บทปริทัศน์

มหัศจรรย์ RNAi กับการวิจัยด้านการแพทย์สมัยใหม่

รุ่งรัตน์ จิตวโรภาส*, สัญชัย พยุงภร**

บทคัดย่อ

RNA interference (RNAi) ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการควบคุมการแสดงออกของยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ กระบวนการ RNAi แบ่งออกเป็น ๒ วิถี โดยเริ่มจาก pri-miRNA ที่มีอยู่ภายในเซลล์ หรือ RNA สายคู่ที่ได้รับจากภายนอก ถูกตัดด้วยเอนไซม์ไดเซอร์ได้เป็น miRNA และ siRNA ตามลำดับ จากนั้น mi/siRNA เข้ารวมกับกลุ่มโปรตีนเป็น RISC แล้วไปจับคู่สมกับเบสของ RNA เป้าหมาย ผลของ RNAi ไม่เพียงสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนแต่สามารถทำให้ยีนเป้าหมายถูกย่อยสลายได้อีกด้วย ปัจจุบันนี้เทคโนโลยี RNAi มีบทบาทสำคัญต่องานวิจัยด้านการแพทย์สมัยใหม่ โดยมีเป้าหมายคือค้นหาผลทางชีวภาพที่เกิดจากการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สนใจ, หน้าที่ของยีน และความสัมพันธ์ระหว่างร่างกายมนุษย์กับเชื้อโรค นอกจากนี้ RNAi มีประโยชน์ทางด้านคลินิกโดยใช้เป็นแนวทางใหม่ในการรักษาโรคต่างๆ ได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคติดเชื้อไวรัส และโรคอื่นๆ อย่างไรก็ตาม RNAi ยังไม่สามารถนำมาใช้รักษาบางโรคได้ เนื่องจากข้อจำกัดของสาย RNA ที่ส่งเข้าไปมีความเป็นพิษต่อเซลล์

คำสำคัญ: การยับยั้งการแสดงออกของ RNA, การปิดการทำงานของยีน, วิจัยการแพทย์สมัยใหม่, การรักษาด้วย RNAi

ประวัติการค้นพบ RNA interference (RNAi)

ในปี พ.ศ. ๒๕๔๕ ศาสตราจารย์ Andrew Fire และ Craig Mello ได้รับรางวัลโนเบลสาขาสรีรวิทยาหรือแพทยศาสตร์ จากการค้นพบองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับกลไกการทำงานของ RNAi ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญของเซลล์ในการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยได้ตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานครั้งแรกในวารสาร Nature ในปี พ.ศ. ๒๕๔๑ ซึ่งเป็นการทดสอบลักษณะทางกายภาพที่แสดงออกหรือฟีโนไทป์ของตัวหนอน *(Caenorhabditis elegans)* ที่ได้รับอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA), อาร์เอ็นเอสายเดี่ยวชนิด antisense หรืออาร์เอ็นเอสายเดี่ยวชนิด sense จากผลการทดลองพบว่าเมื่อฉีด dsRNA จะทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของ mRNA เป้าหมายได้อย่างมีนัยสำคัญ[๑] ต่อมามีการทดสอบยืนยันผลหลายขั้นตอน จนทำให้สามารถสรุปได้ว่า

- dsRNA ที่ฉีดเข้าไปในเซลล์ของตัวหนอนสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่ sense หรือ antisense RNA ไม่สามารถยับยั้ง หรือยับยั้งการแสดงออกได้น้อยมาก
- การยับยั้งการแสดงออกของยีนมีลักษณะจำเพาะ โดยจะยับยั้งเฉพาะ mRNA ที่มีลำดับเบสคู่สมกับ dsRNA ที่ใส่เข้าไปเท่านั้น แต่ไม่มีผลกระทบต่อ mRNA ของยีนอื่นๆ

* สาขาวิชาชีวเคมี สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

● ลำดับเบสของ dsRNA ที่ใส่เข้าไปในเซลล์จะต้องสอดคล้องกับลำดับเบสในส่วนของ exon เท่านั้น หากลำดับเบสสอดคล้องกับ intron หรือ promoter จะไม่มีผลในการยับยั้ง ซึ่งตั้งสมมติฐานได้ว่ากระบวนการเกิดขึ้นในขั้นตอนหลังการถอดรหัส (Post-transcription) และเกิดขึ้นในไซโทพลาสซึมของเซลล์

● หลังการใส่ dsRNA เข้าไปมีผลทำให้ mRNA เป้าหมายหายไป จึงตั้งข้อสังเกตว่า mRNA เป้าหมายถูกย่อยทำลายไป

● จำนวนโมเลกุลของ dsRNA เพียงเล็กน้อยสามารถยับยั้ง mRNA เป้าหมายทั้งหมดภายในเซลล์ เป็นการบ่งชี้ว่ามีการเพิ่มจำนวนของ dsRNA หรือมีการนำกลับมาใช้ใหม่ได้ มิใช่การใช้แล้วหมดไป

● ผลกระทบของ dsRNA ที่ฉีดเข้าไปสามารถแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง หรือส่งต่อไปยังเซลล์ลูกหลานได้

นอกจากนี้ทีมวิจัยได้เสนอแนวคิดว่า สามารถนำ dsRNA มาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนอย่างจำเพาะในสิ่งมีชีวิตได้ ต่อมามีผู้ศึกษากลไก RNAi ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ มากมายหลายชนิด ได้แก่ โปรโตซัว, พลานาเรีย, ไฮดรา, พืช, แมลงวันผลไม้, ปลาม้าลาย รวมทั้งเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม[๒,๓]

หลักการของกระบวนการ RNAi

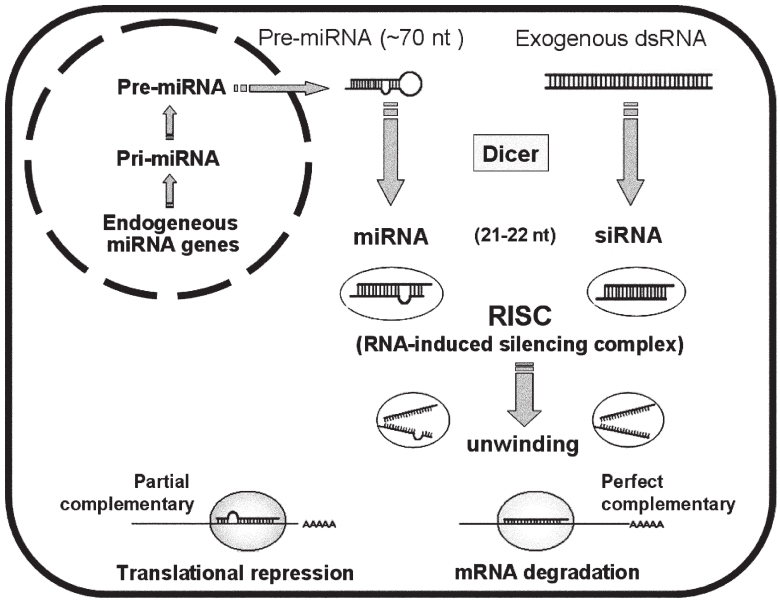
RNAi เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลง RNA สายคู่ขนาดยาวให้กลายเป็น RNA สายคู่ขนาดสั้นๆ ประมาณ ๒๑-๒๒ คู่เบส ซึ่งจะทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนได้อย่างจำเพาะในสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต[๔,๕,๖] โดยสามารถจัดจำแนกได้เป็น ๒ กระบวนการหลัก ขึ้นอยู่กับชนิดของ RNA สายคู่ที่มาเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ RNAi ได้แก่

๑. RNA สายคู่จากภายนอกเซลล์ (Exogenous double strand RNA)

เมื่อ RNA สายคู่ขนาดยาว (long dsRNA) จากภายนอกเซลล์ เข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์จะมีเอนไซม์ไดเซอร์ (Dicer) ซึ่งมีคุณสมบัติของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส ๓ (ribonuclease III)[๗] ทำหน้าที่ย่อย RNA สายคู่จากภายนอกเซลล์เหล่านั้นให้กลายเป็น RNA สายคู่ขนาดสั้นๆ ยาวประมาณ ๒๑-๒๒ คู่เบส โดยที่ปลาย 3' ของแต่ละด้านมีเบส ๒ ตัวที่อยู่อย่างอิสระโดยไม่จับเป็นคู่เบส หรือเรียกว่า **short interfering RNA (siRNA)** จากนั้นโมเลกุลของ siRNA จะรวมตัวเข้าจับกับกลุ่มโปรตีนเชิงซ้อนกลายเป็น **RNA-induced silencing complex (RISC)** ซึ่งจะมีการทำงานของเอนไซม์อาร์เอ็นเอเฮลิเคส (RNA-helicase) เพื่อใช้ในการคลายเกลียว siRNA สายคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยว โดยใช้พลังงาน ATP[๘] จากนั้นสาย antisense ของ siRNA จะเหนี่ยวนำกลุ่มโปรตีนเชิงซ้อน RISC ให้เคลื่อนที่ไปยัง mRNA เป้าหมายที่มีลำดับเบสคู่สมกับสาย antisense ของ siRNA หากจับกันได้อย่างสมบูรณ์ (ไม่เกิด mismatch) ผลที่ได้คือ mRNA เป้าหมายจะถูกตัดบริเวณตรงกลางหรือภายในสาย โดยอาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส (endonuclease) ของ RISC ทำให้สาย mRNA ขาดเสถียรภาพ และสุดท้ายจะถูกย่อยโดยเอนไซม์เอกโซนิวคลีเอส (exonuclease) ทำให้ไม่มีการแสดงออกของยีนดังกล่าว ดังแสดงในรูปที่ ๑

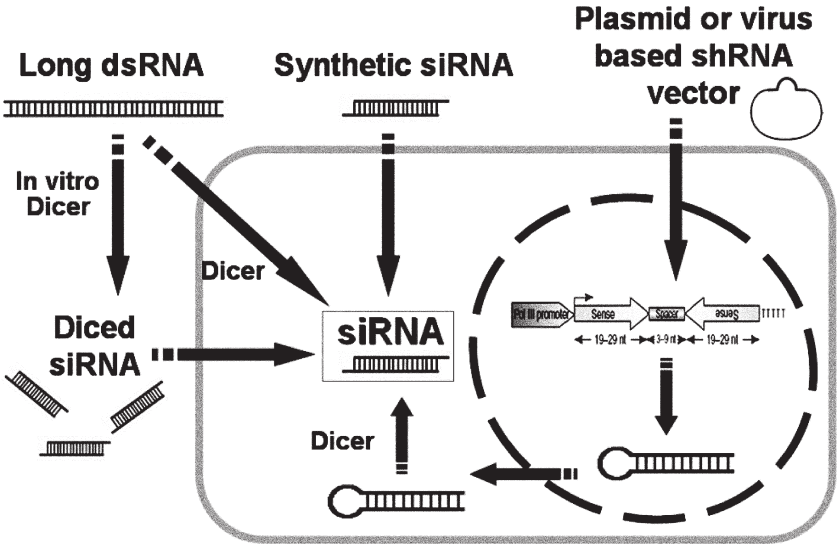
๒. RNA สายคู่จากภายในเซลล์ (Endogenous microRNA)

ไมโครอาร์เอ็นเอ **(MicroRNA หรือ miRNA)** จัดเป็น RNA ส่วนที่ไม่ถูกถอดรหัส (noncoding RNA) พบได้ในสิ่งมีชีวิตจำพวกพืชและสัตว์ ในมนุษย์พบว่ามีการสร้าง miRNA ประมาณ ๔๐๐ ชนิด ซึ่งถูกใช้ในการควบคุมการแสดงออกประมาณ ๑ ใน ๓ ของโปรตีนภายในเซลล์ miRNA ถูกสร้างโดยกระบวนการถอดรหัสจาก DNA ต้นแบบที่อยู่ภายในนิวเคลียสออกมาในรูป primary miRNA **(Pri-miRNA)** ซึ่งเป็น RNA สายคู่ที่มีลักษณะเป็น stem-loop ขนาดยาว จากนั้นจะถูกตัดแต่งให้เป็น stem-loop ที่มีขนาดสั้นลงขนาดประมาณ ๖๐-๑๐๐ คู่เบส เรียกว่า **Pre-miRNA** เพื่อส่งออกจากนิวเคลียสไปยังไซโตพลาซึม[๙] จากนั้นเอนไซม์ Dicer ซึ่งมีคุณสมบัติของ ribonuclease III[๗] จะทำหน้าที่ย่อย Pre-miRNA ให้กลายเป็น miRNA สายคู่ขนาดสั้นๆ ประมาณ ๒๑-๒๒ คู่เบส โดยที่ปลาย 3' ของแต่ละด้านมีเบส ๒ ตัวที่อยู่อย่างอิสระโดยไม่จับเป็นคู่เบส จากนั้นโมเลกุลของ miRNA จะรวมตัวเข้าจับกับกลุ่มโปรตีนเชิงซ้อน กลายเป็น RNA-induced silencing complex (RISC) ซึ่งมีการทำงานของเอนไซม์ RNA-helicase เพื่อใช้ในการคลายเกลียว miRNA สายคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยว โดยใช้พลังงาน ATP[๘] จากนั้นสาย antisense ของ miRNA จะเหนี่ยวนำ RISC ให้เคลื่อนที่ไปยัง mRNA เป้าหมายที่มีลำดับเบสคู่สมกับสาย antisense ของ siRNA หากจับกันได้เพียงบางส่วน (มี mismatch เกิดขึ้นบางตำแหน่ง) จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการแปลรหัส ทำให้ไม่เกิดการสร้างโปรตีนดังกล่าว ดังแสดงในรูปที่ ๑



รูปที่ ๑ สรุปหลักการของกระบวนการ RNAi

การนำเทคนิค RNAi มาใช้ในการศึกษาวิจัย ส่วนใหญ่นิยมสังเคราะห์เป็น RNA จากภายนอกแล้วนำส่งเข้าสู่เซลล์เพื่อศึกษาดูผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นหลังการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สนใจ ปัจจุบันมีวิธีและรูปแบบการเตรียม RNA จากภายนอกเซลล์หลายรูปแบบ ได้แก่ Long dsRNA, Diced siRNA, Synthetic single siRNA, Synthetic siRNA pools และ shRNA/viral vector ซึ่ง siRNA แต่ละรูปแบบมีลักษณะเฉพาะตัว มีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกันดังแสดงรายละเอียดเปรียบเทียบในตารางที่ ๑ และสรุปเป็นแผนภาพการเตรียม siRNA รูปแบบต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ ๒



รูปที่ ๒ การเตรียม siRNA รูปแบบต่าง ๆ

ตารางที่ ๑ เปรียบเทียบการเตรียม siRNA รูปแบบต่างๆ[๑๐]

รูปแบบ	ลักษณะ	ข้อดี	ข้อเสีย
Long dsRNA	dsRNA สายยาว (>๕๐ bp) สร้างมาจาก in vitro transcription เมื่อเข้าสู่เซลล์จะถูกตัดด้วย Dicer ได้เป็น siRNA	● สังเคราะห์ง่าย ราคาถูก	● กระตุ้น interferon ● เกิดการยับยั้งแบบไม่จำเพาะ ● มีผลในการยับยั้งชั่วคราว
Diced siRNA	siRNAs ที่เกิดจากการนำ dsRNA มาตัดด้วย Dicer ในหลอดทดลอง แล้วจึงนำ siRNA ที่ได้เข้าสู่เซลล์	● สังเคราะห์ง่าย ราคาถูก ● ไม่กระตุ้น interferon	● มี siRNAs หลายบริเวณ ● อาจทำให้เกิด cross-silencing ● มีผลในการยับยั้งชั่วคราว
Synthetic single siRNA	siRNA ที่สังเคราะห์ขึ้นอย่างจำเพาะ	● ออกแบบให้มีความจำเพาะสูง ● สามารถดัดแปลงให้เสถียรได้	● ราคาแพง ● มีผลในการยับยั้งชั่วคราว
Synthetic siRNA pools	siRNA ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยออกแบบให้จำเพาะหลายตำแหน่งในยีนเดียวกัน	● เพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง	● ราคาแพงมาก ● มีผลในการยับยั้งชั่วคราว
shRNA/viral vector	short hair-pin expression vector เมื่อเข้าสู่เซลล์จะถูกสร้างออกมาในรูป shRNA เมื่อถูกตัดด้วย Dicer ได้เป็น siRNA	● ราคาถูก เพิ่มจำนวนได้ง่าย ● มีผลในการยับยั้งนานขึ้น ● สามารถเหนี่ยวนำให้แสดงออกได้	● ขั้นตอนการออกแบบและเตรียมต้องอาศัยความเชี่ยวชาญ

ประโยชน์ของ RNAi ในการศึกษาวิจัยด้านการแพทย์สมัยใหม่

ในปัจจุบันนี้การศึกษาวิจัยด้านการแพทย์มีความก้าวหน้ามาก และมีการนำเทคโนโลยีสมัยใหม่ RNAi มาใช้ในการศึกษาวิจัยกันอย่างแพร่หลาย เช่น การศึกษาหาหน้าที่และบทบาทของยีน กลไกควบคุมการแสดงออกของยีน ความสัมพันธ์ระหว่างยีนกับการเกิดโรค รวมทั้งการศึกษาหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่บอกถึงพยาธิสภาพและการเกิดโรคต่างๆ ได้ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคนิค RNAi เพื่อนำมาใช้ในการรักษาระดับยีนอีกด้วย ดังจะเห็นได้จากตัวอย่างงานวิจัยใหม่ๆ มากมายดังต่อไปนี้ (ข้อมูลได้จากการสืบค้นจากฐานข้อมูล Pubmed จนถึงวันที่ ๑๐ พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๕๓)

การศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งชนิดต่างๆ

ถึงแม้ว่าโรคมะเร็งมีความซับซ้อน แบ่งเป็นหลายระยะ และเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนจำนวนมาก แต่ปัจจุบันมีเทคโนโลยีสมัยใหม่มากมาย รวมทั้งเทคนิค RNAi ช่วยทำให้การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคมะเร็งง่ายขึ้น เมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานวิจัยโดยใช้เทคนิค RNAi เป็นส่วนหนึ่งในการศึกษาหน้าที่และความสัมพันธ์ระหว่าง Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) และมะเร็งตับอ่อน พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีน ALCAM ส่งผลให้ความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งตับอ่อน PDAC ลดลง เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งดื้อต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัด และส่งผลให้เซลล์เนื้องอก PNET เจริญเติบโตลดลง ดังนั้นสามารถนำ ALCAM มาใช้ประโยชน์เป็นตัวบ่งชี้ตัวใหม่ของการเกิดโรคมะเร็งตับอ่อนในมนุษย์ได้[๑๑] ในปี พ.ศ. ๒๕๕๓ Sahni และทีมวิจัยศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน Fibroblast growth factor (FGF)-2 ด้วยเทคนิค RNAi พบว่าการผลิตโปรตีน Fibrinogen ลดลง ซึ่งมีผลยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก จากผลการทดลองสรุปได้ว่าโปรตีน Fibrinogen ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดผ่านการทำงานร่วมกับ FGF-2[๑๒] นอกจากนี้ความรู้ที่ได้จากการศึกษาโดยอาศัยเทคนิค RNAi ยังนำไปสู่การรักษาโรคมะเร็งชนิดต่างๆ แนวทางใหม่ได้อีกด้วย ยกตัวอย่างเช่น การยับยั้งยีน ErbB3 มีผลลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่ และลดการดำเนินไปของโรค รวมทั้งทำให้หนูที่เป็นโรคมะเร็งรังไข่มีชีวิตยาวนานยิ่งขึ้น ดังนั้น ErbB3 จึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการนำมาใช้รักษาโรคมะเร็งรังไข่ต่อไปในอนาคตได้[๑๓] อย่างไรก็ตามการใช้ RNAi เพื่อการรักษาหรือต่อต้านโรคมะเร็งไม่ได้จำกัดแค่โรคมะเร็งรังไข่ แต่สามารถใช้รักษาโรคมะเร็งชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย เช่น โรคมะเร็งต่อมลูกหมาก, มะเร็งผิวหนัง[๑๔] และมะเร็งเต้านม[๑๕] เป็นต้น และที่น่าสนใจยิ่งกว่านั้น RNAi ยังสามารถใช้ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัดได้อีกด้วย ดังเช่นการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า Superoxide dismutase 1 (SOD1) มีผลทำให้เซลล์มะเร็งรังไข่ดื้อยา Cisplatin ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษามะเร็งรังไข่ด้วยเคมีบำบัด แต่ในปัจจุบันพบว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน SOD1 ได้สำเร็จโดยอาศัยเทคนิค

RNAi ส่งผลให้เซลล์มะเร็งรังไข่ที่เคยดื้อยา Cisplatin มีความไวต่อยามากขึ้น[๑๖]

การรักษาระดับยีนด้วย RNAi

ในปัจจุบันมีแนวทางการรักษาโรคแบบใหม่เป็นการรักษาระดับยีนด้วย RNAi โดยใช้การปิดการทำงานของยีนที่ก่อโรค เพื่อการบรรเทา รักษาโรคหรือพยาธิสภาพที่ผิดปกติได้ เมื่อต้นปี พ.ศ. ๒๕๕๓ มีรายงานความสำเร็จในการรักษาโรคตาที่เกิดจากความผิดปกติของยีน โดยสามารถส่ง short hairpin RNA (shRNA) ที่จำเพาะต่อยีน Peripherin-2 แล้วไปมีผลยับยั้งการแสดงออกของยีน Peripherin-2 ภายใน ๓ สัปดาห์แรก โดยมีผลจำเพาะเจาะจงที่เรตินาของตาเท่านั้น การวิจัยครั้งนี้นับว่าเป็นการค้นพบที่มีคุณค่าและสามารถใช้เป็นทางเลือกในการรักษาโรคทางพันธุกรรมอื่นๆ ได้ในอนาคต[๑๗] ในปีเดียวกันมีรายงานการนำเทคนิค RNAi มาใช้ในการรักษาโรคไขข้ออักเสบได้เป็นผลสำเร็จเป็นครั้งแรก โดยยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF-alpha มีผลช่วยลดการดำเนินไปของโรคไขข้ออักเสบ รวมทั้งไขข้อถูกทำลายลดลงอีกด้วย[๑๘]

การศึกษาด้านระบบภูมิคุ้มกัน การต้านเชื้อไวรัสและโรคติดเชื้อชนิดต่างๆ

โรคภูมิคุ้มกันบกพร่องที่เกิดจากการติดเชื้อ HIV (โรคเอดส์) ยังเป็นโรคที่น่ากลัวและยังไม่มีวิธีรักษาให้หายขาดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะนี้ได้มีงานวิจัยที่ยับยั้งการจำลองตัวของเชื้อไวรัสและป้องกันการกลายพันธุ์ของไวรัสเพื่อหลบหนีระบบภูมิคุ้มกันได้ด้วยเทคนิค RNAi โดยทำการยับยั้งที่กระบวนการหลบหนี ๒ วิถีหลัก อย่างไรก็ตามภายใต้สภาวะที่ถูกยับยั้งด้วย RNAi ไวรัส HIV-1 สามารถวิวัฒนาการเปลี่ยนไปใช้วิถีอื่นในการหลบหนีได้[๑๕] เทคนิค RNAi ไม่เพียงแต่ใช้ในการรักษาหรือต่อต้านการติดเชื้อไวรัส HIV เท่านั้น แต่ยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสและต้านการติดเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ ได้อีกหลายชนิด เช่น ไวรัสเดงกี่ก่อให้เกิดไข้เลือดออก[๒๐], ไวรัสตับอักเสบ C[๒๑], ไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจ RSV, parainfluenza, metapneumoviruse[๒๒] รวมทั้งเชื้อไวรัส H1N1 สายพันธุ์ใหม่ ซึ่งก่อให้เกิดโรคไข้หวัด ๒๐๐๙ ที่เพิ่งระบาดไปทั่วโลกอีกด้วย[๒๓] สิ่งที่น่าสนใจยิ่งไปกว่านั้นคือ RNAi ยังสามารถนำมาใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยภายในร่างกายมนุษย์ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสได้ ดังจะเห็นได้จากงานวิจัยที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าโปรตีนของมนุษย์มีส่วนเกี่ยวข้องกับการจำลองตัวเองหรือเพิ่มจำนวนของไวรัสชนิดต่างๆ ได้แก่ เชื้อ HIV, flaviviruses และ influenza ภายในร่างกายได้[๒๔]

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคทางเมแทบอลิซึม

ปัจจุบันนี้โรคทางเมแทบอลิซึมเป็นที่รู้จักและได้รับความสนใจมากขึ้น นักวิจัยหลายกลุ่มพยายามที่จะศึกษาเพื่อให้เข้าใจถึงสาเหตุของการเกิดโรค ค้นหาวิธีในการรักษา รวมทั้งศึกษาความเชื่อมโยงระหว่างยีนกับการเกิดโรคทางเมแทบอลิซึม ดังจะเห็นได้จากงานวิจัยของ Prior และทีมวิจัย โดยทำการศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน Abelson helper integration site-1 (AHI1) ด้วยเทคนิค RNAi ทำให้ทราบบทบาทหน้าที่ใหม่ของ AHI1 ในการควบคุมสมดุลน้ำตาลและแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารพันธุกรรมกับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ ๒ ได้[๒๕] ส่วนการวิจัยของ Hanson และ Reshef ศึกษาผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน Phosphoenolpyruvate carboxy-kinase (PEPCK) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการควบคุมวิถีการสังเคราะห์น้ำตาลและควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดโดยอาศัยเทคนิค RNAi ผลการทดลองพบว่าเมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน PEPCK มีผลทำให้โปรตีน PEPCK ในตับลดลง ๕๐% และสามารถลดน้ำตาลในเลือดลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากผลงานวิจัยดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคเบาหวานด้วยยีนบำบัดต่อไปในอนาคตได้[๒๖] ในปัจจุบันมีการดัดแปลง siRNA ก่อนนำส่งเข้าสู่เซลล์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการส่ง siRNA ไปยังเนื้อเยื่อเป้าหมายต่างๆ ดังเช่นงานวิจัยนี้ทำการศึกษาผลการยับยั้งการแสดงออกของยีนสร้าง apolipoprotein B (apoB) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของคอเลสเตอรอล คณะผู้วิจัยได้ทำการดัดแปลงสาย siRNA ของยีน apoB เชื่อมต่อกับคอเลสเตอรอล (apoB-cholesterol) ก่อนนำส่งเข้าเซลล์ พบว่า apoB-cholesterol สามารถเข้าสู่เซลล์ของเนื้อเยื่อได้หลายชนิด ได้แก่ เซลล์ตับ ลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม หัวใจ ไต ปอด และเนื้อเยื่อไขมัน ส่งผลยับยั้งการแสดงออกของยีน apoB และทำให้ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดลดลงอย่างมีประสิทธิภาพ[๒๗]

การศึกษาด้านระบบประสาทและสมอง

โรคทางระบบประสาทเป็นโรคที่ค่อนข้างซับซ้อนและจำเป็นที่ต้องศึกษาหาวิธีในการรักษาที่มีประสิทธิภาพอีกมาก อย่างไรก็ตาม RNAi ถูกนำมาใช้ในการรักษา

ผู้ป่วยโรคระบบประสาทแนวทางใหม่ โดยอาศัยหลักการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ทำให้เกิดโรคนั้น ๆ จากการศึกษาหายีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคตื่นตระหนก (Panic disorder) พบว่า orexin มีผลต่อการเกิดพยาธิสรีระของโรคนี้ ดังนั้นจากความรู้นี้สามารถประยุกต์ใช้เทคนิค RNAi มาใช้ในการรักษาโรคนี้ได้ โดยการยับยั้งการแสดงออกของยีน orexin ในไฮโปทาลามัส[๒๘] นอกจากนี้มีการค้นพบว่าการเกิดเนื้องอกในสมองเกี่ยวข้องกับ Nucleostemin (NS) เมื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของ NS มีผลไปขัดขวางการแบ่งตัวของเซลล์เนื้องอกของสมองได้ แสดงให้เห็นว่า NS มีบทบาทสำคัญต่อการก่อให้เกิดเนื้องอกในสมอง[๒๙]

ข้อจำกัดของ RNAi

อย่างไรก็ตามการนำเทคนิค RNAi มาใช้ในการรักษาโรคยังพบว่ามีข้อจำกัดอีกมากมาย ซึ่งยังต้องอาศัยเวลาและต้องพัฒนาอีกหลายขั้นตอน เพื่อนำไปสู่การรักษาทางเลือกใหม่ที่มีประสิทธิภาพ โดยเริ่มจากการศึกษาระดับเซลล์ จากนั้นต้องมีการศึกษากับสัตว์ทดลองเพื่อให้แน่ใจว่าเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการรักษาได้อย่างจำเพาะเจาะจงกับอวัยวะเป้าหมาย รวมทั้งต้องคำนึงถึงผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ของ siRNA ที่ถูกส่งเข้าไปอาจเป็นพิษต่อเซลล์หรือมีผลทำลายเนื้อเยื่อเป้าหมายได้ อย่างไรก็ตาม RNAi อาจไม่สามารถนำมาใช้ในการรักษาบางโรคได้ ดังเช่นเมื่อไม่นานนี้ได้มีรายงานถึงข้อจำกัดและอภิปรายถึงความยากและอุปสรรคในการนำเทคนิค RNAi มาใช้ในการรักษาโรคหัวใจล้มเหลว[๓๐,๓๑] การศึกษาทางประสาทวิทยาและโรคทางระบบประสาท เนื่องจาก siRNA ที่ส่งเข้าไปด้วยวิธีต่าง ๆ มีผลทำให้เซลล์ได้รับบาดเจ็บและเสียหาย[๓๒]

สรุป

RNAi เป็นเทคนิคสมัยใหม่และเป็นที่นิยมสำหรับใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาวิจัยด้านการแพทย์กันอย่างแพร่หลาย ปัจจุบันเทคนิคนี้มีประโยชน์ในการศึกษาหาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค สามารถหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของการเกิดโรค ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการคัดกรองกลุ่มเสี่ยง เพื่อนำไปสู่การป้องกันการเกิดโรคได้ นอกจากนี้เทคนิค RNAi เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพมากสำหรับใช้ในการศึกษาหาหน้าที่และกลวิธานการเกิดโรค รวมทั้งศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยภายในร่างกายที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อหรือเกิดโรคได้ ยิ่งไปกว่านั้นเทคนิค RNAi สามารถถูกพัฒนาและนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคแนวทางใหม่ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัดอีกหลายอย่าง ซึ่งมีผลต่อการนำ RNAi มาใช้ในการรักษาโรคบางชนิด

เอกสารอ้างอิง

๑. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans.* Nature 1998;391:806-11.

๒. Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. Genes Dev 1999;13:3191-7.

๓. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 2001;411:494-8.

๔. Hannon GJ. RNA interference. Nature 2002; 418:244-51.

๕. McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nat Rev Genet 2002;3:737-47.

๖. Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. Nat Rev Mol Cell Biol 2003;4:457-67.

๗. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 2001;409:363-6.

๘. Nykänen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. Cell 2001;107:309-21.

๙. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat Rev Mol Cell Biol 2005;6:376-85.

๑๐. Echeverri CJ, Perrimon N. High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. Nat Rev Genet 2006;7:373-84.

๑๑. Hong X, Michalski CW, Kong B, Zhang W, Raggi MC, Sauliunaite D, et al. ALCAM is associated with chemoresistance and tumor cell adhesion in pancreatic cancer. J Surg Oncol 2010;101:564-9.

๑๒. Sahni A, Simpson-Haidaris PJ, Sahni SK, Vaday GG, Francis CW. Fibrinogen synthesized by cancer cells augments the proliferative effect of fibroblast growth factor-2 (FGF-2). J Thromb Haemost 2008;6:176-83.

๑๓. Sheng Q, Liu X, Fleming E, Yuan K, Piao H, Chen J, et al. An activated ErbB3/NRG1 autocrine loop supports in vivo proliferation in ovarian cancer cells. Cancer Cell 2010;17:298-310.

๑๔. Di Cresce C, Koropatnick J. Antisense Treatment in Human Prostate Cancer and Melanoma. Curr Cancer Drug Targets 2010:10:555-65.

๑๕. Zang S, Chen F, Dai J, Guo D, Tse W, Qu X, et al. RNAi-mediated knockdown of Notch-1 leads to cell growth inhibition and enhanced chemosensitivity in human breast cancer. Oncol Rep 2010;23:893-9.

๑๖. Kim JW, Sahm H, You J, Wang M. Knockdown of superoxide dismutase 1 sensitizes cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. Anticancer Res 2010;30:2577-81.

๑๗. Georgiadis A, Tschernutter M, Bainbridge JW, Robbie SJ, McIntosh J, Nathwani AC, et al. AAV-mediated knockdown of peripherin-2 in vivo using miRNA-based hairpins. Gene Ther 2010;17:486-93.

๑๘. Khoury M, Courties G, Fabre S, Bouffi C, Seemayer CA, Vervoordeldonk MJ, et al. Adeno-associated virus type 5-mediated intra-articular administration of tumor necrosis factor small interfering RNA improves collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum 2010;62:765-70.

๑๙. Schopman NC, ter Brake O, Berkhout B. Anticipating and blocking HIV-1 escape by second generation antiviral shRNAs. Retrovirology 2010;7:52.

๒๐. Subramanya S, Kim SS, Abraham S, Yao J, Kumar M, Kumar P, et al. Targeted delivery of small interfering RNA to human dendritic cells to suppress dengue virus infection and associated proinflammatory cytokine production. J Virol 2010;84:2490-501.

๒๑. Pfeffer S, Baumert TF. Impact of microRNAs for pathogenesis and treatment of hepatitis C virus infection. Gastroenterol Clin Biol 2010; 34:431-5.

๒๒. DeVincenzo JP. Harnessing RNA interference to develop neonatal therapies: from Nobel Prize winning discovery to proof of concept clinical trials. Early Hum Dev 2009;85(10 Suppl): S31-5.

๒๓. Zhiqiang W, Yaowu Y, Fan Y, Jian Y, Yongfeng H, Lina Z, et al. Effective siRNAs inhibit the replication of novel influenza A (H1N1) virus. Antiviral Res 2010;85:559-61.

๒๔. Hirsch AJ. The use of RNAi-based screens to identify host proteins involved in viral replication. Future Microbiol 2010;5:303-11.

๒๕. Prior MJ, Foletta VC, Jowett JB, Segal DH, Carless MA, Curran JE, et al. The characterization of Abelson helper integration site-1 in skeletal muscle and its links to the metabolic syndrome. Metabolism 2010;59:1057-64.

๒๖. Hanson RW, Reshef L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. Annu Rev Biochem 1997;66:581-611.

๒๗. Farese RV, Jr, Ruland SL, Flynn LM, Stokowski RP, Young SG. Knockout of the mouse apolipoprotein B gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:1774-78.

๒๘. Johnson PL, Truitt W, Fitz SD, Minick PE, Dietrich A, Sanghani S, et al. A key role for orexin in panic anxiety. Nat Med 2010;16:111-5.

๒๙. Malakootian M, Mowla SJ, Saberi H, Asadi MH, Atlasi Y, Shafaroudi AM. Differential expression of nucleostemin, a stem cell marker, and its variants in different types of brain tumors. Mol Carcinog 2010;49:818-25.

๓๐. Poller W, Hajjar R, Schultheiss HP, Fechner H. Cardiac-targeted delivery of regulatory RNA molecules and genes for the treatment of heart failure. Cardiovasc Res 2010;86:353-64.

๓๑. Poller W, Fechner H. Development of novel cardiovascular therapeutics from small regulatory RNA molecules-an outline of key requirements. Curr Pharm Des 2010;16:2252-68.

๓๒. Akaneya Y. A new approach for therapeutic use by RNA interference in the brain. Methods Mol Biol 2010;623:313-24.

Abstract

The miracle of RNA interference in the modern medical research

Rungrat Jitvaropas*, Sunchai Payungporn**

*Division of Biochemistry, Department of Preclinical Science, Faculty of Medicine, Thammasat University

**Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

RNA interference (RNAi) serves as a powerful tool in regulating specific genes. There are two pathways of RNAi that are triggered by endogenous microRNA (pri-miRNA) or exogenous double-strand RNA (dsRNA). In the initiation step, pri-miRNA or dsRNA is cleaved into miRNA and small interfering RNA duplex (siRNA), respectively. Subsequently the mi/siRNA is incorporated into the RNA induced silencing complex (RISC) and leading the RISC to complementary RNA molecules. RNAi results in not only the knockdown of gene expression but also degradation of the target gene. To date, RNAi technology is indispensable in modern medical research. The goal of RNAi research is to elucidate the biological effects resulting from silencing a target of interest, gene function, as well as host-pathogen interactions. Moreover, the clinical application of RNAi is employed as a novel RNAi-therapy for treatment of several diseases including cancers, viral infection and others. However, RNAi therapy has limitation due to cytotoxicity of the existing siRNA delivery method.

Key word: RNA interference, RNAi, silencing RNA, siRNA, Modern medical research, RNAi therapy