



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยาทางสัตว์)
ปริญญา

สัตววิทยาทางสัตว์

สัตววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกในเนื้อเยื่อของฮอร์โมนเลปตินและตัวรับ
ในไก่พื้นเมืองไทย (*Gallus gallus domesticus*)

Study of Nucleotide Sequence and Tissue Expression of Leptin and Its Receptor
in Thai Native Chicken (*Gallus gallus domesticus*)

نامผู้วิจัย นายกิตติ จิรวัดน์จรรยา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุกเดช บุญประกอบ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สันติ แก้วโมกุล, ป.ร.ค.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประชุมพร คงเสรี, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์อภัสสรา ชูเทศะ, Dr.rer.nat)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกในเนื้อเยื่อของฮอร์โมนเลปตินและตัวรับใน
ไก่พื้นเมืองไทย (*Gallus gallus domesticus*)

Study of Nucleotide Sequence and Tissue Expression of Leptin and Its Receptor in
Thai Native Chicken (*Gallus gallus domesticus*)

โดย

นายกิริติ จิรวัดณ์จรรยา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยาทางสัตว์)

พ.ศ. 2552

กิริติ จิรวัดนักรรยา 2552: การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกในเนื้อเยื่อของฮอร์โมนเลปตินและตัวรับในไก่พื้นเมืองไทย (*Gallus gallus domesticus*) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยาทางสัตว์) สาขาสรีรวิทยาทางสัตว์ ภาควิชาสรีรวิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุกเดช บุญประกอบ, Ph.D.
97 หน้า

ฮอร์โมนเลปติน (leptin) เป็นโปรตีนฮอร์โมนที่ทำงานหลายด้าน มีหน้าที่ทางสรีรวิทยาหลายประการ รวมถึงการกินอาหาร การเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ และการควบคุมสมดุลพลังงานของร่างกาย ลำดับนิวคลีโอไทด์ของซีดีเอ็นเอของฮอร์โมนเลปตินและตัวรับของฮอร์โมนเลปตินในไก่ได้มีรายงานแล้ว แต่ความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮอร์โมนเลปตินของไก่ยังไม่มี ความชัดเจน การศึกษานี้ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนและตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮอร์โมนเลปตินและตัวรับของฮอร์โมนเลปตินในไก่พื้นเมืองไทย การเพิ่มจำนวนซีดีเอ็นเอของฮอร์โมนเลปตินของไก่ไม่ประสบความสำเร็จ แม้ว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวได้รับผลอย่างสม่ำเสมอเมื่อใช้ซีดีเอ็นเอของหนูเมาส์เป็นต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ชุดเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ซีดีเอ็นเอของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่ได้รับการโคลน ตรวจลำดับและคุณลักษณะของนิวคลีโอไทด์เป็นผลสำเร็จ โปรตีนคาดการณ์ขนาด 1,148 กรดอะมิโนของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่พื้นเมืองไทย มีลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนร้อยละ 99 เหมือนกับตัวรับฮอร์โมนเลปตินชนิดยาวของไก่สายพันธุ์ LegHorn ตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่พื้นเมืองไทย มีน้ำหนักโมเลกุลคาดการณ์ 129 กิโลดาลตัน ส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์พบ WSXWS motif 2 ตำแหน่ง ส่วนที่แทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์มี 1 ครั้ง และส่วนที่อยู่ในเซลล์พบบริเวณอนุรักษ์ box 1 2 และ 3 motifs นอกจากนี้ พบการแสดงออกของยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินที่เนื้อเยื่อสมองส่วนไฮโปทาลามัส เนื้อเยื่อไขมัน ปอด ตับ ตับอ่อน ลำไส้เล็ก กล้ามเนื้อหัวใจ กล้ามเนื้อลาย ไต อัณฑะ และรังไข่

Keerati Jirawajanya 2009: Study of Nucleotide Sequence and Tissue Expression of Leptin and Its Receptor in Thai Native Chicken (*Gallus gallus domesticus*). Master of Science (Animal Physiology), Major Field: Animal Physiology, Department of Physiology. Thesis Advisor: Assistant Professor Ukadej Boonyaparakob, Ph.D. 97 pages.

Leptin, a multifaceted protein hormone, provides multiple physiological activities including food intake, growth, reproduction and especially energy stabilization. In chicken, the cDNA sequence of leptin and its receptors have been reported but the correction of the sequence of chicken leptin is still unclear. In this study, we aimed to clone and sequence of leptin and its receptor gene in Thai native chicken. Amplification of chicken leptin sequence was failed, although its expression consistently obtained in the mouse cDNA templates with the same primers. However, the chicken LEPR cDNA has been cloned, sequenced and characterized. The predicted 1,148 amino acids of the Thai chicken LEPR shares 99% sequence identity at both the nucleotides and amino acids level with the long form of LegHorn chicken LEPR. The Thai chicken LEPR has a predicted molecular weight of 129 kDa, containing two WSXWS motifs in the extracellular region, a single transmembrane domain, and the conserved box 1, 2 and 3 motifs in the cytoplasmic region. In addition, LEPR gene expression was observed in hypothalamus, adipose tissue, lung, liver, pancreas, intestine, cardiac muscle, skeletal muscle, kidney, testis and ovary.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างยิ่ง ทั้งด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย จากบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ได้แก่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.อุคเดช บุญประกอบ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. สันติ แก้วโมกุล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประชุมพร คงเสรี กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำแนะนำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ช่วยแก้ปัญหา และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งช่วยตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ คณะอาจารย์ประจำภาควิชาสัตววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกท่าน ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้อันเป็นประโยชน์ คอยสั่งสอนคุณธรรมและจริยธรรมในการสร้างผลงานวิจัย และให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบคุณพี่ๆนักวิทยาศาสตร์ ประจำภาควิชาสัตววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกท่านที่คอยช่วยเหลือให้คำปรึกษา รวมถึงให้คำแนะนำในเรื่องการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ในงานวิจัย

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี ที่เอื้อเฟื้อพันธุ์ไก่พื้นเมืองในงานวิจัย และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับเงินทุนวิจัยซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนคุณครู และอาจารย์ที่เคารพรักทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยเสมอมา จนทำให้ประสบความสำเร็จในชีวิต

กิริติ จิรวัดณ์จรรยา

พฤษภาคม 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	32
อุปกรณ์	32
วิธีการ	36
ผลและวิจารณ์	49
สรุปและข้อเสนอแนะ	62
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	66
ภาคผนวก	93
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	97

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 เปรียบเทียบจำนวน ขนาด และลำดับของเอ็กซอนในยีนตัวรับของฮอร์โมน เลปติน (ชนิดยาว) เฉพาะตำแหน่งที่มีการแปลรหัสระหว่างสัตว์เลี้ยงลูกด้วย น้ำนม และสัตว์ปีก	13
2 จำนวนร้อยละของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน (nucleotide identities) ของ ตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและสัตว์ปีก	14
3 จำนวนร้อยละของลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกัน (amino acid identities) และ ลำดับกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ที่เหมือนกัน (conserved amino acid identities; แสดงในวงเล็บ) ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและ สัตว์ปีก	15
4 การแสดงออกของ mRNA ของยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ของคน สุนัข หนูเมาส์ หนูแรท ไก่ และไก่ทอง	24
5 ส่วนประกอบของสารเคมีสำหรับใช้ตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยวิธี อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส	38
6 ส่วนประกอบของสารเคมีเบื้องต้นสำหรับการสร้าง cDNA	38
7 ส่วนประกอบของสารเคมีสำหรับการสร้าง cDNA	39
8 ส่วนประกอบของสารเคมีสำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอร์เรส	40
9 คู่มือไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอร์เรส ของยีนฮอร์โมนเลปตินและตัวรับของฮอร์โมนเลปติน	41
10 ปริมาณสารสำหรับใช้ในการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์	44
11 ส่วนประกอบของสารละลายสำหรับปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ EcoRI เพื่อตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอภายในพลาสมิด	46
12 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของตัวรับของฮอร์โมน เลปตินระหว่างไก่พื้นเมืองไทย ไก่ ไก่ทอง คน สุนัข หนูเมาส์ และหนูแรท แสดง ในรูปร้อยละของจำนวนและชนิดการเรียงลำดับที่เหมือนกัน	52

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	ตำแหน่งของลำดับของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของโปรตีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินในไก่พื้นเมืองไทยเปรียบเทียบกับไก่และไก่กังว	59
14	จำนวนร้อยละแสดงความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮอร์โมนเลปติน โพรแลคติน (prolactin) อินเตอร์เฟอรอน แกมมา (interferon gamma) และ อินเตอร์ลิวคิน 2 (interleukin 2) ของไก่เปรียบเทียบกับหนูเมาส์ หนูแรท และแกะ	63

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้าง helical loop ของฮอร์โมนเลปติน	7
2 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมนเลปตินระหว่างไก่ ไก่วง เป็ด และ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม	8
3 ปัจจัยควบคุมการแสดงออกของยีนฮอร์โมนเลปตินในเนื้อเยื่อไขมันของสัตว์เลี้ยง ลูกด้วยน้ำนม	11
4 ส่วนประกอบหลักของโครงสร้างของตัวรับไซโตไคน์กลุ่ม class 1 cytokine receptor family ประกอบด้วย growth hormone receptor (GH-R) interleukin-6 receptor (IL6-R) granulocyte colony-stimulating factor receptor (GCSF-R) และ ตัวรับของฮอร์โมนเลปติน (OB-Rb)	17
5 โครงสร้างตัวรับของฮอร์โมนเลปติน (Ob-R) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม	19
6 การเกิด alternative splicing ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิดสั้นและชนิดยาว ในไก่	19
7 กลไกการส่งและยับยั้งสัญญาณภายในเซลล์ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิด ยาว	21
8 การทำงานของฮอร์โมนเลปตินและตัวรับบริเวณของ arcuate nuclei ในสมอง ส่วนไฮโปทาลามัส	26
9 การควบคุมการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินของ β -pancreatic cell ผ่านการทำงานของ ฮอร์โมนเลปติน	28
10 ผลการเพิ่มผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอจาก cDNA ของเนื้อเยื่อไขมันของหนูเมาส์ ไก่ พื้นเมืองไทย และเป็ด	50
11 การแสดงตำแหน่งการแบ่งเอ็กซอนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวรับของ ฮอร์โมนเลปตินในไก่พื้นเมืองไทย	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
12 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินในไก่พื้นเมืองไทย	55
13 การแสดงออกของยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิดยาวในเนื้อเยื่อไขมัน เนื้อเยื่อสมองส่วนไฮโปทาลามัส เนื้อเยื่อ หัวใจ ลำไส้เล็ก ปอด กล้ามเนื้อลาย อัณฑะ รังไข่ ตับอ่อน และไต ในไก่พื้นเมืองไทย	61
ภาพผนวกที่	
1 โครงสร้างสมองแต่ละส่วนของสัตว์ปีก และภาพถ่ายสมองของไก่ที่ใช้ในงานวิจัย	94
2 ตำแหน่งการจับของรีเซพเตอร์ F-1/R-2 Lpt001-F/Lpt002-R UFlep81/R486lep และ Lepup/Lepdn ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮอร์โมนเลปตินในไก่ หนูเมาส์ หนูแรท คน โค และสุกร	95

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกในเนื้อเยื่อของฮอร์โมนเลปตินและตัวรับ ในไก่พื้นเมืองไทย (*Gallus gallus domesticus*)

Study of Nucleotide Sequence and Tissue Expression of Leptin and Its Receptor in Thai Native Chicken (*Gallus gallus domesticus*)

คำนำ

ฮอร์โมนเลปติน (leptin) จัดเป็นโปรตีนฮอร์โมนชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมสมดุลพลังงาน อีกทั้งมีผลต่อการทำงานทางสรีรวิทยาในหลายระบบ ฮอร์โมนเลปตินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมมีแหล่งผลิตหลักจากเนื้อเยื่อไขมันและสามารถผลิตได้จากกระเพาะอาหาร (Bado *et al.*, 1998) รก (Masuzaki *et al.*, 1997) และกล้ามเนื้อลาย (Wang *et al.*, 1998a) แต่มีปริมาณเพียงเล็กน้อย ขณะที่สัตว์ปีกพบการผลิตฮอร์โมนดังกล่าวจากตับและเนื้อเยื่อไขมันในปริมาณใกล้เคียงกัน (Ashwell *et al.*, 1999a) ฮอร์โมนเลปตินที่ผลิตได้จะถูกส่งเข้าสู่กระแสโลหิตและขนส่งไปยังอวัยวะเป้าหมาย ฮอร์โมนเลปตินออกฤทธิ์ผ่านตัวรับในสมองส่วนไฮโปธาลามัสและมีบทบาทในการควบคุมการกินอาหาร และใช้พลังงานของร่างกาย (Houseknecht *et al.*, 1998; Ahima *et al.*, 2000) รวมถึงควบคุมการหลั่งโกรทฮอร์โมน (growth hormone) (Chen *et al.*, 2001; Korbonits *et al.*, 2002) และฮอร์โมนเพศ (Yu *et al.*, 1997) ฮอร์โมนเลปตินสามารถยับยั้งการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินจากตับอ่อน (Pallett *et al.*, 1997; Kulkarni *et al.*, 1997; Seufert, 2004) อีกทั้งเชื่อว่าอาจมีผลต่อการเจริญของตัวอ่อนทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Hoggard *et al.*, 1997a; Henson *et al.*, 2004) และสัตว์ปีก (Lamosova *et al.*, 2003)

ปัจจุบัน แม้มีการศึกษาการทำงานของฮอร์โมนเลปตินอย่างแพร่หลายในสัตว์หลายชนิด รวมถึงในสัตว์ปีก แต่พบว่าในไก่ยังไม่มีความชัดเจนของลำดับนิวคลีโอไทด์ กรดอะมิโน และโครงสร้างของฮอร์โมนเลปติน เนื่องจากมีเพียง Taouis *et al.* (1998) และ Ashwell *et al.* (1999a) เท่านั้นที่รายงานความสำเร็จในการโคลนยีนฮอร์โมนเลปตินของไก่ ขณะที่นักวิจัยอีกหลายกลุ่มไม่สามารถตรวจพบเพื่อยืนยันการมีอยู่ของยีนฮอร์โมนเลปตินของไก่ได้ (Friedman-Einat *et al.*, 1999; Dunn *et al.*, 2000; Amills *et al.*, 2003; Ninov *et al.*, 2008) อีกทั้งไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์ใดๆที่มี

ความใกล้เคียงกับฐานข้อมูลจีโนมของไก่ (Pitel *et al.*, 2000a; Amills *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตาม ไม่พบอุปสรรคดังกล่าวในการโคลนและศึกษาการทำงานของยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่

ตัวรับของฮอร์โมนเลปติน (Leptin receptor; Ob-R, LepR) เป็นโปรตีนตัวรับที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม class I cytokine receptor superfamily ร่วมกับ growth hormone receptor (GH-R) interleukin-6 receptor (IL6-R) และ granulocyte colony-stimulating factor receptor (GCSF-R) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมพบตัวรับของฮอร์โมนเลปตินอย่างน้อย 6 ชนิดคือ Ra, Rb, Rc, Rd, Re และ Rf ทั้งนี้ มีเพียงตัวรับชนิด Rb จัดเป็นชนิดยาว (long form) เพราะมีส่วนของโปรตีนยื่นเข้ามาภายในเซลล์ยาวที่สุดและสามารถนำส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์เมื่อจับกับฮอร์โมนเลปติน (Chua *et al.*, 1996; Ghilardi *et al.*, 1996; Vaisse *et al.*, 1996; Bjorbaek *et al.*, 1997) ขณะที่ตัวรับชนิด Ra, Rc, Rd และ Rf จัดเป็นชนิดสั้น (short form) เพราะแม้ว่ามีส่วนของโปรตีนยื่นเข้ามาภายในเซลล์ขนาดแตกต่างกัน แต่สั้นกว่าชนิด Rb และไม่สามารถนำส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์เมื่อจับกับฮอร์โมนเลปติน และตัวรับชนิด Re เป็นชนิดที่ปล่อยออกนอกเซลล์เพราะไม่มีส่วนของโปรตีนทั้งที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และที่อยู่ในภายในเซลล์ ขณะที่การศึกษาในไก่พบตัวรับของฮอร์โมนเลปตินอย่างน้อย 2 ชนิดคือชนิดสั้น (Lui *et al.*, 2007) และชนิดยาว (Horev *et al.*, 2000; Ohkubo *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตามตัวรับของฮอร์โมนเลปตินแต่ละชนิดที่พบทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและสัตว์ปีกมีแหล่งกำเนิดจากยีนเดียวกันคือ Ob-R gene แต่เนื่องจากการเกิด alternative splicing ทำให้เกิดตัวรับแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน

ตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิดยาวของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมประมาณร้อยละ 60 และพบการแสดงออกจำนวนมากที่สมองและรังไข่ และพบที่เนื้อเยื่อไขมัน หัวใจ ปอด ตับ ไต ต่อมหมวกไต ม้าม และลำไส้ด้วย (Ohkubo *et al.*, 2000; Horev *et al.*, 2000) แต่ตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิดสั้นของไก่มีปริมาณการแสดงออกน้อยกว่าและจำกัดอยู่เฉพาะที่สมอง ตับ ไต รังไข่ และปอด (Liu *et al.*, 2007) ปัจจุบันพบว่าบทบาททางสรีรวิทยาของฮอร์โมนเลปตินในไก่มีหลากหลายและได้รับความสนใจในการศึกษาอย่างกว้างขวาง โดยพบว่าฮอร์โมนเลปตินมีผลระดับสมองต่อการยับยั้งการกินอาหารของไก่ (Dridi *et al.*, 2005) ช่วยบรรเทาผลกระทบด้านลบจากการอดอาหารต่อระบบสืบพันธุ์ของไก่ เช่น ช่วยยืดเวลาการออกไข่ ลดการฟ่อของฟอลลิเคิล (Paczoska-Eliasiewicz *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าฮอร์โมนเลปตินยังช่วยลดระยะเวลาการฟักของไข่ และมีผลต่อน้ำหนักของลูกนกกระทาแรกฟักด้วย (Lamosova *et al.*, 2003)

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าไก่พื้นเมืองไทย (Thai native chicken) ได้รับการจัดอยู่ในสปีชีส์ *Gallus gallus domesticus* เช่นเดียวกับ ไก่เนื้อและไก่ไข่ทางการค้าที่มีสายพันธุ์มาจากต่างประเทศ แต่เนื่องจากลักษณะรูปร่าง พฤติกรรมการกิน และการสะสมไขมันมีความแตกต่างกัน จึงมีความเป็นไปได้ว่ายีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการรักษาสมดุลพลังงาน เช่น ฮอร์โมนเลปตินและตัวรับของฮอร์โมนเลปติน อาจมีโครงสร้างและการทำงานแตกต่างกันระหว่างไก่ทั้งสองสายพันธุ์ ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนฮอร์โมนเลปตินและตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่พื้นเมืองไทย ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรม และการแสดงออกของยีนดังกล่าวในเนื้อเยื่อต่างๆ ของไก่ เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาลักษณะการทำงานของยีนดังกล่าวในไก่พื้นเมืองของไทยต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีนฮอว์โมนเลปติน และตัวรับของฮอว์โมนเลปตินในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว และเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และตำแหน่งการแสดงออกของยีนฮอว์โมนเลปติน และตัวรับของฮอว์โมนเลปตินระหว่างไก่พื้นเมืองของไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว สัตว์ปีกชนิดอื่นและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

การตรวจเอกสาร

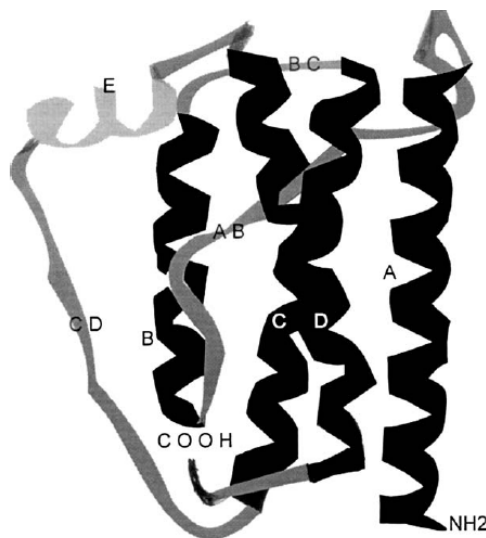
การปศุสัตว์จัดเป็นอาชีพทางเกษตรกรรมที่สำคัญของประเทศไทย เพราะนอกจากเป็นแหล่งอาหาร โปรตีนที่จำเป็นแล้วยังสามารถส่งเป็นสินค้าออกได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลผลิตจากไก่เนื้อได้รับการจัดอยู่อันดับ 1 ใน 5 ของประเทศผู้ส่งออกของโลกในช่วงปีคริสต์ทศวรรษ 2003-2008 (United State Department of Agriculture, 2008) ช่วงเวลาที่ผ่านมามีความพยายามพัฒนาผลผลิตไก่เนื้อให้มีคุณภาพอยู่ในระดับที่สามารถแข่งขันกับประเทศคู่แข่งอื่นๆ ได้ โดยอาศัยการจัดการด้านการเลี้ยง โภชนาการ และปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้สัตว์เจริญเติบโตเร็วและมีประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio; FCR) ดีขึ้น ทำให้สัตว์มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม ผลของการปรับปรุงพันธุ์ดังกล่าวกลับมีข้อเสียร่วมด้วยคือ ไก่เนื้อที่เลี้ยงระบบฟาร์มและได้รับการคัดเลือกสายพันธุ์ดังกล่าวมีการสะสมไขมันมาก หรือเกิดภาวะอ้วน (obesity) จึงทำให้คุณภาพซากด้อยลง และไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ดังนั้น จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาเกี่ยวกับกลไกทางสรีรวิทยาของการเกิดภาวะอ้วน และหามาตรการควบคุมตลอดจนประยุกต์ใช้การปรับปรุงด้านพันธุกรรมเพื่อคัดเลือกลักษณะของไก่เนื้อให้ตรงตามความต้องการของผู้บริโภค ซึ่งปัจจุบันมีการค้นพบยีนหลายตำแหน่งของไก่ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการสร้างและการสลายไขมัน จึงอาจนำมาใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ดังกล่าวได้

ยีนอ้วน และฮอโมนเลปติน

ยีนอ้วน (obese gene หรือ *ob* gene) ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Zhang *et al.* (1994) จากการศึกษาหนูเมาส์ (mouse) ที่มีลักษณะอ้วนและน้ำหนักมากกว่าปกติ ซึ่งต่อมาพบว่าเป็น *ob/ob* mouse ที่มีความผิดปกติของยีนอ้วน (*ob*-homologous gene) และได้รับการจัดเป็นหนูสายพันธุ์ C57BL/6J *ob/ob* ที่มีความผิดปกติของการแทนที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 105 ของยีน *ob* จากเบสไซโทซีน (cytosine; C) เป็นไทมีน (thymine; T) เป็นผลทำให้เกิดจุดหยุดการสังเคราะห์โปรตีน (stop codon) และไม่สามารถสร้างฮอโมนเลปตินปกติได้ (Zhang *et al.*, 1994; Rau *et al.*, 1999) และต่อมายังพบหนูสายพันธุ์ *ob^{2J}/ob^{2J}* ที่มีชิ้นส่วน ETn transposon เพิ่มเข้ามาบริเวณอินตรอนที่ 1 ของยีนและขัดขวางการสร้างฮอโมนเลปตินปกติ (Moon and Friedman, 1997) สำหรับการศึกษา ยีนอ้วนในคนพบว่า Montague *et al.* (1997) อาจเป็นนักวิทยาศาสตร์กลุ่มแรกที่รายงานความ

ผิดปกติของยีนดังกล่าวจากการพบเด็กชาวปากีสถานที่เป็นลูกพี่ลูกน้องกันจำนวน 2 คนมีลักษณะ อ้วนเร็วเกินและมีปริมาณฮอร์โมนเลปตินในเลือดต่ำ ซึ่งต่อมาพบว่าเกิดจาก frameshift mutation ของยีนอ้วนเพราะการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 133 ที่มีเบสกวานีน (guanine; G) ทำให้ฮอร์โมนเลปตินที่สร้างออกมาผิดปกติ นำออกมาภายนอกเซลล์ไม่ได้และถูกทำลายในที่สุด (Rau *et al.*, 1999) จึงเป็นผลทำให้เกิดโรคทางพันธุกรรมของการขาดฮอร์โมนเลปติน ที่เรียกว่า “congenital leptin deficiency” นอกจากนี้ Strobel *et al.* (1998) ยังรายงานความผิดปกติแบบ missense mutation ของยีนอ้วนที่พบในผู้ป่วยชาวตุรกีจำนวน 3 คนว่าเป็นผลมาจากการแทนที่ นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 105 จากเบสไซโทซีน เป็นไธมีน ซึ่งปัจจุบันมีหลักฐานชัดเจนว่ายีนอ้วน และฮอร์โมนเลปตินมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมสมดุลพลังงานของร่างกาย ความผิดปกติของยีน และสูญเสียการทำหน้าที่ของโปรตีนฮอร์โมนเลปตินมีผลทำให้ผู้ป่วยรับประทานอาหารมากเกินไป (hyperphagia) เกิดภาวะอ้วน และมีปัญหาด้านระบบสืบพันธุ์

ยีนอ้วน หรือ ยีนฮอร์โมนเลปติน (leptin) มาจากภาษากรีก คำว่า “leptos” แปลว่า “ผอม (thin)” โดยพบว่ายีนฮอร์โมนเลปตินอยู่บนตำแหน่ง A3.3; 6 10.5 cM ของโครโมโซมที่ 6 ของหนู เมาส์ ขณะที่อยู่บนตำแหน่ง 7q31.3 ของโครโมโซมที่ 7 ของคน ยีนดังกล่าวมีความยาวประมาณ 4,500 กิโลเบส (kb) ประกอบด้วยอินตรอน (intron) 2 ส่วนและเอ็กซอน (exon) 3 ส่วน ซึ่งถอดรหัส เป็น mRNA ขนาด 650 เบส และแปลรหัสเป็นโปรตีนฮอร์โมนเลปติน ขนาด 16 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 167 ตัว แบ่งเป็น signal peptide จำนวน 21 ตัวและ mature protein จำนวน 146 ตัวทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนเลปติน (Prolo *et al.*, 1998) ซึ่งเป็นโปรตีนฮอร์โมนและได้รับการจัดอยู่ในกลุ่ม long-chain class-I helical cytokine family เพราะมีลักษณะโครงสร้างเป็นเกลียว แอลฟา (α -helix bundle) จำนวน 4 เกลียวเชื่อมต่อกันและจัดเรียงรูปแบบเป็น ‘up-up-down-down’ (ภาพที่ 1) อยู่ในกลุ่มเดียวกับ interleukin (IL)-6, IL-11, IL-12, leukemia inhibitory factor, ciliary neurotrophic factor, oncostatin-M และ cardiotrophin-1 (Huisin *et al.*, 2006 and Anubhuti and Arora, 2008) กลุ่ม helical cytokines ดังกล่าวมี disulfide bridges อย่างน้อย 1-3 ตำแหน่งทำหน้าที่ยึดเพื่อรักษาความเสถียรของโครงสร้าง และทำงานผ่านตัวรับ (receptor) ที่มีลักษณะ โครงสร้างคล้ายกัน คือ บริเวณที่จับกับฮอร์โมน (cytokine-binding domain) มีรูปแบบเป็น fibronectin type-III (FnIII) domains ที่ส่วนใหญ่มี FnIII หรือ immunoglobulin domain เพิ่มขึ้นมา อีกอย่างน้อย 1 domain และ FnIII domain มีการจัดเรียงของกรดอะมิโนที่มีลักษณะเฉพาะคือ WSXWS motif (Thoreau *et al.*, 1991)



ภาพที่ 1 โครงสร้าง helical loop ของฮอร์โมนเลปตินแสดงโครงสร้างของโปรตีนแบบเกลียวชนิดแอลฟา (α -helix) จำนวน 4 เกลียวคือ A B C และ D โดยมีโปรตีนสาย AB BC และ CD เชื่อมเกลียวทั้ง 4 ไว้ด้วยกัน

ที่มา: Anubhuti and Arora (2008)

ปัจจุบันพบว่าการโคลนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮอร์โมนเลปตินในสัตว์หลายชนิด ทั้งสัตว์เลื้อยลูกด้วยน้ำนม เช่น สุกร (Bidwell *et al.*, 1997) โค (Pfister-Genskow *et al.*, 1996) หนูเมาส์ (Zhang *et al.*, 1994) หนูแรท (Murakami and Shima, 1995) คน (Zhang *et al.*, 1994) และสัตว์ปีก เช่น ไก่ (Taouis *et al.*, 1998) ไก่วง (GenBank AF082501) และเป็ด (GenBank AY555727) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง cDNA ของฮอร์โมนเลปตินของไก่และสัตว์เลื้อยลูกด้วยน้ำนมพบว่า cDNA ของฮอร์โมนเลปตินของไก่มีความเหมือน cDNA ของฮอร์โมนเลปตินของหนูเมาส์ (mouse) และหนูแรท (rat) ร้อยละ 90 ขณะที่เหมือน cDNA ของสัตว์เลื้อยลูกด้วยน้ำนมชนิดอื่นๆ เพียงร้อยละ 80-82 ทั้งนี้ ฮอร์โมนเลปตินของไก่และไก่วงมีจำนวนกรดอะมิโนเท่ากันคือ 145 ตัว แต่น้อยกว่าจำนวนกรดอะมิโนของฮอร์โมนเลปตินของสัตว์เลื้อยลูกด้วยน้ำนมที่มี 146 ตัว (Ashwell *et al.*, 1999a; Taouis *et al.*, 1998) และยังเป็นที่น่าสนใจที่ว่า mature protein ของฮอร์โมนเลปตินของหนูเมาส์มีชนิดและลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับสัตว์ปีกมากกว่า สัตว์เลื้อยลูกด้วยน้ำนมชนิดอื่นหลายชนิด คือ เหมือนของหนูแรท ร้อยละ 96.4 ไก่ ร้อยละ 94.6 โค ร้อยละ 83.2 คน ร้อยละ 83.2 และ สุกร ร้อยละ 82.0 ตามลำดับ (Doyon *et al.*, 2000)

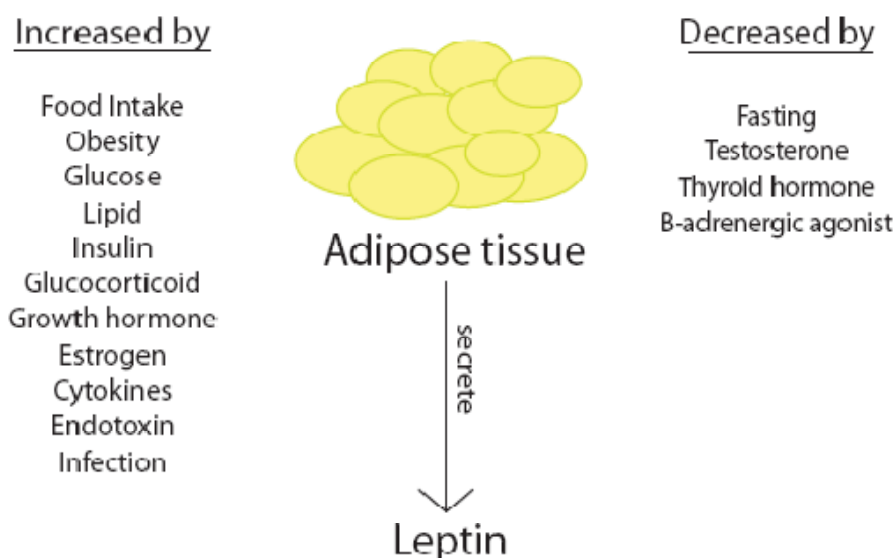
รายงานตรงกันว่าไม่สามารถตรวจพิสูจน์เพื่อยืนยันการมีอยู่ของยีนของฮอร์โมนเลปตินของไก่ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนตามที่มีการรายงานไว้โดย Taouis *et al.* (1998) และ Ashwell *et al.* (1999a) เช่น Friedman-Einat *et al.* (1999) ใช้ไพรเมอร์ 14 เส้นที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ของยีนฮอร์โมนเลปตินของหนูและไก่ แต่ไม่สามารถตรวจพบยีนฮอร์โมนเลปตินของไก่เนื้อ (broiler) ไก่แจ้ (bantam) ไก่กวาง (turkey) และนกกระทาญี่ปุ่น (Japanese quail) ทั้งในสภาวะปกติและสภาวะการให้อาหารเชิงบังคับ (force-feeding) ขณะที่สามารถโคลนยีนดังกล่าวได้ในหนูเมาส์ เช่นเดียวกัน Amills *et al.* (2003) ไม่สามารถโคลนยีนฮอร์โมนเลปตินจากเนื้อเยื่อไขมันของไก่ได้ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮอร์โมนเลปตินของไก่ตามรายงานของ Taouis และ คณะ (1998) ความล้มเหลวดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Ninov *et al.* (2008) ที่ไม่ประสบความสำเร็จจากการโคลนยีนฮอร์โมนเลปตินจากตัวอย่างเลือด เนื้อเยื่อไขมัน และตับของไก่เนื้อและไก่ไข่ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ ทั้งที่ออกแบบเองและอ้างอิงจาก Dridi *et al.* (2005) นอกจากนี้ Amills *et al.* (2003) ยังรายงานว่าไม่พบนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งใดๆ ในฐานข้อมูลจีโนมของไก่ (*Gallus gallus domesticus*) ตามฐานข้อมูลออนไลน์จาก The Biotechnology and Biological Sciences Research Council chicken expressed sequence tag database (<http://www.chick.umist.ac.uk>) และ University of Delaware Chick EST database (<http://www.chickest.udel.edu>) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนยีนฮอร์โมนเลปตินของไก่ตามที่มีการรายงานไว้ดังกล่าว จึงสอดคล้องกับ Pitel *et al.* (2000a) ที่รายงานว่าการศึกษาด้วยเทคนิค PCR-SSCP ไม่พบตำแหน่งโคดอนโครโมโซมของไก่ที่มีลักษณะของลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนของยีนฮอร์โมนเลปตินตามที่มีการอ้างอิงไว้ และเมื่อเร็วๆ นี้ Sharp *et al.* (2008) ได้เสนอต่อวารสารทางวิชาการต่างๆ ในกรณีของการทดลองที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดระดับฮอร์โมนเลปติน การแสดงผลทางชีวภาพของฮอร์โมนเลปติน หรือทดลองผลทางสรีรวิทยาของฮอร์โมนเลปตินของสัตว์ปีก ว่ายังไม่สามารถให้ความเชื่อถือได้จนกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮอร์โมนเลปตินจริงของไก่จะได้รับการพิสูจน์ให้ชัดเจน ดังนั้น แม้ว่ามีรายงานการผลิตฮอร์โมนเลปตินสังเคราะห์ของไก่จากเทคโนโลยีดีเอ็นเอรีคอมบิแนนท์ (recombinant DNA) (Raver *et al.*, 1998) รวมถึงรายงานการทดลองที่แสดงผลว่าฮอร์โมนเลปตินสังเคราะห์ของไก่ให้ผลทางชีวภาพเหมือนกับฮอร์โมนเลปตินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั้งแบบ *in vitro* และ *in vivo* เช่น จับตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิดยาว (long form) ของคนบน leptin-sensitive BAF/3 cells (Dridi *et al.*, 2000; Raver *et al.*, 2000) และลดปริมาณการกินอาหารของไก่ (Denbow *et al.*, 2000; Dridi *et al.*, 2000) ได้ดังเช่นที่พบในหนูและคน จึงยังเป็นที่น่าสงสัยและจำเป็นต้องมีการพิสูจน์ความถูกต้องต่อไป

การแสดงออกของยีนฮอร์โมนเลปติน

ยีนฮอร์โมนเลปตินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมมีการแสดงออกที่เนื้อเยื่อไขมันเป็นหลักและพบการแสดงออกที่เนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร (Bado *et al.*, 1998; Cinti *et al.*, 2000) ริก (Masuzaki *et al.*, 1997) กล้ามเนื้อลาย (Wang *et al.*, 1998a) เซลล์เยื่อบุต่อมน้ำนม (Casabiell *et al.*, 1998) เนื้อเยื่อสมอง และ ต่อมใต้สมอง (Morash *et al.*, 1999) นอกจากนี้ ยังพบการแสดงออกของยีนฮอร์โมนเลปตินที่เนื้อเยื่อหัวใจ กระดูกอ่อน และต่อมขนของตัวอ่อนของหนูแรท (Hoggard *et al.*, 1997b) ขณะที่การแสดงออกของยีนฮอร์โมนเลปตินของสัตว์ปีกพบเป็นส่วนใหญ่ที่เนื้อเยื่อไขมันและตับ (Taouis *et al.*, 1998; Ashwell *et al.*, 1999a) ทั้งนี้ เนื่องจากการแสดงออกของยีนฮอร์โมนเลปตินของไก่พบที่ตับและเนื้อเยื่อไขมันในระดับปริมาณใกล้เคียงกัน จึงเข้าใจว่าฮอร์โมนเลปตินอาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ไขมันในตับของสัตว์ปีกด้วย (Ashwell *et al.*, 1999a)

ปริมาณของการแสดงออกของยีนฮอร์โมนเลปตินยังเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยต่างๆ เช่น ระดับพลังงานสะสมของสัตว์ โภชนาการ เพศ ปริมาณและชนิดของฮอร์โมนในกระแสเลือด และสภาวะความผิดปกติของร่างกายบางชนิด (ภาพที่ 3) ทั้งนี้พบว่าฮอร์โมนเลปตินในเลือดมีปริมาณเพิ่มขึ้นภายใน 4-5 ชั่วโมง (สัตว์ฟันแทะ) หรือ 2-3 วัน (คน) หลังจากรับประทานอาหาร (Saladin *et al.*, 1995; Kolaczynski *et al.*, 1996) นอกจากนี้ ยังพบว่าฮอร์โมนเลปตินในกระแสเลือดมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณของการสะสมเนื้อเยื่อไขมัน (Hamilton *et al.*, 1995)

ระดับพลังงานของเซลล์มีความสัมพันธ์ต่อการแสดงออกของยีนฮอร์โมนเลปตินผ่านวิถีของ hexosamine biosynthetic pathway โดย Wang *et al.* (1998a) รายงานว่า glucosamine กระตุ้นการแสดงออกของยีนฮอร์โมนเลปตินในกล้ามเนื้อลายและเนื้อเยื่อไขมันของหนูแรทในสภาวะปกติ และเมื่อให้ UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายในวิถีดังกล่าวแก่หนูแรท สามารถเพิ่มปริมาณการแสดงออกของยีนฮอร์โมนเลปตินในกล้ามเนื้อลายและเนื้อเยื่อไขมัน อีกทั้งเพิ่มระดับของฮอร์โมนเลปตินในกระแสเลือดได้ และยังพบการแสดงออกของยีนฮอร์โมนเลปตินเพิ่มมากขึ้นเมื่อร่างกายของหนูแรทเข้าสู่ภาวะ hyperglycaemia และ hyperlipidaemia ด้วย (Wang *et al.*, 1998a)



ภาพที่ 3 ปัจจัยควบคุมการแสดงออกของฮอร์โมนเลปตินในเนื้อเยื่อไขมันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

ที่มา: ดัดแปลงจาก Macajova *et al.*, 2004

ฮอร์โมนหลายชนิดยังมีบทบาทต่อระดับของฮอร์โมนเลปตินในกระแสเลือด โดยพบว่า ฮอร์โมนที่มีฤทธิ์กระตุ้นการผลิตฮอร์โมนเลปติน ได้แก่ ฮอร์โมนอินซูลิน (insulin) (Saladin *et al.*, 1995; Rentsch and Chiesi, 1996; Kolaczynski *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 1996) ฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoid) (Slieker *et al.*, 1996) โกรทฮอร์โมน (growth hormone) (Houseknecht *et al.*, 1998) และฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) (Wang *et al.*, 1998a) ขณะที่ ฮอร์โมนที่มีฤทธิ์ลดการผลิตฮอร์โมนเลปติน คือ ฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) (Castracane *et al.*, 1998) ฮอร์โมนไทรอยด์ (thyroid hormone) (Escobar-Morreale *et al.*, 1997) รวมไปถึงสารจำพวก β -adrenergic agonist (Li *et al.*, 1997)

นอกจากนี้ พบว่าฮอร์โมนเลปตินของสัตว์เพศเมียมีปริมาณสูงกว่าของสัตว์เพศผู้ที่มีน้ำหนัก อายุ และปริมาณของไขมันสะสมในร่างกายอยู่ในระดับเดียวกัน (Frederich *et al.*, 1995; Murakami and Shima, 1995; Slieker *et al.*, 1996) และมีปริมาณของฮอร์โมนเลปตินในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นเมื่อร่างกายได้รับเชื้อโรค หรือสารพิษจำพวกเอนโดทอกซิน (endotoxin) และสารไซโตไคน์ (cytokines) บางชนิด เช่น tumor necrosis factor (TNF) leukemia inhibitory factor

(LIF) และ interleukin 1 (IL-1) (Grunfeld *et al.*, 1996; Janik *et al.*, 1997; Bornstein *et al.*, 1984) จึงเป็นไปได้ว่าเมื่อสัตว์ได้รับเชื้อโรคหรือสารพิษแล้วอาจไปมีผลกระทบต่อน้ำนมให้มีการผลิตและหลั่งไฮโดรคาลซินออกมาทำหน้าที่กระตุ้นการสร้างฮอร์โมนเลปตินออกสู่กระแสเลือดเพิ่มขึ้น จึงเป็นสาเหตุทำให้สัตว์เบื่ออาหาร และน้ำหนักลดลง (Sarraf *et al.*, 1997; Janik *et al.*, 1997; Schwartz and Seeley, 1997) ในทางกลับกัน การให้ยา troglitazone ที่มีฤทธิ์ลดการอักเสบและต่อต้านภาวะเบาหวาน สามารถลดการสังเคราะห์ฮอร์โมนเลปตินจากเซลล์เนื้อเยื่อไขมันได้ (Kallen and Lazar, 1996)

สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีนฮอร์โมนเลปตินของไก่ พบว่าการให้ฮอร์โมนอินซูลิน และ dexamethasone (ฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์สังเคราะห์) มีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนฮอร์โมนเลปตินเฉพาะเนื้อเยื่อตับแต่ไม่พบความแตกต่างในเนื้อเยื่อไขมัน เช่นเดียวกับ ฮอร์โมนกลูคาгон (glucagon) ซึ่งให้ผลยับยั้งการแสดงออกของยีนดังกล่าวเฉพาะในเนื้อเยื่อตับเท่านั้น ขณะที่การให้ฮอร์โมนเอสโตรเจน สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนฮอร์โมนเลปตินได้ทั้งในเนื้อเยื่อตับและเนื้อเยื่อไขมัน แต่ปริมาณการแสดงออกของยีนดังกล่าวในเนื้อเยื่อตับมีมากกว่าในเนื้อเยื่อไขมันอย่างเห็นได้ชัด (Ashwell *et al.*, 1999a)

ยีน Ob-R และตัวรับของฮอร์โมนเลปติน

ตัวรับของฮอร์โมนเลปติน (leptin receptor) ได้ถูกค้นพบครั้งแรกในปีคริสต์ศักราช 1995 โดย Tartaglia *et al.* จากหนูกลายพันธุ์ *db/db* mouse ที่มีลักษณะอ้วนเกินเช่นเดียวกับหนู *ob/ob* แต่มีภาวะของโรคเบาหวานร่วมด้วย และพบต่อมาในภายหลังว่าหนูสายพันธุ์ *db/db* ดังกล่าวมีความผิดปกติของยีน Ob-R ทำให้ไม่สามารถผลิตโปรตีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิดยาว (long-form) ได้ การศึกษาโครงสร้างยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีกพบว่าประกอบด้วย 19 อินตรอน และ 20 เอ็กซอน แต่มีเพียง 18 เอ็กซอนเท่านั้นที่กำหนดรหัสของโปรตีนตัวรับของฮอร์โมนเลปติน โดยตำแหน่งของโคดอนกำหนดรหัสเริ่มต้น (start codon) อยู่บนเอ็กซอนที่ 3 และโคดอนกำหนดรหัสสิ้นสุด (stop codon) อยู่บนเอ็กซอนที่ 20 จากการเปรียบเทียบโครงสร้างยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินระหว่างสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (หนูเมาส์ และคน) และสัตว์ปีก (ไก่และไก่งวง) พบว่ามีจำนวน ขนาด และลำดับของเอ็กซอนที่กำหนดรหัสการสร้างโปรตีน (เอ็กซอนที่ 3-20) คล้ายกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 (Horev *et al.*, 2000; Richards and Poch, 2003)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบจำนวน ขนาด และลำดับของเอ็กซอนในยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปติน (ชนิดยาว) เฉพาะตำแหน่งที่มีการแปลรหัสระหว่างสัต์ว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม และสัต์ว์ปีก

เอ็กซอนที่	ไก่อ่งวง	ไก่	หนูเมาส์	คน
	จำนวนนิวคลีโอไทด์ที่มีการแปลรหัส			
3	38	38	40	40
4	311	311	330	330
5	118	118	124	124
6	205	205	206	209
7	147	150	143	146
8	151	145	145	145
9	291	291	291	291
10	121	118	118	118
11	196	196	200	200
12	150	150	149	149
13	156	156	160	160
14	84	84	83	83
15	213	213	217	217
16	186	186	183	183
17	96	96	96	96
18	105	105	106	106
19	75	75	76	76
20	801	804	822	825
จำนวนนิวคลีโอไทด์ ที่มีการแปลรหัสได้ ทั้งหมด	3444	3441	3489	3498

ปัจจุบันมีการโคลนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินในสัตว์หลายชนิด เช่น คน (Tartaglia *et al.*, 1995) สุกร (Ernst *et al.*, 1997) หนูแรท (Phillips *et al.*, 1996) หนูเมาส์ (Chen *et al.*, 1996) ไก่ (Horev *et al.*, 2000) และไก่อ่งวง (Richards and Poch, 2003) และ

พบว่าเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA และ กรดอะมิโนของโปรตีนตัวรับฮอร์โมนเลปตินระหว่างสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมด้วยกันเองพบที่มีความเหมือนกันระหว่างร้อยละ 80-93 และ 74-91 ตามลำดับ ขณะที่การเปรียบเทียบระหว่างสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมมีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันอยู่ระหว่างร้อยละ 60-63 (ตารางที่ 2) และ 46-48 (ตารางที่ 3) ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาเฉพาะบริเวณอนุรักษ์ระหว่างสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมพบที่มีความเหมือนกันอยู่ระหว่างร้อยละ 62-64 (Horev *et al.*, 2000; Richards and Poch, 2003)

ตารางที่ 2 จำนวนร้อยละของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน (nucleotide identities) ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและสัตว์ปีก

	ขนาด (คู่เบส)	คน	สุกร	หนูแรท	หนูเม้าส์	ไก่	ไก่ทอง
คน	3,498	100	88	81	81	62	63
สุกร	3,498		100	80	80	61	62
หนูแรท	3,489			100	93	60	61
หนูเม้าส์	3,489				100	60	60
ไก่	3,441					100	94
ไก่ทอง	3,444						100

ที่มา: Richards and Poch (2003)

แม้ว่าลำดับกรดอะมิโนของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินระหว่างสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและสัตว์ปีกมีความคล้ายคลึงกันเพียงร้อยละ 46-48 แต่มีรายงานว่าฮอร์โมนรีคอมบิแนนท์เลปติน (recombinant leptin) ของคน สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดผลทางชีวภาพในไก่ได้ (Denbow *et al.*, 2000) โดยเมื่อฉีดฮอร์โมนเลปตินเข้าสู่ช่องน้ำเลี้ยงสมองและไขสันหลัง (intracerebrovascular (ICV) injection) ในไก่เนื้อซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว และไก่สายพันธุ์ Single Comb White LegHorn (SCWL) ซึ่งมีลักษณะการเจริญเติบโตช้า พบว่าสามารถลดการกินอาหารในไก่ทั้งสองสายพันธุ์ได้ เช่นเดียวกับ Dridi *et al.* (2000) ที่พบว่าฮอร์โมนรีคอมบิแนนท์เลปตินจากแกะสามารถลดการกินอาหารในไก่ไข่และไก่เนื้อเช่นเดียวกับการให้ฮอร์โมนรีคอมบิแนนท์เลปตินของไก่ อย่างไรก็ตาม Kuo *et al.* (2005) ได้ทดลองฉีดฮอร์โมนรีคอมบิแนนท์เลปตินของคนแบบ ICV ให้กับไก่

ตารางที่ 3 จำนวนร้อยละของลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกัน (amino acid identities) และลำดับกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ที่เหมือนกัน (conserved amino acid identities; แสดงในวงเล็บ) ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก

	จำนวน กรดอะมิโน	คน	สุกร	หนูแรท	หนูเมาส์	ไก่	ไก่ทอง
คน	1,165	100	83 (89)	75(85)	75(84)	47(63)	48(64)
สุกร	1,162		100	74(84)	74(83)	47(64)	48(64)
หนูแรท	1,162			100	91(94)	46(63)	47(63)
หนูเมาส์	1,162				100	46(62)	47(63)
ไก่	1,146					100	90(93)
ไก่ทอง	1,147						100

ที่มา: Richards and Poch (2003)

สายพันธุ์ White rock ที่ถูกคัดเลือกพันธุ์ผ่านมาแล้ว 45 รุ่น เพื่อให้ได้ไก่ 2 กลุ่มที่มีน้ำหนักแตกต่างกัน 9 เท่าที่อายุ 8 สัปดาห์ คือกลุ่มสายพันธุ์น้ำหนักมาก (HWS) และกลุ่มสายพันธุ์น้ำหนักน้อย (LWS) พบว่าฮอร์โมนดังกล่าวมีผลต่อการลดปริมาณการกินอาหารเฉพาะไก่กลุ่ม LWS เท่านั้น แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการกินอาหารของไก่กลุ่ม HWS ทั้งนี้คณะผู้วิจัยสันนิษฐานว่าอาจเป็นผลมาจากกลไกการทำงานของฮอร์โมนเลปตินที่แตกต่างกันระหว่างไก่ทั้งสองกลุ่ม แต่ในปัจจุบันยังไม่สามารถอธิบายถึงความแตกต่างของกลไกดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตาม เหตุผลหนึ่งที่ฮอร์โมนรีคอมบิเนนต์เลปตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดผลทางชีวภาพในไก่ได้เป็นเพราะตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่สามารถจับกับฮอร์โมนรีคอมบิเนนต์เลปตินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น คน (Denbow *et al.*, 2000; Kuo *et al.*, 2005) และ (Dridi *et al.*, 2000) และหนู (Lamozova and Zeman, 2001) นอกจากนี้ ลักษณะโครงสร้างของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่และของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีบริเวณอนุรักษ์ที่จำเป็นต่อการทำงานของตัวรับเหมือนกัน คือ บริเวณส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular domain) พบลำดับโปรตีนอนุรักษ์ Tryptophan-Serine-X-Tryptophan-Serine หรือ WSXWS ที่เป็นตำแหน่งของการจับของฮอร์โมนเลปติน และบริเวณส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular domain) พบ Box 1 motif (X-Tryptophan-X-X-X-Proline-X-Proline; xWxxxPxP) Box 3 motif (Tyrosine-X-X-Glutamine;

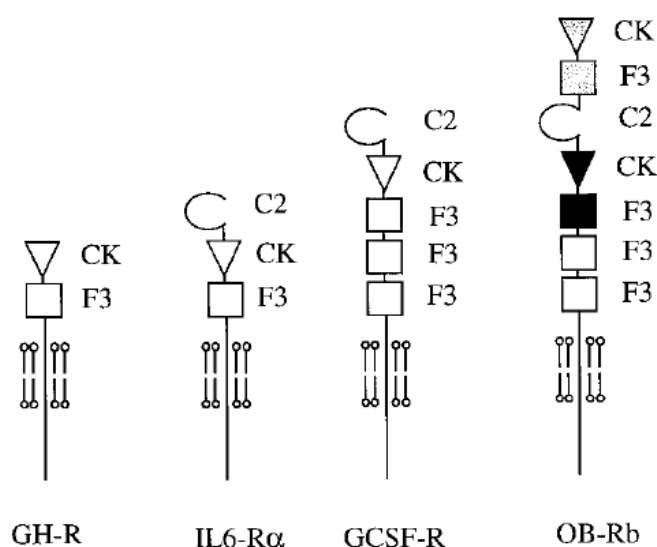
YxxQ) และตำแหน่งของกรดอะมิโนไทโรซีน 3 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 986 1,079 และ 1,141 (ในไก่) และตำแหน่งที่ 975 1,070 และ 1,128 (ในไก่ทอง) ทั้งนี้ เข้าใจว่าตำแหน่งของกรดอะมิโนไทโรซีนดังกล่าวมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการนำส่งสัญญาณภายในเซลล์ (Horev *et al.*, 2000; Richards and Poch, 2003)

ทั้งนี้ มีข้อสังเกตตามรายงานของ Horev *et al.* (2000) และ Richards and Poch (2003) ว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 269 และ 260 ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่และไก่ทอง ตามลำดับ (สอดคล้องกับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 269 ของหนู) เป็นชนิดกลูตาเมต (Glutamate; Glu) ไม่ใช่กลูตามีน (Glutamine; Gln) ดังที่พบในหนูปกติ ทั้งนี้ มีรายงานในหนูสายพันธุ์ *fa Zucker* ว่าการเกิดการกลายพันธุ์ของยีนตำแหน่งนี้โดยการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนจากกลูตามีนเป็นโพรลีน (Proline; Pro) ทำให้ตัวรับของฮอร์โมนเลปตินทำงานผิดปกติ (Iida *et al.*, 1996; White *et al.*, 1997) แต่การที่กรดอะมิโนตำแหน่งดังกล่าวของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่และไก่ทองเป็นชนิดกลูตาเมต (ไม่ใช่กลูตามีน) ไม่มีผลต่อการทำงานตามปกติของตัวรับของฮอร์โมนเลปติน

ตัวรับของฮอร์โมนเลปตินถูกจัดอยู่ในกลุ่ม class 1 cytokine receptor family ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับ growth hormone receptor (GH-R) interleukin-6 receptor (IL6-R) และ granulocyte colony-stimulating factor receptor (GCSF-R) คือเป็น single transmembrane receptor และมีโครงสร้างแบบอนุรักษของโปรตีนคล้ายกัน คือ ส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์ ประกอบด้วย fibronectin-3 (F3) domain immunoglobulin C2 (C2) domain และ cytokine (CK) domain (Fong *et al.*, 1998) ทั้งนี้ จากการศึกษาพบว่าตัวรับของฮอร์โมนเลปตินมี CK-F3 domain จำนวน 2 ตำแหน่ง ซึ่งตามปกติ CK-F3 domain เป็นตำแหน่งบนตัวรับสำหรับการจับของฮอร์โมนกลุ่มนี้ แต่ Fong *et al.* (1998) รายงานว่าพบเฉพาะ CK-F3 domain ตำแหน่งที่ 2 ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินเพียงตำแหน่งเดียวที่จับกับฮอร์โมนเลปติน (ภาพที่ 4)

นอกจากนี้ยังพบบริเวณอนุรักษของส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ ด้วย คือ Box 1 Box 2 และ Box 3 motif รวมถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนไทโรซีน 3 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 985 (Tyr₉₈₅) 1,077 (Tyr_{1,077}) และ 1,138 (Tyr_{1,138}) ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ตำแหน่งที่ 986 (Tyr₉₈₆) 1,079 (Tyr_{1,079}) และ 1,141 (Tyr_{1,141}) ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่ และตำแหน่งที่ 975 (Tyr₉₇₅) 1,070 (Tyr_{1,070}) และ 1,128 (Tyr_{1,128}) ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่ทอง จากการศึกษาพบว่า Box 1 ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดโพรลีนเป็นจำนวนมาก เข้าใจว่า

Box 1 เป็นจุดจับและสนับสนุนการทำงานของเอนไซม์ Janus kinase (JAKs) และส่วน Box 2 ทำหน้าที่คัดเลือกชนิดของเอนไซม์ JAKs (Taga and Kishimoto, 1997; Ihle and Kerr, 1995) โดยการศึกษาตัวรับของฮอร์โมนเลปตินในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมพบว่า Box 2 มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ JAK2 (Kloek *et al.*, 2002) และพบเฉพาะในตัวรับชนิดยาวเท่านั้น (ไม่พบในตัวรับชนิดสั้น) จึงเข้าใจว่า Box 2 อาจเป็นบริเวณสำคัญภายในเซลล์สำหรับการทำงานของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินและอาจใช้อธิบายเหตุผลที่พบว่าหนู *db/db* มีความผิดปกติของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิดยาวเพียงชนิดเดียว (ตัวรับชนิดอื่นปกติ) แต่สามารถทำให้เกิดลักษณะความผิดปกติได้เช่นเดียวกับหนู *ob/ob* ที่มีความผิดปกติของฮอร์โมนเลปติน (Tartaglia, 1997; Kloek *et al.*, 2002; White *et al.*, 1997) นอกจากนี้ กรดอะมิโนไทโรซีน ทั้ง 3 ตำแหน่ง (Tyr₉₈₅ Tyr_{1,077} และ Tyr_{1,138}) ยังมีความสำคัญต่อการส่งสัญญาณสื่อสารภายในเซลล์ผ่านกระบวนการเคลื่อนย้ายหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) (Banks *et al.*, 2000; Tartaglia, 1997; White *et al.*, 1997)

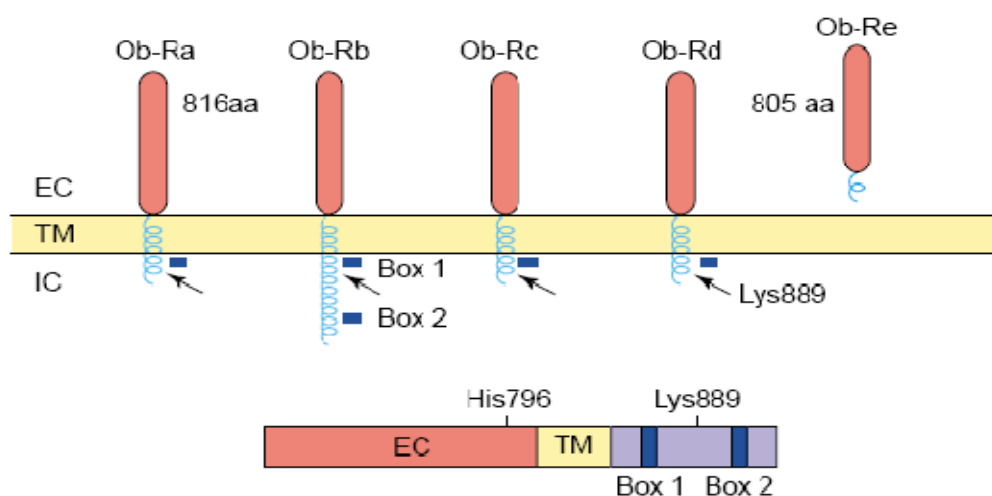


ภาพที่ 4 ส่วนประกอบหลักของโครงสร้างของตัวรับไซโตไคน์กลุ่ม class 1 cytokine receptor family ประกอบด้วย growth hormone receptor (GH-R) interleukin-6 receptor (IL6-R) granulocyte colony-stimulating factor receptor (GCSF-R) และตัวรับของฮอร์โมนเลปติน (OB-Rb)

ที่มา: Fong *et al.*, 1998

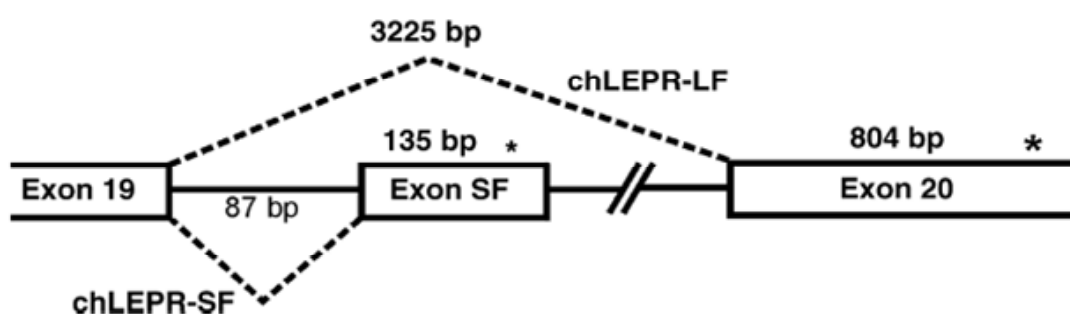
ตัวรับของฮอร์โมนเลปตินถูกกำหนดรหัสมาจากยีนเพียงชนิดเดียว คือ Ob-R gene แต่ผลของ alternative splicing ของ mRNA ทำให้เกิดโปรตีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินแตกต่างกันหลายชนิดและอาจแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะโครงสร้าง (Chen *et al.*, 1996; Tartaglia, 1997) คือ กลุ่มแรกเป็นตัวรับชนิดอยู่บนผิวเซลล์และมีส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ยาว ที่เรียกว่าตัวรับชนิดยาว (long form) กลุ่มที่สองเป็นตัวรับชนิดอยู่บนผิวเซลล์และมีส่วนที่อยู่ภายในเซลล์สั้น ที่เรียกว่าตัวรับชนิดสั้น (short form) และกลุ่มสุดท้ายเป็นตัวรับชนิดไม่มีส่วนที่แทรกอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ และเชื่อว่าการเกี่ยวข้องกับการขนส่งฮอร์โมนเลปตินในกระแสเลือด ที่เรียกว่าตัวรับชนิดหลั่งออกนอกเซลล์ (secreted form) ปัจจุบันพบตัวรับของฮอร์โมนเลปตินอย่างน้อย 6 ชนิดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (ภาพที่ 5) (Ahima and Flier., 2000; Ahima *et al.* 2000; Meister, 2000) ประกอบด้วย ตัวรับชนิดบี (Ob-Rb) จัดอยู่ในกลุ่มตัวรับชนิดยาว ตัวรับชนิดเอ (Ob-Ra) ชนิดซี (Ob-Rc) ชนิดดี (Ob-Rd) และชนิดเอฟ (Ob-Rf) (ไม่ได้แสดง) จัดอยู่ในกลุ่มตัวรับชนิดสั้น และ ตัวรับชนิดอี (Ob-Re) จัดอยู่ในกลุ่มตัวรับชนิดคัดหลั่งออกนอกเซลล์ได้ โดยตัวรับของฮอร์โมนเลปตินทั้ง 6 ชนิดมีส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์ (เอ็กซอนที่ 3-14) เหมือนกัน แต่การเกิด alternative splicing ของเอ็กซอนที่ 14 ทำให้เกิดตัวรับชนิดอีที่ไม่มีส่วนที่แทรกอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane domain) ในขณะที่ความแตกต่างของส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ของตัวรับชนิดเอ ซี ดี และเอฟ เป็นผลมาจากการเกิด alternative splicing ของเอ็กซอนที่ 17 ทำให้ตัวรับชนิดดังกล่าวมีส่วนของส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ ถึงบริเวณ Box 1 เท่านั้น อย่างไรก็ตามในตัวรับกลุ่มดังกล่าวจะมีความแตกต่างของ short form exon ทำให้เกิดลำดับกรดอะมิโนหลังจากตำแหน่งที่เกิด alternative splicing แตกต่างกัน ขณะที่ตัวรับชนิดบีสามารถถอดรหัสได้ถึงเอ็กซอนที่ 20 จึงมีส่วนประกอบของ Box 2 และ 3 รวมถึงกรดอะมิโนไทโรซีนที่มีหน้าที่สำคัญในการนำส่งสัญญาณภายในเซลล์

สำหรับการศึกษาในสัตว์ปีกพบว่าตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่มีอย่างน้อย 2 ชนิดตามผลของ alternative splicing บริเวณเอ็กซอนที่ 19 และต่อด้วยเอ็กซอน 2 แบบ คือ ต่อด้วย short form exon ขนาด 135 คู่เบส ทำให้เกิดตัวรับชนิดสั้น หรือ ต่อด้วยเอ็กซอนที่ 20 ขนาด 804 คู่เบส ทำให้เกิดตัวรับชนิดยาว ดังแสดงในภาพที่ 6 (Liu *et al.*, 2007)



ภาพที่ 5 โครงสร้างตัวรับของฮอร์โมนเลปติน (Ob-R) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ ตัวรับชนิดเอ (Ob-Ra) ชนิดบี (Ob-Rb) ชนิดซี (Ob-Rc) ชนิดดี (Ob-Rd) และชนิดอี (Ob-Re) โดยสามารถตัวรับทั้งหมดออกเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะโครงสร้าง คือ กลุ่มตัวรับชนิดสั้น ได้แก่ ตัวรับชนิดเอ ซี ดี และเอฟ (ไม่ได้แสดงภาพ) กลุ่มตัวรับชนิดยาว ได้แก่ ตัวรับชนิดบี และตัวรับชนิดหลังออกนอกเซลล์ ได้แก่ ตัวรับชนิดอี

ที่มา: Caprio *et al.*, 2001



ภาพที่ 6 แสดงการเกิด alternative splicing ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิดตัวรับชนิดสั้น และตัวรับชนิดยาวในไก่ โดยฮอร์โมนเลปตินชนิดยาว (chLEPR-LF) จะถูกเชื่อมต่อโดยเอ็กซอนที่ 20 (ขนาด 804 คู่เบส) ขณะที่ตัวรับชนิดสั้น (chLEPR-SF) จะถูกเชื่อมต่อด้วยเอ็กซอน SF (ขนาด 135 คู่เบส)

ที่มา: Liu *et al.*, 2007

กลไกการปฏิสัมพันธ์และการยับยั้งของตัวรับของฮอร์โมนเลปติน

กลไกการปฏิสัมพันธ์ของฮอร์โมนเลปตินและตัวรับ

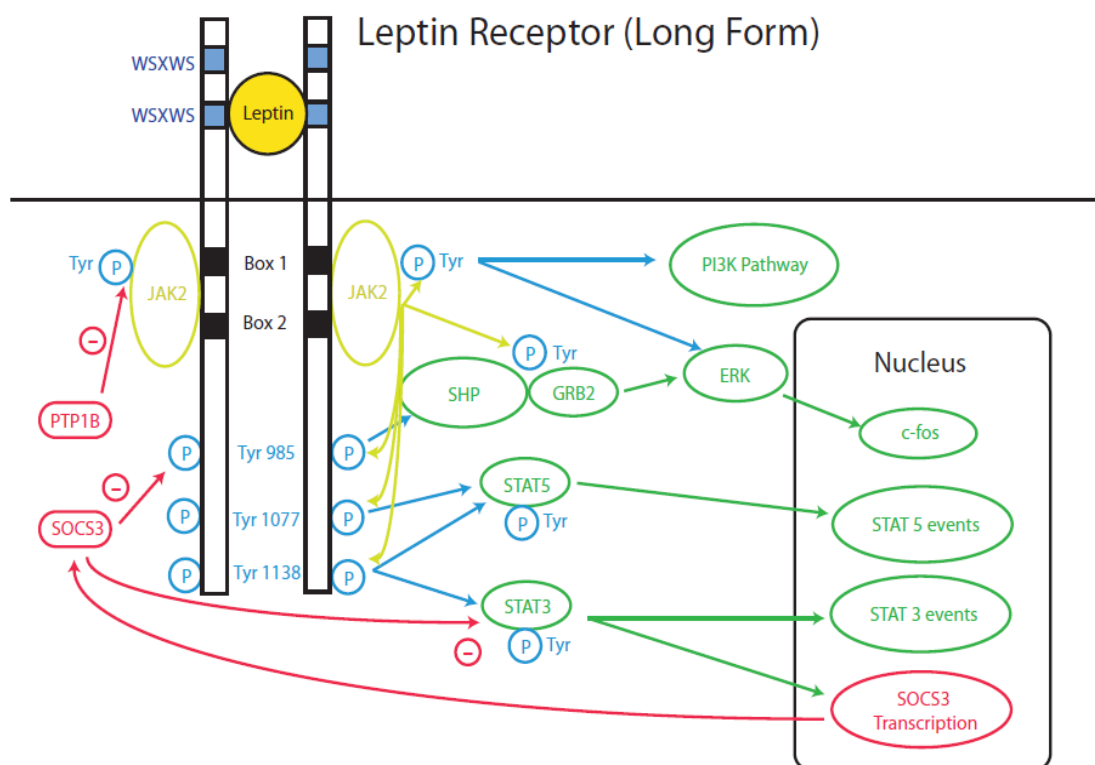
หลักฐานปัจจุบันแสดงให้เห็นว่ากลไกการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเลปตินเกิดขึ้นได้เฉพาะเมื่อทำงานผ่านตัวรับชนิดยาวเท่านั้น (Bjorbaek *et al.*, 1997; Tartaglia, 1997) โดยพบว่าเมื่อฮอร์โมนเลปตินจับตัวรับชนิดนี้แล้วสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ได้อย่างน้อย 2 เส้นทางคือ

1. วิธี Janus kinases and Signal Transducers and Activators of Transcription

เนื่องจากโปรตีนตัวรับของกลุ่ม class 1 cytokine receptor รวมถึงตัวรับของฮอร์โมนเลปตินไม่มีส่วนประกอบของโปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณโดยตรงจากส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ จึงต้องอาศัยโมเลกุลของโปรตีนภายในไซโทพลาสซึมเป็นตัวช่วย โดยตัวรับของฮอร์โมนเลปตินอาศัยเอนไซม์ Janus kinase (JAKs) สำหรับส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ เอนไซม์ดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ tyrosine kinase และมีสมาชิกทั้งหมด 4 ตัว ได้แก่ Janus kinase1 (JAK1) Janus kinase2 (JAK2) Janus kinase3 (JAK3) และ Tyrosine kinase (Tyk2) (Ihle and Kerr, 1995; Taniguchi, 1995) ทั้งนี้พบ JAK1 JAK2 และ Tyk2 อยู่ในเซลล์เนื้อเยื่อทั่วไป แต่พบ JAK3 อยู่เฉพาะในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (hematopoietic cells) และเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเท่านั้น

Kloek *et al.* (2002) รายงานว่าตัวรับของฮอร์โมนเลปตินทำงานผ่าน JAK2 โดยเริ่มจากฮอร์โมนเลปตินจำนวน 1 โมเลกุลจับกับตัวรับของฮอร์โมนเลปตินจำนวน 2 โมเลกุลที่เข้าคู่กันแบบ homodimer บนผิวเซลล์ หลังจากนั้นจะกระตุ้นเอนไซม์ JAK2 ที่เกาะอยู่บริเวณ Box 1 และ Box 2 ให้เกิดกระบวนการ phosphorylation เพื่อให้หมู่ฟอสเฟตแก่กรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) และเกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (Banks *et al.*, 2000; Couturier and Jockers, 2003; Tartaglia, 1997; White *et al.*, 1997) โดยปัจจุบันพบว่า การจับกันของฮอร์โมนเลปตินและตัวรับจะเหนี่ยวนำให้เอนไซม์ JAK2 เกิดกระบวนการ phosphorylation แก่กรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) เป้าหมายอย่างน้อย 4 ตำแหน่ง (ภาพที่ 7) ในวิถี JAK-STAT คือ ตำแหน่งที่ Tyr₉₈₅ Tyr_{1,077} Tyr_{1,138} ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินและ Tyr ของ JAK2 ภายหลังการเกิด phosphorylation แล้ว Tyr₉₈₅ กระตุ้นการเกิด phosphorylation ต่อไปยังกลุ่มโปรตีน SHP/GRB2 เพื่อส่งต่อสัญญาณผ่าน p21ras-

extracellular-signal-regulation kinase (ERK) ขณะเดียวกัน การเกิด phosphorylation ของ Tyr_{1,138} เป็นผลให้เกิดการนำสัญญาณผ่านวิถี Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) 3 และ STAT5 เข้าสู่เซลล์ โดยอาศัย STAT3 เป็นหลัก (Hekerman *et al.*, 2004)



ภาพที่ 7 กลไกการส่งและยับยั้งสัญญาณภายในเซลล์ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิดยาว โดยวิธีการกระตุ้นแสดงโดยลูกศรสีเหลือง เทียบ และน้ำเงิน ขณะที่วิธีการยับยั้งแสดงโดยใช้ลูกศรสีแดง (PI3K Pathway - Phosphatidylinositol – 3 kinase pathway; Jak2 – Janus kinase 2 ; PTP1B - protein tyrosine phosphatase 1B; Tyr – Tyrosine residue; SHP-2 - SH2 domain-containing tyrosine phosphatases 2; GRB2 - Growth factor receptor-bound protein 2 ; ERK - extracellular-signal-regulated kinase; SOCS3 - suppressor of cytokine signaling-3; STAT3 - Signal Transducer and Activator of Transcription 3; STAT5 - Signal Transducer and Activator of Transcription 5)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Bates and Myer (2003) และ Lavens *et al.*, 2006a

แม้ว่าในปัจจุบันยังไม่ทราบถึงกลไกการทำงานของ Tyr_{1,077} อย่างชัดเจน แต่พบว่ากรดอะมิโนตำแหน่งดังกล่าวมีความจำเพาะต่อการจับของ STAT5 ซึ่งอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณและเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการบางอย่างภายในเซลล์ได้ (Lavens *et al.*, 2006b; Gong *et al.*, 2007) โดยจากการศึกษาของ Gong *et al.* (2007) พบว่า ฮอร์โมนเลปตินสามารถกระตุ้นกระบวนการ phosphorylation ของ STAT5 ภายในเซลล์สมองส่วนไฮโปทาลามัสบริเวณ arcuate nucleus ของหนูเมาส์ที่ได้รับการเพาะเลี้ยงได้ โดยอาจเป็นไปได้ว่า Tyr_{1,077} อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมสมดุลพลังงานในระดับสมอง

2. วิถี Janus kinase – insulin receptor substrate - phosphatidylinositol-3 kinase

ตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิดยาวส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ผ่านวิถี Janus kinase - insulin receptor substrate - phosphatidylinositol – 3 kinase (JAK-RIS-PI3K) (Kellerer *et al.*, 1997; Bjorbaek *et al.*, 1997) โดยพบว่าเมื่อฮอร์โมนเลปตินจับตัวรับแล้วสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด phosphorylation ของเอนไซม์ Janus kinase (JAK) การกระตุ้นเอนไซม์ดังกล่าวมีผลต่อมาให้โปรตีน insulin receptor substrate (IRS) ได้รับการกระตุ้น และมีผลไปกระตุ้นเอนไซม์ phosphatidylinositol – 3 kinase ให้ทำงานต่อไป ซึ่งพบว่าตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิดสั้นสามารถส่งสัญญาณผ่านวิถีดังกล่าวได้เช่นกัน (Kellerer *et al.*, 1997) แต่อย่างไรก็ตาม การนำสัญญาณผ่านวิถี JAK-RIS-PI3K ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินดังกล่าวเป็นข้อมูลที่ได้จากผลการศึกษาของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการและยังมีข้อมูลจำกัด จึงยังเข้าใจว่าการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินอาศัยวิถี JAK-STAT เป็นหลัก

กลไกการยับยั้งการปฏิสัมพันธ์ของฮอร์โมนเลปตินและตัวรับ

การส่งสัญญาณของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินเข้าสู่เซลล์ถูกควบคุมด้วยโปรตีนอย่างน้อย 2 ชนิด คือ protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) และกลุ่ม suppressor of cytokine signalings (SOCs) (Lavens *et al.*, 2006a) (ภาพที่ 7) โดยพบว่า PTP1B ขัดขวางการส่งสัญญาณจากตัวรับของฮอร์โมนเลปตินโดยยับยั้งการทำงานของ JAK2 ผ่านกระบวนการ dephosphorylation (Cheng *et al.*, 2002; Kaszubska *et al.*, 2002; Lund *et al.*, 2005; Zabolotny *et al.*, 2002) ขณะที่กลุ่มโปรตีน SOCs ยับยั้งการส่งสัญญาณจากตัวรับดังกล่าวได้หลายตำแหน่ง ขึ้นกับชนิดของโปรตีน SOCs ยกตัวอย่างเช่น การส่งสัญญาณจากตัวรับของฮอร์โมนเลปตินถูกยับยั้งด้วย SOCS1 ที่ระดับการทำงานของ

เอนไซม์ JAK2 (Yasukawa *et al.*, 1999; Giordanetto *et al.*, 2003) ขณะที่ SOCS3 ยับยั้งที่ระดับของ Tyr₉₈₅ (Bjorbaek *et al.*, 2000; Eyckerman *et al.*, 2000) และ Tyr_{1,077} (Eyckerman *et al.*, 2000)

กลไกการยับยั้งการปฏิสัมพันธ์ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินภายในเซลล์ สามารถเกิดได้ผ่านหลายปัจจัย แต่พบว่า ส่วนหนึ่งของการส่งสัญญาณของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินผ่านวิถีของ STAT3 ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) ให้โปรตีน SOCS3 กลับมาทำงานยับยั้งแบบย้อนกลับ (negative feedback) โดย SOCS3 จับ Tyr₉₈₅ บนตัวรับและยับยั้งการทำงานของโปรตีน SH2 (Banks *et al.*, 2000; Bjorbaek *et al.*, 2000)

การแสดงออกของยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปติน

การศึกษาการแสดงออกของยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น คน หนู สุกร พบ mRNA และโปรตีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินอยู่ในหลายเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 4) รวมถึง สมองส่วนไฮโปทาลามัส ตับ ตับอ่อน ม้าม ไต ลำไส้ ปอด กล้ามเนื้อ ไขมัน อวัยวะ และรังไข่ แสดงถึงบทบาททางสรีรวิทยาที่มีความหลากหลายของฮอร์โมนเลปติน เช่นเดียวกัน การศึกษาการแสดงออกของยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของสัตว์ปีก พบการแสดงออกของ mRNA หรือ โปรตีนอยู่ในหลายเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 4) เช่น Horev *et al.* (2000) ศึกษาด้วยเทคนิค reverse transcriptase polymerase chain reaction และรายงานว่าพบการแสดงออกของยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินที่สมองส่วนไฮโปทาลามัส ปอด ไต เนื้อเยื่อไขมัน ตับ และ ร่างแหเส้นเลือดฝอยในสมองของไก่สายพันธุ์ LegHorn โดยพบการแสดงออกสูงสุดในสมองส่วนไฮโปทาลามัส ขณะที่ Ohkubo *et al.* (2000) และ Liu *et al.* (2007) รายงานการแสดงออกของยีนดังกล่าวในสมองส่วนไฮโปทาลามัส ตับ ไต ลำไส้เล็ก รังไข่ หัวใจ ปอด และเนื้อเยื่อไขมัน นอกจากนี้ Richards and Poch (2003) รายงานการศึกษาในไก่วงว่ายีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินมีการแสดงออกที่เนื้อเยื่อสมอง ตับ ลำไส้เล็ก เนื้อเยื่อไขมัน ไต ตับอ่อน ปอด ม้าม และเยื่อหุ้มไข่แดง และพบการแสดงออกของยีนดังกล่าวมากที่สุดในเนื้อเยื่อสมอง เช่นเดียวกับที่มีรายงานในไก่ (Horev *et al.*, 2000)

ตารางที่ 4 การแสดงออกของ mRNA ของยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆของ
คน สุกร หนูเมาส์ หนูแรท ไก่ และไก่ทอง (NI – ไม่มีรายงาน)

	สัตว์โตเต็มวัย											ตัวอ่อน			
	สมอง	ตับ	ตับอ่อน	ลำไส้เล็ก	เนื้อเยื่อไขมัน	ไต	ปอด	ม้าม	กล้ามเนื้อลาย	รังไข่	อวัยวะ	รก	สมอง	ตับ	เยื่อหุ้มไข่แดง
คน	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NI	NI	NI
สุกร	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NI
หนูเมาส์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NI	NI
หนูแรท	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NI	NI	NI
ไก่	+	+	+	+	+	+	+	NI	NI	+	NI	NI	NI	NI	NI
ไก่ทอง	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NI	NI	NI	+	+	+

ที่มา: สุกร (Lin *et al.*, 2000; Ruiz-Cortes *et al.*, 2000; Czaja *et al.*, 2002) หนูแรท (Kieffer *et al.*, 1996; Gal *et al.*, 1997; Zamorano *et al.*, 1997; Lostao *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998a; Tena-Sempere *et al.*, 2001; Smith and Waddell, 2002) หนูเมาส์ (Hoggard *et al.*, 1997a; Hoggard *et al.*, 1997b; Tartaglia, 1997; El-Hefnawy *et al.*, 2000) คน (Karlsson *et al.*, 1997; Kielar *et al.*, 1998; Tsuchiya *et al.*, 1999; Burguera *et al.*, 2000; Ashworth *et al.*, 2000) ไก่ (Horev *et al.*, 2000; Ohkubo *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2007) ไก่ทอง (Richard and Poch, 2003)

ทั้งนี้พบว่าตัวรับของฮอร์โมนเลปตินปรากฏอยู่บนผิวเซลล์ภายในช่วงระยะเวลาสั้นๆ เพราะเซลล์มีกระบวนการนำตัวรับของฮอร์โมนเลปตินบนผิวเซลล์กลับเข้าไปในเซลล์ (internalization) ตลอดเวลา โดยอาศัยวิถี clathrin-coated pit pathway ให้อยู่ในรูปของ early endosome เพื่อนำไปสลาย (protein degradation) หรือนำกลับมาใช้อีกครั้งหนึ่ง (recycling back) จึงเป็นเหตุให้พบตัวรับของฮอร์โมนเลปตินปรากฏอยู่บนผิวเซลล์ (สภาวะปกติ) ประมาณร้อยละ 5-25 ของปริมาณตัวรับของฮอร์โมนเลปตินทั้งหมดที่มีอยู่ของเซลล์ และส่วนใหญ่พบต้องลอยอยู่ในไซโทพลาสซึม

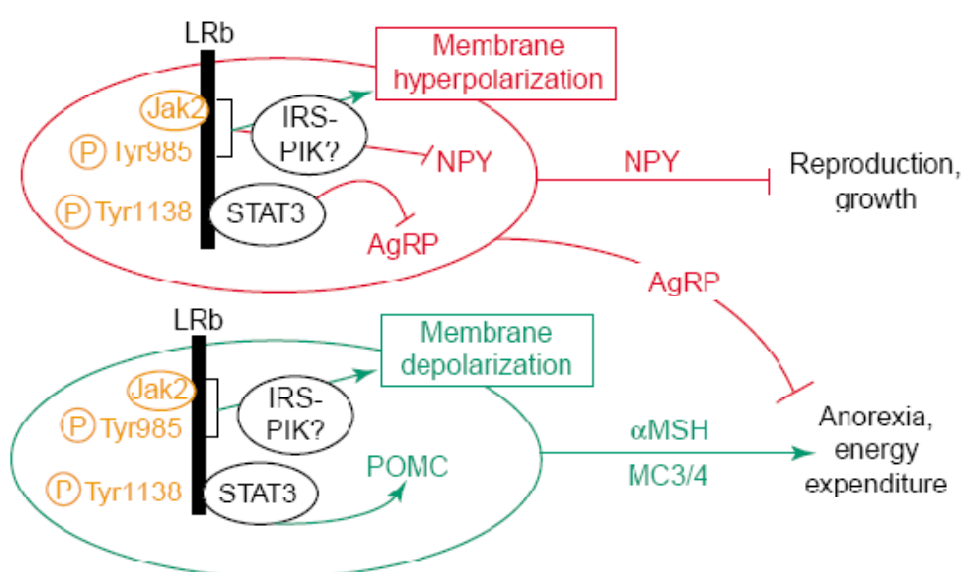
นอกจากนี้ ยังพบว่าโปรตีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินที่ผลิตขึ้นใหม่ยังไม่สามารถออกมาปรากฏบนผิวเซลล์ได้ในทันทีแต่ต้องรอปัจจัยกระตุ้นที่เหมาะสม แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกอย่างมีประสิทธิภาพของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินบนผิวเซลล์ (ระดับสูงสุด) เกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นโดยปัจจัยบางอย่างที่เหมาะสม (Barr *et al.*, 1999; Belouzard *et al.*, 2004) แต่ปัจจุบันยังขาดข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยการควบคุมปริมาณและการแสดงออกของโปรตีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินบนผิวเซลล์ดังกล่าว นอกจากนี้ Barr *et al.* (1999) และ Uotani *et al.* (1999) แสดงให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างฮอร์โมนเลปตินและตัวรับถูกดึงเข้าไปภายในเซลล์อย่างรวดเร็วหลังจากฮอร์โมนเลปตินจับกับตัวรับบนผิวเซลล์

ผลทางสรีรวิทยาของฮอร์โมนเลปตินต่อการทำงานของร่างกาย

ผลต่อการกินอาหารและการใช้พลังงาน

ปัจจุบันเป็นที่ทราบแน่ชัดแล้วว่าฮอร์โมนเลปตินมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมความอยากอาหารของสัตว์ เริ่มจากที่พบหลักฐานว่าลักษณะอ้วนผิดปกติจากการกินอาหารมากเกินไปของหนูสายพันธุ์ *ob/ob* และ *db/db* เป็นผลมาจากความผิดปกติของยีนฮอร์โมนเลปตินและตัวรับตามลำดับ (Zhang *et al.*, 1994; Tartaglia *et al.*, 1995) ต่อมาพบว่าตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิดยาวมีแสดงออกอย่างหนาแน่นบริเวณสมองส่วน basomedial hypothalamus โดยเฉพาะบริเวณ arcuate (ARC) dorsomedial hypothalamic (DMH) และ ventromedial hypothalamic (VMH) nuclei (Schwartz and Seeley, 1997; Baskin *et al.*, 1999; Elmquist *et al.*, 1998) ซึ่งเป็นศูนย์ควบคุมความอยากอาหาร (satiety center) เมื่อสมองบริเวณนี้ถูกทำลายทำให้หนูเมาส์กินอาหารเพิ่มขึ้นมากผิดปกติและมีลักษณะอ้วนเกิน ดังเช่นที่พบในหนูทั้งสองสายพันธุ์ดังกล่าว (Elmquist *et al.*, 1998; Schwartz *et al.*, 2000) นอกจากนี้ การให้ฮอร์โมนเลปตินสังเคราะห์ทำให้ลดปริมาณการกินอาหารลงร้อยละ 75-80 ในหนูสายพันธุ์ *ob/ob* และร้อยละ 20 ในหนูปกติ ตามลำดับ (Mercer *et al.*, 1997) กรณีดังกล่าวมีรายงานในแกะ (Celi *et al.*, 2000) และสุกร (Barb *et al.*, 1998) เช่นกันว่าฮอร์โมนเลปตินยับยั้งการกินอาหารของสัตว์ดังกล่าวด้วย ทั้งนี้พบว่าการให้ฮอร์โมนเลปตินแบบ ICV ลดการกินอาหารของสุกรตั้งแต่ชั่วโมงที่ 20 หลังการฉีดเป็นต้นไป (Barb *et al.*, 1998) จากหลักฐานต่างๆดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนเลปตินยับยั้งความอยากอาหารโดยอาจทำงานผ่านตัวรับที่อยู่บริเวณ basomedial hypothalamus

บริเวณ arcuate nuclei ของสมองส่วน basomedial hypothalamus ประกอบด้วยเซลล์ประสาทสองกลุ่ม (ภาพที่ 8) กลุ่มแรกสร้างและหลั่ง pro-opiomelanocortin (POMC) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) ซึ่งเป็นเปปไทด์ยับยั้งความอยากอาหาร (anorectic peptide) (Elmqvist *et al.*, 1998; Schwartz *et al.*, 2000) ขณะที่กลุ่มที่สองสร้างและหลั่ง neuropeptide Y (NPY) และ agouti-related peptide (AgRP) ซึ่งเป็นเปปไทด์กระตุ้นความอยากอาหาร (orexigenic peptide) ทั้งนี้ Cowley *et al.* (2001) และ Schwartz *et al.* (2000) รายงานว่าฮอร์โมนเลปตินกระตุ้นการสร้าง POMC และ α -MSH ผ่าน LRb/POMC neuron แต่ยับยั้งการสร้าง AgRP (α -MSH inhibitor) และ NPY ผ่าน AgRP/NPY neuron จึงเป็นไปได้ว่าฮอร์โมนเลปตินยับยั้งความอยากอาหารโดยควบคุมการทำงานของกลุ่มโปรตีนดังกล่าว (Erickson *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 1997; Seeley *et al.*, 1997; Bates and Myers., 2003)



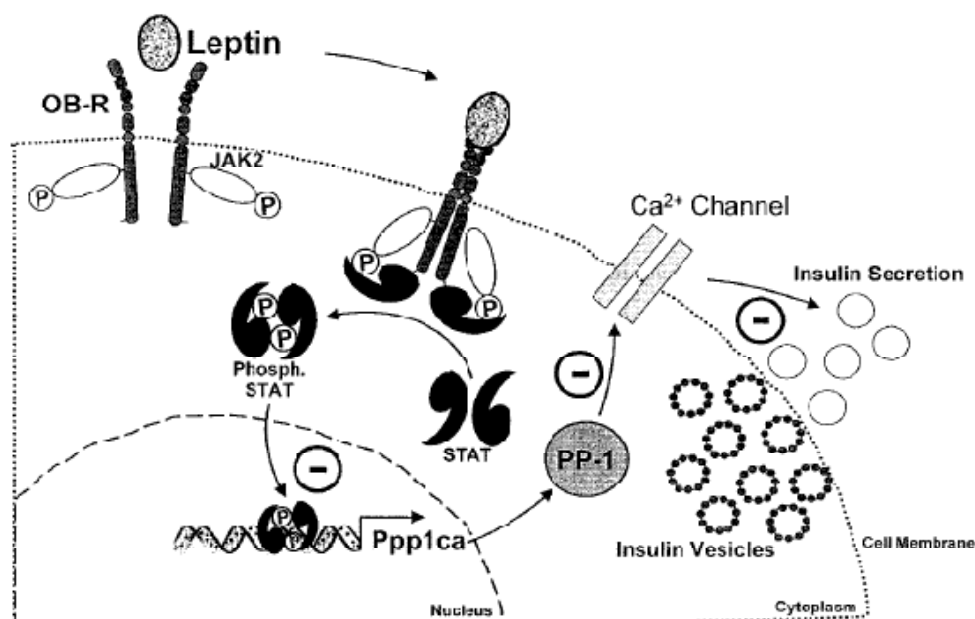
ภาพที่ 8 การทำงานของฮอร์โมนเลปตินและตัวรับบริเวณของ arcuate nuclei ในสมองส่วนไฮโปทาลามัส โดยฮอร์โมนเลปตินมีผลต่อเซลล์ประสาทสองกลุ่มในบริเวณ arcuate nuclei ของสมองส่วน basomedial hypothalamus ซึ่งจะยับยั้งการสร้าง AgRP (α -MSH inhibitor) และ NPY ผ่าน AgRP/NPY neuron (แสดงด้วยเส้นสีแดง) และกระตุ้นการสร้าง POMC และ α -MSH ผ่าน LRb/POMC neuron (แสดงด้วยเส้นสีเขียว)

ที่มา: Bates and Myers (2003)

นอกจากควบคุมปริมาณการกินอาหารแล้ว ฮอร์โมนเลปตินยังควบคุมและรักษาสมดุลพลังงานของร่างกายผ่านการทำงานของระบบอื่นๆ เช่น ฮอร์โมนเลปตินรักษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดไว้ให้อยู่ในระดับสูงเพราะมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินจาก β -pancreatic cell ของตับอ่อนดังที่พบในหนูแรท (Pallett *et al.*, 1997; Kulkarni *et al.*, 1997) หนูสายพันธุ์ *ob/ob* และคน Seufert *et al.* (1999) รายงานว่าฮอร์โมนเลปตินยับยั้งการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินจาก β -pancreatic cell โดยทำงานผ่านตัวรับบนเซลล์ดังกล่าวและอาศัยการเหนี่ยวนำสัญญาณผ่านวิถี JAK-STAT ไปยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ protein phosphatase 1 (PP-1) จากยีน *Ppp1ca* ที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการทำงานของ Ca^{2+} Channel เป็นผลทำให้เซลล์ขาด Ca^{2+} จึงไม่สามารถนำฮอร์โมนอินซูลินออกนอกเซลล์ได้ (Seufert, 2004) (ภาพที่ 9) นอกจากนี้ฮอร์โมนเลปตินยังกระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์ไขมัน (apoptosis) (Qian *et al.*, 1998; Gullicksen *et al.*, 2003) และเร่งการสลายไขมันภายในเซลล์ โดยกระตุ้นการปล่อยกลีเซอรอลจากเซลล์ไขมันเข้าสู่กระแสเลือด (Siegrist-Kaiser *et al.*, 1997) และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด fatty acid oxidation (Yeaman, 2004)

ผลต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์

ตามที่มีรายงานว่าหนู *ob/ob* เป็นหมันและการให้ฮอร์โมนเลปตินสังเคราะห์กับหนูชนิดดังกล่าว และหนูที่อยู่ในสภาวะขาดแคลนอาหาร ช่วยรักษาภาวะการเป็นหมันของหนู *ob/ob* และเหนี่ยวนำการเจริญพันธุ์ของหนูทั้ง 2 กลุ่มได้ เป็นหลักฐานสำคัญที่แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนเลปตินมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบสืบพันธุ์ (Chehab *et al.*, 1996; Ahima *et al.*, 1997; Chehab *et al.*, 1997) นอกจากนี้ ยังพบการแสดงออกของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินที่สมองส่วนไฮโปธาลามัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เซลล์ประสาท gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secreting neuron (Zamorano *et al.*, 1997; Cunningham *et al.*, 1999) ซึ่งมีหน้าที่หลั่งฮอร์โมน GnRH และการให้ฮอร์โมนเลปตินสังเคราะห์สามารถกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมน GnRH จากเซลล์ประสาทชนิดดังกล่าวในหลอดทดลองได้ (Magni *et al.*, 1999) นอกจากสมองส่วนไฮโปธาลามัสแล้ว ยังพบการแสดงออกของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินที่ต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland) (Dyer *et al.*, 1997; Iqbal *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2000) ซึ่งมีหน้าที่สร้าง follicle-stimulating hormone (FSH) และ luteinizing hormone (LH) ปัจจุบันจึงเชื่อว่าฮอร์โมนเลปตินอาจมีความสามารถควบคุมการหลั่งฮอร์โมนเพศได้โดยทำงานผ่านตัวรับที่สมองส่วนไฮโปธาลามัส และต่อมใต้สมองส่วนหน้า (Caprio *et al.*, 2001; Moschos *et al.*, 2002)



ภาพที่ 9 การควบคุมการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินของ β -pancreatic cell ผ่านการทำงานของฮอร์โมนเลปติน โดยเมื่อฮอร์โมนเลปตินจับกับตัวรับ จะมีการส่งสัญญาณเพื่อยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ protein phosphatase 1 (PP-1) จากยีน Ppp1ca ที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการทำงานของ Ca^{2+} Channel เป็นผลทำให้เซลล์ขาด Ca^{2+} จึงไม่สามารถนำฮอร์โมนอินซูลินออกนอกเซลล์

ที่มา: Seufert, 2004

อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่าขณะที่ฮอร์โมนเลปตินกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมน LH และ FSH จากสมอง แต่กลับมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างฮอร์โมนเพศจากรังไข่และอัณฑะ Karlsson *et al.* (1997) รายงานว่า ฮอร์โมนเลปตินยับยั้งการสร้างฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) และโปรเจสเตอโรน (progesterone) จากเนื้อเยื่อรังไข่ของคนเช่นเดียวกับที่มีรายงานในสุกร (Spicer and Francisco, 1997) จึงเข้าใจว่าฮอร์โมนเลปตินอาจออกฤทธิ์ได้ทั้งในเชิงกระตุ้นและยับยั้งการหลั่งฮอร์โมนเพศเพื่อรักษาระดับของฮอร์โมนเพศในกระแสโลหิต (Caprio *et al.*, 2001) กล่าวคือ ขณะที่ฮอร์โมนเลปตินภายในกระแสเลือดมีปริมาณอยู่ในระดับต่ำ อาจมีกลไกช่วยขนส่งฮอร์โมนดังกล่าวผ่าน blood - brain barrier เข้าไปภายในสมอง จับตัวรับ และกระตุ้นการหลั่ง GnRH จากสมองส่วนไฮโปทาลามัสได้ แต่เมื่อฮอร์โมนเลปตินในกระแสเลือดมีปริมาณอยู่ในระดับสูงอาจมีผลทำให้ระบบการขนส่งผ่าน blood - brain barrier ดังกล่าวเกิดการอัมตัมและไม่สามารถขนส่งได้

ทั้งหมด สอร์โมนเลปตินส่วนที่เหลือจึงมีโอกาสดำเนินกับตัวรับที่เนื้อเยื่อรังไข่หรืออวัยวะที่มีความไวต่อสอร์โมนเลปตินต่ำ เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการสร้างและการหลั่งสอร์โมนเพศดังกล่าว (Caprio *et al.*, 2001; Moschos *et al.*, 2002)

แม้ว่าปัจจุบันยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับบทบาทการทำงานของสอร์โมนเลปตินต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ปีก แต่มีหลักฐานแสดงให้เห็นว่าสอร์โมนเลปตินสามารถกระตุ้นการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ได้ เช่น Macajova *et al.* (2002) รายงานว่าการให้สอร์โมนเลปตินแก่ตัวอ่อนของนกกระทาญี่ปุ่นสามารถเร่งการเจริญของระบบสืบพันธุ์ และทำให้เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ได้เร็วกว่าปกติ มีน้ำหนักอวัยวะและปริมาณของสอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) ของตัวอ่อนนกกระทาเพศผู้สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน ขณะที่นกกระทาเพศเมียที่ได้รับสอร์โมนมีการวางไข่เร็วขึ้น น้ำหนักไข่และอัตราส่วนจำนวนไข่สูงกว่ากลุ่มควบคุม

ผลต่อการเจริญเติบโต

บทบาทการทำงานของสอร์โมนเลปตินต่อการเจริญเติบโตเริ่มได้รับความสนใจเมื่อพบว่าสัตว์ที่มีภาวะอ้วน หรือการกลายพันธุ์ของยีนอ้วนหรือยีนตัวรับของสอร์โมนเลปตินมีระดับของปริมาณโกรทฮอร์โมน (GH) (Clement *et al.*, 1998) และ insulin-like growth factor (IGF) (Scacchi *et al.*, 1999) ในกระแสเลือดต่ำกว่าระดับปกติ สอดคล้องกับข้อมูลที่พบการปรากฏของตัวรับของสอร์โมนเลปตินอยู่ที่กลุ่มเซลล์ประสาท arcuate และ periventricular nuclei ของสมองส่วนไฮโปธาลามัสซึ่งเป็นบริเวณเดียวกันกับกลุ่มเซลล์ประสาทที่ทำหน้าที่สร้างสอร์โมน somatostatin (SRIH) และ growth hormone-releasing hormone (GHRH) (Schwartz and Seeley, 1997) ซึ่ง Hakansson *et al.* (1998) แสดงให้เห็นด้วยวิธี double-labelling immunofluorescence histochemistry ว่าเซลล์ประสาทบางส่วนของ arcuate nuclei มีการแสดงออกของ GHRH และตัวรับของสอร์โมนเลปตินรวมอยู่บนเซลล์เดียวกันด้วย การแสดงออกของตัวรับของสอร์โมนเลปตินยังพบที่ต่อมใต้สมองส่วนหน้าซึ่งเป็นแหล่งการสร้างโกรทฮอร์โมนด้วย (Roh *et al.*, 1998; Shimon *et al.*, 1998)

ปัจจุบันแม้เป็นที่ยอมรับแล้วว่าสอร์โมนเลปตินสามารถกระตุ้นการหลั่งโกรทฮอร์โมนได้ แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด (Casanueva and Dieguez, 1999; Ahima *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตามเชื่อว่าสอร์โมนดังกล่าวมีกลไกการทำงานผ่าน 3 ช่องทาง คือ ควบคุมจากต่อมใต้สมองได้โดยตรง (Barb *et al.*, 1998; Roh *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2001; Korbonits *et al.*, 2002) ควบคุมผ่านการ

ทำงานของ growth hormone-releasing factor (GRF) และ somatostatin (LaPaglia *et al.*, 1998; Carro *et al.*, 1999; Cocchi *et al.*, 1999) และควบคุมผ่านกลไกของ NPY และ α -MSH (Casanueva and Dieguez, 1999; Ahima *et al.*, 2000)

นอกจากนี้ ยังมีหลักฐานแสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนเลปตินอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของตัวอ่อนของคนและสัตว์ด้วย เนื่องจากมีรายงานการพบการแสดงออกของยีนดังกล่าวในรกของคน (Masuzaki *et al.*, 1997) และการแสดงออกของยีนตัวรับในปอดของตัวอ่อนหนูเมาส์ (Hoggard *et al.*, 1997a) และในปอดของตัวอ่อนลิงบาบูน (Henson *et al.*, 2004) แม้ว่าปัจจุบันยังไม่พบหลักฐานที่ชัดเจนเกี่ยวกับกลไกการทำงานของฮอร์โมนเลปตินต่อการเจริญของตัวอ่อนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม แต่จากรายงานของ Schubring *et al.* (1997) Ong *et al.* (1999) และ Lepercq *et al.* (2001) พบว่าน้ำหนักรกแรกเกิดมีความสัมพันธ์กับปริมาณของฮอร์โมนเลปตินภายในเส้นเลือดดำของรก โดยเมื่อปริมาณฮอร์โมนเลปตินในเส้นเลือดดังกล่าวมีความเข้มข้นสูง น้ำหนักรกแรกเกิดทารกจะมีค่าสูงตามไปด้วย

สำหรับการศึกษาในสัตว์ปีกพบการแสดงออกของยีนฮอร์โมนเลปตินในไข่ฟักวันที่ 5 และในเนื้อเยื่อถุงหุ้มไข่แดง และตับของตัวอ่อนไก่ในวันที่ 17 (Ashwell *et al.*, 1999a) อีกทั้งพบการแสดงออกของยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินจากสมอง ตับ และถุงหุ้มไข่แดงของตัวอ่อนไก่ฟักในวันที่ 14 (Richards and Poch, 2003) นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าเมื่อให้ฮอร์โมนรีคอมบิแนนท์เลปตินของหนูกับตัวอ่อนของไก่ในวันที่ 11 สามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนในกล้ามเนื้อและตับได้ (Lamosova and Zeman, 2001) และการให้ฮอร์โมนเลปตินกับไข่ของนกกระทาญี่ปุ่นยังช่วยเร่งเวลาการฟักให้เร็วขึ้นกว่าปกติประมาณ 5-24 ชั่วโมง และมีน้ำหนักรกแรกเกิดมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัด (Lamosova *et al.*, 2003)

ผลต่อการทำงานของระบบอวัยวะอื่น

ปัจจุบันเป็นที่ทราบแน่ชัดแล้วว่าฮอร์โมนเลปตินมีบทบาทหน้าที่ทางสรีรวิทยาอย่างหลากหลาย เพราะนอกจากพบการปรากฏของตัวรับชนิดยาวของฮอร์โมนดังกล่าวในเนื้อเยื่อหลายชนิด รวมถึงพบบทบาทการทำงานที่มีต่อสมดุลพลังงาน การทำงานของระบบสืบพันธุ์และการเจริญเติบโตตามที่กล่าวถึงแล้ว ยังมีหลักฐานแสดงบทบาทการทำงานของฮอร์โมนเลปตินอีกมากมาย เช่น การที่พบว่าหนู *ob/ob* มีการเจริญของระบบประสาทและสมองผิดปกติ มีขนาดของ

สมองและเซลล์ประสาทเล็กลง ขนาดของเยื่อหุ้ม myelin และปริมาณของดีเอ็นเอในเซลล์น้อยกว่าปกติ (Kroon and Speijers, 1979) แต่สามารถป้องกันไม่ให้เกิดภาวะผิดปกติดังกล่าวได้เมื่อมีการให้ฮอร์โมนเลปตินกับหนู *ob/ob* ตั้งแต่แรกเกิด (Ahima *et al.*, 2000) แสดงให้เห็นถึงบทบาทของฮอร์โมนดังกล่าวว่ายังอาจทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของระบบประสาทและสมองด้วย ทั้งนี้ยังพบอีกว่าฮอร์โมนเลปตินเป็น growth factor ที่สำคัญของเซลล์อีกหลายชนิด รวมถึงเซลล์เม็ดเลือดขาว (Lord *et al.*, 1998) เซลล์เยื่อผนังหลอดลม และ lung squamous cells (Tsuchiya *et al.*, 1999) และเซลล์ตับอ่อน (Tanabe *et al.*, 1997) และฮอร์โมนเลปตินที่สร้างขึ้นจากรกอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญของตัวอ่อนในครรภ์ด้วย (Masuzaki *et al.*, 1997)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

ภาคสนาม

1. สัตว์ทดลอง

ตัวอย่างหนูเมาส์ (*Mus musculus*) และเป็ด (*Anas platyrhynchos*) สำหรับงานวิจัยได้รับการสนับสนุนจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และตัวอย่างไก่พันธุ์พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว (*Gallus gallus domesticus*) ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อหนู เป็ด และไก่พื้นเมือง ได้แก่ คีมจับและใบมีด (เบอร์ 21) กรรไกรตัดกระดูก กรรไกรตัดเนื้อเยื่อ คีมหนีบปลายแหลม หลอดเก็บตัวอย่างขนาด 2.0 ซีซี หลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร เข็มฉีดยา (เบอร์ 24) สำลี ปากคีบ ถุงมือยาง และถังเก็บความเย็น

3. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ ได้แก่ RNeasy Lysis Buffer (Qiagen) ยาสลบแบบฉีด เน็มบูทอล (Nembutal) สารละลายแอกอซอลล์ 70% และ น้ำแข็ง

ห้องปฏิบัติการ

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 เครื่องย่อยสลายเนื้อเยื่อ (Homogenizer) รุ่น T 25-S1 Blade-type Homogenizer บริษัท Janke & Kunkel GmbH & Co. KG - IKA-Labortechnik (Germany)

1.2 เครื่องปั่นแยกความเร็วสูง (high speed microcentrifuge) ชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น Centrifuge 17RS (Heraeus SEPATECH) และ รุ่น Z 233 MK-2 บริษัท Hermle (Germany)

1.3 เครื่องปั่นแยกความเร็วสูง (high speed microcentrifuge) รุ่น SIGMA 201M

1.4 เครื่องปั่นแยกสารปริมาณน้อย (microcentrifuge) รุ่น GMC-260 (LabTech)

1.5 Heating block รุ่น Test tube heater SHT1 บริษัท Stuart Scientific (England)

1.6 ปิเปตอัตโนมัติ (autopipette) รุ่น Pipetman (p1 p10 p20 p200 และ p1000) บริษัท Gilson (USA)

1.7 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Helios Alpha 9423 UVA 1002E บริษัท Thermo Electronic Corporation (Australia)

1.8 เครื่องสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ GeneAmp® PCR system 9700 บริษัท Applied Biosystems (USA)

1.9 ชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสได้แก่ชุด electrophoresis chamber รุ่น AE 6100 บริษัท ATT0 (ญี่ปุ่น) และรุ่น DNA SUB CELL™ บริษัท Bio-RAD (USA)

1.10 เครื่องแปลงกระแสไฟฟ้า รุ่น Power PAC 300 บริษัท Bio-RAD (USA)

1.11 เครื่องให้กำเนิดแสงอุลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator) พร้อมกล้องดิจิทัล KODAK และโปรแกรม KODAK1-D Image Analysis Software

1.12 เครื่องชั่งละเอียด รุ่น B 120S บริษัท Sartorius (Germany)

1.13 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น GC 842 บริษัท Schott (Germany)

1.14 เครื่องเขย่าตั้งอุณหภูมิได้ (incubator shaker) รุ่น IM550R บริษัท Clayson (Australia)

1.15 Vortex mixture รุ่น G 560E vortex-2 Genie™ บริษัท Scientific Industries (USA)

1.16 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส รุ่น SHF 230SAD บริษัท Sanden Intercool (Thailand)

1.17 ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส รุ่น ULT-1490-7VBF บริษัท Revco (USA)

1.18 ตู้บ่มเชื้อปรับอุณหภูมิได้ รุ่น EB 208S บริษัท Jouan (France)

1.19 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ

1.20 Laminar flow พร้อมอุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ เข็มเขี่ยเชื้อ แท่งแก้ว สำหรับ spread plate ตะเกียงแอลกอฮอล์ และ หลอดเลี้ยงเชื้อขนาด 10 มิลลิลิตร

1.21 เครื่องคอมพิวเตอร์ต่อพ่วงระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ต และโปรแกรมออนไลน์ ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/-clustalw/>) โปรแกรม Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn>) และโปรแกรม Blast 2 sequence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>)

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ ได้แก่ Trizol[®] (Invitrogen) chloroform isopropanol 70% ethanol และ UltraPure[™] DNase/RNase-free distilled water (Invitrogen)

2.2 สารเคมีสำหรับสร้างสาย complementary DNA (cDNA) จากชุด SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System ของบริษัท Invitrogen ประกอบด้วย magnesium chloride (MgCl₂), reverse transcriptase buffer, dithiothreitol (DTT), Oligo-d_T, reverse transcriptase enzyme (Superscript[®] III; Invitrogen), ribonuclease H enzyme (RNase H) และ UltraPure[™] DNase/RNase-free distilled water (Invitrogen)

2.3 สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จากชุด Platinum[®] taq DNA polymerase ของบริษัท Invitrogen ประกอบด้วย dNTPs, magnesium chloride (MgCl₂), PCR buffer, Platinum[®] Taq DNA polymerase (Invitrogen), คู่ไพรเมอร์ (primers) จากหน่วยบริการชีวภาพ (BioService Unit : BSU) และ UltraPure[™] DNase/RNase-free distilled water (Invitrogen)

2.4 สารเคมีสำหรับการตรวจผลผลิตพีซีอาร์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) ประกอบด้วย agarose powder (Invitrogen), tris-boric acid-disodium EDTA (TBE) buffer, ethidium bromide, 10X BlueJuice Gel Loading buffer (Invitrogen), DNA marker 1Kb Plus Ladder[™] (Invitrogen)

2.5 สารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย การโคลนดีเอ็นเอ และการสกัดพลาสมิด ได้แก่ yeast extract, agar powder, tryptone, spectinomycin powder, sodium chloride (NaCl), sodium hydroxide (NaOH), TOPO[®] cloning Kits (Invitrogen), ชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Miniprep[®] (Qiagen)

วิธีการ

การหาลำดับเบสของยีนฮอร์โมนเลปตินและยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปติน

1. เนื้อเยื่อตัวอย่าง

ไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวจำนวน 2 ตัวได้รับเมตตาฆาตด้วยการฉีดยาสลบ (Nembutal) เกินขนาด ในอัตราส่วน 100 มิลลิกรัมของสารต่อน้ำหนักสัตว์ 1 กิโลกรัม เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อสมองส่วนไฮโปทาลามัส ไขมัน และตับทันทีหลังจากสัตว์ตาย นำเนื้อเยื่อตัวอย่างแช่ใน RNAlater® (Qiagen) เพื่อรักษอาร์เอ็นเอ และแช่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน เนื้อเยื่อของหนูและเปิดได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการอนุชีววิทยา ภาควิชา สรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การสกัดอาร์เอ็นเอ

อาร์เอ็นเอ จากเนื้อเยื่อตัวอย่างได้รับการสกัดด้วยสารละลาย Trizol® (Invitrogen, USA) ตามวิธีที่บริษัทแนะนำ กล่าวคือย่อยสลายเนื้อเยื่อน้ำหนัก 50 มิลลิกรัมด้วยเครื่อง homogenizer ที่ความเร็ว 50,000 rpm เป็นเวลา 10 วินาทีในสารละลาย Trizol® ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 3 นาที ก่อนเติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที ก่อนปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol จำนวน 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 xg นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนของเหลวและล้างตะกอนด้วยสารละลาย 75% ethanol จำนวน 1,000 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,500 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนของเหลวอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นตากตะกอนอาร์เอ็นเอ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ให้แห้งหมาดๆ แล้วละลายตะกอนอาร์เอ็นเอ ด้วย UltraPure™ DNase/RNase-free distilled water (Invitrogen) จำนวน 20 ไมโครลิตร และเก็บไว้ ณ อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

3. การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณอาร์เอ็นเอ

สารละลายอาร์เอ็นเอ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ได้รับการเจือจางด้วยน้ำกลั่น 598 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 (A_{260}) และ 280 (A_{280}) นาโนเมตรตามลำดับ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ ด้วยสูตรดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)} = \frac{A_{260} \times 40 \times \text{dilution factor}}{1000}$$

โดยค่า dilution factor สามารถคำนวณได้จาก

$$\text{dilution factor} = \frac{\text{ปริมาตรของสารละลายทั้งหมด}}{\text{ปริมาตรของ RNA}}$$

และคำนวณหาความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ ด้วยสูตรดังนี้

$$\text{ความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ} = \frac{\text{การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร}}{\text{การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร}}$$

(อาร์เอ็นเอที่บริสุทธิ์ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.8-2.1)

จากนั้นนำสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตรผสมด้วยสารเคมีดังแสดงในตารางที่ 5 หลังจากนั้นจึงแช่ไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีก่อนนำไปตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอ ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสเพื่อสังเกตความชัดเจนของ 28S และ 18S อาร์เอ็นเอ

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของสารเคมีสำหรับใช้ตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรเจล อิเล็กโตรโฟเรซิส

ส่วนประกอบ	ปริมาตรสารต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
10x MOPs	1
Formaldehyde	2
Formamide	5

4. การโคลน cDNA ของฮอร์โมนเลปตินและตัวรับของฮอร์โมนเลปติน

สาย complementary DNA (cDNA) ของฮอร์โมนเลปตินและตัวรับของฮอร์โมนเลปติน สร้างขึ้นจากอาร์เอ็นเอ ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อไขมันและตับ (สำหรับฮอร์โมนเลปติน) และเนื้อเยื่อสมองส่วนไฮโปทาลามัส (สำหรับตัวรับของฮอร์โมนเลปติน) ตามลำดับ โดยอาศัยกระบวนการ reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR) ด้วยเอนไซม์ Superscript[®] III Reverse Transcriptase (Invitrogen) ตามวิธีที่บริษัทแนะนำ กล่าวโดยย่อคือ ผสมสารละลายอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ด้วย 50 μ M Oligo-d_T หรือ 2 μ M gene specific primer (GSP) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ RNase free H₂O จนมีปริมาตรครบ 10 ไมโครลิตร (ตารางที่ 6) แล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ก่อนเติมเอนไซม์และสารเคมีสำหรับสร้างสาย cDNA ปริมาตร 10 ไมโครลิตรดังแสดงในตารางที่ 7 ผสมให้เข้ากันแล้วใส่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ณ อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของสารเคมีเบื้องต้นสำหรับการสร้าง cDNA

ส่วนประกอบ	ปริมาตรสารต่อปฏิกิริยา(ไมโครลิตร)
สารละลาย 1 ไมโครกรัมอาร์เอ็นเอ	n
50 μ M Oligo-d _T หรือ 2 μ M GSP	1
10 mM dNTP mix	1
RNase free H ₂ O	จนมีปริมาตรครบ 10 ไมโครลิตร

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของสารเคมีสำหรับการสร้าง cDNA

ส่วนประกอบ	ปริมาตรสารต่อปฏิกิริยา(ไมโครลิตร)
10X RT buffer	2
25 mM MgCl ₂	4
0.1 M DTT	2
RNase OUT TM (40 U/ μ l)	1
Superscript [®] III enzyme (200 U/ μ l)	1

จากนั้นเติมเอนไซม์ ribonuclease H (RNaseH) ปริมาตร 1 ไมโครลิตรและแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อทำลายสายอาร์เอ็นเอต้นแบบ แล้วเก็บสารละลาย cDNA ดังกล่าวที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

5. การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยกระบวนการลูกโซ่โพลิเมอร์เรส

การเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของยีนของอินซอร์โมนเลปตินและตัวรับของอินซอร์โมนเลปตินอาศัยต้นแบบจาก cDNA ที่ได้จากเนื้อเยื่อไขมัน (สำหรับอินซอร์โมนเลปติน) และเนื้อเยื่อสมองส่วนไฮโปธาลามัส (สำหรับตัวรับของอินซอร์โมนเลปติน) ตามลำดับ โดยอาศัยกระบวนการลูกโซ่โพลิเมอร์เรส หรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) โดยยี่ห้อคือ ปฏิกริยาพีซีอาร์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ PCR master mix ปริมาตร 49 ไมโครลิตร (รายละเอียดสารเคมีแสดงไว้ในตารางที่ 8) คู่มือเฉพาะสำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของแต่ละยีนแสดงไว้ในตารางที่ 9 โดยมียีน β -actin เป็นตัวควบคุมผลการแสดงออกของยีนด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ของแต่ละเนื้อเยื่อ

หลังจากผสมสารละลายแต่ละหลอดแล้ว การเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเออาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสโดยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ รุ่น GeneAmp[®] PCR system 9700 (Applied Biosystems) โดยแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยามีการกำหนดอุณหภูมิและเวลา ดังนี้

ตารางที่ 8 ส่วนประกอบของสารเคมีสำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซ่
โพลีเมอร์เรส (Invitrogen)

ส่วนประกอบ	ปริมาตรสารต่อปฏิกิริยา(ไมโครลิตร)
10X PCR Buffer minus Mg ²⁺	5
50 mM MgCl ₂	1.5
10 mM dNTP mix	1
<i>Platinum</i> [®] <i>Taq</i> DNA Polymerase (50 u/μl)	0.25
Forward primer (10 pmol/μl)	1
Reverse primer (10 pmol/μl)	1
DNase free H ₂ O	38.25
ปริมาตรรวม	49

Preheat	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	นาน 5 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที	} 35 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน 4 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน 10 นาที	

ตารางที่ 9 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสของสอร์โมโนเลปดินและตัวรับของสอร์โมโนเลปดิน (ตำแหน่งการจับของไพรเมอร์อ้างอิงจากฐานข้อมูล Genbank AF012727 สำหรับสอร์โมโนเลปดิน และ AF169827 สำหรับตัวรับของสอร์โมโนเลปดิน)

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ตำแหน่งในการจับ	
สอร์โมนเลปติน			
Forward	F-1	5'-AGGAAAATGTGCTGGAGACC-3'	1-14
	Lpt001-F	5'- AGGATCAATGACATTTACACACG-3	108-131
	UFlep81	5'-CACCAAAACCCTCATCAAGACCAT-3'	81-100
	LepUp ¹	5'-CACCAGGATCAATGACAT TTCAC-3'	105-127
Reverse	R-2	5'-CTCAGCATTCCGGGCTAATA-3'	473-492
	Lpt002-R	5'-CCACCACCTCTGTG AGTAGA-3'	401-421
	R486lep	5'-TTCCGGGCTAATATCCAACGTGT -3'	465-486
	LepDn ¹	5'-CACCTCTGTGGAGTAGAGTGAGGC-3'	397-420
ตัวรับของสอร์โมนเลปติน			
Forward	L129	5'-AGATGGCATTCTCCCACAG-3'	129-148
	ClepF-21 ²	5'-GGAGCAATAACAACGCCAGT-3'	433-452
	OboF1 ³	5'-TATATTGTTTCAGATCCGCTG-3'	1,973-1,993
	ClepF-91 ²	5'-TCCAGATCAGGTGGGCTTTA-3'	3,129-3,148

หมายเหตุ: ¹ อ้างอิงจาก Ashwell *et al.* (1999a)

² อ้างอิงจาก Richards และ Poch (2003)

³ อ้างอิงจาก Ohkubo *et al.* (2000)

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ชื่อไพรเมอร์		ลำดับนิวคลีโอไทด์	ตำแหน่งในการจับ
ตัวรับของฮอร์โมนเลปติน			
Reverse	Rclep-52IM	5'-ATCTTCAGTGACAGTTCTCC-3'	2091-2110
	2ObRo ³	5'-GGGTTTGGAAACATCTTCCCA-3'	2,740-2,758
	RClep-92 ²	5'-CTGTGGTCTCTTGCACCTTG-3'	3,596-3,615
	R3731	5'-ATCAGCTTCCCAACCTTCCT-3'	3,712-3,731
เบต้าแอคติน (β -actin)			
Forward	AF1	5'-TGATGATATTGCTGCGCTCG-3'	
Reverse	β	5'-GGTCATCTTCTCACGGTTGG-3'	

6. การแยกผลผลิตพีซีอาร์ ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

แผ่นเจลอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร้อยละ 0.8 เตรียมขึ้นจากการละลายผงอะกาโรสน้ำหนัก 0.32 กรัมใน Tris-boric EDTA buffer (TBE) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 100°C ด้วยไมโครเวฟ และเขย่าเบาๆ เพื่อให้ผงอะกาโรสละลายหมด ตั้งรอไว้ 10 นาทีเพื่อให้เย็นลง (อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส) แล้วเทลงในถาดเตรียมเจล เสียบหัวลงตรงตำแหน่งที่กำหนด เพื่อให้เกิดร่องสำหรับหยอดตัวอย่าง และตั้งรอไว้ที่อุณหภูมิห้องนานไม่น้อยกว่า 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว เมื่อพร้อมวางถาดเจลลงในช่องวางถาดของเครื่องแยกสารละลายด้วยไฟฟ้า (electrophoresis chamber) รุ่น AE 6100 (ATT0, Japan) เติม 1X TBE buffer ให้ท่วมเจลและดึงหัวออกจากนั้นผสม 10x BlueJuice Gel Loading buffer (Invitrogen) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เข้ากับผลผลิตพีซีอาร์ของแต่ละตัวอย่าง (ปริมาตร 9 ไมโครลิตร) และ 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen) (ปริมาตร 1 ไมโครลิตร) แล้วหยอดลงในร่องหัวบนแผ่นเจล การแยกสารละลายด้วยเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิสอาศัยแรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำเจลมาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 30 นาที ล้าง ethidium bromide ส่วนเกินบนเจลออกด้วยน้ำสะอาด แล้วตรวจแถบดีเอ็นเอ (ผลผลิตพีซีอาร์) บนแผ่นเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิทัล โดยใช้โปรแกรม KODAK1-D Image Analysis Software

7. การทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัดชิ้นดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล

การสกัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากแผ่นเจลใช้ QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Germany) ตามคำแนะนำของบริษัท กล่าวคือใช้ไบมิด โคนตัดเจลที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ เติมนัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักรวม (เช่น ปริมาตรบัฟเฟอร์ QG 300 ไมโครลิตร ต่อน้ำหนักรวม 100 มิลลิกรัม) อุณหภูมิห้อง 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (เขย่าสารละลายทุก 2-3 นาที) จนเจลละลาย เติมนิโพรพานอล ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักรวม ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดสารละลายใส่คอลัมน์ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่ส่วนของเหลวก่อนเติมสารละลายบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ก่อนเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่ส่วนของเหลว แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนของคอลัมน์ดังกล่าวใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติมนิวคลีเอสฟรี H_2O ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ก่อนปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที แช่วสารละลายชิ้นดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจลบนน้ำแข็งจนกว่าใช้งาน

8. การโคลนยีนฮอว์โมนฮอร์โมนเลปตินและตัวรับของฮอว์โมนเลปติน

การเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์ (ชิ้นดีเอ็นเอของยีนฮอว์โมนฮอร์โมนเลปตินหรือตัวรับของฮอว์โมนเลปติน) เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์เพื่อสร้าง TOPO-leptin และ TOPO-LEPR ตามลำดับอาศัย pCR[®] 8/GW/TOPO[®] TA cloning kit (Invitrogen, USA) ตามคำแนะนำของบริษัท กล่าวคือนำสารละลายชิ้นดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจลผสมกับพลาสมิดเวกเตอร์และสารละลายเกลือตามสัดส่วนที่แสดงไว้ในตารางที่ 10 ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาผันกลับของเอนไซม์ Topoisomerase เชื่อมผลผลิตพีซีอาร์และเวกเตอร์เข้าด้วยกัน แล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 1-2 นาที ก่อนนำเข้าสู่เชื้อแบคทีเรียชนิด *E. coli*

ตารางที่ 10 ปริมาณสารสำหรับใช้ในการเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์

ส่วนประกอบ	ปริมาณสารต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
PCR product	2
Salt solution	1
Sterile water	2
pCR [®] 8/GW/TOPO [®] vector	1
ปริมาณรวม	6

9. การนำเวกเตอร์ TOPO-leptin และ TOPO-LEPR เข้าสู่เซลล์ *Escherichia coli*

การนำ TOPO-leptin และ TOPO-LEPR เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host) ชนิด *E. coli* อาศัยการกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) กล่าวคือ นำคอมพิเทนต์เซลล์ (One Shot[®] Mach1[™] T1R competent *E. coli* ของบริษัท Invitrogen, USA) จากตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส ออกมาละลายในน้ำแข็ง แล้วเติมสารละลายพลาสมิด (ข้อ 8) ผสมเข้ากันเบาๆ แล้วแช่บนน้ำแข็งนาน 20 นาที จากนั้นอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อกระตุ้นการเข้าสู่เซลล์ของเวกเตอร์ แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ (S.O.C. medium) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีรอบการเขย่า 225 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงแบ่งเซลล์ 10-50 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (Luria-Bertani (LB) agar) ซึ่งมียาปฏิชีวนะ Spectinomycin (ความเข้มข้น 50 mg/ml) เพื่อใช้ประโยชน์ในการคัดเลือก positive clone ก่อนบ่มเพาะในตู้เลี้ยงเชื้อชนิดควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

10. การเพิ่มจำนวนเชื้อ *E. coli*

เลือกโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของเชื้อ *E. coli* จากที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารแข็ง (ข้อ 1.9) จำนวน 2 โคโลนีต่อตัวอย่าง เชื้อเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* จากแต่ละ plate เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (LB media) และบ่มเพาะในตู้เลี้ยงเชื้อชนิดควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง โดยมีรอบการเขย่า 225 รอบต่อนาที

11. การสกัดพลาสมิด

การเก็บเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (ข้อ 1.10) อาศัยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ส่วนของเหลว แล้วนำตะกอนเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาใช้ในการสกัดเพื่อเก็บพลาสมิด โดยชุดสกัด QIAprep Miniprep (Qiagen, Germany) ตามคำแนะนำของบริษัท กล่าวคือ ละลายตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ละลายเซลล์ให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง และเติมบัฟเฟอร์ N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตรทันที ผสมโดยการกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนบนลงบนเยื่อใน QIAprep spin column ที่วางอยู่ใน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัดของเหลวที่ค้างอยู่ จากนั้นย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอด microcentrifuge ใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ปราศจาก DNase ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอ (TOPO-leptin และ TOPO-LEPR) ที่ -20 องศาเซลเซียส

12. การตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่สกัดได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตรวจหาความถูกต้องของชิ้นดีเอ็นเอ (ยีนฮอร์โมนเลปตินและตัวรับ) ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด TOPO-leptin และ TOPO-LEPR จากข้อ 1.11 ใช้การตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI (Fermentas, Canada) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ทำการตัดลำดับเบส G|AATTC ที่อยู่บนสายดีเอ็นเอ ของพลาสมิดและขนานอยู่ระหว่างปลายทั้ง 2 ข้างของชิ้นดีเอ็นเอ (ยีนฮอร์โมนเลปตินและตัวรับ) ที่เพิ่มเข้ามา โดยใช้ปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 11 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตารางที่ 11 ส่วนประกอบของสารละลายสำหรับปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ EcoRI เพื่อตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอภายในพลาสมิด

ส่วนประกอบ	ปริมาตรสารต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
สารละลาย 1 ไมโครกรัมดีเอ็นเอ	1
10X EcoRI buffer	2
EcoRI (5 unit/ μ l)	1
DNase free H ₂ O	16
ปริมาตรรวม	20

13. การตรวจหาลำดับเบส

ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอ ภายในพลาสมิดได้รับการวิเคราะห์ด้วยวิธี dideoxy chain termination ณ สถาบันวิจัยและพัฒนา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี โดยอาศัยเครื่อง automated DNA sequencing รุ่น Perkin Elmer Cetus Model 2400 (Perkin-Elmer, USA.)

14. การวิเคราะห์ผล

ลำดับเบสของ cDNA และลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมนเลปตินและตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่พื้นเมืองที่ได้จากการศึกษานี้ได้รับการเปรียบเทียบกับลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมนเลปติน (AF012727) และตัวรับของฮอร์โมนเลปติน (AF169827) ของไก่ ตามข้อมูลจากฐานข้อมูลออนไลน์ โดยอาศัยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Blast 2 sequence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) และ ClustalW เพื่อระบุหาตำแหน่งลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกต้อง จากนั้นทำการถอดรหัสนิวคลีโอไทด์ และหาน้ำหนักของโปรตีนที่ได้ รวมถึงค่า pI และตำแหน่งของกรดอะมิโนอนุรักษ์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของไก่ และสัตว์ปีกตามที่มีรายงาน (GenBank accession number AF169827)

การตรวจผลการแสดงออกของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินในเนื้อเยื่อของไก่พื้นเมือง

1. เนื้อเยื่อตัวอย่าง

ตัวอย่างเนื้อเยื่อไขมัน สมองส่วนไฮโปทาลามัส กล้ามเนื้อลาย หัวใจ ไต ลำไส้เล็ก ดับอ่อน รั้งไข่ อังทะ และปอด ของไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวจำนวน 2 ตัว เก็บทันทีหลังจากการเมตตามาด้วยการฉีดยาสลบ (Nembutal) เกินขนาด ในอัตราส่วน 100 มิลลิกรัมของสารต่อน้ำหนักสัตว์ 1 กิโลกรัม และแช่ใน RNAlater® (Qiagen) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียสในห้องปฏิบัติการ

2. การสกัดอาร์เอ็นเอและการศึกษาดำเนินการแสดงออกของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินในเนื้อเยื่อของไก่พื้นเมืองด้วยเทคนิค RT-PCR

อาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของไก่ได้รับการสกัดด้วยสารละลาย Trizol® (Invitrogen, USA) ตามรายละเอียดในข้อ 1.2 จากนั้นใช้อาร์เอ็นเอปริมาณ 1 ไมโครกรัมเพื่อสร้างสาย complementary DNA หรือ cDNA template ของเนื้อเยื่อต่างๆตามวิธีที่กล่าวมาข้างต้น (ข้อ 1.3) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอคร่อมระหว่างเอ็กซอนที่ 19 และเอ็กซอนที่ 20 ได้แก่ Left19 (forward) 5'- GATGTTCCAAACCCCAAGAA-3' และ Right20 (reverse) 5'-GCCCACCTGATCTGGAGTTA-3' ตรงตามตำแหน่งที่ 2,772-2,791 และตำแหน่งที่ 3,125-3,144 ของยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิดยาวในไก่ (GenBank accession number AF169827) ตามลำดับ ร่วมกับปฏิกิริยาอุกโซโพลีเมอเรส ดังนี้

Preheat	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	นาน	5	นาที	} 35 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	นาน	30	วินาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	นาน	30	วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน	1	นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน	10	นาที	

ผลผลิตพีซีอาร์ของแต่ละปฏิกิริยาได้รับการตรวจสอบบนแผ่นเจลที่มีความเข้มข้น 0.8% ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส และย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 30 นาที เพื่อวิเคราะห์ชนิดของเนื้อเยื่อที่เป็นแหล่งผลิตตัวรับของฮอร์โมนเลปติน

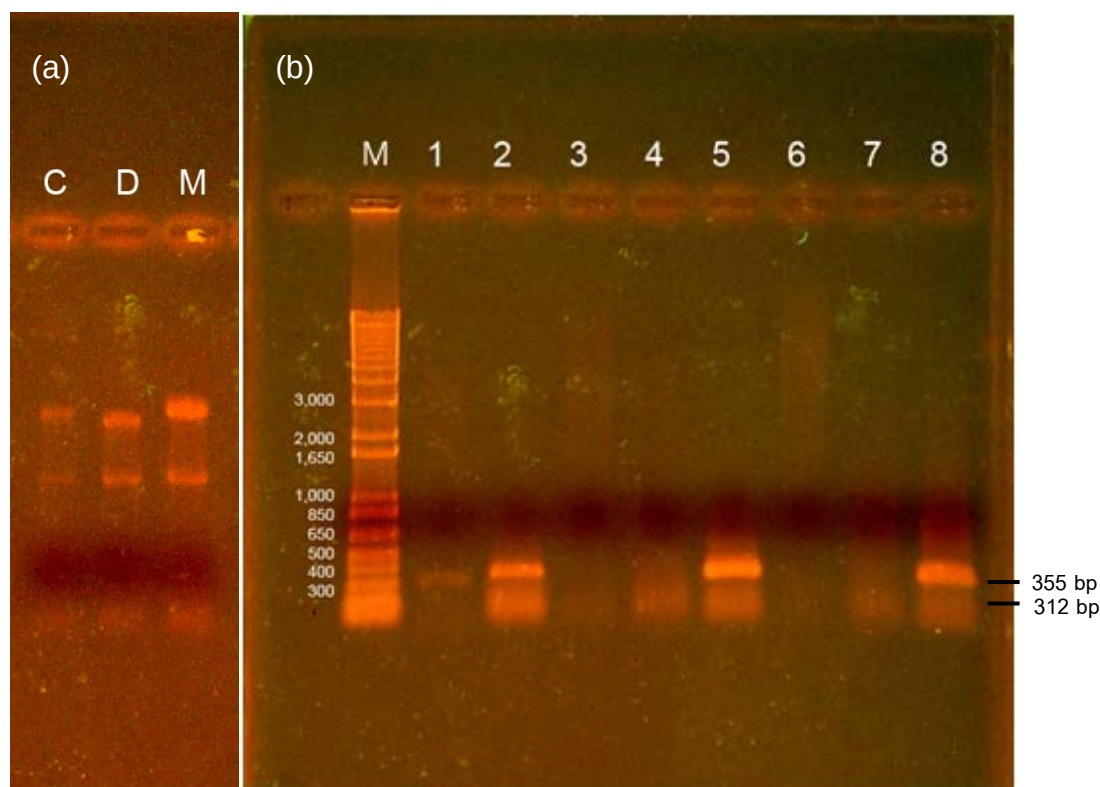
ผลและวิจารณ์

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกในเนื้อเยื่อของฮอร์โมนเลปตินในไก่พื้นเมืองไทย

การศึกษานี้ไม่ประสบความสำเร็จในการโคลนยีนฮอร์โมนเลปตินของไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวด้วยไพรเมอร์หลายคู่ที่ขึ้นกับข้อมูลที่ออกแบบเองตามข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA จากยีนฮอร์โมนเลปตินของไก่ (GenBank number AF012727) หรือคู่ไพรเมอร์ LepUp/LepDn ตามรายงานของ Ashwell *et al.* (1999a) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 8 และภาคผนวกที่ 2 แต่ขณะเดียวกันสามารถเพิ่มผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอของยีนฮอร์โมนเลปตินจาก cDNA ของหนูด้วยคู่ไพรเมอร์ LepUp/LepDn และยีน β -actin จาก cDNA ของทุกตัวอย่างด้วยคู่ไพรเมอร์ AF1/ β ที่ใช้เป็นยีนควบคุมของการศึกษานี้ได้ (ภาพที่ 10) แสดงให้เห็นว่าการสกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อไขมันของไก่ เป็ด และหนูเม้าส์ ให้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดี และสารเคมีตลอดจนกระบวนการผลิต cDNA จากอาร์เอ็นเอ กระบวนการพีซีอาร์และการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ใช้ในการศึกษานี้มีคุณภาพที่ดีและสามารถให้ผลผลิตที่ต้องการได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้ผู้วิจัยยังใช้ gene specific primer (GSP) ที่จำเพาะต่อยีนฮอร์โมนเลปตินในระหว่างกระบวนการ RT-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณของ cDNA ตั้งต้นด้วย แต่ไม่สามารถเพิ่มผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอใดๆ จากเนื้อเยื่อไขมันของไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวและเป็ดได้ (ภาพที่ 10) ดังนั้นความล้มเหลวที่เกิดขึ้นในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของฮอร์โมนเลปติน ของไก่จึงไม่ควรมีสาเหตุมาจากความผิดพลาดของกระบวนการศึกษาของผู้วิจัย และมีความเป็นไปได้ว่ามาจากสาเหตุอื่น

อย่างไรก็ตาม ผลของการศึกษานี้สอดคล้องกับ Friedman-Einat *et al.* (1999) ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของฮอร์โมนเลปตินด้วยเทคนิคพีซีอาร์จาก genomic DNA และ mRNA ของเนื้อเยื่อไขมัน ตับ และตับอ่อน จากไก่ ไก่วง ห่าน และนกกระทาญี่ปุ่นได้ แม้จะมีการใช้คู่ไพรเมอร์จำนวน 14 เส้นที่ออกแบบตามข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไก่ที่รายงานไว้โดย Taouis *et al.* (1998) และ Ashwell *et al.* (1999a) อีกทั้งยังไม่สามารถตรวจพบอาร์เอ็นเอของฮอร์โมนเลปติน ผ่านวิธี Northern Blot Hybridization ได้ นอกจากนี้ Ninov *et al.* (2008) รายงานว่าไม่ประสบความสำเร็จในการเพิ่มผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอจาก genomic DNA และ mRNA ของฮอร์โมนเลปตินของไก่เนื้อ และไก่ไข่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แม้จะใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ที่ออกแบบจากบริเวณนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์จากไก่ และหนูเม้าส์ เช่นเดียวกับ Amills และ คณะ (2003) รายงานว่าการเพิ่มผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอของยีนฮอร์โมนเลปตินของสัตว์ปีกด้วยวิธี RT-PCR ไม่ประสบ

ผลสำเร็จทั้งจากตัวอย่างของไก่ ไก่วง และนกกระทาญี่ปุ่น ที่ให้กินอาหารแบบปกติหรือแบบบังคับ (force feeding) และเมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของไก่ในฐานะข้อมูลออนไลน์แล้ว ไม่พบว่ามีตำแหน่งใดที่มีลักษณะสอดคล้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮอร์โมนเลปตินของไก่ตาม รายงานของ Taouis *et al.* (1998) และ Ashwell *et al.* (1999a)



ภาพที่ 10 ผลการเพิ่มผลผลิตชิ้นเนื้อจาก cDNA ของเนื้อเยื่อไขมันของหนูเมาส์ ไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว และเป็ด โดย (a) แสดงแถบของ 18s และ 28s ribosomal RNA จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อไขมันของไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว (C) เป็ด (D) และหนูเมาส์ (M) และ (b) แสดงผลผลิตชิ้นเนื้อจากปฏิกิริยา RT-PCR จากอาร์เอ็นเอชุดดังกล่าวของหนูเมาส์ (ช่องที่ 1-2) ไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว (ช่องที่ 3-5) และเป็ด (ช่องที่ 6-8) จากคู่ไพรเมอร์ LepUp/LepDn (ยีนฮอร์โมนเลปติน) ร่วมกับ cDNA ที่สร้างจาก Oligo d_T (ช่องที่ 1 3 และ 6) และ cDNA ที่สร้างจาก gene specific primer (ช่องที่ 4 และ 7) และผลผลิตชิ้นเนื้อจากคู่ไพรเมอร์ AF1/β (ยีน β-actin) ร่วมกับ cDNA ที่สร้างจาก Oligo d_T (ช่องที่ 2 5 และ 8) ช่องที่ M แสดง 1kb Plus DNA Ladder

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Pitel *et al.* (2000a, 2000b) และ Dunn *et al.* (2000) ยังไม่พบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ใดๆ ที่มีความใกล้เคียงกับยีนฮอว์โมนเลปตินของไก่ตามรายงานของ Taouis *et al.* (1998) และ Ashwell *et al.* (1999a) บนฐานข้อมูลจีโนม และเมื่อเร็วๆ นี้ Sharp *et al.* (2008) ได้ทำการตั้งข้อสังเกตว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮอว์โมนเลปตินของไก่ตามรายงานดังกล่าวอาจไม่มีอยู่จริง จึงอาจเป็นไปได้ว่าสาเหตุหนึ่งที่ไม่สามารถโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮอว์โมนเลปตินจากตัวอย่างเนื้อเยื่อไขมัน และตับของไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวได้ เนื่องมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮอว์โมนเลปตินของสัตว์ปีกนั้นอาจมีความแตกต่างจากรายงาน Taouis *et al.* (1998) และ Ashwell *et al.* (1999a)

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกในเนื้อเยื่อของตัวรับฮอว์โมนเลปตินในไก่พื้นเมืองไทย

1. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวรับฮอว์โมนเลปตินในไก่พื้นเมืองไทย

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตัวรับของฮอว์โมนเลปตินของไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์เหลืองหางขาว เป็นผลของการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ตามข้อมูลผลการตรวจลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ 4 คู่ (ตารางที่ 9) ที่เพิ่มปริมาณขึ้นดิเอ็นเอ จาก cDNA ของยีนดังกล่าว เป็นการเรียงลำดับความต่อเนื่องโดยอาศัยข้อมูลบริเวณที่ซ้อนทับ (overlapping) ร่วมกับการเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตัวรับของฮอว์โมนเลปตินของไก่ที่มีรายงานไว้แล้ว (GenBank accession number AF169827) การศึกษาครั้งนี้พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีนตัวรับของฮอว์โมนเลปติน มีความยาว 3,603 คู่เบส แบ่งเป็นส่วนที่สามารถถอดรหัสได้จำนวน 3,447 คู่เบส และส่วนที่ไม่สามารถถอดรหัสด้าน 5' จำนวน 54 คู่เบสและด้าน 3' จำนวน 102 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 10) ส่วนที่ถอดรหัสได้กำหนดการสร้างโปรตีนขนาดประมาณ 129 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 1,148 ตัว และเมื่อพิจารณาองค์ประกอบของกรดอะมิโนของตัวรับของฮอว์โมนเลปตินพบกรดอะมิโน cysteine (C) จำนวน 39 ตัวที่มีโอกาสสร้างพันธะไดซัลไฟด์ที่จำเป็นต่อการยึดจับของโครงสร้างโปรตีนตัวรับ

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตัวรับของฮอว์โมนเลปตินระหว่างไก่พื้นเมืองไทย จากการศึกษา และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตัวรับของฮอว์โมนเลปตินที่มีรายงานไว้ในไก่เนื้อ (Horev *et al.*, 2000) และไก่วง (Richards and Poch, 2003) มีลักษณะคล้ายกันจึงทำให้

Exon 3 | **Start ->**
 agatggcattttctccacaggaatagctgtaattctaccagctcttcaaaacaag**atg**tat

| **Exon 4 ->**
 caccaaattcattctgaccatgtctttgctggttgggctttcttcacgtggcagctgcccac
 tgtatgggtccacgagattcatcccaggagctttacattaccgtgcctactgctgaatgag
 acatcttcgagtccttctgctgcccggagttgtacggagccggtctggttggaggagggag
 catggagttgctgaaaccaacccttccttgctaattggatgaggagagttttctgtgttgc
 ctttggagcaataacaacgccagttgttctttgtacagtgcacacatgcaagcgaggatg

| **Exon 5 ->**
 cttattccttcagaaatgagcatctctgcatctcaggaaagagattcaaattggaacatt
 gaatgttgggttgaaggcaagctggatctgttagttttagctgcagttcccgaagttt

| **Exon 6 ->**
 cacgtgagacttgatatgaagggttcatcttttatatgctgtgtcagagctgtcactggga
 gacgcatctacgagctccctgaaggagactgccctggctgctcagtgtaactgcaatgag
 tatggcaaattgtgagtgccatgtgccttcccccaagactcaaccacacttacgtcatgtgg
 ctgaagactgtgattggtgtaacacctctttggtcacccttgatgtcagtcgaagccata

| **Exon 7 ->**
 gacatagtaaagcctgaacctcctttgaatgtgctctagagatgacagagagaggtcaa
 gtttaagatctgctgggtctgagcctgtaccgatgccgtaccgctccggtgtgaagtgaac

| **Exon 8 ->**
 atctctggaaattcagatcaaaatgactggcaggtgggttcaagttgctttaaacctca
 ttagacatagacaatatgctgcttgattcttcctcctttgctcaagtgggtgcaagagt
 cattgtgggtccgggttctggagtgatggagcacactgtataatctgaatgtgggagct

| **Exon 9 ->**
 gaagtgtgtacttccctactaagatactgaccagtgttgggttctaactgttctgctttcat
 tgcattctataaaaaacaaaaccagagcgttagcgtccaagaagattgttgggtggctgaat
 ttagcagaagaaatcccagaaagttagtatacgttgtgaacgatcgcgtaagcaaagtt
 actcttttcaacttgaaagcaacaaaacctagaggaagtttcttctataacgcattgtac

| **Exon 10 ->**
 tgttgccatcaaaaataggggaatgccatcatagatacgtgaattatatgtagtagatgtg
 aatatcaatatcaaatgtgaaactgatgggtacttaactaaaatgacttgcagatggtct

| **Exon 11 ->**
 gcagacccaaacgcattgtcttggggagtttcttgcagtttaagataccacaggagcaaaa
 atttattgttctaactttccaagtactcctccagaatcagagggtgaaagaatgccatttc
 cagaggaatcattcttatgagtgcacatttcagcctgtttttcttttatctggatatacc
 atgtggattgagcttaagcactcgttgggaacacttgaatcctcaccaacttgtgtcgtt

| **Exon 12 ->**
 ccagcagatgtgggtgaagccactgcctccctccaacattaaagcagagatcaccagaaac
 gatgggctgctgaacgtgagctggacaaacccggtgtttacaaatgatgaccttaagttt

| **Exon 13 ->**
 cagatccggtacgcagtgaacaggggaagaactcacatgggagctgtatgaagttctaagc
 gtaccaacaagatcagctgtgatagaagtgaactttgtgttgaatatattgttcagatc
 cgctgcagagccctggatggcttaggctactggagcaactggagcagatcagcctatgca

| **Exon 14 ->**
 gcagtaaaagatatccaagctcccttacatggccctgagttttggagaactgtcactgaa

| **Exon 15 ->**
 gatccagcaacggggcagaagaacgtttacgctcctgtgggaagccactgatgaagaatcac
 tcaactgtcagtggtgagccggtacgttataaagcatcagacgtcagaaaacacctcgtgg
 tcagagtatgtcgacaatggcaccacctgctcatttccatggactgaaagcacacacacc

ภาพที่ 11 การแสดงตำแหน่งการแบ่งเอ็กซอนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวรับของฮอร์โมน
 เลปตินในไก่พื้นเมืองไทย

attacaattctagccgtgaattcaattggagcttcttcagttaattttaatttaactctg

| Exon 16 ->

tcacaacaaatgagcacagtgaatgctgtgcagtcctctcattgcttaccagtgaaacagc
acgtgtgtgattttgacttggacgctttcgctcaaataatgtgataacatcttttatt
attgagtggagaaaccttaacaaagaagaggagatgaagtgggtgcaagttcctccaaat

| Exon 17 ->

attagtaaacactatatttatgaccactttattctgattgagaagtaccggttcagcctg

| Exon 18 ->

taccccgctgtttgctgcaggagttggcaaataccagagccacggatcagttctccaaagat
gggtatgccagtcagaccagttctaacctctatatgggtcctgccaatagttatttcaacc

| Exon 19 ->

tccgtgctgttgcttggagcgctgctgggtttcgaccgaagaatgaagaaactgctctgg

| Exon 20 ->

gaagatgttccaaaccccaagaattgctcgtgggcacaagggtgttgattttcagcagcct
gaaacttttgagcacctttttgtcaagcacctgaagcaatgtcatttgagcctcttctt
ctggaaccggaaatagtgtggaagacatcagtggtactaaagctttggaacaagaagac
acgcaagattttcttagtgcttgattccacgttcacaaaacctgaagactctgagcacgac
tctgctgttcccagcagccacttcagtggtcgagctccctggagtgctccccagtgac
ccgacctctggagaaacagcaagtcagtcacaacattaagtatgccactgttatcactaac
tccagatcaggtgggctttacgaacagaataagaatcccagatgtcattttgatggatgt
tttctagctgaagactccttggctgcaggtgcttgcaggtagctcctgggagctggga
aatgaggcggttctcctgctgcctgaccagcctggcagccagccctgcaagaccctctcc
cttatctcttcagagggattttccgagccttcagatcaggatgatgctttcacagatgga
ggtagccctgagcgaggtctccattacctagggataacatcactgggcaaaagagaaaat
gacatttttttaacggaaagttccagactgatgtgccatttccatacagctgatctgctc
agaggtgtgggattttcttcagaatacgctcctctaattttaaatgcatttatccagagtagc
attaaagccatcgtgccatacgtgccgcagtttcagatgactgctgccaaagtgaagag

<- Stop |

accacagagaacagctgtttaaagccctcacaccttaatttgatgctctttatggctttcta
agtgtaggtatatactgtgtttttccctctcctagcttctttaaggaaggttgggaagct
gatctag

ภาพที่ 11 (ต่อ)

Extracellular Domain

ภาพที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินในไก่พื้นเมืองไทยโดยมีส่วนของโปรตีนองค์ประกอบที่สำคัญคือ ส่วนที่ทำหน้าที่กำหนดสัญญาณผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (signaling peptide) (อักษรสีเทา) ส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular domain) ส่วนที่แทรกอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane domain) และส่วนที่อยู่ในเซลล์ (intracellular domain) และแสดงตำแหน่งของการจับกับฮอร์โมนเลปติน (WSXWS motif) (แถบสีเทา) และส่วนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (Box1, 2 and 3 motif) (แถบสีดำ) รวมถึงส่วนที่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนจากไก่ชนิดอื่น (GenBank accession number AF169827)

955 aag agt cat tgt ggt ccc ggg ttc **tgg agt gaa tgg agc** aca ctg tat aat ctg aat gtg
 K S H C G P G F **W S E W S** T L Y N L N V
 1015 gga gct gaa gtg ctg tac ttc cct act aag ata ctg acc agt gtt ggt tct aac gtt tcg
 G A E V L Y F P T K I L T S V G S N V S
 1075 ttt cat tgc atc tat aaa aac aaa acc cag agc gta gcg tcc aag aag att gtt tgg tgg
 F H C I Y K N K T Q S V A S K K I V W W
 1135 ctg aat tta gca gaa gaa atc cca gaa agt cag tat acg ctt gtg aac gat cgc gta agc
 L N L A E E I P E S Q Y T L V N D R V S
 1195 aaa gtt act ctt ttc aac ttg aaa gca aca aaa cct aga gga agt ttc ttc tat aac gca
 K V T L F N L K A T K P R G S F F Y N A
 1255 ttg tac tgt tgc cat caa aat agg gaa tgc cat cat aga tac gct gaa tta tat gta gta
 L Y C C H Q N R E C H H R Y A E L Y V V
 1315 gat gtg aat atc aat atc aaa tgt gaa act gat ggg tac tta act aaa atg act tgc aga
 D V N I N I K C E T D G Y L T K M T C R
 1375 tgg tct gca **Gac** cca aac gca ttg ctc ttg ggg agt tcc ttg cag tta **aGa** tac cac **aGg**
 W S A **D** P N A L L L G S S L Q L **R** Y H **R**
 1435 agc aaa att tat tgt tct aac ttt cca agt act cct cca gaa tca gag gtg aaa gaa tgc
 S K I Y C S N F P S T P P E S E V K E C
 1495 cat ttc cag agg aat cat tct tat gag tgc aca ttt cag cct gtt ttt ctt tta tct gga
 H F Q R N H S Y E C T F Q P V F L L S G
 1555 tat acc atg tgg att gag ctt aag cac tcg ctg gga aca ctt gaa tcc tca cca act tgt
 Y T M W I E L K H S L G T L E S S P T C
 1615 gtc gtt cca gca gat gtg gtg aag cca ctg cct ccc tcc aac att aaa gca gag atc acc
 V V P A D V V K P L P P S N I K A E I T
 1675 aga aac gat ggg ctg ctg aac gtg agc tgg aca aac ccc gtg ttt aca aat gat gac ctt
 R N D G L L N V S W T N P V F T N D D L
 1735 aag ttt cag atc cgg tac gca gtg aac agg gaa gaa ctc aca tgg gag ctg tat gaa gtt
 K F Q I R Y A V N R E E L T W E L Y E V
 1795 cta agc gta cca aca aga tca gct gtg ata gaa gtg caa ctt tgt gtt gaa tat att gtt
 L S V P T R S A V I E V Q L C V E Y I V
 1855 cag atc cgc tgc aga gcc ctg gat ggc tta ggc tac **tgg agc aac tgg agc** aga tca gcc
 Q I R C R A L D G L G Y **W S N W S** R S A
 1915 tat gca gca gta aaa gat atc caa gct ccc tta cat ggc cct gag ttt tgg aga act gtc
 Y A A V K D I Q A P L H G P E F W R T V
 1975 act gaa gat cca gca acg ggg cag aag aac gtt acg ctc ctg tgg aag cca ctg atg aag
 T E D P A T G Q K N V T L L W K P L M K
 2035 aat cac tca ctg tgc agt gtg agc cgg tac gtt ata aag cat cag acg tca gaa aac acc
 N H S L C S V S R Y V I K H Q T S E N T
 2095 tcg tgg tca gag tat gtc gac aat ggc acc acc tgc tca ttt cca tgg act gaa agc aca
 S W S E Y V D N G T T C S F P W T E S T
 2155 cac acc att aca att cta gcc gtg aat tca att gga gct tct tca gtt aat ttt aat tta
 H T I T I L A V N S I G A S S V N F N L
 2215 act ctg tca caa caa atg agc aca gtg aat gct gtg cag tct ctc att gct tac cca gtg
 T L S Q Q M S T V N A V Q S L I A Y P V
 2275 aac agc acg tgt gtg att ttg act tgg acg ctt tcg cct caa ata tat gtg ata aca tct
 N S T C V I L T W T L S P Q I Y V I T S

ภาพที่ 12 (ต่อ)

2335	ttt att att gag tgg aga aac ctt aac aaa gaa gag gag atg aag tgg gtg caa gtt cct	F I I E W R N L N K E E E M K W V Q V P
2395	cca aat att agt aaa cac tat att tat gac cac ttt att ctg att gag aag tac cgg ttc	P N I S K H Y I Y D H F I L I E K Y R F
2455	agc ctg tac ccc gtg ttt gct gca gga gtt ggc aaa tcc aga gcc acg gat cag ttc tcc	S L Y P V F A A G V G K S R A T D Q F S
2515	aaa gat ggg tat gcc agt cag acc agt tct aac ctc tat atg gtc ctg cca ata gtt att	K D G Y A S Q T S S N L Y M V L P I V I
2575	tca acc tcc gtg ctg ttg ctt gga gcg ctg ctg gtt tcg cac cga aga atg aag aaa ctg	S T S V L L L G A L L V S H R R M K K L
2635	ctc tgg gaa gat gtt cca aac ccc aag aat tgc tcg tgg gca caa ggt gtt gat ttt cag	L W E D V P N P K N C S W A Q G V D F Q
2695	cag cct gaa act ttt gag cac ctt ttt gtc aag cac cct gaa gca atg tca ttt gag cct	Q P E T F E H L F V K H P E A M S F E P
2755	ctt ctt ctg gaa ccg gaa ata gtg ctg gaa gac atc agt gtt act aaa gct ttg gaa caa	L L L E P E I V L E D I S V T K A L E Q
2815	gaa gac acg caa gat ttc tta gtg ctt gat tcc acg ttc aca aaa cct gaa gac tct gag	E D T Q D F L V L D S T F T K P E D S E
2875	cac gac tct gcg tgt ccc agc agc cac ttc agt ggt cgc agc tcc ctg gag tgc tcc ccc	H D S A C P S S H F S G R S S L E C S P
2935	agt gac ccg acc tct gga gaa aca gca agt cag tcc aac att aag tat gcc act gtt atc	S D P T S G E T A S Q S N I K Y A T V I
2995	act aac tcc aga tca ggt ggg ctt tac gaa cag aat aag aat ccc aga tgt cat ttt gat	T N S R S G G L Y E Q N K N P R C H F D
3055	gga tgt ttt cta gct gaa gac tcc ttg gct gca ggt gct tgc tca ggt agc tcc tgg gag	G C F L A E D S L A A G A C S G S S W E
3115	ctg gga aat gag gcg ttc ctc ctg ctg cct gac cag cct ggc agc cag ccc tgc aag acc	L G N E A F L L L P D Q P G S Q P C K T
3175	ctc tcc ctt atc tct tca gag gga ttt tcc gag cct tca gat cag gat gat gct ttc aca	L S L I S S E G F S E P S D Q D D A F T
3235	gat gga ggt agc cct gag cga ggt ctc cat tac cta ggg ata aca tca ctg ggc aaa aga	D G G S P E R G L H Y L G I T S L G K R
3295	gaa aat gac att ttt tta acg gaa agt tcc aga ctg atg tgc cat ttc cat aca gct gat	E N D I F L T E S S R L M C H F H T A D
3355	ctg ctc aga ggt gtg gga ttt ctt cag aat acG cct cct aat tta aat gca ttt atc cag	L L R G V G F L Q N T P P N L N A F I Q
3415	agt agc att aaa gcc atc gtg cca tac gtg ccg cag ttt cag atg act gct gcc aaA gtg	S S I K A I V P Y V P Q F Q M T A A K V
3475	caa gag acc aca gag aac agc tgt taa	Q E T T E N S C -

Transmembrane Domain

Intracellular Domain

-----3511 -----3521 -----3531 -----3541 -----3551 -----3561 -----3571
gccctcacac cttaatttga tgctctttat ggcttttctaa gtgtaggtat atactgtgtt tttccctctc

-----3581 -----3591 -----3601 --
ctagctttctt taaggaaggt tgggaagctg at

ภาพที่ 12 (ต่อ)

การศึกษาโครงสร้างโปรตีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่พื้นเมืองไทยจากลำดับของกรดอะมิโนจำนวน 1,148 ตัว ที่ได้จากการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว พบว่าตัวรับของฮอร์โมนเลปตินประกอบด้วยส่วนที่ทำหน้าที่กำหนดสัญญาณการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (signal peptide) จำนวน 21 ตัว และส่วนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับของฮอร์โมนเลปตินจำนวน 1,127 ตัว แบ่งเป็นส่วนที่อยู่นอกเซลล์ จำนวน 810 ตัว ส่วนที่แทรกอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ จำนวน 21 ตัว และส่วนที่อยู่ในเซลล์ จำนวน 296 ตัว (ภาพที่ 12) การตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินด้วยวิธี BLASTn พบว่าได้รับการจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ class I cytokines receptor super-family เช่นเดียวกับตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของสัตว์ชนิดอื่น โดยมีส่วนประกอบของ cytokine receptor (CK) immunoglobulin C2-like (C2) และ fibronectin type III (Fong *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังพบลักษณะจำเพาะของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินตามที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (ภาพที่ 12 และ ตารางที่ 13) คือส่วนของ tryptophan/serine motif หรือ WSXWS ซึ่งเข้าใจว่าเป็นส่วนสำคัญต่อการจับกับฮอร์โมนเลปตินบริเวณ CK-F3 domain ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินส่วนที่อยู่นอกเซลล์ รวมถึงบริเวณอนุรักษ์ จำนวน 3 ตำแหน่ง (Box 1-3) ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินส่วนที่อยู่ในเซลล์ และเข้าใจว่ามีความสำคัญต่อการจับและการส่งสัญญาณของ JAK และ STAT และกรดอะมิโนไทโรซีนอนุรักษ์จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ Y₉₇₆ Y_{1,071} และ Y_{1,129} ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยา phosphorylation สำหรับการส่งสัญญาณของตัวรับของฮอร์โมนเลปติน (White *et al.*, 1997)

นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนกลูตามีนเป็นกลูตาเมตของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 260 (Gln260Glu) ซึ่งเคยมีรายงานว่าพบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าว (จาก A เป็น C ตำแหน่งที่ 806) ในหนูสายพันธุ์ fatty (*fa/fa*) Zucker rat ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนชนิดของลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 269 จาก กลูตามีนเป็น โพรลีน (Gln269Pro) และมีผลยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนเลปติน เป็นผลให้เกิดลักษณะอ้วนในหนูสายพันธุ์ดังกล่าว (Phillips *et al.*, 1996; Takaya *et al.*, 1996)

ตารางที่ 13 ตำแหน่งของลำดับของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของโปรตีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินในไก่พื้นเมืองไทยเปรียบเทียบกับไก่และไก่วง

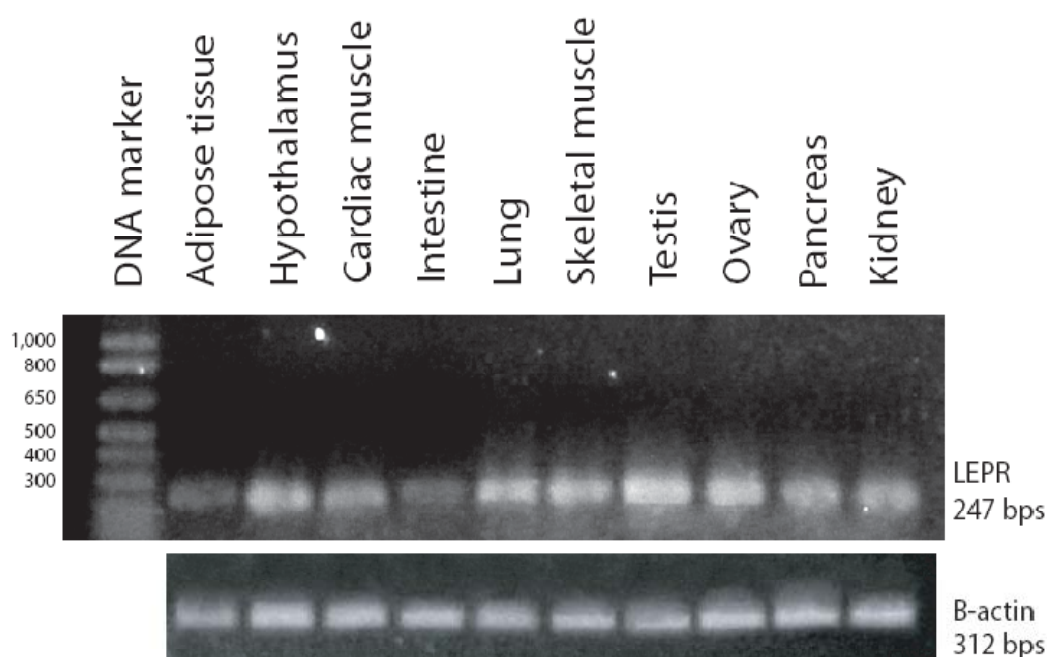
Features	Nucleotide position	Amino acid position	Description
5'-UTR	1-54		5' end mRNA untranslated region
CDS	55-3,501	1-1,148	Coding region
Signal peptide	55-117	1-21	Signal peptide sequence
Mature Protein	118-3,501	22-1,148	Functional receptor
Extracellular domain	118-2,547	22-831	Extracellular portion that includes the leptin-binding domain
C2 domain	1,018-1,296	322-414	Immunoglobulin C2-like domain
CK domain	226-564	58-170	Cytokine receptor domain
	1,312-1,638	420-528	
FN3 domain	732-975	227-307	Fibronectin type III domain
	1,639-1,887	529-611	
	1,953-2,196	634-714	
	2,238-2,487	729-811	
WSXWS motif	979-993	309-313	Conserved tryptophan-serine repeat
	1,891-1,905	613-617	
<i>Mutation sites</i>	<i>1,384</i>	<i>444</i>	<i>From Asparagine to Aspartic acid</i>
	<i>1,424</i>	<i>457</i>	<i>From Lysine to Arginine</i>
	<i>1,433</i>	<i>460</i>	<i>From Methionine to Arginine</i>
Transmembrane domain	2,548-2,610	832-852	Membrane spanning region
Intracellular domain	2,611-3,501	853-1,148	Cytoplasmic signaling portion (long form)
Box 1 motif	2,634-2,658	861-868	JAK-binding site
Box 2 motif	2,751-2,775	900-907	JAK-binding site
Box 3 motif	3,439-3,450	1,129-1,132	STAT-binding site
Conserved tyrosine	2,980-2,982	976	Leptin receptor intracellular signaling phosphorylation sites
	3,265-3,267	1,071	
	3,439-3,441	1,129	
<i>Mutation sites</i>	<i>3,387,3,471</i>		
3'-UTR	3,502-3,603		3' end mRNA untranslated region

การเปรียบเทียบลำดับของนิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วนที่สามารถถอดรหัสและลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินระหว่างไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์เหลืองหางขาวและไก่เนื้อตามรายงานของ Horev *et al.* (2000) พบว่ามีจำนวนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนเท่ากัน แต่มีความแตกต่างของชนิดนิวคลีโอไทด์ จำนวน 5 ตำแหน่ง (ภาพที่ 12) และส่งผลให้มีความแตกต่างของชนิดกรดอะมิโนจำนวน 3 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 444 เปลี่ยนจากกรดอะมิโนแอสพาราจีน (Asparagine; Asn₄₄₄) เป็น แอสพาเตท (Aspartate; Asp₄₄₄) ตำแหน่งที่ 457 เปลี่ยนจากกรดอะมิโนไลซีน (Lysine; Lys₄₅₇) เป็น อาร์จินีน (Arginine; Arg₄₅₇) และ ตำแหน่งที่ 460 เปลี่ยนจากกรดอะมิโนเมทไธโอนีน (Methionine; Met₄₆₀) เป็น อาร์จินีน (Arg₄₆₀) โดยเฉพาะอย่างยิ่งตำแหน่งที่ 444 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของประจุจากกลาง เป็นลบ และตำแหน่งที่ 460 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของประจุจากกลางเป็นบวก

2. การแสดงออกในเนื้อเยื่อของตัวรับฮอร์โมนเลปตินในไก่พื้นเมืองไทย

การศึกษาเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินด้วยวิธี RT-PCR อาศัยการออกแบบไพรเมอร์ให้เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ ครอบคลุมบริเวณเอ็กซอนที่ 19 และ 20 เพื่อเป็นการตรวจสอบส่วนที่อยู่ภายในเซลล์แสดงถึงการสร้าง mRNA ของตัวรับชนิดยาว ผลของการศึกษาพบการแสดงออกของยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิดยาวในทุกเนื้อเยื่อที่ได้รับการศึกษาประกอบด้วย เนื้อเยื่อไขมัน สมองส่วนไฮโปทาลามัส หัวใจ ลำไส้เล็ก ปอด กล้ามเนื้อลาย รังไข่ อัณฑะ ตับอ่อน และไต การแสดงออกของยีนตัวรับดังกล่าวส่วนใหญ่สอดคล้องกับรายงานของ Horev *et al.* (2000) ที่พบว่าตัวรับของฮอร์โมนเลปตินสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อไขมัน สมองส่วนไฮโปทาลามัส ปอด ตับ และไต Ohkubo *et al.* (2000) ในเนื้อเยื่อ ตับ ไต ลำไส้เล็ก รังไข่ สมอง และ Liu *et al.* (2007) ในสมองส่วนไฮโปทาลามัส ตับ ไต รังไข่ หัวใจ ปอด เนื้อเยื่อไขมัน (ตารางที่ 4 และ ภาพที่ 13) แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเลปตินในไก่พื้นเมืองที่ไม่แตกต่างจากไก่เนื้อ แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าตัวรับของฮอร์โมนเลปตินมีการแสดงออกเพิ่มเติมในเนื้อเยื่อตับอ่อน ซึ่งมีรายงานในสัตว์ปีกชนิดอื่น (ไก่วง) (Richards and Poch, 2003) รวมถึงเนื้อเยื่ออัณฑะ และกล้ามเนื้อลาย ซึ่งในปัจจุบันยังไม่พบรายงานการแสดงออกในไก่ แต่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

อย่างไรก็ตาม จากการพบตัวรับของฮอร์โมนเลปตินในเนื้อเยื่อต่างๆ แสดงให้เห็นถึงหน้าที่ทางสรีรวิทยาที่หลากหลายของฮอร์โมนเลปติน แม้ว่าปัจจุบันไม่มีหลักฐานที่ชัดเจนของหน้าที่ของฮอร์โมนดังกล่าวในสัตว์ปีก แต่อาจมีความเป็นไปได้ที่จะมีหน้าที่ใกล้เคียงกันกับที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม



ภาพที่ 13 การแสดงออกของยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิดยาวใน เนื้อเยื่อไขมัน เนื้อเยื่อสมอง ส่วนไฮโปทาลามัส เนื้อเยื่อ หัวใจ ลำไส้เล็ก ปอด กล้ามเนื้อลาย อัณฑะ รังไข่ ตับอ่อน และไต ของไก่พื้นเมืองไทย

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกในเนื้อเยื่อของฮอร์โมนเลปตินในไก่พื้นเมืองไทย

ปัจจุบันยังไม่มีความชัดเจนถึงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถูกต้องของฮอร์โมนเลปตินของไก่ แม้ว่า Taouis *et al.* (1998) และ Ashwell *et al.* (1999a) รายงานว่าพบยีนของฮอร์โมนเลปตินจากเนื้อเยื่อไขมันและตับของไก่ และแสดงให้เห็นว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนของหนูเมาส์ หนูแรท และคนถึงร้อยละ 97 96 และ 83 ตามลำดับ (Taouis *et al.*, 1998) และต่อมายังมีการแสดงผลการทำงานทางสรีรวิทยาของรีคอมบิแนนท์โปรตีนของฮอร์โมนเลปตินที่ผลิตขึ้นตามข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว (Dridi *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่ารายงานส่วนใหญ่เป็นผลการศึกษาของนักวิจัยจากกลุ่มของ Taouis *et al.* เพียงกลุ่มเดียวเท่านั้นที่พบยีนของฮอร์โมนเลปตินของไก่ แต่นักวิจัยกลุ่มอื่นอีกหลายกลุ่มรวมถึงงานวิจัยนี้ไม่ประสบความสำเร็จในการเพิ่มผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอของยีนฮอร์โมนเลปตินหรือยีนใดๆ ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับยีนฮอร์โมนเลปตินตามที่ Taouis *et al.* (1998) และ Ashwell *et al.* (1999a) รายงานไว้

ความล้มเหลวของความพยายามในการโคลนยีนฮอร์โมนเลปตินของไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวของงานวิจัยนี้ สอดคล้องกับรายงานของ Friedman-Einat *et al.* (1999) Ninov *et al.* (2008) Amills และ คณะ (2003) Pitel *et al.* (2000a และ 2000b) Dunn *et al.* (2000) และ Sharp *et al.* (2008) ที่ไม่มีผู้ใดสามารถโคลนยีนฮอร์โมนเลปตินของไก่ได้สำเร็จ จนกระทั่งมีการตั้งข้อสังเกตว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮอร์โมนเลปตินของไก่ตามรายงานของ Taouis *et al.* (1998) และ Ashwell *et al.* (1999a) อาจไม่มีอยู่จริง (Friedman-Einat *et al.*, 1999; Ninov *et al.*, 2008; Sharp *et al.*, 2008) นอกจากนี้ Friedman-Einat *et al.* (1999) ยังตั้งข้อสังเกตว่าขณะที่ฮอร์โมนเลปตินของไก่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับของหนูเมาส์ หนูแรท และแกะมากถึงร้อยละ 90 แต่ไซโตไคน์ (cytokine) ชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกันกับฮอร์โมนเลปติน คือ โปรแลคติน (prolactin) อินเตอร์เฟอรอน แกมมา (interferon gamma) และอินเตอร์ลิวคิน 2 (interleukin 2) ของไก่กลับมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับของหนูเมาส์ หนูแรท และแกะ อยู่เพียงร้อยละ 55.4 – 66.7 เท่านั้น (ตารางที่ 14) จึงไม่สอดคล้องตามทฤษฎีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และเมื่อเร็วๆ นี้ Sharp *et al.* (2008) ได้ตั้งข้อสังเกตถึงการทดลองที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดระดับฮอร์โมนเลปติน การแสดงผลทางชีวภาพของฮอร์โมนเลปติน และทดลองผลทางสรีรวิทยาของฮอร์โมนเลปติน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์ปีก ว่ายังไม่มีมีความน่าเชื่อถือกว่าลำดับ

ตารางที่ 14 จำนวนร้อยละแสดงความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮอร์โมนเลปติน (leptin) โพรแลคติน (prolactin) อินเตอร์เฟอรอน แกมมา (interferon gamma) และ อินเตอร์ลิวคิน 2 (interleukin 2) ของไก่เปรียบเทียบกับหนูเมาส์ หนูแรท และแกะ

		หนูเมาส์	หนูแรท	แกะ	ไก่
ฮอร์โมนเลปติน	หนูเมาส์	100	95.6	83.3	94.6
	หนูแรท		100	83.6	90.4
	แกะ			100	81.5
	ไก่				100
โพรแลคติน	หนูเมาส์	100	89.4	68.4	62.6
	หนูแรท		100	71.3	65.7
	แกะ			100	67.3
	ไก่				100
อินเตอร์เฟอรอน แกมมา	หนูเมาส์	100	88.2	64.2	59.8
	หนูแรท		100	65.4	56.4
	แกะ			100	57.2
	ไก่				100
อินเตอร์ลิวคิน 2	หนูเมาส์	100	85.6	65.6	ไม่มีรายงาน
	หนูแรท		100	67.5	ไม่มีรายงาน
	แกะ			100%	55.4
	ไก่				100

ที่มา: คัดแปลงจาก Friedman-Einat *et al.*, 1999

นิวคลีโอไทด์ของฮอร์โมนเลปตินที่แท้จริงจะได้รับการพิสูจน์ ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าในปัจจุบันยังไม่มี การค้นพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องของฮอร์โมนเลปตินของไก่ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าประหลาดใจว่าขณะนี้ปัจจุบันยังไม่ปรากฏหลักฐานความชัดเจนถึงการมีอยู่ของฮอร์โมนเลปตินของสัตว์ปีก แต่รายงานหลายฉบับแสดงให้เห็นว่าสามารถโคลนยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของสัตว์ปีกได้ เช่น Horev *et al.* (2000) Ohkubo *et al.* (2000) Richard และ Poch (2003) รวมถึง Liu *et*

al. (2007) เช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ที่ประสบความสำเร็จในการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่ แต่ทว่ากลับไม่ประสบความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนขึ้น ดีเอ็นเอของยีนฮอร์โมนเลปตินตามข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานโดย Taouis *et al.* (1998) และ Ashwell *et al.* (1999a) แม้ว่าจะมีการควบคุมปัจจัยหลายประการให้เหมาะสม ทั้งในการเลือกไพรเมอร์ การควบคุมคุณภาพของอาร์เอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน ฮอร์โมนเลปตินในระหว่างกระบวนการสร้าง cDNA ก็ตาม

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกในเนื้อเยื่อของตัวรับฮอร์โมนเลปตินในไก่พื้นเมืองไทย

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวมีความแตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่เนื้อสายพันธุ์ LegHorn ตามรายงานของ Horev *et al.* (2000) จำนวน 5 ตำแหน่ง (ตารางที่ 13) เป็นส่วนที่อยู่บริเวณภายนอกเซลล์ 3 ตำแหน่ง และอยู่บริเวณภายในเซลล์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว 2 ตำแหน่ง ทว่าเมื่อถอดรหัสเป็นโปรตีนพบความแตกต่างของชนิดกรดอะมิโนเกิดขึ้นเพียง 3 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 444 ตำแหน่งที่ 457 และ ตำแหน่งที่ 460 โดยกรดอะมิโนทั้ง 3 ตำแหน่งอยู่ในบริเวณ CK domain อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างของชนิดของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนดังกล่าวระหว่างตัวรับของฮอร์โมนเลปตินของไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวไก่เนื้อสายพันธุ์ LegHorn อาจเป็นผลมาจากความแตกต่างอันเนื่องมาจากสายพันธุ์ที่ต่างกัน หรืออาจเป็นเพราะตัวอย่างของไก่ที่สุ่มเลือกมาใช้ในการศึกษามีจำนวนน้อยเกินไป (2 ตัว) จึงอาจจะต้องมีการเพิ่มจำนวนประชากรในการศึกษาให้มากขึ้นเพื่อยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์และอะมิโนดังกล่าวของไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวต่อไป

การแสดงออกของยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิดยาวของไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวพบได้ในทุกเนื้อเยื่อที่ใช้ในการศึกษา ซึ่งได้แก่ เนื้อเยื่อไขมัน สมองส่วนไฮโปทาลามัส หัวใจ ลำไส้เล็ก ปอด กล้ามเนื้อลาย อัณฑะ รังไข่ ตับอ่อน และไต แสดงว่าฮอร์โมนดังกล่าวอาจมีหน้าที่ทางสรีรวิทยาที่หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเนื้อเยื่อไขมัน สมองส่วนไฮโปทาลามัส หัวใจ ลำไส้เล็ก ปอด รังไข่ และไต ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับรายงานในไก่และในสัตว์ปีกชนิดอื่น (ไก่อ้วน) (Horev *et al.*, 2000; Ohkubo *et al.*, 2000; Richards and Poch, 2003; Liu *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีนดังกล่าวเพิ่มเติมใน อัณฑะ และกล้ามเนื้อลาย โดยแม้ยังไม่พบรายงานใน

สัตว์ปีก แต่มีรายงานในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนเลปตินในไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวนั้น มีกลไกการทำงานทางสรีรวิทยาไม่แตกต่างกับไก่สายพันธุ์อื่น (Horev *et al.*, 2000; Ohkubo *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2007) และอาจเป็นไปได้ว่ามีหน้าที่ทางสรีรวิทยาเหมือนกันกับฮอร์โมนเลปตินในสัตว์ปีกชนิดอื่นและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- Ackerley, S.K. 2005. **Histogenesis of the Nervous System: The Brain**. Developmental Biology Online. Available Source: <http://www.uoguelph.ca/zoology/devobio/210labs/ecto3.html>, May 20, 2005.
- Ahima, R. S., J. Dushay, S. N. Flier, D. Prabakaran and J. S. Flier. 1997. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. **J Clin Invest**. 99 (3): 391-395.
- _____ and J. S. Flier. 2000. Leptin. **Annu Rev Physiol**. 62: 413-437.
- _____, D. Prabakaran, C. Mantzoros, D. Qu, B. B. Lowell, E. Maratos-Flier and J. Flier. 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. **Nature**. 382: 250-252.
- _____, C. B. Sape, J. S. Flier and J. K. Elmquist. 2000. Leptin Regulation of Neuroendocrine Systems. **Front Neuroendocrinol**. 21 (3): 263-307.
- Amills, M., N. Jim'enez, D. Villalba, M. Tor, E. Molina and D. Cubil'o. 2003. Identification of three single nucleotide polymorphisms in the chicken insulin-like growth factor 1 and 2 genes and their associations with growth and feeding traits. **Poult Sci**. 82 (10): 1485-1493.
- Anubhuti, A. and S. Arora. 2008. Leptin and its metabolic interactions – an update. **Diabetes Obes Metab**. 10 (11): 973-993.
- Araki, E., M. A. Lipes, M.-E. Patti, J. C. Brüning, B. Haag, R. S. Johnson and C. R. Kahn. 2002. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**. 372: 186 – 190.

- Ashwell, C. M., S. M. Czerwinski, D. M. Brocht and J. P. McMurtry. 1999a. Hormonal regulation of leptin expression in broiler chickens. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 276: 226-232.
- _____, J. P. McMurtry, X. H. Wang, Y. Zhou and R. Vasilatos-Younken. 1999b. Effects of growth hormone and pair-feeding on leptin mRNA expression in liver and adipose tissue. **Domest Anim Endocrinol.** 17: 77-84.
- Ashworth, C. J., N. Hoggard, L. Thomas, J. G. Merce, J. M. Wallace and R. G. Lea. 2000. Placental leptin. . **Rev Repro.** 5: 18-24.
- Bado, A., S. Levasseur, S. Attoub, S. Kermogant and J. P. Laigneau. 1998. The stomach is a source of leptin. **Nature.** 394: 790-793.
- Banks, A. S., S. M. Davis, S. H. Bates and M. G. Myers. 2000. Activation of Downstream Signals by the Long Form of the Leptin Receptor. **J Biol Chem.** 275 (19): 14563–14572.
- Barb, C. R., X. Yan, M. J. Azain, R. R. Kraeling, G. B. Rampacek and T. G. Ramsay. 1998. Recombinant Porcine Leptin Reduces Feed Intake and Stimulates Growth Hormone Secretion in Swine. **Domest Anim Endocrinol.** 15 (1): 77-86.
- Barr, V. A., K. Lane and S. I. Taylor. 1999. Subcellular Localization and Internalization of the Four Human Leptin Receptor Isoforms. **J Biol Chem.** 274 (30): 21416-21424.
- Baskin, D. G., M. W. Schwartz, R. J. Seeley, S. C. Woods, D. Porte, J. F. Breininger, Z. Jonak, J. Schaefer, M. Krouse, C. Burghardt, L. A. Campfield, P. Burn and J. P. Kochan. 1999. Leptin Receptor Long-form Splice-variant Protein Expression in Neuron Cell Bodies of the Brain and Co-localization with Neuropeptide Y mRNA in the Arcuate Nucleus. **J Histochem Cytochem.** 47: 353-362.

- Bates, S. H. and M. G. Myers. 2003. The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. **Trends Endocrinol Metab.** 14 (10): 447-452.
- Belouzard, S., D. Delcroix and Y. Rouille. 2004. Low Levels of Expression of Leptin Receptor at the Cell Surface Result from Constitutive Endocytosis and Intracellular Retention in the Biosynthetic Pathway. **J Biol Chem.** 279 (27): 28499–28508.
- Bidwell, C. A., S. Q. Ji, G. R. Frank, S. G. Cornelius, G. M. Willis and M. E. Spurlock. 1997. Cloning and expression of the porcine obese gene. **Anim. Biotech.** 8 (2): 191-206.
- Bjorbaek, C., R. M. Buchholz, S. M. Davis, S. H. Bates, D. D. Pierroz, H. Gu, B. G. Neel, M. G. Myers and J. S. Flier. 2000. Divergent Roles of SHP-2 in ERK Activation by Leptin Receptors. **J Biol Chem.** 276 (7): 4747-4755.
- _____, S. Uotani, B. d. Silva and J. S. Flier. 1997. Divergent Signaling Capacities of the Long and Short Isoforms of the Leptin Receptor. **J Biol Chem.** 272 (7): 32686-32695.
- Blum, W. F., P. Englaro, S. Hanitsch, A. Juul, N. T. Hertel, J. Müller, N. E. Skakkebaek, M. L. Heiman, M. Birkett, A. M. Attanasio, W. Kiess and W. Rascher. 1997. Plasma Leptin Levels in Healthy Children and Adolescents: Plasma leptin levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage, and testosterone. **J Clin Endocrinol Metab.** 82 (9): 2904-2910.
- Bornstein, S., I. Plavnik and Y. Lev. 1984. Body weight and/or fatness as potential determinants of the onset of egg production in broiler breeder hens. **Br Poult Sci.** 25 (3): 323-41.
- Bruning, J. C., D. Gautam, D. J. Burks, J. Gillette, M. Schubert, P. C. Orban, Rüdiger Klein, W. Krone, D. Müller-Wieland and C. R. Kahn². 2000. Role of Brain Insulin Receptor in Control of Body Weight and Reproduction. **Science.** 289 (5487): 2122-2125.

- Burguera, B., M. E. Couce, J. Long, J. Lamsam, K. Laakso, M. D. Jensen, J. E. Parisi and R. V. Lloyd. 2000. The Long Form of the Leptin Receptor (OB-Rb) Is Widely Expressed in the Human Brain. **Neuroendocrinology**. 71 (3): 187-195.
- Campfield, L. A., F. J. Smith, Y. Guisez, R. Devos and P. Burn. 1995. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science**. 269 (5223): 546-549.
- Caprio, M., E. Fabbri, A. M. Isidori, A. Aversa and A. Fabbri. 2001. Leptin in reproduction. **Trends Endocrinol Metab**. 12 (2): 65-72.
- Carro, E., R. M. Se  ar  s, L. M. Seoane, L. A. Frohman, A. Arimura, F. F. Casanueva and C. Di  guez. 1999. Role of Growth Hormone (GH)-Releasing Hormone and Somatostatin on Leptin-Induced GH Secretion. **Neuroendocrinology**. 69 (1): 3-10.
- Casabiell, X., V. Pi  eiro, R. Peino, M. Lage, J. Cami  a, R. Gallego, L. G. Vallejo, C. Dieguez and F. F. Casanueva. 1998. Gender Differences in Both Spontaneous and Stimulated Leptin Secretion by Human Omental Adipose Tissue in Vitro: Dexamethasone and Estradiol Stimulate Leptin Release in Women, But Not in Men. **J Clin Endocrinol Metab**. 83 (6): 2149-2155.
- Casanueva, F. F. and C. Dieguez. 1999. Neuroendocrine Regulation and Actions of Leptin. **Front Neuroendocrinol**. 20 (4): 317-363.
- Castracane, V. D., D. R. Stewart, T. Gimpel, J. W. Overstreet and B. L. Lasley. 1998. Maternal serum androgens in human pregnancy: early increases within the cycle of conception. **Hum Reprod**. 13: 460-464.

- Celi, P., M. A. Blackberry, R. A. Dynes and G. B. Martin. 2000. Decrease in voluntary feed intake and pulsatile luteinizing hormone secretion after intracerebroventricular infusion of recombinant bovine leptin in mature male sheep. **Reprod Fert Dev.** 12 (8): 373-381.
- Chehab, F. F., M. E. Lim and R. Lu. 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. **Nat Genet.** 12 (3): 318-320.
- _____, K. Mounzih, R. Lu and M. E. Lim. 1997. Early Onset of Reproductive Function in Normal Female Mice Treated with Leptin. **Science.** 275 (5296) : 88-90.
- Chen, C., S.-G. Roh, G.-Y. Nie, K. Loneragan, R.-W. Xu, M. Ruan, I. J. Clarke, J. W. Goding and A. Gertler. 2001. The In Vitro Effect of Leptin on Growth Hormone Secretion from Primary Cultured Ovine Somatotrophs. **Endocrine.** 14 (1): 73-78.
- Chen, H., O. Charlat, L. A. Tartaglia, E. A. Woolf, X. Weng, S. J. Ellis, N. D. Lakey, J. Culpepper, K. J. Moore, R. E. Breitbart, G. M. Duyk, R. I. Tepper and J. P. Morgenstern. 1996. Evidence That the Diabetes Gene Encodes the Leptin Receptor: Identification of a Mutation in the Leptin Receptor Gene in *db/db* Mice. **Cell.** 84 (3): 491-495.
- Cheng, A., N. Uetani, P. D. Simonci, V. P. Chaubey, A. Lee-Loy, C. J. McGlade, B. P. Kenned and M. L. Tremblay. 2002. Attenuation of Leptin Action and Regulation of Obesity by Protein Tyrosine Phosphatase 1B. **Dev cell.** 2 (4): 497-503
- Chua, S. C., W. K. Chung, X. S. Wu-Peng, Y. Zhang, S.-M. Liu, L. Tartaglia and R. L. Leibel. 1996. Phenotypes of Mouse diabetes and Rat fatty Due to Mutations in the OB (Leptin) Receptor. **Science.** 271 (5251): 994-996.

- Cinti, S., R. D. Matteis, C. Picó, E. Ceresi, A. Obrador, C. Maffei, J. Oliver and A. Palou. 2000. Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin. **Int J Obes (Lond)**. 24 (6): 789-793.
- Clement, K., C. Vaisse, N. Lahlou, S. Cabrol, V. Pelloux, D. Cassuto, M. Gormel, C. Dina, J. Chambaz, J.-M. Lacorte, A. Basdevant, P. Bougnères, Y. Lebouc, P. Froguel and B. Guy-Grand. 1998. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. **Nature**. 392: 398-401.
- Cocchi, D., V. D. G. Colonna, M. Bagnasco, D. Bonacci and E. Muller. 1999. Leptin regulates GH secretion in the rat by acting on GHRH and somatostatinergic functions. **J Endocrinol**. 162: 95-99.
- Cohen, B., D. Novick and M. Rubinstein. 1996. Modulation of Insulin Activities by Leptin. **Science**. 274 (5290): 1185 - 1188.
- Couturier, C. and R. Jockers. 2003. Activation of the Leptin Receptor by a Ligand-induced Conformational Change of Constitutive Receptor Dimers. **J Biol Chem**. 278 (29): 26604-26611.
- Cowley, M. A., J. L. Smart, M. Rubinstein, M. G. Cordan, S. Diano, T. L. Horvath, R. D. Cone and M. J. Low. 2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. **Nature**. 411: 480-484.
- Cunningham, M. J., D. K. Clifton and R. A. Steiner. 1999. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. **Biol Reprod**. 60: 216-222.
- Czaja, K., M. Lakomy, W. Sienkiewicz, J. Kaleczyc, Z. Pidsudko, C. R. Barb, G. B. Rampacek and R. R. Kraeling. 2002. Distribution of neurons containing leptin receptors in the hypothalamus of the pig. **Biochem Biophys Res Commun**. 298 (3): 333-337.

- Denbow, D. M., S. Meade, A. Robertson, J. P. McMurtry, M. Richards and C. M. Ashwell. 2000. Leptin-induced decrease in food intake in chickens. **Physiol Behav.** 69: 359-362.
- Doyon, C., G. Drouin, V. L. Trudeau and T. W. Moon. 2000. Molecular Evolution of Leptin. **Gen Comp Endocrinol.** 124 (2): 188-198.
- Dridi, S., N. Raver, E. E. Gussakovsky, M. Derouet, M. Picard, A. Gertler and M. Taouis. 2000. Biological activities of recombinant chicken leptin C4S analog compared with unmodified leptins. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 279 (1): E116-E123.
- _____, Q. Swenson, E. Decuypere and J. Buyse. 2005. Mode of leptin action in chicken hypothalamus. **Brain Res.** 1047 (2): 214-223.
- Dunn, I. C., T. Boswell, J. M. Friedman-Einat, Y. Eshdat, D. W. Burt and I. R. Paton. 2000. Mapping of the leptin receptor gene (LEPR) to chicken chromosome 8. **Anim Genet.** 31 (4): 290.
- Dyer, C. J., J. M. Simmons, R. L. Matteri and D. H. Keisler. 1997. Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes. **Domest Anim Endocrinol.** 14 (2): 119-128.
- El-Hefnawy, T., S. Ioffe and M. Dym. 2000. Expression of the Leptin Receptor during Germ Cell Development in the Mouse Testis. **Endocrinology.** 141 (7): 2624-2630.
- Elmqvist, J. K., C. Bjørbæk, R. S. Ahima, J. S. Flier and C. B. Saper. 1998. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. **J Comp Neurol.** 395 (4): 535 - 547.
- Erickson, J. C., G. Hollopeter and R. D. Palmiter. 1996. Attenuation of the Obesity Syndrome of *ob/ob* Mice by the Loss of Neuropeptide Y. **Science.** 274 (5293): 1704 - 1707.

- Ernst, C. W., P. A. Kapke, M. Yerle and M. F. Rothschild. 1997. The leptin receptor gene (LEPR) maps to porcine chromosome 6. **Mamm Genome** 8 (3): 1432-1777.
- Escobar-Morreale, H. F., F. E. d. Rey and G. M. d. Escobar. 1997. Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. **Endocrinology**. 138 (10): 4485-4488.
- Eyckerman, S., D. Broekaert, A. Verhee, J. Vandekerckhove and J. Tavernier. 2000. Identification of the Y985 and Y1,077 motifs as SOCS3 recruitment sites in the murine leptin receptor. **FEBS lett**. 486 (1): 33-37
- Fan, W., B. A. Boston, R. A. Kesterson, V. J. Hruby and R. D. Cone. 1997. Role of melanocortineric neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. **Nature**. 385: 165-168.
- Finn, P. D., M. J. Cunningham, K. Y. F. Pau, H. G. Spies, D. K. Clifton and R. A. Steiner. 1998. The Stimulatory Effect of Leptin on the Neuroendocrine Reproductive Axis of the Monkey. **Endocrinology**. 139 (11): 4652-4662.
- Fong, T. M., R.-R. C. Huang, M. R. Tota, C. Mao, T. Smith, J. Varnerin, V. V. Karpitskiy, J. E. Krause and L. H. T. V. d. Ploeg. 1998. Localization of Leptin Binding Domain in the Leptin Receptor **Mol Pharmacol**. 53 (2): 234-240.
- Frederich, R., C. A. Hamann, S. Anderson, B. Lollmann, B. B. Lowell and J. S. Flier. 1995. Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nat Med**. 1: 1311-1314.
- Friedman-Einat, J. M., T. Boswell, G. Horev, G. Girishvarma, I. C. Dunn and R. T. Talbot. 1999. The chicken leptin gene: has it been cloned? **Gen Comp Endocrinol**. 115: 354-363.

- Gal, C. S.-L., D. Raufaste, G. Brossard, B. Pouzet, E. Marty, J.-P. Maffrand and G. L. Fur. 1997. Characterization and localization of leptin receptors in the rat kidney. **FEBS J.** 404 (2-3): 185-191.
- Ghilardi, N., S. Ziegler, A. Wiestner, R. Stoffel, M. H. Heim and R. C. Skoda. 1996. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. **PNAS.** 93 (13): 6231-6235
- Giordanetto, F. and R. T. Kroemer. 2003. A three-dimensional model of Suppressor Of Cytokine Signalling 1 (SOCS-1) **Protein Eng.** 16 (2): 115-124.
- Golden, P. L., T. J. Maccagnan and W. M. Pardridge. 1997. Human blood-brain barrier leptin receptor. Human Blood-Brain Barrier Leptin Receptor-Binding and Endocytosis in Isolated Human Brain Microvessels. **J Clin Invest.** 99 (1): 14-18.
- Gong, D.-W., Y. He, M. Karas and M. Reitman. 1997. Uncoupling Protein-3 Is a Mediator of Thermogenesis Regulated by Thyroid Hormone, 3-Adrenergic Agonists, and Leptin. **ASBMB.** 272 (39): 24129-24132.
- Gong, Y., R. Ishida-Takahashi, E. C. Villanueva, D. C. Fingar, H. Munzberg and M. G. M. Jr. 2007. The long form of the leptin receptor regulates STAT5 and ribosomal protein S6 via alternate mechanisms. **J Biol Chem.** 282 (42): 31019-31027.
- Grasso, P., M. C. Leinung, S. P. Ingher and D. W. Lee. 1997. In Vivo Effects of Leptin-Related Synthetic Peptides on Body Weight and Food Intake in Female *ob/ob* Mice: Localization of Leptin Activity to Domains Between Amino Acid Residues 106–140. **Endocrinology** 138 (4): 1413-1418.
- Grunfeld, C., C. Zhao, J. Fuller, A. Pollack, A. Moser, J. Friedman and K. R. Feingold. 1996. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the *ob* gene product, in hamsters. **J Clin Invest.** 97 (9): 2152-2157.

- Gullicksen, P. S., M. A. Della-Fera and C. A. Baile. 2003. Leptin-induced adipose apoptosis: Implications for body weight regulation. **Apoptosis**. 8: 327–335.
- Hakansson, M.-L., H. Brown, N. Ghilardi, R. C. Skoda and B. Meister. 1998. Leptin Receptor Immunoreactivity in Chemically Defined Target Neurons of the Hypothalamus **J Neurosci**. 18 (1): 559-572.
- Halaas, J., K. Gajiwala, M. Maffei, S. Cohen and B. Chait. 1995. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science**. 269 (5223): 543-46.
- Hamilton, B. S., D. Paglia, A. Y. M. Kwan and M. Dietel. 1995. Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. **Nat Med**. 1: 953-956.
- Harris, R. B. S., T. G. Ramsay, S. R. Smith and R. C. Bruch. 1996. Early and late stimulation of ob mRNA expression in meal-fed and overfed rats. **J Clin Invest**. 97 (9): 2020-2026.
- Harvey, J., N. G. McKay, K. S. Walker, J. V. d. Kaay, C. P. Downes and M. L. J. Ashford. 2000. Essential Role of Phosphoinositide 3-Kinase in Leptin-induced KATP Channel Activation in the Rat CRI-G1 Insulinoma Cell Line. **J Biol Chem**. 275 (7): 4660-4669.
- Hekerman, P., J. Zeidler, S. Bamberg-Lemper, H. Knobelspies, D. Lavens, J. Tavernier, H.-G. Joost and W. Becker. 2004. Pleiotropy of leptin receptor signalling is defined by distinct roles of the intracellular tyrosines. **FEBS J**. 272 (1): 109 - 119.
- Henson, M. C., K. F. Swan, D. E. Edwards, G. W. Hoyle, J. Purcell and V. D. Castracane. 2004. Leptin receptor expression in fetal lung increases in late gestation in the baboon: a model for human pregnancy. **Reproduction**. 127: 87-94.

- Hoggard, N., L. Hunter, J. S. Duncan, L. M. Williams, P. Trayhurn and J. G. Mercer. 1997a. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. **Proc Natl Acad Sci.** 94 (20): 11073-11078.
- _____, J. G. Mercer, D. V. Rayner, K. Moar, P. Trayhurn and L. M. Williams. 1997b. Localization of Leptin Receptor mRNA Splice Variants in Murine Peripheral Tissues by RT-PCR and in Situ Hybridization **Biochem Biophys Res Commun.** 232 (17): 383-387.
- Horev, G., P. Einat, T. Aharoni, Y. Eshdat and M. Friedman-Einat. 2000. Molecular cloning and properties of the chicken leptin-receptor (CLEPR) gene. **Mol Cell Endocrinol.** 162 (1-2): 95-106.
- Houseknecht, K. L., A. C. Baile, L. R. Matter and E. M. Spurlock. 1998. The Biology of Leptin: A Review. **J Anim Sci.** 76: 1405-1420.
- Huising, M. O., C. P. Kruiswijk and G. Flik. 2006. Phylogeny and evolution of class-I helical cytokines. **J Endocrinol.** 189: 1-25.
- Hwang, C.-S., T. M. Loftus, S. Mandrup and M. D. Lane. 1997. Adipocyte differentiation and leptin expression. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 13: 231-259.
- Ihle, J. N. and I. M. Kerr. 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily **Trends Genet.** 11 (2): 69-74.
- Iida, M., T. Murakami, K. Ishida, A. Mizuno, M. Kuwajima and K. Shima. 1996. Phenotype-Linked Amino Acid Alteration in Leptin Receptor cDNA from Zucker Fatty(fa/fa)Rat. **Biochem Biophys Res Commun.** 222 (1): 19-26.

- Iqbal, J., S. Pompolo, R. V. Considine and I. J. Clarke. 2000. Localization of Leptin Receptor-Like Immunoreactivity in the Corticotropes, Somatotropes, and Gonadotropes in the Ovine Anterior Pituitary. **Endocrinology**. 141 (4): 1515-1520.
- Janik, J. E., B. D. Curti, R. V. Considine, H. C. Rager, G. C. Powers, W. G. Alvord, John W. Smith, B. L. Gause and W. C. Kopp. 1997. Interleukin 1 Increases Serum Leptin Concentrations in Humans. **J Clin Endocrinol Metab**. 82 (9): 3084-3086.
- Jin, L., S. Zhang, B. G. Burguera, M. E. Couce, R. Y. Osamura, E. Kulig and R. V. Lloyd. 2000. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. **Endocrinology**. 141 (1): 333-339.
- Kallen, C. B. and M. A. Lazar. 1996. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **PNAS**. 93: 5793-5796.
- Karlsson, C., K. Lindell, E. Svensson, C. Bergh, P. Lind, H. Billig, L. M. S. Carlsson and B. Carlsson. 1997. Expression of Functional Leptin Receptors in the Human Ovary. **J Clin Endocrinol Metab**. 82 (12): 4144-4148.
- Kaszubska, W., H. D. Falls, V. G. Schaefer, D. Haasch, P. Hessler, P. E. Kroeger, D. W. White, M. R. Jirousek and J. M. Trevillyan. 2002. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. **Mol Cell Endocrinol**. 195 (1-2): 109-118.
- Kellerer, M., M. Koch, E. Metzinger, J. Mushack, E. Capp and Hans Ulrich Häring. 1997. Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways. **Diabetologia**. 40 (11): 1358-1362.
- Kieffer, T. J., R. S. Heller and J. F. Habener. 1996. Leptin Receptors Expressed on Pancreatic β -Cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 224 (2): 522-527.

- Kielar, D., J. S. C. Clark, A. Ciechanowicz, G. Kurzawski, T. Sulikowski and M. Naruszewicz. 1998. Leptin receptor isoforms expressed in human adipose tissue. **Metabolism**. 47 (7): 844-847.
- Kile, B. T., B. A. Schulman, W. S. Alexander, N. A. Nicola, H. M. E. Martin and D. J. Hilton. 2002. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. **Trends Biochem Sci**. 27 (5): 235-241.
- Kloek, C., A. K. Haq, S. L. Dunn, H. J. Lavery, A. S. Banks and M. G. Myers. 2002. Regulation of Jak Kinases by Intracellular Leptin Receptor Sequences. **J Biol Chem**. 277(44): 41547-41555.
- Koch, C. A., M. F. Moran, D. Anderson, X. Q. Liu, G. Mbamalu and T. Pawson. 1992. Multiple SH2-mediated interactions in v-src-transformed cells. **Mol Cell Biol**. 12(3): 1366-1374.
- Kochan, Z., J. Karbowska and W. Meissner. 2006. Leptin is synthesized in the liver and adipose tissue of the dunlin (*Calidris alpina*). **Gen Comp Endocrinol**. 148 (3): 336-339
- Kolaczynski, J. W., R. V. Considine, J. Ohannesian, C. Marco, I. Opentanova, M. R. Nyce, M. Myint and J. F. Caro. 1996. Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans : A link with ketogenesis but not ketones themselves. **Diabetes**. 45 (11): 1511-1515.
- Korbonits, M., M. M. Chitnis, M. Gueorguiev, D. Norman, N. Rosenfelder, M. Suliman, T. H. Jones, K. N. A. Fabbri, G. M. Besser, J. M. Burrin and A. B. Grossman. 2002. The release of leptin and its effect on hormone release from human pituitary adenomas. **Clin Endocrinol**. 54 (6): 781-789.
- Kroon, P. H. W. v. d. and G. J. A. Speijers. 1979. Brain deviations in adult obese-hyperglycemic mice (*ob/ob*). **Metabolism**. 28 (1): 1-3.

Kulkarni, R. N., Z. L. Wang, R. M. Wang, J. D. Hurley, D. M. Smith, M. A. Ghatei, D. J.

Withers, J. V. Gardiner, C. J. Bailey and S. R. Bloom. 1997. Leptin rapidly suppresses insulin release from insulinoma cells, rat and human islets and, in vivo, in mice. **J Clin Invest.** 100 (11): 2729-2736.

Kuo, A. Y., M. A. Cline, E. Werner, P. B. Siegel and D. M. Denbow. 2005. Leptin effects on

food and water intake in lines of chickens selected for high or low body weight. **Physiol Behav.** 84 (3): 459-464.

Lamosova, D., M. Macajova, M. Zeman, S. Mozes and D. Jezova. 2003. Effect of in ovo leptin administration on the development of Japanese quail. **Physiol Res.** 52 (2): 201-210.

_____ and M. Zeman. 2001. Effect of Leptin and Insulin on Chick Embryonic Muscle Cells and Hepatocytes. **Physiol Res.** 50: 813-819.

LaPaglia, N., J. Steiner, L. Kirsteins, M. Emanuele and N. Emanuele. 1998. Leptin alters the response of the growth hormone releasing factor- growth hormone--insulin-like growth factor-I axis to fasting. **J Endocrinol.** 159: 79-83.

Lavens, D., J. Piesseaux and J. Tavernier. 2006a. Review: negative regulation of leptin receptor signalling. **Eur Cytokine Netw.** 17 (3): 211-219.

Lavens, D., T. Montoye, J. Piesseaux, L. Zabeau, J. Vandekerckhove, K. Gevaert, W. Becker, S. Eyckerman and J. Tavernier. 2006b. A complex interaction pattern of CIS and SOCS2 with the leptin receptor. **J Cell Sci.** 119: 2214-2224.

Lepercq, J., J.-C. Challier, M. Guerre-Millo, M. Cauzac, H. Vidal and S. H.-d. Mouzon. 2001.

Prenatal Leptin Production: Evidence That Fetal Adipose Tissue Produces Leptin. **J Clin Endocrinol Metab.** 86 (6): 2409-2413.

- Leshan, R. L., M. Björnholm, H. Münzberg and M. G. Myers. 2006. Leptin Receptor Signaling and Action in the Central Nervous System. **Obesity**. 14: 208-212.
- Li, H., M. Matheny and P. J. Scarpace. 1997. Beta 3 adrenergic-mediated suppression of leptin gene expression in rats. **Am J Physiol**. 272 (6): E1031-E1036.
- Lin, J., C. R. Barb, R. L. Matteri, R. R. Kraeling, X. Chen, R. J. Meinersmann and G. B. Rampacek. 2000. Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary, and other tissues in the pig. **Domest Anim Endocrinol**. 19 (1): 53-61.
- Liu, X., I. C. Dunn, P. J. Sharp and T. Boswell. 2007. Molecular cloning and tissue distribution of a short form chicken leptin receptor mRNA. **Domest Anim Endocrinol**. 32 (3): 155–166.
- Lord, G. M., G. Matarese, J. K. Howard, R. J. Baker, S. R. Bloom and R. I. Lechler. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. **Nature**. 394: 897-901.
- Lostao, M. P., E. Urdaneta, E. Martínez-Ansó, A. Barber and J. A. Martínez. 1998. Presence of leptin receptors in rat small intestine and leptin effect on sugar absorption. **FEBS J**. 423 (3): 302-306.
- Lund, K., J. A. Hansen, H. S. Andersen, N. P. H. Møller and N. Billestrup. 2005. Mechanism of protein tyrosine phosphatase 1B-mediated inhibition of leptin signalling. **J Mol Endocrinol**. 34: 339-351.
- Lundin, A., H. Rondahl, E. Walum and M. Wilcke. 2000. Expression and intracellular localization of leptin receptor long isoform-GFP chimera. **Biochim Biophys Acta**. 1499 (1-2): 130-138.

- Macajova, M., D. Lamosova and M. Zeman. 2002. Role of leptin in Japanese quail development. **Acta Veterinaria**. 71(4): 473-479.
- _____, D. Lamosova and M. Zeman. 2004. Role of Leptin in Farm Animals: a Review. **J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med**. 51 (4): 157-166.
- Madej, T., M. S. Boguski and S. H. Bryant. 1995. Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. **FEBS lett**. 373 (1): 13-18.
- Mantzoros, C. S., J. S. Flier and A. D. Rogol. 1996. A Longitudinal Assessment of Hormonal and Physical Alterations during Normal Puberty in Boys. V. Rising Leptin Levels May Signal the Onset of Puberty. **J Clin Endocrinol Metab**. 82 (4): 1066-1070.
- Masuzaki, H., Y. Ogawa, N. Sagawa, K. Hosoda and T. Matsumoto. 1997. Non-adipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta derived hormone in humans. **Nat Med**. 3: 1029-1033.
- Meister, B. 2000. Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. **Vitam Horm**. 59: 265-304.
- Mercer, J. G., N. Hoggard, L. M. Williams, C. B. Lawrence, L. T. Hannah and P. Trayhurn. 1996. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. **FEBS lett**. 387 (2-3): 113-116.
- _____, K. M. Moar, D. V. Rayner, P. Trayhurn and N. Hoggard. 1997. Regulation of leptin receptor and NPY gene expression in hypothalamus of leptin-treated obese (*ob/ob*) and cold-exposed lean mice. **FEBS J**. 402 (2-3): 185-188.

- Mise, H., N. Sagawa, T. Matsumoto, S. Yura, H. Nanno, H. Itoh, T. Mori, H. Masuzaki, K. Hosoda, Y. Ogawa and K. Nakao. 1998. Augmented Placental Production of Leptin in Preeclampsia: Possible Involvement of Placental Hypoxia. **J Clin Endocrinol Metab.** 83 (9): 3225-3229.
- Montague, C. T., I. S. Farooqi, J. P. Whitehead, M. A. Soos, H. Rau, N. J. Wareham, C. P. Sewter, J. E. Digby, S. N. Mohammed, J. A. Hurst, C. H. Cheetham, A. R. Earley, A. H. Barnett, J. B. Prins and S. O'Rahilly. 1997. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. **Nature.** 387: 903-908
- Moon, B. C. and J. M. Friedman. 1997. The Molecular Basis of the Obese Mutation in ob^{2J} Mice. **Genomics.** 42 (1): 152-156.
- Morash, B., A. Li, P. R. Murphy, M. Wilkinson and E. Ur. 1999. Leptin Gene Expression in the Brain and Pituitary Gland. **Endocrinology.** 140 (12): 5995-5998.
- Morton, N. M., V. Emilsson, Y.-L. Liu and M. A. Cawthorne. 1998. Leptin Action in Intestinal Cells. **J Biol Chem.** 273 (40): 26194-26201.
- Moschos, S., J. L. Chan and C. S. Mantzoros. 2002. Leptin and reproduction: a review. **Fertil Steril.** 77 (3): 433-444.
- Murakami, T. and K. Shima. 1995. Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun.** 214 (3): 126-127.
- Nagatani, S., Y. Zeng, D. H. Keisler, D. L. Foster and C. A. Jaffe. 2000. Leptin Regulates Pulsatile Luteinizing Hormone and Growth Hormone Secretion in the Sheep. **Endocrinology.** 141 (11): 3965-3975.

- Ninov, K., M. C. Ledur, H. J. Alves, M. F. d. Rosário, K. Nones and L. L. Coutinho. 2008. Investigation of Leptin gene in broiler and layer chicken lines. **Scientia Agricola**. 65 (2): 214-219.
- Niswender, K. D., G. J. Morton, W. H. Stearns, C. J. Rhodes, M. G. Myers and M. W. Schwartz. 2001. Intracellular signalling: Key enzyme in leptin-induced anorexia. **Nature**. 413: 794-795.
- Ogueh, O., S. Sooranna, K. H. Nicolaides and M. R. Johnson. 2000. The Relationship between Leptin Concentration and Bone Metabolism in the Human Fetus. **J Clin Endocrinol Metab**. 85 (5): 1997-1999.
- Ohkubo, T., M. Tanaka and K. Nakashima. 2000. Structure and tissue distribution of chicken leptin receptor (cOb-R) mRNA. **Biochim Biophys Acta**. 1491 (1-3): 303-308.
- Ong, K. K. L., M. L. Ahmed, A. Sherriff, K. A. Woods, A. Watts, J. Golding and D. B. Dunger. 1999. Cord Blood Leptin Is Associated with Size at Birth and Predicts Infancy Weight Gain in Humans. **J Clin Endocrinol Metab**. 84 (3): 1145-1148.
- Paczoska-Eliasiewicz, H., A. Gertler, M. Proszkowiec, J. Proudman, A. Hrabia, A. Sechman, M. Mika, T. Jacek, S. Cassy, N. Raver and J. Rzasa. 2003. Attenuation by leptin of the effects of fasting on ovarian function in hens (*Gallus domesticus*). **Reproduction**. 126: 739-751.
- Pallett, A. L., N. M. Morton, M. A. Cawthorne and V. Emilsson. 1997. Leptin Inhibits Insulin Secretion and Reduces Insulin mRNA Levels in Rat Isolated Pancreatic Islets. **Biochem Biophys Res Commun**. 238 (8): 267-270.
- Pelleymounter, M., M. Cullen, M. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone and F. Collins. 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice. **Science**. 269 (5223): 540-543.

- Pezet, A., H. Favre, P. A. Kelly and M. Edery. 1999. Inhibition and Restoration of Prolactin Signal Transduction by Suppressors of Cytokine Signaling. **J Biol Chem.** 274 (35): 24497-24502.
- Pfister-Genskow, M., H. Hayes, A. Eggen and M. D. Bishop. 1996. Chromosomal localization of the bovine obesity (OBS) gene. **Mamm Genome.** 7 (5): 398-399.
- Phillips, M. S., Q. Liu, H. A. Hammond, V. Dugan, P. J. Hey, C. T. Caskey and J. F. Hess. 1996. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. **Nat Genet.** 13: 18-19.
- Pitel, F., C. Monbrun, J. Gellin and A. Vignal. 2000a. The chicken LEP (OB) gene has not been mapped. **Anim Genet.** 31 (4): 281.
- _____, C. Monbrun, J. Gellin and A. Vignal. 2000b. Mapping of the LEP (OB) gene to a chicken microchromosome. **Anim Genet.** 30 (1): 73-74.
- Prolo, P., M. Wong and J. Licinio. 1998. Molecules in focus : Leptin. **J Biocel.** 30: 1285-1290.
- Qian, H., M. J. Azain, M. M. Compton, D. L. Hartzell, G. J. Hausman and C. A. Baile. 1998. Brain Administration of Leptin Causes Deletion of Adipocytes by Apoptosis. **Endocrinology** 139 (2): 791-794.
- Rau, H., B. J. Reaves, S. O'Rahilly and J. P. Whitehead. 1999. Truncated Human Leptin (133) Associated with Extreme Obesity Undergoes Proteasomal Degradation after Defective Intracellular Transport. **Endocrinology** 140 (4): 1718-1723.
- Raver, N., M. Taouis, S. Dridi, M. Derouet, J. Simon, B. Robinzon, J. Djiane and A. Gertler. 1998. Large-Scale Preparation of Biologically Active Recombinant Chicken Obese Protein (Leptin). **Protein Expr Purif.** 14 (6): 403-406.

- Raver, N., E. E. Gussakovsky, D. H. Keisler, R. Krishna, J. Mistry and A. Gertler. 2000. Preparation of recombinant bovine, porcine, and porcine W4R/R5K leptins and comparison of their activity and immunoreactivity with ovine, chicken, and human leptins. **Protein Expr Purif.** 19 (1): 30-40.
- Rentsch, J. and M. Chiesi. 1996. Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. **FEBS lett.** 22: 55-59.
- Richards, M. P. and S. M. Poch. 2003. Molecular cloning and expression of the turkey leptin receptor gene. **Comp Biochem Physiol.** 136 (4): 833-847.
- Rock, F. L., S. W. Altmann, M. Vanheek, R. A. Kastelein and J. F. Bazon. 1996. The leptin haemopoietic cytokine fold is stabilized by an intrachain disulfide bond. **Horm Metab Res.** 28 (12): 649-652.
- Roh, S.-G., I. J. Clarke, R.-W. Xu, J. W. Goding, K. Loneragan and C. Chen. 1998. The in vitro Effect of Leptin on Basal and Growth Hormone-Releasing Hormone-Stimulated Growth Hormone Secretion from the Ovine Pituitary Gland. **Neuroendocrinology.** 68 (6): 361-364.
- Rosenbaum, M., M. Nicolson, J. Hirsch, S. B. Heymsfield, D. Gallagher, F. Chu and R. L. Leibel. 1996. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. **J Clin Endocrinol Metab.** 81: 3424-3427.
- Ruiz-Cortes, Z. T., T. Men, M.-F. Palin, B. R. Downey, D. A. Lacroix and B. D. Murphy. 2000. Porcine leptin receptor: Molecular structure and expression in the ovary. **Mol Reprod Dev.** 56(4): 465-474.
- Saladin, R., P. Devos, M. Guerre-Millo, A. Leturge and J. Girard. 1995. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. **Nature.** 377: 527-529.

- Sarraf, P., R. C. Frederich, E. M. Turner, G. Ma, N. T. Jaskowiak, D. J. R. III, J. S. Flier, B. B. Lowell, D. L. Fraker and H. R. Alexander. 1997. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. **J Exp Med.** 185: 171-175.
- Scacchi, M., A. I. Pincelli and F. Cavagnini. 1999. Growth hormone in obesity. **Int J Obes (Lond).** 23 (3): 260-271.
- Schubring, C., W. Kiess, P. Englaro, W. Rascher, J. Dötsch, S. Hanitsch, A. Attanasio and W. F. Blum. 1997. Levels of Leptin in Maternal Serum, Amniotic Fluid, and Arterial and Venous Cord Blood: Relation to Neonatal and Placental Weight. **J Clin Endocrinol Metab.** 82 (5): 1480-1483.
- Schwartz, M. W. and R. J. Seeley. 1997. Neuroendocrine Responses to Starvation and Weight Loss. **N Engl J Med.** 336 (25): 1802-1811.
- _____, S. C. Woods, D. Porte, R. J. Seeley and D. G. Baskin. 2000. Central nervous system control of food intake. **Nature.** 404: 661-671.
- Seeley, R. J., K. A. Yagaloff, S. L. Fisher, P. Burn, T. E. Thiele, G. v. Dijk, D. G. Baskin and M. W. Schwartz. 1997. Melanocortin receptors in leptin effects. **Nature.** 390: 349.
- Seufert, J., T. J. Kieffer, C. A. Leech, G. G. Holz, W. Moritz, C. Ricordi and J. F. Habener. 1999. Leptin Suppression of Insulin Secretion and Gene Expression in Human Pancreatic Islets: Implications for the Development of Adipogenic Diabetes Mellitus. **J Clin Endocrinol Metab.** 84 (2): 670-676.
- _____. 2004. Leptin Effects on Pancreatic B-Cell Gene Expression and Function. **Diabetes.** 53: S152-S158.

- Sharp, P. J., I. C. Dunna, D. Waddington and T. Boswell. 2008. Chicken leptin. **Gen Comp Endocrinol.** 158 (1): 2-4.
- Shekhawala, t. P. S., J. S. Garland and C. Shivpuri. 1998. Neonatal Cord Blood Leptin: Its Relationship to Birth Weight, Body Mass Index, Maternal Diabetes, and Steroids. **Pediatr Research.** 43 (3): 338-343.
- Shimon, I., X. Yan, D. A. Magoffin, T. C. Friedman and S. Melmed. 1998. Intact Leptin Receptor Is Selectively Expressed in Human Fetal Pituitary and Pituitary Adenomas and Signals Human Fetal Pituitary Growth Hormone Secretion. **J Clin Endocrinol Metab.** 83 (11): 4059-4064.
- Siegrist-Kaiser, C. A., V. Pauli, C. E. Juge-Aubry, O. Boss, A. Pernin, W. W. Chin, I. Cusin, F. Rohner-Jeanrenaud, A. G. Burger, J. Zapf and C. A. Meier. 1997. Direct Effects of Leptin on Brown and White Adipose Tissue. **J Clin Invest.** 10 (11): 2858–2864.
- Sinha, M. K., J. P. Ohannesian, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, S. Magosin, C. Marco and J. F. Caro. 1996. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. **J Clin Invest.** 97 (5): 1344-1347.
- Slieker, L. J., K. W. Sloop, P. L. Surface, A. Kriauciunas, F. LaQuier, J. Manetta, J. Bue-Valleskey and T. W. Stephens. 1996. Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. **J Biol Chem.** 271 (10): 5301-5304.
- Smith, J. T. and B. J. Waddell. 2002. Leptin Receptor Expression in the Rat Placenta: Changes in Ob-Ra, Ob-Rb, and Ob-Re with Gestational Age and Suppression by Glucocorticoids. **Biol Reprod.** 67: 1204-1210.

- Songyang, Z., K. L. Carraway, M. J. Eck, S. C. Harrison, R. A. Feldman, M. Mohammadi, J. Schlessinger, S. R. Hubbard, D. P. Smith, C. Eng, M. J. Lorenzo, B. A. J. Ponder, B. J. Mayer and L. C. Cantley. 1995. Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. **Nature**. 373: 536 – 539.
- Spanswick, D., M. A. Smith, V. E. Gropp, S. D. Logan and M. L. J. Ashford¹. 1997. Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. **Nature**. 390: 521-525.
- Spicer, L. J. and C. C. Francisco. 1997. The Adipose Obese Gene Product, Leptin: Evidence of a Direct Inhibitory Role in Ovarian Function. **Endocrinology**. 138 (8): 3374-3379.
- Stein, T. P., T. O. Scholl, M. D. Schluter and C. M. Schroeder. 1998. Plasma leptin influences gestational weight gain and postpartum weight retention. **Am J Clin Nutr**. 68: 1236-1240.
- Strobel, A., T. Issad, L. Camoin, M. Ozata and A. D. Strosberg. 1998. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. **Nat Genet**. 18: 213 – 215.
- Suzuki, R., H. Sakamoto, H. Yasukawa, M. Masuhara, T. Wakioka, A. Sasaki, K. Yuge, S. Komiya, A. Inoue and A. Yoshimura. 1998. CIS3 and JAB have different regulatory roles in interleukin-6 mediated differentiation and STAT3 activation in M1 leukemia cells. **Oncogene**. 17 (17): 2271-2278.
- Sweeney, G. 2002. Leptin signalling. **Cell Signal**. 14 (8): 655-663.
- Taga, T. and T. Kishimoto. 1997. gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. **Annu Rev Immunol**. 15: 797-819.

- Takaya, K., Y. Ogawa, N. Isse, T. Okazaki, N. Satoh, H. Masuzaki, K. Mori, N. Tamura, K. Hosoda and K. Nakao. 1996. Molecular Cloning of Rat Leptin Receptor Isoform Complementary DNAs—Identification of a Missense Mutation in Zucker Fatty (fa/fa) Rats. **BBRC**. 225 (1): 75-83.
- Tanabe, K., S. Okuya, Y. Tanizawa, A. Matsutani and Y. Oka. 1997. Leptin Induces Proliferation of Pancreatic β -Cell Line MIN6 through Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase. **Biochem Biophys Res Commun**. 241 (3): 765-768.
- Taniguchi, T. 1995. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. **Science**. 268 (5208): 251 - 255.
- Taouis, M., J. Chen, C. Daviaud, J. Dupont, M. Derouet and J. Simon. 1998. Cloning the chicken leptin gene. **Gene**. 208 (2): 239-242.
- _____, S. Dridi, S. Cassy, Y. Benomar, N. Raver, N. Rideau, M. Picard, J. Williams and A. Gertler. 2001. Chicken leptin: properties and actions. **Domest Anim Endocrinol**. 21 (4): 319-327.
- Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker, A. Moriarty, K. J. Moore, J. S. Smutko, G. G. Mays, E. A. Woolf, C. A. Monroe and R. I. Tepper. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**. 83 (7): 1263-1271.
- _____. 1997. The Leptin Receptor. **ASBMB**. 272 (10): 6093-6096.
- Tena-Sempere, M., P. R. Manna, F. P. Zhang, L. Pinilla, L. C. Gonzalez, C. Dieguez, I. Huhtaniemi and E. Aguilar. 2001. Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. **J Endocrinol**. 170: 413-423

- Thoreau, E., B. Petridou, J. Djiane and J. Mornon. 1991. Structural symmetry of the extracellular domain of the cytokine/growth hormone/prolactin receptor family and interferon receptors revealed by hydrophobic cluster analysis. **FEBS J.** 282 (1): 26-31.
- Trayhurn, P., M. E. A. Thomas, J. Duncan and D. V. Rayner. 1995. Effects of fasting and refeeding on Ob gene expression in white adipose tissue of lean and obese mice. **FEBS Lett.** 368 (3): 488-490.
- Tsuchiya, T., H. Shimizu, T. Horie and M. Mori. 1999. Expression of leptin receptor in lung: leptin as a growth factor. **Eur J Pharmacol.** 365 (2-3): 273-279.
- United State Department of Agriculture. 2008. **Broiler Meat Summary Selected Countries.** USDA. Available source: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdHome.aspx>, November 5, 2008.
- Uotani, S., C. Bjorbaek, J. Tornoe and J. S. Flier. 1999. Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. **Diabetes.** 48 (2): 279-286.
- Vaisse, C., J. L. Halaas, C. M. Horvath, J. E. Darnell, M. Stoffel and J. M. Friedman. 1996. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and *ob/ob* mice but not *db/db* mice. **Nat Genet.** 14 (1): 95 - 97.
- Vanhaesebroeck, B. and M. D. Waterfield. 1999. Signaling by Distinct Classes of Phosphoinositide 3-Kinases. **Exp Cell Res.** 253 (1): 239-254.
- Wang, J., R. .Liu, M. Hawkins, N. Barzalai and L. Rossetti. 1998a. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. **Nature.** 393: 684-688.

- Wang, X. H., J. R. Day, J. L. Beard, Y. Zhou and R. Vasilatos-Younken. 1998b. Evidence for mediation of the depressive effect of growth hormone on voluntary feed intake by neuropeptide Y and monoamines. **Poult Sci.** 77: 1-33.
- White, D. W., K. K. Kuropatwinski, R. Devos, H. Baumann and L. A. Tartaglia. 1997. Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization. **ASBMB.** 272 (7): 4065-4071.
- Wiederkehr-Adam, M., P. Ernst, K. Müller, E. Bieck, F. O. Gombert, J. Ottl, P. Graff, F. Grossmüller and M. H. Heim. 2003. Characterization of Phosphopeptide Motifs Specific for the Src Homology 2 Domains of Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) and STAT3. **J Biol Chem.** 278 (18): 16117-16128.
- Withers, D. J., J. S. Gutierrez, H. Towery, D. J. Burks, J.-M. Ren, S. Previs, Y. Zhang, D. Bernal, S. Pons, G. I. Shulman, S. Bonner-Weir and M. F. White. 1998. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. **Nature.** 391: 900-904.
- Yasukawa, H., H. Misawa, H. Sakamoto, M. Masuhara, A. Sasaki, T. Wakioka, S. Ohtsuka, T. Imaizumi, T. Matsuda, J. N. Ihle and A. Yoshimura. 1999. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. **The EMBO Journal** .18: 1309–1320.
- Yeaman, S. J. 2004. Hormone-sensitive lipase – new roles for an old enzyme. **Biochem soc.** 379: 11-12.
- Yu, W. H., M. Kimura, A. Walczewska, S. Karanth and S. M. McCann. 1997. Role of leptin in hypothalamic–pituitary function. **PNAS.** 94 (3): 1023–1028.

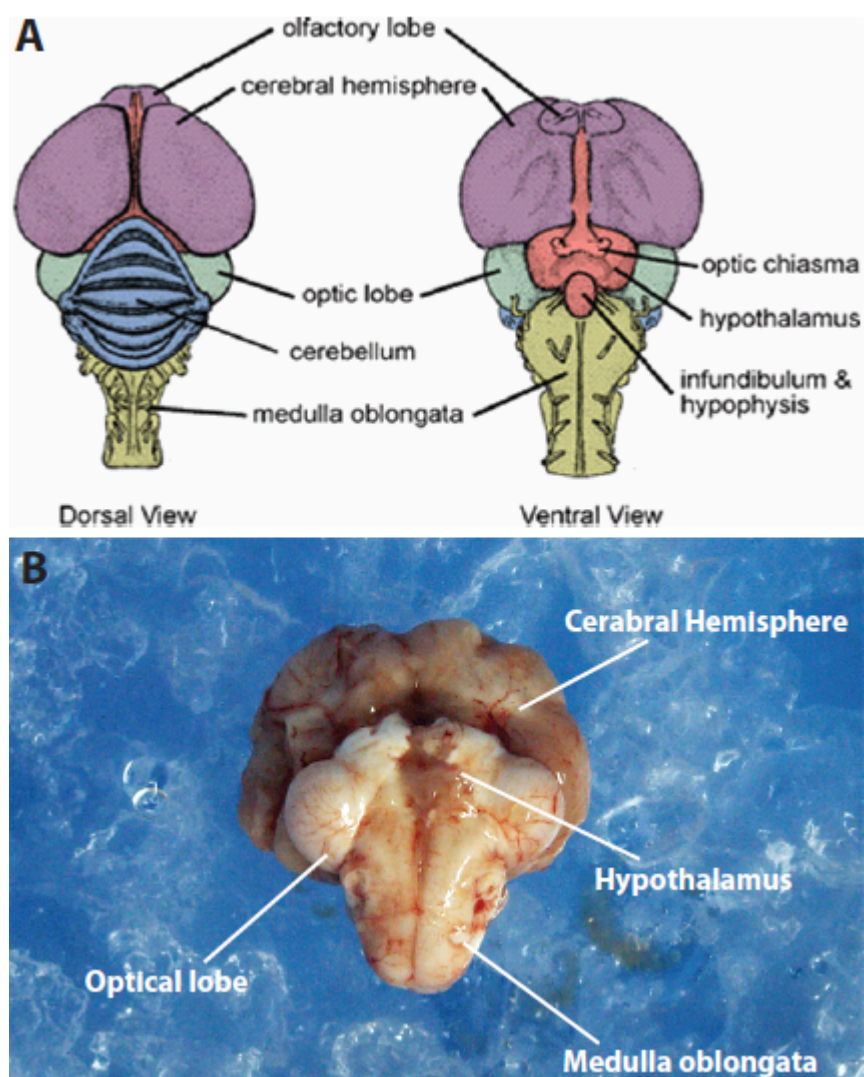
Zabolotny, J. M., K. K. Bence-Hanulec, A. Stricker-Krongrad, F. Haj, Y. Wang, Y. Minokosh, Y.-B. Kim, J. K. Elmquist, L. A. Tartaglia, B. B. Kahn and B. G. Neel. 2002. PTP1B Regulates Leptin Signal Transduction In Vivo. **Dev cell.** 2 (4): 489-495.

Zamorano, P. L., V. B. Mahesh, L. M. De Sevilla, L. P. Chorch, G. K. Bhat and D. Brann, W, . 1997. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. **Neuroendocrinology.** 65 (3): 223-228.

Zhang, F., M. Basinski, J. M. Beals, S. L. Briggs, L. M. Churgay, D. K. Clawson, R. Dimarchi, T. C. Furman, J. E. Hale, H. M. Hsiung, B. E. Schoner, D. P. Smith, X. Y. Zhang, J. Wery and R. W. Schevitz. 1997. Crystal structure of the obese protein leptin E-100. **Nature.** 387: 206-209.

Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature (Lond.).** 372: 425-432.

ภาคผนวก



ภาพผนวกที่ 1 โครงสร้างสมองแต่ละส่วนของสัตว์ปีก (A) และภาพถ่ายสมองของไก่ที่ใช้ในงานวิจัย (B)

ที่มา: (A) - Ackerley, 2005

	F-1	5'-AGGAAAATGTGCTGGAGACC-3' →	
Chicken	-----	-----	
Mouse	TGCTCCAGCAGCTGCAAGGTGCAAGAAGAAGATCCCAGGG	<u>AGGAAAATGTGCTGGAG</u>	70
Rat	-----	-----	
Human	AGCGCCAACGGTTGCAAGGCCAAGAAGC----	CATCCTGGGAAGGAAA <u>ATGCATTGGG</u>	67
Cattle	-----	-----	
Pig	GGTTCCTCTGTTTCCAGGCCCCAGAAGC---	ACATCCCGGAAAGGAAA <u>ATGCCTGTG</u>	837
Chicken	-----	-----	
Mouse	<u>ACC</u> CCTGTGTGCGGTTCTGTGGCTTTGGTCCTATCTGTCTTATGTTCAAGCAGTGCCTAT		130
Rat	<u>ACC</u> CCTGTGCGCGGTTCTGTGGCTTTGGTCCTATCTGTCTTATGTTCAAGCTGTGCCTAT		100
Human	<u>AA</u> CCTGTGCGGATTCTGTGGCTTTGGCCCTATCTTTTCTATGTCCAAGCTGTGCCCAT		127
Cattle	<u>ACC</u> CCTGTATCGATTCTGTGGCTTTGGCCCTATCTGTCTTACGTGGAGGCTGTGCCCAT		71
Pig	<u>ACC</u> CCTGTGCGGATTCTGTGGCTTTGGCCCTATCTGTCTTACGTGAAGCCGTGCCCAT		897
	LepUp	5'-CACCAGGATCAATGACATTTTCAC-3' →	
	UFlep81	5'-CACCAAACCCCTCATCAAGACCAT-3' →	
Chicken	-----	TCCAGGATGACACCAAACCCCTCATCAAGACCATTGT	CACCAGGATCAATGA 52
Mouse	CCAGAAAGTCCAGGATGACACCAAACCCCTCATCAAGACCATTGT	CACCAGGATCAATGA 190	
Rat	CCACAAAGTCCAGGATGACACCAAACCCCTCATCAAGACCATTGT	CACCAGGATCAATGA 160	
Human	CCAAAAAGTCCAGGATGACACCAAACCCCTCATCAAGACAAATGT	CACCAGGATCAATGA 187	
Cattle	CCGCAAGGTCCAGGATGACACCAAACCCCTCATTAAGACAATGT	CACCAGGATCAATGA 131	
Pig	CTGGAGAGTCCAGGATGACACCAAACCCCTCATCAAGACGATGT	CACCAGGATCAATGA 957	
	****	*****	*****
Lpt001-F			
	5'-AGGATCAATGACATTTTCACACACG-3' →		
Chicken	<u>CATTTTCACACACG</u>	---TCGGTATCCGCCAAGCAGAGGGTCACTGGCTTGGACTTCATTCC	109
Mouse	<u>CATTTTCACACACG</u>	CAGTCGGTATCCGCCAAGCAGAGGGTCACTGGCTTGGACTTCATTCC	250
Rat	<u>CATTTTCACACACG</u>	CAGTCGGTATCCGCCAAGCAGAGGGTCACTGGCTTGGACTTCATTCC	220
Human	<u>CATTTTCACACACG</u>	CAGTCAGTCTCTCTCCAAACAGAAAGTCAACCGTTTGGACTTCATTCC	247
Cattle	<u>CATTCACACACG</u>	CAGTCCGTCTCTCTCCAAACAGAGGGTCACTGGTTGGACTTCATTCC	191
Pig	<u>CATTTTCACACATG</u>	CAGTCTGTCTCTCTCCAAACAGAGGGTCAACCGTTTGGACTTCATTCC	1017
	***	*****	*
Chicken	TGGGCTTCACCCATTCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACTCTGGCAGTCTATCAACA		169
Mouse	TGGGCTTCACCCATTCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACTCTGGCAGTCTATCAACA		310
Rat	CGGGCTTCACCCATTCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACTCTGGCAGTCTATCAACA		280
Human	TGGGCTTCACCCATTCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACTCTGGCAGTCTATCAACA		307
Cattle	TGGGCTTCACCCATTCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACTCTGGCAGTCTATCAACA		251
Pig	TGGGCTTCATCTGTCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACTCTGGCAGTCTATCAACA		1077
	*****	**	*
Chicken	GGTCCTCACCAGCTGCCTTCCCAAAATGTGCTGCAGATAGCCAATGACCTGGAGAATCT		229
Mouse	GGTCCTCACCAGCTGCCTTCCCAAAATGTGCTGCAGATAGCCAATGACCTGGAGAATCT		370
Rat	GATCCTCACCAGCTGCCTTCCCAAAACGTGCTGCAGATAGCTCATGACCTGGAGAATCT		340
Human	GATCCTCACCAGTATGCCTTCCAGAAACGTGATCCAAATATCCAACGACCTGGAGAATCT		367
Cattle	GATCCTCACCAGTGCCTTCCAGAAATGTGGTCCAAATATCCAATGACCTGGAGAATCT		311
Pig	GATCCTCACCAGTGCCTTCCAGAAATGTGATCCAAATATCGAATGACCTGGAGAATCT		1137
	*	*****	*****
Chicken	CCGAGACCTCCTCCATCTGCTGGCCTTCTCCAAGAGCTGCTCTCTGCCTCAGACCAGTGG		289
Mouse	CCGAGACCTCCTCCATCTGCTGGCCTTCTCCAAGAGCTGCTCCCTGCCTCAGACCAGTGG		430
Rat	GCGAGACCTCCTCCATCTGCTGGCCTTCTCCAAGAGCTGCTCCCTGCCGAGACCCGTGG		400
Human	CCGGGATCTTCTTACAGTGTGGCCTTCTCTAAGAGCTGCCACTTGCCCTGGGCCAGTGG		427
Cattle	CCGGGACCTTCTCCACCTGCTGGCGCCTTCCAAGAGCTGCCCTTGCCGAGGTGAGGGC		371
Pig	CCGGGACCTTCTCCACCTGCTGGCCTTCTCCAAGAGCTGCCCTTGCCCGAGCCAGGGC		1197
	**	*	*

ภาพผนวกที่ 2 ตำแหน่งการจับของคู่ไพรเมอร์ F-1/R-2 Lpt001-F/Lpt002-R UFlep81/R486lep และ Lepup/Lepdn ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮอว์โมนเลปตินในไก่ (AF012727) หนูเมาส์ (NM_008493) หนูแรท (NM_013076) คน (NM_000230) โค (NM_173928) และสุกร (NM_213840)

			Lpt002-R
	← 5' - <u>TCTACTCCACAGAGGTGGTG</u> -3'		
			LepDn
	← 5' - <u>GCCTCACTCTACTCCACAGAGGTG</u> -3'		
Chicken	CCTGCAGAAGCCAGAGAGCCTGGATGGCGTCCTGGAA <u>GCCTCACTCTACTCCACAGAGGT</u>	349	
Mouse	CCTGCAGAAGCCAGAGAGCCTGGATGGCGTCCTGGAA <u>GCCTCACTCTACTCCACAGAGGT</u>	490	
Rat	CCTGCAGAAGCCAGAGAGCCTGGATGGCGTCCTGGAA <u>GCCTCCTCTACTCCACAGAGGT</u>	460	
Human	CCTGGAGACCTTGGACAGCCTGGGGGTGTCTGGAA <u>GCTTCAGGCTACTCCACAGAGGT</u>	487	
Cattle	CCTGGAGAGCTTGGAGAGCTTGGCGTTGTCTGGAA <u>GCTTCCTCTACTCCACAGAGGT</u>	431	
Pig	CCTGGAGACCTTGGAGAGCCTGGGCGGCGTCCTGGAA <u>GCCTCCTCTACTCCACAGAGGT</u>	1257	
	**** ** ** ** * * ***** ** ***** *****		
			R486lep
	← 5' - <u>ACAGTTGGATATTAGCCCGGAA</u> -3'		
Chicken	<u>GGTGG</u> CCTTGAGCAGGCTGCAGGGCTCTCTGCAGGACATTCTCA <u>ACAGTTGGATATTAG</u>	409	
Mouse	<u>GGTGG</u> CCTTGAGCAGGCTGCAGGGCTCTCTGCAGGACATTCTCA <u>ACAGTTGGATATTAG</u>	550	
Rat	<u>GGTGG</u> CTCTGAGCAGGCTGCAGGGCTCTCTGCAGGACATTCTCA <u>ACAGTTGGATATTAG</u>	520	
Human	<u>GGTGG</u> CCCTGAGCAGGCTGCAGGGGTCTCTGCAGGACATGCTGTGG <u>CAGCTGGA</u> CCTCAG	547	
Cattle	<u>GGTGG</u> CCCTGAGCCGGCTGCAGGGGTCTCTGCAGGACATGTTGCGG <u>CAGCTGGA</u> CCTCAG	491	
Pig	<u>GGTGG</u> CCCTGAGCAGGCTGCAGGGGTCTCTGCAGGACATGCTGCGG <u>CAGCTGGA</u> CCTCAG	1317	
	***** ***** ***** * * ***** * *** ***** * *		
	← 5' - <u>TATTAGCCCGGAATGCTGAG</u> -3' R-2		
Chicken	<u>CCCGGAATGCTGA</u> -----	422	
Mouse	<u>CCCTGAATGCTGA</u> AGTTTCAAAGGCCACCAGGCTCCCAAGAATCATGTAGAGGGAAGAAA	610	
Rat	<u>CCCTGAATGCTGAG</u> GTTTC-----	539	
Human	<u>CCCTGGGTGCTGAG</u> GCCTTGAAGGTCACCTCTCCTGCAAGGACTACGTTAAGGGAAGGAA	607	
Cattle	<u>TCCCGGGTGTCTGA</u> -----	504	
Pig	<u>CCCTGGCTGTCTGA</u> AGCCTTGAAGGCTCTCTCCCAACA-----GTCGGGGGAAGAAA	1369	
	** * *****		

ภาพผนวกที่ 2 (ต่อ)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายกิริติ จิรวัดน์จรรยา
วัน เดือน ปี ที่เกิด	18 กันยายน พ.ศ. 2526
สถานที่เกิด	จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการศึกษา	- จบการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียน ปรินส์รอยแยลส์วิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2544 - จบการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต จาก ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2548
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาประจำปี งบประมาณ 2549
ผลงานทางวิชาการ	- นำเสนอผลงานทางวิชาการภาคบรรยาย (oral presentation) ในการประชุมวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 56 - ผลงานตีพิมพ์ในวารสารสัตวแพทย์ ปีที่ 18 ฉบับที่ 3 พ.ศ. 2551 หน้า 177-189 เรื่อง การโคลนและการแสดงออก ของยีนเลปตินและตัวรับในไก่พื้นเมืองไทย (Cloning and Expression of leptin and Its Receptor in Thai Native Chicken)