บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

2.1 Matrix metalloproteinases (MMPs)

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์และ extracellular matrix (ECM) มีความสำคัญมากต่อกระบวนการทางสรีรวิทยา ด้วยระบบของการย่อยสลายโปรตีน (proteolytic) ที่สร้างได้จากเซลล์ซึ่งมีหน้าที่ย่อยสลายสารชีวโมเลกุลที่เป็นส่วนประกอบของ ECM การควบคุมความสมดุลของโครงสร้าง ECM นั้นจะส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ การเปลี่ยนแปลงเซลล์ และการตายของเซลล์ ดังนั้นการที่ระบบเอนไซม์นี้สูญเสียความสมดุลจะทำให้เกิดพัฒนาที่ผิดปกติของตัวอ่อนและนำไปสู่การเกิดโรคหลายอย่าง อันเนื่องมาจากการย่อยสลาย ECM มากเกินไป (Massova *et al.*, 1998 และ Das *et al.*, 2002)

Matrix metalloproteinases (MMPs) เป็นเอนไซม์หลักของระบบเอนไซม์ในกลุ่ม proteolytic ที่ควบคุมการทำงานระหว่างเซลล์กับส่วน ECM โปรตีน MMPs จัดเป็น zinc-dependent endopeptidase ที่สามารถย่อยสลายส่วนประกอบของโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของ ECM รวมถึงโปรตีนที่ไม่ใช่ส่วนประกอบโครงสร้าง ECM ด้วย MMPs นั้นเป็นกลุ่มของโปรตีนที่มีหลายชนิดที่มีลักษณะทางโครงสร้างของโปรตีนคล้ายๆกัน ซึ่งถอดรหัสได้จากยีนที่ต่างกัน อย่างไรก็ตาม MMPs จะมีลักษณะทางโครงสร้างแตกต่างกันบางขึ้นอยู่กับชนิดของ MMPs นั้น (Massova *et al.*, 1998) โดยทั่วไปแล้ว MMPs จะมีช่วงของลำดับกรดอะมิโนที่เป็นตัวกำหนดกิจกรรมการทำงานของโปรตีน ที่เรียกว่า “domain” MMPs ทุกชนิดประกอบด้วย domains ที่สำคัญ 3 domains ได้แก่ pro-peptide domain มีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการทำงานของ MMPs catalytic domain ซึ่งจะมีขนาดประมาณ 100 กรดอะมิโน และ catalytic domain จะประกอบไปด้วย zinc binding site และ conserved methionine โดยใน domain นี้จะมี zinc และ calcium เป็นองค์ประกอบซึ่งจะช่วยในการรักษาโครงสร้างสามมิติ ซึ่งมีความจำเป็นอย่างมาต่อความเสถียรภาพและกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ใน MMPs บางชนิด เช่น stromelysin-1, stromelysin-2 และ interstitial collagenase จะมีส่วนที่เรียกว่า hemopexin-like-domain ที่ปลาย C-terminal และใน MMPs ชนิด gelatinase A และ B จะมี hemopexin-like-domain อยู่ระหว่าง active enzyme และ zinc binding sites นอกจากนี้ใน MMPs ชนิด gelatinase B จะมี type V collagen-like domain อยู่ระหว่าง zinc binding domain และ

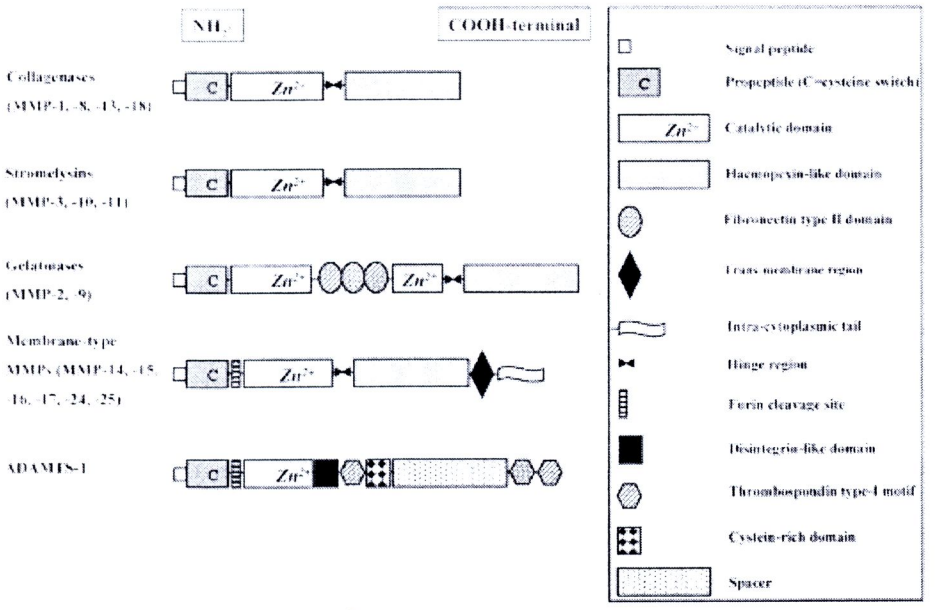
haemeopexin-like C-terminal domain และเอนไซม์เหล่านี้จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน (Woesner, 1991; Twining, 1994 และ Ravanti and Kahari, 2000)

เซลล์ปกติส่วนมากจะสังเคราะห์และหลั่ง MMPs ออกสู่ ECM ทันที (Woessner, 1991) แต่ในเซลล์ที่มีการอักเสบ protease บางชนิดจะถูกเก็บเอาไว้ภายในเซลล์ เช่น neutrophil collagenase และ gelatinase B นอกจากนี้ MMPs แต่ละชนิดจะมีการกระจายในแต่ละเนื้อเยื่อแตกต่างกัน และ MMPs บางชนิด เช่น gelatinase A พบว่าจะมีการสังเคราะห์เป็นปกติอยู่แล้วในหลายๆ เซลล์ ในขณะที่บางชนิด เช่น collagenase นั้นจะต้องได้รับการกระตุ้นจึงจะมีการสังเคราะห์เกิดขึ้น (Fini and Girard,1990)

มีหลักฐานที่ชี้ให้เห็นว่า MMPs นั้นมีบทบาทต่อการกระบวนทางสรีรวิทยาและการก่อให้เกิดโรค เช่น embryogenesis, wound healing, inflammation, arthritis, cardiovascular diseases และ มะเร็ง ตัวอย่าง เช่น การรักษาสมดุลทางโครงสร้างของเส้นเลือดแดงที่สำคัญ (arteries) โดยเฉพาะ aorta ที่จะประกอบด้วย collagen และ elastin ที่ผนังของเส้นเลือดเพื่อป้องการถูกทำลาย การที่หลอดเลือดได้รับบาดเจ็บ เช่น atherosclerosis เป็นต้น จะส่งผลให้เกิดกระบวนการอักเสบซึ่งทำให้เกิดการสังเคราะห์ MMPs มากขึ้นนำไปสู่การย่อยสลายของหลอดเลือด ผนังหลอดเลือดเกิดการขยายตัวทำให้เพิ่มโอกาสการทำลายสูงขึ้น (Vine and Powell, 1991) การย่อยสลายของผนังเลือดแดงนั้นเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการพัฒนาเป็นหลอดเลือดโป่งพอง (aneurysms) ซึ่งพบว่าจะมีการสังเคราะห์ gelatinase B สูงขึ้นที่ abdominal aortic aneurysms (Heron *et al.*, 1991) ซึ่งการที่โครงสร้างของเส้นเลือดแดงเกิดความผิดปกตินั้นมีผลมาจากโครงสร้างของ collagen ที่ผิดปกติไป ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากกระบวนการควบคุมการทำงานของระบบเอนไซม์ proteolytic มีการเปลี่ยนแปลง จนทำให้ความสมดุลของ MMPs และตัวยับยั้งผิดปกติ (Denhardt *et al.*, 1993)

2.1.1 โครงสร้างของ MMPs (Nagase and Woessner, 1999)

โดยทั่วไปแล้ว MMPs จะลักษณะโครงสร้าง domain ที่คล้ายคลึงกัน โดยประกอบด้วย domain สำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ pro-peptide, catalytic domain และ haemeopexin-like C-terminal domain ซึ่ง haemeopexin-like C-terminal domain นั้นจะเชื่อมต่อกับส่วน catalytic domain ด้วย flexible hinge region ดังรูป 2.1



รูป 2.1 แสดงโครงสร้าง domains ต่างๆ ที่ประกอบเป็นโปรตีน matrix metalloproteinases (Posthumus *et al.*, 2004)

1. Pro-peptide

MMPs ที่สังเคราะห์ได้นั้นจะอยู่ในรูป inactive form เรียกว่า zymogens ที่มีส่วนของ pro-peptide domain ซึ่งการกำจัดส่วนนี้ออกจะทำให้ MMPs อยู่รูป active form ในส่วนของ pro-peptide domain จะมี cysteine switch โดยจะถูกอนุรักษ์ไว้เพื่อจับกับ zinc binding site ใน active site ผ่าน cysteine residue ซึ่งทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ลำดับกรดอะมิโนที่ถูกอนุรักษ์สำหรับ cystein residue คือ PRCGxPD และ MMPs บางชนิดอาจจะมีส่วน furin recognition site (prohormone convertase cleavage site) ในส่วน pro-peptide ด้วย

2. Catalytic domain

จากการศึกษาโครงสร้างของ MMPs หลายชนิด ด้วยวิธี x-ray crystallographic พบว่าในส่วน catalytic domain นั้นจะมี active site ขนาด 2 nm และในการเกิด active site ที่ catalytic domain นั้นจะมี zinc ion เป็นตัวกระตุ้นที่สำคัญต่อการทำงาน ซึ่ง zinc จะจับกับส่วนที่เป็น histidine residues ลำดับกรดอะมิโนที่ถูกอนุรักษ์ของส่วนนี้คือ HExxHxxGxxH เรียกว่าเป็น zinc binding motif

3. Hinge region

เป็นส่วนที่เชื่อมต่อระหว่าง catalytic domains กับส่วนที่เป็น C-terminal domain จะมีความยาวของกรดอะมิโนประมาณ 75 ตัว และมีโครงสร้างที่ไม่แน่นอน

4. Haemopexin-like C-terminal domain

C-terminal domain มีลักษณะทางโครงสร้างที่คล้ายกับ serum protein haemopexin และโครงสร้างจะประกอบด้วย 4 bladed β-propeller ซึ่งโครงสร้างนี้จะเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน ซึ่งจะทำหน้าที่กำหนดความจำเพาะของสารตั้งต้นและ TIMPs ที่จะเข้าจับกับ MMPs และไม่พบ domain นี้ใน MMP-7, MMP-23, MMP-26, พืช และ nematode นอกจากนี้ MMPs ชนิด MT-MMPs จะถูกยึดติดอยู่กับ plasma membrane ผ่านส่วนของกรดอะมิโนที่เป็น transmembrane domain หรือ GPI-anchoring domain

2.1.2 การควบคุมของการสังเคราะห์ MMPs

เพื่อป้องกันการถูกทำลายของเนื้อเยื่อ การควบคุมกิจกรรมการทำงานของ MMPs จึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง ความสมดุลของระหว่าง MMPs กับตัวยับยั้งของ MMPs จึงบ่งชี้ถึง ECM turnover MMPs หลายชนิดที่ไม่ได้มีการแสดงออกเป็นปกติ แต่อาจจะต้องมีการกระตุ้นจากสภาวะแวดล้อมภายนอกเซลล์ดังนั้นการสร้าง MMPs เหล่านี้จึงจำเป็นต้องถูกควบคุมในหลายระดับ เช่น signal transduction proceeding transcription, posttranscription และ posttranslational processing

1. Signal transduction pathway

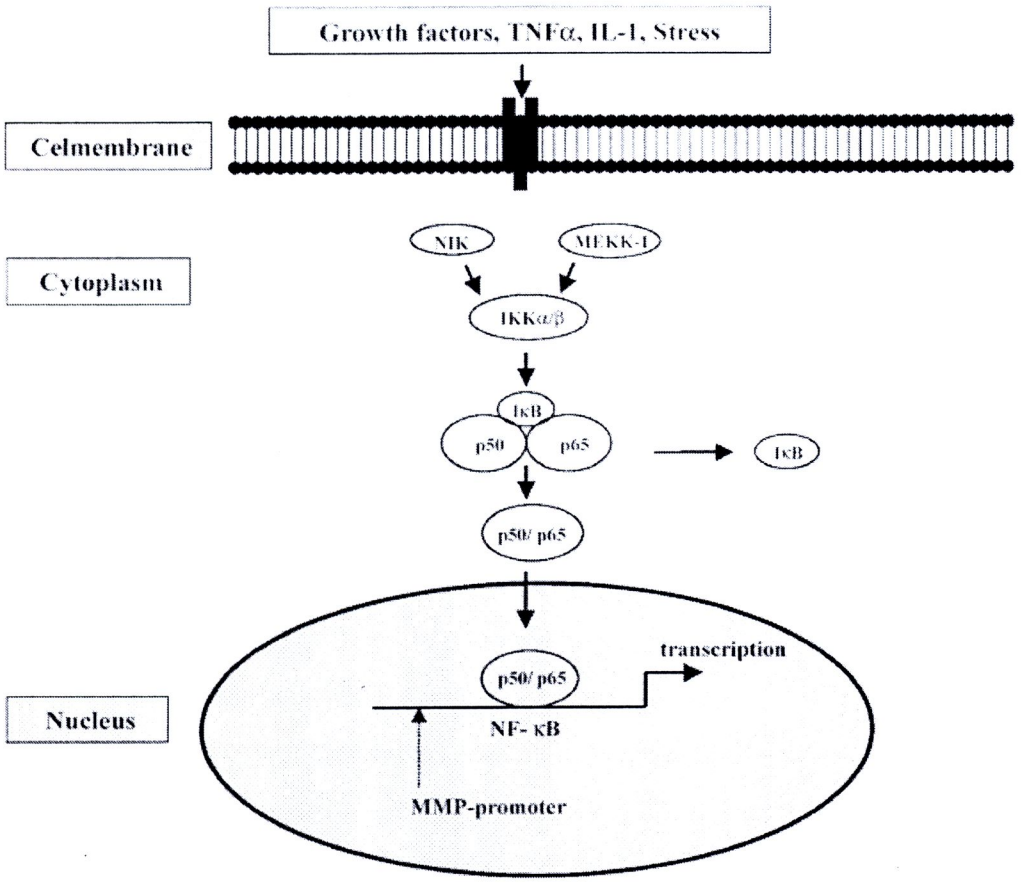
การแสดงของยีนสามารถเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากการกระตุ้นหลายชนิดจากสภาพแวดล้อมภายนอกเซลล์ เช่น inflammatory cytokines, growth factor และ matrix proteins การส่งสัญญาณการกระตุ้นจากสภาวะภายนอกเซลล์นั้นจะถูกส่งต่อไปยังนิวเคลียสเพื่อกระตุ้นการทำงานของ transcription factor ผ่านทาง signal transduction pathway เช่น nuclear factor κB (NF-κB), mitogen-activated protein kinase (MAPK) และ signal transducers and activators of transcription (STAT) pathway (Malinin *et al.*, 1997; Vincenti, 2001 และ Li *et al.*, 2001)

สำหรับการแสดงออกของยีน MMPs หลายชนิดจะมี transcription factor binding site ที่สำคัญหลายตำแหน่ง เช่น NF-κB, activating protein-1 (AP-1), STAT และ polyoma enhancer A-binding protein-3 (PEA-3) sites

NF-κB pathway (รูป 2.2)

กลุ่มของ NF-κB/Rel ประกอบด้วย NF-κB1 (p50/p150), NF-κB2 (p50/p100), p65 (RelA), RelB และ c-Rel (Chen *et al.*, 1999) ส่วนมากรูปแบบที่ active ของ transcription factor กลุ่มนี้จะอยู่ในรูป heterodimer ของ p65 ที่รวมกับ p50 หรือ p52 (Tak and Firestein, 2001)

เมื่อเกิดการจับกันของ IL-1 และ/หรือ TNF-α กับ receptor จะทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ โปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์ผ่านทาง cytoplamic domain ของ receptor และโปรตีน complex นี้จะไปกระตุ้นการทำงานของ NF-κB inducing kinase (NIK) (Malinin *et al.*, 1997) และ mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1 (MEKK-1) และโปรตีนในกลุ่มของ MAPK kinase kinase (MAPKKK) (Lee *et al.*, 1997) จะกระตุ้น inhibitor of κB kinase (IKK-α, IKK-β และ IKK-γ) และ IKKs จะทำหน้าที่ phosphorylation ให้กับ inhibitor of κB (IκB) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ NF-κB ทำให้ NF-κB ไม่สามารถเข้าสู่นิวเคลียสได้ หลังจากที่เกิดกระบวน phosphorylation ของ IκB จะส่งผลให้เกิดการทำลาย IκB ด้วยการกระบวน proteosome–mediated proteolytic และทำให้ p50 และ p65 ของ NF-κB สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส ที่ซึ่งจะไปจับกับตำแหน่ง NF-κB binding site ที่บริเวณส่วนควบคุมการแสดองของยีน (promoter) เช่น MMP-1 promoter ซึ่ง binding site เหล่านี้จะร่วมทำงานกับ binding site อื่นๆ เช่น AP-1 site (Vincenti *et al.*, 1998) และการกระตุ้นที่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมกัน เรียกว่า cross-talk และจะมีความสำคัญกับการแสดงออกของ MMPs หลายชนิดเช่น MMP-3 (Kirstein *et al.*, 1996) และ MMP-9 (Yokoo and Kitamura, 1996)



รูป 2.2 วิถีการส่งสัญญาณ (signal transduction pathway) ของ nuclear factor-κB (NF-κB) NIK; NF-κB inducing kinase, MEKK-1; mitogen activated protein kinase/ERK (extra-cellular stimulus regulated kinase) kinase kinase-1, IKKα/β; inhibitor of κB kinase, IκB; inhibitor of κB (Posthumus *et al.*, 2004)

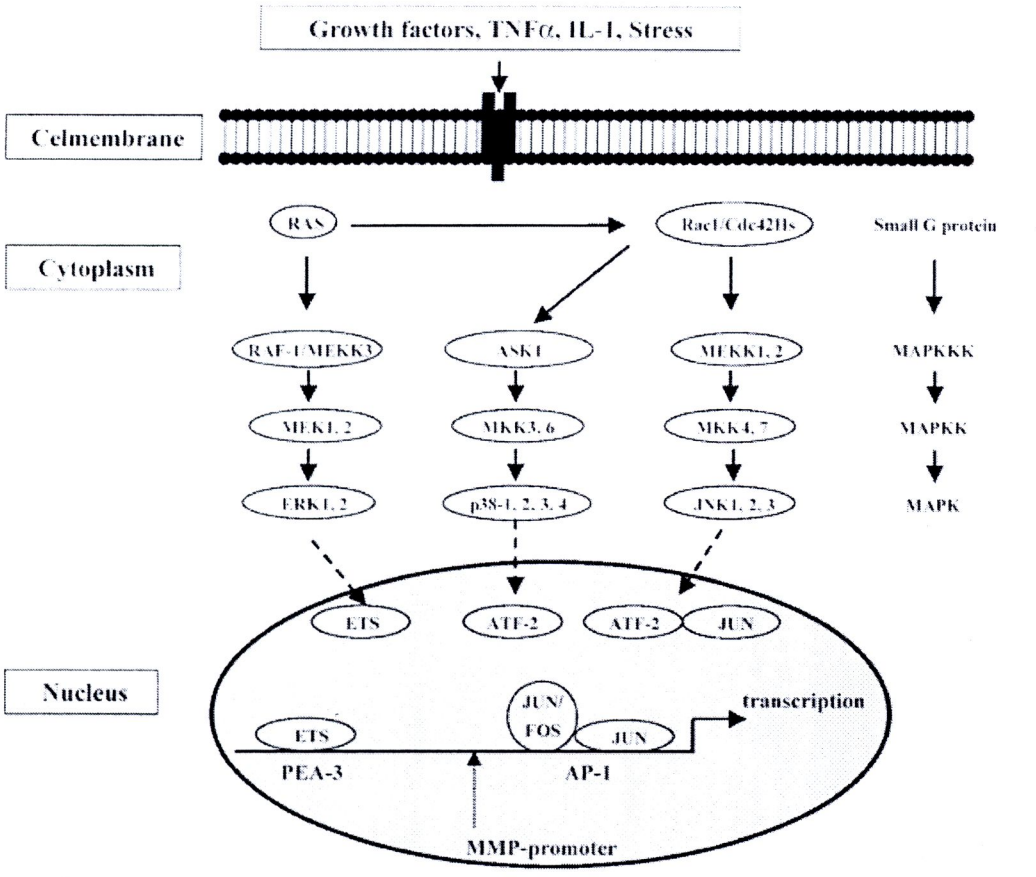
MAPK pathway (รูป 2.3)

IL-1 และ TNF-α สามารถกระตุ้น MAPK pathway โดยลำดับการส่งสัญญาณของ MAPK (Vincenti, 2001) นั้นจะประกอบด้วยด้วยโปรตีน kinase ที่กระตุ้นการทำงานของโปรตีน kinase ด้วยกระบวนการ phosphorylation เป็นลำดับต่อๆ กันไป และสุดท้ายแล้วจะไปกระตุ้น transcription factor (Garrington and Jonson, 1999) สำหรับการแสดงออกของยีน MMPs จะมีกลุ่มของ MAPKs ที่สำคัญ 3 กลุ่ม ได้แก่ extra-cellular stimulus-regulated kinases (ERK), c-Jun N-terminal kinases (JNK) และ p38 MAPK (p38)

หลังจากที่มีการจับกันของตัวกระตุ้นจากสภาวะภายนอกเซลล์ เช่น cytokines หรือ growth factor กับ receptor ของมัน จะทำให้ small guanylyl tripohosphate (GTP)-binding proteins เช่น Ras

(Rac, Cdc42) ไปกระตุ้นการทำงานของ MAPKKK และ MAPKKK จะไปเติมหมู่ phosphate ให้กับ MAPKK เพื่อกระตุ้นการทำงาน และ MAPKK จะกระตุ้นการทำงานของ MAPK (ERK, JNK และ p38) เมื่อ MAPK ถูกกระตุ้นจะเคลื่อนที่จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่นิวเคลียส ที่ซึ่ง MAPK นั้นสามารถกระตุ้นการทำงานของ transcription factors โดยการเติมหมู่ phosphate ให้กับ transcription factors ได้ เช่น erythroblastosis twenty-six (ETS), jun และ activating transcription factor 2 (ATF-2) โดยผ่าน pathway ของ ERK, JNK และ p38 ตามลำดับ และ transcription factor เหล่านี้จะจับกับตำแหน่งที่ดีเอ็นเอที่จำเพาะในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน เช่น AP-1 stie เป็นตำแหน่งสำหรับจับกับโปรตีนในกลุ่ม fos และ jun และ PEA-3 sites เป็นตำแหน่งสำหรับจับกับโปรตีนในกลุ่ม ETS ซึ่งการจับกันของ transcription factors กับตำแหน่งของดีเอ็นเอจำเพาะนี้จะเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการ transcription ของยีนหลายยีน ไม่เพียงแต่ยีนเป้าหมาย เช่น MMPs เท่านั้น แม้แต่ยีนของ transcription factor เอง เช่น c-fos, jun และอื่นๆ ก็จะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเช่นกัน

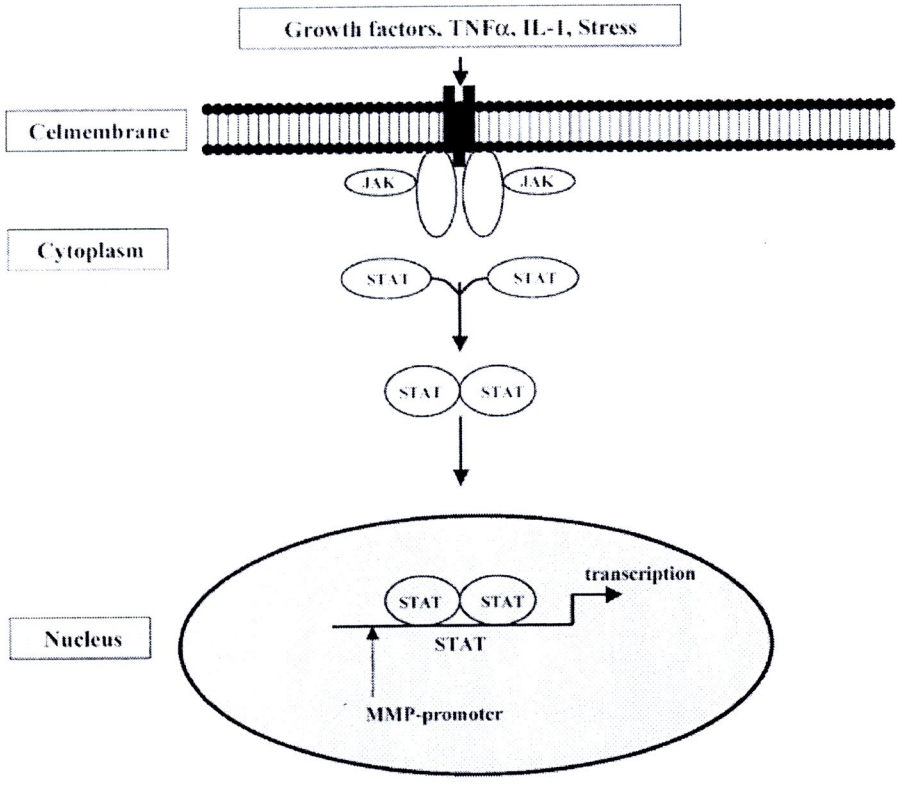
ปัจจุบันยังคงไม่สามารถอธิบายเกี่ยวกับ pathway ของ p38 ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งยังไม่ทราบถึงเป้าหมายที่ p38 จะไปมีบทบาทในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีนใน MMPs อย่างไรก็ตาม p38 นั้นสามารถกระตุ้นการทำงานของ transcription factor เช่น ATF-2 และ Elk-2 (ที่เป็นสมาชิกของ ETS) ซึ่งจะสามารถส่งผลต่อส่วนควบคุมการแสดงของยีน c-jun และ c-fos ได้ บางทีการส่งเสริมการแสดงออกของยีน transcription factor ก็สามารถส่งผลต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายได้ นั้นแสดงให้เห็นว่า p38 อาจจะส่งผลต่อการแสดงออกของยีน MMP โดยอ้อมก็เป็นไปได้ (Vincenti and Brinckerhoff, 2002)



รูป 2.3 วิถีการส่งสัญญาณ (signal transduction pathway) ของ mitogen activated protein kinase (MAPK) MEKK; mitogen activated protein kinase/ERK (extra-cellular stimulus-regulated kinase) kinase kinase, ASK-1; apoptosis signal-regulating kinase 1, ERK; extra-cellular stimulus-regulated kinase, JNK; c-Jun N-terminal kinase, ETS; erytroblastosis twenty six, ATF-2; activating transcription factor-2, PEA-3; polyoma enhancer A-binding protein-3 binding site, AP-1; activating protein-1 binding site (Posthumus *et al.*, 2004)

STAT pathway (รูป 2.4)

เมื่อสิ่งเร้าภายนอกเซลล์จับกับ Janus kinases receptor จะเกิดการกระตุ้นการทำงานของ STATs และ STATs ที่ถูกเติมหมู่ phosphate จะจับกันเองเป็น dimer และย้ายเข้าสู่นิวเคลียสที่ซึ่งจะจับกับตำแหน่งจำเพาะบนดีเอ็นเอในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMPs (Vincenti, 2001) Li และคณะ (2001) ได้ทดสอบ oncostatin ซึ่งจัดอยู่ใน superfamily ของ IL-6 พบว่าสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-1, -3, -13 และ TIMP-3 ในเซลล์กระดูกอ่อนโดยผ่านการกระตุ้นจาก JAK/STAT และ MAPK signaling cascades (Li *et al.*, 2001)



รูป 2.4 วิถีการส่งสัญญาณของ STAT (signal transducers and activators of transcription) JNK; Janus kinases (Posthumus *et al.*, 2004)

Transcription repression

การแสดงออกของยีนนั้นสามารถถูกยับยั้งได้ เช่น glucocorticoids จับกับ glucocorticoid receptor ที่อยู่ภายในเซลล์ ทำให้เกิดการย้ายเข้าสู่นิวเคลียส และเข้าไปเกาะกับตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ตอบสนองกับ glucocorticoid ในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน ซึ่งกลไกนี้สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนหลายยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบ นอกจากนี้ glucocorticoid receptor สามารถรบกวนการทำงานของ transcription factor เช่น NF-κB ผ่านการกระตุ้นการทำงานของยีน IκB-α และ AP-1 ผ่านการรบกวนลักษณะทางกายภาพร่วมกับ fos และ jun ของ AP-1 (Firestein และ Manning, 1999)

2. ความผันแปร (polymorphism) ของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน

SNPs (single nucleotide polymorphisms) ที่เกิดขึ้นในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMPs นั้นมีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน เนื่องจากในส่วนควบคุมการแสดองออกของยีน

นั้นมีหลายตำแหน่งของดีเอ็นเอที่มีหน้าที่สำหรับการเข้าเกาะของ transcription factors หลายชนิด ดังนั้นตำแหน่งดีเอ็นเอนี้จะมีความสำคัญกับการควบคุมการแสดงออกของยีน MMP ทั้งในระดับปกติ (basal) และระดับที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยสาร เช่น cytokines และ growth factors โดยธรรมชาติแล้วการผันแปรในส่วนดีเอ็นเอที่ควบคุมการแสดงออกของยีนจะส่งผลทำให้ระดับการแสดงออกของยีน MMPs เปลี่ยนแปลงไป (Ye, 2000)โดยเฉลี่ยแล้วจะพบ SNPs ประมาณ 90% ของดีเอ็นเอที่เป็นการแทนที่เบส (base substitutions) หรือการเพิ่มเบส (insertions) (Collins *et al.*, 1998) การเกิดการผันแปรของดีเอ็นเอในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMPs ถูกพบได้ในหลายยีน เช่น MMP-1 และ MMP-3 ในยีน MMP-1 ถูกพบว่ามี 2 alleles คือ การมีเบส guanine 1 เบส (1G) และ 2 เบส (2G) ที่ตำแหน่ง -1607 (-1607:1G/2G) สำหรับในยีน MMP-3 พบว่ามี 2 allele เช่นกันคือ การมีเบส adenine 5 เบส และ 6 เบส ที่ตำแหน่ง -1171 (-1171:5A/6A) โดยตำแหน่งที่เกิดการผันแปรของยีนทั้งสองนี้จะมีผลต่อการเกิดแสดงออกของยีนและเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหลายชนิด เช่น มะเร็ง และ atherosclerosis เป็นต้น

ในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-1 ที่ตำแหน่ง -1607 (และ -1608) 2 guanines ที่อยู่ติดกับ adenine จะทำให้เกิดตำแหน่งจับของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบส 5'-GGA-3' ซึ่ง ETS family transcription factor สามารถจับได้ และการมี allele 2G จะทำให้การแสดงออกของยีนมากกว่า allele แบบ 1G ในเซลล์ fibroblast และ melanoma (Rutter *et al.*, 1998) รวมถึงในเนื้องอกของรังไข่ allele 2G พบมากในคนที่เป็นเนื้องอกรังไข่กว่าคนปกติ (Kanamori *et al.*, 1999) และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของมะเร็ง melanoma (Ye *et al.*, 2001) การศึกษาของ Constantin และคณะ (2002) ไม่พบว่าการเกิด SNP ที่ตำแหน่ง -1607 ในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-1 จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการอ่อนไหวต่อการเกิดโรค หรือความรุนแรงของโรค rheumatoid arthritis

ความผันแปรที่เกิดขึ้นในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ตำแหน่ง -1171:5A/6A มีความสำคัญมากต่อการแสดงออกของยีน จากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง fibroblast และ vascular smooth muscle พบว่า allele แบบ 6A จะมีการแสดงออกได้น้อยกว่า allele แบบ 5A ถึง 2 เท่า ซึ่งศึกษาด้วยวิธี reporter gene technology (Ye *et al.*, 1996) ความแตกต่างในการแสดงออกของยีนที่ต่างกันนี้อาจจะเกิดจากการที่ transcription repressor จับกับลำดับเบสแบบที่เป็น allele แบบ 6A ได้ดีกว่า allele แบบ 5A (Ye *et al.*, 1996 และ Borghaei *et al.*, 1999) และมีการศึกษาพบว่าอิทธิพลของความผันแปรนี้จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค atherosclerosis และมะเร็ง allele แบบ 5A พบว่าจะมีความอ่อนไหวต่อการเกิดโรค acute myocardial infarction (Terashima *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2002) และ abdominal aortic aneurysm (Yoon *et al.*, 1999) ยังมีหลายโรคที่มีความอ่อนไหวต่อการทำลายส่วน matrix นี้อาจจะมีผลมาจากการเพิ่มการแสดงของ MMP-3 นอกจากนี้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 12 มี.ค. 2556
เลขทะเบียน 209147
เลขเรียกหนังสือ

แล้วการมี allele แบบ 6A ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการพัฒนาการของโรค coronary atherosclerosis (Ye *et al.*, 1995) อันเกิดจากการสะสมของ ECM เนื่องจากมีการแสดงออกของยีน MMP-3 น้อยกว่าปกติ (Ye, 2000) และในผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมพบว่าการมี allele แบบ 5A จะมีความสัมพันธ์กับการอ่อนไหวและความรุนแรงต่อโรค (Ghilardi *et al.*, 2002) นอกจากนี้พบว่าคนไข้มะเร็ง colorectal มักจะมีจีโนไทป์แบบ 6A/6A มากกว่าในกลุ่มควบคุม

ในคนไข้ที่เป็นโรคข้อ rheumatoid arthritis ไม่พบความสัมพันธ์ของการเกิดความผันแปรของดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง -1171:5A/6A กับความอ่อนไหวในการเกิดโรค อย่างไรก็ตามจากตรวจสอบข้อต่อที่ถูกทำลายด้วยการฉายรังสี พบว่ามีความรุนแรงและการก้าวหน้าของโรคจะมีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์แบบ 6A/6A (Constantin *et al.*, 2002) ซึ่งจีโนไทป์แบบนี้จะมีผลให้มีเกิดการแสดงออกของยีนน้อยกว่าจีโนไทป์แบบ 5A แต่พบว่ามีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการทำลายข้อต่อ ซึ่งอาจจะเกิดจากความไม่สมดุลของการเชื่อมกัน (linkage unequilibrium) ของยีน MMP-3 กับ MMP-1 เนื่องจากยีนทั้งสองนี้ตั้งอยู่บนโคโมโซมเดียวกันและอยู่ติดกันมากจึงเป็นผลให้เกิดความไม่สมดุลของยีนทั้งสอง จากการศึกษาของมะเร็ง colorectal พบว่า haplotype แบบ 2G MMP-1/6A MMP-3 นั้นถูกพบสูงมากอย่างมีนัยสำคัญ (Hinoda *et al.*, 2002) และจากรายงานของ Keyszer และคณะ พบว่าในคนไข้โรค rheumatoid arthritis นั้นจะพบ haplotypes อยู่ 2 แบบ คือ 1G MMP-1/5A MMP-3 หรือ 2G MMP-1/6A MMP-3 เกือบทั้งหมด (Keyszer *et al.*, 2002)

3. การควบคุมกระบวนการ posttranscriptional

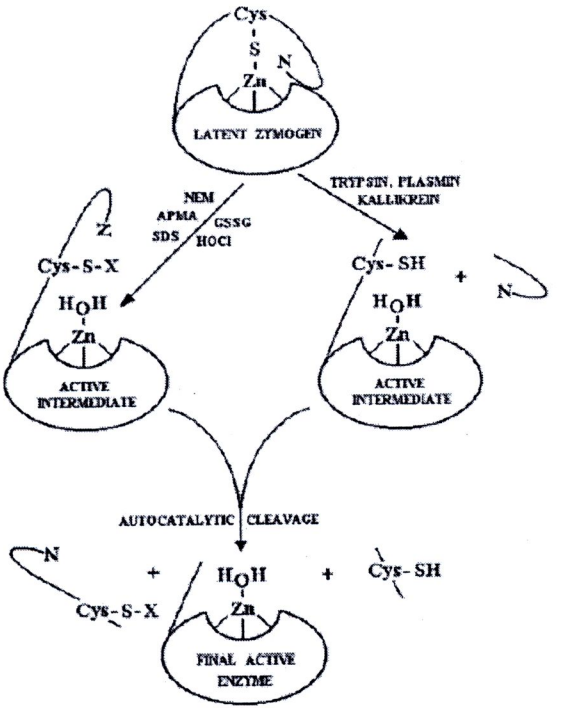
การควบคุมกระบวนการ posttranscription หมายถึง การควบคุมความเสถียรภาพของ mRNA และกระบวนการ translation ซึ่งกระบวนการนี้จะมีผลต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่ม pro-inflammation ซึ่งจะควบคุมผ่านบริเวณที่เรียกว่า adenosine/uridine rich element (AREs) ซึ่งอยู่ในส่วน 3'untranslated region ของ mRNA (Clark, 2000) AREs จะมีผลต่อความไม่เสถียรภาพของ mRNA (Chen and Shyu, 1995) จากการกำจัดส่วน ARE ของ TNF-α ในหนูพบว่า mRNA ของ TNF-α มีความเสถียรภาพสูงขึ้นและทำให้ตัวยับยั้ง p38 MAPK นั้นสูญเสียประสิทธิภาพในการยับยั้งการสังเคราะห์ของ TNF-α (Kontoyiannis *et al.*, 1999) การควบคุมการทำงานของ p38 อาจจะถูกกระตุ้นผ่านโปรตีน mitogen activated protein kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAPK2) และจากการศึกษาโดยทำให้ MAPKAPK2 ไม่ทำงานพบว่าระดับของโปรตีน TNF-α ลดลง แต่ไม่ส่งผลต่อระดับ mRNA ของ TNF-α (Kotlyarov *et al.*, 1999) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า p38 อาจจะควบคุมกระบวนการ translation ของ TNF-α mRNA โดยการกระตุ้นการทำงานผ่าน MAPKAPK2 รวมถึง

กลไกที่เกี่ยวกับ AREs region ในยีน TNF-α นอกจากนี้ p38 และ MAPKAPK2 จะควบคุมความเสถียรภาพของกระบวนการ translation ของ IL-6, IL-8, GM-CSF และ Cox-2 mRNA ในเซลล์เพาะเลี้ยง Hela (Winzen *et al.*, 1999) นอกจากนี้ ARE จะควบคุม mRNA turn over ของยีน cytokine และ prostaglandin แล้วยังควบคุมการสลายของ MMP-transcript เช่น MMP-1 และ บางทีอาจจะเป็น MMP-13 ด้วย (Vincenti and Brinckerhoff, 2001)

2.1.3 การควบคุมการทำงานของ MMPs

1. การกระตุ้นการทำงานของ MMPs

MMPs ที่สังเคราะห์ได้ส่วนมากจะอยู่ในรูป inactive prepro-enzymes และจะถูกหลั่งออกนอกเซลล์ เป็น inactive pro-enzymes แล้วจึงจะถูกกระตุ้นการทำงานได้ด้วยการถูกย่อยผ่านปฏิกิริยา proteolytic ซึ่งในสิ่งมีชีวิตนั้นการกระตุ้นการทำงานของ protease จะถูกย่อยที่ตำแหน่งที่เรียกว่า bait ในส่วนของ propeptide ก่อน ผลที่ได้จะได้เป็น intermediate peptide ที่มีส่วนของ cysteine-zinc interaction ที่ไม่เสถียรภาพ ส่งผลทำให้เกิด proteolytic ครั้งที่ 2 ด้วยตัวของมันเองเรียกว่า autocatalytic (Nagase, 1997) (รูป 2.5) MMPs บางชนิดนั้นจะถูกกระตุ้นตั้งแต่ภายในเซลล์ เช่น MMP-11 และบางชนิดจะถูกกระตุ้นที่ผิวเซลล์ เช่น MMP-2 (Visse and Nagase, 2003)



รูป 2.5 กลไกการกระตุ้นการทำงานของ matrix metalloproteinases (Chakraborti *et al.*, 2003)

2. การยับยั้งการทำงานของ MMPs

MMPs ที่ถูกกระตุ้นการทำงานแล้ว จะสามารถถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วยตัวยับยั้ง เช่น tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) และ α-2macroglobulin (α-2M) ในขณะที่ α-2M จะทำหน้าเป็นตัวยับยั้งหลักในระบบหมุนเวียนโลหิต และ TIMPs จะเป็นตัวยับยั้งในส่วนของเนื้อเยื่อ TIMPs จะประกอบด้วย 2 domain คือ N-terminal domain ยาวประมาณ 125 กรดอะมิโน และ c-terminal domain ยาวประมาณ 65 กรดอะมิโน ซึ่งในแต่ละ domain จะถูกทำให้เสถียรภาพด้วย 3 disulfide bond รูปร่างของ TIMP จะมีลักษณะเหมือน wedge ซึ่งจะเข้าจับกับตำแหน่ง active-site cleft ของ MMP ที่มีรูปร่างคล้ายกับ substrate ของ MMP นั้นๆ (Visse and Nagase, 2003) ถึงแม้ว่า TIMPs จะมี 4 ชนิดที่แตกต่างกันแต่สามารถจับกับ MMPs ที่ถูกกระตุ้นในอัตราส่วน 1:1 enzyme : inhibitor complex ซึ่ง MMPs ต่างชนิดกันจะสามารถจับกับ TIMPs ที่แตกต่างกัน เช่น TIMP-3 เป็นตัวยับยั้งที่ดีสำหรับ TACE (TNF-α converting enzyme) และมีความสำคัญในการยับยั้ง ADAMTS-4 และ -5 (Hashimoto *et al.*, 2001 และ Kashiwagi *et al.*, 2001) นอกจาก TIMPs จะสามารถยับยั้งการทำงานของ MMPs แล้วยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ pro-MMP-2, ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์, การยับยั้งการสร้างหลอดเลือด และกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis (Brew *et al.*, 2000) และนอกจากนี้ยังมีโปรตีน α-2M ที่สามารถยับยั้งการทำงานของ MMPs ได้ ซึ่ง α-2M เป็น plasma glycoprotein ที่ถูกสังเคราะห์จากตับ เซลล์ macrophage และ fibroblast มีขนาดประมาณ M_r 725,000 จะทำหน้าที่ยับยั้ง proteases ที่ถูกกระตุ้นในระบบหมุนเวียนโลหิต α-2M จะต่อต้านการทำงานของ endopeptidase หลายชนิด regardless of their specific protease ที่ถูกกระตุ้นจะเข้าจับกับ α-2M ในส่วน bait-region ซึ่งจะทำให้รูปร่างของ α-2M เปลี่ยนแปลงไป แล้วจะส่งผลต่อการยับยั้งการทำงานของ proteases หลังจากนั้นเซลล์ macrophage และ fibroblast จะกำจัด α-2M-protease complex ด้วยกระบวนการ receptor-mediated endocytosis (Barrett, 1981)

3. การรักษาสภาวะสมดุลของ MMPs

ภายใต้สภาวะการทำงานปกตินั้นระดับของตัวยับยั้ง proteases จะมีมากกว่าระดับ proteases เป้าหมาย การควบคุมการทำงานของ MMPs และตัวยับยั้งด้วยตัวยับยั้งเฉพาะที่ เช่น TIMP จะมีระดับ turnover ต่ำ proteases หลายตัวรวมถึง MMPs ที่ไม่ได้แสดงออกเป็นปกติแต่ต้องถูกกระตุ้นในสภาวะที่ก่อให้เกิดโรคนั้นจะพบว่า กระบวนการ transcription, translation และ activation จะเพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้าม ตัวยับยั้งการทำงานของ proteases ที่มีการแสดงออกเป็นปกตินั้นจะมีการผลิตเพิ่มขึ้นด้วยการกระตุ้นจาก cytokines เช่น IL-1, IL-6 และ TNF-α บทบาทที่สำคัญของ MMPs

ต่อการทำลายส่วน ECM นั้นจะขึ้นอยู่กับความสมดุลของ MMPs ที่ถูกกระตุ้นกับตัวยับยั้งของพวกมัน เช่น TIMPs กับ α-2M

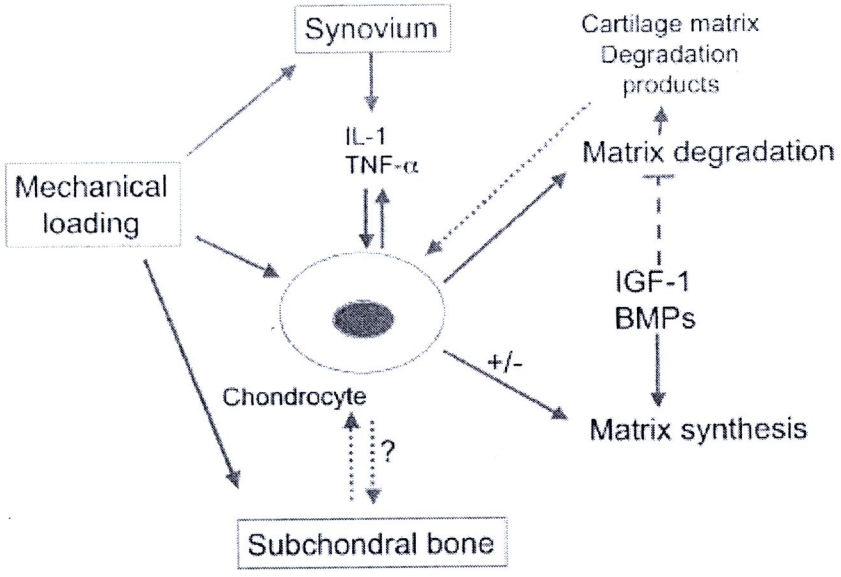
2.1.4 บทบาทของMMPs กับการเกิดโรคต่างๆ

โรคข้อเสื่อม (Goldring, 2006)

เซลล์กระดูกอ่อนที่อยู่ในภาวะที่มีการดำเนินของโรคข้อเสื่อมนั้นจะมีความล้มเหลวในการรักษาสมดุลของกระบวนการสังเคราะห์และการสลายของ ECM ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มระดับการผลิตของเอนไซม์ proteinase ได้แก่ MMPs (MMP1,3 8, และ 13) และ aggrecanases (ADAMTs-4, และ -5) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะส่งผลต่อการทำลายส่วนของกระดูกอ่อน การสูญเสียของ proteoglycan และย่อยของ type II collagen จะเริ่มต้นที่ส่วนพื้นผิวกระดูกอ่อนข้อต่อก่อน ซึ่งจะทำให้ปริมาณน้ำในกระดูกอ่อนสูงขึ้น และยังทำให้เกิดการสูญประสิทธิภาพของความแข็งแรงและยืดหยุ่นของกระดูกอ่อน และจากการศึกษาในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมพบว่าทั้ง aggrecanse และ MMPs นั้นทำให้ aggrecan ถูกย่อยสลายได้ นอกจากนี้ยังพบว่า MMP-13 มีจำเพาะต่อการย่อยสลาย type II collagen จากการศึกษาด้วยวิธี immunolocalization พบว่ามีการแสดงออกของ MMP-13 ในกระดูกอ่อนของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นถึงกลไกการทำลายของเซลล์กระดูกอ่อนที่มีความเกี่ยวข้องกับส่วน matrix ที่นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของกระบวนเมตาบอลิซึมในเซลล์กระดูกอ่อน ในเซลล์กระดูกอ่อนนั้นจะมีโปรตีนตัวรับ (receptor) ที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อความเครียดจากการกระตุ้นด้วยแรงเชิงกล และผลผลิตจากการย่อยสลายของ ECM ซึ่งรวมถึงชิ้นส่วนของ fibronectin (FN) ซึ่งชิ้นส่วนของ FN จะจับกับ intregrin ที่อยู่บนผิวของเซลล์กระดูกอ่อนทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้าง proteinase ที่ย่อยสลายส่วน matrix ซึ่งส่งผลกระทบต่อการเรียงตัวของเส้นใยต่างๆ ใน ECM และเปลี่ยนแปลงเชิงคุณภาพ การกระจายตัว หรือองค์ประกอบของ matrix protein

ในระยะแรกเริ่มของโรคข้อเสื่อม เซลล์กระดูกอ่อนจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นเพียงแค่ชั่วคราวเพื่อเพิ่มปริมาณของ matrix proteins ที่ถูกทำลายไปซึ่งเป็นการตอบสนองของเซลล์กระดูกอ่อนที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมส่วนสึกหรอ จากการศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งหมดในระดับ genomic และ proteomic พบว่ามีการแสดงออกของยีน type II collagen (COL2AI) เพิ่มขึ้น ในระยะแรกเริ่มของโรค ซึ่งอาจจะเกิดจากในระยะนี้เซลล์ยังคงสามารถสร้างสาร anabolic factor เช่น bone morphogenetic protein-2 (BMP2) และ inhibin βA/activin และนอกจากนี้แล้วยังมีสารในกลุ่ม transforming growth factor (TGF)-β ซึ่งอาจจะกระตุ้นการสังเคราะห์ aggrecan พร้อมกับมีการเกิด

fibrocartilage และ osteophytes, โครงสร้างของกระดูกในส่วน periphery ของผิวข้อต่อ และถึงแม้ว่าจะพบว่ามีการแสดงออกของยีน SOX-9 (transcription factor ของยีนในกลุ่ม collagen) ลดลงแต่ก็ไม่ส่งผลต่อการสังเคราะห์ของ type II collagen ในระยะตอนท้ายของการเกิดโรคข้อเสื่อมองค์ประกอบต่างๆ ของ ECM ในกระดูกอ่อนจะถูกทำลายลดลง และไม่สามารถที่จะเพิ่มได้ collagen network ถูกทำลาย และนอกจากนี้เซลล์กระดูกอ่อนจะสูญเสียความสามารถในการซ่อมแซมเนื่องจากความเครียดทำให้เกิดการตายของเซลล์กระดูกอ่อนแบบ apoptosis หรือ senescence



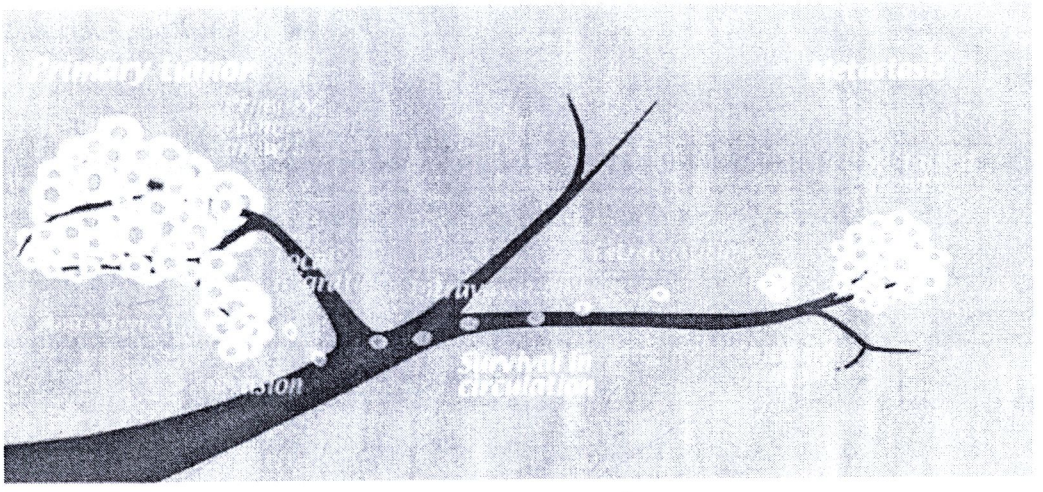
รูป 2.6 กลไกการเกิดโรคข้อเสื่อม IL-1; interleukin-1, TNF-α; tumor necrosis factor α, IGF-1; insulin growth like factor-1, BMPs; bone morphogenetic proteins (Goldring, 2006)

จากปัจจัยต่างๆที่สาเหตุของการเกิดโรคข้อเสื่อม และสาเหตุที่ทำให้คนทุกคนเป็นโรคข้อเสื่อมคืออายุที่เพิ่มขึ้นซึ่งอายุจะส่งผลให้เกิดความเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของเซลล์กระดูกอ่อน และด้วยการได้รับการกระทบเทือนที่มากเกินไปของข้อต่อ ซึ่งทั้งหมดนี้นำไปสู่การอักเสบบริเวณข้อต่อเนื่องจากสารอักเสบที่ถูกสร้างขึ้นนี้จะส่งผลต่อการสลายของกระดูกอ่อน (รูป 2.7) โรคข้อเสื่อมนั้นไม่จัดว่าเป็นการอักเสบแบบ arthropathy เนื่องจากไม่มี neutrophils ในน้ำไขข้อและบริเวณที่มีการอักเสบ อย่างไรก็ตามการอักเสบที่เยื่อบุข้อนั้นเป็นเหตุการณ์ปกติที่เกิดขึ้น ซึ่งจะพัฒนาเป็นโรคข้อเสื่อมได้เนื่องจากการผลิตสาร proinflammatory ที่มากกว่าปกติซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการพัฒนาเป็นโรคข้อเสื่อมในระยะต้นและท้าย และจากการศึกษาทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลองพบว่า interleukin-1 (IL-1) และ tumor necrosis factor (TNF)-α เป็น catabolic cytokine ที่สำคัญต่อการเริ่มต้นและดำเนินของการทำลายข้อต่อกระดูกอ่อน เนื่องจากการเพิ่มของระดับ catabolic enzymes

prostaglandins, nitric oxide และโปรตีนอื่นที่พบในของเหลวและเนื้อเยื่อในโรคข้อเสื่อมพบว่ามีความสัมพันธ์กับระดับของสาร IL-1 และ TNF-α และจากการศึกษาด้วย anticytokine ชนิดต่างๆ ทำให้พบวิถีการส่งสัญญาณจากการกระตุ้นด้วยสาร IL-1 และ TNF-α

โรคมะเร็ง (Rundhaug, 2003)

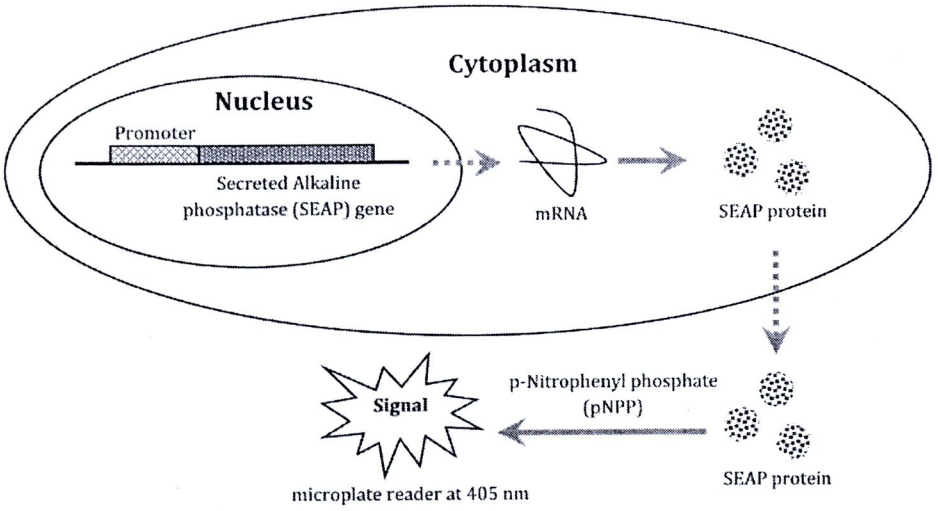
การแสดงออกของ MMPs ต่างๆ พบว่ามีการแสดงออกสูงขึ้นในเกือบทุกประเภทของโรคมะเร็งที่พบในมนุษย์และมีความสัมพันธ์กับการรุกรานและการแพร่กระจาย การแสดงออกเริ่มต้นของการ MMPs ทั้งโดยเซลล์มะเร็งเองหรือเซลล์ที่อยู่รอบ คือ เซลล์ stromal จะช่วยให้การเปลี่ยนแปลง ECM และปล่อย ECM และ growth factor ที่ดีสำหรับสถานการเติบโตของเนื้องอกหลัก (รูป 2.7) เป็นเนื้องอกที่เติบโตขึ้นพร้อมกับการเกิดการสร้างหลอดเลือด (angiogenic) เกิดขึ้น (เนื่องจากภาวะการขาดออกซิเจน) ซึ่งความสมดุลของปัจจัย proangiogenic (เช่น bFGF และ VEGF) เอาชนะการแสดงออกของสารยับยั้งการสร้างหลอดเลือด เช่น angiogenic (เช่น thrombospondins, angiostatin และ IFNs ทั้ง MMP - 2 และ MMP - 9 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำของการเปลี่ยนของการสร้างหลอดเลือดในระบบรูปแบบที่แตกต่างกัน protooncogenes เช่น K – *ras* หรือ H - *ras* ในเซลล์เนื้องอกจะกระตุ้นการแสดงออกของยีน VEGF และลดการแสดงออกของยีน thrombospondin ในขณะที่การส่งสัญญาณ oncogenic erbB2 เพิ่มการแสดงออกของ proangiogenic factor และ ลดการแสดงออกของยีน thrombospondin การควบคุมการสร้างหลอดเลือด (angiogenic) สามารถเกิดขึ้นได้ในช่วงต้นมากๆ ของโรคมะเร็งบางชนิดก่อนการเกิดการดำเนินร้าย พร้อมกับการสร้างหลอดเลือดอย่างหนาแน่นในแผลของเนื้อมะเร็ง การแสดงออกของ MMP โดยเฉพาะในกลุ่ม gelatinases ซึ่งสามารถย่อยสลายส่วนประกอบของเยื่อหุ้ม basement ที่ช่วยให้เซลล์เนื้องอกสามารถบุกรุกเข้ามาในส่วน stroma ที่อยู่ติดกันและจะทำลายเนื้อเยื่อชั้น basement ที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือดและน้ำเหลืองช่วยเซลล์มะเร็งเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิตและแพร่กระจายไปบริเวณอื่นของร่างกายได้ ซึ่ง MMPs จะช่วยในการทำลายโปรตีนที่เป็น adhesion protein ของเซลล์มะเร็งที่ยึดติดออยู่กับเซลล์มะเร็งด้วยกันเองหรือบริเวณที่เกาะติดอยู่กับส่วนของ matrix และนอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยในการปลดปล่อยสาร chemoattractants จาก ECM อีกด้วย ทั้งหมดนี้จะเอื้อต่อการเจริญเติบโต การแพร่กระจายและการสร้างหลอดเลือดในเนื้องอกสำหรับการเจริญเติบโตอย่างยั่งยืน ดังนั้น MMPs มีส่วนร่วมในกระบวนการก่อมะเร็งในหลายๆ ขั้นตอน



รูป 2.7 บทบาทของ MMPs ในโรคมะเร็ง MMPs จะมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Rundhaug, 2003)

2.2 Reporter gene technology

ปัจจุบันนี้ความรู้ในเกี่ยวกับการติดต่อสื่อสารของเซลล์ทั้งที่เป็นภายในเซลล์เองหรือระหว่างเซลล์มีเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยสัญญาณที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นภายนอกเซลล์เป็นสัญญาณที่เกิดขึ้นเพียงชั่วคราว เช่น polypeptide, steroid hormones, cytokines และ neurotransmitters เป็นต้น เมื่อสารเหล่านี้จับกับตัวรับโปรตีน (receptor) ที่อยู่บนผิวเซลล์หรือภายในเซลล์จะส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีนซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระยะยาวตามมา ซึ่งสัญญาณจากการกระตุ้นจากภายนอกเซลล์นั้นจะไปกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของ transcription factor ได้หลายตัว ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่าวิถีการส่งสัญญาณนั้นมีหลากหลาย โดย transcription factor ที่ถูกกระตุ้นนั้นจะเกาะกับลำดับดีเอ็นเอในส่วนของ promoter ของยีน เรียกว่า response element (Karin, 1994; Montminy, 1997 และ Manning, 1996) ดังนั้นการนำส่วน response element ของมาเชื่อมต่อกับ reporter gene เมื่อพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของ reporter gene นั้นแสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงในส่วนของ response element เกิดขึ้น ซึ่ง response element จะตอบสนองต่อการกระตุ้นจากภายนอกเซลล์จึงทำให้สามารถติดตามการทำงานของ secondary messenger cascades และผลของมันต่อการแสดงออกของยีน และการควบคุมการแสดงออกภายในเซลล์ (reporter gene technology) (รูป 2.6)



รูป 2.8 หลักการทำงานของ reporter gene technology โดยใช้ secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) เป็น reporter gene

Reporter gene มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับการใช้งานว่าต้องการศึกษาเรื่องใด เช่น การศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีนในช่วงเวลาต่างๆ หรืออวัยวะต่างๆ ของการพัฒนาของตัวอ่อน การค้นหาตัวยา หรือระบบการส่งถ่ายยีน เป็นต้น การเลือกใช้ reporter gene นั้นจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น การแสดงของ phenotype และมีไม่มีการแสดง phenotype นี้ใน host cell (ไม่มีโปรตีน endogenous) (Alam and Cook, 1990) นอกจากนี้การเลือก reporter gene ยังขึ้นกับ ความไว ช่วงของการตรวจสอบ (dynamic range) สะดวก และน่าเชื่อถือ (Alam and Cook, 1990; Suto and Ignar, 1997 และ Bronstein *et al.*, 1994) การแสดงออกของ reporter gene ที่ถูกควบคุมด้วย *cis*-regulatory element (response element) นั้นมีผลมาจากการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นต่างๆจากนอกเซลล์แล้วส่งสัญญาณไปกระตุ้น secondary messenger pathway โดยการควบคุมนั้นจะเกิดจากกระบวน phosphorylation กับโปรตีนต่างๆ มากมายเป็นลำดับต่อๆ กันจนถึง transcription factor ที่จะเข้าสู่นิวเคลียสและไปมีผลต่อการแสดงออกของยีนนั้นในส่วน response element (Karin, 1994) เช่น G-protein coupled receptor, ion channel linked protein หรือ ตัวรับโปรตีนต่างๆ (receptor) ซึ่งการมีสิ่งเหล่ากระตุ้นที่โปรตีนเหล่านี้จะทำให้เกิดการส่งสัญญาณที่เป็นลำดับมาจนถึง transcription factor โดยอาศัยการทำงานของ protein kinase ที่แตกต่างกันในแต่ละ pathway เช่น cAMP-dependent protein kinase A, protein kinase C, และ receptor tyrosine kinases เป็นต้น และ transcription factor ที่ถูกกระตุ้นจะจับกับดีเอ็นเอที่จำเพาะในส่วน response element เช่น CREs, TREs, และ SREs เป็นต้น (Manning, 1996 และ Jones, 1991)

2.2.1 Reporter gene

1. Chloramphenicol acetyltransferase (CAT)

CAT เป็น reporter gene ตัวแรกที่มีการพัฒนาขึ้นมาเพื่อติดตามการแสดงออกของยีนในเซลล์ (Bronstein *et al.*, 1994) ซึ่ง CAT เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในแบคทีเรียทำหน้าที่กำจัดสารพิษต่อเซลล์ คือ chloramphenical โดยสารตัวนี้จะทำให้กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนใน prokaryotes ถูกยับยั้งการทำงาน เอนไซม์นี้จะย้ายหมู่ acetyl จาก acetyl CoA ไปตำแหน่ง 3-hydroxyl ของ chloramphenicol เอนไซม์นี้มีความเสถียรภาพ (Schwartz *et al.*, 1990 และ Williams *et al.*, 1989) และไม่พบว่ามีการแสดงออกในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อย่างไรก็ตามการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์นี้ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสีซึ่งเป็นอันตราย และถึงแม้ว่าจะสามารถตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ได้ด้วยวิธี ELISA แต่เนื่องจากช่วงของการทดสอบที่เป็นเชิงเส้นตรงแคบและ

ความไวของการตรวจสอบค่อนข้างต่ำกว่าการใช้ reporter gene ตัวอื่นๆ (Bronstein *et al.*, 1994 และ Pazzagli *et al.*, 1992)

2. β-galactosidase

เอนไซม์ β-galactosidase พบในแบคทีเรียและเป็น reporter gene ที่นิยมใช้มากที่สุดในการหาประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน และสามารถตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ β-galactosidase ได้ด้วยวิธีการ colorimetric แต่ค่อนข้างมีความไวต่ำและมีช่วง dynamic range แคบ แต่สามารถเพิ่มความไวในการตรวจสอบได้โดยการการใช้ bio- หรือ chemi-luminescent ซึ่งมีข้อดีมากกว่าการใช้ CAT เนื่องจากไม่ต้องใช้สาร radioisotopes อย่างไรก็ตามพบว่ามี β-galactosidase ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด และการทำงานของเอนไซม์นี้จะลดลงในสภาวะที่มี pH สูง (Alam and Cook, 1990)

3. Luciferase

Luciferase เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม oxidation สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นได้หลายชนิด เช่น luciferin และ coelenterazine เป็นต้น การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้แล้วจะได้ผลผลิตที่สามารถปลดปล่อยแสงออกมาได้ luciferase ที่นิยมใช้เป็น reporter gene จะมีที่มาจากหลายแหล่ง ได้แก่ bacteria, หิ่งห้อย (*Photinus pyralis*) และ Renilla (*Renilla rentiformis*) (Bronstein *et al.*, 1994 และ Suto and Ignar, 1994) luciferase จากแบคทีเรียนั้น ไม่ทนความร้อน เป็น dimeric protein ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการนำไปใช้กับเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อย่างไรก็ตามการใช้ luciferase จากแบคทีเรียจะมีช่วย linear range อยู่ที่ 3 order of magnitude (Pazzagli *et al.*, 1992 และ Manen *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังมี luciferase จากหิ้งห้อย ที่มีความนิยมใช้เป็น reporter gene กับเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื่องจากเอนไซม์นี้มีความไวสูง (Joyeux *et al.*, 1997 และ Welsh and Kay, 1997) และตัวสุดท้าย luciferase จาก Rinella เหมาะกับการใช้รายงานในเซลล์ที่มีชีวิต เนื่องจากเอนไซม์นี้จะย่อยสลาย coelenterazine ที่เป็นสารที่สามารถแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ลักษณะอื่นก็จะคล้ายกับ luciferase จากหิ้งห้อย (Lorenz *et al.*, 1996) และที่สำคัญเอนไซม์ luciferase ทั้งหมดนี้ไม่พบในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

4. Secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP)

SEAP เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากการทำให้เกิด mutation ของยีน placental alkanline phosphatase ข้อดีของ reporter gene นี้คือเอนไซม์จะหลั่งออกจากเซลล์ทำให้สามารถที่จะเก็บ

ตัวอย่างจากอาหารเลี้ยงเซลล์ไปตรวจสอบได้ ดังนั้นจะมีเซลล์เหลือสำหรับการทดลองอื่นๆ (Suto and Ignar, 1997 และ Jones *et al.*, 1991) และวิธีการตรวจสอบเอนไซม์นี้ด้วย colorimetric นั้นราคาไม่แพง แต่ถ้าต้องการให้มีความไวในการตรวจสอบที่ดีขึ้นสามารถใช้ วิธี chemiluminescent แทนได้ซึ่งจะเหมาะสำหรับการทดลองที่มีตัวอย่างจำนวนมาก (HTS)

5. Green fluorescent protein (GFP)

GFP เป็นโปรตีน bioluminescent ที่พบได้จาก jellyfish (*Aequorea victoria*) GFP นั้นสามารถที่จะมีการปลดปล่อยแสงได้ตัวเองโดยไม่จำเป็นต้อง cofactor หรือสารตั้งต้น ซึ่งแสงที่ GFP ปลดปล่อยนั้นเป็นแสงสีเขียว (510 nm) ดังนั้นจึงสามารถใช้ในการติดตามการเกิดเหตุการณ์ต่างๆ ภายในเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตได้ เช่น การเคลื่อนที่ของโปรตีน (protein localization) การเกิดการแบ่งเซลล์ (cell division) รวมถึงการส่งสารเข้าออกจากเซลล์ด้วย vesicle (vesicle tracking) เป็นต้น GFP ที่ใช้อยู่ทุกวันนี้เป็น GFP ที่มีถูกทำให้กลายพันธุ์ไปจาก GFP ดั้งเดิม การตรวจโปรตีนนี้ไม่จำเป็นต้องทำการแตกเซลล์ สามารถทำได้ขณะที่เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ (Misteli and Spector, 1997 และ Welsh and Kay, 1997)

ในการศึกษานั้นมีการนำ reporter gene หลายชนิดมาใช้พร้อมกันเพื่อที่ใช้ normalize ข้อมูลแต่ละชุดการทดลองให้สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ เช่น luciferase กับ β-galactosidase ซึ่ง β-galactosidase จะถูกใช้ในการดูประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์เพื่อให้รู้ว่าทุกเซลล์นั้นมีการได้รับการส่งถ่ายที่เท่ากัน (Bronstein *et al.*, 1994 และ Suto and Ignar, 1997) แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกที่มากน้อยของ reporter gene นั้นไม่ได้เกิดจากการที่การทดลองนั้นได้รับการส่งถ่ายที่มากน้อยต่างกัน และนอกจากนี้แล้วการเลือกใช้ reporter gene นั้นต้องเลือกให้เหมาะสมกับงานที่ต้องการศึกษา เช่น การศึกษาเรื่องการแสดงออกของยีน reporter gene ที่ใช้ควรจะมี half life ที่ยาว เนื่องจากต้องเกิดการสะสมของ reporter protein ในเซลล์เพื่อแสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกมากน้อยเท่าไหร่ แต่ถ้า reporter gene นั้นมี half-life สั้นจะไม่สามารถมาบอกถึงการแสดงออกของยีนได้ เนื่องจากเมื่อมีการสร้าง reporter protein ขึ้นมาในเซลล์ก็จะถูกทำลายทำให้เมื่อตรวจสอบจะเป็นการแสดงออกในช่วงเวลาสั้นๆ แต่ไม่ได้บอกถึงการแสดงออกของยีนทั้งหมดในระยะเวลานานได้ (Pazzagli *et al.*, 1992)

ตาราง 2.1 สรุปเปรียบเทียบการใช้งาน reporter gene แต่ละชนิด (Naylor, 1999)

Reporter gene	ข้อดี	ข้อเสีย
Chloramphenicol acetyltransferase (CAT)	ไม่มีกิจกรรม endogenous	ช่วงที่เป็นเชิงเส้นตรงแคบ ต้องใช้ radioisotopes
β-galactosidase (bacterial)	ตรวจสอบง่าย ความเสถียรภาพสูง สามารถตรวจสอบด้วยวิธี colorimetric หรือ chemiluminescent	มี endogenous
Luciferase (firefly)	มีความจำเพาะ ไม่พบ endogenous ช่วงในการตรวจสอบละเอียดกว้าง ตรวจสอบได้ง่าย	จำเป็นต้องใช้สารตั้ง (lucifin) ร่วมกับ O_2 และ ATP
Alkaline phosphatase (human placental)	โปรตีนหลั่งออกนอกเซลล์ การตรวจสอบด้วย colorimetric ราคาถูก และมีความไวสูงในการตรวจสอบด้วยวิธี luminescent	มี endogenouns (ในเซลล์บางชนิด) และมีสารอื่นรบกวนการทำงานของเอนไซม์
Green fluorescent protein (GFP)	ไม่ต้องใช้สารตั้งต้น ไม่มี endogenous	จำเป็นต้องเกิด post-translation ความไวต่ำ

2.2.2 การประยุกต์ใช้ reporter gene technology

1. การส่งถ่ายและการแสดงออกของยีน

1.1 การวิเคราะห์ส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน (promoter analysis) reporter gene technology เป็นวิธีการแรกที่สามารถนำมาวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของ *cis*-acting genetic element เช่น enhancers และส่วนควบคุมการแสดงออกที่อยู่หน้ายีน ตัวอย่างการใช้ reporter gene technology ที่ใช้วิเคราะห์ส่วนควบคุมการแสดงออกของยีนนั้น ทำให้ทราบถึงระดับการแสดงอออก พื้นฐานของแต่ละยีน และ response element ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะแต่ละชนิด ซึ่งทำให้รู้ว่าทำไมยีนบางยีนมีการแสดงออกอย่างจำเพาะ เช่น β_1-adrenergic (Bahouth *et al.*, 1997b), m1 muscarinic (Pepitoni *et al.*, 1997), luteinizing hormone (Tasi-Morris *et al.*, 1998) และ interleukine-2 receptor gene (Bamberger *et al.*, 1997) เป็นต้น นอกจากนี้แล้วยังทำให้ค้นพบ response element ต่างๆที่ตอบสนองกับ estrogens (Zhang *et al.*, 1997), androgens (Sathya *et al.*,

1997), thyroid hormone (Bahouth *et al.*, 1997a), Ca^{2+} (Murata and Yamaguchi, 1998), nitric oxide (Ichiki *et al.*, 1998) และ transcription factor อื่นๆ อีกมากมาย ที่มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันไป และทำให้ทราบว่าเหตุใดยีนนี้มีการแสดงออกเมื่อถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนหรือสารบางชนิด

1.2 การส่งถ่ายยีน reporter gene ถูกใช้เพื่อในการติดตามการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ที่ใช้เพื่อให้เซลล์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงบางอย่างภายในเซลล์ เช่น การผลิตโปรตีนบางชนิด การทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบางประการ และการยับยั้งการแสดงออกของยีนบางชนิด เป็นต้น การใช้ bicistronic vector จะถูกใช้ในการส่งถ่าย reporter gene และ ยีนที่สนใจเข้าสู่เซลล์เพื่อติดตามว่ามีการส่งถ่ายยีนนั้นสำเร็จ ก็จะดูจากการแสดงออกของ reporter gene ตัวอย่าง เช่น การใช้ fluorescence activated cell sorting (FACs) เพื่อวิเคราะห์การแสดงอออกของ GFP ที่เป็นโปรตีนเครื่องหมายสำหรับการติดตามการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืช (Galbraith *et al.*, 1995) ยีสต์ (Cormack *et al.*, 1997) และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mosser *et al.*, 1997) ถึงแม้ว่าจะมีการใช้ reporter gene technology จำนวนมากมายที่สามารถใช้กับเซลล์เพาะเลี้ยงได้ แต่กับการทดลองในสัตว์ทดลองหรือพืชนั้น นิยมใช้ GFP (Chiocchetti *et al.*, 1997) และ β-galactosidase (Quintana *et al.*, 1998) ในสัตว์ทดลองที่ถูกส่งถ่ายยีน เนื่องจากสามารถตรวจสอบการทำงานของโปรตีนได้ง่าย และโปรตีนนี้จะไม่สามารถกระจายไปเนื้อเยื่ออื่นและวิธีการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานนั้นเหมาะสมกับการทำในสัตว์ทดลองได้ดีกว่า reporter gene ตัวอื่น และสำหรับในพืชนั้นนิยม β-glucoronidase ที่จะติดตามในแบคทีเรียที่เป็นพาหะสำหรับการส่งถ่ายเข้าสู่พืช (Babic *et al.*, 1998)

นอกจากนี้การรักษาโรคด้วยวิธี gene therapy นั้นจำเป็นต้องมีการติดตามว่ามีเซลล์ที่ได้รับดีเอ็นเอในตำแหน่งที่เข้าไปออกฤทธิ์นั้นถูกต้องหรือไม่ และ ลักษณะการแสดงออกของยีนเป็นอย่างไร วิธีการที่ส่งถ่ายยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนสำหรับการรักษาโรคเข้าสู่เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นมีหลายวิธีเช่น การใช้ virus หรือ retrovirus เป็นพาหะ (Welsh *et al.*, 1997), cataion liposome (Mahato *et al.*, 1997), electrical stimulation (Manen *et al.*, 1997) และ peptide-mediated delivery (Wadhwa *et al.*, 1997)

1.3 การแสดงออกของยีน การวัดการแสดงออกของยีนด้วย reporter gene ในพืชและสัตว์นั้นในอดีตจะวิธี colorimetric และ fluorimetric เพื่อตรวจวัดทำงานของเอนไซม์ β-glucoronidase และ β-galactosidase แต่ปัจจุบันมีการพัฒนาเอนไซม์ luciferase และ โปรตีน GFP ซึ่งไม่มีการเคลื่อนของโปรตีน ทำให้มีการใช้สามารถตรวจสอบด้วย bioluminescent และ fluorescence

microscopy ตามลำดับได้ การตรวจสอบการแสดงออกยีนทั้งที่มีการแสดงออกแบบ temporal และ spatial จึงได้มีการพัฒนามากขึ้น ตัวอย่างการศึกษาการแสดงออกของยีนแบบ temporal เป็นลักษณะที่มีการแสดงของยีนแบบชั่วคราวในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ซึ่งการแสดงออกแบบนี้จะมีส่วนสำคัญอย่างมากต่อกระบวนการพัฒนาการของตัวอ่อน เช่น การแสดงออกของยีน transcription factor การศึกษาการแสดงออกของยีนนั้นจะต้องทำการสร้างตัวอ่อนที่เป็น transgenic animals ที่ถูกส่งถ่าย reporter gene ที่ถูกควบคุมด้วยส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน transcription factor นั้น และตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของ reporter protein เช่น β-galactosidase เป็นต้น ถ้าเกิดมีตรวจพบการทำงานของ reporter gene เมื่อใดแสดงว่าช่วงเวลานั้นเป็นช่วงที่มีการแสดงออกของยีน transcription factor นั้น นอกจากนี้ตำแหน่งที่มีการแสดงออกของยีน transcription factor ยังทำหน้าทราบถึงเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของยีนนั้นด้วย และการศึกษาการแสดงออกของยีนแบบ spatial เป็นการศึกษา (Leung *et al.*, 1998)

2. การค้นหาทางชีววิทยาสำหรับการค้นหายา (Biological screens for drug discovery)

การพัฒนาทางด้านชีวโมเลกุลมีความเจริญมากขึ้นอย่างรวดเร็ว การค้นพบและความเข้าใจเกี่ยวกับการจับกันของ receptor และ ligand ที่ส่งให้มีการส่งสัญญาณอย่างเป็นลำดับภายในเซลล์นั้นทำให้การค้นพบเป้าหมายของการพัฒนายาที่มีศักยภาพมากขึ้น (Stadel *et al.*, 1997) ความแม่นยำความน่าเชื่อถือของข้อมูล ความไวของการใช้ reporter gene technology จะทำให้เกิดการศึกษากับการทดลองที่มีตัวอย่างจำนวนมหาศาล (HTS) สำหรับการค้นหาตัวยาที่ออกฤทธิ์ที่ต้องการก็มีความเป็นไปได้สูงมากขึ้น หลักการของการใช้ cell-based assay (Suto and Ignar, 1997) นั้นจะให้ข้อมูลที่เกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ของ receptor และ ligans รวมถึง signaling pathway มีความเสร็จอย่างมาก

2.1 การระบุการจับกันของ receptor กับ ligands reporter gene technology มีประโยชน์หลายอย่าง เช่น การโคลนยีน, ตรวจสอบการแสดงออกของยีน (Spengler et al., 1993) และการระบุลักษณะการจับกันของโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Stratowa *et al.*, 1995) และการจับกันของ receptor ภายในเซลล์ (McPhaul *et al.*, 1997) การจับกันของ receptor กับ ligands จะมี 2 แบบ คือ agonist และ antagonist เมื่อเกิดการจับกันของ receptor กับ ligands แล้วจะส่งผลต่อกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์เกิดขึ้นตามมา ตัวอย่างที่ชัดเจน เช่น การศึกษา GPCR โดยใช้ reporter gene technology ใน stable cell line โดยการส่งถ่ายยีน GPCR และ reporter gene โดยวิถีการส่งสัญญาณของ GPCR นั้นจะผ่านเอนไซม์ adenylyl cyclase (George *et al.*, 1998) และ phospholipase C (Chen *et al.*, 1995) ซึ่งเมื่อเซลล์มีการแสดงออกของ recombinant GPCR ที่ผิวเซลล์ เมื่อมีการจับกันของสาร ligans กับ GPCR แล้วจะเกิดการส่งสัญญาณตามลำดับ และภายในเซลล์จะมี reporter protein คือ aequorin ซึ่ง

เป็น Ca^{2+}-sensitive photoprotein โดย apoaequorin นั้นต้องใช้สารตั้งต้นเป็น coelentetazine ซึ่งสารนี้สามารถแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ และการส่งสัญญาณจากการจับกันของ ligans กับ GPCR นั้นจะทำให้ระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์สูงขึ้นในกรณีนี้จะตรวจสอบสาร ligands ชนิด agonist เมื่อมี Ca^{2+} และ coelentetazine ซึ่งเป็น cofactor ของ apoaequorin จะทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้นจึงตรวจสอบจากระดับความเข้มของการเรืองแสง

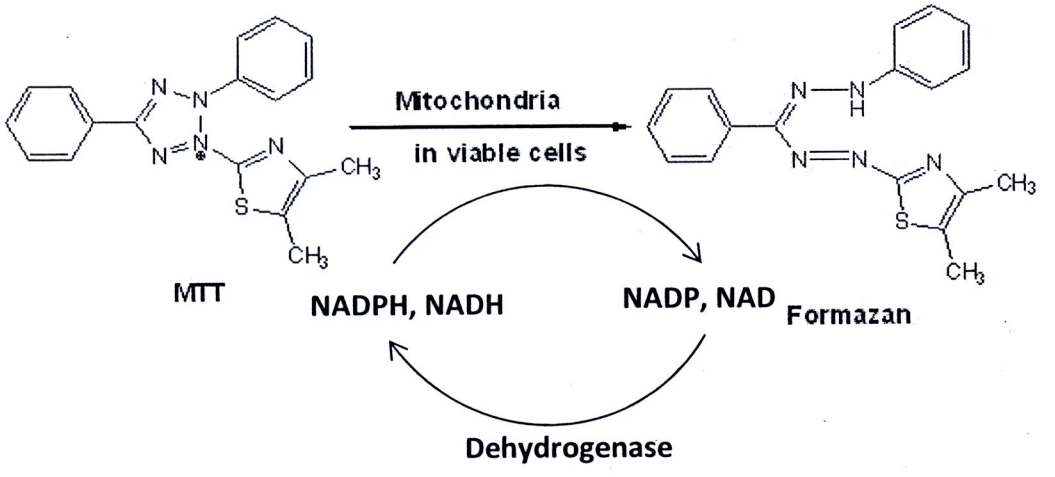
2.2 วิถีการส่งสัญญาณ (signaling pathway) กระบวนการนี้มีความสำคัญอย่างมากต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนซึ่งจะมีผลต่อพฤติกรรมต่างๆ ของเซลล์ และนอกจากนี้การเข้าในวิถีการส่งสัญญาณต่างๆอย่างละเอียดจะนำไปสู่การเข้าใจกลไกการเกิดโรคต่างในระดับโมเลกุลได้ดียิ่งขึ้นและนำไปสู่แนวทางการรักษาโรคด้วยวิธีใหม่โดยการค้นพบเป้าหมายของการพัฒนายาตัวใหม่ให้มีประสิทธิภาพในการรักษาได้ดีขึ้น (Manning, 1996 และ Levitzki, 1996) และการจะเข้าใจวิถีการส่งสัญญาณของภายในเซลล์ได้ การใช้ reporter gene technology เป็นเครื่องมือที่ดีในการนำมาศึกษานี้อย่างมาก เช่น การยับยั้ง G-protein, kinases, และ transcription factor จะช่วยในการรักษาโรคได้หลายชนิด เช่น การอักเสบ มะเร็ง และโรคที่เกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด รวมถึงโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส (Manning, 1996 และ Levitzki, 1996) และมีการนำ reporter gene technology มาใช้เพื่อค้นหาสารที่สามารถยับยั้งไวรัส และต่อต้านเนื้องอก โดยการยับยั้ง transcription factor ที่จำเพาะต่อยีนบางยีน (Anonymous, 1997) อย่างไรก็ตามในความเป็นจริงแล้วมีวิถีการส่งสัญญาณหลายวิถีที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นสารเพียงตัวเดียว แต่ในการเกิดโรคจะถูกกระตุ้นด้วยสารต่างๆมากมาย ดังนั้นจึงมีการเกิดการส่งสัญญาณหลายวิถีพร้อมๆ กัน การรักษาที่ดีและมีประสิทธิภาพคือการยับยั้งในหลายวิถีที่ทำให้เกิดความผิดปกติและก่อให้เกิดโรค

2.3 การศึกษาความเป็นพิษ (toxicology) การสร้าง stable cell line ที่มีการส่งถ่าย reporter gene ที่สามารถรายงานการเป็นพิษต่อเซลล์นั้นได้ ซึ่งจะตรวจสอบจากการทำงานของ reporter gene เช่น β-galactosidase หรือ luciferase ซึ่งจะตรวจสอบด้วยวิธี colorimetric และ luminometric โดยการตรวจสอบความเป็นพิษนั้นจะเป็นเสมือน biosensor สำหรับการตรวจสอบความเป็นพิษของสิ่งแวดล้อมได้ เช่น การปนเปื้อนของดินด้วยสารจำพวก naphtalens (Heitzer *et al.*, 1994), ions (arsonites และ antimonites) (Scott *et al.*, 1997), metals และ agrochemical (van Dyk *et al.*, 1994) เป็นต้น นอกจากนี้เคยมีการใช้ yeasts เป็น host สำหรับ reporter gene technology เพื่อตรวจสอบปริมาณของสารสังเคราะห์ estrogens และ xenoestrogens ในสิ่งแวดล้อม (Arnold *et al.*, 1996 และ Steinmetz *et al.*, 1997) ซึ่งสารเหล่านี้จะรบกวนการทำงานของ endocrine ในมนุษย์และสัตว์ป่า มี

การนำ luciferase-based reporter gene มาใช้เพื่อตรวจสอบสารพิษ dioxins ในกระแสเลือดของเป็ด (Mark *et al.*, 1997) และการตรวจระดับสาร metabolite ของ vitamin D ในเลือดของคนโดยไม่ต้องทำการทำบริสุทธิ์สารที่ต้องการตรวจสอบ (Arbour *et al.*, 1998)

2.3 หลักการตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

MTT assay เป็นการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ mitochondria succinate dehydrogenase ซึ่งสารสีเหลืองของ MTT จะเข้าสู่เซลล์และผ่านเข้าสู่ mitochondria และถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ mitochodria dehydrogenase ได้เป็นผลึกสีม่วงของ formazan โดยปฏิกิริยานี้จะเกี่ยวข้องกับการใช้ cofactor NADH และ NADPH ซึ่ง cofactor นี้จะเกิดขึ้นในสภาวะที่เซลล์มีชีวิต (รูป 2.7) และผลึก formazan จะถูกละลายด้วย DMSO และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ดังนั้นการรีดิวซ์สาร MTT ให้เป็นผลึก formazan จึงนำมาใช้ในการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ ถ้ามีเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถรีดิวซ์ MTT ได้เป็นผลึก formazan ได้ แต่ถ้าเซลล์นั้นตายจะไม่สามารถรีดิวซ์สาร MTT ให้เป็นผลึก formazan ได้ (Mosmann, 1983)



รูป 2.9 แสดงการเกิดปฏิกิริยาเคมีของกระบวนการวัดการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay (ที่มา: ดัดแปลงจาก http://www.mclab.com/product.php?productid=19249&cat=116)