



DEVELOPMENT OF MULTIPLEX RT-QPCR IN URINE SPECIMEN FROM LUPUS NEPHRITIS PATIENTS

^{1*}Nantawan Wongchidwan, ¹Yingyos Avihingsanon & ¹Wonngarm Kittanamongkolchai
¹Chulalongkorn University

*Corresponding author: Moojass22@gmail.com

Received	Reviewed	Revised	Accepted
27/06/2025	28/08/2025	30/08/2025	31/08/2024

Abstract

This study developed an in-house Multiplex RT-qPCR method to measure mRNA from four gene sets: Set 1 (18s rRNA, MCP-1), Set 2 (IP-10, VEGF), Set 3 (FoxP3, NGAL), and Set 4 (GATA3, TBX-21). The method was applied to urine samples from LN patients for clinical analysis.

Method: Comparison between the Multiplex and Single RT-qPCR methods used ΔC_t and correlation values, evaluated with linear regression. Urine samples from 15 LN patients (Active and Non-active groups) were tested.

Conclusion: Results indicated ΔC_t values for VEGF, NGAL, and TBX-21 were acceptable; 18s rRNA, IP-10, and GATA-3 were slightly outside limits; MCP-1 and FoxP3 showed variability with many values outside limits. Correlation tests revealed no significant differences for genes 1, 2, and 4 between methods, except for low correlation in FoxP3 (Group 3). Comparing mRNA levels with LN patient characteristics, MCP-1, IP-10, VEGF, NGAL, and TBX-21 were significantly higher in active LN and lower in non-active LN. Conversely, GATA-3 levels were higher in non-active LN and lower in active LN. Due to RT-qPCR inefficiency, FoxP3 mRNA levels were not analyzed in LN patients.

Keywords: Multiplex Reverse Real-Time PCR Technique; Urine; Lupus Nephritis



การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์รีเวิร์สเรียลไทม์พีซีอาร์ ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรัง

นันทวัน วงศ์จิตรวรรณ,¹ ยิงยศ อวิหิงสานนท์ และ¹วรรณงาม กิจธนามงคลชัย

¹จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*ผู้นิพนธ์หลัก: Moojass22@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี In-house Multiplex RT-qPCR ที่สามารถตรวจวัด mRNA ของยีนทั้ง 4 ชุด ชุดที่ 1 (18s rRNA, MCP-1) ชุดที่ 2 (IP-10, VEGF) ชุดที่ 3 (FoxP3, NGAL) และชุดที่ 4 (GATA3, TBX-21) พร้อมทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้าน คลินิกในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วย LN ได้

วิธีดำเนินงานวิจัย ทำการทดสอบหาค่า ΔC_t และ Correlation เปรียบเทียบ ระหว่าง 2 เทคนิค In-house Multiplex และ Single RT-qPCR โดยใช้สถิติ Simple linear regression จากนั้น ทดสอบโดยใช้ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วย LN จำนวน 15 ราย โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่ม Active LN และ Non-active LN

ผลการวิจัย ค่า ΔC_t ของ VEGF, NGAL และ TBX-21 อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ 18s rRNA, IP10 และ GATA-3 มีส่วนน้อยที่อยู่นอกเหนือเกณฑ์ และ MCP-1 และ FoxP3 มีค่าอยู่ นอกเหนือจาก เกณฑ์จำนวนมากและมีค่าสูง และผลทดสอบ correlation พบว่ายีนชุดที่ 1, 2 และ 4 ไม่มีความแตกต่าง กันทั้ง 2 เทคนิค ยกเว้นในกลุ่มที่ 3 FoxP3 มีความสัมพันธ์ระดับต่ำ การเปรียบเทียบระดับ mRNA กับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย LN พบว่า MCP-1, IP-10, VEGF, NGAL และ TBX-21 มีปริมาณ mRNA ในปัสสาวะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญใน active LN และลดลงใน non-active LN ส่วน GATA-3 พบว่ามีระดับ mRNA ในปัสสาวะลดลงอย่างมีนัยสำคัญใน active LN และเพิ่มขึ้นใน non-active LN ส่วนในยีน FoxP3 เนื่องจากประสิทธิภาพของเทคนิค RT-qPCR มีค่า Efficiency ต่ำ จึงไม่รวม การศึกษาใน FoxP3 ในปัสสาวะของผู้ป่วย LN ในงานวิจัยนี้

คำสำคัญ: เทคนิคมัลติเพล็กซ์รีเวิร์สเรียลไทม์พีซีอาร์; ปัสสาวะ; ไตอักเสบเรื้อรัง

บทนำ

โรคไตอักเสบเรื้อรัง (Lupus nephritis) เป็นภาวะที่พบได้บ่อยประมาณ 50% ในผู้ป่วยโรคเอสแอลอี (SLE) มีลักษณะการดำเนินโรคในลักษณะเรื้อรัง ถึงแม้จะมีการรักษาด้วยยาต้านการอักเสบและยากดภูมิคุ้มกันก็ยังสามารถนำไปสู่สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะไตวายขั้นสุดท้ายได้ (Almaani S, Meara A, Rovin BH, 2017) โดยส่วนใหญ่ผู้ป่วยที่มีภาวะไตอักเสบมักไม่แสดงอาการ โดยในปัจจุบันการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้กันทั่วไปสำหรับการวินิจฉัยโรคไตอักเสบเรื้อรังมักจะใช้การวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ อาทิเช่น ระดับครีเอตินินในซีรัม, โปรตีนในปัสสาวะ, ตะกอนปัสสาวะ, ระดับ Complement และระดับ Anti-dsDNA เป็นต้น (Wilhelmus S, Bajema IM, Bertsias GK, Boumpas DT, Gordon C, Lightstone L, et al, 2016) วิธีการตรวจที่ดีที่สุดในปัจจุบันที่ใช้ในการวินิจฉัยและแยกระดับไตอักเสบเรื้อรัง คือวิธีการตัดตรวจเนื้อเยื่อไต (Kidney biopsy) (Inês L, Silva C, Galindo M, López-Longo FJ, Terroso G, Romão VC, et al, (2015) Okpechi IG, Gcelu A, Ameh OI, (2015) akiela B, Kosatka J, Plutecka H, Węgrzyn A, Bazan-Socha S, Sanak M, et al, 2018) แม้ในปัจจุบันวิธีนี้หากมีการประเมินความเสี่ยงของภาวะแทรกซ้อนอย่างรอบคอบก่อนการตรวจชิ้นเนื้อไต จะทำให้มีความปลอดภัยและเสี่ยงต่อภาวะแทรกซ้อนต่ำก็ตาม (Trajceska L, Severova-Andreevska G, Dzekova-Vidimliski P, Nikolov I, Selim G, Spasovski G, et al, 2019) แต่การตรวจซ้ำบ่อยครั้งในผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังเพื่อติดตามการดำเนินโรคก็ยังคงเป็นเรื่องยาก เนื่องจากตัวผู้ป่วยเองปฏิเสธการเจาะไตซ้ำ ๆ หรือเกิดจากข้อจำกัดของทรัพยากรบุคคลและขีดจำกัดของทรัพยากรต่างๆในโรงพยาบาลแต่ละระดับ ในขณะที่การตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้กันทั่วไปสำหรับการวินิจฉัยพยาธิวิทยาโรคไตอักเสบเรื้อรังยังมีความไวและความจำเพาะที่มากพอ (Mok CC, 2010) จึงมีความจำเป็นในการหาเครื่องหมายทางชีวภาพที่ไม่รุกราน เพื่อสะท้อนการทำงานของไต การพยากรณ์การกำเริบ รวมทั้งเป็นแนวทางในติดตามการรักษา โดยทศวรรษที่ผ่านมาได้เห็นความก้าวหน้าที่โดดเด่นในการระบุและตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องหมายชีวภาพของโรคไตอักเสบเรื้อรัง โดยนักวิจัยจำนวนมากมุ่งเน้นไปที่การระบุเครื่องหมายชีวภาพจากปัสสาวะเนื่องจากไม่รุกรานร่างกายผู้ป่วยและยังสามารถสะท้อนกิจกรรมที่เกิดขึ้นภายในไตได้โดยตรง (Liu L, Wang R, Ding H, Tian L, Gao T, Bao C, 2020) อีกทั้งเครื่องหมายชีวภาพจากปัสสาวะยังเหมาะกับการตรวจวัดแบบอนุกรม เพื่อวิเคราะห์หารูปแบบการเปลี่ยนแปลงข้อมูลอย่างต่อเนื่องเพื่อการพยากรณ์อาการทางคลินิกของผู้ป่วย จึงมีความเป็นไปได้ในการใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคไตอักเสบเรื้อรัง (Jakiela B, Kosatka J, Plutecka H, Węgrzyn A, Bazan-Socha S, Sanak M, et al, 2018)



ในปัจจุบันมีความพยายามหาวิธีการตรวจวัดการแสดงออกของ mRNA และ Protein ที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของโรคจากปัสสาวะผู้ป่วยด้วยเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคไตอักเสบเรื้อรังจำนวนมาก อาทิเช่น Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) มีการศึกษาพบว่า MCP-1 ในปัสสาวะผู้ป่วยกลุ่ม Active-LN สูงกว่า ผู้ป่วยกลุ่ม Inactive-LN และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผู้ป่วยกลุ่ม Inactive-LN มีระดับ MCP-1 ในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (Lee YH, Song GG, 2017) Rovin และคณะ (Rovin BH, Song H, Birmingham DJ, Hebert LA, Yu CY, Nagaraja HN, 2005) พบว่า ในผู้ป่วยกลุ่ม Proliferative (WHO class III or IV) จะมีระดับ uMCP-1 ที่สูงกว่ากลุ่มใน Membranous (class V) nephritis และไม่มีความสัมพันธ์กับกลุ่ม Nonrenal SLE activity ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจะมีความจำเพาะเจาะจงต่อ Renal activity เท่านั้น โดยพบว่า uMCP-1 เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ดีสำหรับการเกิด Renal flare ในผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังโดยมีความจำเพาะสูงถึง 73%

ปัสสาวะของผู้ป่วย SLE ที่เป็นโรคไตวาย (rSLEDAI > 4) พบระดับของ Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ SLE ที่ไม่มีอาการทางไต (Rubinstein T, Pitashny M, Levine B, Schwartz N, Schwartzman J, Weinstein E, et al, 2010) และอัตราส่วน uNGAL1 / creatinuria เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (สูงถึง 104%) สามารถตรวจพบได้ถึง 3 เดือนก่อนการกำเริบ (Aragón CC, Tafúr R-A, Suárez-Avellaneda A, Martínez MT, de Las Salas A, Tobón GJ, 2020) และเพิ่มขึ้นเร็วมากในช่วงที่ไตเกิด flare และลดลงหลังการให้ยากดภูมิคุ้มกัน เช่น Cyclosporine และ Mycophenolate mofetil (Satirapoj B, Kitiyakara C, Leelahavanichkul A, Avihingsanon Y, Supasynhdh O, 2017) แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่ดีในการตอบสนองการรักษาและพยากรณ์การกำเริบของไต ซึ่งเพิ่มความเป็นไปได้ในการใช้เป็น Biomarker ของโรคไตอักเสบเรื้อรัง นอกจากนี้ มีการศึกษาพบว่าในผู้ป่วย Proliferative LN พบระดับของ mRNA FoXP3 ในปัสสาวะสูง ซึ่งมีความสอดคล้องกับคะแนน rSLEDAI และระดับ titers ของ anti-dsDNA นอกจากนี้ FoXP3 ยังมีความสัมพันธ์กับ histological activity index และระดับ mRNA FoXP3 จะลดลงในผู้ป่วย SLE ที่ตอบสนองต่อการรักษา (Wang G, Lai FM-M, Tam L-S, Li EK-M, Kwan BC-H, Chow K-M, et al, 2009) และมีงานวิจัยรายงานว่า FoXP3 จะเริ่มสูงขึ้นประมาณ 8 สัปดาห์ก่อนเกิดภาวะ Renal flare (Szeto CC, 2017) โดยผลจากการศึกษานี้อาจมีประโยชน์ในการทำนายการกำเริบและติดตามการตอบสนองต่อการรักษา

SLE เป็นโรคที่มีลักษณะทางสรีรวิทยาโดยมีการกระตุ้นที่ผิดปกติของ T lymphocytes นำไปสู่ผลิตไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบเพิ่มขึ้น (Horwitz DA, Jacob CO, 1995) ความไม่สมดุลในการผลิตไซโตไคน์ที่เกิดจาก T-helper cells ไม่ว่าจะเป็น Th1 และ Th2 อาจมีบทบาทสำคัญในการ



กำเร็บของโรคไตอักเสบลูปัส (Foster MH, Kelley VR, editors, 1999) โดย T-bet และ GATA-3 เป็นปัจจัยกำหนด T-helper differentiation หรือก็คือกระบวนการเปลี่ยน T-helper cell เพื่อไปทำหน้าที่ต่างๆ (Noble A, 2000) โดย T-bet เป็น transcription factors หลักสำหรับ Th1 (Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, et al, 2001) และ GATA-3 เป็น transcription factors หลักสำหรับ Th2 (Lantelme E, Mantovani S, Palermo B, Campanelli R, Sallusto F, Giachino C, 2001) มีการศึกษาระดับ mRNA และการแสดงออกของโปรตีนของ T-bet ในปัสสาวะ พบว่า มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่เป็นโรคไตอักเสบ (Active nephritis) เมื่อเทียบกับ Inactive nephritis อีกทั้งยังมีความสัมพันธ์กับคะแนนดัชนีกิจกรรมโรค SLE (SLEDAI) และ Histological activity index ในทางกลับกัน mRNA และการแสดงออกของโปรตีนของ GATA-3 ในปัสสาวะลดลงอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่เป็นโรคไตอักเสบ และการแสดงออกของ mRNA GATA-3 มีความสัมพันธ์ผกผันกับคะแนน SLEDAI (Chan R-Y, Lai F-M, Li E-M, Tam L-S, Chow K-M, Li P-T, et al, 2006)

Avihingsanon และคณะ (Avihingsanon, Phumesin, Benjachat, Akkasilpa, Kittikowit, Praditpornsilpa et al, 2006) รายงานว่าระดับของ chemokine และ growth factor mRNA ในปัสสาวะสามารถแยกแยะ Class IV lupus nephritis จาก Lupus nephritis class อื่นได้ และพบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของ Interferon-producing protein 10 (IP-10), C-X-C motif chemokine receptor-3 (CXCR3), transforming growth factor beta (TGF- β) and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA levels พบในผู้ป่วยที่ตอบสนองการบำบัดด้วยภูมิคุ้มกัน ในขณะที่ระดับมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นในผู้ที่ป็น Refractory disease ซึ่งทำให้เป็นเครื่องมือที่มีศักยภาพสำหรับการติดตามกิจกรรมของโรคลูปัสและการตอบสนองต่อการรักษา จากผลงานวิจัยดังกล่าวได้นำไปสู่การตรวจวัด messenger RNAs (mRNAs) ของ Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10) และ Vascular endothelial growth factor (VEGF) ในปัสสาวะ ด้วยเทคนิค Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) ในผู้ป่วยลูปัส (Active Lupus Nephritis) ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

แม้ในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมาจะมีปรับปรุงการพยากรณ์โรคไตอักเสบลูปัสอย่างต่อเนื่อง แต่ก็ยังไม่เป็นที่น่าพอใจ ผู้ป่วยมากถึง 25% ยังคงพัฒนาเข้าสู่ภาวะไตวายขั้นสุดท้ายได้ (Mok CC, 2006) มุ่งงานวิจัยพยายามจะเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ Biomarker ที่ใช้ในการพยากรณ์โรคไตอักเสบลูปัส โดยทำการที่วิเคราะห์ mRNA ของยีนเป้าหมายเป็นกลุ่ม 4 ยีน ได้แก่ (MCP-1, IL-17, GATA-3 และ FOXP3) โดยพบว่าเมื่อกำหนดค่าที่ MCP-1 เพิ่มขึ้น 50%; ระดับ IL-17 ลดลง 50%; ระดับ GATA-3 ลดลง 50% และ FOXP3 เพิ่มขึ้น 50% ของระดับ mRNA ในตะกอนปัสสาวะของผู้ป่วย

เปรียบเทียบกับระดับปัสสาวะพื้นฐาน จากคะแนนรวมอยู่ระหว่าง 0 ถึง 4 จากผู้ป่วย 19 คนในกลุ่มที่มีอาการกำเริบพบมี 13 ราย (68.4%) มีคะแนน ≥ 3 และ 16 ราย (84.2%) มีคะแนน ≥ 2 ในทางตรงกันข้าม ไม่มีผู้ป่วย 19 รายที่อยู่ในกลุ่มควบคุมกลุ่มมีคะแนน ≥ 2 เลย (Szeto C-C, Tam L-S, Kwan BC-H, Lai K-B, Wang G, Li EK-M, et al, 2012) ดังนั้นผู้วิจัย จึงมีความเห็นว่าการที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคไตอักเสบเฉียบพลันให้ดียิ่งขึ้นนั้น ควรมีศึกษาและพัฒนาแนวทางการพยากรณ์โรคไตอักเสบเฉียบพลัน โดยการตรวจวิเคราะห์ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพหลายตัวประกอบกัน โดยใช้เทคนิค Multiplex RT-qPCR ที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้มากกว่า 1 ตำแหน่งในปฏิกิริยาเดียวกันโดยใช้คู่ไพรเมอร์มากกว่า 1 คู่ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมายแตกต่างกัน มาใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งจะทำได้สามารถวิเคราะห์ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพได้รวดเร็วจากการทดสอบคราวเดียว ทำให้ประหยัดเวลา ค่าใช้จ่ายและแรงงานที่ทำการทดสอบ

วิธีการวิจัย

1. ประชากรและตัวอย่าง

งานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างสารพันธุกรรมของผู้ป่วยโรคไตอักเสบเฉียบพลัน โดยได้รับการอนุเคราะห์สารพันธุกรรมบางส่วนจากโครงการวิจัยการป้องกันโรคไตอักเสบเฉียบพลันด้วยการปรับยาคดภูมิคุ้มกัน และการติดตามปริมาณตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในเซลล์ปัสสาวะ การทดลองเปรียบเทียบทางคลินิกแบบสุ่ม (หมายเลขโครงการ 366/62, CREC007/62BRm) จำนวน 16 ราย โดยตัวอย่าง cDNA และ RNA ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ตัวอย่าง Urine pellet ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะใช้ในการทดสอบ งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ 0402/65

2. การออกแบบไพรเมอร์และโพรบ

การออกแบบไพรเมอร์และโพรบที่มีความจำเพาะต่อยีน IP-10, MCP-1, TBX21, GATA3, FOXP3, VEGF, NGAL และ 18s RNA โดยใช้โปรแกรม Primer3Plus (A Untergasser, 2007), Bioedit Version 7.2.5 (Tom Hall, Ibis Therapeutics, U.S.A.) โดยให้มี melting temperature (T_m) ที่ใกล้เคียงกัน (ต่างกันไม่เกิน 2°C) จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน database ด้วยโปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) เพื่อดูว่าไพรเมอร์และโพรบมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อกลุ่มอื่นๆหรือไม่ และเพื่อเป็นการตรวจสอบว่าไพรเมอร์และโพรบมีความจำเพาะต่อยีน IP-10, MCP-1, TBX21, GATA3, FOXP3, VEGF, NGAL และ 18s rRNA เท่านั้น และใช้โปรแกรม OligoAnalyzer™ Tool (Integrated DNA Technologies,



Inc) ในการตรวจหา Hairpin, Self-dimer, Hetero dimer ของไพรเมอร์และโพรบแต่ละคู่เปรียบเทียบกับกันเพื่อหาความเป็นไปได้ในการใช้ทดลองปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR ต่อไป

Table 1: Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	Length (bp)	Product size (bp)	Reference
IP-10 FW	ATT TTG TCC ACG TGT TGA GAT CA	23	80	(Avihingsanon Y et al., 2006)
IP-10 RV	TGG CCT TCG ATT CTG GAT TC	20		
Tbx21 FW	CCC TTG GTG TGG ACT GAG AT	20	110	This study
Tbx21 RW	TCA CCA CTG GAA GGA TAG GG	20		
VEGF FW	GTC CTC ACA CCA TTG AAA CCA C	22	132	This study
VEGF RW	GAT CCT GCC CTG TCT CTC TG	20		
GATA3 FW	TCA TTA AGC CCA AGC GAA GG	20	107	(Lin Z-W et al., 2015)
GATA3 RW	GTC CCC ATT GGC ATT CCT C	19		
FoxP3 FW	CAC CTG GCT GGG AAA ATG G	19	63	(Lin Z-W et al., 2015)
FoxP3 RW	GGA GCC CTT GTC GGA TGA	18		
MCP-1 FW	GCA ATC AAT GCC CCA GTC A	19	94	(Xiao J, Chodosh J., 2005)
MCP-1 RW	TRC TGC TGG TGA TTC TTC TAT AGC T	25		
NGAL FW	TGA GCA CCA ACT ACA ACC AG	20	138	This study
NGAL RW	TGG AGA AGC GGA TGA AGT TC	20		
18s rRNA FW	GCC CGA AGC GTT TAC TTT GA	20	81	(Avihingsanon Y et al., 2006)
18s rRNA RW	TCC ATT ATT CCT AGC TGC GGT ATC	24		

Table 2: Probes used in this study

Probe sequence (5'-3')	Length (bp)	Specificity	5' Reporter	3' Quancher	Reference
ACA TCT CTT CTC ACC CTT CTT TTT CAT TGT AGC A	34	IP-10	FAM	TAMRA	(Avihingsanon Y et al., 2006)
TGG GCG AAG GAG ACT CTA AGA GGA	24	Tbx21	ROX	BHQ1	This study
GTG AGT GGT TGA CCT TCC TCC ATC C	25	VEGF	CY5	BHQ2	This study
GTC CTG TGC GAA CTG TCA GAC CA	23	GATA3	HEX	BHQ1	This study
ACT GAC CAA GGC TTC ATC TGT GGC A	25	FoxP3	ROX	BHQ1	This study



CAC CAA TAG GAA GAT CTC AGT GCA GAG	27	MCP-1	CY5	BHQ2	This study
GAG AAC CAA GGA GCT GAC TTC GGA AC	26	NGAL	HEX	BHQ1	This study
AAA GCA GGC CCG AGC CGC C	19	18s rRNA	FAM	TAMRA	(Avihingsanon Y et al., 2006)

3. การเลือกหาชุดยีนเป้าหมายสำหรับ In-house Multiplex RT-qPCR

ในงานวิจัยนี้ต้องการตรวจวัดการแสดงออกของ mRNA ของยีน IP-10, NGAL, MCP-1, FOXP3, VEGF, GATA3, TBX21 และ 18s rRNA โดยใช้เทคนิค Multiplex RT-qPCR ซึ่งเทคนิคนี้มีการใช้ Primer มากกว่า 1 คู่ และ Probe มากกว่า 1 โพรบ ที่มารวมอยู่ใน 1 หลอดปฏิกิริยาเดียวกัน ดังนั้นการคัดเลือกยีนมากกว่า 1 ยีนเพื่อมารวมกลุ่มปฏิกิริยาเดียวกันนั้น จำเป็นต้องคำนึงถึงลักษณะและคุณสมบัติของ Primer และ Probe โดยใช้โปรแกรม OligoAnalyzer™ Tool (Integrated DNA Technologies, Inc) โดยยีนที่จะมารวมอยู่ในกลุ่มปฏิกิริยาเดียวกัน ต้องพบการเกิด Hairpin, self dimer และ hetero dimer น้อย และควรมีค่าพลังงาน ΔG มากกว่า -7.0 kcal.mole และที่สำคัญต้องมีช่องสัญญาณหรือติดฉลากสีสารเรืองแสงที่แตกต่างกันอีกด้วย

4. ขั้นตอนการเตรียม Real-time PCR reaction master mix

การเตรียม Real-time PCR reaction master mix โดยใช้ TaqMan™ Fast Advanced Master Mix มีกระบวนการที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

Table 3: การเตรียม Single RT-qPCR reaction master mix

Reagents	Final concentration
TaqMan Fast Advance Master Mix	10 μl
Forward primer (20uM)	0.5 μl
Reverse primer (20uM)	0.5 μl
Probe (20uM)	0.2 μl
DNase - RNase free water	6.8 μl
Template	2 μl
Total	1 Reaction (μl)

**Table 4:** การเตรียม In-house Multiplex Real-time PCR reaction master mix

Reagents	Final concentration
TaqMan Fast Advance Master Mix	10 μ l
Forward primer (20uM) (1)(2) or (3)	0.5 μ l(1)+ 0.5 μ l(2) + or 0.5 μ l(3)
Reverse primer (20uM) (1)(2) or (3)	0.5 μ l(1)+ 0.5 μ l(2) + or 0.5 μ l(3)
Probe (20uM) (1)(2)	0.2 μ l(1)+ 0.2 μ l(2) + or 0.2 μ l(3)
DNase - RNase free water	5.6 μ l or 4.4 μ l
Template	2 μ l
Total	1 Reaction (μl)

การเตรียม Single RT-qPCR และ In-house Multiplex Real-time PCR reaction master mix โดยใช้ TaqMan™ Fast Advanced Master Mix มีกระบวนการที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้โดยใช้เครื่อง QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System

Table 5: สภาวะของ Single RT-qPCR และ In-house Multiplex Real-time PCR reaction

Step	UNG incubation	Polymerase activation	PCR	
			CYCLE (40 cycles)	
			Denaturation	Annealing/ Extension
Temperature	50°C	95°C	95°C	60°C
Time	2min	2min	1sec	20sec

5. การทดสอบคุณสมบัติของ Primer และ Probe

ทำการทดสอบคุณสมบัติของ Primer และ Probe ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ โดยการนำ DNA ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา Real-time PCR จาก primer และ probe ทั้ง 8 ยีนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ นำมาทำการแยกแแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100V เป็นเวลา 40 นาที แปรผลจากแถบเรืองแสงที่ปรากฏบนเจล

6.การทดสอบประสิทธิภาพของวิธี In-house Multiplex RT-qPCR เปรียบเทียบกับวิธี Single RT-qPCR

6.1 การหาค่า LOD (Limit of detection)

LOD (limit of detection) หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้ การหาค่า Limit of detection จากการทำ serial dilution โดยให้ค่าความเข้มข้นของ cDNA อยู่ระหว่าง 10^8 - 10^1 Copies/ μ l เพื่อนำมาใช้เป็นแม่แบบในการทำ Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ดูผลความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยังคงให้ PCR product ที่มองเห็นได้

6.2 การประเมินประสิทธิภาพของวิธี In-house Multiplex RT-qPCR เปรียบเทียบกับวิธี Single RT-qPCR

เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวัด mRNA ของยีน โดยทำการหาค่า PCR Efficiency (ค่าประสิทธิภาพของเทคนิค PCR), Linearity (ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่สัมพันธ์กันโดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์เป็นเชิงเส้นตรง), Dynamic Range (อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นมากที่สุดและความเข้มข้นน้อยสุดที่ตรวจวัดได้), Sensitivity (ความไว) และ Specificity (ความจำเพาะ) ว่ามีประสิทธิภาพเทียบเท่ากันหรือไม่

7. การตรวจวัด mRNA ของยีน ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังโดยใช้เทคนิค In-house Multiplex RT-qPCR กับเทคนิค Single RT-qPCR

ทำการทดสอบในตัวอย่าง Clinical samples หรือปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังที่ใช้ตัวอย่างสารพันธุกรรมจากปัสสาวะของผู้ป่วยจำนวน 15 ตัวอย่าง สำหรับประเภทของ Clinical samples ที่เลือกมาใช้ในการทดสอบนี้ โดยจะเลือกมาจากประเภทของตัวอย่างแช่แข็งที่มีเสถียรภาพที่ดีที่สุดหรือเทียบเท่ากับ Fresh sample โดยใช้วิธี In-house Multiplex RT-qPCR เปรียบเทียบวิธี Single RT-qPCR

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

1. ผลการทดสอบคุณสมบัติของ Primer และ Probe

นำ DNA ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา Real-time PCR โดยใช้คู่ primer และ probe ของ 8 ยีน ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ นำมาทำการแยกแยะดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100V เป็นเวลา 40 นาที ผลแสดงดังรูป

Fig.1 แสดงผลการแยกแยะดีเอ็นเอของยีนทั้ง 8 ยีน

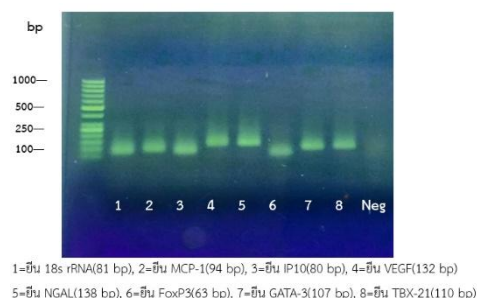
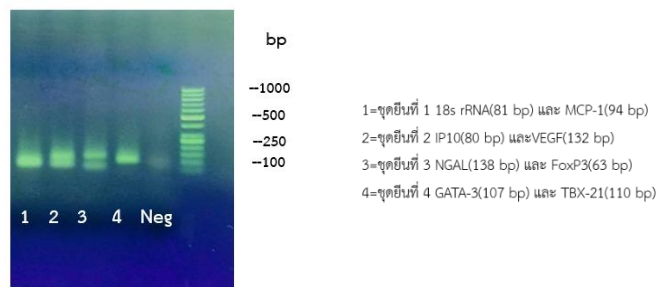


Fig.2 แสดงผลการแยกแอมพลิฟิเคชันของยีนแบบแบ่งเป็น 4 ชุดยีน



2.ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธี In-house Multiplex RT-qPCR เปรียบเทียบกับวิธี Single RT-qPCR

2.1 ค่า LOD (Limit of detection)

จากตารางเปรียบเทียบ Detection limits ของเทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR พบว่าในการตรวจวัดการแสดงออกของยีน IP-10, NGAL, MCP-1, FOXP3, VEGF, GATA3, TBX21 และ 18s rRNA พบว่ามีค่า Detection limits ที่ตรวจวัดได้เท่ากันทั้ง 2 เทคนิค

Table 6: สรุป Detection limits ของเทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR

Gene	Single Real-time PCR	In-house Multiplex Real-time PCR
	Limit of Detection (copy/ μ l)	Limit of Detection (copy/ μ l)
IP-10	500	500
FoxP3	500	500
GATA-3	500	500
18s rRNA	500	500
MCP-1	600	600
NGAL	4000	4000
TBX-21	6000	6000
VEGF	6000	6000



2.2 ค่า Efficiency, Linearity, Dynamic Range, Sensitivity และ Specificity ของวิธี In-house Multiplex RT-qPCR เปรียบเทียบกับวิธี Single RT-qPCR

Table 7: สรุปค่า Exclusion และ Variability

Gene	Efficiency,%	Linearity, R^2	Dynamic Range, Concentration	Sensitivity, Concentration	Specificity
18s rRNA					
Single	62.99	0.9656	$0.5 \times 10^8 - 0.5 \times 10^3$	0.5×10^3	Yes
Multiplex	63.61	0.976	$0.5 \times 10^8 - 0.5 \times 10^3$	0.5×10^3	Yes
MCP-1					
Single	77.65	0.9848	$0.6 \times 10^8 - 0.6 \times 10^3$	0.6×10^3	Yes
Multiplex	65.11	0.999	$0.6 \times 10^8 - 0.6 \times 10^3$	0.6×10^3	Yes
IP-10					
Single	59.66	0.9955	$0.5 \times 10^8 - 0.5 \times 10^3$	0.5×10^3	Yes
Multiplex	58.46	0.9923	$0.5 \times 10^8 - 0.5 \times 10^3$	0.5×10^3	Yes
VEGF					
Single	73.38	0.9953	$0.6 \times 10^8 - 0.6 \times 10^4$	0.6×10^4	Yes
Multiplex	65.37	0.9717	$0.6 \times 10^8 - 0.6 \times 10^4$	0.6×10^4	Yes
FoxP3					
Single	62.69	0.9695	$0.5 \times 10^8 - 0.5 \times 10^3$	0.5×10^3	Yes
Multiplex	76.68	0.9946	$0.5 \times 10^8 - 0.5 \times 10^3$	0.5×10^3	Yes
NGAL					
Single	66.77	0.9981	$0.4 \times 10^8 - 0.4 \times 10^4$	0.4×10^4	Yes
Multiplex	65.65	0.9864	$0.4 \times 10^8 - 0.4 \times 10^4$	0.4×10^4	Yes
GATA-3					
Single	74.63	0.9986	$0.5 \times 10^8 - 0.5 \times 10^3$	0.5×10^3	Yes
Multiplex	74.48	0.9976	$0.5 \times 10^8 - 0.5 \times 10^3$	0.5×10^3	Yes
TBX-21					
Single	68.99	0.9903	$0.6 \times 10^8 - 0.6 \times 10^4$	0.6×10^4	Yes
Multiplex	70.08	0.9849	$0.6 \times 10^8 - 0.6 \times 10^4$	0.6×10^4	Yes

จากตารางสรุปจะพบว่าค่า Efficiency จากทั้ง 2 เทคนิคที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้นั้น ยังมีประสิทธิภาพไม่สูงเท่าที่ควร โดยค่าปกติของ PCR Efficiency ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 90-110% Efficiency (Slope ควรมีค่าประมาณ -3.6 ถึง -3.1) แต่ก็พบว่าค่า Linearity, R^2 ส่วนใหญ่ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้มีค่าสูงกว่าหรือใกล้เคียงกับค่าที่ยอมรับได้คือ ≥ 0.980 เป็นอย่างมาก



3. ผลการตรวจวัดการแสดงออกของ mRNA โดยใช้เทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR โดยแบ่งยื่นออกเป็น 4 กลุ่มปฏิกิริยา กลุ่มที่ 1 (18s rRNA, MCP-1) กลุ่มที่ 2 (IP-10, VEGF) กลุ่มที่ 3 (FoxP3, NGAL) และกลุ่มที่ 4 (GATA3, TBX-21)

Group 1 (18s rRNA, MCP-1)

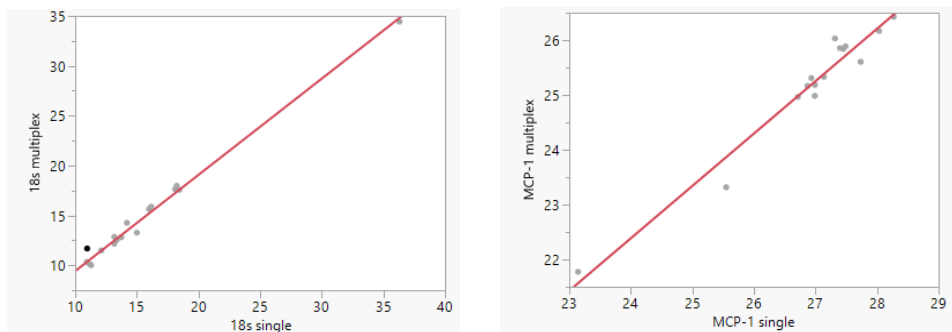


Fig. 3 ค่า Cycle threshold (Ct) เทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน 18s rRNA และ MCP-1

ค่า Cycle threshold (Ct) ระหว่างเทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ในยีน 18s rRNA มีความสัมพันธ์กันร้อยละ 99.2961 ($R^2 = 0.992961$) และมีค่าสัมประสิทธิ์การพยากรณ์ (R^2 Adj) เท่ากับ 0.992459 ส่วนในยีน MCP-1 มีค่า Cycle threshold (Ct) ระหว่างเทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน MCP-1 มีค่า Cycle threshold (Ct) ระหว่างเทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR มีความสัมพันธ์กันร้อยละ 95.5521 ($R^2 = .955521$) และมีค่าสัมประสิทธิ์การพยากรณ์ (R^2 Adj) เท่ากับ 0.952099

Group 2 (IP-10, VEGF)

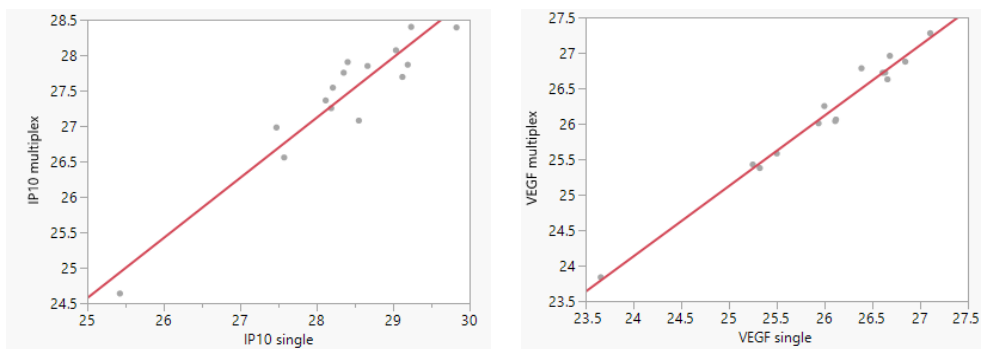


Fig. 4 ค่า Cycle threshold (Ct) เทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน IP-10 และ VEGF

ค่า Cycle threshold (Ct) เทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน IP-10 พบว่า เทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน IP-10 ไม่มีความแตกต่างกัน โดยค่า Cycle threshold (Ct) ระหว่างเทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน IP-10 มีความสัมพันธ์กันร้อยละ 89.5991 (RSquare = 0.895991) และมีค่าสัมประสิทธิ์การพยากรณ์ (Rsquare Adj) เท่ากับ 0.887991 ส่วนในยีน VEGF มีค่า Cycle threshold (Ct) ระหว่างเทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน VEGF มีความสัมพันธ์กันร้อยละ 97.7747 (RSquare = 0.977747) และมีค่าสัมประสิทธิ์การพยากรณ์ (Rsquare Adj) เท่ากับ 0.976036

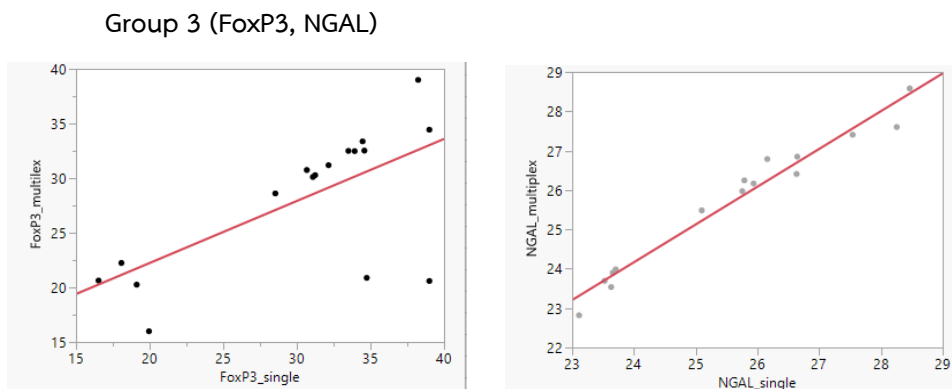


Fig. 5 ค่า Cycle threshold (Ct) เทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน FoxP3 และ NGAL

ค่า Cycle threshold (Ct) เทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน FoxP3 พบว่า เทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน FoxP3 ไม่มีความสัมพันธ์กัน โดยค่า Cycle threshold (Ct) ระหว่างเทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน FoxP3 มีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำเพียงร้อยละ 38.8945 (RSquare = 0.388945) ส่วนเทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน NGAL ไม่มีความแตกต่างกัน โดยค่า Cycle threshold (Ct) ระหว่างเทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน NGAL มีความสัมพันธ์กันร้อยละ 96.541 (RSquare = 0.96541) และมีค่าสัมประสิทธิ์การพยากรณ์ (Rsquare Adj) เท่ากับ 0.962749

Group 4 (GATA3, TBX-21)

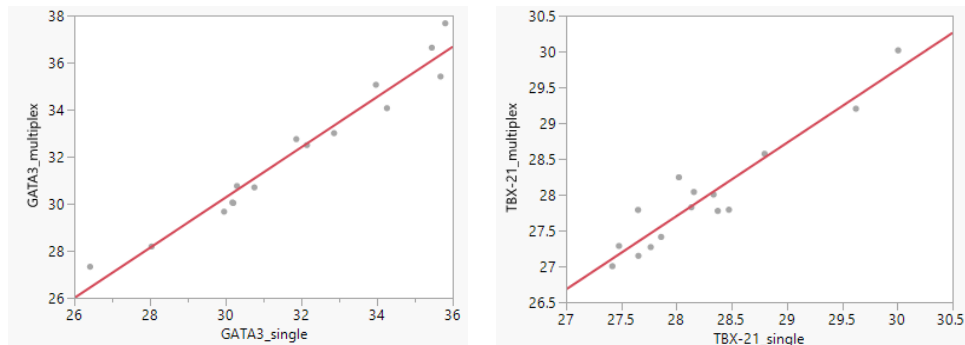


Fig. 6 ค่า Cycle threshold (Ct) เทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน GATA3 และ TBX-21

ค่า Cycle threshold (Ct) เทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน GATA3 พบว่า เทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน GATA3 ไม่มีความแตกต่างกัน โดยค่า Cycle threshold (Ct) ระหว่างเทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน GATA3 มีความสัมพันธ์กันร้อยละ 95.8834 ($RSquare = 0.958834$) และมีค่าสัมประสิทธิ์การพยากรณ์ ($RSquare\ Adj$) เท่ากับ 0.955668 ส่วนใน TBX-21 พบว่า เทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน TBX-21 ไม่มีความแตกต่างกัน โดยค่า Cycle threshold (Ct) ระหว่างเทคนิค Single RT-qPCR และ In-house Multiplex RT-qPCR ใน TBX-21 มีความสัมพันธ์กันร้อยละ 89.3611 ($RSquare = 0.893611$)

4.การเปรียบเทียบผลการตรวจวัดระดับ mRNA ในยีน IP-10, NGAL, MCP-1, FOXP3, VEGF, GATA3, TBX21 และ 18s rRNA กับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรัง

Fig.7 แผนภูมิกล่องและวิสกอร์แสดงการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนทั้ง 7 ตัว กับกลุ่มผู้ป่วยโรคไตอักเสบเรื้อรัง ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิค In-house Multiplex RT-qPCR

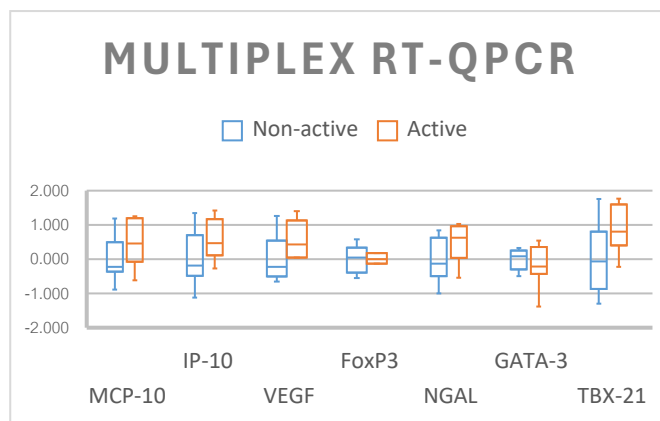
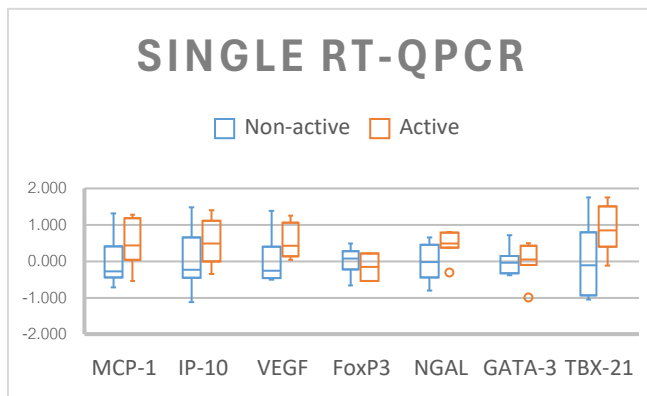


Fig.8 แผนภูมิกล่องและวิสกอร์แสดงการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนทั้ง 7 ตัว กับกลุ่มผู้ป่วยโรคไตอักเสบเรื้อรัง ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิค Single RT-qPCR



สรุปผลการวิจัย

ในการเลือกหาชุดยีนเป้าหมายสำหรับ In-house Multiplex RT-qPCR นั้น การตรวจสอบประเมินเบื้องต้นนั้นโดยใช้โปรแกรม OligoAnalyzer™ Tool (Integrated DNA Technologies, Inc) โดยมีเกณฑ์ที่หากยีนที่จะมารวมอยู่ในกลุ่มปฏิกิริยาเดียวกัน ต้องพบการเกิด Hairpin, self dimer และ hetero dimer น้อย และควรมีค่าพลังงาน delta G มากกว่า -7.0 kcal.mole สามารถช่วยสรุปแนวโน้มความเป็นไปได้ของการรวมกลุ่มปฏิกิริยาได้ดีในระดับหนึ่ง แต่ในท้ายที่สุดแล้วขั้นตอนในทดสอบตรวจวิเคราะห์จริงในห้องปฏิบัติการจะเป็นการช่วยยืนยันความถูกต้องได้ดีที่สุดในการเลือกหาชุดยีนเป้าหมายสำหรับ Multiplex RT-qPCR

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของวิธี In-house Multiplex RT-qPCR เปรียบเทียบกับ Single RT-qPCR พบว่าค่า LOD ที่วัดได้มีค่าเท่ากันทั้ง 2 เทคนิค ส่วนค่า PCR Efficiency จากทั้ง 2 เทคนิคที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้นั้นยังมีประสิทธิภาพไม่สูงเท่าที่ควร โดยค่าปกติของ PCR Efficiency ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 90-110% Efficiency (Slope ควรมีค่าประมาณ -3.6 ถึง -3.1) แต่ในงานวิจัยนี้มีค่า PCR Efficiency อยู่ระหว่าง 58-78% เท่านั้น ซึ่งต้องทำการ validation protocol ของ qPCR เพิ่มเติมเพื่อปรับปรุงค่า PCR Efficiency ในอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ส่วนในค่า Linearity, R^2 PCR protocol ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้มีค่าสูงกว่าหรือใกล้เคียงกับค่าที่ยอมรับได้คือ ≥ 0.980 เป็นอย่างมาก

ผลตรวจวัด mRNA แบบแบ่งเป็นชุดยีน 4 ชุด ชุดที่ 1 (18s rRNA, MCP-1) ชุดที่ 2 (IP-10, VEGF) ชุดที่ 3 (FoxP3, NGAL) และชุดที่ 4 (GATA3, TBX-21) เปรียบเทียบกับเทคนิค Single RT-qPCR เกณฑ์ที่ยอมรับได้คือมีค่าอยู่ช่วง $\Delta Ct < 1$ โดยในยีน VEGF, NGAL และ TBX-21 ค่า ΔCt ที่ได้ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งหมดในทุกตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ สะท้อนให้เห็นถึงประสิทธิภาพและความ



นำเชื้อที่ส่ง สำหรับยีน 18s rRNA, IP10 และ GATA-3 มีค่า ΔCt ส่วนน้อยประมาณ 3-4 ตัวอย่างเท่านั้นที่มีค่าอยู่นอกเหนือเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และสุดท้ายในยีน MCP-1 และ FoxP3 มีค่า ΔCt มีค่าอยู่นอกเหนือจากเกณฑ์ที่ยอมรับได้จำนวนมากและมีค่าสูง สะท้อนให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่ต่ำเทคนิคการตรวจวัดการ mRNA ซึ่งต้องมีการปรับปรุงในรายละเอียดของ Protocol ในการตรวจวิเคราะห์มีประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือเพิ่มขึ้น และเมื่อทดสอบหาค่า correlation โดยใช้สถิติ Simple linear regression พบว่าในกลุ่มกลุ่มที่ 1 (18s rRNA, MCP-1) กลุ่มที่ 2 (IP-10, VEGF) และกลุ่มที่ 4 (GATA3, TBX-21) ทุกกลุ่มปฏิกิริยาไม่มีความแตกต่างกันทั้ง 2 เทคนิค ยกเว้นในกลุ่มที่ 3 (FoxP3, NGAL) ซึ่งยีน FoxP3 มีความสัมพันธ์ระดับต่ำระหว่าง 2 เทคนิค ส่วนยีน NGAL ไม่มีความแตกต่างกันทั้ง 2 เทคนิค

สุดท้ายในเปรียบเทียบผลการตรวจวัดระดับ mRNA ในยีนกับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรัง โดยแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่มคือได้แก่กลุ่มอาการกำเริบ Active LN และกลุ่มอาการโรคสงบ Non-Active LN โดยค่าที่นำมาพิจารณาจัดกลุ่มผู้ป่วยหลัก คือค่า SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) UPCI, Complement C3 C4 และ Anti dsDNA และเพื่อหลีกเลี่ยงความแปรปรวนในการหาปริมาณของ mRNA จึงทำการ Normalization โดยใช้ "housekeeping" gene ในงานวิจัยนี้คือยีน 18s rRNA เมื่อนำมาสร้างแผนภูมิบ็อกซ์และวิสกอร์พบว่า ยีน MCP-1, IP-10, VEGF, NGAL และ TBX-21 มีการแสดงออกของ mRNA ในปัสสาวะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ป่วย active LN โดยมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของโรคไตอักเสบ และคะแนนดัชนีกิจกรรมในไต SLEDAI นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของ mRNA ในปัสสาวะมีระดับที่ลดลงในกลุ่มของผู้ป่วยที่เป็น non-active LN ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์กับการตอบสนองการรักษาหรือว่าอาการของโรคเริ่มสงบ

ในส่วนของยีน GATA-3 พบว่ามีการแสดงออกของ mRNA ในปัสสาวะลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ป่วย active LN และเพิ่มขึ้นในกลุ่มผู้ป่วย non-active LN ซึ่งเป็นแสดงออกแบบ Downregulation และสุดท้ายในยีน FoxP3 เนื่องจากประสิทธิภาพของ Protocol ในการตรวจวัดการ แสดงออกของ mRNA มีค่า Efficiency ที่ค่อนข้างต่ำ ถึงแม้จะทำการ Normalization โดยใช้ House keeping gene (18 rRNA) แล้วก็ตาม ค่า Log10 ที่ได้ก็ยังไม่มีความน่าเชื่อถือต่ำ แต่ตั้งนั้นทางผู้วิจัยจึงยังไม่รวมการศึกษาประเมินยีน FoxP3 ในปัสสาวะของผู้ป่วย LN ในงานวิจัยนี้



References

- Almaani S, Meara A, Rovin BH. (2017). Update on lupus nephritis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 12(5): 825-35.
- Aragón CC, Tafúr R-A, Suárez-Avellaneda A, Martínez MT, de Las Salas A, Tobón GJ. (2020). Urinary biomarkers in lupus nephritis. *Journal of Translational Autoimmunity*. 3:100042.
- Avihingsanon Y, Phumesin P, Benjachat T, Akkasilpa S, Kittikowit V, Praditpornsilpa K, et al. (2006). Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: a noninvasive monitoring in lupus nephritis. *Kidney international*. 69(4):747-53.
- Chan R-Y, Lai F-M, Li E-M, Tam L-S, Chow K-M, Li P-T, et al. (2006). Imbalance of Th1/Th2 transcription factors in patients with lupus nephritis. *Rheumatology*. 45(8):951-7.
- Foster MH, Kelley VR, editors. (1999). *Lupus nephritis: update on pathogenesis and disease mechanisms*. Seminars in nephrology.
- Horwitz DA, Jacob CO. (1995). The cytokine network in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and possible therapeutic implications. *Systemic Lupus Erythematosus*. 51-70.
- Inês L, Silva C, Galindo M, López-Longo FJ, Terroso G, Romão VC, et al. (2015). Classification of systemic lupus erythematosus: Systemic Lupus International Collaborating Clinics versus American College of Rheumatology criteria. *A comparative study of 2,055 patients from a real -life, international systemic lupus erythematosus cohort*. *Arthritis care & research*. 67(8):1180-5.
- Jakiela B, Kosalka J, Plutecka H, Węgrzyn A, Bazan-Socha S, Sanak M, et al. (2018). Urinary cytokines and mRNA expression as biomarkers of disease activity in lupus nephritis. *Lupus*. 27(8):1259-70.



- Lantelme E, Mantovani S, Palermo B, Campanelli R, Sallusto F, Giachino C. (2001). Kinetics of GATA-3 gene expression in early polarizing and committed human T cells. *Immunology*. 102(2):123-30.
- Lee YH, Song GG. (2017). Urinary MCP-1 as a biomarker for lupus nephritis: a meta-analysis. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 76(4):357-63.
- Liu L, Wang R, Ding H, Tian L, Gao T, Bao C. (2020). The utility of urinary biomarker panel in predicting renal pathology and treatment response in Chinese lupus nephritis patients. *PloS one*. 15(10): e0240942.
- Lin Z-W, Wu L-X, Xie Y, Ou X, Tian P-K, Liu X-P, et al. The expression levels of transcription factors T-bet, GATA-3, ROR γ t and FOXP3 in peripheral blood lymphocyte (PBL) of patients with liver cancer and their significance. *International Journal of Medical Sciences*. 2015;12(1):7.
- Mok CC. (2006). *editor Therapeutic options for resistant lupus nephritis*. Seminars in arthritis and rheumatism: Elsevier.
- Mok CC. (2010). Biomarkers for lupus nephritis: a critical appraisal. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Noble A. (2000). Molecular signals and genetic reprogramming in peripheral T-cell differentiation. *Immunology*. 101(3):289-99.
- Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, et al. (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science*. 292(5523):1907-10.
- Okpechi IG, Gcelu A, Ameh OI. (2015). Lupus nephritis: An approach to diagnosis and treatment in South Africa. *South African Medical Journal*. 105(12).
- Rovin BH, Song H, Birmingham DJ, Hebert LA, Yu CY, Nagaraja HN. (2005). Urine chemokines as biomarkers of human systemic lupus erythematosus activity. *Journal of the American Society of Nephrology*. 16(2):467-73.



- Rubinstein T, Pitashny M, Levine B, Schwartz N, Schwartzman J, Weinstein E, et al. (2010). Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel biomarker for disease activity in lupus nephritis. *Rheumatology*. 49(5):960-71.
- Satirapoj B, Kitiyakara C, Leelahavanichkul A, Avihingsanon Y, Supasynhdh O. (2017). Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin to predict renal response after induction therapy in active lupus nephritis. *BMC nephrology*. 18(1):1-8.
- Szeto CC. (2017). Urinary mRNA and lupus disease flare. *Nephrology*. 22:27-30.
- Szeto C-C, Tam L-S, Kwan BC-H, Lai K-B, Wang G, Li EK-M, et al. (2012). Monitoring of urinary messenger RNA levels for the prediction of flare in systemic lupus erythematosus. *Clinica Chimica Acta*. 413(3-4):448-55.
- Trajceska L, Severova-Andreevska G, Dzekova-Vidimliski P, Nikolov I, Selim G, Spasovski G, et al. (2019). Complications and risks of percutaneous renal biopsy. *Open access Macedonian journal of medical sciences*. 7(6): 992.
- Wang G, Lai FM-M, Tam L-S, Li EK-M, Kwan BC-H, Chow K-M, et al. (2009). Urinary FOXP3 mRNA in patients with lupus nephritis—relation with disease activity and treatment response. *Rheumatology*. 48(7):755-60.
- Wilhelmus S, Bajema IM, Bertsias GK, Boumpas DT, Gordon C, Lightstone L, et al. (2016). Lupus nephritis management guidelines compared. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 31(6):904-13.
- Xiao J, Chodosh J. JNK regulates MCP-1 expression in adenovirus type 19–infected human corneal fibroblasts. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2005;46(10):3777-82.