

บทบาทของความหลากหลายของยีนในการควบคุมการแสดงออกของ
SEROTONIN TRANSPORTER



นางสาวอัญชลี ประสารสุขลาภ

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูพันธุศาสตร์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ROLE OF GENETIC POLYMORPHISM IN REGULATING THE EXPRESSION OF
SEROTONIN TRANSPORTER



Miss Anchalee Prasansuklab

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

บทบาทของความหลากหลายของยีนในการควบคุมการแสดงออกของ
SEROTONIN TRANSPORTER

โดย

นางสาวอัญชลี ประสารสุขลาภ

สาขาวิชา

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษา

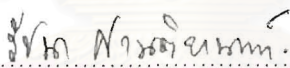
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

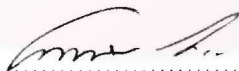


..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วินัย ตะห์ลัน)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานตียานนท์)



..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ)



..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.วนิดา คำพา)

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อัญชลี ประสารสุขลภาม : บทบาทของความหลากหลายของยีนในการควบคุมการแสดงออกของ SEROTONIN TRANSPORTER (ROLE OF GENETIC POLYMORPHISM IN REGULATING THE EXPRESSION OF SEROTONIN TRANSPORTER) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.เทวิน เทนคำเนา , 146 หน้า.

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

ภาควิชา เคมีคลินิก

ลายมือชื่อนิสิต..... *ณัฐชวี ประสารสุขลภาม*

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *Amn A.*

ปีการศึกษา 2549

4877215237 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEY WORD: SERT / 5-HTTLPR / Estrogen / Glucocorticoid / Expression

ANCHALEE PRASANSUKLAB : ROLE OF GENETIC POLYMORPHISM IN REGULATING THE EXPRESSION OF SEROTONIN TRANSPORTER.

THESIS ADVISOR : ASST. PROF. TEWIN TENCOMNAO, PhD., 146 pp.

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

Department Clinical Chemistry
 Field of study Clinical Biochemistry
 and Molecular Medicine
 Academic year 2006

Student's signature.....*(Signature)*
 Advisor's signature.....*(Signature)*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวัลย์ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนข้อคิดต่างๆ ในการทำงานด้วยดีตลอดมา ดิฉันขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.วนิดา คำพา ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ นพ.ยง ภู่วรวรรณ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อและอำนวยความสะดวกในการตรวจหาลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ และ Professor Dr. Robert K. Yu ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเพื่อพลาสติกที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นพ.ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ศาสตราจารย์ ดร.พรเทพ เทียนสิวกุล รองศาสตราจารย์ ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล รองศาสตราจารย์ พญ.ดร. ณีฐฐิยา หิรัญกาญจน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีระ วงศ์คำ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พญ.ดร.จงกลณี วงศ์ปิยะบวร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรีพร จิตจำรูญโชคไชย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทิภา บุรินทราภิบาล ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ

ขอขอบพระคุณทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา ทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่ ปีที่ 1 กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุนค่าลงทะเบียน และทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอน ของคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ และศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วนในการศึกษาวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยมาตลอด

ความดีของการศึกษา และคุณค่าของวิทยานิพนธ์นี้ ข้าพเจ้าขออุทิศแด่บูรพาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

สารบัญ

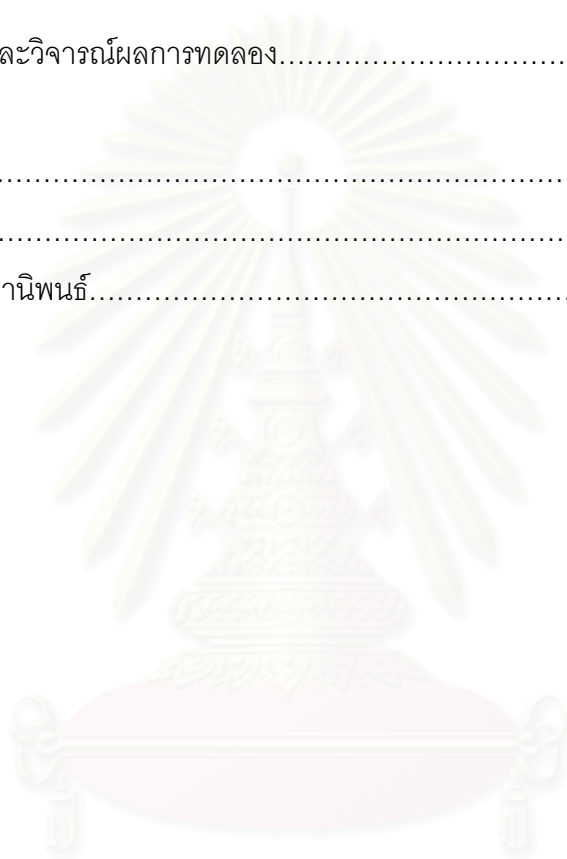
บทที่	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ

บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	7
ขอบเขตของงานวิจัย.....	7
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	7
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	8
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
2.1 ประวัติ โครงสร้างและเมแทบอลิซึมของซีโรโทนิน.....	9
2.2 ซีโรโทนินในธรรมชาติ.....	12
2.3 ความสำคัญและบทบาทของซีโรโทนิน.....	13
2.4 กลไกการออกฤทธิ์ของซีโรโทนิน (Serotonergic Pathway).....	13
2.5 ตัวดูดกลับซีโรโทนิน (Serotonin Transporter).....	16
2.6 Human Serotonin Transporter Gene (SLC6A4).....	17
2.7 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR.....	21
2.8 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับโรคและความผิดปกติต่างๆ.....	25
2.8.1 การศึกษา 5-HTTLPR กับแบบแผนลักษณะทางบุคลิกภาพ (personality traits)	25
2.8.2 การศึกษา 5-HTTLPR กับพฤติกรรมก้าวร้าวรุนแรง (aggression).....	28

บทที่	หน้า
2.8.3 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคอารมณ์แปรปรวน (mood disorders).....	30
2.8.4 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคจิตเภท (schizophrenia).....	35
2.8.5 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคเนื่องจากความวิตกกังวล (anxiety disorders).....	36
2.8.6 การศึกษา 5-HTTLPR กับการฆ่าตัวตาย (suicide).....	39
2.8.7 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคสมองเสื่อม (dementia).....	42
2.8.8 การศึกษา 5-HTTLPR กับความผิดปกติของการรับประทานอาหาร (eating disorders).....	43
2.8.9 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคสมาธิสั้น (attention deficit hyperactive disorder).....	44
2.8.10 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคออทิสซึม (autism, autistic disorder).....	45
2.8.11 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคปวดศีรษะไมเกรน (migraine).....	46
2.8.12 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคลำไส้แปรปรวน (irritable bowel syndrome).....	47
2.8.13 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease).....	48
2.8.14 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis).....	49
2.9 ชนิดและกลไกของยาที่ใช้รักษาโรคที่มีความผิดปกติของ Serotonergic Pathway.....	50
2.10 บทบาทของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา SSRIs.....	52
2.11 สเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone).....	54
2.11.1 ฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoid).....	58
2.11.2 ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen).....	59
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	63
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	63
3.2 ตัวอย่าง.....	67
3.2.1 ประชากรและการเก็บตัวอย่าง.....	67
3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction).....	67

บทที่	หน้า
3.2.3 การตรวจหาความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	68
3.2.4 การศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing).....	68
3.3 การโคลนนิ่ง (Cloning)	69
3.3.1 การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับการโคลน (Insert DNA) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	69
3.3.2 การสร้างดีเอ็นเอพลาสมิด (luciferase reporter gene constructs).....	70
3.3.3 การนำดีเอ็นเอพลาสมิด (Plasmid DNA) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Transformation).....	73
3.3.4 การสกัดพลาสมิด (Plasmid DNA) จากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณที่น้อย และอาศัยต่างในการสกัด (Alkaline Lysis Miniprep).....	74
3.3.5 การตรวจสอบโคลน (Colony Screening) โดยเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัด จำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP).....	74
3.3.6 การสกัดพลาสมิด (Plasmid DNA) จากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมาก (Maxiprep).....	75
3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell Culture)	76
3.5 การคัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการทดลอง.....	76
3.5.1 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) จากเซลล์เพาะเลี้ยง.....	76
3.5.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR.....	77
3.6 การถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง (Transfection)	79
3.7 การทดสอบการแสดงออกของยีน luciferase reporter ด้วยเทคนิค Reporter Gene Assay.....	80
3.8 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล.....	81
4 ผลการทดลอง.....	82
4.1 ตัวอย่าง.....	82
4.2 การศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing).....	83
4.3 การคัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการทดลอง.....	85

บทที่	หน้า
4.4 การศึกษา promoter activity ของยีน SERT.....	87
4.5 การศึกษาผลของ Dexamethasone ต่อ promoter activity ของยีน SERT.....	92
4.6 การศึกษาผลของ β -Estradiol ต่อ promoter activity ของยีน SERT.....	94
5 สรุป อภิปราย และวิจารณ์ผลการทดลอง.....	96
รายการอ้างอิง.....	106
ภาคผนวก.....	141
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	146



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญญัตราจ

ตาราง	หน้า
2.1 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน (sequence homology) ของตัวดูดกลืนซีโรโทนิน (serotonin transporter proteins) ในสิ่งมีชีวิตหลายสายพันธุ์กับมนุษย์ (human SERT).....	19
2.2 แสดงการศึกษาถึงการกระจายของจีโนไทป์และความถี่อัลลีลในเชื้อชาติต่างๆ.....	23
2.3 สรุปการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับแบบแผนลักษณะทางบุคลิกภาพ.....	26
2.4 สรุปการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับโรคอารมณ์แปรปรวน.....	31
2.5 สรุปการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับอาการซึมเศร้า.....	33
2.6 สรุปการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับการฆ่าตัวตาย.....	39
2.7 สรุปการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา SSRIs ในโรคซึมเศร้า (Major Depression).....	52
3.1 แสดง primers จำเพาะที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ.....	78
4.1 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน.....	86

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
2.1 แสดงโครงสร้างของซีโรโทนิน.....	9
2.2 แสดงเมแทบอลิซึมของทริปโตเฟน (tryptophan) ในร่างกาย.....	10
2.3 แสดงขั้นตอนในการสังเคราะห์และการสลายซีโรโทนิน.....	11
2.4 แสดงการขนส่งสารซีโรโทนินผ่านตัวขนส่งบนผิวของถุง (vesicle-associated transporter, VAT) และตัวดูดกลับซีโรโทนิน (serotonin transporter, SERT).....	15
2.5 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของซีโรโทนิน (Serotonergic Pathway) ตั้งแต่การสร้าง การเก็บสะสม การนำกลับ และการสลายซีโรโทนิน.....	15
2.6 แสดงลักษณะ 12 hydrophobic transmembrane (TM) domains ของตัวดูดกลับซีโรโทนิน.....	16
2.7 แสดงกลไกการทำงานของตัวดูดกลับซีโรโทนิน.....	17
2.8 แสดงตำแหน่งของ SLC6A4 locus บนโครโมโซมคู่ที่ 17.....	18
2.9 แสดงตำแหน่งต่างๆของความหลากหลายของยีน hSERT (SLC6A4) ทั้งในส่วนของ coding และ noncoding region.....	20
2.10 แสดงลักษณะของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR แบบ L และ S อัลลีล.....	21
2.11 แสดงกลไกต่างๆของยาในการรักษาโรคที่เกิดจากความผิดปกติของกลไกการออกฤทธิ์ของซีโรโทนิน.....	51
2.12 แสดงโครงสร้าง cyclopentanoperhydrophenanthrene ring ของ pregnenolone.....	54
2.13 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroidogenesis).....	55
2.14 แสดงโครงสร้างของตัวรับสัญญาณสเตียรอยด์ฮอร์โมน.....	57
2.15 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของสเตียรอยด์ฮอร์โมน.....	57
2.16 แสดงโครงสร้างของ cortisol.....	58
2.17 แสดงโครงสร้างของ dexamethasone.....	58
2.18 แสดงโครงสร้างของ estriol.....	60
2.19 แสดงโครงสร้างของ estradiol.....	60
2.20 แสดงโครงสร้างของ estrone.....	60

ภาพประกอบ	หน้า
3.1 แสดงลักษณะของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอสำหรับโคลน.....	71
3.2 แสดงลักษณะของ pGEM [®] -T Easy Vector.....	71
3.3 แสดงลักษณะของ promoterless luciferase expression vector pGL3.....	72
3.4 แสดงลักษณะของ Co-transfected pRL-CMV Vector.....	80
4.1 แสดงผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ที่มีลักษณะของจีโนไทป์ประเภท S/S และ L/L บนหลอดกาโรส.....	82
4.2 แสดงผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ที่มีลักษณะของจีโนไทป์ประเภท S/XL และ L/XL บนหลอดกาโรส.....	83
4.3 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี Jotan Hein Method ในโปรแกรม MegAlign.....	84
4.4 แสดงผลการวิเคราะห์ Transcription Factor ด้วยโปรแกรม TFSEARCH.....	85
4.5 แสดงแผนภาพของยีน SERT ในส่วน promoter และลักษณะของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ที่ใช้ในการทดลอง (plasmid constructs).....	87
4.6 แสดง promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR ในเซลล์ SW480.....	88
4.7 แสดง promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR ในเซลล์ HT-29.....	90
4.8 แสดงผลของ Dexamethasone ต่อ promoter activity ของยีน SERT ที่มี ความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR ในเซลล์ SW480.....	92
4.9 แสดงผลของ β -Estradiol ต่อ promoter activity ของยีน SERT ที่มี ความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR ในเซลล์ SW480.....	94
4.10 แสดงแผนภาพกลไกที่เป็นไปได้ (proposed mechanism) ของความสัมพันธ์ระหว่าง ฮอร์โมน Estrogen และซีโรโทนินกับโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่.....	103

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันนี้การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างมนุษย์แต่ละคน หรือที่เรียกว่า genetic polymorphisms นั้นได้รับความสนใจและแพร่หลายในวงการวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็นอย่างมาก เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้ เป็นการแปรผันในระดับของยีนซึ่งอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีนด้วย และการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนไปนั้นก็สามารถที่จะนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ ได้ ดังนั้นการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของมนุษย์สามารถที่จะนำมาใช้ศึกษาเกี่ยวกับโรคทั้งโรคทางร่างกายและโรคทางจิตใจ รวมถึงมีบทบาทสำคัญในการทำนายความเสี่ยงของการเกิดโรค (prognosis) การป้องกันโรค (prevention) การตรวจวินิจฉัยโรค (diagnosis) และการรักษาโรคด้วย ยกตัวอย่างเช่น การนำข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมมาใช้ในงานด้านเภสัชพันธุศาสตร์ (pharmacogenomics) เพื่อค้นหาการรักษาใหม่ หรือนำมาใช้ในการตรวจประเมินประสิทธิภาพ รวมทั้งผลข้างเคียงของยาเฉพาะบุคคลก่อนการให้ยาจริง

ซีโรโทนิน (serotonin) หรือ 5-hydroxytryptamine (5-HT) ถูกสังเคราะห์มาจากทริปโตเฟน (L-tryptophan) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ส่วนใหญ่ได้จากการบริโภคอาหาร (1) ซีโรโทนินเป็นสารสื่อประสาท (monoamine neurotransmitter) ที่สร้างมาจากเซลล์ประสาทในระบบประสาทส่วนกลางและจากเซลล์ enterochromaffin ในระบบทางเดินอาหารเป็นหลักซึ่งเป็นเซลล์ชนิดพิเศษอยู่ที่เยื่อผนังลำไส้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการสร้างซีโรโทนินขึ้นที่ต่อมไพเนียลด้วย แต่มีในปริมาณที่น้อยซึ่งส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนให้เป็นเมลาโทนิน โดยปกติแล้วในร่างกายมนุษย์เราจะมีซีโรโทนินอยู่ประมาณ 5-10 มิลลิกรัม และพบว่าประมาณร้อยละ 95 ของซีโรโทนินที่สร้างขึ้นในร่างกายจะอยู่ที่ระบบทางเดินอาหาร ที่เหลือส่วนใหญ่จะอยู่ในระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) และเกล็ดเลือด (platelet) จากการศึกษาพบว่าซีโรโทนินนั้นจะมีบทบาทหน้าที่สำคัญในหลายๆ ระบบของร่างกาย (2) ได้แก่ ระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบทางเดินหายใจ ระบบภูมิคุ้มกัน ระบบลำไส้และทางเดินอาหาร รวมถึงระบบประสาทในการทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของอารมณ์และพฤติกรรมหลายอย่างด้วยกัน

สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของซีโรโทนิน (serotonergic pathway) นั้นจะเริ่มจากการที่ซีโรโทนินที่สร้างขึ้นจะถูกนำไปเก็บสะสมไว้ในถุง (vesicle) ภายในเซลล์ก่อน หลังจากนั้นจะถูกปล่อยออกมาจากปลายประสาทแอกซอน (axon) ของเซลล์ประสาท (presynaptic neuron) ด้วย

กระบวนการขนส่งออกจากเซลล์ (exocytosis) เข้าสู่ช่องว่างไซแนปส์ (synaptic cleft) เพื่อไปกระตุ้นตัวรับสัญญาณซีโรโทนิน (serotonin receptor) ที่อยู่บนปลายประสาทเดนไดรต์ (dendrite) ของเซลล์ประสาทที่อยู่ติดกัน (postsynaptic neuron) และจะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการต่างๆ ต่อไปผ่านตัวรับสัญญาณซีโรโทนิน (serotonin receptor) หลายชนิด แต่อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของซีโรโทนินจะถูกยับยั้งหรือทำให้สิ้นสุดลง โดยการนำซีโรโทนินกลับเข้าสู่เซลล์ผ่านการทำงานของตัวดูดกลับซีโรโทนิน (serotonin transporter, SERT) ที่อยู่บนผิวของเซลล์เหล่านี้ (1) ซึ่งการดูดกลับซีโรโทนินนั้นจะเป็นกลไกป้องกันไม่ให้ความเข้มข้นซีโรโทนินมากเกินไปจนไปกระตุ้นตัวรับสัญญาณเพิ่มมากขึ้น (overstimulation) หรืออาจเป็นพิษต่ออวัยวะอื่นๆ ได้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าทั้งจำนวนและการทำหน้าที่ของตัวดูดกลับซีโรโทนินเหล่านี้ จะเป็นตัวกำหนดระยะเวลาของการที่สัญญาณซีโรโทนินจะคงอยู่ได้ในช่องว่างไซแนปส์ ส่วนใหญ่แล้วบริเวณที่มีการแสดงออกของตัวดูดกลับซีโรโทนิน (SERT) ในร่างกายจะอยู่ในส่วนของลำไส้กับสมอง เช่น เซลล์ประสาทและเซลล์ enterochromaffin แต่เนื่องจากซีโรโทนินเป็นสารที่มีบทบาทในหลายระบบของร่างกาย ซึ่งก็มีรายงานพบว่ามีแสดงออกของ SERT ที่เซลล์หรืออวัยวะอื่นๆ ในร่างกายด้วย ได้แก่ เซลล์รก (placenta) เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์เนื้อเยื่อกระดูก เซลล์ในระบบหัวใจและหลอดเลือด และเกล็ดเลือด (platelet) เป็นต้น

ตัวดูดกลับซีโรโทนิน (SERT) ในมนุษย์ถูกสร้างมาจากยีน human serotonin transporter (hSERT gene) หรือที่เรียกว่า SLC6A4 (Solute Carrier Family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4) ซึ่งเป็นสัญลักษณ์ของยีนที่เป็นที่ยอมรับกันทั่วไป ยีน hSERT นั้นตั้งอยู่บน ตำแหน่ง SLC6A4 locus โดยถูกบันทึกอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 17 (17q11.1 – 17q12) ซึ่งยีนนี้มีความยาวทั้งหมดประมาณ 37.8 กิโลเบส (kilo base pairs, kb) ประกอบด้วย 14 exons (3) สามารถถอดรหัสได้เป็นโปรตีนจำนวนกรดอะมิโน 630 ตัว ที่ผ่านมามีการศึกษาโดยการโคลนยีน SERT ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ได้แก่ human SERT (hSERT) (4, 5) rat SERT (rSERT) (6, 7) และ mice SERT (mSERT) (8) และพบว่ายีน SERT นี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก ทั้งที่เกิดขึ้นในส่วนของยีน ไม่ว่าจะเป็น exon (coding region) หรือ intron หรือแม้กระทั่งในส่วนของ noncoding region ที่เป็น 5' และ 3' untranslated region (UTR) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของ regulatory domains (promoter) ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (transcriptional activity) ความหลากหลายในส่วนของ promoter นี้จะมีลักษณะเป็นทอนดีเอ็นเอ ลำดับเบสซ้ำ (repetitive elements) ที่อยู่ทาง 5' flanking region ห่างจากจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส (transcription start site) เหนือขึ้นไปประมาณ 1.4 กิโลเบส ในส่วนของ regulatory domains (promoter) ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (transcriptional activity) ซึ่งถือเป็นความ

หลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่เกิดจากการ Insertion และ Deletion ที่มีจำนวนชุดของการซ้ำ (repeat elements) แตกต่างกัน และเรียกความหลากหลายชนิดนี้ว่า 5-HTT gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) ซึ่งเป็นความหลากหลายที่พบและมีการศึกษากันมากที่สุด

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTT gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) นั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แบบ (3) คือ

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

โดยในแต่ละชุด (repeat elements) นั้นจะมีประมาณ 20-23 คู่เบส และก่อให้เกิดความยาวที่แตกต่างกันระหว่าง S และ L อัลลีลประมาณ 44 คู่เบส (base pairs, bp) จากการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนชนิด 5-HTTLPR สามารถนำไปสู่การแสดงออกของยีน SERT ที่แตกต่างกันได้ (9, 10) เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมชนิดนี้พบอยู่ในส่วนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (promoter) ซึ่งอาจมีผลต่อปริมาณของโปรตีนที่สร้างได้แตกต่างกัน โดยที่ “Short” หรือ “S” อัลลีลจะทำให้การแสดงออกของยีน (transcriptional activity) ลดลง ในขณะที่ “Long” หรือ “L” อัลลีลจะทำให้การแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นในเซลล์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เซลล์รก (human placental choriocarcinoma cell line, JAR) (9) เซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphoblast cell line) (11) และเซลล์ประสาทของหนู (immortalized serotonergic raphe neurons, RN46A) (12) นอกจากนี้ยังพบว่าการกระจายของจีโนไทป์กับความถี่อัลลีลของ 5-HTTLPR ในประชากรทั่วไปนั้นจะมีการกระจายที่แตกต่างกันไปในแต่ละเชื้อชาติด้วย โดยจะพบ S อัลลีลได้มากในเชื้อชาติเอเชีย (Asian) ตรงข้ามกับในกลุ่มคนผิวขาวในประเทศแถบยุโรปรวมถึงอเมริกา (Caucasian) ซึ่งจะพบ L อัลลีลได้มากกว่า และยังคงพบ XL อัลลีลได้เฉพาะในบางกลุ่ม เช่น ในกลุ่มประเทศแอฟริกา ประเทศญี่ปุ่น รวมถึงเชื้อชาติไทยด้วย ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมของ 5-HTTLPR ที่มีความแตกต่างกันไปในแต่ละเชื้อชาติเหล่านี้ อาจสามารถส่งผลให้เกิดความหลากหลายของอาการทางคลินิกของโรคหรือความผิดปกติต่างๆ รวมถึงความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่แตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาตินั้นๆ ได้ จนถึงปัจจุบันนี้มีการศึกษามากมายที่รายงานว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR นั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคทางประสาทและโรคจิต (neuropsychiatric diseases) เช่น แบบแผนลักษณะทางบุคลิกภาพประเภท Neuroticism (11) พฤติกรรมก้าวร้าวรุนแรง (aggression) (13, 14) โรคอารมณ์แปรปรวน (mood disorders) (15) ภาวะซึมเศร้า (16)

โรคจิตเภท (schizophrenia) (17) โรคย้ำคิดย้ำทำ (obsessive-compulsive disorder) (18) โรคอัลไซเมอร์ (alzheimer's disease) (19) และการฆ่าตัวตาย (suicide) (20) เป็นต้น

สำหรับความหลากหลายในบทบาทหน้าที่ของซีโรโทนินที่เกิดขึ้น อาจเนื่องมาจากการที่ซีโรโทนินนั้น ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมหลักในการติดต่อสื่อสารกันของหลายๆ ระบบในร่างกายที่มีความซับซ้อนผ่านทางตัวรับสัญญาณซีโรโทนินซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ทำให้เกิดการประสานงานกับการทำงานในระบบอื่นๆ โดยเฉพาะระบบฮอร์โมน (hormones) ตัวอย่างเช่น การที่ซีโรโทนินสามารถที่จะกระตุ้นการหลั่งของ corticotrophin-releasing hormone (CRH) ผ่านทางตัวรับสัญญาณซีโรโทนินซึ่งอยู่บนเซลล์ประสาทที่สร้าง CRH ในระบบ hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis ส่งผลต่อการสร้างและการทำหน้าที่ของฮอร์โมนในกลุ่ม corticosteroids ได้ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามในร่างกายจะมีกลไกควบคุมกลับ (feedback regulation) ของฮอร์โมนเหล่านี้ไปที่สมองส่วนไฮโปทาลามัส (hypothalamus) โดยพบว่ามีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณของฮอร์โมนในกลุ่ม corticosteroids บนเซลล์ประสาทที่สร้างซีโรโทนินด้วย และอาจไปมีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการออกฤทธิ์ของซีโรโทนินได้ ความแตกต่างของความแรงในการจับ (affinity) รวมถึงตำแหน่งของตัวรับสัญญาณของฮอร์โมนเหล่านี้ อาจมีผลต่อการสร้างและการสลายซีโรโทนินด้วย ซึ่งได้แก่ ตัวรับสัญญาณ และตัวควบคุมกลับซีโรโทนิน เป็นต้น (21)

ในร่างกายของมนุษย์เรา ฮอร์โมนจัดเป็นตัวส่งสัญญาณเคมี (chemical messenger) ซึ่งทำหน้าที่คล้ายเป็นข้อความที่ใช้ในการติดต่อสื่อสาร อย่างถูกต้องและมีความจำเพาะต่อชนิดของเซลล์ ระหว่างเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนกับเซลล์เป้าหมาย (target cell) ซึ่งอาจจะเป็นเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนนั่นเองได้ เมื่อฮอร์โมนเหล่านี้เดินทางมาถึงยังเซลล์เป้าหมายแล้ว มันจะเข้าจับกับตัวรับสัญญาณฮอร์โมนซึ่งอยู่ที่เซลล์เพื่อกระตุ้นให้เกิดการทำงานต่างๆ ต่อไป เพื่อให้เซลล์รวมถึงอวัยวะต่างๆ ในร่างกายสามารถทำงานได้อย่างต่อเนื่อง และเป็นการรักษาภาวะสมดุลของร่างกายด้วย (Homeostasis) ตัวรับสัญญาณฮอร์โมนนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทตามชนิดของฮอร์โมน ได้แก่ ตัวรับสัญญาณฮอร์โมนที่อยู่บนผิวเซลล์ (cell surface receptor) สำหรับเปปไทด์ฮอร์โมน (peptide hormone) กับตัวรับสัญญาณฮอร์โมนที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular receptor) สำหรับสเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) ซึ่งในที่นี้จะขอกล่าวถึงเฉพาะสเตียรอยด์ฮอร์โมนเท่านั้น

ฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์นั้นจัดเป็นสารประเภทไขมัน (lipid) และมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด โดยสามารถสร้างได้จากคอเลสเตอรอล (cholesterol) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาการ

สร้างสเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroidogenesis) โดยทั่วไปแล้ว เราสามารถแบ่งสเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) ออกได้เป็น 5 กลุ่มหลักๆ คือ

1. กลุ่มฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoids) เช่น cortisol
2. กลุ่มฮอร์โมนมิเนอรัลโคคอร์ติคอยด์ (mineralocorticoids) เช่น aldosterone
3. กลุ่มฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgens) เช่น testosterone
4. กลุ่มฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) รวมถึง estradiol และ estrone
5. กลุ่มฮอร์โมนโปรเจสโตเจน (progestogens) หรือ progestins เช่น progesterone

กลไกการออกฤทธิ์หรือการทำงานของสเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) นั้นจะต้องอาศัยตัวรับสัญญาณฮอร์โมนที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งอาจมีได้หลายรูปร่างเพื่อเพิ่มความซับซ้อนของการตอบสนองที่เกิดขึ้น โครงสร้างของตัวรับสัญญาณฮอร์โมนจะประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์สายเดี่ยว สามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วนหลักๆ คือ

1. ส่วนปลายอะมิโน (amino-terminus) เกี่ยวข้องในการกระตุ้นการถอดรหัสของยีน โดยจะทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบอื่นๆ ของกลไกการถอดรหัส เช่น transcription factor ลำดับของกรดอะมิโนในส่วนนี้จะมีความหลากหลายมาก (highly variable) และจะแตกต่างกันไปตามชนิดของตัวรับสัญญาณ
2. ส่วนที่จับกับสายดีเอ็นเอ (DNA binding domain) กรดอะมิโนในบริเวณนี้จะตอบสนองโดยการจับกันของตัวรับสัญญาณกับลำดับเบสที่จำเพาะของยีน
3. ส่วนปลายกรดคาร์บอกซิล (carboxy-terminus) หรือส่วนที่จับกับฮอร์โมน (ligand-binding domain) เป็นส่วนที่จะเข้าจับกับสเตียรอยด์ฮอร์โมน

นอกจากนี้ยังมีอีก 2 ส่วนที่สำคัญ คือ ส่วน nuclear localization sequence ซึ่งจะเป็นส่วนที่ทำหน้าที่นำพาโปรตีนเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ และส่วน dimerization domain ซึ่งจะช่วยให้เกิดการเข้าคู่กันของตัวรับสัญญาณ 2 ตัว เพื่อเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้เหมาะสมที่จะจับกับสายดีเอ็นเอของยีนได้

หลังจากที่สเตียรอยด์ฮอร์โมนเดินทางมาถึงเซลล์เป้าหมายแล้ว ด้วยคุณสมบัติของไขมันทำให้สเตียรอยด์ฮอร์โมนสามารถที่จะผ่านเข้าสู่เซลล์โดยการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มของเซลล์ (plasma membrane) เข้าไปหาตัวรับสัญญาณฮอร์โมนซึ่งอยู่ทั้งในบริเวณไซโตพลาสซึมและในนิวเคลียสได้ เมื่อเกิดการจับกันระหว่างฮอร์โมนกับตัวรับสัญญาณ (receptor activation) จะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของตัวรับสัญญาณ เพื่อให้เหมาะสมที่จะสามารถจับกับสายดีเอ็นเอของยีน จากนั้นตัวรับสัญญาณที่ถูกกระตุ้นนี้จะไปจับกับส่วน hormone response element (HRE) ซึ่งเป็นลำดับเบสจำเพาะสั้นๆ ของดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณ promoter ของยีน และอาจทำให้เกิดการ

กระตุ้นหรือยับยั้งการถอดรหัสของยีนเหล่านี้ได้ โดยที่คอมเพล็กซ์ระหว่างฮอริโมนกับตัวรับ สัญญานนี้จะทำหน้าที่เหมือนเป็น transcription factor ในปฏิกิริยา

ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่าฮอริโมนในกลุ่มสเตียรอยด์ สามารถที่จะควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานของซีโรโทนิน เช่น ตัวดูดกลับซีโรโทนิน (SERT) ผ่านทางตัวรับสัญญาณของฮอริโมนนั้นๆ กับบริเวณ HRE ที่อยู่บนยีนในส่วนของ 5' flanking region ซึ่งจากการศึกษาในปี 2003 ของ Glatz และคณะ (21) ได้สนับสนุนสมมติฐานดังกล่าว พบว่า กลูโคคอร์ติคอยด์ซึ่งเป็นฮอริโมนในกลุ่มสเตียรอยด์ประเภทหนึ่งนั้น สามารถเพิ่มการแสดงออกของ SERT ในเซลล์รก (human placental choriocarcinoma cell, JAR) ได้ โดยมีกลไกการควบคุมที่บริเวณความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR นอกจากนี้ยังมีอีกหลายการศึกษาที่สนับสนุนความสัมพันธ์ระหว่างเอสโทรเจนกับ SERT ด้วย เริ่มต้นจากในปี 1998 มีรายงานว่าในกลุ่มลิง (rhesus macaques) ที่ได้รับฮอริโมนเอสโทรเจน จะมีการเปลี่ยนแปลงของ SERT โดยที่ระดับอาร์เอ็นเอของ SERT (SERT mRNA) จะลดลงเท่ากับ 32 % ของกลุ่มควบคุม (22) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Bethea และคณะที่พบว่ามีการลดลงของระดับอาร์เอ็นเอของ SERT อย่างมีนัยสำคัญในลิงภายหลังจากที่ได้รับฮอริโมนเอสโทรเจนแล้ว (23) นอกจากนี้ยังพบการลดลงของเซลล์ที่มีการแสดงออกของ SERT บริเวณ dorsal raphe (DR) nucleus ในสมองของหนู (rat) ด้วย (24) ต่อมาในปี 2004 มีรายงานว่า การได้รับเอสโทรเจนสามารถลดการทำหน้าที่ดูดกลับซีโรโทนินของ SERT ในเซลล์ประสาทซีโรโทนินของหนู (rat serotonergic neuronal cell line, RN46A) ได้ (25) อีกทั้งยังพบว่าภาวะที่มีเอสโทรเจนต่ำลงนั้น จะมี activity ของ SERT เพิ่มมากขึ้นในบริเวณ hippocampus ของหนู (mouse) ด้วย ถึงแม้ว่าจะมีการลดลงของ SERT ก็ตาม (26) อย่างไรก็ตามมีบางการศึกษาที่ให้ผลขัดแย้งกัน โดยมีรายงานว่าในลิงที่ได้รับเอสโทรเจน จะมีการจับกับ SERT (SERT binding) และการดูดกลับซีโรโทนิน (SERT uptake) เพิ่มขึ้น (27) รวมถึงผลการศึกษาในหนู (rat) ด้วย (28) แต่ทั้งนี้จากงานวิจัยที่ผ่านมา ยังไม่ได้ศึกษาว่าความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR นั้นมีความเกี่ยวข้องด้วยหรือไม่ อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยจึงประสงค์จะศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR และฮอริโมนในกลุ่มสเตียรอยด์ เช่น เอสโทรเจน ที่มีต่อการแสดงออกของ serotonin transporter (SERT) รวมถึงการศึกษาความสัมพันธ์กับกลูโคคอร์ติคอยด์ในเซลล์ชนิดอื่นนอกเหนือจากที่ได้มีการศึกษามาแล้ว ด้วย เนื่องจากฮอริโมนเหล่านี้มักมีความจำเพาะต่อชนิดของเซลล์ โดยจะใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture model) ที่ซึ่งต้องมีการทดสอบเพื่อยืนยันก่อนว่า เซลล์ชนิดใดเหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวแทนของเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน serotonin transporter (positive) และเซลล์ชนิดใดเหมาะสมจะเป็นตัวแทนของเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน serotonin transporter (negative)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาการแสดงออกของยีน serotonin transporter, estrogen receptor, glucocorticoid receptor, bFGF receptor และ EGF receptor ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ เพื่อหาตัวแทนเซลล์ (model) ที่เหมาะสมมาใช้ในงานวิจัยต่อไป
2. เพื่อศึกษาบทบาทของความหลากหลายของยีนที่เกิดจากความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR ต่อการควบคุมการแสดงออกของ serotonin transporter ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสม
3. เพื่อศึกษาถึงบทบาทของฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์ เช่น เอสโตรเจน และ กลูโคคอร์ติคอยด์ ต่อความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR ในการควบคุมการแสดงออกของ serotonin transporter โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสม

ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้จะทำการทดลองเฉพาะในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture model) ที่มาจากมนุษย์ โดยจะใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากตัวแทนอาสาสมัครที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบจีโนไทป์ชนิด L/L กับ S/S อย่างละ 1 รายเท่านั้นจากประชากรไทยที่แข็งแรงและมีสุขภาพดี ข้อมูลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้จะนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้สถิติ t-test ซึ่งกำหนดค่า P-value น้อยกว่า 0.05 ในการตัดสินใจว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่

ข้อจำกัดของการวิจัย

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จะใช้การตรวจวัดการแสดงออกจากยีน luciferase reporter โดยวัด luciferase activity ซึ่งอาจมีความคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้ เพราะไม่ได้ครอบคลุมถึงวงจรของการควบคุม (gene regulation) ในร่างกายมนุษย์ เช่น กลไกการควบคุมย้อนกลับ (negative feedback) ทำให้ค่าที่วัดได้อาจมากกว่าความเป็นจริง แต่การจะตรวจสอบปริมาณของซีโรโทนินหรือ SERT ที่สร้างขึ้นจริงภายในเซลล์โดยที่มีกลไกการควบคุมย้อนกลับด้วยนั้น จำเป็นที่ต้องเกี่ยวข้องกับการใช้สารกัมมันตภาพรังสี จึงไม่สามารถที่จะทำได้ในห้องปฏิบัติการในขณะนี้ ทำให้เป็นข้อจำกัดของงานวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สร้างองค์ความรู้ใหม่ที่แสดงให้เห็นถึงบทบาทของความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR รวมถึงบทบาทของฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์ เช่น เอสโตรเจน และ กลูโคคอร์ติคอยด์ ที่มีต่อการควบคุมการแสดงออกของ serotonin transporter
2. เป็นงานวิจัยพื้นฐานเพื่อต่อยอดงานวิจัยในระดับที่สูงขึ้นในอนาคต เพื่อให้สามารถประยุกต์ใช้ข้อมูล ในการให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์แก่ประชาชนที่มีความหลากหลายของยีน serotonin transporter ได้ตระหนักและปฏิบัติตนให้เหมาะสมเพื่อนำไปสู่การมีสุขภาพดี
3. เป็นแนวทางในการพัฒนาการรักษาโรคที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับ serotonin transporter โดยการให้ฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์ เช่น เอสโตรเจน และ กลูโคคอร์ติคอยด์ รวมถึงสามารถให้คำแนะนำกับผู้ที่จะรักษาโดยวิธีการให้ฮอร์โมน (hormone therapy) ด้วยว่ามีความเหมาะสมหรือไม่ อย่างไร
4. ได้เซลล์เพาะเลี้ยงที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมมาใช้ในการศึกษา



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

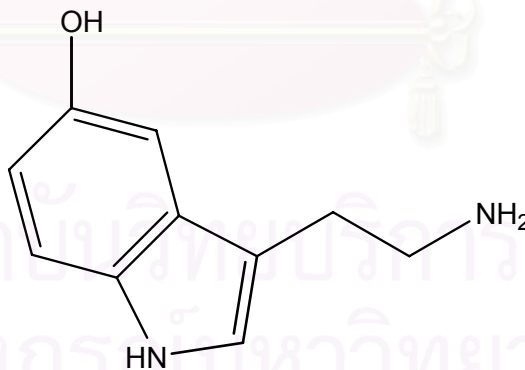
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติ โครงสร้างและเมแทบอลิซึมของซีโรโทนิน

ประวัติของการค้นพบสารซีโรโทนินนั้น เริ่มแรกพบเป็นสารที่ถูกให้ความสนใจว่ามีฤทธิ์เกี่ยวข้องกับทางระบบหัวใจและหลอดเลือด คือมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดหดตัว (vasoconstrictor) ในกระบวนการแข็งตัวของเลือดซึ่งสารนี้จะถูกหลั่งออกมาจากลิ่มเลือดเข้าสู่ซีรัม โดยในปี ค.ศ. 1930 Dr. Vittorio Erspamer สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้จาก acetone extract ของ rabbit gastric mucosa และตั้งชื่อสารนี้ว่า “enteramine” ต่อมาในปี ค.ศ.1940 Dr. Irving ก็สามารถสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดหดตัวนี้ได้จากซีรัมและตั้งชื่อสารว่า “ซีโรโทนิน (serotonin)” ซึ่งที่มาของการตั้งชื่อสารชนิดนี้ว่า “serotonin” นั้นมาจากคำว่า “serum” กับ “tone” หมายความว่า เป็นสารที่มีอยู่ในซีรัมและมีฤทธิ์ในการควบคุมจังหวะของหลอดเลือด (vascular tone) สามารถสกัดแยกซีโรโทนินมาทำให้บริสุทธิ์และตกผลึกได้ในปี ค.ศ. 1948 สำหรับโครงสร้างของซีโรโทนินนั้นได้ถูกรายงานไว้ในปี ค.ศ.1949 จนกระทั่งในปี ค.ศ.1952 จึงทราบว่า “enteramine” เป็นสารตัวเดียวกันกับ “ซีโรโทนิน (serotonin)”

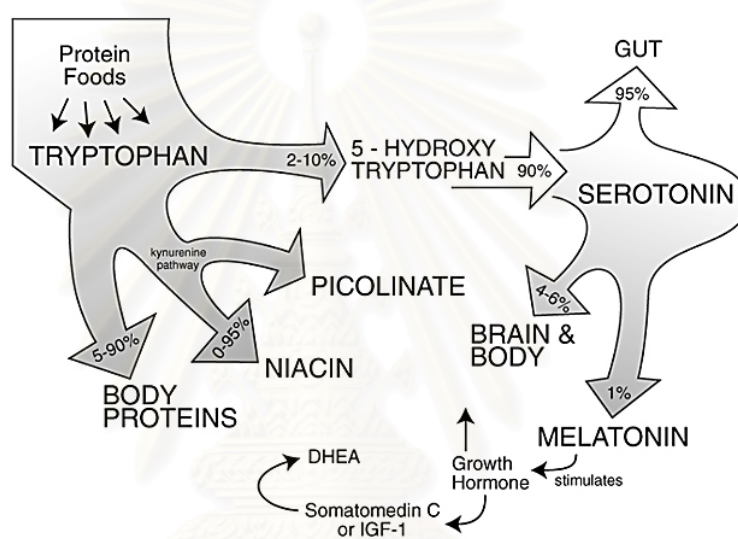
ซีโรโทนิน (serotonin) หรือ 5-hydroxytryptamine (5-HT) มีสูตรโมเลกุล $C_{10}H_{12}N_2O$ และมีสูตรโครงสร้างเป็นดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของซีโรโทนิน

ซีโรโทนินถูกสังเคราะห์มาจากกรดอะมิโนเพียงตัวเดียวคือ ทริปโตเฟน (L-tryptophan) ซึ่งได้มาจากการบริโภคอาหารเป็นหลัก โดยในกระบวนการนำทริปโตเฟนจากกระแสเลือดไปสู่สมองนั้น ต้องอาศัยกระบวนการ facilitated transport และ carrier เป็นตัวพา แต่ก็ยังมีกรด

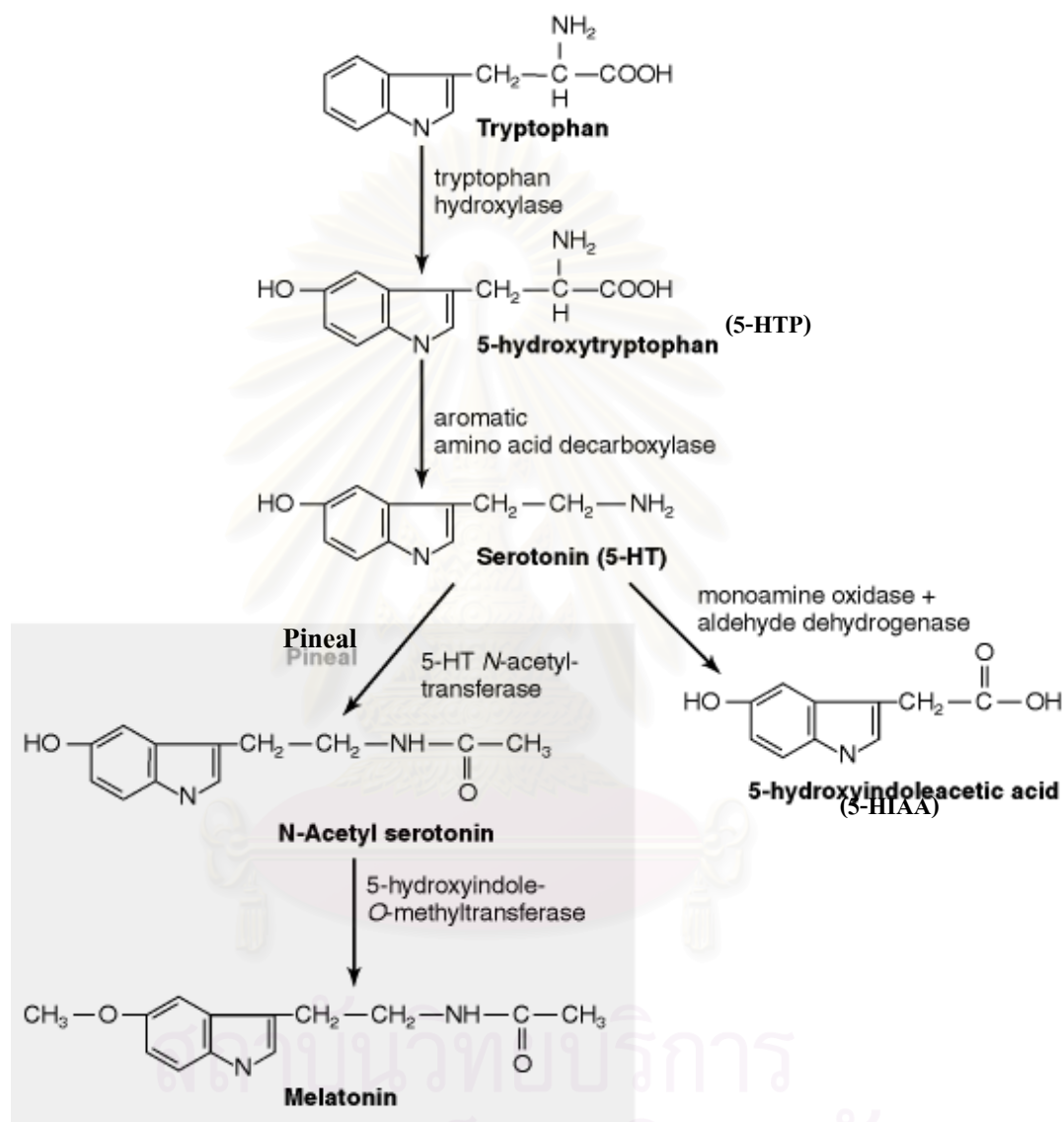
อะมิโนตัวอื่นๆ ที่สามารถถูกพาไปที่สมองได้โดยอาศัย carrier ตัวเดียวกันด้วย เช่น ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) วาลีน (valine) ไอโซลิวซีน (isoleucine) ลิวซีน (leucine) และ เมไทโอนีน (methionine) เป็นต้น ซึ่งในการขนส่งทริптоเฟนไปสู่สมองนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณทริптоเฟนในกระแสเลือดเพียงอย่างเดียว แต่มันยังสัมพันธ์กับปริมาณของกรดอะมิโนตัวอื่นๆ ด้วย เช่น หากร่างกายได้รับปริมาณทริптоเฟนจากอาหารน้อยลง ในขณะที่ได้รับกรดอะมิโนตัวอื่นมากกว่า จะทำให้เกิดการแข่งขันกันในการจับกับ carrier ส่งผลให้ปริมาณทริптоเฟนที่มาสู่สมองน้อยลงและทำให้มีการสร้างซีโรโทนินลดลงด้วย โดยในรูปที่ 2.2 นั้นจะแสดงถึงเมแทบอลิซึมของทริптоเฟน



รูปที่ 2.2 แสดงเมแทบอลิซึมของทริптоเฟน (tryptophan) ในร่างกาย
(<http://websites.golden-orb.com/nutrition/100311.php>)

ในกระบวนการสังเคราะห์และการสลายซีโรโทนินดังแสดงในรูปที่ 2.3 นั้น เริ่มจากการที่กรดอะมิโนทริптоเฟน (tryptophan) ถูกเปลี่ยนเป็น 5-hydroxytryptophan (5-HTP) ด้วยเอนไซม์ tryptophan hydroxylase ซึ่งขั้นตอนนี้ถือเป็นขั้นที่กำหนดอัตราเร็ว (rate-limiting step) ของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ซีโรโทนิน และต่อมา 5-HTP ก็จะถูกเอนไซม์ aromatic amino acid decarboxylase (AADC) เปลี่ยนให้เป็น 5-hydroxytryptamine (5-HT) หรือซีโรโทนิน จากนั้นซีโรโทนินที่สร้างขึ้นนี้อาจถูกนำไปเก็บสะสมไว้ในเซลล์ชนิดต่างๆ โดยเฉพาะที่เซลล์ enterochromaffin ในระบบทางเดินอาหาร หรืออาจถูกสลายไปอย่างรวดเร็วด้วยเอนไซม์ monoamine oxidase (MAO) และ aldehyde dehydrogenase ได้เป็นสารตัวกลางที่ชื่อว่า 5-hydroxyindoleacetaldehyde และถูกออกซิไดส์ต่อเป็น 5-hydroxyindoleacetic acid

(5-HIAA) ในที่สุด ซึ่งในภาวะที่มีการรับประทานอาหารปกตินั้นการตรวจวัดระดับของ 5-HIAA จะสามารถบ่งชี้ถึงปริมาณซีโรโทนินในร่างกายได้ นอกจากนี้ยังพบว่าซีโรโทนินเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในสร้างสารเมลาโทนิน (melatonin) ที่ต่อมไพเนียล (pineal gland) อีกด้วย



รูปที่ 2.3 แสดงขั้นตอนในการสังเคราะห์และการสลายซีโรโทนิน (1)

ซีโรโทนินเป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ในกลุ่ม monoamine ที่สร้างมาจากเซลล์ประสาทในระบบประสาทส่วนกลาง และจากเซลล์ enterochromaffin ในระบบทางเดินอาหารเป็นหลักซึ่งเป็นเซลล์ชนิดพิเศษอยู่ที่เยื่อบุผนังลำไส้ โดยทันทีที่เกิดการกระตุ้นเยื่อบุผนังลำไส้ไม่ว่าจะเป็นจากสาเหตุใดก็ตาม เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ดังกล่าวจะหลั่งซีโรโทนินออกมา ทำให้เกิดการบีบตัวของลำไส้อย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการสร้างซีโรโทนิน

ชั้นที่ต่อมไพลีลด้วย แต่มีในปริมาณที่น้อยซึ่งจะถูกเปลี่ยนให้เป็นเมลาโทนินเป็นส่วนใหญ่ โดยปกติแล้วในร่างกายมนุษย์เรานั้น จะมีซีโรโทนินอยู่ประมาณ 5-10 มิลลิกรัม และพบว่าประมาณร้อยละ 95 ของซีโรโทนินที่สร้างขึ้นในร่างกายจะอยู่ที่ระบบทางเดินอาหาร ซึ่งพบว่า 90 % จะอยู่ที่เซลล์ enterochromaffin ในทางเดินอาหาร (29) ที่เหลือส่วนใหญ่จะอยู่ในระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) และเกล็ดเลือด (platelet) ซึ่งในระบบประสาทส่วนกลางจะสามารถพบซีโรโทนินได้ที่บริเวณ raphe nuclei ของ brain stem ประกอบด้วยเซลล์ประสาทซีโรโทนิน (serotonergic neuron) ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง เก็บสะสม และหลั่งสารซีโรโทนินในการทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท นอกจากนี้ยังพบเซลล์ประสาทซีโรโทนินได้ที่ระบบประสาทของทางเดินอาหาร (enteric nervous system) ในชั้น submucosa และ myenteric plexus ในชั้น muscularis ของผนังท่อทางเดินอาหาร รวมถึงบริเวณหลอดเลือดรอบๆ ด้วย ดังนั้นจะเห็นได้ว่าซีโรโทนินมีทั้งส่วนที่อยู่ในเซลล์และในกระแสเลือด และไม่ใช่ว่าทุกเซลล์ที่มีซีโรโทนินอยู่นั้นจะต้องเป็นเซลล์ที่สร้างซีโรโทนินได้เสมอไป ตัวอย่างเช่นในเกล็ดเลือด โดยที่มันจะสะสมซีโรโทนินจากในพลาสมา (plasma) ผ่านกลไกการขนส่ง (active transport) ของตัวดูดกลับซีโรโทนินที่อยู่บนผนังเซลล์ (membrane) ของเกล็ดเลือด ทำให้สามารถที่จะวัดปริมาณของซีโรโทนินในเลือดจากพลาสมาชนิดที่มีเกล็ดเลือดมาก (platelet rich plasma) ได้ และในสัตว์จำพวกหนูที่ใช้ฟันกัดแทะ (rodents) สามารถพบซีโรโทนินได้ใน mast cells ด้วย (2)

2.2 ซีโรโทนินในธรรมชาติ

มีรายงานว่าซีโรโทนินยังสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ รวมถึงในพืชและสัตว์อีกหลายชนิด เช่น สัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (vertebrates) เพรียงหัวหอม (tunicates) หอย (mollusks) สัตว์พวกอาร์โทรพอด (arthropods) ที่รู้จักดีได้แก่ แมงมุม กุ้ง ปู เหล็กไนของตัวต่อ (wasp stings) พิษแมงป่อง (scorpion venom) และแมลงต่างๆ รวมถึงพวกปะการัง กัดบึงหา ดอกไม้ทะเล (29) ในผัก ผลไม้อีกหลายชนิด ได้แก่ อาหารและพืชสมุนไพรบางชนิดในประเทศอียิปต์ (30) สับปะรด กัญชง ลูกพลับ มะเขือเทศ กีวี และถั่วชนิดต่างๆ (31) โดยเฉพาะข้าว ข้าวเหนียวและข้าวโพด ซึ่งเป็นแหล่งหลักของสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต พบว่าจะมีปริมาณของทริปโตเฟนที่เป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารซีโรโทนินอยู่จำนวนมาก (32) ซึ่งการรับประทานอาหารประเภทที่มีคาร์โบไฮเดรตสูงนั้นจะกระตุ้นให้ตับอ่อนมีการหลั่งอินซูลินออกมามาก ทำให้ไปลดปริมาณของกรดอะมิโนตัวอื่น ที่สามารถถูกพาไปที่สมองได้โดยอาศัย carrier ตัวเดียวกันกับทริปโตเฟนลง เช่น ลิวซีน ไอโซลิวซีน และวาลีน ส่งผลให้ทริปโตเฟนสามารถเข้าสู่สมองได้มากขึ้นและถูกเปลี่ยนเป็นซีโรโทนินเพิ่มขึ้นด้วย (33) โดยจะทำให้เกิดอาการง่วงนอนหรือมีอาการมึนงงหลังจากรับประทานอาหารได้

2.3 ความสำคัญและบทบาทของซีโรโทนิน

ซีโรโทนินมีบทบาทหน้าที่สำคัญในหลายๆ ระบบของร่างกาย (2) แต่จะพบเด่นชัดที่สุดในระบบหัวใจและหลอดเลือด เกี่ยวข้องกับการหดตัวของผนังหลอดเลือด (vascular smooth muscle) ซึ่งเป็นสารสำคัญในการทำให้หลอดเลือดหดตัว (vasoconstriction) ยกเว้นที่บริเวณหัวใจและในกล้ามเนื้อลาย โดยซีโรโทนินจะมีบทบาทในการทำให้หลอดเลือดขยายตัวแทน (vasodilation) และช่วยให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) ในกระบวนการแข็งตัวของเลือดด้วย นอกจากนี้ซีโรโทนินก็ยังมีผลต่อระบบทางเดินหายใจในการกระตุ้น bronchiolar smooth muscle โดยตรงและช่วยในการหลั่ง acetylcholine จากปลายประสาทของ bronchial vagal nerve อีกทั้งซีโรโทนินยังมีบทบาทในการเพิ่มจำนวน (proliferation) (34) และกระตุ้นการทำงาน (activation) (35) ของเม็ดเลือดขาวชนิดทีเซลล์ (T cells) ในระบบภูมิคุ้มกัน และบทบาทในการควบคุมสรีรวิทยาของระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ ควบคุมการรับรู้ของอวัยวะภายใน (visceral sensation) (36, 37) การส่งต่อสัญญาณประสาท (brain-gut axis) (29) ควบคุมการหลั่งสาร (gastrointestinal fluid) ในทางเดินอาหาร การหดตัวของกล้ามเนื้อและการเคลื่อนไหวของลำไส้ในทางเดินอาหาร โดยจะช่วยให้เพิ่มจังหวะการบีบตัวของลำไส้ให้มีการบีบตัวอย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพ (29, 38) ที่สำคัญอย่างยิ่งซีโรโทนินยังมีผลต่อระบบประสาทในการควบคุมการแสดงออกของอารมณ์ และพฤติกรรมหลายอย่างด้วยเช่นกัน โดยเชื่อว่าซีโรโทนินนั้นมีความเกี่ยวข้องกับกลไกทางชีวเคมีของโรคทางจิตประสาท เช่น โรคซึมเศร้า (depression) โรคไบโพลาร์ (bipolar disorder) โรควิตกกังวล (anxiety disorder) โรคปวดศีรษะไมเกรน (migraine) เป็นต้น รวมถึงหน้าที่ในการควบคุมภาวะต่างๆ ได้แก่ อารมณ์ (mood) การนอนหลับ (sleep) ความอยากอาหาร (appetite) การควบคุมอุณหภูมิ (temperature regulation) ความเจ็บปวด (pain) และมีอิทธิพลต่อเรื่องของเพศ (sexuality) ด้วย ซึ่งจะกล่าวต่อไปในหัวข้อที่ 2.8

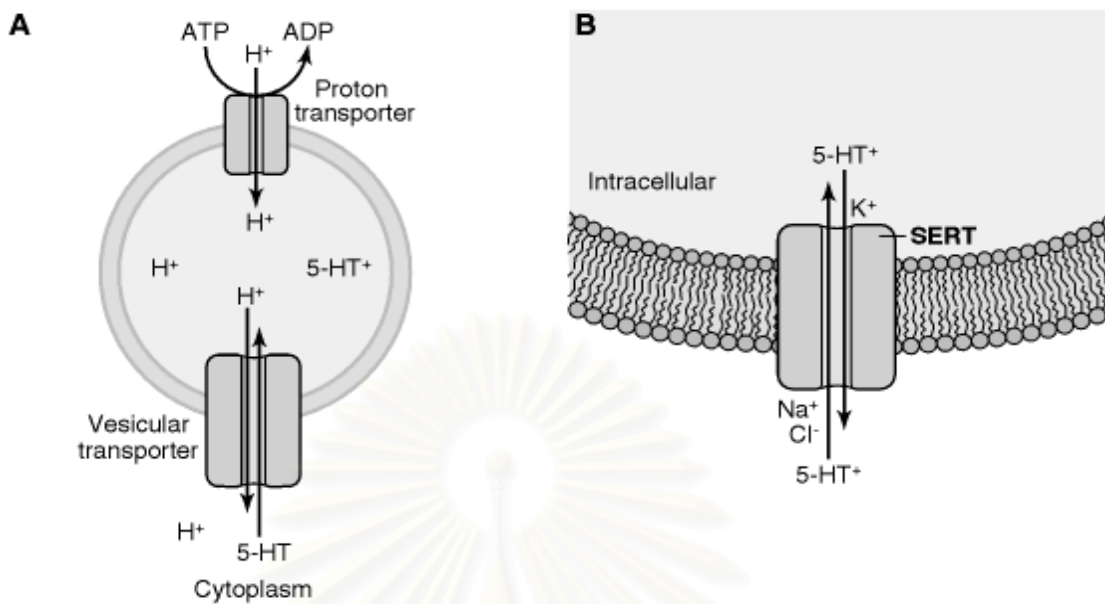
2.4 กลไกการออกฤทธิ์ของซีโรโทนิน (Serotonergic Pathway)

แหล่งหลักที่สร้างซีโรโทนินในร่างกาย คือ ระบบประสาทส่วนกลางและระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเซลล์ที่อยู่ในทั้งสองระบบนั้นจะเริ่มต้นกลไกการออกฤทธิ์ของซีโรโทนิน โดยซีโรโทนินที่สร้างขึ้นจะถูกนำไปเก็บสะสมไว้ในถุง (vesicle) ภายในเซลล์ก่อน ผ่านการทำหน้าที่ของตัวขนส่งบนผิวของถุง (vesicle-associated transporter, VAT) (2) ดังรูปที่ 2.4 (A) หลังจากนั้นจะถูกปล่อยออกมาจากปลายประสาทแอกซอน (axon) ของเซลล์ประสาท (presynaptic neuron) ด้วยกระบวนการขนส่งออกจากเซลล์ (exocytosis) เข้าสู่ช่องว่างไซแนปส์ (synaptic cleft) เพื่อไป

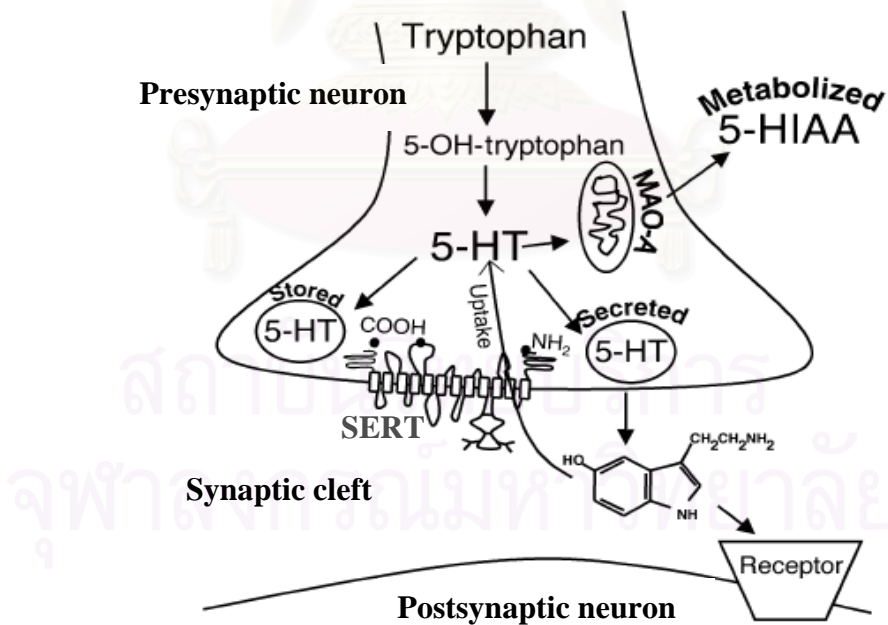
กระตุ้นตัวรับสัญญาณซีโรโทนิน (serotonin receptor) ที่อยู่บนปลายประสาทเดนไดรต์ (dendrite) ของเซลล์ประสาทที่อยู่ติดกัน (postsynaptic neuron) และจะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการต่างๆ ต่อไปดังแสดงในรูปที่ 2.5 ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของซีโรโทนินในระบบประสาทนั้นมีความสำคัญอย่างมาก เพราะมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมทั้งในเรื่องของอารมณ์ จิตใจ และพฤติกรรมต่างๆ สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของซีโรโทนินในระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากไม่มีเซลล์ประสาทขาเข้าปฐมภูมิ (primary afferent neurons) ของระบบประสาทของทางเดินอาหาร (enteric nervous system) แทรกผ่านชั้นเยื่อบุทางเดินอาหาร (epithelial cells) ไปปรับความรู้สึกจาก lumen ของทางเดินอาหารโดยตรง จึงจำเป็นต้องอาศัยเซลล์ enterochromaffin ที่ชั้นเยื่อบุทางเดินอาหารในการทำหน้าที่เป็นตัวแปลงสัญญาณ (sensory transducer) (39) ซึ่งเซลล์ enterochromaffin จะไวต่อการเปลี่ยนแปลงของความดันภายในลำไส้ (intraluminal pressure) และสารเคมีต่างๆ ที่มากระตุ้น (chemical stimuli) และจะตอบสนองต่อภาวะเหล่านั้น โดยการหลั่งสารซีโรโทนินออกมาเพื่อไปกระตุ้นตัวรับสัญญาณซีโรโทนิน (serotonin receptor) ชนิดต่างๆ (39-41) ที่อยู่บนแขนงประสาทของเซลล์ประสาทขาเข้าปฐมภูมิทั้งภายในและภายนอก (intrinsic and extrinsic primary afferent neurons) ให้เกิดกระบวนการต่างๆ ในการควบคุมสรีรวิทยาและการทำงานของทางเดินอาหารต่อไป (42)

ตัวรับสัญญาณซีโรโทนิน (serotonin receptor) สามารถแบ่งเป็น 7 ชนิดหลัก ได้แก่ ชนิดที่ 1 (5-HT₁) ถึงชนิดที่ 7 (5-HT₇) และแต่ละชนิดยังแบ่งออกได้เป็นหลายชนิดย่อย เช่น ชนิดย่อย 1A (5-HT_{1A}) ชนิดย่อย 1B (5-HT_{1B}) เป็นต้น ซึ่งจะแตกต่างกันตามพื้นฐานของโครงสร้าง หน้าที่ และกลไกการทำงานของตัวรับสัญญาณ (1, 29)

อย่างไรก็ตาม กลไกการออกฤทธิ์ของซีโรโทนินจะถูกยับยั้งหรือทำให้สิ้นสุดลง โดยการนำซีโรโทนินกลับเข้าสู่เซลล์ ทั้งเซลล์ประสาทจากระบบประสาทส่วนกลาง และเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารในระบบทางเดินอาหาร (43) ผ่านการทำงานของตัวดูดกลับซีโรโทนิน (serotonin transporter, 5-HTT, SERT) ดังรูปที่ 2.4 (B) ที่อยู่บนผิวของเซลล์เหล่านี้ ซึ่งกลไกการดูดกลับซีโรโทนินนั้นเพื่อเป็นการรักษาสมดุล โดยป้องกันไม่ให้อัตราซีโรโทนินมากเกินไปจนไปกระตุ้นตัวรับสัญญาณเพิ่มมากขึ้น (overstimulation) หรืออาจเป็นพิษต่ออวัยวะอื่นๆ ได้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าทั้งจำนวนและการทำหน้าที่ของตัวดูดกลับซีโรโทนินเหล่านี้ จะเป็นตัวกำหนดระยะเวลาของการที่สัญญาณซีโรโทนินจะคงอยู่ในช่องว่างไซแนปส์



รูปที่ 2.4 แสดงการขนส่งสารซีโรโทนิน (A) ผ่านตัวขนส่งบนผิวของถุง (vesicle-associated transporter, VAT) และ (B) ผ่านตัวดูดกลับซีโรโทนิน (serotonin transporter, SERT) (1)



รูปที่ 2.5 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของซีโรโทนิน (Serotonergic Pathway) ตั้งแต่การสร้าง การเก็บสะสม การนำกลับ และการสลายซีโรโทนิน (44)

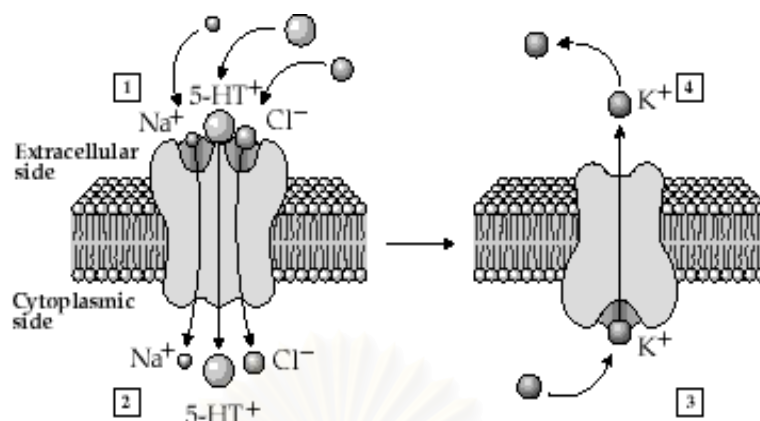
2.5 ตัวดูดกลับซีโรโทนิน (Serotonin Transporter)

ตัวดูดกลับซีโรโทนิน (Serotonin Transporter, 5-HTT, SERT) เป็นโปรตีนขนส่งที่มีความจำเพาะสูงมาก (specific transporter protein) มีลักษณะเป็น channel-like ชนิดที่ต้องอาศัยโซเดียมไอออนและคลอไรด์ไอออนในการทำงาน ($\text{Na}^+ / \text{Cl}^-$ dependent transporter) จัดอยู่ในตระกูล (family) เดียวกันกับตัวขนส่งสาร monoamine อื่นๆ รวมถึงตัวขนส่งนอร์เอพิเนฟริน (norepinephrine) และโดปามีน (dopamine) ประกอบด้วย 12 hydrophobic transmembrane (TM) domains ดังรูปที่ 2.6 และมี single binding site อยู่ภายนอกเซลล์ (Extracellular surface)



รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะ 12 hydrophobic transmembrane (TM) domains ของตัวดูดกลับซีโรโทนิน (<http://intramural.nimh.nih.gov/lcs/research.html>)

กลไกการทำงานของตัวดูดกลับซีโรโทนิน เริ่มต้นโดยการจับกับโซเดียมไอออน (1Na^+) และคลอไรด์ไอออน (1Cl^-) และซีโรโทนิน ซึ่งอยู่ในสภาพที่มีประจุเป็นบวกพร้อมๆ กัน จากนั้นจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ส่งผลให้ binding site ของบริเวณด้านนอก (extracellular surface) ปิด และเปิดที่บริเวณด้านใน (cytoplasmic surface) ของผนังเซลล์แทน ทำให้ซีโรโทนินสามารถเคลื่อนที่ผ่านเข้ามาในเซลล์ได้ หลังจากนั้นทั้งหมดก็จะแยกตัวออกจาก binding site และจะมีโพแทสเซียมไอออน (K^+) เข้ามาจับที่ binding site แทน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างกลับไปเป็นแบบเดิม คือสร้างเป็น binding site พร้อมที่จะรับซีโรโทนินเข้ามาใหม่ได้ ดังรูปที่ 2.7 กลไกการขนส่งซีโรโทนินเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับการรักษาระดับของ ion gradient ที่ผ่านเข้าออกผนังเซลล์ ซึ่งอาศัยการทำงานของ $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase (3)



รูปที่ 2.7 แสดงกลไกการทำงานของตัวดูดกลับซีโรโทนิน

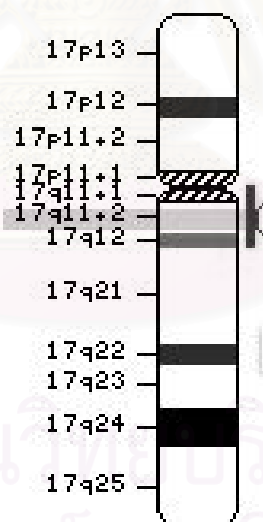
(<http://www.chemistry.emory.edu/justice/seminar/5ht2.htm>)

ส่วนใหญ่แล้วบริเวณที่มีการแสดงออกของตัวดูดกลับซีโรโทนิน (SERT) ในร่างกายนั้นจะอยู่ในส่วนของลำไส้กับสมองเช่นเซลล์ประสาทและเซลล์ enterochromaffin แต่เนื่องจากซีโรโทนินเป็นสารที่มีบทบาทในหลายระบบของร่างกาย ซึ่งก็มีรายงานพบว่าการแสดงออกของ SERT ที่เซลล์ หรืออวัยวะอื่นๆ ในร่างกายด้วย ได้แก่ เซลล์รก (placenta) (45-49) เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น lymphocyte (50) และ macrophage (51) เซลล์เนื้อเยื่อกระดูก เช่น osteoclast (52) osteoblast หรือ osteocyte (53-55) เซลล์ในระบบหัวใจและหลอดเลือด เช่น หัวใจ (heart) หลอดเลือด (blood vessel) (44) เกล็ดเลือด (platelet) (56, 57) และต่อมหมวกไต (adrenal gland) (58) เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังคงไม่ทราบว่าเซลล์ต่างๆ ที่นอกเหนือจากลำไส้และสมองเหล่านั้นนั้น จะทำหน้าที่สร้างสารซีโรโทนินด้วยหรือไม่ ซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไป

2.6 Human Serotonin Transporter Gene (SLC6A4)

ในมนุษย์ตัวดูดกลับซีโรโทนิน (SERT) ถูกสร้างมาจากยีน human serotonin transporter (hSERT gene) หรือที่เรียกว่า SLC6A4 (Solute Carrier Family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4) ซึ่งเป็นสัญลักษณ์ของยีนที่เป็นที่ยอมรับกันทั่วไป ยีน hSERT นั้นตั้งอยู่บนตำแหน่ง SLC6A4 locus โดยถูกบันทึกอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 17 (17q11.1 – 17q12) (4) ดังแสดงในรูปที่ 2.8 ยีนนี้มีความยาวทั้งหมดประมาณ 37.8 กิโลเบส (kilo base pairs, kb) ประกอบด้วย 14 exons (3, 59) ถอดรหัสได้เป็นโปรตีนจำนวนกรดอะมิโน 630 ตัว โดยจะมีความหลากหลายของอาร์เอ็นเอขนส่ง (messenger RNA, mRNA) ที่เกิดจากการ alternative splicing ระหว่าง exon 1A, 1B และ 1C รวมถึงตรงตำแหน่ง polyadenylation site ของยีนด้วย

ทำให้อาร์เอ็นเอขนส่งที่ได้แตกต่างกันไปตามชนิดของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะเพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนในแต่ละชนิดเซลล์ (3) ที่ผ่านมามีการศึกษาโดยการโคลนยีน SERT ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ได้แก่ human SERT (hSERT) (4, 5) rat SERT (rSERT) (6, 7) และ mice SERT (mSERT) (8) แม้ว่าการศึกษาลำดับเบสและการโคลนยีน hSERT หรือ SLC6A4 นั้น เกิดขึ้นมาเมื่อประมาณ 10 ปีที่แล้ว อย่างไรก็ตามเพิ่งจะเริ่มมีการศึกษา SERT homologs ในสิ่งมีชีวิตกว่า 10 สายพันธุ์ (species) มาเมื่อไม่นานนี้เอง โดยการศึกษาเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SERT ในสิ่งมีชีวิตหลายๆ สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ได้แก่ พวก non-human primates สัตว์ที่ใช้ฟันกัดแทะ (rodents) หนู (C.elegans) แมลง (Drosophila) และรวมถึงในพวกโปรคาริโอต (prokaryotes) ด้วย จะพบว่าส่วนของลำดับกรดอะมิโนที่มีการอนุรักษ์ไว้นั้น มีความคล้ายคลึงกันอยู่พอสมควร (>90 %) ในระหว่างของมนุษย์ (hSERT) กับสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrates) เมื่อเทียบกับในหนูและแมลงที่มีความแตกต่างกันมากกว่า (44-53 %)



รูปที่ 2.8 แสดงตำแหน่งของ SLC6A4 locus บนโครโมโซมคู่ที่ 17

(<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/2004/Cobain/angergene.html>)

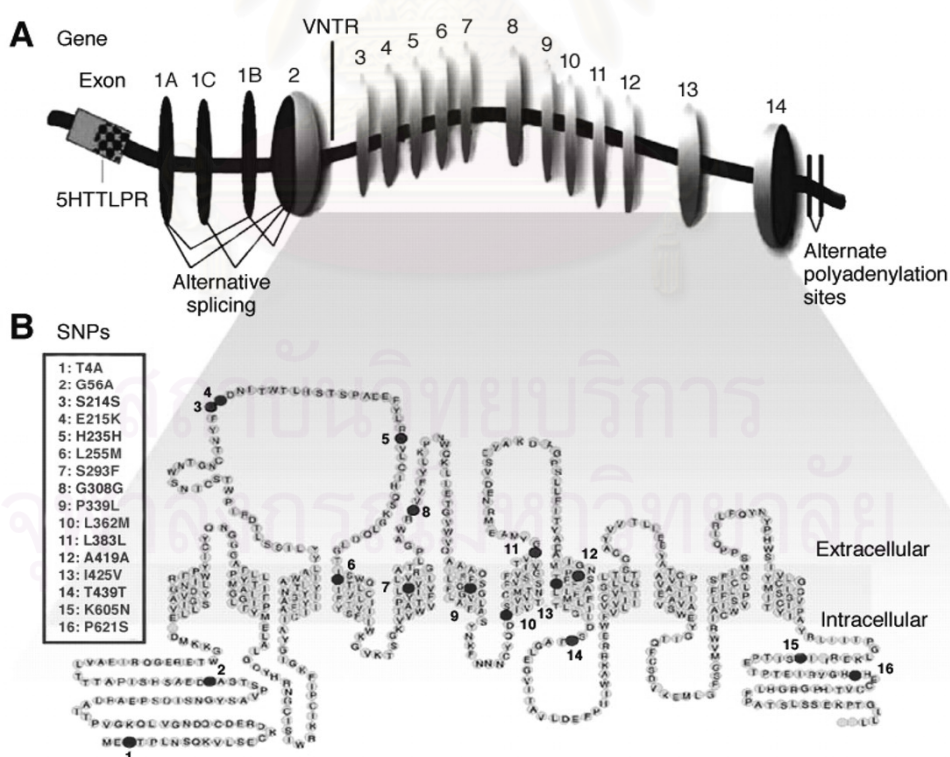
ตารางที่ 2.1 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน (sequence homology) ของตัวดูดกลับซีโรโทนิน (serotonin transporter proteins) ในสิ่งมีชีวิตหลายสายพันธุ์ กับมนุษย์ (human SERT) (3)

Species	Homology
Human	98 %
Rhesus Mongey	93 %
Cow	93 %
Sheep	90 %
Guinea pig	91 %
Rat	91 %
Mouse	91 %
Drosophila	51 %
Tobacco Hawkmoth	53 %
C. elegans	44 %
S. thermophilum	21 %

กลไกการออกฤทธิ์ของซีโรโทนิน มีความสำคัญมากในการทำงานของหลายระบบของร่างกาย โดยเฉพาะในระบบประสาททั้งระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) และระบบประสาทส่วนปลาย (PNS) เกี่ยวข้องกับการควบคุมอารมณ์ จิตใจ และพฤติกรรมต่างๆ ซึ่งตัวดูดกลับซีโรโทนิน (SERT) นั้นถือว่ามีบทบาทอย่างยิ่งในการควบคุมกลไกเหล่านี้ ดังนั้นจึงทำให้นักวิจัยหลายท่านเริ่มมีความสนใจที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SERT กับความผิดปกติทางอารมณ์และจิตใจ โดยในขณะนี้หลายการศึกษาที่แสดงให้เห็นแล้วว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างยีน SERT กับการเกิดโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคที่มีความผิดปกติทางด้านจิตประสาท (neuropsychiatric disease) จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Polymorphisms) ของยีน SERT ที่ผ่านมาพบว่ามีความหลากหลายของยีนเกิดขึ้นมากมาย ทั้งที่เกิดขึ้นในส่วนของยีน ไม่ว่าจะเป็น exon (coding region) หรือ intron หรือแม้กระทั่งในส่วนของ noncoding region ที่เป็น 5' และ 3' untranslated region (UTR) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของ regulatory domains (promoter) ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (transcriptional activity) ความหลากหลายในส่วนของ promoter นี้ จะมีลักษณะเป็นท่อนดีเอ็นเอลำดับเบสซ้ำ (repetitive elements) ที่อยู่ทาง 5' flanking region ห่างจากจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส (transcription start site) เหนือขึ้นไปประมาณ 1.4 กิโลเบส ก่อให้เกิดความยาวที่แตกต่างกันถึง 44 คู่เบส (base pairs, bp) ถือเป็นความหลากหลายทาง

พันธุกรรมของยีนที่เกิดจากการ Insertion และ Deletion และเรียกความหลากหลายชนิดนี้ว่า 5-HTT gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) ซึ่งเป็นความหลากหลายที่พบและมีการศึกษากันมากที่สุด นอกจากนี้ยังมีความหลากหลายของยีนเกิดขึ้นที่ตำแหน่งอื่นๆ อีก ดังแสดงในรูปที่ 2.9 ได้แก่

- ความหลากหลายชนิด ~380 kb deletion [del(17)(q11.2)] ที่บริเวณระหว่าง 5-HTTLPR กับจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส (transcription start site)
- ความหลากหลายชนิด Variable number of tandem repeat (VNTR) ในบริเวณ Intron 2 ประกอบด้วยจำนวนซ้ำตั้งแต่ 9, 10, 12 ซ้ำ ของหน่วยซ้ำ 16-17 คู่เบส เรียกความหลากหลายชนิดนี้ว่า 5-HTTVNTR
- ความหลากหลายชนิด G to T transversion บนตำแหน่งที่มีการ adenylation ในบริเวณ 3' untranslated region (UTR)
- ความหลากหลายชนิดที่มีการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงตัวเดียว (single nucleotide polymorphisms, SNPs) บนตำแหน่งต่างๆ ของยีนเช่น T4A, G56A, E215K, L225M, I425V, P621S เป็นต้น



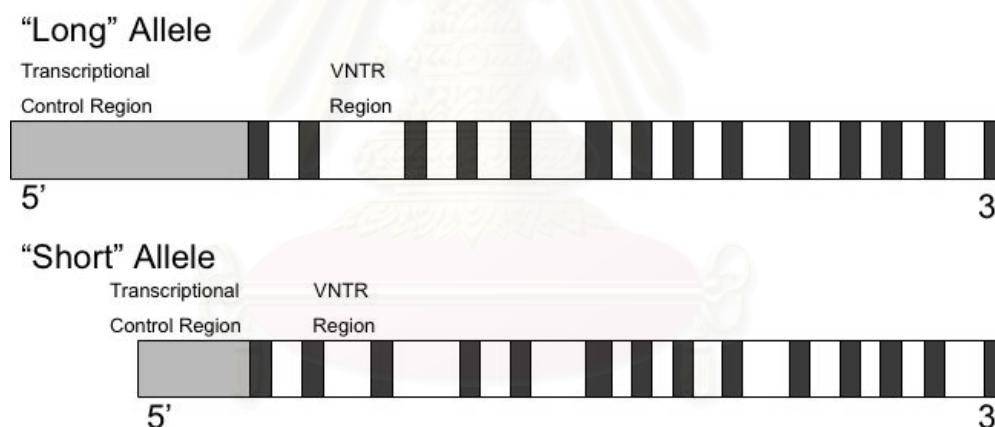
รูปที่ 2.9 แสดงตำแหน่งต่างๆ ของความหลากหลายของยีน hSERT (SLC6A4) ทั้งในส่วนของ coding และ noncoding region (3)

2.7 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTT gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) จะมีลักษณะเป็นท่อนดีเอ็นเอลำดับเบสซ้ำ (repetitive elements) ที่อยู่ทาง 5' flanking region ห่างจากจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส (transcription start site) เหนือขึ้นไป ประมาณ 1.4 กิโลเบส ในส่วนของ regulatory domains (promoter) ที่ควบคุมการแสดงออกของ ยีน (transcriptional activity) ซึ่งถือเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่เกิดจากการ Insertion และ Deletion ที่มีจำนวนชุดของการซ้ำ (repeat elements) แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปแบบ ที่ 2.10 โดยสามารถแบ่งชนิดของ 5-HTTLPR ออกได้เป็น 3 แบบ (3) คือ

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

โดยในแต่ละชุด (repeat elements) นั้นจะมีประมาณ 20-23 คู่เบส



รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR แบบ L และ S อัลลีล
(<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/2004/Cobain/angergene.html>)

ถึงแม้ว่าโปรตีน SERT ซึ่งสร้างได้จากยีนที่มีชนิดอัลลีลของ 5-HTTLPR คนละแบบนั้น จะมีลักษณะเหมือนกัน แต่เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมชนิดนี้พบอยู่ในส่วนที่ทำหน้าที่ ควบคุมการแสดงออกของยีน (promoter) ซึ่งอาจมีผลต่อปริมาณของโปรตีนที่สร้างได้แตกต่างกัน จากการศึกษาวิจัยว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนชนิด 5-HTTLPR สามารถนำไปสู่ การแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันได้ (9, 10) โดยที่ “Short” หรือ “S” อัลลีลจะทำให้การ แสดงออกของยีน (transcriptional activity) ลดลง ในขณะที่ “Long” หรือ “L” อัลลีลจะทำให้การ

แสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นในเซลล์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เซลล์รก (human placental choriocarcinoma cell line, JAR) (9) เซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphoblast cell line) (11) และเซลล์ประสาทของหนู (immortalized serotonergic raphe neurons, RN46A) (12) ซึ่งจากการศึกษาด้วยเทคนิค Reporter gene assay พบว่า basal activity ของ L อัลลีลนั้นสูงกว่าของ S อัลลีลอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบความแตกต่างในเซลล์จากไตของลิง (kidney monkey cell line, COS-1) ซึ่งไม่มีการแสดงออกของ SERT (12) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกิดขึ้น ยังอาจนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของระดับอาร์เอ็นเอขนส่ง (mRNA) และโปรตีน SERT ได้ด้วย จากการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงจากตัวแทนของแต่ละจีโนไทป์ พบว่าในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงจากตัวแทนของจีโนไทป์ชนิด L/L จะมีระดับอาร์เอ็นเอขนส่ง SERT เพิ่มขึ้นเป็น 1.4 ถึง 1.7 เท่า และมีการนำกลับของซีโรโทนิน (5-HT uptake) ได้มากกว่า 1.9 ถึง 2.2 เท่าเมื่อเทียบกับจีโนไทป์ชนิด S/L และ S/S (11) ซึ่งสอดคล้องกับที่เคยมีรายงานไว้ในเซลล์เกล็ดเลือด (57) กับเนื้อเยื่อสมอง (60) ด้วย จะเห็นได้ว่าผลการศึกษานี้สนับสนุนความเป็น dominant ของ S อัลลีล เนื่องจากการแสดงออกของยีน SERT และการนำกลับของซีโรโทนินไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเซลล์ที่มีจีโนไทป์ชนิด S/L และ S/S แต่ทั้งสองจีโนไทป์จะมีการลดลงของการแสดงออกของยีน SERT และการนำกลับของซีโรโทนินอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับจีโนไทป์ชนิด L/L (11, 57, 60)

อย่างไรก็ตาม เมื่อศึกษาถึงการกระจายของจีโนไทป์และความถี่อัลลีลในประชากรทั่วไปแล้ว พบว่ามีการกระจายแตกต่างกันไปในแต่ละเชื้อชาติ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.2 จะเห็นได้ว่า S อัลลีลนั้นจะพบมากในเชื้อชาติเอเชีย (Asian) ตรงข้ามกับในกลุ่มคนผิวขาวในประเทศแถบยุโรป รวมถึงอเมริกา (Caucasian, European, American) ซึ่งจะพบ L อัลลีลได้มากกว่า นอกจากนี้ยังอาจพบ XL อัลลีลได้เฉพาะในบางกลุ่ม เช่น ในกลุ่มประเทศแอฟริกา ประเทศญี่ปุ่น รวมถึงเชื้อชาติไทยด้วย ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมของ 5-HTTLPR ที่มีความแตกต่างกันไปในแต่ละเชื้อชาติเหล่านี้ อาจสามารถส่งผลให้เกิดความหลากหลายของอาการทางคลินิกของโรคหรือความผิดปกติต่างๆ รวมถึงความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่แตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาตินั้นๆ ได้

ตารางที่ 2.2 แสดงการศึกษาถึงการกระจายของจีโนไทป์และความถี่อัลลีลในเชื้อชาติต่างๆ

อ้างอิง	การศึกษา	เชื้อชาติ	ความถี่จีโนไทป์ (%)			ความถี่อัลลีล (%)		
			S/S	S/L	L/L	S	L	XL
(61)	เมธินี ต้นนุกิจ (2548)	Thai				62.5	34.4	3.1
(62)	Nakamura และคณะ (1997)	Japanese	68.5	29.6	2.0	83.3	16.7	0
(63)	Ohara และคณะ (1998)	Japanese	56.4	36.3	7.3	74.5	25.5	0
(64)	Kumakiri และคณะ (1999)	Japanese				78.5	21.5	0
(65)	Katsuragi และคณะ (1999)	Japanese	65.0	31.0	4.0	81.0	19.0	0
(66)	Narita และคณะ (2001)	Japanese				86.1	13.5	0.4
(67)	Umekage และคณะ (2003)	Japanese				80.0	20.0	0
(68)	Narita และคณะ (2003)	Japanese				88.0	12.0	0
(69)	Tsai และคณะ (2000)	Chinese	57.0	29.0	14.0	71.0	29.0	0
(70)	You และคณะ (2005)	Chinese				71.0	29.0	0
(71)	Li และคณะ (2006)	Chinese	57.3	35.4	7.3			
(72)	Lee และคณะ (2004)	Korean	57.1	37.5	5.4			
(73)	Lee และคณะ (2005)	Korean	65.0	31.0	4.0	81.0	19.0	0
(74)	Kim และคณะ (2005)	Korean	62.6	34.5	2.9	79.8	20.2	0
(75)	Kim และคณะ (2006)	Korean	62.1	33.5	4.4	78.9	21.1	0
(76)	Park และคณะ (2006)	Korean	62.5	31.8	5.7			
(77)	Pata และคณะ (2002)	Turkish	39.5	37.0	23.5			
(78)	Meira-Lima และคณะ (2005)	Brazilian				45.6	54.4	0
(79)	Ospina-Duque และคณะ (2000)	Colombian	26.0	54.0	20.0	53.0	47.0	0
(15)	Hauser และคณะ (2003)	Polish	16.4	46.0	37.6	39.4	60.6	0
(80)	Samochowiec และคณะ (2004)	Polish	10.0	48.0	42.0	35.0	65.0	0
(81)	Hranilovic และคณะ (2003)	Croatian/Slavic	16.0	49.0	35.0	40.0	60.0	0
(20)	Gaysina และคณะ (2006)	Russian/Slavic	25.0	49.0	27.0	49.0	51.0	0
(82)	Furlong และคณะ (1998)	Caucasian	17.2	47.9	34.9	41.1	58.9	0
(83)	Haberstick และคณะ (2006)	Caucasian	19.9	49.2	30.4	44.6	55.4	0
(16)	Gonda และคณะ (2005)	Caucasian				41.4	58.6	0
(84)	Stober และคณะ (1998)	German	18.0	48.0	34.0	42.0	58.0	0
(85)	Lang และคณะ (2004)	German	18.0	44.7	37.3	40.4	59.6	0
(86)	Marziniak และคณะ (2005)	German	18.3	48.7	39.0	42.6	57.4	0
(87)	Bellivier และคณะ (1998)	French	22.5	48.0	29.4	41.4	58.6	0

อ้างอิง	การศึกษาศึกษา	เชื้อชาติ	ความถี่ในไทย (%)			ความถี่อัลดีล (%)		
			S/S	S/L	L/L	S	L	XL
(88)	Chabane และคณะ (2004)	French	15.3	52.0	32.7	41.0	59.0	0
(89)	Denys และคณะ (2006)	Netherland	19.4	44.8	35.8	42.0	58.0	0
(90)	Rodonto และคณะ (2002)	Italian	19.0	48.0	33.0	43.0	57.0	0
(91)	Serretti และคณะ (2002)	Italian	16.4	47.5	36.1	40.2	59.8	0
(18)	Di Bella และคณะ (2002)	Italian	13.1	49.2	37.7	37.7	62.3	0
(92)	Cavallini และคณะ (2002)	Italian	15.2	52.7	32.1	43.3	56.7	0
(93)	Gutierrez และคณะ (1998)	Spanish				42.8	57.3	0
(94)	Baca-Garcia และคณะ (2002)	Spanish				68.0	32.0	0
(95)	Cervilla และคณะ (2006)	Spanish	21.0	52.0	27.0	47.2	52.8	0
(11)	Lesch และคณะ (1996)	American	19.0	49.0	32.0	43.0	57.0	0
(96)	Gelernter และคณะ (1998)	African American				26.0	66.0	8.0
		European American				47.0	53.0	0
(97)	Nellisery และคณะ (2003)	European /African American				39.8	60.2	0
(98)	Collier และคณะ (1996)	European	20.7	47.7	31.6	44.5	55.5	0
		Italian	15.8	54.7	29.5	43.2	56.8	0
		German	16.6	47.5	35.9	40.4	59.6	0
(99)	Hoehle และคณะ (1998)	West European	17.1	49.1	33.8	41.6	58.4	0
(100)	Courtet และคณะ (2001)	West European	16.0	53.0	31.0	42.0	58.0	0
(101)	Courtet และคณะ (2003)	West European	16.0	53.0	31.0	42.0	58.0	0
(102)	Mendlewicz และคณะ (2004)	European	19.6	47.1	33.0			

2.8 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับโรคและความผิดปกติต่างๆ

เนื่องจากซีโรโทนินเป็นสารสื่อประสาทที่สำคัญ และมีบทบาทอย่างมากต่อการทำงานของระบบต่างๆ ในร่างกายมนุษย์ ทำให้ที่ผ่านมามีงานวิจัยมากมายพยายามที่จะศึกษาถึงบทบาทของซีโรโทนินกับพยาธิสรีรวิทยาของโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคหรือความผิดปกติของการทำงานในระบบประสาทและระบบทางเดินอาหาร ซึ่งทั้งสองระบบนี้เป็นแหล่งที่อยู่หลักๆ ของเซลล์ที่สร้างซีโรโทนินในร่างกาย อย่างไรก็ตามฤทธิ์ของซีโรโทนินสามารถถูกควบคุมและทำให้สิ้นสุดได้ผ่านการทำงานของตัวดูดกลับซีโรโทนิน (serotonin transporter, SERT) ที่มักเป็นเป้าหมายสำคัญของยา SSRIs (selective serotonin reuptake inhibitors) ในการรักษาโรค หากเกิดความผิดปกติในการทำหน้าที่ของตัวดูดกลับซีโรโทนินแล้ว อาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งในระดับและปริมาณของ ซีโรโทนินแล้ว สามารถนำไปสู่การเกิดโรคหรือการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ตามมาได้ พันธุกรรมอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ทำให้จนถึงปัจจุบันนี้ไม่มีรายงานการศึกษา มากมายที่กล่าวถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ว่ามีความสัมพันธ์กับโรคหรือความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับทางด้านจิตประสาทและระบบทางเดินอาหารต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของการเป็นสาเหตุโดยตรงของการเกิดโรค หรือเป็นเพียงปัจจัยเสริมของโรคนั้นก็ตามที่ ซึ่งต่อไปนี่จะเป็นตัวอย่างของการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับโรคและความผิดปกติต่างๆ โดยเฉพาะทางด้านจิตประสาทและระบบลำไส้

2.8.1 การศึกษา 5-HTTLPR กับแบบแผนลักษณะทางบุคลิกภาพ (personality traits)

บุคลิกภาพ (personality) หมายถึง แบบแผนหรือลักษณะจำเพาะของแต่ละบุคคล โดยเป็นผลรวมของความรู้สึกนึกคิด การรับรู้ และพฤติกรรมแสดงออกของบุคคลนั้นที่เป็นไปในชีวิต ประจำวันปกติ personality traits จึงเป็นแบบแผนบุคลิกภาพของแต่ละบุคคล ซึ่งอาจเด่นออกมาในแต่ละด้านไม่เท่ากันและไม่ถือว่าเป็นความผิดปกติด้วย (103) สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ประเภทหลักๆ ซึ่งประเภทพื้นฐานที่สำคัญคือ Neuroticism โดยลักษณะบุคลิกภาพของ Neuroticism เช่น ความวิตกกังวล (anxiety) อากาการซึมเศร้า (depression) ความโกรธ (angry) เป็นต้น อย่างไรก็ตามโรคหรือความผิดปกติในทางจิตเวชนั้น บางครั้งไม่สามารถแยกจากภาวะปกติได้ชัดเจนเนื่องจากอาการที่เกิดขึ้นเป็นการเบี่ยงเบนทางอารมณ์ ความคิด และพฤติกรรม ซึ่งอาจพบได้เป็นครั้งคราวในผู้ที่ปกติ โดยการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับแบบแผนลักษณะทางบุคลิกภาพนั้นได้สรุปไว้ในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สรุปการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับแบบแผนลักษณะทางบุคลิกภาพ

การศึกษ	ภาวะที่ศึกษา	เชื้อชาติ	ผลการศึกษา
Lesch และคณะ (1996)	Neuroticism (anxiety) – related traits	European American African American Hispanic และอื่นๆ	NEO Neuroticism และลักษณะวิตกกังวล รวมถึง Harm Avoidance มีความสัมพันธ์อย่างมากกับจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR ชนิด S/S ($p=0.002$)
Ebstein และคณะ (1997)	Neuroticism	Israel	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Nakamura และคณะ (1997)	Anxiety – related traits	Japanese	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Ball และคณะ (1997)	Neuroticism	-	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Mazzanti และคณะ (1998)	Anxiety – related traits	Finns	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Jorm และคณะ (1998)	Neuroticism	Caucasian (Australian)	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Ricketts และคณะ (1998)	Neuroticism	-	S อัลลีลมีความสัมพันธ์กับ Harm Avoidance
Gelemtner และคณะ (1998)	Personality traits	European American African American	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR กับ personality measures
Gustavsson และคณะ (1999)	Neuroticism	Swedish	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR กับ KSP scales (Neuroticism)
Deary และคณะ (1999)	Neuroticism	-	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Katsuragi และคณะ (1999)	Anxiety – related traits	Japanese	ผู้ที่มีจีโนไทป์ชนิด S/S หรือ S อัลลีลจะมี Harm Avoidance scores สูงกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดอื่นๆ
Kumakiri และคณะ (1999)	Anxiety – related traits	Japanese	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Murakami และคณะ (1999)	Anxiety – related traits	Japanese	ผู้ที่มีจีโนไทป์ชนิด S/S จะมี anxiety scores สูงกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ชนิดอื่นๆ
Flory และคณะ (1999)	Neuroticism	Caucasian	ผู้ที่มี S อัลลีลไม่พบว่ามีสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ NEO Neuroticism แต่สัมพันธ์กับการลดลงของภาวะวิตกกังวล

การศึกษ	ภาวะที่ศึกษา	เชื้อชาติ	ผลการศึกษา
			แทนในเพศชายเท่านั้น
Greenberg และคณะ (2000)	Neuroticism	White/ Black/ Asian Non-Hispanic Pacific Islander Hispanic/Latino African American	S อัลลีลมีความสัมพันธ์กับลักษณะต่างๆ ของ Neuroticism เช่น anxiety, hostility, depression
Osher และคณะ (2000)	Anxiety – related traits	Israel	S อัลลีลมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ TPQ Harm Avoidance scale ($p=0.03$) รวมถึง anxiety ($p=0.03$) และ depression ($p=0.04$) ด้วย
Du และคณะ (2000)	Neuroticism (anxiety) – related traits	-	S อัลลีลมีความสัมพันธ์กับค่าเฉลี่ยที่สูงขึ้นของ Neuroticism scores ในเพศชายเท่านั้น ($p=0.018$)
Melke และคณะ (2001)	Anxiety – related traits	Caucasian (European)	ผู้ที่มีจีโนไทป์ชนิด S/S จะมี anxiety scores สูงกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ชนิดอื่นๆ
Hariri และคณะ (2002)	Response of the Human Amygdala	-	พบว่าการที่มีจีโนไทป์ชนิด S/S หรือ S อัลลีลจะเพิ่ม neuronal activity ของ Amygdala อย่างมากซึ่งอาจนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของ fear และ anxiety – related behaviours ได้
Tsai และคณะ (2002)	Neuroticism	Chinese	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Stoltenberg และคณะ (2002)	Personality traits	Caucasian	พบว่าในเพศชายที่มี S อัลลีลจะค่าเฉลี่ยของ NEO-FFI scores ที่สูง ($p=0.002$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวในเพศหญิง ($p=0.42$)
Golimbet และคณะ (2003)	Personality traits	-	พบว่าการที่มีจีโนไทป์ชนิด S/S หรือ S อัลลีลจะสัมพันธ์กับ Personality traits แบบ psychopathic deviance, paranoia และ schizophrenia ในผู้ป่วยโรค affective disorder และแบบ schizophrenia ในคนปกติ
Umekage และคณะ (2003)	Personality traits	Japanese	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR กับ Neuroticism หรือ Personality traits ประเภทอื่นๆ

การศึกษา	ภาวะที่ศึกษา	เชื้อชาติ	ผลการศึกษา
Lang และคณะ (2004)	Neuroticism (anxiety) – related traits	Caucasian (German)	ไม่พบความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Jacob และคณะ (2004)	Neuroticism (anxiety) – related traits	Caucasian (European)	ไม่พบความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Sen และคณะ (2004)	Neuroticism	Non Hispanic Caucasian	S อัลลีลมีความสัมพันธ์กับ Neuroticism scores ที่สูง (p=0.008)
Betha และคณะ (2004)	Anxious behavior	-	พบว่าการที่มีจีโนไทป์ชนิด S/S จะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ anxious behavior

จากรายงานการศึกษาในตารางที่ 2.3 จะเห็นว่าผลการศึกษาที่ได้นั้นไม่เป็นไปในทางเดียวกัน แม้ว่าจะมีการศึกษาในแบบแผนลักษณะบุคลิกภาพเดียวกันก็ตาม ซึ่งผลการศึกษาที่ได้มีทั้งที่พบความสัมพันธ์ (11, 65, 104-114) และไม่พบความสัมพันธ์ (62, 64, 67, 85, 96, 115-122) กับความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR รวมถึงการศึกษาของ Flory และคณะ (123) ที่แม้ว่าจะพบความสัมพันธ์แต่กลับตรงข้ามกับผลการศึกษาอื่น โดยพบว่ามีความสัมพันธ์กับการลดลงของภาวะวิตกกังวลแทน อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์จากผลการศึกษาที่พบความสัมพันธ์แล้วสามารถสรุปได้ว่า S อัลลีลอาจเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดลักษณะของ Neuroticism ที่มากขึ้นได้ (124) ซึ่งล่าสุดการศึกษาของ Vormfelde และคณะ (125) ได้ช่วยสนับสนุนข้อสรุปดังกล่าวด้วยว่า S อัลลีล น่าจะมีบทบาทในการเกิดลักษณะต่างๆ ของแบบแผนลักษณะทางบุคลิกภาพประเภท Neuroticism โดยเฉพาะในเรื่องของภาวะวิตกกังวลและอาการซึมเศร้า

2.8.2 การศึกษา 5-HTTLPR กับพฤติกรรมก้าวร้าวรุนแรง (aggression)

พฤติกรรมก้าวร้าวรุนแรง เป็นอาการซึ่งพบได้บ่อยในผู้ป่วยโรคทางระบบประสาทและจิตเวชตัวอย่าง เช่น ร้อยละ 70 ของผู้ป่วยที่ได้รับบาดเจ็บบริเวณศีรษะมักมีอาการหงุดหงิดง่ายและเจ้าอารมณ์ ร้อยละ 10 - 20 ของผู้ป่วยในจิตเวชมีพฤติกรรมก้าวร้าวรุนแรงหรือทะเลาะวิวาทก่อนเข้ารับการรักษา 2 สัปดาห์ และผู้ป่วยร้อยละ 3 - 37 จะทำร้ายแพทย์ พยาบาลหรือผู้มีส่วนในการดูแลผู้ป่วย (126) ลักษณะของพฤติกรรมก้าวร้าวนั้นจะเป็นการแสดงออกทางด้านความคิด คำพูด และการกระทำที่รุนแรง ขาดความยับยั้งชั่งใจ ไม่เป็นมิตร คุกคามและรุกรานผู้อื่นเพื่อระบายความโกรธความคับข้องใจ หรือปกปิดความกลัว ทำให้เสี่ยงต่อการเกิดอันตรายทั้งต่อตนเอง บุคคลอื่น และสิ่งแวดล้อมรอบตัวด้วย จากการศึกษาพบว่าซีโรโทนินเป็นสารสื่อประสาทที่สำคัญในการปรับพฤติกรรมก้าวร้าวรุนแรง โดยพบว่าระดับ metabolite ของซีโรโทนินจะมีปริมาณลดลงในน้ำไขสัน

หลังของผู้ป่วยซึ่งฆ่าตัวตายหรือพยายามฆ่าตัวตายด้วยวิธีการที่รุนแรง เช่นเดียวกับในผู้ป่วยซึ่งมีบุคลิกภาพชนิด borderline และมีพฤติกรรมก้าวร้าวรุนแรง อย่างไรก็ตามการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับพฤติกรรมก้าวร้าวรุนแรง (aggressive behavior) ยังมีอยู่ค่อนข้างน้อย อีกทั้งผลการศึกษาที่ได้ก็ขาดความสม่ำเสมออีกด้วย ในปี 2004 Liao และคณะ (13) ได้ทำการศึกษาในผู้ชายชาวจีนที่ก่ออาชญากรรมรุนแรงพบว่า S อัลลีล มีสัดส่วนที่สูงกว่าในกลุ่มอาชญากรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มคนปกติ ($p=0.06$) บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ของการมี S อัลลีลกับพฤติกรรมก้าวร้าวรุนแรง และผลการศึกษาที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Retz และคณะ (14) ในปีเดียวกันที่พบ S อัลลีลและจีโนไทป์ชนิด S/S สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยที่มีพฤติกรรมรุนแรงชัดเจนและกระทำซ้ำๆ ซากๆ แม้ว่าความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้สามารถพบได้ในกลุ่มวัยรุ่น (127) แต่ไม่กลับพบในวัยเด็ก (128-130) ด้วย อย่างไรก็ตามล่าสุดจากการศึกษาของ Haberstick และคณะ (83) กลับพบความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับการเพิ่มขึ้นของพฤติกรรมก้าวร้าวรุนแรงในเด็ก โดยเฉพาะเด็กอายุ 9 ปีจากการประเมินพฤติกรรมก้าวร้าวโดยครูของเด็กเอง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงพฤติกรรมก้าวร้าวในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ด้วย เนื่องจากโรคอัลไซเมอร์มักพบซ้อนร่วมกับภาวะอาการทางจิตและประสาทอื่นๆ รวมถึงพฤติกรรมก้าวร้าวทั้งทางด้านคำพูดและการกระทำ ซึ่ง Sukonick และคณะ (131) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR ในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ที่มีและไม่มีประวัติการแสดงพฤติกรรมก้าวร้าว พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของความถี่ของอัลลีล L ในผู้ป่วยอัลไซเมอร์อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.001$) โดยเฉพาะในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ที่แสดงพฤติกรรมก้าวร้าว จะมีความถี่ของจีโนไทป์ชนิด L/L สูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีพฤติกรรมก้าวร้าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย ดังนั้นจีโนไทป์ชนิด L/L น่าจะมีความสัมพันธ์กับพฤติกรรมก้าวร้าวในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ ซึ่งข้อสรุปดังกล่าวนี้ได้รับการสนับสนุนจากการศึกษาของ Sweet และคณะ (132) ที่พบว่าอาการทางจิตและพฤติกรรมก้าวร้าวในผู้ป่วยอัลไซเมอร์มีความสัมพันธ์กับทั้งจีโนไทป์ชนิด L/L และความถี่ของ L อัลลีลที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญด้วย จากการศึกษาที่กล่าวมานั้นจะเห็นได้ว่า มีความไม่สม่ำเสมอของผลการศึกษาในพฤติกรรมก้าวร้าวรุนแรง อาจเนื่องจากขนาดของกลุ่มตัวอย่างมีขนาดเล็ก และความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมในเรื่องของอายุ เพศ เชื้อชาติ สภาพแวดล้อมที่อยู่ เป็นต้น รวมถึงเครื่องมือหรือเกณฑ์ที่ใช้ในการวินิจฉัยพฤติกรรมก้าวร้าวในภาวะหรือโรคต่างๆ นั้นมีความหลากหลาย ซึ่งเหล่านี้เองอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความไม่สอดคล้องกันของผลการศึกษาได้

2.8.3 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคอารมณ์แปรปรวน (mood disorders)

ลักษณะที่สำคัญของโรคอารมณ์แปรปรวน (mood disorders) คือเป็นโรคที่ผู้ป่วยมีความผิดปกติของอารมณ์เป็นอาการเด่น และไม่มีโรคทางกาย โรคของสมอง พิษจากยาหรือสารเสพติดเป็นสาเหตุของอาการดังกล่าว (126) โดยอารมณ์แปรปรวนที่ผิดปกตินั้นอาจเป็นอารมณ์เศร้ามากผิดปกติ ร้องไห้ อ่อนเพลีย ออยากตาย หรือเป็นอารมณ์ดี รื่นเริง สนุกสนานมากผิดปกติ ครึกครื้น พุดมาก ซึ่งผู้ป่วยอาจมีอาการเพียงด้านเดียวหรือทั้งสองด้านก็ได้ ทำให้โรคในกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ โดยจำแนกออกตามลักษณะอาการที่ผิดปกติในแต่ละด้าน ได้แก่ โรคซึมเศร้า (major depressive disorder) และโรคไบโพลาร์ (bipolar disorder) (103)

โรคซึมเศร้า (major depressive disorder, unipolar disorder) ลักษณะอาการที่สำคัญของโรคนี้คือผู้ป่วยมีอาการซึมเศร้าเป็นอาการเด่นชัด ผู้ป่วยจะรู้สึกซึมเศร้าหดหู่อ่อนใจ ร้องไห้ง่าย เกิดร่วมกับอาการอย่างอื่น เช่น มีความรู้สึกเบื่อหน่ายและหมดความสนใจในสิ่งต่างๆ เบื่ออาหาร นอนไม่หลับ อ่อนเพลียไม่มีแรง ไม่มีสมาธิ เชื่องช้าลง กระวนกระวาย รู้สึกไร้ค่าหรือรู้สึกผิด และมีความคิดอยากฆ่าตัวตาย

โรคไบโพลาร์ (bipolar disorder) เป็นโรคอารมณ์แปรปรวนที่ผู้ป่วยมีอาการแมนี (mania) หรือไฮโปแมนี (hypomania) สลับกับอาการของโรคซึมเศร้า ลักษณะอาการที่สำคัญของโรคนี้คือ ทางด้านอารมณ์ผู้ป่วยจะรู้สึกมีความสุขมาก อารมณ์ดี พุดจาามีอารมณ์ขัน คึกคะนอง ไม่สำรวม มีการแสดงออกของอารมณ์หรือความต้องการอย่างขาดความยับยั้งชั่งใจ ไม่ค่อยคำนึงถึงผู้อื่นหรือกฎเกณฑ์ของสังคม อาการทางด้านพฤติกรรมจะรู้สึกคึกคักมีกำลังวังชา ขยันมากกว่าปกติแต่มักทำได้ไม่ค่อยดี ชอบพุดคุยทักทายผู้อื่นแม้แต่คนแปลกหน้า พุดมากพุดเร็ว อาการทางด้านความคิดผู้ป่วยจะมีความคิดสร้างสรรค์มากมาย เชื่อมั่นในตนเองมากและมีการตัดสินใจที่ไม่เหมาะสม ไม่ยอมรับฟังผู้อื่น โดยอาการเหล่านี้มักมีอาการของโรคซึมเศร้าร่วมไปด้วย

สำหรับสาเหตุของทั้งโรคซึมเศร้าและไบโพลาร์ นั้น ปัจจุบันนี้เชื่อว่าเกิดจากความบกพร่องของสารสื่อประสาทหลายชนิด โดยเฉพาะสารซีโรโทนินซึ่งเป็นที่สนใจศึกษากันมากที่สุดตัวหนึ่ง ทำให้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับโรคอารมณ์แปรปรวนเกิดขึ้นอย่างมากมาย ดังตารางที่ 2.4 รวมถึงการศึกษาถึงความสัมพันธ์กับอาการซึมเศร้าที่เป็นอาการสำคัญของโรคซึมเศร้า และมักพบได้ในโรคไบโพลาร์ด้วย ดังจะเห็นได้จากตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.4 สรุปการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับโรคอารมณ์แปรปรวน

การศึกษา	ภาวะที่ศึกษา	เชื้อชาติ	ผลการศึกษา
Collier และคณะ (1996)	Unipolar และ Bipolar disorder	Caucasian (European)	แม้ความถี่ของ S อัลลีลในกลุ่มผู้ป่วยสูงกว่าคนปกติแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กลับพบว่าจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR ชนิด S/S ในกลุ่มผู้ป่วยนั้นมากกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.02$) แทน
Rees และคณะ (1997)	Unipolar disorder	Caucasian (British)	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
	Bipolar disorder		ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Oruc และคณะ (1997)	Bipolar disorder	Croatian	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Kunagi และคณะ (1997)	Unipolar disorder	Japanese	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
	Bipolar disorder		ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR แต่พบว่าจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR ชนิด S/S ในกลุ่มผู้ป่วยนั้นสูงกว่าคนปกติ
Bellivier และคณะ (1998)	Unipolar disorder	Caucasian (French)	พบว่าจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR ชนิด S/S ในกลุ่มผู้ป่วยนั้นสูงกว่าในกลุ่มคนปกติ
	Bipolar disorder		พบว่าจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR ชนิด S/S ในกลุ่มผู้ป่วยนั้นสูงกว่าในกลุ่มคนปกติ
Furlong และคณะ (1998)	Unipolar disorder	Caucasian (British)	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
	Bipolar disorder		ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
	Unipolar และ Bipolar disorder		ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Hoehe และคณะ (1998)	Unipolar disorder	Caucasian	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
	Bipolar disorder		ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
	Unipolar และ Bipolar disorder		ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR

การศึกษา	ภาวะที่ศึกษา	เชื้อชาติ	ผลการศึกษา
Mendes de Oliveira และคณะ (1998)	Bipolar disorder	Brazilian	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Gutierrez และคณะ (1998)	Major depression with melancholia	Spanish	ความถี่ของ S อัลลีลในกลุ่มผู้ป่วยสูงกว่าคนปกติ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่กลับพบว่าความถี่ของ haplotype 484-STin2.10 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ป่วย ($p=0.007$)
Vincent และคณะ (1999)	Bipolar disorder	Caucasian	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Ospina-Duque และคณะ (2000)	Bipolar disorder	Columbian	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Rotondo และคณะ (2002)	Comorbid Bipolar disorder กับ Panic disorder	Caucasian (Italian)	พบว่าความถี่ของ S อัลลีลจะสูงที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการของ panic disorder ร่วมด้วย ($p=0.008$)
Serretti และคณะ (2002)	Unipolar disorder	Caucasian (Italian)	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
	Bipolar disorder		ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Hauser และคณะ (2003)	Unipolar disorder	Polish	พบว่าจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR ชนิด S/S ในกลุ่มผู้ป่วยสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.003$) และพบความถี่ของ S อัลลีลในกลุ่มผู้ป่วยมากกว่าด้วย
	Bipolar disorder		พบว่าจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR ชนิด S/S ในกลุ่มผู้ป่วยสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.011$) และพบความถี่ของ S อัลลีลในกลุ่มผู้ป่วยมากกว่าด้วย
Nelliserv และคณะ (2003)	Comorbid alcohol dependence กับ Major depression	European American African American	พบว่าความถี่ของ S อัลลีลในกลุ่มผู้ป่วยสูงกว่าในกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.045$)
Mendlewicz และคณะ (2004)	Unipolar disorder	Caucasian (European)	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR

การศึกษา	ภาวะที่ศึกษา	เชื้อชาติ	ผลการศึกษา
	Bipolar disorder		ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Meira-Lima และคณะ (2005)	Bipolar disorder	Brazilian	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ แม้ว่าจะมีความแตกต่างของความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับกลุ่มคนปกติก็ตาม
Ikeda และคณะ (2006)	Bipolar disorder	Japanese	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Van Den Boqaert และคณะ (2006)	Bipolar disorder	Northern Swedish	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR

ตารางที่ 2.5 สรุปการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับอาการซึมเศร้า

การศึกษา	ภาวะที่ศึกษา	เชื้อชาติ	ผลการศึกษา
Serretti และคณะ (1999a)	Depression	Caucasian (Italian)	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Serretti และคณะ (1999b)	Depression	-	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Mossner และคณะ (2000)	Depression	-	พบความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับความเสี่ยงในการเกิดภาวะ depression ในผู้ป่วย
Mossner และคณะ (2001)	Depression	Caucasian (German)	ผู้ป่วยที่มี S อัลลีลจะมี HAM-D score (depression) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ
Joiner และคณะ (2003)	Family history of depression	Caucasian African American Hispanic	ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR ชนิด S/S จะมีประวัติของอาการ depression ในเครือญาติมากกว่าจีโนไทป์ชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)
Gonda และคณะ (2005)	Depression	Caucasian	ผู้ที่มี S อัลลีลจะมี Zung SDS (depression) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ
Cervilla และคณะ (2006)	Depression	Caucasian (European)	พบความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR ชนิด S/S และยังมีนัยสำคัญเมื่อมีระดับความรุนแรงของ depression เพิ่มขึ้น ($p = 0.013$)
Burn และคณะ (2006)	Depression	Caucasian	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Dick และคณะ (2007)	Depression	Caucasian	พบความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับ lifetime depression ในผู้ที่เคยได้รับภาวะเครียด

จากการศึกษาในตารางที่ 2.4 ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR นั้นมีความสัมพันธ์กับโรคอารมณ์แปรปรวนหรือไม่ เพราะส่วนใหญ่แล้วผลการศึกษาที่ได้มักไม่พบความสัมพันธ์ (78, 79, 82, 91, 93, 99, 102, 133-139) และมีส่วนน้อยที่พบความสัมพันธ์ (15, 87, 90, 93, 97, 98, 133) โดยพบว่าสัมพันธ์กับจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR ชนิด S/S แต่กลับไม่ค่อยสัมพันธ์กับ S อัลลีล (15, 87, 98, 133) อาจเนื่องมาจากผลของยีนด้อย (recessive effect) ซึ่งถ้าหากศึกษาลงไปเฉพาะความสัมพันธ์กับอาการซึมเศร้าในโรคอารมณ์แปรปรวนดังที่สรุปในตารางที่ 2.5 แล้ว (16, 19, 95, 140-145) จะยิ่งเห็นถึงบทบาทและความสำคัญของจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR ชนิด S/S หรือ S อัลลีลที่มากขึ้น และสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ amygdala activation ที่เป็นปรากฏการณ์ที่มักพบได้ในโรคซึมเศร้าในผู้ที่มี S อัลลีล (146) และการจับกับ serotonin transporter ที่ลดต่ำลงในส่วน prefrontal cortical (PFC) ของผู้ป่วยโรคซึมเศร้า (147) ด้วย นอกจากนี้ที่ผ่านมายังมีการศึกษาแบบ meta-analysis แต่ก็ยังคงไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัด เนื่องจากการศึกษาที่รายงานว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR ชนิด S/S จะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคซึมเศร้าแต่มีแค่แนวโน้มในโรคไบโพลาร์ (82, 148) ขณะที่อีกสองการศึกษาพบว่าจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR ชนิด S/S จะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคไบโพลาร์เท่านั้น (149, 150) ทำให้จนถึงปัจจุบันนี้ยังไม่สามารถทราบได้แน่ชัดว่ายีนเป็นสาเหตุหรือปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคโรคอารมณ์แปรปรวนทั้งสองชนิดหรือไม่ แต่หากเปรียบเทียบกับโรคไบโพลาร์แล้ว ดูเหมือนว่าโรคซึมเศร้านั้นจะมีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย โดยเป็นการศึกษาแบบ gene-by-environment (GxE) interaction จากการศึกษาของ Caspi และคณะ (151) พบว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR ชนิด S/S หรือ S/L จะมี susceptibility ต่อการเกิดภาวะซึมเศร้า หรือแสดงอาการซึมเศร้ามากขึ้น จากการกระตุ้นของเหตุการณ์ในชีวิตที่ทำให้เกิดภาวะเครียดมากกว่าชนิด L/L ซึ่ง S อัลลีลจะสัมพันธ์กับการพัฒนาของอาการซึมเศร้า เฉพาะในวัยรุ่นที่มีประวัติไม่ได้รับการเอาใจใส่ดูแล (maltreatment) ในวัยเด็กหรือเคยประสบเหตุการณ์ในชีวิตที่ทำให้เกิดภาวะเครียดมาแล้วเท่านั้น มิฉะนั้น S อัลลีลจะไม่สัมพันธ์กับโรค และผลการศึกษาดังกล่าวนี้ถูกสนับสนุนโดยการศึกษาต่อมา (152-155) รวมถึงมีการศึกษาปัจจัยในเรื่องของเพศ (156) ด้วย

นอกจากนี้ยังพบว่ามีการศึกษาถึง 5-HTTLPR ในโรค seasonal affective disorder (SAD) หรือที่รู้จักกันในชื่อ winter depression เป็นโรคที่จัดอยู่ในกลุ่ม affective หรือ mood disorder ด้วย ซึ่งผู้ป่วยโรคนี้จะมีสภาพจิตใจเหมือนปกติ แต่จะแสดงอาการซึมเศร้าออกมาในช่วงฤดูหนาวหรือฤดูร้อนเท่านั้น โรคนี้พบได้ไม่มากและมักจะพบในแถบประเทศที่อยู่ในเขตร้อน ซึ่งโรทินั้นจึงถูกคิดว่าจะมีบทบาทสำคัญในการเกิดพยาธิสภาพของโรคนี้ด้วย อย่างไรก็ตามผลการศึกษาที่ได้ในปี 2003 กลับไม่พบความแตกต่างในการกระจายของจีโนไทป์หรือความถี่อัลลีล

ของ 5-HTTLPR ระหว่างผู้ป่วยกับคนปกติ แต่กลับพบความสัมพันธ์เมื่อแยกประเภทของภาวะซึมเศร้า (DSM-IV depression subtypes) โดย melancholic และ atypical depression จะมีความสัมพันธ์กับ L และ S อัลลีลตามลำดับ (157) ซึ่งตรงข้ามกับการศึกษาก่อนหน้าของ Rosenthal และคณะที่รายงานว่า S อัลลีลมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดลักษณะ seasonality และเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรค SAD ได้ (158) ทำให้ยังคงต้องมีการศึกษากันต่อไป

2.8.4 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคจิตเภท (schizophrenia)

โรคจิตเภท (schizophrenia) เป็นความผิดปกติที่ยังไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเริ่มมีอาการในช่วงวัยรุ่น เมื่อเป็นแล้วมักไม่หายขาดและมีอาการกำเริบเป็นช่วงๆ โดยมีอาการหลงเหลืออยู่บ้างในระหว่างนั้น อาการในช่วงที่กำเริบจะเป็นกลุ่มอาการด้านบวกคือจะแสดงออกในด้านความผิดปกติของความคิด การรับรู้ การติดต่อสื่อสารและพฤติกรรม เช่น อาการประสาทหลอน อาการหลงผิด แต่ในระยะหลังส่วนใหญ่จะมีกลุ่มอาการด้านลบคือภาวะที่ขาดในสิ่งที่คนทั่วไปควรมี เช่น พุดน้อย ขาดความกระตือรือร้น เฉื่อยชา เก็บตัว แยกตนเอง เป็นต้น (103) สำหรับสมมติฐานที่ว่าซีโรโทนินมีความเกี่ยวข้องกับโรคจิตเภทนั้น เริ่มมาจากการสังเกตที่ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของตัวรับ (receptor) หรือตัวดูดกลับ (transporter) ซีโรโทนิน (159) ในการส่งสัญญาณซีโรโทนินในระบบประสาท (serotonergic neurotransmission) โดยต่อมายังได้พบว่ามี การลดลงของตัวดูดกลับซีโรโทนินในบริเวณต่างๆ ของสมองผู้ป่วยโรคจิตเภท เช่น บริเวณ hippocampus (160-162) และ prefrontal cortex (163) รวมถึงพบการเปลี่ยนแปลงของ SERT mRNA ในบริเวณ frontal กับ temporal cortex ของผู้ป่วยโรคจิตเภทด้วย (164) ทำให้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับโรคจิตเภทเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามจากการศึกษาทั้งหมดที่ผ่านมาล้วนดูเหมือนว่า 5-HTTLPR จะไม่มีบทบาทสำคัญในโรคจิตเภท ทั้งในด้านที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค (84, 91, 136, 138, 165-167) พยาธิสภาพและอาการแสดงออกของโรค (69, 168) รวมถึงไม่พบความสัมพันธ์ในรูปแบบที่ร่วมกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนอื่นด้วย (169) ถึงแม้การศึกษาของ Malhotra และคณะจะรายงานว่าผู้ป่วยโรคจิตเภทที่มีจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR ชนิด L/L จะมี Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS) สูงกว่าจีโนไทป์ชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ (165) ซึ่งสนับสนุนโดยการศึกษาต่อมาของ Dubertret และคณะ ที่ทำการศึกษาคำความสัมพันธ์ด้วยวิธี Transmission Disequilibrium Test (TDT) และพบว่ามีกำเริบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของ Transmission ของ L อัลลีล ($p=0.03$) ในโรคจิตเภท (17) ก็ตาม

2.8.5 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคเนื่องจากความวิตกกังวล (Anxiety Disorders)

ความวิตกกังวล (anxiety) เป็นกลุ่มอาการที่เกิดขึ้นได้ในคนปกติทั่วไป ซึ่งมักจะมีอาการ ตึงเครียด ระวังระวัง หรือบางครั้งอาจตื่นตระหนกกับเรื่องต่างๆ ในชีวิตประจำวัน มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระต่างๆ เช่น เหงื่อแตก ใจสั่น ใจเต้นเร็ว ตัวสั่น หายใจเร็ว ท้องไส้ปั่นป่วน ความวิตกกังวลนี้มักจะมีเมื่ออยู่ในสถานการณ์ที่ตึงเครียด จะถือว่าเป็นความวิตกกังวลที่ผิดปกติ (disorders) ก็ต่อเมื่อความวิตกกังวลนี้มีมากเกินไปจนรบกวนกิจวัตรประจำวันหรือเป้าหมายของการทำงานต่างๆ และกระทบต่ออารมณ์ความรู้สึกอย่างมาก หากทำการแบ่งประเภทของโรคเนื่องจากความวิตกกังวล (anxiety disorders) ตามเกณฑ์ DSM-IV แล้วจะสามารถแบ่งออกเป็นโรคย่อยได้ 5 โรค (103) ได้แก่ โรคกังวล (generalized anxiety disorder) โรคแพนิก (panic disorder) โรคกลัว (phobic disorder) โรคย้ำคิดย้ำทำ (obsessive-compulsive disorder) และโรคทางจิตเวชเนื่องจากภัยอันตราย (posttraumatic stress disorder)

จากข้อสรุปในการศึกษาความสัมพันธ์ ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับแบบแผนลักษณะทางบุคลิกภาพที่ว่า S อัลลีลน่าจะมีส่วนในการเกิดลักษณะต่างๆ ของแบบแผนลักษณะทางบุคลิกภาพประเภท Neuroticism โดยเฉพาะในเรื่องของภาวะวิตกกังวล (anxiety – related traits) รวมถึงการศึกษาล่าสุดที่มีการพบว่าภาวะที่มีระดับความวิตกกังวลสูงจะสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ S อัลลีลทั้งในกลุ่มผู้ป่วยและคนปกติ (170) ทำให้เริ่มมีการตั้งสมมติฐานว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ก็น่าจะมีความสัมพันธ์กับโรคที่อยู่ในกลุ่มของโรคเนื่องจากความวิตกกังวล (anxiety disorders) ด้วยโดยการศึกษาแรกของ Ohara และคณะ (63) ที่ศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยโรคเนื่องจากความวิตกกังวลซึ่งประกอบด้วยโรคกังวล โรคแพนิก โรคกลัวและโรคย้ำคิดย้ำทำ พบว่าไม่มีความแตกต่างของการกระจายของจีโนไทป์ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับคนปกติ แต่มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของความถี่ S อัลลีล ในกลุ่มผู้ป่วยเมื่อเทียบกับคนปกติ ซึ่งขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่น้อยเกินไปอาจทำให้ไม่สามารถพบนัยสำคัญของแนวโน้มได้ อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้กลับไม่ได้รับการสนับสนุนจากการศึกษาต่อมาของ Samochowiec และคณะ (80) ที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการกระจายของจีโนไทป์หรือความถี่อัลลีล ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคเนื่องจากความวิตกกังวลที่ประกอบด้วยโรคกังวล โรคแพนิก โรคกลัว กับคนปกติ การที่ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวนั้นอาจเนื่องจากการที่ไม่ได้ศึกษาแยกลงไปในแต่ละประเภทของโรคในกลุ่มโรคเนื่องจากความวิตกกังวลก็เป็นได้ ซึ่งต่อไปจะกล่าวถึงรายละเอียดของแต่ละประเภทของโรคในกลุ่มนี้รวมถึงความสัมพันธ์กับ 5-HTTLPR ด้วย

โรคกังวล (generalized anxiety disorder) ลักษณะที่สำคัญของโรคนี้คือผู้ป่วยจะมีความวิตกกังวลเกี่ยวกับเหตุการณ์หรือกิจกรรมต่างๆ มากผิดปกติ มีอาการกังวลเกินกว่าเหตุในหลายๆ เรื่องพร้อมกัน (excessive and pervasive worry) และมีอาการทางระบบประสาทอัตโนมัติร่วมด้วย เช่น กระวนกระวายใจ หงุดหงิดง่าย ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ และนอนไม่หลับ เป็นต้น แม้การศึกษาถึงความสัมพันธ์กับ 5-HTTLPR ในโรคนี้ยังมีอยู่น้อยมาก แต่มีรายงานว่าพบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของการกระจายของจีโนไทป์ชนิด S/S ($p=0.002$) และความถี่ของ S อัลลีล ($p=0.044$) ในผู้ป่วยโรคกังวลเมื่อเทียบกับคนปกติ (70)

โรคกลัว (phobic disorder) ลักษณะที่สำคัญของโรคนี้คือผู้ป่วยมีความกลัวที่รุนแรงเกินกว่าเหตุ และไม่เหมาะสมกับสิ่งที่มีมากระตุ้นให้เกิดความกลัว จะเกิดขึ้นซ้ำๆ โดยที่ผู้ป่วยไม่สามารถรับความกลัวนั้นได้ ผู้ป่วยจะพยายามหลีกเลี่ยงหรือหลบหนีจากสิ่งที่ทำให้เกิดกลัว โรคกลัวนี้สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 ชนิดคือ โรคกลัวเฉพาะเจาะจง (specific or simple phobia) ที่เป็นการกลัวต่อสัตว์ สิ่งของ สถานที่หรือเหตุการณ์บางอย่าง และโรคกลัวกิจกรรมทางสังคม (social phobia) เป็นความกลัวที่มีต่อการที่จะต้องไปอยู่ในสถานที่ซึ่งผู้ป่วยอาจถูกจ้องมองจากผู้อื่นได้ สำหรับการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับโรคกลัวนี้ เช่นเดียวกันกับการศึกษาในโรคกังวลที่ยังมีอยู่น้อยอีกทั้งผลการศึกษาที่ได้นั้นไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวอีกด้วย (171)

โรคแพนิค (panic disorder) ลักษณะที่สำคัญของโรคนี้คือผู้ป่วยจะมีอาการแพนิค (panic attack) เกิดขึ้นซ้ำๆ เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 1 เดือน อาการแพนิคที่วุ่นวายนี้หมายถึงการที่ผู้ป่วยมีความกลัวหรือตื่นตระหนกอย่างรุนแรง พร้อมกันนั้นจะมีอาการทางกายหลายๆ อย่างร่วมไปด้วย เช่น ใจสั่น เหงื่อออกมาก มือสั่นหรือตัวสั่น หายใจไม่ออก เวียนศีรษะ คลื่นไส้และชาตามตัว อาการจะเกิดอย่างเฉียบพลันและเป็นมากอย่างรวดเร็วภายในเวลา 10 นาที โดยแต่ละรายจะมีความรุนแรงแตกต่างกัน ผู้ป่วยจะรู้สึกกังวลเกี่ยวกับอาการและผลที่จะตามมาทำให้บางรายมีพฤติกรรมเปลี่ยนไปเช่นขาดงานหรือไม่กล้าออกนอกบ้านเพราะกลัวมีอาการอีก การที่ผู้ป่วยไม่กล้าออกนอกบ้าน หรือกลัวการไปตามสถานที่ต่างๆ นั้นเรียกว่า อาการกลัวที่โล่งแจ้ง (agoraphobia) สำหรับการศึกษาค้นคว้าถึงความสัมพันธ์กับ 5-HTTLPR ในโรคนี้ แม้ว่าจะมีการศึกษาอยู่มากมายแต่ผลการศึกษาที่ได้นั้นส่วนใหญ่กลับไม่พบความสัมพันธ์ (75, 172-179) อย่างไรก็ตาม Maron และคณะกลับรายงานว่ามีการกระจายของจีโนไทป์ชนิด L/L ($p=0.016$) และความถี่ของ L อัลลีล ($p=0.007$) สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยโรคแพนิค (180) ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาอื่นๆ

โรคย้ำคิดย้ำทำ (obsessive-compulsive disorder) เป็นโรคซึ่งมีแนวโน้มว่าจะพบได้บ่อยขึ้นกว่าแต่ก่อน แต่สามารถรักษาให้หายได้ ลักษณะที่สำคัญของโรคนี้คือผู้ป่วยจะมีอาการย้ำคิดหรือย้ำทำสิ่งใดสิ่งหนึ่งซ้ำๆ โดยไม่มีเหตุผล ซึ่งตัวผู้ป่วยเองก็รู้ว่าเป็นเรื่องไร้สาระแต่ไม่สามารถขัดขึ้นได้ พร้อมกันนั้นผู้ป่วยจะรู้สึกไม่สบายใจ วิตกกังวล เครียดและมีอาการซึมเศร้าด้วย โดยอาการย้ำคิด (obsession) คือการที่มีความคิดหรือความรู้สึกที่เกิดขึ้นเองโดยไร้เหตุผล ซึ่งก่อให้เกิดความกังวลใจ ความไม่สบายใจอย่างมาก และอาการย้ำทำ (compulsion) คือการกระทำอย่างมีเป้าหมายชัดเจนซ้ำๆ เพื่อป้องกันหรือลดความไม่สบายใจจากอาการย้ำคิดข้างต้นและเป็นการกระทำที่ไร้เหตุผลด้วย สำหรับการศึกษาดังกล่าวถึงความสัมพันธ์กับ 5-HTTLPR ในโรคนี้ก็เป็นเช่นเดียวกันกับการศึกษาในโรคแพนิค ที่แม้ว่าจะมีการศึกษาอยู่มากมายแต่ผลการศึกษาที่ได้นั้นไม่เป็นไปในทางเดียวกันหรือสอดคล้องกัน ซึ่งมีทั้งการศึกษาที่พบความสัมพันธ์และไม่พบความสัมพันธ์กับ 5-HTTLPR ทำให้ไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด อีกทั้งผลการศึกษามากมายก็ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับโรคด้วย (18, 88, 181-185) อย่างไรก็ตาม Billett และคณะ (186) รายงานว่าแม้จะไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างผู้ป่วยกับคนปกติ แต่พบว่ามีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของจีโนไทป์ชนิด L/L ในกลุ่มผู้ป่วยโรคย้ำคิดย้ำทำ ซึ่งได้รับสนับสนุนโดยการศึกษาต่อมาของ McDougle และคณะ (187) ที่ตรวจสอบความสัมพันธ์ด้วยการทดสอบ Transmission Disequilibrium Test (TDT) แล้วพบว่า L อัลลีลมีความสัมพันธ์กับโรคย้ำคิดย้ำทำ ($p < 0.03$) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Bengel และคณะ (188) ที่พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคย้ำคิดย้ำทำจะมีความถี่ของจีโนไทป์ชนิด L/L มากกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.023$) ด้วย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ของ 5-HTTLPR กับลักษณะที่แสดงออกสำคัญต่างๆ ของโรคย้ำคิดย้ำทำ ซึ่งจำแนกตามหลักของ Yale-Brown Obsessive-Compulsive Scale (YBOCS) ของ Cavallini และคณะ (92) พบว่ามีแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับปัจจัยที่ 5 (repetitive rituals) ของ YBOCS โดยที่ผู้ป่วยจะมีความถี่ของจีโนไทป์ชนิด L/L สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญมากกว่าจีโนไทป์ชนิดอื่น ต่อมาก็ได้มีการใช้หลักของ YBOCS ในการศึกษาของ Kim และคณะด้วย (74) ผลการศึกษานั้นไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับการเกิดโรคย้ำคิดย้ำทำ แต่กลับพบว่าสัมพันธ์กับปัจจัยของ YBOCS แทน โดยผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด L/L จะมีระดับของ religious/somatic มากกว่าชนิด S/S ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า 5-HTTLPR ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคแต่มีความสัมพันธ์กับอาการแสดงออกของโรคแทน อย่างไรก็ตามล่าสุดในปี 2006 กลับมีการศึกษาที่รายงานถึงความสัมพันธ์ของ S อัลลีลกับโรคเป็นครั้งแรก (89, 178) ซึ่งผลการศึกษาที่ได้นั้นขัดแย้งกับการศึกษาที่ผ่านมา

โรคทางจิตเวชเนื่องจากภัยอันตราย (posttraumatic stress disorder, PTSD) เป็นโรควิตกกังวลที่เกิดขึ้นภายหลังจากที่ผู้ป่วยเผชิญกับเหตุการณ์รุนแรงต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับตัวผู้ป่วยเองหรือกับบุคคลใกล้ชิด เช่น ภาวะสงคราม อุทกภัย วินาศภัย ติ๊กถล่ม ถูกทำร้ายร่างกาย หรือข่มขืน ประสบอุบัติเหตุร้ายแรง เป็นต้น ลักษณะที่สำคัญของโรคนี้คือผู้ป่วยจะมีอาการหวาดกลัวอย่างรุนแรง รู้สึกสิ้นหวัง คิดและฝันซ้ำๆ เกี่ยวกับเหตุการณ์นั้นๆ มีปัญหาเกี่ยวกับการนอน อารมณ์หงุดหงิด แปรปรวน ตื่นเต้นตกใจง่าย สมาธิความจำแย่ลง บางรายอาจมีอาการประสาทหลอน ซึ่งอาการทั้งหมดจะเป็นติดต่อกันยาวนานระยะเวลาหนึ่ง และรุนแรงขึ้นจนทำให้เกิดปัญหาต่อผู้ป่วยในการใช้ชีวิตประจำวัน สำหรับการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับโรคทางจิตเวชเนื่องจากภัยอันตรายนั้น แม้ว่ายังมีการศึกษาอยู่ค่อนข้างน้อยแต่ก็มีรายงานพบว่าในผู้ป่วยโรคทางจิตเวชเนื่องจากภัยอันตรายจะมีความถี่ของจีโนไทป์ชนิด S/S สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.042$) เมื่อเทียบกับคนปกติด้วย (73)

2.8.6 การศึกษา 5-HTTLPR กับการฆ่าตัวตาย (suicide)

ในปัจจุบันนี้แนวโน้มว่าภาวะการฆ่าตัวตายสามารถพบได้บ่อยขึ้นเรื่อยๆ และเกิดได้กับคนทุกเพศทุกวัย แต่ในเด็กอายุต่ำกว่า 10 ปีอาจพบได้น้อยมาก ซึ่งการกระทำของเด็กมักจะเป็นเพราะอารมณ์ชั่ววูบเป็นส่วนใหญ่ ไม่มีการเตรียมการล่วงหน้า และไม่ได้เป็นโรคจิตหรือโรคประสาท สำหรับในกลุ่มวัยรุ่นและหนุ่มสาว โรคจิตเภทและภาวะการติดยาเสพติดจะเป็นสาเหตุการฆ่าตัวตายที่สำคัญ และในวัยกลางคนขึ้นไปนั้นโรคทางจิตเวชที่เป็นสาเหตุสำคัญของการฆ่าตัวตายคือโรคซึมเศร้า ลักษณะของผู้ป่วยที่มีแนวโน้มจะฆ่าตัวตายสูงได้แก่ ผู้ป่วยเคยมีประวัติการฆ่าตัวตายมาก่อน อาจมีปัญหาเกี่ยวกับการงานหรืออาชีพ ปัญหาด้านสุขภาพ มีประวัติการฆ่าตัวตายของคนในครอบครัว มีโรคทางจิตเวชเช่นอาการซึมเศร้าอย่างรุนแรงหรือโรคจิต เป็นต้น (126) สำหรับการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับการฆ่าตัวตายนั้นได้สรุปไว้ในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 สรุปการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับการฆ่าตัวตาย

การศึกษา	ภาวะที่ศึกษา	เชื้อชาติ	ผลการศึกษา
Du และคณะ (1999)	Depressed Suicide	-	พบว่าความถี่ของ L อัลลีลในกลุ่มผู้ป่วยสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.048$)
Bellivier และคณะ (2000)	Violent Attempted Suicide in affective disorder	Caucasian (French)	พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการกระจายของอัลลีลระหว่างผู้ป่วยและคนปกติ ($p=0.023$) โดยความถี่ของ S อัลลีลจะสูงสุดใน Violent Attempted Suicide

การศึกษาศึกษา	ภาวะที่ศึกษา	เชื้อชาติ	ผลการศึกษา
Gorwood และคณะ (2000)	Attempted Suicide in alcohol dependence	Caucasian (French)	พบว่า S อัลลีลจะสัมพันธ์กับความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะพฤติกรรมที่กระทำซ้ำๆ และรุนแรง
Bondy และคณะ (2000)	Completed Suicide	Caucasian (Southern Germany)	พบจีโนไทป์ชนิด S/S และ S/L สูงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ป่วย (p=0.0003)
Mann และคณะ (2000)	Suicide	White, Asian Hispanic African American	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Chong และคณะ (2000)	Suicide in schizophrenia	Chinese	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Geijer และคณะ (2000)	Attempted Suicide	Caucasian (European)	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Russ และคณะ (2000)	Suicide	Caucasian, Hispanic African American Indian, Asian	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR แต่เมื่อดูเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วย กลับพบว่า L อัลลีลจะสัมพันธ์กับ Suicide
Faludi และคณะ (2000)	Depressed Suicide	-	พบว่าความถี่ของ L อัลลีลในกลุ่มผู้ป่วย สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ
Rujescu และคณะ (2001)	Attempted Suicide	Caucasian (German)	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Zalsman และคณะ (2001)	Suicidal Behavior	Israeli	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Fitch และคณะ (2001)	Completed Suicide	Caucasian (French canadian)	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Du และคณะ (2001)	Depressed and Completed Suicide	Hungarian	ความถี่ของจีโนไทป์ชนิด L/L ในผู้ป่วยสูงกว่ากลุ่มควบคุมเกือบสองเท่า และพบว่าจีโนไทป์ชนิด S/L สัมพันธ์กับ Completed Suicide ด้วย
Courtet และคณะ (2001)	Violent Attempted Suicide	Caucasian (West European)	พบว่าความถี่ของจีโนไทป์ชนิด S/S และ S อัลลีล สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ป่วย (p=0.04 และ 0.02 ตามลำดับ)
Preuss และคณะ (2001)	Attempted Suicide in alcohol dependence	Caucasian (German)	พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่ S อัลลีลระหว่างผู้ป่วย alcohol dependence ที่มีและไม่มี suicide

การศึกษา	ภาวะที่ศึกษา	เชื้อชาติ	ผลการศึกษา
			behavior (p=0.019) โดยพบความถี่ของ S อัลลีลมากกว่าในผู้ป่วยที่มี suicide behavior
Joiner และคณะ (2002)	Family history of Suicide	-	พบว่าการมีจีโนไทป์ชนิด S/S สัมพันธ์กับประวัติการฆ่าตัวตายของคนในครอบครัว
Baca-Garcia และคณะ (2002)	Attempted Suicide	Caucasian (Spanish)	พบจีโนไทป์ชนิด S/S และ S/L สูงอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยเพศหญิง (p=0.02)
Campi-Azevedo และคณะ (2003)	Violent Attempted Suicide	Brazilian	พบจีโนไทป์ชนิด S/S และ S/L ในกลุ่มผู้ป่วยมากกว่าชนิด L/L อย่างมีนัยสำคัญ (p=0.002)
Bayle และคณะ (2003)	Violent Attempted Suicide in schizophrenia	Caucasian (French)	พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่จีโนไทป์ระหว่างผู้ป่วย violent กับ non-violent attempted suicide (p=0.013) และคนปกติ (p=0.026) และพบความถี่ S อัลลีลสูงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม violent attempted suicide (p=0.007) ด้วย
Pooley และคณะ (2003)	Deliberate self-harm	Caucasian (UK)	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Courtet และคณะ (2003)	Non-violent Attempted Suicide	Caucasian (West European)	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR
Hranilovic และคณะ (2003)	Completed Suicide	Croatian	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR แม้ว่าจะพบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของ L อัลลีลในกลุ่มผู้ป่วยก็ตาม
Pungercic และคณะ (2006)	Suicide	Slovenian	ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์หรืออัลลีลชนิดใดของ 5-HTTLPR แม้ว่าจะพบความถี่ของจีโนไทป์ชนิด L/L กับ L อัลลีลสูงขึ้นเล็กน้อยในกลุ่มผู้ป่วยก็ตาม
Gaysina และคณะ (2006)	Attempted Suicide	Russian	พบความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR ชนิด L/L (p=0.013) และ L10 haplotype (p=0.04) เฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยเพศหญิงเท่านั้น

จากรายงานการศึกษาในตารางที่ 2.6 จะเห็นว่าจนถึงปัจจุบันนี้ได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับ

พฤติกรรมการฆ่าตัวตายเกิดขึ้นอย่างมากมาย แต่ผลการศึกษาที่ได้นั้นก็กลับไม่สอดคล้องหรือเป็นไปในทางเดียวกัน ถึงแม้ว่าผลการศึกษาส่วนใหญ่จะรายงานว่าไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับพฤติกรรมการฆ่าตัวตาย (81, 101, 147, 189-196) แต่มีบางการศึกษาที่รายงานความสัมพันธ์ดังกล่าว อย่างไรก็ตามยังคงมีความแตกต่างของความสัมพันธ์อยู่ด้วย โดยขณะที่มี 4 การศึกษาพบความสัมพันธ์ของ 5-HTTLPR ชนิด L (20, 197-199) อีก 9 การศึกษากลับพบความสัมพันธ์ของ 5-HTTLPR ชนิด S (94, 100, 200-206) นอกจากนี้ในปี 2004 Lin และคณะ (207) ได้ทำการศึกษายืนยันความสัมพันธ์ต่างๆ ที่พบระหว่าง 5-HTTLPR กับพฤติกรรมการฆ่าตัวตายด้วยการทำ Meta-analysis จากการศึกษาที่ผ่านมา โดยได้รวบรวมผลการศึกษาของงานวิจัยต่างๆ แล้วนำมาจำแนกตามเกณฑ์ที่กำหนดเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่างๆ รวมถึงเรื่องของการเชื้อชาติด้วย อย่างไรก็ตามผลการศึกษา Meta-analysis ที่รวบรวมเฉพาะผลการศึกษาจากเชื้อชาติ Caucasian ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีลและจีโนไทป์ของ 5-HTTLPR กับพฤติกรรมการฆ่าตัวตาย ($p=0.294$ และ 0.180 ตามลำดับ) แต่หากทำการศึกษาโดยเปรียบเทียบระหว่าง suicide attempter กับ non-suicide attempter ในกลุ่มประชากรที่มีภาวะทางจิตประสาทต่างๆ เช่น โรคอารมณ์แปรปรวน โรคจิตเภทหรือภาวะ alcohol dependence แล้วจะพบว่าความถี่ของ S อัลลีลสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในผู้ที่พยายามฆ่าตัวตาย (suicide attempter) ($p=0.004$) และยังสัมพันธ์กับการฆ่าตัวตายด้วยวิธีรุนแรง (violent suicide) ($p=0.0001$) อีกด้วย ผลการศึกษาที่ขัดแย้งต่างๆ เหล่านี้ อาจเนื่องมาจากข้อจำกัดของงานวิจัยบางประการที่นอกเหนือจากขนาดของกลุ่มตัวอย่างและเชื้อชาติแล้ว อาจเกี่ยวข้องกับลักษณะการฆ่าตัวตายและระดับความรุนแรงในการฆ่าตัวตายของผู้ป่วยที่ในบางการศึกษาไม่ได้จำแนกไว้ด้วย นอกจากนี้การที่เคยมีรายงานการศึกษามากมายที่บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับโรคหรือความผิดปกติทางจิตประสาทอื่นๆ เช่น โรคซึมเศร้า โรคจิตเภท เป็นต้น ทำให้คาดว่าความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับพฤติกรรมการฆ่าตัวตายที่พบนั้น เป็นไปได้ว่าอาจจะมาจากความสัมพันธ์กับลักษณะดังกล่าวนี้มากกว่าที่จะมาจากพฤติกรรมการฆ่าตัวตายโดยตรงได้

2.8.7 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคสมองเสื่อม (Dementia)

ลักษณะที่สำคัญของผู้ป่วยโรคนี้คือผู้ป่วยมีความบกพร่องใน การรับรู้ การเข้าใจ (cognitive function) รวมทั้งสูญเสียความจำด้วย สาเหตุเนื่องจากการถูกทำลายหรือเกิดโรคที่สมองบริเวณที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับเรื่องของความจำ (memory) ความเอาใจใส่ (attention) ภาษา (language) และการแก้ปัญหา (problem solving) เป็นต้น อาการต่างๆ ของโรคสมองเสื่อมนี้มีทั้งชนิดที่สามารถรักษาให้หายและไม่มีทางรักษาหายได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคสมอง

เสื่อมมนั้ๆ อย่งไรก็ตามมีเพียงผู้ป่วยน้อยกว่า 10% ที่สามารถรักษาให้หายจากโรค ดังนั้นโรคสมองเสื่อมจะแบ่งได้ออกเป็นหลายชนิดขึ้นอยู่กับสาเหตุของโรค โดยชนิดที่พบได้บ่อยที่สุดคือมีสาเหตุมาจากโรคอัลไซเมอร์ (alzheimer's disease) ซึ่งเป็นโรคที่มีการถูกทำลายของเซลล์ประสาทจำนวนมาก (neuro-degenerative disease) รองลงมาคือชนิดที่มีสาเหตุจากโรคหลอดเลือดสมอง (vascular dementia) และชนิดที่พบได้น้อยคือโรคพาร์กินสัน (parkinson's disease) เป็นต้น อุบัติการณ์ของโรคนี้ส่วนใหญ่จะพบในกลุ่มผู้สูงอายุ โดยชนิดที่พบบ่อยคือโรคอัลไซเมอร์ และโรคหลอดเลือดสมอง พบได้น้อยในเด็กและวัยรุ่นซึ่งมักมีสาเหตุจากการที่ศีรษะได้รับบาดเจ็บ มีเนื้องอกในสมอง โรคเอดส์และโรคหลอดเลือดสมอง (126) ในการศึกษาความสัมพันธ์กับความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR นั้น มักพบว่ามีความสัมพันธ์กับ S อัลลีล (19, 208-210) โดยอาจเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดภาวะ late-onset Alzheimer's (AD) disease และมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะซึมเศร้าซึ่งเป็นอาการที่พบได้บ่อยในโรคพาร์กินสัน (19) แม้จะมีบางการศึกษาไม่สามารถพบความสัมพันธ์ดังกล่าว (211, 212) อาจเนื่องจากขนาดของกลุ่มตัวอย่างและความแตกต่างทางด้านเชื้อชาติ รวมถึงเกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกผู้ป่วยของแต่ละการศึกษาด้วย เช่น การศึกษาของ Hu และคณะ (208) ที่คัดเลือกผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์เฉพาะที่มีอาการรุนแรงเท่านั้น

2.8.8 การศึกษา 5-HTTLPR กับความผิดปกติของการรับประทานอาหาร (eating disorders)

ความผิดปกติของการรับประทานอาหาร (eating disorders) นั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ โรคอะนอเรเซีย (anorexia nervosa) กับโรคบูลิเมีย (bulimia nervosa) (126)

โรคอะนอเรเซีย (anorexia nervosa) ลักษณะที่สำคัญของผู้ป่วยโรคนี้คือผู้ป่วยปฏิเสธที่จะรับประทานอาหารเพื่อควบน้ำหนักปกติไว้ โดยที่ผู้ป่วยจะมีทัศนคติที่ผิดปกติเกี่ยวกับเรื่องรูปร่างและน้ำหนักตัว โรคนี้จะแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ restricting type หมายถึงผู้ป่วยจะลดน้ำหนักด้วยวิธีการลดปริมาณอาหาร หรือออกกำลังกายอย่างหนัก กับ binge-eating/purging type หมายถึงผู้ป่วยจะมีการรับประทานอาหารมากผิดปกติเป็นช่วงๆ แล้วจะทำให้อาเจียนหรือใช้ยาระบายหรือยาขับปัสสาวะหรือทั้งสองอย่างเพื่อทำให้น้ำหนักลด โดยผู้ป่วยจะมีพฤติกรรมดังกล่าวอย่างน้อยสัปดาห์ละครั้ง

โรคบูลิเมีย (bulimia nervosa) ลักษณะที่สำคัญของผู้ป่วยโรคนี้คือผู้ป่วยจะรับประทานอาหารมากผิดปกติเป็นช่วงๆ แล้วใช้วิธีที่ไม่เหมาะสมเพื่อไม่ให้น้ำหนักตัวเพิ่ม เช่น ทำให้อาเจียน

ใช้ยาระบายหรือยาขับปัสสาวะ อดอาหาร หรือออกกำลังกายอย่างหนัก โดยที่ผู้ป่วยจะมีทัศนคติที่ผิดปกติเกี่ยวกับเรื่องของรูปร่างและน้ำหนักตัวคล้ายกับผู้ป่วยโรคอะนอเรคเซีย คือกลัวน้ำหนักตัวเพิ่ม มีความปรารถนาที่จะลดน้ำหนัก และมีความพอใจอย่างมากถ้าน้ำหนักตัวเพิ่ม โรคนี้จะแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ purging type หมายถึงผู้ป่วยใช้วิธีทำให้อาเจียน ใช้ยาระบายหรือยาขับปัสสาวะ กับ nonpurging type หมายถึงผู้ป่วยใช้วิธีอดอาหาร หรือออกกำลังกายอย่างหนักแทน นอกจากนี้ทั้งโรคอะนอเรคเซียและโรคบูลิเมียมักจะพบว่ามีอาการซึมเศร้าร่วมด้วย

สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับความผิดปกติของการรับประทานอาหาร เช่น โรคอะนอเรคเซีย กับ โรคบูลิเมีย นั้น ส่วนใหญ่แล้วผลการศึกษาที่ได้ไม่พบความสัมพันธ์กับโรค (213-217) แต่มีบางการศึกษา รายงานถึงความสัมพันธ์กับ S อัลลีล โดย Fumeron และคณะ (218) พบความถี่ของจีโนไทป์ชนิด S/S สูงในผู้ป่วยโรคอะนอเรคเซียอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และ Di Bella และคณะ (219) รายงานว่าพบความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับโรคอะนอเรคเซียและโรคบูลิเมียด้วย อย่างไรก็ตามผลของทั้งสองการศึกษานี้ อาจเป็นผลบวกปลอมได้ เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างที่ใช้มีขนาดค่อนข้างเล็ก ทำให้ในปีล่าสุดได้มีการศึกษาถึงลักษณะอาการของทั้งสองโรค และพบว่า 5-HTTLPR นั้นมีความสัมพันธ์กับอาการจำเพาะทางคลินิก พฤติกรรมและทัศนคติของโรคที่มีความผิดปกติของการรับประทานอาหารโดยเฉพาะชนิด S อัลลีล (220) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบความถี่ของจีโนไทป์ชนิด L/L และ L อัลลีลสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วย binge eating disorder ด้วย (221) จะเห็นได้ว่าการศึกษา 5-HTTLPR กับโรคในกลุ่มนี้ไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ได้แน่ชัด เนื่องจากยังมีการศึกษาอยู่ค่อนข้างน้อย

2.8.9 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคสมาธิสั้น (attention deficit hyperactive disorder)

โรคสมาธิสั้น (attention deficit hyperactive disorder, ADHD) จัดเป็นโรคทางจิตเวชเด็ก เป็นภาวะที่เด็กมีสมาธิความสนใจในสิ่งต่างๆ สั้นและมีภาวะไม่อยู่นิ่ง ถูกตั้งให้เบี่ยงเบนได้ง่าย หรือชนมากกว่าเด็กทั่วไปตามอายุ มักจะเห็นอาการก่อนอายุ 7 ปี ซึ่งแต่เดิมเข้าใจว่าเป็นความผิดปกติของสมองที่เรียกว่า minimal brain damage เด็กที่เป็นโรคนี้จะมีผลกระทบต่อการเรียนรู้ การทำกิจกรรมและสังคม โดยเด็กจะมีอาการต่างๆ ได้แก่ อาการสมาธิสั้น (inattention) เช่น ไม่ใส่ใจในรายละเอียดเวลาทำงานหรือเรียน หรือการทำกิจกรรมต่างๆ มักทำผิดพลาดๆ ไม่ค่อยระวัง เดินเล่น ขี้ลืม ทำของหายบ่อย วอกแวกตามสิ่งเร้าภายนอกง่าย อาการชนไม่อยู่นิ่ง (hyperactivity) เช่น นั่งนิ่งๆ ไม่ได้ ต้องลุกเดินหรือขยับตัวไปมา เล่นเสียงดัง เล่นผาดโผน หรือทำกิจกรรมเสี่ยงอันตราย พูดคุยตลอด พูดไม่หยุด และอาการหุนหันพลันแล่น (impulsivity) เช่น

ว่าความ ใจร้อน ตอบสนองต่อสิ่งเร้าโดยไม่ได้คิด ขาดความระมัดระวัง รอคอยไม่ได้ พุดแทรกในเวลา ที่ผู้อื่นพูดคุยกัน เป็นต้น (103) สาเหตุของโรคนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด มีผู้กล่าวถึงทั้งสาเหตุทาง พันธุกรรมและความบกพร่องของระบบสารสื่อประสาท เช่น ซีโรโทนิน ซึ่งจากผลการศึกษาที่ผ่านมา นั้น อาจจะสามารถบ่งชี้ได้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับโรคซึมเศร้าได้ เริ่มต้นจากการศึกษาที่มีการพบความสัมพันธ์ระหว่าง L อัลลีลกับโรค hyperkinetic (222) และพบว่ามี การเพิ่มขึ้นของ L อัลลีลในผู้ป่วยโรคซึมเศร้า (223) สอดคล้องกับที่พบการลดลงของจีโนไทป์ชนิด S/S ในกลุ่มผู้ป่วยมากกว่ากลุ่มควบคุม (224) ด้วย นอกจากนี้ Beithman และคณะ (129) ยังได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ในเด็กพฤติกรรม ก้าวร้าวที่เป็นและไม่เป็นโรคซึมเศร้า แล้วพบว่าผลการทดลองที่ได้สนับสนุนความสัมพันธ์ ระหว่าง 5-HTTLPR กับโรคซึมเศร้า โดยที่เด็กพฤติกรรมก้าวร้าวที่เป็นโรคซึมเศร้าจะมี จีโนไทป์ชนิด L/L หรือ S/L สูงกว่าเด็กที่ไม่เป็นโรคอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.04$) รวมถึงการศึกษา ของ Davidge และคณะ (130) ที่สนับสนุนความสัมพันธ์ดังกล่าวด้วย ($p=0.025$) อย่างไรก็ตาม ควรจะมีการศึกษาต่อไปโดยเฉพาะในกลุ่มตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากยังมีการศึกษาอยู่ ก่อนข้างน้อย แม้ว่าผลการศึกษาที่ได้จะสอดคล้องไปในทางเดียวกันก็ตาม

2.8.10 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคออทิสซึม (autism, autistic disorder)

โรคออทิสซึม (autism, autistic disorder) เป็นโรคที่มีความผิดปกติของการพัฒนาการ ของระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งก็คือมีความผิดปกติในด้านพัฒนาการอย่างรอบด้าน จะแสดง อาการอย่างชัดเจนในวัยเด็ก ก่อให้เกิดพัฒนาการทางด้านความสัมพันธ์ทางสังคมและการสื่อสาร ที่ไม่เป็นไปตามปกติ ส่งผลให้มีพฤติกรรมความสนใจ และกิจกรรมที่ผิดปกติได้ ดังนั้นเด็กออทิสติก จึงเป็นเด็กที่มีความผิดปกติทางพัฒนาการด้านสังคม ภาษา และการสื่อความหมาย พฤติกรรม อารมณ์ และจินตนาการ ซึ่งมีสาเหตุเนื่องมาจากการทำงานในหน้าที่บางส่วนของสมองผิดปกติไป และความผิดปกตินี้จะพบได้ก่อนวัย 30 เดือน สำหรับสาเหตุของโรคนี้ยังไม่มีผู้ใดสามารถสรุปได้ ว่า อะไรคือสาเหตุที่แท้จริงที่ทำให้เด็กเป็นออทิสติก แม้ว่าจากการวิจัยใหม่ๆ จะพบว่ามีความ ผิดปกติของโครงสร้างและหน้าที่ของระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งมีปัจจัยเกี่ยวข้องกับเรื่องไวรัส กรรมพันธุ์ และการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีในร่างกายด้วยก็ตาม สำหรับการศึกษาร่วมกันระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับโรคออทิสซึมที่ผ่านมา ในอดีตนั้น ส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาแบบ Family-based ด้วยวิธี Transmission Disequilibrium Test (TDT) ซึ่งผลการศึกษาที่ได้้นอกจากจะไม่สอดคล้องกันแล้วยังมีความขัดแย้งกันอีกด้วย เริ่ม จากการศึกษาร่วมกันของ Cook และคณะ (225) ที่รายงานว่ามี การเพิ่มขึ้นของ transmission ของ S

อัลลีล ($p=0.03$) แต่กลับไม่พบความสัมพันธ์ในการศึกษาต่อมา (226-228) อีกทั้งยังมีบางการศึกษาที่รายงานความสัมพันธ์ตรงกันข้าม นั่นคือพบการเพิ่มขึ้นของ transmission ของ L อัลลีลด้วย (229, 230) อย่างไรก็ตามมีรายงานเพิ่มเติมว่า transmission ของอัลลีลใน 5-HTTLPR เหล่านี้สัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของอาการของโรค (231) และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษาที่สนับสนุนการศึกษาแรกของ Cook และคณะที่พบ transmission ของ S อัลลีลเกิดขึ้นตามมาด้วย (232-234) แม้ว่าจะมีบางการศึกษารายงานว่าไม่พบความสัมพันธ์ใดๆ ก็ตาม (235-240) แต่ล่าสุด Guhathakurta และคณะ (237) ก็ได้ทำการศึกษาแบบ meta-analysis จากการศึกษาความสัมพันธ์ของ 5-HTTLPR กับโรคออทิสซึมที่ผ่านมาและพบว่า transmission ของ S อัลลีล อย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.006$) และยิ่งอาจสัมพันธ์กับอาการที่จำเพาะในเด็กออทิสติกด้วย (241)

2.8.11 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคปวดศีรษะไมเกรน (migraine)

อาการปวดศีรษะไมเกรน (migraine) นั้นจัดเป็นความผิดปกติในกลุ่มโรคทางกายที่มีสาเหตุมาจากจิตใจ (psychosomatic disorders) ซึ่งภาวะทางจิตใจสามารถทำให้เกิดโรคทางกายได้หลายชนิด โดยมักผ่านการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติและฮอโมน อาการปวดศีรษะถือเป็นอาการที่พบบ่อยมากที่สุดอาการหนึ่ง เนื่องจากมีสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการนี้ได้มากมายแต่การตรวจร่างกายแล้วพบสาเหตุนั้นกลับพบได้ไม่บ่อย ทำให้เกิดความไม่สบายใจทั้งกับแพทย์และตัวผู้ป่วยเอง เชื่อกันว่าสาเหตุส่วนใหญ่ของโรคนี้อาจเกิดจากอารมณ์และความเครียด เช่น ภาวะซึมเศร้าจะมากกระตุ้นให้เกิดอาการต่างๆ ขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าอาการปวดศีรษะชนิดไมเกรนมักมีปัจจัยทางพันธุกรรมมาเกี่ยวข้องถึง 2 ใน 3 ของผู้ป่วยด้วย (103) อาการปวดศีรษะไมเกรนมีหลายชนิดแต่ชนิดที่พบได้บ่อยคือชนิดที่ไม่มี aura มีการพบหลักฐานที่แสดงว่าซีโรโทนินอาจมีบทบาทสำคัญในโรคนี้ได้ โดยพบว่าในผู้ป่วยไมเกรนจะมีระดับของซีโรโทนินในพลาสมาต่ำลง และมีเมตาบอลิท์ของซีโรโทนินสูงขึ้น (242) แต่ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับอาการปวดศีรษะไมเกรนในช่วงแรกๆ ได้ผลค่อนข้างไม่คงที่ โดยที่การศึกษาหนึ่งไม่พบความสัมพันธ์กับอัลลีลชนิดใด (243) และก็ไม่พบความสัมพันธ์ในการศึกษาต่อมาเช่นกัน แม้ว่าความถี่ของ attacks จะพบได้บ่อยในผู้ป่วยที่มี S อัลลีล (244) อีกการศึกษากลับพบความสัมพันธ์ของ S อัลลีล ($p=0.049$) ในผู้ป่วยไมเกรนเพศหญิง (245) อาจเพราะขนาดของกลุ่มตัวอย่างและชนิดของไมเกรนที่ศึกษาด้วยสังเกตว่าการศึกษาที่กล่าวมานั้น ไม่ได้มีการแยกชนิดของไมเกรนออกเป็นชนิดที่มีและไม่มี aura เนื่องจากความชุกของโรคไมเกรนชนิดที่มี aura จะต่ำกว่าชนิดไม่มี aura โดยจากการศึกษาของ Marziniak และคณะ (86) ซึ่งเป็นการศึกษาแรกที่ทำการแยกชนิดของไมเกรนนั้นพบว่าความถี่ของ

S อัลลีลจะเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยชนิดที่มี aura เท่านั้น ($p < 0.001$) จะเห็นว่าเป็นชนิดของไมเกรนที่พบได้น้อย ด้วยสาเหตุนี้อาจทำให้ไม่สามารถตรวจพบความสัมพันธ์กับ 5-HTTLPR ในการศึกษา ก่อนหน้านี้ได้ ข้อสันนิษฐานดังกล่าวได้ถูกสนับสนุนจากการศึกษาต่อมา (246) อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดเนื่องจากยังมีผลการศึกษาที่ขัดแย้งอยู่ด้วย (170)

2.8.12 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคลำไส้แปรปรวน (irritable bowel syndrome)

โรคลำไส้แปรปรวน (irritable bowel syndrome, IBS) เป็นโรคเรื้อรังที่มีลักษณะของความผิดปกติในการทำหน้าที่ของลำไส้ จะมีอาการเจ็บปวดบริเวณช่องท้อง โดยที่ไม่มีอาการทางกายของอวัยวะอื่นร่วมด้วย (functional gastrointestinal disorder, FGID) ผู้ป่วย IBS มักมีอาการท้องผูกสลับกับท้องเสีย ปวดท้อง มีลมในทางเดินอาหารมากอย่างรวดเร็วโดยไม่สัมพันธ์กับชนิดของมื้ออาหาร การติดเชื้อหรือการใช้ยา มีรายงานว่าพบอุบัติการณ์ของโรคนี้ประมาณ 20% ของประชากรในประเทศที่พัฒนาแล้ว (247) และมีความชุกของโรคประมาณ 3-15% ของประชากรทั่วไปในประเทศแถบตะวันตก (248) มักพบได้บ่อยในเพศหญิง อย่างไรก็ตามสาเหตุของโรคนี้ยังคงไม่ทราบแน่ชัด เนื่องจากมีหลายปัจจัยที่มาเกี่ยวข้องทั้งทางด้านสิ่งแวดล้อมและทาง ด้านพันธุกรรม อีกทั้งภาวะทางจิตใจก็สามารถทำให้เกิดโรคทางกายได้เช่นกัน โดยมักผ่านการทำงาน ของระบบประสาทอัตโนมัติและฮอร์โมน พบว่าลำไส้ใหญ่ของคนที่เป็นโรคนี้จะมีความไวกว่าปกติ ต่อสารต่างๆ และความเครียด ทำให้โรคลำไส้แปรปรวน IBS นี้ถูกจัดเป็นโรคในกลุ่มโรคทางกายที่มีสาเหตุมาจากจิตใจ (psychosomatic disorders) เช่นเดียวกับโรคปวดศีรษะไมเกรน(103) และสามารถแบ่งย่อยออกได้ 3 ชนิดตามลักษณะของอาการ ได้แก่ โรค IBS ชนิดที่มีอาการท้องเสีย เป็นลักษณะเด่น (diarrhea-predominant, D-IBS) โรค IBS ชนิดที่มีอาการท้องผูกเป็นลักษณะเด่น (constipation-predominant, C-IBS) และโรค IBS ชนิดท้องเสียสลับกับท้องผูก (alternating diarrhea and constipation, A-IBS) จากการศึกษาที่ผ่านมามีหลักฐานมากมายที่สนับสนุนว่า ซีโรโทนินอาจมีบทบาทสำคัญในการเกิดพยาธิสรีรวิทยาของโรค IBS ได้ เช่นในปี 2001 พบว่าหนูที่ถูก knockout การแสดงออกของยีนที่สร้าง SERT จะมีอาการท้องเสีย สัมพันธ์กับการเคลื่อนไหวของลำไส้ที่มากและรวดเร็วขึ้น ส่งผลให้มีการขับน้ำออกมาในอุจจาระมากขึ้น(249) ต่อมาในปี 2003 Houghton และคณะพบความแตกต่างของระดับซีโรโทนินในผู้ป่วยกับคนปกติ โดยความเข้มข้นของซีโรโทนินในพลาสมาจะเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วย D-IBS เพศหญิงภายหลังจากการรับประทานมื้ออาหาร (250) สอดคล้องกับผลการศึกษาเบื้องต้นในปี 1998 (251) ในปีเดียวกันนี้ยังพบว่าความรุนแรงของอาการในผู้ป่วย D-IBS สัมพันธ์กับการลดลงของความสามารถในการดูดกลับของ SERT (252) นอกจากนี้ยังพบการลดลงของระดับซีโรโทนินใน mucosal, mRNA ของ

SERT และ SERT immunoreactivity อย่างมีนัยสำคัญในโรค D-IBS และ C-IBS ด้วย แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ enterochromaffin (253) การศึกษาล่าสุดยังพบอีกว่าหนูที่ถูกยับยั้งการทำงานของ SERT ด้วยยา paroxetine นั้นจะมีการขับอุจจาระลดลง และการเคลื่อนไหวในทางเดินอาหารส่วนบนจะช้าลงด้วย (254) จากหลักฐานต่างๆ เหล่านี้ทำให้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับโรค IBS เริ่มจากการศึกษาแรกในชาวตุรกีพบว่าจีโนไทป์ชนิด S/L จะสัมพันธ์กับโรค D-IBS และจีโนไทป์ชนิด S/S จะสัมพันธ์กับโรค C-IBS (77) ขณะที่การศึกษาในเชื้อชาติอเมริกันกลับพบว่า จีโนไทป์ชนิด S/S จะสัมพันธ์กับโรค D-IBS แทน (255) เช่นเดียวกันกับผลการศึกษาล่าสุดในชาวเกาหลี (76) แม้ว่าจะไม่พบความสัมพันธ์ของบางการศึกษาในผู้ป่วยเชื้อชาติเดียวกันก็ตาม (72, 256) ยิ่งกว่านั้นยังมีบางการศึกษาที่รายงานว่าจีโนไทป์ชนิด L/L มีความสัมพันธ์กับโรค C-IBS ในผู้ป่วยชาวจีนด้วย (71, 257) จากการศึกษาที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าแม้จะมีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับโรค IBS ก็ตาม แต่ก็ยังคงมีความขัดแย้งกันอยู่ อาจเนื่องจากข้อจำกัดของงานวิจัย ที่นอกเหนือจากเรื่องขนาดกลุ่มตัวอย่างแล้ว ความแตกต่างในการกระจายของจีโนไทป์และอัลลีลของแต่ละเชื้อชาติ ดูเหมือนว่าจะมีความสำคัญอย่างยิ่ง รวมถึงความชุกของโรคที่แตกต่างกันไปในแต่ละประเทศด้วย (258)

2.8.13 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease)

โรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) คือกลุ่มโรคหรือความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับหัวใจและหลอดเลือดหัวใจ เช่น ความดันโลหิตสูง โรคเจ็บหน้าอกเนื่องจากหัวใจขาดเลือด (angina pectoris) โรคกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน (acute myocardial infarction) มีการตั้งสมมติฐานว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR น่าจะมีความสัมพันธ์กับโรคนี้ เนื่องจากซีโรโทนินมีบทบาทสำคัญในระบบหัวใจและหลอดเลือด เช่น ช่วยกระตุ้นการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดในกระบวนการแข็งตัวของเลือด การหดตัวของหลอดเลือด และ hyperplasia ของ pulmonary artery smooth muscle cell (PA-SMCs) (259-261) เป็นต้น โดยเฉพาะบทบาทในเรื่อง hyperplasia นี้สามารถนำไปสู่การเกิด pulmonary hypertension (PH) ในผู้ป่วย advanced chronic obstructive pulmonary disease (COPD) ที่มีภาวะ hypoxia ได้ (262) ซึ่งพบว่าภาวะ pulmonary hypertension ของผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด L/L จะรุนแรงกว่าในจีโนไทป์ชนิด S/L และ S/S สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า L อัลลีลสัมพันธ์กับการเกิด hyperplasia ของ PA-SMCs ด้วย (261) นอกจากนี้บทบาทของซีโรโทนินในเกล็ดเลือดอาจนำไปสู่การเกิดลิ่มเลือด และบอกเป็นนัยๆ ถึงการเกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจตายได้ (263) ดังผล

การศึกษาที่พบว่าจีโนไทป์ชนิด L/L สัมพันธ์กับความเครียดที่เพิ่มขึ้นของการเกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจตาย (264, 265) โรคหัวใจและหลอดเลือดสามารถจัดอยู่ในกลุ่มโรคทางกายที่มีสาเหตุมาจากจิตใจ (psychosomatic disorders) ได้เช่นเดียวกับโรคปวดศีรษะไมเกรนและโรคลำไส้แปรปรวน (103) เนื่องจากการศึกษาถึงการตอบสนองของระบบหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular responses) ต่อการเปลี่ยนแปลงของภาวะทางจิตใจกับความสัมพันธ์กับ 5-HTTLPR พบว่าจีโนไทป์ชนิด L/L และ S/L จะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของความดันโลหิต และการตอบสนองของอัตราการเต้นของหัวใจต่อภาวะเครียดด้วย (266) ตรงข้ามกับการศึกษาของ McCaffery และคณะที่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวในจีโนไทป์ชนิด S/S แทน (267) อย่างไรก็ตาม การเพิ่มขึ้นของการตอบสนองของระบบหัวใจและหลอดเลือดนี้ อาจจะนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของความดันโลหิต การเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง หรือโรคเส้นเลือดในสมองตีบได้

2.8.14 การศึกษา 5-HTTLPR กับโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis)

โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) เป็นโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรังที่เกิดจากระบบภูมิคุ้มกันมีความบกพร่อง ทำให้เซลล์ผิวหนังกำพำแบ่งตัวเร็ว (hyperproliferative keratinocytes) จนส่งผลให้ผิวหนังตัวขึ้นและเป็นขุย เชื่อกันว่าโรคนี้เกิดจากมีสาเหตุหลายปัจจัยประกอบกัน ซึ่งไม่ได้เกิดจากเชื้อโรค สารเคมี ภาวะทางฟิสิกส์ที่เป็นพิษต่อผิวหนังโดยตรงเพียงอย่างเดียวหรือสาเหตุใดสาเหตุหนึ่งเพียงอย่างเดียวเท่านั้น แต่เป็นผลจากพันธุกรรมหรือยีนที่ผิดปกติหลายชนิดร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมทั้งภายในและภายนอกที่ร่างกายที่ไม่เหมาะสมต่างๆ มากกระตุ้นให้โรคปรากฏขึ้น สำหรับกลไกการเกิดหรือการดำเนินของโรคนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างกลไกของโรคกับระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้แนวทางการพัฒนาการรักษาผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินในยุคปัจจุบันจะมุ่งเน้นไปในการรักษาแบบเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory therapy) และมีการศึกษาถึงสารชีวโมเลกุลในระบบภูมิคุ้มกัน ที่มีบทบาทต่อพยาธิสภาพของโรคนี้ ได้แก่ ซีโรโทนิน ซึ่งซีโรโทนินไม่ได้มีบทบาทต่อระบบประสาทเท่านั้น แต่ยังเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีบทบาทสำคัญ ในการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างระบบประสาทและระบบภูมิคุ้มกัน (neuroimmune interaction) ด้วย ความเกี่ยวข้องของซีโรโทนินต่อพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงินนั้นถูกสนับสนุนมากขึ้นเมื่อมีการรายงานว่า ยาต้านโรคซึมเศร้าประเภทที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการส่งกลับของซีโรโทนิน (selective serotonin reuptake inhibitor; SSRI) ให้ผลดีต่อการรักษาโรคสะเก็ดเงิน (268) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับโรคสะเก็ดเงิน แม้ว่าจะมีการศึกษาที่สนับสนุนบทบาทของซีโรโทนินในการเกิดพยาธิสภาพของโรคนี้ก็ตาม (269)

2.9 ชนิดและกลไกของยาที่ใช้รักษาโรคที่มีความผิดปกติของ Serotonergic Pathway

ในด้านการรักษาโรคที่เกิดจากความผิดปกติของกลไกการออกฤทธิ์ของซีโรโทนินนั้น เป้าหมายของยาจะอยู่ที่ขั้นตอนการสร้าง การเก็บสะสม การนำกลับ และการสลายซีโรโทนิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับตัวดูดกลับซีโรโทนิน (SERT) ที่มักเป็นเป้าหมายสำคัญของยาส่วนใหญ่ในการรักษาโรคในกลุ่มนี้ เนื่องจาก SERT เป็นตัวกำหนดระยะเวลาของการที่สัญญาณซีโรโทนินจะคงอยู่ในช่องว่างไซแนปส์ และมีผลทำให้ปริมาณหรือความเข้มข้นของซีโรโทนินที่อยู่ในช่องว่างไซแนปส์นั้นเปลี่ยนแปลงไป แนวทางการรักษาจึงจำเป็นต้องใช้ยาหรือสารที่มีฤทธิ์ไปทำหน้าที่ปรับสมดุลของสารสื่อประสาทซีโรโทนินเหล่านี้ให้กลับมาอยู่ในภาวะปกติ ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายกลไกที่จะไปปรับสมดุลดังแสดงในภาพที่ 2.11 ในกรณีที่ปริมาณซีโรโทนินในช่องว่างไซแนปส์นั้นมีมากเกินไป กลไกที่จะไปลดปริมาณซีโรโทนินลง ได้แก่

- ยับยั้งการเปลี่ยนจากทริปโตเฟน (tryptophan) เป็น 5-hydroxytryptophan (5-HTP) เช่น PCPA (parachlorophenylalanine) มีฤทธิ์สามารถที่จะยับยั้งเอนไซม์ tryptophan hydroxylase
- ยับยั้งการเปลี่ยนจาก 5-HTP เป็นสารซีโรโทนิน เช่น NSD1015 มีฤทธิ์สามารถที่จะยับยั้งเอนไซม์ aromatic amino acid decarboxylase (AADC)

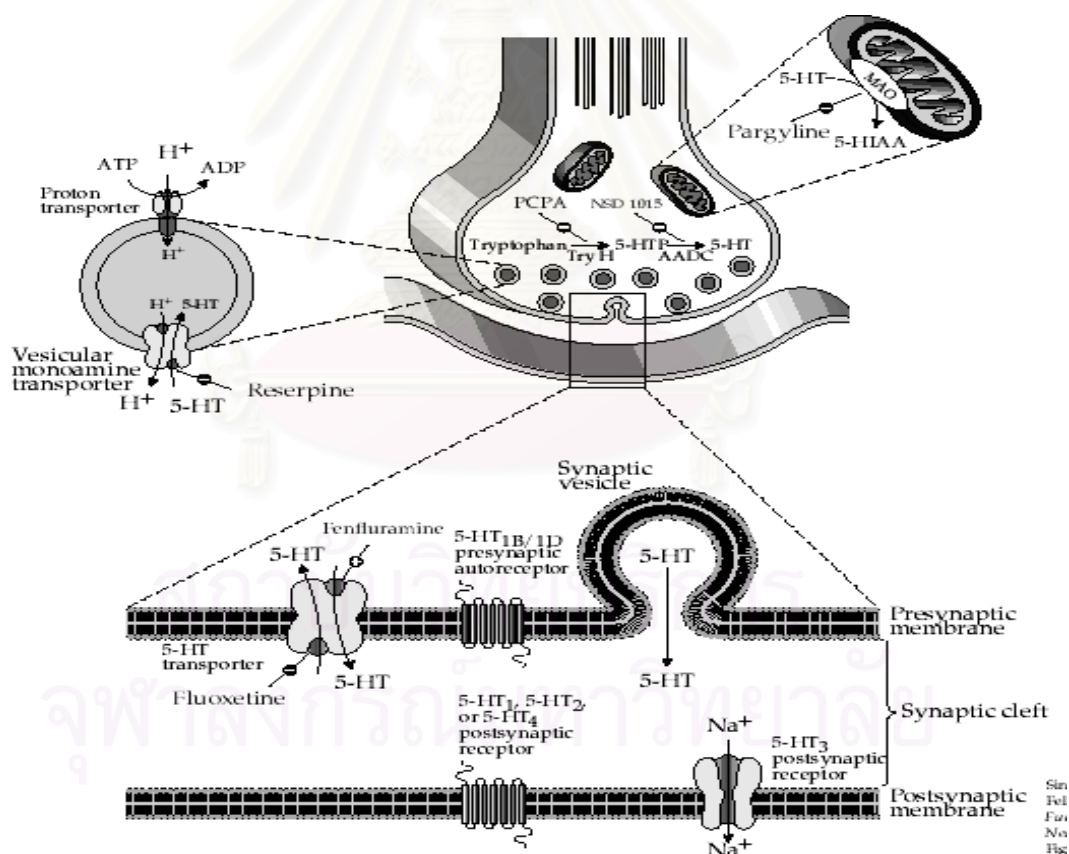
แต่หากปริมาณซีโรโทนินในช่องว่างไซแนปส์นั้นมีน้อยเกินไป ก็จำเป็นต้องอาศัยกลไกในการเพิ่มปริมาณ ซึ่งก็มีอยู่หลายวิธีด้วยกัน ได้แก่

- ยับยั้งการสลายตัวของซีโรโทนินไปเป็นเมทาบอไลต์ (5-HIAA) เช่น MAOIs (monoamine oxidase inhibitors) ซึ่งสามารถยับยั้งเอนไซม์ monoamine oxidase ที่ใช้ในปฏิกิริยาการสลายของ serotonin ได้
- ยับยั้งการนำซีโรโทนินเข้าสู่ถุง (vesicle) โดยยับยั้งการทำงานของตัวขนส่งบนผิวของถุง (VAT) เช่น Reserpine , Tetrabenazine
- ยับยั้งการการทำหน้าที่นำกลับซีโรโทนินของ SERT เช่น MDMA (3,4-methylenedioxy methamphetamine) or ecstasy, cocaine, TCAs (tricyclic antidepressants), SSRIs (selective serotonin reuptake inhibitors) หรือ SRIs

SSRIs (selective serotonin reuptake inhibitors) หรือ SRIs เป็นยากลุ่มที่ใช้ในการรักษามากที่สุด ตัวอย่างเช่น fluoxetine, fluvoxamine, paroxetine, sertraline, citalopram และ escitalopram เป็นต้น โดยจะทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งจำเพาะ (selective inhibitors) ของ SERT บริเวณปลายประสาทของเซลล์ประสาท (presynaptic neurons) และเซลล์อื่นๆ ที่มีการแสดงออก

ของ SERT ส่วน TCAs (tricyclic antidepressants) นั้นเป็นตัวยับยั้งที่จำเพาะน้อยกว่า SSRIs (less-selective reuptake inhibitors) ตัวอย่างเช่น clomipramine, desipramine โดยที่ clomipramine จะมีประสิทธิภาพมากกว่า desipramine และ TCAs ตัวอื่นๆ

นอกจากจะอาศัยกลไกเหล่านี้ในการเพิ่มปริมาณของซีโรโทนินแล้ว ยังสามารถเพิ่มปริมาณได้โดยการรับประทานอาหารที่มีปริมาณทริปโตเฟนหรือ 5-HTP อยู่สูงได้ เช่น ข้าวเหนียว เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะไปเป็นตัวตั้งต้นในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ซีโรโทนินต่อไป แต่ในการบริโภคอาหารที่มีซีโรโทนินอยู่เข้าไปโดยตรงนั้น กลับไม่สามารถไปเพิ่มปริมาณซีโรโทนินในสมองได้ เนื่องจากซีโรโทนินมีส่วนประกอบที่เป็น hydroxyl group ทำให้มันมีคุณสมบัติเป็น hydrophilic substance จึงไม่สามารถที่จะผ่าน blood-brain barrier ที่มีคุณสมบัติเป็น lipophilic เข้าไปสู่ระบบประสาทส่วนกลางได้ โดยหน้าที่ของ blood-brain barrier นั้นจะคอยป้องกันไม่ให้ระดับของซีโรโทนินในกระแสเลือดไปเปลี่ยนแปลงระดับซีโรโทนินในสมอง



รูปที่ 2.11 แสดงกลไกต่างๆ ของยาในการรักษาโรคที่เกิดจากความผิดปกติของ

กลไกการออกฤทธิ์ของซีโรโทนิน (<http://www.chemistry.emory.edu/justice/chem190j/Serotonin2.htm>)

2.10 บทบาทของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา SSRIs

เนื่องจากตัวดูดกลับซีโรโทนิน (SERT) นั้นมักเป็นเป้าหมายสำคัญของยาส่วนใหญ่ที่ใช้ในการรักษาโรคกลุ่มนี้ แต่ยีนที่สร้าง SERT กลับพบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างมาก ซึ่งอาจส่งผลทำให้ผลการรักษาที่ได้แตกต่างกันไปในแต่ละบุคคลรวมถึงเชื้อชาติด้วย ทำให้เริ่มมีความสนใจที่จะศึกษาถึงบทบาทของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ต่างๆ โดยเฉพาะความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR กับการตอบสนองต่อการรักษา เพื่อสามารถนำไปใช้เป็น pharmacogenetic marker สำหรับการทำนายผลการตอบสนองของยาต่างๆ ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง SSRIs ซึ่งมีการใช้กันแพร่หลายที่สุด ดังแสดงตัวอย่างการศึกษาในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 สรุปการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง 5-HTTLPR กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา SSRIs ในโรคซึมเศร้า (major depression)

การศึกษา	เชื้อชาติ	ชนิดของยา SSRIs	ผลการศึกษา
Smeraldi และคณะ(1998)	Italian	Fluvoxamine (6 weeks)	พบว่า L อัลลีลให้ผลตอบสนองต่อการรักษาที่ดีกว่า (p=0.017)
Zanardi และคณะ(2000)	Italian	Paroxetine (4 weeks)	พบว่า L อัลลีลให้ผลตอบสนองต่อการรักษาที่ดีกว่า (p<0.001)
Pollock และคณะ(2000)	US	Paroxetine (12 weeks)	พบว่า L อัลลีลให้ผลตอบสนองต่อการรักษาที่ดีกว่า (p=0.028)
Kim และคณะ(2000)	Korean	Paroxetine และ Fluvoxamine (6 weeks)	พบว่า S อัลลีลให้ผลตอบสนองต่อการรักษาที่ดีกว่า (p=0.007)
Zanardi และคณะ(2001)	Italian	Fluvoxamine (6 weeks)	พบว่า L อัลลีลให้ผลตอบสนองต่อการรักษาที่ดีกว่า (p=0.029)
Rausch และคณะ(2002)	US	Fluoxetine (18 weeks)	พบว่า L อัลลีลให้ผลตอบสนองต่อการรักษาที่ดีกว่า (p<0.005)
Yoshida และคณะ (2002)	Japanese	Fluvoxamine (6 weeks)	พบว่าจีโนไทป์ชนิด S/S ให้ผลตอบสนองต่อการรักษาที่ดีกว่า (p=0.010)
Yu และคณะ(2002)	Taiwanese	Fluoxetine (4 weeks)	พบว่าจีโนไทป์ชนิด L/L ให้ผลตอบสนองต่อการรักษาที่ดีกว่า (p=0.013)
Arias และคณะ (2003)	Spanish	Citalopram (>12 weeks)	พบว่า L อัลลีลให้ผลตอบสนองต่อการรักษาที่ดีกว่า และการมีจีโนไทป์ชนิด S/S จะสัมพันธ์กับผลการรักษาที่แย่ด้วย (p=0.013)

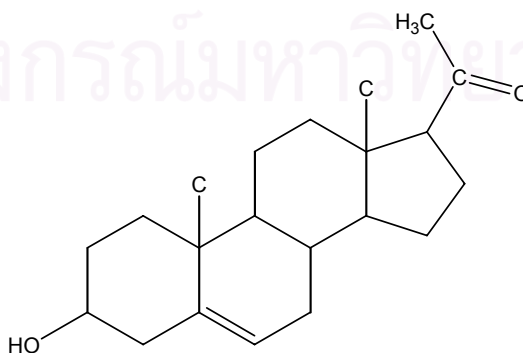
จากการศึกษาในตารางที่ 2.7 เริ่มจากในปี 1998 Smeraldi และคณะ (270) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา fluvoxamine กับความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR พบว่าผู้ป่วยที่มี L อัลลีล จะให้ผลการตอบสนองต่อการรักษาด้วย fluvoxamine ดีกว่าเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่มี S อัลลีล ต่อมาในปี 2000 และ 2001 Zanardi และคณะ (271, 272) ได้ศึกษาผลการตอบสนองต่อยา paroxetine กับ fluvoxamine ตามลำดับ ซึ่งพบว่า L อัลลีลจะสัมพันธ์ต่อผลการตอบสนองของยาที่ดีและเร็วกว่า S อัลลีล หรือแม้แต่ในการศึกษาของ Pollock และคณะ (273) ที่ใช้ยา paroxetine ก็ให้ผลการรักษาเป็นเช่นเดียวกัน รวมถึงในอีกหลายๆ การศึกษาด้วย ได้แก่ การศึกษาของ Rausch และคณะ (274) และ Yu และคณะ (275) ในปี 2002 ที่ศึกษาในยา fluvoxamine ก็พบว่า L อัลลีลนั้นมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วย SSRIs ดีกว่า S อัลลีล ทั้งในผู้ป่วยเชื้อชาติตะวันตกและไต้หวัน นอกจากนี้ Arias และคณะ (276) ยังพบอีกว่าการมีจีโนไทป์ชนิด S/S จะสัมพันธ์กับผลการรักษาที่แย่งด้วย จะเห็นได้ว่าการศึกษาในเชื้อชาติตะวันตกที่ผ่านมาแสดงว่าการมี L อัลลีลให้ผลการตอบสนองต่อยาได้ดีกว่า ซึ่งตรงข้ามกับในเชื้อชาติเอเชียเช่นญี่ปุ่น (277) และเกาหลี (278) ที่พบว่า S อัลลีลจะให้ผลการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา paroxetine และ fluvoxamine ดีกว่าเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่มี L อัลลีล ดังนั้นนอกจากความหลากหลายของยีนแล้ว ความแตกต่างทางด้านเชื้อชาติก็มีความสัมพันธ์กับผลการรักษาด้วย โดยสามารถสรุปได้ว่าอัลลีลที่ให้ผลการตอบสนองต่อการรักษาที่ดีในเชื้อชาติตะวันตกนั้นจะเป็น L อัลลีล ซึ่งตรงกันข้ามกับในเชื้อชาติเอเชียที่เป็น S อัลลีล

นอกจากการใช้ยาในกลุ่ม SSRIs จะช่วยในการรักษาและลดอาการต่างๆ ของโรคแล้ว ยังสามารถช่วยลดความเสี่ยงในพฤติกรรมฆ่าตัวตายได้ด้วย โดยเมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาของ Barak และคณะ (279) พบว่าการรักษาด้วยยาในกลุ่ม SSRIs สามารถลดความเสี่ยงในพฤติกรรมฆ่าตัวตายได้ อย่างไรก็ตามในการใช้ยาก็ยังมีผลข้างเคียงตามมาด้วยเช่นกัน เช่น อาการนอนไม่หลับ (insomnia) ภาวะกระวนกระวายใจ (agitation) และไฮโปแมนเนีย (hypomania) เป็นต้น ดังนั้นโดยสรุปแล้วการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองต่อการรักษา รวมถึงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น กับความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน SERT ต่างๆ โดยเฉพาะความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR นั้น จะมีประโยชน์ในการเลือกให้ยาในการรักษาให้เหมาะสมกับแต่ละบุคคล เพื่อหลีกเลี่ยงภาวะที่ต้องมีการเปลี่ยนยาที่ใช้ในการรักษาไปเรื่อยๆ เมื่อยานั้นไม่ได้ผลด้วย

2.11 สเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone)

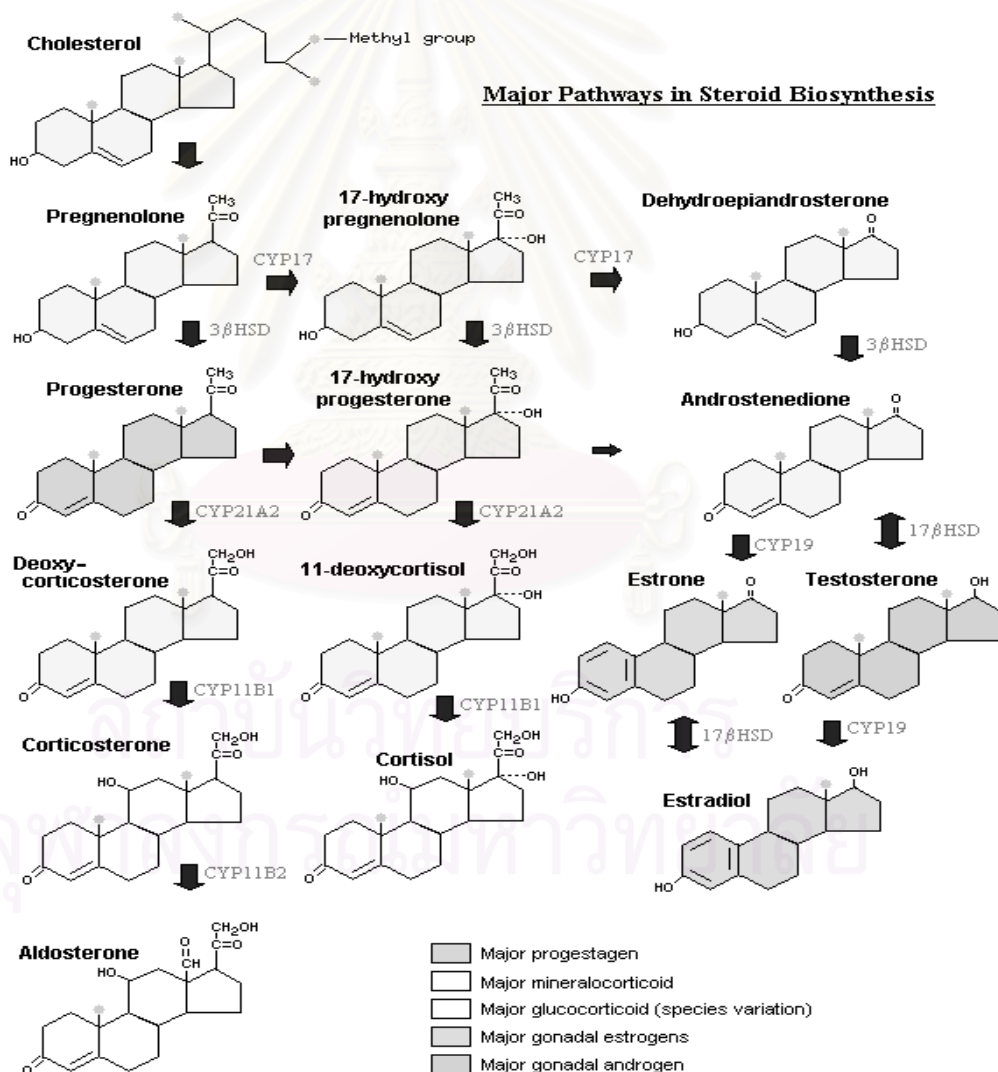
ในร่างกายของมนุษย์เรา ฮอร์โมนจัดเป็นตัวส่งสัญญาณเคมี (chemical messenger) ซึ่งทำหน้าที่คล้ายเป็นข้อความที่ใช้ในการติดต่อสื่อสาร อย่างถูกต้องและมีความจำเพาะต่อชนิดของเซลล์ ระหว่างเซลล์ที่สร้างฮอร์โมน กับเซลล์เป้าหมาย (target cell) ซึ่งอาจจะเป็นเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนนั่นเองได้ เมื่อฮอร์โมนเหล่านี้เดินทางมาถึงยังเซลล์เป้าหมายแล้ว มันจะเข้าจับกับตัวรับสัญญาณฮอร์โมนซึ่งอยู่ที่เซลล์และกระตุ้นให้เกิดการทำงานต่างๆ ต่อไป เพื่อให้เซลล์รวมถึงอวัยวะต่างๆ ในร่างกายสามารถทำงานได้อย่างต่อเนื่อง และเป็นการรักษาภาวะสมดุลของร่างกายด้วย (homeostasis) ตัวรับสัญญาณฮอร์โมนนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ตามชนิดของฮอร์โมน ได้แก่ ตัวรับสัญญาณฮอร์โมนที่อยู่บนผิวเซลล์ (cell surface receptor) สำหรับเปปไทด์ฮอร์โมน (peptide hormone) กับตัวรับสัญญาณฮอร์โมนที่อยู่ภายในเซลล์ (Intracellular receptor) สำหรับสเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) ซึ่งในที่นี้จะขอกล่าวถึงเฉพาะสเตียรอยด์ฮอร์โมนเท่านั้น ฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์นั้นจัดเป็นสารประเภทไขมัน (lipid) และมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด โดยสามารถสร้างได้จากคอเลสเตอรอล (cholesterol) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาการสร้างสเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroidogenesis) ดังนั้นสเตียรอยด์ฮอร์โมนจึงถือเป็นอนุพันธ์ (derivatives) ของคอเลสเตอรอลและสร้างได้จากเนื้อเยื่อหลายชนิด ส่วนใหญ่จะอยู่ที่ต่อมหมวกไต (adrenal gland) และอวัยวะสืบพันธุ์ (gonads) โดยคอเลสเตอรอลที่นำมาสร้างเป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนนั้นมาจากหลายแหล่งด้วยกัน ได้แก่ คอเลสเตอรอลภายในเซลล์ที่ถูกสร้างมาจากอะซีเตต (acetate) จากคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (cholesterol ester) ที่เก็บสะสมไว้ที่หยดไขมันในเซลล์ (intracellular lipid droplets) หรือคอเลสเตอรอลจากการนำกลับ (uptake) ของไลโปโปรตีนประเภท LDL (low density lipoprotein)

โครงสร้างพื้นฐานของสเตียรอยด์ฮอร์โมนทุกชนิด จะมีลักษณะเป็นวงของ cyclopentano perhydrophenanthrene ตัวอย่างเช่นลักษณะของ pregnenolone ดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 แสดงโครงสร้าง cyclopentanoperhydrophenanthrene ring ของ pregnenolone

ในกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biosynthesis) ของสเตียรอยด์ฮอร์โมนนั้น ต้องการเอนไซม์ oxidative ซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (ER, endoplasmic reticulum) ของเซลล์ ปฏิกริยาจะเริ่มจากการที่คอเลสเตอรอลซึ่งเป็นสารตั้งต้น ถูกเปลี่ยนให้เป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนชนิดต่างๆ ด้วยเอนไซม์หลายตัว เช่น aromatase (CYP19), aldosterone synthase (CYP11B2) เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 2.13 โดยขั้นกำหนดอัตราเร็วของปฏิกริยานี้คือการขนส่งคอเลสเตอรอลอิสระ (free cholesterol) จากไซโตพลาสซึมมายังไมโทคอนเดรียและเปลี่ยนให้เป็น pregnenolone ด้วยเอนไซม์ CYP11A1 ซึ่ง pregnenolone นั้นไม่ได้ถือเป็นฮอร์โมนแต่จัดเป็นสารตัวกลาง (immediate precursor) สำหรับการสร้างสเตียรอยด์ฮอร์โมนทุกตัว



รูปที่ 2.13 แสดงปฏิกริยาการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroidogenesis)

((<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/basics/steroidogenesis.htm>)

โดยทั่วไปแล้วสามารถแบ่งสเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) ออกได้เป็น 5 กลุ่มหลักๆ คือ

1. กลุ่มฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoids) เช่น cortisol
2. กลุ่มฮอร์โมนมิเนอรัลโลคอร์ติคอยด์ (mineralocorticoids) เช่น aldosterone
3. กลุ่มฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgens) เช่น testosterone
4. กลุ่มฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) รวมถึง estradiol และ estrone
5. กลุ่มฮอร์โมนโปรเจสโตเจน (progestogens) หรือ progestins เช่น progesterone

หลังจากที่มีการสร้างสเตียรอยด์ฮอร์โมนขึ้นแล้ว มันจะถูกปล่อยออกจากเซลล์อย่างรวดเร็ว โดยอาจเก็บสะสมไว้เพียงเล็กน้อย จากนั้นสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่หลั่งออกมาจะเข้าไปจับกับโปรตีนที่อยู่ในพลาสมา เช่น อัลบูมิน (albumin) แต่การจับกันนี้จะไม่หนาแน่น (low affinity) และไม่จำเพาะด้วย แต่อย่างไรก็ตามสเตียรอยด์ฮอร์โมนบางชนิดอาจถูกขนส่งโดยโปรตีนจำเพาะ เช่น โปรตีน cortisol-binding globulin (CBG) จะจำเพาะกับ cortisol และ progesterone หรือ โปรตีน sex hormone-binding globulin (SHBG) ที่จำเพาะกับ testosterone และเอสโตรเจนเป็นต้น เพื่อไปยังเซลล์เป้าหมาย สุดท้ายแล้วสเตียรอยด์ฮอร์โมนเหล่านี้จะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยการเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้ไม่สามารถทำงานได้ และขับออกนอกร่างกายทางปัสสาวะหรือน้ำดี

กลไกการออกฤทธิ์หรือการทำงานของสเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) นั้นจะต้องอาศัยตัวรับสัญญาณฮอร์โมนที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งอาจมีได้หลายรูปร่างเพื่อเพิ่มความซับซ้อนของการตอบสนองที่เกิดขึ้น โครงสร้างของตัวรับสัญญาณฮอร์โมนจะประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์สายเดี่ยว ดังแสดงในรูปที่ 2.14 โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วนหลักๆ คือ

1. ส่วนปลายอะมิโน (amino-terminus) เกี่ยวข้องในการกระตุ้นการถอดรหัสของยีน โดยจะทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบอื่นๆ ของกลไกการถอดรหัส เช่น transcription factor เป็นต้น ลำดับของกรดอะมิโนในส่วนนี้จะมีความหลากหลายมาก (highly variable) และจะแตกต่างกันไปตามชนิดของตัวรับสัญญาณ
2. ส่วนที่จับกับสายดีเอ็นเอ (DNA binding domain) กรดอะมิโนในบริเวณนี้จะตอบสนองโดยการจับกันของตัวรับสัญญาณกับลำดับเบสที่จำเพาะของยีน
3. ส่วนปลายกรดคาร์บอกซิล (carboxy-terminus) หรือส่วนที่จับกับฮอร์โมน (ligand-binding domain) เป็นส่วนที่จะเข้าจับกับสเตียรอยด์ฮอร์โมน

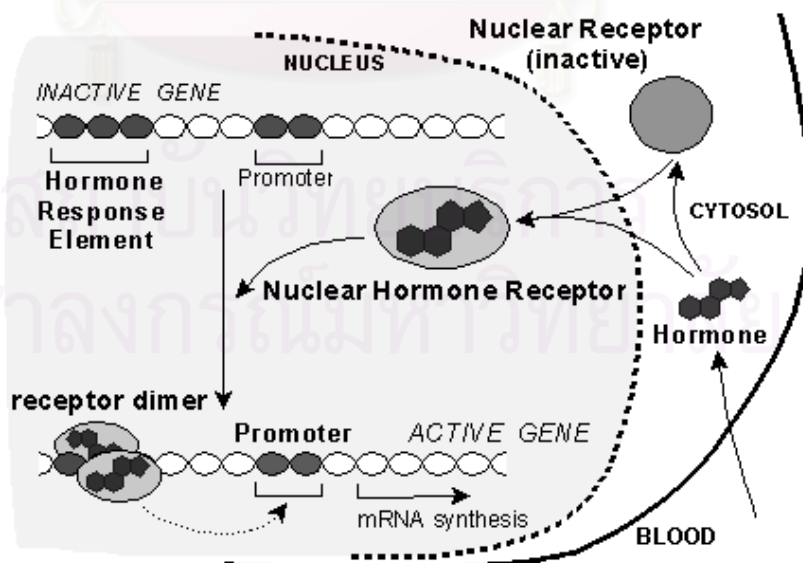


รูปที่ 2.14 แสดงโครงสร้างของตัวรับสัญญาณสเตียรอยด์ฮอร์โมน

(<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/hypopit/acth.htm>)

นอกจากนี้ยังมีอีก 2 ส่วนที่สำคัญ คือ ส่วน nuclear localization sequence ซึ่งจะเป็นส่วนที่ทำหน้าที่นำพาโปรตีนเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ และส่วน dimerization domain ซึ่งจะช่วยในการเข้าคู่กันของตัวรับสัญญาณ 2 ตัว เพื่อเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้เหมาะสมที่จะจับกับสายดีเอ็นเอของยีนได้

หลังจากที่สเตียรอยด์ฮอร์โมนเดินทางมาถึงเซลล์เป้าหมายแล้ว ด้วยคุณสมบัติของไขมันทำให้สเตียรอยด์ฮอร์โมนสามารถที่จะผ่านเข้าสู่เซลล์โดยการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มของเซลล์ (plasma membrane) เข้าไปหาตัวรับสัญญาณฮอร์โมนซึ่งอยู่ทั้งในบริเวณไซโตพลาสซึมและในนิวเคลียสได้ เมื่อเกิดการจับกันระหว่างฮอร์โมนกับตัวรับสัญญาณ (receptor activation) จะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของตัวรับสัญญาณ เพื่อให้เหมาะสมที่จะสามารถจับกับสายดีเอ็นเอของยีน จากนั้นตัวรับสัญญาณที่ถูกกระตุ้นนี้จะไปจับกับส่วน hormone response element (HRE) ซึ่งเป็นลำดับเบสจำเพาะสั้นๆ ของดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณ promoter ของยีน และอาจทำให้เกิดการกระตุ้นหรือยับยั้งการถอดรหัสของยีนเหล่านี้ได้ โดยที่คอมเพลกซ์ระหว่างฮอร์โมนกับตัวรับสัญญาณนี้จะทำหน้าที่เหมือนเป็น transcription factor ในปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 2.15

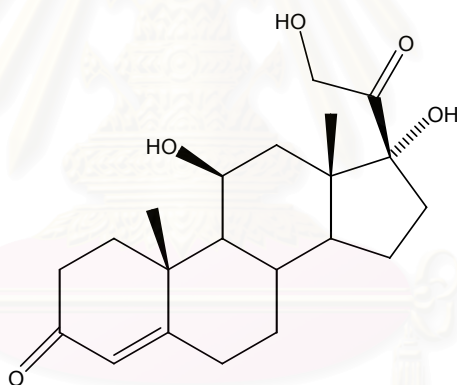


รูปที่ 2.15 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของสเตียรอยด์ฮอร์โมน

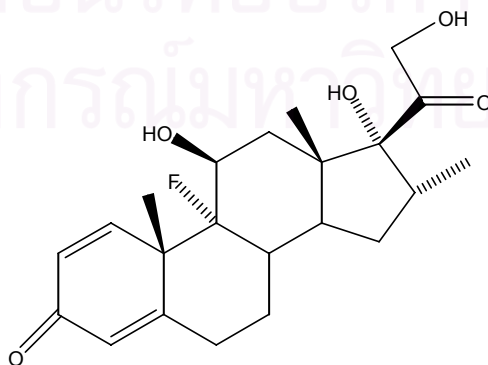
(http://www.zoology.ubc.ca/~auid/bio456/lectures/lecture_intro.htm)

2.11.1 ฮอริโมนกลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoid)

ฮอริโมนกลูโคคอร์ติคอยด์ เป็นสเตียรอยด์ฮอริโมนชนิดหนึ่งสร้างขึ้นที่ต่อมหมวกไตจากการกระตุ้นของฮอริโมน adrenocorticotrophic hormone (ACTH) จากต่อมใต้สมอง (pituitary gland) สามารถแยกจากฮอริโมนมีเนอรัลโคคอร์ติคอยด์ และสเตียรอยด์อื่นๆ ได้ด้วยความจำเพาะของตัวรับสัญญาณฮอริโมน ฤทธิ์ของฮอริโมน และเซลล์เป้าหมาย กลูโคคอร์ติคอยด์ชนิดที่สำคัญมากที่สุดในคนคือ cortisol หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า hydrocortisone ซึ่งบทบาทหน้าที่ของ cortisol นั้นจำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตและสนับสนุนการทำงานในระบบต่างๆ ที่สำคัญมากมายหลายระบบ ได้แก่ ระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบภูมิคุ้มกัน เมแทบอลิซึม และควบคุมสมดุลของร่างกาย นอกจากนี้ยังมีการสังเคราะห์สารที่มีฤทธิ์ของฮอริโมนกลูโคคอร์ติคอยด์ เพื่อใช้ในการรักษาโรคบางชนิดด้วย ซึ่งสารบางตัวมีฤทธิ์มากกว่าฤทธิ์ของ cortisol เช่น dexamethasone และ betamethasone ที่มีฤทธิ์มากกว่า cortisol ถึง 25 เท่า เป็นต้น ดังแสดงโครงสร้างของ cortisol ในรูปที่ 2.16 และโครงสร้างของ dexamethasone ในรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.16 แสดงโครงสร้างของ cortisol



รูปที่ 2.17 แสดงโครงสร้างของ dexamethasone

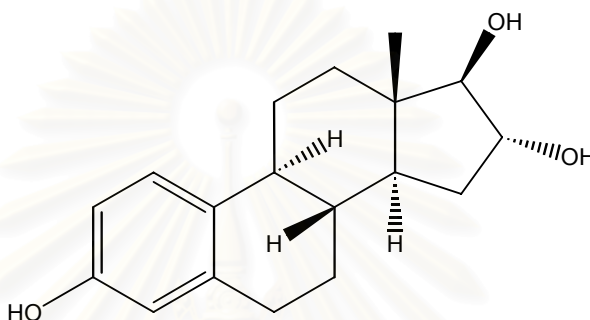
สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์นั้น ก็เป็นเช่นเดียวกับสเตียรอยด์ฮอร์โมนอื่นๆ โดยที่จะแพร่ผ่านเยื่อหุ้มของเซลล์ เข้าไปหาตัวรับสัญญาณฮอร์โมนที่อยู่ภายในเซลล์ เพื่อกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของตัวรับสัญญาณ ให้เหมาะสมที่จะสามารถจับกับสายดีเอ็นเอของยีนในส่วน glucocorticoid response element (GRE) ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5' AGAACA nnnTGGTCT 3' และส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการถอดรหัสของยีน เช่น สามารถยับยั้งการถอดรหัสของยีนในระบบภูมิคุ้มกันบางตัว ได้แก่ ไซโตไคน์ชนิด IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 และ IFN- γ

บทบาทหน้าที่ของกลูโคคอร์ติคอยด์นั้นจะสัมพันธ์กับชื่อของฮอร์โมน โดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของกลูโคส ซึ่งในภาวะที่ร่างกายไม่ได้รับประทานอาหาร (fasted state) Cortisol จะไปกระตุ้นกระบวนการต่างๆ ที่จะทำให้ระดับกลูโคสในเลือดเพิ่มสูงขึ้น แต่ยังคงรักษาสสมดุลให้อยู่ในระดับที่ปกติด้วยกระบวนการต่างๆ เหล่านี้ ได้แก่ การกระตุ้นให้เกิดการสร้างกลูโคสขึ้นจากกรดอะมิโนหรือไขมัน (gluconeogenesis) ที่อวัยวะอื่นๆ โดยเฉพาะที่ตับ การยับยั้งการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อ (muscle) และเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) รวมทั้งเพิ่มการสลายไขมันในเนื้อเยื่อไขมัน (lipolysis) มากขึ้น ซึ่งกรดไขมันที่ได้จะถูกนำไปเป็นสารตั้งต้นในการสร้างกลูโคส นอกจากนี้มันยังมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) จากฤทธิ์ของกลูโคคอร์ติคอยด์ในการยับยั้งสาร prostaglandins กับ leukotrienes ที่เป็นสารสำคัญในกระบวนการอักเสบ และคุณสมบัติในการเป็นสารกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive) ด้วย โดยจะไปยับยั้งการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันบางตัว บทบาทของกลูโคคอร์ติคอยด์นี้ยังพบในการเจริญของตัวอ่อน (fetal development) เช่นสนับสนุนการเจริญเต็มที่ของปอด การผลิตสาร (surfactant) สำคัญในการทำหน้าที่ของปอด เป็นต้น จากความสำคัญและบทบาทหน้าที่ที่กล่าวมานั้น ทำให้กลูโคคอร์ติคอยด์ถูกใช้เป็นยาในการรักษาภาวะที่เกิดการอักเสบต่างๆ เช่น ข้ออักเสบ (arthritis) หรือผิวหนังอักเสบ (dermatitis) และอาการแพ้ (allergic) รวมถึงใช้ในการรักษาโรคภูมิคุ้มกันต่อต้านตัวเอง (autoimmune disease) หรือให้ฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์หลังการผ่าตัดเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ (posttransplantory) เพื่อกดภูมิคุ้มกันและป้องกันไม่ให้ร่างกายต่อต้านหรือปฏิเสธอวัยวะที่ถูกปลูกถ่าย (transplant rejection หรือ graft-versus-host disease) นั้นด้วย

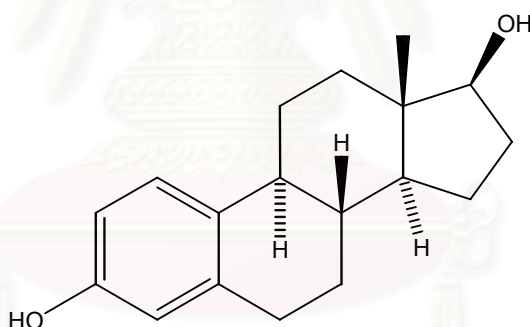
2.11.2 ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen)

ฮอร์โมนเอสโตรเจน หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า oestrogen จัดอยู่ในกลุ่มของสเตียรอยด์ฮอร์โมนและเป็นฮอร์โมนเพศหญิงที่สำคัญ ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในผู้หญิงจะมีอยู่ด้วยกัน 3 รูปแบบหลัก ได้แก่ estradiol, estriol และ estrone โดยที่จะพบในรูปแบบของ

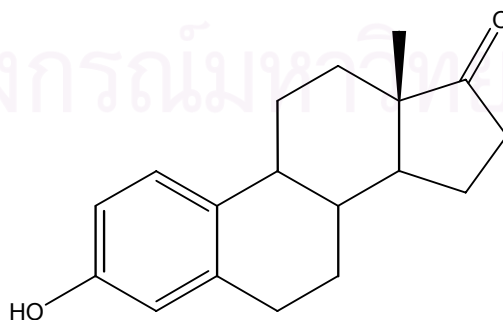
17 β -estradiol ตั้งแต่เมื่อเริ่มมีประจำเดือนครั้งแรก (menarche) จนถึงภาวะหมดประจำเดือน (menopause) หลังจากนั้นจะพบได้มากในรูปแบบของ estrone ซึ่งมีฤทธิ์อ่อนกว่า estradiol นอกจากนี้ยังมี xenoestrogen ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ของฮอร์โมนเอสโตรเจน รวมถึง phytoestrogen ที่เป็นสารจากพืชในธรรมชาติด้วย ดังแสดงโครงสร้างของ estriol ในรูปที่ 2.18 โครงสร้างของ estradiol ในรูปที่ 2.19 และแสดงโครงสร้างของ estrone ในรูปที่ 2.20



รูปที่ 2.18 แสดงโครงสร้างของ estriol



รูปที่ 2.19 แสดงโครงสร้างของ estradiol



รูปที่ 2.20 แสดงโครงสร้างของ estrone

ฮอร์โมนเอสโตรเจนสามารถผลิตได้ทั้งจากฟอลลิเคิล (follicles) ที่กำลังเจริญภายในรังไข่ จากคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum) และจากกรวดด้วยการกระตุ้นของฮอร์โมน follicle-stimulating hormone (FSH) กับ luteinizing hormone (LH) จากต่อมใต้สมอง (pituitary gland) นอกจากนี้ยังอาจพบการสร้างได้ที่อวัยวะอื่นๆ อีก เช่นที่ตับ ต่อมหมวกไต และเต้านม เป็นต้น ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ผลิตได้จากอวัยวะเหล่านี้จะมีความจำเป็นอย่างมากในผู้หญิงหลังวัยหมดประจำเดือนแล้ว (postmenopause women) ในการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจนจะเริ่มตั้งแต่ที่เซลล์ theca interna ของรังไข่ จาก androstenedione ที่สร้างได้จากคอเลสเตอรอลที่เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา ดังรูปที่ 2.13 androstenedione นั้นเป็นสารที่มีฤทธิ์ของฮอร์โมนในกลุ่ม androgen ระดับปานกลางและสามารถที่จะผ่านชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ด้านฐาน (basal membrane) เข้าสู่ชั้นเซลล์ granulosa ที่ซึ่งจะเปลี่ยนให้เป็นฮอร์โมน estrone ทันทัน หรืออาจเปลี่ยนเป็น estradiol โดยผ่านการเปลี่ยนเป็นฮอร์โมน testosterone ก่อนสำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนก็เป็นเช่นเดียวกับสเตียรอยด์ฮอร์โมนอื่นๆ โดยที่จะแพร่ผ่านเยื่อหุ้มของเซลล์เข้าไปหาตัวรับสัญญาณฮอร์โมนที่อยู่ภายในเซลล์ เพื่อกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของตัวรับสัญญาณ ให้เหมาะสมที่จะสามารถจับกับสายดีเอ็นเอของยีนในส่วน estrogen response element (ERE) ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5' AGGTCAnnnTGACCT 3' และส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการถอดรหัสของยีน

แม้ว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนจะพบได้ทั้งในเพศชายและเพศหญิงก็ตาม แต่โดยทั่วไปแล้วจะพบได้มากอย่างมีนัยสำคัญในหญิงวัยเจริญพันธุ์ และมีระดับสูงที่สุดในช่วงระยะก่อนตกไข่ โดยฮอร์โมนเอสโตรเจนจะมีบทบาทในการแสดงออกของลักษณะทางเพศหญิง (female secondary sex characteristics) ที่มากขึ้นเช่น เต้านม เป็นต้น อีกทั้งยังช่วยในการเจริญของผนังชั้น endometrium ช่วยเพิ่มการเจริญของมดลูก รักษาสภาวะที่หลอดเลือดกับชั้นผิวหนัง ช่วยเพิ่มการสร้างกระดูก นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการสร้างโปรตีนที่ตับเพิ่มขึ้น รวมถึงโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือดต่างๆ ได้แก่ factors 2, 7, 9, 10, antithrombin III, plasminogen และยังช่วยในการเกาะกันของเกล็ดเลือด (platelet adhesiveness) ด้วย บทบาทในเรื่องของไขมันเช่น ช่วยเพิ่มไลโปโปรตีนชนิด HDL ไตรกลีเซอไรด์ และลดระดับไลโปโปรตีนชนิด LDL เป็นต้น บทบาทในการรักษาสสมดุลของของเหลวในร่างกาย บทบาทในระบบลำไส้และทางเดินอาหาร เช่น ลดการเคลื่อนที่ของลำไส้ และเพิ่มคอเลสเตอรอลในน้ำดี เป็นต้น สำหรับบทบาทของฮอร์โมนเอสโตรเจนในเพศชายจะช่วยในการควบคุมหน้าที่สำคัญต่างๆ ในระบบสืบพันธุ์ เช่น ในการเจริญของอสุจิ (maturation of sperm) และอาจจำเป็นในเรื่องของความกำหนัด (libido) ด้วย จากความสำคัญและบทบาทหน้าที่ที่หลากหลายนี้เอง ทำให้มีการนำฮอร์โมนเอสโตรเจนมาใช้ในการรักษาโรคหรือ

ภาวะต่างๆ เช่น มักใช้เป็นส่วนประกอบของยาคุมกำเนิด และการรักษาด้วยการให้ฮอร์โมนเพื่อทดแทนในผู้หญิงหลังวัยหมดประจำเดือน เพื่อป้องกันอาการที่เกิดภายหลังการหมดประจำเดือน เช่น ภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) อาการร้อนวูบวาบ (hot flashes) อาการช่องคลอดแห้ง (vaginal dryness), ความแปรปรวนในการควบคุมการขับถ่าย (urinary stress incontinence) ครั่นเนื้อครั่นตัว (chilly sensation) อาการวิงเวียน (dizziness) อาการล้า (fatigue) โมโหง่ายหรือไวต่อการกระตุ้น (irritability) และเหงื่อออก (sweating) เป็นต้น และยังมีรายงานว่า การรักษาด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจนนั้น สามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ด้วย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. เครื่อง Micro High Speed Refrigerated Centrifuge รุ่น VS-15000CFNII	Vision Scientific Co.,Ltd	เกาหลีใต้
2. เครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer) รุ่น FINE VORTEX	FINEPCR	เกาหลีใต้
3. เครื่อง Vacuum Concentrator (DNA SpeedVacs) รุ่น DNA110-230	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath)	Memmert	เยอรมนี
5. เครื่อง Block Heater รุ่น HB-1 และ HB-2	Wealtec Corp.	สหรัฐอเมริกา
6. ตู้แช่แข็ง -20 °C (Top Open Chest Freezer)	SANYO Electric Co.,Ltd	ญี่ปุ่น
7. ตู้แช่แข็ง -80 °C (ULT Deep Freezer) รุ่น DF8524	ilShin Lab Co.,Ltd.	เกาหลีใต้
8. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น PTC-200	MJ Research, Inc.	สหรัฐอเมริกา
10. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น GeneAmp PCR System 2400	PerkinElmer	สหรัฐอเมริกา
11. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น PX2	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
12. ชุดถ่ายภาพเจล (Transilluminator และ Doc-Print)	VILBER LOURMAT	ฝรั่งเศส
13. เครื่องถ่ายภาพเจล (GEL DOC 1000)	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
14. ตู้อบ (Incubator Shaker) Minitron	Appropriate	สหรัฐอเมริกา
15. เครื่อง Suction รุ่น Pumpe 4010	Boehringer Mannheim	เยอรมนี
16. เครื่อง Cryocentrifuge รุ่น Biofuge Stratos	Kendro Laboratory Products	เยอรมนี
17. ตู้อบเพาะเลี้ยง CO ₂ (CO ₂ Incubator)	Sheldon Manufacturing Inc.	สหรัฐอเมริกา
18. ตู้อบ (Incubator)	Memmert	เยอรมนี
19. ตู้ปลอดเชื้อ (Class II Biosafety Cabinet) รุ่น NapFLOW	Thermo Scientific, Inc. (Napco)	สหรัฐอเมริกา
20. ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar Flow Cabinet)	E.S.I. FLUFRANCE	ฝรั่งเศส

21. เครื่องวัดแสง luminescence (Luminometer) รุ่น VICTOR ³	PerkinElmer	สหรัฐอเมริกา
22. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer) รุ่น UV-1601	SHIMADZU	ญี่ปุ่น
23. เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น AB204-S CLASSIC	METTLER TOLEDO	สวิสเซอร์แลนด์
24. ถัง Liquid Nitrogen รุ่น XT20	TAYLOR-WHARTON	สหรัฐอเมริกา
25. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) รุ่น Olympus CK30	Olympus	ญี่ปุ่น

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. Microcentrifuge tube (ขนาด 0.5 ml และ 1.5 ml) และ PCR tube	Continental Lab Products, Inc.	สหรัฐอเมริกา
2. Centrifuge tube (ขนาด 15 ml และ 50 ml)	BioLogix Research	สหรัฐอเมริกา
3. Oak Ridge Centrifuge tube (ขนาด 50 ml)	Thermo Fisher Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
4. Pipette tips (ขนาด 10, 200, 1000 μ l)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
5. BARRIERTIPS (ขนาด 20, 200, 1000 μ l)	Continental Lab Products, Inc.	สหรัฐอเมริกา
6. Auto pipette (ขนาด 20, 200, 1000 μ l)	GILSON	ฝรั่งเศส
7. Auto pipette (ขนาด 20 μ l)	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
8. Pipette Aid รุ่น Portable XP	Drummond Scientific	สหรัฐอเมริกา
9. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri Dishes)	Bibby Sterilin Ltd.	อังกฤษ
10. Luminometer Plate	PerkinElmer	สหรัฐอเมริกา
11. Cell Culture Flask (ขนาด 25 cm ² และ 75 cm ²)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
12. Disposable Serological pipette (ขนาด 5 ml และ 10 ml)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
13. Pasteur pipette	COPAN innovation	สหรัฐอเมริกา
14. Cryovial tube (ขนาด 2 ml)	Simport plastics	แคนาดา
15. Cell Culture Dish (ขนาด 100mm X 20mm)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
16. 96 Well Cell Culture Cluster, Flat Bottom with Lid	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
17. SUB CELL รุ่น Mini-Sub Cell GT	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา

18. SUB CELL รุ่น Wide Mini-Sub Cell GT	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
19. เครื่อง Power Supply รุ่น POWER PAC 200 และ 300	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
20. เครื่อง Power Supply รุ่น SX250 MightySlim PSU.	Hofer, Inc.	สหรัฐอเมริกา

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. ชุดน้ำยา FlexiGene DNA Kit	QIAGEN	เยอรมนี
2. Ethidium Bromide	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
3. 2-Propanol	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
4. Absolute Ethanol	MERCK	เยอรมนี
5. GenePure LE Agarose	ISC BioExpress	สหรัฐอเมริกา
6. ชุดน้ำยา MasterTaq [®] Kit	Eppendorf	เยอรมนี
7. ชุดน้ำยา TaqPCR ^x DNA polymerase	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
8. ชุดสกัดแยกดีเอ็นเอจากเจล (Quantum Prep Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Column)	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
9. Sterile Water (deionized water)	General Hospital Products Public Co., Ltd	ประเทศไทย
10. ชุดน้ำยา pGEM [®] -T Easy Vector System	Promega	สหรัฐอเมริกา
11. เอนไซม์ <i>KpnI</i> , <i>HindIII</i> และ 100 bp ladder	New England Biolabs, Inc.	สหรัฐอเมริกา
12. ชุดน้ำยา T4 DNA Ligase	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
13. Tryptone Peptone	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
14. Bacto [™] Yeast Extract	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
15. BACTO-AGAR	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
16. AMPILIN (Ampicilin, Ampicilin Sodium)	Atlantic Laboratories Corp. Ltd	ประเทศไทย
17. Sodium chloride	MERCK	เยอรมนี
18. Calcium chloride dehydrate	MERCK	เยอรมนี
19. Magnesium chloride	APS Finechem	ออสเตรเลีย
20. Sodium acetate	MERCK	เยอรมนี
21. Potassium acetate	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
22. Tris Base	Promega	สหรัฐอเมริกา
23. Orthoboric acid	BDH	อังกฤษ

24. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt	BDH	อังกฤษ
25. Sodium hydroxide	Carlo Erba Reagenti	อิตาลี
26. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
27. ชุดสกัด PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kits	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
28. RIBONUCLEASE A	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
29. น้ำยา TRIZOL® Reagent	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
30. ชุดน้ำยา SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
31. RNase AWAY (for RNase Decontamination)	Continental Lab Products, Inc.	สหรัฐอเมริกา
32. เอนไซม์ Deoxyribonuclease I, Amplification Grade	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
33. Chloroform	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
34. Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
35. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 4.00 mM/L Glutamine, 4500 mg/L Glucose without Sodium Pyruvate	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
36. Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) Medium with 2.05 mM L-Glutamine	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
37. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS Modified) without Calcium, Magnesium	JRH Biosciences	สหรัฐอเมริกา
38. Fetal Bovine Serum (FBS)	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
39. HyQ Trypsin 0.25 % with EDTA with 2.5 g Porcine Trypsin without Calcium, Magnesium	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
40. Penicillin-Streptomycin Solution 10,000 units/ml Penicillin, 10,000 µg/ml Streptomycin	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
41. Fungizone Amphotericin B 250 µg/ml	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
42. Dimethyl Sulfoxide	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
43. Dexamethasone-Water Soluble Cell Culture	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
44. β-estradiol-Water Soluble Cell Culture	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา

45. ชุดน้ำยา Lipofectamine™ 2000	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
46. ชุดน้ำยา Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Promega	สหรัฐอเมริกา

3.2 ตัวอย่าง

3.2.1 ประชากรและการเก็บตัวอย่าง

ผู้บริจาคโลหิตจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย และอาสาสมัครนิสิตจาก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นประชากรไทยที่มีสุขภาพดี โดยที่อาสาสมัคร ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยในครั้งนี้ จะต้องกรอกรายละเอียดลงในแบบฟอร์มใบยินยอมด้วยความ สมัยครใจให้ทำการวิจัยในมนุษย์ จากนั้นจึงทำการเจาะเก็บโลหิตจำนวนประมาณ 10 ml เพื่อนำมา สกัดดีเอ็นเอตามกระบวนการทำต่อไป

3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

นำตัวอย่างเลือดที่ทำการเก็บจากอาสาสมัคร มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา FlexiGene DNA Kit (QIAGEN) โดยใช้หลักการ alkaline lysis ในการสกัด เริ่มจากบีบเม็ดเลือดครบส่วน (whole blood) ปริมาตร 100 μ l ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube เติม Buffer FG1 ลงไป 250 μ l ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาประมาณ 5 ครั้ง แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 1 นาที เสร็จแล้วเทส่วนใสทิ้งและตากตะกอนให้แห้ง จากนั้นเติม Buffer FG2 ที่ผสมกับ QIAGEN Protease ในอัตราส่วน 1:100 (Protease : Buffer FG2) แล้วลงในหลอดทดลองปริมาตร 50 μ l นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5-10 นาที จะเห็น สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียวเมื่อครบเวลา จากนั้นเติม 100% Isopropanol ลงไป 50 μ l ผสมให้ เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาประมาณ 20 ครั้ง จนกว่าจะเห็นตะกอนของดีเอ็นเอ แล้ว นำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 3-5 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนที่ได้ ด้วยการเติม 70 % Ethanol 50 μ l ลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 3-5 นาที เทส่วนใสทิ้งและตากตะกอนให้แห้งด้วยเครื่อง Speed Vac ขั้นสุดท้าย ละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย Buffer FG3 ปริมาตร 100 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่ อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5-10 นาทีหรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลายใน Buffer หมด และนำ สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

3.2.3 การตรวจหาความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ตรวจหาชนิดอัลลีลของ 5-HTTLPR ด้วยเทคนิค Touchdown PCR ในหลอดทดลอง (PCR tube) โดยใช้ชุดน้ำยา MasterTaq[®] Kit (Eppendorf) และ primers ที่จำเพาะซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ Forward primer (5'-GGC GTT GCC GCT CTG AAT TGC-3') และ Reverse primer (5'-GAG GGA CTG AGC TGG ACA ACC AC-3') (21) ทำการผสมดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ที่สกัดได้ปริมาตร 2 µl กับ 23 µl ของน้ำยาในการทำปฏิกิริยา PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x TaqMaster, 1x Taq Buffer / Mg²⁺ (500 mM KCL, 100 mM Tris-HCL pH 8.3, 15 mM Mg(OAc)₂), 0.2 mM dNTP Mix, 0.2 µM Forward และ Reverse primer, 12.5 U Taq DNA Polymerase โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 95.0 °C 5 นาที (1 รอบ), 94.0 °C 1 นาที; 68.0 °C-0.5 °C 1 นาที; 72.0 °C 1 นาที (25 รอบ), 94.0 °C 1 นาที; 50.0 °C 1 นาที; 72.0 °C 1 นาที (10 รอบ), 72.0 °C 10 นาที (1 รอบ) แล้วจึงตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลออกาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 3 % (3 % agarose gel electrophoresis) จากนั้นย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล หากแถบของดีเอ็นเอบนเจลมีขนาดประมาณ 484 คู่เบสจะเป็น 5-HTTLPR ชนิด S อัลลีล และขนาดประมาณ 528 คู่เบสจะเป็น 5-HTTLPR ชนิด L อัลลีล

3.2.4 การศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing)

เมื่อทราบชนิดอัลลีลของ 5-HTTLPR แล้ว จึงทำการเลือกตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีชนิด S อัลลีลและชนิด L อัลลีลมาอย่างละ 1 ราย เพื่อทำการศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของทั้งสองอัลลีลประมาณ 44 คู่เบส โดยเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ขนาดประมาณ 484 คู่เบสของชนิด S อัลลีล และขนาดประมาณ 528 คู่เบสของชนิด L อัลลีล นำไปตกตะกอน (precipitation) เพื่อให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์และเข้มข้นมากขึ้น แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 60 ng ในน้ำกลั่น (deionized water) ปริมาตร 15 µl จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมได้ทั้งสองอัลลีลนี้ ไปหาลำดับเบส ณ ห้องปฏิบัติการของ ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสตับอักเสบบี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้ชุดน้ำยา ABI Sequencing kit (ABI, Fostercity, CA) ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyser (ABI, Fostercity, CA) และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้ นั้นกับลำดับเบสใน GenBank accession No. AF117826 และ No. X76753 ตามลำดับ

3.3 การโคลนนิ่ง (Cloning)

3.3.1 การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับการโคลน (Insert DNA) ด้วยปฏิกิริยา

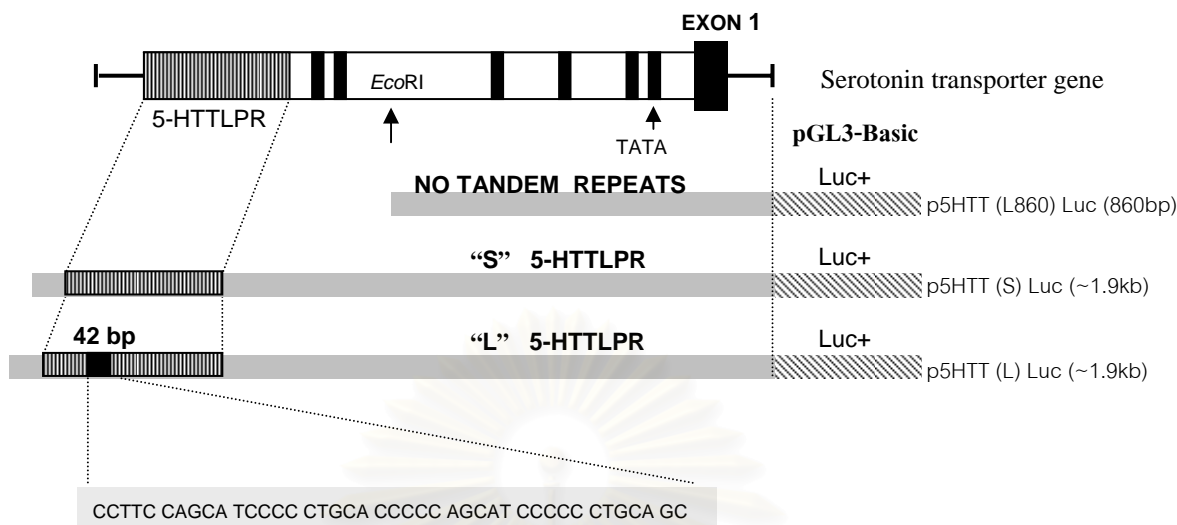
ลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

การเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (Insert DNA) สำหรับใช้การโคลนนั้น เนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการใช้มีปริมาณเบส G และเบส C เป็นจำนวนมาก (GC-rich) ทำให้การเตรียมโดยใช้ Conventional PCR ตามปกติค่อนข้างจะมีความลำบาก คณะผู้วิจัยจึงได้ปรับปรุงเทคนิคขึ้นมาโดยใช้ชุดน้ำยา *Taq*PCRx DNA polymerase (Invitrogen) เพื่อแก้ปัญหา และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับการเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีลักษณะของ 5-HTTLPR แตกต่างกัน ทั้ง S และ L อัลลีล คือ Forward primer (5'-CAA AGG TAC CGT TGC CGC TCT GAA TGC CAG-3') และ Reverse primer (5'-CCG AAG CTT GAA ACG TGG GTT CGA GGC GGA GAG-3') กับ primers ที่จำเพาะสำหรับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ขาดลักษณะของ 5-HTTLPR คือ Forward primer (5'-CAA GGT ACC GAA TTC CTG GGC TCA AGC AAT CCT-3') และ Reverse primer (5'-CCG AAG CTT GAA ACG TGG GTT CGA GGC GGA GAG-3') เริ่มจากการผสมดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ที่สกัดได้ปริมาณ 2 μ l กับ 23 μ l ของน้ำยาในการทำปฏิกิริยา PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 2x PCRx Enhancer Solution, 1x PCRx Amplification Buffer (200 mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCL), 1.5 mM MgSO₄, 0.2 mM dNTP Mix, 0.2 μ M Forward และ Reverse primer, 1.25 U *Taq* DNA Polymerase โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 95.0 °C 2 นาที (1 รอบ), 95.0 °C 30 วินาที; 60.0 °C 30 วินาที; 68.0 °C 2 นาที (35 รอบ); 68.0 °C 10 นาที (1 รอบ) เสร็จแล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอากาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 1 % (1 % agarose gel electrophoresis) จากนั้นย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล โดยแถบของดีเอ็นเอบนเจลจะมีขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบส ซึ่งจะเป็นส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายชนิด S และ L อัลลีล ของ 5-HTTLPR และขนาด 860 คู่เบส ซึ่งจะเป็นส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่ขาดลักษณะของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR หลังจากนั้นทำการสกัดแยกเฉพาะชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจล ด้วยชุดสกัด Quantum Prep Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Column (BIO-RAD) โดยใช้ใบมีดตัดเจลที่มีแถบของดีเอ็นเอที่ต้องการ สับเจลให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ลงใน Column จากนั้นนำไปไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 5 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 g เป็นเวลา 3 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ที่ก้นหลอด ขั้นตอนสุดท้ายนำไปตกตะกอน (precipitation) เพื่อให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์และเข้มข้นมากขึ้น โดยปิเปตต์สารละลายดีเอ็นเอ

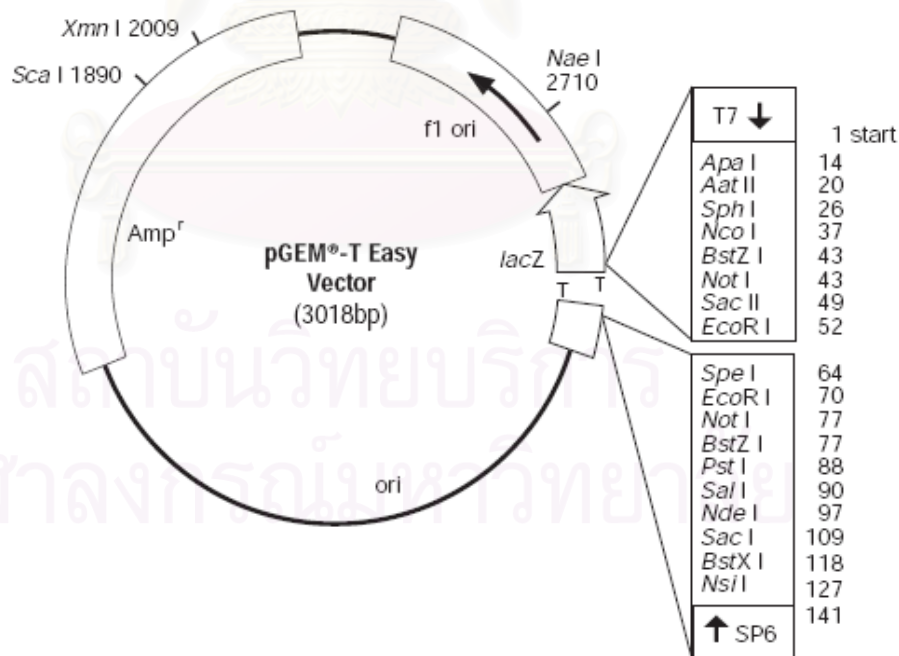
ที่สกัดแยกได้มาวัดปริมาณแล้วเติมน้ำให้ครบ 100 μ l ผสมให้เข้ากันกับ 3 M NaAC pH 5.0 ปริมาตร 10 μ l และ 100 % Ethanol ปริมาตร 220 μ l วางตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนที่ได้ด้วยการเติม 70% Ethanol 200 μ l ลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและตากตะกอนให้แห้งด้วยเครื่อง DNA SpeedVacs (Thermo Scientific) จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำกลั่น (deionized water) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5-10 นาทีหรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลายหมด และนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

3.3.2 การสร้างดีเอ็นเอพลาสมิด (luciferase reporter gene constructs)

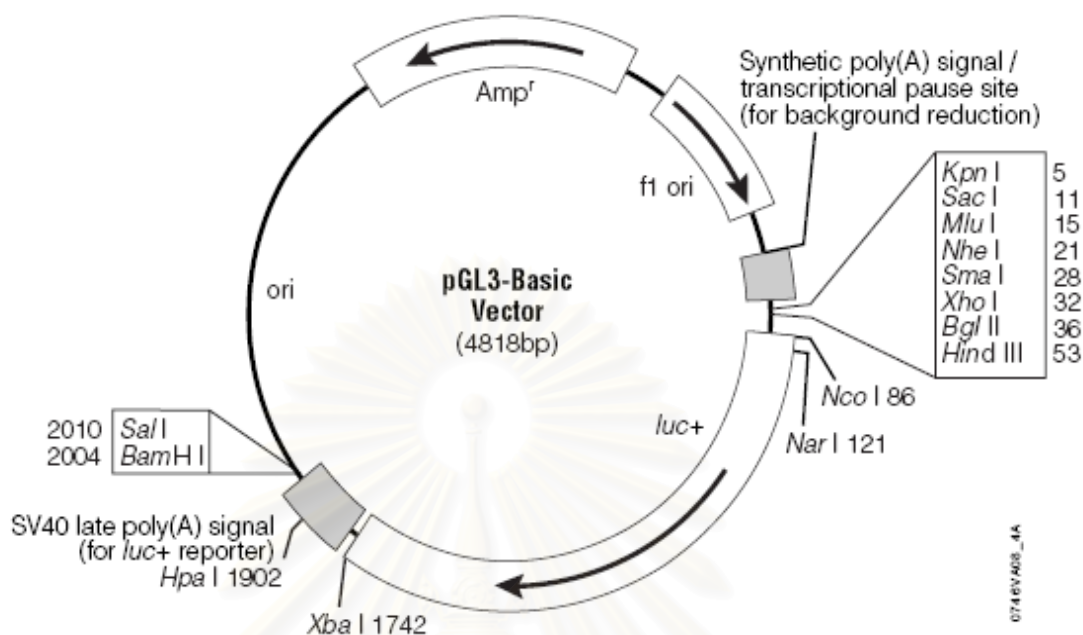
เมื่อเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบสและขนาด 860 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายชนิด S และ L อัลลีล ของ 5-HTTLPR และไม่มีมีความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (L860) ได้แล้ว จะทำการเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนเหล่านั้นกับ Plasmid Vector ที่ขาดส่วนของ promoter (promoterless luciferase expression vector pGL3-Basic) (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr. Robert K. Yu, Institute of Molecular Medicine and Genetics, Medical College of Georgia, Georgia's Health Science University, USA) (21, 280) แต่เนื่องจากการโคลนโดยเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ pGL3-Basic Vector โดยตรงนั้นมีโอกาสสำเร็จค่อนข้างน้อย คณะผู้วิจัยจึงตัดสินใจที่จะโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับ TA Vector ก่อน ซึ่งใช้ชุดน้ำยา pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega) มีส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาเป็นดังนี้ 1x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase, 5ng pGEM[®]-T Easy Vector, 3 Weiss units T4 DNA Ligase ผสมให้เข้ากันกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ซ้ำมคืน โดยแสดงลักษณะของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เตรียมนั้นไว้ดังรูปที่ 3.1 ลักษณะของ pGEM[®]-T Easy Vector ดังรูปที่ 3.2 และลักษณะของ pGL3-Basic Vector ดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอสำหรับโคลน โดยส่วนของ promoter ของ ยีน SERT ที่มีความหลากหลายชนิด S และ L อัลลีล ของ 5-HTTLPR จะมีขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบส และส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่ขาดลักษณะของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (*EcoRI* deletional mutant) จะมีขนาด 860 คู่เบส (L860)



รูปที่ 3.2 แสดงลักษณะของ TA Vector หรือ pGEM[®]-T Easy Vector ([http://www.promega.com/figures/popup.asp?fn=1473va&partno=A1360&product=pGEM[®]-T Easy Vector System+I](http://www.promega.com/figures/popup.asp?fn=1473va&partno=A1360&product=pGEM%3Csup%3E%26%23x00AE%3B%3C%2Fsup%3E%2DT+Easy+Vector+System+I))



รูปที่ 3.3 แสดงลักษณะของ promoterless luciferase expression vector pGL3-Basic
 (<http://www.promega.com/figures/popup.asp?fn=0746va&partno=E1751&product=pGL3%2DBasic+Vector>)

สำหรับการเชื่อมต่อยีนส่วนดีเอ็นเอเข้ากับ pGL3-Basic Vector นั้นจำเป็นที่จะต้องให้ปลายทั้งสองข้างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอและ Vector สามารถเชื่อมต่อกันได้อย่างจำเพาะ โดยทั้งคู่จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* (NEB) และ *HindIII* (NEB) สำหรับปลายแต่ละข้าง ซึ่งในปฏิกิริยาจะประกอบด้วย 1x NEBuffer 2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.9), 1x BSA, 1 U *KpnI*, 1 U *HindIII* และชิ้นส่วนดีเอ็นเอ หรือ pGL3-Basic Vector ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเชื่อมต่อยีนส่วนดีเอ็นเอเข้ากับ pGL3-Basic Vector โดยใช้ชุดน้ำยา T4 DNA Ligase (Invitrogen) มีส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาเป็นดังนี้ 1x DNA Ligase Reaction Buffer (250 mM Tris-HCL pH 7.6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 % (w/v) polyethylene glycol-8000), 1 U T4 DNA Ligase, pGL3-Basic Vector และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ปลายทั้งสองข้างถูกตัดแล้ว นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน

3.3.3 การนำดีเอ็นเอพลาสมิด (Plasmid DNA) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Transformation)

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เซลล์แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α และใช้ CaCl_2 เพื่อเพิ่ม permeability ของผนังเซลล์แบคทีเรีย ในการเตรียมเซลล์ให้พร้อม (competent cell) ก่อนที่จะทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ ขั้นตอนการเตรียมเซลล์นั้นจะเริ่มต้นจากเซลล์แบคทีเรีย *E.coli* ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (LB broth) จำนวน 5 ml ข้ามคืน วันต่อมานำมาเลี้ยงต่อเพื่อเพิ่มจำนวนใน 25 ml LB broth โดย incubate ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm ในตู้อบ (shaking incubator) จนวัดความขุ่นของเซลล์ (OD_{590}) ได้ค่าประมาณ 0.375 ซึ่งจะใช้เวลา 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ที่ได้มีการเจริญอยู่ในช่วงของ early log phase หรือระยะทวีคูณ จากนั้นย้ายเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดใส่ลงใน centrifuge tube (prechilled) นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$ นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งเหลือเฉพาะตะกอนเซลล์ เสร็จแล้วค่อยๆ เติมน้ำละลาย 0.1 M MgCl_2 ปริมาตร 12.5 ml ลงไปในหลอดและเขย่าหลอดเบาๆ เพื่อให้ทุกเซลล์โดนสารละลายทั่วกัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$ นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือเฉพาะตะกอนเซลล์แล้วเติมน้ำละลาย 0.1 M CaCl_2 ปริมาตร 12.5 ml เขย่าเบาๆ และนำไปปั่นอีกครั้ง สุดท้ายละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ใน 0.1 M CaCl_2 ที่ผสม 15 % glycerol ปริมาตร 4 ml จะได้เซลล์ที่พร้อมทำการถ่ายโอน และแบ่งเซลล์แบคทีเรียเหล่านี้ไว้ใน 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดละ 200 μl โดยสามารถนำมาใช้ได้เลยหรืออาจเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 $^{\circ}\text{C}$ เมื่อเตรียมเซลล์ได้แล้วจึงเริ่มทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิด ซึ่งในการทดลองนี้จะเป็นชิ้นส่วนขนาดต่างๆ ของดีเอ็นเอที่ศึกษากับ pGL3-Basic Vector หรือ pGEM $^{\text{®}}$ -T Easy Vector โดยปิเปตดีเอ็นเอพลาสมิดที่ต้องการถ่ายโอนนี้ปริมาตร 10 μl ลงในหลอดที่มีเซลล์แบคทีเรีย *E.coli* ซึ่งผ่านการเตรียมแล้ว ผสมให้เข้ากันเบาๆ และนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาย้ายหลอดไปจุ่มใน block heater อุณหภูมิ 42 $^{\circ}\text{C}$ นาน 90 วินาที ระหว่างนี้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียจะถูกทำให้เปิดกว้างขึ้นสามารถที่จะรับดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ได้ แล้วรีบเติม LB broth ลงไป 800 μl เลี้ยงเซลล์ต่ออีก 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) หลังจากนั้นปิเปตเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนแล้ว 100 μl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (LB agar) ที่มีแอมพิซิลิน (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ampicillin) ผสมอยู่ แล้วใช้แท่งแก้ว spreader หมุนให้ทั่วหน้าอาหารแข็งเพื่อให้เชื้อกระจายได้ดี นำจานเพาะเชื้อไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ ในตู้อบเป็นเวลา 1 คืน

3.3.4 การสกัดพลาสมิด (Plasmid DNA) จากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณที่น้อยและอาศัยต่างในการสกัด (Alkaline Lysis Miniprep)

หลังจากถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียแล้ว จะต้องทำการเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อนั้นมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนใน LB broth และนำมาสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์ก่อน เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ต้องการนั้นมาศึกษาต่อไป ซึ่งการสกัดพลาสมิดในการทดลองนี้เป็นการสกัดจากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณที่น้อยมาก และอาศัยต่างในการสกัด เรียกวินี้ว่า alkaline lysis miniprep เริ่มต้นจากการปั่นเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนใน LB Broth ปริมาตร 1 ml ที่ความเร็ว 8,000 rpm นาน 5 นาที จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ใน Buffer P1 (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 100 µg/ml RNase A) ปริมาตร 330 µl และ Buffer P2 (0.2 M NaOH, 10 % SDS) ปริมาตร 380 µl ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จึงเติม Buffer P3 ที่เย็น (iced-cold 3 M potassium acetate (KAc) pH 5.5) ปริมาตร 380 µl แซ่หลอดไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ความเร็ว 9,500 rpm นาน 10 นาที และเก็บเฉพาะส่วนใสมาทำการตกตะกอนดีเอ็นเอต่อโดยเติม 100 % Isopropanol ลงไป 1 ml ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำหลอดไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm นาน 10 นาที จะได้ตะกอนดีเอ็นเอที่กั้นหลอด ล้างตะกอนด้วย 70 % Ethanol ปริมาตร 200 µl นำไปปั่นอีกครั้งและตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งด้วยเครื่อง DNA SpeedVacs (Thermo Scientific) จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น (deionized water) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5-10 นาทีหรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลายหมด และนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ทั้งนี้อาจสามารถตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งเพื่อให้ดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นได้ด้วย 3 M ammonium acetate หรือ sodium acetate, pH 5.0 ปริมาตร 20 µl กับ 100 % Ethanol ปริมาตร 440 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หรือที่ -70 °C ข้ามคืน แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 13,500 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วย 70 % Ethanol อีกครั้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งด้วยเครื่อง DNA SpeedVacs (Thermo Scientific) สุดท้ายละลายในน้ำกลั่น (deionized water) ปริมาตร 30-50 µl ตามต้องการและนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

3.3.5 การตรวจสอบโคลน (Colony Screening) โดยเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

ในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ต้องการนั้น เนื่องจากดีเอ็นเอพลาสมิดที่ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เกิดจากเชื่อมต่อกันส่วนดีเอ็นเอกับ pGL3-Basic Vector หรือ pGEM[®]-T Easy Vector

ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* (NEB) และ *HindIII* (NEB) ดังนั้นในการตรวจสอบจึงใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งในปฏิกิริยาจะประกอบด้วย 1x NEBuffer 2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.9), 1x BSA, 1 U *KpnI*, 1 U *HindIII* และดีเอ็นเอพลาสมิดที่สกัดได้ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลลอกกาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 1 % (1 % agarose gel electrophoresis) จากนั้นย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล โดยหากพลาสมิดนั้นมีชิ้นส่วนที่ต้องการศึกษาอยู่ แถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลจะมีทั้งแถบของ pGL3-Basic Vector ขนาดประมาณ 4,800 คู่เบส หรือ pGEM[®]-T Easy Vector ขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบส ซึ่งจะเป็นส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายชนิด S และ L อัลลีล ของ 5-HTTLPR หรือขนาด 860 คู่เบส ซึ่งจะเป็นส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่ขาดลักษณะของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (*EcoRI* deletional mutant)

3.3.6 การสกัดพลาสมิด (Plasmid DNA) จากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมาก (Maxiprep)

หลังจากคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ต้องการแล้ว ขั้นตอนต่อไปต้องทำการเพิ่มจำนวนพลาสมิดเหล่านี้ ให้มีปริมาณและความบริสุทธิ์สูงมากเพียงพอที่จะทำการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ โดยใช้ชุดสกัด PureLink[™] HiPure Plasmid DNA Purification Kits (Invitrogen) เป็นการสกัดจากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมากเรียกว่า Maxiprep เริ่มจากเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียใน LB Broth ปริมาตร 200 ml นำมาปั่นที่ความเร็ว 4,000g นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและเติมสารละลาย Resuspension Buffer (R3), Lysis Buffer (L7) และ Precipitation Buffer (N3) อย่างละปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 12,000 g นาน 10 นาที ดูเฉพาะส่วนใสเติมลงใน Column ที่ทำการ equilibrated แล้ว ภายใน Column จะมี anion-exchange resin ซึ่งจะจับกับประจุลบของดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนใส ขณะที่สารอื่นๆ จะถูกชะออกไปด้วย Wash Buffer 60 ml จากนั้นดีเอ็นเอที่อยู่ภายใน Column จะถูกชะออกมาพร้อมกับ Elution Buffer 15 ml แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอเหล่านั้นด้วย 100 % Isopropanol ปริมาตร 10.5 ml โดยปั่นที่ความเร็วมากกว่า 15,000 g อุณหภูมิ 4 °C นาน 30 นาที และล้างตะกอนด้วย 70 % Ethanol ปริมาตร 5 ml ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายในน้ำกลั่น (deionized water) ปริมาตร 200-500 µl ตามต้องการและนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell Culture)

เลี้ยงเซลล์ HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line) (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ผศ.ดร.วีระ วงศ์คำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) เซลล์ HEP2 (Human Larynx carcinoma cell line) (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ศ.ดร.พรเทพ เทียนสีวากุล ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) เซลล์ HeLa (Human Cervix carcinoma cell line) (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก รศ.ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) เซลล์ HaCaT (Human Keratinocyte cell line) (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ผศ.พญ.ดร.จงกลณี วงศ์ปิยะบวร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) เซลล์ HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line) (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก รศ.พญ.ดร. ณัฐฉิยา หิรัญกาญจน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) เซลล์ Jurkat (Human T cell lymphoblast-like cell line) และเซลล์ SW480 (Human colon adenocarcinoma cell line) (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ศ.นพ.ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Hyclone) และเลี้ยงเซลล์ L6 (Rat skeletal muscle cell line) (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ผศ.ดร.จันทิภา บุรินทรภักดี ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) ในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Hyclone) ที่ผสมกับ 10% Fetal Bovine Serum (Hyclone) และยาปฏิชีวนะซึ่งประกอบด้วย 100 U/100 µg/ml Penicillin-Streptomycin (Invitrogen) และ 0.25 µg/ml Fungizone Amphotericin B (Invitrogen) โดยนำเซลล์มา incubate ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO₂ ที่มีอุณหภูมิ 37 °C และความเข้มข้นของ CO₂ ประมาณ 5 %

3.5 การคัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการทดลอง

3.5.1 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) จากเซลล์เพาะเลี้ยง

เริ่มต้นเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการสกัดใน cell culture dish (ขนาด 100 mm X 20 mm) ล้างเซลล์ด้วย Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (JRH Biosciences) ที่เย็น แล้วรีบเติม น้ำยา TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen) ปริมาตร 3 ml ลงไปในจานเพาะเลี้ยง จากนั้นใช้ใบมีดที่ทำความสะอาดด้วย RNase AWAY (Continental Lab Products) ชูดเซลล์ให้หลุดออกจากจานเพาะเลี้ยง บีบแปดต์สารละลายเซลล์ที่ได้ใส่หลอดและเติม chloroform ที่เย็นลงไป 200 µl ต่อ ปริมาตรน้ำยา TRIZOL[®] Reagent 1 ml เขย่าให้เข้ากันอย่างแรงแล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 2 °C

-8 °C ด้วยความเร็วไม่เกิน 12,000 g นาน 15 นาที สารละลายที่ได้จะแยกออกเป็นชั้น โดยชั้นล่างสุดของหลอดคือชั้นที่มีสีแดงซึ่งเป็นชั้นของ organic phase (phenol-chloroform phase) ถัดขึ้นมาเป็นชั้น interphase และบนสุดคือชั้นน้ำที่ไม่มีสีเป็นชั้นของ aqueous phase ซึ่งอาร์เอ็นเอจะอยู่ในชั้นนี้ จากนั้นดูเฉพาะส่วนใสชั้นบนสุดมาทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 100 % Isopropanol ปริมาตร 500 µl ต่อปริมาตรน้ำยา TRIZOL[®] Reagent 1 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่อุณหภูมิ 2 °C -8 °C ด้วยความเร็วไม่เกิน 12,000 g นาน 10 นาที และล้างตะกอนด้วย 70 % Ethanol ปริมาตร 1 ml ทั้งหมด 3 รอบโดยปั่นที่อุณหภูมิ 2 °C -8 °C ด้วยความเร็วไม่เกิน 7,500 g นาน 5 นาที สุดท้ายตกตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase (DEPC-treated water) ที่อุณหภูมิ 55 °C -60 °C นาน 10 นาที ซึ่งสารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้นี้สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C

3.5.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR

ทำการตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีนต่างๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่เหมาะสมในการทดลอง ด้วยเทคนิค Reverse-Transcriptase (RT) PCR ซึ่งยีนที่ต้องการตรวจสอบมีดังนี้ ยีน Serotonin transporter (SERT), Estrogen receptor (ER), Glucocorticoid receptor (GR), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) receptor (bFGFR) และ Epidermal Growth Factor (EGF) receptor (EGFR) โดยใช้ยีน β -actin หรือ glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) เป็นตัวควบคุม การทดลองครั้งนี้จะใช้ชุดน้ำยา SuperScript[™] III One-Step RT-PCR System with Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen) และใช้อาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) ที่สกัดได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นต้นแบบ (template) ในการทำปฏิกิริยา เริ่มจากการ treat อาร์เอ็นเอด้วย Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen) เพื่อกำจัดดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนจากการสกัดโดยผสมอาร์เอ็นเอความเข้มข้น 1µg กับน้ำยา (1x DNase I Reaction buffer, 0.1 U/ml DNase I Amp Grade) แล้วนำไปวางที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เมื่อครบเวลาให้ inactivate เอนไซม์ DNase I ด้วย 25 mM EDTA, pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ผ่านการ treat มาเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา RT-PCR และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ ดังตารางที่ 3.1 โดยผสมอาร์เอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 1 µg กับน้ำยาในการทำปฏิกิริยา RT-PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x Reaction Mix (0.4 mM dNTP mix, 3.2 mM MgSO₄), SuperScript[™] III RT/Platinum Taq

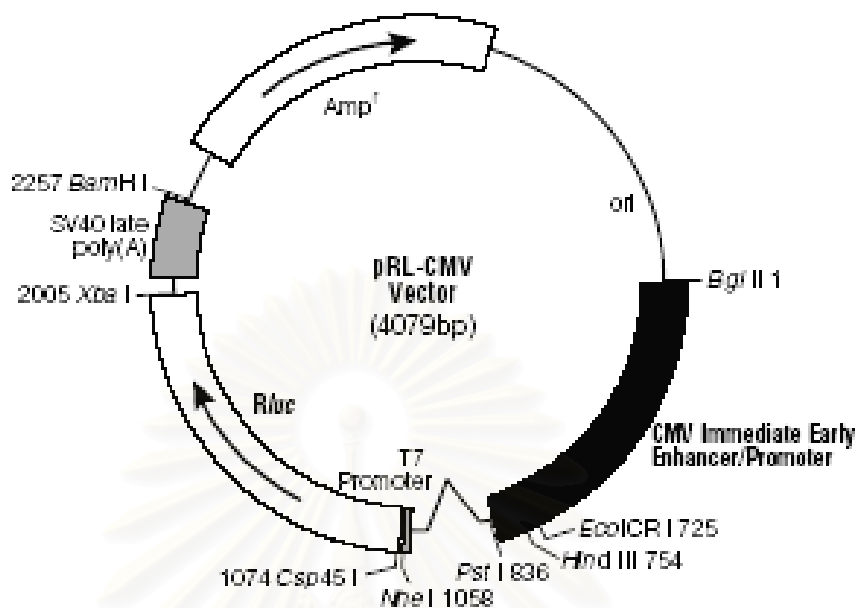
Mix, 0.2 μ M Forward และ Reverse primer โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 45 °C -60 °C นาน 15-30 นาทีในขั้นตอนการสร้างสาย complementary DNA (cDNA) จากนั้น ต่อด้วย 94.0 °C 2 นาที (1 รอบ), 94.0 °C 30 วินาที; 55.0 °C -65.0 °C 30 วินาที; 68.0 °C 2 นาที (40 รอบ); 68.0 °C 10 นาที (1 รอบ) เสร็จแล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลลอกกาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 1 % (1 % agarose gel electrophoresis) ย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล เซลล์ที่เหมาะสมในการทดลองจะต้องเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน receptor ของสารที่จะทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.1 แสดง primers จำเพาะที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ

Primer	Sequence	Product (bp)
h β -actin Sense	5'-ACG GGT CAC CCA CAC TGT GC-3'	863
h β -actin Anti-sense	5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT G-3'	
hER α Sense	5'-TAT GGG GTC TGG TCC TGT GA-3'	334
hER α Anti-sense	5'-GGG CGG GGC TAT TCT TCT TA-3'	
hER β Sense	5'-TTC CCG GCA GCA CCA GTA ACC-3'	262
hER β Anti-sense	5'-TCC CTC TTT GCG TTT GGA CTA-3'	
hGR α / β Sense	5'-CTT ACT GCT TCT CTC TTC AGT TCC T-3'	204
hGR α Anti-sense	5'-GCA ATA GTT AAG GAG ATT TTC AAC C-3'	
hGR β Anti-sense	5'-AGT GCA CAT AAT CTT CTT TTT CTC A-3'	
hGAPDH Sense	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'	226
hGAPDH Anti-sense	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'	
hSERT Sense	5'-CAT CTG GAA AGG CGT CAA G-3'	319
hSERT Anti-sense	5'-CGA AAC GAA GCT CGT CAT G-3'	
hEGFR Sense	5'-GCT ACG ATT GGC TGA AGT AC-3'	518
hEGFR Ant-sense	5'-ATT GGG TGT AGA GAG ACT GGA-3'	
hFGFR1 Sense	5'-CAT CAT CTA TTG CAC AGG GG-3'	442
hFGFR1 Anti-sense	5'-AGT CTT TCT CTG TTG CGT CCG-3'	
hFGFR2 Sense	5'-CTC AAC CAG AAG TGT ACG TG-3'	470
hFGFR2 Anti-sense	5'-GCT CCT GCT TAA ACT CCT TC-3'	

3.6 การถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง (Transfection)

นำดีเอ็นเอพลาสมิดที่สกัดได้ทั้ง 3 แบบ ซึ่งจะมีปริมาณและความบริสุทธิ์สูงมากเพียงพอที่จะทำการทดลอง มาทำการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ที่เหมาะสมที่ผ่านการคัดเลือกแล้วด้วยชุดน้ำยา Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการทดสอบ (เซลล์ SW480 จำนวน 40,000 เซลล์ต่อหลุมและเซลล์ HT-29 จำนวน 50,000 เซลล์ต่อหลุม) ใน 96 well cell culture plate และนำมา incubate ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO₂ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อให้ปริมาณเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 90-95 % ในวันต่อไปที่จะทำการทดลอง ก่อนการถ่ายโอนดีเอ็นเอให้ล้างเซลล์ที่จะทดสอบ 2 รอบด้วยอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มีซีรัม (serum) กับยาปฏิชีวนะผสมอยู่และจึงเติมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มีซีรัมกับยาปฏิชีวนะนั้นลงไปหลุมละปริมาตร 100 µl จากนั้นเติมส่วนผสม (complexes) ของดีเอ็นเอพลาสมิดที่จะทำการถ่ายโอนให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอสุดท้ายเท่ากับ 0.2 µg และพลาสมิดร่วม (Co-transfected pRL-CMV Vector) ดังแสดงลักษณะของพลาสมิดในรูปที่ 3.4 (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr. Robert K. Yu, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia) 0.02 µg ต่อหลุม กับน้ำยา Lipofectamine™ 2000 ปริมาตร 0.5 µl ต่อหลุม โดยเจือจางในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มีซีรัมกับยาปฏิชีวนะผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที ซึ่งในขั้นตอนนี้อาจเห็นสารละลายเป็นสีขุ่นได้ และสามารถเก็บส่วนผสมนี้ไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานถึง 6 ชั่วโมง ขั้นต่อมาปิเปตส่วนผสมที่เตรียมปริมาตร 50 µl ต่อหลุม ผสมให้เข้ากันโดยการเคาะ plate เบาๆ จากด้านข้าง แล้วนำมา incubate ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO₂ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วันต่อมาจึงทำการเปลี่ยนเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีซีรัมกับยาปฏิชีวนะผสมอยู่ และอาจผสมสารต่างๆ ได้แก่ dexamethasone water soluble (Sigma) หรือ β-estradiol water soluble (Sigma) ที่จะทดสอบกับเซลล์ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีซีรัมกับยาปฏิชีวนะผสมอยู่นี้ให้มีความเข้มข้นตามต้องการได้ ซึ่งการทดลองนี้จะใช้ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 10⁻³, 10⁻⁶ และ 10⁻⁹ nM (21, 281) เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 24 ชั่วโมงก่อนที่จะทดสอบการแสดงออกของยีน luciferase reporter ในวันต่อไป



รูปที่ 3.4 แสดงลักษณะของ Co-transfected pRL-CMV Vector

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

3.7 การทดสอบการแสดงออกของยีน luciferase reporter ด้วยเทคนิค

Reporter Gene Assay

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน luciferase reporter เพื่อศึกษา promoter activity ของยีน SERT จะทำการวัดโดยใช้ชุดน้ำยา Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) ซึ่งจะวัดทั้งปริมาณของ firefly luciferase จาก luciferase reporter gene constructs (pGL3-Basic Vector) ที่สร้างขึ้นกับปริมาณของ *Renilla* luciferase จาก pRL-CMV Vector ซึ่งเป็นตัวควบคุม (control reporter) ที่จะถูกถ่ายโอนร่วมกับดีเอ็นเอพลาสมิดที่ต้องการทดสอบ (co-transfected) เข้าไปด้วยพร้อมกัน เพื่อลดปัญหาผลกระทบจากจำนวนของเซลล์ที่ใช้ (cell number) และประสิทธิภาพในการ transfection (transfection efficiency) รวมถึงผลที่ไม่จำเพาะต่างๆ (global effects) เป็นต้น โดยนำเซลล์ที่จะตรวจวัดออกมาเติมน้ำยา Dual-Glo™ Luciferase Reagent (Dual-Glo™ Luciferase Buffer, Dual-Glo™ Luciferase Substrate) ปริมาตร 100 µl ต่อหลุมของ 96 well cell culture plate ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้ววัดปริมาณของ firefly luciferase จากนั้นเติมน้ำยา Dual-Glo™ Stop&Glo Reagent (Dual-Glo™

Stop&Glo Buffer, Dual-Glo™ Stop&Glo Substrate) อีก 100 μ l ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้ววัดปริมาณของ *Renilla luciferase* ซึ่งค่าของปริมาณแสง luminescence ที่ได้ทั้งสองจะถูกวัดด้วยเครื่อง VICTOR³ (PerkinElmer)

3.8 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

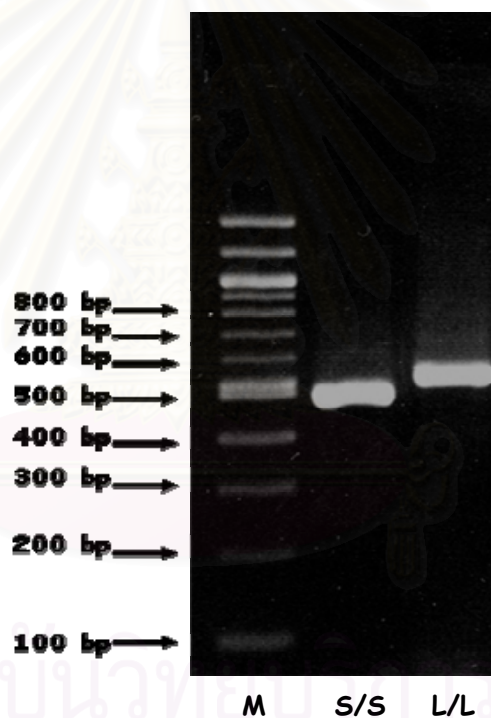
ข้อมูลที่ได้คือ activities ของ firefly luciferase กับ *Renilla luciferase* ซึ่งจะถูกนำมาเทียบเป็นอัตราส่วนของ firefly luciferase activities ต่อ *Renilla luciferase* activities ในแต่ละการทดลอง แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับอัตราส่วนที่มาจากการถูก transfect ด้วย negative control คือ pGL3-Basic plasmid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

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ตัวอย่าง

ผลการตรวจหาความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) จากดีเอ็นเอของอาสาสมัคร คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการเลือกตัวอย่างของดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายชนิด S อัลลีล (จีโนไทป์ประเภท S/S) และชนิด L อัลลีล (จีโนไทป์ประเภท L/L) มาอย่างละ 1 ราย โดยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจสอบจะมีขนาดประมาณ 484 คู่เบส และประมาณ 528 คู่เบสตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.1



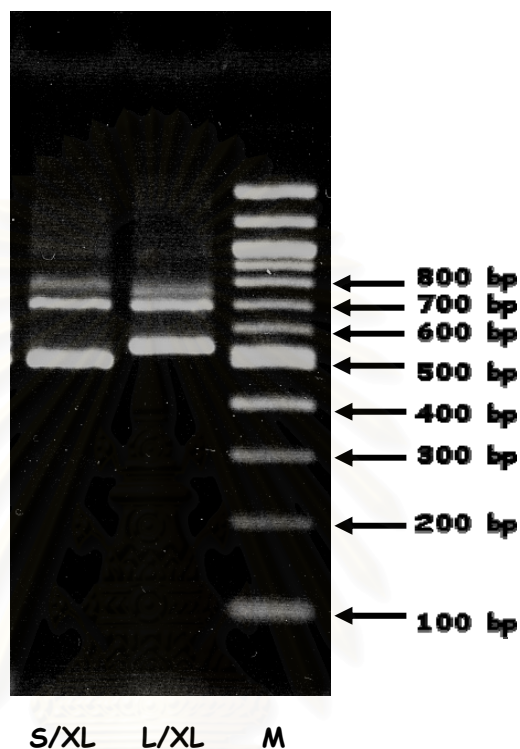
รูปที่ 4.1 แสดงผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR

ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) บนเจลอกาโรส

โดยแถวแรกเป็น DNA marker แสดงขนาดของคู่เบส (bp) กำกับไว้ (M)

และแถวถัดไปเป็นลักษณะของจีโนไทป์ประเภท S/S และ L/L ตามลำดับ

ในการทดลองครั้งนี้ นอกจากตัวอย่างของดีเอ็นเอที่มีจีโนไทป์ประเภท S/S และ L/L แล้ว คณะผู้วิจัยยังพบความหลากหลายของ 5-HTTLPR ชนิด XL อัลลีล แบบจีโนไทป์ประเภท S/XL และ L/XL ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) บนเจลอกาไรส โดยแถวแรกกับแถวที่ 2 เป็นลักษณะของจีโนไทป์ประเภท S/XL และ L/XL ตามลำดับ และแถวถัดไปเป็น DNA marker แสดงขนาดของคู่เบส (bp) กำกับไว้ (M)

4.2 การศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing)

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

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

แต่เมื่อนำลำดับเบสของ S อัลลีลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ L อัลลีลที่อยู่ในฐานข้อมูล (GenBank) กลับพบว่ามีความแตกต่างของลำดับเบสอยู่ 44 คู่เบส ซึ่งลำดับเบสที่แตกต่างกันนี้ เหมือนกันทั้งใน GenBank accession No. AF117826 และ No. X76753 ดังนี้

GenBank accession No. AF117826

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

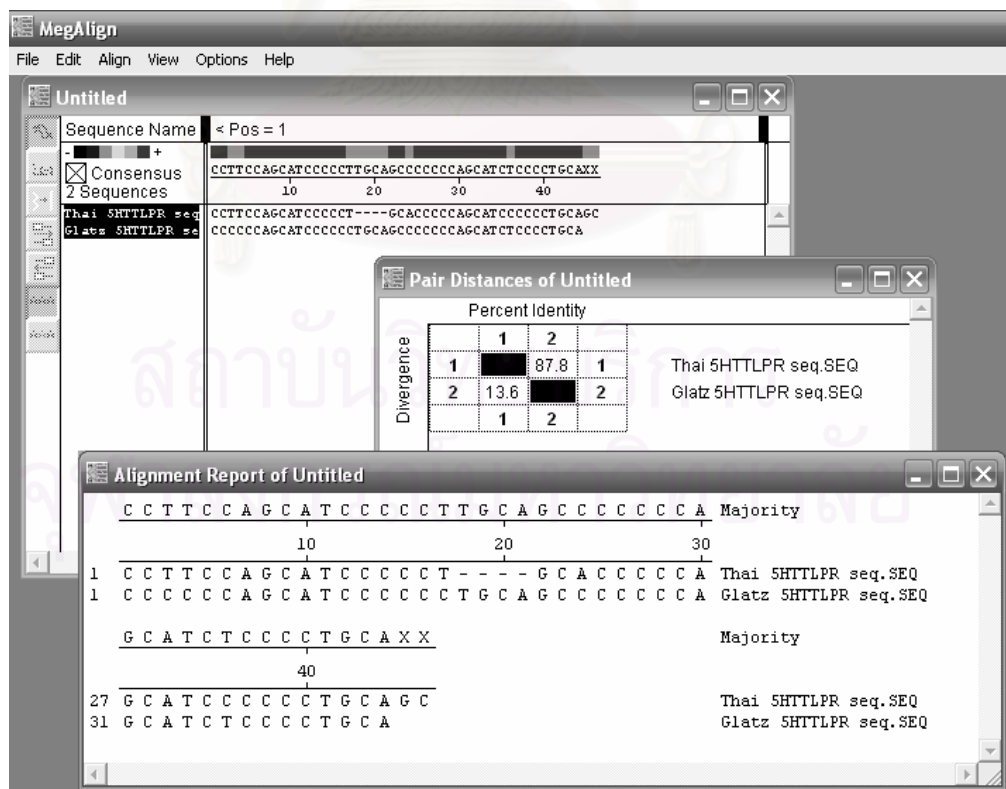
GenBank accession No. X76753

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

เมื่อนำลำดับเบสซึ่งมีความแตกต่างกันของทั้งสองอัลลีลอยู่ 42 คู่เบสที่ได้จากการศึกษา ครั้งนี้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสจากการศึกษาของ Heils (9) และ Glatz (21) ที่เคยรายงาน ความแตกต่างกันของทั้งสองอัลลีลอยู่ 44 คู่เบส ดังนี้

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

โดยใช้วิธี Jotan Hein Method ในโปรแกรม MegAlign ของบริษัท DNASTAR ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามีความคล้ายกันของลำดับเบสอยู่ประมาณ 87.8 % ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี Jotan Hein Method ในโปรแกรม MegAlign

สำหรับผลการศึกษา Transcription Factor ในลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของ ชนิด S และ L อัลลีลอยู่ 42 คู่เบส ด้วยโปรแกรม TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) พบว่ามี Transcription Factor ของมนุษย์ ที่มีจำเพาะสูงกับลำดับเบสดังกล่าวทั้งหมด 2 ตัว ได้แก่ GATA-2 และ MZF1 ดังแสดงในรูปที่ 4.4

TFSEARCH Search Result

** TFSEARCH ver.1.3 ** (c)1995 Yutaka Akiyama (Kyoto Univ.)

This simple routine searches highly correlated sequence fragments versus TFMATRIX transcription factor binding site profile database by E.Wingender, R.Khueppel, P.Dietze, H.Karas (GBF-Braunschweig).

<Warning> Scoring scheme is so straightforward in this version.
score = 100.0 * ('weighted sum' - min) / (max - min)
The score does not properly reflect statistical significance!

Database: TRANSFAC MATRIX TABLE, Rel.3.3 06-01-1998
Query: untitled (42 bases)
Taxonomy: Vertebrate
Threshold: 85.0 point

TFMATRIX entries with High-scoring:

entry	score
M00083 MZF1	96.5
M00075 GATA-1	90.6
M00075 GATA-1	90.6
M00076 GATA-2	88.1
M00076 GATA-2	88.1
M00083 MZF1	86.1

Total 6 high-scoring sites found.
Max score: 96.5 point, Min score: 86.1 point

รูปที่ 4.4 แสดงผลการวิเคราะห์ Transcription Factor ด้วยโปรแกรม TFSEARCH

4.3 การคัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการทดลอง

ในการตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีนต่างๆ ได้แก่ ยีน Serotonin transporter (SERT), Estrogen receptor (ER) ชนิด α และ β , Glucocorticoid receptor (GR) ชนิด α และ β , basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) receptor (bFGFR) ชนิด 1 และ 2 กับ Epidermal Growth Factor (EGF) receptor (EGFR) โดยใช้ยีน β -actin หรือยีน glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) เป็นตัวควบคุม ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line) เซลล์ HEp2 (Human Larynx carcinoma cell line) เซลล์ HeLa (Human Cervix carcinoma cell line) เซลล์ HaCaT (Human Keratinocyte cell line) เซลล์ HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line) เซลล์ Jurkat (Human T cell lymphoblast-like cell line) เซลล์ SW480 (Human colon

adenocarcinoma cell line) และเซลล์ L6 (Rat skeletal muscle cell line) เพื่อทำการคัดเลือกเซลล์ที่เหมาะสมในการทดลองครั้งนี้ ผลการศึกษาที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน Serotonin transporter (SERT), Estrogen receptor (ER) ชนิด α , Glucocorticoid receptor (GR) ชนิด α , basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) receptor (bFGFR) ชนิดที่ 1 และ Epidermal Growth Factor (EGF) receptor (EGFR) โดยใช้ยีน β -actin หรือยีน glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) เป็นตัวควบคุม ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ รวมถึงอุณหภูมิ Annealing ที่ใช้ในการตรวจสอบด้วย (เครื่องหมาย \checkmark คือมีการแสดงออกของยีนและ \times คือไม่มีการแสดงออกของยีน)

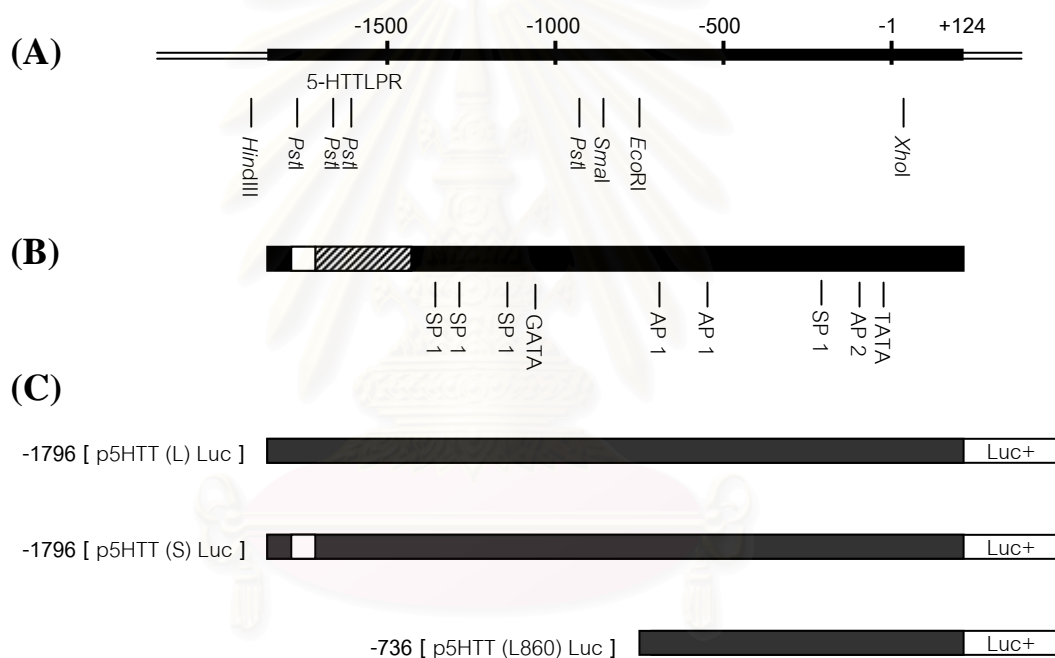
ยีน เซลล์	β -actin 58°C	GAPDH 58°C	SERT 59-60°C	hER α 58-59°C	hGR α 52°C	hEGFR 59°C	hFGFR1 59°C
HepG2	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
SW480	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
HT-29	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\times	\checkmark	\checkmark
HEp2	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
HeLa	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\times	\checkmark	\checkmark	\checkmark
HaCaT	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\times	\checkmark	\checkmark	\times
Jurkat	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\times	\checkmark
L6	\times	\times					

อย่างไรก็ตามยังคงไม่ทราบผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน Estrogen receptor (ER) ชนิด β , Glucocorticoid receptor (GR) ชนิด β และ basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) receptor (bFGFR) ชนิดที่ 2 เนื่องจากคณะผู้วิจัยไม่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ชนิดได้

จากผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ได้ คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้เซลล์ SW480 และเซลล์ HT-29 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีแหล่งกำเนิดจากระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ เป็นตัวแทนของเซลล์ที่เหมาะสมเป็นตัวแทนของเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน SERT (positive) เพื่อใช้ในการศึกษา promoter activity ของยีน SERT ในการทดลองต่อไป แต่เป็นที่น่าเสียดายอย่างยิ่งว่าในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยไม่สามารถที่จะหาตัวแทนของเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน SERT (negative) ได้

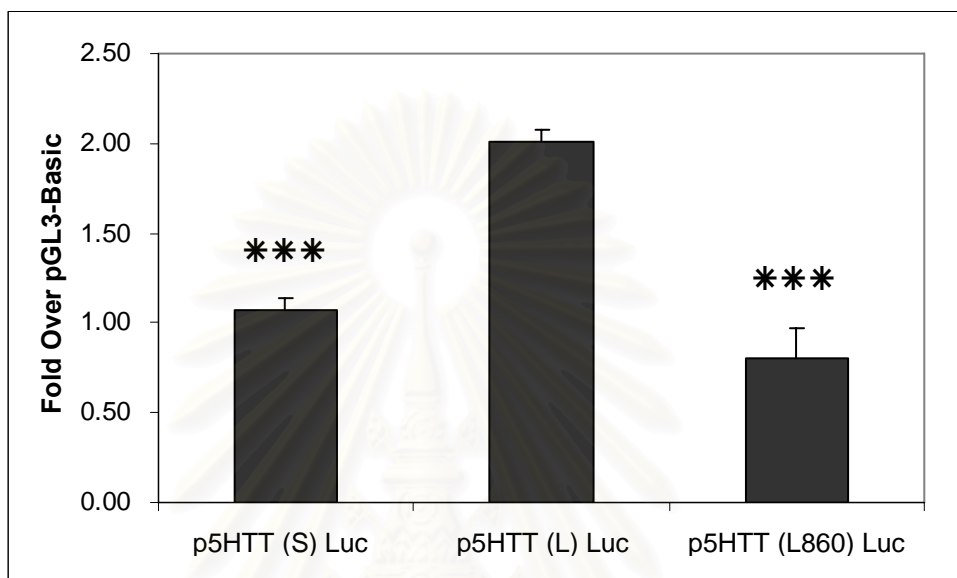
4.4 การศึกษา promoter activity ของยีน SERT

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษา promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบอัลลีล L และอัลลีล S รวมถึงเมื่อขาดส่วนความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR ไป (L860) โดยการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอลักษณะเหล่านี้ลงใน plasmid vector ที่ขาดส่วนของ promoter (promoterless luciferase expression vector pGL3-Basic) แล้วตรวจวัดด้วยเทคนิค Reporter gene assay ซึ่งใช้ activity ของยีน luciferase เป็นตัวบ่งบอกถึงการแสดงออกของยีน โดยลักษณะของดีเอ็นเอพลาสมิด (luciferase reporter gene constructs) ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้านี้ ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 แสดงแผนภาพของยีน SERT ในส่วน promoter ที่มีตำแหน่งของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ (12) (A) รวมถึง Transcription Factors (9, 12) (B) และแสดงลักษณะของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลอง (plasmid constructs) ที่ได้จากการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบอัลลีล L (p5HTT (L) Luc) และอัลลีล S (p5HTT (S) Luc) จากตำแหน่ง -1796 ถึง +124 รวมถึงชิ้นส่วนที่ขาดส่วนความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (L860) (p5HTT (L860) Luc) จากตำแหน่ง -736 ถึง +124 เหล่านี้ ลงใน Plasmid Vector ที่ขาดส่วนของ promoter (promoterless luciferase expression vector pGL3-Basic, Luc+) อ้างอิงจาก GenBank accession No. X76753 (C)

ผลการศึกษา promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบอัลลีล L และอัลลีล S รวมถึงเมื่อขาดส่วนความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (L860) ในเซลล์ SW480 เป็นดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 แสดง promoter activity ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบอัลลีล L (p5HTT (L) Luc) และอัลลีล S (p5HTT (S) Luc) รวมถึงเมื่อขาดส่วนความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (L860) (p5HTT (L860) Luc) ในเซลล์ SW480 ซึ่งแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิด pGL3-Basic จะถูกถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์พร้อมกับพลาสมิดร่วม pRL-CMV โดยค่า firefly luciferase activities ของแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจะถูกเทียบเป็นอัตราส่วนกับ *Renilla luciferase activities* และนำมาคำนวณเป็นจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) และแสดงค่าเฉลี่ยของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ในแต่ละแท่งกราฟ *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบค่าของ L อัลลีลด้วยสถิติ t-test

โดยพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ที่ได้ของแต่ละอัลลิลจากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) เป็นดังนี้

L อัลลิล (p5HTT (L) Luc) เท่ากับ 2.0141

S อัลลิล (p5HTT (S) Luc) เท่ากับ 1.0708

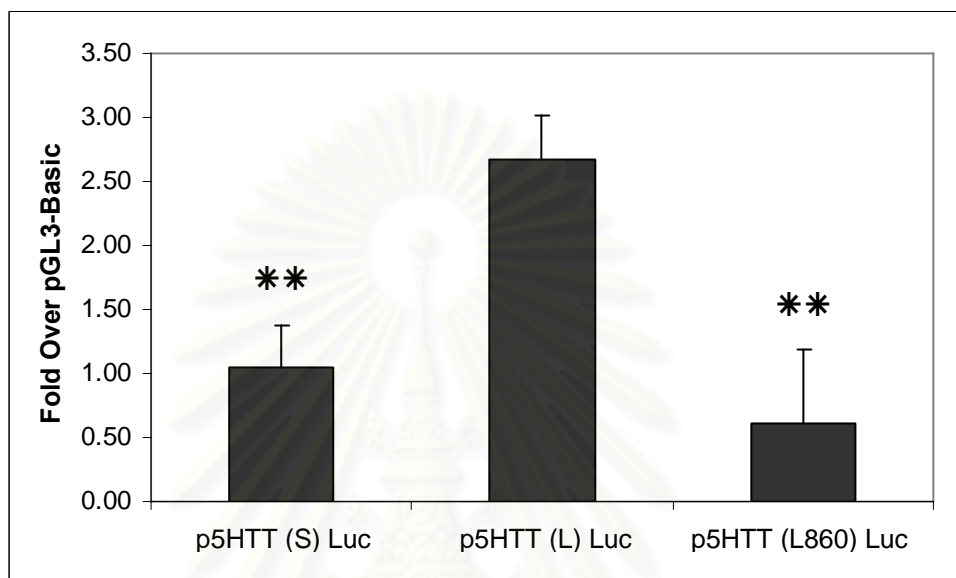
L860 (p5HTT (L860) Luc) อัลลิลเท่ากับ 0.8012

และเมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณสถิติ t-test เพื่อเปรียบเทียบกันนั้น พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control ของ L อัลลิลมากกว่าของ S อัลลิลและส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่ขาดลักษณะของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (L860) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.00005$ และ 0.001 ตามลำดับ)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษา promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบอัลลีล L และอัลลีล S รวมถึงเมื่อขาดส่วนความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (L860) ในเซลล์ HT-29 เป็นดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 แสดง promoter activity ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบอัลลีล L (p5HTT (L) Luc) และอัลลีล S (p5HTT (S) Luc) รวมถึงเมื่อขาดส่วนความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (L860) (p5HTT (L860) Luc) ในเซลล์ HT-29 ซึ่งแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิด pGL3-Basic จะถูกถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์พร้อมกับพลาสมิดร่วม pRL-CMV โดยค่า firefly luciferase activities ของแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจะถูกเทียบเป็นอัตราส่วนกับ *Renilla* luciferase activities และนำมาคำนวณเป็นจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) และแสดงค่าเฉลี่ยของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ในแต่ละแท่งกราฟ $**P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบค่าของ L อัลลีลด้วยสถิติ t-test

โดยพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ที่ได้ของแต่ละอัลลิลจากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) เป็นดังนี้

L อัลลิล (p5HTT (L) Luc) เท่ากับ 2.6775

S อัลลิล (p5HTT (S) Luc) เท่ากับ 1.0477

L860 อัลลิล (p5HTT (L860) Luc) เท่ากับ 0.6160

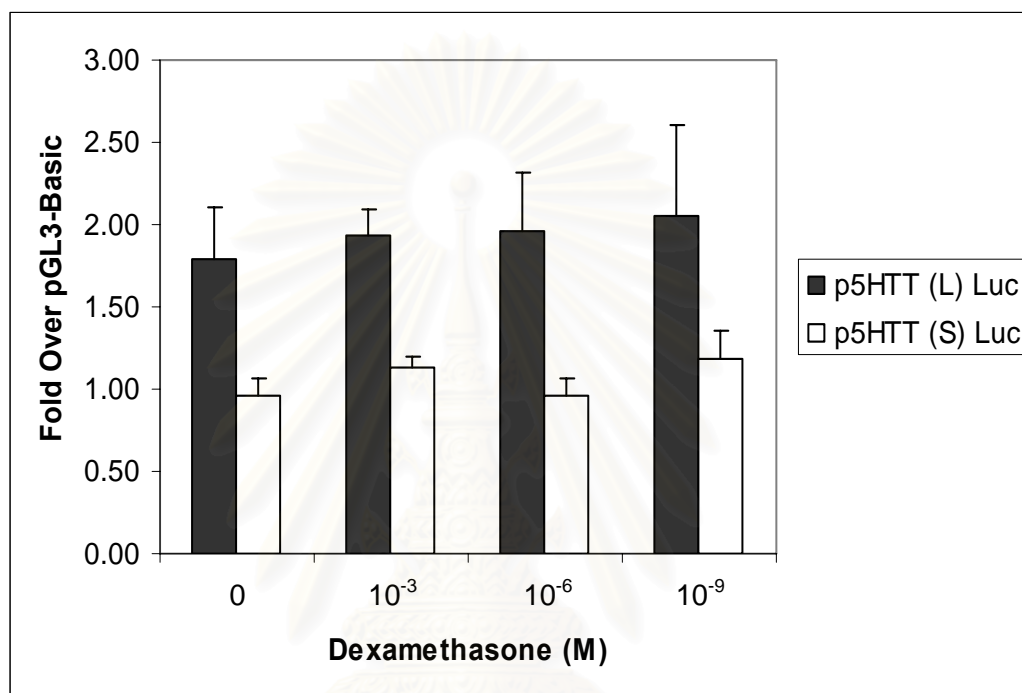
และเมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณสถิติ t-test เพื่อเปรียบเทียบกันนั้น พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control ของ L อัลลิลมากกว่าของ S อัลลิลและส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่ขาดลักษณะของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (L860) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.004$ และ 0.006 ตามลำดับ)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 การศึกษาผลของ Dexamethasone ต่อ promoter activity ของยีน SERT

การศึกษาผลของ dexamethasone ที่ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 0, 10^{-3} , 10^{-6} และ 10^{-9} M ต่อ promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบ อัลลีล L และอัลลีล S ในเซลล์ SW480 นั้น ผลการศึกษาที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 แสดงผลของ dexamethasone ที่ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 0, 10^{-3} , 10^{-6} และ 10^{-9} M ต่อ promoter activity ของยีนส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบอัลลีล L (p5HTT (L) Luc) และอัลลีล S (p5HTT (S) Luc) ในเซลล์ SW480 ซึ่งแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิด pGL3-Basic จะถูกถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์พร้อมกับพลาสมิดร่วม pRL-CMV โดยค่า firefly luciferase activities ของแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจะถูกเทียบเป็นอัตราส่วนกับ *Renilla* luciferase activities และนำมาคำนวณเป็นจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) และแสดงค่าเฉลี่ยของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ในแต่ละแท่งกราฟ

โดยพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ที่ได้ของแต่ละอัลลิลเมื่อทดสอบด้วยสาร dexamethasone ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0 M จากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) เป็นดังนี้

L อัลลิล (p5HTT (L) Luc) เท่ากับ 1.7938

S อัลลิล (p5HTT (S) Luc) เท่ากับ 0.9616

ค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ที่ได้ของแต่ละอัลลิลเมื่อทดสอบด้วยสาร dexamethasone ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-3} M จากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) เป็นดังนี้

L อัลลิล (p5HTT (L) Luc) เท่ากับ 1.9292

S อัลลิล (p5HTT (S) Luc) เท่ากับ 1.1268

ค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ที่ได้ของแต่ละอัลลิลเมื่อทดสอบด้วยสาร dexamethasone ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-6} M จากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) เป็นดังนี้

L อัลลิล (p5HTT (L) Luc) เท่ากับ 1.9602

S อัลลิล (p5HTT (S) Luc) เท่ากับ 0.9610

และค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ที่ได้ของแต่ละอัลลิลเมื่อทดสอบด้วยสาร dexamethasone ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-9} M จากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) เป็นดังนี้

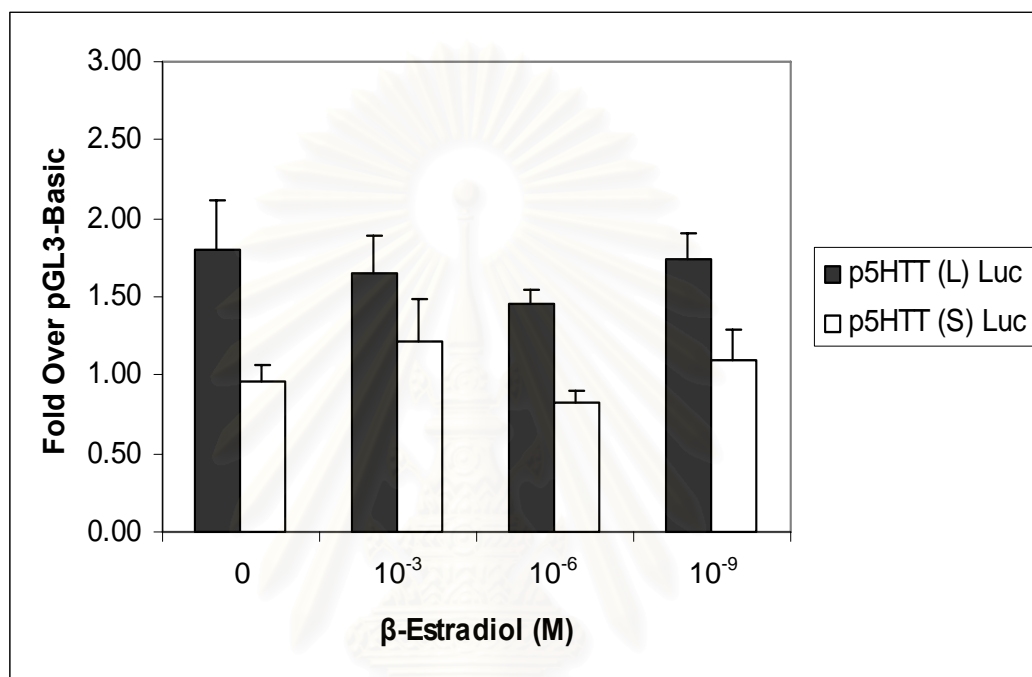
L อัลลิล (p5HTT (L) Luc) เท่ากับ 2.0501

S อัลลิล (p5HTT (S) Luc) เท่ากับ 1.1842

และเมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณสถิติ t-test เพื่อเปรียบเทียบกันนั้น พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control ของทั้ง L อัลลิลและ S อัลลิล เมื่อทดสอบด้วย dexamethasone ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-3} , 10^{-6} และ 10^{-9} M นั้นไม่แตกต่างจากการทดสอบที่ความเข้มข้น 0 M อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

4.6 การศึกษาผลของ β -Estradiol ต่อ promoter activity ของยีน SERT

การศึกษาผลของ β -estradiol ที่ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 0, 10^{-3} , 10^{-6} และ 10^{-9} M ต่อ promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบอัลลีล L และอัลลีล S ในเซลล์ SW480 นั้น ผลการศึกษาที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 แสดงผลของ β -estradiol ที่ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 0, 10^{-3} , 10^{-6} และ 10^{-9} M ต่อ promoter activity ของยีนส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบอัลลีล L (p5HTT (L) Luc) และอัลลีล S (p5HTT (S) Luc) ในเซลล์ SW480 ซึ่งแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิด pGL3-Basic จะถูกถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์พร้อมกับพลาสมิดรวม pRL-CMV โดยค่า firefly luciferase activities ของแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจะถูกเทียบเป็นอัตราส่วนกับ *Renilla* luciferase activities และนำมาคำนวณเป็นจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) และแสดงค่าเฉลี่ยของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ในแต่ละแท่งกราฟ

โดยพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ที่ได้ของแต่ละอัลลิลเมื่อทดสอบด้วยสาร β -estradiol ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0 M จากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) เป็นดังนี้

L อัลลิล (p5HTT (L) Luc) เท่ากับ 1.7938

S อัลลิล (p5HTT (S) Luc) เท่ากับ 0.9616

ค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ที่ได้ของแต่ละอัลลิลเมื่อทดสอบด้วยสาร β -estradiol ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-3} M จากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) เป็นดังนี้

L อัลลิล (p5HTT (L) Luc) เท่ากับ 1.6486

S อัลลิล (p5HTT (S) Luc) เท่ากับ 1.2092

ค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ที่ได้ของแต่ละอัลลิลเมื่อทดสอบด้วยสาร β -estradiol ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-6} M จากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) เป็นดังนี้

L อัลลิล (p5HTT (L) Luc) เท่ากับ 1.4579

S อัลลิล (p5HTT (S) Luc) เท่ากับ 0.8231

และค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ที่ได้ของแต่ละอัลลิลเมื่อทดสอบด้วยสาร β -estradiol ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-9} M จากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) เป็นดังนี้

L อัลลิล (p5HTT (L) Luc) เท่ากับ 1.7391

S อัลลิล (p5HTT (S) Luc) เท่ากับ 1.0897

และเมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณสถิติ t-test เพื่อเปรียบเทียบกันนั้น พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control ของทั้ง L อัลลิลและ S อัลลิล เมื่อทดสอบด้วย β -estradiol ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-3} , 10^{-6} และ 10^{-9} M นั้นไม่แตกต่างจากการทดสอบที่ความเข้มข้น 0 M อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

บทที่ 5

สรุป อภิปราย และวิจารณ์ผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ทั้งสองอัลลีลมีลำดับเบสที่แตกต่างกันอยู่ 42 คู่เบสจากดีเอ็นเอของอาสาสมัครเชื้อชาติไทย ซึ่งแตกต่างจากในเชื้อชาติ Caucasian ที่เคยมีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ว่าทั้งสองอัลลีลมีลำดับเบสที่แตกต่างกันอยู่ 44 คู่เบส แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งสองด้วยวิธี Jotan Hein Method โดยใช้โปรแกรม MegAlign (DNASTAR, สหรัฐอเมริกา) แล้วพบว่ามีความคล้ายกันของลำดับเบสอยู่ถึงประมาณ 87.8 % อีกทั้งพบว่ามี Transcription Factor ของมนุษย์ที่จำเพาะกับส่วนลำดับเบสที่แตกต่างกันของเชื้อชาติไทยนี้อยู่ 2 ชนิดด้วย ได้แก่ GATA-2 และ MZF1

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ นั้นพบว่า ทุกเซลล์มีการแสดงออกของยีน Serotonin transporter (SERT) และส่วนใหญ่ก็มีการแสดงออกของยีน Estrogen receptor (ER) ชนิด α กับ Glucocorticoid receptor (GR) ชนิด α ที่ใช้ในการศึกษานี้ด้วย ยกเว้นเซลล์ HeLa (Human Cervix carcinoma cell line) กับเซลล์ HaCaT (Human Keratinocyte cell line) ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน ER α และเซลล์ HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line) ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน GR α ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกที่จะใช้เซลล์ SW480 (Human colon adenocarcinoma cell line) ซึ่งเป็นเซลล์จากระบบทางเดินอาหารมาเป็นตัวแทนของเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน SERT (positive) และเหมาะสมในการศึกษาทดลองครั้งนี้ อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าเสียดายอย่างยิ่งว่าคณะผู้วิจัยไม่สามารถจะหาตัวแทนของเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน SERT (negative) ได้

ผลการศึกษา promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR ในเซลล์ SW480 นั้นพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ของ L อัลลีลมากกว่าของ S อัลลีลประมาณ 2 เท่า และสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.00005$) สอดคล้องกับผลการศึกษาในเซลล์ HT-29 ที่พบว่าค่าเฉลี่ยของ L อัลลีลมากกว่าของ S อัลลีลประมาณ 2.5 เท่า และสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.004$) เช่นกัน แต่เมื่อศึกษาถึงผลของสเตียรอยด์ฮอร์โมนต่างๆ ได้แก่ ฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ (dexamethasone) และฮอร์โมน

เอสโตรเจน (β -estradiol) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อ promoter activity ของยีน SERT แล้ว กลับไม่พบว่าการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญแต่อย่างใดทั้งความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR แบบ L อัลลีลและ S อัลลีล แสดงว่าฮอร์โมนทั้งสองชนิดนั้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน SERT ในเซลล์ SW480 และเซลล์ HT-29 ไม่ว่าจะเป็ความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR อัลลีลใดก็ตาม

อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ที่พบว่าทั้งสองอัลลีลมีลำดับเบสที่แตกต่างกันอยู่ 42 คู่เบสจากดีเอ็นเอของอาสาสมัครเชื้อชาติไทยนั้นแตกต่างจากในเชื้อชาติ Caucasian ที่เคยมีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ว่าทั้งสองอัลลีลมีลำดับเบสที่แตกต่างกันอยู่ 44 คู่เบส (9, 21) อาจเนื่องจากความแตกต่างทางด้านเชื้อชาติ อีกทั้งในแต่ละชุด (repeat elements) ของความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR ที่มีขนาดประมาณ 20-23 คู่เบสนั้น ยังสามารถแตกต่างด้วยความหลากหลายเกิดขึ้นภายในชุด (repeat elements) ได้เช่นกัน (3) อย่างไรก็ตาม ลำดับเบสของทั้งสองเชื้อชาตินี้มีความคล้ายกันของลำดับเบสอยู่ถึงประมาณ 87.8 % เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี Jotan Hein Method ในโปรแกรม MegAlign (DNASTAR, สหรัฐอเมริกา) นอกจากนี้หากนำลำดับเบสที่แตกต่างกันอยู่ 42 คู่เบสนั้น มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ได้จากการเทียบกันระหว่างลำดับเบสของ S อัลลีลในการศึกษาครั้งนี้กับลำดับเบสของ L อัลลีลจากลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank accession No. AF117826 และ No. X76753 พบว่ามีความแตกต่างกันของลำดับเบส รวมถึงความยาวหรือขนาดของลำดับเบส อย่างไรก็ตาม ลำดับเบสที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ทั้งสองหมายเลขนั้นเป็นลำดับเบสของเชื้อชาติ Caucasian

ผลการวิเคราะห์ Transcription Factor ของมนุษย์ที่จำเพาะกับส่วนลำดับเบส 42 คู่เบสที่แตกต่างกันของทั้งสองอัลลีลในเชื้อชาติไทยจากโปรแกรม TFSEARCH นั้นพบอยู่ด้วยกันทั้งหมด 2 ตัว ได้แก่ GATA-2 หรือ Endothelial transcription factor GATA-2 (GATA-binding protein2) และ MZF1 หรือ Myeloid zinc finger1 ซึ่งบทบาทหรือความสำคัญของ Transcription Factor ทั้งสองนี้ยังคงต้องศึกษาต่อไป โดยอาจใช้เทคนิค Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) ในการตรวจสอบว่ามีการจับกันของ Transcription Factor เหล่านี้ในบริเวณลำดับเบสของดีเอ็นเอหรือไม่ อย่างไร

ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้พบตัวอย่างดีเอ็นเอของอาสาสมัครที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR แบบ XL อัลลีล ซึ่งส่วนใหญ่แล้ว XL อัลลีลมักพบเฉพาะในเชื้อชาติแอฟริกา (96) และพบได้บ้างในเชื้อชาติญี่ปุ่น (66) ซึ่งการที่สามารถพบ XL อัลลีลได้ในเชื้อชาติไทยด้วยนั้น อาจเป็นการบ่งบอกถึงความสำคัญของการศึกษาการกระจายของอัลลีลนี้ในกลุ่มประชากรไทย รวมถึงความสัมพันธ์กับโรคต่างๆ โดยเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษานำร่องถึงการกระจายของอัลลีลในประเทศไทย พบว่าความถี่ของ XL อัลลีลเท่ากับร้อยละ 3.1 โดยมีความถี่ของ S และ L อัลลีลเท่ากับร้อยละ 62.5 และ 34.4 ตามลำดับ (61) อย่างไรก็ตาม กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ยังมีขนาดเล็กและควรทำการศึกษาต่อไปโดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้น

สำหรับลำดับเบสที่แตกต่างกันในส่วนความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ระหว่าง S และ L อัลลีลในงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยไม่สามารถที่จะระบุตำแหน่งของลำดับเบสดังกล่าวได้ เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีการทำฐานข้อมูลลำดับเบสทั้งหมด (Whole Genome) ในเชื้อชาติไทย ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงใช้การอ้างอิงจากลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank accession No. X76753 ในการระบุตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้แทน ถึงแม้ว่าลำดับเบสดังกล่าวจะเป็นของเชื้อชาติ Caucasian ก็ตาม แต่คาดได้ว่าลำดับเบสที่แตกต่างกันในส่วนความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR นี้ น่าจะอยู่ที่ตำแหน่งประมาณ -1630 ของยีน SERT ในปี 1996 Heils และคณะ (9) ได้รายงานลำดับเบสที่แตกต่างกันของ 5-HTTLPR ชนิด S และ L อัลลีล ดังนี้

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

โดยลำดับเบสดังกล่าวมีการรายงานว่าอยู่ที่ตำแหน่ง -1255 ถึง -1212 ซึ่งไม่ตรงกับที่คาดไว้ อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบใหม่อีกครั้งกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank accession No. X76753 กลับพบว่า เป็นตำแหน่ง -1638 ถึง -1595 ซึ่งใกล้เคียงกับตำแหน่งที่คาดไว้จากผลการทดลองในครั้งนี้ โดยภายหลังมีรายงานเพิ่มเติมว่ามีลำดับเบส (novel sequence) ขนาดประมาณ 380 คู่เบส อยู่ระหว่างความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR กับจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสซึ่งไม่ถูกรายงานไว้ในการศึกษาที่ผ่านมา และเมื่อเพิ่มเติมส่วนลำดับเบสที่ขาดหายนี้เข้าไปจะพบว่ามีตำแหน่งใกล้เคียงกับที่คาดไว้เช่นเดียวกัน (12, 282)

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ นั้นพบว่า นอกจากที่เคยมีการรายงานการแสดงออกของ SERT ในเซลล์ชนิดต่างๆ เช่น เซลล์ประสาท เซลล์รก เซลล์ enterochromaffin เซลล์ lymphocyte เซลล์ macrophage เซลล์ osteoclast เซลล์ osteoblast หรือ osteocyte หัวใจ หลอดเลือด กล้ามเนื้อ และต่อมหมวกไต เป็นต้นแล้ว จากการศึกษาครั้งนี้

ยังพบว่ามี การแสดงออกของ SERT ในเซลล์จากบริเวณลำไส้ใหญ่ (เซลล์ HT-29 และเซลล์ SW480) เซลล์ผิวหนัง (เซลล์ HaCaT) เซลล์ตับ (เซลล์ HepG2) เซลล์กล้ามเนื้อ (เซลล์ HEp2) เซลล์ปากมดลูก (HeLa) ด้วย ซึ่งในการศึกษาวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยจึงเลือกที่จะใช้เซลล์ SW480 และเซลล์ HT-29 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย epithelial (epithelial-like) ของลำไส้ใหญ่ในระบบทางเดินอาหารมาเป็นตัวแทนของเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน SERT (positive) และเหมาะสมในการศึกษา promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR รวมถึงผลของสเตียรอยด์ฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์กับฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วย แต่เนื่องจากผู้วิจัยยังไม่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการศึกษาดังกล่าวถึงผลของสเตียรอยด์ฮอร์โมนเหล่านี้ในเซลล์ HT-29 ได้ รวมถึงการที่เซลล์นี้ไม่มีการแสดงออกของยีน GR α แล้วนั้น ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาดังกล่าวเฉพาะแต่ในเซลล์ SW480 อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าเสียดายอย่างยิ่งที่ไม่สามารถจะหาตัวแทนของเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน SERT (negative) มาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ ทำให้ไม่ทราบว่าผลที่เกิดขึ้นจำเพาะกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน SERT เท่านั้นหรือไม่ อย่างไร ในความจริงแล้วเซลล์ HepG2 กับเซลล์ HaCaT ก็มีความเหมาะสมและน่าสนใจศึกษาเช่นกัน โดยมีรายงานถึงบทบาทสำคัญของซีโรโทนินในการงอกใหม่ของเซลล์ตับ (liver regeneration) (283, 284) และบทบาทในเซลล์ผิวหนังของโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) ด้วย เพียงแต่มีอุปสรรคในการทำการทดลองนั่นคือเซลล์ HepG2 ค่อนข้างที่จะเพาะเลี้ยงยากและเซลล์ HaCaT ที่ทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ยากกว่าเซลล์ชนิดอื่นๆ

โดยส่วนใหญ่แล้ว จากการศึกษที่ผ่านมา มักมุ่งเน้นไปที่การศึกษาในเซลล์ประสาท (12) เซลล์เม็ดเลือดขาว (11) และเซลล์รก (9, 21) เป็นต้นแบบ (model) หลัก เพื่อศึกษาถึง promoter activity ของความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR หากแต่ยังไม่เคยมีการรายงานถึง เซลล์ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเซลล์ลำไส้ใหญ่นั้นยังมีการศึกษาอยู่ค่อนข้างน้อย โดยเฉพาะในเรื่องของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR ถึงแม้ว่าซีโรโทนินจะมีบทบาทสำคัญในการทำงานของระบบทางเดินอาหาร รวมถึงเป็นแหล่งหลักของการสร้างและเก็บสะสมซีโรโทนินในร่างกายของมนุษย์ก็ตาม ทำให้คณะผู้วิจัยเลือกที่จะใช้เซลล์จากระบบทางเดินอาหารในการศึกษาครั้งนี้

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

เซลล์รก (9) การศึกษาของ Lesch และคณะในปี 1996 รายงานว่า basal activity ของ L อัลลีลมากกว่าของ S อัลลีลประมาณ 2 เท่าในเซลล์เม็ดเลือดขาว (11) และการศึกษาของ Mortensen และคณะในปี 1999 ที่รายงาน basal activity ของ L อัลลีลมากกว่าของ S อัลลีลประมาณ 2 เท่าในเซลล์ประสาทของหนู (12) แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าผลการศึกษาที่ได้นี้มีความจำเพาะกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของ SERT เท่านั้นหรือไม่ ถึงแม้ว่าจะเคยมีการศึกษาในเซลล์ COS-1 (Kidney monkey cell line) ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน SERT ด้วย (12) อย่างไรก็ตาม เซลล์ COS-1 ซึ่งเป็นเซลล์จากลิง รวมถึงเซลล์ RN64A (Immortalized serotonergic raphe neurons) ที่เป็นเซลล์ประสาทของหนูนั้นไม่เหมาะที่จะใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา promoter activity ในยีนของมนุษย์ เนื่องจากลำดับเบสในส่วน promoter ของยีนดังกล่าว อาจไม่จำเพาะกับ Transcription factor ในเซลล์ของสัตว์ทดลอง และทำให้ผลการทดลองที่ได้ผิดพลาดไป

ในการศึกษา promoter activity ของยีน SERT ของงานวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการตรวจวัด promoter activity ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า luciferase reporter gene assay โดยตรวจวัด promoter activity จากการแสดงออกของยีน luciferase reporter ซึ่งค่าที่ได้จะบ่งบอกถึง activity ของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR แต่ละอัลลีลในการแสดงออกของยีน อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบด้วยเทคนิคนี้อาจจะคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้ เพราะไม่ได้ครอบคลุมถึงวงจรของการควบคุม (gene regulation) ในร่างกายมนุษย์ เช่น กลไกการควบคุมย้อนกลับ (negative feedback) ทำให้ค่าที่วัดได้นั้นมากกว่าความเป็นจริง แต่การจะตรวจสอบปริมาณของซีโรโทนิน หรือ SERT ที่สร้างขึ้นจริงภายในเซลล์โดยที่มีกลไกการควบคุมย้อนกลับด้วยนั้น จำเป็นที่จะต้องเกี่ยวข้องกับการใช้สารกัมมันตภาพรังสี จึงไม่สามารถที่จะทำได้ในห้องปฏิบัติการในขณะนี้ ทำให้เป็นข้อจำกัดของงานวิจัย

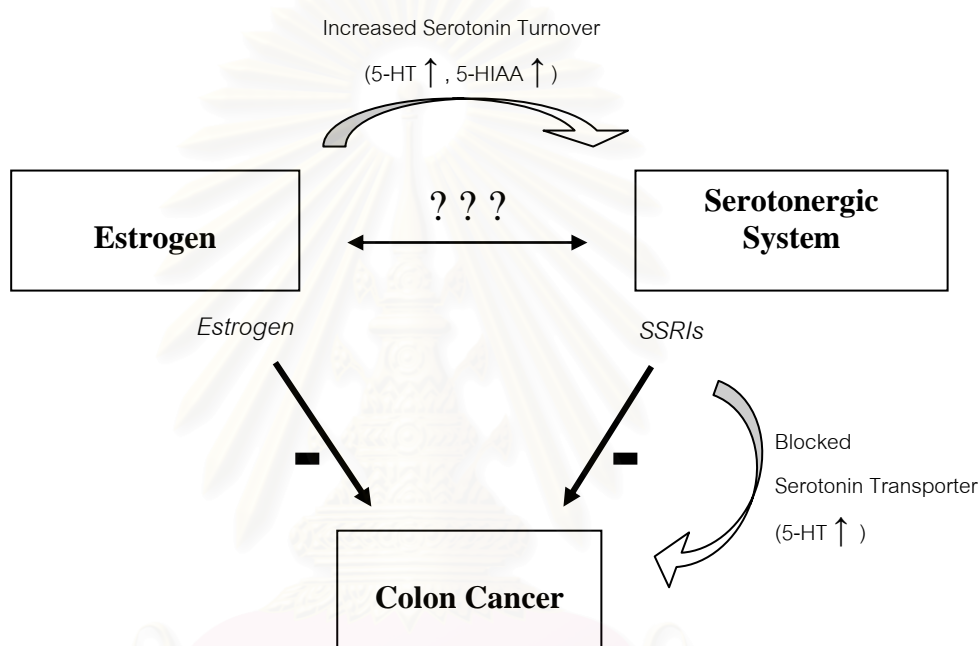
การศึกษาผลของสเตียรอยด์ฮอร์โมนต่อการแสดงออกของยีน พบว่าทั้งกลูโคคอร์ติคอยด์ (dexamethasone) และเอสโตรเจน (β -estradiol) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน SERT ไม่ว่าจะมีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR อัลลีลใดก็ตาม ซึ่งผลการศึกษาที่ได้นี้ขัดแย้งกับการศึกษาของ Glatz และคณะที่พบว่า กลูโคคอร์ติคอยด์มีผลต่อการแสดงออกของยีน SERT ผ่านทางความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR ในการศึกษาในเซลล์รก (21) อาจเป็นไปได้ว่าลำดับเบสในส่วนของ 5-HTTLPR ที่เป็นตำแหน่งซึ่งจับกับ Transcription Factor นั้นมีความจำเพาะต่อชนิดของเซลล์ (cell-specific) รวมถึงชนิดของฮอร์โมน (hormone-specific) ด้วยในการควบคุมการแสดงออกของยีน SERT

นอกจากฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์แล้ว เอสโตรเจนยังเป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนอีกตัวหนึ่งที่มีความสำคัญและน่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับซีโรโทนินด้วย ซึ่งปฏิสัมพันธ์ระหว่างเอสโตรเจนกับซีโรโทนินนั้น ได้มีการศึกษากันมานานในเรื่องของอารมณ์ (mood) และความจำ (cognition) โดยพบว่าเอสโตรเจนสามารถเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบต่างๆ ในกลไกการออกฤทธิ์ของซีโรโทนิน เช่น ซีโรโทนิน ตัวรับสัญญาณซีโรโทนิน (serotonin receptor) ตัวดูดกลับซีโรโทนิน (SERT) รวมไปถึงเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการสลายซีโรโทนินด้วย (285) ในปี 2001 มีรายงานว่าพบการแสดงออกของ ER β บนเซลล์ประสาทซีโรโทนิน ทั้งในระดับอาร์เอนเอขนส่งและระดับโปรตีน (286, 287) สอดคล้องกับผลการศึกษาทาง Immunocytochemical localization ในสมองของหนู (rat และ mouse) (288, 289) นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของซีโรโทนิน และสารเมแทบอลิท์ (5-HIAA) บริเวณต่างๆ ของสมองหลังจากได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนในหนูที่ถูกตัดรังไข่ออกแล้ว (ovariectomized rats) ได้แก่บริเวณ dorsal raphe และ striatum เป็นต้น (290, 291) บ่งบอกถึงการหมุนเวียนของสารซีโรโทนินที่มากขึ้น ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ tryptophan hydroxylase (292) ได้ เช่นเดียวกันนี้ยังมีรายงานถึงความสัมพันธ์ของเอสโตรเจนกับ SERT ด้วย แต่ผลการศึกษาที่ได้ไม่สอดคล้องกัน บางการศึกษานับเสนอว่าการได้รับเอสโตรเจนสามารถเพิ่มระดับของ SERT (27, 28) บางการศึกษากลับรายงานว่ามีการลดลงของระดับ SERT (22-26) การได้รับเอสโตรเจนนั้นยังสามารถลด activity ของเอนไซม์ monoamine oxidase (MAO) ในสมองของหนู (293) ระดับอาร์เอนเอขนส่งของเอนไซม์ MAO ชนิด A ในบริเวณ dorsal raphe ของลิง (294) รวมถึงเพิ่มการแสดงออกของยีน serotonin receptor ชนิด 2A ในหนูด้วย (295, 296) จากการศึกษาที่ผ่านมาล้วนสนับสนุนความสำคัญของชนิด β ต่อซีโรโทนินมากกว่าชนิด α เนื่องจาก ER ส่วนใหญ่ที่แสดงออกบนเซลล์ประสาทซีโรโทนินนั้นเป็นชนิด β (286, 287) อีกทั้งยา Tamoxifen ที่เป็น ER β antagonist สามารถยับยั้งผลของเอสโตรเจนต่อซีโรโทนิน (297) ด้วย อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยไม่ได้ตรวจสอบการแสดงออกของ ER β ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างเอสโตรเจนกับ SERT หากผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนจำเป็นต้องอาศัย ER β แต่ทว่าเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นเซลล์มะเร็งจากลำไส้ใหญ่ (colon) ของระบบทางเดินอาหาร ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ epithelial (epithelial-like) ซึ่งพบว่ามีรายงานการแสดงออกของ ER β ในเซลล์มะเร็งชนิดนี้และในเนื้อเยื่อปกติของลำไส้ใหญ่ด้วย (298-300) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ β -estradiol ในการทดลองครั้งนี้ สารตัวนี้มีคุณสมบัติที่สามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งทาง ER α และ ER β ซึ่งผลการทดลองนี้พบการแสดงออกของ ER α ในเซลล์ SW480 กับ HT-29 ด้วย นอกจากการศึกษาในสัตว์ทดลองดังที่กล่าวมาแล้วนั้น ยังมีการศึกษาในมนุษย์ซึ่งสนับสนุนบทบาทของเอสโตรเจนต่อซีโรโทนินด้วย เช่นพบว่าในผู้หญิงหลัง

วัยหมดประจำเดือนที่ได้รับเอสโตรเจนทางผิวหนังและการรับประทานนั้น จะมีการขับ 5-HIAA ทางปัสสาวะมากขึ้น (301) บ่งบอกถึงการหมุนเวียนซีโรโทนินที่เพิ่มขึ้น รวมถึงช่วยปรับสภาวะของ อารมณ์และเพิ่มการจับกับ imipramine บนเกล็ดเลือด (302) แม้ว่าการจับกับ paroxetine นั้นจะไม่เปลี่ยนแปลง (303)

ไม่เพียงแต่ระบบประสาทเท่านั้น ฮอริโมนเอสโตรเจนยังมีบทบาทในระบบทางเดินอาหาร ด้วย โดยเฉพาะเรื่องของมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) ซึ่งโรคนี้พบว่ามีการเกิดในเพศชายสูงกว่าเพศหญิงเกือบ 50 % บ่งบอกถึงความเกี่ยวข้องกับเรื่องของฮอริโมนเพศ ซึ่งยังพบว่าอุบัติการณ์เกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ในผู้หญิงหลังวัยหมดประจำเดือนนั้น จะสูงกว่าผู้หญิงก่อนวัยหมดประจำเดือน (304) แต่จะลดลงในผู้หญิงหลังวัยหมดประจำเดือนที่รักษาด้วยฮอริโมนเอสโตรเจน (305, 306) อีกทั้งจากหลักฐานการศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่ทั้งแบบ case-control และ cohort ล้วนสนับสนุนว่า เอสโตรเจนสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ (307) ตัวอย่างเช่นการศึกษาแบบ cohort ของ Calle และคณะพบว่าการรักษาด้วยฮอริโมนเอสโตรเจน ในผู้หญิงหลังวัยหมดประจำเดือนจะสัมพันธ์กับความเสี่ยงของโรคมะเร็งลำไส้ที่ลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากใช้มาเป็นระยะเวลาานาน (long-term) (308) และล่าสุดมีการรายงานถึงความสำคัญของ ER β ในระบบทางเดินอาหาร โดยที่ศึกษาเปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยา (morphology) วิทยาเนื้อเยื่อ (histology) การเจริญ (proliferation) และการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของเซลล์ epithelium ในลำไส้ใหญ่ของหนูที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน ER β กับหนูปกติ (wild-type) พบว่าหนูที่ขาด ER β จะมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์มากกว่าหนูปกติ และมีการตายของเซลล์ลดลงด้วย สนับสนุนว่า ER β มีบทบาทในการเจริญ รวมถึงการจัดโครงสร้าง (organization) และรักษาสภาพ (maintenance) ของเนื้อเยื่อบริเวณ crypt-villus ในลำไส้ใหญ่ปกติ (309) ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า เอสโตรเจนน่าจะมีบทบาทในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะที่ลำไส้ใหญ่ อย่างไรก็ตาม ยังคงไม่ทราบกลไกในระดับโมเลกุล (molecular mechanism) ที่ชัดเจน แต่คณะผู้วิจัยคาดว่าอาจมีความเกี่ยวข้องกับซีโรโทนินเช่นเดียวกันกับในระบบประสาท โดยเฉพาะ SERT เนื่องจากเมื่อเร็ว ๆ นี้เองมีรายงานพบว่าการใช้ยาต้านโรคซึมเศร้า (antidepressants) ชนิด SSRIs ในปริมาณที่สูงมาก ($>6.0 \times 10^{-6}$ โมลต่อวัน) ทุกวันเป็นระยะเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 5 ปีนั้นสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้โดยอาจไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ (310) อย่างไรก็ตาม ยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมมากถึงผลของ SSRIs รวมไปถึงการทดสอบยา (trial) ก่อนที่จะนำไปใช้รักษาจริง (311) จากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ผู้วิจัยคาดว่าอาจจะมีความเป็นไปได้ ที่ความสัมพันธ์ระหว่างฮอริโมนเอสโตรเจนกับโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่นั้น

จะเกี่ยวข้องกับกลไกการออกฤทธิ์ของซีโรโทนิน และการที่เอสโตรเจนสามารถป้องกันหรือลดความเสี่ยงของการเกิดโรคได้นั้นไม่ได้เป็นผลโดยตรงของมัน แต่เป็นผลทางอ้อมที่ผ่านกลไกของซีโรโทนินแทน ซึ่งไม่ว่าจะเป็นการใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือ SSRIs ก็ตามล้วนมีผลทำให้ปริมาณของซีโรโทนินเพิ่มมากขึ้น โดยการเพิ่มขึ้นของซีโรโทนินนี้อาจเป็นกลไกหนึ่งในการลดความเสี่ยงของโรคได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 แสดงแผนภาพกลไกที่เป็นไปได้ (proposed mechanism) ของความสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมนเอสโตรเจนและซีโรโทนินกับโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

แต่จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ฮอร์โมนเอสโตรเจนไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน SERT ไม่ว่าจะมีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR อัลลีลใดก็ตาม แสดงว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณซีโรโทนินไม่ได้เกิดจากผลโดยตรงของเอสโตรเจนต่อ SERT เป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของ SERT หลังจากได้รับเอสโตรเจนนั้น เป็นผลทางอ้อมจากผลของเอสโตรเจนต่อองค์ประกอบอื่นๆ ในกลไกของซีโรโทนิน เช่นมีผลต่อการสร้างซีโรโทนินโดยตรง และเมื่อได้รับสารไปเป็นระยะเวลาหนึ่งก็อาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ SERT ตามมาได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อการแสดงออกของยีน SERT ที่ผ่านมามักทำในสัตว์ทดลอง เช่น ลิง (22, 23, 27) หรือสัตว์ที่ใช้ฟันกัดแทะ (rodents) เช่น หนู (rat) (24, 25, 28)

และหนู (mouse) (26) เป็นต้น แต่ความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR นี้สามารถพบได้เฉพาะในมนุษย์และในสัตว์ไพรเมท (primates) ที่ไม่ใช่มนุษย์ เช่น ลิง (rhesus monkey) ที่มีความหลากหลายของยีนในบริเวณ 5'-flanking region เป็น 21 bp insertion or deletion (rh5-HTTLPR) ขณะที่ในพวก prosimians และสัตว์ที่ใช้ฟันกัดแทะ (rodents) ไม่พบว่ามีความหลากหลายดังกล่าว (21)

การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมนเอสโตรเจนกับซีโรโทนิน ถือเป็นเรื่องที่มีความสำคัญ ไม่ว่าจะเป็นในระบบประสาทหรือระบบทางเดินอาหารก็ตาม เอสโตรเจนในเพศหญิงจัดเป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนตัวหนึ่งที่ใช้ในการรักษา (hormone therapy) เพื่อทดแทนฮอร์โมนที่ขาดไป (replacement) หรือบรรเทาอาการจากการหมดประจำเดือน เช่น อาการร้อนวูบวาบ (hot flashes) รวมถึงช่วยลดความเสี่ยงของภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) ในผู้หญิงหลังวัยหมดประจำเดือน (postmenopause) รวมถึงผู้หญิงก่อนวัยหมดประจำเดือนที่ขาดเอสโตรเจนเนื่องจากการผ่าตัด (surgical menopause) ด้วย อย่างไรก็ตาม หากได้รับเป็นระยะเวลาสั้นหรือในปริมาณที่มากเกินไปก็สามารถทำให้เกิดผลข้างเคียงได้ เช่น โรคกระดูกพรุน โรคหัวใจ เป็นต้น ดังนั้น การเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมนเอสโตรเจนกับซีโรโทนินถึงกลไกในระดับโมเลกุลจะเป็นแนวทางในการผลิตคิดค้นยาหรือวิธีการรักษาใหม่ๆ เพื่อให้สามารถรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ภาพมากขึ้นโดยลดความเสี่ยงที่จะเกิดผลข้างเคียงลง และยังช่วยในการป้องกันรวมถึงการเลือกใช้วิธีการรักษาด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจนได้อย่างถูกต้องและเหมาะสมกับแต่ละบุคคลด้วย

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยพบองค์ความรู้ใหม่ที่แสดงว่าความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR นั้นมีบทบาทในเซลล์จากระบบทางเดินอาหาร เช่นเดียวกับในเซลล์รก เซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ประสาท อย่างไรก็ตาม ควรทำการศึกษาในเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน SERT ในการศึกษาต่อไปด้วย เพื่อให้สามารถสรุปได้ว่าผลการศึกษาที่ได้นี้มีความจำเพาะกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของ SERT เท่านั้นหรือไม่ นอกจากนี้ควรทำการศึกษาปริมาณของซีโรโทนินหรือ SERT ที่สร้างขึ้นจริงภายในเซลล์โดยที่มีกลไกการควบคุมย้อนกลับด้วย เพื่อยืนยันผลการทดลอง ส่วนผลการศึกษาฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ และ เอสโตรเจนนั้นไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ต่อการแสดงออกของยีน SERT ไม่ว่าจะเป็นความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR อัลลีลใดก็ตาม อย่างไรก็ตาม การศึกษากลไกในระดับโมเลกุลของปฏิสัมพันธ์ระหว่าง เอสโตรเจนกับซีโรโทนิน ยังคงไม่ทราบแน่ชัดและน่าสนใจที่จะศึกษาต่อถึงกลไกที่แท้จริง แม้ว่าจากการศึกษาครั้งนี้จะไม่พบบทบาทของเอสโตรเจนต่อ SERT สำหรับลำดับเบส 42 คู่เบสที่ได้จากการศึกษาในส่วน

ความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR นั้นแตกต่างจากที่เคยมีการศึกษาไว้ในเชื้อชาติ Caucasian ซึ่งคณะผู้วิจัยเสนอว่าควรจะมีการทำฐานข้อมูลลำดับเบสทั้งหมด (whole genome) ในเชื้อชาติไทย เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาถึงยีนที่ก่อให้เกิดโรค และการศึกษาทางด้านเภสัชพันธุศาสตร์ (pharmacogenomics) ต่อไปในอนาคต



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- [1] Frazer A, Hensler JG. Part two. Intracellular Signaling. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects Sixth Edition [Online]. 1999. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=bnchm.section.946> [2007, Feb 15]
- [2] Katzung BG. Chapter 16. Histamine, Serotonin, & the Ergot Alkaloids. Basic & Clinical Pharmacology. 10th Edition [Online]. 2006. Available from: <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aID=2501872> [2007, Feb 15]
- [3] Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. Mol Interv 4 (Apr 2004): 109-23.
- [4] Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, et al. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. Proc Natl Acad Sci U S A 90 (Mar 1993): 2542-6.
- [5] Mortensen OV, Kristensen AS, Rudnick G, Wiborg O. Molecular cloning, expression and characterization of a bovine serotonin transporter. Brain Res Mol Brain Res 71 (Jul 1999): 120-6.
- [6] Blakely RD, Berson HE, Fremeau RT, Jr., Caron MG, Peek MM, Prince HK, et al. Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. Nature 354 (Nov 1991): 66-70.
- [7] Hoffman BJ, Mezey E, Brownstein MJ. Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. Science 254 (Oct 1991): 579-80.
- [8] Chang AS, Chang SM, Starnes DM, Schroeter S, Bauman AL, Blakely RD. Cloning and expression of the mouse serotonin transporter. Brain Res Mol Brain Res 43 (Dec 1996): 185-92.
- [9] Heils A, Teufel A, Petri S, Stober G, Riederer P, Bengel D, et al. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. J Neurochem 66 (Jun 1996): 2621-4.

- [10] Heils A, Mossner R, Lesch KP. The human serotonin transporter gene polymorphism--basic research and clinical implications. J Neural Transm 104 (1997): 1005-14.
- [11] Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. Science 274 (Nov 1996): 1527-31.
- [12] Mortensen OV, Thomassen M, Larsen MB, Whitemore SR, Wiborg O. Functional analysis of a novel human serotonin transporter gene promoter in immortalized raphe cells. Brain Res Mol Brain Res 68 (May 1999): 141-8.
- [13] Liao DL, Hong CJ, Shih HL, Tsai SJ. Possible association between serotonin transporter promoter region polymorphism and extremely violent crime in Chinese males. Neuropsychobiology 50 (2004): 284-7.
- [14] Retz W, Retz-Junginger P, Supprian T, Thome J, Rosler M. Association of serotonin transporter promoter gene polymorphism with violence: relation with personality disorders, impulsivity, and childhood ADHD psychopathology. Behav Sci Law 22 (2004): 415-25.
- [15] Hauser J, Leszczynska A, Samochowiec J, Czerski PM, Ostapowicz A, Chlopocka M, et al. Association analysis of the insertion/deletion polymorphism in serotonin transporter gene in patients with affective disorder. Eur Psychiatry 18 (May 2003): 129-32.
- [16] Gonda X, Juhasz G, Laszik A, Rihmer Z, Bagdy G. Subthreshold depression is linked to the functional polymorphism of the 5HT transporter gene. J Affect Disord 87 (Aug 2005): 291-7.
- [17] Dubertret C, Hanoun N, Ades J, Hamon M, Gorwood P. Family-based association study of the 5-HT transporter gene and schizophrenia. Int J Neuropsychopharmacol 8 (Mar 2005): 87-92.
- [18] Di Bella D, Erzegovesi S, Cavallini MC, Bellodi L. Obsessive-Compulsive Disorder, 5-HTTLPR polymorphism and treatment response. Pharmacogenomics J 2 (2002): 176-81.

- [19] Mossner R, Schmitt A, Syagailo Y, Gerlach M, Riederer P, Lesch KP. The serotonin transporter in Alzheimer's and Parkinson's disease. J Neural Transm Suppl 60 (2000): 345-50.
- [20] Gaysina D, Zainullina A, Gabdulhakov R, Khusnutdinova E. The serotonin transporter gene: polymorphism and haplotype analysis in Russian suicide attempters. Neuropsychobiology 54 (2006): 70-4.
- [21] Glatz K, Mossner R, Heils A, Lesch KP. Glucocorticoid-regulated human serotonin transporter (5-HTT) expression is modulated by the 5-HTT gene-promotor-linked polymorphic region. J Neurochem 86 (Sep 2003): 1072-8.
- [22] Pecins-Thompson M, Brown NA, Bethea CL. Regulation of serotonin re-uptake transporter mRNA expression by ovarian steroids in rhesus macaques. Brain Res Mol Brain Res 53 (Jan 1998): 120-9.
- [23] Bethea CL, Gundlah C, Mirkes SJ. Ovarian steroid action in the serotonin neural system of macaques. Novartis Found Symp 230 (2000): 112-30; discussion 30-3.
- [24] McQueen JK, Wilson H, Sumner BE, Fink G. Serotonin transporter (SERT) mRNA and binding site densities in male rat brain affected by sex steroids. Brain Res Mol Brain Res 63 (Jan 1999): 241-7.
- [25] Koldzic-Zivanovic N, Seitz PK, Watson CS, Cunningham KA, Thomas ML. Intracellular signaling involved in estrogen regulation of serotonin reuptake. Mol Cell Endocrinol 226 (Oct 2004): 33-42.
- [26] Bertrand PP, Paravitane UT, Chavez C, Gogos A, Jones M, van den Buuse M. The effect of low estrogen state on serotonin transporter function in mouse hippocampus: a behavioral and electrochemical study. Brain Res 1064 (Dec 2005): 10-20.
- [27] Lu NZ, Eshleman AJ, Janowsky A, Bethea CL. Ovarian steroid regulation of serotonin reuptake transporter (SERT) binding, distribution, and function in female macaques. Mol Psychiatry 8 (Mar 2003): 353-60.

- [28] Krajnak K, Rosewell KL, Duncan MJ, Wise PM. Aging, estradiol and time of day differentially affect serotonin transporter binding in the central nervous system of female rats. Brain Res 990 (Nov 2003): 87-94.
- [29] Kim DY, Camilleri M. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. Am J Gastroenterol 95 (Oct 2000): 2698-709.
- [30] Badria FA. Melatonin, serotonin, and tryptamine in some egyptian food and medicinal plants. J Med Food 5 (Fall 2002): 153-7.
- [31] Feldman JM, Lee EM. Serotonin content of foods: effect on urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid. Am J Clin Nutr 42 (Oct 1985): 639-43.
- [32] Afaghi A, O'Connor H, Chow CM. High-glycemic-index carbohydrate meals shorten sleep onset. Am J Clin Nutr 85 (Feb 2007): 426-30.
- [33] Wurtman RJ, Wurtman JJ. Carbohydrate craving, obesity and brain serotonin. Appetite 7 Suppl (1986): 99-103.
- [34] Yin J, Albert RH, Tretiakova AP, Jameson BA. 5-HT_{1B} receptors play a prominent role in the proliferation of T-lymphocytes. J Neuroimmunol 181 (Dec 2006): 68-81.
- [35] Leon-Ponte M, Ahern GP, O'Connell P J. Serotonin provides an accessory signal to enhance T cell activation by signaling through the 5-HT₇ receptor. Blood (Dec 2006).
- [36] Camilleri M. Serotonergic modulation of visceral sensation: lower gut. Gut 51 Suppl 1 (Jul 2002): i81-6.
- [37] Tack J, Sarnelli G. Serotonergic modulation of visceral sensation: upper gastrointestinal tract. Gut 51 Suppl 1 (Jul 2002): i77-80.
- [38] Ormsbee HS, 3rd, Fondacaro JD. Action of serotonin on the gastrointestinal tract. Proc Soc Exp Biol Med 178 (Mar 1985): 333-8.
- [39] Gershon MD. Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. Aliment Pharmacol Ther 13 Suppl 2 (May 1999): 15-30.
- [40] Tuladhar BR, Costall B, Naylor RJ. 5-HT₃ and 5-HT₄ receptor-mediated facilitation of the emptying phase of the peristaltic reflex in the marmoset isolated ileum. Br J Pharmacol 117 (Apr 1996): 1679-84.

- [41] Pan H, Gershon MD. Activation of intrinsic afferent pathways in submucosal ganglia of the guinea pig small intestine. J Neurosci 20 (May 2000): 3295-309.
- [42] Gershon MD. Review article: serotonin receptors and transporters -- roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. Aliment Pharmacol Ther 20 Suppl 7 (Nov 2004): 3-14.
- [43] Wade PR, Chen J, Jaffe B, Kassem IS, Blakely RD, Gershon MD. Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. J Neurosci 16 (Apr 1996): 2352-64.
- [44] Ni W, Watts SW. 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). Clin Exp Pharmacol Physiol 33 (Jul 2006): 575-83.
- [45] Balkovetz DF, Tiruppathi C, Leibach FH, Mahesh VB, Ganapathy V. Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush-border membranes. J Biol Chem 264 (Feb 1989): 2195-8.
- [46] Cool DR, Leibach FH, Bhalla VK, Mahesh VB, Ganapathy V. Expression and cyclic AMP-dependent regulation of a high affinity serotonin transporter in the human placental choriocarcinoma cell line (JAR). J Biol Chem 266 (Aug 1991): 15750-7.
- [47] Prasad PD, Hoffmans BJ, Moe AJ, Smith CH, Leibach FH, Ganapathy V. Functional expression of the plasma membrane serotonin transporter but not the vesicular monoamine transporter in human placental trophoblasts and choriocarcinoma cells. Placenta 17 (May 1996): 201-7.
- [48] Padbury JF, Tseng YT, McGonnigal B, Penado K, Stephan M, Rudnick G. Placental biogenic amine transporters: cloning and expression. Brain Res Mol Brain Res 45 (Apr 1997): 163-8.
- [49] Martel F, Keating E. Uptake of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) by the JAR human placental choriocarcinoma cell line: comparison with 5-hydroxytryptamine. Placenta 24 (Apr 2003): 361-9.

- [50] Faraj BA, Olkowski ZL, Jackson RT. Expression of a high-affinity serotonin transporter in human lymphocytes. Int J Immunopharmacol 16 (Jul 1994): 561-7.
- [51] Rudd ML, Nicolas AN, Brown BL, Fischer-Stenger K, Stewart JK. Peritoneal macrophages express the serotonin transporter. J Neuroimmunol 159 (Feb 2005): 113-8.
- [52] Battaglini R, Fu J, Spate U, Ersoy U, Joe M, Sedaghat L, et al. Serotonin regulates osteoclast differentiation through its transporter. J Bone Miner Res 19 (Sep 2004): 1420-31.
- [53] Bliziotis MM, Eshleman AJ, Zhang XW, Wiren KM. Neurotransmitter action in osteoblasts: expression of a functional system for serotonin receptor activation and reuptake. Bone 29 (Nov 2001): 477-86.
- [54] Bliziotis M, Gunness M, Eshleman A, Wiren K. The role of dopamine and serotonin in regulating bone mass and strength: studies on dopamine and serotonin transporter null mice. J Musculoskelet Neuronal Interact 2 (Mar 2002): 291-5.
- [55] Bliziotis M, Eshleman A, Burt-Pichat B, Zhang XW, Hashimoto J, Wiren K, et al. Serotonin transporter and receptor expression in osteocytic MLO-Y4 cells. Bone 39 (Dec 2006): 1313-21.
- [56] Hranilovic D, Lesch KP, Ugarkovic D, Cicin-Sain L, Jernej B. Identification of serotonin transporter mRNA in rat platelets. J Neural Transm 103 (1996): 957-65.
- [57] Greenberg BD, Tolliver TJ, Huang SJ, Li Q, Bengel D, Murphy DL. Genetic variation in the serotonin transporter promoter region affects serotonin uptake in human blood platelets. Am J Med Genet 88 (Feb 1999): 83-7.
- [58] Schroeter S, Levey AI, Blakely RD. Polarized expression of the antidepressant-sensitive serotonin transporter in epinephrine-synthesizing chromaffin cells of the rat adrenal gland. Mol Cell Neurosci 9 (1997): 170-84.
- [59] Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL, et al. Organization of the human serotonin transporter gene. J Neural Transm Gen Sect 95 (1994): 157-62.

- [60] Little KY, McLaughlin DP, Zhang L, Livermore CS, Dalack GW, McFinton PR, et al. Cocaine, ethanol, and genotype effects on human midbrain serotonin transporter binding sites and mRNA levels. Am J Psychiatry 155 (Feb 1998): 207-13.
- [61] เมธิณี ตันนุกิจ. โพลีมอร์ฟิซึมของยีนซีโรโทนินทรานสปอร์เตอร์ในเด็กท้องผูกที่ไม่มีโรคทางกาย (SEROTONIN TRANSPORTER GENE POLYMORPHISM IN CHILDHOOD FUNCTIONAL CONSTIPATION). วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, ภาควิชาการุณการเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548.
- [62] Nakamura T, Muramatsu T, Ono Y, Matsushita S, Higuchi S, Mizushima H, et al. Serotonin transporter gene regulatory region polymorphism and anxiety-related traits in the Japanese. Am J Med Genet 74 (Sep 1997): 544-5.
- [63] Ohara K, Nagai M, Suzuki Y, Ochiai M, Ohara K. Association between anxiety disorders and a functional polymorphism in the serotonin transporter gene. Psychiatry Res 81 (Nov 1998): 277-9.
- [64] Kumakiri C, Kodama K, Shimizu E, Yamanouchi N, Okada S, Noda S, et al. Study of the association between the serotonin transporter gene regulatory region polymorphism and personality traits in a Japanese population. Neurosci Lett 263 (Mar 1999): 205-7.
- [65] Katsuragi S, Kunugi H, Sano A, Tsutsumi T, Isogawa K, Nanko S, et al. Association between serotonin transporter gene polymorphism and anxiety-related traits. Biol Psychiatry 45 (Feb 1999): 368-70.
- [66] Narita N, Narita M, Takashima S, Nakayama M, Nagai T, Okado N. Serotonin transporter gene variation is a risk factor for sudden infant death syndrome in the Japanese population. Pediatrics 107 (Apr 2001): 690-2.
- [67] Umekage T, Tochigi M, Marui T, Kato C, Hibino H, Otani T, et al. Serotonin transporter-linked promoter region polymorphism and personality traits in a Japanese population. Neurosci Lett 337 (Jan 2003): 13-6.
- [68] Narita M, Nishigami N, Narita N, Yamaguti K, Okado N, Watanabe Y, et al. Association between serotonin transporter gene polymorphism and chronic fatigue syndrome. Biochem Biophys Res Commun 311 (Nov 2003): 264-6.

- [69] Tsai SJ, Hong CJ, Yu YW, Lin CH, Song HL, Lai HC, et al. Association study of a functional serotonin transporter gene polymorphism with schizophrenia, psychopathology and clozapine response. Schizophr Res 44 (Sep 2000): 177-81.
- [70] You JS, Hu SY, Chen B, Zhang HG. Serotonin transporter and tryptophan hydroxylase gene polymorphisms in Chinese patients with generalized anxiety disorder. Psychiatr Genet 15 (Mar 2005): 7-11.
- [71] Li YY, Nie YQ, Xie J, Tan HZ, Zhou YJ, Wang H. [Serotonin transporter gene polymorphisms in irritable bowel syndrome and their impact on tegaserod treatment]. Zhonghua Nei Ke Za Zhi 45 (Jul 2006): 552-5.
- [72] Lee DY, Park H, Kim WH, Lee SI, Seo YJ, Choi YC. [Serotonin transporter gene polymorphism in healthy adults and patients with irritable bowel syndrome]. Korean J Gastroenterol 43 (Jan 2004): 18-22.
- [73] Lee HJ, Lee MS, Kang RH, Kim H, Kim SD, Kee BS, et al. Influence of the serotonin transporter promoter gene polymorphism on susceptibility to posttraumatic stress disorder. Depress Anxiety 21 (2005): 135-9.
- [74] Kim SJ, Lee HS, Kim CH. Obsessive-compulsive disorder, factor-analyzed symptom dimensions and serotonin transporter polymorphism. Neuropsychobiology 52 (2005): 176-82.
- [75] Kim W, Choi YH, Yoon KS, Cho DY, Pae CU, Woo JM. Tryptophan hydroxylase and serotonin transporter gene polymorphism does not affect the diagnosis, clinical features and treatment outcome of panic disorder in the Korean population. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 30 (Dec 2006): 1413-8.
- [76] Park JM, Choi MG, Park JA, Oh JH, Cho YK, Lee IS, et al. Serotonin transporter gene polymorphism and irritable bowel syndrome. Neurogastroenterol Motil 18 (Nov 2006): 995-1000.
- [77] Pata C, Erdal ME, Derici E, Yazar A, Kanik A, Ulu O. Serotonin transporter gene polymorphism in irritable bowel syndrome. Am J Gastroenterol 97 (Jul 2002): 1780-4.

- [78] Meira-Lima I, Michelon L, Cordeiro Q, Cho HJ, Vallada H. Allelic association analysis of the functional insertion/deletion polymorphism in the promoter region of the serotonin transporter gene in bipolar affective disorder. J Mol Neurosci 27 (2005): 219-24.
- [79] Ospina-Duque J, Duque C, Carvajal-Carmona L, Ortiz-Barrientos D, Soto I, Pineda N, et al. An association study of bipolar mood disorder (type I) with the 5-HTTLPR serotonin transporter polymorphism in a human population isolate from Colombia. Neurosci Lett 292 (Oct 2000): 199-202.
- [80] Samochowiec J, Hajduk A, Samochowiec A, Horodnicki J, Stepien G, Grzywacz A, et al. Association studies of MAO-A, COMT, and 5-HTT genes polymorphisms in patients with anxiety disorders of the phobic spectrum. Psychiatry Res 128 (Aug 2004): 21-6.
- [81] Hranilovic D, Stefulj J, Furac I, Kubat M, Baliija M, Jernej B. Serotonin transporter gene promoter (5-HTTLPR) and intron 2 (VNTR) polymorphisms in Croatian suicide victims. Biol Psychiatry 54 (Nov 2003): 884-9.
- [82] Furlong RA, Ho L, Walsh C, Rubinsztein JS, Jain S, Paykel ES, et al. Analysis and meta-analysis of two serotonin transporter gene polymorphisms in bipolar and unipolar affective disorders. Am J Med Genet 81 (Feb 1998): 58-63.
- [83] Haberstick BC, Smolen A, Hewitt JK. Family-based association test of the 5HTTLPR and aggressive behavior in a general population sample of children. Biol Psychiatry 59 (May 2006): 836-43.
- [84] Stober G, Jatzke S, Heils A, Jungkunz G, Fuchs E, Knapp M, et al. Susceptibility for schizophrenia is not influenced by a functional insertion/deletion variant in the promoter of the serotonin transporter gene. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 248 (1998): 82-6.
- [85] Lang UE, Bajbouj M, Wernicke C, Rommelspacher H, Danker-Hopfe H, Gallinat J. No association of a functional polymorphism in the serotonin transporter gene promoter and anxiety-related personality traits. Neuropsychobiology 49 (2004): 182-4.

- [86] Marziniak M, Mossner R, Schmitt A, Lesch KP, Sommer C. A functional serotonin transporter gene polymorphism is associated with migraine with aura. Neurology 64 (Jan 2005): 157-9.
- [87] Bellivier F, Henry C, Szoke A, Schurhoff F, Nosten-Bertrand M, Feingold J, et al. Serotonin transporter gene polymorphisms in patients with unipolar or bipolar depression. Neurosci Lett 255 (Oct 1998): 143-6.
- [88] Chabane N, Millet B, Delorme R, Lichtermann D, Mathieu F, Laplanche JL, et al. Lack of evidence for association between serotonin transporter gene (5-HTTLPR) and obsessive-compulsive disorder by case control and family association study in humans. Neurosci Lett 363 (Jun 2004): 154-6.
- [89] Denys D, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Westenberg HG. Association between serotonergic candidate genes and specific phenotypes of obsessive compulsive disorder. J Affect Disord 91 (Mar 2006): 39-44.
- [90] Rotondo A, Mazzanti C, Dell'Osso L, Rucci P, Sullivan P, Bouanani S, et al. Catechol o-methyltransferase, serotonin transporter, and tryptophan hydroxylase gene polymorphisms in bipolar disorder patients with and without comorbid panic disorder. Am J Psychiatry 159 (Jan 2002): 23-9.
- [91] Serretti A, Lilli R, Lorenzi C, Lattuada E, Cusin C, Smeraldi E. Serotonin transporter gene (5-HTTLPR) and major psychoses. Mol Psychiatry 7 (2002): 95-9.
- [92] Cavallini MC, Di Bella D, Siliprandi F, Malchiodi F, Bellodi L. Exploratory factor analysis of obsessive-compulsive patients and association with 5-HTTLPR polymorphism. Am J Med Genet 114 (Apr 2002): 347-53.
- [93] Gutierrez B, Pintor L, Gasto C, Rosa A, Bertranpetit J, Vieta E, et al. Variability in the serotonin transporter gene and increased risk for major depression with melancholia. Hum Genet 103 (Sep 1998): 319-22.
- [94] Baca-Garcia E, Vaquero C, Diaz-Sastre C, Saiz-Ruiz J, Fernandez-Piqueras J, de Leon J. A gender-specific association between the serotonin transporter gene and suicide attempts. Neuropsychopharmacology 26 (May 2002): 692-5.

- [95] Cervilla JA, Rivera M, Molina E, Torres-Gonzalez F, Bellon JA, Moreno B, et al. The 5-HTTLPR s/s genotype at the serotonin transporter gene (SLC6A4) increases the risk for depression in a large cohort of primary care attendees: the PREDICT-gene study. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 141 (Dec 2006): 912-7.
- [96] Gelernter J, Kranzler H, Coccaro EF, Siever LJ, New AS. Serotonin transporter protein gene polymorphism and personality measures in African American and European American subjects. Am J Psychiatry 155 (Oct 1998): 1332-8.
- [97] Nellisery M, Feinn RS, Covault J, Gelernter J, Anton RF, Pettinati H, et al. Alleles of a functional serotonin transporter promoter polymorphism are associated with major depression in alcoholics. Alcohol Clin Exp Res 27 (Sep 2003): 1402-8.
- [98] Collier DA, Stober G, Li T, Heils A, Catalano M, Di Bella D, et al. A novel functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene: possible role in susceptibility to affective disorders. Mol Psychiatry 1 (Dec 1996): 453-60.
- [99] Hoehe MR, Wendel B, Grunewald I, Chiaroni P, Levy N, Morris-Rosendahl D, et al. Serotonin transporter (5-HTT) gene polymorphisms are not associated with susceptibility to mood disorders. Am J Med Genet 81 (Feb 1998): 1-3.
- [100] Courtet P, Baud P, Abbar M, Boulenger JP, Castelnaud D, Mouthon D, et al. Association between violent suicidal behavior and the low activity allele of the serotonin transporter gene. Mol Psychiatry 6 (May 2001): 338-41.
- [101] Courtet P, Buresi C, Abbar M, Baud P, Boulenger JP, Castelnaud D, et al. No association between non-violent suicidal behavior and the serotonin transporter promoter polymorphism. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 116 (Jan 2003): 72-6.
- [102] Mendlewicz J, Massat I, Souery D, Del-Favero J, Oruc L, Nothen MM, et al. Serotonin transporter 5HTTLPR polymorphism and affective disorders: no evidence of association in a large European multicenter study. Eur J Hum Genet 12 (May 2004): 377-82.

- [103] มาโนช หล่อตระกูล และ ปราโมทย์ สุคนิษฐ์. จิตเวชศาสตร์ รามาธิบดี. พิมพ์ครั้งที่ 8. กรุงเทพมหานคร: สวีชาญการพิมพ์, 2546.
- [104] Ricketts MH, Hamer RM, Sage JI, Manowitz P, Feng F, Menza MA. Association of a serotonin transporter gene promoter polymorphism with harm avoidance behaviour in an elderly population. Psychiatr Genet 8 (Summer 1998): 41-4.
- [105] Murakami F, Shimomura T, Kotani K, Ikawa S, Nanba E, Adachi K. Anxiety traits associated with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region in the Japanese. J Hum Genet 44 (1999): 15-7.
- [106] Du L, Bakish D, Hrdina PD. Gender differences in association between serotonin transporter gene polymorphism and personality traits. Psychiatr Genet 10 (Dec 2000): 159-64.
- [107] Greenberg BD, Li Q, Lucas FR, Hu S, Sirota LA, Benjamin J, et al. Association between the serotonin transporter promoter polymorphism and personality traits in a primarily female population sample. Am J Med Genet 96 (Apr 2000): 202-16.
- [108] Osher Y, Hamer D, Benjamin J. Association and linkage of anxiety-related traits with a functional polymorphism of the serotonin transporter gene regulatory region in Israeli sibling pairs. Mol Psychiatry 5 (Mar 2000): 216-9.
- [109] Melke J, Landen M, Baghei F, Rosmond R, Holm G, Bjorntorp P, et al. Serotonin transporter gene polymorphisms are associated with anxiety-related personality traits in women. Am J Med Genet 105 (Jul 2001): 458-63.
- [110] Hariri AR, Mattay VS, Tessitore A, Kolachana B, Fera F, Goldman D, et al. Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala. Science 297 (2002): 400-3.
- [111] Stoltenberg SF, Twitchell GR, Hanna GL, Cook EH, Fitzgerald HE, Zucker RA, et al. Serotonin transporter promoter polymorphism, peripheral indexes of serotonin function, and personality measures in families with alcoholism. Am J Med Genet 114 (Mar 2002): 230-4.
- [112] Golimbet VE, Alfimova MV, Shcherbatikh T, Kaleda VG, Abramova LI, Rogaev EI. Serotonin transporter gene polymorphism and schizoid personality traits in

- the patients with psychosis and psychiatrically well subjects. World J Biol Psychiatry 4 (Jan 2003): 25-9.
- [113] Bethea CL, Streicher JM, Coleman K, Pau FKY, Moessner R, Cameron JL. Anxious Behavior and Fenfluramine-Induced Prolactin Secretion in Young Rhesus Macaques with Different Alleles of the Serotonin Reuptake Transporter Polymorphism (5HTTLPR). Behavior Genetics 34 (2004): 295-307.
- [114] Sen S, Villafuerte S, Nesse R, Stoltenberg SF, Hopcian J, Gleiberman L, et al. Serotonin transporter and GABAA alpha 6 receptor variants are associated with neuroticism. Biol Psychiatry 55 (Feb 2004): 244-9.
- [115] Ball D, Hill L, Freeman B, Eley TC, Strelau J, Riemann R, et al. The serotonin transporter gene and peer-rated neuroticism. NeuroReport 8 (1997): 1301-4.
- [116] Ebstein RP, Gritsenko I, Nemanov L, Frisch A, Osher Y, Belmaker RH. No association between the serotonin transporter gene regulatory region polymorphism and the Tridimensional Personality Questionnaire (TPQ) temperament of harm avoidance. Mol Psychiatry 2 (May 1997): 224-6.
- [117] Jorm AF, Henderson AS, Jacomb PA, Christensen H, Korten AE, Rodgers B, et al. An association study of a functional polymorphism of the serotonin transporter gene with personality and psychiatric symptoms. Mol Psychiatry 3 (Sep 1998): 449-51.
- [118] Mazzanti CM, Lappalainen J, Long JC, Bengel D, Naukkarinen H, Eggert M, et al. Role of the serotonin transporter promoter polymorphism in anxiety-related traits. Arch Gen Psychiatry 55 (Oct 1998): 936-40.
- [119] Deary IJ, Battersby S, Whiteman MC, Connor JM, Fowkes FG, Harmar A. Neuroticism and polymorphisms in the serotonin transporter gene. Psychol Med 29 (May 1999): 735-9.
- [120] Gustavsson JP, Nothen MM, Jonsson EG, Neidt H, Forslund K, Rylander G, et al. No association between serotonin transporter gene polymorphisms and personality traits. Am J Med Genet 88 (Aug 1999): 430-6.
- [121] Tsai SJ, Hong CJ, Cheng CY. Serotonin transporter genetic polymorphisms and harm avoidance in the Chinese. Psychiatr Genet 12 (Sep 2002): 165-8.

- [122] Jacob CP, Strobel A, Hohenberger K, Ringel T, Gutknecht L, Reif A, et al. Association between allelic variation of serotonin transporter function and neuroticism in anxious cluster C personality disorders. Am J Psychiatry 161 (Mar 2004): 569-72.
- [123] Flory JD, Manuck SB, Ferrell RE, Dent KM, Peters DG, Muldoon MF. Neuroticism is not associated with the serotonin transporter (5-HTTLPR) polymorphism. Mol Psychiatry 4 (Jan 1999): 93-6.
- [124] Sen S, Burmeister M, Ghosh D. Meta-analysis of the association between a serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) and anxiety-related personality traits. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 127 (May 2004): 85-9.
- [125] Vormfelde SV, Hoell I, Tzvetkov M, Jamrozinski K, Sehrt D, Brockmoller J, et al. Anxiety- and novelty seeking-related personality traits and serotonin transporter gene polymorphisms. J Psychiatr Res 40 (Sep 2006): 568-76.
- [126] สมภพ เรืองตระกูล. ตำราจิตเวชศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์เวียนแก้ว การพิมพ์, 2545.
- [127] Gerra G, Garofano L, Castaldini L, Rovetto F, Zaimovic A, Moi G, et al. Serotonin transporter promoter polymorphism genotype is associated with temperament, personality traits and illegal drugs use among adolescents. J Neural Transm 112 (Oct 2005): 1397-410.
- [128] Patkar AA, Berrettini WH, Hoehe M, Thornton CC, Gottheil E, Hill K, et al. Serotonin transporter polymorphisms and measures of impulsivity, aggression, and sensation seeking among African-American cocaine-dependent individuals. Psychiatry Res 110 (Jun 2002): 103-15.
- [129] Beitchman JH, Davidge KM, Kennedy JL, Atkinson L, Lee V, Shapiro S, et al. The serotonin transporter gene in aggressive children with and without ADHD and nonaggressive matched controls. Ann N Y Acad Sci 1008 (Dec 2003): 248-51.
- [130] Davidge KM, Atkinson L, Douglas L, Lee V, Shapiro S, Kennedy JL, et al. Association of the serotonin transporter and 5HT1Dbeta receptor genes with

extreme, persistent and pervasive aggressive behaviour in children.

Psychiatr Genet 14 (Sep 2004): 143-6.

[131] Sukonick DL, Pollock BG, Sweet RA, Mulsant BH, Rosen J, Klunk WE, et al. The 5-HTTPR*S/*L polymorphism and aggressive behavior in Alzheimer disease.

Arch Neurol 58 (Sep 2001): 1425-8.

[132] Sweet RA, Pollock BG, Sukonick DL, Mulsant BH, Rosen J, Klunk WE, et al. The 5-HTTPR polymorphism confers liability to a combined phenotype of psychotic and aggressive behavior in Alzheimer disease. Int Psychogeriatr 13

(Dec 2001): 401-9.

[133] Kunugi H, Hattori M, Kato T, Tatsumi M, Sakai T, Sasaki T, et al. Serotonin transporter gene polymorphisms: ethnic difference and possible association with bipolar affective disorder. Mol Psychiatry 2 (Oct-Nov 1997): 457-62.

[134] Oruc L, Verheyen GR, Furac I, Jakovljevic M, Ivezic S, Raeymaekers P, et al. Association analysis of the 5-HT_{2C} receptor and 5-HT transporter genes in bipolar disorder. Am J Med Genet 74 (Sep 1997): 504-6.

[135] Rees M, Norton N, Jones I, McCandless F, Scourfield J, Holmans P, et al. Association studies of bipolar disorder at the human serotonin transporter gene (hSERT; 5HTT). Mol Psychiatry 2 (Sep 1997): 398-402.

[136] Mendes de Oliveira JR, Otto PA, Vallada H, Lauriano V, Elkis H, Lafer B, et al. Analysis of a novel functional polymorphism within the promoter region of the serotonin transporter gene (5-HTT) in Brazilian patients affected by bipolar disorder and schizophrenia. Am J Med Genet 81 (May 1998): 225-7.

[137] Vincent JB, Masellis M, Lawrence J, Choi V, Gurling HM, Parikh SV, et al. Genetic association analysis of serotonin system genes in bipolar affective disorder. Am J Psychiatry 156 (Jan 1999): 136-8.

[138] Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, et al. No association of serotonin transporter gene (SLC6A4) with schizophrenia and bipolar disorder in Japanese patients: association analysis based on linkage disequilibrium. J Neural Transm 113 (Jul 2006): 899-905.

- [139] Van Den Bogaert A, Slegers K, De Zutter S, Heyrman L, Norrback KF, Adolfsson R, et al. No allelic association or interaction of three known functional polymorphisms with bipolar disorder in a northern Swedish isolated population. Psychiatr Genet 16 (Oct 2006): 209-12.
- [140] Serretti A, Cusin C, Lattuada E, Di Bella D, Catalano M, Smeraldi E. Serotonin transporter gene (5-HTTLPR) is not associated with depressive symptomatology in mood disorders. Mol Psychiatry 4 (May 1999): 280-3.
- [141] Serretti A, Lattuada E, Catalano M, Smeraldi E. Serotonin transporter gene not associated with psychotic symptomatology of mood disorders. Psychiatry Res 86 (Apr 1999): 59-65.
- [142] Mossner R, Henneberg A, Schmitt A, Syagailo YV, Grassle M, Hennig T, et al. Allelic variation of serotonin transporter expression is associated with depression in Parkinson's disease. Mol Psychiatry 6 (May 2001): 350-2.
- [143] Joiner TE, Jr., Johnson F, Soderstrom K, Brown JS. Is there an association between serotonin transporter gene polymorphism and family history of depression? J Affect Disord 77 (Dec 2003): 273-5.
- [144] Burn DJ, Tiangyou W, Allcock LM, Davison J, Chinnery PF. Allelic variation of a functional polymorphism in the serotonin transporter gene and depression in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord 12 (Apr 2006): 139-41.
- [145] Dick DM, Plunkett J, Hamlin D, Nurnberger J, Jr., Kuperman S, Schuckit M, et al. Association analyses of the serotonin transporter gene with lifetime depression and alcohol dependence in the Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism (COGA) sample. Psychiatr Genet 17 (Feb 2007): 35-8.
- [146] Heinz A, Braus DF, Smolka MN, Wrase J, Puls I, Hermann D, et al. Amygdala-prefrontal coupling depends on a genetic variation of the serotonin transporter. Nat Neurosci 8 (Jan 2005): 20-1.
- [147] Mann JJ, Huang YY, Underwood MD, Kassir SA, Oppenheim S, Kelly TM, et al. A serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) and

- prefrontal cortical binding in major depression and suicide. Arch Gen Psychiatry 57 (Aug 2000): 729-38.
- [148] Lotrich FE, Pollock BG. Meta-analysis of serotonin transporter polymorphisms and affective disorders. Psychiatr Genet 14 (Sep 2004): 121-9.
- [149] Anguelova M, Benkelfat C, Turecki G. A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: I. Affective disorders. Mol Psychiatry 8 (Jun 2003): 574-91.
- [150] Lasky-Su JA, Faraone SV, Glatt SJ, Tsuang MT. Meta-analysis of the association between two polymorphisms in the serotonin transporter gene and affective disorders. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 133 (Feb 2005): 110-5.
- [151] Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, et al. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. Science 301 (Jul 2003): 386-9.
- [152] Eley TC, Sugden K, Corsico A, Gregory AM, Sham P, McGuffin P, et al. Gene-environment interaction analysis of serotonin system markers with adolescent depression. Mol Psychiatry 9 (Oct 2004): 908-15.
- [153] Kaufman J, Yang BZ, Douglas-Palumberi H, Houshyar S, Lipschitz D, Krystal JH, et al. Social supports and serotonin transporter gene moderate depression in maltreated children. Proc Natl Acad Sci U S A 101 (Dec 2004): 17316-21.
- [154] Grabe HJ, Lange M, Wolff B, Volzke H, Lucht M, Freyberger HJ, et al. Mental and physical distress is modulated by a polymorphism in the 5-HT transporter gene interacting with social stressors and chronic disease burden. Mol Psychiatry 10 (Feb 2005): 220-4.
- [155] Taylor SE, Way BM, Welch WT, Hilmert CJ, Lehman BJ, Eisenberger NI. Early family environment, current adversity, the serotonin transporter promoter polymorphism, and depressive symptomatology. Biol Psychiatry 60 (Oct 2006): 671-6.
- [156] Sjöberg RL, Nilsson KW, Nordquist N, Ohrvik J, Leppert J, Lindström L, et al. Development of depression: sex and the interaction between environment

- and a promoter polymorphism of the serotonin transporter gene. Int J Neuropsychopharmacol 9 (Aug 2006): 443-9.
- [157] Willeit M, Praschak-Rieder N, Neumeister A, Zill P, Leisch F, Stastny J, et al. A polymorphism (5-HTTLPR) in the serotonin transporter promoter gene is associated with DSM-IV depression subtypes in seasonal affective disorder. Mol Psychiatry 8 (Nov 2003): 942-6.
- [158] Rosenthal NE, Mazzanti CM, Barnett RL, Hardin TA, Turner EH, Lam GK, et al. Role of serotonin transporter promoter repeat length polymorphism (5-HTTLPR) in seasonality and seasonal affective disorder. Mol Psychiatry 3 (Mar 1998): 175-7.
- [159] Joyce JN, Shane A, Lexow N, Winokur A, Casanova MF, Kleinman JE. Serotonin uptake sites and serotonin receptors are altered in the limbic system of schizophrenics. Neuropsychopharmacology 8 (Jun 1993): 315-36.
- [160] Dean B, Opeskin K, Pavey G, Naylor L, Hill C, Keks N, et al. [3H]paroxetine binding is altered in the hippocampus but not the frontal cortex or caudate nucleus from subjects with schizophrenia. J Neurochem 64 (Mar 1995): 1197-202.
- [161] Dean B, Hayes W, Opeskin K, Naylor L, Pavey G, Hill C, et al. Serotonin₂ receptors and the serotonin transporter in the schizophrenic brain. Behav Brain Res 73 (1996): 169-75.
- [162] Naylor L, Dean B, Opeskin K, Pavey G, Hill C, Keks N, et al. Changes in the serotonin transporter in the hippocampus of subjects with schizophrenia identified using [3H]paroxetine. J Neural Transm 103 (1996): 749-57.
- [163] Laruelle M, Abi-Dargham A, Casanova MF, Toti R, Weinberger DR, Kleinman JE. Selective abnormalities of prefrontal serotonergic receptors in schizophrenia. A postmortem study. Arch Gen Psychiatry 50 (Oct 1993): 810-8.
- [164] Hernandez I, Sokolov BP. Abnormal expression of serotonin transporter mRNA in the frontal and temporal cortex of schizophrenics. Mol Psychiatry 2 (Jan 1997): 57-64.

- [165] Malhotra AK, Goldman D, Mazzanti C, Clifton A, Breier A, Pickar D. A functional serotonin transporter (5-HTT) polymorphism is associated with psychosis in neuroleptic-free schizophrenics. Mol Psychiatry 3 (Jul 1998): 328-32.
- [166] Hranilovic D, Schwab SG, Jernej B, Knapp M, Lerer B, Albus M, et al. Serotonin transporter gene and schizophrenia: evidence for association/linkage disequilibrium in families with affected siblings. Mol Psychiatry 5 (Jan 2000): 91-5.
- [167] Golimbet VE, Mitiushina NG, Shcherbatykh TV, Aksenova MG, Abramova LI, Kaleda VG, et al. [Molecular genetic polymorphism of the genes of neurotransmitter systems in schizophrenics with early manifestation of the disease]. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova 101 (2001): 48-50.
- [168] Serretti A, Catalano M, Smeraldi E. Serotonin transporter gene is not associated with symptomatology of schizophrenia. Schizophr Res 35 (Jan 1999): 33-9.
- [169] Serretti A, Cusin C, Lattuada E, Lilli R, Lorenzi C, Di Bella D, et al. No interaction between serotonin transporter gene and dopamine receptor D4 gene in symptomatology of major psychoses. Am J Med Genet 88 (Oct 1999): 481-5.
- [170] Gonda X, Rihmer Z, Juhasz G, Zsombok T, Bagdy G. High anxiety and migraine are associated with the s allele of the 5HTTLPR gene polymorphism. Psychiatry Res 149 (Jan 2007): 261-6.
- [171] Schultz SK, Moser DJ, Bishop JR, Ellingrod VL. Phobic anxiety in late-life in relationship to cognition and 5HTTLPR polymorphism. Psychiatr Genet 15 (Dec 2005): 305-6.
- [172] Deckert J, Catalano M, Heils A, Di Bella D, Friess F, Politi E, et al. Functional promoter polymorphism of the human serotonin transporter: lack of association with panic disorder. Psychiatr Genet 7 (Spring 1997): 45-7.
- [173] Hamilton SP, Heiman GA, Haghghi F, Mick S, Klein DF, Hodge SE, et al. Lack of genetic linkage or association between a functional serotonin transporter polymorphism and panic disorder. Psychiatr Genet 9 (Mar 1999): 1-6.

- [174] Ishiguro H, Arinami T, Yamada K, Otsuka Y, Toru M, Shibuya H. An association study between a transcriptional polymorphism in the serotonin transporter gene and panic disorder in a Japanese population. Psychiatry Clin Neurosci 51 (Oct 1997): 333-5.
- [175] Martinez-Barrondo S, Saiz PA, Morales B, Garcia-Portilla MP, Coto E, Alvarez V, et al. Serotonin gene polymorphisms in patients with panic disorder. Actas Esp Psiquiatr 33 (Jul-Aug 2005): 210-5.
- [176] Matsushita S, Muramatsu T, Kimura M, Shirakawa O, Mita T, Nakai T, et al. Serotonin transporter gene regulatory region polymorphism and panic disorder. Mol Psychiatry 2 (Sep 1997): 390-2.
- [177] Olesen OF, Bennike B, Hansen ES, Koefoed P, Woldbye DP, Bolwig TG, et al. The short/long polymorphism in the serotonin transporter gene promoter is not associated with panic disorder in a Scandinavian sample. Psychiatr Genet 15 (Sep 2005): 159.
- [178] Perez M, Brown JS, Vrshek-Schallhorn S, Johnson F, Joiner TE, Jr. Differentiation of obsessive-compulsive-, panic-, obsessive-compulsive personality-, and non-disordered individuals by variation in the promoter region of the serotonin transporter gene. J Anxiety Disord 20 (2006): 794-806.
- [179] Sand P, Lesch KP, Catalano M, Bosi M, Syagailo YV, Okladnova O, et al. Polymorphic MAO-A and 5-HT-transporter genes: analysis of interactions in panic disorder. World J Biol Psychiatry 1 (Jul 2000): 147-50.
- [180] Maron E, Lang A, Tasa G, Liivlaid L, Toru I, Must A, et al. Associations between serotonin-related gene polymorphisms and panic disorder. Int J Neuropsychopharmacol 8 (Jun 2005): 261-6.
- [181] Camarena B, Rinetti G, Cruz C, Hernandez S, de la Fuente JR, Nicolini H. Association study of the serotonin transporter gene polymorphism in obsessive-compulsive disorder. Int J Neuropsychopharmacol 4 (Sep 2001): 269-72.
- [182] Frisch A, Michaelovsky E, Rockah R, Amir I, Hermesh H, Laor N, et al. Association between obsessive-compulsive disorder and polymorphisms of genes

- encoding components of the serotonergic and dopaminergic pathways. Eur Neuropsychopharmacol 10 (May 2000): 205-9.
- [183] Kinnear CJ, Niehaus DJ, Moolman-Smook JC, du Toit PL, van Kradenberg J, Weyers JB, et al. Obsessive-compulsive disorder and the promoter region polymorphism (5-HTTLPR) in the serotonin transporter gene (SLC6A4): a negative association study in the Afrikaner population. Int J Neuropsychopharmacol 3 (Dec 2000): 327-31.
- [184] Meira-Lima I, Shavitt RG, Miguita K, Ikenaga E, Miguel EC, Vallada H. Association analysis of the catechol-o-methyltransferase (COMT), serotonin transporter (5-HTT) and serotonin 2A receptor (5HT2A) gene polymorphisms with obsessive-compulsive disorder. Genes Brain Behav 3 (Apr 2004): 75-9.
- [185] Walitza S, Wewetzer C, Gerlach M, Klampfl K, Geller F, Barth N, et al. Transmission disequilibrium studies in children and adolescents with obsessive-compulsive disorders pertaining to polymorphisms of genes of the serotonergic pathway. J Neural Transm 111 (Jul 2004): 817-25.
- [186] Billett EA, Richter MA, King N, Heils A, Lesch KP, Kennedy JL. Obsessive compulsive disorder, response to serotonin reuptake inhibitors and the serotonin transporter gene. Mol Psychiatry 2 (Sep 1997): 403-6.
- [187] McDougle CJ, Epperson CN, Price LH, Gelernter J. Evidence for linkage disequilibrium between serotonin transporter protein gene (SLC6A4) and obsessive compulsive disorder. Mol Psychiatry 3 (May 1998): 270-3.
- [188] Bengel D, Greenberg BD, Cora-Locatelli G, Altemus M, Heils A, Li Q, et al. Association of the serotonin transporter promoter regulatory region polymorphism and obsessive-compulsive disorder. Mol Psychiatry 4 (Sep 1999): 463-6.
- [189] Chong SA, Lee WL, Tan CH, Tay AH, Chan AO, Tan EC. Attempted suicide and polymorphism of the serotonin transporter gene in Chinese patients with schizophrenia. Psychiatry Res 97 (Dec 2000): 101-6.

- [190] Geijer T, Frisch A, Persson ML, Wasserman D, Rockah R, Michaelovsky E, et al. Search for association between suicide attempt and serotonergic polymorphisms. Psychiatr Genet 10 (Mar 2000): 19-26.
- [191] Russ MJ, Lachman HM, Kashdan T, Saito T, Bajmakovic-Kacila S. Analysis of catechol-O-methyltransferase and 5-hydroxytryptamine transporter polymorphisms in patients at risk for suicide. Psychiatry Res 93 (Feb 2000): 73-8.
- [192] Rujescu D, Giegling I, Sato T, Moeller HJ. A polymorphism in the promoter of the serotonin transporter gene is not associated with suicidal behavior. Psychiatr Genet 11 (Sep 2001): 169-72.
- [193] Zalsman G, Frisch A, Bromberg M, Gelernter J, Michaelovsky E, Campino A, et al. Family-based association study of serotonin transporter promoter in suicidal adolescents: no association with suicidality but possible role in violence traits. Am J Med Genet 105 (Apr 2001): 239-45.
- [194] Pooley EC, Houston K, Hawton K, Harrison PJ. Deliberate self-harm is associated with allelic variation in the tryptophan hydroxylase gene (TPH A779C), but not with polymorphisms in five other serotonergic genes. Psychol Med 33 (Jul 2003): 775-83.
- [195] Pungercic G, Videtic A, Pestotnik A, Pajnic IZ, Zupanc T, Balazic J, et al. Serotonin transporter gene promoter (5-HTTLPR) and intron 2 (VNTR) polymorphisms: a study on Slovenian population of suicide victims. Psychiatr Genet 16 (Oct 2006): 187-91.
- [196] Fitch D, Lesage A, Seguin M, Trousignant M, Bankelfat C, Rouleau GA, et al. Suicide and the serotonin transporter gene. Mol Psychiatry 6 (Mar 2001): 127-8.
- [197] Du L, Faludi G, Palkovits M, Demeter E, Bakish D, Lapierre YD, et al. Frequency of long allele in serotonin transporter gene is increased in depressed suicide victims. Biol Psychiatry 46 (Jul 1999): 196-201.

- [198] Faludi G, Du L, Palkovits M, Antal B, Sotonyi P, Hrdina PD. Serotonin transporter, serotonin-2A receptor and tryptophan hydroxylase gene polymorphisms in depressed suicide victims. Neurobiology (Bp) 8 (2000): 269-71.
- [199] Du L, Faludi G, Palkovits M, Bakish D, Hrdina PD. Serotonergic genes and suicidality. Crisis 22 (2001): 54-60.
- [200] Bellivier F, Szoke A, Henry C, Lacoste J, Bottos C, Nosten-Bertrand M, et al. Possible association between serotonin transporter gene polymorphism and violent suicidal behavior in mood disorders. Biol Psychiatry 48 (Aug 2000): 319-22.
- [201] Bondy B, Erfurth A, de Jonge S, Kruger M, Meyer H. Possible association of the short allele of the serotonin transporter promoter gene polymorphism (5-HTTLPR) with violent suicide. Mol Psychiatry 5 (Mar 2000): 193-5.
- [202] Gorwood P, Batel P, Ades J, Hamon M, Boni C. Serotonin transporter gene polymorphisms, alcoholism, and suicidal behavior. Biol Psychiatry 48 (Aug 2000): 259-64.
- [203] Preuss UW, Koller G, Soyka M, Bondy B. Association between suicide attempts and 5-HTTLPR-S-allele in alcohol-dependent and control subjects: further evidence from a German alcohol-dependent inpatient sample. Biol Psychiatry 50 (Oct 2001): 636-9.
- [204] Joiner TE, Jr., Johnson F, Soderstrom K. Association between serotonin transporter gene polymorphism and family history of attempted and completed suicide. Suicide Life Threat Behav 32 (Fall 2002): 329-32.
- [205] Bayle FJ, Leroy S, Gourion D, Millet B, Olie JP, Poirier MF, et al. 5HTTLPR polymorphism in schizophrenic patients: further support for association with violent suicide attempts. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 119 (May 2003): 13-7.
- [206] Campi-Azevedo AC, Boson W, De Marco L, Romano-Silva MA, Correa H. Association of the serotonin transporter promoter polymorphism with suicidal behavior. Mol Psychiatry 8 (Nov 2003): 899-900.

- [207] Lin PY, Tsai G. Association between serotonin transporter gene promoter polymorphism and suicide: results of a meta-analysis. Biol Psychiatry 55 (May 2004): 1023-30.
- [208] Hu M, Retz W, Baader M, Pesold B, Adler G, Henn FA, et al. Promoter polymorphism of the 5-HT transporter and Alzheimer's disease. Neurosci Lett 294 (Nov 2000): 63-5.
- [209] Li T, Holmes C, Sham PC, Vallada H, Birkett J, Kirov G, et al. Allelic functional variation of serotonin transporter expression is a susceptibility factor for late onset Alzheimer's disease. Neuroreport 8 (Feb 1997): 683-6.
- [210] Oliveira JR, Gallindo RM, Maia LG, Brito-Marques PR, Otto PA, Passos-Bueno MR, et al. The short variant of the polymorphism within the promoter region of the serotonin transporter gene is a risk factor for late onset Alzheimer's disease. Mol Psychiatry 3 (Sep 1998): 438-41.
- [211] Kunugi H, Ueki A, Otsuka M, Isse K, Hirasawa H, Kato N, et al. Alzheimer's disease and 5-HTTLPR polymorphism of the serotonin transporter gene: no evidence for an association. Am J Med Genet 96 (Jun 2000): 307-9.
- [212] Zill P, Padberg F, de Jonge S, Hampel H, Burger K, Stubner S, et al. Serotonin transporter (5-HTT) gene polymorphism in psychogeriatric patients. Neurosci Lett 284 (Apr 2000): 113-5.
- [213] Hinney A, Barth N, Ziegler A, von Prittwitz S, Hamann A, Hennighausen K, et al. Serotonin transporter gene-linked polymorphic region: allele distributions in relationship to body weight and in anorexia nervosa. Life Sci 61 (1997): PL 295-303.
- [214] Lauzurica N, Hurtado A, Escarti A, Delgado M, Barrios V, Morande G, et al. Polymorphisms within the promoter and the intron 2 of the serotonin transporter gene in a population of bulimic patients. Neurosci Lett 352 (Dec 2003): 226-30.
- [215] Monteleone P, Santonastaso P, Mauri M, Bellodi L, Erzegovesi S, Fuschino A, et al. Investigation of the serotonin transporter regulatory region polymorphism in

- bulimia nervosa: relationships to harm avoidance, nutritional parameters, and psychiatric comorbidity. Psychosom Med 68 (Jan-Feb 2006): 99-103.
- [216] Rybakowski F, Slopian A, Dmitrzak-Weglarz M, Czernski P, Rajewski A, Hauser J. The 5-HT_{2A} -1438 A/G and 5-HTTLPR polymorphisms and personality dimensions in adolescent anorexia nervosa: association study. Neuropsychobiology 53 (2006): 33-9.
- [217] Sundaramurthy D, Pieri LF, Gape H, Markham AF, Campbell DA. Analysis of the serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) in anorexia nervosa. Am J Med Genet 96 (Feb 2000): 53-5.
- [218] Fumeron F, Betoulle D, Aubert R, Herbeth B, Siest G, Rigaud D. Association of a functional 5-HT transporter gene polymorphism with anorexia nervosa and food intake. Mol Psychiatry 6 (Jan 2001): 9-10.
- [219] Di Bella DD, Catalano M, Cavallini MC, Riboldi C, Bellodi L. Serotonin transporter linked polymorphic region in anorexia nervosa and bulimia nervosa. Mol Psychiatry 5 (May 2000): 233-4.
- [220] Frieling H, Romer KD, Wilhelm J, Hillemecher T, Kornhuber J, de Zwaan M, et al. Association of catecholamine-O-methyltransferase and 5-HTTLPR genotype with eating disorder-related behavior and attitudes in females with eating disorders. Psychiatr Genet 16 (Oct 2006): 205-8.
- [221] Monteleone P, Tortorella A, Castaldo E, Maj M. Association of a functional serotonin transporter gene polymorphism with binge eating disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 141 (Jan 5 2006): 7-9.
- [222] Seeger G, Schloss P, Schmidt MH. Functional polymorphism within the promotor of the serotonin transporter gene is associated with severe hyperkinetic disorders. Mol Psychiatry 6 (Mar 2001): 235-8.
- [223] Kent L, Doerry U, Hardy E, Parmar R, Gingell K, Hawi Z, et al. Evidence that variation at the serotonin transporter gene influences susceptibility to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): analysis and pooled analysis. Mol Psychiatry 7 (2002): 908-12.

- [224] Manor I, Eisenberg J, Tyano S, Sever Y, Cohen H, Ebstein RP, et al. Family-based association study of the serotonin transporter promoter region polymorphism (5-HTTLPR) in attention deficit hyperactivity disorder. Am J Med Genet 105 (Jan 2001): 91-5.
- [225] Cook EH, Jr., Courchesne R, Lord C, Cox NJ, Yan S, Lincoln A, et al. Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. Mol Psychiatry 2 (May 1997): 247-50.
- [226] Maestrini E, Lai C, Marlow A, Matthews N, Wallace S, Bailey A, et al. Serotonin transporter (5-HTT) and gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta3 (GABRB3) gene polymorphisms are not associated with autism in the IMGSA families. The International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. Am J Med Genet 88 (Oct 1999): 492-6.
- [227] Persico AM, Militerni R, Bravaccio C, Schneider C, Melmed R, Conciatori M, et al. Lack of association between serotonin transporter gene promoter variants and autistic disorder in two ethnically distinct samples. Am J Med Genet 96 (Feb 2000): 123-7.
- [228] Zhong N, Ye L, Ju W, Brown WT, Tsiouris J, Cohen I. 5-HTTLPR variants not associated with autistic spectrum disorders. Neurogenetics 2 (Apr 1999): 129-31.
- [229] Klauck SM, Poustka F, Benner A, Lesch KP, Poustka A. Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism? Hum Mol Genet 6 (Dec 1997): 2233-8.
- [230] Yirmiya N, Pilowsky T, Nemanov L, Arbelle S, Feinsilver T, Fried I, et al. Evidence for an association with the serotonin transporter promoter region polymorphism and autism. Am J Med Genet 105 (May 2001): 381-6.
- [231] Tordjman S, Gutknecht L, Carlier M, Spitz E, Antoine C, Slama F, et al. Role of the serotonin transporter gene in the behavioral expression of autism. Mol Psychiatry 6 (Jul 2001): 434-9.

- [232] Conroy J, Meally E, Kearney G, Fitzgerald M, Gill M, Gallagher L. Serotonin transporter gene and autism: a haplotype analysis in an Irish autistic population. Mol Psychiatry 9 (Jun 2004): 587-93.
- [233] Devlin B, Cook EH, Jr., Coon H, Dawson G, Grigorenko EL, McMahon W, et al. Autism and the serotonin transporter: the long and short of it. Mol Psychiatry 10 (Dec 2005): 1110-6.
- [234] McCauley JL, Olson LM, Dowd M, Amin T, Steele A, Blakely RD, et al. Linkage and association analysis at the serotonin transporter (SLC6A4) locus in a rigid-compulsive subset of autism. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 127 (May 2004): 104-12.
- [235] Betancur C, Corbex M, Spielewoy C, Philippe A, Laplanche JL, Launay JM, et al. Serotonin transporter gene polymorphisms and hyperserotonemia in autistic disorder. Mol Psychiatry 7 (2002): 67-71.
- [236] Coutinho AM, Oliveira G, Morgadinho T, Fesel C, Macedo TR, Bento C, et al. Variants of the serotonin transporter gene (SLC6A4) significantly contribute to hyperserotonemia in autism. Mol Psychiatry 9 (Mar 2004): 264-71.
- [237] Guhathakurta S, Ghosh S, Sinha S, Chatterjee A, Ahmed S, Chowdhury SR, et al. Serotonin transporter promoter variants: Analysis in Indian autistic and control population. Brain Res 1092 (May 2006): 28-35.
- [238] Kim SJ, Cox N, Courchesne R, Lord C, Corsello C, Akshoomoff N, et al. Transmission disequilibrium mapping at the serotonin transporter gene (SLC6A4) region in autistic disorder. Mol Psychiatry 7 (2002): 278-88.
- [239] Koishi S, Yamamoto K, Matsumoto H, Koishi S, Enseki Y, Oya A, et al. Serotonin transporter gene promoter polymorphism and autism: a family-based genetic association study in Japanese population. Brain Dev 28 (May 2006): 257-60.
- [240] Ramoz N, Reichert JG, Corwin TE, Smith CJ, Silverman JM, Hollander E, et al. Lack of evidence for association of the serotonin transporter gene SLC6A4 with autism. Biol Psychiatry 60 (Jul 2006): 186-91.

- [241] Brune CW, Kim SJ, Salt J, Leventhal BL, Lord C, Cook EH, Jr. 5-HTTLPR Genotype-Specific Phenotype in Children and Adolescents With Autism. Am J Psychiatry 163 (Dec 2006): 2148-56.
- [242] Ferrari MD, Odink J, Tapparelli C, Van Kempen GM, Pennings EJ, Bruyn GW. Serotonin metabolism in migraine. Neurology 39 (Sep 1989): 1239-42.
- [243] Yilmaz M, Erdal ME, Herken H, Cataloluk O, Barlas O, Bayazit YA. Significance of serotonin transporter gene polymorphism in migraine. J Neurol Sci 186 (May 2001): 27-30.
- [244] Kotani K, Shimomura T, Shimomura F, Ikawa S, Nanba E. A polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region and frequency of migraine attacks. Headache 42 (Oct 2002): 893-5.
- [245] Juhasz G, Zsombok T, Laszik A, Gonda X, Sotonyi P, Faludi G, et al. Association analysis of 5-HTTLPR variants, 5-HT_{2a} receptor gene 102T/C polymorphism and migraine. J Neurogenet 17 (Apr-Sep 2003): 231-40.
- [246] Borroni B, Brambilla C, Liberini P, Rao R, Archetti S, Gipponi S, et al. Functional serotonin 5-HTTLPR polymorphism is a risk factor for migraine with aura. J Headache Pain 6 (Sep 2005): 182-4.
- [247] Hagymasi K, Tulassay Z. [Genetic background of irritable bowel syndrome]. Orv Hetil 147 (Jun 2006): 1167-70.
- [248] Andresen V, Camilleri M. Irritable bowel syndrome: recent and novel therapeutic approaches. Drugs 66 (2006): 1073-88.
- [249] Chen JJ, Li Z, Pan H, Murphy DL, Tamir H, Koepsell H, et al. Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: Abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters. J Neurosci 21 (Aug 2001): 6348-61.
- [250] Houghton LA, Atkinson W, Whitaker RP, Whorwell PJ, Rimmer MJ. Increased platelet depleted plasma 5-hydroxytryptamine concentration following meal ingestion in symptomatic female subjects with diarrhoea predominant irritable bowel syndrome. Gut 52 (May 2003): 663-70.

- [251] Bearcroft CP, Perrett D, Farthing MJ. Postprandial plasma 5-hydroxytryptamine in diarrhoea predominant irritable bowel syndrome: a pilot study. Gut 42 (Jan 1998): 42-6.
- [252] Bellini M, Rappelli L, Blandizzi C, Costa F, Stasi C, Colucci R, et al. Platelet serotonin transporter in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome both before and after treatment with alosetron. Am J Gastroenterol 98 (Dec 2003): 2705-11.
- [253] Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, et al. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. Gastroenterology 126 (Jun 2004): 1657-64.
- [254] Coates MD, Johnson AC, Greenwood-Van Meerveld B, Mawe GM. Effects of serotonin transporter inhibition on gastrointestinal motility and colonic sensitivity in the mouse. Neurogastroenterol Motil 18 (Jun 2006): 464-71.
- [255] Yeo A, Boyd P, Lumsden S, Saunders T, Handley A, Stubbins M, et al. Association between a functional polymorphism in the serotonin transporter gene and diarrhoea predominant irritable bowel syndrome in women. Gut 53 (Oct 2004): 1452-8.
- [256] Kim HJ, Camilleri M, Carlson PJ, Cremonini F, Ferber I, Stephens D, et al. Association of distinct alpha(2) adrenoceptor and serotonin transporter polymorphisms with constipation and somatic symptoms in functional gastrointestinal disorders. Gut 53 (Jun 2004): 829-37.
- [257] Wang BM, Wang YM, Zhang WM, Zhang QY, Liu WT, Jiang K, et al. [Serotonin transporter gene polymorphism in irritable bowel syndrome]. Zhonghua Nei Ke Za Zhi 43 (Jun 2004): 439-41.
- [258] Gwee KA. Irritable bowel syndrome in developing countries--a disorder of civilization or colonization? Neurogastroenterol Motil 17 (Jun 2005): 317-24.
- [259] Cerrito F, Lazzaro MP, Gaudio E, Arminio P, Aloisi G. 5HT₂-receptors and serotonin release: their role in human platelet aggregation. Life Sci 53 (1993): 209-15.

- [260] Eddahibi S, Fabre V, Boni C, Martres MP, Raffestin B, Hamon M, et al. Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle cells. Relationship with the mitogenic action of serotonin. Circ Res 84 (Feb 1999): 329-36.
- [261] Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, Raffestin B, Darmon M, Capron F, et al. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. J Clin Invest 108 (Oct 2001): 1141-50.
- [262] Eddahibi S, Chaouat A, Morrell N, Fadel E, Fuhrman C, Bugnet AS, et al. Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. Circulation 108 (Oct 2003): 1839-44.
- [263] Sauer WH, Berlin JA, Kimmel SE. Selective serotonin reuptake inhibitors and myocardial infarction. Circulation 104 (Oct 16 2001): 1894-8.
- [264] Coto E, Reguero JR, Alvarez V, Morales B, Batalla A, Gonzalez P, et al. 5-Hydroxytryptamine 5-HT_{2A} receptor and 5-hydroxytryptamine transporter polymorphisms in acute myocardial infarction. Clin Sci (Lond) 104 (Mar 2003): 241-5.
- [265] Fumeron F, Betoulle D, Nicaud V, Evans A, Kee F, Ruidavets JB, et al. Serotonin transporter gene polymorphism and myocardial infarction: Etude Cas-Temoins de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM). Circulation 105 (Jun 2002): 2943-5.
- [266] Williams RB, Marchuk DA, Gadde KM, Barefoot JC, Grichnik K, Helms MJ, et al. Central nervous system serotonin function and cardiovascular responses to stress. Psychosom Med 63 (Mar-Apr 2001): 300-5.
- [267] McCaffery JM, Bleil M, Pogue-Geile MF, Ferrell RE, Manuck SB. Allelic variation in the serotonin transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) and cardiovascular reactivity in young adult male and female twins of European-American descent. Psychosom Med 65 (Sep-Oct 2003): 721-8.

- [268] Gupta MA, Guptat AK. The use of antidepressant drugs in dermatology. J Eur Acad Dermatol Venereol 15 (Nov 2001): 512-8.
- [269] Huang J, Li G, Xiang J, Yin D, Chi R. Immunohistochemical study of serotonin in lesions of psoriasis. Int J Dermatol 43 (Jun 2004): 408-11.
- [270] Smeraldi E, Zanardi R, Benedetti F, Di Bella D, Perez J, Catalano M. Polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene and antidepressant efficacy of fluvoxamine. Mol Psychiatry 3 (Nov 1998): 508-11.
- [271] Zanardi R, Benedetti F, Di Bella D, Catalano M, Smeraldi E. Efficacy of paroxetine in depression is influenced by a functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene. J Clin Psychopharmacol 20 (Feb 2000): 105-7.
- [272] Zanardi R, Serretti A, Rossini D, Franchini L, Cusin C, Lattuada E, et al. Factors affecting fluvoxamine antidepressant activity: influence of pindolol and 5-HTTLPR in delusional and nondelusional depression. Biol Psychiatry 50 (Sep 2001): 323-30.
- [273] Pollock BG, Ferrell RE, Mulsant BH, Mazumdar S, Miller M, Sweet RA, et al. Allelic variation in the serotonin transporter promoter affects onset of paroxetine treatment response in late-life depression. Neuropsychopharmacology 23 (Nov 2000): 587-90.
- [274] Rausch JL, Johnson ME, Fei YJ, Li JQ, Shendarkar N, Hobby HM, et al. Initial conditions of serotonin transporter kinetics and genotype: influence on SSRI treatment trial outcome. Biol Psychiatry 51 (May 2002): 723-32.
- [275] Yu YW, Tsai SJ, Chen TJ, Lin CH, Hong CJ. Association study of the serotonin transporter promoter polymorphism and symptomatology and antidepressant response in major depressive disorders. Mol Psychiatry 7 (2002): 1115-9.
- [276] Arias B, Catalan R, Gasto C, Gutierrez B, Fananas L. 5-HTTLPR polymorphism of the serotonin transporter gene predicts non-remission in major depression patients treated with citalopram in a 12-weeks follow up study. J Clin Psychopharmacol 23 (Dec 2003): 563-7.

- [277] Yoshida K, Ito K, Sato K, Takahashi H, Kamata M, Higuchi H, et al. Influence of the serotonin transporter gene-linked polymorphic region on the antidepressant response to fluvoxamine in Japanese depressed patients. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 26 (Feb 2002): 383-6.
- [278] Kim DK, Lim SW, Lee S, Sohn SE, Kim S, Hahn CG, et al. Serotonin transporter gene polymorphism and antidepressant response. Neuroreport 11 (Jan 2000): 215-9.
- [279] Barak Y, Olmer A, Aizenberg D. Antidepressants reduce the risk of suicide among elderly depressed patients. Neuropsychopharmacology 31 (Jan 2006): 178-81.
- [280] Tencomnao T, Kapitonov D, Bieberich E, Yu RK. Transcriptional regulation of the human UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase (hCGT) gene expression: functional role of GC-box and CRE. Glycoconj J 20 (2004): 339-51.
- [281] Soares R, Balogh G, Guo S, Gartner F, Russo J, Schmitt F. Evidence for the notch signaling pathway on the role of estrogen in angiogenesis. Mol Endocrinol 18 (Sep 2004): 2333-43.
- [282] Flattem NL, Blakely RD. Modified structure of the human serotonin transporter promoter. Mol Psychiatry 5 (Jan 2000): 110-5.
- [283] Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, et al. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. Science 312 (Apr 2006): 104-7.
- [284] Jeyabalan G, Geller DA. The importance of platelet-derived serotonin in mediating hepatic regeneration. J Hepatol (2006).
- [285] Amin Z, Canli T, Epperson CN. Effect of estrogen-serotonin interactions on mood and cognition. Behav Cogn Neurosci Rev 4 (Mar 2005): 43-58.
- [286] Gundlah C, Lu NZ, Mirkes SJ, Bethea CL. Estrogen receptor beta (ERbeta) mRNA and protein in serotonin neurons of macaques. Brain Res Mol Brain Res 91 (Jul 2001): 14-22.

- [287] Lu H, Ozawa H, Nishi M, Ito T, Kawata M. Serotonergic neurones in the dorsal raphe nucleus that project into the medial preoptic area contain oestrogen receptor beta. J Neuroendocrinol 13 (Oct 2001): 839-45.
- [288] Alves SE, Weiland NG, Hayashi S, McEwen BS. Immunocytochemical localization of nuclear estrogen receptors and progesterin receptors within the rat dorsal raphe nucleus. J Comp Neurol 391 (Feb 1998): 322-34.
- [289] Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, et al. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. Endocrinology 144 (May 2003): 2055-67.
- [290] Di Paolo T, Diagle M, Picard V, Barden N. Effect of acute and chronic 17 beta-estradiol treatment on serotonin and 5-hydroxyindole acetic acid content of discrete brain nuclei of ovariectomized rat. Exp Brain Res 51 (1983): 73-6.
- [291] Morissette M, Levesque D, Belanger A, Di Paolo T. A physiological dose of estradiol with progesterone affects striatum biogenic amines. Can J Physiol Pharmacol 68 (Dec 1990): 1520-6.
- [292] Pecins-Thompson M, Brown NA, Kohama SG, Bethea CL. Ovarian steroid regulation of tryptophan hydroxylase mRNA expression in rhesus macaques. J Neurosci 16 (Nov 1996): 7021-9.
- [293] Luine VN, Khylichevskaya RI, McEwen BS. Effect of gonadal steroids on activities of monoamine oxidase and choline acetylase in rat brain. Brain Res 86 (Mar 1975): 293-306.
- [294] Gundlah C, Lu NZ, Bethea CL. Ovarian steroid regulation of monoamine oxidase-A and -B mRNAs in the macaque dorsal raphe and hypothalamic nuclei. Psychopharmacology (Berl) 160 (Mar 2002): 271-82.
- [295] Cyr M, Bosse R, Di Paolo T. Gonadal hormones modulate 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors: emphasis on the rat frontal cortex. Neuroscience 83 (Apr 1998): 829-36.

- [296] Sumner BE, Fink G. Estrogen increases the density of 5-hydroxytryptamine(2A) receptors in cerebral cortex and nucleus accumbens in the female rat. J Steroid Biochem Mol Biol 54 (Jul 1995): 15-20.
- [297] Sumner BE, Grant KE, Rosie R, Hegele-Hartung C, Fritzeimer KH, Fink G. Effects of tamoxifen on serotonin transporter and 5-hydroxytryptamine(2A) receptor binding sites and mRNA levels in the brain of ovariectomized rats with or without acute estradiol replacement. Brain Res Mol Brain Res 73 (Nov 1999): 119-28.
- [298] Arai N, Strom A, Rafter JJ, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta mRNA in colon cancer cells: growth effects of estrogen and genistein. Biochem Biophys Res Commun 270 (Apr 2000): 425-31.
- [299] Pfaffl MW, Lange IG, Meyer HH. The gastrointestinal tract as target of steroid hormone action: quantification of steroid receptor mRNA expression (AR, ERalpha, ERbeta and PR) in 10 bovine gastrointestinal tract compartments by kinetic RT-PCR. J Steroid Biochem Mol Biol 84 (Feb 2003): 159-66.
- [300] Xie LQ, Yu JP, Luo HS. Expression of estrogen receptor beta in human colorectal cancer. World J Gastroenterol 10 (Jan 2004): 214-7.
- [301] Lippert TH, Filshie M, Muck AO, Seeger H, Zwirner M. Serotonin metabolite excretion after postmenopausal estradiol therapy. Maturitas 24 (May 1996): 37-41.
- [302] Sherwin BB, Suranyi-Cadotte BE. Up-regulatory effect of estrogen on platelet 3H-imipramine binding sites in surgically menopausal women. Biol Psychiatry 28 (Aug 1990): 339-48.
- [303] Wihlbäck AC, Sundström-Poromaa I, Allard P, Mjorndal T, Spigset O, Backström T. Influence of postmenopausal hormone replacement therapy on platelet serotonin uptake site and serotonin 2A receptor binding. Obstet Gynecol 98 (Sep 2001): 450-7.
- [304] Franceschi S, Gallus S, Talamini R, Tavani A, Negri E, La Vecchia C. Menopause and colorectal cancer. Br J Cancer 82 (Jun 2000): 1860-2.

- [305] Troisi R, Schairer C, Chow WH, Schatzkin A, Brinton LA, Fraumeni JF, Jr. A prospective study of menopausal hormones and risk of colorectal cancer (United States). Cancer Causes Control 8 (Mar 1997): 130-8.
- [306] Grodstein F, Newcomb PA, Stampfer MJ. Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. Am J Med 106 (May 1999): 574-82.
- [307] al-Azzawi F, Wahab M. Estrogen and colon cancer: current issues. Climacteric 5 (Mar 2002): 3-14.
- [308] Calle EE, Miracle-McMahill HL, Thun MJ, Heath CW, Jr. Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. J Natl Cancer Inst 87 (Apr 1995): 517-23.
- [309] Wada-Hiraike O, Warner M, Gustafsson JA. New developments in oestrogen signalling in colonic epithelium. Biochem Soc Trans 34 (Dec 2006): 1114-6.
- [310] Xu W, Tamim H, Shapiro S, Stang MR, Collet JP. Use of antidepressants and risk of colorectal cancer: a nested case-control study. Lancet Oncol 7 (Apr 2006): 301-8.
- [311] Sorensen HT. Selective serotonin-reuptake inhibitors and chemoprevention of colorectal cancer. Lancet Oncol 7 (Apr 2006): 277-9.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

LB broth	ประกอบด้วย	Bacto-tryptone 5 g Bacto-yeast extract 2.5 g NaCl 5 g เติมน้ำกลั่น (DW) จนครบ 500 ml
LB agar	ประกอบด้วย	LB broth 500 ml Bacto agar 7.5 g
LB agar/Amp ⁺	ผสม	Ampicilin 100 µg ต่อ LB agar 1 ml
Buffer P1	ประกอบด้วย	10mM Tris, pH 8.0 1mM EDTA, pH 8.0 100µg/ml RNase A
Buffer P2	ประกอบด้วย	0.2M NaOH 10% SDS
Tris-borate (TBE) Buffer	ประกอบด้วย	0.045 M Tris-borate 0.001 M EDTA, pH 8.0
DEPC-treated Water	ประกอบด้วย	0.01 % (v/v) Diethylpyrocarbonate (DEPC) ผสมกับน้ำในภาชนะที่ปราศจาก RNase ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนและนำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave)

ภาคผนวก ข

ลำดับเบสของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองที่มีความหลากหลายชนิด S และ L อัลลีล
ของ 5-HTTLPR โดยเริ่มต้นที่ตำแหน่ง -1796 จนถึง +124 อ้างอิงจากลำดับเบสในฐานข้อมูล
GenBank accession No. X76753

-1796 gtt gccgctctga atgccagcac ctaacccta atgtccctac tgcagcctcc cagcatcccc
cctgcaacct cccagcaact ccctgtacct ctctaggat cgctctgca tccccatta tccccctt
cactcctgc gccatcccc ctgcacccc cagcatcccc cctgcagccc ccccagcatc tcccctgcac
cccagcatc ccccctgcag ccctccagc atccccctgc acctctcccaggatctcccc tgcaaccccc
attatcccc ctgcacccct cgcagtatcc ccctgcacc ccccagcatc cccccatgca ccccggcat
ccccctgca ccctccagc attctcttg caccctacca gtattcccc gcatccggc ctccaagct
cccgcccacc ttgcggtccc cgccctggcg tctaggtggc accagaatcc cgcgcgact ccaccgctg
ggagctgccc tcgctgccc gtggtgtcc agctcagtcc ctctagacgc tcagcccaac cggccgcaca
gtttcaggg gtcagttcct ccaagtaca gggcggtgg ctctctgga gctgcaaact tgcactgct
attctcttc ggtctctac ttctatcgt tctggcctc ctctgggga gaggtagagc cctctcttt ccgcctcagg
gacaacccaa agcaagtact gcatgtgccc ttttaaagt ttaaataat ttagcaaaa aggatattaa
cattaaatca attttaaac ttttgaaaa aattatcaaa actacatgca catggttcaa aacaataggc
tctgctggg cccttcaga taattcaat tgcaccagg ttggagtgca gtggtcgat cacggctcac
tgcagcctcg actcccggc tcagctgatc ctccacctca gcctctgag tagctgggaa cacaagcgcg
agcaaccacg cccggctaataaaaaaaaaat ttttttcta gagatggggt ctgctgtgt tgcccaggct
ggtcttgaat tctgggctc aagcaatcct cccgcctcag cctcccaag cactgtgctc cttttgacg
cagcttgaa ctgtagctgg ttaacaaaat gagaaccagt tcttattcc tcattgtgg aagtctttat tgtgagactc
tggggacgga gaggaattag acaagggcct ctaagctgag ctacatccc agccggtgag tcagataaac
gcatgggtat cgagtactgc taggtcccag gaagaaagag agagcagctt tcgggatggg gacgatggg
aggtgtccga ggtcaagaga aagcggcacg agcagacccc tgtgtgccgt cctgtgggcg
cggggcgga ggggagggc acacctgctc cttgtgacg cctccccct cccgcaaagt taaagagcag
gaaagtcagg attcctcgt cgccctgcc ctgccggctg ctccgcgctc cgctctccc tgcgagcgtg
tgtgtgtgc gggggtccct cccctcctgg ctctggggtt cgggcgcgca ccccgccccg tagcgggccc
cctccctggc gagcgcaacc ccatccagcg ggagcgcgga gccgcggccg cggggaagca ttaagttat

tcgcctcaaa gtgacgcaaa aattcttcaa gagctctttg gcggcggtta tctagagatc agaccatgtg
 agggcccgcg ggtacaaata cggccgcgcc ggcgcccctc cgc acagcca gcgccgccgg
 gtgcctcgag ggcgagagc cagcccgcct gccagcccg ggaccagcct ccccgcgag
 cctggcaggt gggccgttt ttctctccg cctcgaacct acgtttc +124

ลำดับเบสของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองที่ไม่มีความหลากหลายของ 5-HTTLPR
 โดยเริ่มต้นที่ตำแหน่ง -736 จนถึง +124 อ้างอิงจากลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank accession
 No. X76753

-736 aat tcctgggctc aagcaatcct cccgcctcag cctcccaaag cactgtgctc cttttgacg
 cagcttgaa ctgtagctgg ttaacaaat gagaaccagt tctcattcc tcattgtgg aagtcttat tggagactc
 tggggacgga gaggaattag acaagggcct ctaagctgag ctacatccc agccggtgag tcagataaac
 gcatgggtat cgagtactgc taggtcccag gaagaaagag agagcagctt tcgggatggg gacgatgggg
 aggtgtccga ggtcaagaga aagcggcacg agcagacccc tgtgtgccgt cctgtgggcg
 cggggcggca ggggagggcg acacctgctc cttgtgag cctccccct cccgcaaagt taaagagcag
 gaaagttagg attcctcgt cggccctgcc ctgccggctg ctccgcgctc cgctcctccc tgcgagcgtg
 tgtgtgtgc gggggtcct cccctcctgg ctctggggtt cgggcgagca cccgccccg tagcgcgacc
 cctccctggc gagcgcaacc ccatccagcg ggagcgcgga gccgcggccg cggggaagca ttaagttat
 tcgcctcaaa gtgacgcaaa aattcttcaa gagctctttg gcggcggtta tctagagatc agaccatgtg
 agggcccgcg ggtacaaata cggccgcgcc ggcgcccctc cgcacagcca gcgccgccgg
 gtgcctcgag ggcgagagc cagcccgcct gccagcccg ggaccagcct ccccgcgag
 cctggcaggt gggccgttt ttctctccg cctcgaacct acgtttc +124

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

Subject No.....

ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (Consent form)

การวิจัย การตรวจวัดซีโรโทนิน และการพัฒนาเทคนิคทางห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีของตนเองต่อซีโรโทนินในเลือดของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน

วันที่ให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....
.....ได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย อันตรายหรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว

ข้าพเจ้าได้ซักถามและทำความเข้าใจเกี่ยวกับการศึกษาดังกล่าว โดยผู้วิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่างๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบัง ซ่อนเร้น จนข้าพเจ้าพอใจแล้ว

ข้าพเจ้าเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ด้วยความสมัครใจ และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลใดๆ ต่อข้าพเจ้า

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปแบบที่เป็นสรุปผลการวิจัย (หรือข้าพเจ้าอนุญาตให้ผู้วิจัยเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องตามที่ผู้วิจัยเห็นสมควร

ในการวิจัยครั้งนี้ จะมีการเก็บเลือดเป็นจำนวนประมาณ 10 ซีซี เพียงหลอดเดียว

ผู้วิจัยได้อธิบายให้ข้าพเจ้าทราบและเข้าใจแล้วว่า การเก็บเลือดเพียงเล็กน้อย โดยทั่วไปจะไม่เกิดอันตรายใดๆ แก่ข้าพเจ้าเลย

ลงนาม.....ผู้ให้การยินยอม

(.....)

...../...../.....

ลงนาม.....พยาน

(.....)

...../...../.....

ลงนาม.....พยาน

(.....)

...../...../.....

ลงนาม.....ผู้ทำการวิจัย

(.....)

...../...../.....

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว อัญชลี ประสารสุขลาภ เกิดเมื่อวันที่ 8 เมษายน พ.ศ.2527 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต เกียรตินิยมอันดับ 1 สาขาวิชา เทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2547 และได้เข้า ศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิก และอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี การศึกษา 2548 โดยได้รับทุนค่าลงทะเบียน และทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอน ของคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในระหว่างการศึกษาในระดับปริญญาโท มี ประสบการณ์ทำงานในหน้าที่ Review Literature เกี่ยวกับองค์ความรู้ด้านวิชาการ และการวิจัย ด้านพันธุศาสตร์ เน้นผลงานที่เกี่ยวข้องกับจิตเวชศาสตร์ ให้กับศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านชีววิทยา ศาสตร์ของประเทศไทย (Thailand Center of Excellence for Life Sciences, TCELS)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย