาใช้

การทำ Absolute qPCR

การวัดปริมาณ HBV viral load สามารถทำได้โดยวิธี absolute quantitative real-time PCR โดยใช้เครื่อง ABI Prism 7500 sequence detection system (Applied Biosystem) อันดับแรก พลาสมิดที่มียีนของไวรัสตับอักเสบบี (preS1) จะถูกสกัดออกจาก *E. coli* transformants โดยใช้ GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) ปริมาณของพลาสมิดที่สกัดได้จะถูกวัดปริมาณด้วยเครื่อง spectrophotometer (Nanodrop, Thermo SCIENTIFIC) และความเข้มข้นของจากหน่วย ng/μl จะถูกแปลงมาเป็น copies/μl โดยคำนวณจากสูตรข้างล่างนี้

$$\text{Copies}/\mu\text{l} = \frac{6.02 \times 10^{23} \text{ (copy/mol)} \times \text{DNA amount (g}/\mu\text{l)}}{\text{DNA length (Plasmid size + inserted gene)(bp)} \times 660 \text{ (g/mol/bp)}}$$

หลังจากเปลี่ยนหน่วยแล้ว ความเข้มข้นของพลาสมิดจะถูกปรับและเจือจางลงให้อยู่ในช่วง 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 และ 10^2 copies/μl โดยความเข้มข้นเหล่านี้จะถูกใช้เพื่อสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน โดยทั้งพลาสมิดที่ทราบปริมาณเหล่านี้และตัวอย่างจะถูกเพิ่มปริมาณไปพร้อมๆ กันภายใต้สภาวะเดียวกันตามที่ได้อธิบายไว้แล้วในข้างต้น ความเข้มของแสงของฟลูออเรสเซนซ์ที่ปล่อยออกมาจาก SYBR Green ของทั้งตัวอย่างและพลาสมิดที่ทราบปริมาณจะถูกตรวจวัดเป็นค่า C_t value สำหรับพลาสมิดที่ทราบปริมาณนี้ จะนำค่า C_t value และค่าความเข้มข้นของพลาสมิดที่ทราบปริมาณมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน จากนั้นจะนำค่า C_t value ของตัวอย่างมาคำนวณเพื่อหาปริมาณเชื้อไวรัสตับอักเสบบี สถิติ Student *t*-test และ One-way ANOVA จะถูกนำมาใช้เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ viral load ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของอินเตอร์เฟียร์อนแลมปต้า 3 ค่า *p*-values ที่น้อยกว่า 0.05 จะถือว่ามีความสำคัญ

การทำ MTT assay

HepG2.2.15 cells จะถูกเลี้ยงในหลุมของ 96-well plate ที่ความหนาแน่น 1×10^4 cells ต่อหลุม และเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าจะถูกเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีปริมาณความเข้มข้นต่างๆ ของอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 3 (0, 1, 10, 100 และ 1,000 ng/ml) และทำการบ่มเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา MTT solution ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 10 μ l จะถูกใส่เข้าไปในแต่ละหลุมเลี้ยงเซลล์ร่วมกับการเขย่าเบาๆ เนื่องจากสารนี้มีสีความไวต่อแสง ดังนั้นขั้นตอนนี้จึงต้องทำในที่มืด เมื่อบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ที่ไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะเห็นว่าสีม่วงเกิดขึ้น โดยผลึกเหล่านี้จะถูกละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO, Riedel-deHaën) ร่วมกับการผสมหลายๆ ครั้งด้วยไปเปตต์ จากนั้นสารละลายนี้จะถูกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 3 ในแต่ละความเข้มข้นจะถูกเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับการกระตุ้น) และคำนวณออกมาเป็นค่า % cell viability

การกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดาสามและการสกัดแยกโปรตีนจากแต่ละออร์แกเนลล์

HepG2.2.15 cells จะถูกเลี้ยงในภาชนะ T-75 flask จำนวน 5×10^6 cells โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ complete DMEM และบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น อาหารเลี้ยงเซลล์เก่าจะถูกแทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 3 ที่มีความเข้มข้น 100 ng/ml ซึ่งเป็นการกระตุ้นที่เหมาะสม จากนั้นเซลล์จะถูก trypsinization เมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมงหลังได้รับอินเตอร์เฟียร์รอนแลมบ์ดา 3 ออร์แกเนลล์ของเซลล์จะถูกแยกและสกัดเป็นโปรตีนโดยใช้ Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (Thermo SCIENTIFIC) วิธีการทำได้ปฏิบัติตามคู่มือที่ให้มาให้กับชุดสกัด กล่าวคือ เซลล์จะถูกล้างด้วย ice-cold PBS และปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ $500 \times g$ เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำส่วนของเหลวทิ้งไป และตั้งให้ส่วนตะกอนเซลล์แห้ง จากนั้น ice-cold CEB ที่มี protease inhibitor จะถูกผสมเข้ากับตะกอนเซลล์ที่แห้ง และบ่มร่วมกับการเขย่าที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ส่วนของ supernatants จะเป็นส่วนของ cytoplasmic extract จะถูกนำมาใส่หลอดทดลองอันใหม่ หลังจากปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ $500 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น ice-cold MEB ที่มี protease inhibitor จะถูกเติมเข้าไปในตะกอนเซลล์จากขั้นตอนที่แล้ว และตามด้วย vortex-mixing ส่วนผสมนี้จะบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาทีร่วมกับการเขย่าเบาๆ ส่วนของ supernatants ซึ่งเป็น membrane extract จะได้หลังจากที่ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว $3,000 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น ice-cold NEB ที่มี protease inhibitor จะถูกเติมเข้าไปในตะกอนเซลล์ ตามด้วย high-speed vortex-mixing และบ่มร่วมกับการเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ส่วนผสมนี้จะถูกปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ $5,000 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น supernatants ซึ่งเป็นส่วนของ soluble nuclear extract จะถูกย้ายมาไว้ที่หลอดทดลองอันใหม่ ก่อนที่จะทำการสกัด chromatin-bound nuclear proteins บัฟเฟอร์ที่จะใช้ในการสกัดส่วนนี้ เตรียมโดยการเติม 100 mM CaCl_2 ร่วมกับ micrococcal nuclease 300 Units ผสมใน NEB ที่อุณหภูมิห้อง บัฟเฟอร์ที่เตรียมนี้เมื่อผสมกับ protease inhibitor จะถูกเติมเข้าไปในตะกอนเซลล์ตามด้วย vortex-mixing จากนั้น

บ่มรวมกับการเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ก่อนที่จะปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 16,000 x g เป็นเวลา 5 นาที ส่วนผสมเหล่านี้จะถูกผสมให้เข้ากันด้วย vortex ที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 15 วินาที supernatants ซึ่งเป็นส่วนที่มี chromatin-bound extract จะถูกนำไปรวมกับ soluble nuclear extract และเรียกส่วนผสมนี้ใหม่ว่า nuclear extract โปรตีนจากออร์แกเนลล์ต่างๆ ที่สกัดได้นี้จะถูกเก็บที่อุณหภูมิ -80°C จนกระทั่งนำออกมาใช้

การนำเกลี้ออก, การเพิ่มความเข้มข้นโปรตีน และการวัดปริมาณโปรตีน

เนื่องจากว่าบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากออร์แกเนลล์ต่างๆ นั้นมีปริมาณเกลี้ออกที่ค่อนข้างสูง ซึ่งเกลี้ออกอาจจะมีผลรบกวนต่อการทำการทดลองอื่นๆ เทคนิคที่นิยมใช้เพื่อเอาเกลี้ออกคือการทำไดอะไลซิส (dialysis) โดยใช้หลักการการแพร่กระจาย วิธีการทำได้ปฏิบัติตามคู่มือที่แนบมากับสินค้า กล่าวคือ ถุงเมมเบรน SnakeSkin Dialysis Tubing (3,500 MWCO, Thermo SCIENTIFIC) จะถูกทำให้เปียกชุ่มก่อน จากนั้นจะเอาคลิปปิดที่ปลายถุงด้านหนึ่ง และใส่โปรตีนตัวอย่างตรงปลายถุงอีกด้านหนึ่ง เมื่อใส่เสร็จแล้วจะปิดปากถุงโดยใช้คลิปปีกตัวหนึ่ง ถุงเมมเบรนที่มีโปรตีนตัวอย่างอยู่ภายในนี้จะถูกนำไปใส่ในภาชนะที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 2 ลิตรเพื่อใช้เป็นสารละลายในการนำเกลี้ออก จากนั้นจะทำการเอาเกลี้ออกที่อุณหภูมิ 4°C ร่วมกับการกวนสารอย่างต่อเนื่อง ก่อนที่จะทำการเอาเกลี้ออกข้ามคืน น้ำกลั่นจะถูกเปลี่ยนอย่างน้อย 3 ครั้ง หลังจากที่น่าเกลี้ออกแล้ว ปริมาตรของโปรตีนตัวอย่างจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากการรับน้ำเข้ามาในถุงเมมเบรนระหว่างกระบวนการนี้ ส่งผลให้ความเข้มข้นของโปรตีนเจือจาง ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน โปรตีนตัวอย่างเหล่านี้จึงนำมาใส่ใน Vivaspin (GE Healthcare) ซึ่งเป็น membrane ultrafiltration tubes จากนั้นใส่ไลซิสบัฟเฟอร์เพื่อละลายตะกอนโปรตีน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C จนกระทั่งปริมาตรของโปรตีนตัวอย่างน้อยกว่า 100 µl จากนั้นวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay โดยใช้ Bio-Rad Protein Assay Dye reagent Concentrate (BIO-RAD)

การทำ Western blot analysis

เพื่อเป็นการดูว่าโปรตีนที่สกัดได้จากออร์แกเนลล์ต่างๆ นั้นมีความบริสุทธิ์หรือไม่ สามารถทำได้ด้วยวิธี immunoblotting assay โดย GAPDH, CEACAM1 และ histone H1 จะถูกใช้เป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะที่ไซโตพลาสซึม, เมมเบรน และนิวเคลียส ตามลำดับ โดยทั้งไพรเมอร์และเซนคันดาร์แอนติบอดีซื้อมาจาก Abcam การเตรียมเจลทั้ง 12.5% separating และ 4% stacking SDS-PAGE นั้น ได้เตรียมตามที่อธิบายไว้ในภาคผนวก โปรตีนตัวอย่างประมาณ 50 µg ของแต่ละออร์แกเนลล์จะถูกโหลดลงเจล จากนั้นใช้ความต่างศักย์คงที่ 120 โวลต์ เป็นเวลา 75 นาทีเพื่อทำการแยกโปรตีน จากนั้นจะเคลื่อนย้ายโปรตีนจากเจลสู่ nitrocellulose membranes (BIO-RAD) ด้วยวิธี wet transfer โปรตีนบนเมมเบรนจะถูกย้อมด้วยสี Ponceau S dye (AppliChem) เพื่อดูว่าโปรตีนจากเจลมีการเคลื่อนย้ายมาบนเมมเบรนสมบูรณ์หรือไม่และล้างออกด้วยน้ำกลั่น เมมเบรนจะถูกบ่มด้วย 5% skim milk ใน TBST เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ร่วมกับการเขย่า จากนั้นล้างด้วย TBST จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาทีและบ่มด้วยไพรเมอร์แอนติบอดีที่

อัตราส่วนเหมาะสมใน 5% skim milk ที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำมคั้น หลังจากล้าง 2 ครั้งด้วย TBST ครั้งละ 15 นาที เมมเบรนจะถูกบ่มในเซคันดารีที่ติดฉลากด้วย HRP ด้วยอัตราส่วนที่เหมาะสม ใน 5% skim milk ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย TBST 15 นาที 2 ครั้ง ซับสเตรตที่ใช้เพื่อดูโปรตีนที่มีความจำเพาะในไซโตพลาสซึมและในเมมเบรนคือ DAB ในขณะที่ ECL จะใช้เพื่อการการแสดงผลของโปรตีนที่มีความจำเพาะในนิวเคลียส หลังจากเสร็จสิ้นขั้นตอนการล้าง เมมเบรนที่บ่มด้วย anti-GAPDH และ anti-CEACAM1 จะบ่มด้วย DAB working solution ซึ่งเตรียมโดยการผสม DAB substrate กับ 50X DAB chromogen (Abcam) เป็นเวลา 3 นาที สำหรับโปรตีน histone-H1 จะใช้ SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo SCIENTIFIC) โดยผสมกับ reagent 1 และ reagent 2 ด้วยอัตราส่วน 1:1 (vol:vol) เมมเบรนนี้จะบ่มกับ ECL working solution เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปดูการแสดงผลของโปรตีนโดยใช้เครื่อง Gel doc (BIO-RAD) สำหรับการทำให้ WB เพื่อยืนยันผลการศึกษาจากโปรตีน โอมิกส์จะใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน proteasome activator complex subunit 2 และทำให้เกิดภาพโดยใช้น้ำยา ECL

การทำ 2-Dimensional gel electrophoresis

ส่วนผสมปริมาตร 150 µl ซึ่งประกอบไปด้วย 200 µg ของโปรตีนตัวอย่าง, rehydration buffer, 1.5 mg ของ DTT และ IPG pH 4-7 จะถูกนำมาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 13,000 x g เป็นเวลา 3 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ก่อนที่จะนำส่วน supernatant มาบ่มกับ immobilized pH gradient (IPG) strips (length 7 cm, pH 4-7 linear, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) อย่างน้อย 12 ชั่วโมงเพื่อให้โปรตีนได้ถูกดูดซึมเข้าไปใน gel strip ก่อนขั้นตอน focusing การแยกโปรตีนในมิติแรกซึ่งก็คือ isoelectric focusing (IEF) จะใช้เครื่อง Ettan IPGphor3 (GE Healthcare) โดยมีโปรแกรมการทำงานดังนี้ constant current 50 µA per strip at 20°C, running program S1; Step 300V 200Vhr, S2; Gradient 1000V 300Vhr, S3 Gradient 5000V 4000Vhr and S4; Step 5000V 2000Vhr จากนั้น strips จะถูก equilibrated ด้วย SDS-equilibration buffer ที่มี 50 mg ของ Dithiothreitol (DTT) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจะ equilibrated ด้วยบัฟเฟอร์เดียวกันที่มี 125 mg Iodoacetamide (IAA) เป็นเวลา 15 นาที หลังจากขั้นตอน equilibration การแยกในมิติที่ 2 ซึ่งเป็นการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า โดยการนำ strip ที่ผ่านการ equilibrated แล้วมาวางบน 12.5% SDS-PAGE และใช้กระแสไฟคงที่ 20 mA ต่อเจลจนกระทั่ง bromophenol blue dye front เลื่อนลงไปจนสุดขอบเจล จากนั้นเจลจะถูกย้อมด้วยสียฟลูออเรสเซนต์ (Oriole fluorescent gel stain, BIO-RAD) และบ่มร่วมกับการเขย่าในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที หลังจากล้างด้วยน้ำกลั่น เจลจะถูกสแกนด้วยเครื่อง Geldoc (BIO-RAD)

การวิเคราะห์ Image analysis

หลังจากถ่ายภาพเจลภายใต้แสงยูวีแล้ว ภาพ 2-DE ของตัวอย่างทั้งหมดทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอินเตอร์เฟียร์รอนแลมปีดา 3 จะถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image Master Version 5 โดยจุดโปรตีนของ

แต่ละออร์แกนเนลล์ของทั้ง 2 กลุ่ม จะถูกจับคู่โดยอัตโนมัติและมีการแก้ไขเองบ้างเพื่อแก้ไขจุดโปรตีนที่ไม่เข้าคู่กันและจุดโปรตีนที่จับคู่ผิด โดยจุดที่จะใช้เป็นจุดอ้างอิงจะเลือกจากจุดที่มีจำนวนจุดโปรตีนมากที่สุด ความเข้มของจุดโปรตีนซึ่งเป็นตัวที่แสดงถึงระดับการแสดงออกของโปรตีนจะถูกทำให้เป็นมาตรฐานด้วยความเข้มรวมของจุดโปรตีนที่เข้าคู่กันทั้งหมดในเจลนั้นๆ โดยจุดโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกอย่างสอดคล้องกันมากกว่า 2 เท่าและมีค่า p -value น้อยกว่า 0.05 จะถูกนิยามว่าเป็นโปรตีนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจะถูกเลือกมาเพื่อทำการระบุเอกลักษณ์โดย MS ในลำดับต่อไป

การทำ In-gel digestion

จุดโปรตีนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ข้างต้น จะถูกตัดออกจากเจลภายใต้แสงยูวี โดยจุดที่ถูกตัดออกมานั้นจะถูกล้าง 3 ครั้งด้วย 25 mM NH_4HCO_3 /50% acetonitrile (ACN) จากนั้นจะถูกเอาน้ำออกด้วย 100% ACN และจะถูกทำให้แห้งด้วยเครื่อง centrifugal evaporator (Savant) เจลที่แห้งแล้วจะถูกรีดิวซ์ ด้วย 10 mM DTT ใน 25 mM NH_4HCO_3 ตามด้วยการบ่มที่ 56°C เป็นเวลา 45 นาที เจลที่ถูกรีดิวซ์แล้วจะถูกแอลคิเลทเป็นเวลา 30 นาทีด้วย 55 mM iodoacetamide ใน 25 mM NH_4HCO_3 ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด หลังจากเสร็จสิ้นขั้นตอนนี้ เจลจะถูกเอาน้ำออกอีกครั้งด้วย 100% ACN และทำให้เกิดการแห้งอย่างสมบูรณ์ด้วยเครื่อง centrifugal evaporator เจลที่แห้งนี้จะถูกเติมด้วยเอนไซม์ทริปซินที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Promega, Madison, WI, United States) ที่ละลายใน 25 mM NH_4HCO_3 และบ่มทิ้งไว้ในที่เย็นเป็นเวลา 60 นาทีเพื่อให้เอนไซม์ถูกดูดซึมเข้าไปในเจล จากนั้นเอนไซม์ทริปซินที่ไม่ถูกดูดซึมเข้าสู่เจลจะถูกนำออกและแทนที่ด้วย 25 mM NH_4HCO_3 ก่อนที่จะบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 14 ชั่วโมง หลังจากการครบเวลา ส่วนของ supernatant จะถูกย้ายไปใส่หลอดทดลองอันใหม่ส่วนเปปไทด์ที่ยังคงอยู่ในเจลจะถูกสกัดอีก 2 ครั้งด้วย 50% ACN/0.1% formic acid (FA) นำของเหลวที่สกัดได้ทั้งหมดซึ่งเป็น tryptic peptides มารวมกันก่อนที่จะทำให้แห้งด้วยเครื่อง centrifugal evaporator และเก็บที่อุณหภูมิ -20°C จนกระทั่งวิเคราะห์ผลโดย LC-ESI MS/MS analysis ในลำดับต่อไป

การทำ In-solution digestion

หลังจากเก็บเซลล์ HepG2.2.15 ทั้งกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มที่ได้รับอินเตอร์เฟียรอนแลมบ์ดา 3 แล้วเซลล์เหล่านี้จะถูกล้าง 2 ครั้งด้วย PBS และปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 1,500 x rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเซลล์จะถูกย่อยด้วย 5% sodium deoxycholate (SDC) ที่มี proteinase inhibitor ผสมอยู่ และเซลล์ที่ถูกย่อยนี้จะถูกทำให้แตกอย่างสมบูรณ์โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง โปรตีนที่ได้จะถูกวัดปริมาณโดยใช้ BCA assay kit โปรตีนประมาณ 200 μg จะถูกทำให้เจือจางด้วย 25 mM triethylammonium bicarbonate (TEAB) เพื่อให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 μl จากนั้นโปรตีนเหล่านี้จะถูกทำการรีดิวซ์และแอลคิเลทด้วย DTT และ IA ตามลำดับ จากนั้นโปรตีนจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินที่อุณหภูมิ 37°C ไม่เกิน 16 ชั่วโมง เนื่องจาก SDC สามารถรบกวนการทำงานของเครื่อง MS ดังนั้นจึงต้องมีการตกตะกอน SDC ออกจากโปรตีนตัวอย่างหลังจากย่อยโปรตีนเสร็จ ซึ่งทำได้โดยการเติม TFA เข้าไปในส่วนผสมของโปรตีนตัวอย่างที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน

แล้ว และบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ $15,000 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นส่วนที่เป็น supernatant จะถูกย้ายมาเก็บใส่หลอดทดลองอันใหม่ เปปไทด์ที่ได้นี้จะถูกนำมาวัดปริมาณโดยใช้วิธี fluorometric assay

การทำ In-solution dimethyl labeling

เปปไทด์ประมาณ 100 μg ของแต่ละตัวอย่างจะถูกทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง centrifugal evaporator จากนั้นเปปไทด์เหล่านี้จะถูกละลายด้วย 100 μl ของ 100 mM TEAB เปปไทด์ตัวอย่างของกลุ่มควบคุมจะถูกติดฉลากด้วย light labeling โดยการเติม 4% CH_2O และ 0.6 M $NaCNBH_3$ ในขณะที่ตัวอย่างของกลุ่มที่ได้รับอินเตอร์เฟียร์รอนแลมป์ดา 3 จะถูกติดฉลากด้วย heavy labeling โดยการเติม 4% $^{13}CD_2O$ และ 0.6 M $NaCHBD_3$ จากนั้นทำการบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ปฏิกิริยาจะสิ้นสุดลงเมื่อเติม 100% FA และ 1% Ammonia solution บนน้ำแข็ง และก่อนที่จะนำตัวอย่างที่ถูกติดฉลากด้วย light และ heavy labeling มารวมกัน ทั้ง 2 labeling จะถูกทดสอบ efficiency ในการติดฉลากก่อน จากนั้น labeling ทั้ง 2 จะถูกนำมาผสมรวมกันและทำให้แห้งด้วยเครื่อง centrifugal evaporator

การทำ fractionation

เปปไทด์ที่ติดฉลากและถูกทำให้แห้งแล้ว จะถูกละลายใน 0.1% TFA จากนั้นเปปไทด์นี้จะถูกแฟลกชันเนชัน โดยใช้ Pierce High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit ซึ่งวิธีการทำได้ปฏิบัติตามคู่มือที่ให้มากับชุด kit แต่มีการปรับ gradient ของ Acetonitrile และเพิ่มจำนวนแฟลกชันจาก 8 เป็น 10 แฟลกชัน

การระบุเอกลักษณ์โปรตีนด้วยเครื่อง LC-ESI-MS/MS สำหรับโปรตีนจาก 2-DE

เปปไทด์ที่ที่ถูกสกัดและทำให้แห้งจะถูกละลายด้วย 0.1% FA เพื่อให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 μl และสารละลายนี้จะถูกฉีดเข้าไปในคอลัมน์ ultra-performance liquid chromatography (UPLC) และจะถูกชะล้างออกมาด้วยเกรเดียนท์ 10-55% ของ 80% acetonitrile ใน HPLC water เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นตามด้วยขั้นตอนโฮลด์ที่ 90% ของ 80% acetonitrile ใน HPLC water เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 10% ของ organic solution เป็นเวลา 20 นาที จากนั้น เปปไทด์จะถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง micrOTOF-Q IITM ESI-Qq-TOF mass spectrometer (Bruker; Berman, Germany) ซึ่งต่อเข้ากับเครื่อง online nanoESI source โดย Bruker software จะถูกใช้เพื่อวิเคราะห์ MS/MS spectra และทำการสืบค้นโดยใช้ฐานข้อมูลของ SwissProt ด้วยโปรแกรม MASCOT search engine ในขั้นตอนการสืบค้นโปรตีนนี้จะใช้พารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ database, SwissProt; taxonomy, Homo sapiens; enzyme, trypsin; allowance of one missed cleavage; fixed modification, carbamidomethyl at cysteine residues; variable

modification, oxidation at methionine residues; peptide charges, 1+, 2+ and 3+ นอกจากนี้เปปไทด์และ MS/MS tolerance จะถูกตั้งค่าไว้ที่ 1.0 Da และ 0.6 Da ตามลำดับ ค่าคะแนนโปรตีนที่มากกว่า 32 จะถูกพิจารณาว่ามีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

การระบุเอกลักษณ์โปรตีนด้วยเครื่อง Orbitrap LC-MS/MS สำหรับโปรตีนที่ทำ In-solution digestion และการวิเคราะห์ quantitative data

ตัวอย่างโปรตีนจะถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง EASY-nLC1000 1100 system coupled to Q Exactive Orbitrap Plus mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA) ซึ่งต่อเข้ากับเครื่อง nano-electrospray ion source พีกของเปปไทด์ที่สูงเป็น 10 อันดับแรกจะถูกนำไปทำ MS2 ใน higher energy collision-induced dissociation cell โดยผลจาก MS ที่เป็น spectra จะถูกแปลงเป็นลำดับของเปปไทด์โดยใช้ 2 algorithms ที่แตกต่างกันคือ X! Tandem และ SEQUEST สำหรับข้อมูลจาก MS2 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการสืบค้นจะถูกตั้งค่าดังนี้ fixed modifications: carbamidomethylation of cysteine (+57.02146 Da) เช่นเดียวกับ light และ heavy dimethylation ที่ N-terminus และ lysine (+28.031300 และ +36.075670 Da) สำหรับ variable modifications พารามิเตอร์ที่ใช้ในการสืบค้นคือ oxidation of methionine (+15.99491 Da) นอกจากนี้ยังตั้งค่าที่ว่า 1 เปปไทด์สามารถมี modification ได้สูงสุด 4 modifications และมี missed cleavages เท่ากับ 2 โดย MS raw data files จะถูกสืบค้นโดยใช้ฐานข้อมูลที่มี forward และ reversed peptide sequences ของ Human ในฐานข้อมูล RefSeq Database โดยการสืบค้นเหล่านี้จะใช้โปรแกรม Proteome Discoverer

การใช้ชีวสารสนเทศ

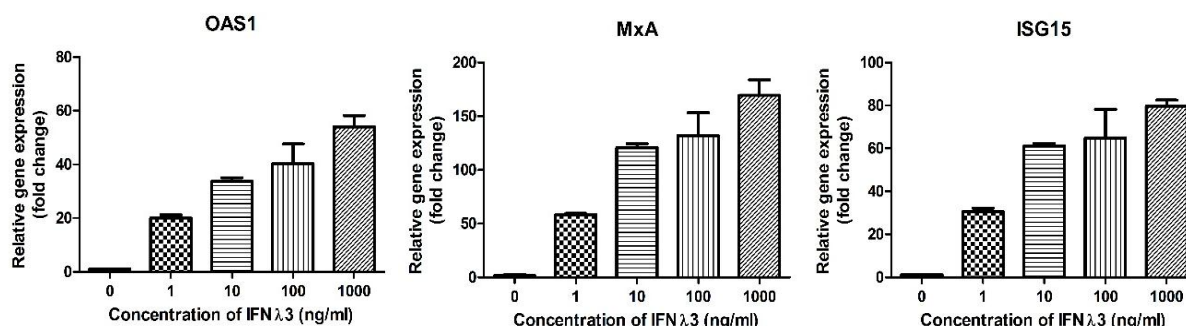
การหาปริมาณเปปไทด์โดยใช้พื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมสำหรับ heavy และ light precursors สามารถทำได้โดยใช้ Proteome Discoverer software ในขณะที่ซอฟต์แวร์ออนไลน์ Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, ver 6.7, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) จะใช้เพื่อจัดกลุ่มโปรตีนของเซลล์ HepG2.2.15 ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์รอนแลมปดา 3 เป็นกลุ่มหน้าที่ต่างๆ โดยในที่นี้จะจัดกลุ่มเป็น Biological Process (GOTERM_BP_ALL) สำหรับการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่มีการตอบสนองเมื่อได้รับอินเตอร์เฟียร์รอนแลมปดา 3 สามารถทำได้โดยใช้เครื่องมือออนไลน์ที่มีชื่อว่า STRING 9.0

ผลการทดลอง

ผลของอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ต่อเซลล์ HepG2.2.15

อินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ ISGs ในเซลล์ HepG2.2.15

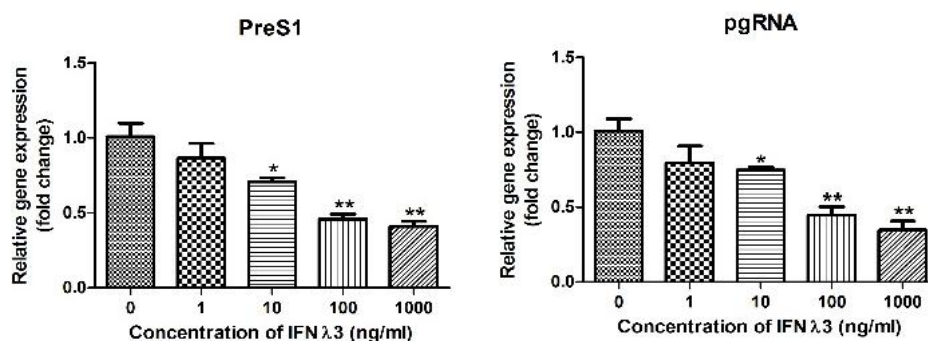
แม้ว่าจะมีการใช้ตัวรับสัญญาณที่ต่างกัน อินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดาสามารถส่งสัญญาณผ่านวิถีสัญญาณ Jak-STAT pathway ได้เช่นเดียวกับอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟา และเหนี่ยวนำให้เกิดรูปแบบการแสดงออกของ ISG ที่คล้ายกับยีนที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟา เพื่อสาธิตให้เห็นผลของอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ ISGs ในเซลล์ HepG2.2.15 ยีน OAS1, MxA และ ISG15 ถูกเลือกมาเพื่อตรวจสอบการแสดงออกหลังจากที่เซลล์ HepG2.2.15 ได้รับการกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 เมื่อเซลล์ HepG2.2.15 ได้รับอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง RNA ของเซลล์ HepG2.2.15 ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 จะถูกสกัดออกมา และการแสดงออกของยีนจะถูกประเมินด้วยการทำ relative qPCR โดยการแสดงออกของ ISGs ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 จะแสดงอยู่ในรูปที่ 2 เช่นเดียวกับอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟา การแสดงออกของยีน OAS1, MxA และ ISG15 มีการแสดงออกมากขึ้นในเซลล์ HepG2.2.15 ($p < 0.001$) เมื่อกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 โดยการแสดงออกที่มากขึ้นจะสัมพันธ์กับปริมาณความเข้มข้นของอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ที่สูงขึ้น



รูปที่ 2 การแสดงออกของ ISGs. การแสดงออกของยีน OAS1, MxA และ ISG15 ในเซลล์ HepG2.2.15 cells หลังได้รับอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยแสดงเป็น Mean $\pm$ SEM ทั้ง 3 ยีนมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ($p < 0.001$)

อินเตอร์เฟียร์อนแลมปต้า 3 ยับยั้งการแสดงออกของ HBV RNA และ RNA intermediate

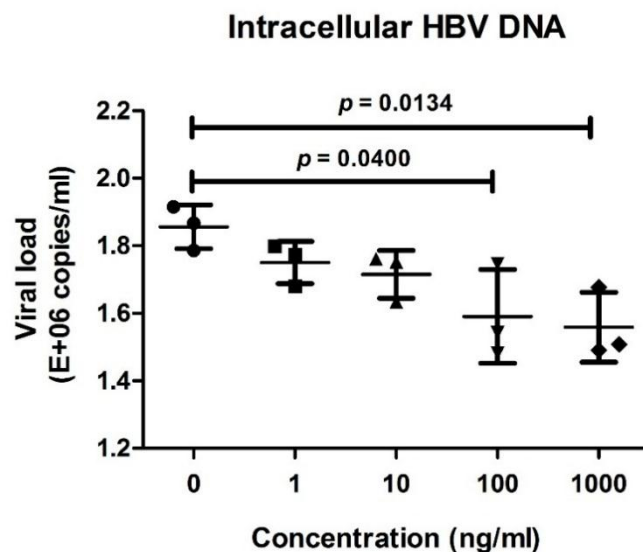
เพื่อดูว่าอินเตอร์เฟียร์อนแลมปต้า 3 สามารถยับยั้งการแสดงออกของ HBV transcript (pres1 gene) และ replicative intermediate (pgRNA) ได้หรือไม่ ดังนั้นระดับการแสดงออกของทั้ง 2 ยีนในเซลล์ HepG2.2.15 ที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมปต้า 3 ที่ความเข้มข้น 0, 1, 10, 100 และ 1,000 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะถูกวัดด้วยวิธี qPCR ดังแสดงในรูปที่ 3 อินเตอร์เฟียร์อนแลมปต้า 3 สามารถลดการแสดงออกของทั้ง HBV RNA และ pgRNA เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยการลดระดับของยีนทั้ง 2 ยีนนี้สัมพันธ์กับความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้นของอินเตอร์เฟียร์อนแลมปต้า 3



รูปที่ 3 ผลของอินเตอร์เฟียร์อนแลมปต้า 3 ต่อการแสดงออกของ HBV RNA และ RNA. เซลล์ HepG2.2.15 cells ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมปต้า 3 (1, 10, 100 and 1,000 ng/ml) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่า relative gene expression ของ PreS1 และ pgRNA แสดงในรูปของ Mean $\pm$ SEM

อินเตอร์เฟียร์อนแลมปต้า 3 ลดการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี

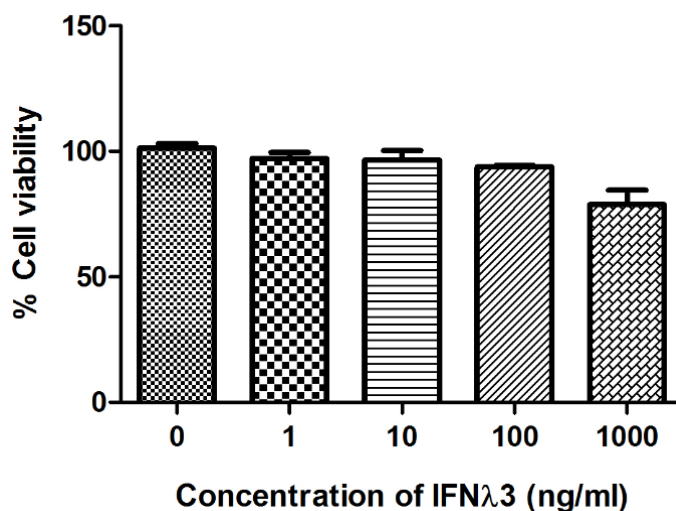
ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านไวรัสตับอักเสบบีของอินเตอร์เฟียร์อนแลมปต้า 3 โดยดูการลดลงของปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีที่อยู่ภายในเซลล์ เพื่อบรรลุวัตถุประสงค์นี้ จำนวนไวรัสที่รู้ปริมาณที่แน่นอนจะถูกนำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน โดยกราฟนี้สามารถตรวจพบไวรัสได้ตั้งแต่ $10^2 - 10^7$ copies/ μ l และพบว่ากราฟมาตรฐานนี้มีค่า $R^2 = 0.992237$ เซลล์ HepG2.2.15 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมปต้า 3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0, 1, 10, 100 และ 1,000 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเซลล์จะถูกเก็บและ cellular DNA จะถูกสกัดเพื่อทำ absolute qPCR ดังแสดงในรูปที่ 4 ปริมาณของไวรัสจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของอินเตอร์เฟียร์อนแลมปต้า 3 เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยปริมาณไวรัสที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญจะพบได้ในเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมปต้า 3 ที่ความเข้มข้น 100 ng/ml ($p = 0.04$) และ 1,000 ng/ml ($p = 0.0134$) ตามลำดับ



รูปที่ 4 การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีโดยอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3. หลังจากกระตุ้นเซลล์ HepG2.2.15 ด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 และปริมาณ HBV viral load จะถูกตรวจวัดด้วยวิธี absolute qPCR ปริมาณของไวรัสตับอักเสบบีหลังได้รับอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 จะแสดงในรูปของ Mean $\pm$ SEM โดย

ความเป็นพิษของอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ต่อเซลล์ HepG2.2.15

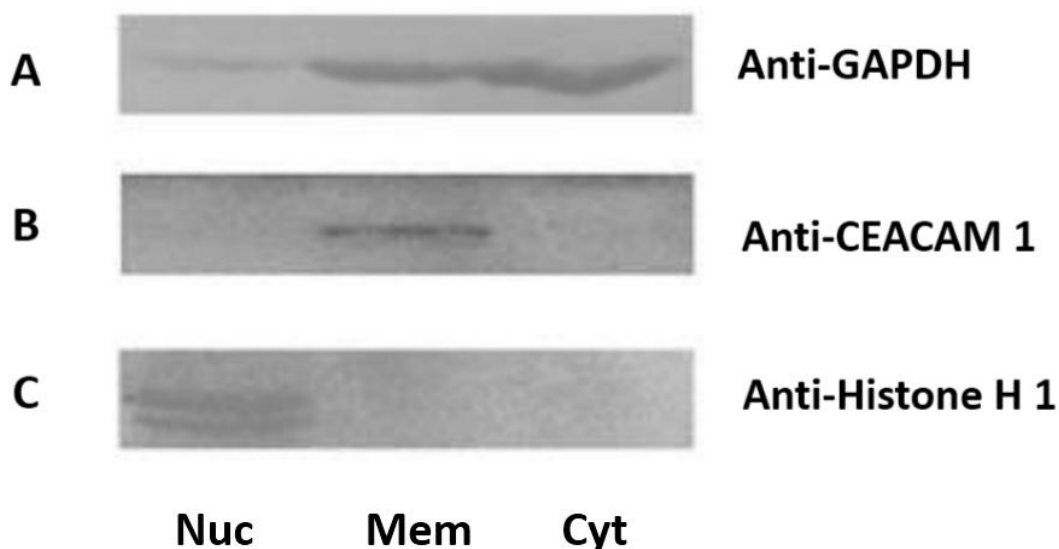
ก่อนจะทำการศึกษาการตอบสนองของโปรตีนในเซลล์ HepG2.2.15 ต่ออินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี ความเป็นพิษของยาชนิดนี้ต้องได้รับการตรวจสอบก่อน ดังนั้นการมีชีวิตรอดของเซลล์ HepG2.2.15 หลังจากได้รับอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ จะถูกวัดโดยวิธี MTT assay โดยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอดได้แสดงในรูปที่ 5 จากกราฟแสดงให้เห็นว่าปริมาณที่สูงขึ้นของอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ทำให้เกิดการตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้น ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นสูงสุดของยาที่ใช้ในการทดลองนี้พบว่า เซลล์ HepG2.2.15 ที่มีชีวิตรอดจะลดลงจาก 100% เหลือเพียง 84% ในขณะที่ความเข้มข้นของยาที่ 100 ng/ml หรือน้อยกว่านี้จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์เพียงเล็กน้อย (เซลล์ที่มีชีวิตรอด > 94%) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นของอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ที่ความเข้มข้น 100 ng/ml เพื่อศึกษาผลของยาต่อการตอบสนองของเซลล์ เนื่องจากความเข้มข้นนี้แสดงให้เห็นว่ามีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของ HBV RNA และการเพิ่มจำนวนของไวรัสอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2.2.15 เพียงเล็กน้อย



รูปที่ 5 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3. การมีชีวิตของเซลล์ HepG2.2.15 หลังจากได้รับอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 จะถูกทดสอบด้วยวิธี MTT assay เปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตจะแสดงในรูปของ Mean $\pm$ SEM

วิธีที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากออร์แกเนลล์ต่างๆ ให้ผลที่บริสุทธิ์

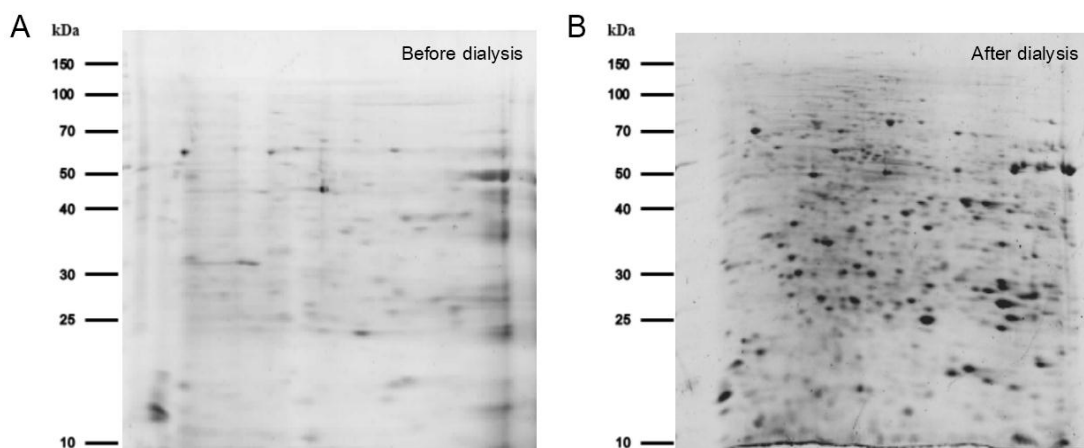
การแยกโปรตีนจากออร์แกเนลล์ต่างๆ นี้ทำเพื่อลดความซับซ้อนของโปรตีนและเป็นการเพิ่มโปรตีนที่มีการแสดงออกน้อยให้มีปริมาณที่เพิ่มขึ้น หลังจากที่ได้รับอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 แก่เซลล์ HepG2.2.15 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์เหล่านี้จะถูกสกัดเพื่อแยกเป็นโปรตีนจากไซโตพลาสซึม, เมมเบรน และนิวเคลียส โดยความบริสุทธิ์ของโปรตีนในแต่ละออร์แกเนลล์จะถูกตรวจสอบด้วยวิธี western blotting โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีนที่มีความจำเพาะกับออร์แกเนลล์นั้นๆ ซึ่งได้แก่ GAPDH, CEACAM1 และ histone H1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเพาะในไซโตพลาสซึม, เมมเบรน และนิวเคลียส ตามลำดับ ผลจากการทำ western blotting ดังแสดงในรูปที่ 6 โดย GAPDH สามารถพบได้ทั้ง 3 ออร์แกเนลล์โดยพบในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยพบในปริมาณมาก, ปานกลาง และเล็กน้อยในออร์แกเนลล์ที่เป็นไซโตพลาสซึม, เมมเบรน และนิวเคลียส ตามลำดับ ในขณะที่ CEACAM 1 จะพบแค่ในเมมเบรนเท่านั้น และ histone H1 จะพบในนิวเคลียสเท่านั้น จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากออร์แกเนลล์ต่างๆ ให้ผลที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้พบว่า GAPDH ไม่ใช่โปรตีนที่จำเพาะต่อไซโตพลาสซึมเพียงอย่างเดียวเท่านั้น



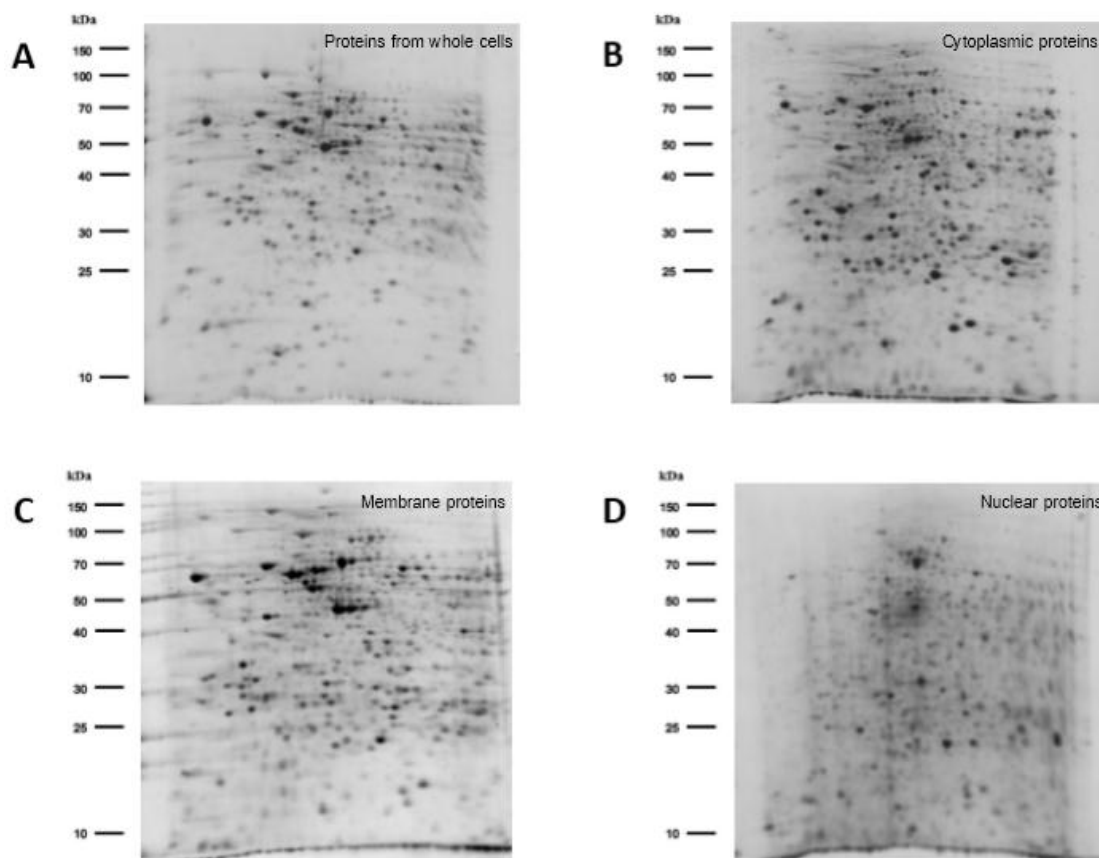
รูปที่ 6 ความบริสุทธิ์ของโปรตีนจากทั้ง 3 ออร์แกเนลล์. โปรตีนจากทั้ง 3 ออร์แกเนลล์นี้ถูกบ่มด้วย anti-GAPDH (A), anti-CEACAM1(B), และ anti-histone H1 (C). Nuc, Mem และ Cyt คือ nuclear, membrane และ cytoplasmic fraction, ตามลำดับ

การหาสถานะที่เหมาะสมในการทำ 2-DE

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเซลล์ HepG2.2.15 ที่ตอบสนองต่ออินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 โปรตีนในแต่ละออร์แกเนลล์ทั้งจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 จะถูกนำมาแยกโปรตีนด้วยวิธี 2-DE จากนั้นย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจพบโปรตีนที่มีการแสดงออกน้อย จากรูปที่ 7A พบว่ามี horizontal streaks และ จุดโปรตีนบนเจลมีลักษณะที่ไม่คมชัด ผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่าลักษณะเหล่านี้น่าจะเป็นผลมาจากการปนเปื้อนของเกลียวที่อยู่ในบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากออร์แกเนลล์ต่างๆ โดยเกลียวสามารถรบกวนการโฟกัสซึ่งในการแยกโปรตีนในมิติแรกได้ โดยจะไปเพิ่มความร้อนและการเหนี่ยวนำไฟฟ้าให้สูงขึ้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงเอาออร์แกเนลล์โปรตีนเหล่านี้ไปผ่านกระบวนการนำเกลียวออก จากนั้นนำโปรตีนเหล่านี้มาทำ 2-DE อีกครั้งดังแสดงในรูปที่ 7B จะเห็นได้ว่า horizontal streaks ได้หายไปและ จุดโปรตีนบนเจลมีความคมชัดมากขึ้น นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบเจล 2-DE ของโปรตีนที่ได้จากทั้งเซลล์กับโปรตีนที่ได้จากออร์แกเนลล์ต่างๆ ของเซลล์ แม้ว่ารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนจากทั้ง 2 กลุ่มดูเหมือนจะคล้ายกัน แต่จำนวนและปริมาณของจุดโปรตีนนั้นแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 8 A-D) ซึ่งให้เห็นว่าการศึกษากลไกการตอบสนองในระดับอนุ โดยโปรตีนจากออร์แกเนลล์ของเซลล์อาจจะให้ข้อมูลที่มากกว่าการศึกษาจากโปรตีนที่มาจากทั้งเซลล์ก็เป็นได้



รูปที่ 7 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ 2-DE. (A) ตัวอย่างโปรตีนเมื่อทำ 2-DE และย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ จากภาพจะเห็นว่ามี horizontal streaks และจุดโปรตีนไม่ชัดเจน (B) ตัวอย่างโปรตีนที่ถูกนำเกลือออก ก่อนทำ 2-DE พบว่า horizontal streaks หายไป และจุดโปรตีนค่อนข้างคมชัด



รูปที่ 8 เปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนระหว่างโปรตีนทั้งเซลล์และโปรตีนจากออร์แกเนลล์ต่างๆ. ภาพ 2-DE ของโปรตีนจากทั้งเซลล์, โปรตีนจากไซโทพลาสซึม, โปรตีนจากเมมเบรน และโปรตีนจากนิวเคลียส ได้แสดงอยู่ในรูป A, B, C และ D ตามลำดับ จำนวนและปริมาณโปรตีนในแต่ละจุดจะแตกต่างกันระหว่างโปรตีนจากทั้งเซลล์และโปรตีนจากออร์แกเนลล์ต่างๆ

การทำ 2-DE และ การวิเคราะห์ MS ของโปรตีนที่ตอบสนองต่ออินเตอร์เฟียรอนแลมปดา 3 ในเซลล์ HepG2.2.15

หลังจากที่ทำการสกัดแยกโปรตีนจากออร์แกเนลล์ต่างๆ โปรตีนจากทั้ง 3 ออร์แกเนลล์ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอินเตอร์เฟียรอนแลมปดา 3 จะถูกเอาเกลือออก จากนั้นโปรตีนจะถูกแยกตามค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธี 2-DE และเจลจะถูกย้อมด้วยสียฟลูออเรสเซนต์ และถ่ายภาพด้วยแสงยูวี การทดลองนี้เป็นการทดลองที่ทำ 3 ซ้ำเพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในแต่ละออร์แกเนลล์ของเซลล์ HepG2.2.15 ที่ได้รับหรือไม่ได้รับอินเตอร์เฟียรอนแลมปดา 3 จากนั้นทำการวิเคราะห์รูปภาพ โดยจำนวนจุดโปรตีนที่เข้ากันได้ และโปรตีนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอินเตอร์เฟียรอนแลมปดา 3 ในแต่ละออร์แกเนลล์ได้แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 จำนวนจุดโปรตีนจากการวิเคราะห์ภาพทั้งกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับอินเตอร์เฟียรอนแลมปดา 3

Spot	Cytoplasmic protein		Membrane protein		Nuclear protein	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
Total	508 ± 56	455 ± 33	316 ± 16	438 ± 23	359 ± 11	562 ± 58
Differential		24		35		40

การศึกษาโปรตีนในไซโตพลาสซึมของเซลล์ HepG2.2.15 ก่อนและหลังได้รับอินเตอร์เฟียรอนแลมปดา 3

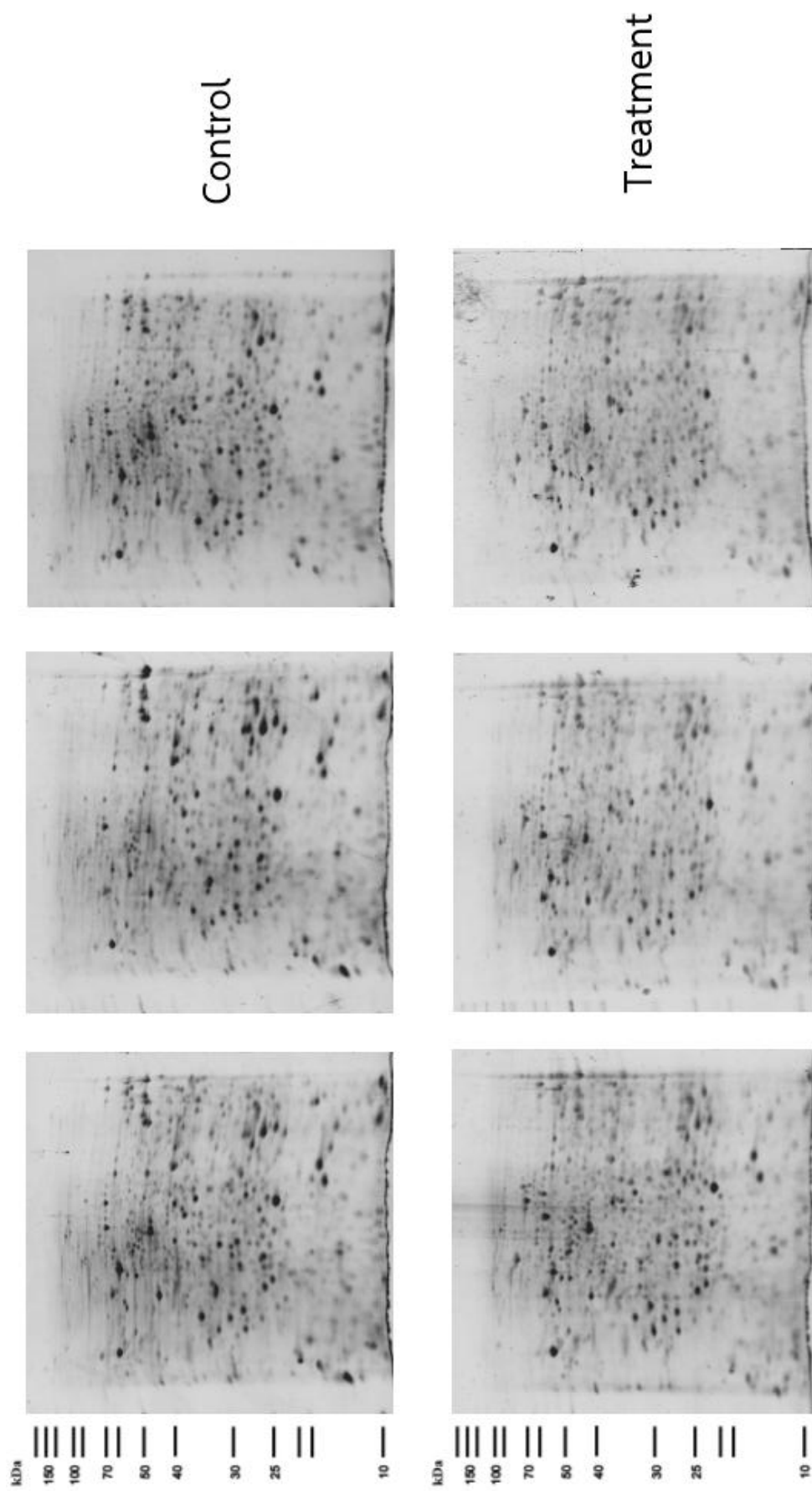
เจล 2-DE ของโปรตีนในไซโตพลาสซึมทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอินเตอร์เฟียรอนแลมปดา 3 แสดงในรูปที่ 9 หลังจากทำการวิเคราะห์รูปเจล พบว่ามี 24 จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} < 0.05$ และ $\pm 2\text{-fold changes}$) ในจำนวนนี้มี 14 โปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น และ 10 โปรตีนมีการแสดงออกลดลง โปรตีนเหล่านี้จะถูกลำดับด้วยเอนไซม์ทริปซินและระบุเอกลักษณ์ด้วย MS โดยพบว่ามี 14 โปรตีน (9 โปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น และ 5 โปรตีนที่มีการแสดงออกลดลง) ที่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้ดังแสดงในรูปที่ 10, ตารางที่ 10 และตารางที่ 11

การศึกษาโปรตีนในเมมเบรนของเซลล์ HepG2.2.15 ก่อนและหลังได้รับอินเตอร์เฟียรอนแลมปดา 3

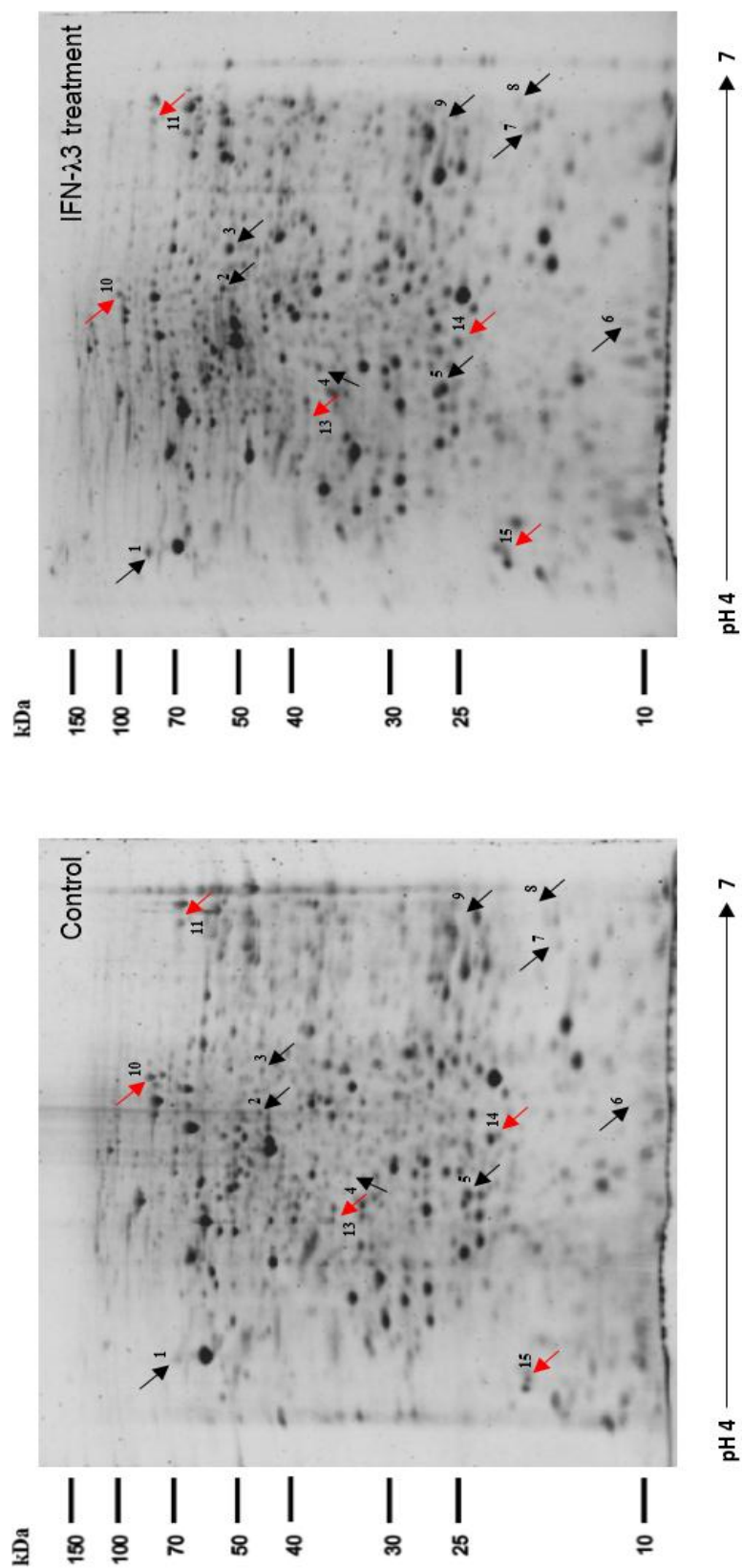
เจล 2-DE ของโปรตีนในเมมเบรนทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอินเตอร์เฟียรอนแลมปดา 3 แสดงในรูปที่ 11 โดยผลจาก Image Master Program แสดงให้เห็นว่ามี 23 จุดโปรตีนและ 12 จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นและลดลงอย่างมีนัยสำคัญมากกว่าหรือเท่ากับ 2 เท่าหลังได้รับอินเตอร์เฟียรอนแลมปดา 3 โดย จุดโปรตีนเหล่านี้จะถูกระบุเอกลักษณ์โดย MS พบว่ามี 25 จุดโปรตีนจาก 35 จุดโปรตีนที่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้ ดังแสดงในรูปที่ 12, ตารางที่ 12 และตารางที่ 13

การศึกษาโปรตีนในนิวเคลียสของเซลล์ HepG2.2.15 ก่อนและหลังได้รับอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3

เจล 2-DE ของโปรตีนในนิวเคลียสทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 แสดงในรูปที่ 13 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่ามี 28 จุดโปรตีนและ 12 จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลงตามลำดับ และเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดในเซลล์ HepG2.2.15 ที่ได้รับอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 โดยจุดโปรตีนเหล่านี้จะถูกระบุเอกลักษณ์โดย MS ซึ่งผล MS แสดงให้เห็นว่ามีจุดโปรตีนทั้งหมด 29 จุดที่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้ โดยในจำนวนนี้มี 18 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น และ 11 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 14, ตารางที่ 14 และตารางที่ 15



รูปที่ 9 2-DE เจลของโปรตีนในไซโตพลาสซึมของเซลล์HepG2.2.15 ของกลุ่มควบคุม (แถวบน) และกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย อินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3



รูปที่ 10 จุดโปรตีนในไซโตพลาสซึมที่ถูกกระตุ้นด้วย IFN- γ 3 ได้. จากภาพแสดงให้เห็นว่ามี 14 จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญและสามารถระบุเอกลักษณ์ได้ ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นโดย IFN- γ 3 ซึ่งมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลงตามลำดับ

ตารางที่ 10 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในไซโตพลาสซึม

Spot ID	Relative intensity (Mean $\pm$ SD)		p-value	Ratio after treatment
	Untreatment	Treatment		
1	0.099 $\pm$ 0.007	0.227 $\pm$ 0.022	0.0010	$\uparrow$ 2.29
2	0.064 $\pm$ 0.005	0.178 $\pm$ 0.018	0.0101	$\uparrow$ 2.80
3	0.143 $\pm$ 0.030	0.345 $\pm$ 0.031	0.0187	$\uparrow$ 2.41
4	0.087 $\pm$ 0.010	0.181 $\pm$ 0.042	0.0386	$\uparrow$ 2.08
5	0.300 $\pm$ 0.048	0.648 $\pm$ 0.055	0.0042	$\uparrow$ 2.16
6	N/A	0.267 $\pm$ 0.165	0.0063	$\uparrow$ (Dev/0)
7	N/A	0.189 $\pm$ 0.048	0.0013	$\uparrow$ (Dev/0)
8	N/A	0.146 $\pm$ 0.070	0.0004	$\uparrow$ (Dev/0)
9	N/A	0.118 $\pm$ 0.019	0.0016	$\uparrow$ (Dev/0)
10	0.199 $\pm$ 0.051	0.084 $\pm$ 0.018	0.0351	$\downarrow$ 2.38
11	0.177 $\pm$ 0.027	0.070 $\pm$ 0.024	0.0133	$\downarrow$ 2.51
13	0.102 $\pm$ 0.030	N/A	0.0278	$\downarrow$ (0*)
14	0.113 $\pm$ 0.024	N/A	0.0149	$\downarrow$ (0*)
15	0.250 $\pm$ 0.026	N/A	0.0035	$\downarrow$ (0*)

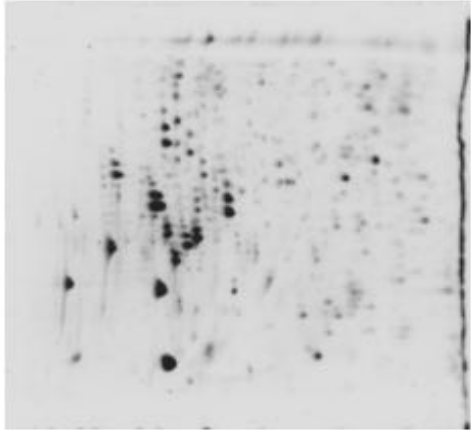
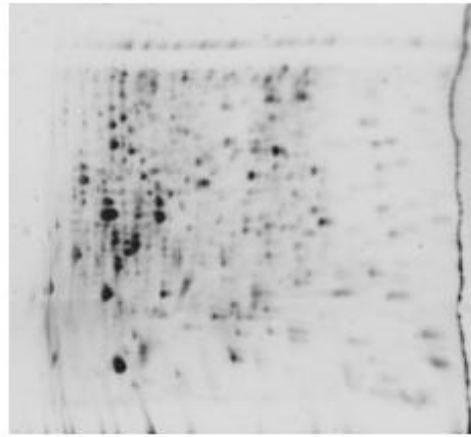
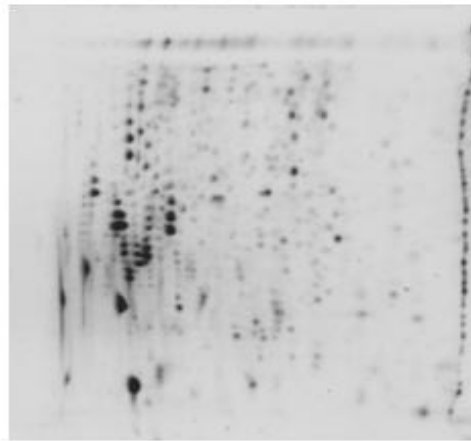
N/A แสดงถึงไม่มีค่าเนื่องจากจุดโปรตีนไม่สามารถตรวจพบได้ Dev/0 หมายถึง จุดโปรตีนที่ตรวจพบได้หลังจากได้รับอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 และ 0* หมายถึง จุดโปรตีนที่ตรวจไม่พบหลังได้รับอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3

ตารางที่ 11 โปรตีนในไซโตพลาสซึมที่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้

Spot ID	Protein name	Code	Score	Cal. Mw	Cal. pI	Biological function(s)
1	Nuclear autoantigenic sperm protein	P49321	53	85471	4.26	DNA metabolic process, DNA replication
2	Protein NDRG1	Q92597	83	43264	5.49	Leukocyte activation
3	Tubulin beta chain	P07437	227	50095	4.78	Protein polymerization
4	Tubulin beta chain	P07437	231	50095	4.78	Protein polymerization
5	Lactoylglutathione lyase	Q04760	104	20992	5.12	Regulation of apoptosis, metabolic process
6	Triosephosphate isomerase	P60174	45	31057	5.65	Glucose metabolic process
7	Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142	115	71082	5.37	Protein folding
8	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	P40925	44	36631	6.91	Glucose metabolic process,
9	Triosephosphate isomerase	P60174	84	31057	5.65	Glucose metabolic process
10	Stress-70 protein, mitochondrial	P38646	388	73920	5.87	Protein folding,
11	Stress-induced-phosphoprotein 1	P31948	178	63227	6.40	Heat shock chaperonin-binding
13	Elongation factor 1-delta	P29692	90	31217	4.90	Translation
14	Peroxiredoxin-2	P32119	113	22049	5.66	Response to reactive oxygen species
15	Prostaglandin E synthase 3	Q15185	59	18971	4.35	Fatty acid metabolic process

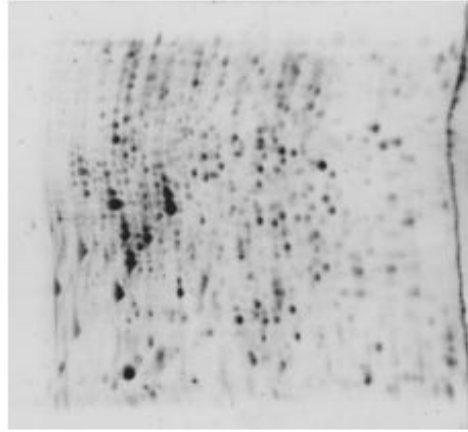
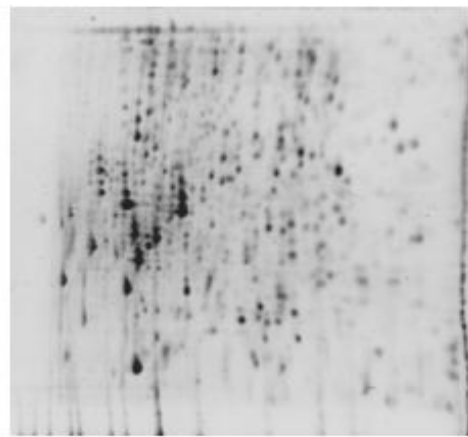
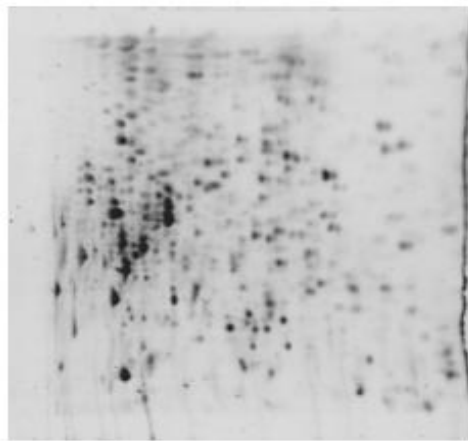
Cal. refers to calculated.

kDa
150
100
70
50
40
30
25
10



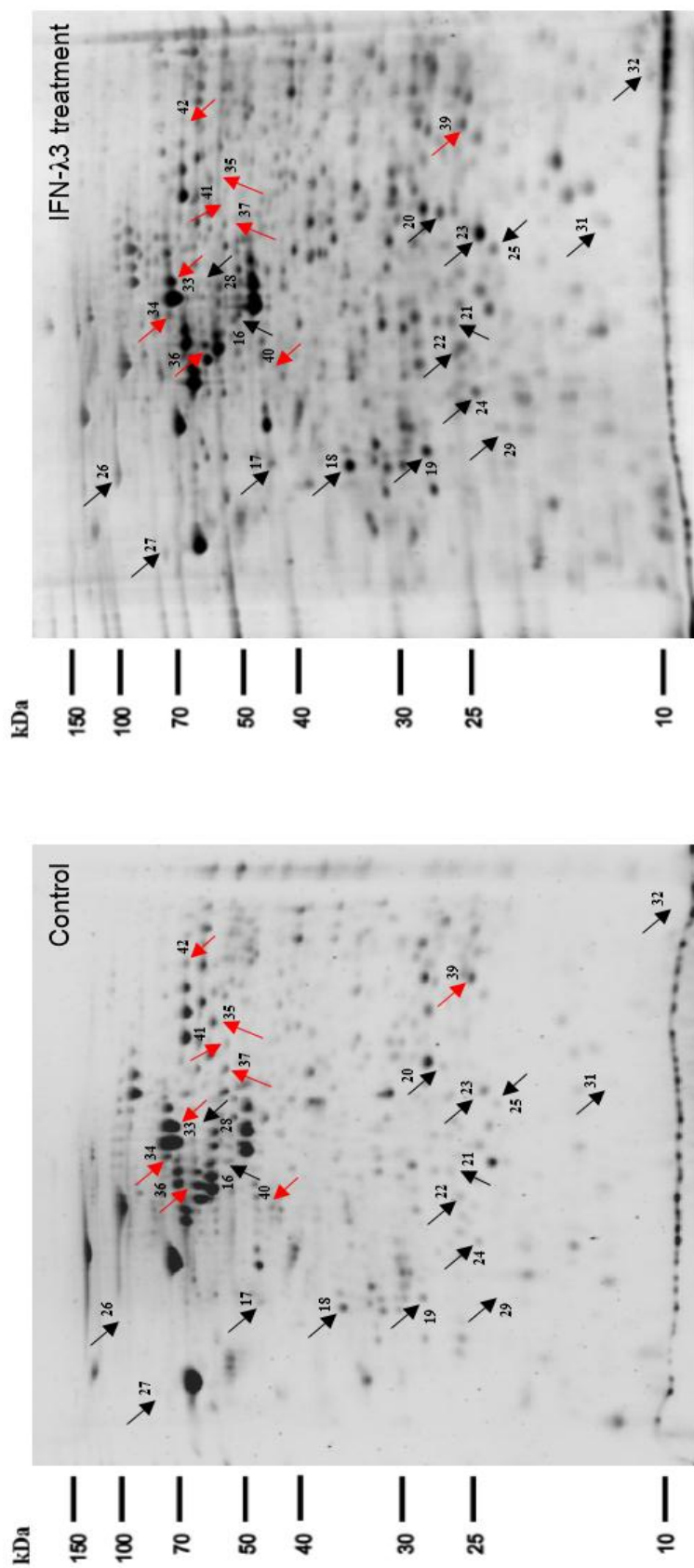
Control

kDa
150
100
70
50
40
30
25
10



Treatment

รูปที่ 11 2-DE เจลของโปรตีนในเมมเบรน. 2-DE เจลของโปรตีนในเมมเบรนของเซลล์-HepG2.2.15 ของกลุ่มควบคุม (แถวบน) และกลุ่มที่ถูกรกระตุ้นด้วย อินเตอร์เฟียร์อนแลมปดา 3



รูปที่ 12 จุดโปรตีนในเมมเบรนที่ถูกระบุเอกลักษณ์ได้. จากรูปแสดงให้เห็นว่ามี 25 จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญและสามารถระบุเอกลักษณ์ได้ ลูกศรสีดำและลูกศรสีแดง หมายถึงโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลงตามลำดับ

ตารางที่ 12 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในเมมเบรน

Spot ID	Relative intensity (Mean $\pm$ SD)		p-value	Ratio after treatment
	Untreatment	Treatment		
16	0.128 $\pm$ 0.040	0.321 $\pm$ 0.018	0.0451	$\uparrow$ 2.51
17	0.097 $\pm$ 0.026	0.222 $\pm$ 0.030	0.0267	$\uparrow$ 2.29
18	0.341 $\pm$ 0.008	0.703 $\pm$ 0.029	0.0027	$\uparrow$ 2.06
19	0.185 $\pm$ 0.036	0.438 $\pm$ 0.067	0.0383	$\uparrow$ 2.37
20	0.101 $\pm$ 0.012	0.291 $\pm$ 0.057	0.0271	$\uparrow$ 2.88
21	0.075 $\pm$ 0.025	0.173 $\pm$ 0.031	0.0103	$\uparrow$ 2.29
22	0.107 $\pm$ 0.067	0.402 $\pm$ 0.064	0.0444	$\uparrow$ 3.75
23	0.343 $\pm$ 0.067	0.843 $\pm$ 0.123	0.0456	$\uparrow$ 2.46
24	0.127 $\pm$ 0.023	0.256 $\pm$ 0.022	0.0391	$\uparrow$ 2.02
25	0.060 $\pm$ 0.022	0.158 $\pm$ 0.039	0.0172	$\uparrow$ 2.62
26	N/A	0.627 $\pm$ 0.121	0.0121	$\uparrow$ (Dev/0)
27	N/A	0.110 $\pm$ 0.033	0.0281	$\uparrow$ (Dev/0)
28	N/A	0.115 $\pm$ 0.042	0.0421	$\uparrow$ (Dev/0)
29	N/A	0.131 $\pm$ 0.020	0.0077	$\uparrow$ (Dev/0)
31	N/A	0.162 $\pm$ 0.063	0.0464	$\uparrow$ (Dev/0)
32	N/A	0.221 $\pm$ 0.084	0.0452	$\uparrow$ (Dev/0)
33	2.279 $\pm$ 0.549	0.906 $\pm$ 0.161	0.0464	$\downarrow$ 2.52
34	0.421 $\pm$ 0.101	0.090 $\pm$ 0.034	0.0254	$\downarrow$ 4.66
35	0.310 $\pm$ 0.043	0.123 $\pm$ 0.008	0.0032	$\downarrow$ 2.53
36	0.833 $\pm$ 0.238	0.268 $\pm$ 0.045	0.0433	$\downarrow$ 3.11
37	0.256 $\pm$ 0.021	0.119 $\pm$ 0.013	0.0169	$\downarrow$ 2.15
39	0.574 $\pm$ 0.134	0.258 $\pm$ 0.075	0.0164	$\downarrow$ 2.22
40	0.134 $\pm$ 0.041	N/A	0.0073	$\downarrow$ (0*)
41	0.106 $\pm$ 0.027	N/A	0.0095	$\downarrow$ (0*)
42	0.117 $\pm$ 0.029	N/A	0.0092	$\downarrow$ (0*)

N/A แสดงถึงไม่มีค่าเนื่องจากจุดโปรตีนไม่สามารถตรวจพบได้ Dev/0 หมายถึง จุดโปรตีนที่ตรวจพบได้หลังจากได้รับอินเตอร์เฟียร์ออนแลมป์ดา 3 และ 0* หมายถึง จุดโปรตีนที่ตรวจไม่พบหลังได้รับอินเตอร์เฟียร์ออนแลมป์ดา 3

ตารางที่ 13 โปรตีนในเมมเบรนที่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้

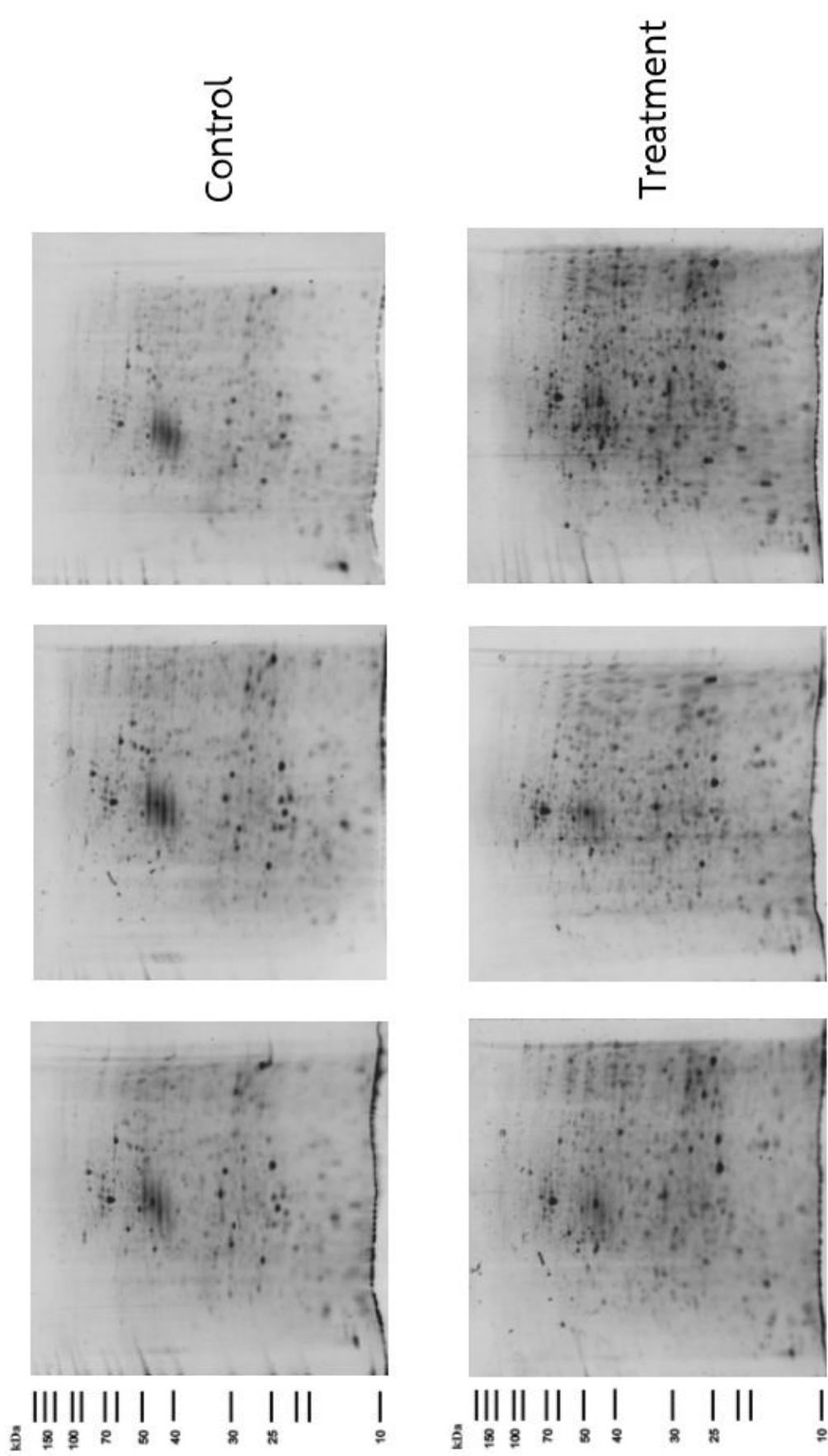
Spot ID	Protein name	Code	Score	Cal. Mw	Cal. pI	Biological function(s)
16	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F	Q00303	290	37654	5.24	Translation
17	Protein disulfide-isomerase	P07237	67	57480	4.76	Cellular homeostasis
18	Proliferating cell nuclear antigen	P12004	344	29092	4.57	Regulation of DNA replication, cellular protein localization,
19	Proteasome subunit alpha type-5	P28066	198	26565	4.74	Proteolysis
20	Proteasome subunit beta type-4	P28070	84	29242	5.72	Proteolysis
21	Cathepsin B	P07858	44	38766	5.88	Endopeptidase activity
22	Lactoylglutathione lyase	Q04760	128	20992	5.12	Regulation of apoptosis, metabolic process
23	Peroxiredoxin-2	P32119	213	22049	5.66	Response to reactive oxygen species
24	Proteasome subunit beta type-6	P28072	207	25570	4.80	Proteolysis
25	Adenine phosphoribosyltransferase	P07741	262	19766	5.78	Nucleobase, nucleoside and nucleotide biosynthetic process
26	Nucleolin	P19338	426	76625	4.60	DNA binding, RNA binding
27	Nuclear autoantigenic sperm protein	P49321	158	85471	4.26	DNA metabolic process, DNA replication
28	Endophilin-A2	Q99961	43	41692	5.31	Endocytosis
29	Proteasome subunit beta type-9	P28065	130	23364	4.93	Proteolysis
31	Actin, cytoplasmic 1	P60709	103	42052	5.29	Cell morphogenesis
32	Fatty acid-binding protein, epidermal	Q01469	199	15497	6.60	Fatty acid binding
33	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	860	61187	5.70	Cell activation
34	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	654	61187	5.70	Cell activation

Cal. refers to calculated.

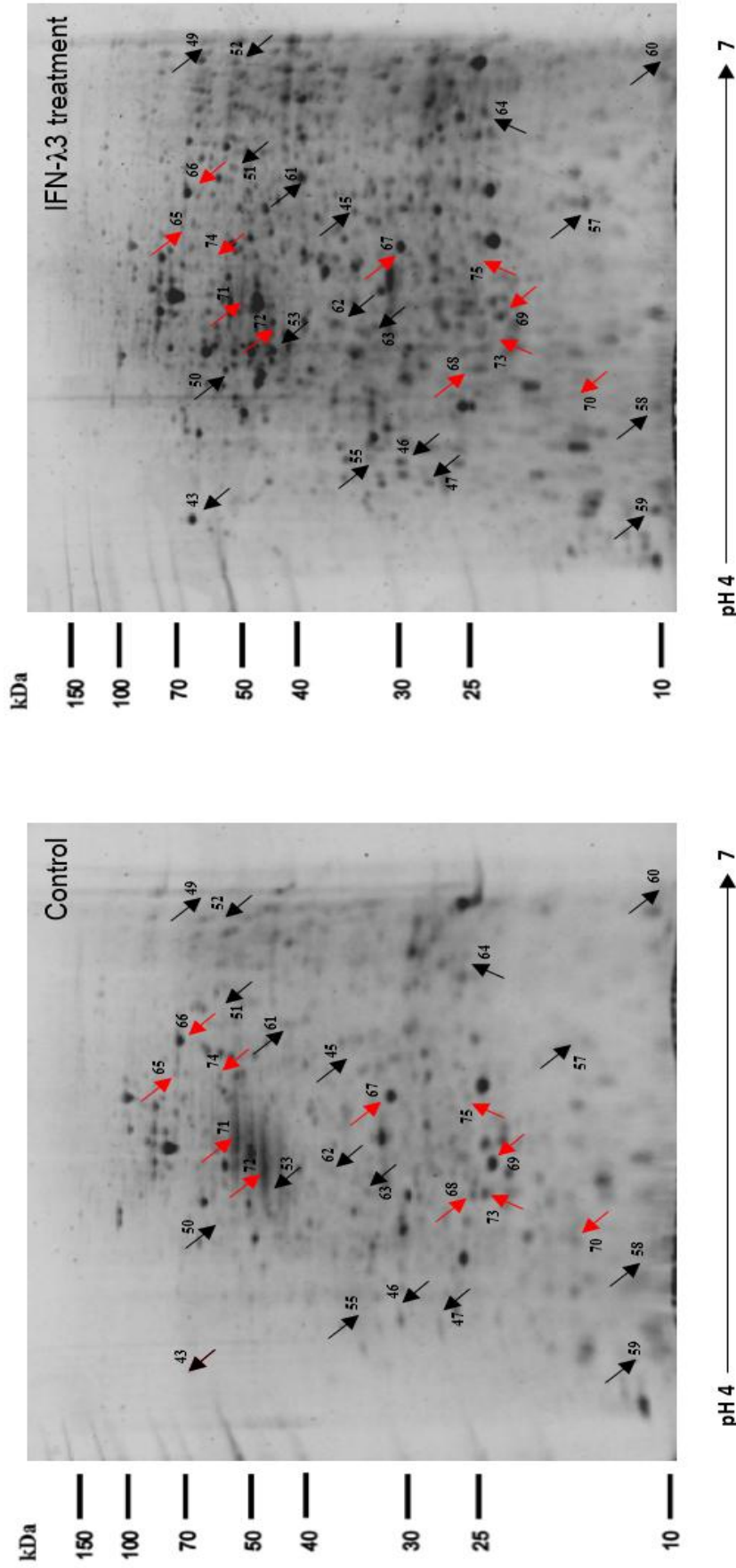
ตารางที่ 13 (ต่อ)

Spot ID	Protein name	Code	Score	Cal. Mw	Cal. pI	Biological function(s)
35	Fibrinogen gamma chain	P02679	402	52106	5.37	Protein polymerization, calcium ion binding
36	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	P06576	1091	56525	5.26	ATP metabolic process
37	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	P31930	118	53297	5.94	Generation of precursor metabolites and energy
39	Ras-related protein Rab-11A	P62491	228	24492	6.12	GTP metabolic process
40	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	P07910	167	33707	4.95	mRNA processing, RNA splicing
41	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	P31930	47	53297	5.94	Generation of precursor metabolites and energy
42	Protein disulfide-isomerase A3	P30101	86	57146	5.98	Intracellular protein transport

Cal. refers to calculated.



รูปที่ 13 2-DE เจลของโปรตีนในนิวเคลียส. 2-DE เจลของโปรตีนในนิวเคลียสของเซลล์HepG2.2.15 ของกลุ่มควบคุม (แฉบบ) และกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย อินเตอร์เฟียรอนแลมเบต้า 3



รูปที่ 14 จุดโปรตีนในนิวเคลียสที่ถูกกระตุ้นโดย IFN-λ3 ได้ จากรูปแสดงให้เห็นว่ามี 29 จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญและสามารถระบุเอกลักษณ์ได้ ลูกศรสีดำและลูกศรสีแดง หมายถึงโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลงตามลำดับ

ตารางที่ 14 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในนิวเคลียส

Spot ID	Relative intensity (Mean $\pm$ SD)		p-value	Ratio after treatment
	Untreatment	Treatment		
43	N/A	0.222 $\pm$ 0.033	0.0012	$\uparrow$ (Dev/0)
45	N/A	0.127 $\pm$ 0.027	0.0023	$\uparrow$ (Dev/0)
46	N/A	0.144 $\pm$ 0.021	0.0242	$\uparrow$ (Dev/0)
47	N/A	0.149 $\pm$ 0.017	0.0032	$\uparrow$ (Dev/0)
49	N/A	0.166 $\pm$ 0.067	0.0498	$\uparrow$ (Dev/0)
50	N/A	0.110 $\pm$ 0.032	0.0268	$\uparrow$ (Dev/0)
51	N/A	0.101 $\pm$ 0.023	0.0168	$\uparrow$ (Dev/0)
52	N/A	0.182 $\pm$ 0.046	0.0204	$\uparrow$ (Dev/0)
53	N/A	0.240 $\pm$ 0.078	0.0338	$\uparrow$ (Dev/0)
55	N/A	0.135 $\pm$ 0.019	0.0064	$\uparrow$ (Dev/0)
57	N/A	0.340 $\pm$ 0.105	0.0305	$\uparrow$ (Dev/0)
58	N/A	0.232 $\pm$ 0.029	0.0052	$\uparrow$ (Dev/0)
59	N/A	0.300 $\pm$ 0.060	0.0133	$\uparrow$ (Dev/0)
60	N/A	0.396 $\pm$ 0.153	0.0464	$\uparrow$ (Dev/0)
61	0.126 $\pm$ 0.046	0.502 $\pm$ 0.074	0.0154	$\uparrow$ 3.98
62	0.088 $\pm$ 0.015	0.219 $\pm$ 0.028	0.0158	$\uparrow$ 2.48
63	0.166 $\pm$ 0.041	0.427 $\pm$ 0.040	0.0194	$\uparrow$ 2.57
64	0.191 $\pm$ 0.061	0.424 $\pm$ 0.125	0.0126	$\uparrow$ 2.22
65	0.094 $\pm$ 0.005	0.040 $\pm$ 0.007	0.0213	$\downarrow$ 2.36
66	0.666 $\pm$ 0.116	0.316 $\pm$ 0.022	0.0186	$\downarrow$ 2.11
67	0.539 $\pm$ 0.102	0.225 $\pm$ 0.045	0.0401	$\downarrow$ 2.39
68	0.588 $\pm$ 0.123	0.207 $\pm$ 0.059	0.0241	$\downarrow$ 2.84

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Spot ID	Relative intensity (Mean $\pm$ SD)		<i>p</i> -value	Ratio after treatment
	Untreatment	Treatment		
69	0.788 $\pm$ 0.022	0.253 $\pm$ 0.034	0.0029	↓ 3.12
70	0.596 $\pm$ 0.152	0.101 $\pm$ 0.063	0.0414	↓ 5.90
71	1.394 $\pm$ 0.060	0.474 $\pm$ 0.144	0.0251	↓ 2.94
72	2.900 $\pm$ 0.759	0.886 $\pm$ 0.480	0.0366	↓ 3.27
73	0.465 $\pm$ 0.074	N/A	0.0012	↓ (0*)
74	0.111 $\pm$ 0.017	N/A	0.0064	↓ (0*)
75	0.138 $\pm$ 0.050	N/A	0.0199	↓ (0*)

N/A แสดงถึงไม่มีค่าเนื่องจากจุดโปรตีนไม่สามารถตรวจพบได้ Dev/0 หมายถึง จุดโปรตีนที่ตรวจพบได้หลังจากได้รับอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 และ 0* หมายถึง จุดโปรตีนที่ตรวจไม่พบหลังได้รับอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3

ตารางที่ 15 โปรตีนในนิวเคลียสที่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้

Spot ID	Protein name	Code	Score	Cal. Mw	Cal. pI	Biological function(s)
43	Calreticulin	P27797	168	48283	4.29	Antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I, calcium ion binding
45	Alpha-enolase	P06733	107	47481	7.01	Glucose metabolic process
46	14-3-3 protein sigma	P31947	49	27871	4.68	Regulation of cell proliferation, regulation of protein kinase activity
47	Eukaryotic translation initiation factor 6	P56537	109	27095	4.56	Translation
49	Prelamin-A/C	P02545	202	74380	6.57	Nucleus organization, nuclear envelope organization
50	Histone-binding protein RBBP4	Q09028	77	47911	4.74	DNA metabolic process, DNA replication
51	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	81	61187	5.70	Cell activation

Cal. refers to calculated.

ตารางที่ 15 (ต่อ)

Spot ID	Protein name	Code	Score	Cal. Mw	Cal. pI	Biological function(s)
52	Prelamin-A/C	P02545	446	74380	6.57	Nucleus organization, nuclear envelope organization
53	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	P08107	187	70294	5.48	Response to unfolded protein
55	Calreticulin	P27797	171	48283	4.29	Antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I , calcium ion binding
57	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	P00441	72	16154	5.70	Response to reactive oxygen species
58	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	84	51230	5.39	mRNA processing, RNA splicing
59	Myosin light polypeptide 6	P60660	121	17090	4.56	ATPase activity, calcium ion binding
60	40S ribosomal protein S12	P25398	164	14905	6.81	Translation
61	Alpha-enolase	P06733	308	47481	7.01	Glucose metabolic process
62	Tubulin beta chain	P07437	71	50095	4.78	Protein polymerization
63	EF-hand domain-containing protein D2	Q96C19	172	26794	5.15	Calcium ion binding
64	Protein DJ-1	Q99497	193	20050	6.33	Response to reactive oxygen species
65	Protein disulfide-isomerase A3	P30101	173	57146	5.98	Intracellular protein transport
66	Protein disulfide-isomerase A3	P30101	150	57146	5.98	Intracellular protein transport
67	Prohibitin	P35232	326	29843	5.57	Negative regulation of cell proliferation
68	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	Q00217	56	24203	6.00	Mitochondrial ATP synthesis coupled electron
69	ATP synthase subunit d, mitochondrial	Q75947	178	18537	5.21	ATP metabolic process

Cal. refers to calculated.

ตารางที่ 15 (ต่อ)

Spot ID	Protein name	Code	Score	Cal. Mw	Cal. pI	Biological function(s)
70	Coiled-coil domain-containing protein 110	Q8TBZ0	58	97235	5.88	Alternative splicing
71	Coiled-coil domain-containing protein 110	Q8TBZ0	57	97235	5.88	Alternative splicing
72	Protein disulfide-isomerase A3	P30101	238	57146	5.98	Intracellular protein transport
73	Peroxiredoxin-2	P32119	111	22049	5.66	Response to reactive oxygen species
74	Lamin-B2	Q03252	435	67762	5.29	Nuclear envelope, nuclear inner membrane
75	Peroxiredoxin-2	P32119	308	22049	5.66	Response to reactive oxygen species

Cal. refers to calculated.

การทดสอบประสิทธิภาพในการติดฉลากของ Dimethyl labeling

หลังจากที่วัดปริมาณเปปไทด์ที่ได้จากการทำ In-solution digestion แล้ว เปปไทด์เหล่านี้จะถูกติดฉลากด้วย dimethyl labeling ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างไอโซโทปของฟอสฟอรัส-3 และไอโซโทปของไฮโดรเจน-2 กับหมู่ฟอสเฟตในเปปไทด์ โดยโปรตีนจากกลุ่มควบคุมจะถูกติดฉลากด้วย light labeling ในขณะที่โปรตีนจากกลุ่มที่ได้รับอินเตอร์เฟอรอนแลมบ์ดา 3 จะถูกติดฉลากด้วย heavy labeling หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยานี้ เปปไทด์ที่ถูกติดฉลากจากทั้ง 2 labeling จะถูกนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง MS จากนั้นไฟล์ข้อมูลดิบของ MS จะถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Proteome Discoverer โดยให้ตั้งค่าเป็นโหมด No quantification และเลือกให้ dimethyl labeling ที่เปปไทด์เป็น light หรือว่า heavy เป็น dynamic modification หลังการวิเคราะห์ โปรแกรม PD จะแสดงจำนวนเปปไทด์ทั้งหมด และจำนวนเปปไทด์ที่ถูกติดฉลากด้วย dimethyl labeling ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงประสิทธิภาพการติดฉลากของ Dimethyl labeling

Labeling	Labeled peptides	Total peptides	% Efficiency
Light	5,775	5,786	99.81
Heavy	4,849	4,865	99.67

การวิเคราะห์ quantitative data จากโปรตีโอมที่ตอบสนองต่ออินเตอร์เฟียร์อนแลมปีดา 3 ในเซลล์ HepG2.2.15

หลังจากทดสอบประสิทธิภาพการติดฉลาก dimethyl labeling ของเปปไทด์แล้ว ตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มจะนำมาผสมรวมกัน และทำการแฟรกชันเนชันเพื่อลดความซับซ้อนของโปรตีนก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MS จากนั้นผลที่ได้จากเครื่อง MS จะทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PD พบว่าโปรตีนที่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้มีจำนวน $3,222 \pm 234$ โปรตีน (ค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ) ในจำนวนนี้มีเพียง 2,086 โปรตีนที่สามารถพบได้ทั้ง 3 ซ้ำ และเมื่อนำโปรตีนเหล่านี้มาคำนวณทางสถิติ *t*-test พบว่ามีโปรตีนที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมปีดาที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จำนวน 472 โปรตีน โดยเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจำนวน 211 โปรตีน และโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงจำนวน 261 โปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 โปรตีนที่ได้จากการทำโปรตีโอมิกส์โดยไม่ใช้เจล

Acession	Protein	Ratio (Treated/control)	<i>p</i> -value
P62258-1	14-3-3 protein epsilon	0.878 ± 0.051	0.0309282
Q04917	14-3-3 protein eta	0.863 ± 0.058	0.036954
P31947-1	14-3-3 protein sigma	0.883 ± 0.048	0.030545
P63104-1	14-3-3 protein zeta/delta	0.912 ± 0.035	0.0264513
P09543-1	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	1.471 ± 0.088	0.0007926
Q9Y6K5	2'-5'-oligoadenylate synthase 3	5.161 ± 1.205	0.0004986
Q15646-1	2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein	9.667 ± 3.997	0.003619
Q9UNM6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	0.926 ± 0.023	0.0123069
O00487	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	0.807 ± 0.076	0.0316599
P51665	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	0.900 ± 0.024	0.0049337
P82921	28S ribosomal protein S21, mitochondrial	1.180 ± 0.057	0.0079
P82673-1	28S ribosomal protein S35, mitochondrial	1.163 ± 0.026	0.0006977
Q9Y3B7-1	39S ribosomal protein L11, mitochondrial	0.703 ± 0.008	1.941E-06
Q99714-1	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	1.164 ± 0.064	0.0171514
P62280	40S ribosomal protein S11	0.879 ± 0.019	0.0011493
P25398	40S ribosomal protein S12	0.839 ± 0.047	0.0115758
P62263	40S ribosomal protein S14	1.089 ± 0.034	0.0187599
P62841	40S ribosomal protein S15	0.864 ± 0.062	0.0406715
P62244	40S ribosomal protein S15a	1.246 ± 0.099	0.0202126
P62249	40S ribosomal protein S16	1.105 ± 0.053	0.0414729
P39019	40S ribosomal protein S19	1.046 ± 0.020	0.0311796
P15880	40S ribosomal protein S2	0.862 ± 0.054	0.0280661
P23396-1	40S ribosomal protein S3	1.141 ± 0.022	0.000612
P62861	40S ribosomal protein S30	1.673 ± 0.279	0.0132565
P22090	40S ribosomal protein S4, Y isoform 1	0.570 ± 0.115	0.0145384

Acession	Protein	Ratio (Treated/control)	p-value
P62753	40S RIBOSOMAL PROTEIN S6	1.283 ± 0.105	0.0126503
P62241	40S ribosomal protein S8	1.463 ± 0.278	0.0477695
P05388	60S acidic ribosomal protein P0	0.909 ± 0.035	0.0247299
P05387	60S acidic ribosomal protein P2	0.946 ± 0.020	0.0194483
P30050-1	60S ribosomal protein L12	1.071 ± 0.003	2.38E-06
P40429	60S ribosomal protein L13a	1.782 ± 0.348	0.0198376
P50914	60S ribosomal protein L14	1.682 ± 0.296	0.0199288
P84098	60S ribosomal protein L19	1.283 ± 0.058	0.0014284
P35268	60S ribosomal protein L22	1.169 ± 0.025	0.0005055
P83731	60S ribosomal protein L24	1.585 ± 0.179	0.0054617
P46776	60S ribosomal protein L27a	1.325 ± 0.130	0.0146322
P62910	60S ribosomal protein L32	1.183 ± 0.086	0.0319
P18124	60S ribosomal protein L7	1.553 ± 0.190	0.0079876
P62424	60S ribosomal protein L7a	1.253 ± 0.128	0.0395236
P62917	60S ribosomal protein L8	1.244 ± 0.096	0.0182866
P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	0.919 ± 0.014	0.0014958
A1L0T0	Acetolactate synthase-like protein	1.195 ± 0.039	0.001458
O14639-1	Actin-binding LIM protein 1	0.874 ± 0.059	0.0439846
O96019-1	Actin-like protein 6A	0.791 ± 0.077	0.025335
P61160-1	Actin-related protein 2	1.121 ± 0.039	0.0094143
P13798	Acylamino-acid-releasing enzyme	0.893 ± 0.023	0.0031898
O75608	Acyl-protein thioesterase 1	0.791 ± 0.088	0.0424259
P07741-1	Adenine phosphoribosyltransferase	1.198 ± 0.039	0.0014562
P30520	adenylosuccinate synthetase isozyme 2	1.144 ± 0.028	0.0015916
Q01518-1	adenyl cyclase-associated protein 1	0.870 ± 0.057	0.0351897
P05141	ADP/ATP translocase 2	1.144 ± 0.038	0.0044197
Q66PJ3-1	ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 4	2.223 ± 0.385	0.0030452
P10109	Adrenodoxin, mitochondrial	1.374 ± 0.140	0.0119123
Q92667	A-kinase anchor protein 1, mitochondrial	0.681 ± 0.053	0.0024718
Q8TD30-1	Alanine aminotransferase 2	1.378 ± 0.125	0.0078613
Q04828	aldo-keto reductase family 1 member C1	0.838 ± 0.011	4.897E-05
P52895	Aldo-keto reductase family 1 member C2	0.748 ± 0.062	0.0082259
P15121	aldose reductase	0.908 ± 0.028	0.0112984
P01009-1	alpha-1-antitrypsin	0.634 ± 0.120	0.030876
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	0.723 ± 0.034	0.0006539
P54920	alpha-soluble nsf attachment protein	1.864 ± 0.086	4.281E-05
Q10567	AP-1 complex subunit beta-1	0.900 ± 0.026	0.0073419
P61966	AP-1 complex subunit sigma-1A	1.144 ± 0.068	0.0345123
Q92572	AP-3 complex subunit sigma-1	0.753 ± 0.041	0.0016817
Q9NQ94	APOBEC1 complementation factor	0.882 ± 0.022	0.0018853
Q7L4I2-1	Arginine/serine-rich coiled-coil protein 2	0.790 ± 0.080	0.0303209
P54136-1	arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	0.885 ± 0.044	0.0245082

Acession	Protein	Ratio (Treated/control)	p-value
P07306	asialoglycoprotein receptor 1	1.287 ± 0.074	0.0034489
P14868	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic	1.113 ± 0.023	0.0018244
P25705-1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	1.121 ± 0.048	0.0203927
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	1.100 ± 0.034	0.0122224
P56385	ATP synthase subunit e, mitochondrial	0.929 ± 0.028	0.0249789
Q8NE71-1	ATP-binding cassette sub-family F member 1	1.273 ± 0.048	0.0008694
O76031	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial	0.765 ± 0.098	0.035618
Q92499	ATP-dependent RNA helicase DDX1	0.852 ± 0.016	0.0002372
Q9NVP1	ATP-dependent RNA helicase DDX18	1.427 ± 0.132	0.0054705
O95816	BAG family molecular chaperone regulator 2	1.164 ± 0.059	0.0129064
P07686	Beta-hexosaminidase subunit beta	0.703 ± 0.117	0.0341345
P07814	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	0.780 ± 0.040	0.0023498
P31939	bifunctional purine biosynthesis protein purH	0.902 ± 0.018	0.0018243
Q06520	Bile salt sulfotransferase	1.346 ± 0.099	0.0045042
P53004	Biliverdin reductase A	0.831 ± 0.080	0.0470315
Q10589	bone marrow stromal antigen 2	3.346 ± 0.812	0.002628
P11274-1	Breakpoint cluster region protein	1.098 ± 0.049	0.0435018
Q6NUK1	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	0.587 ± 0.021	2.797E-05
P62158	Calmodulin	0.492 ± 0.213	0.049005
Q99439	Calponin-2	0.814 ± 0.083	0.0411243
P27797	Calreticulin	0.855 ± 0.037	0.0067001
P13861	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	0.787 ± 0.080	0.0248424
Q14444-1	Caprin-1	0.681 ± 0.116	0.0346491
P19784	casein kinase II subunit alpha'	0.735 ± 0.091	0.019891
P67870	Casein kinase II subunit beta	1.219 ± 0.080	0.0127431
Q8N5K1	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2	0.853 ± 0.041	0.0094069
P60953	Cell division control protein 42 homolog	0.887 ± 0.052	0.0429411
Q9H3R5	Centromere protein H	0.698 ± 0.103	0.0209037
O43264	Centromere/kinetochore protein zw10 homolog	0.655 ± 0.090	0.0097297
Q9Y696	Chloride intracellular channel protein 4	0.809 ± 0.043	0.0045204
Q14019	coactosin-like protein	0.664 ± 0.030	0.0002119
Q9Y678	Coatomer subunit gamma-1	1.157 ± 0.075	0.0366124
O00748	Cocaine esterase	1.387 ± 0.122	0.0060857
P23528	Cofilin-1	0.859 ± 0.052	0.0216058
P0C0L4-1	Complement C4-A	1.405 ± 0.063	0.0004514
Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	0.865 ± 0.047	0.017477
P00751-1	Complement factor B	1.916 ± 0.465	0.0294997
Q7L5N1	COP9 signalosome complex subunit 6	0.440 ± 0.145	0.0331281
O00244	Copper transport protein ATOX1	0.733 ± 0.041	0.0013331
Q9P0M6	Core histone macro-H2A.2	1.520 ± 0.029	6.388E-06

Acession	Protein	Ratio (Treated/control)	p-value
O15320	cTAGE family member 5	0.726 ± 0.106	0.0392858
P01034	Cystatin-C	1.230 ± 0.084	0.01476
O43169	Cytochrome b5 type B	1.479 ± 0.257	0.0361307
Q9Y2R0	Cytochrome c oxidase assembly factor 3 homolog, mitochondrial	0.612 ± 0.119	0.0230537
P20674	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	0.837 ± 0.067	0.0317824
P09669	Cytochrome c oxidase subunit 6C	0.713 ± 0.021	8.362E-05
P14406	Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial	0.875 ± 0.022	0.0016751
Q13011	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	1.452 ± 0.168	0.0097111
P54886	delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	1.140 ± 0.058	0.0233787
Q9Y3Z3	deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	2.285 ± 0.434	0.0038985
Q9Y295	developmentally-regulated GTP-binding protein 1	1.221 ± 0.105	0.0338333
P00374	dihydrofolate reductase	0.520 ± 0.003	5.296E-09
P49736	DNA replication licensing factor mcm2	0.896 ± 0.003	2.145E-06
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	0.952 ± 0.017	0.0176877
O00411	DNA-directed RNA polymerase, mitochondrial	1.509 ± 0.233	0.0184653
Q96EY1-1	DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial	1.120 ± 0.042	0.0134736
O75937	DnaJ homolog subfamily C member 8	0.820 ± 0.062	0.0178033
Q8WXX5	dnaJ homolog subfamily C member 9	0.864 ± 0.028	0.0032169
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	1.334 ± 0.163	0.0347086
P04844-1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	1.233 ± 0.124	0.0484151
P61803	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit DAD1	1.226 ± 0.067	0.0060235
P46977	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A	1.230 ± 0.029	0.0002472
Q8TCJ2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B	1.442 ± 0.076	0.0005607
Q14203	Dynactin subunit 1	0.697 ± 0.118	0.0361225
Q14258	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25	1.285 ± 0.038	0.0002666
Q15075	Early endosome antigen 1	0.782 ± 0.038	0.0020255
Q99961	Endophilin-A2	0.768 ± 0.027	0.0004637
Q96DZ1	Endoplasmic reticulum lectin 1	1.310 ± 0.135	0.0212921
Q96DN0	Endoplasmic reticulum resident protein 27	1.100 ± 0.013	0.0003669
Q9BS26	Endoplasmic reticulum resident protein 44	1.311 ± 0.170	0.0431432
P84090	Enhancer of rudimentary homolog	0.870 ± 0.036	0.008385
Q12929	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8	0.383 ± 0.110	0.0065671
P07099	epoxide hydrolase 1	1.325 ± 0.070	0.0018061
Q8N766-1	ER membrane protein complex subunit 1	1.184 ± 0.056	0.0069294
Q8NBQ5	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11	1.848 ± 0.390	0.013732
P05198	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	1.109 ± 0.047	0.0255191

Acession	Protein	Ratio (Treated/control)	p-value
Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	0.863 ± 0.057	0.0348914
Q9Y262	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	0.880 ± 0.056	0.0449304
P78344-1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	0.768 ± 0.062	0.0101515
Q15056-1	Eukaryotic translation initiation factor 4H	0.876 ± 0.059	0.0454121
Q9Y3B2	Exosome complex component csl4	1.254 ± 0.082	0.0078802
Q15024	Exosome complex component RRP42	1.185 ± 0.029	0.0006025
Q9Y2L1-1	exosome complex exonuclease RRP44	0.731 ± 0.063	0.0068387
Q9Y5B9	FACT complex subunit SPT16	1.159 ± 0.059	0.0149149
Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal	0.756 ± 0.105	0.0391996
P02679	Fibrinogen gamma chain	0.910 ± 0.035	0.023548
Q14254	Flotillin-2	1.143 ± 0.066	0.0339595
Q06787	fragile X mental retardation protein 1	1.363 ± 0.127	0.0094694
Q08380	Galectin-3-binding protein	2.374 ± 0.523	0.007846
O75223-1	gamma-glutamylcyclotransferase	0.783 ± 0.024	0.0003556
Q8WUA4-1	General transcription factor 3C polypeptide 2	1.354 ± 0.135	0.0129225
P53611	Geranylgeranyl transferase type-2 subunit beta	0.769 ± 0.064	0.0107815
O94925-1	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	0.732 ± 0.104	0.0299879
P47897	glutamine--tRNA ligase	0.566 ± 0.023	3.909E-05
P06737-1	Glycogen phosphorylase, liver form	0.647 ± 0.121	0.0236092
Q9H4A6	Golgi phosphoprotein 3	0.744 ± 0.118	0.0466649
Q969N2	GPI transamidase component PIG-T	1.335 ± 0.140	0.017783
P28799	Granulins	1.406 ± 0.101	0.002388
P29354-1	Growth factor receptor-bound protein 2	0.833 ± 0.068	0.0356341
Q99988	Growth/differentiation factor 15	0.660 ± 0.120	0.0296137
Q9HAV7	GrpE protein homolog 1, mitochondrial	0.833 ± 0.060	0.0229392
Q9BVP2	Guanine nucleotide-binding protein-like 3	1.283 ± 0.121	0.0196936
Q9Y450-1	HBS1-like protein	0.665 ± 0.132	0.0475227
O14964	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	1.651 ± 0.164	0.0024501
P51858	hepatoma-derived growth factor	0.844 ± 0.064	0.0345804
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	1.093 ± 0.044	0.0364111
Q14103	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	0.905 ± 0.038	0.0278395
P09429	High mobility group protein B1	0.835 ± 0.014	0.0001224
P52926-1	high mobility group protein HMGI-C	3.538 ± 2.056	0.0419335
P49773	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	1.047 ± 0.023	0.0409244
P16402	Histone H1.3	1.720 ± 0.373	0.0276084
Q92522	Histone H1x	2.207 ± 0.651	0.0206423
Q86X55	Histone-arginine methyltransferase CARM1	1.252 ± 0.089	0.0107823
P01892	HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain	2.225 ± 0.366	0.0032639
O95373	Importin-7	0.918 ± 0.035	0.0330265
Q70UQ0	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein	1.320 ± 0.143	0.0219932
Q9NZI8	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	0.905 ± 0.026	0.0075576

Acession	Protein	Ratio (Treated/control)	p-value
P56199	Integrin alpha-1	1.230 ± 0.022	8.903E-05
P17301	Integrin alpha-2	1.272 ± 0.122	0.0244794
P20592	interferon-induced GTP-binding protein Mx2	77.61 ± 31.66	0.0003372
Q14879	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	24.37 ± 6.393	5.357E-05
Q01628	Interferon-induced transmembrane protein 3	3.610 ± 0.832	0.0013866
P19525	interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase	2.533 ± 0.064	8.037E-07
P48735	Isocitrate dehydrogenase	0.935 ± 0.023	0.0188718
P51553-1	isocitrate dehydrogenase	1.717 ± 0.383	0.0419053
Q13404-1	Isoform 1 of Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	0.702 ± 0.098	0.0256306
Q13510-2	Isoform 2 of Acid ceramidase	0.657 ± 0.097	0.0128184
Q12904-2	Isoform 2 of Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1	0.808 ± 0.077	0.0354382
Q9UG63-2	Isoform 2 of ATP-binding cassette sub-family F member 2	1.198 ± 0.080	0.0178122
P51572-2	Isoform 2 of B-cell receptor-associated protein 31	0.817 ± 0.031	0.0016471
Q9P287-2	Isoform 2 of BRCA2 and CDKN1A-interacting protein	0.621 ± 0.110	0.0210327
P35221-2	Isoform 2 of Catenin alpha-1	0.785 ± 0.084	0.0319843
Q9BWS9-2	Isoform 2 of Chitinase domain-containing protein 1	67.70 ± 45.68	0.0407369
Q5RI15-2	Isoform 2 of Cytochrome c oxidase protein 20 homolog	1.339 ± 0.152	0.0210435
Q13268-2	Isoform 2 of Dehydrogenase/reductase SDR family member 2, mitochondrial	1.112 ± 0.044	0.019078
Q63HN8-4	Isoform 2 of E3 ubiquitin-protein ligase RNF213	3.627 ± 1.329	0.0068351
Q15717-2	Isoform 2 of ELAV-like protein 1	1.204 ± 0.056	0.0052307
P26641-2	Isoform 2 of Elongation factor 1-gamma	0.916 ± 0.019	0.0038876
Q9Y371-2	Isoform 2 of Endophilin-B1	1.129 ± 0.048	0.0160585
Q14240-2	Isoform 2 of Eukaryotic initiation factor 4A-II	0.846 ± 0.071	0.0436068
P55884-2	Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	0.773 ± 0.024	0.0002835
P63241-2	Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	0.672 ± 0.094	0.0129017
Q96AE4-2	Isoform 2 of Far upstream element-binding protein 1	1.116 ± 0.054	0.0368534
Q14789-2	Isoform 2 of Golgin subfamily B member 1	0.768 ± 0.071	0.0142404
Q99729-2	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	0.902 ± 0.029	0.0106801
Q9H2U2-2	Isoform 2 of Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	0.726 ± 0.080	0.0134329
P05787-2	Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 8	0.949 ± 0.024	0.0416258
Q9UIC8-2	Isoform 2 of Leucine carboxyl methyltransferase 1	0.741 ± 0.087	0.0206725
Q96IJ6-2	Isoform 2 of Mannose-1-phosphate guanylttransferase alpha	1.069 ± 0.029	0.0258052
Q3ZCQ8-2	Isoform 2 of Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	0.658 ± 0.117	0.0278993
Q9BQG0-2	Isoform 2 of Myb-binding protein 1A	1.555 ± 0.298	0.0306839
Q9P0J0-2	Isoform 2 of NADH dehydrogenase	0.832 ± 0.076	0.0437057
P19838-2	Isoform 2 of Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	0.896 ± 0.013	0.0004103

Acession	Protein	Ratio (Treated/control)	p-value
Q14318-2	Isoform 2 of Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8	1.176 ± 0.083	0.0325129
Q15084-2	Isoform 2 of Protein disulfide-isomerase A6	1.027 ± 0.012	0.0350777
P22061-2	Isoform 2 of Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	1.239 ± 0.088	0.012761
P18754-2	Isoform 2 of Regulator of chromosome condensation	0.930 ± 0.004	1.549E-05
Q12765-2	Isoform 2 of Secernin-1	0.903 ± 0.030	0.0119215
Q9Y3F4-2	Isoform 2 of Serine-threonine kinase receptor-associated protein	0.739 ± 0.076	0.014676
Q13126-2	Isoform 2 of S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase	0.270 ± 0.034	0.0001302
P31948-2	Isoform 2 of Stress-induced-phosphoprotein 1	0.858 ± 0.060	0.0340842
P82094-2	Isoform 2 of TATA element modulatory factor	0.707 ± 0.125	0.0431303
Q9BZE9-2	Isoform 2 of Tether containing UBX domain for GLUT4	0.847 ± 0.054	0.0222674
P26639-2	Isoform 2 of Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	1.249 ± 0.087	0.0116405
O75410-2	Isoform 2 of Transforming acidic coiled-coil-containing protein 1	0.518 ± 0.147	0.0299272
P09493-2	Isoform 2 of Tropomyosin alpha-1 chain	0.820 ± 0.079	0.0451467
P46939-2	Isoform 2 of Utrophin	0.786 ± 0.061	0.01182
Q8WWM7-3	Isoform 3 of Ataxin-2-like protein	0.887 ± 0.049	0.0364268
Q7L1Q6-3	Isoform 3 of Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	0.717 ± 0.082	0.014877
Q14677-3	Isoform 3 of Clathrin interactor 1	0.902 ± 0.041	0.0322311
Q9H8Y8-3	Isoform 3 of Golgi reassembly-stacking protein 2	0.850 ± 0.014	0.000139
O00410-3	Isoform 3 of Importin-5	0.878 ± 0.021	0.001404
Q13310-3	Isoform 3 of Polyadenylate-binding protein 4	0.798 ± 0.069	0.0196316
Q15424-3	Isoform 3 of Scaffold attachment factor B1	0.870 ± 0.043	0.0151861
O75534-4	Isoform 4 of Cold shock domain-containing protein E1	0.855 ± 0.052	0.0223449
P11388-4	Isoform 4 of DNA topoisomerase 2-alpha	0.714 ± 0.104	0.0253286
P55265-4	Isoform 4 of Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	1.698 ± 0.184	0.0021489
Q13564-4	Isoform 4 of NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit	0.853 ± 0.051	0.0185079
P46087-4	Isoform 4 of Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase	1.474 ± 0.213	0.0186497
P08559-4	Isoform 4 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	1.209 ± 0.090	0.025259
O14617-5	Isoform 5 of AP-3 complex subunit delta-1	1.992 ± 0.552	0.0346802
P35658-5	Isoform 5 of Nuclear pore complex protein Nup214	0.314 ± 0.120	0.0168885
Q01844-5	Isoform 5 of RNA-binding protein EWS	0.790 ± 0.090	0.0444298
P62633-6	Isoform 6 of Cellular nucleic acid-binding protein	0.853 ± 0.017	0.0003449
O94979-8	Isoform 8 of Protein transport protein Sec31A	0.936 ± 0.024	0.0204436
Q04637-9	Isoform 9 of Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	0.914 ± 0.034	0.02642
Q93062-3	Isoform C of RNA-binding protein with multiple splicing	0.786 ± 0.062	0.0111478
Q9NZB2-6	Isoform F of Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	0.646 ± 0.121	0.0268154

Acession	Protein	Ratio (Treated/control)	p-value
P09496-2	Isoform Non-brain of Clathrin light chain A	1.040 ± 0.008	0.0019748
P14923	Junction plakoglobin	0.919 ± 0.033	0.0286626
P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19	1.122 ± 0.025	0.0018776
P33176	Kinesin-1 heavy chain	0.918 ± 0.025	0.0102557
Q04760-1	lactoylglutathione lyase	0.778 ± 0.053	0.0063897
P42167	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma	1.185 ± 0.090	0.0376078
P20700	Lamin-B1	0.945 ± 0.027	0.048325
Q9NS86	lanC-like protein 2	0.655 ± 0.057	0.0020894
O95202-1	LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1, mitochondrial	0.816 ± 0.019	0.0002296
P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	0.782 ± 0.004	3.841E-07
P30740	Leukocyte elastase inhibitor	1.106 ± 0.048	0.030688
P09960-1	leukotriene A-4 hydrolase	0.774 ± 0.082	0.0273002
O60488-1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	1.066 ± 0.018	0.0066254
P05455	Lupus La protein	0.783 ± 0.007	2.812E-06
Q9NRZ9	Lymphoid-specific helicase	0.547 ± 0.135	0.0189702
P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	1.213 ± 0.086	0.0205576
Q8IVS2	Malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase, mitochondrial	2.037 ± 0.578	0.0460571
Q13724-1	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	1.174 ± 0.047	0.0050982
P50579	methionine aminopeptidase 2	1.553 ± 0.172	0.0058325
Q9BUR5-1	MICOS complex subunit MIC26	1.232 ± 0.057	0.0031748
Q9UPN3	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5	0.786 ± 0.042	0.0028276
Q8N183	Mimitin, mitochondrial	0.849 ± 0.02	0.0005662
Q9BTE3-1	Mini-chromosome maintenance complex-binding protein	0.446 ± 0.143	0.031437
Q9Y5L4	mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM13	1.115 ± 0.033	0.0071134
O60220	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A	0.881 ± 0.044	0.0237681
O75439	mitochondrial-processing peptidase subunit beta	1.164 ± 0.028	0.0009308
P28482	mitogen-activated protein kinase 1	0.962 ± 0.011	0.0080233
Q9Y6D9	mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD1	0.550 ± 0.025	5.306E-05
P58546	Myotrophin	0.765 ± 0.079	0.0219012
O14745	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	0.953 ± 0.014	0.0087898
Q13423	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	1.213 ± 0.075	0.0111309
O95182	NADH dehydrogenase	0.777 ± 0.031	0.0008492
P19404	NADH dehydrogenase	0.862 ± 0.039	0.0099319
O43181	NADH dehydrogenase	1.087 ± 0.039	0.0310587
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	0.914 ± 0.033	0.0237994
Q15843	NEDD8	0.828 ± 0.063	0.0228551
P48681	Nestin	0.581 ± 0.122	0.0158753
Q09666-1	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	0.701 ± 0.037	0.0006531

Acession	Protein	Ratio (Treated/control)	p-value
Q8NBF2-1	NHL repeat-containing protein 2	0.624 ± 0.065	0.0033254
P22307-1	Non-specific lipid-transfer protein	0.849 ± 0.017	0.0002986
Q9Y266	nuclear migration protein nudC	0.893 ± 0.010	0.0001187
Q92621	Nuclear pore complex protein Nup205	0.874 ± 0.017	0.000598
O00567	Nucleolar protein 56	2.254 ± 0.716	0.0217295
Q9Y2X3	Nucleolar protein 58	1.621 ± 0.342	0.0309852
Q9NR30-1	Nucleolar RNA helicase 2	1.629 ± 0.176	0.0028993
P17480-1	Nucleolar transcription factor 1	0.974 ± 0.007	0.0077054
Q9NTK5-1	obg-like ATPase 1	0.886 ± 0.033	0.0104797
Q9NZT2-1	opioid growth factor receptor	1.628 ± 0.239	0.0088057
P36551	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	1.224 ± 0.042	0.0011511
Q9NUG6	p53 and DNA damage-regulated protein 1	0.583 ± 0.129	0.0279489
P50897	Palmitoyl-protein thioesterase 1	0.778 ± 0.063	0.0103356
Q8TEW0	Partitioning defective 3 homolog	1.378 ± 0.197	0.0338108
Q9GZU2	Paternally-expressed gene 3 protein	0.666 ± 0.045	0.0010614
Q9Y365	PCTP-like protein	1.131 ± 0.039	0.0077991
P30405	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial	0.630 ± 0.035	0.0002887
Q8TBX8-1	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 gamma	0.890 ± 0.041	0.0222098
Q16822-1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	1.098 ± 0.033	0.0113777
O00168	Phospholemman	1.275 ± 0.096	0.0108727
Q99959	Plakophilin-2	1.183 ± 0.067	0.0146437
P43034	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	1.139 ± 0.058	0.0245407
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	0.921 ± 0.039	0.0499598
Q9BY77	Polymerase delta-interacting protein 3	0.773 ± 0.052	0.005112
Q9UHV9	Prefoldin subunit 2	0.861 ± 0.056	0.030939
Q9NQP4	Prefoldin subunit 4	1.167 ± 0.074	0.02554
Q99471-1	prefoldin subunit 5	0.829 ± 0.071	0.0352011
Q9NW64-1	Pre-mRNA-splicing factor RBM22	1.079 ± 0.035	0.0303432
Q8IY81	pre-rRNA processing protein FTSJ3	1.440 ± 0.180	0.0138236
Q9Y2R4	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52	1.148 ± 0.019	0.0002939
P26196	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	0.796 ± 0.083	0.0351325
Q9UNQ2	Probable dimethyladenosine transferase	1.353 ± 0.103	0.0050383
Q9Y4C8	Probable RNA-binding protein 19	0.919 ± 0.020	0.005156
Q99848	Probable rRNA-processing protein EBP2	1.608 ± 0.336	0.0310216
Q07954	prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	1.297 ± 0.160	0.0434718
Q16186	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1	1.321 ± 0.127	0.0140777
Q06323-1	Proteasome activator complex subunit 1	1.307 ± 0.116	0.0128598
Q9UL46	proteasome activator complex subunit 2	1.464 ± 0.097	0.0014087
Q969U7	Proteasome assembly chaperone 2	1.410 ± 0.085	0.0014439
P11171-1	protein 4.1	0.537 ± 0.141	0.030551

Acession	Protein	Ratio (Treated/control)	p-value
Q99497	Protein deglycase DJ-1	0.886 ± 0.034	0.0110931
P35659-1	Protein DEK	1.243 ± 0.114	0.0279847
O60610-1	Protein diaphanous homolog 1	0.761 ± 0.020	0.000119
Q01658	Protein Dr1	1.181 ± 0.057	0.0086343
Q8N8S7	Protein enabled homolog	0.645 ± 0.076	0.0066819
Q658Y4	Protein FAM91A1	0.799 ± 0.085	0.0401909
P49354	protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	0.838 ± 0.006	4.093E-06
Q13045-1	protein flightless-1 homolog	0.307 ± 0.049	0.0004038
O94992	Protein HEXIM1	2.156 ± 0.523	0.0105562
Q86UE4	protein LYRIC	1.459 ± 0.186	0.0129239
Q9BPW8	Protein NipSnap homolog 1	1.033 ± 0.009	0.0068283
Q9BVG4	Protein PBDC1	0.735 ± 0.068	0.0094817
P29590	Protein PML	2.998 ± 0.353	0.0001919
Q96PU8	protein quaking	0.636 ± 0.108	0.0184754
P25815	Protein S100-P	0.770 ± 0.036	0.0012909
Q9UBV2	Protein sel-1 homolog 1	0.889 ± 0.040	0.02146
O95486-1	Protein transport protein Sec24A	1.236 ± 0.082	0.0118331
P53992	Protein transport protein sec24c	1.230 ± 0.034	0.0004797
P60468	protein transport protein Sec61 subunit beta	0.895 ± 0.043	0.028805
P06454-1	Prothymosin alpha	0.795 ± 0.053	0.0072575
Q9HCE1	Putative helicase MOV-10	1.236 ± 0.025	0.0001248
Q6P996-1	Pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1	0.856 ± 0.046	0.0137584
Q9NVS9	Pyridoxine-5'-phosphate oxidase	0.822 ± 0.056	0.0156633
O43504	Ragulator complex protein LAMTOR5	0.624 ± 0.124	0.0324991
P43487	Ran-specific GTPase-activating protein	0.898 ± 0.016	0.0010789
Q9UN86	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	0.821 ± 0.062	0.019168
P61026	ras-related protein rab-10	1.238 ± 0.049	0.0016394
P61019-1	Ras-related protein Rab-2A	0.710 ± 0.073	0.0098774
P78509	Reelin	0.889 ± 0.044	0.02749
Q96TC7	Regulator of microtubule dynamics protein 3	1.289 ± 0.107	0.0121438
Q86TG7-1	Retrotransposon-derived protein PEG10	0.817 ± 0.041	0.0041719
O75116	Rho-associated protein kinase 2	0.868 ± 0.054	0.0327244
P13489	Ribonuclease inhibitor	1.126 ± 0.032	0.0041339
P23921	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	0.874 ± 0.038	0.0114096
O76021	Ribosomal L1 domain-containing protein 1	6.884 ± 3.066	0.0103721
P51812	Ribosomal protein S6 kinase alpha-3	0.905 ± 0.012	0.0005117
Q92979	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase Nep1	1.565 ± 0.291	0.0377536
P38159-1	RNA-binding motif protein, X chromosome	0.952 ± 0.005	0.0001459
Q9NTZ6	RNA-binding protein 12	0.787 ± 0.079	0.028288
Q9P2N5	RNA-binding protein 27	1.652 ± 0.268	0.0120911
Q9Y5S9	RNA-binding protein 8A	1.104 ± 0.049	0.037188

Acession	Protein	Ratio (Treated/control)	p-value
P35637-1	RNA-binding protein FUS	0.934 ± 0.027	0.0272315
P22087	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	1.233 ± 0.056	0.0027855
Q5JTH9-1	RRP12-like protein	1.164 ± 0.060	0.0145064
Q00266	S-adenosylmethionine synthase isoform type-1	0.797 ± 0.078	0.0255578
P82979	SAP domain-containing ribonucleoprotein	0.796 ± 0.045	0.0050709
Q14151	scaffold attachment factor B2	0.857 ± 0.028	0.002762
Q16181	Septin-7	0.814 ± 0.083	0.0483306
Q9UHD8-1	Septin-9	0.868 ± 0.060	0.0419088
Q07955-1	Serine/arginine-rich splicing factor 1	0.940 ± 0.029	0.0459591
Q13247	Serine/arginine-rich splicing factor 6	1.150 ± 0.070	0.0317869
O95747	Serine/threonine-protein kinase OSR1	0.844 ± 0.035	0.0044105
P30153	serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	0.916 ± 0.028	0.0145864
Q96HS1-1	Serine/threonine-protein phosphatase Pgam5, mitochondrial	1.210 ± 0.104	0.0347788
P02787	Serotransferrin	0.881 ± 0.009	6.665E-05
P50454	Serpin H1	1.093 ± 0.033	0.0141157
P10768	S-formylglutathione hydrolase	0.865 ± 0.049	0.0209186
Q9H299	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	1.148 ± 0.060	0.0211896
Q96B97-1	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1	0.753 ± 0.039	0.0013595
Q9H9B4	Sideroflexin-1	1.294 ± 0.049	0.0006822
Q9BWM7	Sideroflexin-3	1.137 ± 0.041	0.0080496
Q15005	Signal peptidase complex subunit 2	1.284 ± 0.113	0.0175197
P61009	Signal peptidase complex subunit 3	1.346 ± 0.183	0.0456823
O76094	Signal recognition particle subunit SRP72	1.936 ± 0.176	0.0005393
P42224-1	Signal transducer and activator of transcription 1- alpha/beta	4.888 ± 1.405	0.0028153
O43765	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha	0.899 ± 0.024	0.0048959
P62314	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	1.400 ± 0.156	0.0126126
O75691	Small subunit processome component 20 homolog	0.804 ± 0.060	0.0153335
Q96QD8	sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	3.557 ± 1.613	0.0164041
Q9Y6X4-1	Soluble lamin-associated protein of 75 kDa	1.332 ± 0.122	0.0109923
O60749	Sorting nexin-2	0.967 ± 0.012	0.0215679
Q9Y5X3	sorting nexin-5	0.935 ± 0.016	0.0055444
P52788-1	Spermine synthase	0.651 ± 0.097	0.0120153
Q15459	splicing factor 3A subunit 1	0.847 ± 0.052	0.0169126
Q12874	splicing factor 3a subunit 3	1.043 ± 0.022	0.0471523
P37268	squalene synthase	1.423 ± 0.124	0.0044283
Q9GZT3-1	SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial	0.681 ± 0.052	0.0019139
Q02318	Sterol 26-hydroxylase, mitochondrial	1.240 ± 0.026	0.0001259
Q9UQE7	Structural maintenance of chromosomes protein 3	0.769 ± 0.060	0.0092938
Q8NBJ7-1	Sulfatase-modifying factor 2	1.621 ± 0.265	0.0186694

Acession	Protein	Ratio (Treated/control)	p-value
O60264	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5	1.247 ± 0.056	0.0022671
Q96A49	Synapse-associated protein 1	0.758 ± 0.009	4.843E-06
Q99536	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	0.874 ± 0.021	0.0014038
Q9Y490	Talin-1	0.902 ± 0.044	0.0376179
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	0.950 ± 0.022	0.0352075
Q99614	tetratricopeptide repeat protein 1	0.745 ± 0.108	0.0479258
Q6P3X3	tetratricopeptide repeat protein 27	1.214 ± 0.005	3.311E-07
P10599-1	thioredoxin	0.796 ± 0.067	0.0194343
Q16762	thiosulfate sulfurtransferase	1.179 ± 0.031	0.0009733
Q86V81	THO complex subunit 4	1.192 ± 0.097	0.0440818
P04183	Thymidine kinase, cytosolic	0.746 ± 0.024	0.0002318
P51532-1	Transcription activator BRG1	1.306 ± 0.150	0.0301703
Q7KZ85	transcription elongation factor spt6	0.898 ± 0.039	0.0235121
P20290-1	transcription factor BTF3	0.846 ± 0.037	0.0053957
P52655-1	Transcription initiation factor IIA subunit 1	0.815 ± 0.082	0.047808
Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta	0.789 ± 0.036	0.001767
P25490	Transcriptional repressor protein YY1	0.754 ± 0.037	0.001287
Q12788	Transducin beta-like protein 3	1.223 ± 0.090	0.019691
P61586	Transforming protein RhoA	0.973 ± 0.012	0.0376496
P46199	Translation initiation factor IF-2, mitochondrial	0.472 ± 0.062	0.0014763
Q92616	translational activator GCN1	0.881 ± 0.051	0.0352187
P13693	Translationally-controlled tumor protein	0.907 ± 0.030	0.0127847
Q15631-1	Translin	0.883 ± 0.032	0.0082573
Q99805	Transmembrane 9 superfamily member 2	0.866 ± 0.035	0.0069102
Q92544	Transmembrane 9 superfamily member 4	1.165 ± 0.072	0.0245625
Q7Z7H5	Transmembrane emp24 domain-containing protein 4	0.921 ± 0.034	0.0336493
Q9UHN6-1	Transmembrane protein 2	0.730 ± 0.045	0.0020488
Q6UW68	Transmembrane protein 205	1.372 ± 0.169	0.0218383
Q3LXA3	Triokinase/FMN cyclase	0.958 ± 0.019	0.0391458
Q96G46	tRNA-dihydrouridine(47) synthase	0.767 ± 0.090	0.027114
Q9Y3I0	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	0.836 ± 0.070	0.0353945
P07226-1	Tropomyosin alpha-4 chain	0.913 ± 0.020	0.0038398
Q9BVA1	Tubulin beta-2B chain	0.606 ± 0.122	0.0199591
Q99426	tubulin-folding cofactor B	1.099 ± 0.035	0.0147399
O75347	Tubulin-specific chaperone A	0.886 ± 0.007	2.218E-05
Q14166	Tubulin--tyrosine ligase-like protein 12	0.902 ± 0.018	0.0016931
P09234	U1 small nuclear ribonucleoprotein C	1.331 ± 0.091	0.0045947
Q9BVJ6-1	U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A	1.290 ± 0.143	0.0309435
Q9Y5J1	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog	1.407 ± 0.237	0.0450364
Q9NYH9	U3 small nucleolar RNA-associated protein 6 homolog	1.433 ± 0.141	0.006209
O75643-1	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	0.904 ± 0.006	3.423E-05

Acession	Protein	Ratio (Treated/control)	p-value
O75208-1	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	1.018 ± 0.009	0.0440626
Q9UPU5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24	0.886 ± 0.041	0.0203898
P41226	ubiquitin-like modifier-activating enzyme 7	2.524 ± 0.333	0.0005717
P05161	Ubiquitin-like protein ISG15	9.055 ± 3.014	0.0006998
Q8WWC4	Uncharacterized protein C2orf47, mitochondrial	0.662 ± 0.069	0.0041784
Q9UM54-3	Unconventional myosin-VI	0.858 ± 0.070	0.049929
Q16851	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	1.106 ± 0.024	0.0030019
P26640	Valine--tRNA ligase	1.092 ± 0.031	0.0117186
P50552	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	0.756 ± 0.080	0.0218879
Q9BQB6-1	vitamin K epoxide reductase complex subunit 1	1.739 ± 0.165	0.0011146
P36543	V-type proton ATPase subunit E 1	0.888 ± 0.040	0.0200169
Q9BV38	WD repeat-containing protein 18	1.337 ± 0.144	0.0220181
P61964	WD repeat-containing protein 5	1.211 ± 0.048	0.0025544
Q9Y2W2	WW domain-binding protein 11	0.837 ± 0.058	0.0231317
P16989-1	Y-box-binding protein 3	0.801 ± 0.044	0.0049162
Q7ZZW4	zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	2.001 ± 0.512	0.0258972
Q96ME7	Zinc finger protein 512	1.920 ± 0.324	0.0075358
Q92785	Zinc finger protein ubi-d4	1.324 ± 0.120	0.0113623

การใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศในการสืบค้นหน้าที่และปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน

นอกจากโปรแกรม PD จะระบุหน้าที่ของโปรตีนที่ระบุเอกลักษณ์ด้วยเครื่อง MS ได้ดังแสดงในตารางที่ 18 แล้ว ซอฟต์แวร์ออนไลน์เช่น PANTHER และ DAVID ก็ยังถูกนำมาเพื่อจัดกลุ่มหน้าที่ของโปรตีนเหล่านี้ โดยพบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ที่ตอบสนองต่ออินเตอร์เฟียร์อนแลมปดา 3 ในเซลล์ HepG2.2.15 ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับ metabolic process, immune response, cellular process, viral defense เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 15 นอกจากนี้ KEGG pathway ซึ่งเป็นหนึ่งใน annotation ของ DAVID Bioinformatics Resources ที่ใช้ทำนายวิถีต่างๆ ที่โปรตีนที่ตอบสนองต่ออินเตอร์เฟียร์อนแลมปดา 3 เกี่ยวข้องเช่น proteasome และ antigen processing ดังแสดงในรูปที่ 16 - 19

ตารางที่ 18 หน้าที่ของโปรตีนจากโปรแกรม Proteome Discoverer

Protein	Biological Process
14-3-3 protein epsilon	cell organization and biogenesis;cellular component movement;regulation of biological process;response to stimulus;transport
14-3-3 protein eta	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
14-3-3 protein sigma	cell differentiation;cell organization and biogenesis;regulation of biological process;response to stimulus
14-3-3 protein zeta/delta	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	cell communication;cell differentiation;cell organization and biogenesis;metabolic process;response to stimulus
2'-5'-oligoadenylate synthase 3	defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein	defense response;regulation of biological process;response to stimulus
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
28S ribosomal protein S21, mitochondrial	cell organization and biogenesis;metabolic process
28S ribosomal protein S35, mitochondrial	cell organization and biogenesis;metabolic process;response to stimulus
39S ribosomal protein L11, mitochondrial	cell organization and biogenesis;metabolic process
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	cell differentiation;cell organization and biogenesis;metabolic process
40S ribosomal protein S11	cell differentiation;cell organization and biogenesis;metabolic process;transport
40S ribosomal protein S12	cell organization and biogenesis;metabolic process;transport
40S ribosomal protein S14	cell differentiation;cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;transport
40S ribosomal protein S15	cell differentiation;cell organization and biogenesis;metabolic process;transport
40S ribosomal protein S15a	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
40S ribosomal protein S16	cell organization and biogenesis;metabolic process;transport
40S ribosomal protein S19	cell differentiation;cell organization and biogenesis;cellular component movement;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
40S ribosomal protein S2	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;transport
40S ribosomal protein S3	cell death;cell division;cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport

Protein	Biological Process
40S ribosomal protein S30	cell organization and biogenesis;defense response;metabolic process;response to stimulus;transport
40S ribosomal protein S4, Y isoform 1	cell organization and biogenesis;development;metabolic process;transport
40S RIBOSOMAL PROTEIN S6	cell death;cell differentiation;cell organization and biogenesis;cell proliferation;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
40S ribosomal protein S8	cell organization and biogenesis;metabolic process;transport
60S acidic ribosomal protein P0	cell organization and biogenesis;metabolic process;response to stimulus;transport
60S acidic ribosomal protein P2	cell organization and biogenesis;metabolic process;transport
60S ribosomal protein L12	cell organization and biogenesis;metabolic process;transport
60S ribosomal protein L13a	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
60S ribosomal protein L14	cell organization and biogenesis;metabolic process;transport
60S ribosomal protein L19	cell organization and biogenesis;metabolic process;transport
60S ribosomal protein L22	cell differentiation;cell organization and biogenesis;metabolic process;transport
60S ribosomal protein L24	cell organization and biogenesis;cellular component movement;metabolic process;regulation of biological process;transport
60S ribosomal protein L27a	cell organization and biogenesis;metabolic process;transport
60S ribosomal protein L32	cell organization and biogenesis;metabolic process;response to stimulus;transport
60S ribosomal protein L7	cell organization and biogenesis;metabolic process;transport
60S ribosomal protein L7a	cell organization and biogenesis;metabolic process;transport
60S ribosomal protein L8	cell organization and biogenesis;metabolic process;transport
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	metabolic process
Acetolactate synthase-like protein	
Actin-binding LIM protein 1	cell organization and biogenesis
Actin-like protein 6A	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Actin-related protein 2	cell division;cell organization and biogenesis;cellular component movement;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Acylamino-acid-releasing enzyme	cell organization and biogenesis;metabolic process
Acyl-protein thioesterase 1	metabolic process;regulation of biological process
Adenine phosphoribosyltransferase	metabolic process;response to stimulus;transport
adenylosuccinate synthetase isozyme 2	metabolic process;response to stimulus
adenylyl cyclase-associated protein 1	cell organization and biogenesis;cellular component movement;regulation of biological process;response to stimulus;transport
ADP/ATP translocase 2	metabolic process;regulation of biological process;transport
ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 4	metabolic process
Adrenodoxin, mitochondrial	metabolic process;transport

Protein	Biological Process
A-kinase anchor protein 1, mitochondrial	coagulation;regulation of biological process;response to stimulus
Alanine aminotransferase 2	metabolic process
aldo-keto reductase family 1 member C1	cell differentiation;cell organization and biogenesis;metabolic process;response to stimulus;transport
Aldo-keto reductase family 1 member C2	cell differentiation;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
aldose reductase	metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
alpha-1-antitrypsin	cell organization and biogenesis;coagulation;defense response;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Alpha-2-HS-glycoprotein	defense response;regulation of biological process;response to stimulus;transport
alpha-soluble nsf attachment protein	cell communication;cell differentiation;cell organization and biogenesis;regulation of biological process;transport
AP-1 complex subunit beta-1	regulation of biological process;transport
AP-1 complex subunit sigma-1A	regulation of biological process;response to stimulus;transport
AP-3 complex subunit sigma-1	cellular component movement;regulation of biological process;response to stimulus;transport
APOBEC1 complementation factor	metabolic process;regulation of biological process
Arginine/serine-rich coiled-coil protein 2	
arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	metabolic process
asialoglycoprotein receptor 1	cell communication;response to stimulus;transport
Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic	cell organization and biogenesis;metabolic process
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	metabolic process;regulation of biological process;transport
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	cell differentiation;cell organization and biogenesis;cellular homeostasis;metabolic process;regulation of biological process;transport
ATP synthase subunit e, mitochondrial	metabolic process;transport
ATP-binding cassette sub-family F member 1	defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial	metabolic process;regulation of biological process
ATP-dependent RNA helicase DDX1	cell organization and biogenesis;development;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
ATP-dependent RNA helicase DDX18	metabolic process;response to stimulus
BAG family molecular chaperone regulator 2	metabolic process;regulation of biological process
Beta-hexosaminidase subunit beta	cell organization and biogenesis;cellular component movement;cellular homeostasis;metabolic process;regulation of biological process;reproduction;response to stimulus
Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
bifunctional purine biosynthesis protein purH	metabolic process;response to stimulus
Bile salt sulfotransferase	metabolic process

Protein	Biological Process
Biliverdin reductase A	metabolic process
bone marrow stromal antigen 2	cell communication;cell proliferation;cellular component movement;defense response;development;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Breakpoint cluster region protein	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Calmodulin	metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Calponin-2	cell organization and biogenesis;regulation of biological process;response to stimulus
Calreticulin	cell differentiation;cell organization and biogenesis;cellular homeostasis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	coagulation;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Caprin-1	cell differentiation;regulation of biological process
casein kinase II subunit alpha'	cell death;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Casein kinase II subunit beta	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2	metabolic process;regulation of biological process
Cell division control protein 42 homolog	cell communication;cell differentiation;cell division;cell organization and biogenesis;cellular component movement;coagulation;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Centromere protein H	cell organization and biogenesis
Centromere/kinetochore protein zw10 homolog	cell division;cell organization and biogenesis;regulation of biological process;transport
Chloride intracellular channel protein 4	cell death;cell differentiation;cell organization and biogenesis;cellular homeostasis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
coactosin-like protein	defense response;response to stimulus
Coatomer subunit gamma-1	cellular component movement;transport
Cocaine esterase	metabolic process
Cofilin-1	cell organization and biogenesis;regulation of biological process;response to stimulus
Complement C4-A	defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	cell death;cell organization and biogenesis;defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Complement factor B	defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
COP9 signalosome complex subunit 6	cell organization and biogenesis;metabolic process;response to stimulus
Copper transport protein ATOX1	cellular homeostasis;response to stimulus;transport

Protein	Biological Process
Core histone macro-H2A.2	cell organization and biogenesis;regulation of biological process
cTAGE family member 5	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;transport
Cystatin-C	cell death;cell organization and biogenesis;defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Cytochrome b5 type B	metabolic process;transport
Cytochrome c oxidase assembly factor 3 homolog, mitochondrial	cell organization and biogenesis;regulation of biological process
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	metabolic process;transport
Cytochrome c oxidase subunit 6C	metabolic process;transport
Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial	transport
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	metabolic process
delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	metabolic process
deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	cell organization and biogenesis;defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
developmentally-regulated GTP-binding protein 1	development;metabolic process;transport
dihydrofolate reductase	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
DNA replication licensing factor mcm2	cell organization and biogenesis;metabolic process;response to stimulus
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	cell death;cell differentiation;cell organization and biogenesis;cell proliferation;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
DNA-directed RNA polymerase, mitochondrial	cell organization and biogenesis;metabolic process
DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial	cell death;cell differentiation;cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
DnaJ homolog subfamily C member 8	metabolic process
dnaJ homolog subfamily C member 9	regulation of biological process;response to stimulus
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	metabolic process
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	metabolic process;response to stimulus
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit DAD1	cell death;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A	metabolic process
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B	metabolic process;response to stimulus
Dynactin subunit 1	cell organization and biogenesis;cellular component movement;metabolic process;regulation of biological process;transport
E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25	defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Early endosome antigen 1	cell organization and biogenesis;metabolic process;transport

Protein	Biological Process
Endophilin-A2	regulation of biological process;response to stimulus;transport
Endoplasmic reticulum lectin 1	metabolic process
Endoplasmic reticulum resident protein 27	metabolic process;response to stimulus
Endoplasmic reticulum resident protein 44	cellular homeostasis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Enhancer of rudimentary homolog	cell differentiation;metabolic process;regulation of biological process
Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8	cell organization and biogenesis;cell proliferation;cellular component movement;regulation of biological process;response to stimulus
epoxide hydrolase 1	metabolic process;response to stimulus
ER membrane protein complex subunit 1	metabolic process
Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11	metabolic process
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	cell communication;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	cell death;metabolic process;regulation of biological process
Eukaryotic translation initiation factor 4H	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;reproduction
Exosome complex component csl4	metabolic process;regulation of biological process
Exosome complex component RRP42	metabolic process;regulation of biological process
exosome complex exonuclease RRP44	metabolic process;regulation of biological process
FACT complex subunit SPT16	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Fatty acid-binding protein, epidermal	metabolic process;response to stimulus;transport
Fibrinogen gamma chain	cell organization and biogenesis;coagulation;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Flotillin-2	cell communication;cell organization and biogenesis;regulation of biological process
fragile X mental retardation protein 1	metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Galectin-3-binding protein	defense response;regulation of biological process;response to stimulus;transport
gamma-glutamylcyclotransferase	cell organization and biogenesis;metabolic process
General transcription factor 3C polypeptide 2	metabolic process
Geranylgeranyl transferase type-2 subunit beta	metabolic process;regulation of biological process
Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	cell communication;cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
glutamine--tRNA ligase	metabolic process
Glycogen phosphorylase, liver form	cell death;metabolic process

Protein	Biological Process
Golgi phosphoprotein 3	cell organization and biogenesis;cell proliferation;cellular component movement;metabolic process;regulation of biological process;transport
GPI transamidase component PIG-T	cell death;cell differentiation;metabolic process
Granulins	cell proliferation;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Growth factor receptor-bound protein 2	cell communication;cell differentiation;cell organization and biogenesis;cellular component movement;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Growth/differentiation factor 15	cell communication;regulation of biological process;response to stimulus
GrpE protein homolog 1, mitochondrial	metabolic process;regulation of biological process;transport
Guanine nucleotide-binding protein-like 3	cell proliferation;regulation of biological process;transport
HBS1-like protein	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
hepatoma-derived growth factor	cell proliferation;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
High mobility group protein B1	cell differentiation;cell organization and biogenesis;cell proliferation;cellular component movement;cellular homeostasis;defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
high mobility group protein HMGI-C	cell communication;cell differentiation;cell division;cell organization and biogenesis;cell proliferation;development;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Histidine triad nucleotide-binding protein 1	cell death;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Histone H1.3	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process
Histone H1x	cell organization and biogenesis
Histone-arginine methyltransferase CARM1	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain	defense response;regulation of biological process;response to stimulus
Importin-7	defense response;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein	response to stimulus
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	cell proliferation;metabolic process;regulation of biological process;transport

Protein	Biological Process
Integrin alpha-1	cell organization and biogenesis;cellular component movement;regulation of biological process;response to stimulus
Integrin alpha-2	cell differentiation;cell organization and biogenesis;cell proliferation;cellular component movement;coagulation;regulation of biological process;response to stimulus
interferon-induced GTP-binding protein Mx2	cell organization and biogenesis;defense response;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	defense response;regulation of biological process;response to stimulus
Interferon-induced transmembrane protein 3	defense response;regulation of biological process;response to stimulus
interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase	cell communication;defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Isocitrate dehydrogenase	metabolic process
isocitrate dehydrogenase	metabolic process;regulation of biological process
Isoform 1 of Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	
Isoform 2 of Acid ceramidase	metabolic process
Isoform 2 of Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1	cell communication;cell death;cellular component movement;defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Isoform 2 of ATP-binding cassette sub-family F member 2	transport
Isoform 2 of B-cell receptor-associated protein 31	cell organization and biogenesis;cellular homeostasis;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Isoform 2 of BRCA2 and CDKN1A-interacting protein	cell differentiation;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Isoform 2 of Catenin alpha-1	
Isoform 2 of Chitinase domain-containing protein 1	defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Isoform 2 of Cytochrome c oxidase protein 20 homolog	cell organization and biogenesis;metabolic process
Isoform 2 of Dehydrogenase/reductase SDR family member 2, mitochondrial	cell differentiation;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Isoform 2 of E3 ubiquitin-protein ligase RNF213	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process
Isoform 2 of ELAV-like protein 1	development;metabolic process;regulation of biological process
Isoform 2 of Elongation factor 1-gamma	metabolic process;response to stimulus
Isoform 2 of Endophilin-B1	cell communication;cell death;cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Isoform 2 of Eukaryotic initiation factor 4A-II	metabolic process;regulation of biological process
Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	

Protein	Biological Process
Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	cell death;metabolic process;regulation of biological process;transport
Isoform 2 of Far upstream element-binding protein 1	metabolic process;regulation of biological process
Isoform 2 of Golgin subfamily B member 1	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;transport
Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	cell organization and biogenesis;regulation of biological process
Isoform 2 of Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	metabolic process
Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 8	cell death;cell differentiation;cell organization and biogenesis;regulation of biological process;response to stimulus
Isoform 2 of Leucine carboxyl methyltransferase 1	metabolic process;regulation of biological process
Isoform 2 of Mannose-1-phosphate guanylttransferase alpha	metabolic process
Isoform 2 of Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	cell organization and biogenesis;metabolic process;transport
Isoform 2 of Myb-binding protein 1A	cell communication;cell differentiation;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Isoform 2 of NADH dehydrogenase	
Isoform 2 of Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	cell death;defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Isoform 2 of Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8	cell death;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Isoform 2 of Protein disulfide-isomerase A6	cellular homeostasis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Isoform 2 of Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	metabolic process
Isoform 2 of Regulator of chromosome condensation	cell division;cell organization and biogenesis;regulation of biological process
Isoform 2 of Secernin-1	metabolic process;transport
Isoform 2 of Serine-threonine kinase receptor-associated protein	cell organization and biogenesis;regulation of biological process
Isoform 2 of S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase	metabolic process;response to stimulus
Isoform 2 of Stress-induced-phosphoprotein 1	response to stimulus
Isoform 2 of TATA element modulatory factor	cell differentiation;cell organization and biogenesis;cellular component movement;defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Isoform 2 of Tether containing UBX domain for GLUT4	regulation of biological process;transport
Isoform 2 of Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	metabolic process
Isoform 2 of Transforming acidic coiled-coil-containing protein 1	cell division;cell organization and biogenesis;cell proliferation;cellular component movement;regulation of biological process;transport

Protein	Biological Process
Isoform 2 of Tropomyosin alpha-1 chain	
Isoform 2 of Utrophin	
Isoform 3 of Ataxin-2-like protein	cell organization and biogenesis;regulation of biological process
Isoform 3 of Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	metabolic process;regulation of biological process
Isoform 3 of Clathrin interactor 1	cell organization and biogenesis;transport
Isoform 3 of Golgi reassembly-stacking protein 2	cell organization and biogenesis
Isoform 3 of Importin-5	cell organization and biogenesis;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Isoform 3 of Polyadenylate-binding protein 4	coagulation;metabolic process
Isoform 3 of Scaffold attachment factor B1	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Isoform 4 of Cold shock domain-containing protein E1	metabolic process;regulation of biological process
Isoform 4 of DNA topoisomerase 2-alpha	metabolic process
Isoform 4 of Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	metabolic process
Isoform 4 of NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit	cell death;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Isoform 4 of Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase	metabolic process;regulation of biological process
Isoform 4 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	metabolic process;regulation of biological process
Isoform 5 of AP-3 complex subunit delta-1	cell organization and biogenesis;cellular component movement;metabolic process;regulation of biological process;transport
Isoform 5 of Nuclear pore complex protein Nup214	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;transport
Isoform 5 of RNA-binding protein EWS	metabolic process;regulation of biological process
Isoform 6 of Cellular nucleic acid-binding protein	metabolic process;regulation of biological process
Isoform 8 of Protein transport protein Sec31A	cell organization and biogenesis;response to stimulus;transport
Isoform 9 of Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	
Isoform C of RNA-binding protein with multiple splicing	metabolic process;regulation of biological process
Isoform F of Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	
Isoform Non-brain of Clathrin light chain A	cellular component movement;regulation of biological process;transport
Junction plakoglobin	cell organization and biogenesis;cellular component movement;regulation of biological process;response to stimulus
Keratin, type I cytoskeletal 19	cell differentiation;cell organization and biogenesis;regulation of biological process;response to stimulus

Protein	Biological Process
Kinesin-1 heavy chain	cell differentiation;cell organization and biogenesis;cellular component movement;metabolic process;regulation of biological process;transport
lactoylglutathione lyase	cell differentiation;metabolic process;regulation of biological process
Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma	regulation of biological process
Lamin-B1	regulation of biological process
lanC-like protein 2	regulation of biological process
LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1, mitochondrial	cell organization and biogenesis;cellular homeostasis
Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	cellular component movement;metabolic process;regulation of biological process;transport
Leukocyte elastase inhibitor	regulation of biological process
leukotriene A-4 hydrolase	cell differentiation;defense response;metabolic process;response to stimulus
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	cell differentiation;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Lupus La protein	metabolic process
Lymphoid-specific helicase	cell division;cell organization and biogenesis;cell proliferation;development;metabolic process;regulation of biological process
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	cell death;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase, mitochondrial	metabolic process
Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	metabolic process
methionine aminopeptidase 2	metabolic process;regulation of biological process
MICOS complex subunit MIC26	cell organization and biogenesis;transport
Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5	cell organization and biogenesis;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Mimitin, mitochondrial	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process
Mini-chromosome maintenance complex-binding protein	cell division;cell organization and biogenesis;metabolic process
mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM13	cell organization and biogenesis;transport
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A	transport
mitochondrial-processing peptidase subunit beta	metabolic process
mitogen-activated protein kinase 1	cell communication;cell death;cell differentiation;cell proliferation;cellular component movement;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD1	cell division;cell organization and biogenesis;regulation of biological process
Myotrophin	cell differentiation;cell growth;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus

Protein	Biological Process
Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	cell differentiation;cell organization and biogenesis;cellular homeostasis;regulation of biological process;response to stimulus;transport
NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	cellular homeostasis;metabolic process;regulation of biological process;transport
NADH dehydrogenase	cell organization and biogenesis;metabolic process;transport
NADH dehydrogenase	cell organization and biogenesis;metabolic process;transport
NADH dehydrogenase	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	metabolic process;regulation of biological process;transport
NEDD8	metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Nestin	cell organization and biogenesis;cell proliferation;development;regulation of biological process
Neuroblast differentiation-associated protein AHNK	cell organization and biogenesis;regulation of biological process
NHL repeat-containing protein 2	cellular homeostasis;metabolic process;regulation of biological process
Non-specific lipid-transfer protein	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;transport
nuclear migration protein nudC	cell division;cell organization and biogenesis;cell proliferation;development;metabolic process
Nuclear pore complex protein Nup205	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;transport
Nucleolar protein 56	metabolic process
Nucleolar protein 58	cell growth;metabolic process;transport
Nucleolar RNA helicase 2	cell differentiation;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Nucleolar transcription factor 1	metabolic process;regulation of biological process
obg-like ATPase 1	metabolic process;transport
opioid growth factor receptor	regulation of biological process;response to stimulus
Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	metabolic process;response to stimulus
p53 and DNA damage-regulated protein 1	metabolic process
Palmitoyl-protein thioesterase 1	cell communication;cell organization and biogenesis;cellular homeostasis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Partitioning defective 3 homolog	cell differentiation;cell division;cell organization and biogenesis;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Paternally-expressed gene 3 protein	cell death;metabolic process;regulation of biological process
PCTP-like protein	regulation of biological process;transport
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial	cell death;cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 gamma	metabolic process;regulation of biological process

Protein	Biological Process
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	cellular homeostasis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Phospholemman	regulation of biological process;transport
Plakophilin-2	cell communication;cell organization and biogenesis;regulation of biological process
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	cell communication;cell differentiation;cell division;cell organization and biogenesis;cell proliferation;cellular component movement;development;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Poly [ADP-ribose] polymerase 1	cell differentiation;cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Polymerase delta-interacting protein 3	metabolic process;regulation of biological process;transport
Prefoldin subunit 2	metabolic process;regulation of biological process
Prefoldin subunit 4	metabolic process
prefoldin subunit 5	metabolic process;regulation of biological process
Pre-mRNA-splicing factor RBM22	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
pre-rRNA processing protein FTSJ3	metabolic process
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52	metabolic process
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process
Probable dimethyladenosine transferase	metabolic process
Probable RNA-binding protein 19	development;regulation of biological process
Probable rRNA-processing protein EBP2	metabolic process
prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	cell proliferation;development;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process
Proteasome activator complex subunit 1	metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
proteasome activator complex subunit 2	metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Proteasome assembly chaperone 2	cell organization and biogenesis;regulation of biological process
protein 4.1	cell organization and biogenesis
Protein deglycase DJ-1	cell communication;cell organization and biogenesis;defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Protein DEK	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Protein diaphanous homolog 1	cell organization and biogenesis;regulation of biological process;response to stimulus
Protein Dr1	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process
Protein enabled homolog	cellular component movement

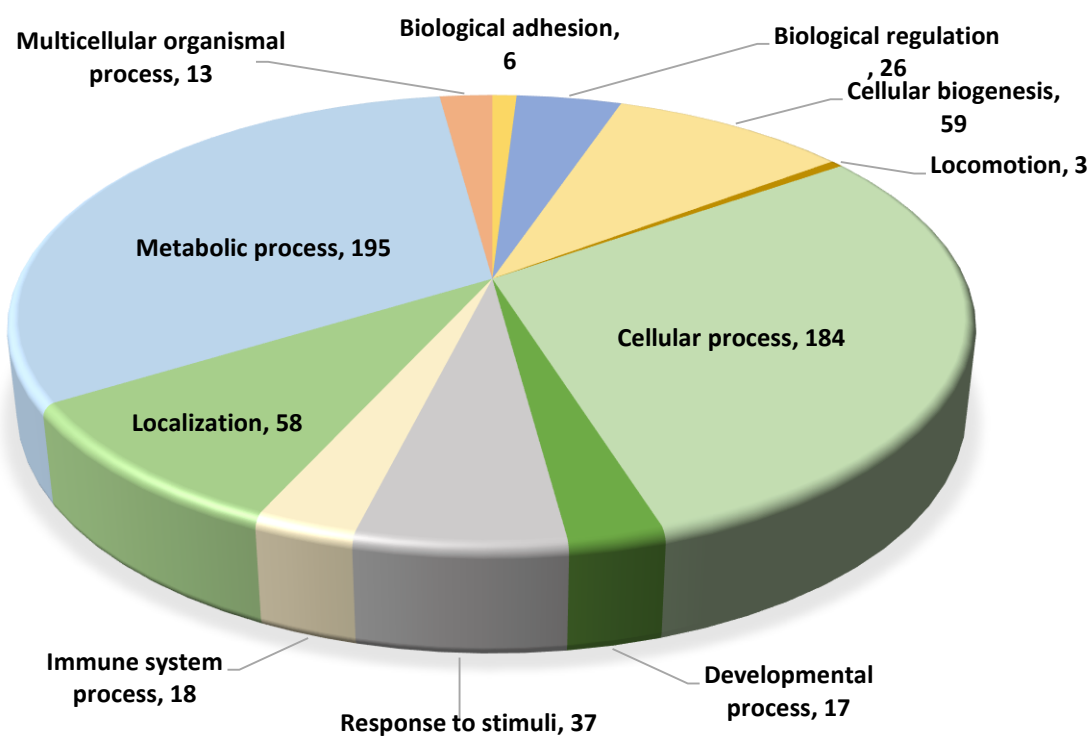
Protein	Biological Process
Protein FAM91A1	
protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
protein flightless-1 homolog	cell organization and biogenesis;development;metabolic process;regulation of biological process
Protein HEXIM1	metabolic process;regulation of biological process
protein LYRIC	cell organization and biogenesis;regulation of biological process;response to stimulus
Protein NipSnap homolog 1	
Protein PBDC1	
Protein PML	cell death;cell differentiation;cell organization and biogenesis;cellular component movement;cellular homeostasis;defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
protein quaking	cell differentiation;development;metabolic process;regulation of biological process;transport
Protein S100-P	cellular component movement;response to stimulus
Protein sel-1 homolog 1	metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Protein transport protein Sec24A	cell organization and biogenesis;regulation of biological process;transport
Protein transport protein sec24c	cell organization and biogenesis;regulation of biological process;transport
protein transport protein Sec61 subunit beta	metabolic process;transport
Prothymosin alpha	cell organization and biogenesis;metabolic process
Putative helicase MOV-10	metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Pyridoxal-dependent decarboxylase domain- containing protein 1	metabolic process
Pyridoxine-5'-phosphate oxidase	metabolic process;regulation of biological process
Ragulator complex protein LAMTOR5	cell communication;cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Ran-specific GTPase-activating protein	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	regulation of biological process;response to stimulus;transport
ras-related protein rab-10	cell differentiation;cell organization and biogenesis;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Ras-related protein Rab-2A	cell organization and biogenesis;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Reelin	cell differentiation;cell organization and biogenesis;cellular component movement;development;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Regulator of microtubule dynamics protein 3	cell death;cell differentiation;cellular homeostasis
Retrotransposon-derived protein PEG10	cell death;cell differentiation;cell organization and biogenesis;regulation of biological process;reproduction

Protein	Biological Process
Rho-associated protein kinase 2	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Ribonuclease inhibitor	metabolic process;regulation of biological process
Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	cell organization and biogenesis;cell proliferation;metabolic process;response to stimulus
Ribosomal L1 domain-containing protein 1	cell differentiation;metabolic process;regulation of biological process
Ribosomal protein S6 kinase alpha-3	cell death;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Ribosomal RNA small subunit methyltransferase Nep1	metabolic process
RNA-binding motif protein, X chromosome	cell differentiation;cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
RNA-binding protein 12	
RNA-binding protein 27	metabolic process
RNA-binding protein 8A	metabolic process;regulation of biological process;transport
RNA-binding protein FUS	metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	cell differentiation;cell organization and biogenesis;metabolic process
RRP12-like protein	
S-adenosylmethionine synthase isoform type-1	cell organization and biogenesis;metabolic process
SAP domain-containing ribonucleoprotein	metabolic process;regulation of biological process;transport
scaffold attachment factor B2	cell differentiation;metabolic process;regulation of biological process
Septin-7	cell division;cell organization and biogenesis;regulation of biological process
Septin-9	cell division;cell organization and biogenesis;regulation of biological process
Serine/arginine-rich splicing factor 1	cell differentiation;cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;transport
Serine/arginine-rich splicing factor 6	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Serine/threonine-protein kinase OSR1	metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	cell death;cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Serine/threonine-protein phosphatase Pgam5, mitochondrial	cell death;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Serotransferrin	cellular homeostasis;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Serpin H1	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
S-formylglutathione hydrolase	metabolic process

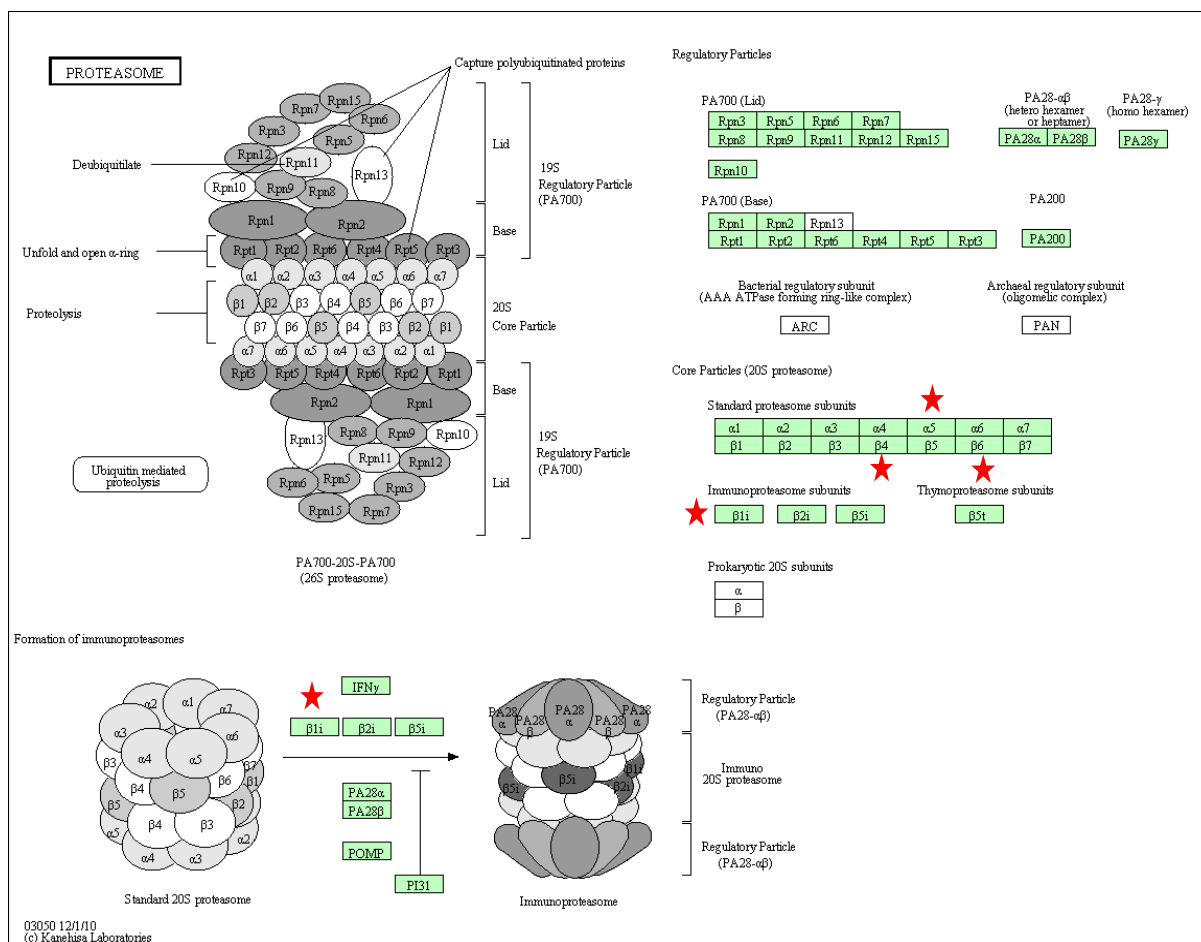
Protein	Biological Process
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	cell organization and biogenesis;cellular homeostasis;metabolic process;regulation of biological process
SH3 domain-containing kinase-binding protein 1	cell communication;cell death;cell organization and biogenesis;cellular component movement;metabolic process;regulation of biological process;transport
Sideroflexin-1	cell differentiation;transport
Sideroflexin-3	transport
Signal peptidase complex subunit 2	metabolic process;transport
Signal peptidase complex subunit 3	metabolic process
Signal recognition particle subunit SRP72	cell organization and biogenesis;response to stimulus;transport
Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	cell death;cell differentiation;cell proliferation;cellular component movement;defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha	regulation of biological process
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;transport
Small subunit processome component 20 homolog	metabolic process;regulation of biological process
sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	cell communication;response to stimulus;transport
Soluble lamin-associated protein of 75 kDa	
Sorting nexin-2	cell organization and biogenesis;transport
sorting nexin-5	cell organization and biogenesis;regulation of biological process;transport
Spermine synthase	metabolic process
splicing factor 3A subunit 1	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process
splicing factor 3a subunit 3	cell organization and biogenesis;metabolic process
squalene synthase	metabolic process
SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial	cell organization and biogenesis;cellular component movement;metabolic process;regulation of biological process
Sterol 26-hydroxylase, mitochondrial	metabolic process
Structural maintenance of chromosomes protein 3	cell division;cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Sulfatase-modifying factor 2	metabolic process
SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Synapse-associated protein 1	
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	metabolic process;regulation of biological process
Talin-1	cell organization and biogenesis;cellular component movement;transport
T-complex protein 1 subunit alpha	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;transport
tetratricopeptide repeat protein 1	metabolic process

Protein	Biological Process
tetratricopeptide repeat protein 27	
thioredoxin	cell communication;cell proliferation;cellular component movement;cellular homeostasis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
thiosulfate sulfurtransferase	cell differentiation;metabolic process;transport
THO complex subunit 4	cell differentiation;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Thymidine kinase, cytosolic	cell organization and biogenesis;cell proliferation;metabolic process;response to stimulus
Transcription activator BRG1	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process
transcription elongation factor spt6	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;transport
transcription factor BTF3	metabolic process;regulation of biological process;transport
Transcription initiation factor IIA subunit 1	metabolic process;regulation of biological process
Transcription intermediary factor 1-beta	cell organization and biogenesis;defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Transcriptional repressor protein YY1	cell differentiation;cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Transducin beta-like protein 3	metabolic process
Transforming protein RhoA	cell division;cell organization and biogenesis;cellular component movement;regulation of biological process;response to stimulus
Translation initiation factor IF-2, mitochondrial	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
translational activator GCN1	cell communication;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Translationally-controlled tumor protein	cell differentiation;cellular homeostasis;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Translin	metabolic process;regulation of biological process
Transmembrane 9 superfamily member 2	transport
Transmembrane 9 superfamily member 4	cell organization and biogenesis;cellular homeostasis;regulation of biological process;response to stimulus;transport
Transmembrane emp24 domain-containing protein 4	regulation of biological process;response to stimulus;transport
Transmembrane protein 2	development
Transmembrane protein 205	
Triokinase/FMN cyclase	defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
tRNA-dihydrouridine(47) synthase	metabolic process
tRNA-splicing ligase RtcB homolog	metabolic process
Tropomyosin alpha-4 chain	cell differentiation;cellular component movement
Tubulin beta-2B chain	cell organization and biogenesis;cellular component movement

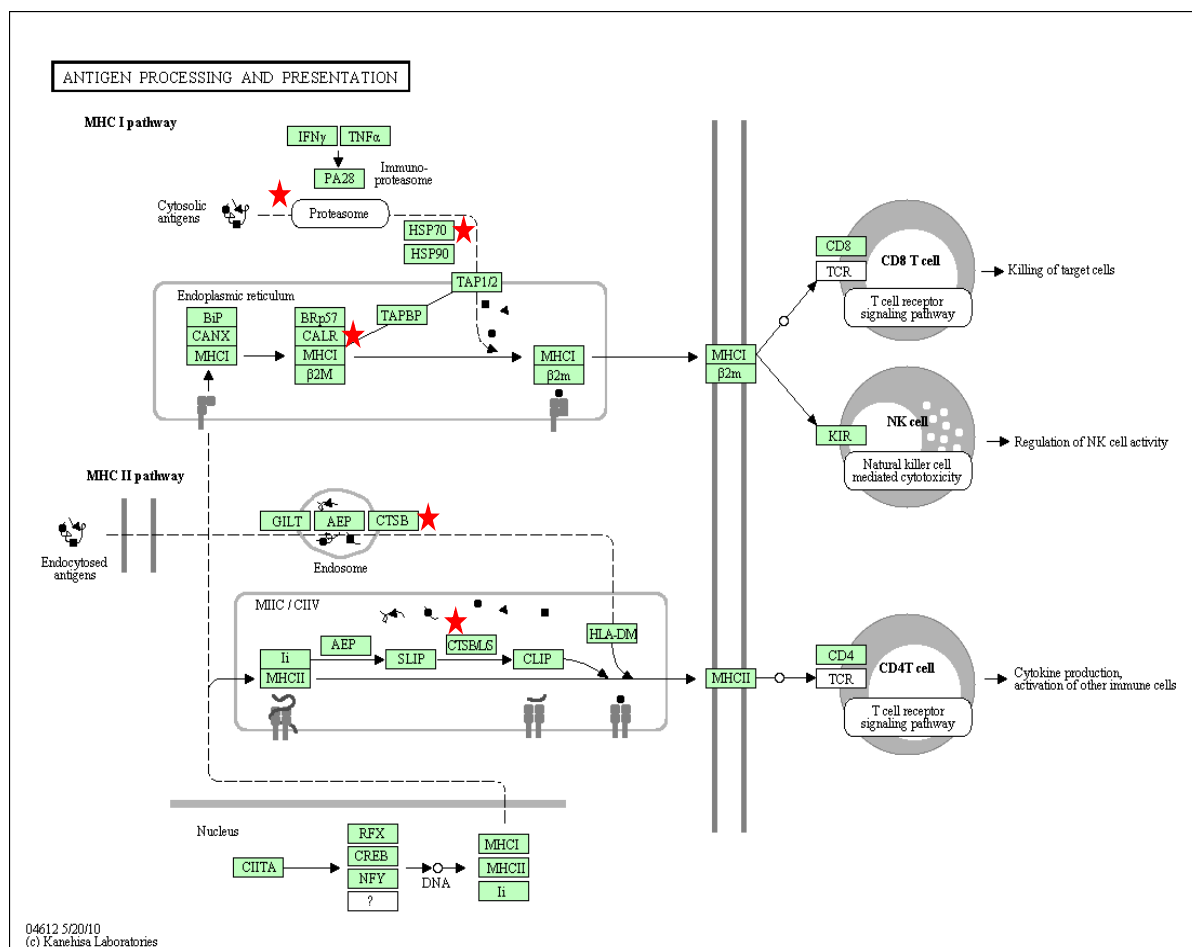
Protein	Biological Process
tubulin-folding cofactor B	cell differentiation;development
Tubulin-specific chaperone A	cell organization and biogenesis;metabolic process
Tubulin--tyrosine ligase-like protein 12	metabolic process
U1 small nuclear ribonucleoprotein C	cell organization and biogenesis;metabolic process
U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A	metabolic process
U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog	metabolic process
U3 small nucleolar RNA-associated protein 6 homolog	metabolic process
U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	cell differentiation;cell organization and biogenesis;metabolic process
Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	metabolic process
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24	cellular component movement;metabolic process
ubiquitin-like modifier-activating enzyme 7	metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Ubiquitin-like protein ISG15	defense response;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
Uncharacterized protein C2orf47, mitochondrial	cell organization and biogenesis;cellular homeostasis;transport
Unconventional myosin-VI	cellular component movement;regulation of biological process;response to stimulus;transport
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	metabolic process
Valine--tRNA ligase	metabolic process;regulation of biological process
Vasodilator-stimulated phosphoprotein	cell organization and biogenesis;cellular component movement;regulation of biological process
vitamin K epoxide reductase complex subunit 1	coagulation;metabolic process
V-type proton ATPase subunit E 1	cellular homeostasis;regulation of biological process;response to stimulus;transport
WD repeat-containing protein 18	development;metabolic process
WD repeat-containing protein 5	cell organization and biogenesis;metabolic process;regulation of biological process
WW domain-binding protein 11	metabolic process;regulation of biological process
Y-box-binding protein 3	metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus
zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	defense response;regulation of biological process;response to stimulus
Zinc finger protein 512	metabolic process;regulation of biological process
Zinc finger protein ubi-d4	cell death;metabolic process;regulation of biological process;response to stimulus



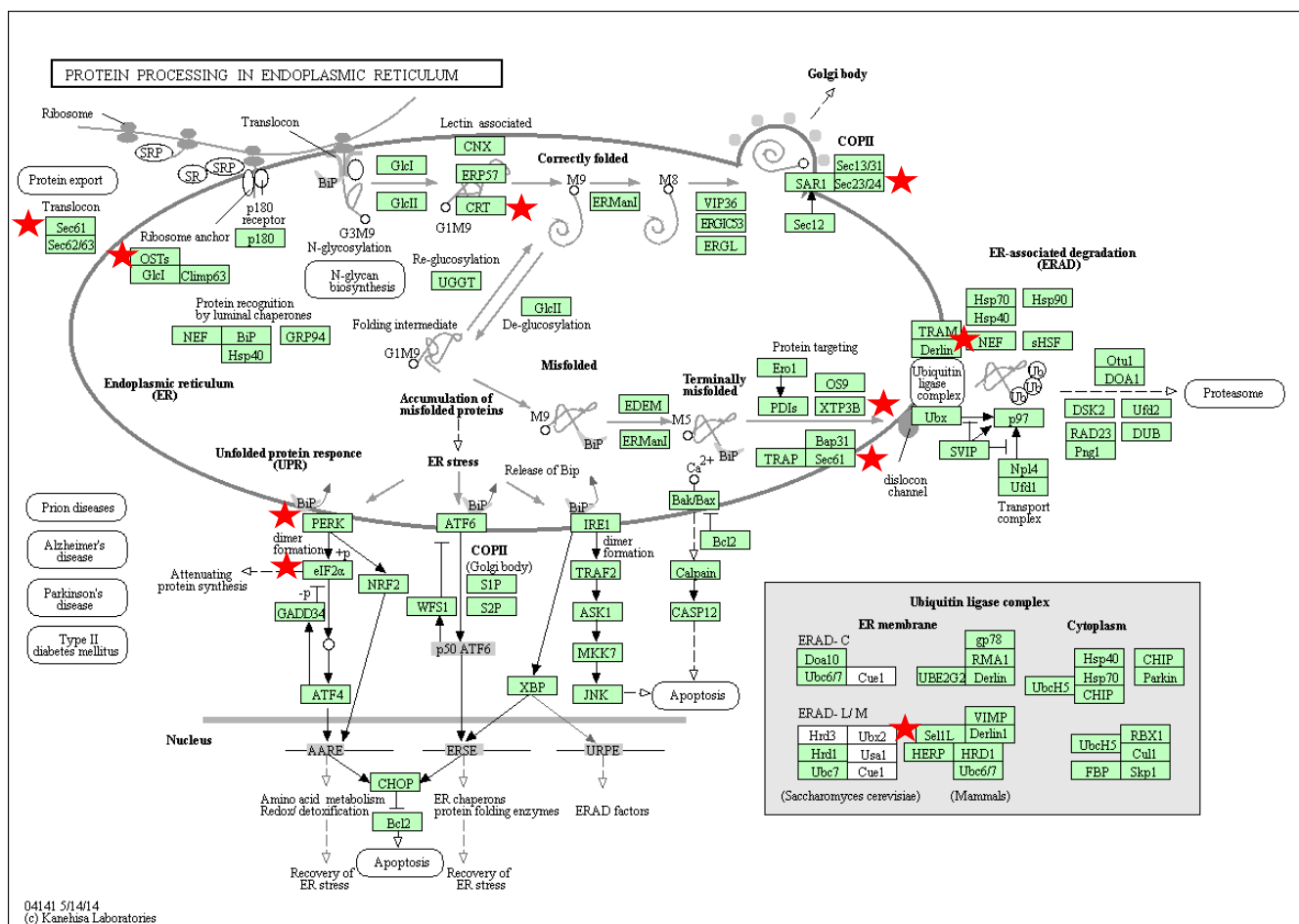
รูปที่ 15 การจัดกลุ่มหน้าที่ของโปรตีนในเซลล์ HepG2.2.15 ที่ตอบสนองต่ออินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3. โดยโปรตีนเหล่านี้ถูกนำมาจัดกลุ่มหน้าที่โดยใช้ PANTHER bioinformatics tool ซึ่งใช้ฐานข้อมูล Swiss-Prot



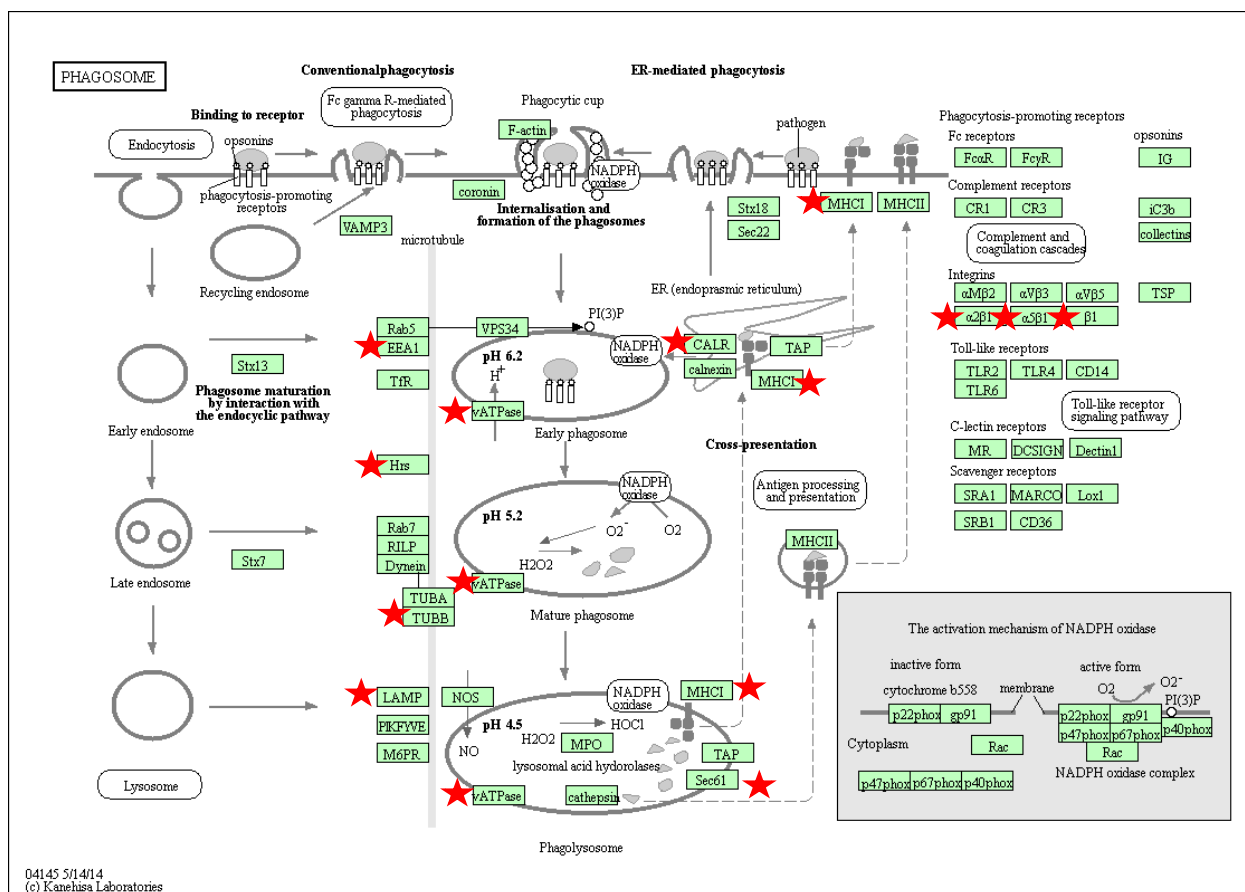
รูปที่ 16 Proteasome pathway. โดยวิธีนี้ถูกทำนายโดย KEGG pathway โดยดาวสีแดงแสดงถึงโปรตีนที่พบในการศึกษานี้



รูปที่ 17 Antigen processing and presentation. โดยวิธีนี้ถูกทำนายโดย KEGG pathway โดยดาวสีแดงแสดงถึงโปรตีนที่พบในการศึกษานี้

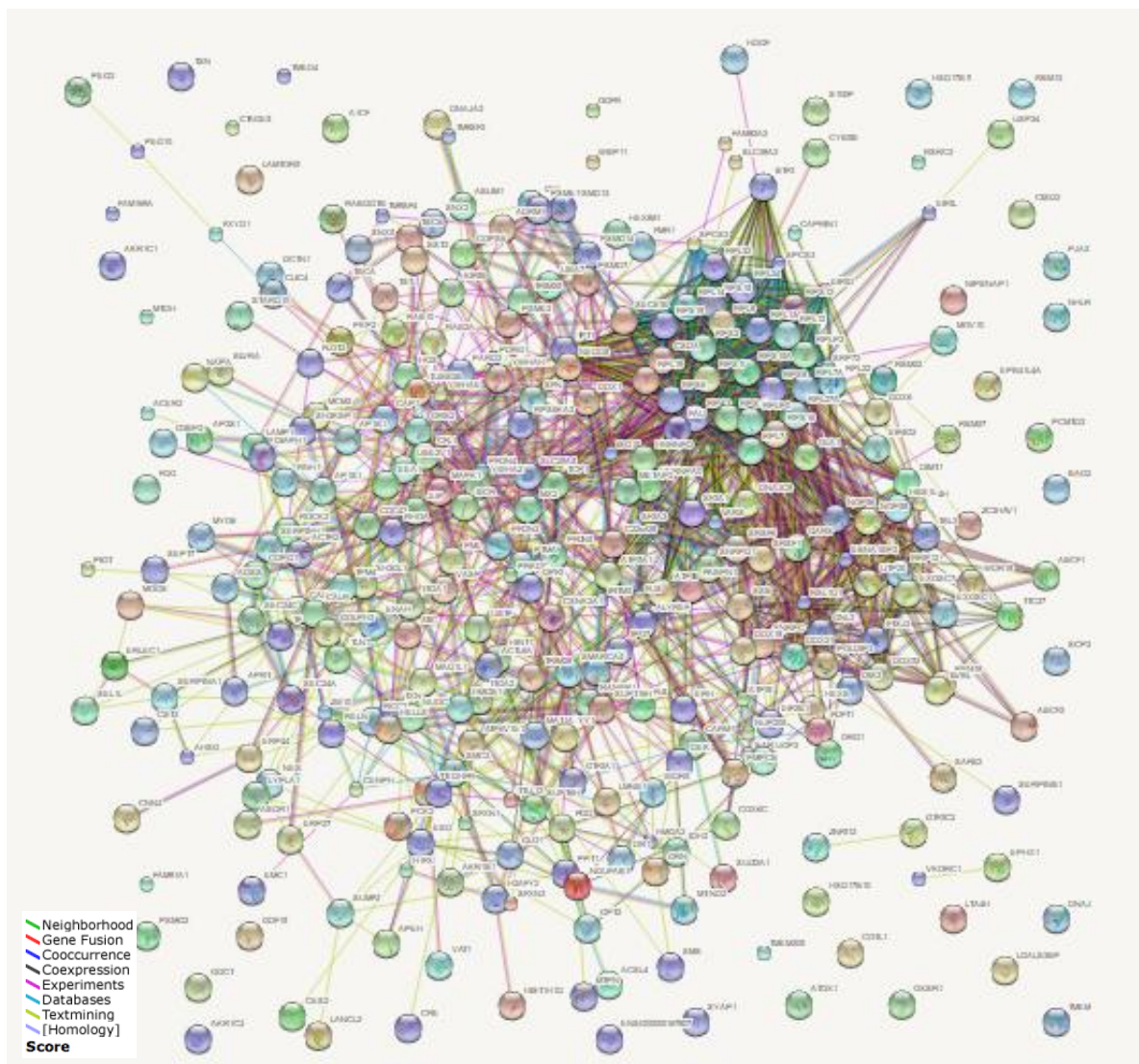


รูปที่ 18 Protein processing in ER. โดยวิธีนี้ถูกทำนวยโดย KEGG pathway โดยดาวสีแดงแสดงถึงโปรตีนที่พบในการศึกษานี้



รูปที่ 19 Phagosome. โดยวิธีนี้ถูกทำนายโดย KEGG pathway โดยดาวสีแดงแสดงถึงโปรตีนที่พบในการศึกษานี้

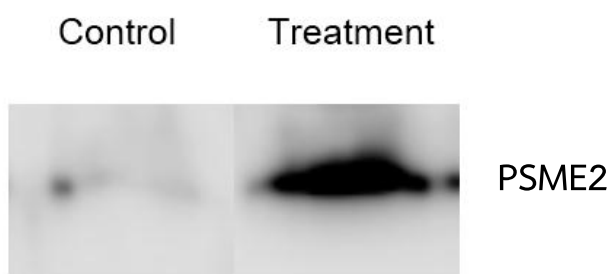
ยิ่งไปกว่านั้น การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนสามารถทำได้โดยใช้ STRING version 9.1 เพื่อสร้าง network จากโปรตีนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยชื่อของโปรตีนเหล่านี้จะถูกอัปโหลดลงออนไลน์ซอฟต์แวร์ จากนั้น network ที่สัมพันธ์กับหลายๆ หน้าที่เช่น antigen processing and presentation และ metabolic process จะแสดงในรูปที่ 20



รูปที่ 20 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน โดย network นี้สร้างจาก STRING bioinformatics tool

การยืนยันผลโปรตีนโอมิกส์ด้วยวิธี western blotting

เพื่อเป็นการยืนยันผลจากการศึกษาด้วยวิธีทางโปรตีโอมิกส์ โปรตีน proteasome activator complex subunit 2 (PSME2) ถูกเลือกมาเพื่อทำ western blotting โดยสอดคล้องกับผลโปรตีโอมิกส์ โปรตีน PSME2 มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหลังได้รับการกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ดังแสดงในรูปที่ 21 จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าผลการศึกษาจากโปรตีโอมิกส์นั้นมีความน่าเชื่อถือ



รูปที่ 21 การยืนยันผลโปรตีนโอมิกส์ด้วยวิธี WB. การแสดงออกของโปรตีน proteasome activator complex subunit 2 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาจากโปรตีโอมิกส์

อภิปรายผลการทดลอง

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบียังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก(2) โดยพบว่ามีประชากรถึง 4 พันล้านคนที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังสามารถพัฒนาไปเป็นตับแข็งและมะเร็งตับได้ซึ่งโรคที่เกี่ยวข้องเหล่านี้เป็นสาเหตุการตายของผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสูงถึง 6 แสนคนต่อปี(22, 25, 31) แม้ว่าอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาและยาต้านไวรัสชนิดนิวคลีโอไทด์อะนาล็อกจะใช้เป็นยาแรกในการรักษาผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง อย่างไรก็ตามยาแต่ละชนิดก็มีข้อจำกัดในการใช้เช่น การมีอาการข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟา หรือการเกิดเชื้อดื้อยาหลังได้รับการรักษาด้วยยานิวคลีโอไซด์อะนาล็อก ดังนั้นยาชนิดใหม่ที่สามารถเอาชนะข้อจำกัดเหล่านี้ได้จึงยังเป็นที่ต้องการอยู่ในปัจจุบัน อินเตอร์เฟียร์อนแลมปีดาเป็นไซโตไคน์ชนิดใหม่ที่กำลังถูกศึกษาเพื่อใช้เป็นยาใหม่ในการรักษาหลายๆ โรค เช่นการติดเชื้อไวรัสต่างๆ และมะเร็งต่างๆ เนื่องจากว่าอินเตอร์เฟียร์อนแลมปีดามีฤทธิ์คล้ายกับอินเตอร์เฟียร์อนชนิดที่ 1 เช่น ฤทธิ์ในการต้านไวรัส, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และเนื่องจากการแสดงออกที่ค่อนข้างจำกัดของตัวรับสัญญาณของอินเตอร์เฟียร์อนแลมปีดาที่จะกระจายตัวเฉพาะในอวัยวะที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์บุผิว ดังนั้นอาการที่ไม่พึงประสงค์จากการใช้อินเตอร์เฟียร์อนแลมปีดาจึงน้อยกว่าอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟา อินเตอร์เฟียร์อนแลมปีดาทั้ง 3 ซับไทป์นั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ในไวรัสหลายๆ ชนิด เช่น อินฟลูเอนซาไวรัส, เฮปปีซึมเพล็กซ์ไวรัส, เอชไอวี และไวรัสตับอักเสบบี(35, 37, 39, 44)

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยพบว่าอินเตอร์เฟียร์อนแลมปีดา 3 ซึ่งเป็นซับไทป์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน OAS1, MxA และ ISG15 ในเซลล์ HepG2.2.15 โดยปริมาณการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นนี้จะสัมพันธ์กับปริมาณความเข้มข้นของอินเตอร์เฟียร์อนแลมปีดาที่สูงขึ้น ซึ่งผลเช่นนี้สามารถพบได้ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาเช่นกัน นอกจากนี้ผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นว่าอินเตอร์เฟียร์อนแลมปีดา 3 มีฤทธิ์ในการต้านไวรัสตับอักเสบบี โดยลดระดับการแสดงออกของยีน *pres1* ซึ่งเป็น HBV RNA transcript, replicative intermediate (pgRNA) และ HBV DNA โดยระดับที่ลดลงของไวรัสสัมพันธ์กับปริมาณของอินเตอร์เฟียร์อนแลมปีดาที่เพิ่มสูงขึ้น โดยผลการศึกษาที่สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Robek และ Seung-Ho Hong ซึ่งให้เห็นว่าอินเตอร์เฟียร์อนแลมปีดาทั้ง 3 ซับไทป์สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีได้ในหลอดทดลอง(47, 53) ด้วยเหตุนี้อินเตอร์เฟียร์อนแลมปีดา 3 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการต้านไวรัสอาจจะเป็นยาใหม่ที่เหมาะสมกับการนำไปใช้ในการรักษาไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

เพื่อที่จะเข้าใจกลไกการออกฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบบีของอินเตอร์เฟียร์อนแลมปีดา 3 ในระดับโมเลกุลให้มากขึ้น เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ ซึ่งได้แก่ การแยกโปรตีนใน 2 มิติ และ แมสสเปคโตรมิเตอร์ ซึ่งเป็นวิธีที่มีประโยชน์เป็นอย่างมากในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ ได้ถูกนำมาศึกษาเพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนทั้งหมดในเซลล์ HepG2.2.15 ทั้งก่อนและหลังได้รับการกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมปีดา 3 ในการศึกษา ผู้วิจัยได้เลือกเซลล์ HepG2.2.15 เป็นโมเดลไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังเพราะว่าเซลล์ชนิดนี้ช่วยให้ไวรัสตับอักเสบบีมีการเพิ่มจำนวนและหลัง HBsAg, HBeAg และ HBV DNA ออกมาใน

อาหารเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับไวรัสตับอักเสบบีที่อยู่ในธรรมชาติ(72) โดยเซลล์ HepG2.2.15 จะถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ที่ความเข้มข้น 100 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แม้ว่าฤทธิ์ในการต้านไวรัสจะขึ้นกับความเข้มข้นของอินเตอร์เฟียร์อน แต่ทว่าตัวของอินเตอร์เฟียร์อนเองก็มีความเป็นพิษต่อเซลล์เช่นเดียวกัน ที่ความเข้มข้น 100 ng/ml ของอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่จะใช้กระตุ้นเซลล์ เพราะว่าที่ความเข้มข้นนี้สามารถยับยั้งการแสดงออกยีนของไวรัสตับอักเสบบี และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีได้ อีกทั้งยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์เพียงเล็กน้อย ยิ่งไปกว่านั้นยังมีหลายการศึกษาก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่าอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดาที่ความเข้มข้นนี้สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีและเอชไอวีในหลอดทดลองได้(40, 73) สำหรับระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์ที่เลือกเวลาที่ 24 ชั่วโมงเนื่องจากว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ที่เป็นการศึกษาแบบจุลทรรศน์โดยใช้เทคนิค microarray ได้แสดงให้เห็นว่าอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 1 สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของจำนวนยีนในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมากที่สุดและระดับการแสดงของยีนเหล่านี้ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง(41) และที่เวลานี้ยังเป็นเวลาเดียวกับที่ Leiliang Zhang ใช้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีในเซลล์ OR6 และ JFH1 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งตับที่มีพลาสมิดที่บรรจุ HCV RNA อยู่ภายในเซลล์(40)

หลังจากกระตุ้นเซลล์แล้ว การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทำโปรตีโอมิกส์ก็เป็นสิ่งสำคัญ แม้ว่าเทคนิคการแยกโปรตีนใน 2 มิติจะเป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนจำนวนมากในเวลาเดียวกัน แต่โปรตีนส่วนใหญ่ที่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้จะเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกค่อนข้างสูงเช่นโปรตีนพวกอัลบูมิน เป็นต้น ดังนั้นวิธีนี้อาจจะทำให้เราพลาดข้อมูลของพวกโปรตีนที่มีการแสดงออกน้อยได้ ซึ่งโปรตีนเหล่านี้อาจจะมีหน้าที่ที่สำคัญในเซลล์เช่น เป็นโปรตีนพวกเอนไซม์ไคเนส หรือ เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ เป็นต้น ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสให้กับโปรตีนเหล่านี้ จึงจำเป็นจะต้องหาวิธีที่ลดความซับซ้อนของโปรตีนลงและเพิ่มโอกาสให้โปรตีนที่มีการแสดงออกน้อยได้รับการระบุเอกลักษณ์ทั้งในระดับโปรตีนและในระดับเปปไทด์ ซึ่งในปัจจุบันก็มีหลายเทคนิคให้เลือก เช่น การทำให้มีจำนวนฟอสโฟโปรตีนให้เพิ่มมากขึ้น, การแยกโปรตีนจากออร์แกเนลล์ต่างๆ, การทำโครมาโตกราฟี เป็นต้น(64-66, 74) ซึ่งในที่นี้ ผู้วิจัยจะทำการแยกและสกัดโปรตีนจากเซลล์ทั้งก่อนและหลังได้รับการกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ออกเป็นโปรตีนจากไซโตพลาสซึม, เมมเบรน และนิวเคลียส โดยโปรตีนที่สกัดได้ในแต่ละออร์แกเนลล์จะถูกประเมินด้วยวิธี WB โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีนที่จำเพาะในออร์แกเนลล์นั้นๆ และความบริสุทธิ์ของโปรตีนในแต่ละออร์แกเนลล์จะถูกประเมินโดยการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับออร์แกเนลล์อื่นๆ โดย GAPDH จะถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงความจำเพาะของไซโตพลาสซึม แต่ผลการทดลองพบว่า GAPDH สามารถพบได้ทั้ง 3 ออร์แกเนลล์โดยพบได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน (พบมากที่สุดไซโตพลาสซึมและพบน้อยที่สุดในนิวเคลียส) แม้ว่า GAPDH จะเป็นโปรตีนที่พบในไซโตพลาสซึมเป็นส่วนใหญ่ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานในวิถีไกลโคไลซิส แต่โปรตีนชนิดนี้ยังสามารถพบได้ในออร์แกเนลล์อื่นๆ เช่นกัน เพียงแต่หน้าที่จะต่างกันออกไป กล่าวคือ GAPDH ที่อยู่ในส่วนของเมมเบรนจะช่วยในเรื่องของการขนส่งโปรตีน, การรวมตัวของเมมเบรน และการเกิดเอ็นโดไซโตซิส ในขณะที่บทบาทของ GAPDH ในนิวเคลียสจะเกี่ยวข้องกับการช่วยให้เกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอ, การซ่อมแซมดีเอ็นเอ และช่วยในการขนส่งอาร์เอ็นเอออกจากนิวเคลียส(75) จากความจริงเหล่านี้ GAPDH จึงไม่ใช่ตัวบ่งชี้ที่จำเพาะสำหรับไซโตพลาสซึม

อย่างไรก็ตาม CEACAM1 และ histone-H1 จะพบเพียงแคในเมมเบรนและนิวเคลียสตามลำดับเท่านั้น จากผลการทดลองเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าวิธีที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากออร์แกเนลล์ต่างๆ ให้ผลที่ค่อนข้างดี

เทคนิค 2-DE เป็นวิธีที่ใช้ในการแยกโปรตีนตามค่า pI และมวลโมเลกุลของโปรตีนนั้นๆ ในมิติที่ 1 และมิติที่ 2 ตามลำดับ การที่จะประสบความสำเร็จในการทำ 2-DE ขึ้นอยู่กับหลายขั้นตอน หนึ่งในขั้นตอนที่สำคัญคือการแยกโปรตีนในมิติแรก โดยขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นหลังจากที่มีการนำโปรตีนเข้าสู่ IPG strip หลังจากทำให้กระแสไฟโปรตีนจะมีการเคลื่อนที่ไปตาม pH gradient บน strip ตามประจุของโปรตีน กล่าวคือโปรตีนที่มีประจุลบและโปรตีนที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วแอโนด และแคโทดตามลำดับ โดยโปรตีนจะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อประจุมวลสุทธิเป็นศูนย์ และจุดนี้จะเรียกว่าค่า pI ถ้ามีสิ่งปนเปื้อนในโปรตีนตัวอย่าง สิ่งเหล่านี้จะไปรบกวนการโฟกัสซึ่งในขั้นตอนนี้จะส่งผลให้เกิด streaks หรือจุดโปรตีนไม่มีความคมชัด ซึ่งในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้พบปัญหาดังกล่าว ซึ่งปัญหาเหล่านี้น่าจะมาจากการปนเปื้อนของเกลือหรือสารอื่นๆ ที่อยู่ในบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดแยกโปรตีนจากออร์แกเนลล์ต่างๆ การนำเกลือออกด้วยวิธีไดอะไลซิสเป็นการกำจัดสิ่งปนเปื้อนโดยการแพร่ผ่านถุงเมมเบรนที่มีลักษณะเป็นเยื่อเลือกผ่าน หลังจากเสร็จสิ้นขั้นตอนนี้ โปรตีนตัวอย่างจะถูกทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการลดปริมาตรของน้ำที่อยู่ในตัวอย่าง จากนั้นนำโปรตีนเหล่านี้มาทำ 2-DE อีกครั้ง พบว่าเจลที่ได้จะไม่เกิด streaks และจุดโปรตีนมีความคมชัดขึ้น ขั้นตอนที่มีความสำคัญอีกขั้นตอนหนึ่งในการทำโปรตีโอมิกส์โดยใช้เจลคือการย้อมสีเจล แม้ว่าในปัจจุบันจะมีสีย้อมหลายชนิด แต่สิ่งที่ต้องคำนึงคือความไวในการตรวจพบโปรตีนที่มีปริมาณน้อย และความเข้ากันได้กับเครื่อง MS(68) ในการศึกษา ผู้วิจัยได้เลือกสีย้อมฟลูออเรสเซนต์เพื่อย้อมเจล 2-DE เพราะว่าสีย้อมนี้สามารถย้อมติดสีโปรตีนที่มีปริมาณน้อยกว่า 1 นาโนกรัมได้เมื่อเปรียบเทียบกับสีย้อม Coomassie Brilliant Blue และสีย้อมฟลูออเรสเซนต์นี้ไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเครื่อง MS อีกด้วย อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของสีย้อมนี้คือความไวต่อแสงและราคาที่ค่อนข้างแพง อีกทั้งแสงยูวียังจำเป็นสำหรับการทำให้เห็นจุดโปรตีนอีกด้วย

ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์โปรตีนที่ได้จากออร์แกเนลล์ต่างๆ ของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบเจล 2-DE ของโปรตีนที่ได้จากทั้งเซลล์ และโปรตีนที่ได้จากทั้ง 3 ออร์แกเนลล์ การแสดงออกของโปรตีนของโปรตีนจากทั้งเซลล์จะเหมือนกับโปรตีนที่สกัดได้จากแต่ละออร์แกเนลล์ อย่างไรก็ตามจำนวนจุดโปรตีนและความเข้มของจุดโปรตีนที่พบในเจล 2-DE ของโปรตีนจากทั้งเซลล์จะน้อยกว่าโปรตีนที่ได้จากแต่ละออร์แกเนลล์ นี่เป็นการยืนยันว่าการลดความซับซ้อนของโปรตีนก่อนทำ 2-DE จะให้ข้อมูลเพิ่มเติมมากกว่าการใช้โปรตีนจากทั้งเซลล์ หลังจากทำการวิเคราะห์รูปเจลโปรตีนในแต่ละออร์แกเนลล์จากทั้ง 2 กลุ่ม จำนวนจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในไซโตพลาสซึม, เมมเบรน และนิวเคลียสของเซลล์ HepG2.2.15 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 คือ 24, 40 และ 35 จุดโปรตีน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนในเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 มีจุดโปรตีนทั้งหมด 15 (มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 9 และมีการแสดงออกลดลง 6), 27 (มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 17 และมีการแสดงออกลดลง 10) และ 33 (มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 22 และมีการแสดงออกลดลง 11) จุดโปรตีนในไซโตพลาสซึม, เมมเบรน และนิวเคลียส ตามลำดับที่ประสบความสำเร็จในการระบุเอกลักษณ์ด้วยเครื่อง MS สำหรับจุดโปรตีนที่ไม่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้นั้น เป็นไปได้ที่ปริมาณของโปรตีนในจุดเหล่านั้นต่ำเกินกว่าจะสร้างสัญญาณเพื่อให้ถึงค่า MS threshold อีกสาเหตุที่เป็นไปได้คือค่าคะแนนจาก MS ของโปรตีนที่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้ต่ำเกินกว่าจะถึงจุดที่ถือว่ามีความสำคัญ

อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าจำนวนโปรตีนที่ได้จากการศึกษาด้วยเทคนิค 2-DE, การแยกโปรตีนจากออร์แกเนลล์ต่างๆ และการใช้สีย้อมที่มีความไวสูง จำนวนโปรตีนที่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้นั้นค่อนข้างน้อย สาเหตุที่เป็นไปได้คือ โปรตีนจำพวกที่เป็นไฮโดรโฟบิก, โปรตีนที่มีค่า pI สูงกว่าหรือต่ำกว่า ช่วง pH ใน strip ที่ใช้ หรือโปรตีนที่มีการแสดงออกที่ต่ำมากๆ จะไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค 2-DE นอกจากนี้ยังพบว่า จุดโปรตีน 1 จุดที่พบบนเจลอาจจะไม่ใช่โปรตีนเพียงตัวเดียวเสมอไป อีกทั้งขั้นตอนในการวิเคราะห์รูปเจล แม้ว่าจะใช้โปรแกรมในการวิเคราะห์ แต่ยังคงมีการแก้ไขเพิ่มเติมเองอีก จึงทำให้เกิดความผิดพลาดได้ เหล่านี้จึงเป็นข้อจำกัดของการศึกษาโปรตีโอมิกส์โดยใช้เจล อย่างไรก็ตามเพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้การศึกษาทางโปรตีโอมิกส์ที่ไม่ใช้เจลจึงเป็นตัวเลือกที่ดีอย่างหนึ่ง โดยวิธีนี้โปรตีนที่มีความไฮโดรโฟบิกสูงหรือมีค่า pI ที่สูงหรือต่ำมากๆ ก็สามารถตรวจพบได้ด้วยการศึกษานี้ แม้ว่าเทคนิคนี้จะเพิ่ม protein coverage ได้แต่ความซับซ้อนของโปรตีนที่สูงนี้ทำให้โปรตีนที่มีการแสดงออกน้อยอาจจะไม่ถูกระบุเอกลักษณ์ในการขั้นตอนการทำ MS ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหานี้ผู้วิจัยได้ทำการลดความซับซ้อนของโปรตีนโดยใช้เทคนิค High pH reverse phase ด้วยวิธีต่างๆ ข้างต้นพบว่าโปรตีนมากกว่าสองพันกว่าโปรตีนที่ถูกระบุเอกลักษณ์ได้ ในจำนวนนี้มีโปรตีนที่มีการแสดงออกค่อนข้างต่ำและตรวจไม่พบเมื่อทำด้วยเทคนิค 2-DE เช่น โปรตีนโคเนส, โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ และโปรตีนที่เป็นพวกทรานสคริปชันแฟคเตอร์ แต่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้ ดังแสดงในตารางที่ 17 อนึ่งในการศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้นำเทคนิค dimethyl labeling ซึ่งเป็นเทคนิคการติดฉลากในระดับเปปไทด์ด้วยไอโซโทปที่แตกต่างกันทำให้เปปไทด์ตัวเดียวกันที่ถูกติดฉลากด้วยไอโซโทปที่ต่างกันจะมีมวลที่ต่างกัน ด้วยหลักการนี้ทำให้สามารถติดฉลากเปปไทด์ในตัวอย่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟอรอนแลมบ์ดา 3 ด้วยไอโซโทปที่ต่างกันและนำมารวมกันก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MS ได้ ซึ่งเทคนิคนี้ไม่เพียงแต่จะช่วยหาปริมาณโปรตีนในสองสถานะที่ต่างกันได้ แต่ยังช่วยลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นจากขั้นตอนก่อนวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MS อีกด้วย เมื่อทำการระบุเอกลักษณ์โปรตีนด้วย MS แล้ว จะทำการยืนยันโปรตีนที่ได้จากการศึกษาจากโปรตีโอมิกส์ด้วยวิธี WB โดยผู้วิจัยได้เลือก proteasome subunit beta type-6 มาทำการยืนยัน โดยพบว่าผลจาก WB นั้นสอดคล้องกับผลที่ได้จากเครื่อง MS ซ้ำให้เห็นว่าผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์นั้นน่าเชื่อถือ

โปรตีนที่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้ทั้งหมดจะถูกแบ่งกลุ่มตามหน้าที่ทางชีวภาพซึ่งได้แก่โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นแซปเพอโรน, โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโฮสต์และไวรัส, โปรตีเอส, การตอบสนองต่อความเครียด, โกลโคไลซิส, การเพิ่มจำนวนของเซลล์, เมตาบอลิซึม เป็นต้น โปรตีนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเหล่านี้อาจจะมีฤทธิ์ในการต้านไวรัสตับอักเสบบีเมื่อถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟอรอนแลมบ์ดา 3 นอกจากนี้โปรตีนในกลุ่มที่มีฤทธิ์ในการต้านไวรัส ซึ่งได้แก่ OAS3, ISG15, Mx2, TRIM25 และ ZC3H4V1 แล้ว ยังมีกลไกอื่นที่น่าสนใจ คือกระบวนการจัดการแอนติเจนและการนำเสนอแอนติเจน (รูปที่ 16-19) โดยโปรตีนเหล่านี้ได้แก่ โปรตีเอสซัยยูนิตต่างๆ, แซปเพอโรน และ MHC class I โดยโปรตีนทั้งหมดนี้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังได้รับการกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟอรอนแลมบ์ดา 3 โดยโปรตีเอส จะเป็นตัวเริ่มต้นของกลไกนี้ โดยโปรตีเอสมีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนที่มีการเรียงตัวผิด, โปรตีนที่ไม่มีการพับซ้อน หรือโปรตีนที่ได้รับความเสียหายซึ่งอาจเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติหรือตอบสนองต่อความเครียดจากการเกิดสภาวะออกซิเดชัน โปรตีนที่มีความผิดปกติเหล่านี้จะถูกตัดโดยเอนไซม์โปรตีเอสเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ประมาณ 7-8 กรดอะมิโน และจะถูกไฮโดรไลซ์ต่อเป็นสายที่สั้นกว่าเดิม เพื่อที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการสร้างโปรตีนใหม่หรือเพื่อทำหน้าที่

เป็นแซปเพอโรน เพื่อช่วยให้เกิดการนำเสนอแอนติเจน ดังที่พบในกรณีที่มีการติดเชื้อไวรัส เช่นเดียวกับการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น ไวรัสตับอักเสบบีสามารถสร้างและหลั่งโปรตีนของตัวเองขึ้นมาภายในเซลล์โฮสต์ในระหว่างที่มีการเพิ่มจำนวน โดยโปรตีนเหล่านี้จะช่วยให้การเพิ่มจำนวนของไวรัสมีประสิทธิภาพมากขึ้น(76) อินเตอร์ลิวคิน 4 ซึ่งได้รับการพิสูจน์แล้วว่าสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีได้ สามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนเอชไมได้ถึง 5 ซับยูนิตในเซลล์ HepG2.2.15(77, 78) นี่เป็นการชี้ให้เห็นว่า อินเตอร์ลิวคิน 4 มีฤทธิ์ในการต้านไวรัสตับอักเสบบีผ่านกลไกโปรตีนเอชไมเพื่อทำลายโปรตีนที่สร้างขึ้นระหว่างที่ไวรัสตับอักเสบบีมีการเพิ่มจำนวน ในการศึกษาพบว่า อินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 สามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนเอชไมได้หลายซับยูนิตเช่น ADRM1, PSMD13, PSMD14, PSMD7, PSME2 และ PSMG2 ซึ่งโปรตีนเอชไมเหล่านี้จะถูกใช้เพื่อย่อยสลายโปรตีนจากไวรัส ชี้ให้เห็นว่าการย่อยสลายโปรตีนเป็นหนึ่งในกลไกการออกฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบบีซึ่งถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 เพื่อยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี นอกจากนี้ ในการศึกษาของ Michael D. Robek และคณะพบว่าการยับยั้งการทำงานของโปรตีนเอชไมจะยับยั้งฤทธิ์ในการต้านไวรัสของอินเตอร์เฟียร์อนชนิดที่ 1 ในหลอดทดลอง(79) ชี้ให้เห็นว่าฤทธิ์ในการต้านไวรัสของอินเตอร์เฟียร์อนสัมพันธ์กับโปรตีนเอชไมโดยการย่อยสลายโปรตีนที่มีความจำเพาะของไวรัสเอง และของของโฮสต์ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไวรัสตับอักเสบบีจะใช้เพื่อเพิ่มจำนวนของตัวเอง หลังจากที่มีการย่อยโปรตีนของไวรัสเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ เปปไทด์เหล่านี้จะถูกส่งเข้าไปใน ER และเปปไทด์เหล่านี้จะถูกนำเสนอผ่านโมเลกุลของ MHC class I โดยในการศึกษานี้พบว่าโปรตีน MHC class I มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังได้รับการกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 เช่นกัน

เป็นที่ทราบกันดีว่าโปรตีนจากไวรัสโดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีน HBx สามารถรบกวนกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์เช่น เมตาบอลิซึม, การเพิ่มจำนวนเซลล์ และการส่งสัญญาณ เพื่อเปลี่ยนสภาวะแวดล้อมของโฮสต์ให้เอื้อต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส(21) หนึ่งในกลไกที่ HBx มีผลคือ สัญญาณของแคลเซียม เพราะว่าแคลเซียมไอออนจำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนของไวรัสและการรวมตัวของโปรตีน core โดยแคลเซียมไอออนนี้จะเป็นตัวรับสัญญาณที่สองซึ่งมีหน้าที่หลากหลายในเซลล์ โดยไอออนเหล่านี้จะถูกเก็บอยู่ในไมโทคอนเดรียซึ่งเป็นตัวที่ทำหน้าที่ควบคุมสัญญาณแคลเซียมภายในเซลล์ โปรตีน HBx สามารถมีปฏิสัมพันธ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial permeability transition pore (MPTP) ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของแคลเซียมออกมาสู่ภายนอกเซลล์ กลไกที่ใช้ในการเปิดช่องทางนี้ยังไม่เป็นที่เข้าใจในปัจจุบัน การที่ระดับแคลเซียมในไซโตพลาสซึมเพิ่มสูงขึ้นจะทำให้เกิดการกระตุ้นเอนไซม์ไคเนส Pyk2 และไคเนสตัวนี้ที่ถูกกระตุ้นจะไปกระตุ้นวิถีสัญญาณ Src kinase เพื่อช่วยให้เกิด HBV reverse transcription, การเพิ่มจำนวนของไวรัส และการรวมตัวของโปรตีน core(80-84) ในการศึกษาที่ใช้ cyclosporine A (CsA) หรือที่รู้จักในนามของ MPTP specific blocker พบว่ามีการรวมตัวของโปรตีน core ลดลงและมีการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี(80, 81) อีกการศึกษาหนึ่งที่ให้ผลสอดคล้องกับการรักษาด้วย CsA คือการให้ calcium ion chelating agent (BAPTA-AM) โดยพบว่าสารชนิดนี้สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีได้ จากที่ได้กล่าวมาทั้งหมด ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าการลดระดับของแคลเซียมน่าจะเป็นหนึ่งในกลไกการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี ในการศึกษาพบว่า calcium-ions binding proteins มีการแสดงออกที่ลดลงหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ชี้ให้เห็นว่าในเซลล์ HepG2.2.15 มีระดับแคลเซียม

ที่ลดลง โดย CALR, CALM1, S100P, LRP1 และ TPT1 ซึ่งเป็น calcium-ions binding proteins มีบทบาทในการควบคุมระดับแคลเซียมทั้งภายในและภายนอก ER(85)

โดยสรุป ในการศึกษาพบว่าอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน OAS1, MxA และ ISG15 โดยการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นนี้จะสัมพันธ์กับปริมาณความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 นอกจากนี้อินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ยังมีฤทธิ์ในการต้านไวรัส โดยยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีได้อย่างมีนัยสำคัญ และสามารถลดการแสดงออกของยีนในไวรัสตับอักเสบบีได้ ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ในการศึกษาเพื่อให้เข้าใจกลไกในเซลล์ HepG2.2.15 ที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ผลจากการศึกษาด้วยวิธีทางโปรตีโอมิกส์แสดงให้เห็นว่าอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 มีผลต่อโปรตีนในหลายๆ กระบวนการและหน้าที่หลักๆ จะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะ ยิ่งไปกว่านั้นผู้วิจัยได้เสนอโปรตีนบางตัวที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 อาจจะเกี่ยวข้องกับกลไกการออกฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบบี เห็นได้ชัดว่า อินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 มีบทบาททั้งเป็นสารต้านไวรัสและกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี ดังนั้น อินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 จึงเป็นไซโตไคน์ที่น่าสนใจที่จะใช้เป็นยาใหม่ที่ใช้รักษาผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงหลังได้รับการกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ชนิดนี้อาจจะเป็นเป้าหมายใหม่ในการรักษาต่อไปได้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ๆ ที่เกี่ยวข้องกับตัวอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดาเองในสัตว์ทดลอง และหน้าที่อื่นๆ ของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงหลังได้รับอินเตอร์เฟียร์อนแลมบ์ดา 3 ยังคงต้องทำการศึกษาค้นคว้าต่อไป

บรรณานุกรม

1. Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2009;49(5 Suppl):S13-21.
2. Dienstag JL. Hepatitis B Virus Infection. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(14):1486-500.
3. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B Virus Infection — Natural History and Clinical Consequences. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(11):1118-29.
4. Lin X, Robinson NJ, Thursz M, Rosenberg DM, Weild A, Pimenta JM, et al. Chronic hepatitis B virus infection in the Asia-Pacific region and Africa: review of disease progression. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2005;20(6):833-43.
5. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B Virus Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000;64(1):51-68.
6. Kao JH. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2002;17(6):643-50.
7. Locarnini S. Molecular virology of hepatitis B virus. *Seminars in liver disease*. 2004;24 Suppl 1:3-10.
8. Block TM, Guo H, Guo JT. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clinics in liver disease*. 2007;11(4):685-706, vii.
9. Locarnini S, Zoulim F. Molecular genetics of HBV infection. *Antiviral therapy*. 2010;15 Suppl 3:3-14.
10. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*. 2012;1:e00049.
11. Stephanie S, Eberhard H. HBV Life Cycle: Entry and Morphogenesis. *Viruses*. 2009;1(2).
12. Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. *Journal of hepatology*. 2010;52(2):282-4.
13. Grimm D, Thimme R, Blum HE. HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatology international*. 2011;5(2):644-53.
14. Bertolotti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *The Journal of general virology*. 2006;87(Pt 6):1439-49.
15. Tan AT, Koh S, Goh V, Bertolotti A. Understanding the immunopathogenesis of chronic hepatitis B virus: an Asian prospective. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2008;23(6):833-43.
16. Wieland S, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(17):6669-74.

17. Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunology and cell biology*. 2007;85(1):16-23.
18. Bertoletti A, Maini MK, Ferrari C. The host-pathogen interaction during HBV infection: immunological controversies. *Antiviral therapy*. 2010;15 Suppl 3:15-24.
19. Zhang Z, Zhang JY, Wang LF, Wang FS. Immunopathogenesis and prognostic immune markers of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2012;27(2):223-30.
20. Wright TL. Introduction to chronic hepatitis B infection. *The American journal of gastroenterology*. 2006;101 Suppl 1:S1-6.
21. Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer science*. 2006;97(10):977-83.
22. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2007;45(2):507-39.
23. Samuel CE. Antiviral Actions of Interferons. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14(4):778-809.
24. Gonzalez-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(2):125-35.
25. Yuen MF, Lai CL. Treatment of chronic hepatitis B: Evolution over two decades. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2011;26 Suppl 1:138-43.
26. Pedder SC. Pegylation of interferon alfa: structural and pharmacokinetic properties. *Seminars in liver disease*. 2003;23 Suppl 1:19-22.
27. Foster GR. Review article: pegylated interferons: chemical and clinical differences. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2004;20(8):825-30.
28. Wilt TJ, Shamliyan T, Shaukat A, Taylor BC, MacDonald R, Yuan JM, et al. Management of chronic hepatitis B. Evidence report/technology assessment. 2008(174):1-671.
29. Papatheodoridis GV, Dimou E, Papadimitropoulos V. Nucleoside analogues for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and viral resistance. *The American journal of gastroenterology*. 2002;97(7):1618-28.
30. Fung J, Lai CL, Seto WK, Yuen MF. Nucleoside/nucleotide analogues in the treatment of chronic hepatitis B. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(12):2715-25.
31. Kim KH, Kim ND, Seong BL. Discovery and development of anti-HBV agents and their resistance. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2010;15(9):5878-908.
32. Pramoolsinsup C. Management of viral hepatitis B. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2002;17 Suppl:S125-45.
33. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature immunology*. 2003;4(1):69-77.

34. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature immunology*. 2003;4(1):63-8.
35. Donnelly RP, Kotenko SV. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2010;30(8):555-64.
36. Gad HH, Hamming OJ, Hartmann R. The structure of human interferon lambda and what it has taught us. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2010;30(8):565-71.
37. Hamming OJ, Gad HH, Paludan S, Hartmann R. Lambda Interferons: New Cytokines with Old Functions. *Pharmaceuticals*. 2010;3(4):795-809.
38. Iversen MB, Paludan SR. Mechanisms of type III interferon expression. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2010;30(8):573-8.
39. Witte K, Witte E, Sabat R, Wolk K. IL-28A, IL-28B, and IL-29: promising cytokines with type I interferon-like properties. *Cytokine & growth factor reviews*. 2010;21(4):237-51.
40. Zhang L, Jilg N, Shao RX, Lin W, Fusco DN, Zhao H, et al. IL28B inhibits hepatitis C virus replication through the JAK-STAT pathway. *Journal of hepatology*. 2011;55(2):289-98.
41. Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, Machlin ES, Kotenko SV, MacDonald MR, et al. Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology*. 2006;131(6):1887-98.
42. Dellgren C, Gad HH, Hamming OJ, Melchjorsen J, Hartmann R. Human interferon-lambda3 is a potent member of the type III interferon family. *Genes and immunity*. 2009;10(2):125-31.
43. Martin MP, Qi Y, Goedert JJ, Hussain SK, Kirk GD, Keith Hoots W, et al. IL28B Polymorphism Does Not Determine Outcomes of Hepatitis B Virus or HIV Infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2010;202(11):1749-53.
44. Ank N, West H, Paludan SR. IFN-lambda: novel antiviral cytokines. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2006;26(6):373-9.
45. Diegelmann J, Beigel F, Zitzmann K, Kaul A, Goke B, Auernhammer CJ, et al. Comparative analysis of the lambda-interferons IL-28A and IL-29 regarding their transcriptome and their antiviral properties against hepatitis C virus. *PloS one*. 2010;5(12):e15200.
46. Pagliaccetti NE, Robek MD. Interferon-lambda in the immune response to hepatitis B virus and hepatitis C virus. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2010;30(8):585-90.
47. Robek MD, Boyd BS, Chisari FV. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *Journal of virology*. 2005;79(6):3851-4.

48. Clark PJ, Thompson AJ, McHutchison JG. IL28B genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis C infection: the future of personalized HCV therapies. *The American journal of gastroenterology*. 2011;106(1):38-45.
49. Halfon P, Bourliere M, Ouzan D, Maor Y, Renou C, Wartelle C, et al. A single IL28B genotype SNP rs12979860 determination predicts treatment response in patients with chronic hepatitis C Genotype 1 virus. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2011;23(10):931-5.
50. Jablonowska E, Piekarska A, Koslinska-Berkan E, Omulecka A, Szymanska B, Wojcik K. Sustained virologic response and IL28B single-nucleotide polymorphisms in patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon alfa and ribavirin. *Acta biochimica Polonica*. 2012;59(3):333-7.
51. Kim SU, Song KJ, Chang HY, Shin EC, Park JY, Kim do Y, et al. Association between IL28B polymorphisms and spontaneous clearance of hepatitis B virus infection. *PloS one*. 2013;8(7):e69166.
52. Peng LJ, Guo JS, Zhang Z, Shi H, Wang J, Wang JY. IL28B rs12979860 polymorphism does not influence outcomes of hepatitis B virus infection. *Tissue antigens*. 2012;79(4):302-5.
53. Hong SH, Cho O, Kim K, Shin HJ, Kotenko SV, Park S. Effect of interferon-lambda on replication of hepatitis B virus in human hepatoma cells. *Virus research*. 2007;126(1-2):245-9.
54. Muir AJ, Shiffman ML, Zaman A, Yoffe B, de la Torre A, Flamm S, et al. Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2010;52(3):822-32.
55. Wieland SF, Eustaquio A, Whitten-Bauer C, Boyd B, Chisari FV. Interferon prevents formation of replication-competent hepatitis B virus RNA-containing nucleocapsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(28):9913-7.
56. Chen H, Wang LW, Huang YQ, Gong ZJ. Interferon-alpha Induces High Expression of APOBEC3G and STAT-1 in Vitro and in Vivo. *International journal of molecular sciences*. 2010;11(9):3501-12.
57. Gordien E, Rosmorduc O, Peltekian C, Garreau F, Bréchet C, Kremsdorf D. Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by the Interferon-Inducible MxA Protein. *Journal of virology*. 2001;75(6):2684-91.
58. Li J, Lin S, Chen Q, Peng L, Zhai J, Liu Y, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by MyD88 involves accelerated degradation of pregenomic RNA and nuclear retention of pre-S/S RNAs. *Journal of virology*. 2010;84(13):6387-99.
59. Xiong W, Wang X, Liu XY, Xiang L, Zheng LJ, Liu JX, et al. Analysis of gene expression in hepatitis B virus transfected cell line induced by interferon. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2003;35(12):1053-60.

60. Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004;4(12):3665-85.
61. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):193-7.
62. Wang J, Jiang D, Zhang H, Lv S, Rao H, Fei R, et al. Proteome responses to stable hepatitis B virus transfection and following interferon alpha treatment in human liver cell line HepG2. *Proteomics*. 2009;9(6):1672-82.
63. Chevalier F. Highlights on the capacities of "Gel-based" proteomics. *Proteome science*. 2010;8:23.
64. Huber LA, Pfaller K, Vietor I. Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circulation research*. 2003;92(9):962-8.
65. Stasyk T, Huber LA. Zooming in: fractionation strategies in proteomics. *Proteomics*. 2004;4(12):3704-16.
66. Guillemain I, Becker M, Ociepka K, Friauf E, Nothwang HG. A subcellular prefractionation protocol for minute amounts of mammalian cell cultures and tissue. *Proteomics*. 2005;5(1):35-45.
67. Chevalier F. Standard Dyes for Total Protein Staining in Gel-Based Proteomic Analysis. *Materials*. 2010;3(10):4784-92.
68. Westermeier R, Marouga R. Protein detection methods in proteomics research. *Bioscience reports*. 2005;25(1-2):19-32.
69. Abdallah C, Dumas-Gaudot E, Renaut J, Sergeant K. Gel-Based and Gel-Free Quantitative Proteomics Approaches at a Glance. *International Journal of Plant Genomics*. 2012;2012:17.
70. Monteoliva L, Albar JP. Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches. *Briefings in functional genomics & proteomics*. 2004;3(3):220-39.
71. Boersema PJ, Raijmakers R, Lemeer S, Mohammed S, Heck AJR. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat Protocols*. 2009;4(4):484-94.
72. Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(4):1005-9.
73. Liu MQ, Zhou DJ, Wang X, Zhou W, Ye L, Li JL, et al. IFN-lambda3 inhibits HIV infection of macrophages through the JAK-STAT pathway. *PloS one*. 2012;7(4):e35902.
74. Righetti PG, Castagna A, Antonioli P, Boschetti E. Prefractionation techniques in proteome analysis: the mining tools of the third millennium. *Electrophoresis*. 2005;26(2):297-319.
75. Tristan C, Shahani N, Sedlak TW, Sawa A. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cellular signalling*. 2011;23(2):317-23.
76. Kish-Trier E, Hill CP. Structural biology of the proteasome. *Annual review of biophysics*. 2013;42:29-49.

77. Lin SJ, Shu PY, Chang C, Ng AK, Hu CP. IL-4 suppresses the expression and the replication of hepatitis B virus in the hepatocellular carcinoma cell line Hep3B. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2003;171(9):4708-16.
78. Yao Y, Li J, Lu Z, Tong A, Wang W, Su X, et al. Proteomic analysis of the interleukin-4 (IL-4) response in hepatitis B virus-positive human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Electrophoresis*. 2011;32(15):2004-12.
79. Robek MD, Wieland SF, Chisari FV. Inhibition of hepatitis B virus replication by interferon requires proteasome activity. *Journal of virology*. 2002;76(7):3570-4.
80. Bouchard MJ, Wang LH, Schneider RJ. Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science (New York, NY)*. 2001;294(5550):2376-8.
81. Choi Y, Gyoo Park S, Yoo JH, Jung G. Calcium ions affect the hepatitis B virus core assembly. *Virology*. 2005;332(1):454-63.
82. Clippinger AJ, Bouchard MJ. Hepatitis B Virus HBx Protein Localizes to Mitochondria in Primary Rat Hepatocytes and Modulates Mitochondrial Membrane Potential. *Journal of virology*. 2008;82(14):6798-811.
83. Xu Z, Yen TS, Wu L, Madden CR, Tan W, Slagle BL, et al. Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice. *Journal of virology*. 2002;76(5):2579-84.
84. Yang B, Bouchard MJ. The hepatitis B virus X protein elevates cytosolic calcium signals by modulating mitochondrial calcium uptake. *Journal of virology*. 2012;86(1):313-27.
85. Michalak M, Corbett EF, Mesaeri N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *The Biochemical journal*. 1999;344 Pt 2:281-92.

ภาคผนวก

Culturing media and reagents involving in cell stimulation and viability assay

1.) Complete DMEM (100 ml) (Store at 4°C)

Incomplete DMEM	90	ml
FBS	10	ml
5000 U/ml Penicillin/Streptomycin	1	ml
100X MEM-NEAA	1	ml

2.) 1X PBS pH 7.4

PBS	1	pouch
Distilled water	1	liter

PBS powder was dissolved in distilled water, sterilized this solution by autoclaving at 121°C for 15 minutes and stored at room temperature.

3.) 0.1% BSA (Store at 4°C)

BSA	0.01	g
Sterile PBS	10	ml

4.) 5 mg/ml MTT solution

MTT	50	mg
Sterile PBS	10	ml

MTT was dissolved in sterile PBS and filtrated by 0.2 µM acrodisc syringe filter. This solution was kept at 4°C with light protection.

Mastermixes for reverse transcription and quantitative real-time PCR

1.) Mastermix for cDNA synthesis (1 reaction)

RNase free water	5.5	µl
10X RT buffer	3	µl
25 mM MgCl ₂	6.6	µl

10 mM dNTPs	2	μl
50 M Random hexamer	0.5	μl
20 U/μl RNase inhibitor	0.6	μl
50 U/μl Multiscribe	0.25	μl
RNA 200 ng/μl	11.5	μl

2.) Mastermix for qPCR (1 reaction)

Power SYBR Green PCR Master Mix	10	μl
RNase-free water	7	μl
20 μM forward primer	0.5	μl
20 μM reverse primer	0.5	μl
50 ng/μl of cDNA or DNA	2	μl

Reagents in SDS-PAGE preparation

1.) 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

Tris base	181.7	g
-----------	-------	---

This agent was dissolved in 750 ml of Milli Q and then adjusted pH to 8.8 by HCl. The final volume of this solution was adjusted to 1,000 ml with Milli Q. This solution was kept at 4°C.

2.) 1 M Tris-HCl pH 6.8

Tris base	121.1	g
-----------	-------	---

This chemical was combined with 750 ml of Milli Q followed by pH adjustment to pH 6.8 using HCl. The volume was adjusted to 1,000 ml by Milli Q and this solution was stored at 4°C.

3.) 10% SDS

SDS	10	g
Milli Q	100	ml

4.) 10% APS

Ammonium persulfate	0.1	g
Milli Q	1	ml

This solution should be fresh preparation.

Buffer for running SDS-PAGE

1.) 10X SDS-PAGE running buffer

Glycine	144	g
Tris base	30.2	g
SDS	10	g

All chemicals were dissolved in Milli Q and adjusted to final volume of 1,000 ml with MilliQ. This buffer was kept at room temperature.

2.) 1X SDS-PAGE running buffer

10X SDS-PAGE running buffer	100	ml
Milli Q	900	ml

Reagents and buffers in western blotting assay

1.) Lysis solution

Tris base	9.3642	g
Thio urea	15.22	g
Urea	42	g
CHAPS	4	g

All chemicals were dissolved in 100 ml of distilled water. The pH of this solution was adjusted to 6.8 with HCl and this solution was stored at -20°C. Protease inhibitor cocktails was added to the solution prior to use.

2.) Laemmli buffer (2X)

10% (w/v) SDS	4	ml
Glycerol	2	ml
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.2	ml
Milli Q	2.8	ml

After combination of all agents, bromophenol blue was added to the solution with final concentration 0.02% (w/v). This buffer was stored at -20°C until use. 30 mg of DTT was added to 1 ml of this buffer prior to use.

3.) 12.5% SDS-PAGE (1 gel)

Milli Q	4,175	μl
40% Acrylamide gel	3,125	μl
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5	ml
10% SDS	100	μl
10% APS	100	μl
TEMED	4	μl

4.) 4% Stacking gel (1 gel)

Milli Q	3,650	μl
40% Acrylamide gel	625	μl
1 M Tris-HCl pH 6.8	625	μl
10% SDS	50	μl
10% APS	50	μl
TEMED	5	μl

5.) 10X Transfer buffer (Store at 4°C)

Glycine	144.1	g
Tris base	30.3	g
Milli Q	1,000	ml

6.) 1X Transfer buffer (Store at 4°C)

10X Transfer buffer	100	ml
Methanol	200	ml
Milli Q	700	ml

7.) 10X TBS

Tris base	60.5	g
NaCl	88.7	g

Both Tris base and NaCl were dissolve in 1,000 ml of Milli Q and this buffer was kept at room temperature.

8.) 1X TBST

10X TBS	100	ml
Tween 20	1	ml

Both solutions were mixed and adjusted volume to 1,000 ml with Milli Q. This buffer was kept at room temperature.

9.) 5% Skim milk

Skim milk	0.25	g
1X TBST	5	ml

Reagents and buffers in 2-DE

1.) Rehydration stock solution without IPG buffer (Store at -20°C)

Urea	13.6	g
CHAPS	0.5	g
Bromophenol blue	50	μl
Distilled water	25	ml

2.) Bromophenol blue stock solution

Bromophenol blue	100	mg
Tris base	60.57	mg
Distilled water	10	ml

3.) Agarose sealing solution

SDS electrophoresis buffer	10	ml
Agarose	0.05	g
Bromophenol blue	20	μl

All agents were combined and heated until agarose was completely melted. This solution was kept at room temperature.

4.) SDS equilibrium buffer

Tris base pH 8.8	10	ml
Urea	72.07	g
Glycerol	69	ml
SDS	4	g
Bromophenol blue	400	μ l

Firstly, Tris base and urea were dissolved in 90 ml of distilled water. SDS was subsequently added to the solution. After complete dissolving of all agents, glycerol was added and the final volume of the solution was adjusted to 200 ml prior to storage at -20°C .

Reagents involving in in-gel digestion and identification

1.) 1 M NH_4HCO_3

NH_4HCO_3	3.95	g
HPLC-grade water	50	ml

2.) 50 mM NH_4HCO_3

1 M NH_4HCO_3	0.5	ml
HPLC-grade water	9.5	ml

3.) 25 mM NH_4HCO_3

50 mM NH_4HCO_3	5	ml
HPLC-grade water	5	ml

4.) 25 mM NH_4HCO_3 in 50% ACN

50 mM NH_4HCO_3	5	ml
100% Acetonitrile	5	ml

5.) 50% ACN/ 0.1% FA

100% Acetonitrile	5	ml
HPLC-grade water	5	ml
Formic acid	10	μ l

6.) 0.1% FA

Formic acid	10	μ l
HPLC-grade water	10	ml

ประวัตินักวิจัยและคณะ

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล พญ.ดร.ณัฐธิดา หิรัญกาญจน์

ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์

หน่วยงาน หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2564132 โทรสาร 02-2525952

E-mail Nattiyap@gmail.com

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	MD	แพทยศาสตร์	2536
Georgetown University	Ph.D	Microbiology/Immunology	2542

ผลงานวิจัย

1: Kunanopparat A, Kimkong I, Palaga T, Tangkijvanich P, Sirichindakul B, Hirankarn N. Increased ATG5-ATG12 in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma and their role in apoptosis. World J Gastroenterol. 2016 Oct 7;22(37):8361-8374. PubMed PMID: 27729742; PubMed Central PMCID: PMC5055866.

2: Thammarakcharoen T, Hirankarn N, Sahakitrungruang T, Thongmee T, Kuptawintu P, Kanoonthong S, Chongsrisawat V. Frequency of HLA-DQB1*0201/02 and DQB1*0302 alleles and tissue transglutaminase antibody seropositivity in children with type 1 diabetes mellitus. Asian Pac J Allergy Immunol. 2016 Aug 16. doi: 10.12932/AP0751. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27543737.

3: Khanuntong S, Kuptawintu P, Upaisilpsathaporn K, Poolchareon A, Bunworasate U, Hirankarn N. The effect of missing KIR ligands, activating KIR genotype and haplotype on the outcome of T-cell-replete hematopoietic stem cell transplantation from HLA-identical siblings in Thai patients. HLA. 2016 Jun;87(6):422-31. doi: 10.1111/tan.12829. PubMed PMID: 27273744.

4: Virakul S, Heutz JW, Dalm VA, Peeters RP, Paridaens D, van den Bosch WA, Hirankarn N, van Hagen PM, Dik WA. Basic FGF and PDGF-BB synergistically stimulate hyaluronan and IL-6 production by orbital fibroblasts. *Mol Cell Endocrinol*. 2016 Sep 15;433:94-104. doi: 10.1016/j.mce.2016.05.023. PubMed PMID: 27267669.

5: Boonchaoy A, Wongchampa P, Hirankarn N, Chaithongwongwatthana S. Performance of Chemiluminescent Microparticle Immunoassay in Screening for Syphilis in Pregnant Women from Low-Prevalence, Resource-Limited Setting. *J Med Assoc Thai*. 2016 Feb;99(2):119-24. PubMed PMID: 27249890.

6: Yüksel Ş, Kucukazman SO, Karataş GS, Ozturk MA, Prombhul S, Hirankarn N. Methylation Status of Alu and LINE-1 Interspersed Repetitive Sequences in Behcet's Disease Patients. *Biomed Res Int*. 2016;2016:1393089. doi: 10.1155/2016/1393089. PubMed PMID: 27123441; PubMed Central PMCID: PMC4829674.

7: Thipmanee O, Numnuam A, Limbut W, Buranachai C, Kanatharana P, Vilaivan T, Hirankarn N, Thavarungkul P. Enhancing capacitive DNA biosensor performance by target overhang with application on screening test of HLA-B*58:01 and HLA-B*57:01 genes. *Biosens Bioelectron*. 2016 Aug 15;82:99-104. doi: 10.1016/j.bios.2016.03.065. PubMed PMID: 27054813.

8: Chiewchengchol D, Wright HL, Thomas HB, Lam CW, Roberts KJ, Hirankarn N, Beresford MW, Moots RJ, Edwards SW. Differential changes in gene expression in human neutrophils following TNF- α stimulation: Up-regulation of anti-apoptotic proteins and down-regulation of proteins involved in death receptor signaling. *Immun Inflamm Dis*. 2015 Dec 2;4(1):35-44. doi: 10.1002/iid3.90. PubMed PMID: 27042300; PubMed Central PMCID: PMC4768069.

9: Kupatawintu P, Tatawatorn A, Premasathian N, Avihingsanon Y, Leelahavanichkul A, Hirankarn N. Association between flow cytometric crossmatching and graft survival in Thai cadaveric-donor kidney transplantation. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2016 Mar;34(1):86-93. doi: 10.12932/AP0569.34.1.2016. PubMed PMID: 26994631.

10: Kunanopparat A, Hirankarn N, Kittigul C, Tangkijvanich P, Kimkong I. Autophagy machinery impaired interferon signalling pathways to benefit hepatitis B virus replication. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2016 Mar;34(1):77-85. doi: 10.12932/AP0636.34.1.2016. PubMed PMID: 26994630.

11: Leelahavanichkul A, Somparn P, Issara-Amphorn J, Eiam-ong S, Avihingsanon Y, Hirankarn N, Srisawat N. Serum Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) Outperforms Serum

Creatinine in Detecting Sepsis-Induced Acute Kidney Injury, Experiments on Bilateral Nephrectomy and Bilateral Ureter Obstruction Mouse Models. *Shock*. 2016 May;45(5):570-6. doi: 10.1097/SHK.0000000000000530. PubMed PMID: 26863120.

12: Kongkavitoon P, Tangkijvanich P, Hirankarn N, Palaga T. Hepatitis B Virus HBx Activates Notch Signaling via Delta-Like 4/Notch1 in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2016 Jan 14;11(1):e0146696. doi: 10.1371/journal.pone.0146696. PubMed PMID: 26766040; PubMed Central PMCID: PMC4713073.

13: Virakul S, Dalm VA, Paridaens D, van den Bosch WA, Mulder MT, Hirankarn N, van Hagen PM, Dik WA. Platelet-Derived Growth Factor-BB Enhances Adipogenesis in Orbital Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015 Aug;56(9):5457-64. doi: 10.1167/iovs.15-17001. PubMed PMID: 26284551.

14: Tantivitayakul P, Benjachat T, Somparn P, Leelahavanichkul A, Kittikovit V, Hirankarn N, Pisitkun T, Avihingsanon Y. Elevated expressions of myeloid-related proteins-8 and -14 are danger biomarkers for lupus nephritis. *Lupus*. 2016 Jan;25(1):38-45. doi: 10.1177/0961203315598015. PubMed PMID: 26223295.

15: Zhang J, Zhang L, Zhang Y, Yang J, Guo M, Sun L, Pan HF, Hirankarn N, Ying D, Zeng S, Lee TL, Lau CS, Chan TM, Leung AM, Mok CC, Wong SN, Lee KW, Ho MH, Lee PP, Chung BH, Chong CY, Wong RW, Mok MY, Wong WH, Tong KL, Tse NK, Li XP, Avihingsanon Y, Rianthavorn P, Deekajorndej T, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V, Ying SK, Fung SK, Lai WM, Garcia-Barceló MM, Cherny SS, Sham PC, Cui Y, Yang S, Ye DQ, Zhang XJ, Lau YL, Yang W. Gene-based meta-analysis of genome-wide association study data identifies independent single-nucleotide polymorphisms in ANXA6 as being associated with systemic lupus erythematosus in Asian populations. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Nov;67(11):2966-77. doi: 10.1002/art.39275. PubMed PMID: 26202167.

16: Benjachat T, Tongyoo P, Tantivitayakul P, Somparn P, Hirankarn N, Prom-On S, Pisitkun P, Leelahavanichkul A, Avihingsanon Y, Townamchai N. Biomarkers for Refractory Lupus Nephritis: A Microarray Study of Kidney Tissue. *Int J Mol Sci*. 2015 Jun 23;16(6):14276-90. doi: 10.3390/ijms160614276. PubMed PMID: 26110394; PubMed Central PMCID: PMC4490552.

17: Huang Y, Yang J, Ying D, Zhang Y, Shotelersuk V, Hirankarn N, Sham PC, Lau YL, Yang W. HLAreporter: a tool for HLA typing from next generation sequencing data. *Genome Med*. 2015 Mar 16;7(1):25. doi: 10.1186/s13073-015-0145-3. PubMed PMID: 25908942; PubMed Central PMCID: PMC4407542.

18: Zhang Y, Wang YF, Yang J, Zhang J, Sun L, Hirankarn N, Pan HF, Lau CS, Chan TM, Lee TL, Leung AM, Mok CC, Zhang L, Shen JJ, Wong SN, Lee KW, Ho MH, Lee PP, Chung BH, Chong CY, Wong RW, Mok MY, Wong WH, Tong KL, Tse NK, Li XP, Avihingsanon Y, Rianthavorn P, Deekajorndej T, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V, Ying SK, Fung SK, Lai WM, Wong CM, Ng IO, Garcia-Barcelo MM, Cherny SS, Tam PK, Sham PC, Yang S, Ye DQ, Cui Y, Zhang XJ, Yang W, Lau YL. Meta-analysis of two Chinese populations identifies an autoimmune disease risk allele in 22q11.21 as associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2015 Mar 20;17:67. doi: 10.1186/s13075-015-0577-6. PubMed PMID: 25880549; PubMed Central PMCID: PMC4404227.

19: Zhang Y, Yang J, Zhang J, Sun L, Hirankarn N, Pan HF, Lau CS, Chan TM, Lee TL, Leung AM, Mok CC, Zhang L, Wang Y, Shen JJ, Wong SN, Lee KW, Ho MH, Lee PP, Chung BH, Chong CY, Wong RW, Mok MY, Wong WH, Tong KL, Tse NK, Li XP, Avihingsanon Y, Rianthavorn P, Deekajorndej T, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V, Ying SK, Fung SK, Lai WM, Wong CM, Ng IO, Garcia-Barcelo MM, Cherny SS, Cui Y, Sham PC, Yang S, Ye DQ, Zhang XJ, Lau YL, Yang W. Genome-wide search followed by replication reveals genetic interaction of CD80 and ALOX5AP associated with systemic lupus erythematosus in Asian populations. *Ann Rheum Dis*. 2016 May;75(5):891-8. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206367. PubMed PMID: 25862617.

20: Yooyongsatit S, Ruchusatsawat K, Noppakun N, Hirankarn N, Mutirangura A, Wongpiyabovorn J. Patterns and functional roles of LINE-1 and Alu methylation in the keratinocyte from patients with psoriasis vulgaris. *J Hum Genet*. 2015 Jul;60(7):349-55. doi: 10.1038/jhg.2015.33. PubMed PMID: 25833468.

21: Yoo SJ, Wang LL, Ning HC, Tao CM, Hirankarn N, Kuakarn S, Yang R, Han TH, Chan RC, Hussain BM, Hussin H, Muliathy D, Shen L, Liu H, Wei L. Evaluation of the Elecsys® Anti-HCV II assay for routine hepatitis C virus screening of different Asian Pacific populations and detection of early infection. *J Clin Virol*. 2015 Mar;64:20-7. doi: 10.1016/j.jcv.2014.12.015. PubMed PMID: 25728074.

22: Kimkong I, Chankaew J, Kunanopparat A, Hirankarn N, Tangkijvanich P. Gene polymorphisms of interleukin 28B and the risk to chronic hepatitis B virus infection in Thai. *Tissue Antigens*. 2015 Mar;85(3):177-81. doi: 10.1111/tan.12517. PubMed PMID: 25664396.

23: Leelahavanichkul A, Somparn P, Panich T, Chancharoenthana W, Wongphom J, Pisitkun T, Hirankarn N, Eiam-Ong S. Serum miRNA-122 in acute liver injury induced by kidney injury and sepsis in CD-1 mouse models. *Hepatol Res*. 2015 Dec;45(13):1341-52. doi: 10.1111/hepr.12501. PubMed PMID: 25655304.

24: Chiewchengchol D, Midgley A, Sodsai P, Deekajorndech T, Hirankarn N, Beresford MW, Edwards SW. The protective effect of GM-CSF on serum-induced neutrophil apoptosis in juvenile systemic lupus erythematosus patients. *Clin Rheumatol*. 2015 Jan;34(1):85-91. doi: 10.1007/s10067-014-2800-2. PubMed PMID: 25344776.

25: Pisitkun T, Dummer P, Somparn P, Hirankarn N, Kopp JB, Knepper MA. Integrated Design of Antibodies for Systems Biology Using Ab Designer.. *J Proteomics Bioinform*. 2014 Mar 24;7(4):088-94. PubMed PMID: 25328345; PubMed Central PMCID: PMC4201049.

26: Zhang Y, Zhang J, Yang J, Wang Y, Zhang L, Zuo X, Sun L, Pan HF, Hirankarn N, Wang T, Chen R, Ying D, Zeng S, Shen JJ, Lee TL, Lau CS, Chan TM, Leung AM, Mok CC, Wong SN, Lee KW, Ho MH, Lee PP, Chung BH, Chong CY, Wong RW, Mok MY, Wong WH, Tong KL, Tse NK, Li XP, Avihingsanon Y, Rianthavorn P, Deekajorndej T, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V, Ying SK, Fung SK, Lai WM, Wong CM, Ng IO, Garcia-Barcelo MM, Cherny SS, Tam PK, Sham PC, Yang S, Ye DQ, Cui Y, Zhang XJ, Lau YL, Yang W. Meta-analysis of GWAS on two Chinese populations followed by replication identifies novel genetic variants on the X chromosome associated with systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet*. 2015 Jan 1;24(1):274-84. doi: 10.1093/hmg/ddu429. PubMed PMID: 25149475.

27: Virakul S, Dalm VA, Paridaens D, van den Bosch WA, Hirankarn N, van Hagen PM, Dik WA. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib effectively blocks PDGF-induced orbital fibroblast activation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2014 Jul;252(7):1101-9. doi: 10.1007/s00417-014-2674-7. PubMed PMID: 24874745.

28: Sukapan P, Promnarate P, Avihingsanon Y, Mutirangura A, Hirankarn N. Types of DNA methylation status of the interspersed repetitive sequences for LINE-1, Alu, HERV-E and HERV-K in the neutrophils from systemic lupus erythematosus patients and healthy controls. *J Hum Genet*. 2014 Apr;59(4):178-88. doi: 10.1038/jhg.2013.140. PubMed PMID: 24430577.

29: Sodsai P, Surakiatchanukul T, Kupatawintu P, Tangkitvanich P, Hirankarn N. Association of cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms with the risk of chronic hepatitis B. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2013 Dec;31(4):277-85. doi: 10.12932/AP0284.31.4.2013. PubMed PMID: 24383970.

30: Tan AT, Sodsai P, Chia A, Moreau E, Chng MH, Tham CY, Ho ZZ, Banu N, Hirankarn N, Bertoletti A. Immunoprevalence and immunodominance of HLA-Cw*0801-restricted T cell response targeting the hepatitis B virus envelope transmembrane region. *J Virol*. 2014

Jan;88(2):1332-41. doi: 10.1128/JVI.02600-13. PubMed PMID: 24227846; PubMed Central PMCID: PMC3911665.

31: Zhang J, Zhang Y, Yang J, Zhang L, Sun L, Pan HF, Hirankarn N, Ying D, Zeng S, Lee TL, Lau CS, Chan TM, Leung AM, Mok CC, Wong SN, Lee KW, Ho MH, Lee PP, Chung BH, Chong CY, Wong RW, Mok MY, Wong WH, Tong KL, Tse NK, Li XP, Avihingsanon Y, Rianthavorn P, Deekajorndej T, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V, Ying SK, Fung SK, Lai WM, Garcia-Barceló MM, Cherny SS, Tam PK, Cui Y, Sham PC, Yang S, Ye DQ, Zhang XJ, Lau YL, Yang W. Three SNPs in chromosome 11q23.3 are independently associated with systemic lupus erythematosus in Asians. *Hum Mol Genet.* 2014 Jan 15;23(2):524-33. doi: 10.1093/hmg/ddt424. PubMed PMID: 24001599.

32: Kuakarn S, SomParn P, Tangkijvanich P, Mahachai V, Thongboonkerd V, Hirankarn N. Serum proteins in chronic hepatitis B patients treated with peginterferon alfa-2b. *World J Gastroenterol.* 2013 Aug 21;19(31):5067-75. doi: 10.3748/wjg.v19.i31.5067. PubMed PMID: 23964140; PubMed Central PMCID: PMC3746378.

33: Romporn S, Hirankarn N, Tangkijvanich P, Kimkong I. Association of IFNAR2 and IL10RB genes in chronic hepatitis B virus infection. *Tissue Antigens.* 2013 Jul;82(1):21-5. doi: 10.1111/tan.12133. PubMed PMID: 23745570.

34: Chokdeemeeboon C, Ammarinthukrowh P, Tongkobpetch S, Srichomtong C, Deekajorndech T, Rianthavorn P, Kingwattanakul P, Avihingsanon Y, Wright HL, Akkahat P, Hoven VP, Mekboonsonglarp W, Edwards SW, Hirankarn N, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. DcR3 mutations in patients with juvenile-onset systemic lupus erythematosus lead to enhanced lymphocyte proliferation. *J Rheumatol.* 2013 Aug;40(8):1316-26. doi: 10.3899/jrheum.121285. PubMed PMID: 23729807.

35: Kimkong I, Tangkijvanich P, Hirankarn N. Association of interferon-alpha gene polymorphisms with chronic hepatitis B virus infection. *Int J Immunogenet.* 2013 Dec;40(6):476-81. doi: 10.1111/iji.12055. PubMed PMID: 23566196.

36: Nakkuntod J, Sukkapan P, Avihingsanon Y, Mutirangura A, Hirankarn N. DNA methylation of human endogenous retrovirus in systemic lupus erythematosus. *J Hum Genet.* 2013 May;58(5):241-9. doi: 10.1038/jhg.2013.6. PubMed PMID: 23466822.

37: Yang W, Tang H, Zhang Y, Tang X, Zhang J, Sun L, Yang J, Cui Y, Zhang L, Hirankarn N, Cheng H, Pan HF, Gao J, Lee TL, Sheng Y, Lau CS, Li Y, Chan TM, Yin X, Ying D, Lu Q, Leung AM, Zuo

X, Chen X, Tong KL, Zhou F, Diao Q, Tse NK, Xie H, Mok CC, Hao F, Wong SN, Shi B, Lee KW, Hui Y, Ho MH, Liang B, Lee PP, Cui H, Guo Q, Chung BH, Pu X, Liu Q, Zhang X, Zhang C, Chong CY, Fang H, Wong RW, Sun Y, Mok MY, Li XP, Avihingsanon Y, Zhai Z, Rianthavorn P, Deekajorndej T, Suphapeetiporn K, Gao F, Shotelersuk V, Kang X, Ying SK, Zhang L, Wong WH, Zhu D, Fung SK, Zeng F, Lai WM, Wong CM, Ng IO, Garcia-Barceló MM, Cherny SS, Shen N, Tam PK, Sham PC, Ye DQ, Yang S, Zhang X, Lau YL. Meta-analysis followed by replication identifies loci in or near CDKN1B, TET3, CD80, DRAM1, and ARID5B as associated with systemic lupus erythematosus in Asians. *Am J Hum Genet.* 2013 Jan 10;92(1):41-51. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.11.018. PubMed PMID: 23273568; PubMed Central PMCID: PMC3542470.

38: Treamtrakanpon W, Tantivitayakul P, Benjachat T, Somparn P, Kittikowit W, Eiam-ong S, Leelahavanichkul A, Hirankarn N, Avihingsanon Y. APRIL, a proliferation-inducing ligand, as a potential marker of lupus nephritis. *Arthritis Res Ther.* 2012 Nov 21;14(6):R252. doi: 10.1186/ar4095. PubMed PMID: 23171638; PubMed Central PMCID: PMC3674621.

39: Somparn P, Hirankarn N, Leelahavanichkul A, Khovidhunkit W, Thongboonkerd V, Avihingsanon Y. Urinary proteomics revealed prostaglandin H(2)D-isomerase, not Zn- α 2-glycoprotein, as a biomarker for active lupus nephritis. *J Proteomics.* 2012 Jun 18;75(11):3240-7. doi: 10.1016/j.jprot.2012.03.034. PubMed PMID: 22498882.

40: Jongjaroenprasert W, Phusantisampan T, Mahasirimongkol S, Mushiroda T, Hirankarn N, Snabboon T, Chanprasertyotin S, Tantiwong P, Soonthornpun S, Rattanapichart P, Mamasiri S, Himathongkam T, Ongphiphadhanakul B, Takahashi A, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y. A genome-wide association study identifies novel susceptibility genetic variation for thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis. *J Hum Genet.* 2012 May;57(5):301-4. doi: 10.1038/jhg.2012.20. PubMed PMID: 22399142.

41: Virakul S, Kupatawintu P, Nakkuntod J, Kangwanshiratada O, Vilaivan T, Hirankarn N. A nested sequence-specific primer-polymerase chain reaction for the detection of HLA-B*15:02. *Tissue Antigens.* 2012 Apr;79(4):295-301. doi: 10.1111/j.1399-0039.2012.01836.x. PubMed PMID: 22283394.

42: Kimkong I, Nakkuntod J, Sodsai P, Hirankarn N, Kitkumthorn N. Association of interferon-gamma gene polymorphisms with susceptibility to oral lichen planus in the Thai population. *Arch Oral Biol.* 2012 May;57(5):491-4. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.10.009. PubMed PMID: 22041017.

43: Li R, Yang W, Zhang J, Hirankarn N, Pan HF, Mok CC, Chan TM, Wong RW, Mok MY, Lee KW, Wong SN, Leung AM, Li XP, Avihingsanon Y, Lee TL, Ho MH, Lee PP, Wong WH, Wong CM, Ng IO, Yang J, Li PH, Zhang Y, Zhang L, Li W, Baum L, Kwan P, Rianthavorn P, Deekajorndej T, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V, Garcia-Barceló MM, Cherny SS, Tam PK, Sham PC, Lau CS, Shen N, Lau YL, Ye DQ. Association of CD247 with systemic lupus erythematosus in Asian populations. *Lupus*. 2012 Jan;21(1):75-83. doi: 10.1177/0961203311422724. PubMed PMID: 22004975.

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 1

ชื่อ-นามสกุล นายจิราเดช มักเจริญ

ตำแหน่งปัจจุบัน นิสิตปริญญาเอก

หน่วยงาน สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2564132

E-mail jiradejmak@gmail.com

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	B.Sc.	เทคนิคการแพทย์	2554
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	M.Sc.	จุลชีววิทยาทางการแพทย์	2558

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 2

ชื่อ-นามสกุล นางสาวธิติมา เบ็ญจะชาติ

ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัยหลังปริญญาเอก

หน่วยงาน ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาและโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

โทรศัพท์ 02-2564132

E-mail tbenjachat@gmail.com

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ
มหาวิทยาลัยศิลปากร	B.Sc.	เทคโนโลยีชีวภาพ	2545
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	M.Sc.	วิทยาศาสตร์ทางการแพทย์	2550
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	Ph.D	วิทยาศาสตร์ทางการแพทย์	2559

ผลงานวิจัย

1: Tantivitayakul P, Benjachat T, Somporn P, Leelahavanichkul A, Kittikovit V, Hirankarn N, Pisitkun T, Avihingsanon Y. Elevated expressions of myeloid-related proteins-8 and -14 are danger biomarkers for lupus nephritis. *Lupus*. 2016 Jan;25(1):38-45. doi: 10.1177/0961203315598015. PubMed PMID: 26223295.

2: Benjachat T, Tongyoo P, Tantivitayakul P, Somporn P, Hirankarn N, Prom-On S, Pisitkun P, Leelahavanichkul A, Avihingsanon Y, Townamchai N. Biomarkers for Refractory Lupus Nephritis: A Microarray Study of Kidney Tissue. *Int J Mol Sci*. 2015 Jun 23;16(6):14276-90. doi: 10.3390/ijms160614276. PubMed PMID: 26110394; PubMed Central PMCID: PMC4490552.

3: Huebner AR, Somporn P, Benjachat T, Leelahavanichkul A, Avihingsanon Y, Fenton RA, Pisitkun T. Exosomes in urine biomarker discovery. *Adv Exp Med Biol*. 2015;845:43-58. doi: 10.1007/978-94-017-9523-4_5. PubMed PMID: 25355568.

4: Treamtrakanpon W, Tantivitayakul P, Benjachat T, Somporn P, Kittikowit W, Eiam-ong S, Leelahavanichkul A, Hirankarn N, Avihingsanon Y. APRIL, a proliferation-inducing ligand, as a potential marker of lupus nephritis. *Arthritis Res Ther*. 2012 Nov 21;14(6):R252. doi: 10.1186/ar4095. PubMed PMID: 23171638; PubMed Central PMCID: PMC3674621.