# อะพอพโทซิส: วิถีและการตรวจวัด

**ปกป้อง ประยงค์[1] นาถธิดา วีระปรียากูร[1,2,*] สหพัฒน์ บรัศว์รักษ์[3,4]**

[1]คณะเภสัชศาสตร์ [2]ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร [3]คณะเทคนิคการแพทย์
[4]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**บทคัดย่อ:** อะพอพโทซิสเป็นขบวนการตายที่ถูกควบคุมโดยยีน มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาและรักษาสมดุลของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ การควบคุมอะพอพโทซิสที่ไม่เหมาะสมเกี่ยวข้องกับการก่อโรคเช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคภาวะหลอดเลือดหัวใจตีบตัน โรคออโตอิมมูน และโรคมะเร็งชนิดต่างๆ วิถีอะพอพโทซิสมี 2 แบบคือ 1) วิถีจากภายนอกที่เหนี่ยวนำโดย death receptor และ 2) วิถีจากภายในที่มีไมโตคอนเดรียกับอะพอพโทซมเป็นตัวกลาง อะพอพโทซิสสามารถตรวจสอบได้หลายวิธีเช่นการสังเกตรูปสัณฐานของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ โดยเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสจะหดตัว ผนังเซลล์โป่งพอง โครมาตินจับตัวแน่น และมีการแยกย่อยของดีเอ็นเอ วิธีนี้ใช้ตรวจสอบอะพอพโทซิสในระยะสุดท้ายอย่างคร่าวๆ แต่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดการตายได้อย่างแม่นยำ การตรวจยืนยันโดยวิธีที่มีความจำเพาะจึงมีความสำคัญ เช่น การใช้ Annexin V ในการจับกับ phosphatidylserine ที่เยื่อหุ้มพลาสมา การตรวจสอบการแยกตัวของดีเอ็นเอด้วย electrophoresis gels หรือ TUNEL การวิเคราะห์หน้าที่ของไมโตคอนเดรียระหว่างที่เกิดอะพอพโทซิส และ การวิเคราะห์ทางชีวเคมีของการตายแบบอะพอพโทซิสอื่นๆ การตรวจอะพอพโทซิสดังกล่าวสามารถวิเคราะห์ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ มีประโยชน์ในการบ่งชี้การเกิดอะพอพโทซิสและอธิบายถึงวิถีการเกิดอะพอพโทซิส ด้วยเหตุนี้การตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวจึงนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการตายอะพอพโทซิสที่ผิดปกติ และใช้ในการศึกษาวิจัยถึงเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของสารที่มีคุณค่าในการออกแบบและพัฒนายาที่เกี่ยวข้องกับวิถีอะพอพโทซิสต่อไป

**คำสำคัญ:** อะพอพโทซิส แคสเปส โปรตีนบีซีแอล 2

**บทนำ:** อะพอพโทซิส (apoptosis) เป็นแบบแผนการตายของเซลล์ (programmed cell death) ที่ควบคุมโดยยีน มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาและรักษาสมดุลของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ มีลักษณะแสดงคือเซลล์เกิดการสูญเสียปริมาตรของเซลล์ (loss of cell volume) เยื่อหุ้มเซลล์หดแฟบ (plasma membrane blebbing) นิวเคลียสรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) โครมาตินเกาะกลุ่ม (chromatin aggregation) และ ดีเอ็นเอถูกย่อยเป็นชิ้นเล็ก (endonucleo cytic degradation of DNA into nucleo- somal fragments) การเปลี่ยนแปลงของเซลล์จะเกิดภายหลังจากขบวนการเชื่อมโยงของการสัญญาณภายในเซลล์ (cascade of cell signalling) และ ขบวนการที่อาศัยเอ็นไซม์ caspase ที่เป็นตัวกลาง (caspase-mediated events) โดยการควบคุมของโปรตีนที่ทำให้เกิดการตาย (proapoptotic proteins) และโปรตีนยับยั้งไม่ให้เกิดการตาย (antiapoptotic proteins) การควบคุมอะพอพโทซิสที่ไม่เหมาะสมเกี่ยวข้องกับการก่อโรคเช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคภาวะหลอดเลือดหัวใจตีบตัน โรคออโตอิมมูน และโรคมะเร็งชนิดต่างๆ อะพอพโทซิสยังสามารถถูกกระตุ้นจากปัจจัยภายนอกเซลล์ได้จากสาเหตุต่างๆ เป็นต้นว่าการผ่าเหล่า โรคมะเร็ง การติดเชื้อไวรัส โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน และ โรคทางระบบประสาท เป็นต้น

การตรวจอะพอพโทซิสมีหลายวิธีเลือกใช้ในการศึกษาแตกต่างกันตามวัตถุประสงค์ โดยต้องคำนึงถึงวิถีการเกิดที่มีการสร้างสารควบคุมการตายภายในเซลล์ด้วยลักษณะจำเพาะ หากเลือกใช้เทคนิคเหมาะสมที่ตรวจหาหลักฐานดังกล่าวได้จะสามารถบ่งชี้การเกิดอะพอพโทซิสและอธิบายวิถีการเกิดอะพอพโทซิสได้

## การตายของเซลล์

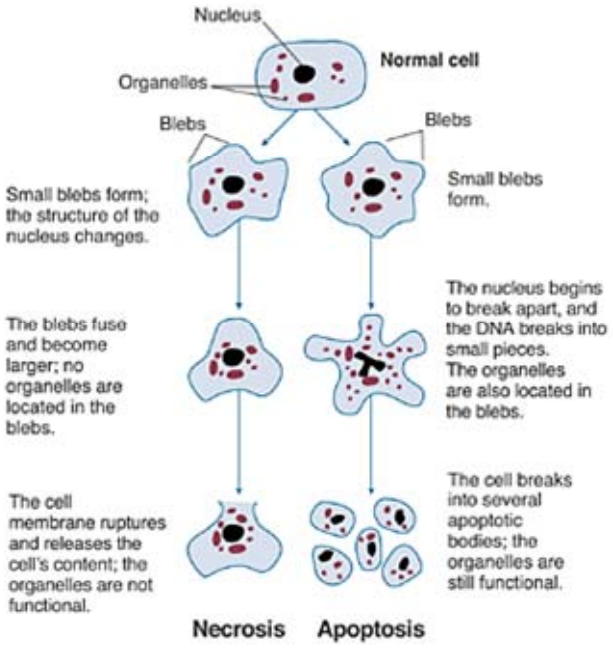
การเจริญและการตายของเซลล์เป็นขบวนการที่จำเป็นตลอดชีวิต ในคนที่โตเต็มวัยมีการตายของเซลล์ถึง $10^9$ เซลล์ต่อวัน การตายของเซลล์เกิดจากขบวนการที่แตกต่างกันอย่างน้อยสองขบวนการคือ การตายแบบอะพอพโทซิส ซึ่งเป็นการตายแบบใช้พลังงานและ การตายแบบเนโครซิส ซึ่งเป็นการตายแบบไม่อาศัยพลังงาน[1] สามารถแบ่งแยกความแตกต่างระหว่างรูปแบบการตายทั้งสองชนิดออกจากกันโดยดูการเปลี่ยนแปลงทางรูปสัณฐานของเซลล์ ดังกล่าวสรุปในตารางที่ 1 การตายของเซลล์สามารถจำแนกตาม Clarke's Classification of programmed cell death (PCD) ได้เป็น 3 แบบ[2,3] โดยมีรายละเอียดดังสรุปไว้ในตารางที่ 1 และรูปที่ 1

*ติดต่อได้ที่ natthida@kkku.ac.th โทรศัพท์/ โทรสาร 0 4336 2091

**ก. Type-I PCD (Apoptosis):** เกิดการหดของเซลล์ oligonucleosome DNA fragmentation, chromatin condensation ซึ่งทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า pyknotic nuclei และการแยกสลายของเซลล์เป็นรูปแบบที่เรียกว่า apoptotic bodies

**ข. Type-II PCD (Autophagocytosis):** มีการสร้าง autophagic vacuoles มีการขยายของไมโตคอนเดรีย และ เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum, ER) และการขยายตัวเล็กน้อยใน Golgi apparatus

**ค. Type-III PCD (Necrosis-like):** มีการบวม (osmotic swelling) ของ cell membranes และ organelles ต่างๆ และเกิดขบวนการอักเสบตามมา




**รูปที่ 1** ลักษณะรูปแบบการตายแบบเนโครซิส และอะพอพโทซิส[4]

**ตารางที่ 1** เปรียบเทียบการตายของเซลล์รูปแบบต่างๆ[3]

| ลักษณะ | Type I (Apoptosis) | Type II (Autophagocytosis) | Type III (Necrosis-like) |
|---|---|---|---|
| **ไซโตพลาสม** | Condensation/ blebbing/ fragmentation<br>Cytoskeletal protein breakdown (fodrin, myosin, light chain, actin) | Autophagic vacules (Avs)<br>Cytoskeletal protein preservation | Swelling of cytoplasm and mitochondria |
| **นิวเคลียส** | pyknotic | pyknotic | no |
| **Nuclear protein breakdown** | yes | no | no |
| **DNA fragmentation** | | | |
| **HMW*** | yes | yes | Random digestion |
| **LMW*** | yes | no | |
| **Morphological change** | cell shrinkage ↓ cell fragmentation into smaller bodies | Autophagic vacuoles | Cell membrane is lysed |
| **ATP requirement** | yes | yes | no |
| **Inflammatory response** | no | no | yes |
| **การตรวจ** | DNA ladder formation assay<br>TUNEL and annexin V<br>FACS analysis<br>Electron microscopy | Electron microscopy<br>Monodansylcadaverine (MDC)<br>Autophagosome membrane (LC3) | Gel electrophoresis |

*HMW = High molecular weight, LMW = Low molecular weight

## วิถีอะพอพโทซิส

อะพอพโทซิสถูกควบคุมโดยยีนหลายตัวเช่น tumor suppressor genes เช่น p53 และ Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10 (PTEN gene) และ oncogenes เช่น AKT และ BCL-2 และมีโมเลกุลเกี่ยวข้องหลายกลุ่มเช่น กลุ่ม anti-apoptotic proteins (Bcl-2และ Bcl-$X_L$) และ กลุ่ม pro - apoptotic proteins (Apaf-1และ caspases) รวมทั้งไมโต-คอนเดรียที่มีบทบาทสำคัญในการหลั่งสารที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิส เช่น cytochrome C และ apoptosis - inducing factor (AIF)[5] อะพอพโทซิสเกิดเมื่อมีการเชื่อมโยงสัญญาณภายในเซลล์ (cascade of cell signalling) โดยอาศัยเอนไซม์ caspase เป็นตัวกลาง (caspase-mediated events) และ pro- apoptotic proteins เป็นตัวชักนำการตาย โดยมี anti-apoptotic proteins เป็นตัวยับยั้งการตาย การเหนี่ยวนำอะพอพโทซิสเกิดได้ 2 วิถี ทั้งสองวิถีจะสัมพันธ์ต่อเนื่องกัน ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ effector caspases ที่ย่อยโปรตีนองค์ประกอบในเซลล์ต่าง ๆเช่น actin, lamin A, ICAD/CAD, PARP, Rb, p27, p21 ซึ่งจะนำไปสู่อะพอพโทซิส [5,6]

**ก) Death-receptor-induced extrinsic pathway[7]:** วิถีภายนอกเกิดเมื่อ death receptors (DRs) เช่น tumor necrosis factor receptor (TNFR), Fas receptor (FasR), DR3, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAILR1 หรือ DR4 และ TRAILR2 หรือ DR5) และ DR6 เป็นต้น[8] ถูกกระตุ้นด้วยการจับของลิแกนด์ที่จำเพาะ เกิดโครงสร้างที่ประกอบด้วย adaptor protein และ initiator caspase (pro caspase 8 หรือ 10) เรียกว่า “death-inducing signaling complex” (DISC) กระตุ้นให้ pro caspase เป็น initiator caspase ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้ effector caspases ทำงานและนำไปสู่ อะพอพโทซิส ดังแสดงในรูปที่ 2

**ข) Mitochondrial-apotosome-mediated apoptotic intrinsic pathway[7]:** วิถีจากภายในที่มีไมโตคอนเดรียและอะพอพโทโซมเป็นตัวกลางเกิดเมื่อมีการกระตุ้นจากสิ่งเร้าต่าง ๆเช่น แสงอัลตราไวโอเลต รังสีแกมม่า ภาวะเครียดออกซิเดชัน หรือการใช้ยาเคมีบำบัด (oxidative stress) ที่ทำให้เกิดการชำรุดเสียหายของ ดีเอ็นเอ เกิดขึ้น [9]

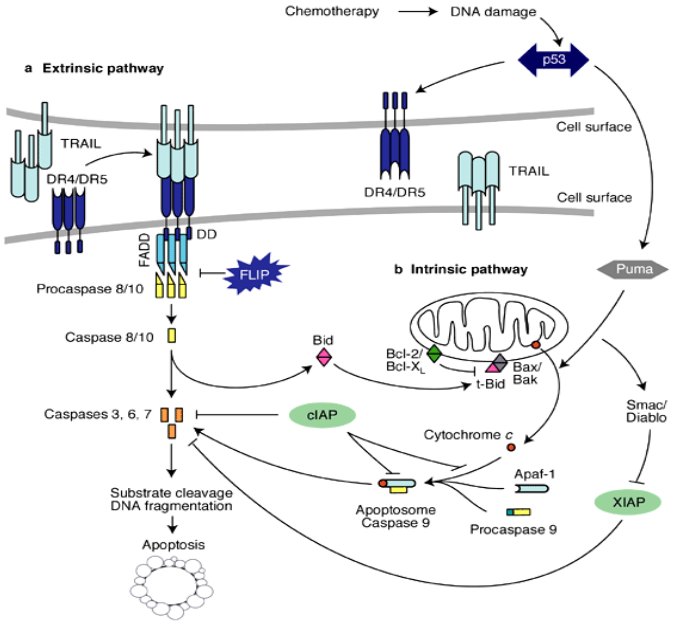
อะพอพโทซิสมีตัวควบคุม (regulators) อื่นอีกหลายตัว โดยสามารถแบ่งการควบคุมได้ 2 กลุ่ม คือ ตัวควบคุมที่ทำให้เกิดการตาย (proapoptotic regulators) และ ตัวควบคุมที่ยับยั้งการตาย (anti-apoptotic regulators) ซึ่งหากมีการควบคุมที่ผิดปกติเช่น การกระตุ้นให้ตัวควบคุมที่ทำให้เกิดการตายมากเกินไปก็จะเป็นสาเหตุของโรคต่าง ๆ เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคภาวะหลอดเลือดหัวใจตีบตัน โรคออโตอิมมูน แต่หากมีการกระตุ้นให้ตัวควบคุมที่ยับยั้งการตายก็จะเป็นสาเหตุหนึ่งของขบวนการเกิดมะเร็ง ดังนั้นการศึกษาอะพอพโทซิส จึงสามารถใช้ตัวควบคุมต่าง ๆมาเป็นตัวชี้บ่ง (marker) หรือ ใช้เป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยาต่อวิถีการตายแบบดังกล่าวได้ ดังแสดงในตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** ตัวควบคุมอะพอพโทซิสชนิดทำให้เกิดการตาย (proapoptotic) และ ชนิดยับยั้งการตาย (anti-apoptotic)[10]

| Proapoptotic regulators | Anti-apoptotic regulators |
|---|---|
| Bid | Bcl-$X_L$ |
| Bad | Bcl-2 |
| Bax | Bcl-w |
| Bim | Bcl-B |
| Bak | Mcl-1 |
| Puma (**p**53 **u**pregulated **m**ediator of **a**poptosis) | FLIP (FLICE-inhibitory protein) |
| AIF (**a**poptosis inducing **f**actor) | XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) |
| Cytochrome C | c-IAP1 (cellular inhibitor of apoptosis 1) |
| Apaf-1 (**a**poptosis **p**rotease-**a**ctivating **f**actor 1) | c-IAP2 (cellular inhibitor of apoptosis 2) |
| p53 | Survivin |
| p73 | NF-ĸB |
| Smac/DIABLO (**s**econd **m**itochondria-**d**erived **a**ctivator) | ICAD |
| Caspases **(C**ysteine **asp**artyl-specific prote**ase**s) | |
| HtrA2/Omi | |
| IkB (inhibitor of NF-ĸB) | |
| CAD (**c**aspase **a**ctivated **D**Nase) | |

## ความสำคัญของไมโตคอนเดรียต่ออะพอพโทซิส

ไมโตคอนเดรียทำหน้าที่สำรองพลังงานต่อเซลล์ผ่านขบวนการที่เรียกว่า “oxidative phosphorylation” มีความสำคัญต่ออะพอพโทซิส[11] ไมโตคอนเดรียมีช่องว่าง (inter membranespace; IMS) คั่นระหว่างเยื่อหุ้มภายนอก (outer membrane; OM) และเยื่อหุ้มภายใน (inner membrane; IM) ชั้น IM มี matrix, เอ็นไซม์ที่เกี่ยวกับ citric acid cycle, ß-oxidation และมีติ่งที่เรียกว่า “cristae” เป็นส่วนประกอบของ electron transport chain และ $F_0F_1$-ATPase ในการควบคุมขบวนการ oxidative phosphorylation[12] ส่วนชั้น IMS จะมีสารหลายชนิดเช่น caspase-independence death effector (nucleases และ / หรือ proteases), caspase activators, pro-caspases 2, 3 และ 9 ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิส[2] สารเหล่านี้จะผ่านจากชั้น OM ออกสู่ไซโตซอล (cytosol) ทางช่อง mitochondria permeability transition pore (PTP) ซึ่งเป็น ion channels ที่พบในไมโตคอนเดรีย เช่น adenine nucleotide translocator (ANT protein), voltage dependent anion channel (VDAC), benzodia-zepine receptor และ cyclophilin D ในภาวะปกติเซลล์จะมีระบบ Mitochondria Outer membrane permeabili- zation (MOMP) ภายใต้การควบคุมของโปรตีนกลุ่ม Bcl-2 family[2,12] ควบคุมไม่ให้สารเหล่านี้ผ่านออกมา เมื่อมีสิ่งกระตุ้นในสภาวะต่างๆ เช่น สภาวะเครียด (stress-induced apoptosis) เช่น การใช้สารเคมี หรือ ยาเคมีบำบัด รังสียูวี อนุมูลอิสระ การเสียสมดุลของแคลเซียมไอออน (disruption of $Ca^{2+}$ homeostasis) จะรบกวน electrochemical gradient ทำให้ PTP เปิด จะมีสารรั่วออกมามีผลให้ไมโตคอนเดรียบวม และ OM เกิดรอยรั่ว ทำให้โปรตีน apoptogenic factors เช่น cytochrome C, apoptosis-inducing factor (AIF), endo nuclease G (Endo G) และ second mitochondria-derived activator of caspases / direct IAP binding protein with a low iso- electric point (Smac / DIABLO) รั่วออกมาจากชั้น IMS หลั่งเข้าสู่ไซโตซอล โดย AIF และ EndoG จะส่งผ่านเข้าไปยังนิวเคลียสเพื่อเนี่ยวนำให้เกิด chromatin condensation และ DNA fragmentation ซึ่งขบวนการนี้ไม่อาศัย ATP และไม่ขึ้นกับการทำงานของเอนไซม์ caspase ส่วน Smac / DIABLO จะมีหน้าที่ในการยับยั้ง X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAPs)[2] เมื่อ cytochrome C หลั่งจากไมโตคอนเดรียเข้าสู่ไซโตซอลจะไปจับ apoptosis protein-activating factor 1 (Apaf-1) เกิดการไฮโดรไลซิสของ dATP / ATP ไปเป็น dADP / ADP ส่งผลให้เกิดการรวมกัน (oligomerisation) ของ cytochrome C, Apaf-1 และ pro-caspase-9 เป็นโครงสร้างเชิงซ้อนที่เรียกว่า “apoptosome”[2,6,10] ทำให้ pro-caspase-9 สามารถแยกย่อยตัวเอง (self-cleavage analogue) ให้เป็นเอนไซม์ที่พร้อมทำงานคือ caspase-9 แล้วไปกระตุ้นให้ effector caspases ทำงาน และเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการตายแบบ อะพอพโทซิสขึ้น (รูปที่ 2)




**รูปที่ 2 วิถีอะพอพโทซิส (apoptosis pathway)**[7]
**a) วิถีภายนอกเหนี่ยวนำโดย death receptor (death-receptor-induced extrinsic pathway)** เมื่อลิแกนด์จับกับ death receptor domain (DD) จะเกิดสัญญาณผ่านไปกระตุ้นเอนไซม์ caspase 8 ซักนำสู่อะพอพโทซิส,
**b) วิถีภายในที่มีไมโตคอนเดรียและอะพอพโทโซมเป็นตัวกลาง (mitochondrial-apotosome-mediated apoptotic intrinsic pathway)** สารที่หลั่งจากช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียได้แก่ cytochrome C และ AIF จะซักนำสู่อะพอพโทซิส ทั้งสองวิถีมีจุดร่วมตรงการตัดย่อยตัวกลาง (mediators) ต่างๆ ด้วย initiator caspases เช่น caspase 8 และ caspase 10

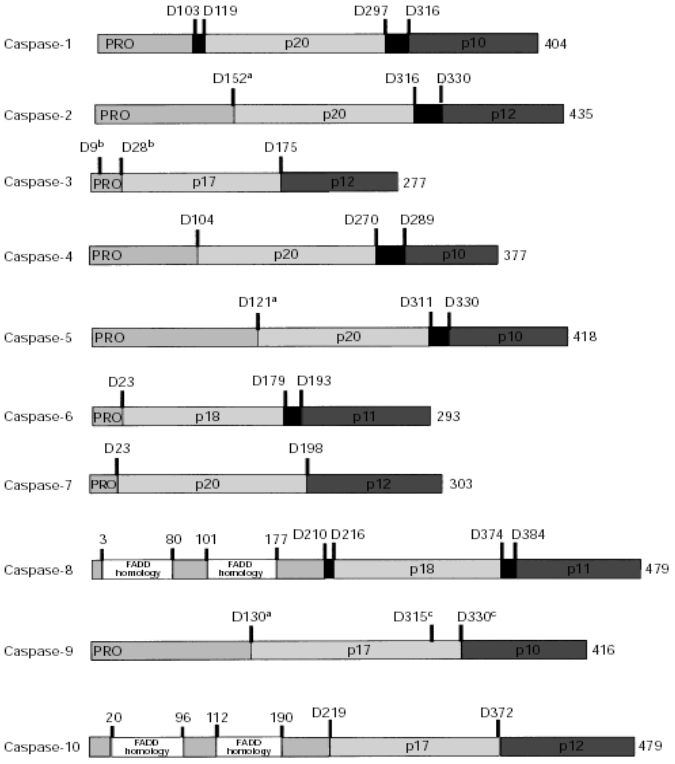
## เอ็นไซม์ CASPASES

**C**ysteine **asp**artyl-specific prote**ase**s **(caspases)** เป็นกลุ่มเอ็นไซม์ที่มีกรดอะมิโน cysteine - residue ตรงตำแหน่งกระตุ้น (active site) เพื่อจำเพาะต่อการเร่งปฏิกิริยาของ aspartate-residue เกี่ยวข้องกับอะพอพโทซิสและขบวนการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับ cytokine[10] ปัจจุบันมีรายงานอย่างน้อย 14 ชนิดแบ่งเป็น 2 กลุ่มตามหน้าที่การทำงาน[13]

**ก. Initiator caspases:** เป็นกลุ่ม caspase ที่มี pro domain ใหญ่กว่า 100 กรดอะมิโนเช่น caspase-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10 และ -12 ในส่วนของ prodomain จะมีโครงสร้างพิเศษ (structural motifs) เช่นใน caspase-8 และ -10 จะมี death effector domain (DED) หรือใน caspase-4, -5 และ -9 จะมี caspase recruitment domain (CARD) สำหรับใช้จับกับ adaptor molecule (FADDหรือ Apaf-1) ในการกระตุ้นการทำงานของ effector caspases ต่อไป

**ข. Effector caspases:** เป็นกลุ่ม caspase ที่มี pro domain น้อยกว่า 30 กรดอะมิโนเช่น caspase-3, -6, -7 และ -14 มีหน้าที่แยกย่อยสารที่เรียกว่า death substrates ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านกลไกการรอดชีวิต ด้วยการย่อยสลายโปรตีนโครงสร้างต่างๆ อันได้แก่ actin, fodrin และ lamin กระตุ้นให้เซลล์เกิดการแยกตัวและนิวเคลียสหดตัว ส่งเสริมการทำงานของ caspase-activated DNase / DNA fragmentation factor (CAD / DFF) ทำให้เกิด DNA fragmentation โดยการสลายเอ็นไซม์ poly (ADP - ribose) polymerase (PARP) ซึ่งหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอ และทำลาย caspase-activated DNase inhibitor (ICAD) เอ็นไซม์กลุ่มนี้ยังสามารถย่อยโปรตีนในวัฏจักรเซลล์ทำให้ในการแบ่งตัวของเซลล์หยุดชะงัก

caspases ถูกสร้างในรูป proenzyme (pro-caspases) โดยมีโครงสร้างหลักประกอบด้วย prodomain (PRO) ทางด้านปลาย N-ter และ หน่วยย่อย (subunits)มีส่วน large subunit (~ 20 kDa) และส่วน small subunit (~ 10 kDa) โดยส่วน large subunitจะมีตำแหน่งกระตุ้นที่เป็น cysteine-residueมีลำดับกรดอะมิโน(pentapeptidesequence) แบบ conserved QACXG motif (Gln-Ala-Cys-X-Gly, โดย X อาจเป็น Arg, Gln หรือ Gly)[1,14] การตัดย่อย (cleavage)[14] จะเกิดที่ตำแหน่งจำเพาะเช่น procaspase-3 จะถูกตัดย่อยที่ Asp-9 หรือ Asp-28 (รูปที่ 3) จากนั้นจะรวมกัน (dimerization) เป็นเฮเทอโรไดเมอไรเซชัน ประกอบด้วย large subunit 2หน่วย และ small subunit 2 หน่วย โดยมีตำแหน่งกระตุ้นจากส่วน large subunit และ small subunit ทำให้มีโครงสร้างแบบเฮเทอโรเตตร้าเมอริกที่จำเป็นต่อการทำงาน[15]




**รูปที่ 3 รูปจำลองโครงสร้างเอ็นไซม์ caspases** [14] เอ็นไซม์ caspases มีโครงสร้างหลักประกอบด้วย prodomain (PRO) ทางด้านปลาย N-ter และ หน่วยย่อย (subunits) มีส่วน large subunit (~ 20 kDa) และส่วน small subunit (~ 10 kDa) การตัดย่อย (cleavage) จะเกิดที่ตำแหน่งจำเพาะเช่น ตำแหน่งที่ถูกตัดย่อยของ procaspase-3 จะเกิดที่ Asp-9 หรือ Asp-28

## โปรตีน BCL-2 FAMILY

โปรตีน Bcl-2 family[16] มีหน่วยย่อยของโครงสร้าง (domain regions) ร่วมกันในส่วน BH1-4 (Bcl-2 homology) ดังแสดงในรูปที่ 4 และมีส่วน N-terminal transmembrane region ของ Bcl-2 proteins โดยโปรตีน Bcl-2 family มีบทบาทควบคุมวิถีอะพอพโทซิสทางไมโตคอนเดรียซึ่งจะถูกเคลื่อนย้ายไปยังส่วนเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโตคอนเดรียเพื่อรักษาความคงตัว (mitochondrial integrity) เพื่อควบคุมการหลั่ง cytochrome C จากไมโตคอนเดรียเข้าสู่ไซโตซอล ปัจจุบันโปรตีน Bcl-2 family ถูกค้นพบมากกว่า 20 ชนิด สามารถแบ่งแยกตามโครงสร้างและหน้าที่ เป็น 3 ชนิดย่อย คือ[6]

**ก. anti-apoptotic fraction:** Bcl-2, Bcl-$X_L$, Bcl-W, A1, Mcl-1 และ Boo

**ข. pro-apoptotic Bax/Bak-like group: Bax,** Bok, Bcl-$X_S$, Bak และ Bcl-$G_L$

**ค. pro-apoptotic BH-3 only proteins:** Bad, Bik, Bid, Hrk, Bim, Bmf, Noxa และ Puma

วิถีอะพอพโทซิสทางไมโตคอนเดรียจะถูกควบคุมโดยโปรตีนทั้งสองกลุ่ม โดย pro-apoptotic Bax/Bak จะกระตุ้นให้มีการหลั่ง cytochrome C และการทำงานของ pro-apoptotic factors อื่นๆ ส่วน pro-apoptotic BH-3 only proteins Bid จะช่วยสนับสนุนการทำงานของ Bax และ Bak โดยทำให้เกิด homo-oligomerization และ การเคลื่อนย้ายไปยังไมโตคอนเดรีย ในทางกลับกัน anti-apoptotic Bcl-2 และ Bcl-$X_L$ จะยับยั้งการหลั่งของ mitochondrial factors ต่างๆ และควบคุมขบวนการ hyperphosphorylation และเกิดอันตรกิริยากับ BH-3 only proteins ทำให้ยับยั้งการกระตุ้นของ Bax และ Bak[8]

## ความผิดปกติจากการเสียสมดุลของอะพอพโทซิส

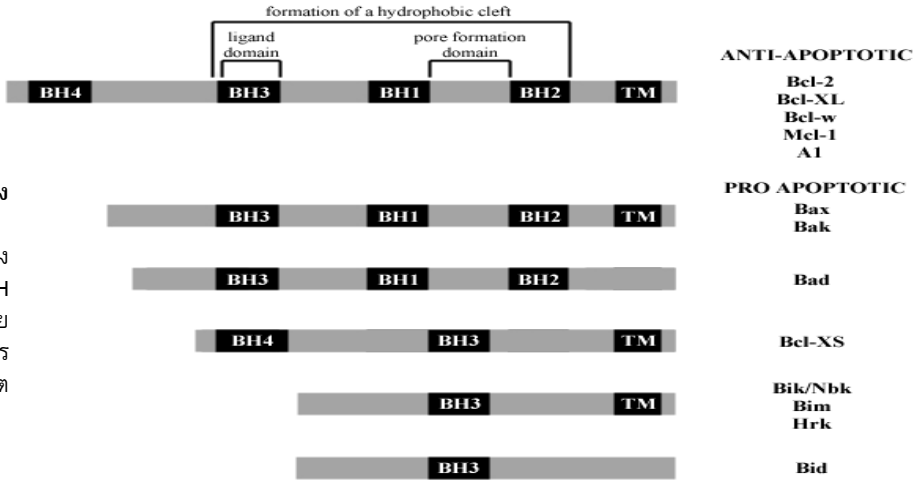
อะพอพโทซิสอาจเป็นทั้งต้นเหตุของโรค หรืออาจเป็นผลจากโรค ทั้งนี้ในภาวะปกติร่างกายจะรักษาสมดุลของการแบ่งตัวและเกิดอะพอพโทซิส หากมีการเหนี่ยวนำหรือยับยั้งอะพอพโทซิสจนเสียสมดุลจะนำไปสู่โรคต่างๆ มากมาย ยกตัวอย่างเช่น

**ความผิดปกติจากการเหนี่ยวนำอะพอพโทซิส:** พบได้ในการติดเชื้อไวรัส, โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน และโรคทางระบบประสาท เป็นต้น ยกตัวอย่างเช่น ในผู้ติดเชื้อ human immunodeficiency virus (HIV) หากมีการเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสของเซลล์ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อไวรัส human immunodeficiency virus (HIV) จะมีผลทำให้แสดงอาการจนเข้าสู่ระยะเอดส์[17] หรือในระหว่างการพัฒนาสมองอะพอพโทซิสที่ผิดปกติมีผลในการทำลายเซลล์ประสาทมากกว่าร้อยละ 50 ย่อมทำให้เกิดความผิดปกติไม่เพียงแค่ neuro-degenerative disorders เช่น Alzheimer's, Huntington's และ Parknson's disease ยังเกี่ยวข้องกับ neurodevelop-mental disorder อื่นๆ เช่น autism, Fragile X syndrome และ schizophrenia เป็นต้น[18,19]

**ความผิดปกติจากการยับยั้งอะพอพโทซิส :** การยับยั้งอะพอพโทซิสเป็นการเพิ่มของเซลล์ที่มีความผิดปกติจนร่างกายไม่สามารถรักษาสมดุลได้ยกตัวอย่างเช่น การผ่าเหล่าของยีนอย่างจำเพาะมีผลต่อการเกิดอะพอพโทซิส ซึ่งพบในโรค autoimmune เช่น systemic lupus erythema tosis (SLE)[20,21] หรือการรอดของเซลล์มะเร็งจากวัฏจักรเซลล์ และการเพิ่มจำนวนของไวรัสที่ก่อโรค เช่น ไวรัส Epstein-Barr ที่เป็นสาเหตุของ infectious mononucleosis, nasopharyngeal carcinoma, post - transplant lympho-proliferative disorder และ Burkitt's lymphoma เป็นต้น

## การตรวจวัดอะพอพโทซิส

อะพอพโทซิสสามารถตรวจวัดได้หลายวิธี แต่ละวิธีมีหลักการและมีข้อดี ข้อด้อยแตกต่างกัน การเลือกใช้เทคนิคที่เหมาะสมเพื่อตรวจสอบจึงมีประโยชน์สามารถบ่งชี้การเกิดอะพอพโทซิสและอธิบายถึงวิถีการเกิดอะพอพโทซิสได้ บทความนี้ได้รวบรวมหลักการตรวจและตัวอย่างการประยุกต์ไปใช้งานของแต่ละวิธี




**รูปที่ 4 รูปจำลองโครงสร้างโปรตีน Bcl-2 family**[16]
โปรตีน Bcl-2 มีโครงสร้างของ domain ที่ร่วมกันในตำแหน่ง BH 1-4 และส่วนใหญ่จะมีส่วนปลาย N-terminal (TM) ที่จำเป็นในการเคลื่อนย้ายไปยังเยื่อหุ้มของไมโตคอนเดรีย

**1. วิธีตรวจรูปสัณฐาน[22]**

**หลักการ:** เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสระยะสุดท้ายจะมีการหดตัว ผนังเซลล์โป่งพอง โครมาตินจับตัวแน่น และมีการแยกย่อยของดีเอ็นเอ การตรวจอะพอพโทซิสด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อประเมินรูปสัณฐานจึงสังเกตการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสและ โครงสร้างของ apoptotic body โดยการย้อมด้วย Haematoxylin และ Thionin การย้อมสีทั้งสองชนิดนี้จะใช้กับตัวอย่างเซลล์เนื้อเยื่อที่ทำการ fix ด้วย formaldahyde และ wax-embebed เซลล์จะย้อมติดสีฟ้าตรงตำแหน่ง nuclei ทั้งหมดและมีสีที่ตัดกันดี โครมาตินที่อัดแน่นภายในเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสจะติดสีที่ค่อนข้างเข้ม และมีขอบเขตที่คมชัดต่างจาก mitotic nuclei เซลล์เพาะเลี้ยงสามารถย้อมนิวเคลียสด้วยสารเรืองแสงได้โดยไม่ต้อง fix เซลล์ก่อน สารเรืองแสงที่นิยมใช้มีหลายตัวได้แก่ 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), Hoechst 33258, Hoechst 33342, Acridine orange, Ethidium bromide และ Propidium iodide จำแนกการตายของเซลล์ได้จากลักษณะการย้อมติดสี DNA หรือ RNA ที่แตกต่างกัน และเซลล์ที่มีชีวิตส่วนใหญ่ไม่ยอมให้สารเรืองแสงแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ดังสรุปในตารางที่ 3 วิธีตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์เหมาะต่อการศึกษาอะพอพโทซิสในระยะสุดท้ายอย่างคร่าวๆ แต่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดการตายได้อย่างแม่นยำ

**ตัวอย่างการประยุกต์ใช้:** การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ และฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 (wild type p53) และ Hep3B (delete p53) เมื่อรับสารสกัดเมทานอลจากไมซีเลีย (MEM) ของเชื้อรา *Antrodia camphorata* (Polyporacea, Aphyllophorales) ทำการตรวจอะพอพโทซิสโดยการย้อมดูด้วย DAPI ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์[23]

**2. วิธีตรวจ Annexin V/ PI binding[24]**

**หลักการ:** เซลล์ระยะเริ่มเกิดอะพอพโทซิสจะมีการเปลี่ยนแปลงของพลาสมาเมมเบรนโดย phosphotidyl serine (PS) ซึ่งอยู่ด้านในจะเคลื่อนที่ด้านนอก (PS externalization หรือ PS redistribution) ในระยะนี้ propidium iodide (PI) ยังไม่สามารถผ่านได้เนื่องจากพลาสมาเมมเบรน ยังไม่สูญเสียคุณสมบัติ แต่หลังจากเกิด chromatin condensation แล้ว Annexin V จะสามารถจับกับประจุลบของ phosphotidyl serine ได้ ดังนั้นหากเชื่อม Annexin V กับสารเรืองแสง (fluorescein) จะสามารถตรวจสอบการตายแบบอะพอพโทซิสได้โดยใช้โฟลไซโทมิเตอร์ และหากใช้ Annexin V – fluorescein ร่วมกับ PI จะทำให้สามารถจำแนกเซลล์ออกเป็นกลุ่มที่มีชีวิต (Annexin V negative / PI negative), Early apoptotic cell (Annexin V Positive / PI negative) และ Late apoptotic cell หรือ Necrosis (PI positive)ได้[25, 26]

**ตัวอย่างการประยุกต์ใช้:** การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับ (Hep G2, Hep 3B และ PLC/PRF/5) ของสารสกัดน้ำ และสารสกัดเมทานอลจากต้น *Physalis angulata* และ *P. peruviana* ตรวจวัดอะพอพโทซิสโดยการตรวจการเปลี่ยนแปลงของพลาสมาเมมเบรนด้วยวิธี annexin V binding โดยใช้ Annexin V-FITC ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วยโฟลไซโตมิเตอร์[24]

**3. วิธีตรวจ DNA fragmentation[26]**

**หลักการ:** เซลล์อะพอพโทซิสจะเกิดการแตกหักของ genomic DNA (DNA fragmentation) เป็น oligonucleosomal fragments หรือ fragmented DNA ที่มีรูปแบบจำเพาะขนาด 180-200 bp โดยมี Extensive DNA degrad-ation ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในอะพอพโทซิสระยะแรก (early apoptosis) เมื่อเกิดการย่อยแยก DNA จะขาดเป็นชิ้นส่วนเล็กๆของ double-stranded, LMW-DNA fragments (mono- และ oligonucleosome) เช่นเดียวกับ single strand breaks (“nicks”)ใน HMW-DNA ตรวจสอบได้โดยการแทรก modified nucleotides ที่ติดฉลาก (X-dUTP,โดย X จะเป็นส่วนที่ติดฉลากเช่น X=biotin, DIG หรือ สารเรืองแสง) เข้ากับปลาย 3′-OH termini ในสายชิ้นส่วน DNA เอนไซม์ที่ใช้เติม X-dUTP nucleotides มี 2 ชนิด คือ

**ตารางที่ 3** คุณสมบัติของสารเรืองแสงในการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มและการย้อมติดนิวเคลียสของเซลล์

| สารเรืองแสงที่ใช้ย้อม | การแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ | | การย้อมติดนิวเคลียส | |
|---|---|---|---|---|
| | เซลล์มีชีวิต | เซลล์ไม่มีชีวิต | Nucleus (DNA) | Cytoplasm (RNA) |
| Acridine orange | ผ่าน | ผ่าน | เขียว | แดง-ส้ม |
| Hoechst 33342 | ผ่าน | ผ่าน | ฟ้า | ไม่ติดสี |
| Hoechst 33258 | ไม่ผ่าน | ผ่าน | ฟ้า | ไม่ติดสี |
| DAPI | ไม่ผ่าน | ผ่าน | ฟ้าสว่าง | ไม่ติดสี |
| Ethidium bromide | ไม่ผ่าน | ผ่าน | ส้ม | ค่อนข้างแดง |
| Propidium iodide | ไม่ผ่าน | ผ่าน | แดง | ไม่ติดสี |

**ก. terminal deoxynucleotidyl transferase (end labeling)** เป็นการเติม X-dUTP เข้ากับปลายหู่ของ double - strand DNA breaks โดยไม่ต้องใช้ template เรียกวิธีนี้ว่า **t**erminal deoxynucleotide transferase (TdT) - mediated conjugated d**U**TP **n**ick **e**nd- **l**abeling (TUNEL)

**ข. DNA polymerase I (nick translation)** เป็นการเติม X-dUTP เข้ากับ template DNA ที่ได้ถูก nicked เรียกวิธีนี้ว่า "***In situ*** **n**ick **t**ranslocation, **ISNT**" สามารถตรวจ apoptotic DNA และ random fragmentation ของ DNA ได้

การตรวจ fragmented DNA เบื้องต้น ทำได้โดยวิธี Agarose gel electrophoresis[22] การตรวจปริมาณของ fragmented DNA ของเซลล์อะพอพโทซิสในเซลล์เดี่ยว (individual cells) อาศัยการย้อมสี DNA ภายในเซลล์โดยวิธี enzymatic labeling เช่น วิธี TUNEL enzymatic labeling assay หรือ การย้อมดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสง เช่น วิธีการวัดปริมาณดีเอ็นเอภายในเซลล์[9]

**3.1 วิธี Agarose gel electrophoresis**

**ตัวอย่างการประยุกต์ใช้:** การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ และฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 (wild type p53) และ Hep 3B (delete p53) เมื่อรับสารสกัดเมทานอลจากไมซีเลียของเชื้อรา *Antrodia camphorata* (Polyporaceae, Aphyllophorales) ตรวจวัดอะพอพโทซิสเบื้องต้นโดยการตรวจ fragmented DNA ด้วยวิธี Agarose gel electro-phoresis[23]

**3.2 วิธี TUNEL (terminal deoxynucleotide transferase (TdT) - mediated conjugated dUTP nick end-labeling) assay**

**ตัวอย่างการประยุกต์ใช้:** การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ และฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 (wild type p53) และ Hep3B (delete p53) เมื่อรับสารสกัดเมทานอลจากไมซีเลีย (MEM) ของเชื้อรา *Antrodia camphorata* (Polyporaceae, Aphyllophorales) ทำการตรวจยืนยันอะพอพโทซิสโดยการตรวจ fragmented DNA ด้วยวิธี TUNEL[23]

**3.3 วิธี Measurement of cellular DNA content**

**ตัวอย่างการประยุกต์ใช้:** การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับ (Hep G2, Hep 3B และ PLC/PRF/5) เมื่อรับสารสกัดน้ำ และสารสกัดเมทานอลจากต้น *Physalis angulata* และ *P. peruviana* ตรวจยืนยันอะพอพโทซิสโดยการตรวจปริมาณ DNA histograms (fractional DNA) โดยโฟลไซโตมิเตอร์ และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยการประมาณร้อยละในแต่ละวัฏจักรของเซลล์ การเกิดอะพอพโทซิสจะพิจารณาจากระดับการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนของเซลล์ sub-G1 (hypodiploid)[27]

**4. วิธีตรวจ mitochondrial transmembrane potential**

**หลักการ:** การสูญเสียหน้าที่ของ mitochondrial trans membrane potential ($\Delta\Psi m$) $\Delta\Psi m$ เป็นผลมาจากการกระจายตัวอย่างไม่สม่ำเสมอของโปรตอนในชั้น IM ของไมโตคอนเดรีย ทำให้มีประจุลบเพิ่มขึ้นบน inner side ของ IM ทำให้ $\Delta\Psi m$ มีค่าศักย์ลดลง สารเรืองแสงหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งมีคุณสมบัติ cationic และ lipophilic สามารถใช้ย้อมตรวจไมโตคอนเดรียเพื่อดูการเปลี่ยนแปลง $\Delta\Psi m$ ได้ จึงใช้เป็นตัวชี้วัดอะพอพโทซิสในระยะ early stage[28]

**ตัวอย่างการประยุกต์ใช้:** การศึกษาผลของ สาร 4-nonylphenol(4-NP)ต่อการเหนี่ยวนำเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดอะพอพโทซิส การศึกษาได้ตรวจยืนยันอะพอพโทซิสโดยการตรวจการเปลี่ยนแปลงของ $\Delta\Psi m$ ด้วยการย้อมด้วย JC-1[29]

**5. วิธีอื่น ๆ**

อะพอพโทซิส ถูกควบคุมโดยยีน มีการสร้างสารชีวเคมีต่างๆ เช่นโปรตีนเอนไซม์ ตัวรับ(receptors) และตัวควบคุมอื่นๆ การตรวจสารชีวเคมีที่เกี่ยวกับอะพอพโทซิสจึงระบุวิถีอะพอพโทซิสได้ การตรวจจึงมีหลายวิธีเช่น การตรวจ catalytic enzyme ต่อสารตั้งต้นที่ถูกเร่งปฏิกิริยาให้เป็นสารเรืองแสงสามารถตรวจวัดการเรืองแสงได้เพื่อบอกถึงปริมาณการทำงานของเอนไซม์ การใช้แอนติบอดี้เชื่อมต่อกับสารเรืองแสงในการจับกับโปรตีนจำเพาะ การใช้เทคนิค Enzyme - Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) การวิเคราะห์ mRNA ด้วยเทคนิค Reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR) การใช้เทคนิค Southern blot analysis รวมทั้งเทคนิคทางโฟลไซโตมิเตอร์ที่สามารถวิเคราะห์การตายในเชิงปริมาณได้[30]

**5.1 วิธีตรวจ Caspase activity assay**

**หลักการ:** 7-amino-4-trifluoromethyl-coumarin (AFC) ถูกเชื่อมด้วยพันธะเปปไทด์กับ DEVD-, LETD หรือ LEHD tetrapeptide ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่จำเพาะของ caspase-3, -8 และ -9 ตามลำดับ เมื่อมี caspase-3, -8 และ -9 ทำงานจะย่อยสารประกอบเชิงซ้อนทำให้ AFC ถูกปลดปล่อยและเรืองแสงสัมพันธ์กับปริมาณการทำงานของ caspase-3, -8 และ -9[23]

**ตารางที่ 4** ชนิดของสารเรืองแสงที่ใช้ในการย้อมเพื่อดูการเปลี่ยนแปลง$\Delta\Psi m$[28]

| สารเรืองแสง | Excitation/emission | เซลล์วิเคราะห์ | ความเข้มข้นที่เหมาะสม |
|---|---|---|---|
| DiOC6(3) | 484 nm/499 nm | Live cells | 20-40 nM |
| Rhodamine123 | 485 nm/530 nm | Live cells | 5 μM |
| JC-1 | 485 nm/530 nm | Live cells | 10 μM |
| CMXRos | 578 nm/591 nm | Live cells, fixed cells | 50-200 nM |

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้: การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์และฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 (wild type p53) และ Hep3B (delete p53) เมื่อได้รับสารสกัดเมทานอลจากไมซีเลียของเชื้อรา *Antrodia camphorata* (Polyporaceae, Aphyllophorales) ทำการตรวจอะพอพโทซิสโดยการตรวจวัด caspase -3, -8 และ -9 activity[23]

**5.2 วิธีตรวจ procaspase activation**

**หลักการ:** caspases ถูกสร้างในรูป proenzyme (procaspases) ประกอบด้วย prodomain (PRO) ทางด้านปลาย N-ter และ หน่วยย่อย (subunits)มีส่วน large subunit (~ 20 kDa) และส่วน small subunit (~ 10 kDa) การตัดย่อยจะเกิดที่ตำแหน่งจำเพาะ จากนั้นจะรวมกัน (dimerization) เป็นเฮเทอโรไดเมอไรเซชัน ประกอบด้วย large subunit 2 หน่วย และ small subunit 2 หน่วยที่จำเป็นต่อการทำงาน[15] การกระตุ้น caspases ทั้งกลุ่ม initiator caspases หรือ effector caspases จะเป็นดัชนีที่บ่งถึงการเกิดอะพอพโทซิส การทดสอบหาชนิดของ caspase ทำโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะตรวจ หลังจากแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลในสนามไฟฟ้า และย้ายไปอยู่บนเมมเบรน (Western blotting) การวิเคราะห์โดยเทคนิค Western blotting นี้สามารถประยุกต์ใช้กับตัวควบคุมอื่นๆ ที่เป็นโปรตีนเกี่ยวข้องกับอะพอพโทซิส โดยใช้ antibodies ที่จำเพาะต่อแต่ละโปรตีน สามารถดูปริมาณได้จากความเข้มของแถบปฏิกิริยา

**ตัวอย่างการประยุกต์ใช้:** การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์และฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ 2 สายพันธุ์ได้แก่ HepG2 (wild type p53) และ Hep3B (delete p53) เมื่อได้รับสารสกัดเมทานอลจากไมซีเลียของเชื้อรา *Antrodia camphorata* (Polyporaceae, Aphyllophorales) ทำการตรวจอะพอพโทซิสโดยการตรวจวัดการกระตุ้น caspase ด้วยการตรวจการเปลี่ยนแปลงความสัมพันธ์เชิงปริมาณของ caspase -3, -8 และ procaspase -3, -8 activation ด้วยเทคนิค Western blotting[23]

**5.3 วิธีตรวจ DNA binding**

**หลักการ:** อะพอพโทซิสควบคุมโดยยีน การเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกอาศัย transcription factor เช่น NF-ΚB (p65 subunit) เข้าจับกับดีเอ็นเอ (DNAbinding) ในตำแหน่งที่จำเพาะเพื่อเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออก การตรวจวัดการทำงานของ NF-ΚB ในการจับกับดีเอ็นเอ (DNAbinding capacity) จึงเป็นตัวบ่งชี้การแสดงออกของยีนเป้าหมาย[31]

**ตัวอย่างการประยุกต์ใช้:** การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านเนื้องอก ของสาร curcumin ที่สกัดมาจากขมิ้นต่อเซลล์ HA22T/VGH โดยใช้สารสกัดจากนิวเคลียส (nuclear extracts) ของเซลล์ HA22T/VGH ซึ่งมีคุณสมบัติแสดงออก activated NF-ΚB ทำการตรวจอะพอพโทซิสโดยตรวจการแสดงออกของ IAPs และ NF-ΚB target genes อื่นๆโดยเทคนิค ELISA[31]

**5.4 วิธีตรวจปริมาณ mRNA**

**หลักการ:** เมื่อเกิดอะพอพโทซิส จะมีการสร้าง RNA ที่กำหนดการสร้างสารชีวเคมีต่างๆ ที่ควบคุมอะพอพโทซิส เช่น Bcl-2, Bcl-XL, c-IAP-1, c-IAP-2, NAIP, XIAP, survivin, livin, $\beta$-catenin, COX-2, c-myc การวิเคราะห์ mRNA ด้วยเทคนิค Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) จึงเป็นอีกวิธีที่สามารถใช้ศึกษาการเกิดอะพอพโทซิสได้ โดยสกัด RNA ออกมาแล้วทำการเปลี่ยนเป็น complementary DNA (cDNA) ด้วยเอ็นไซม์ Reverse transcriptase activity และทำการเพิ่มจำนวน DNA โดยเทคนิค PCR ซึ่งสามารถบ่งชี้การแสดงออกเพิ่มขึ้น (up regulation) หรือลดลง (down regulation) ของยีนต่างๆที่ควบคุม (proapoptotic/ antiapoptotic genes) อะพอพโทซิส[31]

**ตัวอย่างการประยุกต์ใช้:** การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านเนื้องอก ของสาร curcumin ที่สกัดมาจากขมิ้นต่อเซลล์ HA22T/VGH ทำการตรวจอะพอพโทซิสโดยการตรวจการตรวจระดับปริมาณ mRNA ของ Bcl-2, Bcl-XL, c-IAP-1, c-IAP-2, NAIP, XIAP, survivin, livin, $\beta$-catenin, COX-2, c-myc โดยเทคนิค RT-PCR[31]

**5.5 วิธีตรวจการเคลื่อนย้ายของโปรตีนจากไมโตคอนเดรีย (translocation of proteins from mitochondrial in cells**)

**หลักการ:** การเกิดอะพอพโทซิสระยะเริ่มแรก ไมโตคอนเดรียจะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่สองลักษณะใหญ่ๆ คือ เยื่อหุ้มภายนอก (OM) ยอมให้โปรตีนซึมผ่านทำให้มีการหลั่งสาร pro-apoptotic activity เช่น cytochrome C และ AIF ในระหว่างชั้น IMS เข้าสู่ไซโตพลาสม และอีกลักษณะคือ ค่าศักย์ inner mitochondrial membrane transmembrane potential ($\Delta\Psi m$) ลดลง[32] ขณะที่ขบวนการ อะพอพโทซิสดำเนินอยู่ การศึกษาอาจมีความจำเป็นในการติดตามการเคลื่อนย้ายของโปรตีนในเซลล์ด้วยเทคนิคการแยกส่วนประกอบของเซลล์ (cellular fractionation) ร่วมกับเทคนิค Western blotting จึงเป็นวิธีที่นิยมวิธีหนึ่ง[33]

**ตัวอย่างการประยุกต์ใช้:** การศึกษาการกระตุ้นการทำงานของ caspases ในเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร (gastric epithelial cells, AGS) ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสโดยเชื้อ *H. pylori* โดยได้เพาะเลี้ยงเซลล์ differentiated human gastric cancer cells และ human gastric mucous cell primary cultures บ่มกับเชื้อ *H. pylori* ตรวจอะพอพโทซิสโดยติดตามการหลั่ง cytochrome C จากไมโตคอนเดรีย ด้วยเทคนิค Western blotting[34]

## บทสรุป:

อะพอพโทซิสมีลักษณะที่แตกต่างจากการตายแบบเนโครซิส คือ ผนังเซลล์โป่งพอง เซลล์หดตัว โครมาตินจับตัวกันแน่น และ มีการแยกย่อยของดีเอ็นเอ อะพอพโทซิสเกิดโดย 2 วิถี คือ วิถีภายนอกเหนี่ยวนำโดย death receptor และวิถีภายในมีไมโตคอนเดรียกับอะพอพโทซมเป็นตัวกลาง อะพอพโทซิสมีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาและรักษาสมดุลของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ หากเสียสมดุลจากการเหนี่ยวนำหรือยับยั้งอะพอพโทซิสจะนำไปสู่โรคต่างๆ มากมาย อะพอพโทซิสอาจเป็นทั้งต้นเหตุของโรค หรืออาจเป็นผลของโรคก็ได้ การตรวจวัดอะพอพโทซิสมีหลายวิธี การสังเกตรูปสัณฐานของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ เป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อนที่มักเลือกเป็นวิธีเบื้องต้น แต่จะไม่เหมาะต่อการตรวจสอบอะพอพโทซิสระยะเริ่มต้น การตรวจยืนยันโดยวิธีที่มีความจำเพาะเช่นการใช้ Annexin V ในการจับกับ Phosphatidylserine ที่เยื่อหุ้มพลาสมา การตรวจสอบการแยกตัวของดีเอ็นเอด้วย electrophoresis gels หรือ TUNEL การวิเคราะห์หน้าที่ของไมโตคอนเดรียระหว่างที่เกิดอะพอพโทซิส และ การวิเคราะห์ทางชีวเคมีของการตายแบบอะพอพโทซิสอื่นๆ จะสามารถจำแนกชนิดการตายได้อย่างแม่นยำ ดังนั้นการเลือกใช้เทคนิคที่เหมาะสมเพื่อตรวจสอบจะมีประโยชน์สามารถใช้บ่งชี้การเกิดอะพอพโทซิสและอธิบายถึงวิถีการเกิดอะพอพโทซิสได้

## เอกสารอ้างอิง:


**1.** Ashe PC., and Berry MD. 2003. Apoptotic signaling cascades. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 27(2): 199-214.

**2.** Bras M., Queenan B., and Susin A. 2005. Programmed cell death via mitochondria: different models of dying. Biochemistry 70(2): 284-293.

**3.** Kim R., Emi M., Tanabe K., Uchida Y., and Arihiro K. 2006. The role of apoptotic or nonapoptotic cell death in determining cellular response to anticacer treatment. Eur J Surg Oncol 32(3): 269-277.

**4.** Goodlett, CR., and Horn, KH. 2001. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. Alcohol Res Health 25(3):175–184.

**5.** Tannock IF., Hill RP., Bristow RG., and Harrington L. ed. 2005. The Basic science of oncology. 4th ed.: McGraw-Hill Companies Inc. Canada.

**6.** Hu W., and Kavanagh JJ. 2003. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. Lancet Oncol 4(12): 721-729.

**7.** Clarke N., Germain P., Alltucci L., and Gronemeyer H. 2004. Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. Expert Rev Mol Med 6(25): 1-23. Retrieved Feb 20, 2007. from http://www.expertreviews.org/0400852Xh. Htm.

**8.** de Thonel A., and Eriksson JE. 2005. Regilation of death receptors-relevance in cancer therapies. Toxicol Appl Pharmacol 207(2): 123-132.

**9.** Bai J., and Odin, JA. 2003. Apoptosis and the liver: relation to autoimmunity and related conditions. Autoimmun Rev 2(1): 36-42.

**10.** Harwood SM., Yaqoob MM., and Allen DA. 2005. Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis. Ann Clin Biochem 42(6): 415-431.

**11.** Desagher S., and Martinou JC. 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. Trends Cell Biol 10(9): 369-377.

**12.** Regula KM., Ens K., and Kirshenbaum LA. 2003. Mitochondria-assisted cell suicide: a license to kill. J Mol Cell Cardiol 35(6): 559-567.

**13.** Gupta S. 2003. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. Int J Oncol 22(1):15-20.

**14.** Cohen GM. 1997. Caspase: the executioners of apoptosis. Biochem J 326(1): 1-16.

**15.** Fan T., Han L., Cong R., and Liang J. 2005. Caspase family proteases and apoptosis. Acta Biochim Biophys Sin 37(11): 719–727.

**16.** Vaskivuo T. 2002. Regulation of apoptosis in the female reproductive system. Oulu University Library. Retrieved October 12, 2006. from http://herkules. oulu.fi/isbn951426 6676/html/i267425.html.

**17.** Arnoult D., Petit F., Lelièvre JD., and Estaquier J. 2003. Mitochondria in HIV-1-induced apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 304(3): 561-574.

**18.** Lev N., Melamed E., and Offen D. 2003. Apoptosis and Parkinson's disease. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 27(2): 245– 250.

**19.** Takuma K., Yan SS., Stern DM. and Yamada K. 2005. Mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis in Alzheimer's disease. J Pharmacol Sci 97(3): 312-316.

**20.** Eguchi K. 2001. Apoptosis in autoimmune disease. Intern Med 4(4): 275-284.

**21.** Manson JJ., and Isenberg DA. 2003. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus. J Med 61(11): 343-346.

**22.** Studzinski GP. ed. 1999. Apoptosis apractical approach. New York: Oxford University Press. USA. p. 19-132.

**23.** Song TY., Hsu SL., and Yen GC. 2005. Induction of apoptosis in human hepatoma cells by mycelia of Antrodia camphorata in submerged culture. J Ethnopharmacol 100(1-2): 158-167.

**24.** Willingham MC. 1999. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. J Histochem & Cytochem 47(9): 1101–1110.

**25.** Boldyrev AA. 2000. Discrimination between apoptosis and necrosis of neurons under oxidative stress. Biochem (Mosc) 65(7): 834-842.

**26.** Shoieb AM., Elgayyar M., Dudrick PS., Bell JL.and Tithof PK. 2003. *In vitro* inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. Int J Oncol 22(1): 107-113.

**27.** Wu SJ., Ng LT., Chend, CH., Line, DL., Wange SS., and Lin CC. 2004. Antihepatoma activity of *Physalis angulata* and *P peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells. Life Sci 74(16): 2061-2073.

**28.** Goldman RD., and Leinwand LA. eds. 1997. Cells A laboratory manual vol. 1: Culture and Biochemical Analysis of Cell: Chapter 15 Apoptosis Assays. Danver, MA: Cold Spring Harbor Laboratory Pr: USA. p.15.1-15.23.

**29.** Yao G., Yang L., Huc Y., Liang J., Liang J., and Hou Y. 2006. Nonylphenol-induced thymocyte apoptosis involved caspase-3 activation and mitochondrial depolarization. Mol Immunol 43(7): 915-926.

**30.** Roberts R. Ed. 2000. Apoptosis in toxicology: Chapter 10 Toxic mechanisms mediated by gene expression. London: Taylor & Francis. UK. p. 213-232.

**31.** Notarbartolo M., Poma P., Perri D., Dusonchet L., Cervello M., and D' Alessandro N. 2005. Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF-kB activation levels and in IAP gene expression. Cancer Lett 224(1): 53–65.

**32.** Castedo M., Ferri K., Roumier T., Metivier D., Zamzami N., and Kroemer G. 2002. Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. J Immunol Methods 265(1-2): 39-47.

**33.** Hughes D., and Mehmet H. eds. 2003. Cell proliferation & apoptosis. Oxford University, New York: BIOS Scientific Pub. USA.

**34.** Potthoff A., Ledig S., Martin J., Jandl O., Cornberg M., Obst B., *et al*. 2002. Significance of the Caspase Family in *Helicobacter pylori* induced gastric epithelial apoptosis. Helicobacter 7(6): 367-377.

# APOPTOSIS: PATHWAY AND ASSAY

***Pokpong Prayong*[1] *Natthida Weerapreeyakul*[1,2,*] *Sahapat Barusrux*[3,4]**

[1]*Faculty of Pharmaceutical Sciences,* [2]*The Center for Research and Development of Herbal Health Product*

[2]*Faculty of Associated Medical sciences,* [4]*The Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Khon Kaen University.*

**ABSTRACT:** Apoptosis is the gene-regulated process, which has an important role involving with development and homeostasis of multicellular organisms. An inappropriate control of apoptosis can cause the diseases such as Alzheimer, Ischaemic disease, autoimmune disorders and several forms of cancer. Apoptosis is processed through 2 major pathways: 1) the death-receptor-induced extrinsic and 2) mitochondria-apoptosome-mediated apoptotic intrinsic pathway. Apoptosis can be analysed by many methods. For instance; detection of morphology changes by using fluorescent microscope to determine the appearance of cell and nuclear staining. Apoptptic cell will show plasma membrane blebbing, cell shrinkage, chromatin condensation and DNA fragmentation. This method can estimate apoptosis in the late stage but can not discriminate cell death accurately. The specific apoptosis detection is thus necessary. For example an early detection of apoptosis can be confirmed by using mitochondrial function analysis, other biochemical assays or Annexin V which binds to the phosphatidylserine presented at plasma membrane. DNA fragmentation can be detected by using electrophoresis gels or TUNEL. These assay methods can be performed as qualitative and quantitative analyses which can indicate the occurring and apoptotic pathway. The obtained result can be used for diagnosis the apoptosis related disease and for define specific target of the test compound in drug design and development.

**Key words:** Apoptosis, caspases, Bcl-2 family

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: natthida@kku.ac.th Tel/ Fax 0 4336 2091