

การควบคุมการส่งออกของยีนตัวขนส่งโดพามีนโดยกลไกระดับเหนือพันธุกรรมและพันธุกรรม



นายรชตวรรษ บุญมาเลิศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

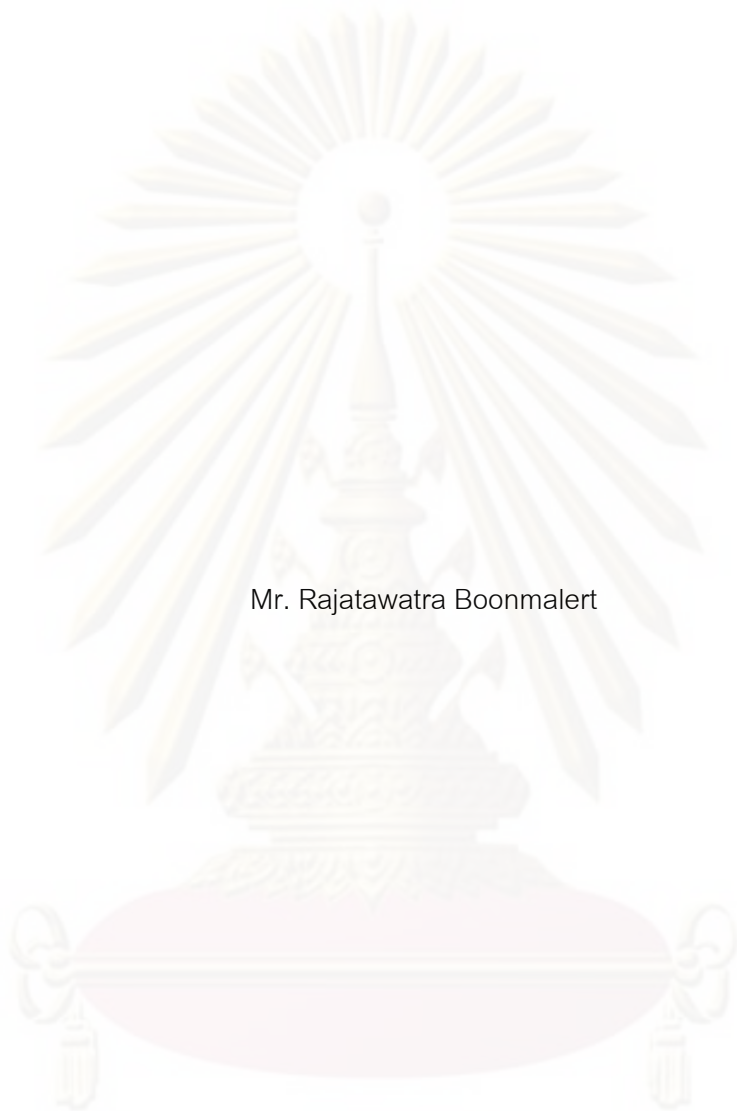
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูพันธุศาสตร์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

REGULATION OF THE DOPAMINE TRANSPORTER EXPRESSION BY
GENETIC AND EPIGENETIC MECHANISMS



Mr. Rajatawatra Boonmalert

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 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การควบคุมการแสดงออกของยีนตัวขนส่งโตพามีนโดยกลไก
ระดับเหนือพันธุกรรมและพันธุกรรม

โดย

นายรัชตวรรษ บุญมาเลิศ

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

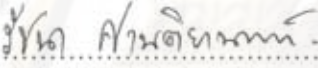
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

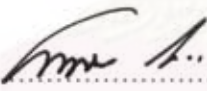
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชณา สานติยานนท์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.ณัฐริกา แสงกฤษ)

ศูนย์วิทยุทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รชตวรรษ บุญมาเลิศ: การควบคุมการแสดงออกของยีนตัวขนส่งโดพามีนโดยกลไกระดับ
เหนือพันธุกรรมและพันธุกรรม. (REGULATION OF THE DOPAMINE TRANSPORTER
EXPRESSION BY GENETIC AND EPIGENETIC MECHANISMS) อ.ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร.เทวิน เทนคำเนา, 96 หน้า.

โดพามีน (DA) เป็นสารสื่อประสาทมีบทบาทสำคัญในการสร้างความสุข แรงแบบตาใจและ
ความทรงจำ การส่งสัญญาณประสาทโดพามีนจะสิ้นสุดโดยการดูดหรือดูดกลับเข้าเซลล์โดยรอบ
ของไซแนปส์โดยผ่านตัวขนส่งโดพามีน (hDAT) โรคซึมเศร้า (MDD) เป็นโรคทางจิตเวชที่เป็นปัญหา
สำคัญของระบบสาธารณสุขโลกที่ทวีความรุนแรงขึ้นเรื่อยๆในแต่ละปี การลดลงของ DA ใน
ไซแนปส์ก่อให้เกิดภาวะอารมณ์ไม่ดีและไม่มีความสุขซึ่งเป็นอาการหลักของโรคซึมเศร้า การศึกษา
แบ่งออกเป็นสามส่วนหลักคือส่วนแรกเกี่ยวกับการทดสอบหา DNA methylation บริเวณ CpG
dinucleotide ที่ตำแหน่ง -942 ของยีน hDAT ด้วยวิธี Methylation-sensitive isoschizomers โดย
เปรียบเทียบการมี DNA methylation และการแสดงออกของยีน hDAT ในเซลล์เพาะเลี้ยงเจ็ดชนิด
ส่วนที่สองคือการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง rs2652511
และ 63bp-VNTR ในบริเวณ Promoter และ Intron 3 ของยีน hDAT ในกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้าใน
ประชากรไทยโดยประกอบด้วยผู้ป่วย 173 ราย (44.5 ± 12.99 ปี) และกลุ่มควบคุม 187 ราย
(42.1 ± 9.89 ปี) และส่วนที่สามเป็นการศึกษาหน้าที่ของ hDAT promoter (-962/+41) กับยา
Dexamethasone ในเซลล์เพาะเลี้ยง (SH-SY5Y, HeLa และ HaCaT) โดยใช้เทคนิค Reporter
gene assay และ RT-PCR คณะผู้วิจัย ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด DNA methylation และ
การแสดงออกของยีน hDAT ในเซลล์เพาะเลี้ยงต่างๆ เนื่องจากไม่มีการเกิด DNA methylation ที่
CpG บริเวณ -942 ส่วนผลการศึกษาความสัมพันธ์นั้น ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความ
หลากหลายทางพันธุกรรมของยีน hDAT กับโรคซึมเศร้าทั้งในรูปแบบความถี่อัลลีล การกระจายตัวจี
โนไทป์และ Haplotype สำหรับการทดสอบหน้าที่ของ hDAT promoter นั้น พบว่า
Dexamethasone สามารถเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ Reporter gene อย่างมีนัยสำคัญทาง
สถิติ โดยมีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกเมื่อให้ 10^{-4} M Dexamethasone ในเซลล์ SH-SY5Y ($p < 0.01$) และ HaCaT ($p < 0.01$) ส่วนที่ความเข้มข้น 10^{-6} M นั้น กดการแสดงออกของ Reporter
gene ในเซลล์ SH-SY5Y อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ภาควิชา.....เคมีคลินิก.....

ลายมือชื่อ.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมีคลินิกและอนุทางวาทแพทย์.....

ลายมือชื่อ.....อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา.....2551.....

5077202637 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE


KEYWORDS : HUMAN DOPAMINE TRANSPORTER / EPIGENETICS / GENE EXPRESSION / GENETICS / METHYLATION / MAJOR DEPRESSIVE DISORDER

RAJATAWATRA BOONMALERT: REGULATION OF THE DOPAMINE TRANSPORTER EXPRESSION BY GENETIC AND EPIGENETIC MECHANISMS.

THESIS ADVISOR: ASST.PROF.TEWIN TENCOMNAO, Ph.D., 96 pp.

Dopamine (DA), a neurotransmitter, plays a key role in pleasure creation, reinforcement, rewarding, attention and cognition. DA neurotransmission is ended by reuptake or uptake to surrounding cells via human dopamine transporter (hDAT). Major depressive disorder (MDD) leads to an increase in a global public health problem nowadays. Shortage of DA in dopaminergic synaptic cleft results in low mood and anhedonia in MDD patients. hDAT is one of the factors regulating the DA elimination from the synaptic cleft. This study was divided into three parts: 1) study of pattern CpG DNA methylation for hDAT promoter at the position -942 in 7 human cell lines using the technique called methylation-sensitive isoschizomers, 2) case-control association study of two polymorphisms (rs2652511 and 63bp-VNTR of the hDAT promoter and intron 3, respectively) and MDD in Thai unrelated patients (44.5 ± 12.99 years; $n = 173$) and healthy controls (42.1 ± 9.89 years; $n = 187$), and 3) functional study of the hDAT promoter (-962/+41) and dexamethasone in cellular model (SH-SY5Y, HeLa and HaCaT) using reporter gene assay and RT-PCR. We found no DNA methylation at the position -942, suggesting no association between this CpG nucleotide and the expression of hDAT. For association study, no differences in allele frequencies, genotype distributions and haplotypes between case and control groups were observed. In the functional analysis, dexamethasone altered the hDAT promoter activity as this drug at concentration 10^{-4} M significantly increased the activity in HaCaT ($p < 0.01$) and SH-SY5Y ($p < 0.01$); but, at 10^{-8} M, it significantly suppressed the activity in SH-SY5Y ($p < 0.05$).

Department : ...Clinical Chemistry.....

Student's Signature : 

Field of Study : ...Clinical Biochemistry.....

Advisor's Signature : 

...and Molecular Medicine.....

Academic Year :2009.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนข้อคิดต่างๆ ในการทำงาน ด้วยดีตลอดมา ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และดร.ณัฐฐิกา แสงกฤช ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ศ.นพ.ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ศ.ดร.พรเทพ เทียนสีวากุล รศ.ดร. ภาพพันธ์ ภัทรโกศล รศ.นพ.วันล่า กุลวิชิต อ.ดร.พูนลาภ ชีพสุนทรและProf. Dr. N.E. Fusenig ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ และขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Robert K. Yu ที่กรุณาเอื้อเฟื้อพลาสติกที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาและบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต

ขอขอบพระคุณผศ.ศราวุธ สุทธิรัตน์ นพ.ฐปนัท ศรีธรรมาธิคุณ และคุณสุทัศน์ จ้อยภูเขียว ที่กรุณาประสานงานต่างๆ ในการเก็บตัวอย่างเลือดมาทำการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณอาสาสมัครทุกท่านที่กรุณาให้ตัวอย่างเลือดของท่านมาทำการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์และโครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้านโอมิิกส์-นาโน เมดิคัลเทคโนโลยี ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ วัสดุอุปกรณ์ ครุภัณฑ์วิจัยและสารเคมีบางส่วนในการศึกษาวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัว เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ป.โท ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยมาตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	3
1.3 ข้อยกเว้นของการวิจัย.....	4
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 โดพามีน (Dopamine).....	7
2.2 ระบบประสาทโดพามีนเอร์จิก (Dopaminergic pathway).....	11
2.3 ตัวขนส่งโดพามีนของมนุษย์ (Human dopamine transporter, hDAT).....	13
2.4 ตัวอย่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน hDAT ในมนุษย์.....	14
2.5 สรีรวิทยาของ hDAT.....	15
2.6 Rewarding system.....	16
2.7 โรคซึมเศร้า (Major depressive disorder).....	17
2.8 การเปลี่ยนแปลงของสมองในโรคซึมเศร้า.....	20

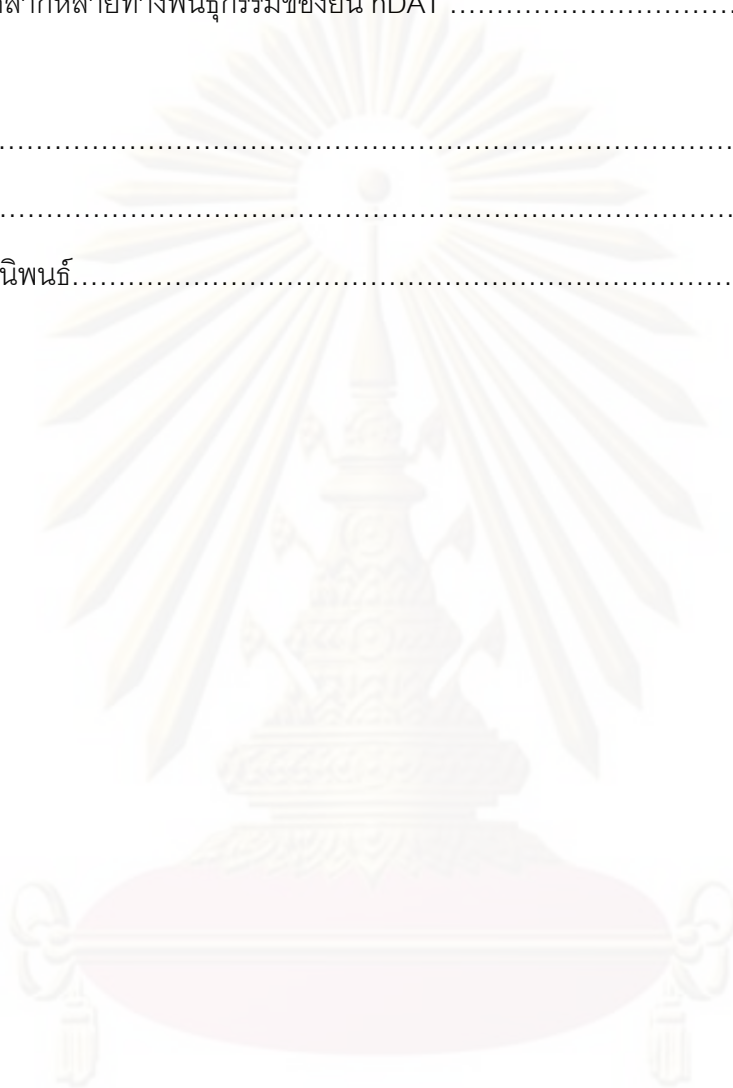
2.9 โดพามีนและโรคซึมเศร้า.....	21
2.10 ระบบลิมบิก (Limbic system).....	24
2.11 Nucleus accumbens.....	25
2.12 Glutamatergic neuron.....	25
2.13 การเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ (DNA methylation).....	25
2.14 ปฏิกริยาไบซัลไฟต์ (Bisulfite conversion).....	28
2.15 Methylation sensitive isoschizomers.....	31
2.16 Reporter gene assay.....	31
2.17 หลักการของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก.....	32
2.18 ปัญหาสำหรับหลักการของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก.....	33
2.19 คอร์ติซอล (Cortisol).....	34

บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	36
3.2 การคัดเลือกประชากรและกลุ่มตัวอย่าง.....	40
3.3 การตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน hDAT.....	44
ตำแหน่ง rs2652511 และ 63bp-repeat VNTR บน Intron 3	
3.4 การวิเคราะห์ผลความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน.....	45
hDAT ในตำแหน่งที่สนใจ	
3.5 การสร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อการโคลน การตกตะกอน.....	46
และการเชื่อมดีเอ็นเอกับพลาสมิด	
3.6 การส่งพลาสมิดเข้าแบคทีเรียด้วยวิธี Electroporation.....	48
3.7 การคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียด้วยวิธี Colony PCR.....	48
3.8 การสกัดพลาสมิดด้วยวิธีการ Alkaline lysis.....	49
3.9 การตรวจสอบพลาสมิดด้วยการตัดเอนไซม์จำเพาะและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	50
3.10 การขนส่งพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง (Transfection).....	50

3.11 Reporter gene assay.....	51
3.12 การสกัดอาร์เอ็นเอและการทดสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอ.....	52
3.13 RT-PCR.....	54
3.14 การทำนายจุดจับ Transcription factor บน Promoter.....	55
3.15 Methylation specific isoschizomers.....	56
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน hDAT และโรคซึมเศร้า	
4.1.1 ผลการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน hDAT.....	59
4.1.2 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง rs2652511 และ 63bp-VNTR กับ.....	61
โรคซึมเศร้าในรูปแบบของ Single marker	
4.1.3 ผลการวิเคราะห์ Linkage disequilibrium (LD) และ Haplotype.....	63
4.1.4 การวิเคราะห์ทาง Bioinformatics สำหรับ rs2652511.....	64
4.1.5 ความหลากหลายแบบ rs2652511 ของยีน hDAT ในชนชาติอื่น.....	65
4.2 การศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน hDAT โดยทางพันธุกรรม	
4.2.1 การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับการโคลนด้วยปฏิกิริยา PCR.....	65
4.2.2 Colony PCR และการสกัดพลาสมิดเพื่อทำ RFLP.....	66
4.2.3 ผลการทดสอบการ Treat dexamethasone ของเซลล์ที่ถูก Transfect ด้วย.....	67
Recombinant pGL3-Basic	
4.2.4 ผลการทดสอบการ Treat dexamethasone ต่อเซลล์โดยวิธี RT-PCR.....	70
4.3 การศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน hDAT โดย Epigenetics	
4.3.1 การแสดงออกของยีน hDAT ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ.....	71
4.3.2 ผลของการทดสอบการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอของ Promoter ของยีน hDAT.....	72
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	
5.1 แสดงออกของยีน hDAT ในเซลล์เพาะเลี้ยงต่างๆ และ DNA methylation.....	73

5.2 การทดสอบผลของยา Dexamethasone ต่อการควบคุมการแสดงออก.....	74
ของยีนบน Promoter	
5.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน hDAT	76
รายการอ้างอิง.....	79
ภาคผนวก.....	92
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	96



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงรายชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer ที่ใช้ในการศึกษา.....	45
ความหลากหลายทาง พันธุกรรมของยีน hDAT	
3.2 แสดงรายชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer ที่ใช้ในการ.....	48
ทำ Colony PCR สำหรับพลาสมิด pGEM®-T Easy vector และ pGL3-Basic	
4.1 การกระจายจีโนไทป์ ความถี่อัลลีลและสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของความหลากหลาย.....	61
ทางพันธุกรรมของยีน hDAT ณ ตำแหน่ง rs2652511 และ 63bp-repeat VNTR	
4.2 ความแตกต่างของการกระจายตัวจีโนไทป์ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้า.....	62
4.3 ความถี่อัลลีลและความสัมพันธ์ระหว่างโรคซึมเศร้าและความหลากหลายทาง.....	63
พันธุกรรมของยีน hDAT ณ ตำแหน่ง rs2652511 และ 63bp-repeat VNTR	
4.4 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ Haplotype ด้วยโปรแกรม Haploview 4.1.....	64
4.5 ความถี่อัลลีลของความหลากหลายตำแหน่ง rs2652511 ของยีน hDAT.....	65
จากการศึกษาในชนชาติต่างๆ	
4.6 แสดงความสัมพันธ์และความแตกต่างระหว่างระดับความเข้มข้นยา	69
Dexamethasone ที่ใช้ Treat เซลล์ชนิดต่างๆ	
4.7 แสดงระดับการแสดงออกของยีน hDAT ของเซลล์เพาะเลี้ยงต่างๆ.....	71

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 การสังเคราะห์โดพามีน (Dopamine biosynthesis) และสารที่เกี่ยวข้อง.....	9
2.2 การสลายตัวของโดพามีนผ่านเอนไซม์ COMT และ MAO.....	10
2.3 ภาพการแสดงบริเวณ Neuroneuronal หรือ Neuromuscular junction.....	11
สำหรับระบบประสาท Dopaminergic	
2.4 Dopaminergic pathway ในสมองของมนุษย์.....	13
2.5 แสดงโครโมโซมแท่งที่ 5 และโลคัสต่างๆ บนโครโมโซมจากการย้อมด้วย G band.....	14
2.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Dopaminergic neuron, CREB.....	23
K-opioid receptor และ GABAnergic neuron	
2.7 แสดงการเกิด Deamination ของ C เป็น U.....	26
2.8 การเปลี่ยนแปลง C เป็น U ภายใต้ปฏิกิริยาไบเซลล์ไฟต์.....	28
2.9 Methylation specific PCR.....	29
2.10 COBRA.....	31
2.11 แสดงปฏิกิริยาของ FLUC และ RLUC.....	32
3.1 แผนที่จังหวัดเลยและอาณาเขตติดต่อกับจังหวัดใกล้เคียง.....	43
3.2 พลาสมิด pGEM®-T Easy vector.....	47
3.3 พลาสมิด pGL3-Basic vector.....	47
3.4 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิดกับฐานข้อมูล NCBI.....	50
3.5 พลาสมิด pRL-CMV.....	51
3.6 ขั้นตอนๆ ของ Trizol® ในการสกัดอาร์เอ็นเอ.....	53
3.7 แสดงภาพการแยกอาร์เอ็นเอบนวุ้นอะกาโรสที่มีฟอร์มัลดีไฮด์.....	54
3.8 เปรียบเทียบแถบของดีเอ็นเอภายหลังการตัดเอนไซม์ <i>Msp</i> I และ <i>Hpa</i> II.....	56
3.9 แสดงถึงตำแหน่งที่ใช้ในการศึกษาการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอบริเวณ.....	57
Promoter ของยีน hDAT	
3.10 แสดง PCR product สำหรับกรณีการเติมหมู่เมทิลในรูปแบบต่างๆ.....	58

ภาพที่	หน้า
4.1 แสดงผลการวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีน hDAT ณ SNP rs2652511.....	59
4.2 แสดงผลการวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีน hDAT ชนิด 63bp-repeat VNTR	60
4.3 ภาพสรุปการทำนาย Transcription factor binding site ของ rs2652511.....	64
4.4 ผลของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ -962 ถึง +41 ของยีน hDAT	66
4.5 ผลของปฏิกิริยา PCR ในการทำ Colony PCR ของพลาสมิด pGEM®-T Easy vector	66
4.6 ผลของปฏิกิริยา PCR ในการทำ Colony PCR ของพลาสมิด pGL3-Basic.....	67
4.7 การแสดงออกของยีน Firefly luciferase ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ.....	68
4.8 การแสดงออกของยีน hDAT ของเซลล์ HeLa และ SH-SY5Y.....	70
4.9 การแสดงออกของยีน hDAT ของเซลล์ HeLa.....	70
4.10 ผลของปฏิกิริยา PCR เพื่อทดสอบการแสดงออกของยีน hDAT.....	71
4.11 แสดงการแยก PCR product จากการทำ Methylation specific isoschizomers (1).....	72
4.12 แสดงการแยก PCR product จากการทำ Methylation specific isoschizomers (2).....	72
5.1 การทดสอบการแสดงออกของยีน hDAT ในเซลล์ต่างๆด้วยวิธี Electronic northern blot	73
5.2 การ Localize ของโปรตีน GR- α ที่แตกต่างกันของเซลล์ HeLa และ HaCaT.....	75

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

โรคซึมเศร้า (Major depressive disorder) เป็นหนึ่งในปัญหาสาธารณสุขสำคัญของโลกและประเทศไทย โดยเฉลี่ยแล้วทุกๆ 8-12% ของประชากรทั่วโลกจะเป็นโรคซึมเศร้า [1, 2] โดยจากการศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่า 3-5% ของประชากรเพศชายและ 8-10% ของประชากรหญิงจะป่วยเป็นโรคซึมเศร้าและมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ [3, 4] ซึ่งในปี 2030 ได้มีการพยากรณ์ไว้ว่าโรคซึมเศร้าจะเป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญของโลกเป็นอันดับที่สองรองจากการติดเชื้อเอชไอวี [5] ในประเทศไทยจากข้อมูลปี 2008 พบว่าประชากรไทย 5% หรือกว่าสามล้านคนป่วยเป็นโรคซึมเศร้า โรคซึมเศร่ายังมีความสัมพันธ์สำคัญกับการเกษียณอายุและการว่างงานจากรายงานพบว่าในปี 1999 หรือสองปีให้หลังจากวิกฤติเศรษฐกิจในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้โรคซึมเศร้าเป็นโรคที่ทำให้เกิดการสูญเสียสุขภาพ (Disability-adjusted life years, DALY) มากเป็นอันดับหนึ่งในเพศหญิงและเป็นอันดับสามในเพศชาย

ระบบประสาทโดพามีนเอร์จิก (Dopaminergic system) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับการสร้างแรงจูงใจ (Reward) ความพึงพอใจ (Pleasure) ความใส่ใจ (Attention) และความทรงจำ (Cognition) [6] ซึ่งเกือบทั้งหมดที่กล่าวมาเป็นสิ่งที่คนเป็นโรคซึมเศร้าไม่สามารถจะมีได้หรือมีได้ยาก โดยระบบประสาทโดพามีนเอร์จิกมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับ Rewarding system ในสมอง [7] ซึ่งจากการทดสอบในหนูแรท (*Rattus norvegicus*) โดยเปรียบเทียบระหว่างการให้สารแอมเฟตามีน (Amphetamine) กับหนูที่มีอาการซึมเศร้าและหนูที่มีอาการปกติพบว่าหนูที่มีอาการซึมเศร้ามีการตอบสนองต่อการให้แอมเฟตามีนที่รุนแรงกว่ามาก [8] โดยแอมเฟตามีนเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทโดพามีนเอร์จิกและ Reward system โดยตรง [9] นอกจากนี้พบว่าในคนที่ป่วยเป็นโรคซึมเศร่าจะมีระดับของโดพามีนใน Reward system ลดลงด้วย [9]

โดพามีน (Dopamine) เป็นสารสื่อประสาทจำพวก Monoamine สร้างจากกรดอะมิโนเพียงตัวเดียวคือไทโรซีน (Tyrosine) โดยโดพามีนจะถูกสร้างมากในระบบประสาทโดพามีนเอร์จิก ระบบประสาทซิมพาเทติก (Sympathetic nervous system) และเซลล์ Chromaffin ของต่อมหมวกไตชั้นใน (Adrenal

medulla) ซึ่งสองบริเวณหลังโดพามีนจัดเป็นสารตัวกลาง (Intermediate) ไม่ได้เป็นสารสื่อประสาทหรือสารออกฤทธิ์หลัก [6] เมื่อการสื่อประสาทโดยโดพามีนเกิดขึ้นเรียบร้อยแล้วโดพามีนในช่องไซแนปส์ (Synapse) จะถูกดูด (Uptake) หรือดูดกลับ (Reuptake) เข้าเซลล์โดยรอบผ่านตัวขนส่งโดพามีน (Dopamine transporter) ซึ่งเมื่อถูกดูดหรือดูดกลับแล้วโดพามีนอาจจะถูกนำมาบรรจุ Vesicle เพื่อใช้เป็นสารสื่อประสาทใหม่อีกครั้ง [10] หรืออาจถูกทำลายโดยเอนไซม์ Monoamine oxidase (MAO) และ Catechol-O-methyltransferase (COMT) ได้สารสุดท้ายคือ Homovanillic acid (HVA) และถูกขับทิ้งออกทางปัสสาวะ [6]

คนที่มีความเครียด (Stress) ไม่ว่าจะเกิดจากสิ่งเร้าภายนอกหรือภายในจะก่อให้เกิดภาวะ Hypercortisolemia ซึ่งฮอร์โมนคอร์ติซอล (Cortisol, Hydrocortisone) เป็นฮอร์โมนที่ใช้ควบคุมสมดุลของกลูโคสในกระแสเลือดและเป็นฮอร์โมนที่ขึ้นชื่อได้ว่าเป็นผู้พิชิตความเครียด ภาวะคอร์ติซอลสูงภายหลังความเครียดเกิดขึ้นไม่ได้เกิดเฉพาะในหลอดเลือดเท่านั้นยังสูงขึ้นในสมองอีกด้วย พบว่าระดับคอร์ติซอลที่สูงขึ้นส่งผลให้ Reward system ทำงานหนักมากขึ้นและตอบสนองลดลงส่งผลให้ผู้ป่วยซึมเศร้าที่มีอาการเครียดประกอบจะมีความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้น [11]

จากการทดลองในหนูแรทโดยการแบ่งกลุ่มแม่หนูกินยา Dexamethasone ซึ่งเป็น Glucocorticoid receptor agonist ก่อนที่จะคลอดและหลังคลอด พบว่าภายหลังลูกหนูที่เกิดจากแม่ทั้งสองกลุ่มมีปริมาณของเซลล์สมองในส่วนที่มีการสร้างเอนไซม์ Tyrosine hydroxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างโดพามีนมากขึ้นเมื่อเทียบกับหนูที่แม่หนูไม่ได้รับยา ครอกที่เกิดและได้รับนมจากแม่หนูที่ได้รับยา Dexamethasone ก่อนคลอดไม่พบความแตกต่างของสมองส่วนนี้ระหว่างเพศผู้และเมีย แต่พบความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเมียในครอกที่เกิดจากและได้รับนมจากแม่ที่ได้รับยา Dexamethasone หลังคลอดโดยในเพศเมียมีเซลล์สมองส่วนนี้น้อยกว่ากว่าเพศผู้ อย่างไรก็ตามทั้งสองกลุ่มมีเซลล์ของสมองส่วนที่มีการสร้างสารสื่อประสาทโดพามีนมากกว่าหนูทั่วไปประมาณ 30-50% นี้แสดงให้เห็นว่าระบบประสาทโดพามีนเนอริจิกมีการตอบสนองต่อคอร์ติซอลหรือความเครียดโดยการต่อสู้กับความเข้มข้นและเพิ่มปริมาณเซลล์ส่วนนี้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ดีสิ่งนี้เกิดขึ้นได้เนื่องจากลูกหนูหรือทารกสมองยังพัฒนาและแบ่งเซลล์ได้อยู่ แต่หากเกิดขึ้นในวัยที่เซลล์สมองหยุดเจริญไปแล้ว (ในคนประมาณ 5 ขวบ) เซลล์ในระบบประสาทโดพามีนเนอริจิกไม่สามารถตอบสนองต่อระดับคอร์ติซอลหรือความเครียดในระดับนี้ด้วยการเพิ่มจำนวนแข่งได้ ระบบประสาทโดพามีนเนอริจิกจึงต้องพ่ายแพ้ต่อความเครียดไป [12]

จากการศึกษาทั้งในคนและหนูไม่ชี้พบว่าทำให้ Dopamine agonist มีฤทธิ์เหมือนการให้ยาต้านโรคซึมเศร้าเช่นเดียวกับการให้ตัวยับยั้งตัวขนส่งโดพามีน (DAT blocker) นอกจากนี้การศึกษาในหนูไม่ชี้พบว่า การ Knock-out ยีนตัวขนส่งโดพามีนทำให้หนูมีการตอบสนองต่อแรงจูงใจและการอยู่รอดของชีวิตได้ดีกว่าซึ่งเป็นสิ่งที่เกิดได้ยากในคนที่เป็นโรคซึมเศร้า [13]

ในโรคจิตเภท (Schizophrenia) และโรคไบโพลาร์ (Bipolar disorder) นั้นระดับ mRNA ของยีน Reelin ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการแตกแขนงของแอกซอน การสร้างไซแนปส์มีการลดลงมากกว่าสมองคนปกติถึง 50% จากการศึกษาล้างความตาย [14] [15] โดยระดับการแสดงออกของยีนนี้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับ DNA methylation บริเวณ Promoter หรือจากการศึกษาของอุ่งศรีพบว่าระดับการแสดงออกของยีน Angiotensin converting enzyme (ACE) กับระดับ DNA methylation ของ Promoter บริเวณ CCWGG motif ก็มีความสัมพันธ์กัน ((DcM motif)) ยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคทางจิตเวชอีกหลายยีนก็มีความเกี่ยวข้องกับ DNA methylation เช่นกัน เช่นในโรคจิตเภทยีน HTR2A(Serotonin receptor 2A) ที่มีความหลากหลายแบบ T102C ซึ่งเป็นอัลลีล C ในผู้ป่วยก็มีการแสดงออกน้อยกว่าอัลลีล C ในคนปกติ โดย C นี้ไม่ได้เป็น C บริเวณ Promoter ด้วยแต่เป็นอัลลีลที่อยู่บนแอกซอน [16] ดังจะเห็นได้ว่าการศึกษา DNA methylation ไม่ได้มีการศึกษาเพียงเฉพาะในการศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อนและมะเร็งเท่านั้น ยังมีการนำมาใช้ในการศึกษาโรคอื่นๆ เช่นกลไกการเกิดโรคทางจิตเวชได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. ศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีนตัวขนส่งโดพามีน (Human dopamine transporter, hDAT) ในรูปแบบของ mRNA ในระดับเหนือพันธุกรรม (Epigenetic, DNA methylation)
2. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายพันธุกรรมของยีนตัวขนส่งโดพามีนบริเวณ Promoter ตำแหน่ง -844C/T (rs2652511) และ Intron 3 63bp-VNTR กับโรคซึมเศร้าในประเทศไทย
3. ศึกษาบทบาทของ Promoter ของยีนตัวขนส่งโดพามีนและสารก่อกวนเอนโดครินที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนตัวขนส่งโดพามีนในเซลล์เพาะเลี้ยงของมนุษย์

1.3 ข้อจำกัดของการวิจัย

การศึกษากการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ (DNA methylation) ของ Promoter ของยีนตัวขนส่งโดพามีนนั้นมีข้อจำกัดทางเทคนิคอยู่สองประเด็นคือข้อจำกัดด้านวิธีตรวจวัดซึ่งในการศึกษานี้ใช้เทคนิค Methylation specific isoschizomers ซึ่งสามารถศึกษากการเติมหมู่เมทิลได้ครั้งละหนึ่งตำแหน่งต่อการตัด เอนไซม์และทำ PCR หนึ่งครั้ง ส่วนข้อจำกัดของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Promoter ของยีนตัวขนส่งโดพามีนเป็นอีกอุปสรรคหนึ่งทางกายภาพเพราะว่า Promoter ของยีนตัวขนส่งโดพามีนสามารถถูกตัดได้ด้วย เอนไซม์ *Msp I/Hpa II* และ *Hha I* ได้ถี่เกินไป ทำให้เป็นอุปสรรคในการเลือกตำแหน่งที่เหมาะสมในการ ตรวจวัดการเติมหมู่เมทิลของ Promoter ของยีนนี้

การศึกษากผลของยา Dexamethasone ที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนตัวขนส่งโดพามีนด้วยวิธี Reporter assay มีข้อจำกัดคือ Promoter ของตัวขนส่งโดพามีนที่เลือกมาทดสอบไม่ใช่ Promoter ของตัว ขนส่งโดพามีนทั้งหมดแต่เป็นนิวคลีโอไทด์ตัวแทนที่มีบริเวณที่ใกล้เคียง Core promoter และมีตำแหน่งที่ สามารถจับได้กับ Glucocorticoid receptor เท่านั้นมาเป็นความยาวประมาณ 1 กิโลเบส (Exogenous) ดังนั้นค่าที่ได้จาก Reporter assay อาจมีข้อจำกัดให้ผลที่ต่างจากการวัดการแสดงออกของยีนตัวขนส่งโด พามีนด้วยวิธี RT-PCR ที่ใช้ Promoter ของยีนนี้ในแต่ละเซลล์ (Endogenous) โดยตรง

การศึกษากสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวขนส่งโดพามีนและโรค ซึมเศร้ามีข้อจำกัดคือดีเอ็นเอชุดเก่ากับชุดใหม่ที่ได้จาก EDTA blood มีคุณภาพดีเอ็นเอแตกต่างกัน ทำให้ ตัวอย่างบางรายไม่สามารถให้ผลบวกในการทำ PCR ได้ รวมถึงกลุ่มตัวอย่างประชากรที่ได้คือคนไทยที่อยู่ใน จังหวัดเลยและบริเวณใกล้เคียงซึ่งไม่ได้เป็นตัวแทนของประชากรไทยทั้งหมด ทำให้การศึกษากที่จะมี ต่อเนื่องควรทำการศึกษากประชากรในเขตอื่นด้วย

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษากบาททาง Epigenetics ได้ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากมนุษย์ 7 ชนิดเป็นตัวแทนใน การศึกษากคือเซลล์ A549 (Human non-squamous cell lung carcinoma) เซลล์ HaCaT (Human keratinocyte) เซลล์ HEK293 (Human embryonic kidney) เซลล์ HeLa (Human cervical cancer) เซลล์ Jurkat (Human T-cell lymphoblastic leukemia) เซลล์ K562 (Human erythroleukemia) และ

เซลล์ SH-SY5Y (Human neuroblastoma) ในการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอบริเวณ Promoter กับการแสดงออกของยีนตัวขนส่งโดพามีนในรูปของ mRNA

การศึกษายาทบาทของ Promoter ในการควบคุมการแสดงออกของยีนตัวขนส่งโดพามีนนั้นได้ศึกษาในรูปแบบของการโคลนชิ้นส่วน Promoter บางส่วนเพื่อนำเข้าสู่เซลล์และวัดการแสดงออกในรูปของ Reporter assay ซึ่งยาทบาทของ Promoter นี้จะใช้ยา Dexamethasone เป็นตัวทดสอบ จากนั้นจึงยืนยันผลที่ได้จาก Reporter assay ที่ให้ผลแบบมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยการทำการเลี้ยงเซลล์ที่ทำการทดสอบ Reporter assay ในช่วงต้นแล้ว Treat ยา Dexamethasone ที่ความเข้มข้นและเวลาเท่ากับการทดลองช่วงต้นแล้วจึงวัดระดับการแสดงออกของยีนตัวขนส่งโดพามีนที่เปลี่ยนแปลงด้วยวิธี RT-PCR แล้วมาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จาก Reporter assay

การศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวขนส่งโดพามีนนั้นได้เลือกตำแหน่งที่ครอบคลุม Core promoter ด้วยตำแหน่ง rs2652511 (-844T/C) และ 63bp-VNTR บน Intron 3 ในกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุมโรคซึมเศร้ากลุ่มละ 131 ราย แล้วจึงวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยสถิติ Student's t-test โดยให้ผลการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$ โดยทั้งกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุมต้องเป็นประชากรเชื้อชาติเดียวกัน ทำงานประกอบอาชีพ ดำรงชีวิตในบริเวณเดียวกัน พฤติกรรมการบริโภคและการดำรงชีวิตใกล้เคียงกัน โดยอยู่ในเขตพื้นที่บริการของโรงพยาบาลจิตเวชเลย ราชนครินทร์ซึ่งรับผิดชอบจังหวัดเลยและจังหวัดใกล้เคียง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สร้างองค์ความรู้ใหม่ทางอนุชีววิทยาเชิงลึกที่แสดงถึงความเกี่ยวข้องของระหว่างการควบคุมในระดับพันธุกรรม ระดับเหนือพันธุกรรมของการแสดงออกของยีนตัวขนส่งโดพามีน อันนำไปสู่ความเข้าใจในการเกิดโรค การทำนายความเสี่ยง การป้องกันและการรักษาโรคซึมเศร้า
2. สามารถนำองค์ความรู้ไปประยุกต์ใช้ป้องกันและวินิจฉัยความผิดปกติของยีนที่สามารถพบได้ในโรคซึมเศร้า
3. เป็นงานวิจัยพื้นฐานเพื่อใช้ในการต่อยอดการศึกษากลไกของระบบประสาทโดพามีนเออร์จิก ตัวขนส่งโดพามีนและความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวขนส่งโดพามีนได้

4. คาดว่าสามารถนำผลงานวิจัยนี้ไปเผยแพร่ในระดับวารสารนานาชาติได้อย่างน้อย 1 ครั้งและสามารถนำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์ในงานทางวิชาการระดับชาติอย่างน้อย 1 ครั้ง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โดพามีน (Dopamine, DA)

โดพามีนเป็นสารสื่อประสาท (Neurotransmitter) ซึ่งมีบทบาทหลากหลายในสัตว์ สามารถพบได้ทั้งในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง โดพามีนถูกสร้างมากในสมองโดยเฉพาะบริเวณ Substantia nigra และ Ventral tegmental area (VTA) และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทซิมพาเทติก (Sympathetic nervous system) สำหรับในระบบต่อมไร้ท่อแล้วโดพามีนทำหน้าที่เป็น Prolactin inhibition factor (PIF) คือเป็น Negative regulator ของการหลั่งฮอร์โมนโพรแลคติน (Prolactin) [6]

โดพามีนส่งเสริมการทำงานของระบบประสาทซิมพาเทติก โดยเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจและความดันโลหิต อย่างไรก็ตามโดพามีนไม่สามารถผ่าน Blood-brain barrier ไปได้ดังนั้นการสร้างโดพามีนภายนอกระบบประสาทจึงไม่สามารถทดแทนโดพามีนที่สร้างในระบบประสาทได้ เพราะฉะนั้นการให้โดพามีนเพื่อการรักษาบำบัดนั้นจำเป็นต้องให้โดพามีนในรูปแบบของสารตั้งต้นที่มีชื่อว่า L-DOPA (3,4-Dihydroxyphenylalanine) ซึ่งสามารถผ่าน Blood-brain barrier ได้ [6]

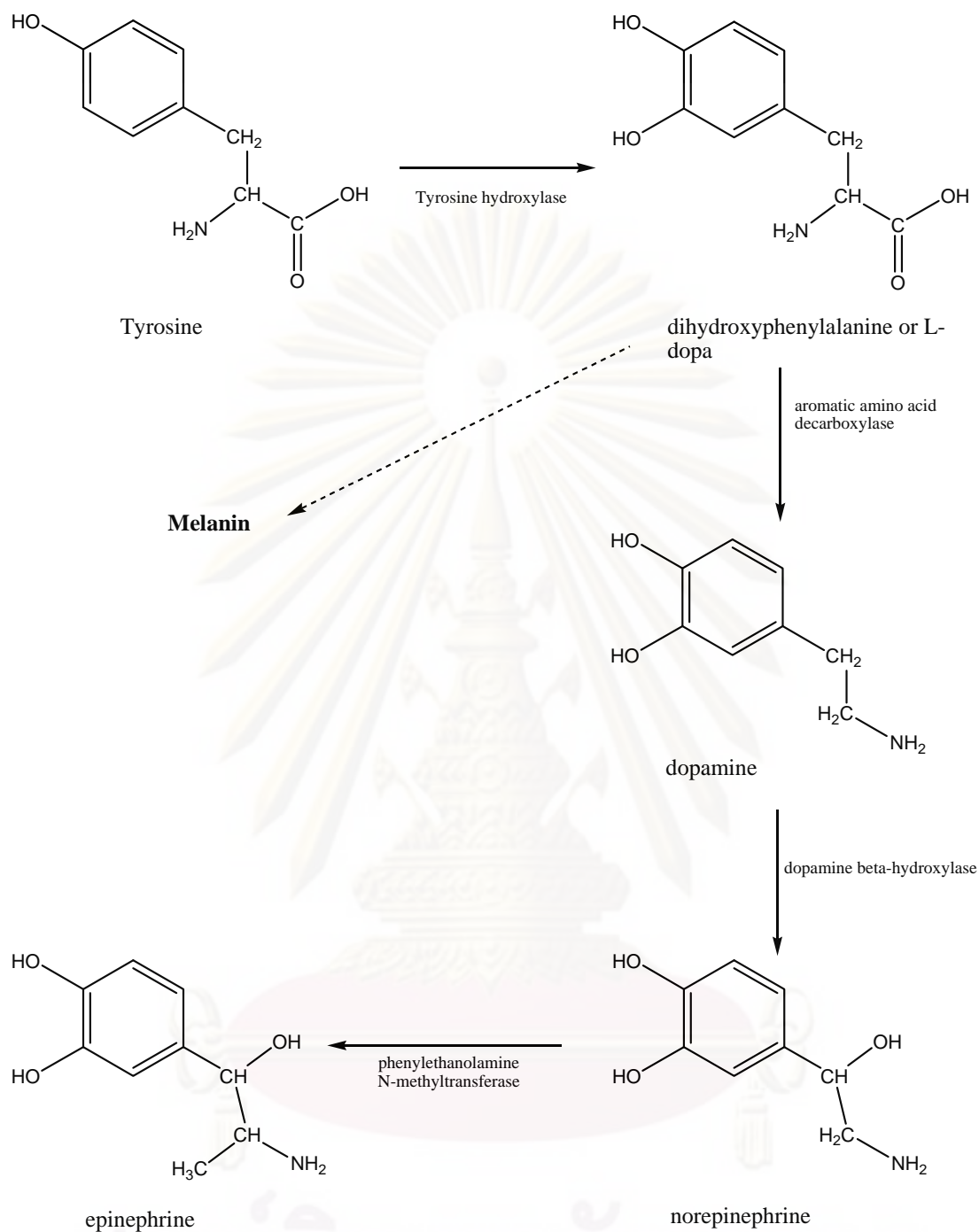
โดพามีนเป็นสารในกลุ่มแคทีโคลามีน (Catecholamine) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างนอร์อิพิเนฟริน (Norepinephrine) ในระบบประสาทนอร์อะดรีเนอร์จิก (Noradrenergic system) และระบบประสาทซิมพาเทติก (Sympathetic system) และสารอีพิเนฟริน (Epinephrine) ในระบบต่อมไร้ท่อ

ในร่างกายมนุษย์โดพามีนสร้างมากในเซลล์ของระบบประสาทส่วนกลาง ระบบประสาทซิมพาเทติกและ Chromaffin cell ของต่อมหมวกไตชั้นใน (Adrenal medulla) แต่บริเวณต่อมหมวกไตชั้นในมักจะเป็นตัวกลางในการสร้างฮอร์โมนอีพิเนฟรินและนอร์อิพิเนฟรินมากกว่า โดพามีนเริ่มต้นจากการเติมหมู่ Hydroxyl บนกรดอะมิโนไทโรซีน (Tyrosine) ด้วยเอนไซม์ Tryptophan hydroxylase ที่ด้าน *meta* ได้สาร DOPA แล้วจึงตามด้วยการนำหมู่ Carboxyl ออกด้วยเอนไซม์ Aromatic amino acid decarboxylase ได้สารโดพามีน ในระบบประสาทซิมพาเทติกหรือต่อมหมวกไตชั้นใน โดพามีนจะถูกเปลี่ยนต่อเป็นนอร์อิพิเนฟรินด้วยเอนไซม์ Dopamine- β -hydroxylase

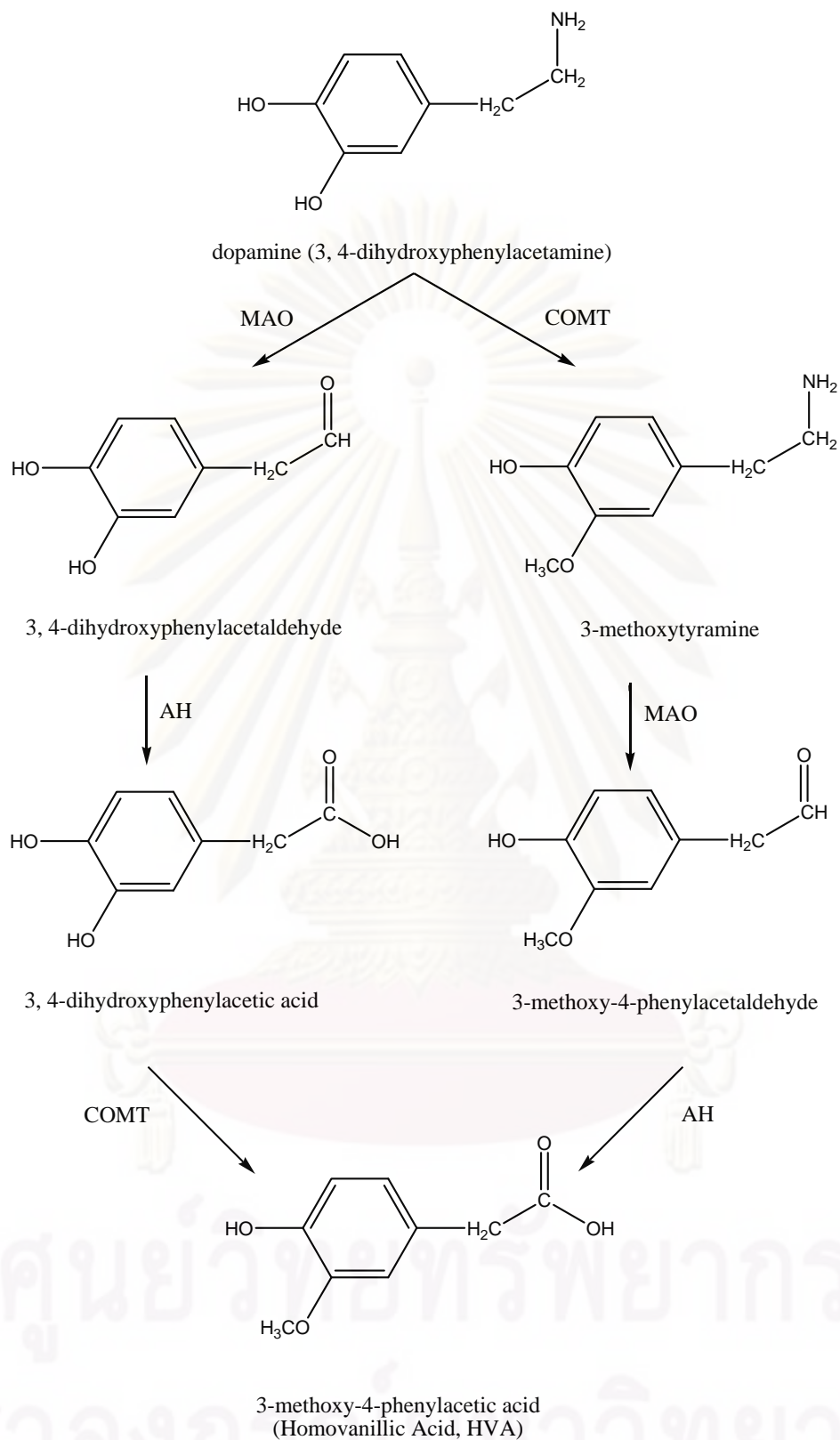
โดพามีนจะถูกกำจัดออกจากช่องไซแนปส์ (Synaptic cleft) โดยการดูดออก (Uptake) หรือดูดกลับ (Reuptake) ผ่านตัวขนส่งโดพามีน (Dopamine transporter) แล้วจึงถูกย่อยโดนเอนไซม์ Catechol-O-methyltransferase (COMT) และ Monoamine oxidase (MAO) แต่ก็จะมีโดพามีนบางส่วนนำบรรจุกลับเข้าเวสิเคิลแล้วนำไปใช้ต่อ

โดพามีนในสมองนั้นมีความเกี่ยวข้องกับพฤติกรรม (Behavior) ความทรงจำ (Cognition) การเคลื่อนไหวแบบไซมาติก (Voluntary movement) แรงบัลดาลใจ (Motivation) การสร้างแรงจูงใจต่อสิ่งไร้ (Rewarding) การหลับตื่น อารมณ์ ความสนใจและการเรียนรู้ โดยเซลล์ประสาทโดพามีนอร์จิกจะพบมากในบริเวณ VTA ของสมองส่วนกลาง (Midbrain) และ Substantia nigra รวมถึง Arcuate nucleus ของ Hypothalamus ด้วย [6]

จากที่ได้กล่าวไปข้างต้นแล้วว่าโดพามีนมีบทบาทหน้าที่หลายประการซึ่งหนึ่งในหน้าที่เหล่านั้นคือการเกี่ยวข้องกับความสามารถที่จะเห็นได้ว่าการสังเคราะห์โดพามีนในบริเวณ Substantia nigra ของสมองลดลงแล้วจะนำไปสู่อาการของโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) ซึ่งมีพยาธิสภาพเกี่ยวกับการควบคุมการเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อได้ นอกจากนี้ยังมีการยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างการลดลงของระดับโดพามีนใน Striatum กับโรคพาร์กินสันด้วย [17]

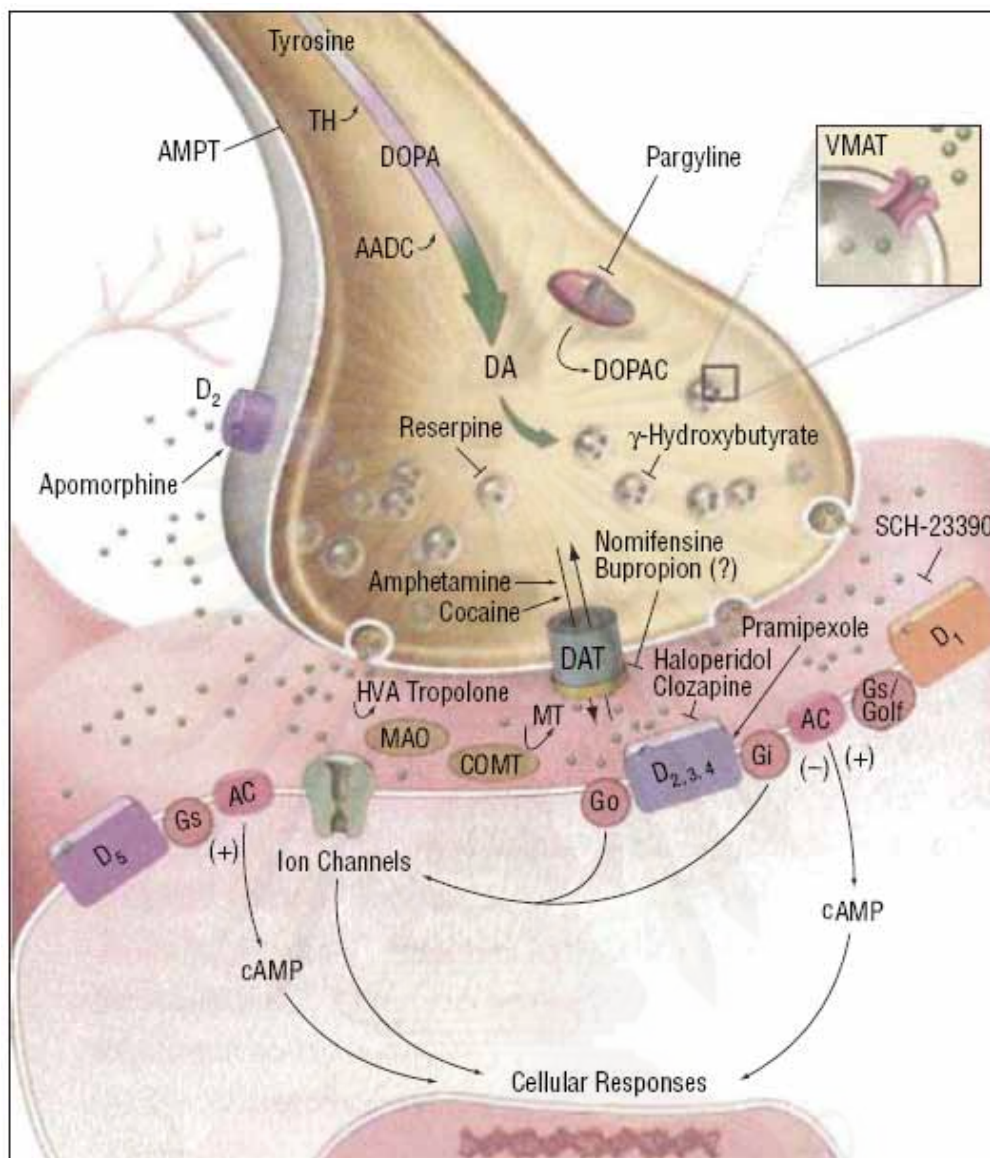


ภาพที่ 2.1 การสังเคราะห์โดพามีน (Dopamine biosynthesis) และสารที่เกี่ยวข้อง โดยกรดอะมิโนไทโรซีนอาจได้จากการสังเคราะห์ผ่านกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ด้วยการเติมหมู่ OH ที่ด้าน *para* ของวงแหวนเบนซีนก็ได้



ภาพที่ 2.2

การสลายตัวของโดพามีนผ่านเอนไซม์ COMT และ MAO



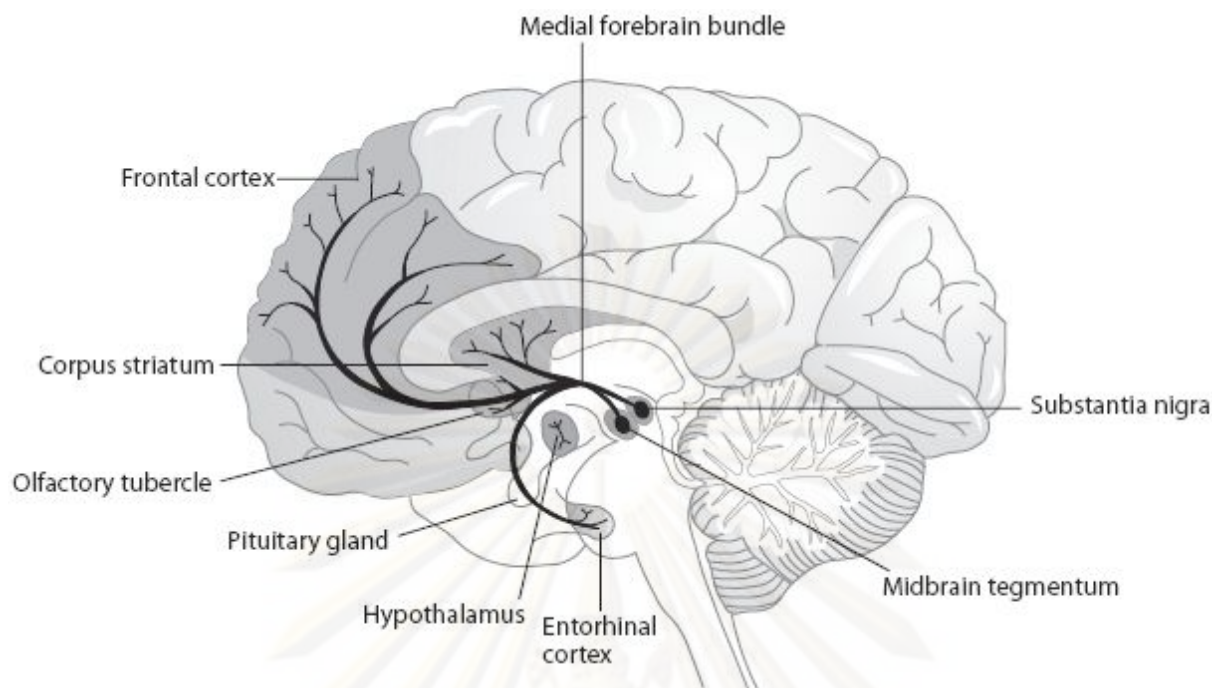
ภาพที่ 2.3 ภาพการแสดงบริเวณ Neuroneuronal หรือ Neuromuscular Junction สำหรับระบบประสาท Dopaminergic ซึ่งเมื่อโดพามีนใช้งานเสร็จแล้วจะมักถูกดูดเข้าเซลล์ไปใช้ใหม่หรืออาจถูกทำลาย รวมทั้งอาจถูกทำลายโดยเอนไซม์ใน Synaptic cleft ได้ด้วย

2.2 ระบบประสาทโดพามีนอร์จิก (Dopaminergic pathways)

จากการศึกษาโดยใช้ Histochemical technique พบว่าในสมองส่วน Midbrain มีเซลล์ประสาทในระบบ Dopaminergic ประมาณ 15,000-20,000 เซลล์ [7] โดยพบ Pathway หลักๆ 3 Pathway คือ

1. Nigrostriatal pathway โดยมีนิวเคลียสอยู่ที่ Substantia nigra ส่งปลายประสาทไปยัง Caudate putamen (Dorsal striatum) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคพาร์กินสัน ซึ่งพบว่าทั้ง D1 receptor (Excitatory receptor) และ D2 receptor (Inhibitory receptor) อยู่ใน Striatum ซึ่ง D2 พบได้ทั้ง Pre และ Postsynaptic แต่ D1 พบได้แค่ใน Postsynaptic โดยมีบทบาทสำคัญในการเกิด Motor plan ซึ่งการทำงานนี้มักจะรับข้อมูลมาจาก Motor cortex มาประมวลแล้วส่งกลับโดยมักผ่าน Thalamus นอกจากนี้บริเวณ Dorsal striatum ยังมีความเกี่ยวข้องกับการเสพติด (Addiction) อีกด้วย [7]
2. Pathway ที่เริ่มจาก VTA ไปยัง Limbic area (Accumbens, Ventral striatum และ Amygdala) เรียกว่า Mesolimbic ส่วนอีก Pathway ที่เริ่มจาก VTA เช่นกันแต่ไปสุดที่ Cortex จะเรียกว่า Mesocortical ซึ่งเรียกสองส่วนนี้รวมกันว่า Mesocorticolimbic pathway โดยมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับ Rewarding system ซึ่งในบริเวณนี้พบ D1 และ D2 receptor พอกัน แต่อาจมี D4 ร่วมด้วย [7]
3. Tuberoinfundibular pathway เริ่มจาก Arcuate และ Periventricular nuclei ของ Hypothalamus ไปยัง Intermediate lobe ของ Pituitary อันมีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบต่อมไร้ท่อ ดังที่ได้กล่าวไปในข้างต้นแล้ว ซึ่งตรงนี้จะถ่ายทอดคำสั่งไปยัง Anterior pituitary โดยผ่าน D2 ดังนั้นยารักษาโรคทางจิตเวชที่ออกฤทธิ์ผ่าน D2 อาจทำให้เกิดการหลั่งน้ำนม (Lactation) ได้ [7]

การปล่อยประสาทของโดพามีนจะอยู่ในสองรูปแบบคือ Phasic dopamine release เกิดจากการระดมปล่อยสัญญาณของเซลล์ใน VTA และเชื่อว่ารูปแบบนี้มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อสิ่งเร้าเช่น Rewarding โดยสัญญาณนี้จะกระตุ้น D2 อย่างมากและสิ้นสุดสัญญาณเมื่อ DAT คุดยออกไปจาก Synaptic cleft ในขณะที่การส่งสัญญาณอีกรูปแบบหนึ่งคือ Tonic dopamine release ซึ่งในรูปแบบนี้จะส่งสัญญาณช้าและไม่ค่อยเป็นรูปแบบปกติที่เกิดจาก VTA โดยมากมักจะทำหน้าที่ยับยั้ง Phasic dopamine release ในรูปแบบของ autoregulation และมักจะถูกทำลายโดย COMT ที่ Synaptic cleft เลยมากกว่าเพราะมีความเข้มข้นของโดพามีนในบริเวณนี้ต่ำ



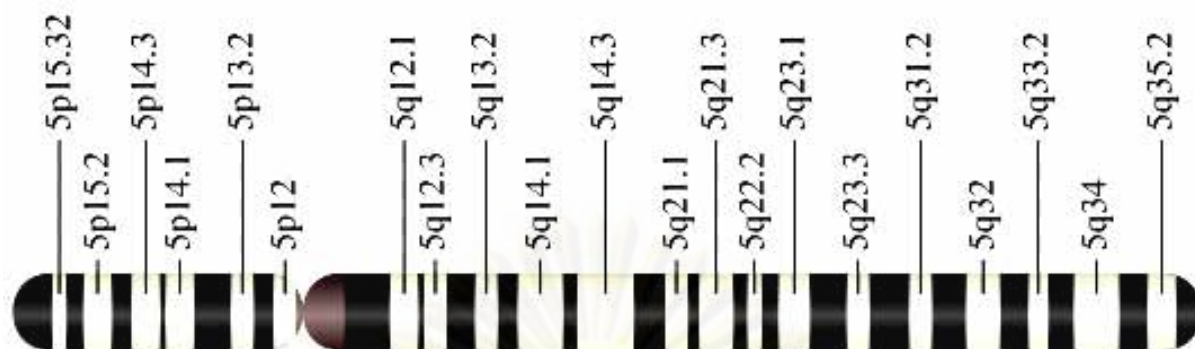
ภาพที่ 2.4 Dopaminergic pathway ในสมองของมนุษย์

(http://content.answers.com/main/content/img/oxford/Oxford_Mind/0198162246.parkinsons-disease.2.jpg)

2.3 ตัวขนส่งโดพามีนของมนุษย์ (Human dopamine transporter, hDAT)

ตัวขนส่งโดพามีนของมนุษย์สร้างมาจากรหัสพันธุกรรมบริเวณโลคัส SLC6A3 บนโครโมโซมคู่ที่ 5 ข้างสั้นตำแหน่ง 5p15.3 โดยมีอาณาบริเวณกว่า 64 กิโลเบต (54 กิโลเบตสำหรับยีนและ 10 กิโลเบตสำหรับ Promoter) โดยยีนนี้ประกอบด้วย 15 เอ็กซอน (Exon) และ 14 อินทรอน (Intron) โดยจะมีรหัสของกรดอะมิโนตั้งแต่ Exon 2 จนถึง Exon 14 ซึ่งมีความยาวของกรดอะมิโน 620 กรดอะมิโน โดยยีน hDAT นี้ไม่มีการเกิด Alternative splicing โดยบริเวณ Promoter ของยีนนี้มีอัตราส่วนของเบส G และ C เป็น 73.4% ต่อจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดซึ่งไม่พบ TATA box หรือ CAAT box บน Promoter ของยีนนี้ [10, 18]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2.5 แสดงโครโมโซมแท่งที่ 5 และโลคัสต่างๆ บนโครโมโซมจากการย้อมด้วย G band (ที่มา Mysid, based on <http://ghr.nlm.nih.gov/chromosome=5>)

ในปี 1999 Sacchetti ได้แสดงให้เห็นว่า cAMP มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน hDAT ผ่าน cAMP responsive element (CRE) sequence ซึ่งอยู่บริเวณตำแหน่ง -241, -1,226 และ -1,551 จากจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส (Transcription initiation) โดยจากการศึกษาของ Sacchetti [10] พบว่าบริเวณส่วนสำคัญของ Promoter (Core promoter) น่าจะอยู่ระหว่าง -798 ถึง +7 จากการทดสอบด้วย Reporter assay ในเซลล์เพาะเลี้ยง Y1 และ PC12 ซึ่งในช่วงถัดมาได้มีการทดสอบยืนยันอีกหลายครั้งและพบว่าบริเวณ Core promoter ควรอยู่บริเวณ -240 ถึง +7 มากกว่าจากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากมนุษย์คือ HeLa, SH-SY5Y [19] และ HEK293 [20]

2.4 ตัวอย่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน hDAT บริเวณต่างๆ

จากบริเวณ Promoter ของยีน hDAT นั้น Rubie และคณะ [21] ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณนี้ของยีน hDAT ทั้งหมด 5 ตำแหน่งโดยพบว่า 2 ตำแหน่งจาก 5 ตำแหน่งนี้เป็นความหลากหลายที่พบบ่อยมากในหมู่ประชากรคือ -71T/A (rs2975226) และ -844C/T (rs2652511) ซึ่งได้แสดงให้เห็นถึงผลต่อการจับได้ของ Transcription factor ชนิดต่างๆ เช่น -71T สามารถจับได้กับ SIF-binding element หรือ -844T สามารถจับได้กับ Leading binding protein-1 (LBP-1) ซึ่งทั้งสองชนิดนี้สามารถส่งเสริมการถอดรหัสได้ตามทฤษฎี [21] นอกจากนี้ [22] ได้พบว่า -844T สามารถจับได้กับ AP2.01 และ -71T สามารถจับได้กับ EGR3.01 อีกด้วย

นอกจากบริเวณ Promoter แล้วบนส่วนของยีนโดยเฉพาะบริเวณ Exon และ Intron ยังพบความหลากหลายทางพันธุกรรมอีกมากเช่น A/G บน Exon 9 (rs6347), C/T บน Intron 14 (rs40184), 63bp-

repeat VNTR บน Intron 3 หรือ 40bp-repeat VNTR บน 3'-UTR เป็นต้น ซึ่งที่กล่าวมาเป็นความหลากหลายที่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโน (Synonymous substitution) แต่ก็มีบางกรณีที่เป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโน (Non-synonymous substitution) คือ V55A, R237Q, V382A, A559V และ E602G [23] โดย V55A และ V382A เป็นการกลายพันธุ์ที่พบมากในคนที่เป็นโรค Tourette's syndrome โรคชุนสมาธิสั้น (ADHD) และโรคพิษสุราเรื้อรัง (Alcoholism) [24] ส่วน A559V และ E602G พบในคนที่เป็นโรคไบโพลาร์ (Bipolar) และไม่พบในคนสุขภาพดีเลย [25] นอกจากนี้แล้ว A559V ยังพบได้มากในเด็กที่เป็น ADHD อีกด้วย [26] จากการศึกษาโดยการทำ Mutation เพื่อโคลน cDNA เข้าไปในเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่มาจากระบบประสาทของมนุษย์ซึ่งไม่มีการแสดงออกของ Wild-type hDAT มารบกวนการทดสอบพบว่า V382A ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการขนส่งสับสเตอร์ของ hDAT ซึ่งส่งผลโดยการลดการแสดงออกบนผิวเซลล์ภายนอกและมีฤทธิ์ในการขนส่งลดลง [27]

ส่วนด้าน 3'-UTR นั้นที่มี VNTR แบบ 40bp-repeat นั้นพบว่าตัว 40bp-repeat VNTR เป็นส่วนสำคัญในการควบคุมการแสดงออกเช่นกันจากการทดสอบกับ Green fluorescence protein plasmid ที่ไม่มีและมี VNTR เดิมเข้าไปบริเวณด้าน 3'-UTR ของยีน [28]

โดยพบว่าความหลากหลายบริเวณ 3'-UTR นี้มีความสัมพันธ์กับการเป็นโรคทางจิตเวชที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทโดพามีนอย่างสำคัญเช่น ความหลากหลายชนิดหนึ่งทำให้คนไข้ไม่สามารถตอบสนองต่อ ยา Methylphenidate ที่ใช้ต้านอาการ ADHD ได้ เป็นต้น [28]

2.5 สรีรวิทยาของ hDAT

โดพามีนจะถูกขนส่ง/ขนส่งกลับเข้าเซลล์โดยการขนส่งควบคู่ไปกับโซเดียมไอออน 2 ไอออนและคลอไรด์ไอออน 1 ไอออน (1 DA: 2 Na⁺: 1 Cl⁻) โดยสาเหตุที่เป็นการขนส่งแบบมีศักย์ไฟฟ้า (Electrogenic transport) แต่อย่างไรก็ดีจากการศึกษาพบว่าโดพามีนอาจจะขนส่งด้านแนวการขนส่งนี้ได้ (แทนที่จะเข้าเซลล์กลับไหลผ่านตัวขนส่งออกไปยังช่องไซแนปส์) ภายใต้บางสภาวะ เช่น การได้รับสารกลุ่มแอมเฟตามีน โดยแอมเฟตามีนจะสามารถเข้าสู่เซลล์ผ่านตัวขนส่งได้ดีกว่าโดพามีนทำให้มีสับสเตอร์เข้าสู่เซลล์พร้อมกับ Na⁺ ปริมาณมาก การที่มี Na⁺ สูงในไซโทซอลส่งผลให้เกิดการกระตุ้นให้เวสิเคิลที่บรรจุโดพามีนแตกออกโดพามีนจึงแพร่ออกนอกเซลล์ตามแนวความเข้มข้นผ่านตัวขนส่งโดพามีน (Reverse transport) นอกจากการออกฤทธิ์โดยตรงต่อ hDAT ของแอมเฟตามีนแล้วยังมีการออกฤทธิ์โดยผ่าน Signal transduction

pathway เช่น PKC- β ซึ่งการเกิด Phosphorylation บน hDAT ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติ อันส่งผลต่อการขนส่งโดพามีนเข้าสู่เซลล์ได้ [9] อย่างไรก็ตามเมื่อมีแอมเฟตามีนมากพอจะพบว่า hDAT ขนส่งโดพามีนในทิศทางตรงข้ามดังที่ได้กล่าวแล้ว ซึ่งพบว่าเมื่อให้ PKC- β inhibitor ต่อหนูแรทแล้ว ผลกระทบของแอมเฟตามีนต่อตัวขนส่งโดพามีนของหนูลดลง ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด Phosphorylation กับ hDAT จะกล่าวในขั้นหลังต่อไป

โคเคน (Cocaine) เป็นสารเสพติดอีกประเภทที่ออกฤทธิ์โดยตรงต่อตัวขนส่งโดพามีนโดยการปิดช่องทางขนส่งทำให้ตัวขนส่งโดพามีนไม่สามารถ Reuptake/uptake โดพามีนกลับเข้าไปในเซลล์ได้ ก่อให้เกิดการสื่อประสาทที่นานกว่าปกติ แต่ภายหลังการเสพโคเคนเป็นเวลานานทำให้ Dopamine receptor ชินชากับการสื่อประสาทที่ผิดปกติ ดังนั้นหากหยุดการเสพโคเคนแล้วอาจทำให้เกิดอาการ ซึมเศร้าในภายหลังได้เพราะว่าการกระตุ้น Rewarding system ในสมองจะเกิดได้ยากขึ้น [29]

ตัวขนส่งโดพามีนถูกควบคุมการทำงานโดยการ Phosphorylation ผ่านเอนไซม์ Kinase ต่างๆ ได้แก่ MAPK (Mitogen-activated protein kinase) และ PKC (Protein kinase C)

ซึ่งจากการศึกษา MAPK กับ hDAT บนเซลล์ HEK293 พบว่าหากมีการยับยั้งการทำงานของ MAPK ผ่านการยับยั้งการทำงานของ MEK จะทำให้ hDAT ถูกขนส่งกลับเข้าไซโทซอลมากขึ้นโดยผ่าน Clathrin-associated redistribution แต่หากเป็นการยับยั้ง MAPK โดยใช้ Inhibitor เช่น Butadiene จะลดการขนส่งโดพามีนโดยจะลดค่า V_{max} [30]

สำหรับการศึกษา PKC เมื่อมีการให้ Staurosporine (Protein kinase inhibitor) จะทำให้มีการ Uptake โดพามีนกัมมันตรังสีมากขึ้น และเมื่อให้ PKC activator (PMA) จะทำให้การ Uptake โดพามีนกัมมันตรังสีลดลง (เพิ่มและลด V_{max}) [31]

2.6 Rewarding system

เป็นระบบในสมองที่ทำหน้าที่ควบคุมและสร้างพฤติกรรมโดยสร้างความสุขให้เกิดขึ้น โดยมีความเกี่ยวข้องกับแรงจูงใจ (Reinforcement) คือเป็นระบบที่ทำให้มีความต้องการสิ่งเร้านั้นมากขึ้นเมื่อมีการกระตุ้นเรื่อยๆ โดย Primary reward ของสิ่งมีชีวิตก็คือสิ่งที่จำเป็นต่อการอยู่รอดของเผ่าพันธุ์เช่นอาหาร น้ำ และเพศสัมพันธ์ โดยบางคนอาจรวมที่อยู่อาศัยเข้ามาในส่วนนี้ด้วย Secondary reward สิ่งที่มีค่ารองจาก Primary reward เช่นเงิน สัมผัสสวาท ความสวยงามหรือดนตรี เป็นต้น

Rewarding มีผลต่อพฤติกรรมโดยรวมของสิ่งมีชีวิตในทางตรงและส่งผลทางอ้อมต่อความรู้สึกจิตใจของสิ่งมีชีวิต ตัวอย่างเช่นการให้โดยปราศจากความเห็นแก่ตัวทำให้เกิด Rewarding ที่รุนแรง นอกจากนี้พบว่าการศึกษาการฝึกฝนพฤติกรรมด้วยการทำให้เกิด Rewarding จะทำให้การฝึกฝนนั้นฝังลึกและได้ผลมากกว่าการฝึกฝนด้วยการทำโทษ (Punishment)

ระบบประสาทที่สำคัญเกี่ยวกับ Rewarding คือ Mesolimbic และ Mesocortical pathway ซึ่งโดยเฉพาะอย่างยิ่ง Mesolimbic pathway จะส่งสัญญาณประสาทโดพามีนจาก Ventral tegmental area ผ่าน Medial forebrain bundle ไปยัง Nucleus accumbens ซึ่งมีบทบาทในด้าน Rewarding เสียงหัวเราะ ความสุข การเสพติด ความกลัวและอุปาทาน (Placebo effect) [32] โดยจากการศึกษาพบว่าหากฝังอิเล็กโทรดไว้ที่สมองส่วน Nucleus accumbens ของหนูแรทที่เลี้ยงด้วยอาหารและเครื่องดื่มอย่างดีแล้วกระตุ้นด้วยไฟฟ้าเรื่อยๆ พบว่าหนูไม่ต้องการอาหารหรือเครื่องดื่มเหล่านั้นอีกต่อไปถึงแม้ว่าตัวของหนูนั่นจะใกล้ตายด้วยภาวะอดอาหาร [33]

2.7 โรคซึมเศร้า (Major depressive disorder, MDD)

อาการของโรคซึมเศร้า

โรคซึมเศร้าเป็นสภาวะการป่วยทางจิตเวช (Psychiatric disorder) ซึ่งมีผลอย่างมากต่อครอบครัว การงาน การศึกษาและพฤติกรรมกิจวัตรประจำวันของผู้ป่วยและคนรอบข้าง โรคซึมเศร้านั้นมักจะพบควบคู่ไปกับการป่วยทางกายเรื้อรังเช่นโรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคอัมพาต เป็นต้น

ผู้ป่วยที่มีอาการซึมเศร้านั้นมักจะมีอารมณ์ไม่ปกติในการดำรงชีวิต (Poor mood) และขาดความสามารถในการมีความสุขในกิจกรรมที่ควรที่จะเกิดความสุขและสนุกสนาน (Loss of cheerful) โดยคนที่มีความซึมเศร้านั้นมักจะรู้สึกไร้ค่า (Worthlessness) ไม่เหมาะสมที่จะมีชีวิตอยู่ รู้สึกผิดอย่างมาก อยู่อย่างไร้ความหวัง รวมทั้งการถอยหนีจากกิจกรรมและบทบาททางสังคม มีสมาธิและความทรงจำต่ำ (Low attention and cognition) หมดสมรรถภาพทางเพศและอาจถึงกับฆ่าตัวตายในที่สุด

อาการนอนไม่หลับ (Insomnia) ถูกพบได้บ่อยในคนไข้กลุ่มนี้โดยคนไข้มักจะตื่นเร็วและไม่สามารถเข้านอนได้ อย่างไรก็ตามก็อาจมีอาการนอนมากเกินไป (Hypersomnia) ก็สามารถพบได้แต่น้อยกว่ามาก ความอยากอาหารส่วนมากมักจะลดลง (Anorexia แต่ไม่ใช่แบบ Anorexia nervosa) ส่งผลให้เกิดน้ำหนักตัว

ลดลงแต่ก็อาจจะพบการบริโภคมากขึ้นพร้อมน้ำหนักตัวเพิ่มได้ จากอาการทางจิตดังกล่าวนำไปสู่อาการทางกายเช่นไม่สบายตัว (Fatigue) ปวดศีรษะ (Headache) และปัญหาในระบบทางเดินอาหาร

ผู้ป่วยโรคซึมเศร้าที่สูงอายุมักจะมีปัญหาเกี่ยวกับความทรงจำร่วมด้วยเช่นอาการหลงลืม หรือตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นช้าลง อาการซึมเศร้าอาจจะเกิดร่วมกับอาการที่มากับอายุที่สูงขึ้นเช่นโรคหลอดเลือดหัวใจ โรคพาร์กินสัน โรค COPD (Chronic obstructive pulmonary disease) โดยในรายที่รุนแรง อาจจะมีอาการทางจิตอย่างอื่นร่วมด้วยเช่นหลงลืมเลอะเลือน (Delusion) และประสาทหลอน (Hallucination)

การวินิจฉัยโรคซึมเศร้า

การวินิจฉัยโรคซึมเศร้าจำเป็นต้องแยกอาการซึมเศร้าโดยเกิดจากโรคซึมเศร้าออกจากโรคอื่นๆ ก่อนโดยการตรวจเลือดเช่นการตรวจหา TSH และ T4 เพื่อคัดแยกผู้ป่วยที่ป่วยเพราะ Hypothyroidism การตรวจอิเล็กโทรไลต์ทั่วไปและแคลเซียมในพลาสมาเพื่อแยกโรคทางเมแทบอลิก รวมถึงการตรวจ ESR (Erythrocyte sedimentation rate) และ CBC (Complete blood count) เพื่อแยกการติดเชื้อและโรคเรื้อรังออกไป (Depressive of chronic disease) [34] รวมถึงการแยกอาการซึมเศร้าที่เกิดจากการดื่มเหล้าด้วยการตรวจแอลกอฮอล์หรือภาวะ Hypogonadism ในผู้ชายด้วยการตรวจ Testosterone [35]

เงื่อนไขการวินิจฉัยโรคซึมเศร้าที่เป็นที่ยอมรับกันกว้างขวางคือ American Psychiatric Association's revised 4th edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) และ WHO's International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10) โดย ICD-10 นิยมใช้ในประเทศกลุ่มสหภาพยุโรป [36]

โดยจากการวินิจฉัยตาม DSM-IV โรคซึมเศร้าจัดเป็นภาวะผิดปกติทางอารมณ์ (Mood disorder) [37] ซึ่ง Major depressive episode ตามการจำแนกของ DSM-IV จะมีอารมณ์ซึมเศร้าอย่างรุนแรงเป็นเวลานานอย่างน้อยสองสัปดาห์ [37] โดยสามารถแบ่งย่อยได้เป็น Mild (มีอาการน้อยแต่เข้าเงื่อนไขการวินิจฉัยทุกประการ), Moderate และ Severe (อาการป่วยส่งผลกระทบต่อสถานะทางสังคมและหน้าที่การงาน) โดยหากมีอาการทางจิตอื่นร่วมด้วยจะเรียกว่า Psychotic depression ซึ่งจะจัดอยู่ในกลุ่มของ Severe และหากผู้ป่วยมีอาการ Mania ร่วมด้วยจะได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค Bipolar disorder [37] บางครั้งโรคซึมเศร้า

ล้วนๆก็เรียกว่า Unipolar disorder โดยเลียนแบบการเรียก Bipolar disorder ที่มีอาการซึมเศร้าและ Mania ร่วม [38]

ระบาดวิทยาของโรคซึมเศร้า

โรคซึมเศร้าเป็นหนึ่งในโรคที่ทำให้เกิดการป่วย (Morbidity) มากเป็นอันดับต้นๆของโลก โดยอุบัติการณ์มีได้ตั้งแต่ 3% ในญี่ปุ่นถึง 17% ในสหรัฐอเมริกา โดยปกติแล้วคือ 8-12% ของประชากรของประเทศเป็นส่วนใหญ่ [1, 2] ซึ่งในทวีปอเมริกาเหนือพบว่า 3-5% ของประชากรเพศชายและ 8-10% ของประชากรหญิงเป็นโรคซึมเศร้า [3, 4] แสดงให้เห็นว่าอุบัติการณ์ในเพศหญิงมีประมาณสองเท่าของเพศชาย [39] โดยสัดส่วนของผู้ป่วยมักเพิ่มขึ้นในช่วงอายุเข้าสู่วัยรุ่นหรือ 15-18 ปี โดยมีความสัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อมทางสังคมมากกว่าผลของฮอร์โมน [39]

ผู้ป่วยมักจะเข้าสู่ระยะเริ่มแรกของโรคซึมเศร้าในช่วงอายุ 30-40 ปี รวมถึงในช่วงอายุ 50-60 ปีได้บ้าง [40] โดยอุบัติการณ์ของโรคซึมเศร้าจะสูงขึ้นในกลุ่มประชากรที่มีโรคทางระบบประสาทบางโรคเช่น Stroke, Parkinson's disease และ Multiple sclerosis รวมทั้งแม่ที่เพิ่งคลอดลูกในช่วงปีแรก [41] นอกจากนี้แล้วโรคซึมเศร่ายังมีความสัมพันธ์กับการว่างงานและการเกษียณอายุ [42] โดยโรคซึมเศร้าเป็นสาเหตุสำคัญสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิด Disease burden (ผลของโรคที่ทำให้เกิดความสูญเสียสุขภาพโดยวัดเป็นตัวเลขคือ DALY (Disability-adjusted life years)) ในทวีปอเมริกาเหนือและประเทศที่มีรายได้ ประชาชาติสูงเป็นอันดับหนึ่งและเมื่อเทียบทั่วโลกแล้วเป็นอันดับสี่ โดยในปี 2030 ได้มีการพยากรณ์ไว้ว่าโรคซึมเศร้าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด Burden disease เป็นอันดับสองรองจากการติดเชื้อ HIV จากรายงานขององค์การอนามัยโลก [5] โดยการที่ตรวจพบล่าช้าหรือขาดบุคลากรที่เหมาะสมในการดูแลผู้ป่วยมักจะ ทำให้อาการแย่ลง [43]

ในปี 2004 องค์การอนามัยโลกได้รายงานใน The global burden of disease เกี่ยวกับ Years Lost due to Disability (YLD) ว่าโรคทางจิตเวชได้เป็นหนึ่งในสามสาเหตุหลักที่ทำให้สมรรถภาพและรายได้ของคนที่มีอายุมากกว่า 15 ปีขึ้นไปลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคซึมเศร้าเป็นสาเหตุอันดับหนึ่งในกลุ่มโรคทางจิตเวชทั้งเพศชายและหญิงในประเทศทุกกลุ่ม [5]

โรคซึมเศร้ามักจะไม่ได้คุกคามผู้ป่วยเพียงโรคเดียวโดดๆ แต่มักจะมาพร้อมกับโรคทางจิตเวชอื่นๆ โดยในปี 1990-92 สหรัฐอเมริกาได้รายงานไว้ว่า 51% ของผู้ป่วยโรคซึมเศร้ามักจะมีอาการวิตกกังวล

(Anxiety) ร่วมด้วย [44] โดยอาการวิตกกังวลสามารถเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดอาการซึมเศร้าได้ รวมทั้งอาจทำให้อาการซึมเศร้าแย่ลงมากขึ้น อาจส่งเสริมให้เกิดการกลับมาเป็นใหม่ได้มากขึ้น รวมถึงสามารถกระตุ้นให้มีการฆ่าตัวตายมากขึ้นด้วย [45] คนที่เป็นโรคซึมเศร้ามีแนวโน้มที่จะติดแอลกอฮอล์และยาเสพติดมากขึ้น [46] และทุกสามคนของผู้ป่วยโรคสมาธิสั้น (ADHD) จะมีอาการซึมเศร้าร่วมด้วย [47] รวมทั้งโรค Post-traumatic stress disorder (PTSD) ที่มักเกิดร่วมกับโรคซึมเศร้าด้วย

2.8 การเปลี่ยนแปลงของสมองและโรคซึมเศร้า

Depressive episode มักจะเป็นอาการทางจิตที่แสดงออกของโรคซึมเศร้าและเมื่อหายแล้วก็จะมีภาวะอารมณ์ปกติ (Euthymic mood) อย่างไรก็ตามก็ไม่ได้เป็นการแสดงว่าโครงสร้างทางสมองไม่ได้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปแล้ว ดังนั้นหากไม่ได้รับการบำบัดที่ถูกต้องผู้ป่วยอาจเผชิญกับภาวะซึมเศร้าเรื้อรังได้

สิ่งที่ช่วยได้มากคือการถ่ายภาพทางสมอง (Neuroimaging) ของคนไข้ที่มีการกลับมาเป็นใหม่ของโรคซึมเศร้านั้นพบการมีขนาดเล็กลงของสมองส่วน Hippocampus ซึ่งหากไม่มีการรักษาหรือรักษาแต่ไม่ตอบสนองต่อการรักษามักจะนำไปสู่การลดขนาดลงเรื่อยๆของสมองส่วนนี้ซึ่งทำให้คนที่มีอาการซึมเศร้าเรื้อรังมักมีปัญหาด้านความทรงจำเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย [48-50] โดยอาจมีการลดลงของขนาดในระบบลิมบิก (Limbic system) ร่วมด้วยทำให้คนเหล่านี้มักจะมีอาการตอบสนองที่มากเกินไป (Overreact) ต่อภัยอันตราย [51]

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสมองในผู้ป่วยโรคซึมเศร้านั้นส่วนหนึ่งเกิดจากความผิดปกติของ Hypothalamic-pituitary-axis โดยการมีภาวะ Hypercortisolemia เป็นเวลานานจะส่งผลให้เกิดการลดการทำงานของ Glucocorticoid receptor ใน Hippocampus ลง ซึ่งส่งผลให้เกิดการลดขนาดของ Hippocampus (Atrophy) อันเกิดจากการลดลงของการแสดงออกของ Brain-derived Neurotrophic factor (BDNF) [52, 53] นอกจากนี้คอร์ติซอลยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใน Amygdala รวมถึงบริเวณอื่นๆ เช่น Prefrontal cortex อีกด้วย

การเจริญ (Growth) และการอยู่รอด (Survival) ของเซลล์สมองนั้นอาศัยกลไกของกลูตาเมต (Glutamate) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทในสมองตัวหนึ่ง โดยการกระตุ้น Receptor ในสมองหลายชนิดเกิดโดยการสื่อประสาทผ่านกลูตาเมต [54] ซึ่งภาวะความเครียดฉับพลัน (Acute stress) มักทำให้เกิดการเพิ่มสัญญาณกลูตาเมตใน Hippocampus และ Amygdala ซึ่งจะมีผลให้เกิดการเพิ่มของระดับ BDNF

และก่อให้เกิด Neuroplasticity ซึ่งเมื่อหายเครียดหรือไม่มีตัวกระตุ้นให้เกิดความเครียดแล้วเซลล์เหล่านี้จะกลับสู่สภาวะพักได้ แต่หากเกิดภาวะที่มีความเครียดแบบเรื้อรัง (Chronic stress) ติดต่อกันนานระดับของกลูตาเมตที่สูงมากในช่องไซแนปส์จะก่อให้เกิดการกระตุ้น N-methyl-D-aspartic acid type glutamate receptor ซึ่งก่อให้เกิดการเพิ่มระดับของ Ca^{2+} จนเกิดการลดระดับของ BDNF ลงทำให้เกิดเซลล์ประสาทตายและเกิดสมองฝ่อ (Death and atrophy) [54] โดยการ Degeneration ของ Glial cell จากกระบวนการเหล่านี้จะเร่งให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทมากขึ้นเนื่องจาก Glial cell จะกำจัดพิษของกลูตาเมตออกจากบริเวณช่องไซแนปส์ ซึ่งส่งผลให้เกิดการทำงานบริเวณ Cortex ลดลง [54, 55]

2.9 โดพามีนและโรคซึมเศร้า

อาการ Anhedonia เป็นอาการหลักในสองอาการที่จำเป็นต่อการจำแนกผู้ป่วยโรคซึมเศร้า ซึ่งจากที่ได้กล่าวไปในข้างต้นแล้วว่าโดพามีนมีบทบาทสำคัญในการสร้างความสุข เกิด Rewarding และ Pleasure ซึ่งเป็นสิ่งเกิดได้ยากในคนป่วยเป็นโรคซึมเศร้า [56] โดยจากการศึกษาพบว่าความรุนแรงของโรคซึมเศร้ามีความสัมพันธ์อย่างมากกับประสบการณ์ Rewarding ภายหลังจากให้ Amphetamine (ซึ่งดังที่ไปกล่าวไปแล้วคือ Amphetamine และ Cocaine มีฤทธิ์เพิ่ม Activity ของ Dopaminergic neuron) ซึ่งยังพบอีกว่าในรายที่ซึมเศร้านรุนแรงแต่ไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสมมีการตอบสนองต่อ Amphetamine ที่รุนแรงกว่าผู้ที่ผ่านการรักษาที่เหมาะสม แต่อย่างไรก็ดีในรายที่ผ่านการรักษาที่เหมาะสมกับกลุ่มควบคุมไม่พบความแตกต่างกันในการตอบสนองต่อ Amphetamine

ทำให้เกิดข้อสรุปจากการศึกษาดังกล่าวได้ว่าในรายที่มีอาการซึมเศร้านรุนแรงมักมีการลดลงของการหลั่งโดพามีนในระบบประสาทโดพามีนเนอร์จิก ซึ่งมีการแสดงให้เห็นแล้วว่าการเพิ่มการทำงานของ D receptor ที่ทำหน้าที่ในเชิง Positive และการลดระดับของตัวขนส่งโดพามีนใน Synaptic cleft น่าจะช่วยให้อาการดีขึ้นได้

จากการศึกษาด้วยวิธี MRI ในกลุ่มคนไข้โรคซึมเศร้าที่ไม่ผ่านการบำบัดด้วยยาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าภายหลังที่ให้สารกระตุ้นประสาทแล้วในกลุ่มคนไข้มีการตอบสนองเกิด Rewarding ที่รุนแรงอาจเกิดจากการที่สารกลูโคคอร์ติคอยด์ในสมองส่งเสริมการส่งสัญญาณประสาทที่ Nucleus accumbens ในขณะที่ในกลุ่มควบคุมการเพิ่มขึ้นของระดับคอร์ติซอลก็มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ

ระดับการส่งสัญญาณประสาท Dopaminergic ใน Ventral striatum และ Dorsal putamen เช่นเดียวกัน [8]

นอกจากนี้ในรายที่มีระดับคอร์ติซอลในพลาสมาสูงขึ้นจะมีผลตอบสนองต่อสารกระตุ้นประสาทที่แรงขึ้นเมื่อเทียบกับคนที่มีระดับคอร์ติซอลปกติ [11]

การพบภาวะ Hypercortisolemia ในผู้ป่วยโรคซึมเศร้าเป็นจำนวนมากเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคโดยมีการเปลี่ยนแปลงในระบบประสาท Dopaminergic โดยเฉพาะ Rewarding system ซึ่งส่งผลให้มีการตอบสนองต่อความสุขน้อยลง [11]

เมื่อให้ยา Dexamethasone ไปในหนูแรทตัวเต็มวัยผ่านทางช่องท้อง (IP injection) พบว่าเซลล์ประสาทหนูในบริเวณนั้นเกิดการทำลายของไมโครทิวบูล (Microtubule) และเกิดการ Apoptosis ของเซลล์ประสาทขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus และ Striatum แต่เมื่อเปลี่ยนเป็นการให้กับหนูแรทที่เกิดใหม่พบว่าไม่ทำให้เกิด Apoptosis ของเซลล์ประสาทขึ้นแต่เกิดเพียงการสร้างแควิวโอลในบริเวณเดนไดรท์ (Dendrite) เท่านั้น [57]

มีหลายการศึกษาที่ได้กล่าวถึงกลูโคคอร์ติคอยด์สามารถกระตุ้น Mesolimbic pathway ได้ โดยการทดลองนี้ยา Dexamethasone ได้ถูกผสมไปในน้ำที่ให้แม่หนูดื่มทั้งก่อนคลอดและหลังคลอดโดยเทียบกับแม่หนูที่ให้น้ำปกติพบว่าในสมองของหนูครอกที่เกิดจากแม่ที่ให้ยาก่อนคลอดมีปริมาณเซลล์ประสาทที่มี Tyrosine hydroxylase positive เพิ่มขึ้น 40-50% เมื่อเทียบกับครอกที่ไม่ได้ยาเหมือนกันทั้งเพศผู้และเมีย แต่ในครอกที่ได้รับยาหลังคลอดนี้หนูเพศเมียจะมีการตอบสนองต่อ Dexamethasone ต่ำกว่าเพศผู้คือปริมาณ Tyrosine hydroxylase positive neuron จะมีมากกว่าครอกที่ไม่ได้รับยาเพียง 30% เท่านั้น ในขณะที่เพศผู้ยังคงมีการตอบสนองแบบเดียวกับครอกที่ได้รับยาก่อนคลอด [58]

จากการศึกษาหลังความตายของผู้ป่วยโรคซึมเศร้ามีผลหลากหลายเนื่องจากมีความแตกต่างทั้งอายุ เพศและพฤติกรรมซึ่งในกรณีนี้รวมถึงการตายเนื่องจากฆ่าตัวตายด้วย จากการศึกษาพบว่าระดับของโดพามีนในสมองของศพที่ฆ่าตัวตายไม่มีความแตกต่างจากศพปกติรวมทั้งมีระดับ HVA ที่ค่อนข้างปกติในศพกลุ่มนี้ทั้งใน Frontal cortex และ Basal ganglia ในขณะที่ในน้ำไขสันหลังนั้นพบ HVA ในระดับต่ำเมื่อเทียบในศพผู้ป่วยที่เคยพยายามฆ่าตัวตายเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างศพผู้ป่วยด้วยกันเองไม่ว่าอาการจะรุนแรงแตกต่างเพียงใด ส่วนระดับ Dihydrophenylacetic acid ใน

จากการศึกษาในหนูไมซ์ (*Mus musculus*) ที่ทำการ Knock-out ยีนตัวขนส่งโดพามีนของมัน ออกไปทั้งแบบ Homozygous knock-out และ Heterozygous knock-out แล้วทดสอบด้วยการทำ Forced swimming test (FST), sucrose consumption test และ tail suspension test (TST) เปรียบเทียบกับหนูที่เป็น Wild-type พบว่าหนูที่มีการ Knock-out ยีนตัวขนส่งโดพามีนมีพฤติกรรมสอดคล้องกับหนูที่ได้รับยาต้านซีมีเศร้า [13] ซึ่งจากการทำ FST พบว่าพฤติกรรมการพุงตัวเองในน้ำ (Immobility) และการว่ายน้ำ (Swimming) ที่พบในหนูปกติกลับไม่พบในหนูกลุ่มที่ถูก Knock-out ทั้งแบบ Homozygous และ Heterozygous แต่พฤติกรรมในการทดสอบ FST ทั้งหมดให้ไปกับการปีนเพื่อที่จะออกจากแก้วน้ำ (Climbing) มีรายงานว่าพฤติกรรมของหนูที่ Knock-out ยีนตัวขนส่งโดพามีนนั้นใกล้เคียงกับหนูที่ได้รับสารแอมเฟตามีน ผลของ Sucrose consumption test แสดงให้เห็นว่าหนูไม่มีอาการของ Anhedonia แต่อย่างไรก็ตามหนูมีการบริโภคซูโครสที่สูงมากเมื่อเทียบกับหนูปกติ [13]

จากการทดลองอื่นโดยการทำ FST พบว่าการให้ Dopamine agonist นั้นจะมีฤทธิ์ในการทำงาน เดียวกับการให้ยาต้านโรคซีมีเศร้า [63] และเสริมฤทธิ์ในการทำงานของ Serotonin selective reuptake inhibitors [64]

ในคนที่มีการให้ DAT blocker เช่น Bupropion มีอาการซีมีเศร้าดีขึ้นโดยการให้ Bupropion มีฤทธิ์เหมือนการให้ยาต้านโรคซีมีเศร้า [65]

2.10 ระบบลิมบิก (Limbic system)

ระบบประสาทลิมบิกเป็นส่วนหนึ่งของสมองที่ประกอบด้วย Hippocampus, amygdala, anterior thalamic nuclei และ limbic cortex ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเกิดอารมณ์ พฤติกรรม ความทรงจำระยะยาวและการดมกลิ่น [66] โดยระบบนี้ตั้งอยู่ในขอบชั้นในของ Cerebral cortex โดยระบบลิมบิกประกอบด้วยส่วนสำคัญของสมอง [66] เช่น Amygdala (เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสิ่งเร้าเพื่อสร้างแรงจูงใจหรือความกลัว รวมทั้งเกี่ยวข้องกับการจับคู่ด้วย) Hippocampus (เป็นบทบาทสำคัญในการเก็บความทรงจำระยะสั้นเพื่อสร้างความทรงจำระยะยาวในรูปแบบของ Cognitive map) Cingulate gyrus (ควบคุมระบบประสาทอัตโนมัติเช่นอัตราการเต้นของหัวใจ ความดันโลหิตและความใส่ใจ) และ Hypothalamus (ในการควบคุมระบบประสาทอัตโนมัติผ่านการสร้างฮอร์โมนเช่นอัตราการเต้นของหัวใจ ความหิวกระหาย ความกระสั่นและวงจรการหลับตื่น) [66]

2.11 Nucleus accumbens

สมองส่วนนี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างแรงจูงใจ การสร้างเสียงหัวเราะ การสร้างความสุข การเสพติด ความกลัวและอุปาทาน (Placebo effect) [32] [67] โดยแต่ละครึ่งของสมองจะมีส่วนของ Nucleus accumbens ซึ่งตั้งอยู่บริเวณหัวของ Caudate nucleus และด้านหน้าของ Putamen และพียงอยู่กับ Septum pellucidum ซึ่ง Nucleus accumbens เป็นส่วนหนึ่งของ Basal ganglia [32] โดยเซลล์ประสาทในส่วน Nucleus accumbens ส่วนใหญ่เป็นกาบาเนอร์จิก (GABAergic neuron)

สัญญาณประสาทที่เข้าสู่ Nucleus accumbens ส่วนมากจะมาจากส่วนของ Amygdala และ VTA ซึ่งทำให้เป็นการเชื่อมกับ Mesolimbic pathway มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการเสพติดสารพวกโคเคน และแอมเฟตามีน ซึ่งสารดังกล่าวจะเพิ่มระดับของโดพามีนใน Nucleus accumbens [67]

2.12 Glutamatergic neuron

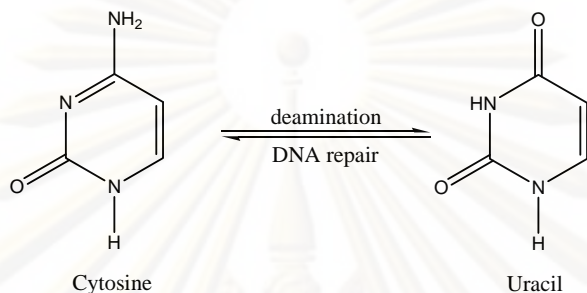
ระบบประสาทที่ใช้กลูตาเมตเป็นสารสื่อประสาทหลักมีบทบาทสำคัญในการสร้างรูปแบบความทรงจำและแปลผลข้อมูล (Information processing) ซึ่งกลูตาเมตเป็นสารสื่อประสาทที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นต่างๆในระบบประสาทส่วนกลาง กลูตาเมตจะออกฤทธิ์ผ่าน Receptor สามชนิดคือ AMPA, Kainate และ NMDA receptor ซึ่งระบบประสาทที่ใช้กลูตาเมตเป็นสารสื่อประสาทนี้จะมีบทบาทสำคัญในโรคสมาธิสั้น (ADHD) โรคซึมเศร้า (Depression) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) และโรคย้ำคิดย้ำทำ (Obsessive-compulsive disorder) [68]

2.13 การเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ (DNA methylation)

นิวคลีโอไทด์ที่ถูกเติมหมู่เมทิลมากที่สุดในจีโนมของมนุษย์คือไซโทซีน (Cytosine, C) ที่มีอยู่ร่วมกับกวานีน (Guanine) ในลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น CpG dinucleotide ซึ่งไซโทซีนจะถูกเติมหมู่เมทิลบริเวณตำแหน่งที่ห้าของคาร์บอนบนวงแหวนไพริมิดีนโดยเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) ซึ่งใช้ตัวให้หมู่เมทิลคือ S-adenosyl-L-methionine (SAM)

ในจีโนมจะมี 5-methylcytosine (5-meC) อยู่ร้อยละ 1 ซึ่งโดยมากจะอยู่บริเวณ CpG site ในเซลล์โซมาติก (Somatic cell) [69] โดยพบว่า 5-meC สามารถเกิด Spontaneous deamination ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์จาก C เป็นไทมีน (Thymine, 5-methyluracil, T) [70] ซึ่งจะเป็นการ

เปลี่ยนแปลงที่ตรวจจับได้ยาก (เพราะ T ก็เป็นส่วนประกอบของดีออกซีนิวคลีโอไทด์ที่เป็นรหัสบนสายดีเอ็นเอ) ในขณะที่ถ้าหาก Unmethylated cytosine เกิด Spontaneous deamination เป็นยูราซิล (Uracil, U) ซึ่งสามารถถูกตรวจพบบนสายดีเอ็นเอและถูกขจัดซ่อมแซมออกไปได้ด้วยเอนไซม์ DNA-uracil glycosylase เป็นผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ C-to-T transition ขึ้นได้ในจีโนม [70]



ภาพที่ 2.7 แสดงการเกิด Deamination ของ C เป็น U ซึ่งอาจเกิดได้โดยกระบวนการต่างๆ แต่เซลล์สามารถซ่อมแซม U ให้กลับเป็น C ดั้งเดิมได้

CpG dinucleotide ส่วนมากจะอยู่ในส่วนที่เรียกว่า CpG islands ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเบสกวีนีน (Guanine, G) และ C จำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ 5'-UTR ของยีนและมักไม่พบ DNA methylation เมื่อมีการแสดงออกของยีนนั้น [71] ซึ่งพบว่า CpG islands ในจีโนมมนุษย์มีอย่างน้อย 29,000 แห่ง [72, 73] และ CpG dinucleotide มักถูกพบในบริเวณที่เป็นลำดับเบสซ้ำ (Repetitive sequence) หรือไม่กี่บริเวณ Parasitic intragenomics sequence ซึ่งเมื่อเทียบกับ CpG islands แล้วกลุ่มของ CpG dinucleotide นั้นมักจะเป็น Methylated DNA เป็นส่วนใหญ่เนื่องด้วยเหตุผลด้านความเสถียรของจีโนม [74]

มีการพบความสัมพันธ์ระหว่าง DNA methylation และการแสดงออกของยีนมาเป็นเวลานานกว่ายี่สิบห้าปีแล้ว [75] โดยในทุกวันนี้พบว่ามีสองกลไกที่ใช้อธิบายการยับยั้งการถอดรหัสของยีนโดยผ่าน DNA methylation คือ

1. Methylated cytosine สามารถเปลี่ยนแปลง Affinity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อ Transcription factor (Transcription factor binding sequence) โดย Transcription factor บาง

ชนิดเช่น Est-1 [76] และ Boundary element factor CTCF [77] ไม่สามารถเกาะบนสายดีเอ็นเอได้เลยหากมี DNA methylation บริเวณ Transcription factor binding site

2. DNA methylation นั้นสามารถเหนี่ยวนำโปรตีนที่จำเพาะกับ 5-meC ที่ CpG เช่น Methyl-CpG-binding domain protein (MBD) และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการยับยั้งถอดรหัสของยีนได้โดยเรียกเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสายโครมาติน (Chromatin remodeling) เช่น Histone deacetylase ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยน Euchromatin เป็น Heterochromatin

เป็นที่แน่นอนว่า DNA methylation มีบทบาทสำคัญในการเกิด Imprinting ของยีนบางตัวเช่น H19, IGF2 หรือ IGF2R [78, 79] หรือการเกิด X inactivation ของ X chromosome โดยการควบคุมการแสดงออกของ XIST และการคง Heterochromatin ของ X chromosome ที่ถูก Inactivate หรือการทำให้เกิด Genomic stability โดยการ Methylation บน Transposable element ต่างๆ [80-82] นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของตัวอ่อนอีกด้วยเช่นเมื่อตัวอ่อนของหนูตัวผู้มีการขาดยีนที่สร้างเอนไซม์ DNMT1 หรือ DNMT3a/b หนูจะตายภายหลังการฝังตัวที่มดลูกแม่หนูไม่นานซึ่งสาเหตุการตายยังไม่เป็นที่ทราบโดยอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลง Imprinting หรือ X inactivation รวมทั้ง Apoptosis ด้วย [83]

มากกว่า 0.1% ของยีนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและพืชชั้นสูงถูกควบคุมการทำงานโดยแบ่งแยกแหล่งกำเนิดว่าได้มาจากฝั่งพ่อหรือฝั่งแม่ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า Genomic imprinting และเป็นคำอธิบายอย่างหนึ่งว่าทำไมสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่สามารถเกิด Parthenogenetic จากไข่ของแม่เพียงฝ่ายเดียวได้อย่างเช่นแมลงบางชนิด [84] โดย Imprinting ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีบทบาทในการควบคุมการพัฒนาตัวอ่อนและการแสดงออกของพฤติกรรมภายหลังคลอด โดยปกติแล้ว Imprinting gene ที่ได้จากฝั่งพ่อมักส่งเสริมการพัฒนาตัวอ่อนแต่จากฝั่งแม่จะยับยั้งการพัฒนา [85]

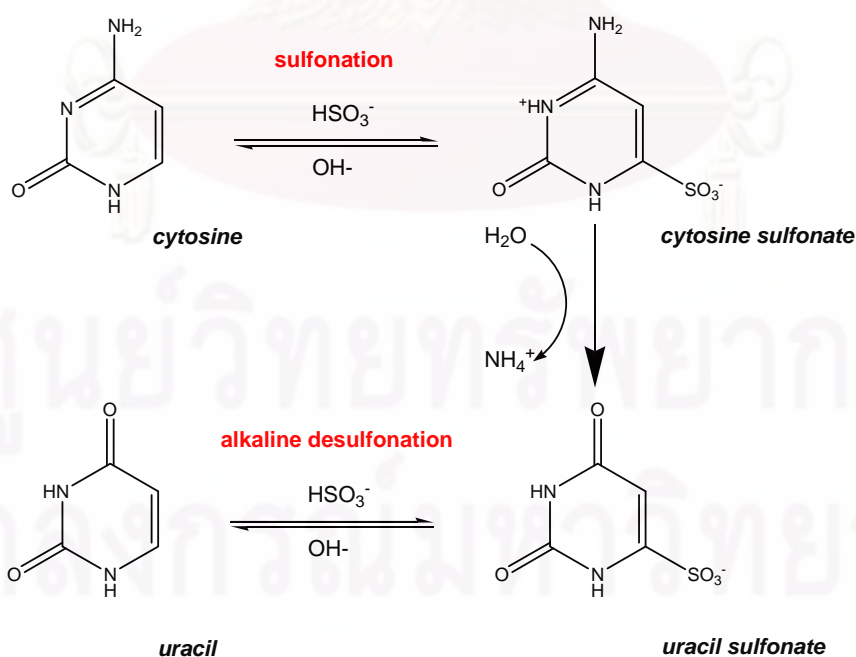
การเกิด Imprinting บน Somatic cell นั้นหมายความว่ายีนต้องทำงานในรูปแบบ Monoallelic gene expression นั่นเอง การเกิด DNA methylation บริเวณ Promoter ของยีนเหล่านี้บนกลไกสำคัญทำให้เกิด Gene silencing ได้เช่นโปรตีน MBD จะช่วยทำงานกับ HDAC ทำให้เกิด Heterochromatin บริเวณที่ยีนนั้นอยู่ทำให้ยากที่จะเกิดการแสดงออก อย่างไรก็ตามในบางยีนที่เกิด Imprinting ก็เกิด Methylation บนอัลลีลที่ทำงานก็เป็นได้แต่การเกิด Methylation นั้นไม่ได้เกิดบน Promoter ของยีนแต่เกิดในบริเวณที่เรียกว่า Differential methylated region (DMR) ซึ่งบริเวณนี้มักจะเป็น Promoter ของ

Antisense RNA ทำให้เมื่อเกิดการ Demethylation ในบริเวณนี้แล้วจะทำให้มีการแสดงออกของ Antisense RNA ยีนที่เป็นเป้าหมายจึงถูกทำให้ไม่แสดงออก [86]

2.14 ปฏิริยาไบซัลไฟต์ (Bisulfite conversion)

ปฏิริยาไบซัลไฟต์ใช้ในการแยกแยะระหว่าง C และ 5-meC โดยหลักการคือการอาศัยความไวในการทำปฏิริยาที่แตกต่างกันของ C และ 5-meC ซึ่งจะถูก Deamination ภายใต้สภาวะกรด ซึ่ง Unmethylated C จะถูกเปลี่ยนเป็น U ในขณะที่ 5-meC ที่มีความไวน้อยกว่ามากจะยังคงเป็น C อยู่ โดยการทำ Bisulfite conversion นี้มีร้อยละของผลได้ (Percent yield) คือ 95-98% ของ C จะถูกเปลี่ยนเป็น U (โดยที่ 5-meC ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง) [87] เพื่อให้เป็นการแน่ใจว่าเกิดการ conversion อย่างสมบูรณ์จริงๆ ดีเอ็นเอจะต้องมีคุณภาพที่ดีและถูก Denature ให้เป็นสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ (เพราะว่าปฏิริยานี้เป็น Single stranded specific reaction) สภาวะพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมก็มีส่วนในระหว่างขั้นตอนการทำปฏิริยา นอกจากนี้แล้วไบซัลไฟต์ไอออนมีความไวสูงจะเกิด Auto-oxidation ได้โดยง่ายจึงต้องใส่สารต้านอนุมูลอิสระไว้ในปฏิริยาซึ่งก็คือไฮโดรควิโนน (Hydroquinone)

ภายหลังการทำปฏิริยาไบซัลไฟต์ นั้นดีเอ็นเอจะถูกนำไปวิเคราะห์การเติมหมู่เมทิลได้หลายแบบ ได้แก่การทำ Allele specific PCR, Sequencing และใช้ Restriction enzyme (COBRA) [88]

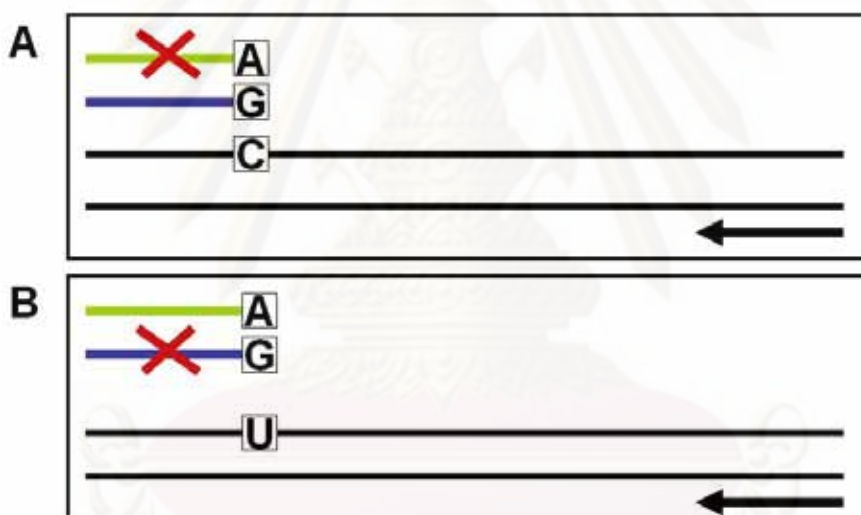


ภาพที่ 2.8 การเปลี่ยนแปลง C เป็น U ภายใต้ปฏิริยาไบซัลไฟต์

1. Methylation specific-PCR (MSP)

MSP เป็นวิธีที่นิยมมากพอสมควรในการศึกษา DNA methylation ในปัจจุบัน โดยภายหลังจากการทำปฏิกิริยาไบซัลไฟต์แล้วจะมีการทำ Allele specific PCR ซึ่งจะจำเพาะต่อ C หรือ U ซึ่งถ้าไพรเมอร์จำเพาะต่อ U ก็หมายความว่าเมื่อตำแหน่ง C บริเวณนี้ไม่มีการเติมหมู่เมทิลแล้วไพรเมอร์จะจับกับ U บริเวณนี้ได้ ในทำนองเดียวกันกับไพรเมอร์ C ซึ่งถ้าหากมีการเติมหมู่เมทิลที่ C บริเวณนี้แล้วไพรเมอร์ก็จะจับกับ C บริเวณนี้ได้

ซึ่งโดยปกติแล้วการเกิดการเติมหมู่เมทิลจะไม่ใช่แบบขาวหรือดำ (All or none) แต่จะมีร้อยละของตัว C ที่ถูกเติมหมู่เมทิลที่แตกต่างกันออกไป โดย PCR product ของทั้งสองไพรเมอร์นี้รวมกันจะเป็น 100% [89, 90]



ภาพที่ 2.9 Methylation specific PCR เป็น Allele specific PCR ประเภทหนึ่งที่ใช้ตรวจหา DNA methylation (A) ในกรณีที่ เป็น Methylated C จะไม่มีการเปลี่ยนเบสทำให้ไพรเมอร์ที่เป็น G จับได้ ในขณะที่ (B) ไม่ใช่ Methylated C ทำให้เปลี่ยนเบสเป็น U ไพรเมอร์ที่จะจับได้คือ A

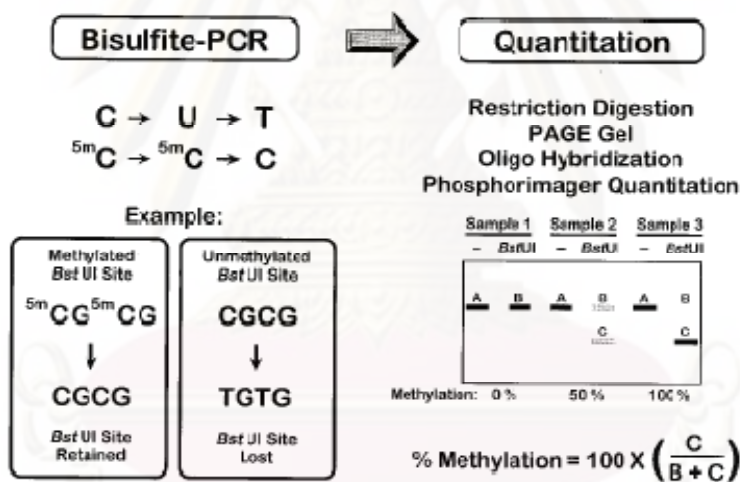
2. Sequencing

การทำ Bisulfite sequencing เป็น Gold standard ของการวิเคราะห์ DNA methylation ซึ่งวิธีนี้จะแสดงชัดเจนว่าภายหลังจาก conversion แล้วบริเวณที่เป็น Unmethylated C จะเปลี่ยนเป็น

U (และ T ภายหลังการทำ PCR) ในขณะที่ 5-meC จะเป็น C จะปรากฏในการทำ sequencing [91] เมื่อเทียบกับไพรเมอร์จากวิธี MSP แล้ว การออกแบบไพรเมอร์ในการทำ sequencing นี้ จะต้องออกแบบให้ไม่สามารถแยกแยะ Unmethylated หรือ Methylated ได้โดยการไม่ออกแบบไพรเมอร์ให้พอดีกับ CpG site แต่ให้ออกแบบคร่อม (ในขณะที่ MSP ต้องออกแบบให้ปลาย 3' ของ forward primer จับกับ CpG site ในรูปแบบต่างกันได้อย่างจำเพาะ) ดังนั้นไม่ว่าจะเป็น Unmethylated หรือ Methylated DNA จะถูกเพิ่มจำนวนด้วยศักยภาพที่เท่ากัน [92] [93]

3. COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) [94]

เมื่อหลังจากการทำปฏิกิริยาไบซัลไฟต์เรียบร้อยแล้ว ดีเอ็นเอส่วนที่สนใจจะถูกเพิ่มจำนวนโดยการทำ PCR แล้วนำไปตัดเอนไซม์ที่คาดว่าจะสามารถแยกแยะระหว่าง Converted C และ Unconverted C ได้ดังภาพ



ภาพที่ 2.10 การทำ COBRA โดยตำแหน่งที่สนใจคือ CGCG ซึ่งหากไม่มี DNA methylation แล้ว CGCG ก็จะถูกเปลี่ยนหลังปฏิกิริยาไบซัลไฟต์เป็น UGUG (TGTG) ซึ่งจะไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ BstUI ได้ แต่หากมี DNA methylation แล้ว CGCG ยังคงอยู่จึงสามารถถูกตัดด้วย BstUI ได้ จากนั้นนำค่าความเข้มแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปเปรียบเทียบหา % Methylation ต่อไป [94]

2.15 Methylation sensitive isoschizomers

วิธีนี้ไม่ต้องอาศัยการทำปฏิกิริยาไบซัลไฟต์แต่จะอาศัยความ Sensitive ต่อ DNA methylation ที่แตกต่างกันของ Isoschizomers (Restriction endonuclease ต่างชนิดที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน) [95] เช่นเอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* ที่สามารถตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ CCGG ได้เหมือนกัน แต่ *HpaII* จะไม่ตัดถ้าหาก CpG มี DNA methylation [95] หรือกรณีของ *PspGI* และ *MvaI* ที่สามารถตัดลำดับ CCWGG ได้เหมือนกันแต่ *MvaI* จะไม่ตัดหาก CpWpG มี DNA methylation

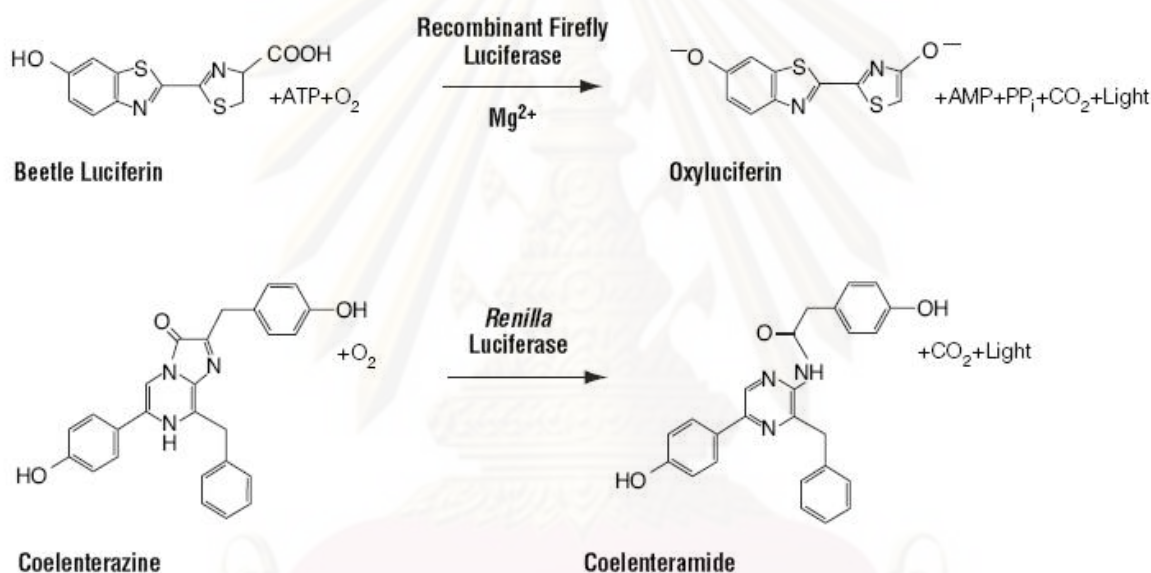
2.16 Reporter assay

การศึกษาทดสอบการออกฤทธิ์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอส่วนมากจะใช้วิธีศึกษาโดยการ Recombine ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษากับพลาสมิดที่มียีนรายงานผล (Reporter gene) อยู่แล้วจึงนำเข้าสู่เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อทดสอบการแสดงออกของ Reporter gene ด้วยวิธีต่างๆ โดยชิ้นส่วนที่มักจะ Recombine กับ Reporter plasmid นั้นมักจะเป็นชิ้นที่น่าสงสัยว่าเป็น Promoter หรือ Enhancer ซึ่งระดับการแสดงออกของ Reporter gene จะแปรผันตามความสามารถในการส่งเสริมการแสดงออกของ Promoter หรือ Enhancer ที่ Recombine เข้าไป โดยวิธีการทดสอบการแสดงออกของ Reporter gene มีสองวิธีหลักคือ Isotopic assay และ Non-isotopic assay [96]

Isotopic assay ที่นิยมใช้กับ Reporter gene สองชนิดคือ Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) และ Human growth hormone (hGH) ส่วนแบบ Non-isotopic assay นิยมใช้ยีน Firefly luciferase (FLUC) และ β -galactosidase (β -GAL) เป็น Reporter gene แบบ Chemiluminescence และ Green fluorescence protein (GFP) เป็นแบบ Fluorescence [96]

ยีน FLUC ที่ได้มาจากหิ่งห้อย (*Photinus pyralis*) เป็น nonisotopic reporter system ที่นิยมใช้มากที่สุดเพราะ Sensitivity สูงและประยุกต์ใช้ได้กับเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนมาก ปฏิกิริยา Bioluminescence ของหิ่งห้อยเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาในการทำปฏิกิริยาของสับสเตรท (Luciferin, ATP และ O_2) ด้วยเอนไซม์ Luciferase โดยมี Mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ ดังนั้นเมื่อ Cell lysate ที่มีการแสดงออกของยีน FLUC ถูกผสมกับน้ำยาที่มีองค์ประกอบข้างต้นเป็นสับสเตรทจะเกิดแสงขึ้นเป็นเวลาสั้นๆ ซึ่งแสงที่ปรากฏสามารถวัดได้ด้วย Luminometer [96]

ในปัจจุบันนิยมใช้ *Renilla luciferase* (RLUC) เป็นตัว Normalize ค่าของ FLUC ด้วยเสมอ เพราะหากมีการแสดงออกของยีน FLUC มากขึ้นเท่าไร ค่า Luminescence ที่ได้จะยิ่งมากแต่จะสร้างข้อกังขาว่าค่า Luminescence ที่มากมาจากการใส่พลาสมิดให้กับเซลล์ในสัดส่วนที่มากกว่าหรือเกิดจากความสามารถของ Promoter ในการส่งเสริมการแสดงออกจริงๆ เพื่อลดปัญหานี้ทุกครั้งที่ทำการ Transfection reporter plasmid ที่มี Reporter gene คือ FLUC จะมีการใส่ Control plasmid ในปริมาณที่เท่ากันควบคู่เสมอโดย Control plasmid จะมี Reporter gene ที่เป็น Bioluminescence enzyme เช่นกันแต่ได้มาจากคนละสิ่งมีชีวิตซึ่งในที่นี้คือ *Renilla* ซึ่งคือกัลปังหา โดยค่า FLUC ที่ได้จากการวัดจะถูกหักล้างด้วยค่า RLUC เป็นสัดส่วนกัน



ภาพที่ 2.11 แสดงปฏิกิริยาของ FLUC และ RLUC โดยสังเกตได้ว่าปฏิกิริยาของ RLUC เกิดโดยไม่ต้องใช้ ATP (Dual-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual #TM058)

Renilla luciferase จะไม่ใช่สับสเตรทร่วมกับ FLUC แต่จะใช้ Coelenterate luciferin (Coelenterazine) แทน โดยเมื่อทำการวัดค่า FLUC แล้วจะมีการเติมสับสเตรทของ RLUC ลงไปซึ่งในสับสเตรทจะมี Quencher สำหรับ FLUC ทำให้ไม่มีค่า Luminescence ของ FLUC รบกวน

2.17 หลักของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg principle)

ฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กได้ให้ข้อสังเกตไว้ว่าทั้งความถี่อัลลีลและจีโนไทป์จะคงที่ในกลุ่มประชากรหรืออยู่ในสมดุลจากรุ่นสู่รุ่นหากไม่มีปัจจัยภายนอกมารบกวน โดยปัจจัยดังกล่าวคือ

1. การจับคู่แบบ Non-random mating เช่นการแต่งงานในเครือญาติ การแต่งงานเฉพาะวรรณะ
2. การกลายพันธุ์ (Mutation) เช่นการเกิด New mutation
3. การเกิด Natural selection เช่นคนที่เป็โรคทำแสนปม (Neurofibroma) จะไม่สามารถหาคู่แต่งงานได้จึงทำให้อัลลีลนี้สูญหายไปในกลุ่มประชากร
4. กลุ่มประชากรขนาดเล็ก เช่น การติดเกาะ
5. เกิด Genetic drift และ Gene flow

โดยถือว่ความถี่อัลลีลในแต่ละกลุ่มประชากรมีค่าคงที่ผ่านรุ่นสู่รุ่นโดยมีการจับคู่แบบสุ่ม ไม่มีการกลายพันธุ์ ไม่มีการอพยพเข้าหรือออก (ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอัลลีลจากภายนอก) รวมทั้งต้องมีกลุ่มประชากรขนาดใหญ่เพื่อที่การกลายพันธุ์หรือการคัดเลือกโดยธรรมชาติส่งผลน้อยที่สุด [97, 98]

ในกรณีสำหรับสองอัลลีลต่อโลคัสเดียว โดยให้ความถี่ของอัลลีลเด่น (Dominant allele) เป็น p ในขณะที่ความถี่ของอัลลีลด้อย (Recessive allele) เป็น q จะได้สมการ

$$1 = p + q \quad \text{----- (1)}$$

$$1 = p^2 + 2pq + q^2 \quad \text{----- (2)}$$

จากสมการที่ (1) ในกรณีของโลคัสที่มีอัลลีลเพียง 2 ชนิด ผลรวมของอัลลีลทั้งหมดจะได้ 1.00 และเมื่อประชากรอยู่ในสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กค่าการกระจายตัวจีโนไทป์จะใกล้เคียงสมการที่ (2) โดย p^2 และ q^2 คือ Homozygous dominant และ recessive ตามลำดับ ในขณะที่ $2pq$ คือจำนวนการกระจายตัวจีโนไทป์ในรูปแบบของ Heterozygous ซึ่งสมการที่ (2) สามารถคำนวณได้จากการคำนวณความน่าจะเป็นเมื่ออัลลีลของเพศชายมาผสมกับอัลลีลของเพศหญิงคือ

$$(p + q)(p + q) = p^2 + 2pq + q^2 \quad \text{----- (3)}$$

2.18 ปัญหาสำหรับหลักการฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

จากสมมติฐานของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กสามารถเบี่ยงเบนจากความคาดการณ์ได้ในหลายกรณี โดยมีสองกรณีใหญ่ที่มักเกิดการเบี่ยงเบนจากสมดุล [97, 98]

1. **กรณีคลาดเคลื่อนจากหลักการจับคู่แบบสุ่ม**จะมีสามปัจจัยที่อาจก่อให้เกิดการเบี่ยงเบนของสมมติฐานฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กคือการแต่งงานในพี่น้องท้องเดียวกัน (Inbreeding) และการคลุมถุงชน (Assortative mating) จะก่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ Homozygosity ในขณะที่หากกลุ่มประชากรมีขนาดเล็กอาจทำให้เกิด Genetic drift ได้
2. **กรณีของการคัดเลือกโดยธรรมชาติ (Natural selection)** มักทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมมติฐานอย่างรวดเร็วโดยทำให้เปลี่ยนแปลงความถี่อัลลีลอย่างมาก โดยอัลลีลชนิดที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วมักจะอยู่รอดในสภาวะกดดันได้ เช่น การระบาดของมาเลเรียทำให้ความถี่อัลลีลของโรค Sickle cell anemia มีมากขึ้น
3. **การกลายพันธุ์ (Mutation)** ในกรณีนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความถี่อัลลีลในกลุ่มประชากรน้อยเพราะค่อยเป็นค่อยไปจาก 1 ใน 10,000 ถึง 1 ใน 100,000,000 ซึ่งพบว่าการกลายพันธุ์มักจะรักษาความถี่ไว้ได้ค่อนข้างมาก โดยการเกิด Recurrent mutation เป็นสิ่งที่ทำให้อุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์นั้นคงที่
4. **การอพยพ (Migration)** ทำให้กลุ่มประชากรสองกลุ่มมารวมกันเป็นกลุ่มเดียว โดยความถี่อัลลีลในอนาคตมักจะเข้าสู่สมมติฐานที่สุดหากไม่เกิดการแบ่งแยก แต่ในขณะเดียวกันผู้อพยพบางส่วนยังมักแต่งงานในกลุ่มตัวเองทำให้กลุ่มประชากรใหม่ที่เกิดจากการรวมกันยังเข้าสู่สมมติฐานได้ยาก

2.19 คอร์ติซอล (Cortisol, hydrocortisone)

คอร์ติซอลเป็นฮอร์โมนกลุ่มกลูโคคอร์ติคอยด์ (Glucocorticoid, GC) ที่สร้างมาจากคอเลสเตอรอลเป็น Steroid hormone ซึ่งสร้างมาจาก Zona fasciculata ของ Adrenal cortex โดยการสร้างคอร์ติซอลที่บริเวณนี้ถูกกระตุ้นโดยการหลั่ง Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าซึ่งตัว ACTH เองก็ถูกกระตุ้นการหลั่งโดย Hypothalamus ผ่านฮอร์โมน Corticotropin-releasing factor (CRF) [99] โดยฮอร์โมนกลุ่มกลูโคคอร์ติคอยด์จะทำงานผ่านการจับกับตัวรับ Glucocorticoid receptor (GR) เกิด Receptor-ligand complex ไปจับกับ Glucocorticoid response element (GRE) บน Promoter ของยีนเป้าหมายเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีนซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า Transactivation [100] ซึ่งยีนที่เป็นเป้าหมายของกระบวนการนี้เช่นเอนไซม์ Tyrosine aminotransferase เอนไซม์ Glucose-6-phosphatase เป็นต้น นอกจากความสามารถในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนแล้ว

Receptor-ligand complex ของฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์และ GR สามารถกวดการแสดงออกด้วยกระบวนการ Transrepression ซึ่ง Complex ดังกล่าวจะไปจับกับ Transcription factor จำพวกที่เกี่ยวข้องกับ Pathway ของการอักเสบคือ AP-1 และ NF- κ B จึงเกิดการกวดการแสดงออกของยีนที่จำเป็นต้องใช้ Transcription factor ดังกล่าวในการแสดงออก ยีนเหล่านี้เช่น IL-1B, IL-4, IL-5 และ TNF- α เป็นต้น [100] การให้ RU-38486 ซึ่งเป็น GR-II antagonist พบว่าเป็นการส่งเสริมการทำให้เกิด Long term depression รวมทั้งลดการเกิด Phosphorylation ของ ERK1/2, MEK1/2 และ Raf ในสมองส่วน Hippocampus ของหนูแรท [101] เมื่อทดลองให้ U0126 ซึ่งเป็น MEK1/2 inhibitor จะส่งเสริมให้หนูที่มีความเครียดเกิด Long term depression ได้ง่ายขึ้นเช่นเดียวกับการให้ Dexamethasone [101] อนึ่งผลของกลูโคคอร์ติคอยด์ต่อการเจริญของเซลล์ SK-N-SH (Human neuroblastoma) ได้รับการยืนยันโดยการ Treat ยา RU-38486 ซึ่งเป็น Glucocorticoid receptor antagonist ในเซลล์ SK-N-SH ซึ่งพบว่าปริมาณเซลล์ SK-N-SH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ [102]

บทที่ 3
ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

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 รุ่น DNA110-230	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	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
9. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น EP Gradient S	Eppendorf	เยอรมนี
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. เครื่องวิเคราะห์และถ่ายภาพสารพันธุกรรม (G : BOX Chemi SD)	Syngene	สหรัฐอเมริกา
14. ตู้อบ (Incubator Shaker) Minitron Technical Resources, Inc.	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)	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
20. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet)	E.S.I. Flufrance	ฝรั่งเศส

21. เครื่องวัดแสง luminescence (Luminometer) รุ่น VICTOR ³	PerkinElmer	สหรัฐอเมริกา
22. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer) NanoDrop รุ่น 1000	Thermo	สหรัฐอเมริกา
23. เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น AB204-S CLASSIC	Mettler Toledo	สวิสเซอร์แลนด์
24. ถัง Liquid Nitrogen รุ่น XT20	Taylor-Wharton	สหรัฐอเมริกา
25. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ รุ่น Olympus CK30	Olympus	ญี่ปุ่น
26. เครื่อง Electroporator รุ่น EC100	EC Apparatus	สหรัฐอเมริกา
27. เครื่อง Power Supply รุ่น POWER PAC 200 และ 300	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา

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. Autopipette (ขนาด 20, 200, 1000 μ l)	Gilson	ฝรั่งเศส
7. Autopipette (ขนาด 20 μ l)	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา
8. Pipette Aid รุ่น Portable XP	Drummond Scientific	สหรัฐอเมริกา
9. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri Dishes)	Bibby Sterilin Ltd.	สหราชอาณาจักร
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. Electroporation cuvettes ระยะห่างช่อง 1 mm.	Bio-Rad	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. n-butanol	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
6. GenePure LE Agarose	ISC BioExpress	สหรัฐอเมริกา
7. ชุดน้ำยา MasterTaq [®] Kit	Eppendorf	เยอรมนี
8. ชุดน้ำยา Pfu DNA polymerase	Fermentas	แคนาดา
9. ชุดน้ำยา Taq DNA polymerase with standard Taq buffer	NEB	สหรัฐอเมริกา
10. ชุดสกัดแยกดีเอ็นเอจากเจล (Quantum Prep Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Column)	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา
11. Sterile Water (deionized water)	General Hospital Products Public Co., Ltd	ไทย
12. ชุดน้ำยา pGEM [®] -T Easy Vector System	Promega	สหรัฐอเมริกา
13. เอนไซม์ <i>MspI</i> , <i>KpnI</i> , <i>HindIII</i> , <i>Bsp1286I</i> , <i>XbaI</i>	NEB	สหรัฐอเมริกา
14. 100 bp ladder	Fermentas	แคนาดา
15. 25 bp ladder, 50 bp ladder	Promega	สหรัฐอเมริกา
16. ชุดน้ำยา T4 DNA Ligase	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
17. Tryptone Peptone	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
18. Bacto [™] Yeast Extract	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
19. Bacto-Agar	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
20. AMPILIN (Ampicilin, Ampicilin Sodium)	Atlantic Laboratories	ประเทศไทย

21. Sodium chloride	Merck	เยอรมนี
22. Calcium chloride dehydrate	Merck	เยอรมนี
23. Magnesium chloride	APS Finechem	ออสเตรเลีย
24. Sodium acetate	Merck	เยอรมนี
25. Potassium acetate	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
26. Tris Base	Promega	สหรัฐอเมริกา
27. Orthoboric acid	BDH	สหราชอาณาจักร
28. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt	BDH	สหราชอาณาจักร
29. Sodium hydroxide	Carlo Erba Reagenti	อิตาลี
30. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา
31. ชุดสกัด PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kits	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
32. RNase A	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
33. น้ำยา TRIzol® Reagent	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
34. ชุดน้ำยา Im-Prom™ II Reverse Transcriptase	Promega	สหรัฐอเมริกา
35. RNase AWAY (for RNase Decontamination)	Continental	สหรัฐอเมริกา
36. เอนไซม์ Deoxyribonuclease I, Amplification Grade	Fermentas	แคนาดา
37. Chloroform	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
38. Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
39. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 4.00 mM/L Glutamine, 4500 mg/L Glucose without Sodium Pyruvate	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
40. Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) Medium with 2.05 mM L-Glutamine	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
41. Minimum Essential Medium (EMEM)	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
42. Ham's F12 medium	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
43. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS Modified) without Calcium, Magnesium	JRH Biosciences	สหรัฐอเมริกา
44. Fetal Bovine Serum (FBS)	Hyclone	สหรัฐอเมริกา

45. HyQ Trypsin 0.25 % with EDTA with 2.5 g Porcine Trypsin without Calcium, Magnesium	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
46. Penicillin-Streptomycin Solution 10,000 units/ml Penicillin, 10,000 µg/ml Streptomycin	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
47. Fungizone Amphotericin B 250 µg/ml	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
48. Dimethyl Sulfoxide	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
49. ชุดน้ำยา Lipofectamine™ 2000	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
50. 40% ฟอรั่มัลดีไฮด์	ศึกษาภัณฑ์พาณิชย์	ประเทศไทย
50. ชุดน้ำยา Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Promega	สหรัฐอเมริกา

3.2 การคัดเลือกประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

เซลล์เพาะเลี้ยง

1. เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T (Human T cell lymphoblast-like) ชื่อ Jurkat ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.นพ.ดร. อภิวัฒน์ มุทิราวงกูร ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Erythroid (Human erythroleukemia) ชื่อ K562 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. พรเทพ เทียนสีวากุล ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. เซลล์มะเร็งปอดชนิด Human alveolar basal epithelial cell ชื่อ A549 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. พูนลาภ ชีพสุนทร ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervical cancer) ชื่อ HeLa (Henrietta Lacks) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. เซลล์ผิวหนังกำพวด (Human keratinocyte) ชื่อ HaCaT ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. เอ็น อี พูซนิก ศูนย์วิจัยมะเร็งแห่งเยอรมนี (German cancer research center) เมืองเฮเดลเบิร์ก สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
6. เซลล์ Human embryonic kidney หรือ HEK293 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.นพ. วันฉ่ำ กุลวิจิต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. เซลล์มะเร็งในระบบประสาท (Human neuroblastoma) ชื่อ SH-SY5Y จัดมาจาก American Type Culture Collection (Cat#:CRL-2266™, ATCC, Manassas, VA)

อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์กลุ่มเม็ดเลือดซึ่งเป็นเซลล์ประเภทแขวนลอย (Suspension) และ A549 คือ Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI1640) (Hyclone, Logan, UT) ผสมกับ Fetal bovine serum (FBS) (Hyclone) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ FBS คือ 10%

อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์เกาะติด (Adherence cell) ยกเว้น SH-SY5Y คือ Dulbecco's Modified Minimum Eagle's Medium (DMEM) (Hyclone) ผสมกับ FBS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ FBS คือ 10%

สำหรับเซลล์ SH-SY5Y คือ DMEM ผสมกับ Ham's F12 medium (Hyclone) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยผสมกับ FBS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ FBS คือ 20%

โดยเซลล์ทั้งหมดจะถูกเพาะเลี้ยง (Incubate) ที่ 37 องศาเซลเซียสภายใต้ความชื้นสัมพัทธ์ 95% และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ 5%

แบคทีเรีย

ใช้เชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ซึ่งไม่มียีนดื้อยา Ampicillin โดยเพาะเลี้ยงใน Terrific broth (TB) หรือ Lysogeny broth (LB) หรือ LB agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

กลุ่มตัวอย่างสุขภาพดีและผู้ป่วยโรคซึมเศร้า

ประชากรเป้าหมาย (Target) สำหรับการศึกษาครั้งนี้คือคนไทยที่เกิดในประเทศไทย มีภูมิลำเนาอยู่ที่จังหวัดเลย หนองบัวลำภูและจังหวัดใกล้เคียงที่อยู่ในเขตควารับผิดชอบของโรงพยาบาลจิตเวชเลยราชนครินทร์ กายรูปต้องบ่งชี้ถึงความเป็นคนเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และต้องป่วยเป็นโรคซึมเศร้า (Major depressive disorder) จากการวินิจฉัยของจิตแพทย์ การเลือกกลุ่มตัวอย่างในเขตนี้เพราะมีความชุกของโรคซึมเศร้าสูงที่สุดในพื้นที่สาธารณสุขเขต 10

ประชากรกลุ่มตัวอย่าง (Sample) ประกอบด้วยผู้ป่วย (Case) ที่เป็นโรคซึมเศร้าตามการจำแนกของประชากรเป้าหมายและมีคุณสมบัติครบตามเกณฑ์ที่กำหนดและคนไทยที่มีสุขภาพดี (Healthy control) ที่มีภูมิลำเนาเดียวกับกลุ่มเป้าหมายและมีคุณสมบัติครบตามเกณฑ์ที่กำหนด

ประชากรกลุ่มตัวอย่างที่เป็นอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการต้องลงนามเป็นลายลักษณ์อักษรใบยินยอมเข้าร่วมโครงการ (ตามภาคผนวก ข) พร้อมทั้งได้แจ้งข้อมูลที่อาสาสมัครและผู้ที่เกี่ยวข้องควรทราบ (ตามภาคผนวก ค) โดยเมื่ออาสาสมัครได้ลงนามในเอกสารดังกล่าวเรียบร้อยแล้วจึงเก็บเลือดครบ (Whole blood) ใส่สารกันเลือดแข็ง EDTA และบันทึกข้อมูลพร้อมสำหรับทำการวิเคราะห์ผล โดยเกณฑ์คัดเลือกกลุ่มผู้ป่วยจะประกอบด้วยเกณฑ์สำหรับเลือกเข้าและคัดออก (Inclusion and exclusion criteria) โดยใช้ DSM-IV เป็นเกณฑ์ที่ใช้ในการวินิจฉัย

เกณฑ์การเลือกเข้า (Inclusion criteria)

1. เข้ารับการรักษาในพื้นที่ให้บริการของโรงพยาบาลจิตเวชเลยราชนครินทร์
2. เป็นประชากรชายหรือหญิงที่มีอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไปที่ยินยอมเข้าร่วมโครงการ
3. ไม่ป่วยทางจิตโรคอื่นร่วมกับโรคซึมเศร้า เช่น โรคจิตเภท (Schizophrenia) หรือ Substance abuse disorder เป็นต้น
4. ไม่เจ็บป่วยด้วยโรคทางกายรุนแรงจนเป็นอุปสรรคต่อการวิจัย
5. เข้าเกณฑ์ในการวินิจฉัยโรคซึมเศร้าโดยจิตแพทย์ โดยมีอาการต่อไปนี้อย่างน้อย 5 ข้อเป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์อย่างต่อเนื่องพร้อมเพรียงกัน คือ
 - 5.1 อารมณ์เศร้าตลอดทั้งวันหรือเกือบทุกวัน*
 - 5.2 ความสนใจในสิ่งต่างๆลดลงมาก ไม่อยากพูดคุยกับใคร ไม่อยากทำอะไรเกือบทั้งวัน*
 - 5.3 น้ำหนักลดลงอย่างมากโดยที่ไม่ได้ตั้งใจลดอาหารหรือน้ำหนักเพิ่มอย่างมากเพราะกินจุ**
 - 5.4 นอนไม่หลับหรือนอนมากเกือบทุกวัน**
 - 5.5 การเคลื่อนไหวและความคิดเชื่องช้า กระวนกระวายอยู่ไม่สุข**
 - 5.6 อ่อนเพลีย เหนื่อยล้า ไม่มีเรี่ยวแรง เป็นเกือบทุกวัน**
 - 5.7 รู้สึกไร้ค่า รู้สึกผิดมากกว่าปกติ เป็นเกือบทุกวัน**
 - 5.8 ไม่มีสมาธิ คิดไม่ออก ตัดสินใจลำบาก เป็นเกือบทุกวัน**
 - 5.9 อยากตายหรือพยายามฆ่าตัวตาย**

หมายเหตุ * ต้องมีอย่างน้อย 1 ใน 2 อาการหลัก, ** ต้องมีอย่างน้อย 4 อาการรอง

6. ทั้งนี้ผู้ป่วยต้อง**ไม่มี**ประวัติแมเนีย (Mania) หรือไฮโปแมเนีย (Hypomania) มาก่อน

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

1. ไม่ยินยอมร่วมโครงการวิจัย
2. ไม่เข้าเกณฑ์การวินิจฉัยโรคซึมเศร้า
3. มีอาการแมเนียหรือไฮโปแมเนีย



ภาพที่ 3.1 แผนที่จังหวัดเลยและอาณาเขตติดต่อกับจังหวัดใกล้เคียง

(ที่มา http://www.rplpei.go.th/web/index.php?option=com_wrapper&Itemid=132)

ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน hDAT บริเวณ rs2652511 บน Promoter และ 63bp-VNTR บน Intron 3 ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีในชนชาติไทยหรือเอเชีย ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้ใช้ความถี่อัลลีลของคนปกติในคนเชื้อชาติเยอรมันจากการศึกษา Association studies กับโรค Bipolar ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับโรคซึมเศร้า โดยได้ใช้ชุดคำสั่งคำนวณ Sample size for case-control study จากโปรแกรม EpiCalc 2000 Version 1.02 (Joe Gilman and Mark Myatt, 1998) ทำให้ได้จำนวนขนาดกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่างโรคซึมเศร้าสำหรับการวิจัย โดยกลุ่มตัวอย่างขั้นต่ำที่ใช้กับการคำนวณเพื่อให้ผลการทดลองที่มีนัยสำคัญมีความน่าเชื่อถือคือ 133 รายสำหรับแต่ละกลุ่ม

Ratio of cases to controls	:	1
OR to detect	:	2.00
Proportion (%) controls exposed	:	46.00%
Significance	:	0.05
Power	:	80%
Sample size	:	133 (cases)
	:	133 (controls)
	:	266 (overall)

3.3 การตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน hDAT ตำแหน่ง -844T/C (rs2652511) และ 63bp-repeat VNTR บน Intron 3

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดครบจะถูกเพิ่มปริมาณในบริเวณที่ต้องการด้วยปฏิกิริยา PCR ที่มีไพรเมอร์จำเพาะต่อบริเวณดังกล่าวด้วยสภาวะที่แตกต่างกัน โดยการศึกษาความหลากหลาย ณ ตำแหน่ง -844T/C (SNP database: rs2652511) จะใช้การตัดเอนไซม์จำเพาะ *Msp I* ร่วมด้วยภายหลังจากการทำปฏิกิริยา PCR ในขณะที่การศึกษาความหลากหลาย ณ Intron 3 ซึ่งเป็น 63bp-Repeat VNTR จะใช้การทำปฏิกิริยา PCR เพียงอย่างเดียว ซึ่งไพรเมอร์และสภาวะที่ใช้ได้แสดงในตารางที่ 3.1

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่ผ่านการตัดเอนไซม์จำเพาะของ rs2652511 แล้วจะถูกแยกในวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 4% ภายใต้อุณหภูมิ 80 โวลต์เป็นเวลา 65 นาที ในขณะที่ผลผลิต PCR ของ VNTR บน Intron 3 จะถูกแยกในวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 2% ภายใต้อุณหภูมิ 100 โวลต์เป็นเวลา 50 นาที ซึ่งภายหลังจากการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าเรียบร้อยแล้ว แผ่นวุ้นจะถูกนำไปย้อมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์แล้วถ่ายภาพใน UV transilluminator เพื่อเก็บข้อมูลแถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ผลต่อไป

ตารางที่ 3.1 แสดงรายชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน hDAT

ตำแหน่งของยีน	ไพรเมอร์	Annealing และ Mg ²⁺
-844T/C ^ψ (rs2652511)	hDAT-691* : 5'- GCACTCGCCTAAGAAAACCA-3' hDAT-962 : 5'- AATTGGTACCATCGAGGGTACACGGGG-3'	63°C / 2 mM
63bp-repeat VNTR (Intron 3)	Intron3-F** : 5'-GAAGTTGGCTGGTTGGTGAG-3' Intron3-R** : 5'-ACCAGAGTCCCCCTACCAA-3'	61°C / 2 mM

หมายเหตุ * Rubie (2001) [21]; ** Franke (2008) [103]; ^ψ อ้างอิงตำแหน่งตาม AF115382

3.4 การวิเคราะห์ผลความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน hDAT ในตำแหน่งที่สนใจ

การกระจายตัวของจีโนไทป์ (Genotypic distribution) ของแต่ละกลุ่มประชากรจะถูกเก็บและนำมาหาความถี่อัลลีล (Allele frequency) ซึ่งหาได้จาก

$$\text{ความถี่อัลลีล } P = \frac{\text{จำนวนอัลลีล } P \text{ ที่นับจากผลการกระจายตัวจีโนไทป์}}{\text{จำนวนทั้งหมด}}$$

ซึ่งผลของความถี่อัลลีลและการกระจายตัวของจีโนไทป์จะใช้เป็นค่าในการคำนวณสมดุลฮาร์ดีไวนเบิร์ก (Hardy-Weinberg) ตามสมการ

$$\begin{array}{l} \text{และ} \\ \begin{array}{l} P + Q = 1 \\ P^2 + 2PQ + Q^2 = 1 \end{array} \end{array}$$

โดย P และ Q คือความถี่อัลลีลของอัลลีลชนิดต่างๆ ในที่นี้คือการคำนวณของความหลากหลายที่มีชนิดของอัลลีลเพียงสองชนิด ในขณะที่ค่า P² และ Q² คือการกระจายตัวจีโนไทป์ของ P/Q แบบโฮโมไซกัส ในขณะที่ 2PQ คือการกระจายตัวจีโนไทป์แบบเฮเทโรไซกัส

ค่าการกระจายตัวจีโนไทป์ตามทฤษฎี (Expected genotype) และตามที่เก็บข้อมูลได้ (Observed genotype) จะถูกนำมาเปรียบเทียบด้วยสถิติ Chi square test (χ^2) ซึ่งหากค่า $p > 0.05$ จึงถือว่าผลที่เก็บข้อมูลได้และผลที่คำนวณได้ตามทฤษฎีไม่มีความแตกต่างกัน

ผลของความถี่อัลลีลจะถูกนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับการเกิดโรคซึมเศร้าทั้งในแบบ Single marker ด้วยชุดคำสั่ง EpiCalc 2000 Version 1.02 (Joe Gilman and Mark Myatt, 1998) และ

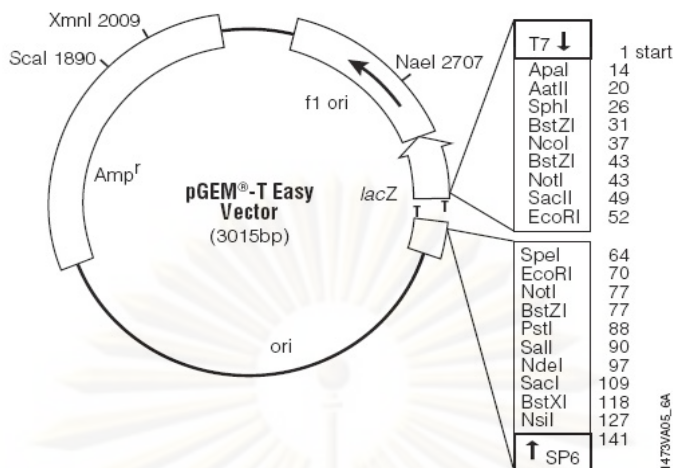
Haplotype รวมถึง Linkage disequilibrium (LD) ด้วยชุดคำสั่ง HaploView™ Version 4.1 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) [104]

3.5 การสร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อการโคลน การตกตะกอนและการเชื่อมดีเอ็นเอกับพลาสมิด

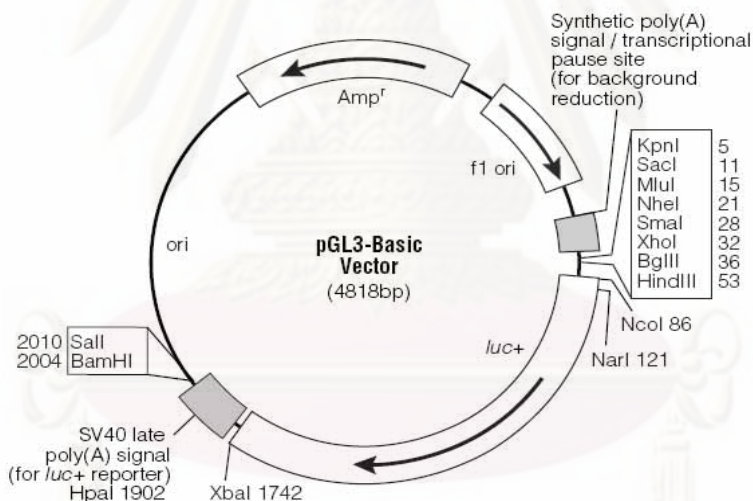
ดีเอ็นเอจากจีโนมจะถูกเพิ่มจำนวนโดยการทำให้ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ hDAT-962-KpnI : 5'-AATTGGTACCATCGAGGGTACACGGGG-3' และ hDAT+41-HindIII : 5'-CTTAAGCTTCGAGAGCGTCCGCG-3' ด้วยสภาวะที่มีแมกนีเซียมซัลเฟต 1 mM โดยปฏิกิริยา PCR จะเริ่มด้วย Initial denaturation 94°C 5 นาที ตามด้วย Denaturation 94°C 30 วินาที, Annealing 62°C 30 วินาที และ Extension 70°C 2 นาที เป็นจำนวน 40 รอบและจบปฏิกิริยาด้วย Final extension ที่ 72°C 15 นาที โดยในการทำปฏิกิริยา PCR นี้จะใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (NEB) 2 ส่วนต่อ *Pfu* DNA polymerase 1 ส่วนซึ่ง *Pfu* polymerase (Fermentas) จะมีฤทธิ์ 3'→5' Exonuclease (Proofreading) อยู่ด้วย

ดีเอ็นเอจากการทำ PCR ในช่วงต้นจะถูกตกตะกอนโดย 3M CH₃COONa (pH 5.5) ปริมาตร 10% ของดีเอ็นเอและ Absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของดีเอ็นเอ จากนั้น Incubate ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีจึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีแล้วจึงล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% Ethanol แล้วละลายด้วย 20 ไมโครลิตรของน้ำกลั่นบริสุทธิ์

ดีเอ็นเอที่ผ่านการตกตะกอนแล้วจะเชื่อมกับพลาสมิด pGEM®-T Easy vector (Promega) ด้วยน้ำยา LigaFast™ Rapid DNA Ligation System (Promega) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียด้วยกระแสไฟฟ้า จากนั้นจึงสกัด pGEM®-T Easy vector ในโคโลนีที่มีชิ้นส่วนที่ต้องการ (hDAT promoter) แล้วจึงนำพลาสมิดนั้นมาตัดเอนไซม์จำเพาะ *Kpn* I (NEB) และ *Hind* III (NEB) จึงนำมาเชื่อมกับพลาสมิด pGL3-Basic (Promega) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Kpn* I และ *Hind* III มาก่อนแล้วด้วยน้ำยา LigaFast™ จึงนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียด้วยกระแสไฟฟ้า



ภาพที่ 3.2 พลาสมิด pGEM®-T Easy vector สำหรับโคลน PCR product โดยพลาสมิดมีปลาย T overhang จึงเหมาะสมกับ PCR product ที่เกิดจากการใช้ Taq DNA polymerase ที่มีการเติม A overhang ที่ปลายด้าน 3'



ภาพที่ 3.3 พลาสมิด pGL3-Basic vector สำหรับการโคลน Promoter โดยมีตำแหน่ง Multiple cloning site สำหรับโคลน ณ บริเวณ 5-53 ของพลาสมิดซึ่งเป็นตำแหน่งที่ Promoter ของยีน Firefly luciferase ขาดหายไป

บัฟเฟอร์ของน้ำยา LigaFast™ มีความเข้มข้น 2X ซึ่งประกอบด้วยสารจำเป็นสำหรับการทำ Ligation ครบแล้ว เช่น 10% PEG4000 หรือ 2 mM ATP ก็ตาม โดยเอนไซม์ที่ใช้กับ LigaFast™ คือ T4 DNA ligase นั้นเอง สัดส่วนการทำ Ligation ด้วยน้ำยา LigaFast™ คือพลาสมิด 3 ส่วนต่อดีเอ็นเอ 1 ส่วน

ในน้ำยา 2X LigaFast™ buffer ที่ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 1X และเอนไซม์ T4 DNA ligase 3 U แล้วจึง Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.6 การส่งพลาสมิดเข้าแบคทีเรียด้วยวิธี Electroporation

การทำ Electroporation เป็นการกระตุ้นให้เกิดรูบนผนังเซลล์ (Cell wall) ของเซลล์แบคทีเรียด้วยกระแสไฟฟ้าส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียสามารถรับดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ได้ชั่วคราวที่มีกระแสไฟฟ้า

แบคทีเรียที่ถูกรีดเตรียมเป็น Competent cell จะถูกละลายที่อุณหภูมิห้องและผสมกับดีเอ็นเอให้เข้ากันแล้วจึงถ่ายไปใส่ใน Cuvette ที่มีขั้วไฟฟ้าที่มีช่องว่างระหว่างขั้วทั้งสอง 1 มิลลิเมตรแล้วชอร์ตด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 1,800 โวลต์เป็นเวลา 3 วินาที จากนั้นให้รีบเติม TB broth เข้าไป 1 มิลลิลิตรแล้วรีบนำแบคทีเรียไปเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมงก่อนที่จะแบ่งแบคทีเรียออกมาละเลง (Spread) ให้ทั่ว LB agar + Ampicillin จนแห้งแล้วจึง Incubate นาน 16-18 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส

3.7 การคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียด้วยวิธี Colony PCR

การทำ Colony PCR นั้นจะใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อพลาสมิดที่ถูกส่งเข้าแบคทีเรียตัวนั้น โดยหากเป็นการตรวจสอบ pGEM-T Easy vector (Promega) จะใช้ไพรเมอร์ SP6 promoter และ T7 promoter ในขณะที่การตรวจสอบ pGL3-Basic (Promega) จะใช้ไพรเมอร์ RV3 และ GL2 ซึ่งรายละเอียดอุณหภูมิ Annealing ที่ใช้และความเข้มข้น Magnesium ได้แสดงไว้ในตารางเบื้องล่าง

ตารางที่ 3.2 แสดงรายชื่อไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการทำ Colony PCR สำหรับพลาสมิด pGEM®-T Easy vector และ pGL3-Basic

พลาสมิด	ไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา	P	C	R	Annealing และ Mg2+
pGEM-T Easy vector	SP6 : 5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3' T7 : 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'				50.1°C / 2mM
pGL3-Basic	RV3 : 5'-CTAGCAAAATAGGCTGTCCC-3' GL2 : 5'-CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA-3'				51.9°C / 2 mM

ปฏิกิริยา PCR จะเริ่มด้วย Initial denaturation 94°C 5 นาที ตามด้วย Denaturation 94°C 30 วินาที, Annealing อุณหภูมิที่เหมาะสม 30 วินาที และ Extension 70°C 1 นาทีต่อกิโลเบส เป็นจำนวน 35 รอบและจบปฏิกิริยาด้วย Final extension ที่ 72°C 5 นาที

ภายหลังการทำ PCR แล้ว ผลผลิต PCR จะถูกนำมาแยกบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2% โดยผลผลิตพลาสมิดที่ไม่มีการแทรกชิ้นส่วนที่สนใจจะมีความยาว 176 คู่เบสและ 184 คู่เบสสำหรับ pGEM-T Easy vector และ pGL3-Basic ตามลำดับ โดยหากพลาสมิดมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจแทรกอยู่ความยาวของผลผลิต PCR ที่แยกได้จะมีขนาดเป็นผลผลิต PCR ของพลาสมิดที่ไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอแทรกบวกด้วยขนาดของดีเอ็นเอที่แทรกเข้าไป

3.8 การสกัดพลาสมิดด้วยวิธีการ Alkaline lysis

หลังจากการตรวจสอบหาโคโลนีแบคทีเรียที่ต้องการด้วยวิธี Colony PCR แล้ว โคโลนีแบคทีเรียที่ต้องการจะถูกนำไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนใน LB broth + Ampicillin เป็นเวลา 3 คืน

เซลล์แบคทีเรียจะถูกแยกออกจาก LB broth ด้วยการปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาทีจากนั้นตะกอนแบคทีเรียจะถูกทำให้เป็นเนื้อเดียวกับสารละลายบัฟเฟอร์หมายเลข 1 (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) 300 ไมโครลิตรและตามด้วยบัฟเฟอร์หมายเลข 2 ที่ถูกอุ่น (0.2 M NaOH, 10% SDS) 380 ไมโครลิตรผสมกันจนกว่าสารละลายจะใส (ผสมโดยการ Inversion mix ไม่ vortex) แล้วตามด้วยบัฟเฟอร์หมายเลข 3 ที่เย็นจัด (3M CH₃COOK pH 5.5) 380 ไมโครลิตรลงไปแล้วแช่เย็น 15 นาที ครบเวลาแล้วตั้งไว้ให้ละลายแล้วนำไปปั่นแยกที่ 13,500 รอบต่อนาที 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียสแล้วจึงถ่ายส่วนใสใส่หลอดทดลอง 2 หลอดเท่าๆกันแล้วจึงเติม Isopropanol 1 มิลลิลิตรที่เย็นจัดลงไป ตั้งทิ้งไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสนาน 10 นาทีจึงไปปั่นแยกที่ 13,500 รอบต่อนาที 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียสจะได้ตะกอนดีเอ็นเอพลาสมิด ให้ล้างตะกอนนี้ด้วย 70% Ethanol 1 มิลลิลิตรแล้วไปปั่นอีกครั้งหนึ่งจึงตากให้แห้งแล้วจึงละลายพลาสมิดด้วยน้ำกลั่นที่มีเอนไซม์ RNase A (Sigma) ผสมอยู่จากนั้น Incubate ที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีแล้วจึงตกตะกอนซ้ำด้วย Isopropanol และล้างด้วย 70% Ethanol อีกครั้งหนึ่งจึงละลายพลาสมิดด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 35 ไมโครลิตร

เพื่อเป็นการทดสอบว่าอาร์เอ็นเอไม่ได้ปนเปื้อนมาในพลาสมิดที่สกัดได้ ให้นำพลาสมิด 3 ไมโครลิตรไปแยกบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 0.7% จะพบเฉพาะพลาสมิดอย่างเดียวที่ 3,000 คู่เบสขึ้นไป

อาจเป็น smear (Smear) กองอยู่เหนือแถบเดี่ยวก็ได้ซึ่งเกิดจากพลาสมิดบางส่วนยังคงรูปแบบของ Supercoiled อยู่ โดยอาร์เอ็นเอที่ปนเปื้อนมาจะมีแถบเป็น smear อยู่ระหว่าง 250-1,000 คู่เบส

3.9 การตรวจสอบพลาสมิดด้วยการตัดเอนไซม์จำเพาะและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

พลาสมิดที่สกัดได้จะถูกนำทดสอบด้วยการตัดเอนไซม์จำเพาะอีกครั้งหนึ่งเพื่อทดสอบความจำเพาะของแถบดีเอ็นเอก่อนนำไปใช้งานต่อไป ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ทดสอบในที่นี้คือ *Kpn* I และ *Hind* III โดยพลาสมิด 2 ไมโครกรัมจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 50 U เป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายในบัพเฟอร์ หมายเลข 2 และ BSA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการตัดเอนไซม์จำเพาะดีเอ็นเอพลาสมิดจะถูกแยกภายใต้หัวอะกาโรสความเข้มข้น 1% ซึ่งจะพบแถบของดีเอ็นเอจากพลาสมิดในระดับประมาณ 3,000 คู่เบสสำหรับ pGEM®-T Easy vector หรือ 4,000 คู่เบสสำหรับ pGL3-Basic ร่วมกับแถบของดีเอ็นเอที่เป็น Insertion element ที่ 1,000 คู่เบส

หลังจากสกัดพลาสมิด pGEM®-T Easy vector แล้วพลาสมิดจะถูกนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI โดยใช้ AF115382 หรือ NT006576.15 เป็นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงสำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการโคลนครั้งนี้

Score	Expected	Identifier	Description
1801	0	g[51464897]ref NT_006576.15 :5..6733	Homo sapiens chromosome 5 genomic contig, reference assembly
1801	0	g[157811974]ref NW_001838923.2 H5_WGA516_36	Homo sapiens chromosome 5 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef_SCAF_1103279188230)
64	2.3e-7	g[133908627]ref NM_001044.3	Homo sapiens solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3 (SLC6A3), mRNA

Score *	1801.	Identity *	(1804/1000) 99.6%
Expect *	0		


```

Query: 1 ATCCAGCCTACACGGCCGCGAAGCCCGCGCTTCGGCCACCCCTAGCGCCGACGCACAGC 60
      |||
Sbjct: 1436511 ATCCAGCCTACACGGCCGCGAAGCCCGCGCTTCGGCCACCCCTAGCGCCGACGCACAGC 1436452
    
```

ภาพที่ 3.4 ผลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิดกับฐานข้อมูล NCBI พบว่าตรงกัน 99.6% โดยส่วนที่แตกต่างกันอาจเกิดจากความผิดพลาดในการอ่านผลหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลก็ได้

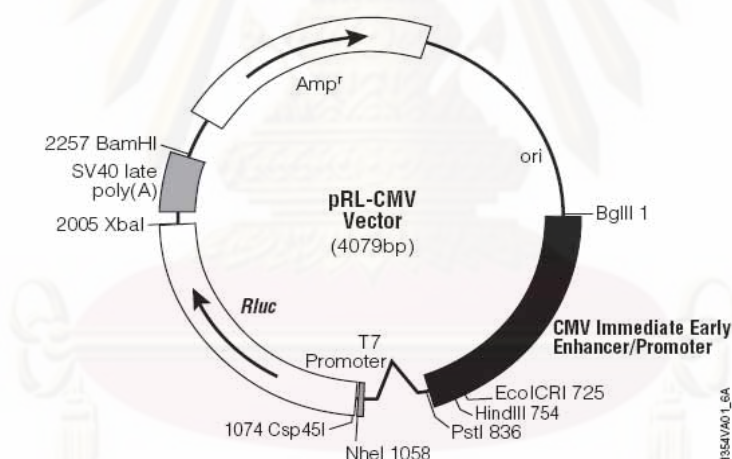
สำหรับกรณีของ pGL3-Basic จะใช้เพียงการตัดเอนไซม์เพื่อคลายพิมพีดีเอ็นเอโดยการใช้เอนไซม์ *Xba* I (NEB) และ *Bsp*1286I (NEB) จากการทำให้ Colony PCR ร่วมด้วย

3.10 การขนส่งพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง (Transfection)

Recombinant plasmid จะถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์ด้วยชุดน้ำยา Lipofectamine 2000™ (Invitrogen) เข้าไปในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าวคือ HeLa (Human cervical cancer), SH-SY5Y

(Human neuroblastoma) และ HaCaT (Human keratinocyte) ซึ่งใช้ปริมาณเซลล์ตั้งต้น 50,000 เซลล์ สำหรับ HeLa และ HaCaT ในขณะที่ SH-SY5Y จะใช้ 200,000 เซลล์ใน 96 well plate และนำมา Incubate เลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียสจนกระทั่งเซลล์เจริญหนาแน่น 90-95% ของพื้นที่ในหลุมเลี้ยง

ก่อนการขนส่งเซลล์จะถูกล้างด้วย Serum free medium 1 ครั้งแล้วเติม Serum free medium ลงแต่ละหลุมเลี้ยงปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วตาม Recombinant plasmid 200 นาโนกรัมร่วมกับ pRL-CMV co-transfection vector (Promega) ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมที่ผสมกันในน้ำยา Lipofectamine 2000™ (Invitrogen) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตรลงไปในแต่ละหลุมแล้วผสมให้เข้ากัน แล้ว Incubate ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมงจึงนำมาเปลี่ยน Medium ด้วยการล้างกับบัฟเฟอร์ PBS 2 ครั้งและเติม Medium with serum ไปในแต่ละหลุม โดยอาหารดังกล่าวนี้สามารถผสมสารเคมีที่ต้องการทดสอบกับเซลล์ได้ด้วย ในที่นี้คือยา Dexamethasone (Sigma) ที่ความเข้มข้น 10^{-4} , 10^{-6} และ 10^{-8} โมลต่อลิตร [105] จากนั้นนำไป Incubate ต่ออีก 24 ชั่วโมงจึงนำมาทดสอบ Reporter assay



ภาพที่ 3.5 พลาสมิด pRL-CMV ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ใช้ในการ co-transfection โดยตัว pRL-CMV จะมี ยีน *Renilla luciferase* พร้อมด้วย CMV Immediate Early Enhancer/Promoter ด้วย

3.11 Reporter gene assay

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน Firefly luciferase เพื่อศึกษา Promoter activity ของยีน hDAT ในสภาวะปกติและในสภาวะที่มียา Dexamethasone ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ในขั้นตอนนี้ใช้

น้ำยา Dual-Glo™ Luciferase assay system (Promega) ซึ่งจะวัดปริมาณของ Firefly luciferase จาก Recombinant-pGL3-Basic-hDAT promoter และ *Renilla* luciferase จาก pRL-CMV control vector ที่ถูกขนส่งเข้าเซลล์ไปร่วมกับพลาสมิดที่ต้องการทดสอบ โดยการนำเซลล์ที่ต้องการตรวจวัดมาเติมน้ำยา Dual-Glo™ Luciferase reagent (Buffer and substrate) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมของ 96 well plate โดยผสมแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีโดยหลีกเลี่ยงการได้รับแสงโดยตรง จากนั้นวัด Firefly luciferase activity โดยเครื่อง VICTOR3 Luminometer (PerkinElmer) จากนั้นให้เติมน้ำยา Dual-Glo™ Stop&Glo reagent (Firefly luciferase stop reagent และ *Renilla* luciferase substrate) อีก 100 ไมโครลิตรแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปวัด *Renilla* luciferase activity ค่าที่ได้จากการทดลองนี้จะถูกนำประมวลโดยเทียบเป็นสัดส่วนของ Firefly luciferase activity ต่อ *Renilla* luciferase activity (F/R ratio)

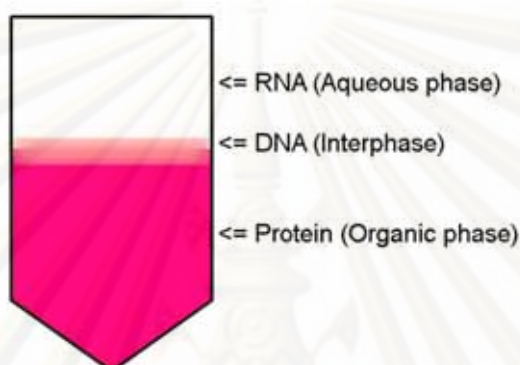
ข้อมูลที่ได้จากการทดสอบ Luciferase activity ของพลาสมิดจะอยู่ในรูปของ F/R ratio ดังที่ได้กล่าวไปในข้างต้นแล้ว ซึ่งค่า F/R ของพลาสมิดที่มีการ Recombinant ด้วย Promoter ของ hDAT จะถูกเปรียบเทียบกับ pGL3-Basic ที่ไม่มีการ Recombinant ของ Promoter จะได้เป็น Fold over pGL3-Basic

ซึ่ง Fold over pGL3-Basic ของหลุมที่มีการ Treat ยา Dexamethasone จะถูกนำมาเทียบกับหลุมที่ไม่มีการ Treat ยาในรูปของ Fold over untreated recombinant pGL3-Basic โดยให้ค่าของ Fold over pGL3-Basic ในหลุมที่ไม่มีการ Treat สารมีค่าเท่ากับ 1.00 (หนึ่ง) โดยค่าที่ได้จะถูกนำมาเปรียบเทียบในรูปแบบของ Student's T-test ซึ่งหากค่า *p*-value มีค่าต่ำกว่า 0.05 จะถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

3.12 การสกัด RNA ด้วยน้ำยา Trizol® (Invitrogen, Carlsband, CA, USA) [106] และการทดสอบคุณภาพ RNA

ก่อนใส่น้ำยา Trizol® เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดเกาะติดจะถูกเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 6 หลุมและดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออกให้หมด ในขณะที่เซลล์ชนิดแขวนลอยจะนำไปปั่นแยกตะกอนเซลล์ออกจากอาหาร จากนั้นเซลล์ทุก 10 ล้านเซลล์จะถูกผสมกับกับน้ำยา Trizol® 1 มิลลิลิตรและรอน้ำยาใสแจ๋วจึงถายน้ำยามายังหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรและผสมคลอโรฟอร์มลงไป 200 ไมโครลิตรต่อ Trizol® 1 มิลลิลิตรแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เมื่อครบเวลาจะถูกปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 G เป็นเวลา 15 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนใสชั้นบนสุดถ่ายมาหลอดใหม่โดยไม่ให้กระทบกระเทือนกับชั้นกลางชั้นล่างฟิงค์ เติมไอโซโพรพานอลที่เย็นจัดลงไปหลอดใหม่ที่มีชั้นบนใสอยู่ 500 ไมโครลิตรต่อ

Trizol® 1 มิลลิลิตรแล้ว Incubate ที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นแยกที่ ความเร็ว 12,000 G เป็นเวลา 15 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียสแล้วเทส่วนใสทิ้ง ชັบให้แห้งและเติม 75% เอทานอลที่มีน้ำ DEPC เป็นตัวเจือจาง 1 มิลลิลิตรเพื่อล้างตะกอนโดยการปั่นแยกที่ความเร็ว 7,500 G เป็น เวลา 5 นาที สุดท้ายให้ตากตะกอนให้แห้งแล้วละลายตะกอนในน้ำที่ปราศจาก RNase (ในที่นี้คือน้ำที่ทำการเติม DEPC) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที สารละลาย RNA นี้สามารถเก็บได้ที่ -80 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 3.6 ชั้นต่างๆ ของ Trizol® ในการสกัดอาร์เอ็นเอ [106]

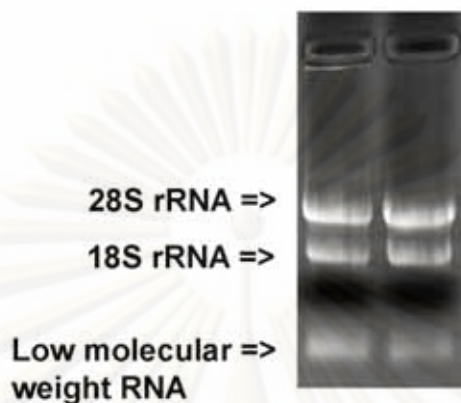
หากต้องการเก็บ RNA ใน -20 องศาเซลเซียส ให้เก็บ RNA ใน 75% เอทานอลที่มีน้ำ DEPC เป็น ตัวเจือจาง ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้อย่างน้อย 1 ปี

วุ้นอะกาโรสสำหรับแยกอาร์เอ็นเอจะถูกเตรียมโดยการต้มวุ้นอะกาโรส 1 กรัมในน้ำกลั่น 72 มิลลิลิตรจากนั้นให้ต้มจนวุ้นละลายแล้วเติม 10X MOPS 10 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ให้เย็นจึงเติม สารละลายฟอร์มอลิน (ศึกษาภัณฑ์พาณิชย์, ประเทศไทย) 18 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเททันทีเพื่อรอ วุ้นแข็งแล้วจึงแช่ใน 1X MOPS ก่อนทำการทดลอง

อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จะถูกแบ่งมาผสมกับ Loading dye ที่ผสมฟอร์มอลินแล้ว Incubate ที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีแล้วซัดด้วยการแช่น้ำแข็งทันทีก่อนที่จะนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน วุ้นอะกาโรสที่มีฟอร์มัลดีไฮด์ผสมอยู่

แถบอาร์เอ็นเอที่ได้จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าควรจะปรากฏแถบของ 28S และ 18S rRNA อย่างชัดเจน โดยอาจจะพบแถบของอาร์เอ็นเอชนิดมอลโมเลกุลต่ำจำพวก 5.8S และ 5S rRNA ได้ อาร์เอ็นเอที่คุณภาพสูงความเข้มข้นของแถบ 28S rRNA ควรจะมีความเข้มเป็นสองเท่าของแถบ 18S rRNA และไม

ควรมีเสมียร์อยู่ระหว่างแถบทั้งสองนี้ โดยแถบ 28S rRNA จะมีขนาดประมาณ 4,700 คู่เบส ในขณะที่ 18S rRNA มีขนาดประมาณ 1,900 คู่เบส [107]



ภาพที่ 3.7 แสดงภาพการแยกอาร์เอ็นเอบนวุ้นอะกาโรสที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ จะพบแถบอาร์เอ็นเอที่ชัดเจน 2 แถบคือ 28S rRNA (4,700 bp) และ 18S rRNA (1,900 bp)

การแสดงออกของยีน hDAT โดยการทำให้ RT-PCR จากอาร์เอ็นเอจากเซลล์เพาะเลี้ยง 7 ชนิดคือ A549, HaCaT, HeLa, HEK293, Jurkat, K562 และ SH-SY5Y

3.13 การทดสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT-PCR

การทดสอบการแสดงออกของยีนในรูปแบบของ Messenger RNA (mRNA) จะต้องทำการเปลี่ยน mRNA ให้อยู่ในรูปแบบของ Complementary DNA (cDNA) หรือดีเอ็นเอคู่สม ด้วยเอนไซม์ Reverse transcriptase ก่อนแล้ว cDNA จึงถูกเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR โดยยีนที่ใช้ทดสอบในการทดลองนี้คือ ยีนบีตาแอคติน (Beta actin, β -actin) และยีนตัวขนส่งโดพามีน (hDAT) ซึ่งใช้สมมติฐานที่ว่า β -actin เป็นยีนที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ดังนั้นทุกเซลล์จะมีการแสดงออกสม่ำเสมอ เมื่อนั้นยีน hDAT ซึ่งมีการแสดงออกไม่เท่ากันในแต่ละเซลล์จะถูกเทียบเป็นอัตราส่วนกับ β -actin เพื่อวัดหาปริมาณสัมพันธ์ของ hDAT ในแต่ละเซลล์

อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จะถูกทำลายดีเอ็นเอส่วนเกินด้วยการ Incubate กับเอนไซม์ DNase I (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada) ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ซึ่ง DNase I จะทำลายดีเอ็นเอสายคู่ด้วยการตัดที่ใช้แมกนีเซียมไอออนเป็นโคแฟกเตอร์ ภายหลังจาก

Incubate เอนไซม์ DNase I จะถูกยับยั้งด้วยการเติม EDTA ซึ่งเป็น Metal chelator และ Incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส 10 นาทีเพื่อทำลายฤทธิ์ของ DNase I อย่างสมบูรณ์

อาร์เอ็นเอที่ผ่านการ Incubate กับ DNase I มาแล้ว 400 นาโนกรัมจะถูก Incubate กับ Primer Oligo-dT (dT-17) เป็นเวลา 5 นาทีที่ 65 องศาเซลเซียสเพื่อให้ Oligo-dT จับกับปลาย poly-A ที่ด้าน 3' ของ mRNA ได้เป็นอย่างดี (ในขั้นตอนนี้จะเป็นการคัดเลือก mRNA ออกจากอาร์เอ็นเอชนิดอื่น) จากนั้นอาร์เอ็นเอจะถูกผสมกับ RT mixture ที่มีแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ 3.2 มิลลิโมลต่อลิตรและเอนไซม์ ImProm™ II Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) เป็นเวลา 60 นาทีที่ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเอนไซม์ RT จะถูกยับยั้งที่ 75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ซึ่งหลังจากขั้นตอนนี้ cDNA จะพร้อมในการเพิ่มจำนวนด้วย PCR

โดยยีน hDAT (195 คู่เบส) [108] และ β -actin (656 คู่เบส) [109] จะถูกเพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ดังต่อไปนี้คือ AC β 1 : 5'-ACGGGTCACCCACACTGTGC-3', AC β 2 : 5'-CTAGAAG CATTGCGGTGGACGATG-3', hDAT-RT1 : 5'-GTCACCAACGGTGGCATCTA-3' และ hDAT-RT2 : 5'-GCTGACCAGCTTCCAGCA-3' [108] โดย Initial Denaturation 95°C 2 นาที ตามด้วย 40 รอบของ Denaturation 95°C 30 วินาที Annealing (hDAT 48°C, β -actin 58°C) 30 วินาที Extension 72°C 30 วินาที ปิดท้ายสุดด้วย Final extension 72°C 10 นาที อันมีส่วนประกอบของ Taq DNA polymerase with standard buffer (NEB, Beverly, MA, USA) และน้ำยาที่เกี่ยวข้องซึ่งมีส่วนประกอบคือ 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.2 uM Primers (each), 1.25U Taq DNA polymerase

โดยผลที่ได้จะอยู่ในรูปของ hDAT/ β -actin ratio ซึ่งจะใช้การวัดจากวงอวกาศ 3 ครั้งเพื่อหาความเข้มข้นที่แท้จริงในรูปของค่าเฉลี่ยและเพื่อลดผลข้างเคียงจากพื้นหลังมากที่สุด โดยค่า hDAT/ β -actin ratio จะถูกนำมาเปรียบเทียบด้วยสถิติแบบ Student's T-test โดยให้ p -value น้อยกว่า 0.05 จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

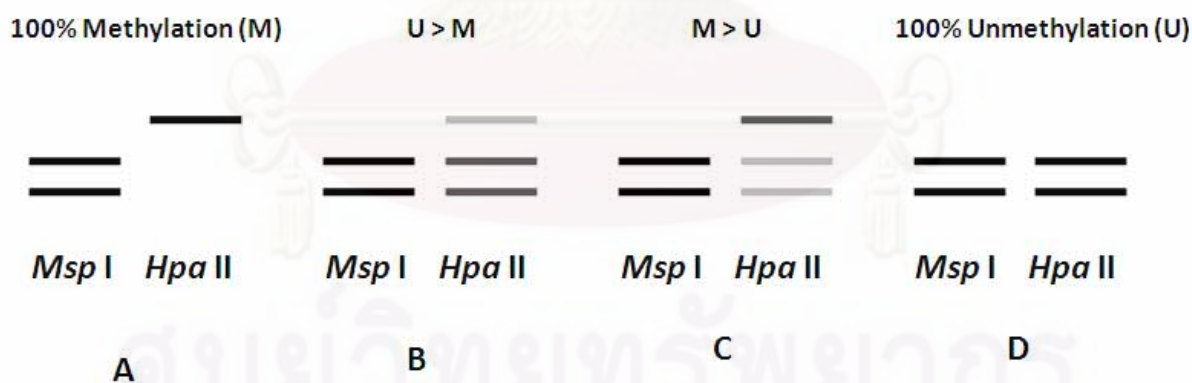
3.14 การทำนายหา CpG dinucleotide และหา Transcription factor binding site เพื่อทดสอบ DNA methylation ในบริเวณที่เหมาะสม

ดาวนโหลดลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง Promoter ของยีน hDAT จากฐานข้อมูลใน NCBI Database ซึ่งในที่นี้ใช้ AF115382 เป็นลำดับเบสในช่วงของ Promoter จนถึง Exon 2

ในการศึกษานี้ได้ให้ความสนใจต่อการเติมหมู่เมทิลที่อยู่ ณ บริเวณ CpG dinucleotide ของ CCGG โดยจากการทำนาย Transcription factor ในคอมพิวเตอร์ด้วยชุดคำสั่ง PROMO 3.0 Version 8.3 [110] พบว่าตำแหน่งที่เป็น CpG dinucleotide เป็น Binding site ของ GCF ซึ่งการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของการเติมหมู่เมทิล ณ บริเวณ C อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับกับ GCF ซึ่งเป็น Transcription factor ได้

3.15 การทดสอบการเติมหมู่เมทิล ณ บริเวณ CpG dinucleotide ด้วยเทคนิค Methylation specific isoschizomers

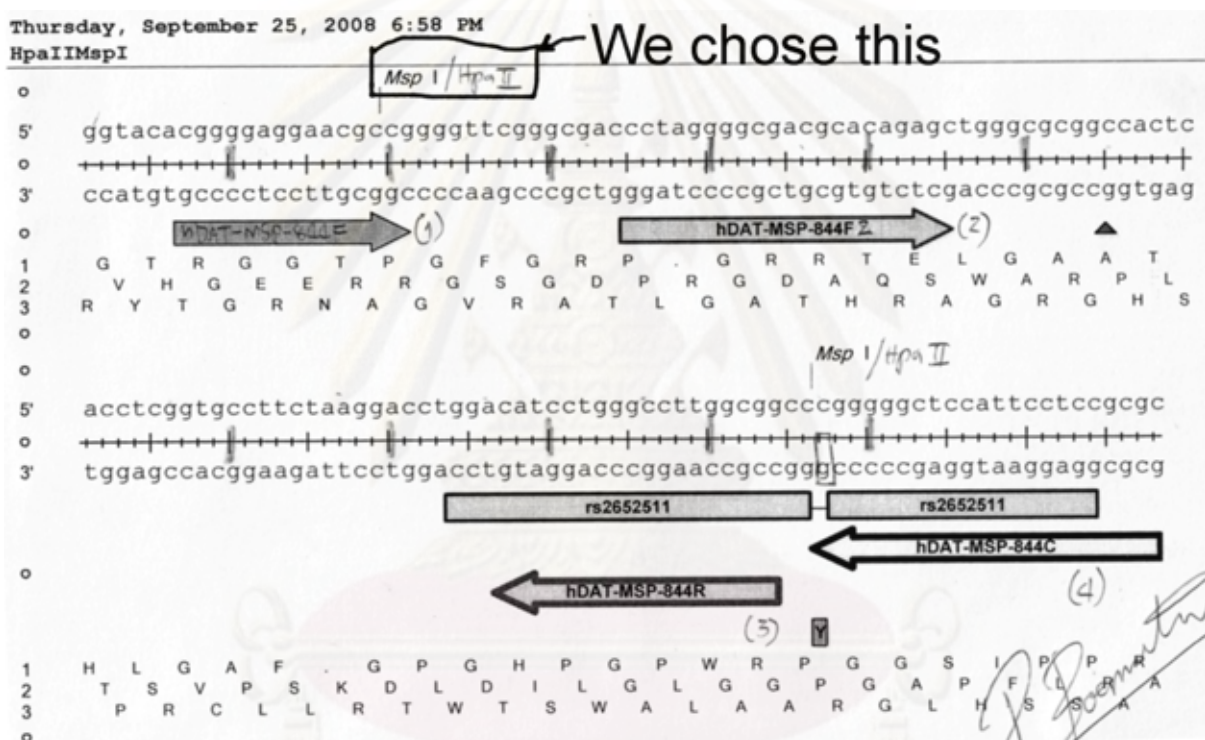
เอนไซม์ *Msp* I (NEB, Beverly, MA, USA) และ *Hpa* II (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada) 50 U จะถูกผสมกับดีเอ็นเอที่ได้จากจีโนมของเซลล์ 500 นาโนกรัมโดยแยกหลอดกัน ซึ่งทั้ง *Msp* I และ *Hpa* II จะสามารถตัดที่ลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะคือ CCGG ได้ทั้งคู่ แต่ *Hpa* II จะไม่สามารถตัดลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ได้หาก CpG dinucleotide นี้มีการเติมหมู่เมทิล [95] ทำให้สามารถอาศัยความแตกต่างนี้ในการทดสอบหาปริมาณของการเติมหมู่เมทิล ณ ตำแหน่งนี้บนดีเอ็นเอได้



ภาพที่ 3.8 เปรียบเทียบแถบของดีเอ็นเอภายหลังการตัดเอนไซม์ *Msp* I และ *Hpa* II เพื่อทดสอบระดับการเติมหมู่เมทิล แสดงให้เห็น (A) มีการเติมหมู่เมทิล 100% เนื่องจาก *Hpa* II ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอนี้ได้เลย (B-C) แสดงถึงการมี การเติมหมู่เมทิลที่ระดับแตกต่างกัน (D) ไม่มีการเติมหมู่เมทิลเนื่องจากเอนไซม์ *Hpa* II สามารถตัดดีเอ็นเอได้ 100%

ความเข้มข้นสุดท้ายของสารเคมีในปฏิกิริยา PCR จะประกอบด้วย 2X Taq DNA polymerase buffer (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada) และ 4 mM MgSO₄ (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada) โดยมีอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาคือ Initial Denaturation 92°C 3 นาทีและตามด้วยรอบของปฏิกิริยาคือ Denaturation 92°C 15 วินาที, Annealing 62°C 15 วินาทีและ Extension 70°C 20 วินาทีจำนวน 35 รอบโดยมี Final extension 72°C 5 นาที

ผลผลิต PCR ที่ได้จะถูกนำมาแยกบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 4% แรงเคลื่อนไฟฟ้า 70 โวลต์โดยจะแยกควบคู่กับ DNA ladder ขนาด 10 คู่เบสและ 25 คู่เบส



ภาพที่ 3.9 แสดงถึงตำแหน่งที่ใช้ในการศึกษาการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอบริเวณ Promoter ของยีน hDAT ซึ่งในตำแหน่งที่การศึกษานี้สนใจได้เลือกใช้ไพรเมอร์ 3 เส้นในการศึกษาคือ hDAT-MSP-844F (1), hDAT-MSP-844F2 (2) และ hDAT-MSP-844R (3) โดย 1+3 ใช้ศึกษาการเติมหมู่เมทิลและ 2+3 ใช้เป็น Control สำหรับการทำให้ PCR แต่ละครั้ง (2+3 จะขึ้นทุกครั้งที่ทำ PCR ไม่ว่าจะตัดด้วย *Msp I* หรือ *Hpa II* ในขณะที่ 1+3 จะทำ PCR ขึ้นก็ต่อเมื่อมีการเติมหมู่เมทิลบริเวณที่สนใจ)

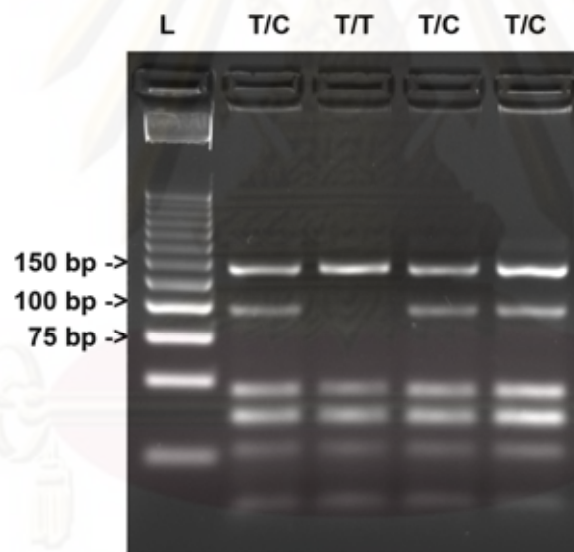
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน hDAT และโรคซึมเศร้า

4.1.1 ผลการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน hDAT

จากที่ได้กล่าวไปในขั้นต้นแล้วว่าการวิเคราะห์ SNP ณ ตำแหน่ง rs2652511 จะได้รูปแบบการกระจายตัวจีโนไทป์ 3 แบบคือ TT, TC และ CC โดยรูปแบบที่มีแอลลีล T จะพบขึ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด ในขณะที่รูปแบบที่มีแอลลีล C จะพบขึ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Msp* I บนหุ่นอะกาโรสความเข้มข้น 4%



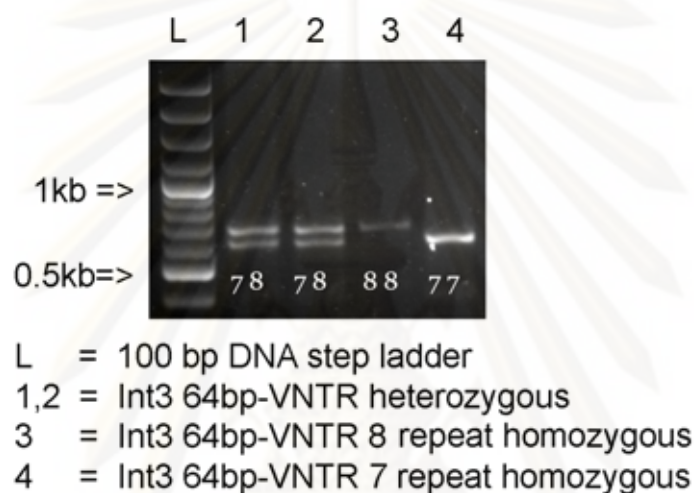
L = 25bp DNA step ladder
T/T = rs2652511 T homozygous
T/C = rs2652511 T/C heterozygous

ภาพที่ 4.1 แสดงผลการวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีน hDAT ณ SNP rs2652511 โดยแถว L เป็น 25 bp DNA step ladder

ผลการกระจายจีโนไทป์ของ rs2652511 ในกลุ่มควบคุม 182 รายซึ่งมีอายุเฉลี่ย 42.1 ± 9.84 ปี พบจีโนไทป์แบบ TT จำนวน 112 ราย (61.54%) แบบ TC 64 ราย (35.16%) และ CC 6 ราย (3.30%) ซึ่งประกอบด้วยความถี่แอลลีล T 288 แอลลีล (79.12%) และ C 76 แอลลีล (20.88%) ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วย

161 รายซึ่งมีอายุเฉลี่ย 45.1 ± 13.94 ปี พบจีโนไทป์แบบ TT จำนวน 107 ราย (66.46%) แบบ TC 48 ราย (29.81%) และ CC 6 ราย (3.73%) ซึ่งประกอบด้วยความถี่แอลลีล T 262 แอลลีล (81.37%) และ C 60 แอลลีล (18.63%) ซึ่งได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.1-4.3

ในส่วนของ การวิเคราะห์ VNTR ชนิด 63bp- repeat บน Intron 3 จะได้รูปแบบการกระจายตัวจีโนไทป์ 3 แบบคือ 7/7, 7/8 และ 8/8 โดยรูปแบบที่มีแอลลีล 7 จะพบขึ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด ในขณะที่รูปแบบที่มีแอลลีล 8 จะพบขึ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด จากการแยกบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2%



ภาพที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีน hDAT ชนิด 63bp-repeat VNTR บน Intron 3 โดยแถว L เป็น 100 bp DNA step ladder แถว 1 และ 2 คือความหลากหลายชนิด 7/8 heterozygous (596 และ 659 bp) แถวที่ 3 คือ 8/8 homozygous (659 bp) และแถวที่ 4 คือ 7/7 homozygous (596 bp)

ผลการกระจายจีโนไทป์ของ 63bp-repeat VNTR บน intron 3 ในกลุ่มควบคุม 164 รายซึ่งมีอายุเฉลี่ย 42.2 ± 9.96 ปี พบจีโนไทป์แบบ 7/7 จำนวน 52 ราย (31.71%) แบบ 7/8 79 ราย (48.17%) และ 8/8 33 ราย (20.12%) ซึ่งประกอบด้วยความถี่แอลลีล 7R 183 แอลลีล (55.79%) และ 8R 145 แอลลีล (44.21%) ในขณะที่กลุ่มตัวอย่าง 150 รายซึ่งมีอายุเฉลี่ย 43.9 ± 12.81 ปี พบจีโนไทป์แบบ 7/7 จำนวน 47 ราย (31.33%) แบบ 7/8 64 ราย (42.67%) และ 8/8 39 ราย (26.00%) ซึ่งประกอบด้วยความถี่แอลลีล 7R 158 แอลลีล (52.67%) และ 8R 142 แอลลีล (47.33%) ซึ่งได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.1-4.3

จากข้อมูลการกระจายจีโนไทป์และความถี่แอลลีลเริ่มต้นทำให้สามารถหาสมดุขของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กโดยใช้ *Chi-square test* ในการทดสอบสมมติฐาน ซึ่งพบว่าหลากหลายทั้งสองชนิดของกลุ่มตัวอย่างทั้งสองที่ทดสอบได้เข้าหลักสมดุขฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กดังผลในตารางที่ 4.1 A และ B

ตารางที่ 4.1 การกระจายจีโนไทป์ ความถี่อัลลีลและสมดุขฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของความหลากหลายพันธุกรรมของยีน hDAT ณ ตำแหน่ง rs2652511 และ 63bp-repeat VNTR ในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีและกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคซึมเศร้า

Markers	Allele	Allele Frequencies	Genotype	Observed	Expected	χ^2	p-value*
Healthy controls							
- rs2652511 (-844C/T) (n = 182)	T	0.8041	TT	112	114	0.43	0.805
			TC	64	60		
	C	0.1959	CC	6	8		
- Intron 3 63-bp VNTR (n = 164)	7R	0.5412	7R/7R	52	51	0.05	0.975
			7R/8R	79	81		
	8R	0.4588	8R/8R	33	32		
MDD patients							
- rs2652511 (-844C/T) (n = 161)	T	0.8269	TT	107	107	0.10	0.950
			TC	48	49		
	C	0.1731	CC	6	5		
- Intron 3 63bp- VNTR (n = 150)	7R	0.5231	7R/7R	47	42	1.49	0.475
			7R/8R	64	75		
	8R	0.4769	8R/8R	39	34		

*p-value < 0.05 ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.1.2 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง rs2652511 และ 63bp-VNTR บน intron 3 กับโรคซึมเศร้าในรูปแบบของ Single marker

ภายหลังการทดสอบสมดุขฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กจากกลุ่มประชากรทั้งกลุ่มควบคุมและตัวอย่างแล้ว ข้อมูลการกระจายตัวจีโนไทป์จะถูกระบุมาเปรียบเทียบทั้งสองกลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างของการกระจายตัวจีโนไทป์ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้าดังตารางที่ 4.2 ส่วนความถี่แอลลีลชนิดต่างๆของความหลากหลายทั้งสองได้ถูกคำนวณเปรียบเทียบในรูปแบบของ Single polymorphism ด้วย *Chi-square test* และ Odd's ratio พบว่าทั้งความหลากหลาย ณ ตำแหน่ง rs2652511 และความหลากหลาย

ณ intron 3 ชนิด 63bp-VNTR ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสถิติ ($p > 0.05$; $95\%CI_{rs2652511}$ (0.59-1.27); $95\%CI_{intron3}$ (0.83-1.55)) ดังค่าที่แสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 ความแตกต่างของการกระจายตัวจีโนไทป์ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วย โรคซึมเศร้า

Markers	Genotypes	Genotype distributions		χ^2	p-value*
		Healthy controls	MDD patients		
rs2652511 (-844 promoter)	TT	112 (61.54%)	107 (66.46%)	1.12	0.57
	TC	64 (35.16%)	48 (29.81%)		
	CC	6 (3.30%)	6 (3.74%)		
63bp-VNTR (Intron 3)	7R/7R	52 (31.71%)	47 (31.33%)	1.71	0.42
	7R/8R	79 (48.17%)	64 (42.67%)		
	8R/8R	33 (20.12%)	39 (26.00%)		

*p-value < 0.05 ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.3 ความถี่แอลลีลและความสัมพันธ์ระหว่างโรคซึมเศร้าและความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน hDAT ณ ตำแหน่ง rs2652511 และ 63bp-repeat VNTR

	Allele frequencies			
	rs2652511		Intron 3 63bp-VNTR	
	T	C	7R	8R
Healthy controls	288 (0.79)	76 (0.21)	183 (0.56)	145 (0.44)
MDD patients	262 (0.81)	60 (0.19)	158 (0.53)	142 (0.47)
χ^2 (Yate's correction)	0.42		0.50	
p-value	0.52		0.48	
Odd's ratio	0.87		1.13	
95% Confidence interval	0.59-1.27		0.83-1.55	

*p-value < 0.05 ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.1.3 ผลการวิเคราะห์ Linkage disequilibrium (LD) และ Haplotype

จากตารางที่ 4.3 ไม่พบความแตกต่างของ Haplotype แต่ละชั้นระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้า (p -value > 0.05) โดยทั้งสองตำแหน่งของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ได้ศึกษามีระยะทางห่างกันประมาณ 3 กิโลเบสและมีค่า r^2 กับ D' คือ 0.06 และ 0.537 ตามลำดับ ซึ่งจะสังเกตได้ว่า Haplotype ที่เป็นแบบ T-7R และ T-8R เป็น Haplotype ที่มีในกลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ Haplotype ด้วยโปรแกรม Haploview 4.1

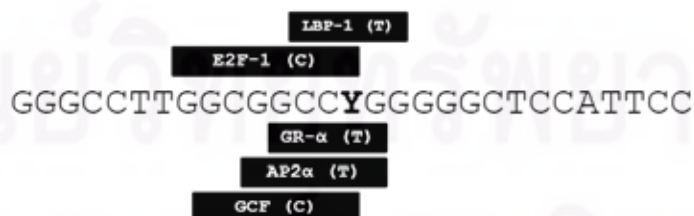
	Haplotype Frequencies	Case:Control ratio counts	Case:Control frequencies	χ^2	p- value*	Empirical p-value
rs2652511 and intron3						
T-8R	0.414	153.5 : 208.5, 149.9 : 220.1	0.424 : 0.405	0.264	0.9348	No significant
T-7R	0.387	140.6 : 221.4, 142.7 : 227.3	0.388 : 0.386	0.005	1.0000	No significant
C-7R	0.157	52.0 : 310.0, 62.7 : 307.3	0.144 : 0.169	0.924	0.6882	No significant
C-8R	0.042	16.0 : 346.0, 14.7 : 355.3	0.044 : 0.040	0.098	0.9841	No significant

หมายเหตุ * วิเคราะห์ด้วยสถิติ *Chi-square test*

** วิเคราะห์หลังจากการทำ Permutations 100,000 ครั้ง

4.1.4 การวิเคราะห์ทาง Bioinformatics สำหรับ rs2652511

จากการวิเคราะห์ด้วยชุดคำสั่งสำหรับการวิเคราะห์ Transcription factor binding site สำหรับความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณ rs2652511 พบว่าในอัลลีล C จะสามารถจับได้กับ GC-rich DNA-binding factor (GCF) ในขณะที่อัลลีล T จะสามารถจับได้กับ Activating protein (AP)-2 α และ Leading binding protein (LBP)-1 จากการศึกษาด้วย TESS ในขณะที่การศึกษาด้วย PROMO 3.0 พบว่าอัลลีล C สามารถจับได้กับ E2F-1 และอัลลีล T สามารถจับได้กับ AP-2 α และ Glucocorticoid receptor (GR)- α ดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 ภาพสรุปการทำนาย Transcription factor binding site ของ rs2652511 ด้วยชุดคำสั่ง PROMO® และ TESS

4.1.5 ความหลากหลายแบบ rs2652511 ของยีน hDAT ในชนชาติอื่น

ตารางที่ 4.5 ความถี่อัลลีลของความหลากหลายตำแหน่ง rs2652511 ของยีน hDAT จากการศึกษาในชนชาติต่างๆ

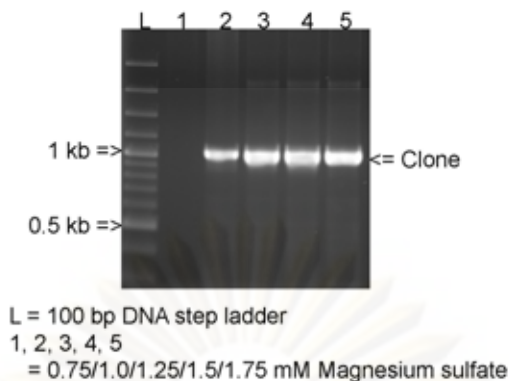
Reference	Ethnics	Major Allele	Allele frequencies				Disease
			Cases		Controls		
			C	T	C	T	
This report	Thai	T	0.17	0.83	0.21	0.79	MDD ^I
Rubie, 2001 [21]	German	C	0.55	0.45	-	-	Bipolar ^{II}
Xu, 2009 [111]	English	C	0.53	0.47	-	-	ADHD ^{III} (TdT ^{IV})
	Taiwanese	C	0.52	0.48	-	-	
Van de Giesse, 2009 [112]	Dutch	C	-	-	0.60	0.40	
Brooke, 2008 [113]	Mixed Caucasian	T	0.41	0.59	-	-	ADHD (TdT)
Genro, 2007 [114]	Brazilian	C	0.55	0.45	-	-	ADHD (TdT)
Genro, 2008 [115]	Brazilian Mixed	C	0.55	0.45	-	-	ADHD (TdT)
Zhou, 2008 [116]	Caucasian	T	0.41	0.59	-	-	ADHD (TdT)
Stober, 2006 [117]	German	C	<u>0.59</u>	<u>0.41</u>	<u>0.54</u>	<u>0.46</u>	Bipolar
Kelada, 2005 [118, 119]	Non-Hispanic Caucasian	T	0.46	0.54	-	-	PD ^V (Case and control)
NCBI	N. American	T	-	-	0.46	0.54	N = 24
NCBI	European	C	-	-	0.64	0.36	N = 184

หมายเหตุ (I) MDD; Major depressive disorder, (II) Bipolar; Bipolar disorder, (III) ADHD; Attention deficit hyperactive disorder, (IV) TdT; Transmission disequilibrium test และ (V) PD; Parkinson's disease

4.2 การศึกษาบทบาททางพันธุกรรมของยีน hDAT

4.2.1 การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับการโคลนด้วยปฏิกิริยา PCR

ผลของการเตรียมดีเอ็นเอชิ้นส่วนสำหรับการโคลนเพื่อทดสอบความสามารถในการแสดงออกด้วยวิธี Reporter assay ได้ทดสอบโดยการแยกด้วยวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2% โดยแถบดีเอ็นเอที่พบจะมีความยาว 1,015 คู่เบส (-962 จนถึง +41 รวมกับ Restriction site ที่เติมเข้าไปในไพรเมอร์)

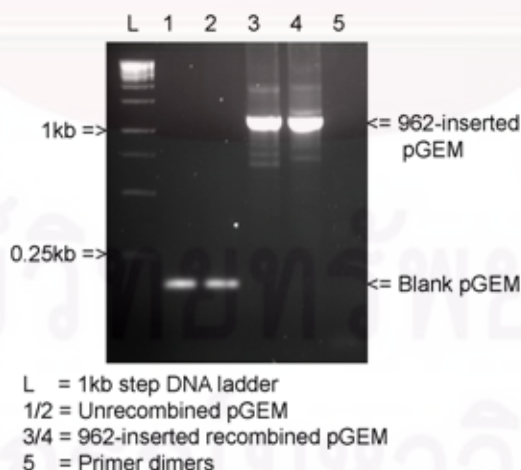


ภาพที่ 4.4 ผลของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ -962 ถึง +41 ของยีน hDAT ที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) ต่างๆ จากภาพ L คือ 100 bp DNA step ladder และ 1-5 คือความเข้มข้นของ $MgSO_4$ ตั้งแต่ 0.75, 1.0, 1.25, 1.50 และ 1.75 mM ตามลำดับ

4.2.2 Colony PCR และการสกัดพลาสมิดเพื่อทำ RFLP

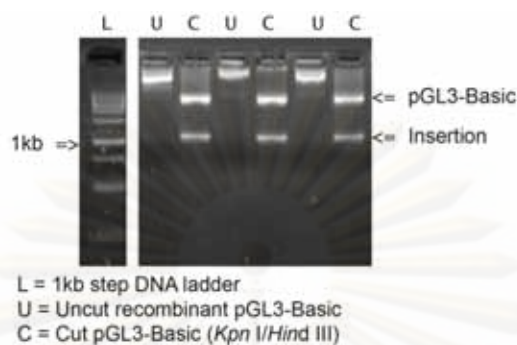
1) pGEM®-T Easy vector

ภายหลังการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิด pGEM®-T Easy vector จึงคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีพลาสมิดที่ต้องการโดยเทคนิค Colony PCR เพื่อคัดเลือกโคลนของแบคทีเรียที่มีพลาสมิดที่มีโครงสร้างตรงความต้องการ



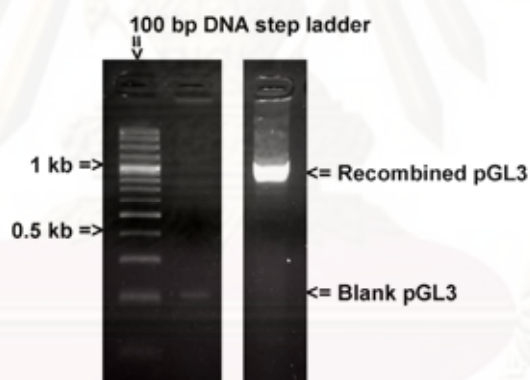
ภาพที่ 4.5 ผลของปฏิกิริยา PCR ในการทำ Colony PCR ของพลาสมิด pGEM®-T Easy vector ด้วยไพรเมอร์ Sp6 และ T7 เพื่อตรวจสอบ Insertion โดย L คือ 1 kb step DNA ladder; 1 และ 2 คือ PCR product ของ pGEM®-T Easy vector ที่ไม่มี Insertion (176 bp); 3

และ 4 คือ PCR product ของ pGEM®-T Easy vector ที่มี Insertion (176+1025 bp)
และ 5 คือ Negative



2) pGL3-Basic

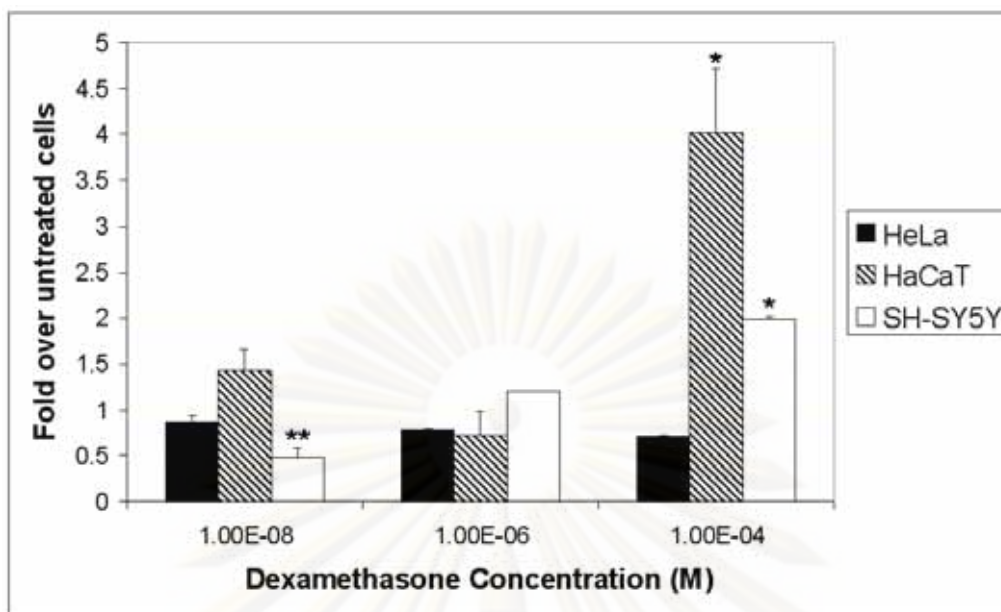
ภายหลังการตัดต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากพลาสมิด pGEM®-T Easy vector เข้าไปยัง pGL3-Basic จึงคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีพลาสมิดที่ต้องการโดยเทคนิค Colony PCR เพื่อคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีพลาสมิดที่มีโครงสร้างตรงความต้องการ



ภาพที่ 4.6 ผลของปฏิกิริยา PCR ในการทำ Colony PCR ของพลาสมิด pGL3-Basic ด้วยไพรเมอร์ RV3 และ GL2 เพื่อตรวจสอบ Insertion (ภาพทั้งสองส่วนเกิดจากการทำ Electrophoresis บนวุ้นอะกาโรสเดียวกัน)

4.2.3 ผลการทดสอบการ Treat dexamethasone ของเซลล์ที่ถูก Transfect ด้วย Recombinant pGL3-Basic

ผลการศึกษา Promoter activity ของยีน hDAT เมื่อผ่านการ Treat สาร Dexamethasone ที่ความเข้มข้น 100 μ M, 1 μ M และ 10 nM เป็นดังภาพที่ 4.6



หมายเหตุ

* คือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ p -value < 0.01 ** p -value < 0.05

ภาพที่ 4.7 การแสดงออกของยีน Firefly luciferase ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ โดยแสดงในรูปของจำนวนเท่าของเซลล์ที่ไม่มีการ Treat ยา Dexamethasone

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 แสดงความสัมพันธ์และความแตกต่างระหว่างระดับความเข้มข้นยา Dexamethasone ที่ใช้ Treat เซลล์ชนิดต่างๆ ในการทดลองนี้

Dependent Variable	(I) concentration	(J) concentration	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	
Hacat	Tukey HSD	10-8	10-6	.089	-3.5616
			10-4	.001	-82.8216
			0	.317	-10.4266
		10-6	10-8	.089	-37.7716
			10-4	.000	-99.9266
			0	.583	-27.5316
		10-4	10-8	.001	41.4884
			10-6	.000	58.5934
			0	.000	51.7284
		0	10-8	.317	-30.9066
			10-6	.583	-13.8016
			10-4	.000	-93.0616
SHSY5y	Tukey HSD	10-8	10-6	.004	-7.0636
			10-4	.000	-12.3336
			0	.012	-5.7636
		10-6	10-8	.004	2.4664
			10-4	.003	-7.5686
			0	.240	-.9986
		10-4	10-8	.000	7.7364
			10-6	.003	2.9714
			0	.001	4.2714
		0	10-8	.012	1.1664
			10-6	.240	-3.5986
			10-4	.001	-8.8686
Hela	Tukey HSD	10-8	10-6	.767	-2.4804
			10-4	.477	-2.0004
			0	.459	-4.5754
		10-6	10-8	.767	-4.0604
			10-4	.928	-2.7904
			0	.179	-5.3654
		10-4	10-8	.477	-4.5404
			10-6	.928	-3.7504
			0	.103	-5.8454
		0	10-8	.459	-1.9654
			10-6	.179	-1.1754
			10-4	.103	-.6954

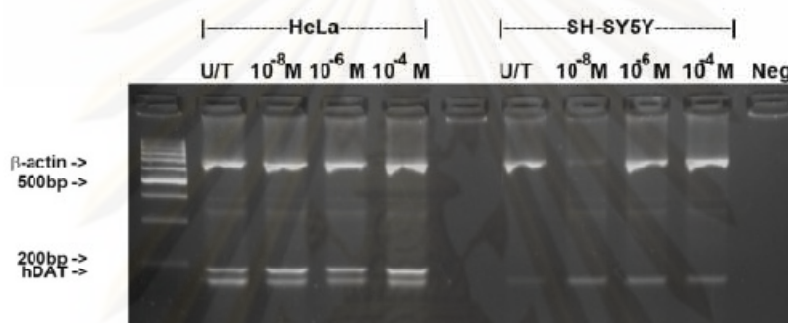
*ค่า p -value ที่ถือว่าผลการทดลองมีนัยสำคัญทางสถิติคือน้อยกว่า 0.05

โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนเท่าของ Firefly/*Renilla* luciferase activity เมื่อเทียบกับ Untreated cell lines ของแต่ละเซลล์นั้นมีการตอบสนองต่อ Dexamethasone ที่ความเข้มข้นต่างๆแตกต่างกันไป โดยเฉพาะในเซลล์ HaCaT และ SH-SY5Y ที่มีนัยสำคัญทางสถิติในการแสดงออกของยีน Firefly luciferase ซึ่งเซลล์ HaCaT ให้ผลการทดลองที่มีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นของยา Dexamethasone 10^{-4} M ส่วนเซลล์ SH-SY5Y มีการแสดงออกของยีน Firefly luciferase ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value

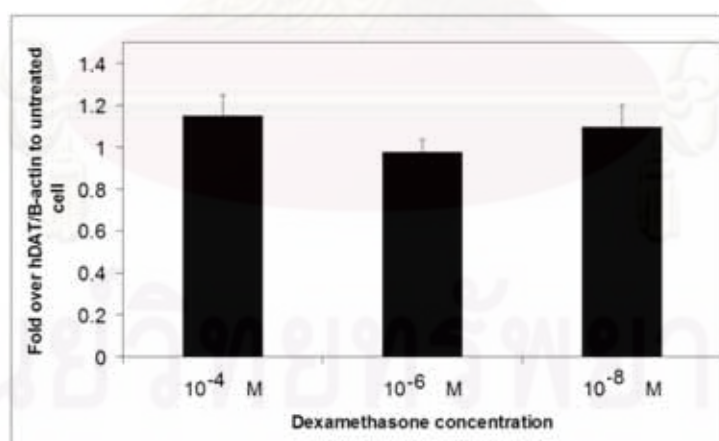
< 0.05) ที่ความเข้มข้น 10^{-8} M และมีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.01) ที่ 10^{-4} M

4.2.4 ผลการทดสอบการ Treat dexamethasone ต่อเซลล์โดยวิธี RT-PCR

ถึงแม้ว่าเซลล์ที่ให้ผลอย่างมีนัยสำคัญได้สองเซลล์คือเซลล์ SH-SY5Y และเซลล์ HaCaT แต่อย่างไรก็ดีเซลล์ที่ผลการแสดงออกจากการทดลอง Reporter gene assay ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติแต่มีการแสดงออกของยีน hDAT แบบ Endogenous คือเซลล์ HeLa ดังนั้นสำหรับเซลล์ HeLa จึงมีการศึกษาผลของการแสดงออกของยีน hDAT หลังจากการ Treat ยา Dexamethasone ด้วย



ภาพที่ 4.8 การแสดงออกของยีน hDAT ของเซลล์ HeLa และ SH-SY5Y (U/T = untreated; M = mole/dm³)

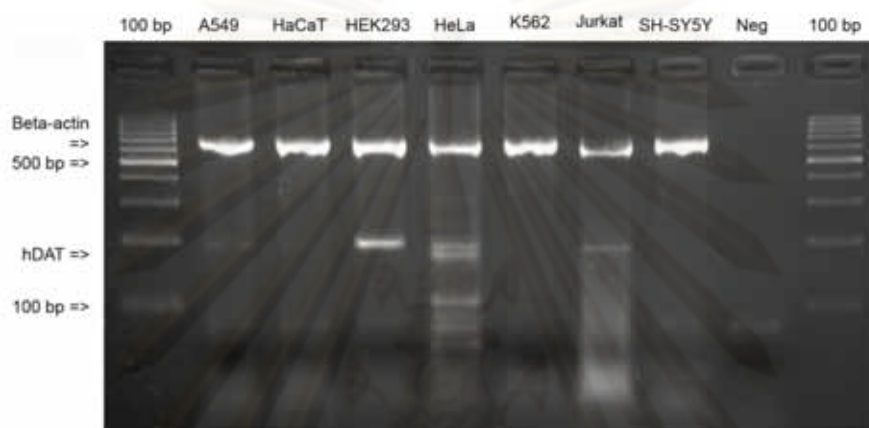


ภาพที่ 4.9 การแสดงออกของยีน hDAT ของเซลล์ HeLa ที่ผ่านการ Treat ยา Dexamethasone ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นจำนวนเท่าต่อเซลล์ HeLa ที่ไม่ได้ Treat ยา Dexamethasone

4.3 การศึกษาบทบาทการควบคุมของยีน hDAT ทาง Epigenetics

4.3.1 การแสดงออกของยีน hDAT ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ

จากการทดสอบการแสดงออกของยีน hDAT พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการแสดงออกของยีน hDAT ที่สามารถตรวจระดับการแสดงออกได้ด้วยเทคนิค RT-PCR คือเซลล์ A549 เซลล์ HEK293 เซลล์ HeLa และเซลล์ Jurkat โดยค่าความเข้มข้นของแถบ PCR product ของยีน hDAT จะถูกเปรียบเทียบกับแถบ PCR product ของยีน β -actin ซึ่งเป็นตัว Normalize ค่าได้ค่าดังตารางที่



ภาพที่ 4.10 ผลของปฏิกิริยา PCR เพื่อทดสอบการแสดงออกของยีน hDAT ซึ่งจะแยกบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 2% แล้วเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน β -actin

ตารางที่ 4.7 แสดงระดับการแสดงออกของยีน hDAT ของเซลล์เพาะเลี้ยงต่างๆ

Cell lines	β -actin intensity	hDAT intensity	hDAT/ β -actin ratio
A549	11703713	2521314	0.22
HaCaT	13007286	N/A	N/A
HEK293	12869272	6406638	0.50
HeLa	10500712	4997835	0.48
K562	12779320	N/A	N/A
Jurkat	8056142	3806216	0.47
SH-SY5Y	12819749	N/A	N/A

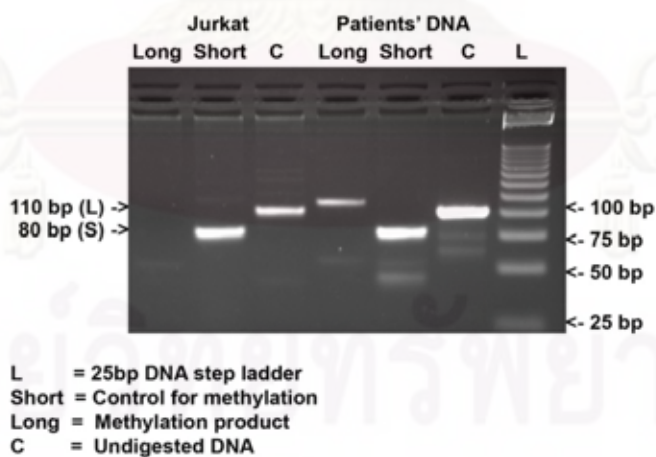
หมายเหตุ N/A คือการแสดงออกของยีน hDAT เป็นลบ ไม่มีการวัดแถบ PCR product

4.3.2 ผลของการทดสอบการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอของ Promoter ของยีน hDAT

จากการศึกษาไม่พบการเติมหมู่เมทิลบริเวณที่ต้องการศึกษาจากการศึกษาด้วยวิธี Methylation specific PCR โดยได้ทดสอบเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ได้จากเลือดครบด้วย



ภาพที่ 4.11 แสดงการแยก PCR product จากการทำ Methylation specific isoschizomers ด้วยเอนไซม์อะกาโรสค ความเข้มข้น 4% โดยแถบควบคุมที่สามารถให้ผลบวกจากทั้งที่มีการเติมหมู่เมทิลและไม่มีการเติมหมู่เมทิลคือแถบดีเอ็นเอขนาด 80 คู่เบส ในขณะที่แถบดีเอ็นเอขนาด 110 คู่เบสไม่ปรากฏในเซลล์ชนิดใด (L = 25bp step DNA ladder)



ภาพที่ 4.12 แสดงการแยก PCR product จากการทำ Methylation specific isoschizomers ด้วยเอนไซม์อะกาโรสค ความเข้มข้น 4% แสดงให้เห็นแถบควบคุม (Short) ที่ 80 คู่เบส แถบตรวจทดสอบการเติมหมู่เมทิล (Long) ที่ 110 คู่เบส และ C คือ Indigested DNA พบ non-specific ที่ประมาณ 100 คู่เบส (L = 25bp DNA step ladder)

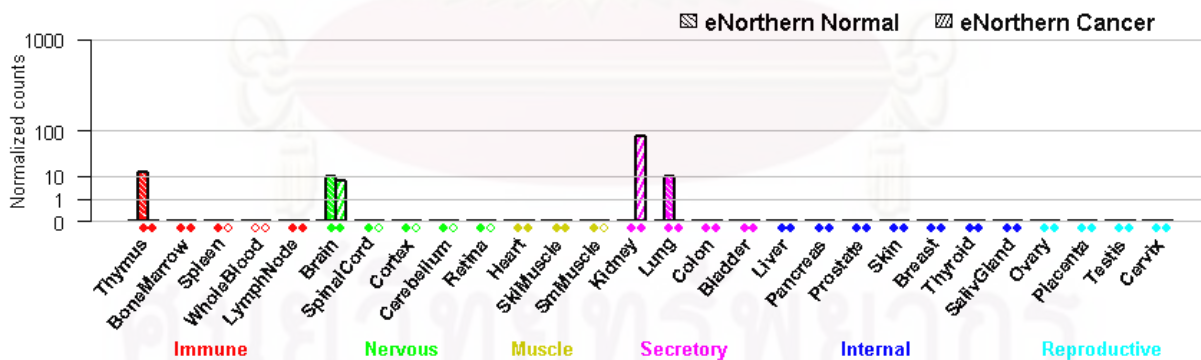
บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การแสดงออกของยีน hDAT ในเซลล์เพาะเลี้ยงต่างๆ และ DNA methylation

จากการทดสอบการแสดงออกในรูปแบบ Messenger RNA ของยีน hDAT พบว่าการแสดงออกพบในเซลล์ที่ได้จากมะเร็งปอด (A549) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเซลล์ที (Jurkat) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และเซลล์ไตของตัวอ่อน (HEK293) ซึ่งพบว่ามีผลไปในทางเดียวกับการทำ eNorthern (Electronic northern blot) คือเซลล์ Jurkat กับต่อมไทมัส เซลล์ HEK293 กับไตและเซลล์ A549 กับปอด

อย่างไรก็ดีพบผลไม่ตรงกับ eNorthern สองเซลล์คือเซลล์ HeLa ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกกลับมีการแสดงออกของยีน hDAT ที่สูง อย่างไรก็ตามเซลล์ HeLa ต่างจากเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากมนุษย์ทั่วไปคือมีโครโมโซม 82 แท่ง นอกจากเซลล์ HeLa แล้ว SH-SY5Y ซึ่งเป็นเซลล์จากระบบประสาทแต่ไม่ได้มาจากสมองคือได้มาจาก Neuroblastoma ก็ไม่มีการแสดงออกของ hDAT ซึ่งเซลล์นี้เป็น Neuroendocrine tumor ที่เกิดจากส่วนที่พัฒนามาจากส่วนของ Neural crest ของระบบประสาทซิมพาเทติก (Sympathetic nervous system)



ภาพที่ 5.1 การทดสอบการแสดงออกของยีน hDAT ในเซลล์ต่างๆ ด้วยวิธี Electronic northern blot (<http://www.genecards.org>)

จากการทดสอบ DNA methylation บริเวณ CpG dinucleotide ณ ตำแหน่ง -942 คู่เบสจาก Transcription initiation ของยีน hDAT พบว่าไม่มีการเกิด DNA methylation จากการทดสอบด้วยวิธี

Methylation-specific isoschizomers ด้วยเอนไซม์ *MspI* / *HpaII* ซึ่งจากการศึกษาที่บริเวณใกล้เคียงด้วยวิธีเดียวกันของด้วยเทคนิค Real-Time PCR พบว่าเกิด DNA hypermethylation บน Promoter ของยีน hDAT อย่างมีนัยสำคัญกับการติดเหล้าจากการประเมินเทียบกับ Obsessive compulsive drinking scale (OCDS) [120]

5.2 การทดสอบผลของยา Dexamethasone ต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนบน Promoter

การทดสอบการ Treat ยา Dexamethasone กับเซลล์ต่างๆแสดงให้เห็นถึงตัวยาสสามารถเปลี่ยนแปลง Activity ของ Promoter ของยีน hDAT ใน pGL3-Basic construct อยู่ โดยจากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง HaCaT, HeLa และ SH-SY5Y พบว่าการเปลี่ยนแปลง Activity ในการส่งเสริมแสดงออกของ Promoter นั้นเซลล์ HaCaT กับเซลล์ SH-SY5Y ให้ผลการแสดงออกของ Firefly luciferase ที่มีความสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของยา Dexamethasone อย่างมีนัยสำคัญ

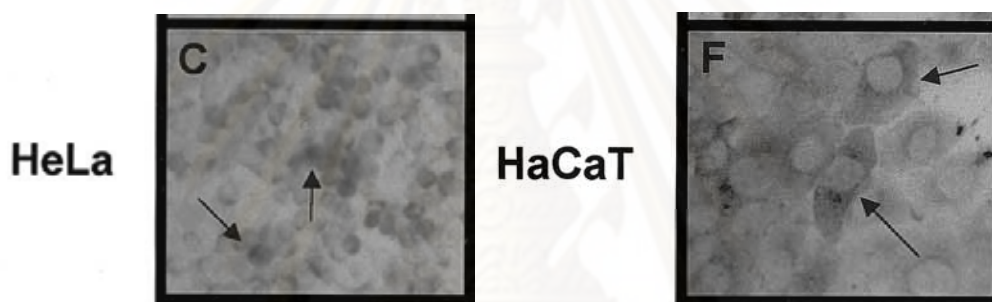
Glucocorticoid receptor ปกติหรือ GR- α ดังที่ได้กล่าวไปแล้วมี Isoform ที่เกิดจาก Alternative splicing ของยีน NR3C1 เรียกว่า Glucocorticoid receptor beta (GR- β) [121] ซึ่งทั้งสองตัวนี้มีด้าน N-terminus ที่เกิดจาก 8 exon แรกเหมือนกันทั้งหมดแต่ต่างกันที่ด้าน C-terminus ซึ่งพบว่า GR- β นั้นไม่มี Glucocorticoid binding site และไม่เกิด Heterodimer กับ GR- α รวมทั้งไม่จับกับ Glucocorticoid response element บน Promoter [122-124] พบว่าการแสดงออกของยีน GR- β ที่มากเกินไปจะกวดการส่งเสริมการแสดงออกของยีนผ่าน GR- α [125] โดย GR- α มีการแสดงออกในเกือบทุกเซลล์ของร่างกาย รวมถึงเซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าวด้วย แต่อาจต่างที่การแสดงออกของยีน GR- β

Diamond และ Mittal พบว่า Dexamethasone และ Transcription factor AP-1 มีฤทธิ์เสริมการแบบ Synergy จากการศึกษากับ Construct ที่มี Glucocorticoid receptor response element (GRE) และ AP-1 binding site [126, 127]

Transcription factor AP-1 มีความสัมพันธ์กับ CREB ดังที่ได้กล่าวไปแล้วในบทที่ 2 ว่า CREB มีบทบาทในการเกิดโรคซึมเศร้าอย่างไร อาจมี Transcription factor ร่วมอีกตัวหนึ่งคือ CREB binding protein (CBP) ซึ่งมีฤทธิ์ Histone acetyltransferase ทำหน้าที่ในการส่งเสริมการแสดงออกของยีน ซึ่ง CREB จะถูกกระตุ้นใน Nucleus accumbens โดยผ่านยาหรือความเครียด [60] การให้สารกลูโคคอร์ติคอยด์เช่นยา Dexamethasone จะเสริมฤทธิ์ของ AP-1 อันส่งผลให้ CREB ทำงานมากขึ้น พบว่าการ

ทำงานของ CREB ที่สูงขึ้นส่งผลให้เกิดอาการ Anhedonia-like [62] ดังนั้นการให้ยา Dexamethasone ในเซลล์เพาะเลี้ยงต่างๆ จึงเปรียบได้กับการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตกอยู่สภาวะใกล้เคียงสภาวะที่มีความเครียด อันเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคซึมเศร้า ผลของเซลล์ที่ตอบสนองต่อความเครียดในรูปแบบของการแสดงออกของ mRNA ของยีน hDAT ที่สามารถตรวจสอบได้ในเซลล์ HeLa เท่านั้นแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นต่ำของยา Dexamethasone เซลล์มีการผลิต hDAT ลดลงเล็กน้อย (10^{-8} – 10^{-6} M) (ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) แล้วก็มี การเพิ่มขึ้นของ hDAT ในความเข้มข้นที่ 10^{-4} M

Bromberg-White และ Meyer ได้ทำการย้อมสี Immunostaining ของโปรตีน GR- α พบว่า GR- α มีในเซลล์ HeLa มีการ Localize เข้าไปในนิวเคลียสแต่ในเซลล์ HaCaT พบว่าไม่มีการ Localize เข้าไปในนิวเคลียสแต่กองกันในไซโทพลาซึม [128] ดังภาพ



ภาพที่ 5.2 การ Localize ของโปรตีน GR- α ที่แตกต่างกันของเซลล์ HeLa และ HaCaT โดยโปรตีน GR- α นั้นมีการ Localize เข้าไปในนิวเคลียสสำหรับเซลล์ HeLa ส่วนเซลล์ HaCaT ไม่มีการ Localize เข้าไปในนิวเคลียสแต่ยังอยู่ในไซโทพลาซึม [128]

จากข้อมูลนี้อาจใช้เป็นคำอธิบายที่การแสดงออกของ FLUC ของ pGL3-Basic construct ในเซลล์ HaCaT ไม่มีแนวโน้มที่ชัดเจน (ไม่เป็นเส้นตรงและ Trend) เพราะ GR- α -ligand complex ไม่ได้เข้าไปในนิวเคลียสเพื่อส่งเสริมการแสดงออก ในขณะที่เซลล์ HeLa มีการนำพา GR- α เข้าไปในนิวเคลียสทำให้การแสดงออกของยีนเป็นไปในลักษณะของ Dose dependent ได้ แต่อย่างไรก็ดีการแสดงออกของ Firefly luciferase ในเซลล์ SH-SY5Y ที่ไปในทิศทางตรงกันข้ามกับเซลล์ HeLa คือมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มยา Dexamethasone ระดับนั้นหมายความว่าเซลล์ SH-SY5Y ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีลักษณะฟีโนไทป์เป็น Dopaminergic neuron มีการตอบสนองต่อยา Dexamethasone โดยความเข้มข้นของยา Dexamethasone ที่เพิ่มสูงขึ้นก็เปรียบได้กับการมีระดับคอร์ติซอลที่สูงขึ้นในระบบประสาทอันนำไปสู่ภาวะเครียดเรื้อรังและโรคซึมเศร้าได้ ตัว Promoter ของยีน hDAT ที่เป็นส่วนหนึ่งของ pGL3-Basic construct

จึงถูก Promote ให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม Promoter ของยีน hDAT ที่อยู่ในเซลล์ SH-SY5Y ก็ไม่สามารถส่งเสริมการแสดงออกได้อยู่ดี จึงอาจเป็นผลมาจากการเกิด DNA methylation บริเวณ Promoter ของยีน hDAT ที่ทำให้โครมาทินไม่สามารถคลายตัวได้ก็เป็นได้

เนื่องจากการลดลงของ MEK ส่งผลให้ตัวขนส่งโดพามีนทำงานมากขึ้นโดยไม่มีการเพิ่มปริมาณของตัวขนส่งโดพามีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ (เพิ่ม V_{max}) ดังนั้นยา Dexamethasone ซึ่ง Yang พบว่ายานี้สามารถยับยั้งหรือลดการทำงานของ MEK1/2 ซึ่ง MEK1/2 [30] มีบทบาทสำคัญในการเกิด Phosphorylation ของตัวขนส่งโดพามีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ดังที่กล่าวไปแล้วในบทที่ 2 การลดการเกิด Phosphorylation ผ่าน MEK1/2 จะทำให้ตัวขนส่งโดพามีนขนส่งโดพามีนกลับเข้าสู่เซลล์ประสาทหรือเซลล์รอบข้างได้มากขึ้นส่งผลให้มีระดับของโดพามีนในไซแนปส์น้อยลง ซึ่งการลดลงของความสามารถของตัวขนส่งโดพามีนทำให้เซลล์ที่สามารถสร้างตัวขนส่งโดพามีนได้จำเป็นต้องมีการแสดงออกของตัวขนส่งโดพามีนมากขึ้นเพื่อให้มีการคง Activity หรือความสามารถในการขนส่งโดพามีนไว้ได้ใกล้เคียงภาวะปกติที่สุด ดังนั้นการแสดงออกของตัวขนส่งโดพามีนในรูปแบบของ mRNA ของเซลล์ HeLa จึงเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญเนื่องจากไม่มีโดพามีนซึ่งเป็นสับสเตรทสำหรับตัวขนส่งโดพามีนเป็นตัวคอยกำหนดการแสดงออกของยีน hDAT

5.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน hDAT

จากการวิเคราะห์ด้วยชุดคำสั่งสำหรับการวิเคราะห์ Transcription factor binding site สำหรับความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณ rs2652511 พบว่าในอัลลีล C จะสามารถจับได้กับ GC-rich DNA-binding factor (GCF) และ E2F-1 ซึ่ง GCF เป็น Transcription factor ประเภท Repressor ซึ่งอาจส่งผลทำให้อัลลีล C มีการแสดงออกของยีน hDAT น้อยกว่าอัลลีล T ได้ [129] ส่วน E2F-1 นั้นสามารถจับกับ Transcription factor Sp1 ได้โดยส่งผลแบบ Synergistic promotion ซึ่งจะมีฤทธิ์สูงสุดในช่วงการแบ่งเซลล์ระยะ G1 แสดงให้เห็นว่า E2F-1 มีผลต่อการเจริญของเซลล์โดย E2F-1 จะกระตุ้น Initiation และ Elongation ของ Transcription [130] ซึ่งจากการทดสอบ Transcription factor binding site ของ Nakamura [18] พบว่า Promoter ของยีน hDAT ถึงแม้จะไม่มี TATA box หรือ CAAT box แต่ก็มีลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับการจับกับ Sp1 อยู่หลายตำแหน่ง [18] อย่างไรก็ตามการที่ E2F-1 มีการแสดงออกมากในช่วงการแบ่งตัวแบบ G1 phase นั้น แต่เซลล์สมองใน Adult นั้นมีอัตราการเจริญและเพิ่มจำนวนต่ำมาก [131] ดังนั้น E2F-1 จึงไม่น่ามีผลต่อการแสดงออกของยีน hDAT ในวัยผู้ใหญ่

ในขณะที่อัลลีล T จะสามารถจับได้กับ Activating protein (AP)-2 α , Leading binding protein (LBP)-1 และ Glucocorticoid receptor (GR) ซึ่งจากการทดสอบให้ยาต้านซึมเศร้ากลุ่ม SSRI คือ Citalopram มีการลดลงของการแสดงออกของยีน AP-2 α และ AP-2 β อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่การให้ยาต้านซึมเศร้ากลุ่ม Tricyclic คือ Imipramine จะส่งผลต่อ AP-2 α โดยตรงซึ่งหากมีผลให้ AP-2 α ลดลงแล้วอาจทำให้มีระดับการแสดงออกของยีน hDAT ลดลงได้ ซึ่งหมายความว่ายาต้านซึมเศร้าทั้งสองกลุ่มนี้อาจจะเป็นประโยชน์ค่อนข้างมากในกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้าที่มีอัลลีลแบบ T ที่ทำให้ยีน hDAT แสดงออกน้อยลงผ่านการยับยั้ง Transcription factor AP-2 α [132] GR- α จะเป็น Classical GR ซึ่งเป็น Ligand-dependent transcription factor หมายความว่าเมื่อมีลิแกนด์หรือสารกลุ่มกลูโคคอร์ติคอยด์มาจับกับ GR- α ตัว GR- α -ligand complex เกิดเป็น Homodimer แล้วเคลื่อนตัวจากไซโทพลาซึมเข้าไปในนิวเคลียสแล้วไปจับกับ GR- α response element บน Promoter และส่งเสริมให้เกิดการแสดงออกของยีน [133]

ส่วน LBP-1 เป็น Transcription factor ที่ทำหน้าที่เป็น Activator ในหลายยีนของมนุษย์แต่ก็พบบทบาทที่เป็น Repressor ด้วยในการทำหน้าที่เป็น Repressor protein สำหรับการแสดงออกของยีนของเชื้อ HIV โดยยับยั้งการจับของ TATA binding protein (TBP) ทำให้ TFIIID complex มาจับกับ TATA box ไม่ได้ จึงเกิดการยับยั้งการ Elongation เกิดขึ้น [134] ซึ่งสำหรับยีน hDAT นั้น LBP-1 ไม่น่าส่งผลในรูปแบบเดียวกับ Promoter ของเชื้อ HIV แต่น่าจะส่งผลแบบเดียวกันกับยีนอื่นๆที่ทั่วไปมากกว่า

นอกจากนี้การที่ rs2652511 มีจีโนไทป์แบบ Heterozygous มากกว่าแบบ Homozygous เล็กน้อยในกลุ่มควบคุมอาจเป็นเพราะว่า rs2652511 มี Heterozygote advantage สำหรับในโรคซึมเศร้า ทำให้การกระจายจีโนไทป์ของ Heterozygous มีในกลุ่มควบคุมมากกว่ากลุ่มผู้ป่วย

สำหรับ 63bp-VNTR บน Intron 3 นั้นยังมีการศึกษาไม่มากนักนอกจากการศึกษาของ Franke [103] ที่ไม่ได้กล่าวอะไรไว้มาก แต่ VNTR นี้ไม่ได้ตั้งอยู่บริเวณ Intronic-exon boundary จึงไม่น่าส่งผลให้เกิดการ Alternative splicing ของยีนนี้แต่อย่างใด [135] อย่างไรก็ตาม VNTR ของ Intron อาจก่อให้เกิด RNA folding ที่เปลี่ยนแปลงส่งผลให้การ Splicing เกิดขึ้นได้ยากและอาจทำให้เกิดการสร้างโปรตีนจาก RNA ที่ถอดรหัสออกมาจากยีนได้น้อยเนื่องจากไม่มี mRNA เป็นต้นแบบในการแปลรหัสสายโพลีเพปไทด์

การพบ Heterozygous เป็นจีโนไทป์หลักของ Intron 3 VNTR นี้ อาจเป็นเนื่องจาก Intron 3 VNTR นี้เกิด Heterozygote advantage ในกลุ่มประชากรมนุษย์ก็เป็นได้ เช่น การมี VNTR แบบ 7 repeat หรือ 8 repeat เพียงอย่างเดียวอาจเป็นผลร้ายต่อมนุษย์หรือเซลล์มากกว่าผลดีก็เป็นได้



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- [1] Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). JAMA 18 (June 2003): 3095-105.
- [2] Laura A, Jorge JC-a, Patricia B, Rob VB, Ron De G, Wilma V, et al. The epidemiology of major depressive episodes: results from the International Consortium of Psychiatric Epidemiology (ICPE) surveys (2003): 3-21.
- [3] Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. Lifetime Prevalence and Age-of-Onset Distributions of DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication (2005): 593-602.
- [4] Murphy JM, Laird NM, Monson RR, Sobol AM, Leighton AH. A 40-Year Perspective on the Prevalence of Depression: The Stirling County Study (2000): 209-15.
- [5] Mathers CD, Loncar D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. PLoS Med 11 (2006): 442.
- [6] Benes FM. Carlsson and the discovery of dopamine. Trends in pharmacological sciences 22 (January 2001): 46-7.
- [7] Iversen SD, Iversen LL. Dopamine: 50 years in perspective. Trends in neurosciences 30 (May 2007): 188-93.
- [8] Marinelli M, Piazza PV. Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. The European journal of neuroscience 16 (August 2002): 387-94.
- [9] Kahlig KM, Binda F, Khoshbouei H, Blakely RD, et al. Amphetamine induces dopamine efflux through a dopamine transporter channel (2005): 3495-500.
- [10] Sacchetti P, Brownschidle LA, Granneman JG, Bannon MJ. Characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine transporter gene. Brain research 10 (December 1999): 167-74.
- [11] Oswald LM, Wong DF, McCaul M, Zhou Y, et al. Relationships among ventral striatal dopamine release, cortisol secretion, and subjective responses to amphetamine. Neuropsychopharmacology 30 (April 2005): 821-32.

- [12] McArthur S, McHale E, Gillies GE. The size and distribution of midbrain dopaminergic populations are permanently altered by perinatal glucocorticoid exposure in a sex-region- and time-specific manner. Neuropsychopharmacology 32 (July 2007): 1462-76.
- [13] Perona MT, Waters S, Hall FS, Sora I, Lesch KP, Murphy DL, et al. Animal models of depression in dopamine, serotonin, and norepinephrine transporter knockout mice: prominent effects of dopamine transporter deletions. Behavioural pharmacology 19 (September 2008): 566-74.
- [14] Fatemi SH, Earle JA, McMenomy T. Reduction in Reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression. Molecular psychiatry 5 (November 2000): 654-63, 571.
- [15] Costa E, Davis J, Grayson DR, Guidotti A, Pappas GD, Pesold C. Dendritic spine hypoplasticity and downregulation of reelin and GABAergic tone in schizophrenia vulnerability. Neurobiology of disease 8 (October 2001): 723-42.
- [16] Poleskaya OO, Sokolov BP. Differential expression of the "C" and "T" alleles of the 5-HT2A receptor gene in the temporal cortex of normal individuals and schizophrenics. Journal of neuroscience research 15 (March 2002): 812-22.
- [17] Fahn S. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease. Journal of neural transmission 71 (2006): 1-15.
- [18] Kawarai T, Kawakami H, Yamamura Y, Nakamura S. Structure and organization of the gene encoding human dopamine transporter. Gene 11 (August 1997): 11-8.
- [19] Kouzmenko AP, Pereira AM, Singh BS. Intronic sequences are involved in neural targeting of human dopamine transporter gene expression. Biochemical and biophysical research communications 26 (November 1997): 807-11.
- [20] Lee KH, Kwak YD, Kim DH, Chang MY, Lee YS, Lee YS. Human zinc finger protein 161, a novel transcriptional activator of the dopamine transporter. Biochemical and biophysical research communications 23 (January 2004): 969-76.
- [21] Rubie C, Schmidt F, Knapp M, Sprandel J, Wiegand C, Meyer J, et al. The human dopamine transporter gene: the 5'-flanking region reveals five diallelic polymorphic sites in a Caucasian population sample. Neuroscience letters 12 (January 2001): 125-8.

- [22] Bamne MN, Talkowski ME, Chowdari KV, Nimgaonkar VL. Functional Analysis of Upstream Common Polymorphisms of the Dopamine Transporter Gene. Schizophrenia bulletin. (March 2009) 9.
- [23] Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. Nature genetics 22 (July 1999): 231-8.
- [24] Lin JJ, Yueh KC, Chang DC, Chang CY. The homozygote 10-copy genotype of variable number tandem repeat dopamine transporter gene may confer protection against Parkinson's disease for male, but not to female patients. Journal of the neurological sciences 15 (May 2003): 87-92.
- [25] Grunhage F, Schulze TG, Muller DJ, et al. Systematic screening for DNA sequence variation in the coding region of the human dopamine transporter gene (DAT1). Molecular psychiatry 5 (May 2000): 275-82.
- [26] Mazei-Robison MS, Couch RS, Shelton RC, Stein MA, Blakely RD. Sequence variation in the human dopamine transporter gene in children with attention deficit hyperactivity disorder. Neuropharmacology 49 (November 2005): 724-36.
- [27] Mazei-Robison MS, Blakely RD. Expression studies of naturally occurring human dopamine transporter variants identifies a novel state of transporter inactivation associated with Val382Ala. Neuropharmacology 49 (November 2005): 737-49.
- [28] Michelhaugh SK, Fiskerstrand C, Lovejoy E, Bannon MJ, Quinn JP. The dopamine transporter gene (SLC6A3) variable number of tandem repeats domain enhances transcription in dopamine neurons. Journal of neurochemistry 79 (December 2001): 1033-8.
- [29] Spanagel R, Weiss F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. Trends in neurosciences 22 (November 1999): 521-7.
- [30] Moron JA, Zakharova I, Ferrer JV, Merrill GA, Hope B, Lafer EM, et al. Mitogen-activated protein kinase regulates dopamine transporter surface expression and dopamine transport capacity. J Neurosci 17 (September 2003): 8480-8.
- [31] Zdenek BP, Fortunata M, Fang L, Heng YM, Frank JSL, Yu TW, et al. Protein kinase-mediated bidirectional trafficking and functional regulation of the human dopamine transporter. (1998): 79-87.

- [32] Schwienbacher I, Fendt M, Richardson R, Schnitzler HU. Temporary inactivation of the nucleus accumbens disrupts acquisition and expression of fear-potentiated startle in rats. Brain Res 19 (November 2004): 87-93.
- [33] Olds J, Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. Journal of comparative and physiological psychology 47 (December 1954): 419-27.
- [34] Dale J, Sorour E, Milner G. Do psychiatrists perform appropriate physical investigations for their patients? A review of current practices in a general psychiatric inpatient and outpatient setting. Informa Healthcare (2008): 293 - 8.
- [35] Orengo CA, Fullerton G, Tan R. Male depression: a review of gender concerns and testosterone therapy. Geriatrics 59 (October 2004): 24-30.
- [36] Sadock BJ, Kaplan HI, Sadock VA. Kaplan & Sadock's synopsis of psychiatry: behavioral sciences/clinical psychiatry: Lippincott Williams & Wilkins (2007).
- [37] American Psychiatric Association. Task Force on D-I. DSM-IV: diagnostic and statistical manual of mental disorders. American Psychiatric Association Washington, DC (1994).
- [38] Parker G, Hadzi-Pavlovic D. Melancholia: a disorder of movement and mood: a phenomenological and neurobiological review. Cambridge University Press (1996).
- [39] Kuehner C. Gender differences in unipolar depression: an update of epidemiological findings and possible explanations. (2003): 163-74.
- [40] Eaton WW, Anthony JC, Gallo J, Cai G, Tien A, Romanoski A, et al. Natural history of Diagnostic Interview Schedule/DSM-IV major depression. The Baltimore Epidemiologic Catchment Area follow-up. Archives of general psychiatry 54 (November 1997): 993-9.
- [41] Rickards H. Depression in neurological disorders: Parkinson's disease, multiple sclerosis, and stroke. (2005): i48-52.
- [42] Weich S, Lewis G. Poverty, unemployment, and common mental disorders: population based cohort study. BMJ 11 (July 1998): 115-9.
- [43] Andrews G. Reducing the burden of depression. Canadian journal of psychiatry 53 (July 2008): 420-7.

- [44] Kessler RC, Nelson CB, McGonagle KA, Liu J, Swartz M, Blazer DG. Comorbidity of DSM-III-R major depressive disorder in the general population: results from the US National Comorbidity Survey. The British journal of psychiatry 30 (June 1996): 17-30.
- [45] Hirschfeld RM. The Comorbidity of Major Depression and Anxiety Disorders: Recognition and Management in Primary Care. Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry 3 (December 2001): 244-54.
- [46] Grant BF. Comorbidity between DSM-IV drug use disorders and major depression: results of a national survey of adults. Journal of substance abuse 7 (1995): 481-97.
- [47] Hallowell EM, Ratey JJ. Delivered from distraction: Getting the most out of life with attention deficit disorder: Ballantine Books (2005).
- [48] Campbell S, MacQueen G. An update on regional brain volume differences associated with mood disorders. Current opinion in psychiatry 19 (January 2006): 25-33.
- [49] Konarski JZ, McIntyre RS, Kennedy SH. Volumetric neuroimaging investigations in mood disorders: bipolar disorder versus major depressive disorder. Bipolar disorders 10 (February 2008): 1-37.
- [50] Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC. Untreated depression and hippocampal volume loss. The American journal of psychiatry 160 (August 2003): 1516-8.
- [51] Merens W, Booij L, Van Der Does AJ. Residual cognitive impairments in remitted depressed patients. Depression and anxiety 25 (2008): E27-36.
- [52] Charney DS, Manji HK. Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. Sci STKE 23 (March 2004): re5.
- [53] Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. Biological psychiatry 15 (June 2006): 1116-27.
- [54] Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. Nature reviews 7 (May 2008): 426-37.
- [55] Hasler G, van der Veen JW, Tumonis T, Meyers N, Shen J, Drevets WC. Reduced prefrontal glutamate/glutamine and gamma-aminobutyric acid levels in major depression

- determined using proton magnetic resonance spectroscopy. Archives of general psychiatry 64 (February 2007): 193-200.
- [56] Hasler G, Drevets WC, Manji HK, Charney DS. Discovering endophenotypes for major depression. Neuropsychopharmacology 29 (October 2004): 1765-81.
- [57] Tan CK, Yan J, Ananth C, Kaur C. Dexamethasone induces dendritic alteration but not apoptosis in the neurons of the hippocampus in postnatal rats. Neuroscience letters 5 (July 2002): 206-10.
- [58] McArthur S, McHale E, Dalley JW, Buckingham JC, Gillies GE. Altered mesencephalic dopaminergic populations in adulthood as a consequence of brief perinatal glucocorticoid exposure. Journal of neuroendocrinology 17 (August 2005): 475-82.
- [59] Dunlop BW, Nemeroff CB. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. Archives of general psychiatry 64 (March 2007): 327-37.
- [60] Barrot M, Olivier JD, Perrotti LI, DiLeone RJ, Berton O, Eisch AJ, et al. CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 20 (August 2002): 11435-40.
- [61] Dudman JT, Eaton ME, Rajadhyaksha A, Macias W, Taher M, Barczak A, et al. Dopamine D1 receptors mediate CREB phosphorylation via phosphorylation of the NMDA receptor at Ser897-NR1. Journal of neurochemistry 87 (November 2003): 922-34.
- [62] Nestler EJ, Carlezon WA, Jr. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. Biological psychiatry 15 (June 2006): 1151-9.
- [63] Basso AM, Gallagher KB, Bratcher NA, Brioni JD, Moreland RB, Hsieh GC, et al. Antidepressant-like effect of D(2/3) receptor-, but not D(4) receptor-activation in the rat forced swim test. Neuropsychopharmacology 30 (July 2005): 1257-68.
- [64] Renard CE, Fiocco AJ, Clenet F, Hascoet M, Bourin M. Is dopamine implicated in the antidepressant-like effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test? Psychopharmacology 159 (December 2001): 42-50.
- [65] Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Learned-Coughlin S, Yang J, Logan J, et al. The slow and long-lasting blockade of dopamine transporters in human brain induced by the new antidepressant drug radafaxine predict poor reinforcing effects. Biological psychiatry 15 (March 2005): 640-6.

- [66] Bruce LL, Neary TJ. The limbic system of tetrapods: a comparative analysis of cortical and amygdalar populations. Brain, behavior and evolution 46 (1995): 224-34.
- [67] Zubieta JK, Stohler CS. Neurobiological mechanisms of placebo responses. Annals of the New York Academy of Sciences 1156 (March 2009): 198-210.
- [68] Dubrovsky BO. Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry 29 (February 2005): 169-92.
- [69] Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. Nucleic Acids Research 10 (1982): 2709-21.
- [70] Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W. Molecular basis of base substitution hotspots in Escherichia coli. Nature 274 (978): 775-80.
- [71] Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. Nature 321 (1986): 209-13.
- [72] Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409 (2001): 860-921.
- [73] Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The Sequence of the Human Genome. Science (2001): 1304-51.
- [74] Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H. CpG islands as gene markers in the human genome. Genomics 13 (1992): 1095-107.
- [75] Taylor SM, Jones PA. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. Cell 17 (1979): 771-9.
- [76] Maier H, Colbert J, Fitzsimmons D, Clark DR, Hagman J. Activation of the Early B-Cell-Specific mb-1 (Ig-?) Gene by Pax-5 Is Dependent on an Unmethylated Ets Binding Site. Molecular and Cellular Biology 23 (2003): 1946-60.
- [77] Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. Nature 405 (2000): 482-5.
- [78] Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. Nat Rev Genet 2 (January 2001): 21-32.
- [79] Reik W, Walter J. Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. Nature genetics 27 (March 2001): 255-6.

- [80] Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. Nature 395 (1998): 89-93.
- [81] Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. Nature 10 (April 1997): 623-7.
- [82] Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94 (March 1997): 2545-50.
- [83] Jackson-Grusby L, Beard C, Possemato R, et al. Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. Nature genetics 27 (January 2001): 31-9.
- [84] Surani MA. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. Cell 93 (May 1998): 309-12.
- [85] Haig D, Graham C. Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor. Cell 64 (March 1991): 1045-6.
- [86] Sleutel MR. Conducting survey research at nursing conferences. Nursing research 50 (November-December 2001): 379-83.
- [87] Grunau C. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. Nucleic Acids Research 29 (2001): 65.
- [88] Fraga MF, Esteller M. DNA methylation: a profile of methods and applications.
- [89] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. National Acad Sciences (1996): 9821-6.
- [90] Rand K, Qu W, Ho T, Clark SJ, Molloy P. Conversion-specific detection of DNA methylation using real-time polymerase chain reaction to avoid false positives. Methods 27 (2002): 114-20.
- [91] Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. Nucleic Acids Research 22 (1994): 2990-7.
- [92] Warnecke PM, Stirzaker C, Melki JR, Millar DS, Paul CL, Clark SJ, et al. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. Nucleic Acids Research 25 (2002): 4422-6.

- [93] Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA Hypermethylation of Multiple Genes in Acute Myeloid Leukemia. AACR (1999): 3730-40.
- [94] Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. Nucleic Acids Research 25 (June 1997): 2532-4.
- [95] McClelland M. The effect of sequence specific DNA methylation on restriction endonuclease cleavage. Nucleic Acids Research 9 (November 1981): 5859-66.
- [96] Alam J, Cook JL. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. Analytical biochemistry 188 (August 1990): 245-54.
- [97] Crow JF. Hardy, Weinberg and language impediments. Genetics 152 (July 1999): 821-5.
- [98] Emigh TH. A Comparison of Tests for Hardy-Weinberg Equilibrium. Biometrics 36 (1980): 627-42.
- [99] Papadimitriou A, Priftis KN. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Neuroimmunomodulation 16 (2009): 265-71.
- [100] Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. Steroids 64 (1999): 310-9.
- [101] Yang CH, Huang CC, Hsu KS. Behavioral stress modifies hippocampal synaptic plasticity through corticosterone-induced sustained extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase activation. J Neurosci 24 (December 2004): 11029-34.
- [102] Maggi R, Poletti A, Casulari LA, Pimpinelli F, Piva F, Zanisi MR, et al. Effects and metabolism of steroid hormones in human neuroblastoma cells. Steroids 63 (May-June 1998): 257-62.
- [103] Franke B, Hoogman M, Arias Vasquez A, Heister JG, Savelkoul PJ, Naber M, et al. Association of the dopamine transporter gene 9-6 haplotype with adult ADHD. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 147B (December 2008): 1576-9.
- [104] Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics 21 (January 2005): 263-5.
- [105] Oshima Y, Kuroda Y, Kunishige M, Matsumoto T, Mitsui T. Oxidative stress-associated mitochondrial dysfunction in corticosteroid-treated muscle cells. Muscle & nerve 30 (July 2004): 49-54.

- [106] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical biochemistry 162 (April 1987): 156-9.
- [107] Masek T, Vopalensky V, Suchomelova P, Pospisek M. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. Analytical biochemistry 336 (January 2005): 46-50.
- [108] Frankhauser P, Grimmer Y, Bugert P, Deuschle M, Schmidt M, Schloss P. Characterization of the neuronal dopamine transporter DAT in human blood platelets. Neuroscience letters 399 (May 2006): 197-201.
- [109] Fisker S, Hansen B, Fuglsang J, Kristensen K, Ovesen P, Orskov H, et al. Gene expression of the GH receptor in subcutaneous and intraabdominal fat in healthy females: relationship to GH-binding protein. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies 150 (June 2004): 773-7.
- [110] Messeguer X, Escudero R, Farre D, Nunez O, Martinez J, Alba MM. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. Bioinformatics 18 (February 2002): 333-4.
- [111] Xu X, Mill J, Sun B, Chen CK, Huang YS, Wu YY, et al. Association study of promoter polymorphisms at the dopamine transporter gene in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. BMC psychiatry 9 (2009): 3.
- [112] van de Giessen EM, de Win MM, Tanck MW, van den Brink W, Baas F, Booij J. Striatal dopamine transporter availability associated with polymorphisms in the dopamine transporter gene SLC6A3. J Nucl Med 50 (January 2009): 45-52.
- [113] Brookes KJ, Xu X, Anney R, Franke B, Zhou K, Wai C, et al. Association of ADHD with genetic variants in the 5prime-region of the dopamine transporter gene: Evidence for allelic heterogeneity. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet (2008): 1519-23.
- [114] Genro JP, Zeni C, Polanczyk GV, Roman T. A promoter polymorphism (-839 C > T) at the dopamine transporter gene is associated with attention deficit/hyperactivity disorder in Brazilian children. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 144B (March 2007): 215-9.
- [115] Genro JP, Polanczyk GV, Zeni C, Oliveira AS, Roman T, Rohde LA, et al. A common haplotype at the dopamine transporter gene 5' region is associated with attention-

- deficit/hyperactivity disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 147B (December 2008): 1568-75.
- [116] Zhou K, Chen W, Buitelaar J, Banaschewski T, Oades RD, Franke B, et al. Genetic heterogeneity in ADHD: DAT1 gene only affects probands without CD. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 147B (December 2008): 1481-7.
- [117] Stober G, Sprandel J, Schmidt F, Faul T, Jabs B, Knapp M. Association study of 5'-UTR polymorphisms of the human dopamine transporter gene with manic depression. Bipolar disorders 8 (October 2006): 490-5.
- [118] Kelada SN, Checkoway H, Kardia SL, Carlson CS, et al. 5' and 3' region variability in the dopamine transporter gene, pesticide exposure and Parkinson's disease risk: a hypothesis-generating study. Human molecular genetics 15 (October 2006): 3055-62.
- [119] Kelada SN, Costa-Mallen P, Checkoway H, Carlson CS, Weller TS, Swanson PD, et al. Dopamine transporter 5' region haplotypes significantly affect transcriptional activity in vitro but are not associated with Parkinson's disease. Pharmacogenetics and genomics 15 (September 2005): 659-68.
- [120] Hillemecher T, Frieling H, Hartl T, Wilhelm J, Kornhuber J, Bleich S. Promoter specific methylation of the dopamine transporter gene is altered in alcohol dependence and associated with craving. Journal of psychiatric research 43 (January 2009): 388-92.
- [121] Gross KL, Cidlowski JA. Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. Trends in endocrinology and metabolism: TEM 19 (November 2008): 331-9.
- [122] Leung DY, Hamid Q, Vottero A. Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. The Journal of experimental medicine 186 (November 1997): 1567-74.
- [123] Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. The Journal of biological chemistry 274 (September 1999): 27857-66.
- [124] Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. The Journal of biological chemistry 271 (April 1996): 9550-9.

- [125] Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP. GR-beta, a potential endogenous inhibitor of GC action in humans. The Journal of clinical investigation 95 (June 1995): 2435-41.
- [126] Diamond MI, Miner JN, Yoshinaga SK, Yamamoto KR. Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. Science 249 (September 1990): 1266-72.
- [127] Mittal R, Kumar KU, Pater A, Pater MM. Differential regulation by c-Jun and c-fos protooncogenes of hormone response from composite glucocorticoid response element in human papilloma virus type 16 regulatory region. Molecular endocrinology 8 (December 1994): 1701-8.
- [128] Bromberg-White JL, Meyers C. Comparison of the basal and glucocorticoid-inducible activities of the upstream regulatory regions of HPV18 and HPV31 in multiple epithelial cell lines. Virology 306 (February 2003): 197-202.
- [129] Kageyama R, Pastan I. Molecular cloning and characterization of a human DNA binding factor that represses transcription. Cell 59 (1989): 815-25.
- [130] Lin SY, Black AR, Kostic D, Pajovic S, Hoover CN, Azizkhan JC. Cell cycle-regulated association of E2F1 and Sp1 is related to their functional interaction. Molecular and cellular biology 16 (April 1996): 1668-75.
- [131] Evans J, Sumners C, Moore J, Huentelman MJ, Deng J, Gelband CH, et al. Characterization of mitotic neurons derived from adult rat hypothalamus and brain stem. Journal of neurophysiology 87 (February 2007): 1076-85.
- [132] Damberg M, Ekblom J, Orelund L. Chronic pharmacological treatment with certain antidepressants alters the expression and DNA-binding activity of transcription factor AP-2. Life sciences 68 (December 2000): 669-78.
- [133] Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, et al. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. Cell 110 (July 2002): 93-105.
- [134] Parada CA, Yoon JB, Roeder RG. A novel LBP-1-mediated restriction of HIV-1 transcription at the level of elongation in vitro. The Journal of biological chemistry 270 (February 1999): 2274-83.

[135] Lievers KJ, Kluijtmans LA, Heil SG, Boers GH, Verhoef P, van Oppenraay-Emmerzaal D, et al. A 31 bp VNTR in the cystathionine beta-synthase (CBS) gene is associated with reduced CBS activity and elevated post-load homocysteine levels. Eur J Hum Genet 9 (August 2001): 583-9.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
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)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

Subject No.....

ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (Consent form)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนต่างๆ และโรคซึมเศร้าในประชากรจังหวัดเลย จังหวัดหนองบัวลำภู และจังหวัดใกล้เคียง

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

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาวได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย อันตรายหรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว

ข้าพเจ้าได้ซักถามและทำความเข้าใจเกี่ยวกับการศึกษาดังกล่าว โดยผู้วิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่างๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบัง ซ่อนเร้น จนข้าพเจ้าพอใจแล้ว

ข้าพเจ้าเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ด้วยความสมัครใจ และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลใดๆ ต่อข้าพเจ้า

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย (หรือข้าพเจ้าอนุญาตให้ผู้วิจัยเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องตามที่ผู้วิจัยเห็นสมควร

ในการวิจัยครั้งนี้ จะมีการเก็บเลือดเป็นจำนวนประมาณ 6 ซีซี เพียงหลอดเดียว

ผู้วิจัยได้อธิบายให้ข้าพเจ้าทราบและเข้าใจแล้วว่า การเก็บเลือดเพียงเล็กน้อย โดยทั่วไป จะไม่เกิดอันตรายใดๆ แก่ข้าพเจ้าเลย

ลงนาม.....ผู้ให้การยินยอม วันที่/...../.....

ลงนาม.....พยาน วันที่...../...../.....

ลงนาม.....พยาน วันที่...../...../.....

ภาคผนวก ค

แบบสอบถามการวิจัยเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของ
ยีนต่าง ๆ และโรคซึมเศร้าในประชากรจังหวัดเลย จังหวัดหนองบัวลำภู และจังหวัด
ใกล้เคียง

Subject No.....

ชื่อ (นาย/นาง/น.ส)..... นามสกุล..... เพศ.....
อายุ.....ปี วัน/เดือน/ปีเกิด..... เบอร์โทรศัพท์.....
จำนวนสมาชิกในครอบครัวมีจำนวนทั้งหมด.....คน เป็นชาย.....คน เป็นหญิง.....คน
โรคประจำตัว.....ยาที่รับประทานประจำ.....

ให้ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่องว่าง □ ที่กำหนดให้

1. สถานะภาพ โสด สมรส
 หย่า แยกกันอยู่
2. อาชีพ รับจ้าง ค้าขาย
 ข้าราชการ พนักงานบริษัท
 นักเรียน/นักศึกษา อื่นๆระบุ.....
3. วุฒิการศึกษา ต่ำกว่าประถมศึกษา
 ประถมศึกษา มัธยมศึกษาตอนต้น
 มัธยมศึกษาตอนปลาย ปวส./ปวช./อนุปริญญา
ปริญญาตรี สูงกว่าปริญญาตรี
4. รายได้ ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 5,000 บาท
 5,000 – 10,000 บาท
 มากกว่า 10,000 – 20,000 บาท
 มากกว่า 20,000 บาท
5. ท่านสูบบุหรี่หรือไม่ สูบ ไม่สูบ
6. ท่านดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์หรือไม่ ดื่ม ไม่ดื่ม

หมายเหตุอื่นๆ.....

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายรชตวรรษ บุญมาเลิศเกิดเมื่อวันจันทร์ที่ 9 กันยายน พุทธศักราช 2528 ในชื่อของเอกวิทย์ บุญมาเลิศ สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยรามคำแหงเมื่อปีการศึกษา 2545 และวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเมื่อปีการศึกษา 2549 ต่อมาได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2550 โดยได้รับทุนอุดหนุนค่าเล่าเรียนจากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย