Review Article

การยับยั้งอาร์เอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้

กนกวรรณ จารุกำจร[1]* และ พิมาน โภคาทรัพย์[2]

[1] สำนักงานวิชาการ สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[2] นักศึกษาเภสัชศาสตร์ ชั้นปีที่ 5 สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* Corresponding author: kanok_ja@kku.ac.th

บทคัดย่อ

การควบคุมการแสดงออกของยีนแบ่งได้หลายระดับ ตั้งแต่การควบคุมในระดับจีโนมไปจนถึงระดับการสร้างและดัดแปลงโปรตีนที่ได้จากยีน การยับยั้งอาร์เอ็นเอ (RNA interference หรือ RNAi) เป็นหนึ่งในกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับหลังการถอดรหัส (post-transcription) ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอท โดยกลไกเริ่มต้นจากเมื่อมี long-double strand RNA (long-dsRNA) เกิดขึ้นในเซลล์ long-dsRNA นี้จะถูกตัดและดัดแปลงต่อได้เป็น short-interference RNA (siRNA) จากนั้น siRNA จะเข้ารวมกับกลุ่มของเอนไซม์เกิดเป็นคอมเพล็กซ์ซึ่งทำหน้าที่ตัดทำลาย mRNA ที่มีลำดับเบสคู่สมกับ siRNA นั้น เป็นเหตุให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน จากความสามารถนี้ทำให้มีการประยุกต์ใช้กระบวนการ RNAi เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนในหลายด้าน โดยมีจุดประสงค์หลักเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนและศึกษาผลที่เกิดขึ้นเมื่อยีนนั้น ๆ ถูกยับยั้ง มีการประยุกต์ใช้กระบวนการ RNAi ในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดรักษา ผลจากการศึกษาทดลองแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำกระบวนการ RNAi ไปใช้ในการรักษาโรค ดังนั้นการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับ RNAi จึงเป็นหัวข้อหนึ่งที่ควรได้รับการพัฒนา เพื่อให้สามารถประยุกต์ใช้ในการบำบัดรักษาได้อย่างกว้างขวางในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: การยับยั้งอาร์เอ็นเอ, อาร์เอ็นเอไอ, การยับยั้งอาร์เอ็นเอสายสั้น, เอสไออาร์เอ็นเอ

Thai Pharm Health Sci J 2009;4(2):262-271[§]

บทนำ

การยับยั้งอาร์เอ็นเอ (RNA interference หรือ RNAi) เป็นกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีนอย่างเฉพาะเจาะจงที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอท โดยการยับยั้งอย่างเฉพาะเจาะจงนี้ อาศัยความเหมือนระหว่างลำดับเบสของส่วนประกอบในกระบวนการ RNAi เป็นตัวกำหนด หน้าที่ของกระบวนการนี้ โดยสรุปแบ่งออกได้ 3 ลักษณะคือ การควบคุมการแสดงออกของยีน การป้องกันจีโนมจาก transposon (jumping gene) และการป้องกันไวรัส จากความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีนอย่างเฉพาะเจาะจงนี้ จึงได้มีการศึกษาและพัฒนากระบวนการ RNAi โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อเป็นเครื่องมือในการศึกษาหาแนวทางการประยุกต์ใช้ในการรักษาโรค

หากพิจารณาการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติแล้ว แนวทางการรักษาที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด คือ การควบคุมการแสดงออกของยีนที่ผิดปกตินั้น ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีต่าง ๆ ขึ้น เพื่อใช้ควบคุมการแสดงออกของยีนอย่างเฉพาะเจาะจง อาทิ เช่น Antisense technology และ Triplex technology แต่ด้วยขีดจำกัดหลายด้านของเทคโนโลยีเหล่านี้ จึงยังมีอุปสรรคในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเหล่านี้ในการรักษาโรค เป็นเหตุให้มีการศึกษาและพัฒนากระบวนการ RNAi โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการประยุกต์ใช้ในการรักษา

กระบวนการ RNA interference

การควบคุมการแสดงออกของยีนโดยทั่วไปสามารถแบ่งได้ 5 ระดับคือ ระดับจีโนม (genome) ระดับการถอดรหัส (transcription) ระดับหลังการถอดรหัส (post-transcription) ระดับการแปลรหัส (translation) และระดับหลังการแปลรหัส (post-translation) กระบวนการ RNAi เป็นการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับหลังการถอดรหัส จากการที่กระบวนการ RNAi มีการทำลาย messenger RNA (mRNA)

[§] 14th year of Srinakharinwirot Journal of Pharmaceutical Science

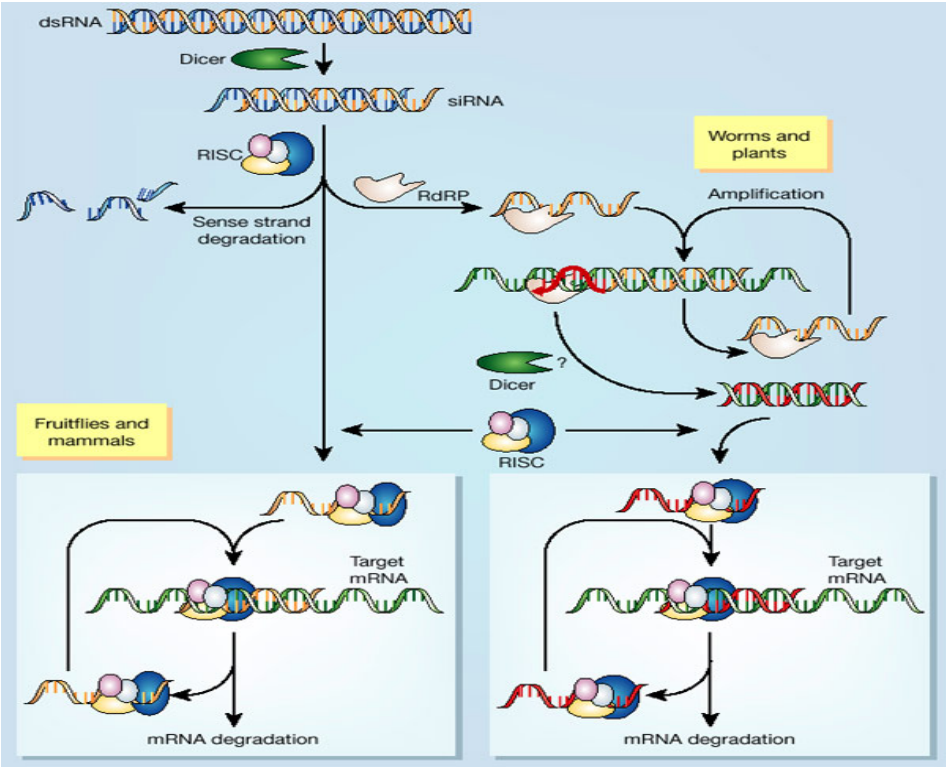
ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากขั้นตอนการถอดรหัส โดยกระบวนการเกิด RNAi ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นการสังเคราะห์ short interference RNA (siRNA) และ ขั้นการทำลาย mRNA เป้าหมาย[1] ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเกิด siRNA

กระบวนการ RNAi เริ่มต้นเมื่อมี long-double stand RNA (dsRNA) เข้ามาในเซลล์ จากนั้น RDE4/R2D2 ซึ่งเป็น dsRNA-binding protein จะทำหน้าที่จับกับ dsRNA นี้ แล้วเหนี่ยวนำให้เอนไซม์ไดเซอร์ (Dicer) ซึ่งเป็นเอนไซม์เอนโดไรโบนิวคลีเอส (endoribonuclease) ในกลุ่ม RNAse III เข้ามาจับและตัด dsRNA โดยใช้พลังงานจาก ATP ได้เป็น short interference RNA (siRNA) มีลักษณะเป็น short-double stand RNA ที่มีความยาวประมาณ 21 ถึง 25 นิวคลีโอไทด์ (nucleotides) มีปลาย 3' ยื่นเลยปลาย 5' ออกมาจำนวน 2 นิวคลีโอไทด์ (3' protruding end) รวมทั้งมีการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ด้วย

ขั้นตอนที่ 2 การทำลาย mRNA เป้าหมาย (target mRNA)

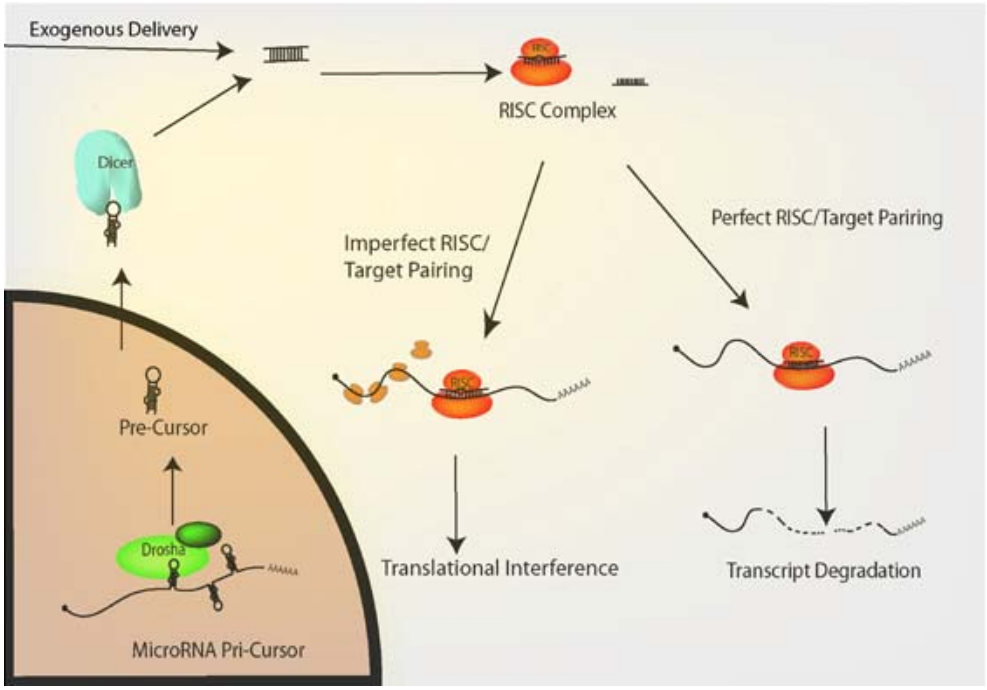
siRNA ที่ได้จากขั้นตอนแรกจะรวมเข้ากับ RNA-induced silencing complex (RISC) โดย RISC เป็นคอมเพล็กซ์ที่เกิดจากการรวมตัวกันของเอนไซม์หลายชนิดเพื่อทำงานร่วมกัน ซึ่งรวมถึงเอนไซม์ในกลุ่ม helicase และ RNAse III ด้วย เอนไซม์ในกลุ่ม helicase จะทำหน้าที่คลายเกลียว siRNA ให้เหลือเพียง antisense strand อยู่ใน RISC ซึ่ง antisense strand นี้ จะทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดความเฉพาะเจาะจงในการทำงานของ RISC หลังจากนั้น RISC จะจับกับเฉพาะ mRNA ที่มีลำดับเบสคู่สม (complementary) กับ antisense strand เท่านั้น หลังจากที่ RISC จับกับ mRNA เป้าหมาย จะทำให้เกิดการตัดทำลาย mRNA ที่ตำแหน่งบริเวณตรงกลางตรงข้ามกับ antisense strand ทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างโปรตีนที่ mRNA นั้นเป็นตัวกำหนด ถือเป็นการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับหลังการถอดรหัส (**รูปที่ 1**)



รูปที่ 1 กระบวนการ RNAi เริ่มจากเมื่อมี dsRNA เข้ามาหรือเกิดขึ้นในเซลล์ เอนไซม์ไดเซอร์จะตัด dsRNA นี้ได้เป็น siRNA ซึ่งจะรวมตัวกับกลุ่มของเอนไซม์ RISC แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดการตัด mRNA เป้าหมาย ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มพืชและหนอนจะมีกระบวนการ RNAi amplification เพิ่มขึ้นมาด้วย โดยเป็นการเพิ่ม dsRNA เข้าไปในระบบโดยใช้ mRNA เป้าหมายเป็นสายต้นแบบและใช้ siRNA เป็นสายเริ่มในการสังเคราะห์ dsRNA สายใหม่ (ที่มา: http://www.nature.com/.../n6996/images/430161a-f2.2.jpg, 2009, สืบค้นเมื่อ 14 ม.ค. 2552)

นอกจากการยับยั้งการแสดงออกของยีนในบริเวณที่เกิดกระบวนการ RNAi แล้ว ในสิ่งมีชีวิตบางชนิดกระบวนการ RNAi ยังสามารถแพร่กระจายไปยังเซลล์หรือเนื้อเยื่ออื่น ๆ ทั่วร่างกาย (systemic RNAi) ทั้งยังสามารถถูกถ่ายทอดไปยังอีกรุ่นได้[2] สิ่งที่น่าสนใจ คือ จากการทดลองยังไม่พบกระบวนการ systemic RNAi ในมนุษย์ แต่พบว่าในเซลล์ของมนุษย์มีโปรตีนที่ชื่อ SID-1 ซึ่งเป็น transmembrane protein ที่ทำหน้าที่ในการรับและส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ systemic RNAi อยู่ด้วย ในขณะที่ RNAi amplification เป็นกระบวนการเพิ่มการทำงานของ RNAi โดยเป็นการเพิ่ม dsRNA ซึ่งเป็นตัวตั้งต้นของกระบวนการ RNAi เข้าไปในระบบ โดยใช้ siRNA และ target mRNA เป็นตัวตั้งต้นในการสร้าง dsRNA โดย mRNA เป้าหมายจะทำหน้าที่เป็นสายแม่แบบ (template strand) ให้กับเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) ใช้ในการสังเคราะห์ new-dsRNA ส่วน siRNA ทำหน้าที่เป็นสายเริ่ม (primer) (รูปที่ 1)

ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอท microRNA (miRNA) ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิดด้วยกัน โดยกระบวนการเกิด miRNA เริ่มจากการถอดรหัสของ endogenous gene ได้ long-primary miRNA หลังจากนั้นจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ Drosha อยู่ในรูป short hairpin RNA มีขนาดประมาณ 75 นิวคลีโอไทด์ จากนั้นจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ไดเซอร์ได้ miRNA ซึ่งสามารถจับกับ RISC เกิดการยับยั้งการทำงานของ mRNA ได้ โดยมีการยับยั้งการทำงานของยีน 2 ลักษณะ คือ ในกรณีที่ลำดับเบสระหว่าง miRNA กับ mRNA เป็นแบบ perfect หรือ nearly perfect complementary จะเกิดการตัดทำลาย mRNA ขึ้น ส่วนกรณีที่สอง คือ ลำดับเบสระหว่าง miRNA กับ mRNA เป็นแบบ partial complementary จะเกิดการจับของ miRNA กับ mRNA เพื่อกดการทำงานของ mRNA และจากคุณสมบัติของ miRNA ที่สามารถทำงานได้ในกรณี partial perfect ทำให้ miRNA สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิดได้ด้วย miRNA เพียงชนิดเดียว เพราะไม่ต้องการความเฉพาะเจาะจงมากนักในการจับกับ mRNA เป้าหมาย (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 กระบวนการ miRNA เริ่มเมื่อมี primary miRNA (MicroRNA pri-Cursor) ซึ่งจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ Drosha ได้ short-hairpin RNA (Pre-Cursor) ขนาดประมาณ 75 นิวคลีโอไทด์ซึ่งสามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ ไดเซอร์ต่อได้ miRNA เมื่อรวมตัวกับ RISC จะสามารถทำงานได้ 2 ลักษณะด้วยกันคือ การทำลาย mRNA เป้าหมายหรือการกดการทำงานของ mRNA เป้าหมาย โดยการทำงานของ miRNA นั้นจะเป็นลักษณะใดขึ้นอยู่กับความเป็นคู่สมระหว่างลำดับเบสของ miRNA และ mRNA เป้าหมาย (ที่มา: http://www.nature.com/.../v13/n6/thumbs/3302723f1th.jpg, สืบค้นเมื่อ 14 ม.ค. 2552)

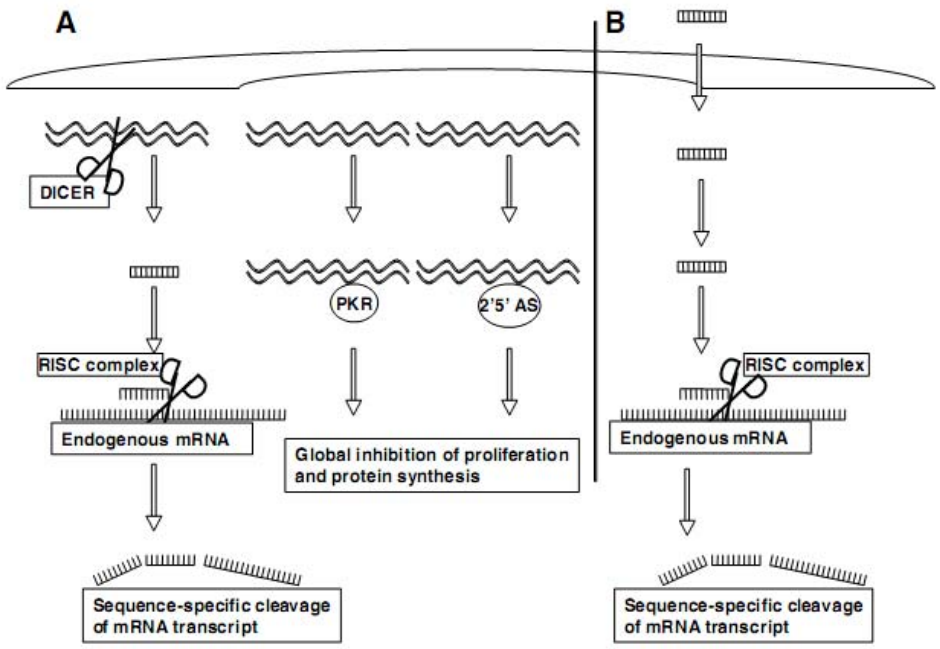
หลักการประยุกต์ใช้ RNAi

การกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการ RNAi ทำได้หลายวิธีด้วยกัน โดยหลักการคือการนำ dsRNA ไม่ว่าจะเป็น long-dsRNA หรือ short-dsRNA (siRNA) ส่งเข้าไปในเซลล์เพื่อกระตุ้นกลไกการทำงานภายในเซลล์ สิ่งที่ควรพิจารณาจากข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้กระบวนการ RNAi คือ สำหรับสัตว์มีกระดูกสันหลังรวมถึงมนุษย์นั้นการให้ long-dsRNA เข้าไปในเซลล์จะเป็นการกระตุ้นระบบป้องกันตัวของเซลล์ผ่านกลไกการทำงานของเอนไซม์ ds-RNA dependent protein kinase (PKR) และ 2',5'-oligosynthetase (2',5' AS response) (รูปที่ 3A) ส่งผลให้เซลล์เกิดการสร้าง interferon alpha และเกิดกระบวนการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยรวม (global inhibition of protein synthesis) ผลสุดท้ายคือทำให้เซลล์เกิด apoptosis ดังนั้นในการทดลองหรือประยุกต์ใช้กระบวนการ RNAi จึงนิยมใช้ siRNA แทน long-dsRNA ในสัตว์มีกระดูกสันหลังเพื่อหลีกเลี่ยงผลจากการกระตุ้นระบบป้องกันตัวของเซลล์ (รูปที่ 3B) ส่วนอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ คือ การให้พลาสมิดเข้าไปในเซลล์เพื่อสังเคราะห์ siRNA หรือ short-hairpin RNA (shRNA) ซึ่งสามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ไดเซอร์ได้เป็น siRNA เช่นกัน

วิธีการสังเคราะห์ siRNA

1) Chemically synthesized siRNA วิธีนี้ใช้การสังเคราะห์ทางเคมีในการผลิต siRNA วิธีนี้สามารถสังเคราะห์ได้ง่ายแต่ใช้ต้นทุนสูง

2) Enzymatically synthesized siRNA วิธีนี้ใช้เอนไซม์ในการผลิต siRNA โดยเอนไซม์ที่นิยมใช้คือ T7 RNA polymerase (4) ใช้เพื่อถอดรหัสยีนที่เราต้องการให้อยู่ในรูป long-dsRNA หลังจากนั้นจึงใช้เอนไซม์ *E. coli* RNAse III ตัดให้ได้ siRNA วิธีนี้มีข้อดีคือใช้เวลาในการสังเคราะห์น้อยและได้ siRNA ที่หลากหลายและมีความจำเพาะเจาะจงต่อ mRNA เป้าหมาย แต่มีข้อด้อยจากการมีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ จึงมีความยุ่งยากมากขึ้นในการทำให้ siRNA ที่ได้บริสุทธิ์



รูปที่ 3 การเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ RNAi A) การเหนี่ยวนำโดยใช้ long-ds RNA นอกจากจะเกิดการยับยั้งการแสดงออกของเซลล์แล้ว ในสัตว์มีกระดูกสันหลังสามารถทำให้เกิดการตอบสนองจากระบบป้องกันตนเองของเซลล์ได้ด้วย ได้แก่ ds-RNA dependent protein kinase (PKR) และ 2',5'-oligosynthetase (2',5' AS response) **B)** การเหนี่ยวนำโดยใช้ siRNA ทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของเซลล์โดยไม่กระตุ้นระบบป้องกันตนเองของเซลล์[3]

3) siRNA-expressing plasmid (vector) เนื่องจากข้อจำกัดของสองวิธีการแรกคือ siRNA ที่ได้ให้ผลยับยั้งการแสดงออกของยีนเพียงชั่วคราว วิธี siRNA-expressing plasmid จึงถูกประยุกต์ใช้ขึ้นมาโดยมีจุดประสงค์เพื่อให้มีการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ยาวนานขึ้น โดยพลาสมิดที่ใช้ในการสังเคราะห์ siRNA หรือ shRNA นี้นิยมใช้ U6 และ H1 RNA polymerase III promoter (5) เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์อาร์เอนเอในตำแหน่งที่ต้องการ ข้อจำกัดของการใช้วิธีนี้คือนอกจากวิธีการเตรียมที่ยุ่งยากกว่าสองวิธีแรกแล้ว ยังต้องการวิธีนำส่งพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ที่ยากกว่าด้วย

การขนส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์เป้าหมาย (transfection of siRNA)

การขนส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์เป้าหมาย ทำได้ 2 วิธี คือ **1) การบริหารโดยตรง (direct administration)** เป็นการนำ siRNA เข้าสู่เซลล์โดยตรงโดยการผสม siRNA กับสารละลายหรืออาหารเลี้ยงเซลล์ และ **2) การใช้ไวรัสเป็นพาหะ (infectious delivery of siRNA by viral vector)** เป็นการนำส่ง siRNA โดยใช้ไวรัสเป็นพาหะในการนำส่ง ตัวอย่างไวรัสที่นิยมใช้เป็นพาหะเช่น retrovirus, adenovirus และ lentivirus เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่น ๆ ที่ใช้นำส่งหรือเพิ่มการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์เพื่อกระตุ้นการเกิดกระบวนการ RNAi เช่น liposomal-based technique, siRNA structure modification และ hydrodynamic injection เป็นต้น

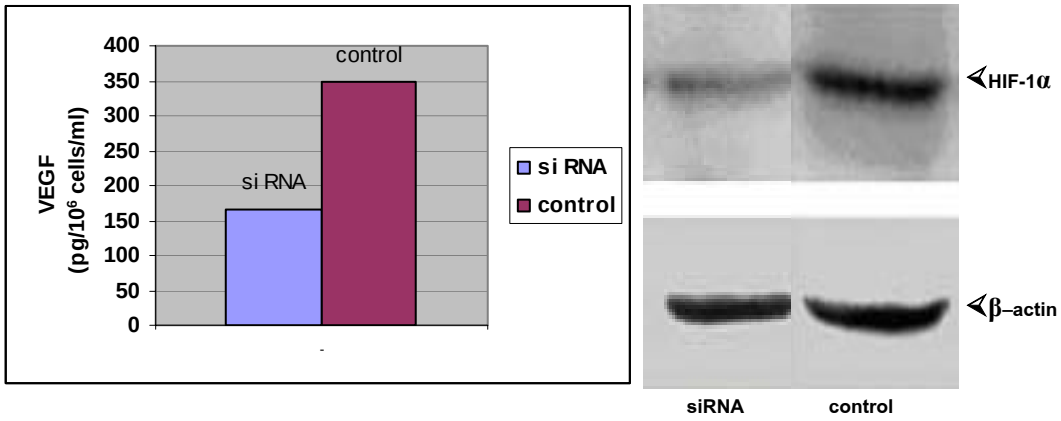
จากความสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนอย่างจำเพาะเจาะจงโดยอาศัยกลไกภายในเซลล์เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการยับยั้ง RNAi จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างหลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการประยุกต์ใช้ RNAi ในการทดลองศึกษาที่เกี่ยวกับยีนเพื่อการรักษาหรือที่เรียกว่ายีนบำบัด (gene therapy) ได้มีการประยุกต์ใช้ RNAi ในการทดลองหลากหลายเพื่อหาความเป็นไปได้ในการรักษาโรคหลายชนิด เช่น โรคมะเร็งและโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส ซึ่งส่วนมากเป็นโรคที่มีพยาธิสภาพหรือกลไกการเกิดโรคผ่านการแสดงออกของยีน

การประยุกต์ใช้ RNAi ในการรักษาโรคมะเร็ง

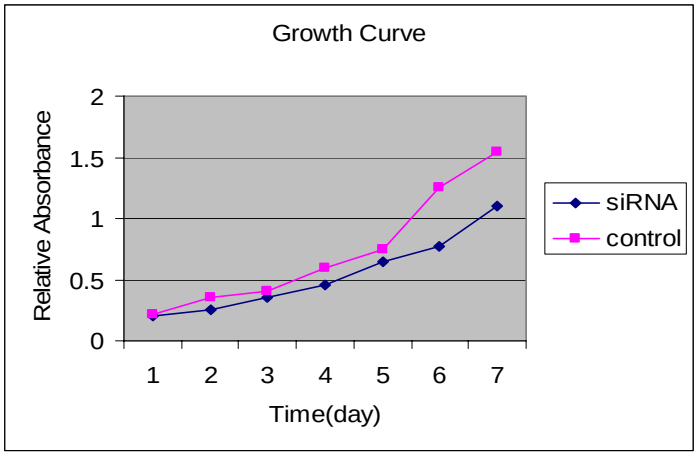
มะเร็งเป็นอีกโรคหนึ่งที่มีสาเหตุมาจากการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติ การแสดงออกของยีนที่ผิดปกตินี้ ยังทำให้มะเร็งเกิดการแพร่กระจาย ยีนในกลุ่ม ras family เป็นอีกยีนหนึ่งที่ทำให้เซลล์เกิดการกลายสภาพจากเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง รวมทั้งหลายกระบวนการที่สนับสนุนให้โรคมะเร็งเลวร้ายลง ทั้งการทำให้เซลล์มะเร็งรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง (invasion) และการแพร่กระจาย (metastasis) รวมทั้งการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างหลอดเลือดเข้ามาเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (angiogenesis) ซึ่งเป็นกระบวนการหนึ่งที่สำคัญที่ทำให้เซลล์มะเร็งมีชีวิตและเติบโต และสนับสนุนให้เซลล์มะเร็งแพร่กระจายด้วย

มีการศึกษาพบว่าการเกิด angiogenesis นี้ โปรตีน Raf-1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่จากยีนในกลุ่ม ras family มีส่วนเกี่ยวข้องด้วย โดย Raf-1 กระตุ้นให้เกิด vascular endothelial growth factor (VEGF) ผ่านทาง hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1α) และยังพบว่า Raf-1 มีการแสดงออกมากผิดปกติในเซลล์มะเร็งหลายชนิด จึงได้มีการทดลองประยุกต์ใช้กระบวนการ RNAi เพื่อยับยั้งการแสดงออกของ Raf-1 ใน SGC7901 cell line ผลพบว่า เมื่อใช้ siRNA เพื่อยับยั้งการทำงานของ Raf-1 ระดับของ HIF-1α และ VEGF มีการแสดงออกที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4) และเมื่อวัดอัตราการเติบโตของเซลล์ พบว่ากลุ่มที่ได้รับ siRNA มีการเติบโตที่ลดลงและเกิดการตายแบบ apoptosis มากกว่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 5)[6]

การแสดงออกที่ผิดปกติของยีนยังเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการดื้อยา ส่วนหนึ่งมาจากการที่เซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของโปรตีนที่ทำหน้าที่ในขับยาออกนอกเซลล์ เช่น multidrug resistance protein (MDR) หรือ P-glyco protein (Pgp) แต่อีกส่วนหนึ่งมาจากการที่เซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของโปรตีนบางชนิดที่ทำหน้าที่กระตุ้นเซลล์มะเร็งให้เกิดการเจริญเติบโตมากผิดปกติ หรือป้องกันไม่ให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis โปรตีนในกลุ่มนี้รวมถึง insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) ซึ่ง IGF1R นี้ มีการแสดงออกมากผิดปกติในเซลล์มะเร็งหลาย ชนิดด้วย และเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์มะเร็งส่วนหนึ่งเกิดการดื้อยา ดังนั้นจึงได้มีการทดลองประยุกต์ใช้กระบวนการ RNAi ร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัดเพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพร่วมในการรักษา



รูปที่ 4 ผลของ siRNA ต่อ VEGF และ HIF-1α: ระดับการแสดงออกสัมพัทธ์ของ VEGF และ HIF-1α ต่อ β-actin ซึ่งเป็น house-keeping gene เปรียบเทียบกันระหว่าง SGC7901 cell line ที่ได้รับ (siRNA) และไม่ได้รับ siRNA (control) ที่มีเป้าหมายต่อ Raf-1 โปรตีน (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 6)



รูปที่ 5 อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อยับยั้ง Raf-1: แสดงอัตราการเติบโตของ SGC7901 cell line ที่ได้รับ (siRNA) และไม่ได้รับ siRNA (control) ที่มีเป้าหมายต่อ Raf-1 (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 6)

ผลการศึกษาประสิทธิภาพร่วมของกลุ่มที่ได้รับ short-hairpin RNA (shRNA) ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ IGF1R ร่วมกับการให้ยา cisplatin เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ cisplatin กับ shRNA ที่ไม่จำเพาะต่อ IGF1R และกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ cisplatin ใน A549 cell line พบว่าในกลุ่มที่ได้รับทั้ง shRNA และ cisplatin มีค่า IC_{50} ลดลงเมื่อเทียบกับอีกสองกลุ่ม (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังได้มีการปลูกถ่าย A549 cell line ในหนูทดลองเพื่อเปรียบเทียบขนาดและน้ำหนักของก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นใน 30 วันหลังการปลูกถ่ายระหว่างกลุ่มที่ได้รับทั้ง shRNA และ cisplatin กับกลุ่มที่ได้รับ cisplatin ร่วมกับ shRNA ที่ไม่จำเพาะต่อ IGF1R และกลุ่มควบคุมที่ได้รับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ผลปรากฏว่ากลุ่มที่ได้รับทั้ง shRNA และ cisplatin มีขนาดและน้ำหนักของก้อนมะเร็งแตกต่างจากทั้งสองกลุ่มที่เหลืออย่างชัดเจน (ตารางที่ 2)[7]

ตารางที่ 1 IC_{50} value of DDP to human lung cancer[7]

Groups	IC50 (mg/L)		
	24 h	48 h	72 h
DDP	3.8	3.5	4.2
DDP+control shRNA	2.7	3.6	3.0
DDP+IGF1R-shRNA1	0.9*	1.3*	1.5*

* $P < 0.05$ compared with DDP-control shRNA group.

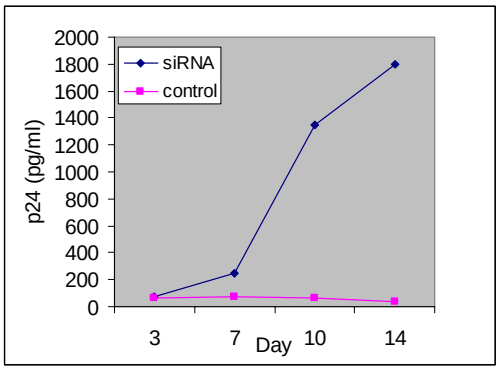
ตารางที่ 2 Tumor size and weight 30 d after inoculation[7]

Groups	Tumors	
	Volume (mm^3)	Weight (mg)
PBS	338.5 ± 44.2*	390.0 ± 80.0*
DDP+control shRNA	50.3 ± 15.2	180.0 ± 20.0
DDP+IGF1R-shRNA1	20.7 ± 4.2*	70.0 ± 12.0*

* $P < 0.05$ compared with DDP-control shRNA group.

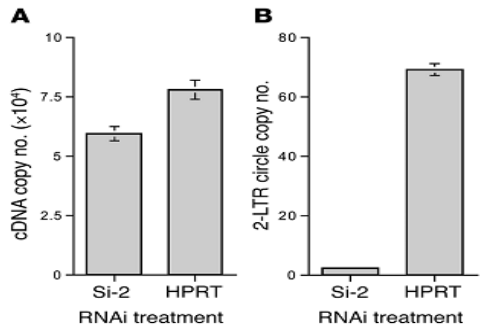
การประยุกต์ใช้ RNAi ในการรักษาโรคติดเชื้อไวรัส

นอกจากการประยุกต์ใช้ RNAi ในการรักษาโรคมะเร็งแล้ว ยังได้มีการประยุกต์ใช้ RNAi ในการศึกษาหน้าที่ของยีนและโปรตีนต่างๆ อีกด้วย โดยอาศัยคุณสมบัติการยับยั้งการแสดงออกของยีนอย่างจำเพาะเจาะจง Zhang และคณะ (8) ได้ทำการศึกษาการทำงานของโปรตีนในกลุ่ม cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะทางกายภาพและการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิด (hematopoeitic stem cells) เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดเหล่านี้มีการแสดงออกของ CD4 และ CXCR4 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เชื้อไวรัส HIV-1 จำเป็นต้องใช้ในกระบวนการติดเชื้อเช่นเดียวกันกับ lymphocytic cell แต่กลับไม่พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดเหล่านี้มีการติดเชื้อไวรัส HIV-1 ดังนั้นจึงได้มีการใช้ siRNA ต่อโปรตีนหลายๆ ชนิดในกลุ่ม CKI เพื่อศึกษาหน้าที่ในการต่อต้านการติดเชื้อ HIV-1 ของโปรตีนเหล่านี้ ผลการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ siRNA ยับยั้งการแสดงออกของ CKI p21 (p21) เซลล์ต้นกำเนิดมีการติดเชื้อไวรัส HIV-1 มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดที่ไม่ได้รับ siRNA โดยวัดจากระดับ HIV-1 p24 ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในส่วนแคปสิดของไวรัส (รูปที่ 6) และเพื่อที่จะทราบว่า p21 ยับยั้งการติดเชื้อไวรัส HIV-1 ในขั้นตอนใดของวงจรชีวิตไวรัสจึงได้มีการศึกษาเพิ่มเติมจากขั้นตอนการวัดระดับของ HIV-1 cDNA (HIV-1 complementary DNA) ซึ่งเป็นค่าที่อ้างอิงถึงการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ได้รับ siRNA และกลุ่มควบคุม



รูปที่ 6 ระดับ p24 ระหว่างเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้รับ (siRNA) และไม่ได้รับ siRNA (control) (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 8)

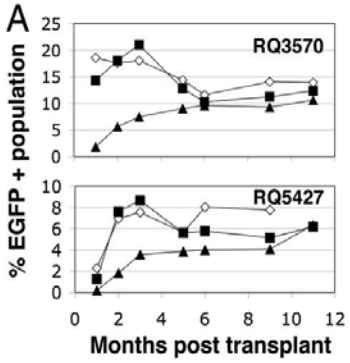
แต่จากขั้นตอนการวัด 2 long terminal repeat (2-LTR circle) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้อ้างอิงถึงความล้มเหลวจากขั้นตอนการ integration ของเชื้อไวรัสพบว่ามีความแตกต่างกันของระดับ 2-LTR circle ระหว่างกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับ siRNA โดยกลุ่มที่ไม่ได้รับ siRNA มีระดับของ 2-LTR circle สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ siRNA อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 7) แสดงให้เห็นว่าในกลุ่มที่ไม่ได้รับ siRNA นั้นไวรัส HIV-1 ไม่สามารถเกิดการ integration ได้ และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค western blot พบว่า p21 เกิดการรวมตัวกับ HIV-1 preintegration complex ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า p21 เป็นโปรตีนที่จำเป็นสำหรับเซลล์ต้นกำเนิดในการป้องกันตนเองจากการติดเชื้อไวรัส HIV-1 เนื่องจากการที่โปรตีนชนิดนี้ยับยั้งการติดเชื้อไวรัสในขั้นตอนการ integration โดยการรวมตัวกับกลุ่มเอนไซม์ integrase



รูปที่ 7 ผลของ p21 ต่อขั้นตอนการ integration ของ HIV-1 (A) ระดับของ cDNA ในเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้รับ (Si-2) และไม่ได้รับ siRNA (HPRT) **(B)** ระดับของ 2-LTR circle ในเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้รับ (Si-2) และไม่ได้รับ siRNA (HPRT)[8]

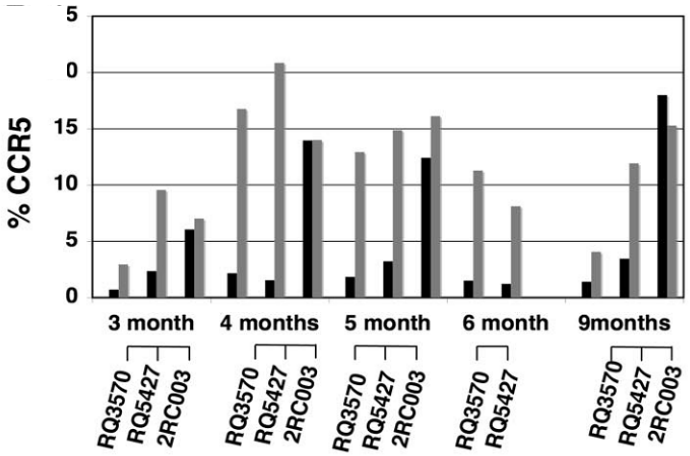
นอกจากนี้ ยังมีการประยุกต์ใช้ RNAi ที่เกี่ยวกับการรักษาโรคติดเชื้อไวรัสด้วย แต่ปัญหาประการหนึ่งของการประยุกต์ใช้ RNAi ในสัตว์ชั้นสูงรวมถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ การที่ RNAi มีฤทธิ์การยับยั้งเพียงชั่วคราว เนื่องจากการสัตว์ชั้นสูงไม่มีกระบวนการ RNAi amplification หนึ่งในวิธีการแก้ปัญหานี้ คือการเลือกใช้พาหะที่เป็นไวรัส (viral-based vector) ซึ่งสามารถขนส่ง siRNA หรือ shRNA ที่ต้องการ เข้าไปรวมกับจีโนมของเซลล์เป้าหมาย ซึ่งทำให้เกิดการแสดงออกของยีนนั้น ๆ ตลอดช่วงอายุของเซลล์เป้าหมาย An และคณะ[9] ได้ทดลองโดยใช้ lentiviral vector ในการนำส่ง shRNA เข้าสู่เซลล์ต้นกำเนิด (hematopoietic stem cell) ของลิง (Rhesus macaque) เพื่อยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน chemokine receptor 5 (CCR5) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เชื้อไวรัส SIV (simian immunodeficiency virus) ใช้ในการจับกับเซลล์เป้าหมาย เพื่อที่จะอ้างอิงถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้วิธีการเดียวกันนี้ในมนุษย์ในการรักษาการติดเชื้อไวรัส HIV และจากการใช้ lentiviral vector ขนส่ง shRNA เข้าสู่เซลล์ต้นกำเนิดที่มีสามารถแบ่งตัวและให้ T-lymphocyte ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CCR5 จึงเป็นการกำหนดเป้าหมายให้เกิดกระบวนการ RNAi อย่างจำเพาะเจาะจง รวมทั้งทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของ CCR5 อย่างถาวรไปในตัวด้วย

จากการทดลองโดยใช้ shRNA 2 ชนิด คือ RQ3570 กับ RQ5427 และกลุ่มควบคุม ซึ่งได้รับ shRNA ที่ไม่จำเพาะเจาะจงต่อ CCR5 (2RC003) อีก 1 กลุ่ม รวมทั้งการให้ยีนที่ถูกสอดใส่เข้าไปในจีโนมของเซลล์ต้นกำเนิดโดย lentiviral vector นั้น มีการใส่ยีน enhanced green fluorescence protein (EGFP) รวมเข้าไปด้วยเพื่อให้เป็นตัวติดตามการแสดงออกของ shRNA ทั้ง 3 ชนิด พบว่าระดับการแสดงออกของ EGFP ในแกรนูโลไซต์ โมโนไซต์และลิมโฟไซต์มีการเปลี่ยนแปลง และเริ่มคงที่ในระยะเวลาประมาณ 6 เดือน (รูปที่ 8) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของ EGFP ของเม็ดเลือดแต่ละชนิด พบว่าในลิมโฟไซต์ระดับ EGFP เพิ่มสูงขึ้นและเริ่มคงที่เมื่อผ่านไปประมาณ 6 เดือน แสดงว่า shRNA เพิ่มขึ้นในลิมโฟไซต์ด้วย



รูปที่ 8 การเพิ่มขึ้นของ EGFP ในเซลล์เม็ดเลือด: แสดง %EGFP+ ในเม็ดเลือดแต่ละชนิดในช่วงเวลาต่างๆหลังได้รับshRNA (แกรนูโลไซต์ (■) โมโนไซต์ (◇) ลิมโฟไซต์ (▲)[9]

ในขณะเดียวกัน มีการวัดระดับ CCR5 ในลิมโฟไซต์ที่มีการแสดงออกของ EGFP (EGFP+) เทียบกับลิมโฟไซต์ที่ไม่มีการแสดงออกของ EGFP (EGFP-) ในแต่ละกลุ่มที่ได้รับ shRNA ผลปรากฏว่าในกลุ่มที่ได้รับ shRNA ที่จำเพาะเจาะจงต่อ CCR5 (RQ3570 และ RQ5427) เซลล์ในกลุ่ม EGFP+ และเซลล์ในกลุ่ม EGFP- มีการแสดงออกของระดับ CCR5 แตกต่างกัน โดยเซลล์ในกลุ่ม EGFP+ มีระดับของ CCR5 ต่ำกว่าเซลล์ในกลุ่ม EGFP- อย่างชัดเจน ซึ่งต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับ shRNA ที่ไม่จำเพาะเจาะจงต่อ CCR5 (2RC003) ซึ่งเซลล์ในกลุ่ม EGFP+ และกลุ่ม EGFP- มีการแสดงออกของระดับ CCR5 ไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน (รูปที่ 9) จากนั้นวัดระดับ CCR5 mRNA เพื่อยืนยันผล พบว่าเซลล์ในกลุ่ม EGFP+ มีระดับ CCR5 mRNA ลดลงด้วย จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่าการใช้ shRNA สามารถยับยั้งการแสดงออกของ CCR5 ได้ และยับยั้งได้อย่างคงทนด้วย



รูปที่ 9 ผลของ siRNA ต่อระดับ CCR5: ความแตกต่างของ %CCR5 ของเม็ดเลือดกลุ่ม EGFP+ (แถบสีดำ) และกลุ่ม EGFP- (แถบสีเทา) ในแต่ละกลุ่มที่ได้รับ shRNA ที่ต่างกัน (RQ3570, RQ5427, 2RC003)[9]

บทสรุป

RNA interference (RNAi) เป็นกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ระดับหลังการแปลรหัส อย่างจำเพาะเจาะจง โดย double-strand RNA เหนี่ยวนำให้เกิดการยับยั้ง mRNA จากคุณสมบัตินี้ทำให้มีการนำกระบวนการ RNAi มาประยุกต์ในศาสตร์หลายด้าน รวมถึงการรักษาโรคด้วย โรคที่อาจประยุกต์ใช้ RNAi ในการรักษามักเป็นโรคที่มีสาเหตุหรือมีปัจจัยเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน เช่น โรคมะเร็งและโรคติดเชื้อไวรัส ข้อดีของการใช้ RNAi ในการศึกษาการรักษาโรคเหล่านี้ คือ RNAi ให้ผลยับยั้งการแสดงออกของยีนผ่านทางโปรตีนอย่างจำเพาะเจาะจงและให้ประสิทธิผลในระดับที่ดี

การศึกษา RNAi ส่วนมากยังไม่ได้ทำในมนุษย์ เนื่องจาก RNAi เป็นกระบวนการที่ถูกค้นพบไม่นาน การประเมินความปลอดภัยในมนุษย์จึงยังน้อยเมื่อเทียบกับการรักษาด้วยวิธีอื่น ด้วยสาเหตุนี้ การศึกษาที่เกี่ยวกับ RNAi ส่วนมากจึงจำกัดอยู่ในสัตว์ทดลองและเซลล์เพาะเลี้ยง การปรเมินเพื่อประยุกต์ใช้ในมนุษย์จึงยังทำได้ยาก

ข้อจำกัดอีกอย่างหนึ่งก็คือ RNAi มีช่วงของการออกฤทธิ์ที่สั้น การใช้ระบบนำส่งที่ใช้ยีนของพาหะที่เป็นไวรัส (viral-based vector) โดยมีจุดประสงค์เพื่อให้เกิดกระบวนการ RNAi ที่นานขึ้นนั้น ในการประเมินความปลอดภัยในมนุษย์นับว่ามีความเสี่ยงจากขั้นตอนการสอดใส่ (insertion) ยีนของพาหะที่เป็นไวรัสนั้นเข้าไปในจีโนมของมนุษย์ ซึ่งอาจกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติในมนุษย์ได้ รวมทั้งจากการที่ RNAi ใช้นิวคลีโอไทด์เพียง 21 ถึง 25 ลำดับ ในการกำหนดความจำเพาะเจาะจง นอกจากนี้ การใช้ RNAi ต่อเซลล์มะเร็งหรือไวรัสที่มีความสามารถในการกลายพันธุ์สูงอยู่แล้วในระยะยาว ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าเซลล์มะเร็งหรือไวรัสจะดื้อต่อการรักษาด้วย RNAi ได้สูง และอุปสรรคอีกประการหนึ่งของการประยุกต์ใช้ RNAi ในการรักษา คือ การนำมาใช้ในทางปฏิบัติยังมีความเป็นไปได้น้อย ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญเช่นเดียวกับเทคโนโลยีนิวคลีโอไทด์อื่น ๆ ทั้งจากการขาดระบบนำส่งที่มีประสิทธิภาพ วิธีปฏิบัติการที่ซับซ้อน รวมทั้งข้อมูลการศึกษาในมนุษย์ที่มีไม่มากเพียงพอ

แม้ว่า RNAi จะมีอุปสรรคหลายประการในการประยุกต์ใช้ในการรักษาโรค ผลการศึกษาต่างๆ ได้แสดงถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้ในการควบคุมการแสดงออกของยีน และจากการเป็นเทคโนโลยีที่เพิ่งถูกค้นพบทำให้การพัฒนายังไม่ถึงจุดอิ่มตัว รวมทั้งจากหลักการที่สามารถประยุกต์ใช้ได้อย่างหลากหลายจะเป็นข้อดีในการผลักดันให้มีการพัฒนาเทคโนโลยีในด้านนี้ จนสามารถนำมาใช้ในมนุษย์ในทางปฏิบัติได้จริง

เอกสารอ้างอิง

1. Fire A, Nirenberg MW. RNA interference technology: From basic science to drug development. Cambridge University Press, 2004.
2. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Murkherjee SK. RNA interference. Biology,

mechanism, and applications. *Microbiol Biol Mol Biol Rev* 2003;67:657-685.
3. Icim TE, Li M, Qian H, Ppov IA, Rycerz K, Zheng X, White D, Zhong R, Min WP. RNA interference: A potent tool for gene-specific therapeutics. *Am J Transplant* 2004;4:1227-1236.
4. Lehner B, Fraser AG, Sanderson CM. How to use RNA interference. *Brief Func Genom Proteom* 2004;3:68-83.
5. Sheuy DJ, McCallus DE, Giordan T. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. *Drug Discov Today* 2002;7: 1040-1046.
6. Meng F, Ding J, Liu N, Zhang J, Shao X, Shen H, Xue Y, Xie H, Fan D. Inhibition of gastric cancer angiogenesis by vector-based RNA interference for Raf-1. *Cancer Biol Ther* 2005;4:113-117.
7. Dong A, Kong M, Ma Z, Qian J, Cheng H, Xu X. Knockdown of insulin-like growth factor 1 receptor enhances chemosensitivity to cisplatin in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Acta Biochim Biophys Sin* 2008;4:497-504.
8. Zhang J, Scadden DT, Crumpacker CS. Primitive hematopoietic cells resist HIV-1 infection via $p21^{waf1/cip1/sdi1}$. *J Clin Invest* 2007;117:473-481.
9. An DS, Donahue RE, Kamata M. Poon B, Matzger M, Mao SH, Bonifacino A. Krouse AE, Darlix JL, Baltimore D. Stable reduction of CCR5 by RNAi through hematopoietic stem cell transplant in non-human primates. *Proc Nat Acad Sci* 2007;104:13110-13115.

Review Article

RNA Interference: From Basic to Applications

Kanokwan Jarukamjorn[1]* and Piman Pocasap[2]

[1] Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand

[2] 5th year pharmacy student, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand

* Corresponding author: kanok_ja@kku.ac.th

ABSTRACT

Dividing level of gene controlling from genomic level to post-transcript level, RNA interference (RNAi) is a gene regulatory mechanism in post-transcription gene controlling level. RNAi is an endogenous defense mechanism in eukaryocytes against viruses and transposable elements in the genome. Upon viral infection or presence of other double-strand RNA (dsRNA) transduced intracellularly, the RNAi mechanism is activated causing the sequential degradation of the dsRNA by the type III endoribonuclease DICER. Subsequently this endonuclease cleaves the dsRNA into about 21 nucleotides double-stranded fragments called short-interference RNA (siRNA). These siRNAs then associate with the RNA-induced silencing complex (RISC) and induce cleavage of endogenous mRNA transcripts. The mRNA cleavage occurs within the region of homology directed by the siRNA, thereby selectively inhibiting target gene expression. By the specific silencing, methods for utilizing RNAi have been developed in many genetic-associating researches for a wide variety of gene silencing applications. RNAi has been used in therapeutic researches. As a potent tool in specific gene silencing in therapeutics, RNAi shows possibilities of its application in various diseases. Thus RNAi is promising vehicle for development of a potential tool in specific gene-silencing therapeutics.

Key words: RNA interference, RNAi, short interference RNA, siRNA

Thai Pharm Health Sci J 2009;4(2):262-271[§]

[§] 14th year of Srinakharinwirot Journal of Pharmaceutical Science