



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “บทบาทของความหลากหลายของยีนในการควบคุม
การแสดงออกของ SEROTONIN TRANSPORTER”

โดย ผศ.ดร.เทวิน เทนคำเนาวัล และคณะ

มกราคม พ.ศ. 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “บทบาทของความหลากหลายของยีนในการควบคุม การแสดงออกของ SEROTONIN TRANSPORTER”

คณะผู้วิจัย

- | | |
|-------------------------------|-------------------|
| 1. ผศ. ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ* | หัวหน้าโครงการ |
| 2. นางสาวอัษฎลี ประสารสุขลาภ* | ผู้ร่วมวิจัย |
| 3. ศ. นพ. ยง ภู่วรวรรณ** | นักวิจัยที่ปรึกษา |

สังกัด

*โครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้านโอมิกส์-นาโน เมดิคัลเทคโนโลยี

ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสตับอักเสบ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รหัสโครงการ : MRG4780018

ชื่อโครงการ : บทบาทของความหลากหลายของยีนในการควบคุมการแสดงออกของ SEROTONIN TRANSPORTER

ชื่อนักวิจัย : เทวิน เทนคำเนาว์ และคณะ, โครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้านโอมิกส์-นาโน เมดิคัลเทคโนโลยี ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Email Address: tewin.t@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

ซีโรโทนิน (5-HT) จัดเป็นสารสื่อประสาทที่มีบทบาทในหลายระบบของร่างกาย โดยฤทธิ์ของซีโรโทนินนั้นถูกควบคุมให้สมดุลผ่านการทำหน้าที่ของตัวดูดกลับซีโรโทนิน (5-HTT, SERT) ซึ่งเป็นเป้าหมายหลักของยารักษาโรคทางจิตประสาทด้วย ความหลากหลายในส่วน promoter ของยีน SERT หรือที่เรียกว่า 5-HTTLPR มีรายงานว่าสัมพันธ์กับหลายโรค มีการศึกษาบทบาทของ 5-HTTLPR นี้ต่อการแสดงออกของยีน SERT ในเซลล์รก เม็ดเลือดขาว และเซลล์ประสาท แต่ยังไม่มีการศึกษาบทบาทของ 5-HTTLPR ในเซลล์จากระบบทางเดินอาหาร ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาอิทธิพลของ 5-HTTLPR ต่อการถอดรหัสของยีน SERT ในเซลล์ SW480 ซึ่งเป็นเซลล์ลำไส้มนุษย์ที่มีการแสดงออกของ SERT ด้วยเทคนิค functional reporter gene assays นอกจากนั้นยังศึกษาถึงผลของสเตียรอยด์ฮอร์โมนได้แก่ กลูโคคอร์ติคอยด์และเอสโตรเจน ต่อการแสดงออกของยีนนี้ผ่านทาง 5-HTTLPR ด้วย ผลการศึกษาพบว่า ฮอร์โมนเอนโดจากอวัยวะเพศชายที่ใช้ในการศึกษานี้ มีความแตกต่างของ 5-HTTLPR อยู่ 42 คู่เบส โดยความหลากหลายชนิด S อัลลีลส่งผลให้มี promoter activity น้อยกว่า L อัลลีลประมาณสองเท่าในเซลล์ SW480 ซึ่งเป็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยสะท้อนให้เห็นถึงการแสดงออกของยีนที่ลดลง อย่างไรก็ตาม ไม่พบว่าสเตียรอยด์ทั้งสองประเภทมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน SERT การศึกษานี้เป็นครั้งแรกที่มีการรายงานถึงลำดับเบสของ 5-HTTLPR ในคนไทย รวมถึงบทบาทของ 5-HTTLPR ในเซลล์ระบบทางเดินอาหาร แม้ว่าไม่พบบทบาทของสเตียรอยด์ต่อ SERT ในการศึกษานี้ก็ตาม คณะผู้วิจัยเห็นว่าควรมีการศึกษาให้มากขึ้นถึงปฏิสัมพันธ์และกลไกที่เป็นไปได้ใน serotonergic system โดยเฉพาะระหว่างเอสโตรเจนและซีโรโทนิน

คำหลัก : ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน, ตัวดูดกลับซีโรโทนิน, เซลล์มะเร็งลำไส้มนุษย์, การแสดงออกของยีน

Project Code : MRG4780018

Project Title : Role of genetic polymorphism in regulating the expression of serotonin transporter

Investigators : Tewin Tencomnao *et al.*, Center for Excellence in Omics-Nano Medical Technology Project, Department of Clinical Chemistry, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University

Email Address : tewin.t@chula.ac.th

Project Period : 2 years

Serotonin (5-HT) is a monoamine neurotransmitter and plays important roles in several human body's systems. The serotonin transporter (5-HTT or SERT) which reuptakes serotonin, plays a critical role in the regulation of serotonergic function and is the target of widely used psychoactive drugs. The allelic variation of SERT expression is caused by functional gene-promoter polymorphism with two predominant variant alleles, known as 5-HTTLPR. It has been demonstrated that 5-HTTLPR is associated with numerous disorders. The functional roles of 5-HTTLPR have been reported in JAR, lymphoblast and raphe cells. At present, there is no profound information regarding the significance of 5-HTTLPR in cells originated from the gastrointestinal tracts. Therefore, the impact of 5-HTTLPR on SERT transcription was studied in SW480 cell line, which was shown to express SERT, using functional reporter gene assays. In addition, the effect of steroid hormones, estrogen and glucocorticoid, was investigated to see whether they regulated SERT expression via 5-HTTLPR. We found 42-bp fragment in L allele as compared to S allele of Thai subjects in this study, and this difference in DNA fragment resulted in 2-fold higher transcriptional efficiency of L allele ($P < 0.05$). However, the transcriptional effect of both steroids was not found. This study was the first to demonstrate the DNA sequence of 5-HTTLPR in Thai subjects as well as the molecular role of this allelic variation in gastrointestinal tract cells. Further investigations on estrogen-serotonin interaction and their involved molecular mechanisms in serotonergic system should be carried out.

Keywords : genetic polymorphism, serotonin transporter, human colon adenocarcinoma cell line, gene expression

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
สารบัญ	iii
รายการตารางประกอบ	iv
รายการภาพประกอบ	v
บทสรุปผู้บริหาร	vi
บทนำ	1
วิธีวิจัย	4
การวิเคราะห์ทางสถิติ	11
ผลการวิจัย	12
สรุปและอภิปรายผล	19
ข้อเสนอแนะ	23
เอกสารอ้างอิง	25
Output ที่ได้จากโครงการ	29

รายการตารางประกอบ

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดง primers จำเพาะที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ	9
ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ	14

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงลำดับขั้นตอนการวิจัย	ix
รูปที่ 2 แสดงลักษณะของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอสำหรับโคลน	6
รูปที่ 3 แสดงลักษณะของ promoterless luciferase expression vector pGL3	7
รูปที่ 4 แสดงลักษณะของ Co-transfected pRL-CMV vector	10
รูปที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ที่มีลักษณะของจีโนไทป์ประเภท S/S และ L/L บนเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	12
รูปที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ที่มีลักษณะของจีโนไทป์ประเภท S/XL และ L/XL บนเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	12
รูปที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี Jotan Hein Method ในโปรแกรม MegAlign	13
รูปที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ Transcription Factor ด้วยโปรแกรม Promo program	14
รูปที่ 9 แสดงแผนภาพของยีน SERT ในส่วน promoter และลักษณะของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ	15
รูปที่ 10 แสดง promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR ในเซลล์ SW480	16
รูปที่ 11 แสดง promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR ในเซลล์ HT-29	17
รูปที่ 12 แสดงผลของ Dexamethasone และ β -Estradiol ต่อ promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR ในเซลล์ SW480	18
รูปที่ 13 แสดงแผนภาพกลไกที่เป็นไปได้ (proposed mechanism)	22

บทสรุปผู้บริหาร

ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) บทบาทของความหลากหลายของยีนในการควบคุมการแสดงออกของ
SEROTONIN TRANSPORTER

(ภาษาอังกฤษ) ROLE OF GENETIC POLYMORPHISM IN REGULATING THE EXPRESSION
OF SEROTONIN TRANSPORTER

คณะนักวิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ (Asst. Prof. Dr. Tewin Tencomnao) (หัวหน้าโครงการ)
โครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้านโอมิกส์-นาโน เมดิคัลเทคโนโลยี ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ห้อง 313 อาคารจุฬาพัฒน์ 1 เลขที่ 154 ถ. พระราม 1 ปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
โทรศัพท์ 02-218-1081 (ต่อ 313), โทรสาร 02-218-1082
การศึกษา ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาเอก Ph.D. (Biochemistry and Molecular Biophysics), Virginia
Commonwealth University ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. ศาสตราจารย์ นพ. ยง ภู่วรวรรณ (Prof. Dr. Yong Poovorawan) (นักวิจัยที่ปรึกษา)
ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสตับอักเสบ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
โทรศัพท์ 02-2564909, โทรสาร 02-2564929
การศึกษา ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์การแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
แพทยศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วุฒิบัตรแสดงความรู้หรือความชำนาญ การประกอบวิชาชีพเวชกรรม สาขากุมารเวช
ศาสตร์ แพทยสภาแห่งประเทศไทย
3. นางสาวอัญชลี ประสารสุขลาภ (Miss Anchalee Prasansuklab) (ผู้ร่วมวิจัย)
นิสิตปริญญาโท สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
การศึกษา ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชาที่ทำการวิจัย

วิทยาศาสตร์การแพทย์ เน้นอณูชีววิทยา

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันนี้ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน (genetic polymorphisms) นั้นได้รับความสนใจแพร่หลายในวงการวิทยาศาสตร์การแพทย์ เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้เป็นการแปรผันในระดับของยีนซึ่งอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีนด้วย และการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนไปนั้น เป็นปัจจัยสำคัญที่มักส่งผลกระทบต่อโรคต่างๆ ได้ ดังนั้น การศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของมนุษย์ สามารถที่จะนำมาใช้ศึกษาเกี่ยวกับโรคทั้งโรคทางร่างกายและโรคทางจิตใจ รวมถึงมีบทบาทสำคัญในการทำนายความเสี่ยงของการเกิดโรค (prognosis) การป้องกันโรค (prevention) การตรวจวินิจฉัยโรค (diagnosis) และการรักษาโรคด้วย ยกตัวอย่างเช่น การนำข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมมาใช้ในงานทางด้านเภสัชพันธุศาสตร์ (pharmacogenomics) เพื่อค้นหายารักษาใหม่ หรือนำมาใช้ในการตรวจประเมินประสิทธิภาพ รวมทั้งผลข้างเคียงของยาเฉพาะบุคคลก่อนการให้ยาจริง

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) เป็นสารสื่อประสาทชนิด monoamine neurotransmitter ที่สร้างมาจากเซลล์ประสาทในระบบประสาทส่วนกลาง และจากเซลล์ enterochromaffin ในระบบทางเดินอาหารเป็นหลัก พบว่า serotonin นั้นมีบทบาทหน้าที่สำคัญในหลายๆ ระบบของร่างกาย ได้แก่ ระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบทางเดินหายใจ ระบบภูมิคุ้มกัน ระบบลำไส้และทางเดินอาหาร รวมถึงระบบประสาทด้วย สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของ serotonin นั้นจะผ่านทาง serotonergic pathway ซึ่งถือเป็นกลไกที่มีความสำคัญต่อระบบประสาทอย่างมาก เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมอารมณ์ จิตใจ และพฤติกรรมต่างๆ เช่น การนอนหลับ ความวิตกกังวล ความเครียด เป็นต้น โดยการออกฤทธิ์ของ serotonin จะขึ้นกับปริมาณของ serotonin ที่อยู่ใน synapse ซึ่งปริมาณนั้นก็ขึ้นอยู่กับการดูดกลับ (reuptake) ของ serotonin ที่ถูกควบคุมโดยการทำหน้าที่ของ serotonin transporter (5-HTT, SERT) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณ promoter ของยีนที่สร้าง SERT หรือที่เรียกว่า 5-HTT gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) นั้น สามารถนำไปสู่การแสดงออกของยีน SERT ที่แตกต่างกันได้ (Heils และคณะ, 1996, 1997) ในเซลล์รก (human placental choriocarcinoma cell line, JAR) (Heils และคณะ, 1996) เซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphoblast cell line) (Lesch และคณะ, 1996) และเซลล์ประสาทของหนู (immortalized serotonergic raphe neurons, RN46A) (Mortensen และคณะ, 1996) นอกจากนี้เมื่อเร็วๆ นี้ ยังมีรายงานการศึกษาที่น่าสนใจซึ่งพบว่าฮอร์โมนบางประเภท มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนที่สร้าง SERT ด้วย เช่น glucocorticoid สามารถเพิ่มการแสดงออกของ 5-HTT ได้ โดยมีกลไกควบคุมที่ 5-HTTLPR (Glatz และคณะ, 2003) รวมถึงพบการลดลงของระดับ SERT mRNA ในลิงภายหลังจากที่ได้รับ estrogen (Bethea และคณะ, 2000) ด้วย เป็นต้น แต่ทั้งนี้จากงานวิจัยที่ผ่านมา ยังไม่ได้ศึกษาว่าความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR นั้น มีความเกี่ยวข้องด้วยหรือไม่ อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยจึงประสงค์จะศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR และฮอร์โมนในกลุ่ม steroids เช่น estrogen ที่มีต่อการแสดงออกของ serotonin transporter (SERT) รวมถึงการศึกษความสัมพันธ์กับ glucocorticoid ในเซลล์ชนิดอื่นนอกเหนือจากที่ได้มีการศึกษามาแล้วด้วย เนื่องจากฮอร์โมนเหล่านี้มักมี

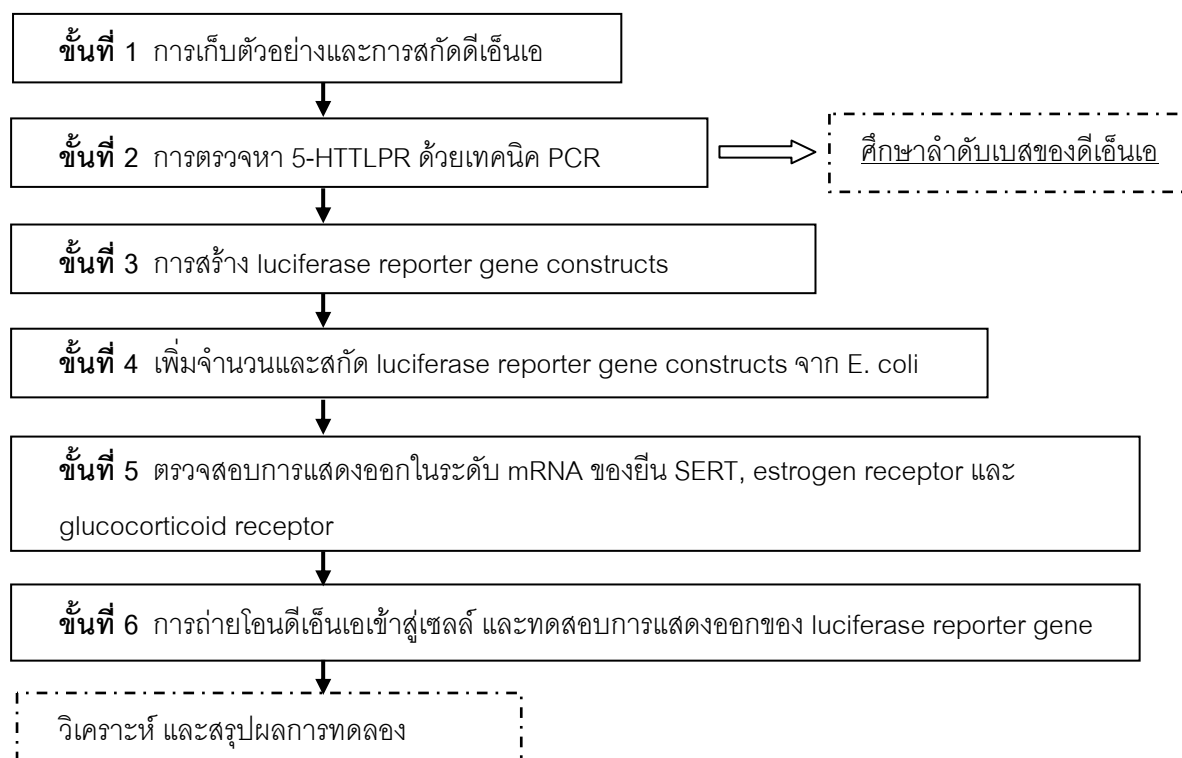
ความจำเพาะต่อชนิดของเซลล์ โดยจะใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture model) ที่ซึ่งต้องมีการทดสอบเพื่อยืนยันก่อนว่า เซลล์ชนิดใดเหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวแทนของเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน SERT (positive) และเซลล์ชนิดใดเหมาะสมจะเป็นตัวแทนของเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน SERT (negative)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน SERT, estrogen receptor และ glucocorticoid receptor ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ เพื่อหาตัวแทนเซลล์ ที่เหมาะสมมาใช้ในการวิจัยต่อไป
2. เพื่อศึกษาบทบาทของความหลากหลายของยีนที่เกิดจากความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR ต่อการควบคุมการแสดงออกของ SERT ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสม
3. เพื่อศึกษาถึงบทบาทของฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์ เช่น estrogen และ glucocorticoid ต่อความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR ในการควบคุมการแสดงออกของ serotonin transporter โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสม

ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษาวิจัยเรื่องบทบาทของความหลากหลายของยีนในการควบคุมการแสดงออกของ SERT นั้น สามารถแบ่งการวิจัยออกได้เป็น 6 ขั้นตอนหลัก ดังแผนภูมิในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงลำดับขั้นตอนการวิจัย

ประโยชน์ที่ได้รับ

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยพบองค์ความรู้ใหม่ที่แสดงว่าความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR นั้น มีบทบาทในเซลล์จากระบบทางเดินอาหาร เช่นเดียวกันกับในเซลล์รก เซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ประสาท รวมถึงการพบการกระจายของอัลลีล XL ในกลุ่มประชากรไทย ซึ่งจะทำให้สามารถเข้าใจถึงบทบาทของความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR มากยิ่งขึ้น และยังเป็นงานวิจัยพื้นฐานเพื่อต่อยอดงานวิจัยในระดับที่สูงขึ้นในอนาคต เพื่อให้สามารถประยุกต์ใช้ข้อมูล ในการให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์แก่ประชาชนที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ได้ตระหนักและปฏิบัติตนให้เหมาะสมเพื่อนำไปสู่การมีสุขภาพดี โดยสามารถใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่มีคุณสมบัติเหมาะสมจากงานวิจัยครั้งนี้มาใช้ในการศึกษาต่อไปได้

ถึงแม้ว่าผลการศึกษาฮอร์โมน glucocorticoid และ estrogen นั้น จะไม่พบว่ามียีนมีบทบาทต่อการแสดงออกของยีน SERT ไม่ว่าจะเป็นความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR อัลลีลใดก็ตาม แต่การศึกษากลไกในระดับโมเลกุลของปฏิสัมพันธ์ระหว่าง estrogen กับ serotonin ยังคงไม่ทราบแน่ชัดและน่าสนใจที่จะศึกษาต่อถึงกลไกที่แท้จริง เพื่อให้สามารถเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่าง estrogen กับ serotonin ถึงกลไกในระดับโมเลกุล และเป็นแนวทางในการผลิตคิดค้นยาหรือวิธีการรักษาใหม่ๆ เพื่อให้สามารถรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยลดความเสี่ยงที่จะเกิดผลข้างเคียงลง เช่น การพัฒนาการรักษาโรคที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับ SERT โดยการใช้ฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์ เป็นต้น อีกทั้งยังช่วยในการป้องกันรวมถึงการเลือกใช้วิธีการรักษาด้วยฮอร์โมน estrogen ได้อย่างถูกต้องและเหมาะสมกับแต่ละบุคคลด้วย

งบประมาณ

งบประมาณที่ใช้แล้วทั้งหมดเท่ากับ 421,857.48 บาท (สี่แสนสองหมื่นหนึ่งพันแปดร้อยห้าสิบบาทถ้วน) ทั้งนี้ ยังไม่รวมค่าตอบแทนงวดสุดท้ายจำนวนหกหมื่นบาทถ้วน

บทนำ

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) เป็นสารสื่อประสาท (monoamine neurotransmitter) ที่สร้างมาจากเซลล์ประสาทในระบบประสาทส่วนกลาง และจากเซลล์ enterochromaffin ในระบบทางเดินอาหารเป็นหลัก พบว่า serotonin นั้นมีบทบาทหน้าที่สำคัญในหลายๆ ระบบของร่างกาย ได้แก่ ระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบทางเดินหายใจ ระบบภูมิคุ้มกัน ระบบลำไส้และทางเดินอาหาร รวมถึงระบบประสาทด้วย สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของ serotonin นั้นจะผ่านทาง serotonergic pathway ซึ่งถือเป็นกลไกที่มีความสำคัญต่อระบบประสาทอย่างมาก เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมอารมณ์ จิตใจ และพฤติกรรมต่างๆ เช่น การนอนหลับ ความวิตกกังวล ความเครียด เป็นต้น โดยการออกฤทธิ์ของ serotonin จะขึ้นกับปริมาณของ serotonin ที่อยู่ใน synapse ซึ่งปริมาณนั้นก็ขึ้นอยู่กับการดูดกลับ (reuptake) ของ serotonin ที่ถูกควบคุมโดยการทำหน้าที่ของ serotonin transporter (5-HTT, SERT) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะพบอยู่ในส่วนของลำไส้และสมอง แต่ก็มีรายงานพบว่าการแสดงออกของ SERT ที่เซลล์หรืออวัยวะอื่นๆ ในร่างกายด้วย ได้แก่ เซลล์รัก เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์เนื้อเยื่อกระดูก เซลล์ในระบบหัวใจและหลอดเลือด และเกล็ดเลือด

SERT ในมนุษย์ถูกสร้างมาจากยีน human serotonin transporter (hSERT) หรือที่เรียกว่า SLC6A4 (Solute Carrier Family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4) ซึ่งเป็นสัญลักษณ์ของยีนที่เป็นที่ยอมรับกันทั่วไป ยีน hSERT นั้นตั้งอยู่บนตำแหน่ง SLC6A4 locus โดยถูกบันทึกลงบนโครโมโซมคู่ที่ 17 (17q11.1 – 17q12) ซึ่งยีนนี้มีความยาวทั้งหมดประมาณ 37.8 kb ประกอบด้วย 14 exons (Murphy และคณะ, 2004) สามารถถอดรหัส และแปลรหัสเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วย 630 กรดอะมิโน มีการศึกษาโดยการโคลนยีน SERT ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ได้แก่ hSERT (Ramamoorthy และคณะ, 1993; Mortensen และคณะ, 1999) rat SERT (rSERT) (Blakely และคณะ, 1991; Hoffman และคณะ, 1991) และ mouse SERT (mSERT) (Chang และคณะ, 1996) และพบว่า ยีน SERT นี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก ทั้งที่เกิดขึ้นในส่วนของยีน ไม่ว่าจะเป็น exon (coding region) หรือ intron หรือแม้กระทั่งในส่วนของ noncoding region ที่เป็น 5' และ 3' untranslated region (UTR) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของ regulatory motif (promoter) ที่อาจควบคุมการแสดงออกของยีน (transcriptional activity) พบว่า ความหลากหลายของยีนในส่วนของ promoter นี้ มีลักษณะเป็นท่อนดีเอ็นเอลำดับเบสซ้ำ (repetitive elements) ที่อยู่ทาง 5' flanking region ห่างจากจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส (transcription start site) เหนือขึ้นไปประมาณ 1.4 กิโลเบส ในส่วนดังกล่าวนี้ ถือเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่เกิดจากการ Insertion และ Deletion ที่มีจำนวนชุดของการซ้ำ (repeat elements) แตกต่างกัน และเรียกความหลากหลายชนิดนี้ว่า 5-HTT gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) ซึ่งเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่พบ และมีการศึกษากันมากที่สุด ในกรณีของยีน SERT

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR นั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แบบ (Murphy และคณะ, 2004) ได้แก่

1. “Short” หรือ “S” อัลลีล จะมีการซ้ำกัน 14 ชุด (repeat elements)
2. “Long” หรือ “L” อัลลีล จะมีการซ้ำกัน 16 ชุด (repeat elements)
3. “Superlong” หรือ “XL” อัลลีล จะมีการซ้ำกัน 18-20 ชุด (repeat elements)

โดยในแต่ละชุด (repeat elements) นั้นจะมีประมาณ 20-23 bp และก่อให้เกิดความยาวที่แตกต่างกันระหว่าง S และ L อัลลีลประมาณ 44 bp จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR นั้น สามารถนำไปสู่การแสดงออกของยีน SERT ที่แตกต่างกันได้ (Heils และคณะ, 1996, 1997) เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมชนิดนี้ พบอยู่ในส่วนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน โดยเฉพาะ promoter ซึ่งอาจมีผลต่อปริมาณของโปรตีนที่สร้างได้แตกต่างกัน โดยที่ “Short” หรือ “S” อัลลีลจะทำให้การแสดงออกของยีน (transcriptional activity) ลดลง ในขณะที่ “Long” หรือ “L” อัลลีลจะทำให้การแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นในเซลล์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เซลล์รก (human placental chorio-carcinoma cell line, JAR) (Heils และคณะ, 1996) เซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphoblast cell line) (Lesch และคณะ, 1996) และเซลล์ประสาทของหนู (immortalized serotonergic raphe neurons, RN46A) (Mortensen และคณะ, 1996) นอกจากนี้ยังพบว่าการกระจายของจีโนไทป์กับความถี่อัลลีลของ 5-HTTLPR ในประชากรทั่วไปนั้นจะมีการกระจายที่ต่างกันไปในแต่ละเชื้อชาติด้วย โดยจะพบ S อัลลีลได้มากในเชื้อชาติเอเชีย (Asian) ตรงข้ามกับในกลุ่มคนผิวขาวในประเทศแถบยุโรปรวมถึงอเมริกา (Caucasian) ซึ่งจะพบ L อัลลีลได้มากกว่า และยังอาจพบ XL อัลลีลได้เฉพาะในบางกลุ่ม เช่น ในกลุ่มประเทศแอฟริกา ประเทศญี่ปุ่น รวมถึงเชื้อชาติไทยด้วย ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมของ 5-HTTLPR ที่มีความแตกต่างกันไปในแต่ละเชื้อชาติเหล่านี้ อาจสามารถส่งผลให้เกิดความหลากหลายของอาการทางคลินิกของโรคหรือความผิดปกติต่างๆ รวมถึงความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่ต่างกันในแต่ละเชื้อชาตินั้นๆ ได้ จนถึงปัจจุบันนี้มีการศึกษามากมายที่รายงานว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR นั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคทางประสาทและโรคจิต (neuropsychiatric diseases) เช่น โรคเครียด (stress) โรคซึมเศร้า (depression) (Mossner และคณะ 2000, 2001; Gonda และคณะ, 2005; Cervilla และคณะ 2006) โรควิตกกังวล (anxiety) (You และคณะ, 2005) โรคจิตเภท (schizophrenia) (Dubertret และคณะ, 2005) โรคย้ำคิดย้ำทำ (obsessive-compulsive disorder) (Di Bella และคณะ, 2002) และการฆ่าตัวตาย (suicide) (Gaysina และคณะ, 2006) เป็นต้น

นอกจากนั้น เมื่อเร็วๆ นี้ ยังมีรายงานการศึกษาที่น่าสนใจซึ่งพบว่าฮอร์โมนบางตัวนั้น มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนที่สร้าง SERT ด้วย เช่น glucocorticoid สามารถเพิ่มการแสดงออกของ SERT ในเซลล์รก (human placental chorio-carcinoma cell, JAR) ได้ โดยมีกลไกการควบคุมที่บริเวณความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR (Glatz และคณะ, 2003) รวมถึงพบ

การลดลงของระดับ SERT mRNA ภายหลังจากที่ได้รับ estrogen โดยมีรายงานว่าในกลุ่มลิง (rhesus macaques) ที่ได้รับฮอร์โมน estrogen จะมีการเปลี่ยนแปลงของระดับ SERT mRNA โดยจะลดลงเท่ากับ 32 % ของกลุ่มควบคุม (Pecins-Thompson และคณะ, 1998) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Bethea และคณะที่พบว่าการลดลงของระดับ SERT mRNA อย่างมีนัยสำคัญในลิงภายหลังจากที่ได้รับฮอร์โมน estrogen แล้ว (Bethea และคณะ, 2000) แต่ทั้งนี้จากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่ได้ศึกษาว่าความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR นั้น มีความเกี่ยวข้องด้วยหรือไม่ อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยจึงประสงค์จะศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR และฮอร์โมนในกลุ่ม steroids เช่น estrogen ที่มีต่อการแสดงออกของ SERT รวมถึงการศึกษความสัมพันธ์กับ glucocorticoid ในเซลล์ชนิดอื่นนอกเหนือจากที่ได้มีการศึกษามาแล้วด้วย เนื่องจากฮอร์โมนเหล่านี้มักมีความจำเพาะต่อชนิดของเซลล์ โดยจะใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture model) ที่ซึ่งต้องมีการทดสอบเพื่อยืนยันก่อนว่า เซลล์ชนิดใดเหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวแทนของเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน SERT (positive) และเซลล์ชนิดใดเหมาะสมจะเป็นตัวแทนของเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน SERT (negative)

วิธีวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ผู้บริจาคโลหิตจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย และอาสาสมัครนิสิตจากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นประชากรไทยที่มีสุขภาพดี โดยที่อาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยในครั้งนี้ จะต้องกรอกรายละเอียดลงในแบบฟอร์มใบยินยอมด้วยความสมัครใจให้ทำการวิจัยในมนุษย์ จากนั้นจึงทำการเจาะเก็บโลหิตจำนวนประมาณ 10 ml เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอตามกระบวนการทำต่อไป

ขั้นที่ 1 การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ

วัตถุประสงค์

เพื่อนำสิ่งตัวอย่างมาทำการสกัดดีเอ็นเอ

วิธีการวิจัย

เก็บตัวอย่างจากเลือดของผู้บริจาคโลหิต จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย และอาสาสมัครนิสิตจากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นนำตัวอย่างเลือดที่ทำการเก็บจากอาสาสมัคร มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา FlexiGene DNA Kit (QIAGEN) โดยใช้หลักการ alkaline lysis ในการสกัด โดยใช้เลือดครบส่วน (whole blood) ปริมาตร 100 μ l และทำตามขั้นตอนที่บริษัทแนะนำ ดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

ขั้นที่ 2 การตรวจหา 5-HTTLPR ด้วยเทคนิค PCR และศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing)

วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีลักษณะของ 5-HTTLPR แตกต่างกัน ทั้งอัลลีลยาว (L) และอัลลีลสั้น (S) มาใช้ในการศึกษา รวมทั้งศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) ที่แตกต่างกันในส่วนที่มีความหลากหลายของยีน

วิธีการวิจัย

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ (ในขั้นที่ 1) มาตรวจหาความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยใช้ primers ที่จำเพาะ (Glatz และคณะ, 2003) ได้แก่

Forward primer (5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATTGC-3')

Reverse primer (5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC-3')

ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิค Touchdown PCR สำหรับการตรวจหา 5-HTTLPR เพื่อตรวจสอบจีโนไทป์ได้อย่างมีความจำเพาะ และได้ผลดีกว่าการใช้ Conventional PCR ตามปกติ ด้วยชุดน้ำยา MasterTaq[®] Kit (Eppendorf) แล้วจึงตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม จากขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นเป็น 3 % (3 % agarose gel electrophoresis) จากนั้นย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อม แล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล หากแถบของดีเอ็นเอบนเจลมีขนาดประมาณ 484 bp จะเป็น 5-HTTLPR ชนิด S อัลลีล และขนาดประมาณ 528 bp จะเป็น 5-HTTLPR ชนิด L อัลลีล เมื่อทราบชนิดอัลลีลของ 5-HTTLPR แล้ว จึงทำการเลือกตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีชนิด S อัลลีลและชนิด L อัลลีลมาอย่างละ 1 ราย เพื่อทำการศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของทั้งสองอัลลีลประมาณ 44 bp โดยเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ขนาดประมาณ 484 bp ของชนิด S อัลลีล และขนาดประมาณ 528 bp ของชนิด L อัลลีล นำไปตกตะกอน (precipitation) เพื่อให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์และเข้มข้นมากขึ้น แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 60 ng ในน้ำกลั่น ปริมาตร 15 µl จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมได้ทั้งสองอัลลีลนี้ ไปหาลำดับเบส ณ ห้องปฏิบัติการของ ศ.นพ.ยง ภูววรรณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสตับอักเสบบี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้ชุดน้ำยา ABI Sequencing kit (ABI, Fostercity, CA) ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyser (ABI, Fostercity, CA) และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้นั้นกับลำดับเบสใน GenBank accession No. AF117826 และ No. X76753 ตามลำดับ

ขั้นที่ 3 การสร้าง luciferase reporter gene constructs

วัตถุประสงค์

เพื่อโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีลักษณะของ 5-HTTLPR แตกต่างกัน ทั้งอัลลีลยาว (L) และอัลลีลสั้น (S) เพื่อนำมาใช้ในการศึกษา

วิธีการวิจัย

การเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (Insert DNA) สำหรับใช้ในการโคลนนั้น เนื่องจากชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการให้มีปริมาณเบส G และเบส C เป็นจำนวนมาก (GC-rich) ทำให้การเตรียมโดยใช้ Conventional PCR ตามปกติค่อนข้างจะมีความลำบาก คณะผู้วิจัยจึงได้ปรับปรุงเทคนิคขึ้นมาโดยใช้ชุดน้ำยา TaqPCR[®] DNA polymerase (Invitrogen) เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว และใช้ primers ที่จำเพาะ ดังต่อไปนี้

- สำหรับการเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีลักษณะของ 5-HTTLPR แตกต่างกัน ทั้ง S และ L อัลลีล

Forward primer (5'-CAA AGG TAC CGT TGC CGC TCT GAA TGC CAG-3')

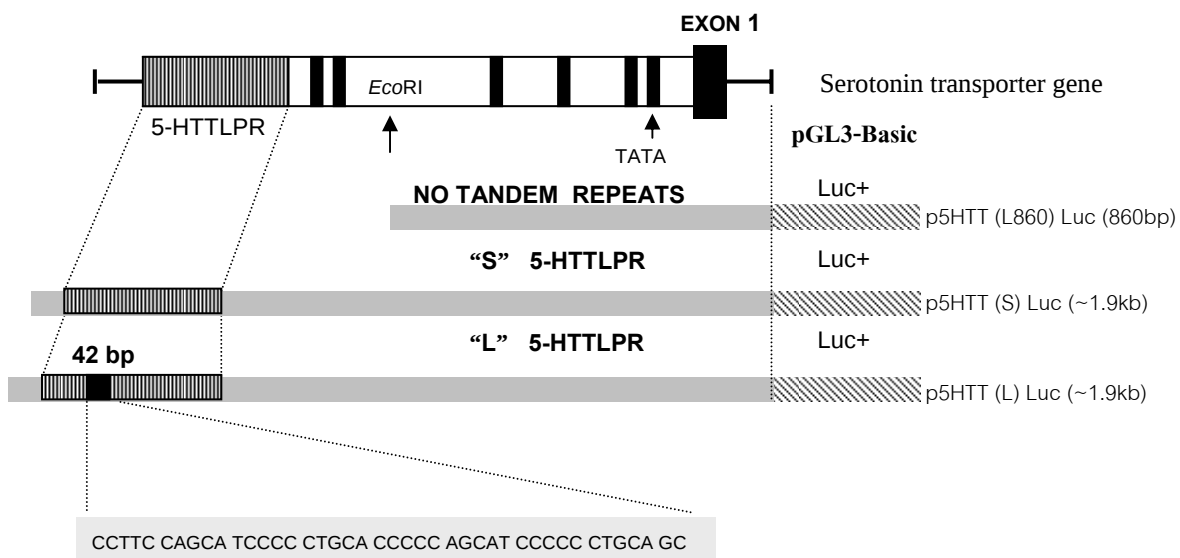
Reverse primer (5'-CCG AAG CTT GAA ACG TGG GTT CGA GGC GGA GAG-3')

- สำหรับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ขาดลักษณะของ 5-HTTLPR

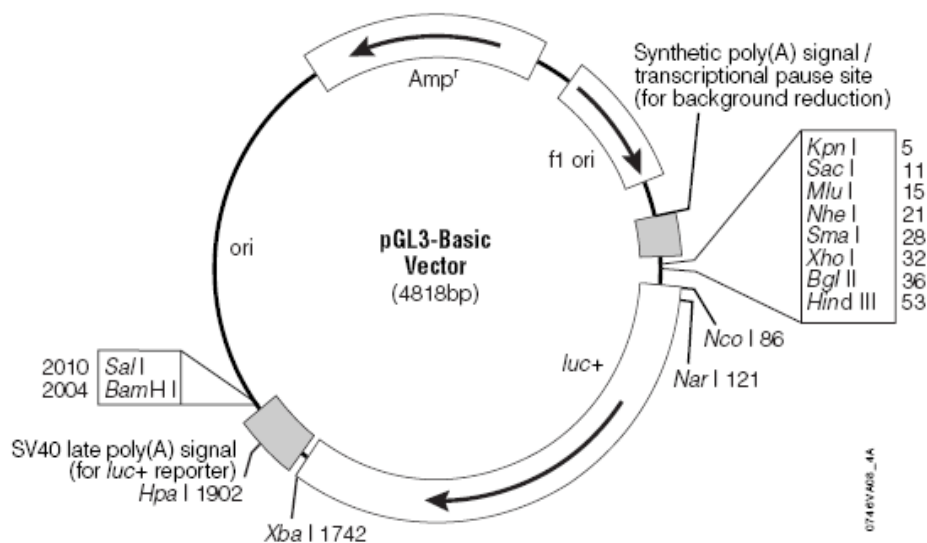
Forward primer (5'-CAA GGT ACC GAA TTC CTG GGC TCA AGC AAT CCT-3')

Reverse primer (5'-CCG AAG CTT GAA ACG TGG GTT CGA GGC GGA GAG-3')

PCR Products ที่ได้นั้น เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอซึ่งเป็นส่วนของ promoter ดังแสดงในรูปที่ 2 จากนั้นทำการโคลนชิ้นส่วนของ promoter ขนาดประมาณ 1.9 kb ซึ่งจะเป็นส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายชนิด S และ L อัลลีล ของ 5-HTTLPR และขนาด 860 bp ซึ่งจะเป็นส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่ขาดลักษณะของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR Plasmid Vector ที่ใช้ในกรณีนี้ ขาดส่วนของ promoter (promoterless luciferase expression vector, pGL3-Basic) (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr. Robert K. Yu, Institute of Molecular Medicine and Genetics, Medical College of Georgia, Georgia's Health Science University, USA) pGL3-Basic เป็นพลาสมิดที่นิยมใช้สำหรับ reporter gene assay (Tencomnao และคณะ, 2001, 2004; Glatz และคณะ, 2003) ลักษณะของพลาสมิดแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 2 แสดงลักษณะของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอสำหรับโคลน โดยส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายชนิด S และ L อัลลีล ของ 5-HTTLPR จะมีขนาดประมาณ 1.9 kb และส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่ขาดลักษณะของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (*EcoRI* deletional mutant) จะมีขนาด 860 bp (L860)



รูปที่ 3 แสดงลักษณะของ promoterless luciferase expression vector, pGL3-Basic (<http://www.promega.com/figures/popup.asp?fn=0746va&partno=E1751&product=pGL3%2DBasic+Vector>)

ขั้นที่ 4 เพิ่มจำนวนและสกัด luciferase reporter gene constructs

วัตถุประสงค์

เพื่อเพิ่มจำนวนของ luciferase reporter gene constructs ให้มีปริมาณมากเพียงพอ แล้วจึงค่อยทำการสกัดออกมาให้บริสุทธิ์ เพื่อที่จะใช้ในการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ที่เหมาะสมในขั้นตอนต่อไป

วิธีการวิจัย

นำ luciferase reporter gene constructs ที่สร้างได้ทั้ง 3 ชนิด จากขั้นที่ 3 มาเพิ่มจำนวนโดยการถ่ายโอน (transformation) plasmid constructs นี้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย แล้วทำการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับ plasmid ที่ต้องการด้วยเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (endonuclease restriction mapping) หลังจากคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับ plasmid ต้องการแล้ว ขั้นตอนต่อไปต้องทำการเพิ่มจำนวน plasmid เหล่านี้ ให้มีปริมาณและความบริสุทธิ์สูงมากเพียงพอที่จะทำการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ โดยใช้ชุดสกัด PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kits (Invitrogen) เป็นการสกัดจากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมากเรียกว่า Maxiprep หลักการเริ่มต้นจะใช้ alkaline lysis เพื่อทำให้เซลล์แตกก่อน จากนั้น plasmid constructs ที่อยู่ใน lysate จะจับกับ QIAGEN Anion-Exchange Resin ของ column โดยที่ genomic DNA, RNA, dye, เศษเซลล์และพวก low-molecular weight ต่างๆ จะถูกกำจัดออกไปเพื่อให้ได้แต่ plasmid constructs บริสุทธิ์เท่านั้น

ขั้นที่ 5 ตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน SERT, estrogen receptor และ glucocorticoid receptor

วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบความเหมาะสมในการใช้ cell culture model ที่จะคัดเลือกชนิดของเซลล์ที่จะนำมาใช้เป็นตัวแทนของเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน SERT กับอีกชนิดที่จะใช้เป็นตัวแทนของเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน SERT gene สำหรับการแสดงออกของ receptors สำหรับ steroids และ growth factors ต่างๆ นั้น จำเป็นที่จะต้องทดสอบดูด้วยเช่นกัน เพราะจะมีผลต่อการตอบสนองของภายหลังที่เติม steroids และ growth factors ดังกล่าว ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์

วิธีการวิจัย

1. เริ่มต้นเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการสกัดใน cell culture dish (ขนาด 100 mm X 20 mm) แล้วทำการสกัด total RNA จาก cell lines โดยจะใช้ชุดน้ำยา TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen) ซึ่งขั้นตอนในการสกัดนั้น จะยึดตาม procedure ที่บริษัทแนะนำ เซลล์เพาะเลี้ยงทั้งหมดที่ใช้สำหรับการศึกษานี้ ได้แก่

HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line) ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ผศ.ดร.วีระ วงศ์คำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

HEp2 (Human Larynx carcinoma cell line) ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ศ.ดร.พรเทพ เทียนสิวกุล ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

HeLa (Human Cervix carcinoma cell line) ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก รศ.ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

HaCaT (Human Keratinocyte cell line) ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Prof. N.E. Fusenig, German Cancer Research Centre, Heidelberg ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

HepG2 (Human hepatocellular carcinoma cell line) ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก รศ.พญ.ดร.ณัฐริยา หิรัญกาญจน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Jurkat (Human T cell lymphoblast-like cell line) และ SW480 (Human colon adenocarcinoma cell line) ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ศ.นพ.ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ทำการตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีนต่างๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่เหมาะสมในการทดลอง ด้วยเทคนิค Reverse-Transcriptase (RT) PCR ซึ่งยีนที่ต้องการตรวจสอบมีดังนี้ ยีน SERT, Estrogen receptor (ER), Glucocorticoid receptor (GR) โดยใช้ยีน β -actin หรือ glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) การทดลองครั้งนี้จะใช้ชุดน้ำยา SuperScript[™] III One-Step RT-PCR System with Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen) และใช้อาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) ที่สกัดได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นต้นแบบ (template) ในการทำปฏิกิริยา

ตารางที่ 1 แสดง primers จำเพาะที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ

Primer	Sequence	Product (bp)	Reference
h β -actin Sense	5'-ACG GGT CAC CCA CAC TGT GC-3'	656	(Fisker และคณะ, 2004)
h β -actin Anti-sense	5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT G-3'		
hER α Sense	5'-TAT GGG GTC TGG TCC TGT GA-3'	334	(You และคณะ, 2003)
hER α Anti-sense	5'-GGG CGG GGC TAT TCT TCT TA-3'		
hER β Sense	5'-TTC CCG GCA GCA CCA GTA ACC-3'	262	
hER β Anti-sense	5'-TCC CTC TTT GCG TTT GGA CTA-3'		
hGR α/β Sense	5'-CTT ACT GCT TCT CTC TTC AGT TCC T-3'	204	(Torrego และคณะ, 2004)
hGR α Anti-sense	5'-GCA ATA GTT AAG GAG ATT TTC AAC C-3'		
hGR β Anti-sense	5'-AGT GCA CAT AAT CTT CTT TTT C TC A-3'		
hGAPDH Sense	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'	226	(Hu และคณะ, 2004)
hGAPDH Anti-sense	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'		
hSERT Sense	5'-CAT CTG GAA AGG CGT CAA G-3'	319	(Kubota และคณะ, 2001)
hSERT Anti-sense	5'-CGA AAC GAA GCT CGT CAT G-3'		

ขั้นที่ 6 การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ (Transfection) และทดสอบการแสดงออกของ luciferase reporter gene

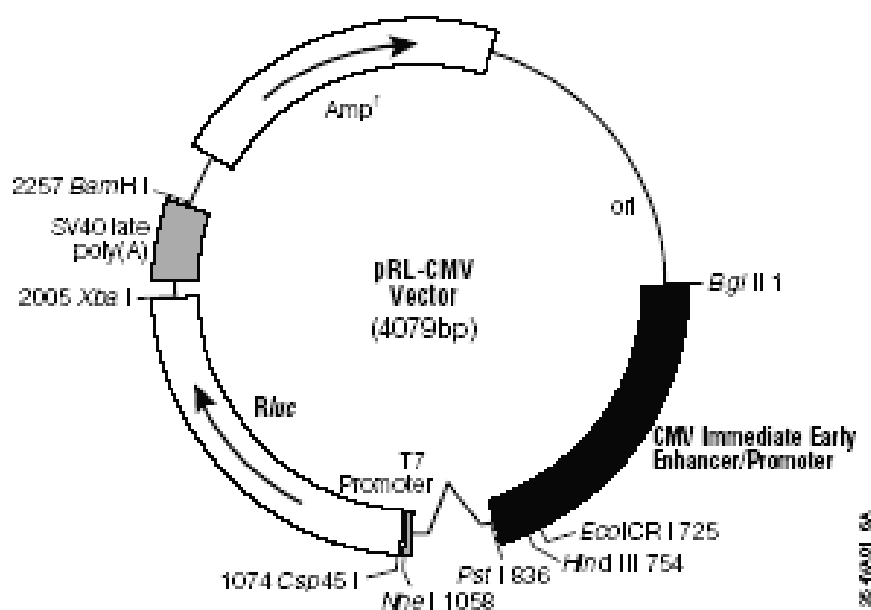
วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาถึงบทบาทของ 5-HTTLPR ต่อการแสดงออกของยีน SERT นอกจากนี้ ยังศึกษาผลของ steroid hormones ต่อ 5-HTTLPR ในการควบคุมการแสดงออกของ SERT โดยการวัดการแสดงออกของ luciferase reporter gene โดยการใช้ cell culture model ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว (จากขั้นที่ 5)

วิธีการวิจัย

เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการทดสอบ (เซลล์ SW480 จำนวน 40,000 เซลล์ต่อหลุมและเซลล์ HT-29 จำนวน 50,000 เซลล์ต่อหลุม) ใน 96 well cell culture plate และนำมา incubate ในตู้บเพาะเลี้ยง CO₂ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อให้ปริมาณเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 90-95 % ในวันต่อไปที่จะทำการทดลอง จากนั้นนำ plasmid DNA ที่สกัดได้ทั้ง 3 แบบ (จากขั้นที่ 4) ซึ่งจะมีปริมาณและความบริสุทธิ์สูงมากเพียงพอที่จะทำการทดลองนั้น มาทำการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ที่เหมาะสมที่ผ่านการคัดเลือกด้วยชุดน้ำยา Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) พร้อมกับพลาสมิดร่วม (Co-transfected pRL-CMV Vector) ดังแสดงลักษณะของพลาสมิดในรูปที่ 4 (ได้รับความเชื่อใจจาก Dr. Robert K. Yu, Institute of Molecular Medicine and Genetics, Medical College of Georgia, Georgia's Health Science University, USA) หลังจากนั้น สามารถผสมสาร dexamethasone water

soluble (Sigma) หรือ β -estradiol water soluble (Sigma) ที่จะทดสอบกับเซลล์ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีซีรัมกับยาปฏิชีวนะผสมอยู่นี้ให้ความเข้มข้นตามต้องการได้ ซึ่งการทดลองนี้จะใช้ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 10^{-3} , 10^{-6} และ 10^{-9} nM (Glatz และคณะ, 2003; Soares และคณะ, 2004) เพราะเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 24 ชั่วโมงก่อนที่จะทดสอบการแสดงออกของยีน luciferase reporter ในวันต่อไป ในทางตรงกันข้าม ไม่ต้องผสมฮอร์โมนใดๆ ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ หากจะศึกษาเพียงผลของ 5-HTTLPR ต่อการแสดงออกของ SERT



รูปที่ 4 แสดงลักษณะของ Co-transfected pRL-CMV Vector

(<http://www.promega.com/figures/popup.asp?fn=1354va&partno=E2261>
&product=pRL%2DCMV+Vector)

สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน luciferase reporter เพื่อศึกษา promoter activity ของยีน SERT จะทำการวัดโดยใช้ชุดน้ำยา Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) ซึ่งจะวัดทั้งปริมาณของ firefly luciferase จาก luciferase reporter gene constructs (pGL3-Basic Vector) ที่สร้างขึ้นกับปริมาณของ Renilla luciferase จาก pRL-CMV Vector ซึ่งเป็นตัวควบคุม (control reporter) สำหรับ normalization ค่าที่วัดได้ pRL-CMV Vector ที่ถูกถ่ายโอนร่วมกับดีเอ็นเอพลาสมิดที่ต้องการทดสอบ (co-transfected) เข้าไปด้วยพร้อมกัน เพื่อลดปัญหาผลกระทบจากจำนวนของเซลล์ที่ใช้ (cell number) และประสิทธิภาพในการ transfection (transfection efficiency) รวมถึงผลที่ไม่จำเพาะต่างๆ (global effects) เป็นต้น โดยนำเซลล์ที่จะตรวจวัดออกมาเติมน้ำยา Dual-Glo™

Luciferase Reagent (Dual-Glo™ Luciferase Buffer, Dual-Glo™ Luciferase Substrate) ปริมาตร 100 µl ต่อหลุมของ 96 well cell culture plate ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้ววัดปริมาณของ firefly luciferase จากนั้นเติมน้ำยา Dual-Glo™ Stop&Glo Reagent (Dual-Glo™ Stop&Glo Buffer, Dual-Glo™ Stop&Glo Substrate) อีก 100 µl ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีแล้ววัดปริมาณของ *Renilla* luciferase ซึ่งค่าของปริมาณแสง luminescence ที่ได้ทั้งสองจะถูกวัดด้วยเครื่อง VICTOR³ (PerkinElmer)

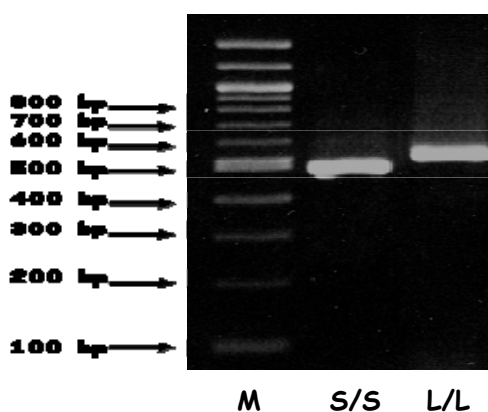
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้คือ activities ของ firefly luciferase กับ *Renilla* luciferase ซึ่งถูกนำมาเทียบเป็นอัตราส่วนของ firefly luciferase activities ต่อ *Renilla* luciferase activities ในแต่ละการทดลอง แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับอัตราส่วนที่มาจากการถูก transfect ด้วยพลาสมิดที่เป็น negative control คือ promoterless pGL3-Basic ค่าที่ได้นั้นจะถูกคำนวณเป็นจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) เพื่อนำมาเปรียบเทียบกันระหว่างค่าที่ได้จากเซลล์ ซึ่งถูกถ่ายโอนด้วยพลาสมิดที่มีส่วน 5-HTTLPR ชนิดอัลลีล L ชนิดอัลลีล S และ พลาสมิดที่ขาดตรงส่วนของ 5-HTTLPR (L860) ไป จะแสดงถึง promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR ในแบบต่างๆ นอกจากนี้ยังดูถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเมื่อมีการเติมสารชนิดต่างๆ ได้แก่ dexamethasone water soluble หรือ β -estradiol water soluble ลงไปในปริมาณที่ต่างกัน (10^{-3} , 10^{-6} และ 10^{-9} nM) รวมถึงการตรวจสอบความจำเพาะต่อเซลล์ ก็จะถูกวัดโดยการเปรียบเทียบผลการศึกษาระหว่างเซลล์แต่ละชนิด (เซลล์ SW480 และเซลล์ HT-29) ด้วย แต่ละการทดลองจะทำทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้การคำนวณสถิติ t-test ($p < 0.05$) ในการตัดสินใจว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ อย่างไร

ผลการวิจัย

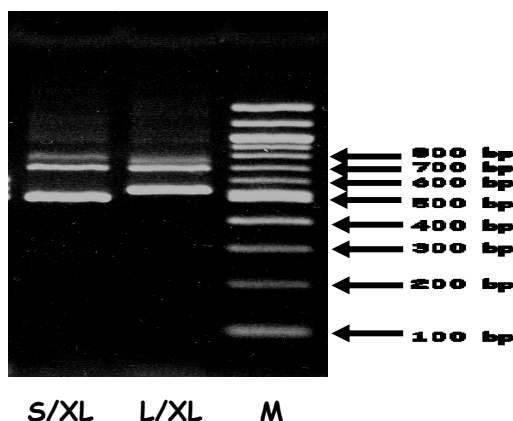
ตัวอย่าง

ผลการตรวจหาความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) จากดีเอ็นเอของอาสาสมัคร คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการเลือกตัวอย่างของดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายชนิด S อัลลีล (จีโนไทป์ประเภท S/S) และชนิด L อัลลีล (จีโนไทป์ประเภท L/L) มาอย่างละ 1 ราย โดยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจสอบจะมีขนาดประมาณ 484 คู่เบส และประมาณ 528 คู่เบสตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) บนเจลอากาโรส โดยแถวแรกเป็น DNA marker แสดงขนาดของคู่เบส (bp) กำกับไว้ (M) และแถวถัดไปเป็นลักษณะของจีโนไทป์ประเภท S/S และ L/L ตามลำดับ

ในการทดลองครั้งนี้ นอกจากตัวอย่างของดีเอ็นเอที่มีจีโนไทป์ประเภท S/S และ L/L แล้ว คณะผู้วิจัยยังพบความหลากหลายของ 5-HTTLPR ชนิด XL อัลลีล แบบจีโนไทป์ประเภท S/XL และ L/XL ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) บนเจลอากาโรส โดยแถวแรกกับแถวที่ 2 เป็นลักษณะของจีโนไทป์ประเภท S/XL และ L/XL ตามลำดับ และแถวถัดไปเป็น DNA marker แสดงขนาดของคู่เบส (bp) กำกับไว้ (M)

การศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing)

ผลการศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่มีความหลากหลายของยีน SERT ชนิด S และ L อัลลีลนั้นพบว่า L อัลลีลมีท่อนดีเอ็นเอแทรกให้ยาวกว่าอัลลีล S 42 คู่เบส ดังนี้

5'- CCTTC CAGCA TCCCC CTGCA CCCCC AGCAT CCCCC CTGCA GC -3'

แตเมื่อนำลำดับเบสของ S อัลลีลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ L อัลลีลที่อยู่ในฐานข้อมูล (GenBank) กลับพบว่ามีความแตกต่างของลำดับเบสอยู่ 44 คู่เบส ซึ่งลำดับเบสที่แตกต่างกันนี้เหมือนกันทั้งใน GenBank accession No. AF117826 และ No. X76753 ดังนี้

GenBank accession No. AF117826

-1631 CAGCA TCCCC CCTGC AGCCC CCCCC GCATC TCCCC TGCAC CCCC -1588

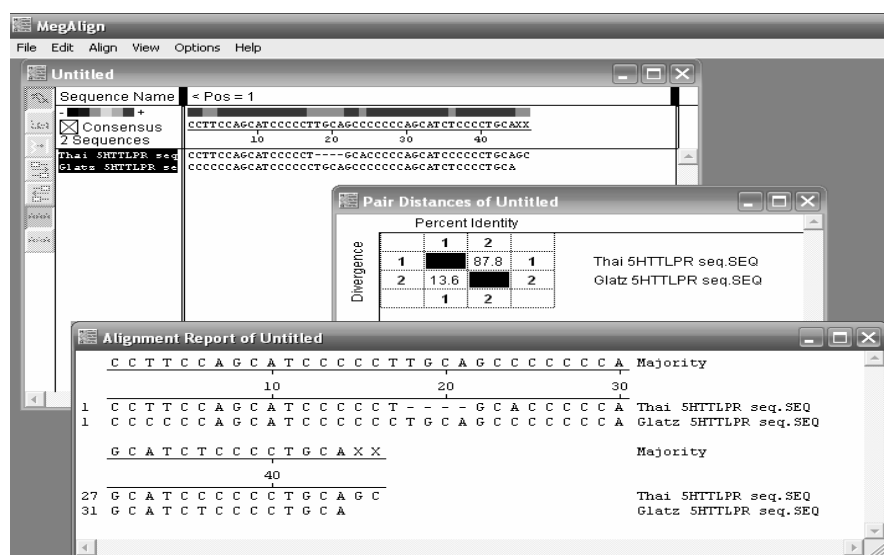
GenBank accession No. X76753

-1633 CAGCA TCCCC CCTGC AGCCC CCCCC GCATC TCCCC TGCAC CCCC -1590

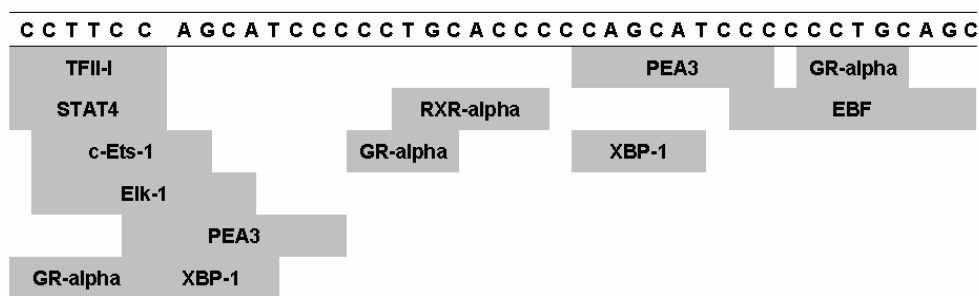
เมื่อนำลำดับเบสซึ่งมีความแตกต่างกันของทั้งสองอัลลีลอยู่ 42 คู่เบสที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสจากการศึกษาของ Heils (Heils และคณะ, 1996) และ Glatz (Glatz และคณะ, 2003) ที่เคยรายงานความแตกต่างกันของทั้งสองอัลลีลอยู่ 44 คู่เบส ดังนี้

5'- CCCCC CAGCA TCCCC CCTGC AGCCC CCCCC GCATC TCCCC TGCA -3'

โดยใช้วิธี Jotan Hein Method ในโปรแกรม MegAlign ของบริษัท DNASTAR ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า มีความคล้ายกันของลำดับเบสอยู่ประมาณ 87.8 % ดังแสดงในรูปที่ 7 นอกจากนี้ ยังพบว่ามี Transcription Factors ของมนุษย์ ที่มีจำเพาะสูงกับลำดับเบสดังกล่าว ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี Jotan Hein Method ในโปรแกรม MegAlign สำหรับผลการศึกษา Transcription Factor ในลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของชนิด S และ L อัลลีลอยู่ 42 คู่เบส ด้วยโปรแกรม TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)



รูปที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ Transcription Factors ด้วยโปรแกรม Promo (Messeguer X และ คณะ 2002; Farre D และคณะ, 2003)

การคัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการทดลอง

ในการตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีนต่างๆ ได้แก่ ยีน SERT, Estrogen receptor (ER) ชนิด α และ β , Glucocorticoid receptor (GR) ชนิด α และ β , โดยใช้ยีน β -actin หรือยีน glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) เป็นตัวควบคุม คณะผู้วิจัยได้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนดังกล่าว ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT-29, HEp2, HeLa, HaCaT, HepG2, Jurkat และ SW480 เพื่อทำการคัดเลือกเซลล์ที่เหมาะสมในการทดลองครั้งนี้ ผลการศึกษาที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

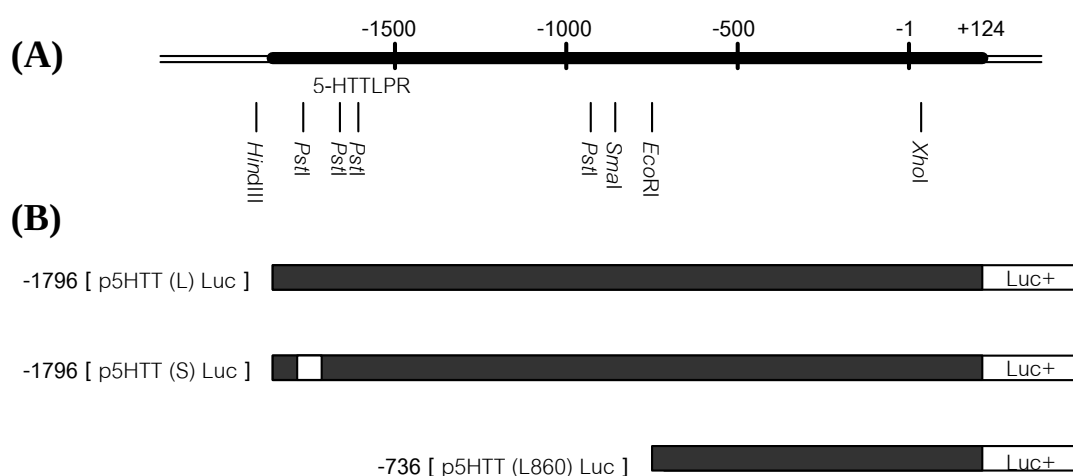
ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ รวมถึงอุณหภูมิ Annealing สำหรับ PCR ที่ใช้ในการตรวจสอบ (เครื่องหมาย ✓ คือมีการแสดงออกของยีนและ ✗ คือไม่มีการแสดงออกของยีน)

ยีน เซลล์	β -actin 58°C	GAPDH 58°C	SERT 59-60°C	hER α 58-59°C	hGR α 52°C
HepG2	✓	✓	✓	✓	✓
SW480	✓	✓	✓	✓	✓
HT-29	✓	✓	✓	✓	✗
HEp2	✓	✓	✓	✓	✓
HeLa	✓	✓	✓	✗	✓
HaCaT	✓	✓	✓	✗	✓
Jurkat	✓	✓	✓	✓	✓

อย่างไรก็ตาม ยังไม่ทราบผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน Estrogen receptor (ER) ชนิด β , Glucocorticoid receptor (GR) ชนิด β เนื่องจากคณะผู้วิจัยไม่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ชนิดได้ และจากผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ได้นั้น คณะผู้วิจัยจึงเลือกที่จะใช้เซลล์ SW480 และเซลล์ HT-29 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีแหล่งกำเนิดจากระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ เป็นตัวแทนของเซลล์ที่เหมาะสมเป็นตัวแทนของเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน SERT (positive) เพื่อใช้ในการศึกษา promoter activity ของยีน SERT ในการทดลองต่อไป แต่เป็นที่น่าเสียดายอย่างยิ่งว่า ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยไม่สามารถที่จะหาตัวแทนของเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน SERT (negative) ได้

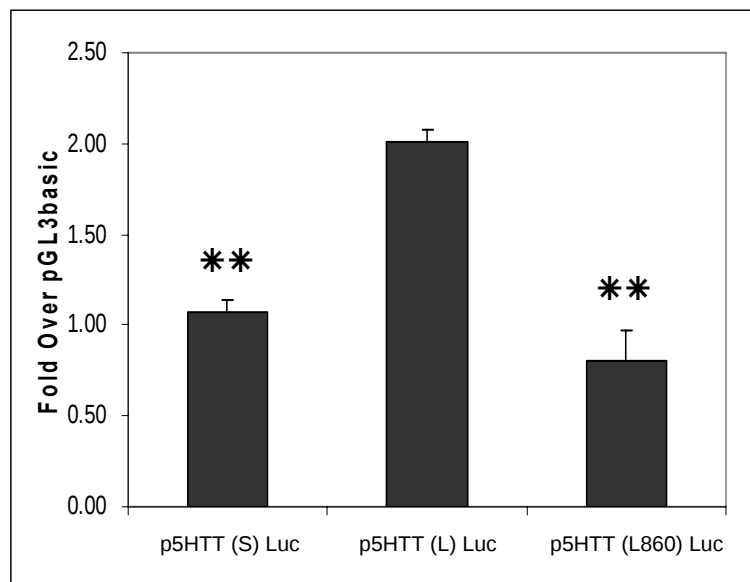
การศึกษา promoter activity ของยีน SERT

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษา promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบอัลลีล L และอัลลีล S รวมถึงเมื่อขาดส่วนความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR ไป (L860) โดยการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอลักษณะเหล่านี้ลงใน plasmid vector ที่ขาดส่วนของ promoter (promoterless luciferase expression vector, pGL3-Basic) แล้วตรวจวัดด้วยเทคนิค Reporter gene assay ซึ่งใช้ activity ของยีน luciferase เป็นตัวบ่งบอกถึงการแสดงออกของยีน โดยลักษณะของดีเอ็นเอพลาสมิด (luciferase reporter gene constructs) ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้านี้ได้แสดงไว้ในรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงแผนภาพของยีน SERT ในส่วน promoter ที่มีตำแหน่งของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ (12) (A) และแสดงลักษณะของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลอง (plasmid constructs) ที่ได้จากการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบอัลลีล L (p5HTT (L) Luc) และอัลลีล S (p5HTT (S) Luc) จากตำแหน่ง -1796 ถึง +124 รวมถึงชิ้นส่วนที่ขาดส่วนความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (L860) (p5HTT (860) Luc) จากตำแหน่ง -736 ถึง +124 เหล่านี้ ลงใน Plasmid Vector ที่ขาดส่วนของ promoter (promoterless luciferase expression vector pGL3-Basic, Luc+) อ้างอิงจาก GenBank accession No. X76753 (B)

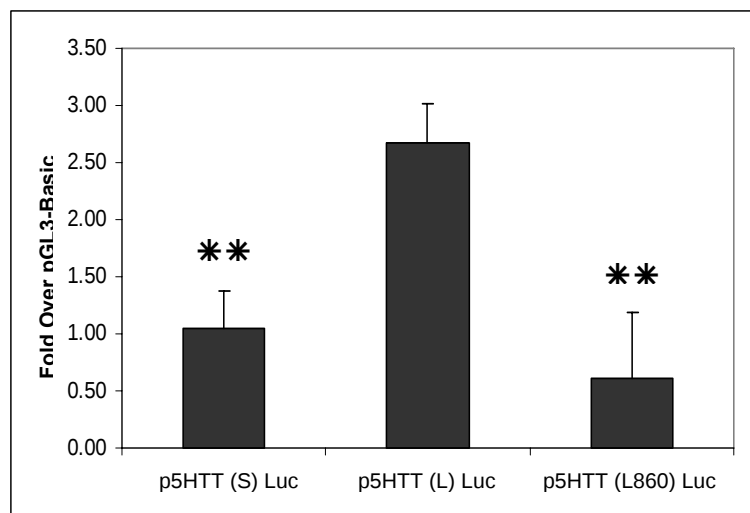
ผลการศึกษา promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบอัลลีล L และอัลลีล S รวมถึงเมื่อขาดส่วนความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (L860) ในเซลล์ SW480 เป็นดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดง promoter activity ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบอัลลีล L (p5HTT (L) Luc) และอัลลีล S (p5HTT (S) Luc) รวมถึงเมื่อขาดส่วนความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (L860) (p5HTT (L860) Luc) ในเซลล์ SW480 ซึ่งแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิด pGL3-Basic จะถูกถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์พร้อมกับพลาสมิดรวม pRL-CMV โดยค่า firefly luciferase activities ของแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจะถูกเทียบเป็นอัตราส่วนกับ *Renilla* luciferase activities และนำมาคำนวณเป็นจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) และแสดงค่าเฉลี่ยของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ในแต่ละแท่งกราฟ *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าของ L อัลลีลด้วยสถิติ *t*-test

ผลการทดลองนี้ ในเซลล์ SW480 แสดงให้เห็นว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าที่มี activity มากกว่าของ pGL3-Basic ของ L อัลลีลมากกว่าของ S อัลลีลและส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่ขาดลักษณะของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (L860) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.00005$ และ 0.001 ตามลำดับ)

ผลการศึกษา promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบอัลลีล L และอัลลีล S รวมถึงเมื่อขาดส่วนความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (L860) ในเซลล์ HT-29 เป็นดังรูปที่ 11

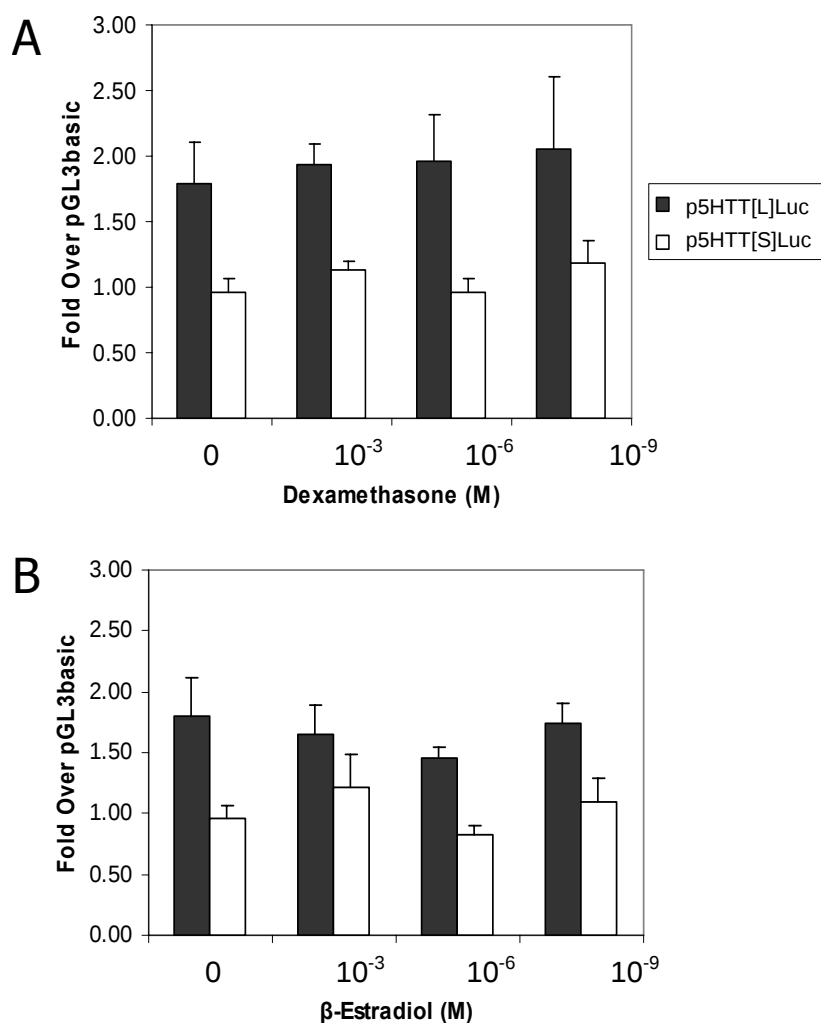


รูปที่ 11 แสดง promoter activity ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบอัลลีล L (p5HTT (L) Luc) และอัลลีล S (p5HTT (S) Luc) รวมถึงเมื่อขาดส่วนความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (L860) (p5HTT (L860) Luc) ในเซลล์ HT-29 ซึ่งแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิด pGL3-Basic จะถูกถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์พร้อมกับพลาสมิดร่วม pRL-CMV โดยค่า firefly luciferase activities ของแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจะถูกเทียบเป็นอัตราส่วนกับ *Renilla* luciferase activities และนำมาคำนวณเป็นจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) และแสดงค่าเฉลี่ยของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ในแต่ละแท่งกราฟ ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบค่าของ L อัลลีลด้วยสถิติ *t*-test

ผลการทดลองนี้ ในเซลล์ HT-29 แสดงให้เห็นว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าที่มี activity มากกว่าของ pGL3-Basic ของ L อัลลีลมากกว่าของ S อัลลีลและส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่ขาดลักษณะของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (L860) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.004$ และ 0.006 ตามลำดับ)

การศึกษาผลของ Dexamethasone และ β -Estradiol ต่อ promoter activity ของยีน SERT

เนื่องจากเซลล์ SW480 แสดงออกทั้ง hER α และ hGR α คณะผู้วิจัยจึงเลือกเซลล์นี้ สำหรับการศึกษาผลของ Dexamethasone และ β -Estradiol ต่อ promoter activity ของยีน SERT ว่ามีกลไกการควบคุมผ่าน 5-HTTLPR หรือไม่ อย่างไร ผลการศึกษา dexamethasone และ β -estradiol ที่ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 0, 10^{-3} , 10^{-6} และ 10^{-9} M ต่อ promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบอัลลีล L และอัลลีล S ในเซลล์ SW480 นั้น แสดงไว้ในรูปที่ 12



รูปที่ 12 แสดงผลของ dexamethasone (A) และ β -estradiol (B) ที่ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 0, 10^{-3} , 10^{-6} และ 10^{-9} M ต่อ promoter activity ของยีนส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบอัลลีล L (p5HTT (L) Luc) และอัลลีล S (p5HTT (S) Luc) ในเซลล์ SW480 ซึ่งแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิด pGL3-Basic จะถูกถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์พร้อมกับพลาสมิดร่วม pRL-CMV โดยค่า firefly luciferase activities ของแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจะถูกเทียบเป็นอัตราส่วนกับ *Renilla* luciferase activities และนำมาคำนวณเป็นจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) และแสดงค่าเฉลี่ยของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ในแต่ละแท่งกราฟ

โดยจากผลการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control ของทั้ง L อัลลีลและ S อัลลีล เมื่อทดสอบด้วย dexamethasone และ β -estradiol ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-3} , 10^{-6} และ 10^{-9} M นั้นไม่แตกต่างจากการทดสอบที่ความเข้มข้น 0 M อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

สรุปและอภิปรายผล

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ที่พบว่าทั้งสองอัลลีลมีลำดับเบสที่แตกต่างกันอยู่ 42 คู่เบสจากดีเอ็นเอของอาสาสมัครเชื้อชาติไทยนั้นแตกต่างจากในเชื้อชาติ Caucasian ที่เคยมีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ว่าทั้งสองอัลลีลมีลำดับเบสที่แตกต่างกันอยู่ 44 คู่เบส (Heils และคณะ, 1996; Glatz และคณะ, 2003) อาจเนื่องจากความแตกต่างทางด้านเชื้อชาติ อีกทั้งในแต่ละชุด (repeat elements) ของความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR ที่มีขนาดประมาณ 20-23 คู่เบสนั้น ยังสามารถแตกต่างด้วยความหลากหลายเกิดขึ้นภายในชุด (repeat elements) ได้เช่นกัน (Murphy และคณะ, 2004; Glatz และคณะ, 2004) อย่างไรก็ตาม ลำดับเบสของทั้งสองเชื้อชาตินี้มีความคล้ายกันของลำดับเบสอยู่ถึงประมาณ 87.8 % เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Jotam Hein Method ในโปรแกรม MegAlign (DNASTAR, สหรัฐอเมริกา) นอกจากนี้หากนำลำดับเบสที่แตกต่างกันอยู่ 42 คู่เบสนั้น มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ได้จากการเทียบกันระหว่างลำดับเบสของ S อัลลีลในการศึกษาครั้งนี้ กับลำดับเบสของ L อัลลีลจากลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank accession No. AF117826 และ No. X76753 พบว่ามีความแตกต่างกันของลำดับเบส รวมถึงความยาวหรือขนาดของลำดับเบส อย่างไรก็ตาม ลำดับเบสที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ทั้งสองหมายเลขนั้นเป็นลำดับเบสของเชื้อชาติ Caucasian

ผลการวิเคราะห์หา Transcription Factors ของมนุษย์ที่จำเพาะกับส่วนลำดับเบส 42 คู่เบสที่แตกต่างกันของทั้งสองอัลลีลในเชื้อชาติไทยจากโปรแกรม Promo นั้นพบอยู่ด้วยกันทั้งหมด 9 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งบทบาทหรือความสำคัญของ Transcription Factor แต่ละชนิดนั้นยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป โดยอาจใช้เทคนิค Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) ในการตรวจสอบว่ามี การจับกันของ Transcription Factors เหล่านี้ในบริเวณลำดับเบสของดีเอ็นเอหรือไม่ อย่างไร

ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยยังได้พบตัวอย่างดีเอ็นเอของอาสาสมัครที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบ XL อัลลีล ซึ่งส่วนใหญ่แล้ว XL อัลลีลมักพบเฉพาะในเชื้อชาติแอฟริกา (Gelernter และคณะ, 1998) และพบได้บ้างในเชื้อชาติญี่ปุ่น (Narita และคณะ, 2001) ซึ่งการที่สามารถพบ XL อัลลีลได้ในเชื้อชาติไทยด้วยนั้น อาจเป็นการบ่งบอกถึงความสำคัญของการศึกษาการกระจายของอัลลีลนี้ในกลุ่มประชากรไทย รวมถึงความสัมพันธ์กับโรคต่างๆ โดยเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษานำร่องถึงการกระจายของอัลลีลในประชากรไทย พบว่าความถี่ของ XL อัลลีลเท่ากับร้อยละ 3.1 โดยมีความถี่ของ S และ L อัลลีลเท่ากับร้อยละ 62.5 และ 34.4 ตามลำดับ (เมธิณี ตันนุกิจ, 2548) อย่างไรก็ตาม กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ยังมีขนาดเล็กและควรทำการศึกษาต่อไปโดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้น

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ นั้นพบว่า นอกจากที่เคยมีการรายงานการแสดงออกของ SERT ในเซลล์ชนิดต่างๆ เช่น เซลล์ประสาท เซลล์รก เซลล์ enterochromaffin เซลล์ lymphocyte เซลล์ macrophage เซลล์ osteoclast เซลล์ osteoblast หรือ osteocyte หัวใจ หลอดเลือด เกล็ดเลือด และต่อมหมวกไต เป็นต้นแล้ว จากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าการแสดงออกของ SERT ในเซลล์จากบริเวณลำไส้ใหญ่ (เซลล์ HT-29 และเซลล์ SW480) เซลล์ผิวหนัง (เซลล์ HaCaT) เซลล์ตับ (เซลล์ HepG2) เซลล์กล้ามเนื้อ (เซลล์ HEp2) เซลล์ปากมดลูก (HeLa) ด้วย ซึ่งในการศึกษาวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยจึงเลือกที่จะใช้เซลล์ SW480 และเซลล์ HT-29 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย epithelial (epithelial-like) ของลำไส้ใหญ่ในระบบทางเดินอาหารมาเป็นตัวแทนของเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน SERT (positive) และเหมาะสมในการศึกษา promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR รวมถึงผลของสเตียรอยด์ฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์กับฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วย แต่เนื่องจากผู้วิจัยยังไม่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการศึกษาถึงผลของสเตียรอยด์ฮอร์โมนเหล่านั้นในเซลล์ HT-29 ได้ รวมถึงการที่เซลล์นี้ไม่มีการแสดงออกของยีน GR α แล้วนั้น ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาผลของสเตียรอยด์ฮอร์โมนเฉพาะแต่ในเซลล์ SW480

โดยส่วนใหญ่แล้ว จากการศึกษาที่ผ่านมา มักมุ่งเน้นไปที่การศึกษาในเซลล์ประสาท (Mortensen และคณะ, 1999) เซลล์เม็ดเลือดขาว (Lesch และคณะ, 1996) และเซลล์รก (Heils และคณะ, 1996, Glatz และคณะ, 2003) เป็นต้นแบบ (model) หลัก เพื่อศึกษาถึง promoter activity ของความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR หากแต่ยังไม่เคยมีการรายงานถึงเซลล์ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเซลล์ลำไส้ใหญ่นี้ยังมีการศึกษาอยู่ค่อนข้างน้อย โดยเฉพาะในเรื่องของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR ถึงแม้ว่าซีโรโทนินจะมีบทบาทสำคัญในการทำงานของระบบทางเดินอาหาร รวมถึงเป็นแหล่งหลักของการสร้างและเก็บสะสมซีโรโทนินในร่างกายของมนุษย์ก็ตาม ทำให้คณะผู้วิจัยเลือกที่จะใช้เซลล์จากระบบทางเดินอาหารในการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าเสียดายอย่างยิ่งที่ไม่สามารถจะหาตัวแทนของเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน SERT (negative) มาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ ทำให้ไม่ทราบว่าการที่เพิ่มขึ้นจำเพาะกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน SERT เท่านั้นหรือไม่ อย่างไร ในความจริงแล้ว เซลล์ HepG2 กับเซลล์ HaCaT ก็มีความเหมาะสมและน่าสนใจศึกษาเช่นกัน โดยมีรายงานถึงบทบาทสำคัญของซีโรโทนินในการงอกใหม่ของเซลล์ตับ (liver regeneration) (Lesurtel และคณะ, 2006; Jeyabalan และคณะ, 2006) และบทบาทในเซลล์ผิวหนังของโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) ด้วย เพียงแต่มีอุปสรรคในการทำทดลองนั่นคือเซลล์ HepG2 ค่อนข้างที่จะเพาะเลี้ยงยากและเซลล์ HaCaT ที่ทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ยากกว่าเซลล์ชนิดอื่นๆ

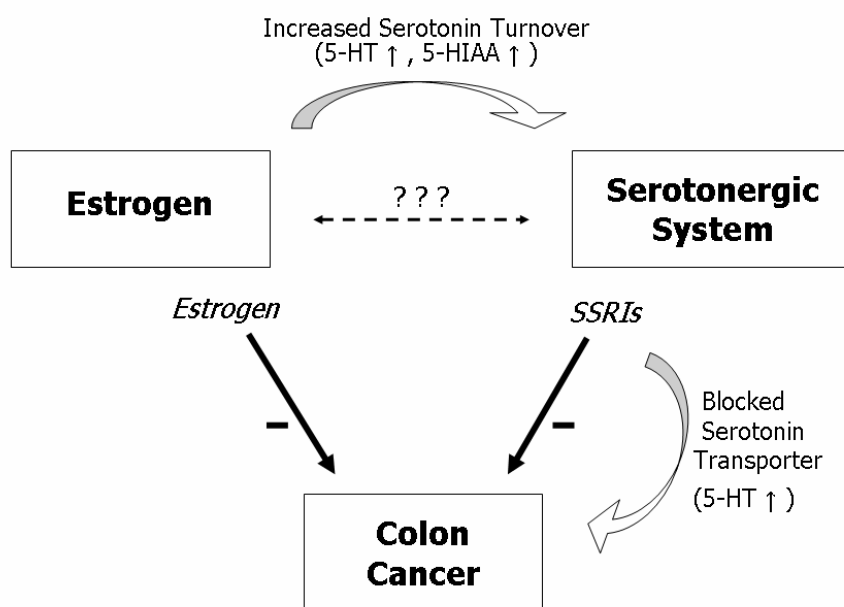
ผลการศึกษา promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR ในเซลล์ SW480 และเซลล์ HT-29 นั้นพบว่า basal activity ของ L อัลลีลมากกว่าของ S อัลลีล ประมาณ 2-3 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในเซลล์ชนิดอื่น ได้แก่ การศึกษาของ Heils และคณะในปี 1996 ที่รายงานว่า basal activity ของ L อัลลีลมากกว่าของ S อัลลีลประมาณ 3 เท่าในเซลล์รก (Heils และคณะ, 1996) การศึกษาของ Lesch และคณะในปี 1996 รายงานว่า basal activity ของ L อัลลีล

มากกว่าของ S อัลลีลประมาณ 2 เท่าในเซลล์เม็ดเลือดขาว (Lesch และคณะ, 1996) และการศึกษาของ Mortensen และคณะในปี 1999 ที่รายงานว่า basal activity ของ L อัลลีลมากกว่าของ S อัลลีลประมาณ 2 เท่าในเซลล์ประสาทของหนู (Mortensen และคณะ, 1999) แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าผลการศึกษาที่ได้นี้มีความจำเพาะกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของ SERT เท่านั้นหรือไม่ ถึงแม้ว่าจะเคยมีการศึกษาในเซลล์ COS-1 (Kidney monkey cell line) ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน SERT ด้วย (Mortensen และคณะ, 1999) อย่างไรก็ตาม เซลล์ COS-1 ซึ่งเป็นเซลล์จากลิง รวมถึงเซลล์ RN64A (Immortalized serotonergic raphe neurons) ที่เป็นเซลล์ประสาทของหนูนั้นไม่เหมาะที่จะใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา promoter activity ในยีนของมนุษย์ เนื่องจากลำดับเบสในส่วน promoter ของยีนดังกล่าว อาจไม่จำเพาะกับ Transcription factor ในเซลล์ของสัตว์ทดลอง และทำให้ผลการทดลองที่ได้ผิดพลาดไป

การศึกษามูลของสเตียรอยด์ฮอร์โมนต่อการแสดงออกของยีน พบว่าทั้ง glucocorticoid (dexamethasone) และ estrogen (β -estradiol) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน SERT ไม่ว่าจะมีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR อัลลีลใดก็ตาม ซึ่งผลการศึกษาที่ได้นี้ขัดแย้งกับการศึกษาของ Glatz และคณะที่พบว่า glucocorticoid มีผลต่อการแสดงออกของยีน SERT ผ่านทางความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR ในการศึกษาในเซลล์รก (Glatz และคณะ, 2003) อาจเป็นไปได้ว่าลำดับเบสในส่วนของ 5-HTTLPR ที่เป็นตำแหน่งซึ่งจับกับ Transcription Factor นั้นมีความจำเพาะต่อชนิดของเซลล์ (cell-specific) รวมถึงชนิดของฮอร์โมน (hormone-specific) ด้วยในการควบคุมการแสดงออกของยีน SERT

นอกจากฮอร์โมน glucocorticoid แล้ว estrogen ยังเป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนอีกตัวหนึ่งที่มีความสำคัญและน่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับ serotonin ด้วย ซึ่งปฏิสัมพันธ์ระหว่าง estrogen กับ serotonin นั้น ได้มีการศึกษากันมานานในเรื่องของอารมณ์ (mood) และความจำ (cognition) โดยพบว่า estrogen สามารถเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบต่างๆ ในกลไกการออกฤทธิ์ของ serotonin เช่น serotonin, serotonin receptor, serotonin transporter รวมไปถึงเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการสลาย serotonin ด้วย (Amin และคณะ, 2005) ซึ่งไม่เพียงแต่ในระบบประสาทเท่านั้น estrogen ยังมีบทบาทในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะเรื่องของมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) ซึ่งโรคนี้พบว่ามีอุบัติการณ์เกิดในเพศชายสูงกว่าเพศหญิงเกือบ 50 % บ่งบอกถึงความเกี่ยวข้องกับเรื่องของฮอร์โมนเพศ ซึ่งยังพบด้วยว่าอุบัติการณ์เกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ในผู้หญิงหลังวัยหมดประจำเดือนนั้น จะสูงกว่าผู้หญิงก่อนวัยหมดประจำเดือน (Franceschi และคณะ, 2000) แต่จะลดลงในผู้หญิงหลังวัยหมดประจำเดือนที่รักษาด้วยฮอร์โมน estrogen (Troisi และคณะ, 1997; Grodstein และคณะ, 1999) โดยเมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานพบว่าการใช้ยาต้านโรคซึมเศร้า (antidepressants) ชนิด SSRIs ในปริมาณที่สูงมาก ($>6.0 \times 10^6$ โมลต่อวัน) ทุกวันเป็นระยะเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 5 ปีนั้นสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้โดยอาจไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ (Xu และคณะ, 2006) ทำให้ผู้วิจัยคาดว่าอาจจะมีความเป็นไปได้ ที่ความสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมน estrogen กับโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่นั้น จะเกี่ยวข้องกับกลไกการออกฤทธิ์

ของ serotonin และการที่ estrogen สามารถป้องกันหรือลดความเสี่ยงของการเกิดโรคได้นั้นไม่ได้เป็นผลโดยตรงของมัน แต่เป็นผลทางอ้อมที่ผ่านกลไกของ serotonin แทน ซึ่งไม่ว่าจะเป็นการใช้ฮอร์โมน estrogen หรือ SSRIs ก็ตามล้วนมีผลทำให้ปริมาณของ serotonin เพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มขึ้นของ serotonin นี้อาจเป็นกลไกหนึ่งในการลดความเสี่ยงของโรคได้ ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 แสดงแผนภาพกลไกที่เป็นไปได้ (proposed mechanism) ของความสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมน estrogen และ serotonin กับโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

แต่จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ฮอร์โมน estrogen ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน SERT ไม่ว่าจะมีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR อัลลีลใดก็ตาม แสดงว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณ serotonin ไม่ได้เกิดจากผลโดยตรงของ estrogen ต่อ SERT เป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของ SERT หลังจากได้รับ estrogen นั้น เป็นผลทางอ้อมจากผลของ estrogen ต่อองค์ประกอบอื่นๆ ในกลไกของ serotonin เช่นมีผลต่อการสร้าง serotonin โดยตรง และเมื่อได้รับสารไปเป็นระยะเวลาหนึ่งก็อาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ SERT ตามมาได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาผลของฮอร์โมน estrogen ต่อการแสดงออกของยีน SERT ที่ผ่านมามักทำในสัตว์ทดลอง เช่น ลิง (Pecins-Thompson และคณะ, 1998, Bethea และคณะ, 2000) หรือสัตว์ที่ใช้ฟันกัดแทะ (rodents) เช่น หนู (rat) (McQueen และคณะ, 1999) และหนู (mouse) (Bertrand และคณะ, 2005) เป็นต้น แต่ความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR นี้สามารถพบได้เฉพาะในมนุษย์และในสัตว์ไพรเมต (primates) ที่ไม่ใช่มนุษย์ เช่น ลิง (rhesus monkey) ที่มีความหลากหลายของยีนในบริเวณ 5'-flanking region เป็น 21 bp insertion หรือ deletion (rh5-HTTLPR) ขณะที่ในพวก prosimians และสัตว์ที่ใช้ฟันกัดแทะ (rodents) ไม่พบว่ามี ความหลากหลายดังกล่าว (Glatz และคณะ, 2003)

ข้อเสนอแนะ

สำหรับลำดับเบส 42 bp ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ในส่วนความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR ซึ่งแตกต่างจากที่เคยมีการศึกษาไว้ในเชื้อชาติ Caucasian นั้น คณะผู้วิจัยเสนอว่าควรจะมีการทำฐานข้อมูลลำดับเบสทั้งหมด (whole genome) ในเชื้อชาติไทยเพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาถึงยีนที่ก่อให้เกิดโรค และการศึกษาทางด้านเภสัชพันธุศาสตร์ (pharmacogenomics) ต่อไปในอนาคต

จากผลการวิเคราะห์ Transcription Factors ของมนุษย์ที่จำเพาะกับส่วนลำดับเบส 42 คู่เบสที่แตกต่างกันของทั้งสองอัลลีลในเชื้อชาติไทยจากโปรแกรม Promo ที่พบอยู่ด้วยกันทั้งหมด 9 ชนิดนั้น สำหรับบทบาทหรือความสำคัญของ Transcription Factor แต่ละชนิดนั้นควรจะมีการศึกษาต่อไป โดยอาจใช้เทคนิค Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) ในการตรวจสอบว่ามีการจับกันของ Transcription Factor เหล่านี้ในบริเวณลำดับเบสของดีเอ็นเอหรือไม่ อย่างไร เพื่อให้ทราบถึงกลไกในระดับโมเลกุล และเข้าใจถึงบทบาทของความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR มากยิ่งขึ้น

จากการที่สามารถพบ XL อัลลีลได้ในเชื้อชาติไทยด้วยนั้น อาจเป็นการบ่งบอกถึงความสำคัญของการศึกษาการกระจายของอัลลีลนี้ในกลุ่มประชากรไทย รวมถึงความสัมพันธ์กับโรคต่างๆ และแม้จะมีการศึกษานำร่องถึงการกระจายของอัลลีลในประชากรไทยแล้วก็ตาม แต่กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ยังมีขนาดเล็ก ซึ่งควรทำการศึกษาต่อไปโดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้น

เป็นที่น่าเสียดายอย่างยิ่งที่ไม่สามารถจะหาตัวแทนของเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน SERT (negative) มาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ ทำให้ไม่ทราบว่าผลที่เกิดขึ้นจำเพาะกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน SERT เท่านั้นหรือไม่ อย่างไร ซึ่งในการศึกษาต่อไปนั้นควรทำการศึกษาในเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน SERT ด้วย เพื่อให้สามารถสรุปได้ว่าผลการศึกษาที่ได้มีความจำเพาะกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของ SERT เท่านั้นหรือไม่ นอกจากนี้ควรทำการศึกษาปริมาณของซีโรโทนินหรือ SERT ที่สร้างขึ้นจริงภายในเซลล์โดยที่มีกลไกการควบคุมย้อนกลับด้วย เพื่อยืนยันผลการทดลอง เนื่องจากในการศึกษา promoter activity ของยีน SERT ของงานวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจวัด promoter activity ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า luciferase reporter gene assay โดยตรวจวัด promoter activity จากการแสดงออกของยีน luciferase reporter ซึ่งค่าที่ได้จะบ่งบอกถึง activity ของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR แต่ละอัลลีลในการแสดงออกของยีน อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบด้วยเทคนิคนี้อาจจะคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้ เพราะไม่ได้ครอบคลุมถึงวงจรของการควบคุม (gene regulation) ในร่างกายมนุษย์ เช่น กลไกการควบคุมย้อนกลับ (negative feedback) ทำให้ค่าที่วัดได้นั้นมากกว่าความเป็นจริง

แม้ว่าในการศึกษาครั้งนี้ จะไม่พบว่าฮอร์โมน estrogen นั้น มีบทบาทต่อการแสดงออกของยีน SERT ไม่ว่าจะเป็นความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR อัลลีลใดก็ตาม แต่การศึกษานี้สัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมน estrogen กับ serotonin ถือเป็นเรื่องที่มีความสำคัญ ไม่ว่าจะเป็นในระบบประสาทหรือระบบทางเดินอาหารก็ตาม estrogen ในเพศหญิงจัดเป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนตัวหนึ่งที่ใช้ในการรักษา

(hormone therapy) เพื่อทดแทนฮอร์โมนที่ขาดไป (replacement) หรือบรรเทาอาการจากการหมดประจำเดือน เช่น อาการร้อนวูบวาบ (hot flashes) รวมถึงช่วยลดความเสี่ยงของภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) ในผู้หญิงหลังวัยหมดประจำเดือน (postmenopause) รวมถึงผู้หญิงก่อนวัยหมดประจำเดือนที่ขาด estrogen เนื่องจากการผ่าตัด (surgical menopause) ด้วย อย่างไรก็ตาม หากได้รับเป็นระยะเวลานานหรือในปริมาณที่มากเกินไปก็สามารถทำให้เกิดผลข้างเคียงได้ เช่น โรคมะเร็งเต้านม โรคหัวใจ เป็นต้น ดังนั้น การเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมน estrogen กับ serotonin ถึงกลไกในระดับโมเลกุล จะเป็นแนวทางในการผลิตคิดค้นยาหรือวิธีการรักษาใหม่ๆ เพื่อให้สามารถรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยลดความเสี่ยงที่จะเกิดผลข้างเคียงลง และยังช่วยในการป้องกันรวมถึงการเลือกใช้วิธีการรักษาด้วยฮอร์โมน estrogen ได้อย่างถูกต้องและเหมาะสมกับแต่ละบุคคลด้วย

เอกสารอ้างอิง

- เมธินี ตันนุกิจ. โพลีมอร์ฟิสมของยีนซีโรโทนินทรานสปอร์เตอร์ในเด็กท้องผูกที่ไม่มีโรคทางกาย
(SEROTONIN TRANSPORTER GENE POLYMORPHISM IN CHILDHOOD
FUNCTIONAL CONSTIPATION). วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต, ภาควิชากุมารเวช
ศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548.
- Amin Z, Canli T, Epperson CN. Effect of estrogen-serotonin interactions on mood and
cognition. Behav Cogn Neurosci Rev 2005 Mar; 4: 43-58.
- Bethea CL, Gundlah C, Mirkes SJ. Ovarian steroid action in the serotonin neural system of
macaques. Novartis Found Symp 2000; 230: 112-130.
- Bethea CL, Gundlah C, Mirkes SJ. Ovarian steroid action in the serotonin neural system of
macaques. Novartis Found Symp 230 2000; 112-130; discussion 30-3.
- Bertrand PP, Paranevitane UT, Chavez C, Gogos A, Jones M, van den Buuse M. The effect of
low estrogen state on serotonin transporter function in mouse hippocampus:
a behavioral and electrochemical study. Brain Res 2005 Dec; 1064: 10-20.
- Blakely RD, Berson HE, Freneau RT, Jr., Caron MG, Peek MM, Prince HK, et al. Cloning and
expression of a functional serotonin transporter from rat brain. Nature 1991 Nov;
354: 66-70.
- Cervilla JA, Rivera M, Molina E, Torres-Gonzalez F, Bellon JA, Moreno B, de Dios Luna J,
Lorente JA, de Diego-Otero Y, King M, Nazareth I, Gutierrez B. The 5-HTTLPR s/s
genotype at the serotonin transporter gene (SLC6A4) increases the risk for depression
in a large cohort of primary care attendees: the PREDICT-gene study. Am J Med
Genet B Neuropsychiatr Genet 2006; 141: 912-917.
- Chang AS, Chang SM, Starnes DM, Schroeter S, Bauman AL, Blakely RD. Cloning and
expression of the mouse serotonin transporter. Brain Res Mol Brain Res 1996 Dec;43:
185-92.
- Di Bella D, Erzegovesi S, Cavallini MC, Bellodi L. Obsessive-Compulsive Disorder, 5-HTTLPR
polymorphism and treatment response. Pharmacogenomics J 2002; 2: 176-81.
- Dubertret C, Hanoun N, Ades J, Hamon M, Gorwood P. Family-based association study of the
5-HT transporter gene and schizophrenia. Int J Neuropsychopharmacol 2005 Mar;
8: 87-92.

- Farre D, Roset R, Huerta M, Adsuara JE, Rosello L, Alba MM, Messeguer X. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. Nucleic Acids Res 2003; 31: 3651-3653.
- Fisker S, Hansen B, Fuglsang J, Kristensen K, Ovesen P, Ørskov H, Jørgensen JO. Gene expression of the GH receptor in subcutaneous and intraabdominal fat in healthy females: relationship to GH-binding protein. Eur J Endocrinol 2004 Jun; 150(6): 773-7.
- Franceschi S, Gallus S, Talamini R, Tavani A, Negri E, La Vecchia C. Menopause and colorectal cancer. Br J Cancer 2000 Jun; 82: 1860-2.
- Gaysina D, Zainullina A, Gabdulhakov R, Khusnutdinova E. The serotonin transporter gene: polymorphism and haplotype analysis in Russian suicide attempters. Neuropsychobiology 2006; 54: 70-4.
- Gelernter J, Kranzler H, Coccaro EF, Siever LJ, New AS. Serotonin transporter protein gene polymorphism and personality measures in African American and European American subjects. Am J Psychiatry 1998 Oct; 155: 1332-8.
- Glatz K, Mossner R, Heils A, Lesch KP. Glucocorticoid-regulated human serotonin transporter (5-HTT) expression is modulated by the 5-HTT gene-promotor-linked polymorphic region. J Neurochem 2003 Sep; 86: 1072-8.
- Gonda X, Juhasz G, Laszik A, Rihmer Z, Bagdy G. Subthreshold depression is linked to the functional polymorphism of the 5HT transporter gene. J Affect Disord 2005; 87: 291-297.
- Grodstein F, Newcomb PA, Stampfer MJ. Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. Am J Med 1999 May; 106: 574-82.
- Heils A, Mossner R, Lesch KP. The human serotonin transporter gene polymorphism--basic research and clinical implications. J Neural Transm 1997; 104: 1005-14.
- Heils A, Teufel A, Petri S, Stober G, Riederer P, Bengel D, et al. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. J Neurochem 1996 Jun; 66: 2621-4.
- Hoffman BJ, Mezey E, Brownstein MJ. Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. Science 1991 Oct; 254: 579-80.
- Hu LH, Chen FH, Li YR, Wang L. Real-time determination of human telomerase reverse transcriptase mRNA in gastric cancer. World J Gastroenterol 2004 Dec 1; 10(23): 3514-7.
- Jeyabalan G, Geller DA. The importance of platelet-derived serotonin in mediating hepatic regeneration. J Hepatol 2006.

- Kubota N, Kiuchi Y, Nemoto M, Oyamada H, Ohno M, Funahashi H, Shioda S, Oguchi K. Regulation of serotonin transporter gene expression in human glial cells by growth factors. Eur J Pharmacol 2001; 417: 69-76.
- Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. Science 1996 Nov; 274: 1527-31.
- Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, et al. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. Science 2006 Apr; 312: 104-7.
- McQueen JK, Wilson H, Sumner BE, Fink G. Serotonin transporter (SERT) mRNA and binding site densities in male rat brain affected by sex steroids. Brain Res Mol Brain Res 1999 Jan; 63: 241-7.
- Messeguer X, Escudero R, Farre D, Nunez O, Martinez J, Alba MM. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. Bioinformatics 2002; 18: 333-334.
- Mortensen OV, Kristensen AS, Rudnick G, Wiborg O. Molecular cloning, expression and characterization of a bovine serotonin transporter. Brain Res Mol Brain Res 1999 Jul; 71: 120-6.
- Mortensen OV, Thomassen M, Larsen MB, Whitemore SR, Wiborg O. Functional analysis of a novel human serotonin transporter gene promoter in immortalized raphe cells. Brain Res Mol Brain Res 1999 May; 68: 141-8.
- Mossner R, Henneberg A, Schmitt A, Syagailo YV, Grassle M, Hennig T, Simantov R, Gerlach M, Riederer P, Lesch KP. Allelic variation of serotonin transporter expression is associated with depression in Parkinson's disease. Mol Psychiatry 2001; 6: 350-352.
- Mossner R, Schmitt A, Syagailo Y, Gerlach M, Riederer P, Lesch KP. The serotonin transporter in Alzheimer's and Parkinson's disease. J Neural Transm Suppl 2000; 345-350.
- Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. Mol Interv 2004 Apr; 4: 109-23.
- Narita N, Narita M, Takashima S, Nakayama M, Nagai T, Okado N. Serotonin transporter gene variation is a risk factor for sudden infant death syndrome in the Japanese population. Pediatrics 2001 Apr; 107: 690-2.
- Pecins-Thompson M, Brown NA, Bethea CL. Regulation of serotonin re-uptake transporter mRNA expression by ovarian steroids in rhesus macaques. Brain Res Mol Brain Res 1998 Jan; 53: 120-9.

- Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, et al. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. Proc Natl Acad Sci U S A 1993 Mar ; 90: 2542-6.
- Soares R, Balogh G, Guo S, Gartner F, Russo J, Schmitt F. Evidence for the notch signaling pathway on the role of estrogen in angiogenesis. Mol Endocrinol 2004 Sep;18: 2333-43.
- Tencomnao T, Kapitonov D, Bieberich E, Yu RK. Transcriptional regulation of the human UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase (hCGT) gene expression: functional role of GC-box and CRE. Glycoconj J 2004;20: 339-51.
- Tencomnao T, Yu RK, Kapitonov D. Characterization of the human UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase gene promoter. Biochim Biophys Acta 2001;1517: 416-23.
- Torrego A, Pujols L, Roca-Ferrer J, Mullol J, Xaubet A, Picado C. Glucocorticoid receptor isoforms alpha and beta in in vitro cytokine-induced glucocorticoid insensitivity. Am J Respir Crit Care Med 2004 Aug 15; 170(4): 420-5.
- Troisi R, Schairer C, Chow WH, Schatzkin A, Brinton LA, Fraumeni JF, Jr. A prospective study of menopausal hormones and risk of colorectal cancer (United States). Cancer Causes Control 1997 Mar; 8: 130-8.
- Xu W, Tamim H, Shapiro S, Stang MR, Collet JP. Use of antidepressants and risk of colorectal cancer: a nested case-control study. Lancet Oncol 2006 Apr; 7: 301-8.
- You JS, Hu SY, Chen B, Zhang HG. Serotonin transporter and tryptophan hydroxylase gene polymorphisms in Chinese patients with generalized anxiety disorder. Psychiatr Genet 2005; 15: 7-11.
- You HJ, Kim JY, Jeong HG. 17 beta-estradiol increases inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. Biochem Biophys Res Commun 2003; 303:1129-1134.

Output ที่ได้จากโครงการ

ระดับชาติ (เป็นการนำเสนอแบบโปสเตอร์)

ผลงานวิจัย เรื่อง “บทบาทของความหลากหลายของยีนในการควบคุมการแสดงออกของ serotonin transporter” ได้รับรางวัลการนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ดีเด่น ในงานการประชุมวิชาการวิศวกรรมชีวการแพทย์แห่งชาติ ครั้งที่ 5 เมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม พ.ศ.2550 ณ โรงแรมทวินทาวเวอร์ กรุงเทพมหานคร จัดโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ร่วมกับสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)



ผศ.ดร.เทวิน เทนคำเนาว์ (หัวหน้าโครงการวิจัย) รับรางวัลจาก ศาสตราจารย์ ดร.ไพรัช ธัชยพงษ์ ประธานกลุ่มความร่วมมือด้านวิศวกรรมชีวการแพทย์ (Thai BME Consortium)

ระดับนานาชาติ (เป็นการนำเสนอแบบบรรยาย)

“Serotonin transporter-linked promoter region (5-HTTLPR) polymorphism detection by a novel touchdown PCR genotyping method”. Tencomnao T., Prasansuklab A., and Poovorawan Y. Oral presentation in The 6th Annual International Mental Health Conference. August 1 – 3, 2007 at Prince Palace Hotel, Bangkok, Thailand

งานประชุมระดับนานาชาติดังกล่าว จัดโดยกรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข ประเด็นสำคัญของการนำเสนอโดยคณะผู้วิจัย คือ การพัฒนาเทคนิค touchdown PCR สำหรับหาจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR ซึ่งทำได้สะดวก มีประโยชน์ในการเพิ่มประสิทธิภาพดีกว่า conventional PCR ทั้งด้านความไว และความจำเพาะ โดยเฉพาะในกรณีเช่นนี้ ซึ่งดีเอ็นเอมีลักษณะเป็น GC-rich templates ปัจจุบันบทความของผลงานนี้ ได้ถูกบันทึกไว้ในเว็บไซต์ของ กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข

รายละเอียดงานวิจัยเรื่อง/Title Name: Serotonin transporter-linked promoter region (5 HTTLPR) polymorphism detection by a novel touchdown PCR genotyping method.	
ผู้วิจัย/Authors:	Tewin Tencomnao, Anchalee Prasarnsuklar, Yong Poovorawan
ชื่อเรื่อง/Title:	Serotonin transporter-linked promoter region (5 HTTLPR) polymorphism detection by a novel touchdown PCR genotyping method.
แหล่งที่มา/Source:	Mental Health in the City. No.6, 2007.1-3 August 2007 ณ. โรงแรมปรีชาพาเลซ กรุงเทพมหานคร Page 47.
รายละเอียด / Details:	The serotonin transporter-linked promoter region (5-HTTLPR) polymorphism occurred by insertion/deletion is evident to result in three different length alleles namely S,L as predominant variant alleles and XL as a rare one. These three alleles have 14, 16 and 18 or 20 repetitive DNA sequences, respectively and have been shown to associate with certain neuropsychiatric diseases. The 5-HTTLPR polymorphism has been demonstrated to significantly depend on ethnic groups, and it today becomes of great importance for pharmacogenomics in psychiatry. However, the 5-HTTLPR genotype distribution and allele frequency in Thai population have not been elucidated. Variable number of tandem repeat polymorphisms (VNTR) including this particular one are frequently analyzed by conventional polymerase chain reaction (PCR), but it is difficult for the 5-HTTLPR polymorphism genotyping due to high GC-rich genomic DNA templates. Therefore, the use of high-cost chemicals such as 7-deaza-dGTP in PCR reactions has been noted to minimize the PCR dilemma. Herein, we successfully developed a new PCR approach called touchdown (TD) PCR, a versatile one-step procedure by which primers would avoid amplifying nonspecific sequence without using the deaza-dGTP. The protocol relied on incremental annealing temperature decreases in progressive cycles designed to bracket the melting temperature of the reaction. The genotyping result could be satisfactorily validated using a Taq polymerase manufactured for GC-rich templates. Our novel finding will be of great benefit in genotyping 5-HTTLPR polymorphism in laboratories.
ปีที่เผยแพร่/Year:	2007
Keywords:	5 HTTLPR, serotonin, DNA, genotype, pharmacogenomic, psychiatry, polymorphism, neuroscience, 5-HT, The serotonin transporter linked promoter region
Address:	Department of clinical chemistry, Faculty of Allied Health Sciences; Center of Excellence in viral hepatitis research unit, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand.
Code:	200700079
ISSN/ISBN:	2859-497-X
Country of publication:	Thailand
Language:	English
Category:	abstract
Download:	