



บทบาทของ Protease-Activated Receptor 2 ในการหลั่งโปรตีนที่
เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยเซลล์กล้ามเนื้อเรียบทางเดินอาหาร

โดย

พ.ต. สรทศ โปสุวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เทคนิคการแพทย์มหาบัณฑิต

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทบาทของ Protease-Activated Receptor 2 ในการหลั่งโปรตีนที่
เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยเซลล์กล้ามเนื้อเรียบทางเดินอาหาร

โดย

พ.ต. สรทศ โปสุวรรณ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เทคนิคการแพทย์มหาบัณฑิต

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์



A ROLE OF PROTEASE-ACTIVATED RECEPTOR 2 IN SECRETION OF
PROTEINS INVOLVED IN INFLAMMATION BY GASTROINTESTINAL
SMOOTH MUSCLE CELLS

BY

Major Sorratod Bosuwan



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF THE MASTER OF

MEDICAL TECHNOLOGY
ALLIED HEALTH SCIENCES
THAMMASAT UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2015

COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะสหเวชศาสตร์

วิทยานิพนธ์

ของ

พ.ต. สรทศ โปสุวรรณ

เรื่อง

บทบาทของ Protease-Activated Receptor 2 ในการหลั่งโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ
โดยเซลล์กล้ามเนื้อเรียบทางเดินอาหาร

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เทคนิคการแพทย์มหาบัณฑิต

เมื่อ วันที่ 20 มิถุนายน พ.ศ. 2559

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์




(ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์



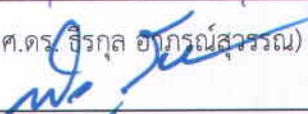
(ดร. วิมลพัทธ์ ศรีไวย์)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(ผศ.ดร. ชีรกุล อานุรักษ์สุวรรณ)

คณบดี



(รศ.ดร. ก้ำพล รุจิวิชญ์)

หัวข้อวิทยานิพนธ์

บทบาทของ Protease-Activated Receptor 2 ในการ
หลังโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยเซลล์กล้ามเนื้อ
เรียบทางเดินอาหาร

ชื่อผู้เขียน

พ.ต.สรทศ โปสุวรรณ

ชื่อปริญญา

เทคนิคการแพทย์มหาบัณฑิต

สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์

คณะสหเวชศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร. วิมลพัทธ์ ศรีไวย์

ปีการศึกษา

2558



บทคัดย่อ

Protease-activated receptor 2 (PAR2) ที่เป็นส่วนหนึ่งของ G protein-coupled receptor ซึ่งถูกกระตุ้นได้ด้วยเอนไซม์ protease ได้แก่ trypsin หรือ tryptase ทำหน้าที่กระตุ้นหรือยับยั้งโปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การพัฒนา การอักเสบ การเคลื่อนที่ และการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ โดยมีหน้าที่ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ที่แสดงออก ซึ่งยังไม่มีการศึกษาหน้าที่ของ PAR2 กับการหลังโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ในครั้งนี้จึงศึกษาผลของการกระตุ้น PAR2 ด้วยเปปไทด์จำเพาะ SLIGKV ต่อระดับการหลังโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยทำการศึกษาในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่ได้รับการกระตุ้นด้วย SLIGKV ที่ความเข้มข้น 10-6 M ทำการเก็บอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 24 ชั่วโมง แล้วจึงทำการเก็บอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์อีกครั้ง เพื่อนำไปศึกษาหาโปรตีนที่หลั่งออกมาในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS พบเปปไทด์ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างสถานะที่มีการกระตุ้น PAR2 เปรียบเทียบกับสถานะที่ไม่มีกระตุ้น PAR2 ทั้งหมด 310 ชนิด สามารถบอกชนิดของโปรตีนได้ 285 ชนิด จากการวิเคราะห์พบโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบในสถานะที่มีการกระตุ้น PAR2 ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ 7 ชนิด ได้แก่ TLR2 และ IL-25 เป็นต้น พบโปรตีน 11 ชนิด ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายแบบ apoptosis และการเจริญเติบโตของเซลล์ ได้แก่ TP53BP2, TOX3 และ MKI67 เป็นต้น และพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ 4 ชนิด ได้แก่ CHRD และ DAG1 เป็นต้น จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าการกระตุ้น PAR2 ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลังโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบได้นอกจากนี้ยังหลังโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ และยับยั้งการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ ส่งผลให้การกระตุ้น PAR2 นั้นอาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยให้เซลล์มีชีวิตรอดอยู่ได้ โดยผ่านการควบคุมการเจริญเติบโตและการตายของเซลล์จากสารที่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลั่งออกมา

คำสำคัญ: protease-activated receptor 2, PAR2, SLIGKV, proteomics, LC-MS, การอักเสบ

Thesis Title	A Role Of Protease-Activated Receptor 2 In Secretion Of Proteins Involved In Inflammation By Gastrointestinal Smooth Muscle Cells
Author	Major Sorratod Bosuwan
Degree	The Degree Of The Master
Department/Faculty/University	Medical Technology Allied Health Sciences Thammasat University
Thesis Advisor	Dr. Wimolpak Sriwai
Academic Years	2015



ABSTRACT

Protease-activated receptor 2 is a member of G protein-coupled receptor and expressed in a wide variety of cells. PAR2 is involved in several physiological and pathophysiological processes, including growth and development, inflammation, migration, and apoptosis depending on cell types. However, the role of PAR2 in the context of secretory function of inflammatory proteins in smooth muscle cells remains unknown. The aim of the present study was to determine the secretory protein involved in inflammatory process upon PAR2 activation by PAR2 in smooth muscle cells. Gastric smooth muscle cells were treated with the PAR2 activating peptide SLIGKV (1 μ M) for up to 48 hours in serum-free media. Serum free media were used as negative controls. Culture supernatants were collected at 48 and 72 hours and subjected to proteomic analysis by LC-MS/MS. A total of 310 peptides were detected and found to correspond to 285 proteins. This approach identified 172 significant changes in protein levels. These proteins were expressed at significantly different levels in treated sample as compared with untreated sample. These proteins could be classified by their functions in inflammation, proliferation and apoptosis, and cell migration. The study successfully identified proteins that are differentially secreted by smooth muscle cells upon activation by PAR2 activating peptide. Such secretory protein may be of pathological significance in the role of PAR2 in regulation the inflammation, proliferation, and apoptotic process and may offer protection of cells against physiological stress.

Keywords: protease-activated receptor 2, PAR2, SLIGKV, proteomics, LC-MS, inflammation

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีด้วยความกรุณาเป็นอย่างยิ่งจาก ดร.วิมลพัทธ์ ศรีไวย์ ที่กรุณาได้รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ซึ่งได้กรุณาหาแหล่งทุนในการทำวิจัย ให้คำปรึกษาและติดตามการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา นับตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสำเร็จเรียบร้อย สมบูรณ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของท่านเป็นอย่างยิ่ง รวมทั้งขอขอบพระคุณ ภาควิชาเทคนิค การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่อนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อ เพื่อเป็นสถานที่ทำการวิจัยในการเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ

ขอขอบพระคุณ ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล หัวหน้าห้องปฏิบัติการวิจัย proteomics สถาบันจีโนม สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่อนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการวิจัย proteomics เป็นสถานที่ในการทำวิจัยตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ รวมทั้งให้ คำปรึกษาที่มีประโยชน์สำหรับการวิจัยครั้งนี้ และขอบคุณนางสาว สุรชาติพย์ กิตติเสนาชัย เจ้าหน้าที่ ห้องปฏิบัติการวิจัย proteomics สถาบันจีโนม สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัยต่างๆ ทำให้การวิจัยครั้งนี้ดำเนินการสำเร็จด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณมารดาที่ให้โอกาสศึกษาในหลักสูตรนี้ คณาจารย์สาขาเทคนิค การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ที่เป็นประโยชน์นำไปใช้ในการ ปฏิบัติงาน และเพื่อนๆหลักสูตรเทคนิคการแพทยมหาบัณฑิตทุกคน ที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจ ตลอดมา

พ.ต. สรทศ โปสุวรรณ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(2)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญตาราง	(9)
สารบัญภาพ	(10)
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 Protease-activated receptors (PARs)	4
2.2 PARs และการส่งสัญญาณ	8
2.3 บทบาทหน้าที่ของ PARs ในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal system)	10
2.4 บทบาทของ PARs ในการเกิดการอักเสบของทางเดินอาหาร	15
2.5 การอักเสบ (inflammation)	18
2.6 สารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (chemical mediators of inflammation)	25
2.7 เทคนิคทาง proteomics	30

บทที่ 3 วิธีการวิจัย	32
3.1 การเตรียมเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากทางเดินอาหารของกระต่าย	32
3.2 การเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากทางเดินอาหาร	32
3.3 การกระตุ้น PAR2 ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากทางเดินอาหาร	33
3.4 การตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Lowry	33
3.5 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE	35
3.6 การย้อมด้วยเงิน (silver staining)	37
3.7 การย่อยโปรตีนภายในเจล (in gel digestion)	38
3.8 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS	40
3.9 การหาปริมาณและบอกชนิดของโปรตีน	41
3.10 การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics analysis)	41
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	42
4.1 ผลการวิจัย	42
4.1.1 ผลการเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากทางเดินอาหาร	42
4.1.2 ผลการกระตุ้น PAR2 ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากทางเดินอาหาร	43
4.1.3 ผลการตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Lowry	43
4.1.4 ผลการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการย้อมสีด้วยเงิน	44
4.1.5 ผลการย่อยโปรตีนภายในเจล	45
4.1.6 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS	46
4.1.7 ผลการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics analysis)	56
4.2 การอภิปรายผล	94
4.2.1 โปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ	94
4.2.2 โปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับ apoptosis และ proliferation	98
4.2.3 โปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการ migration ของเซลล์	104

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	114
5.1 สรุปผลการวิจัย	114
5.2 ข้อเสนอแนะ	114
รายการอ้างอิง	116
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก การเตรียมสาร	148
ภาคผนวก ข ข้อมูลการวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง	153
ภาคผนวก ค ข้อมูลการวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง	157
ภาคผนวก ง ข้อมูลการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE	159
ภาคผนวก จ ข้อมูลของโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS	160
ประวัติผู้เขียน	176

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างทั้ง 12 ตัวอย่าง	43
4.2 โปรตีน 310 ชนิดที่ได้จากการตรวจวัดด้วยวิธี LC-MS	47
4.3 จำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน 310 ชนิด	60
4.4 โปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบ	95
4.5 โปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการ apoptosis และ proliferation	99
4.6 โปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการ migration	104
ค.1 ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทั้ง 12 ตัวอย่าง	158
ง.1 ปริมาตรที่ต้องใช้ในการปรับให้แต่ละตัวอย่างมีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากัน	159
จ.1 ข้อมูลดิบที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS ของโปรตีนทั้งหมด	162

สารบัญภาพ

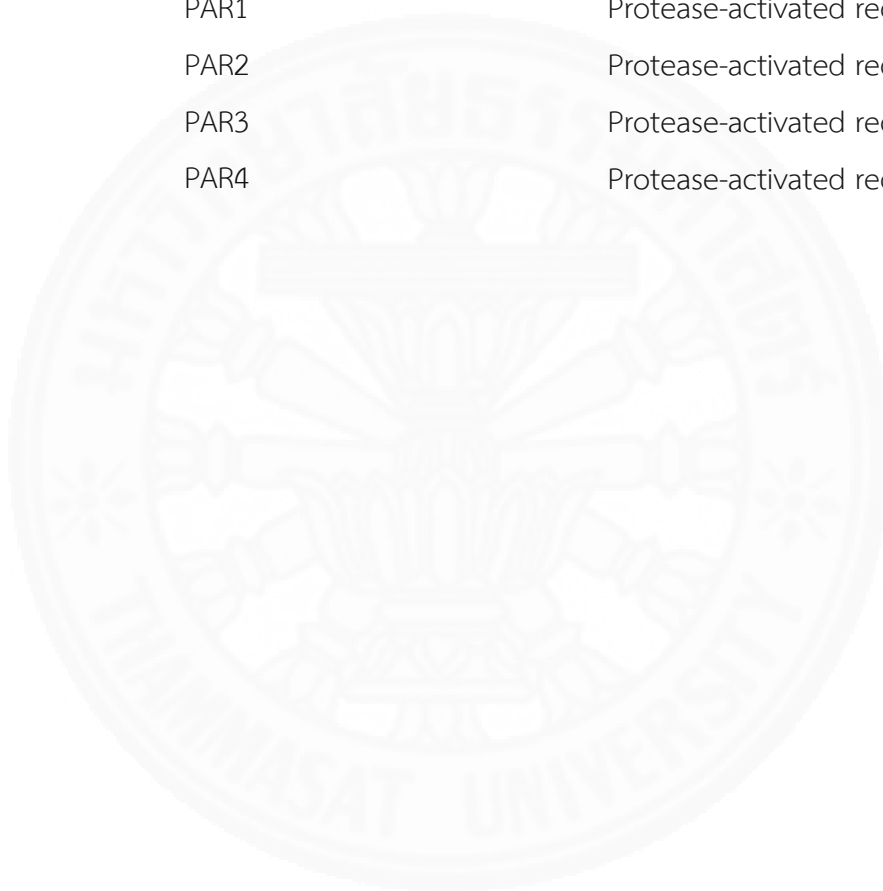
ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างและหน้าที่ในแต่ละส่วนของ PARs ในแต่ละชนิด	5
2.2 ภาพสรุปรวมการส่งสัญญาณของ PAR1	9
2.3 บทบาทโดยสรุปของ PAR2 ในการหลั่งสารจากต่อมมีท่อต่างๆ	12
2.4 กลไกควบคุมการเคลื่อนที่ของกล้ามเนื้อเรียบในทางเดินอาหารโดย PARs	14
2.5 การส่งสัญญาณของ PAR1 ให้เกิดการสร้าง prostaglandin E2	15
2.6 การส่งสัญญาณของ PAR2 ในเซลล์มะเร็งจากการกระตุ้นด้วย TF-FVIIa	18
4.1 เซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากทางเดินอาหารที่ได้จากการเพาะเลี้ยง	42
4.2 เจลที่ได้จากการทำ SDS-PAGE และย้อมด้วยเงินแล้ว	44
4.3 การแบ่งเจลออกเป็นส่วนๆ 14 ส่วนตามขนาดโมเลกุลของโปรตีน	45
4.4 การแบ่งโปรตีนตามหน้าที่ของโมเลกุลโปรตีน	57
4.5 การแบ่งโปรตีนตามกระบวนการทางชีวภาพของโปรตีน	58
4.6 การแบ่งโปรตีนตามส่วนประกอบของเซลล์จากโปรตีนจำนวน	59
4.7 การเปรียบเทียบโปรตีนที่ได้กับคอนโทรลที่เวลา 48 ชั่วโมง	78
4.8 การเปรียบเทียบโปรตีนที่ได้กับคอนโทรลที่เวลา 72 ชั่วโมง	80
4.9 การเปรียบเทียบโปรตีนที่ได้ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง	81
4.10 ความสัมพันธ์กันระหว่างโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์จำนวน 310 ชนิด	83
4.11 ความสัมพันธ์ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ 7 ชนิด	97
4.12 ความสัมพันธ์ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis และ proliferation 11 ชนิด	103
4.13 ความสัมพันธ์ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการ migration ของเซลล์ 4 ชนิด	107
4.14 ความสัมพันธ์ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ, apoptosis และ migration	109
4.15 ผลสรุปรวมกลุ่มของโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ	113
ค.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA	157

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์/คำย่อ

คำเต็ม/คำจำกัดความ

AP	Activating peptide
GPCR	G protein-coupled receptor
PAR1	Protease-activated receptor 1
PAR2	Protease-activated receptor 2
PAR3	Protease-activated receptor 3
PAR4	Protease-activated receptor 4



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ทางเดินอาหาร (digestive tract) นั้นมีลักษณะเป็นท่อที่ประกอบด้วยชั้นกล้ามเนื้อทำหน้าที่ในการย่อยอาหารโดยเชิงกลและทำให้อาหารเคลื่อนที่แบบ peristalsis ซึ่งกระบวนการนี้จะสำเร็จได้นั้นต้องมีการหดตัวและการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบภายในทางเดินอาหาร (1) นอกเหนือจากหน้าที่ดังกล่าวแล้ว เซลล์กล้ามเนื้อเรียบยังสามารถสังเคราะห์และคัดหลั่งโมเลกุลสื่อสัญญาณได้ โดยมีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้รายงานหน้าที่การสังเคราะห์และคัดหลั่งนี้ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่เตรียมได้จากอวัยวะต่างๆ เช่น เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของผนังหลอดเลือด (vascular smooth muscle cells) (2), เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของทางเดินหายใจ (airway smooth muscle cells) (3-5) เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาเรื่องความสามารถในการสังเคราะห์หรือคัดหลั่งสารของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของระบบทางเดินอาหารน้อย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบภายในระบบทางเดินอาหาร พบว่ามีเซลล์หลายชนิดสามารถสังเคราะห์และหลั่ง cytokine หรือสารที่มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบได้เช่น เซลล์จากชั้นเยื่อเมือก (mucosa) สามารถสังเคราะห์และหลั่ง cytokine และ chemokine ได้ โดยในปี ค.ศ. 2002 Matthew D. Vrees และคณะได้พบว่ามี การแสดงออกของ IL-1 β ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากลำไส้ใหญ่ของผู้ป่วยที่เป็นโรค ulcerative colitis (6) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า IL-1 β สามารถกระตุ้นให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบจาก ลำไส้ของหนู ให้เกิดการแสดงออกและหลั่ง IL-6 ได้ (7) ต่อมา Salinthon S. และคณะได้มี การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในลำไส้ของมนุษย์ ซึ่ง ผลที่ได้พบว่าเซลล์กล้ามเนื้อเรียบสามารถสร้างและหลั่ง IL-1 β และ IL-6 รวมถึง chemokine, IL-8 และ RANTES (8) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของเซลล์กล้ามเนื้อ เรียบในการหลั่งโมเลกุลสื่อสัญญาณต่างๆ อย่างเช่น cytokine หรือ chemokine ได้

ในระบบทางเดินอาหารมีการหลั่งเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อใช้ในการย่อยอาหาร โดยมี เอนไซม์กลุ่ม protease เป็นหนึ่งในกลุ่มเอนไซม์สำคัญที่ทำหน้าที่นั้น โดยทำหน้าที่ในการย่อยโปรตีน ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเอนไซม์ protease สามารถติด receptor อย่าง PARs ได้อย่างจำเพาะ และกระตุ้นให้เกิดการส่งสัญญาณเข้าไปภายในเซลล์ โดย PARs ซึ่งเป็น receptor ชนิด G-protein

coupled receptors นั้นมีสมาชิกอยู่ 4 ชนิด ได้แก่ PAR1, PAR2, PAR3 และ PAR4 (6-9) ซึ่งการกระตุ้น PARs ทั้ง 4 ชนิดนั้นอาศัยกลไกพื้นฐานเหมือนกัน กล่าวคือ เอนไซม์ protease จะตัด receptor ที่ N-terminus อย่างจำเพาะ ทำให้เปิดเผยส่วน tethered ligand ออกมา ซึ่งจะทำหน้าที่กระตุ้น PARs ให้เกิดการส่งสัญญาณต่อไป มีเอนไซม์ serine protease หลายชนิดที่สามารถกระตุ้น PARs ได้ เช่น thrombin สามารถกระตุ้น PAR1, PAR3 และ PAR4 ได้ ในขณะที่ trypsin และ tryptase ที่หลังจาก mast cells สามารถกระตุ้น PAR2 ได้ (6-9) นอกจากนี้สาร protease จากจุลชีพ ยังสามารถกระตุ้น PARs ได้ด้วย (10) นอกจากนี้ PARs ยังสามารถถูกกระตุ้นได้โดยการใช้เปปไทด์สังเคราะห์ (synthetic peptide) สายสั้นๆขนาดความยาว 5-6 กรดอะมิโน ที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ tethered ligand จึงสามารถทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น (agonists) PARs ได้โดยไม่ต้องอาศัยการตัดโปรตีนตัวรับด้วยเอนไซม์ (11-12)

มีงานวิจัยรายงานว่าเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของทางเดินอาหารมีการแสดงออกของทั้ง PAR1 และ PAR2 (13) และสามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยเอนไซม์จำเพาะหรือ PARs-activating peptide โดยสำหรับ PAR1 จะเป็น SFLLRN และ PAR2 จะเป็น SLIGKV (14-17) ซึ่งการกระตุ้น PAR1 และ PAR2 นั้นจะทำให้เกิดการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในทางเดินอาหาร อย่างไรก็ตามหน้าที่ของ PARs เกี่ยวกับการสร้างและการหลั่ง cytokine หรือ chemokine โดยเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากทางเดินอาหารยังไม่มีผู้ใดศึกษาไว้มากนัก โดยมีงานวิจัยบางงานได้ศึกษาถึงบทบาทของ PAR2 ในการกระตุ้นให้มีการหลั่งสารในเซลล์ต่างๆเช่น งานของ Saito A. และคณะพบว่า TGF- β 1 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ PAR2 ได้ และยังเพิ่มการกระตุ้น PAR2 ให้มีการหลั่ง IL-6 สูงขึ้นเมื่อเทียบกับ control ใน endometriotic stromal cells ได้ (18) หรืองานวิจัยของ Borensztajn K. และคณะพบว่า FXa สามารถกระตุ้นให้ PAR2 มีการหลั่ง IL-6, MCP-1, α -actin, fibronectin และ TGF- β ใน fibroblast ได้ (19) จากการศึกษาเหล่านี้ทำให้ทราบถึงบทบาทของ PAR2 ที่มีต่อการหลั่ง cytokine, chemokine และโปรตีนอื่นๆ ที่มีความสำคัญ โดยสารที่คัดหลั่งออกมาอาจทำหน้าที่เป็นทั้ง autocrine และ paracrine factors ที่ทำหน้าที่ในการดึงดูดและรักษาระดับของเม็ดเลือดขาวในบริเวณที่มีการอักเสบ (20-21) หรือในทางตรงกันข้ามการคัดหลั่งของสารต่อต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (22-23) เช่น IL-10 อาจทำหน้าที่ในการจำกัดระดับความรุนแรงและระยะเวลาของการอักเสบได้ (23)

การศึกษาหน้าที่ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในการสร้างและหลั่งสารสื่อสัญญาณ จึงมีความสำคัญต่อการเข้าใจกลไกและหน้าที่พื้นฐานของกล้ามเนื้อเรียบ รวมถึงการเกิดพยาธิสภาพและการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบโดย PARs ในอวัยวะต่างๆ เช่น โรคของหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular disease), โรคของระบบทางเดินหายใจ (pulmonary disease) และ

โรคของทางเดินอาหาร (gastrointestinal disease) จากทั้งในสภาวะปกติและในสภาวะที่เกิดการอักเสบ เช่น โรค inflammatory bowel disease ที่มีการอักเสบเรื้อรังมีรายงานในโรคเหล่านั้นพบว่าการแสดงออกของเอนไซม์ protease โดยเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ เซลล์บุหลอดเลือด (vascular endothelial cells), เซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells), T-cells, eosinophils และ neutrophils (18-20, 24) ซึ่งเอนไซม์ protease นี้สามารถกระตุ้น PARs ได้ โดยหน้าที่ของ PARs ที่มีต่อการอักเสบนั้นมีความซับซ้อน เนื่องจาก PARs แต่ละชนิดมีบทบาทเป็นได้ทั้งตัวกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory) และมีบทบาทในการทำหน้าที่ปกป้อง (protective) (25-26) ระบบอวัยวะต่างๆ รวมถึงระบบทางเดินอาหาร ซึ่งขึ้นกับบริบทของโรคและชนิดของเซลล์นั้นๆ

เป็นที่น่าสนใจว่าในโรคบางชนิด เช่น โรค inflammatory bowel disease (IBD) ที่มีการอักเสบเรื้อรังของทางเดินอาหารซึ่งอาจเกิดแผลที่ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่อยู่ลึกลงไปชั้นของทางเดินอาหาร ออกมาสัมผัสกับเอนไซม์ trypsin ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ทั่วไปในทางเดินอาหาร หรือ tryptase ซึ่งหลังจาก mast cell ในบริเวณที่เกิดการอักเสบของโรค ซึ่งทั้งคู่เป็นเอนไซม์ protease ที่สามารถกระตุ้น PAR2 ที่พบได้ทั่วไปบนเซลล์กล้ามเนื้อเรียบได้อย่างจำเพาะ โดยการกระตุ้นนี้อาจทำให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลั่งโมเลกุลสื่อสัญญาณบางชนิดออกมาที่อาจช่วยให้เกิดการอักเสบของโรคที่เป็นอยู่มากขึ้นหรือเกิดเป็นการอักเสบแบบเรื้อรังที่สามารถกลับมาเป็นซ้ำได้ อย่างเช่น cytokine หรือ chemokine ต่างๆ ดังนั้นการศึกษารุ่นนี้ผู้วิจัยจึงสนใจการทำวิจัยเพื่อตรวจสอบหาชนิดของสารที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ที่หลังจากเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของระบบทางเดินอาหารเมื่อมีการกระตุ้นผ่าน receptor ชนิด PAR2

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาการการหลั่งของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยเซลล์กล้ามเนื้อเรียบทางเดินอาหาร หลังจากที่มีการกระตุ้นผ่าน Protease-activated receptor 2

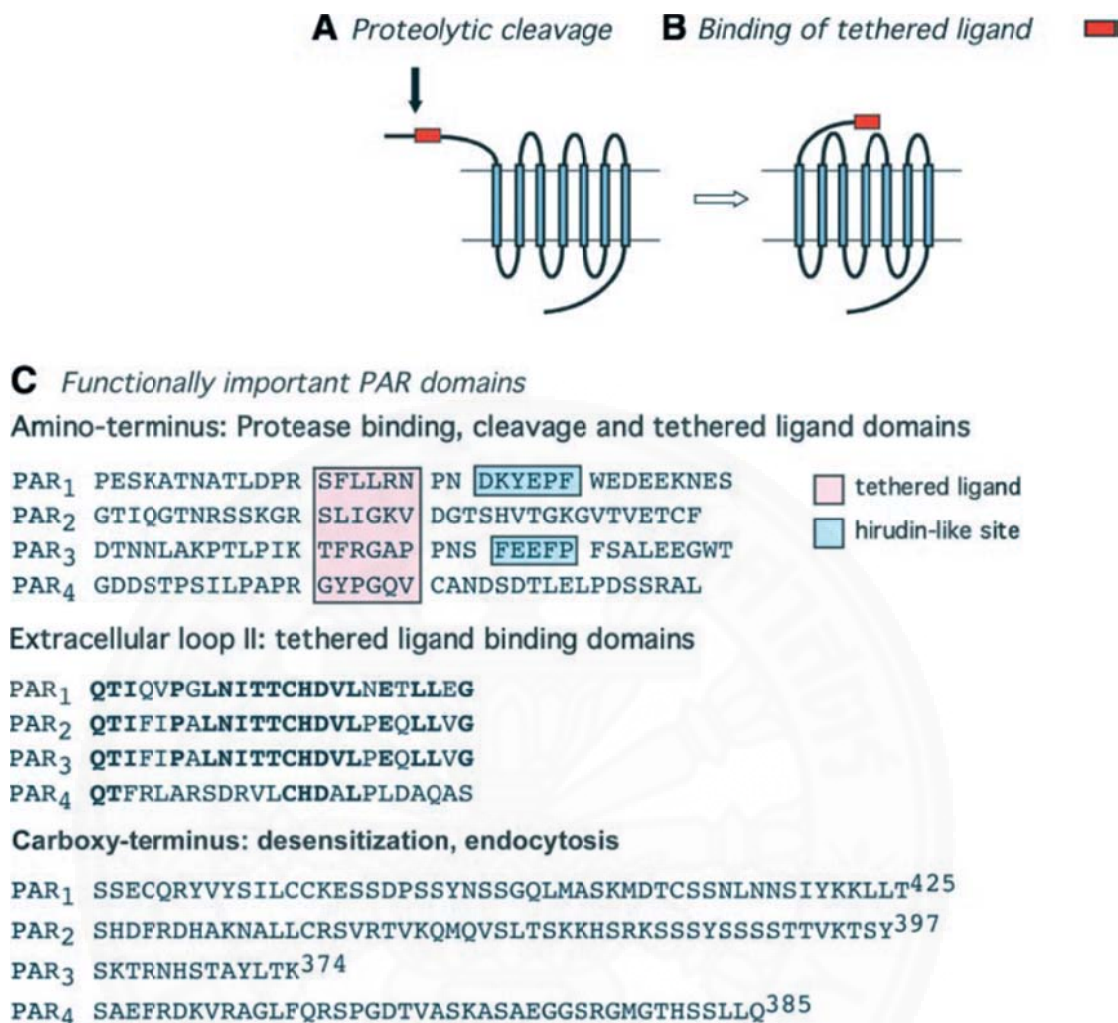
บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 Protease-activated receptors (PARs)

PARs เป็น seven transmembrane domain G protein-coupled receptors (GPCR) ซึ่งจะประกอบไปด้วยสมาชิก 4 ชนิด ได้แก่ PAR1, PAR2, PAR3, PAR4 ซึ่ง PARs จะสามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยเอนไซม์ protease หลากหลายชนิด รวมถึง protease จากกลไกการแข็งตัวของเลือด, จากเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และจากระบบทางเดินอาหาร ซึ่งการกระตุ้น receptor นี้จะทำให้เกิดการส่งสัญญาณไปยังเซลล์มากมายหลายชนิดแล้วก่อผลที่ตามมาหลากหลาย (27)

PAR1 หรือที่รู้จักกันในชื่อของ thrombin receptor เข้ารหัสโปรตีน 425 ตำแหน่งและมี 7 hydrophobic domains ของ GPCR ซึ่งใน PAR1 ของมนุษย์นั้นจะประกอบด้วย amino-terminal signal sequence, extracellular amino-terminal domain 75 ตำแหน่ง และบริเวณที่ถูก thrombin ตัดภายในปลายอะมิโน LDPR41↓ S42FLLRN (28) ต่อมาได้มีการค้นพบ PAR2 ซึ่งพบว่ามีรหัสโปรตีน 395 ตำแหน่ง พร้อมกับมีลักษณะทั่วไปแบบ GPCR โดยที่มีกรดอะมิโนประมาณ 30% ที่เหมือนกันกับ PAR1 แต่ส่วน extracellular amino-terminal domain 46 ตำแหน่ง ประกอบด้วยบริเวณที่มีการตัดด้วย trypsin SKGR3↓ S35LIGKV (29) ซึ่งจากการค้นพบ PAR2 นี้ได้กระตุ้นให้เกิดความพยายามในการค้นหา receptor ตัวอื่นๆในกลุ่มนี้ ซึ่งต่อมาได้มีการค้นพบ PAR3 ซึ่งพบว่ามีลำดับประมาณ 28% ที่มีความเหมือนกันกับ PAR1 และ PAR2 โดยมีส่วนสำหรับตัดด้วย thrombin บริเวณ extracellular amino-terminal domain ที่ LPIK38 ↓ T39FRGAP (30) ต่อมาได้ค้นพบ PAR4 ซึ่งมี 385 กรดอะมิโนและมีความเหมือนกันกับ PARs ชนิดอื่นๆถึง 33% และมีส่วนที่ตัดด้วย thrombin ใน extracellular amino-terminal domain ที่ PAPR47↓ G48YPGQV (31)



รูปภาพที่ 2.1 รูปภาพแสดงโครงสร้างและหน้าที่ในแต่ละส่วนของ PARs ในแต่ละชนิด ซึ่ง A และ B จะแสดงกลไกการตัดและการทำปฏิกิริยาของ tethered ligand กับ extracellular binding domain แล้วส่วน C จะแสดงส่วนที่ทำหน้าที่สำคัญของ ปลาย amino terminus, extracellular loop ที่ 2 และปลาย carboxy terminus โคนตำแหน่งของอะมิโนที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจะถูกเน้นตัวหนาไว้ ในส่วนของ extracellular loop ที่ 2 (ที่มา: Ossovskaya VS., 2004)

ในส่วนของกลไกการตัดด้วยเอนไซม์ protease และกระตุ้น PARs จะเหมือนกันทั้ง 4 ชนิด คือ เอนไซม์ protease จะทำการตัดที่บริเวณจำเพาะเจาะจงของส่วน extracellular amino-terminal domain ของตัว receptor ซึ่งการตัดนี้จะทำให้มีการเปิดเผยปลายอะมิโนใหม่ที่ จะทำหน้าที่เป็น tethered ligand โดยจะไปจับกับ conserved region ของ extracellular loop

ที่ 2 ของตัว receptor เอง ส่งผลให้มีการเริ่มส่งสัญญาณ โดยเอนไซม์ protease ที่มาตัดถ้าเป็น PAR1, PAR3 และ PAR4 จะเป็น thrombin แต่ถ้าเป็น PAR2 จะเป็น trypsin , tryptase และ ปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (coagulation factor) อื่นๆ สำหรับ PAR1 พบว่าเมื่อมีการผ่าเหล่า (mutation) เกิดขึ้นที่บริเวณการตัดจะทำให้เอนไซม์ protease ไม่สามารถทำการตัดและส่งสัญญาณ ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของบริเวณนี้ในการกระตุ้น PAR1 (33) นอกจากนี้โปรตีนสังเคราะห์ ที่เลียนแบบ tethered ligand สามารถกระตุ้น PAR1 ได้โดยตรงปราศจากการตัดด้วย thrombin ซึ่งพบว่าใช้เปปไทด์แค่เพียงสายสั้นๆ SFLLRN เพียง 6 ตำแหน่ง (34) โดยโปรตีนสังเคราะห์นี้จะ เรียกว่า activating peptides (APs) ซึ่งเป็นประโยชน์ในการใช้ศึกษาหาหน้าที่ของ PARs ในส่วนของ PAR2 ถ้ามีการผ่าเหล่าเกิดขึ้นสามารถป้องกันการตัดและการกระตุ้น PAR2 ได้เช่นกัน โดยที่โปรตีนสังเคราะห์ SLIGKV สามารถกระตุ้น PAR2 ได้โดยไม่ต้องมีการตัดของ receptor (35-37) สำหรับ PAR3 นั้นการเกิดการผ่าเหล่าสามารถป้องกันการกระตุ้นของ thrombin ได้ แต่พบว่าการใช้โปรตีนสังเคราะห์ TFRGAP สำหรับ PAR3 นั้นไม่สามารถกระตุ้น PAR3 ได้ ซึ่งยังไม่ทราบสาเหตุ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า PAR3 ในหนูจะไม่สามารถส่งสัญญาณได้ถ้ามีการแสดงออกเพียงชนิดเดียวโดยไม่มี PAR ชนิดอื่นอยู่ด้วย (38) ในส่วนของ PAR4 นั้น โปรตีนสังเคราะห์ GYPGQV สามารถกระตุ้น receptor ได้โดยตรงเช่นกัน (31, 38) นอกจากนี้ PAR1 และ PAR3 ยังพบว่าในส่วนของ extracellular amino-terminal domain จะมีตำแหน่งของลำดับที่มีประจุอยู่ (D51KYEPF56) ซึ่งตำแหน่งนี้จะจับกับบริเวณสำหรับจับที่มีประจุลบของ thrombin ทำให้มีความเข้มข้นของเอนไซม์ protease เพิ่มขึ้นบริเวณผิวของ receptor โดยที่ตำแหน่งที่มีประจุลบนี้มีความคล้ายคลึงกับสารกันเลือดแข็ง hirudin ที่พบในปลิงซึ่งจะทำหน้าที่ยับยั้ง thrombin โดยจับกันที่ตำแหน่งประจุลบนี้ จึงเรียกบริเวณนี้ว่า hirudin-like domain ซึ่งพบว่าเมื่อไม่มีตำแหน่งนี้ จะมีการลดลงของความสามารถ thrombin ในการกระตุ้น PAR1 ต่างกันกับเมื่อมีตำแหน่งนี้ จะทำให้มีความสามารถในการกระตุ้น PAR1 อย่างเต็มที่ (39-40) โดยส่วนของ hirudin-like domain ของ PAR3 นั้นคือ FEEFP (30) แต่สำหรับ PAR4 นั้น จะไม่มีส่วนของ hirudin-like domain (38, 41) ดังนั้น PAR4 จึงมีความสามารถในการจับกับ thrombin ต่ำกว่า PAR1 และ PAR3

จากการศึกษาการผ่าเหล่าและความเหมือนกันของ APs ทำให้ทราบตำแหน่งอะมิโนที่สำคัญของ tethered ligand ซึ่งจะจับกับ PARs แล้วเกิดการส่งสัญญาณที่จำเป็นได้ โดยจากการศึกษาปฏิกิริยาของ tethered ligand และ PAR1 ด้วยการใช้ PAR1 ลูกผสมระหว่างมนุษย์และ กบ โดยที่ tethered ligand ของ PAR1 ในมนุษย์คือ SFLLRN และในกบคือ TRFIFD ซึ่งการแทนที่ของปลายอะมิโนและ extracellular loop ที่ 2 ของ receptor กบ ด้วยตำแหน่งของมนุษย์จะช่วยทำให้ receptor ลูกผสมนี้มีความจำเพาะกับ tethered ligand ของมนุษย์ และการเติมตำแหน่ง 2

ตำแหน่งของ receptor กบด้วยตำแหน่งของ receptor มนุษย์ ได้แก่ Phe⁸⁷ สำหรับ Asn ในส่วนของปลายอะมิโน และ Glu²⁶⁰ สำหรับ Leu ในส่วนของ extracellular loop ที่ 2 จะช่วยทำให้ receptor ถูกผสมมีความจำเพาะต่อเปปไทด์ของมนุษย์มากขึ้นด้วย ดังนั้น 2 ตำแหน่งนี้จึงมีส่วนสำคัญในการทำปฏิกิริยากับ tethered ligand ซึ่งมีการศึกษาเพิ่มเติมว่าที่ตำแหน่ง Glu²⁶⁰ ของ extracellular loop ที่ 2 จะทำปฏิกิริยากันกับ Arg⁵ ของ tethered ligand SLLRN ซึ่งจากการแทนที่นี้แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลง conformation ของ extracellular loop ที่ 2 นั้นจำเป็นในการส่งสัญญาณจาก receptor ผ่านไปยัง plasma membrane (42-44) การศึกษาในส่วนของปฏิกิริยาของ tethered ligand ของ PAR2 และ receptor ที่ถูกตัดแล้วได้ใช้วิธีเดียวกัน โดยการศึกษา receptor ถูกผสมระหว่าง PAR1 และ PAR2 ให้ผลที่สอดคล้องกันกับที่ศึกษาใน PAR1 ซึ่งแสดงให้เห็นความสำคัญของ extracellular loop ที่ 2 ในการกระตุ้น PAR2 (46)

จากการศึกษาเปปไทด์สังเคราะห์ที่สอดคล้องกับ tethered ligand ของ PAR1 ซึ่งสามารถกระตุ้น receptor ได้โดยปราศจากการตัดด้วยเอนไซม์ protease นั้น พบว่ามีความสำคัญหลายประการ อย่างแรก ทำให้สามารถใช้เปปไทด์สังเคราะห์ในการศึกษาหน้าที่ของ PARs ได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ protease ทำให้ Aps นี้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน อย่างที่สอง ทำให้สะดวกในการศึกษาโครงสร้างและความสามารถของ tethered ligand ผ่านการทำหน้าที่ของเปปไทด์สังเคราะห์ ทำให้ทราบข้อมูลสำคัญที่เกี่ยวกับตำแหน่งที่มีความสำคัญของ tethered ligand และยังช่วยให้สามารถพัฒนาเปปไทด์สังเคราะห์ที่มีความจำเพาะมากกว่าเดิมได้ (46-48) อย่างไรก็ตามยังมีข้อควรระวังในการใช้ APs เป็นตัวกระตุ้น PARs โดย APs นั้นจะมีความสามารถในการกระตุ้นที่อ่อนกว่าการใช้ protease ดังนั้นจึงต้องใช้ความเข้มข้นของ APs ที่มากเกินไป ซึ่งก็คือ 1 ไมโครโมลาร์ (μM) ในการกระตุ้น PARs ส่วนใหญ่

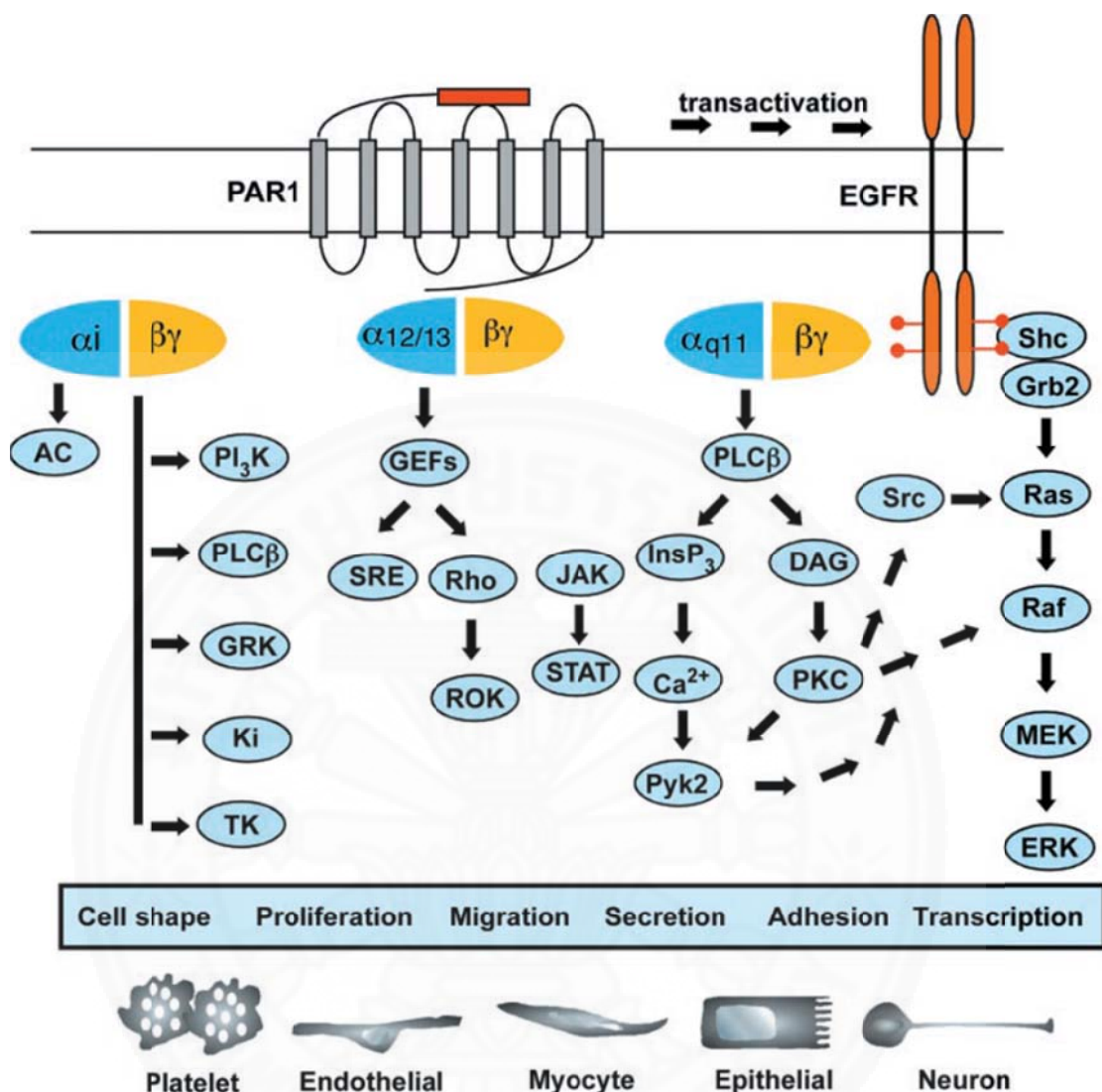
ลักษณะของ PAR1-AP ถูกค้นพบครั้งแรกว่ามี 14 ตำแหน่งของกรดอะมิโน ซึ่งปัจจุบันเหลือเพียงแค่ 6 กรดอะมิโน (SLLRN) ก็เพียงพอในการทำหน้าที่ได้เต็มที่ (32) โดยมีการศึกษาที่พบว่าตำแหน่งที่สำคัญของ APs ประกอบด้วย Phe², Leu⁴ และ Arg⁵ ส่วน Ser¹ แม้จะเปลี่ยนไปก็ยังสามารถทำหน้าที่ได้ แต่ถ้ามีการนำเอากรดอะมิโนนี้ออกไปจะทำให้ APs ไม่ทำงาน ในส่วนของ PAR2-AP (SLIGRL) มีการศึกษาพบว่า Leu² และ Arg⁵ มีความจำเป็นในการทำหน้าที่ ส่วนถ้าแทนที่ Ser¹ หรือ Arg⁵ ด้วย Ala พบว่ามีการลดการทำงานลง และการแทนที่ Gly⁴ หรือ Leu⁶ ส่งผลเพียงเล็กน้อยในการกระตุ้น PAR2 (49)

2.2 PARs และการส่งสัญญาณ

2.2.1 การส่งสัญญาณของ PAR1

เมื่อ PAR1 ถูกกระตุ้น การส่งสัญญาณจะเริ่มจากการที่ PARs ซึ่งจับอยู่กับ G proteins 3 หน่วย ที่ plasma membrane โดยที่การส่งสัญญาณจะขึ้นกับชนิดย่อย (subtype) ของ G proteins ที่ทำปฏิกิริยากับ PAR1 พบว่า PAR1 นั้นทำปฏิกิริยาได้กับหลาย α -subunit ได้แก่ $G_{q11\alpha}$, $G_{12/13\alpha}$ และ $G_{i\alpha}$ โดยวิถี (pathway) หลักนั้นจะเกิดผ่าน $G_{q11\alpha}$ ซึ่งมีบทบาทสำคัญสำหรับการส่งสัญญาณของ thrombin ใน fibroblast และเกล็ดเลือด (platelet) ซึ่งจะไปกระตุ้น phospholipase C- β ทำให้เกิดการสร้าง Inositol trisphosphate (IP3) และ diacylglycerol (DAG) ซึ่ง IP3 จะไปทำให้เกิดการปลดปล่อย Ca^{2+} และ DAG จะไปกระตุ้น protein kinase C (PKC) โดยที่ Ca^{2+} และ PKC สามารถไปกระตุ้นวิถีอื่นๆได้อีกมากมาย (50-51) นอกจากนี้ PAR1 ยังสามารถส่งสัญญาณผ่าน $G_{12/13\alpha}$ ในเกล็ดเลือดและ astrocytoma cell ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมรูปร่างของเซลล์และการ migration โดยจะทำปฏิกิริยากับ Rho guanine-nucleotide exchange factor (GEFs) ทำให้เกิดการกระตุ้น serum response element (SRE) และ Rho ซึ่งจะไปกระตุ้น Rho-kinase (ROK) (51) นอกจากนี้ PAR1 ยังสามารถกระตุ้น $G_{i\alpha}$ ซึ่งจะยับยั้ง adenylyl cyclase และยับยั้งการสร้าง cAMP นอกจากนี้ส่วนที่เป็น α -subunit แล้วยังมีส่วนของ $G_{\beta\gamma}$ subunit ซึ่งสามารถกระตุ้น G protein receptor kinases (GRKs) และ phosphatidylinositol (PI) 3-kinase ได้ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ (cytoskeleton structure), การเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell motility), การมีชีวิตรอด (survival) และ เกิดการแบ่งเซลล์ (mitogenesis)

นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้น mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade ได้ โดยจะมีการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ผ่านโปรตีน Ras-Raf-MEK-ERK ซึ่ง MAP kinase นี้สามารถควบคุมสารอื่นๆที่อยู่ใน cytoplasm และนิวเคลียส (nucleus) ได้มากมาย โดยมีหลายกลไกที่ทำให้ PAR1 สามารถกระตุ้นวิถีนี้ได้โดย สามารถกระตุ้นให้มีการเติมหมู่ฟอสเฟตของ epidermal growth factor receptor (EGFR) ซึ่ง PAR1 จะกระตุ้น ERK1/2 ผ่าน $G_{\beta\gamma}$, PI3 kinase, PKC และ Pyk2 ได้ (52)



รูปภาพที่ 2.2 รูปภาพแสดงภาพสรุปรวมการส่งสัญญาณของ PAR1 ผ่าน $G_{q11\alpha}$, $G_{12/13\alpha}$ และ $G_{i\alpha}$ (ที่มา: Ossovskaya VS., 2004)

2.2.2 การส่งสัญญาณของ PAR2

กลไกการส่งสัญญาณของ PAR2 มีการศึกษาไว้น้อยกว่า PAR1 โดยการกระตุ้น PAR2 นั้นจะทำให้เกิดการสร้าง IP3 และมีการปล่อยของ Ca^{2+} ในเซลล์หลายชนิดไม่ว่าจะเป็น astrocyte, enterocyte, neuron, keratinocyte และ smooth muscle cell (53-54) ดังนั้น PAR2 จึงสามารถกระตุ้นผ่าน $G_{q\alpha}$ ได้ การส่งสัญญาณของ PAR2 ไม่ได้รับผลจากการกระตุ้นของ pertussis toxin ทำให้คาดว่า PAR2 ไม่กระตุ้นผ่าน $G_{i\alpha}$ (55) ใน enterocyte การกระตุ้นของ

PAR2 ยังกระตุ้นให้มีการปลดปล่อย arachidonic acid และมีการสร้างสาร prostaglandin E2 และ F1 α ซึ่งคาดว่ามาจากการกระตุ้นของ phospholipase A2 และ cyclooxygenase-1 (56) นอกจากนี้ PAR2 ยังสามารถกระตุ้น MAP kinase ERK1/2 ได้ (57) ในเร็วๆนี้ยังพบว่า β -arrestins มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้น ERK ผ่าน PAR2 โดยเป็นโปรตีนที่อยู่ในเซลล์ ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ GPCR ที่ plasma membrane แล้วจะเกิดการรวมตัวกันของ MAP kinase signaling module, PAR2, Raf-1, β -arrestins และ ERK1/2 ที่ถูกกระตุ้น ที่บริเวณ plasma membrane ในช่วงเริ่มแรกของการเกิด endosome (58) ซึ่งตัว complex นี้จะเก็บ ERK1/2 ที่ถูกกระตุ้นไว้ในเซลล์ทำให้ไม่สามารถไปกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ อย่างไรก็ตามในเซลล์ที่มีการผ่าเหล่าของ PAR2 ทำให้ไม่สามารถจับกับ β -arrestins ได้ จึงไม่เกิดการสร้าง complex ขึ้น ซึ่งในเซลล์เหล่านี้ ตัวกระตุ้นของ PAR2 จะกระตุ้น ERK1/2 โดยวิธีอื่น ซึ่งจะทำให้เกิดการย้ายเข้าสู่นิวเคลียสแล้วมีการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ นอกจากนี้ PAR2 ยังสามารถกระตุ้นวิถี NF- κ B ได้ใน keratinocyte และ myocyte ทำให้ PAR2 มีความสำคัญในการอักเสบด้วย (60-61)

2.3 บทบาทหน้าที่ของ PARs ในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal system)

2.3.1 PAR2 กับการหลั่งสารจากต่อมมีท่อ (exocrine secretion)

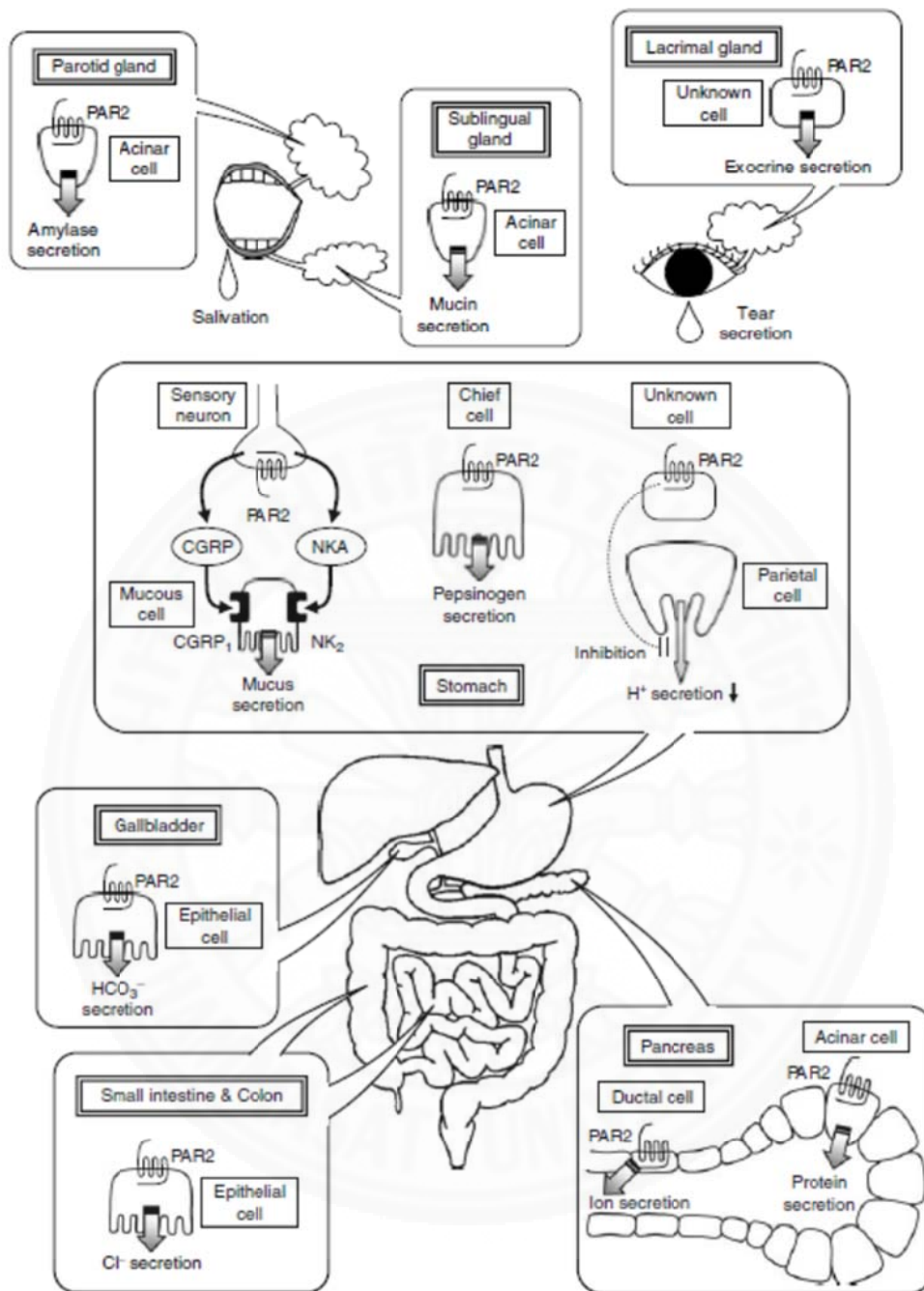
PARs ทุกชนิดนั้นมีการแสดงออกในทางเดินอาหาร ถึงแม้ว่าส่วนใหญ่แล้วการศึกษาวิจัยจะมุ่งเน้นไปที่ PAR2 ซึ่งพบว่ามียบทบาทสำคัญในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งหนึ่งในหน้าที่ที่สำคัญนั้นก็คือ การหลั่งสารต่างๆจากต่อมมีท่อ โดยมีการศึกษาพบเป็นครั้งแรกว่า PAR2 ช่วยให้เกิดการหลั่ง amylase จาก pancreatic acini ในหนู ซึ่งต่อมาพบว่า PAR2 เป็นหนึ่งในโมเลกุลสำคัญที่ควบคุมการหลั่งของตับอ่อน โดย PAR2 จะกระตุ้นให้มีการปลดปล่อย Ca²⁺ ซึ่งไม่เพียงเพิ่มการหลั่งของ acinar cell แล้ว ยังช่วยในเรื่องการขนส่งไอออนอย่าง Cl⁻ และ K⁺ นอกจากนี้ PAR2 ยังช่วยเพิ่มการหลั่ง HCO³⁻ จาก pancreatic ductal cells ด้วย (62-63)

PAR2-AP ยังเป็นสาเหตุให้มีการหลั่งน้ำลาย ที่รวมถึงโปรตีนอย่าง amylase และ mucin ใน parotid และ sublingual gland ของหนู และยังพบว่า PAR2 ยังช่วยเพิ่มการหลั่งน้ำลายในหนูที่ขาด M3-acetylcholine receptor ซึ่งคาดว่า PAR2 อาจช่วยชดเชยการหลั่งน้ำลายที่เสียไป เนื่องจากการขาด M3-acetylcholine receptor ในกรณีนี้เราอาจใช้ PAR2 เป็นเป้าหมายในการพัฒนารักษาสำหรับผู้ที่มีสูญเสียการหลั่งน้ำลายไปอย่างเช่น ภาวะปากแห้ง (dry mouth) นอกจากนี้

ยังพบว่า PAR2 ยังมีส่วนช่วยให้เกิดการหลั่งน้ำตา ทำให้ตัวกระตุ้นของ PAR2 เหมาะที่จะใช้ในการรักษา กลุ่มโรคอย่าง sjogren's syndrome (64-65)

นอกจากนี้ยังมีหลักฐานที่บอกว่า PAR2 มีบทบาทในการหลั่งของ gastric mucosa โดยพบว่า PAR2 พบเป็นจำนวนมากใน gastric mucosa chief cell ของหนู แล้ว PAR2 ยังสามารถช่วยในการหลั่ง pepsinogen ออกมาสู่ gastric lumen จาก gastric chief cell ของหนู ซึ่งเกี่ยวข้องกับการปลดปล่อยของ Ca^{2+} และการกระตุ้นวิถี MEK-ERK แล้วยังพบว่า PAR2 สามารถกระตุ้นการหลั่งของ gastric mucus ในหนูได้ ผ่านการกระตุ้นให้ sensory neuron มีการปลดปล่อย calcitonin-gene related peptide (CGRP) และ neurokinin A (65) ในทางตรงกันข้ามพบว่า PAR2 นั้นจะยับยั้งการหลั่ง gastric acid (66)

PAR2 ยังมีการแสดงออกใน intestinal epithelial cell ด้วย โดยพบว่า PAR2 มีการกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง Cl^- ทั้งในลำไส้เล็กและใน colon (67-68) แล้วในเร็วๆ นี้ยังพบอีกว่า PAR2 ยังสามารถควบคุมการหลั่ง electrolyte อย่าง bicarbonate ในถุงน้ำดีได้ด้วย (69) ทำให้เห็นว่า PAR2 นั้นมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการขนส่งไอออนใน epithelial cell ของทางเดินอาหารด้วย

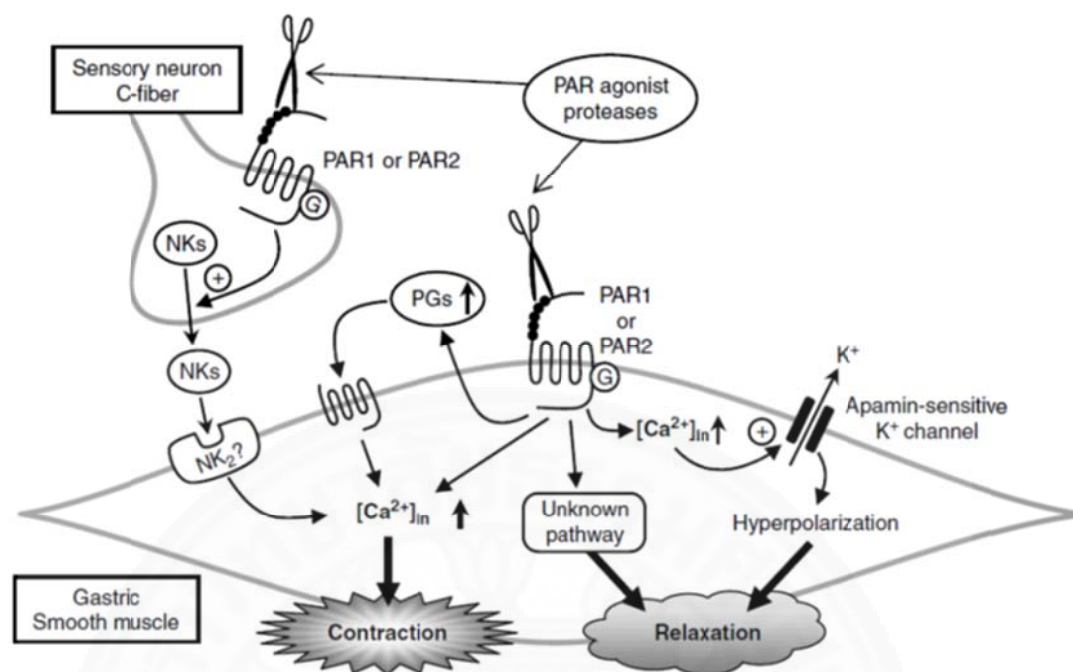


รูปภาพที่ 2.3 รูปภาพแสดงบทบาทโดยสรุปของ PAR2 ในการหลั่งสารจากต่อมมีท่อต่างๆที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร (ที่มา: Kawabata A., 2008)

2.3.2 PAR2 และการควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบทางเดินอาหาร

PAR1, PAR2 และ PAR4 นั้นมีการแสดงออกในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของทางเดินอาหาร ซึ่งจะควบคุมการเคลื่อนที่ (motility) ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ โดยบทบาทของ PARs ในการควบคุมการเคลื่อนที่นั้นจะมีความซับซ้อนมากและมีความแตกต่างกับอวัยวะอื่น โดยตัวกระตุ้นของทั้ง PAR1 และ PAR2 เป็นสาเหตุให้เกิดการหดตัว (constriction) ของกล้ามเนื้อเรียบตามยาวในกระเพาะอาหาร (gastric longitudinal smooth muscle cell) แต่จะทำให้เกิดการคลายตัว (relaxation) เพียงชั่วครวเท่านั้นเมื่อทำการทดลองแบบเดียวกัน แล้วมีการ precontract ด้วย cabachol ส่วนในลำไส้เล็กของหนู PAR1 หรือ PAR2 จะกระตุ้นให้มีการคลายตัวเพียงชั่วครวแล้วตามด้วยการหดตัว ซึ่งยืนยันได้ว่าการตอบสนองต่อตัวกระตุ้นของ PAR2 ที่แสดงให้เห็นในกล้ามเนื้อเรียบทางเดินอาหารจากหนู wild type จะหายไปเมื่อทำการทดลองในหนูที่ไม่มี PAR2 (PAR2-deficiency) (71) ใน duodenal ของหนู PAR2 จะทำให้เกิดการหดตัวซ้ำแบบต่อเนื่อง ในขณะที่ PAR1 จะทำให้คลายตัวทันทีแล้วตามด้วยการหดตัวอย่างรุนแรง นอกจากนี้ยังมีหลักฐานว่า PAR1 หรือ PAR2 จะทำให้เกิดการหดตัวและ/หรือคลายตัว ในกล้ามเนื้อเรียบของ colon ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า PAR4 สามารถทำให้กล้ามเนื้อเรียบของ colon หดตัวได้ด้วย (72-73) ใน oesophageal muscularis mucosae ของหนูพบว่า PAR1 ทำให้คลายตัวส่วน PAR4 ทำให้หดตัว ดังนั้นการควบคุมการเคลื่อนที่ของกล้ามเนื้อเรียบทางเดินอาหารโดย PAR1, PAR2 และ PAR4 จึงมีความซับซ้อนและยังจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยอีกมาก นอกจากนี้ยังพบว่า การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของ colon ในหนู ที่มาจาก PAR2 จะสูญเสียไปหลังมีการอักเสบของ colon โดย dextran sodium sulphate (DSS) (74) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหน้าที่ของ PAR2 ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของลำไส้จะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีการอักเสบเกิดขึ้นที่ลำไส้

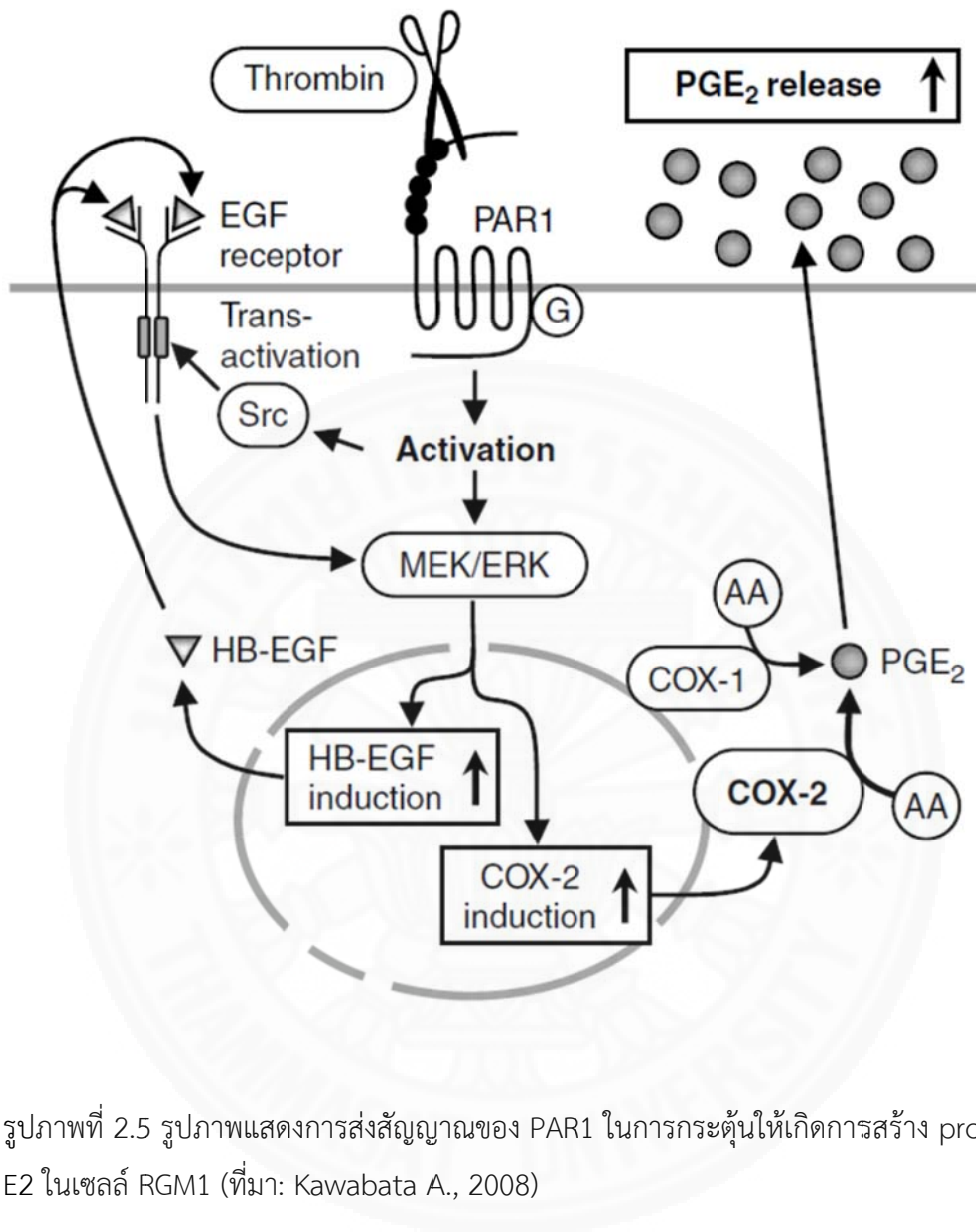
กลไกการควบคุมการเคลื่อนที่ของ PARs เกี่ยวข้องกับวิถีมากมาย โดย PAR1, PAR2 และ PAR4 ที่พบในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจะเป็นตัวกลางในการหดตัวของกล้ามเนื้อทางเดินอาหาร ซึ่งการกระตุ้นของ $G_{q11\alpha}$ รวมถึง phospholipase C- β มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการหดตัว (75) ในบางงานวิจัยการสร้างสารกลุ่ม prostanoids จากการกระตุ้น PARs ทำให้กล้ามเนื้อหดตัวได้ นอกจากนี้ยังพบว่า sensory neuron ยังทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อได้เมื่อกระตุ้น PAR (71) พบว่าบทบาทในการคลายตัวของ PAR ในทางเดินอาหารนั้นเชื่อว่าเกิดจากการกระตุ้นของ apamin-sensitive K^+ channels ซึ่งถูกกระตุ้นได้ด้วย Ca^{2+} (76) ทำให้เห็นว่ากลไกอันซับซ้อนของ PARs ในการควบคุมการเคลื่อนที่ของกล้ามเนื้อเรียบในทางเดินอาหารยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกมาก



รูปภาพที่ 2.4 รูปภาพแสดงกลไกควบคุมการเคลื่อนที่ของกล้ามเนื้อเรียบในทางเดินอาหารโดย PARs (ที่มา: Kawabata A., 2008)

2.3.3 การกระตุ้นการส่งสัญญาณใน epithelial cell ในทางเดินอาหารโดย PARs

การส่งสัญญาณในเซลล์โดย PARs ใน epithelial cell ทางเดินอาหารปกติ ยังไม่มีการศึกษามากนักต่างจากในเซลล์มะเร็ง โดยในทางเดินอาหารนั้นการกระตุ้น PARs สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง prostanoid ได้ ในหนู normal gastric mucosal epithelial cell line หรือเซลล์ RGM1 นิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์หน้าที่ของ gastric mucosal epithelial cell ที่ไม่ใช่มะเร็ง โดยตัวกระตุ้นของ PAR1 เป็นสาเหตุให้เกิดการสร้าง prostaglandin E2 (PGE2) และเพิ่มการแสดงออกของ cyclooxygenase-2 (COX-2) ซึ่งกลไกของ PAR1 ในการกระตุ้นการแสดงออกของ COX-2 ในเซลล์ RGM1 เกี่ยวข้องกับวิถี MEK-ERK และ EGFR ในขณะที่โมเลกุลสื่อสัญญาณอื่น ๆ รวมถึง Src, heparin-binding EGF (HB-EGF) และ COX-1 ตอบสนองต่อการสร้าง PGE2 และการเพิ่มการแสดงออกของ COX-2 (77) กลไกการส่งสัญญาณเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นวิถี MEK-ERK และ EGFR ซึ่งการกระตุ้นของ PAR1 ใน epithelial cell ทางเดินอาหารจะเหมือนกันกับการกระตุ้นของ PAR2 ที่พบใน epithelial cell ปอด (78)



รูปภาพที่ 2.5 รูปภาพแสดงการส่งสัญญาณของ PAR1 ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้าง prostaglandin E₂ ในเซลล์ RGM1 (ที่มา: Kawabata A., 2008)

2.4 บทบาทของ PARs ในการเกิดการอักเสบของทางเดินอาหาร

PARs โดยเฉพาะ PAR2 และ PAR1 มีบทบาทในการรักษาความสมบูรณ์ของ mucosa และ/หรือ การเกิดการอักเสบหรือบาดเจ็บของ mucosa ตลอดทางเดินอาหาร รวมไปถึง หลอดอาหารด้วย การอักเสบของลำไส้มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างและการปล่อยเอนไซม์ protease ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นของ PARs จากการศึกษาวิจัยพบว่า การให้ trypsin, tryptase และ PAR2-AP ใน

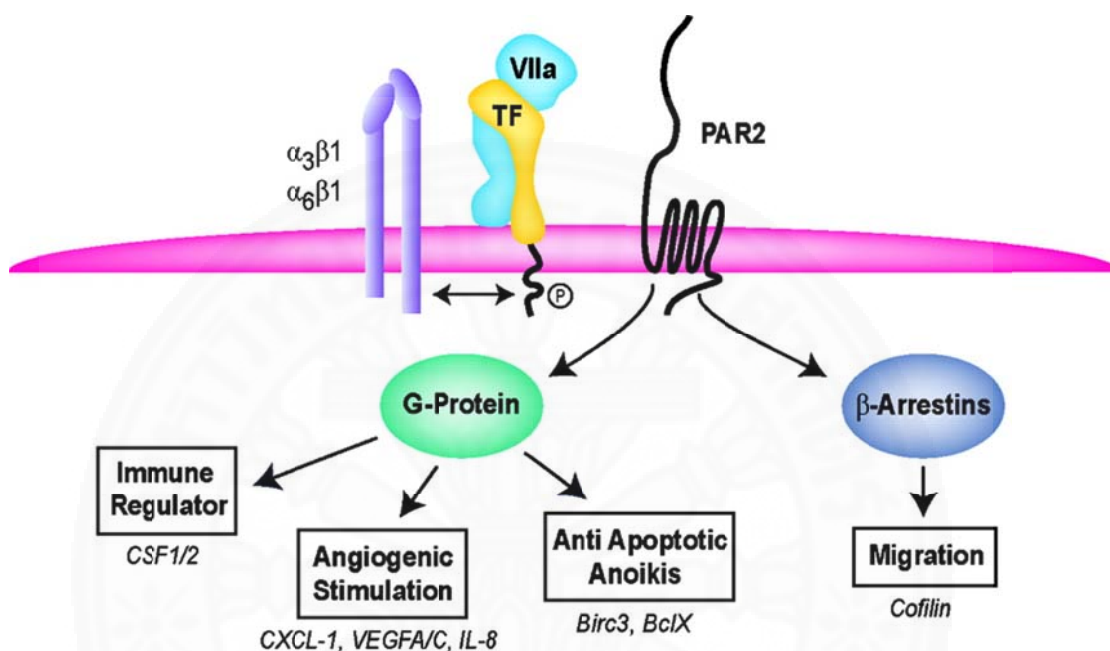
ลำไส้ของหนู wild type จะทำให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบขึ้น แต่จะไม่พบในหนูที่ไม่มี PAR2 การอักเสบที่เกิดจาก PAR2 จะถูกยับยั้งได้โดยการยับยั้ง NO synthase ซึ่งทำได้โดยการนำ sensory nerve ออก และใช้ตัวยับยั้งของ CGRP type I receptor กับ neurokinin-1 receptor ดังนั้นการอักเสบที่เกิดจาก protease จึงมาจากกลไกทางระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับการปล่อยเปปไทด์ออกมาจาก sensory nerve นอกจากนี้การให้ PAR2-AP ในลำไส้จะทำลายด่านกั้น (barrier) ของลำไส้โดยทำให้แบคทีเรียสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ ซึ่งการทำลายของ tight junction นี้เกิดจากการกระตุ้น myosin light-chain kinase (79-80) นอกจากนี้การเพิ่มความสามารถหรือปริมาณของ trypsin และ tryptase ในลำไส้จะสามารถกระตุ้น PAR2 ได้ ซึ่งมีความสำคัญในการเกิดพยาธิสภาพของโรค inflammatory bowel diseases (IBD) อย่างไรก็ตาม PAR2 อาจทำหน้าที่ในการป้องกันลำไส้ได้ โดยการกระตุ้น PAR2 จะทำให้เกิดการปล่อย prostaglandin จาก enterocyte และกระตุ้นให้มีการหลั่ง mucus ได้ (56, 65) ซึ่งทั้ง 2 อย่างนี้ทำให้เกิดการป้องกันลำไส้ขึ้น นอกจากนี้การให้ PAR2-AP กับหนูสามารถป้องกันการอักเสบที่เกิดจากการให้สาร dinitrobenzene sulfonic acid ซึ่งเป็นสารที่ใช้ทั่วไปในการกระตุ้นให้เกิดลำไส้อักเสบเพื่อทำการศึกษา (81) เป็นที่น่าสนใจถึงบทบาทของ PARs โดยเฉพาะ PAR2 ในการก่อโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ มีงานวิจัยที่ศึกษาถึงบทบาทของ PAR2 ในการก่อให้เกิดการอักเสบของทางเดินหายใจ, ข้อ และไต โดยใช้หนูที่ไม่มี PAR2 ในการศึกษาพบว่าในการอักเสบจากภูมิแพ้ของทางเดินหายใจ ที่เกิดจากภูมิคุ้มกันและการให้ ovalbumin จะทำให้มีการลดลงเกี่ยวกับการแทรกตัว (infiltration) ของเม็ดเลือดขาวอย่าง eosinophil และการเกิดปฏิกิริยาที่มากเกินไปต่อ methacholine ในหนูที่ไม่มี PAR2 แต่การตอบสนองเหล่านี้จะรุนแรงขึ้นในหนูที่มีการแสดงออกของ PAR2 ที่สูง (82)

ในโรค Rheumatoid arthritis ที่มีภาวะการอักเสบเรื้อรัง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการอักเสบของ synovium และ hyperplasia จะมีระดับการแสดงออกของ TF และ thrombin ใน synovium ที่สูง แล้วยังมีการสะสมของ fibrin (fibrin) ในข้อที่อักเสบ แสดงให้เห็นถึงการกระตุ้นของระบบการแข็งตัวของเลือด (coagulation system) ซึ่งเมื่อทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแล้วให้คอลลาเจน (collagen) ของไก่กับหนู จะทำให้เกิดข้ออักเสบแต่เมื่อมีการให้ตัวยับยั้ง thrombin อย่าง hirudin จะทำให้มีการลดความรุนแรงของการอักเสบ โดยวัดจากการแสดงออกของ cytokine ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory cytokine) ซึ่งเป็นหลักฐานโดยตรงที่แสดงให้เห็นว่า thrombin มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบ นอกจากนี้ยังมีหลักฐานเกี่ยวกับบทบาทของ PAR2 ในเรื่องข้ออักเสบ (arthritis) โดยพบว่าหนูที่ไม่มี PAR2 จะป้องกันข้ออักเสบที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยการฉีด adjuvant เข้าในข้อและรอบๆ ข้อ (84) โดยเอนไซม์ protease ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบของข้อยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีการสันนิษฐานว่าน่าจะเป็น FVIIa และ FXa ที่อาจจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบการ

แข็งตัวของเลือดภายในภาวะข้ออักเสบ ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับโรคไตที่พบว่า protease และ PARs อาจมีส่วนช่วยในการอักเสบของไต พบว่าใน Crescentic glomerulonephritis ที่เกิดการอักเสบของไตอย่างรุนแรง มีความเกี่ยวข้องกับการสะสมของfibrin คาดว่ามาจากการกระตุ้นของ protease ที่เกี่ยวข้องกับระบบการแข็งตัวของเลือด จากการศึกษาพบว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูด้วย globulin ของแกะแล้วตามด้วยการให้ anti-mouse glomerular basement membrane ของแกะ จะกระตุ้นให้เกิด glomerulonephritis ซึ่งพบการสะสมของfibrin, พบการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาว และการกรองที่ glomerulus ลดลง ซึ่งการอักเสบนี้จะลดลงอย่างมากเมื่อมีการให้ hirudin และพบการอักเสบลดลงในหนูที่ไม่มี PAR1 แสดงให้เห็นถึงความเกี่ยวข้องกับ proteaseในระบบการแข็งตัวของเลือดกับ PAR1 (85) ซึ่งจากการสังเกตว่าการอักเสบลดลงในหนูที่ไม่มี PAR ทำให้คาดว่า ตัวยับยั้ง PARs และตัวยับยั้ง protease อาจมีประโยชน์ในการใช้เป็นสารต้านการอักเสบ ซึ่งจริงๆแล้ว ตัวยับยั้ง tryptase ถูกใช้ในการรักษาโรคหอบหืด (asthma) และ inflammatory bowel disease (IBD) แต่อย่างไรก็ได้ PARs อาจแสดงบทบาทในการป้องกันและต้านการอักเสบได้ในบางสถานะ อย่างเช่นการให้ recombinant activated protein C (APC) จะสามารถป้องกันการตายของ endothelial cell ในสมองของมนุษย์ และยังมีผลในการป้องกัน ischemic brain injury ได้ นอกจากนี้ APC ยังลดอัตราการตายของผู้ป่วยที่เป็น sepsis ได้ ซึ่งบทบาทในการป้องกันของ APC นี้ ขึ้นกับ PAR1 (86-87) ในส่วนของ PAR2 สามารถลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหารและการเกิดลำไส้ อักเสบในการทดลองได้ (65, 88) ดังนั้นตัวกระตุ้น PAR1 และ PAR2 อาจมีประโยชน์ในการรักษาโรค ในบางสถานะได้

นอกจากนี้ยังพบว่ามีการศึกษาที่ทำการศึกษากลไกการกระตุ้นของ PAR2 ใน เซลล์มะเร็ง ซึ่งจะทำการส่งสัญญาณไปยังภายในเซลล์ไปกระตุ้น classical G protein-coupled receptor และ G protein independent pathway ที่กระทำผ่าน adaptor protein อย่าง β -arrestin โดยพบว่า tissue factor (TF) อย่าง FVIIa ซึ่งสามารถเป็นตัวกระตุ้น PAR2 ได้ ซึ่งผล การศึกษาพบว่า PAR2 ส่งสัญญาณกระตุ้นเซลล์มะเร็งเต้านมให้มีการแสดงออกของ proangiogenic factors หลายๆชนิดได้ เช่น VEGF, CXCL1 และ IL-8 นอกจากนี้ยังกระตุ้นตัวควบคุมทางภูมิคุ้มกัน อย่าง GM-CSF2 และ M-CSF1 ถึงแม้ว่ายีนเหล่านี้จะถูกกระตุ้นได้จาก PAR1 แต่สำหรับ PAR2 จะเป็นตัวกระตุ้นหลักในการทำให้มีการแสดงออกของตัวควบคุมทางภูมิคุ้มกันและการสร้างเส้นเลือด ใหม่ (angiogenesis) อย่างไรก็ตามการส่งสัญญาณของ PAR2 ยังส่งผลกับเซลล์มะเร็งในด้านอื่นอย่าง การ metastasis โดยการศึกษาพบว่าสามารถกระตุ้น antiapoptotic protein อย่างเช่น Birc3 และ ยังสามารถป้องกันการตายของเซลล์หลังจากสูญเสียการเกาะติดไป (anoikis) นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้เกิด migration ผ่าน Rho pathway และดึงดูด β -arrestin ซึ่งเป็น scaffold protein สำหรับ ERK

ที่ถูกกระตุ้น ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะถูกดึงดูดยังบริเวณ pseudopodia ของเซลล์ที่ทำการ migration (283) ซึ่งจากการวิจัยในครั้งนี้นี้เราได้ทำการดูการสร้างโปรตีนของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบเมื่อทำการกระตุ้น PAR2 โดยได้มุ่งเน้นไปยังโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ



รูปภาพที่ 2.6 รูปภาพแสดงการส่งสัญญาณของ PAR2 ในเซลล์มะเร็งจากการกระตุ้นด้วย TF-FVIIa (ที่มา: Schaffner F., 2009)

2.5 การอักเสบ (inflammation)

เป็นปฏิกิริยาตอบสนองที่ซับซ้อนของเนื้อเยื่อที่ตอบสนองต่ออันตรายทั้งต่อเซลล์และเนื้อเยื่อไม่ว่าจะเป็น การติดเชื้อ หรือ apoptosis ที่เกิดจากปัจจัยต่างๆ โดยการตอบสนองต่อการอักเสบจะประกอบด้วย การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด, การเข้ามาของเซลล์เม็ดเลือดขาว และผลกระทบที่เกิดกับร่างกาย การอักเสบนั้นจัดเป็นกระบวนการในการป้องกันสิ่งแปลกปลอม โดยผลของการอักเสบจะทำให้เกิดการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคออกจากร่างกาย แต่กระบวนการอักเสบก็มีผลเสียด้วยเช่นกัน เพราะถ้าเกิดการอักเสบที่มากเกินไปหรือเกิดติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้

ให้เนื้อเยื่อมีการทำงานที่ผิดปกติไป นอกจากนี้การอักเสบยังมีบทบาทในการเริ่มต้นของการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในบริเวณที่ถูกทำลาย

กระบวนการอักเสบประกอบด้วยปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อ 2 ชนิด ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด และการตอบสนองของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ ซึ่งกระบวนการอักเสบยังแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) และการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) ซึ่งการอักเสบแบบเฉียบพลันนั้นจะเกิดขึ้นที่ ภายในเวลาเป็นวินาทีหรือนาที โดยมีลักษณะสำคัญคือ มีการบวมของเนื้อเยื่อ (edema) และพบเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil จำนวนมาก โดยลักษณะสำคัญที่เป็นอาการทางคลินิกของการอักเสบเฉียบพลัน (cardinal sign) คือ ปวด (pain), บวม (swelling), แดง (redness) และร้อน (heat) ส่วนการอักเสบแบบเรื้อรังจะเกิดนานกว่าเป็นสัปดาห์หรือเป็นเดือน อาจเกิดตามหลังการอักเสบแบบเฉียบพลัน โดยมีการอักเสบดำเนินอยู่รวมไปกับการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อพร้อมๆ กัน ลักษณะสำคัญจะพบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage และ lymphocyte นอกจากนี้อาจมีการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโดยมีการสร้างพังผืด (fibrosis) ขึ้นมาแทนที่

เซลล์ที่เป็นส่วนประกอบของการอักเสบนั้น ได้แก่เซลล์จำพวกเม็ดเลือดขาวชนิด ไม่ว่าจะเป็น neutrophil ซึ่งมีหน้าที่ในการจับกิน (phagocyte) และต้านทานการติดเชื้อแบคทีเรีย เซลล์กลุ่ม monocyte และ macrophage ที่มีบทบาทสำคัญในการจับกิน เซลล์ eosinophil ที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดภูมิแพ้ (allergy) และการต้านทานปรสิต เซลล์กลุ่ม lymphocyte ที่สามารถทำลายสิ่งแปลกปลอมได้แบบจำเพาะและสามารถสร้างแอนติบอดีต่อสิ่งแปลกปลอมได้ เซลล์ basophil ที่สามารถหลั่ง histamine ได้ นอกจากนี้ยังมีเซลล์ในกลุ่มอื่นๆที่มีความสำคัญในระบบการอักเสบ เช่น เกล็ดเลือด, endothelial cell

2.5.1 การอักเสบแบบเฉียบพลัน จะประกอบด้วยลักษณะสำคัญ 3 ประการ

2.5.1.1 การขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilation)

ทำให้มีเลือดมาเลี้ยงบริเวณอักเสบเพิ่มมากขึ้น เป็นผลมาจากสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิดอย่าง histamine และ nitric oxide โดยจะเกิดขึ้นทันทีหลังได้รับอันตราย อาจพบการหดตัวของหลอดเลือด (vasoconstriction) อยู่ชั่วขณะเพียง 2-3 วินาที ก่อนที่จะมีการขยายตัวของหลอดเลือด โดยเริ่มจาก arteriole ก่อนแล้วจึงเกิดในเส้นเลือดฝอยตามมา (capillaries) (89)

2.5.1.2 การเพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือด (permeability)

ทำให้สารน้ำและโปรตีนรั่วออกจากหลอดเลือดได้ง่ายขึ้น โดยเกิดมาจากความเข้มข้นของเลือดในหลอดเลือดจะมากขึ้น ซึ่งจะทำให้เลือดไหลช้าลง (stasis) เกิดสารน้ำรั่วออกมาคั่งอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ โดยกลไกที่สารน้ำรั่วผ่านผนังหลอดเลือดมีหลายกลไก

(1) การเกิดช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) ชนิด venule ซึ่งเป็นกลไกที่พบได้บ่อยที่สุด เป็นการตอบสนองทันทีหลังบาดเจ็บ โดยมีสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิดที่มีบทบาท เช่น histamine, bradykinin และ leukotriene

(2) เกิดการบาดเจ็บที่เซลล์บุผนังหลอดเลือดโดยตรง มักพบที่บริเวณที่มีการตายของเนื้อเยื่อ จากการบาดเจ็บหรือเกิดการติดเชื้อรุนแรง เกิดได้ทั้งใน arteriole, หลอดเลือดฝอย และ venule ซึ่งจะเกิดขึ้นเร็วและคงอยู่เป็นเวลาหลายชั่วโมง

(3) delayed prolonged leakage ซึ่งยังไม่ทราบกลไกการเกิดที่แน่ชัด แต่ทำให้หลอดเลือดมีการซึมผ่านเพิ่มขึ้น นาน 2-12 ชั่วโมง สามารถเกิดได้กับหลอดเลือดฝอยและ venule

(4) leukocyte-mediated endothelial injury เกิดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เกาะอยู่บนผนังหลอดเลือด หลังสารที่ทำให้เกิดการทำลายเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด ในขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดในช่วงแรก

(5) leakage from new blood vessels หลังเกิดการบาดเจ็บ ซึ่งมีการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) แต่ยังไม่แข็งแรงเนื่องจากยังไม่มี intercellular junction ที่สมบูรณ์ ทำให้มีสารน้ำรั่วจากหลอดเลือดได้

2.5.1.3 การเคลื่อนตัวของเม็ดเลือดขาวออกนอกหลอดเลือด (90)

หลังจากที่เม็ดเลือดขาวมารวมตัวที่ผนังหลอดเลือดแล้ว จะทำการแทรกผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อ เพื่อเตรียมตัวทำลายสิ่งแปลกปลอม สามารถแบ่งเป็นขั้นตอนได้ดังนี้

(1) adhesion และ transmigration เป็นกระบวนการที่มีสารที่อยู่บนเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดและเม็ดเลือดขาวเป็นตัวควบคุมสำคัญ เรียกว่า adhesion molecule รวมทั้งสารอื่นๆที่ควบคุมการทำงานของ adhesion molecule สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม

- selectin ซึ่งแบ่งได้หลายชนิด เช่น E-selectin ที่พบบนเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด, P-selectin ที่พบบนเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดและเกล็ดเลือด และ L-selectin ที่พบบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว

- immunoglobulin family ที่สำคัญมี 2 ชนิด ได้แก่ ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) และ VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) ที่พบบนเซลล์บุผนังหลอดเลือด ทำหน้าที่ยึดเกาะกับ integrin ที่อยู่บนเซลล์เม็ดเลือดขาว

- integrin พบในเซลล์หลายชนิดทำหน้าที่จับกับ integrin ligand อย่าง ICAM-1 และ VCAM-1

- mucin-like glycoprotein ได้แก่ heparin sulfate พบได้ทั้ง extracellular matrix และบนผิวเซลล์หลายชนิด ทำหน้าที่จับกับ CD44 ซึ่งเป็น adhesion molecule บนเซลล์เม็ดเลือดขาว

กลไกการดึงดูดเม็ดเลือดขาวเข้ามายังบริเวณที่บาดเจ็บ ขึ้นอยู่กับการทำงานของ adhesion molecule โดยเกิดจากการที่ร่างกายหลั่งสาร histamine, thrombin และ platelet activating factor (PAF) จะกระตุ้นให้ Weibel-Palade body ปล่อย P-selectin ให้ออกมาปรากฏที่ผิวเซลล์ ส่วนของเซลล์ macrophages, mast cells และเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดจะหลั่งสาร tumor necrotic factor (TNF) และ interleukin-1 (IL-1) ซึ่งสามารถกระตุ้นเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดที่อยู่ข้างเคียงให้สร้าง E-selectin ขึ้นบนผนังเซลล์ ส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวจะสร้าง selectin ligand ซึ่งจะจับกับ selectin ที่อยู่บนผิวเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถจับกับเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดได้ นอกจากนี้ TNF และ IL-1 ยังสามารถที่จะกระตุ้นให้เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดสร้าง integrin ligand ได้แก่ VCAM-1 และ ICAM-1 ทำหน้าที่จับกับ integrin บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว หลังจากที่เซลล์เม็ดเลือดขาวจับกับเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดแล้ว (adhesion) จะเริ่มแทรกผ่านรอยต่อของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด โดย adhesion molecule ซึ่งมีบทบาทในกระบวนการดังกล่าว คือ platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1 หรือ CD31) หลังจากที่เซลล์เม็ดเลือดขาวเข้ามาใน extracellular matrix จะเกิดการสร้าง integrin และ CD44 ทำให้เม็ดเลือดขาวสามารถจับ extracellular matrix ได้มั่นคงยิ่งขึ้น

การพบเม็ดเลือดขาวในบริเวณที่มีการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อจะมีความแตกต่างกัน ตามระยะเวลาของการบาดเจ็บ โดยในช่วง 6 ถึง 24 ชั่วโมง neutrophil จะเข้ามาเป็นพวกแรก หลังจากนั้นจะถูกแทนที่ด้วยเซลล์ monocyte และ macrophage แทน สาเหตุเนื่องจากเซลล์ neutrophil มีจำนวนมากในกระแสเลือดจึงเข้ามาในบริเวณที่มีการบาดเจ็บได้รวดเร็วกว่า แต่มีอายุค่อนข้างสั้น หลังเข้ามาในรอยโรคแล้วจะเกิด apoptosis ในเวลาไม่นาน ในขณะที่ monocyte มีอายุยาวนานกว่า

(2) chemotaxis คือการที่เซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนตัวไปยังเนื้อเยื่อที่เกิดการบาดเจ็บ กระบวนการดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยสารในการชักนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเข้ามาในเนื้อเยื่อนั้น ซึ่งอาจมาจากภายนอกร่างกาย (exogenous stimuli) เช่น เชื้อโรค หรือเป็นสารที่พบอยู่ภายในร่างกาย (endogenous stimuli) ซึ่งได้แก่ Complement อย่างเช่น C5a, สารที่เกิดจากกระบวนการ lipoxygenase pathway เช่น leukotriene B4 (LTB4) และ cytokine เป็นต้น โดยสารเหล่านี้จะจับกับ receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ของเม็ดเลือดขาว กระตุ้นให้สร้าง actin มากขึ้น ช่วยให้เม็ดเลือดขาวมีการเคลื่อนไปยังเนื้อเยื่อที่มีการบาดเจ็บ

(3) leukocyte activation เป็นการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาว ให้สามารถทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เป็นสาเหตุของการบาดเจ็บ ได้แก่ การสร้างสารจาก arachidonic acid, การหลั่งเอนไซม์จาก lysosome (lysosomal enzyme) จากเซลล์เม็ดเลือดขาว, การหลั่ง cytokines เพื่อควบคุมกระบวนการอักเสบ และการสร้าง adhesion molecule บนเซลล์เม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ในกระบวนการนี้ ยังจำเป็นต้องอาศัยสารต่างๆ มาควบคุมเซลล์เม็ดเลือดขาว ผ่าน receptor ชนิดต่างๆ ที่อยู่บนผิวของเซลล์เม็ดเลือดขาว ได้แก่

- Toll-like receptors (TLRs) เป็น receptor ซึ่งมีหน้าที่จับกับสารที่พบในเชื้อแบคทีเรีย เช่น bacterial lipopolysaccharide และ bacterial proteoglycans โดยทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเกิดการสร้าง cytokine และสารอื่นๆ เพื่อใช้ในการทำลายเชื้อ

- G-protein-coupled receptors สารที่จะจับกับ receptor ชนิดนี้คือ chemokine, C5a, platelet activating factor (PAF), prostaglandin E (PGE) และ leukotriene B4 (LTB4) ซึ่งจะช่วยให้เซลล์เม็ดเลือดขาวสร้างสารในการทำลายสิ่งแปลกปลอม แล้วยังส่งเสริมให้เกิด migration ของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้อีกด้วย

- Cytokine receptors พบในเซลล์กลุ่ม phagocytes สารที่จับกับ receptor นี้คือ cytokine ได้แก่ IFN- γ ซึ่งสร้างจากเซลล์ lymphocytes ชนิด natural killer cells (NK cell) และ T lymphocytes ทำหน้าที่กระตุ้นเซลล์ macrophages

- Opsonin receptors สารที่ทำหน้าที่เป็น opsonin เช่น แอนติบอดี, complement และ lectin ซึ่งจะจับกับสิ่งแปลกปลอมทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาว สามารถ phagocytosis ได้ดีขึ้น ได้แก่ Fc γ receptor บนเซลล์ phagocytes ซึ่งจับกับ IgG antibody หรือ complement receptor type 1 (CR1) ซึ่งจับกับ complement protein C3

(4) การจับกิน (phagocytosis) กระบวนการเก็บกินและทำลายสิ่งแปลกปลอม แบ่งเป็นขั้นตอนย่อย 3 ขั้นตอน คือ

- Recognition and attachment เซลล์เม็ดเลือดขาวจะเข้าจับกับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม โดยอาศัย receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว ในการจับกับสารซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์เชื้อโรค โดย mannose receptors และ scavenger receptors นอกจากนี้ opsonin ยังมีส่วนร่วมให้เซลล์เม็ดเลือดขาวจับกับเชื้อโรคได้ง่ายขึ้น

- Engulfment เป็นกระบวนการที่เซลล์จับเชื้อโรคให้เข้ามาภายในเซลล์ โดยการยื่นส่วนของ pseudopods เข้าโอบล้อมเชื้อโรค เกิดเป็น phagosome ให้เข้ามาในเซลล์ หลังจากนั้น phagosome จะรวมเข้ากับ lysosome เกิดเป็น phagolysosome สารจาก lysosome จึงเข้าทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมดังกล่าวภายใน phagolysosome

- Killing and Degradation กระบวนการนี้อาศัยปฏิกิริยาทางเคมีซึ่งใช้ออกซิเจน (oxygen-dependent mechanism) ทำให้เกิดการสร้าง reactive oxygen species เข้าทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมภายใน phagolysosome

ในขณะที่เซลล์เม็ดเลือดขาวทำลายหลังสารชนิดต่างๆ เข้าภายใน phagolysosome เพื่อทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมภายใน จะเกิดการหลังสารชนิดอื่นๆ อีก ออกมานอกเซลล์ได้ เช่น lysosomal enzymes, reactive oxygen intermediates และสารกลุ่มซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจาก arachidonic acid ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ และส่งผลให้เกิดอาการทางคลินิก โรคและความเจ็บป่วยตามมาได้ ภายหลังจากเกิดกระบวนการอักเสบเฉียบพลันอย่างสมบูรณ์แล้ว ผลที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อนั้นๆ อาจแบ่งได้เป็น เนื้อเยื่อกลับมาเป็นปกติ หลังจากได้กำจัดเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมนั้นออกไปแล้ว มักพบในกรณีที่มีการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อปริมาณน้อย โดยหลังจากกำจัดสาเหตุออกไป permeability ของหลอดเลือดจะกลับมาเป็นปกติ เซลล์ neutrophil จะเกิดการตายแบบ apoptosis สารน้ำและโปรตีนที่รั่วออกมาจะถูกดูดซึมกลับทางหลอดน้ำเหลือง เซลล์ macrophage ทำหน้าที่เก็บกินสิ่งแปลกปลอมและเซลล์ตาย หรือเนื้อเยื่ออาจถูกแทนที่ด้วยเนื้อเยื่อพังผืด มักเกิดในกรณีที่มีการบาดเจ็บรุนแรง มีการทำลายโครงสร้างพื้นฐานของเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดหนองซึ่งมี fibrin (fibrin) อยู่จำนวนมาก ร่างกายจะไม่สามารถกำจัดสารดังกล่าวออกไปได้ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจึงเข้าไปแทนที่ สุดท้ายอาจมีกระบวนการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) เกิดขึ้นในกรณีที่ร่างกายไม่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นให้ออกไปจากร่างกายได้หมด (91-92)

2.5.2 กรอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation)

กระบวนการอักเสบเรื้อรัง หมายถึงการอักเสบที่เกิดขึ้นเป็นเวลานานเป็นสัปดาห์ หรือเป็นเดือน ลักษณะการเปลี่ยนแปลงในเนื้อเยื่อจะพบเซลล์อักเสบหลายๆ ชนิด มีการทำลายเนื้อเยื่อบางส่วน และจะเกิดกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อควบคู่กันไป มักเกิดในกรณีต่อไปนี้ เช่น การติดเชื้อบางชนิดซึ่งเชื้อโรคสามารถคงอยู่ในร่างกายได้เป็นเวลานานอย่าง Mycobacterium, การสัมผัสกับสารแปลกปลอม ซึ่งเป็นอันตรายต่อร่างกายเป็นระยะเวลานาน และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติต่อเนื้อเยื่อของร่างกาย ทำให้เกิดโรคกลุ่ม autoimmune diseases การอักเสบเรื้อรังจะพบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ คือ พบเซลล์อักเสบหลายๆ ชนิด เกิดการทำลายเนื้อเยื่อบางส่วน และเกิดกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ ซึ่งแตกต่างจากการอักเสบชนิดเฉียบพลัน ลักษณะของการอักเสบเรื้อรัง ประกอบด้วย

(1) mononuclear cell infiltration โดยเซลล์ที่มีบทบาทมากที่สุดในการบวนการอักเสบเรื้อรัง คือ macrophage ซึ่งสามารถพบเซลล์เหล่านี้ได้ทั้งในกระแสเลือด และในเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ เซลล์เหล่านี้จะพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูก จากนั้นจะเข้าสู่กระแสเลือด และเนื้อเยื่อต่างๆ ต่อไป โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะถูกควบคุมด้วยสารเคมีจำนวนมาก รวมทั้งเซลล์อักเสบชนิดอื่นๆ

(2) กระบวนการดังกล่าวจะอาศัยการกระตุ้นจากเซลล์และสารชนิดต่างๆ เช่น IFN- γ ซึ่งสร้างมาจาก T lymphocytes และ NK cells นอกจากนี้สารประกอบของเชื้อแบคทีเรียและสารเคมีบางชนิด สามารถกระตุ้นเซลล์ macrophage ได้ด้วย หลังจากการกระตุ้น เซลล์ macrophage จะเกิดการเปลี่ยนแปลง คือ มีการเพิ่มขนาดเซลล์ เพิ่มปริมาณของ lysosomal enzyme เพิ่มความสามารถในการเก็บกินสิ่งแปลกปลอม เพิ่มการสร้างสารเคมีหลายๆ ชนิดภายในเซลล์ เมื่อมีการหลั่งสารเหล่านี้ออกมา จะทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อเกิดเป็นพยาธิสภาพตามมาได้

(3) ภายหลังจากที่การอักเสบเฉียบพลันสามารถกำจัดเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมออกไปแล้ว เซลล์ macrophage จะค่อยๆ หายไปจากบริเวณนั้น จึงไม่เกิดการอักเสบเรื้อรัง แต่หากมีปัจจัยใดๆ ก็ตามที่มีกระตุ้นให้เซลล์ macrophage คงอยู่ในบริเวณนั้น จะทำให้เกิดกระบวนการอักเสบเรื้อรังตามมาได้ ซึ่งกลไกที่ทำให้เซลล์ macrophage ยังคงอยู่ในบริเวณนั้น ได้แก่ มีการสร้างสารเคมีทั้ง adhesion molecules และ chemotactic stimuli มากขึ้น, มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ macrophage ในบริเวณนั้น และมีกลไกบางอย่างที่ควบคุมเซลล์ macrophage ให้คงอยู่ในบริเวณนั้น ซึ่งจะทำให้เกิดการหลั่งสารซึ่งสามารถทำลายเนื้อเยื่อได้ เช่น reactive oxygen และ nitrogen intermediates และ protease นอกจากนี้ยังหลั่งสารซึ่งทำให้เซลล์อักเสบ และเซลล์ชนิด

อื่นๆ เช่น fibroblasts และเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด เข้ามาในบริเวณนั้น และเกิดการเพิ่มจำนวนขึ้น จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ การอักเสบซ้ำซ้อน และการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ เกิดเป็นการอักเสบแบบเรื้อรังขึ้นได้ (91-92)

2.6 สารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (chemical mediators of inflammation)

ในกระบวนการอักเสบจะประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ซึ่งต้องอาศัยเซลล์และเนื้อเยื่อหลายชนิด รวมทั้งสารเคมีซึ่งทำหน้าที่เป็นสื่อ (chemical mediator) ในการทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น คุณสมบัติที่สำคัญของสารเคมีซึ่งทำหน้าที่เป็นสื่อในกระบวนการอักเสบ ได้แก่ พบได้ทั้งในพลาสมาและในเซลล์ โดยในพลาสมา จะอยู่ในสภาพที่ยังไม่สามารถทำงานได้ ต้องได้รับการกระตุ้นก่อน, สามารถถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นโดยเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย หรือจาก chemical mediators ชนิดอื่นๆ, ออกฤทธิ์โดยการเข้าจับกับ receptor ที่จำเพาะในเซลล์เป้าหมาย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์, สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้าง chemical mediators อื่นๆ ออกมาได้ ซึ่งจะช่วยให้ chemical mediators ชนิดแรกทำงานได้ดียิ่งขึ้น และมีอายุค่อนข้างสั้น สามารถถูกกลไกอื่นๆ ของร่างกายทำลายอย่างรวดเร็ว เพราะหากปล่อยให้สารเหล่านี้ออกฤทธิ์มากเกินไปจนความจำเป็น มักจะมีผลเสียต่อเนื้อเยื่อมากกว่า

2.6.1 vasoactive amine

สารในกลุ่มนี้ที่มีบทบาทในกระบวนการอักเสบ คือ histamine และ serotonin โดยเฉพาะ histamine เป็นสารตัวแรกที่มีการหลั่งออกมาในกระบวนการอักเสบ

2.6.1.1 histamine

เป็นสารที่สร้างจาก mast cells นอกจากนี้อาจพบใน basophils และเกล็ดเลือด สามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่งได้จากการบาดเจ็บ, ปฏิกริยาทางภูมิคุ้มกันที่กระตุ้นให้ mast cells จับกับแอนติบอดี, anaphylatoxins อย่าง C3a และ C5a, neuropeptide อย่าง substance P และ cytokine อย่าง IL-1 และ IL-8 โดย histamine จะจับกับ H1 receptor บนเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด มีผลทำให้หลอดเลือด arteriole ขยายตัว และทำให้ vascular permeability ของหลอดเลือด venule เพิ่มขึ้น

2.6.1.2 serotonin

serotonin ถูกสร้างมาจากเกล็ดเลือดและ enterochromaffin cells สารที่สามารถกระตุ้นให้มีการหลั่ง serotonin ได้ คือ platelet-activating factors (PAF) โดยที่ผลของ serotonin จะเหมือนกับ histamine

2.6.2 plasma proteins

เป็นกลุ่มที่ประกอบด้วยสารต่างๆ จำนวนมาก สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ complement, kinin และ clotting systems

2.6.2.1 complement system

Complement system ประกอบด้วย complement proteins ตั้งแต่ C1 ถึง C9 สารตัวที่มีความสำคัญ คือ C3 ซึ่งจะถูกระตุ้นได้ 3 วิธี คือ

(1) Classical pathway เกิดจากการจับกันของแอนติเจน แอนติบอดี และ C1 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอีกหลายขั้นตอน และเกิดเอนไซม์ classical pathway C3 convertase เข้ากระตุ้น C3

(2) Alternative pathway สารในผนังเซลล์ของเชื้อโรค เช่น lipopolysaccharide (LPS) จะกระตุ้น C3 โดยตรงทำให้เกิดเอนไซม์ alternative pathway C3 convertase

(3) Lectin pathway เกิดจาก lectin ซึ่งเป็นสารอยู่ในพลาสมาจับกับสารในผนังเซลล์ของเชื้อโรค และกระตุ้น C1 และทำให้เกิดเอนไซม์ C3 convertase เช่นกัน

หลังจากนั้น C3 จะถูกเข้าทำปฏิกิริยาโดย C3 convertase เกิดเป็น C3a และ C3b ซึ่ง C3b จะไปจับ complement proteins อื่นๆ เกิดเป็น C5 convertase ทำหน้าที่ย่อย C5 เกิดเป็น C5a และ C5b โดย C5b จะไปจับ complement proteins อื่นๆ อีกเช่นกัน คือ C6 ถึง C9 เกิดเป็น membrane attack complex (MAC) ซึ่งสามารถทำหน้าที่ทำลายเชื้อโรคได้ นอกจากนี้ สารในกลุ่มนี้ยังทำหน้าที่เป็นสื่อชักนำในกระบวนการอักเสบอีกด้วย เช่น C3a และ C5a สามารถกระตุ้นให้ mast cell หลั่งสาร histamine นอกจากนี้ C5a ยังกระตุ้นเซลล์ neutrophil และ monocyte ให้สร้างสารต่างๆ จาก arachidonic acid โดยเอนไซม์ lipoxigenase ทำให้เกิดสารเคมีซึ่งเป็นสื่อในกระบวนการอักเสบ, C5a เป็น chemotactic stimuli ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว ดังนั้นจึงมีบทบาทสำคัญในกระบวนการ leukocyte adhesion, chemotaxis และ activation และ C3b สามารถทำหน้าที่เป็น opsonin จึงมีส่วนช่วยในกระบวนการ phagocytosis นอกจากนี้หาก

มองเฉพาะสารในกลุ่ม complement system จะพบว่า C3 และ C5 เป็นสารที่มีบทบาทมากที่สุดต่อกระบวนการอักเสบ นอกจากจะถูกกระตุ้นโดยกลไกที่กล่าวมาแล้ว ยังสามารถถูกกระตุ้นได้โดยเอนไซม์ เช่น lysosomal enzyme และ plasmin ที่สร้างจากเซลล์ neutrophils ดังนั้นจะเห็นได้ว่าทั้ง complement system และ neutrophils ต่างสามารถทำหน้าที่ส่งเสริมการทำงานซึ่งกันและกัน

2.6.2.2 kinin system

สารในกลุ่มนี้เปลี่ยนแปลงมาจากโปรตีน kallikreins โดยที่ kallikreins จะเปลี่ยน HMWK ให้เป็นสาร bradykinin ซึ่งมีผลทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด และ permeability ของหลอดเลือดเพิ่มขึ้น หลังจากที่มีการหลั่ง bradykinin ออกมาจะถูกสลายโดย kininase

2.6.2.3 clotting system

สารที่สำคัญในกลุ่มนี้ คือ thrombin และ fibrin โดย fibrin มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือด ส่วนสารที่มีบทบาทในกระบวนการอักเสบคือ thrombin โดย thrombin จะสามารถจับกับ protease-activated receptors (PARs) ซึ่งพบในเซลล์หลายๆ ชนิด การจับกันของ thrombin และ PARs ทำให้เกิดการกระตุ้นให้สร้าง P-selectin, chemokines, integrins, PAF, ไนตริก ออกไซด์ และกระตุ้นเอนไซม์ cyclooxygenase-2 ทำให้เกิดการสร้าง prostaglandins

ในขณะที่มีกระบวนการสร้าง fibrin จะเกิดกระบวนการสลาย fibrin (fibrinolytic system) เช่นกันเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างลิ่มเลือด (clot) มากเกินไป โดยเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด หรือเซลล์เม็ดเลือดขาวจะหลั่ง plasminogen activator ทำหน้าที่สลาย plasminogen ให้เป็น plasmin ซึ่งจะไปทำหน้าที่ในการสลายลิ่มเลือด และยังสามารถกระตุ้น complement C3 ได้อีกด้วย

2.6.3 arachidonic acid metabolite

Arachidonic acid (AA) เป็นสารที่เปลี่ยนมาจาก phospholipids ที่อยู่ในผนังเซลล์ โดยการทำงานของเอนไซม์ phospholipase ซึ่งสามารถกระตุ้นได้จาก สารเคมี การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ สารอื่นๆ ในร่างกาย เช่น C5a โดยที่ arachidonic acid สามารถถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์ cyclooxygenases ได้เป็น prostaglandins และ thromboxanes และเปลี่ยนโดยเอนไซม์ lipoxygenases ได้เป็น leukotrienes และ lipoxin เรียกสารกลุ่มที่เปลี่ยนแปลงมาจาก

arachidonic acid ทั้งหมดนี้ว่า eicosanoids สารกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญในเกือบทุกขั้นตอนของกระบวนการอักเสบ

การเปลี่ยนแปลงของ arachidonic acid โดยเอนไซม์ cyclooxygenases จะทำให้ได้ prostaglandins (PG) หลายชนิด ซึ่งสารกลุ่มนี้ที่มีความสำคัญในกระบวนการอักเสบ คือ PGE₂, PGD₂, PGF₂α, PGI₂ (prostacyclin) และ TxA₂ (thromboxane) สารที่มีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดอาการเจ็บปวดและมีไข้ในการอักเสบ คือ PGE₂ ส่วนสารที่ทำให้เนื้อเยื่อเกิดการบวม คือ PGE₂, PGD₂ และ PGF₂α เนื่องจากสารดังกล่าวทำให้หลอดเลือดขยายตัวและ permeability ของหลอดเลือดสูงขึ้น

เอนไซม์ lipoxygenase สามารถแบ่งได้หลายชนิด โดยสารที่สำคัญ คือ 5-lipoxygenase (5-LO) สามารถพบได้ในเซลล์ neutrophil มีผลทำให้เกิดการสร้าง 5-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE) ซึ่งเป็น chemotaxis นอกจากนี้ 5-HETE ยังสามารถเปลี่ยนต่อไปเป็น leukotrienes ได้อีกหลายชนิด เช่น LTB₄ ซึ่งเป็น chemotaxis ที่สำคัญและสามารถกระตุ้น neutrophils ในกระบวนการเกาะติดและจับกลุ่มของเม็ดเลือดขาวได้, กระตุ้นให้สร้าง oxygen free radicals และหลัง lysosomal enzyme ส่วน leukotriene อื่นๆ คือ LTC₄, LTD₄ และ LTE₄ มีผลทำให้หลอดเลือดหดตัว permeability ของหลอดเลือดสูงขึ้น นอกจากนี้ LTA₄ บางส่วนจะถูกเซลล์เม็ดเลือดขาวส่งต่อไปยังเกล็ดเลือด หลังจากนั้นจะถูกเอนไซม์ 12-lipoxygenase (12-LO) เกิดเป็น lipoxin A₄ (LXA₄) และ lipoxin B₄ (LXB₄) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการอักเสบ

2.6.4 platelet-activating factors

PAF เป็นสารที่เปลี่ยนแปลงมาจาก phospholipid เช่นเดียวกับกลุ่ม arachidonic acid มีผลทำให้หลอดเลือดหดตัว นอกจากนี้ PAF ยังกระตุ้นกระบวนการเกาะติดของเม็ดเลือดขาว, chemotaxis, ส่งเสริม phagocytosis และส่งเสริมให้เกิดการสร้างสารชนิดอื่นๆ อีกด้วย PAF ถูกสร้างได้จากเซลล์หลายชนิด เช่น เกล็ดเลือด, basophil, mast cell, neutrophil, macrophage และเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด

2.6.5 cytokines และ chemokines

Cytokine เป็นสารที่สร้างได้จากเซลล์หลายๆ ชนิด ส่วนใหญ่จะทำหน้าที่กระตุ้น lymphocytes และ macrophages ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทในกระบวนการอักเสบ คือ

2.6.5.1 tumor necrosis factor และ IL-1

Tumor necrotic factor (TNF) และ interleukin-1 (IL-1) ถูกสร้างมาจาก เซลล์ macrophages มีบทบาทในการกระตุ้นเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด เซลล์เม็ดเลือดขาว และ เซลล์ fibroblasts ทำให้เกิด acute-phase reactions

2.6.5.2 IL-8

ถูกหลั่งมาจาก macrophage เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด สารที่สามารถ กระตุ้นให้เกิดการหลั่ง IL-8 คือ TNF, IL-1 และสารที่พบในเชื้อโรค โดย IL-8 จะมีผลทำให้เกิด กระบวนการ activation และ chemotaxis ใน neutrophil

2.6.5.3 chemokine อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

monocyte chemoattractant protein (MCP-1), eotaxin, macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) และ RANTES ทำหน้าที่เป็น chemoattractant

2.6.6 ไนตริก ออกไซด์ (nitric oxide)

Nitric oxide (NO) ถูกสร้างจากเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด macrophage มีหน้าที่ สำคัญในการทำให้หลอดเลือดขยายตัว และมีหน้าที่กระบวนการอักเสบ เพื่อป้องกันการเกิดการ อักเสบที่มากเกินไป นอกจากนี้ยังพบว่า NO มีบทบาทในการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ด้วย

2.6.7 oxygen-derived free radicals

สารกลุ่ม free radicals ซึ่งมีส่วนประกอบเป็นออกซิเจน ถูกสร้างมาจากเซลล์เม็ด เลือดขาว ภายหลังจากได้รับการกระตุ้นจากสารประกอบในเชื้อโรค chemokine หรือ สารประกอบ ทางภูมิคุ้มกัน (immune complexes) โดย oxygen-derived free radicals จะทำให้มีการสร้าง chemokines, cytokines, adhesion molecules และสารชนิดอื่นๆ ซึ่งกระตุ้นกระบวนการอักเสบ มีผลยับยั้งการทำงานของ anti-protease ส่งเสริมให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อได้รุนแรงมากขึ้น

2.6.8 สารที่หลั่งจากเม็ดเลือดขาว

ในเซลล์ neutrophils และเซลล์ monocytes จะพบ lysosomal granules อยู่ ภายใน ซึ่งมีสารชนิดต่างๆ ที่สามารถกระตุ้นกระบวนการอักเสบได้ โดยในเซลล์ neutrophils จะพบ granules 2 ชนิด คือ

2.6.8.1 Azurophil (primary) granules

พบเอนไซม์หลายชนิดเช่นกัน เช่น myeloperoxidase, bactericidal factors (lysozyme, defensins), acid hydrolase, neutral protease เป็นต้น

2.6.8.2 Specific (secondary) granules

เอนไซม์ที่พบอยู่ภายใน เช่น lysozyme, collagenase, gelatinase, lactoferrin, plasminogen activator, histamine และ alkaline phosphatase โดยที่การหลั่งเอนไซม์เหล่านี้ พบใน phagolysosome และส่งผลต่อกระบวนการอักเสบได้ (91-92)

2.7 เทคนิคทาง proteomics

เทคนิคทาง proteomics เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของโปรตีนที่มีอยู่ในสิ่งที่ต้องการศึกษา โดยจัดเป็นเทคนิคการวิเคราะห์โปรตีนที่มีความแม่นยำมากและมีประสิทธิภาพสูง ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ทาง proteomics สามารถนำมาอธิบายกลไกการทำงาน, หน้าที่ และความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนด้วยกัน แต่ก็มีข้อจำกัดอยู่ที่ฐานข้อมูลที่ใช้ในการอ้างอิง ซึ่งบางครั้งอาจไม่สามารถระบุโปรตีนที่มีได้ทั้งหมด

เทคนิค liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) เป็นการแยกโปรตีนที่อยู่ในสถานะของเหลวด้วยเทคนิค liquid chromatography (LC) แล้วระบุชนิดของโปรตีนที่แยกได้ด้วย mass spectrometry โดยส่วนประกอบของ LC-MS จะประกอบไปด้วย autosampler, HPLC, ionization source และ mass spectrometry โดยโปรตีนที่แยกได้จาก LC จะถูกนำไปทำให้อยู่ในรูปไอออนด้วย ionization source แล้วส่งต่อเข้าเครื่อง mass spectrometry เพื่อทำการวัดค่าที่ได้ออกมาเป็นค่ามวล/ประจุ แล้วค่าที่ได้นี้จะถูกนำมาวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วยซอฟต์แวร์ต่างๆ โดยเทียบจากฐานข้อมูล ซึ่งข้อมูลที่ได้เหล่านี้เราสามารถนำมาวิเคราะห์หน้าที่การทำงาน รวมถึงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนได้ (93)

ปัจจุบันเทคนิคทาง proteomics ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายทางด้านการศึกษาแพทย์ และใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับ PARs ด้วย อย่างเช่นงานวิจัยที่มีการศึกษาถึงโปรตีนทั้งหมดที่อยู่ใน pseudopodial proteasome ของเซลล์มะเร็งเต้านม ภายหลังจากมีการกระตุ้น PAR2 เนื่องจาก PAR2 สามารถส่งสัญญาณให้มีการเกิด migration ได้ โดยทำการนำเซลล์มะเร็งเต้านมไปทำการกระตุ้น PAR2 แล้วนำไปทำการหาโปรตีนด้วยเทคนิคทาง proteomic อย่าง mass spectrometry

เพื่อทำการดูโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด migration ที่มีการสะสมบริเวณ pseudopodia หลังจากกระตุ้น PAR2 พบว่ามีโปรตีนมากกว่า 410 ชนิดใน cell body และมากกว่า 380 ชนิดใน pseudopodia โดยมีโปรตีน 93 ชนิดที่พบสูงมากใน pseudopodia ซึ่งในเซลล์มะเร็งเต้านมพบวิถี clathrin-mediated endocytosis สูง ซึ่งเน้นให้เห็นถึงความสำคัญของ β -arrestin ในการส่งสัญญาณ endocytosis ผ่าน PAR2 ซึ่งจากข้อมูลพบว่าหน้าที่ของ β -arrestin จะควบคุมการส่งสัญญาณของ PAR2 ที่เกี่ยวกับการ migration ในเซลล์มะเร็งเต้านม แล้วยังแสดงให้เห็นด้วยว่า β -arrestin ยังมีหน้าที่บางอย่างที่ครอบคลุมไปถึง GPCR และชนิดของเซลล์ (94)

บทบาทของเทคนิคทาง proteomics ยังสามารถนำไปใช้ได้อีกหลายหลาย ไม่ว่าจะเป็นการนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อหาโปรตีนที่เหมาะสมจะใช้เป็น marker ในการทำนายโอกาสในการรอดชีวิตของผู้ป่วย อย่างเช่นในงานวิจัยของ Stetson LC และคณะ ทำการวิจัยโดยใช้ reverse phase protein array data จากผู้ป่วย Glioblastoma multiforme (GBM) จำนวน 203 รายที่ไม่ได้มีการรักษา พบว่ามีโปรตีน 13 ชนิดที่มีความสำคัญกับการทำนายโรคอย่างมีนัยสำคัญ โดยจาก PROGLIO โมเดลที่ถูกสร้างโดยใช้ข้อมูลเพื่อทำนายอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย GBM ซึ่งในโมเดลนี้ประกอบด้วย โปรตีนอย่าง Cox-2 และ Annexin 1 ซึ่งตอบสนองต่อการอักเสบ โดยจากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าโมเดล PROGLIO มีประสิทธิภาพในการเป็นตัวทำนายอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย GBM ซึ่งมีประโยชน์ในการรักษา (95) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอีกมากมายที่ใช้เทคนิคทาง proteomics ในการหา marker ของโรค อย่างงานวิจัยของ Paone G และคณะ ที่ทำการศึกษา Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) และ asthma ซึ่งเป็นโรคที่เกี่ยวกับการอักเสบของปอดซึ่งปกติใช้ spirometry ในการหาความรุนแรงของโรค ซึ่งนอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องไปกับภาวะแทรกซ้อนของคนไข้, ความเชี่ยวชาญของแพทย์ และการแปลผลข้อมูล ซึ่งวิธีเหล่านี้ยังมีข้อจำกัดจึงทำให้จำเป็นต้องหาตัวติดตามใหม่ ซึ่ง biomarker ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบอาจมีบทบาทสำคัญในการใช้วินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งอาจใช้ในการประเมินความผิดปกติของหน้าที่และใช้ในการทำนายโรค โดยจะทำการเก็บตัวอย่างของคนไข้ด้วยวิธีที่มีการ invasive น้อยอย่างการเก็บเลือดหรือเสมหะแทนการ biopsy มาทำการวัดด้วยวิธีทาง proteomics แล้วทำการวิเคราะห์โปรตีนที่ได้ โดยจะทำการประเมินการใช้ biomarker ของการอักเสบที่เกี่ยวกับทางเดินหายใจ (96) ซึ่งจากงานวิจัยที่ได้กล่าวมาข้างต้นทำให้เห็นบทบาทของเทคนิคการ proteomics ในปัจจุบัน โดยจะเห็นว่าเทคนิคทาง proteomics สามารถที่จะนำมาใช้ในการอธิบายกลไกและหน้าที่การทำงานของโปรตีนได้เป็นอย่างดี ซึ่งจากการนี้จึงสามารถนำเทคนิคนี้มาเพื่อใช้ในการศึกษา ถึงผลที่ได้จากการกระตุ้น PAR2 เพื่อดูการหลังโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบได้

บทที่ 3

วิธีการวิจัย (Methodology)

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากทางเดินอาหารของกระต่าย

การทดลองจะใช้กระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ (*Oryctolagus cuniculus*) ทำการแยกกระเพาะอาหารกระต่ายส่วน fundus ออกจากส่วนที่เหลือรวมทั้งชั้นเยื่อเมือกจะถูกตัดออกด้วยใบมีดสำหรับผ่าตัด จากนั้นทำการแยกเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากชั้นกล้ามเนื้อเรียบที่เรียงตัวเป็นวงและตามยาวโดยขั้นตอน การย่อยด้วยเอนไซม์, การกรอง และการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) (97-99) ทำได้โดยการนำกระเพาะอาหารกระต่ายส่วน fundus มาทำการตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำชิ้นส่วนที่ตัดได้ไป incubate ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส ที่มีสารละลาย buffer (buffer) สำหรับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ รวมทั้งมี 0.1% collagenase U/ml และ 0.01% soybean trypsin inhibitor w/v โดยสารละลาย buffer สำหรับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจะประกอบด้วย NaCl 120 mM, KCl 4 mM, KH_2PO_4 2.6 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 0.6 mM, HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N' 2-ethanesulfonic acid) 25 mM, glucose 14 mM และสารผสมของ essential amino acid 2.1% โดยมีค่า pH 7.4 ต่อมาเนื้อเยื่อที่ถูกย่อยแล้วจะนำมาทำการล้าง 2 ครั้ง โดยใช้สารละลาย buffer สำหรับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่ไม่มีเอนไซม์ collagenase 50 ml เสร็จแล้วจะปล่อยให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบกระจายตัวเป็นเวลา 30 นาที ในสารละลาย buffer สำหรับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่ไม่มีเอนไซม์ collagenase ต่อมาจะทำการเก็บเซลล์ โดยเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่ได้จะถูกนำมากรองผ่าน 500 μm Nitex แล้วทำการปั่นเหวี่ยง 2 ครั้ง ที่ 350 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดเซลล์ที่แตกหรือ organelle

3.2 การเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากทางเดินอาหาร

เซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่แยกมาได้ จะมาทำการเพาะเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยง (plate) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร (cm) ด้วยความเข้มข้น 5×10^5 cells/ml โดยมีอาหารเลี้ยงเซลล์คือ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย penicillin 200 U/ml, streptomycin 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, gentamycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, amphotericin B 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ และ 10% fetal bovine serum แล้วนำไป incubate เพาะในสภาพแวดล้อมที่มี 10% CO_2 ที่อุณหภูมิ

37 องศาเซลเซียส (°C) แล้วทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2-3 วัน จนกว่าจะได้เซลล์ที่หนาแน่นประมาณ 80% (confluence) โดยที่การทดลองจะทำการทดลองในเซลล์ที่เลี้ยงมาไม่เกิน 3 รุ่น (passage) (97, 100)

3.3 การกระตุ้น PAR2 ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากทางเดินอาหาร

นำเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 6 หลุม (6-well plate) และทิ้งเซลล์ไว้ข้ามคืนโดยทำการแบ่งเซลล์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม control และกลุ่มของเซลล์ที่มีการกระตุ้น PAR2 โดยมีการทำซ้ำกลุ่มละ 3 ครั้ง

(1) กลุ่มของเซลล์ control โดยกลุ่มนี้ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 6 หลุมจะประกอบไปด้วย เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และ DMEM ที่ไม่มี fetal bovine serum จำนวน 3 หลุม

(2) กลุ่มของเซลล์ที่มีการกระตุ้น PAR2 โดยกลุ่มนี้ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 6 หลุม จะประกอบไปด้วยเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ, DMEM ที่ไม่มี fetal bovine serum และ SLIGKV เปปไทด์ที่ใช้สำหรับกระตุ้น PAR2 ปริมาตร $1 \mu\text{M}$ (10^{-6}M) จำนวน 3 หลุม

จากนั้นเซลล์ทั้ง 2 กลุ่ม ทำการ incubate ไว้ 48 ชั่วโมงแล้วจึงเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ของแต่ละกลุ่มไว้เป็นครั้งที่ 1 แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่ไม่มี fetal bovine serum ลงไปทำการ incubate ต่ออีก 24 ชั่วโมง (รวมเป็น 72 ชั่วโมง) แล้วจึงเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ของแต่ละกลุ่มไว้เป็นครั้งที่ 2 โดยจะได้ตัวอย่าง (sample) รวมทั้งหมด 12 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นตัวอย่างของ control 48 ชั่วโมง 3 ตัวอย่าง, ตัวอย่างของ control 72 ชั่วโมง 3 ตัวอย่าง, ตัวอย่างของเซลล์ที่กระตุ้นด้วย SLIGKV 48 ชั่วโมง 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างของเซลล์ที่กระตุ้นด้วย SLIGKV 72 ชั่วโมง 3 ตัวอย่าง แล้วนำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่เก็บได้ทั้งหมดมาทำให้เป็นผงด้วยการระเหิดแห้ง (freeze drying) เพื่อเก็บไว้ตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีนต่อไป

3.4 การตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Lowry

การหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Lowry (101) มีหลักการคือ จะเป็นการผสมกันของ 2 ปฏิกิริยา ชั้นแรก Cu^{2+} จะเกิดปฏิกิริยากับพันธะเปปไทด์ ในสภาวะที่เป็นต่างปฏิกิริยาชั้นต่อมาคือกรดอะมิโนได้แก่ tyrosine, tryptophan และ cysteine ในตัวอย่างและไอออน Cu จะเกิดการ reduce (reduction) กับ phosphomolybdic acid และ phosphotungstic acid ที่มีอยู่ใน Folin reagent เกิดสารที่มีสีน้ำเงินขึ้น ซึ่งสีที่ได้จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของโปรตีนที่มีอยู่ในตัวอย่างโดยจะวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 750 nm และคำนวณหาความเข้มข้นของ

โปรตีนโดยใช้กราฟมาตรฐาน (standard curve) ซึ่งแกน Y คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm และแกน X เป็นความเข้มข้นของ BSA (bovine serum albumin) ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) โดยมีวิธีการดังนี้

(1) นำตัวอย่างทั้ง 12 ตัวอย่าง มาละลายใหม่ใน 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate) ปริมาตร 1 ml

(2) เตรียมจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุม (96-well plate) เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 12 ตัวอย่าง และทำกราฟมาตรฐานที่ใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 0, 2, 4, 6, 8, 10 μg โดยแต่ละตัวอย่างที่นำมาหาความเข้มข้นโปรตีนและทำกราฟมาตรฐานจะทำซ้ำ 4 ครั้ง

(3) pipette 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA ปริมาตร 0 μl และ pipette 0.1% SDS ปริมาตร 5 μl ใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุมจำนวน 4 หลุม

(4) pipette 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA ปริมาตร 1 μl และ pipette 0.1% SDS ปริมาตร 4 μl ใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุมจำนวน 4 หลุม

(5) pipette 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA ปริมาตร 2 μl และ pipette 0.1% SDS ปริมาตร 3 μl ใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุมจำนวน 4 หลุม

(6) pipette 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA ปริมาตร 3 μl และ pipette 0.1% SDS ปริมาตร 2 μl ใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุมจำนวน 4 หลุม

(7) pipette 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA ปริมาตร 4 μl และ pipette 0.1% SDS ปริมาตร 1 μl ใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุมจำนวน 4 หลุม

(8) pipette 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA ปริมาตร 5 μl และ pipette 0.1% SDS ปริมาตร 0 μl ใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุมจำนวน 4 หลุม

(9) pipette ตัวอย่างแต่ละตัวอย่างปริมาตร 5 μl ใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุมตัวอย่างละ 4 หลุม

(10) เติมนสารละลาย (solution) A ปริมาตร 200 μl ในแต่ละหลุม แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องและต้องอยู่ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที (วิธีเตรียมสารดูในภาคผนวก ข)

(11) เติมนสารละลาย B ปริมาตร 50 μl ในแต่ละหลุม แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องและต้องอยู่ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที (วิธีเตรียมสารดูในภาคผนวก ข)

(12) นำจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุม ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 750 nm

(13) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากโปรตีนที่รู้ความเข้มข้นอย่าง BSA ไปสร้างกราฟมาตรฐาน (ดูกราฟมาตรฐานได้จากภาคผนวก ค)

(14) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากตัวอย่างไปคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนที่มีในตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ดูข้อมูลได้ในภาคผนวก ค)

3.5 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (102)

โดยจะอาศัยหลักว่า SDS (sodium dodecyl sulfate) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิว (detergent) ที่มีประจุลบ จะจับกับโปรตีนในอัตราส่วนโดยน้ำหนักคงที่ คือ 1.4 g SDS/g โปรตีน ทำให้โปรตีนทุกชนิดมีความหนาแน่นของน้ำหนักต่อประจุเท่ากันและยังทำให้โปรตีนเสียสภาพ ทำให้โปรตีนอยู่ในสภาพเส้นตรง และทำให้เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้า โปรตีนจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปหาขั้วบวกตามน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเท่านั้นซึ่งโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยผ่าน polyacrylamide gel (polyacrylamide gel) โดยมีวิธีการดังนี้

3.5.1 การเตรียม polyacrylamide gel

polyacrylamide gel จะใช้ 2 ส่วน คือ ส่วนของ separating gel 12.5% และส่วนของ stacking gel 5% ซึ่งสามารถทำได้ดังนี้

(1) การเตรียม separating gel 12.5%

เตรียมตลับเจล (gel cassette) สำหรับรันเจลโดยประกอบให้เรียบร้อย แล้วจึงทำการเตรียม separating gel ซึ่งที่ส่วนประกอบดังต่อไปนี้ น้ำกลั่น (distilled water) ปริมาตร 4.1967 ml, 40% acrylamide ปริมาตร 3.125 ml, 1.5 M Tris-HCl buffer pH 8.8 ปริมาตร 2.5 ml, 10% w/v SDS ปริมาตร 125 μ l, 10% APS (ammonium persulphate) ปริมาตร 50 μ l และ TEMED ปริมาตร 3.3 μ l โดยมีปริมาตรสุดท้าย 10 ml แล้วจึงเทสารละลายเจลที่ได้ลงในช่องระหว่างกระจก โดยให้ระดับสารละลายอยู่ใต้หวี (comb) ประมาณ 0.5 cm แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ท่วมผิวของสารละลายเจลรอจนเจลแข็งตัวประมาณ 45 นาที

(2) การเตรียม stacking gel 5%

ทำการเตรียมส่วนประกอบดังต่อไปนี้ น้ำกลั่น (distilled water) ปริมาตร 1.8283 ml, 40% polyacrylamide ปริมาตร 375 μ l, 0.5 Molar Tris-HCl buffer pH 6.8 ปริมาตร 742 μ l, 10% w/v SDS ปริมาตร 30 μ l, 10% APS (ammonium persulphate) ปริมาตร 23 μ l และ TEMED ปริมาตร 1.7 μ l โดยมีปริมาตรสุดท้าย 3 ml เมื่อ separating gel แข็งตัวเรียบร้อยแล้ว ให้เทส่วนของน้ำกลั่นด้านบนออกให้หมด แล้วจึงเทสารละลายเจลที่เตรียมไว้ทับลงไปให้เต็มหรือเกือบเต็ม แล้วจึงเสียบหัวลงไประหว่างชุดกระจก แล้วรอให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที แล้วค่อยดึงหัวออกช้าๆอย่าให้เจลที่อยู่ระหว่างซี่หัวขาด

3.5.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับทดสอบ

ทำการ pipette ตัวอย่างทั้ง 12 ตัวอย่างใส่ใน microcentrifuge tube 12 หลอด โดย pipette แต่ละตัวอย่างให้ได้ปริมาตรตามตาราง (ดูข้อมูลได้ในภาคผนวก ข) เพื่อให้ในแต่ละตัวอย่างมีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากันที่ 50 μ g แล้วทำการปรับปริมาตรในแต่ละตัวอย่างให้เท่ากับ 10 μ l ด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงเติม 5X SDS sample buffer หลอดละ 5 μ l ซึ่งจะได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 μ l เท่ากันทุกหลอด แล้วจึงนำตัวอย่างที่เตรียมได้พร้อมกับโปรตีนมาตรฐาน (low molecular weight protein standard marker) ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำตัวอย่างไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียสประมาณ 10 นาที เสร็จแล้วนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

3.5.3 gel electrophoresis

เตรียมอุปกรณ์สำหรับรันเจล โดยเติม 1X SDS running buffer ลงในส่วนถัง (tank) ด้านนอก ใส่ตลับเจลที่เตรียมได้ลงในห้องขั้วไฟฟ้าลบ (negative electrode chamber) แล้วนำใส่ลงในถังด้านนอกที่มี 1X SDS running buffer ใส่อยู่ โดยพยายามไล่ฟองอากาศออกให้หมด แล้วจึงเติม 1X SDS running buffer ลงในห้องขั้วไฟฟ้าลบให้ท่วมตลับเจลโดยให้สูงกว่าระดับของตลับเจลประมาณ 0.5 cm แล้วจึงทำการ pipette ตัวอย่างทั้ง 12 ตัวอย่างที่เตรียมได้ลงในแต่ละหลุมบน stacking gel โดย pipette โปรตีนมาตรฐานลงในหลุมแรกและหลุมสุดท้าย เสร็จแล้วให้ทำการต่อชุดอุปกรณ์รันเจลที่ประกอบเสร็จแล้วเข้ากับแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) ตั้งค่าความต่างศักย์ 100 volt ค่ากระแสไฟฟ้า 30 mA จนกระทั่ง tracking dye เคลื่อนที่ลงไปจนเกือบสุดแผ่นเจล แล้วจึงปิดแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้า ถอดขั้วไฟฟ้าออกจากชุดอุปกรณ์รันเจล แล้วจึงนำเจลที่ได้มาแกะออกจากตลับเจลโดยระวังไม่ให้เจลขาด แล้วทำการตัดส่วนของ stacking gel ที่นำไป เฉพาะส่วนของ separating gel ไปทำการย้อมสีต่อไป

3.6 การย้อมด้วยเงิน (silver staining) (103, 104)

วิธีการตรวจหาโปรตีนที่ได้จากการรัน polyacrylamide gel การย้อมด้วยเงินได้รับความนิยอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีความไว (sensitivity) ที่สูง ทำให้ตรวจหาโปรตีนที่มีปริมาณน้อยเป็น ng ได้ โดยสารที่ใช้เตรียมหาได้ง่ายและมีราคาถูก นอกจากนี้ยังไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์อ่านผลที่ซับซ้อนหรือมีราคาแพง ซึ่งวิธีการย้อมด้วยเงินสามารถนำไปตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค mass spectrometry ได้ โดยหลักการของการย้อมด้วยเงินนั้น โปรตีนที่อยู่ใน polyacrylamide gel จะจับกับไอออนของเงินที่อยู่ในสารละลาย ซึ่งสามารถถูก reduce ได้ในสภาวะที่เหมาะสม ทำให้เกิดโลหะเงิน (silver metal) ที่ไม่ละลายน้ำและสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าได้ ทำให้เกิดแถบของโปรตีนที่มองเห็นได้ขึ้นในเจล โดยการย้อมด้วยเงินมีขั้นตอนใหญ่ๆ ดังนี้

3.6.1 fixing step

เป็นขั้นตอนในการเติมกรดเพื่อทำให้โปรตีนที่อยู่ในเจลไม่ละลายน้ำและไม่มี การแพร่ออกไปจากเจลในระหว่างขั้นตอนการย้อม นอกจากนี้ยังทำให้สารรบกวนการย้อมด้วยเงิน อื่นๆที่อยู่ในเจล เช่น buffer, ไอออน, สารลดแรงตึงผิว และสารอื่นๆ จะถูกล้างออกไปจากเจลใน ขั้นตอนนี้ ซึ่งทำได้โดย นำเจลที่ได้มาใส่ใน fixing solution ให้พอท่วมเจล ซึ่งแล้วนำไปเขย่าด้วย เครื่องเขย่า (shaker) เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเทสารละลายทิ้ง จากนั้นจะทำการล้างเจล ด้วยการ เติม washing solution ให้พอท่วมเจล แล้วนำไปเขย่าเป็นเวลา 5 นาที จึงเทสารละลายทิ้ง แล้วทำ การเติมสารละลายสำหรับล้างเพื่อล้างซ้ำอีกครั้ง

3.6.2 sensitizing step

เป็นขั้นตอนในการเติมสารเคมีเพื่อทำให้โปรตีนในเจลมีความไวเพิ่มขึ้นต่อเงิน และยังช่วยเร่งการ reduce ของไอออนเงิน ซึ่งในขั้นตอนนี้จะเพิ่มความไวอย่างมากในการย้อม สำหรับโปรตีนด้วยเงิน แต่ไม่จำเป็นสำหรับการย้อมดีเอ็นเอด้วยเงิน นอกจากนี้การใส่สารที่ทำให้ไวต่อ การกระตุ้นมากเกินไปจะทำให้มีการย้อมพื้นหลัง (background) ที่เพิ่มมากขึ้นด้วย โยในขั้นตอนนี้จะ ทำได้โดย นำเจลจากขั้นตอนที่แล้วมาเติม sensitizing solution ให้พอท่วมเจล แล้วนำไปเขย่าเป็น เวลา 2 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้งแล้วทำการล้างเจลด้วยน้ำกลั่น นำไปเขย่าเป็นเวลา 5 นาที แล้ว เทน้ำกลั่นทิ้ง ทำการเติมน้ำกลั่นเพื่อล้างซ้ำอีกครั้ง

3.6.3 silver impregnation

เป็นขั้นตอนในการเติม silver nitrate ลงไปจับกับโปรตีนที่อยู่ในเจล ซึ่งใน สภาวะที่เป็นกรดอ่อนจะป้องกันไอออนเงินในการถูก reduce เป็นโลหะเงิน ซึ่งในขั้นตอนนี้จะทำได้

โดย เติม staining solution ให้พอท่วมเจล แล้วนำไปแช่เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้ง แล้วทำการล้างเจลด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 วินาที แล้วจึงเทน้ำกลั่นทิ้ง

3.6.4 developing step

เป็นขั้นตอนที่ทำให้เกิดสีโดยสาร formaldehyde ที่อยู่ใน developing solution จะไปทำการ reduce ไอออนเงินให้กลายเป็นโลหะเงิน โดยปฏิกิริยานี้จะเกิดได้ในสภาวะที่มีค่า pH สูงเท่านั้น ซึ่งในขั้นตอนนี้จะทำได้โดย เติม developing solution ให้พอท่วมเจล แล้วนำไปแช่จนกว่าจะปรากฏแถบสีดำของโปรตีนให้เห็นชัดเจน แล้วจึงเทสารละลายทิ้ง

3.6.5 stopping step

เป็นขั้นตอนในการป้องกันการ reduce ของไอออนเงินจากขั้นตอนที่แล้ว เพื่อให้ไม่ให้เกิดพื้นหลังที่มากเกินไป ซึ่งขั้นตอนนี้ทำได้โดย เติม stopping solution พอท่วมเจล นำไปแช่เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเทสารละลายทิ้ง จากนั้นล้างเจลด้วยน้ำกลั่น นำไปแช่เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเทน้ำกลั่นทิ้ง แล้วทำการเติมน้ำกลั่นเพื่อล้างซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำเจลไปเก็บรักษาในสารละลาย 0.1% acetic acid ก่อนที่จะนำเจลที่ได้ไปเข้าเครื่องสแกนเจลด้วยโปรแกรม Quantity one-42.0 เพื่อให้ได้รูปเจลออกมาสำหรับการจำลองการตัดเจลสำหรับขั้นตอนต่อไป

3.7 การย่อยโปรตีนภายในเจล (in gel digestion)

เป็นเทคนิคที่ต้องใช้ก่อนการนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS ซึ่งเมื่อทำการแยกโปรตีนออกตามขนาดมวลโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้ว การย่อยโปรตีนภายในเจล เป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อนำเอาโปรตีนที่อยู่ในเจลออกมาสู่สารละลาย ก่อนที่จะนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค LC-MS ซึ่งการย่อยโปรตีนภายในเจลมีขั้นตอนใหญ่ๆ ได้แก่ การตัดเจล, การเอาสีย้อมออก, การ reduce และการ alkylate, การย่อย และการสกัดโปรตีนออกจากเจล โดยมีขั้นตอนการทำดังนี้

3.7.1 การตัดเจล

ทำการสแกนเจลด้วยเครื่องสแกนเจล GS-710 Calibrated Imaging Densitometer เมื่อได้รูปเจลออกมาแล้วให้ทำการแบ่งเจลออกเป็นส่วนๆตามโปรตีนมาตรฐานที่รันไปพร้อมกับตัวอย่าง แล้วทำการตัดเจลแต่ละส่วนด้วยใบมีดให้ได้ขนาดประมาณ 1 mm³ แล้วทำการย้ายเจลในแต่ละส่วนไปใส่ในแต่ละหลุมของจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุม เพื่อทำขั้นตอนต่อไป

3.7.2 การเอาสีออกมา

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 μl ลงในแต่ละหลุมแล้วเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการดูดน้ำกลั่นในแต่ละหลุมทิ้งไป ทำการเติม 100% acetonitrile ปริมาตร 200 μl ลงในแต่ละหลุม แล้วเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ดูด acetonitrile แล้วทำการเติม acetonitrile ใหม่เพื่อทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้ง เสร็จแล้วดูดทิ้ง ปล่อยให้เจลที่ได้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที

3.7.3 การ reduce และ alkylation

เติม 10 mM dithiothreitol (DTT) ใน 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ปริมาตร 50 μl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยโปรตีนจะเกิดการ reduce โดยสาร DTT ซึ่งจะไปสลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ระหว่าง cysteine เสร็จแล้วทำการดูดสารทิ้ง แล้วทำการเติมสาร 100 mM iodoacetamide (IAA) ใน 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ปริมาตร 50 μl ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยโปรตีนจะเกิดปฏิกิริยาการเติม alkyl group แทนที่อะตอมไฮโดรเจน เพื่อไม่ให้เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์กลับคืนมาอีก เรียกว่าปฏิกิริยา carbamidomethyl (C) จากนั้นดูดสารทิ้งแล้วจึงเติม 100% acetonitrile ปริมาตร 200 μl เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดสารทิ้ง โดยทำซ้ำอีก 2 รอบ ถ้าเจลยังไม่หดตัวให้ทำซ้ำอีกรอบ

3.7.4 การย่อยโปรตีนภายในเจล

เติมสารละลาย 10 ng trypsin ใน 50% acetonitrile ใน 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ปริมาตร 20 μl นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม 30% acetonitrile ปริมาตร 20 μl แล้วนำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียสต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน ซึ่งขั้นตอนนี้ trypsin จะไปสลายพันธะเปปไทด์ทางด้าน carboxyl terminal ของกรดอะมิโน arginine และ lysine

3.7.5 การสกัดโปรตีนออกจากเจล

ทำการดูดสารละลายจากแต่ละหลุมใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุมอันใหม่ โดย 1 ตัวอย่างต่อ 1 หลุม ถ้าหลุมใดแห้งจนไม่สามารถดูดของเหลวได้ให้ใส่ 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ปริมาตร 30 μl แล้วเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ก่อนดูดใส่จานเพาะเลี้ยงหลุมอันใหม่ จากนั้นทำการสกัดโปรตีนที่ยังเหลืออยู่ในเจลด้วย 50% acetonitrile ใน 0.1% formic acid ปริมาตร 30 μl แล้วทำการเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงทำการดูดสารละลายที่ได้ไปรวมกับสารละลายในจานเพาะเลี้ยงอันใหม่ จากนั้นสกัดโปรตีนในเจลอีกครั้งด้วย 50% acetonitrile

ใน 0.1% formic acid ปริมาตร 30 μl อีกครั้ง แล้วทำการเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงทำการดูดสารละลายที่ได้ไปรวมกับสารละลายในงานเพาะเลี้ยงอันใหม่อีกครั้ง ถ้าเจलयังไม่หดตัวให้ทำการสกัดอีกครั้งด้วย 70% acetonitrile ใน 0.1% formic acid ปริมาตร 50 μl

จากนั้นจึงนำสารละลายโปรตีนที่ได้ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศหรือใช้ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS ต่อไป

3.8 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS

โปรตีนที่ถูกย่อยด้วย trypsin จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS ซึ่งเป็นเครื่อง HPLC ที่ใช้ร่วมกับ MS-MS (tandem mass spectrometry) โดยโปรตีนตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จะถูกนำมาละลายใหม่ในสารละลาย 0.1% formic acid ปริมาตร 4 μl แล้วจึงถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS

โดยเครื่อง mass spectrometry จะใช้ SYNAPT HDMS system ส่วนเครื่อง UPLC จะใช้ nanoACQUITY UPLC system ซึ่งโปรตีนจะถูกแยกในคอลัมน์วิเคราะห์ RP ของเครื่อง UPLC ที่มี bridge ethyl hybrid (BEH) C18 material บรรจุอยู่ โดยเปปไทด์จะถูกชะด้วย 2% - 40% acetonitrile ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมงที่อัตราการไหล 350 nL/minute แล้วจึงทำความสะอาดคอลัมน์ด้วย 80% acetonitrile เป็นเวลา 15 นาทีก่อนจะเริ่มทำตัวอย่างต่อไป เปปไทด์ที่ออกจากระบบของ UPLC จะผ่านเข้าสู่ capillary tube แล้วถูกทำให้เป็นไอออนด้วยเทคนิค electrospray ionization (ESI) โดยจะมีการให้ค่าศักย์ไฟฟ้ากำลังสูง ทำให้เกิดสนามไฟฟ้าที่มีความแรงมาก ทำให้เกิดการสะสมของไอออนบวกบริเวณปลาย capillary tube แล้วเมื่อสารละลายผ่านออกจากปลาย capillary tube จึงมีลักษณะเป็นหยดของเหลวที่มีประจุอยู่ แล้วเมื่อมีการระเหยของสารละลาย จะทำให้หยดของเหลวมีขนาดเล็กลงประจุจะเข้าใกล้กันมากขึ้นและเกิดการแตกกระจายเป็นไอออน จากนั้นจะเข้าสู่ mass spectrometry ตัวแรกที่มีการวิเคราะห์มวลแบบ quadrupole ซึ่งจะใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าและคลื่นความถี่วิทยุช่วยในการแยกไอออนที่เราสนใจ โดยจะมีส่วนที่เชื่อมต่อเรียกว่า CID (collision induced dissociation region) ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้สารเกิดการแตกหัก (fragmentation) เป็นส่วนย่อยๆ โดยใช้แก๊ส argon เป็นตัวชน แล้วจะเข้าสู่ mass spectrometry ตัวที่ 2 ซึ่งมีการวิเคราะห์มวลแบบ time of flight (TOF) ซึ่งเมื่อมีการเร่งด้วยศักย์ไฟฟ้าแล้ว จะทำการวัดเวลาที่ไอออนวิ่งไปสู่ตัวตรวจวัด โดยไอออนที่มีมวลมากจะใช้เวลามากกว่าไอออนที่มีมวลน้อย

แล้วตัวตรวจวัดจะส่งข้อมูลต่อไปยังส่วนประมวลผล โดยจะใช้ MaxEnt 3 ซึ่งเป็นซอฟต์แวร์ที่อยู่ในโปรแกรม MassLynx 4.0 ที่แสดงผลออกมาเป็นกราฟที่เรียกว่า mass spectrum

3.9 การหาปริมาณและบอกชนิดของโปรตีน

การหาปริมาณของโปรตีนนั้นจะใช้โปรแกรม DeCyder MS (105-106) ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือส่วนของ PepDetect ใช้ในการตรวจหาเปปไทด์แบบอัตโนมัติและคำนวณปริมาณเปปไทด์ กับส่วนของ PepMatch ที่ใช้ในการเปรียบเทียบเปปไทด์ โดยใช้การคำนวณและเพิ่มความน่าเชื่อถือทางสถิติ จากนั้นข้อมูลทีวิเคราะห์แล้วจากโปรแกรม DeCyder MS จะนำไปค้นหาจากฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Mascot ของ Matrix Science (<http://www.matrixscience.com>)

การใช้โปรแกรม Mascot นั้น ต้องทำการเลือก MS/MS ion search ทำการตั้งค่าการค้นหา โดยเลือก taxonomy เป็น *Oryctolagus cuniculus*; เอนไซม์ เป็น trypsin; max miss cleavage เลือก 1; fixed modification เลือก carbamidomethyl (C); variable modification เลือก oxidation; peptide mass tolerance เลือก 1 Da; fragment mass tolerance เลือก 0.4 Da; peptide charge state เลือก 1+, 2+ and 3+; mass value เลือก monoisotopic; instrument เลือก ESI-QUAD-TOF โดยข้อมูลจะถูกค้นหาในฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อบอกชนิดของโปรตีน ซึ่งโปรตีนจะถือว่าเป็นโปรตีนที่ระบุจะต้องมีอย่างน้อย 1 เปปไทด์ ที่มี Mascot score สอดคล้องกับ $p < 0.05$

3.10 การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics analysis)

โปรตีนที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรมชีวสารสนเทศ (bioinformatics program) ต่างๆ โดยเริ่มจากการจำแนกหน้าที่, ความเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพ และการเป็นส่วนประกอบของเซลล์ด้วยโปรแกรม PANTHER (<http://pantherdb.org/>) แล้วจึงทำการแยกจำนวนโปรตีนที่เหมือนหรือแตกต่างกันในกลุ่มเซลล์ทดสอบเมื่อเทียบกับกลุ่ม control ในแต่ละช่วงเวลา ด้วยการใช้โปรแกรม Jvenn (<http://bioinfo.genotoul.fr/jvenn/index.html>) แล้วจึงทำการหาความสัมพันธ์ของโปรตีนที่พบทั้งหมดด้วยโปรแกรม STITCH 4.0 (<http://stitch.embl.de/>)

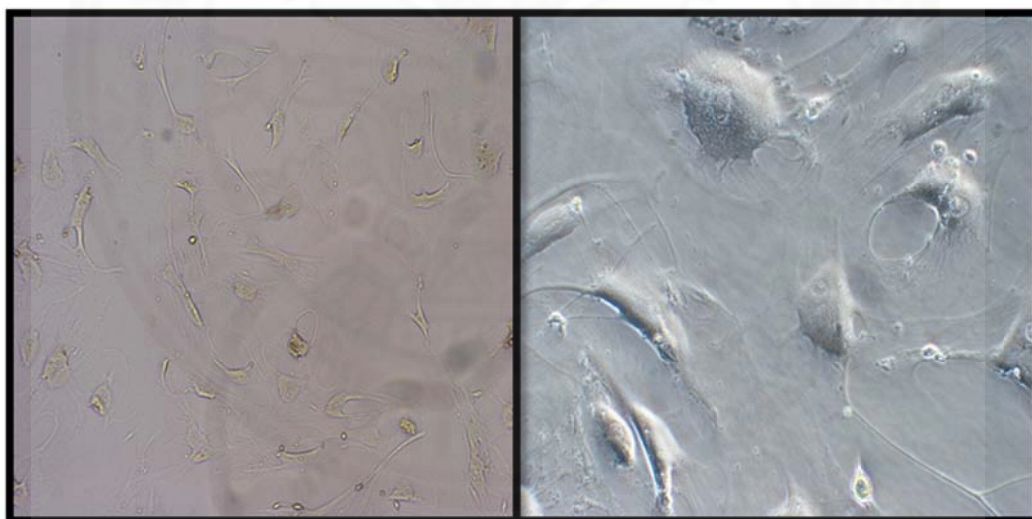
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการวิจัย

4.1.1 ผลการเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากทางเดินอาหาร

จากการเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ด้วย DMEM ที่มี 10% FBS และสารต้านจุลชีพที่จำเป็น ทำให้ได้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพ และมีความหนาแน่นของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่เรียงชิดติดกัน (confluence) ถึง 80% ซึ่งเหมาะแก่การนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 4.1 รูปภาพแสดงเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากทางเดินอาหารที่ได้จากการเพาะเลี้ยง โดยรูปซ้ายเป็นการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบปกติ ส่วนรูปขวาเป็นการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast

4.1.2 ผลการกระตุ้น PAR2 ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากทางเดินอาหาร

เซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจะถูกกระตุ้น PAR2 ที่อยู่บนผิวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ โดยใช้ peptide สำหรับกระตุ้น PAR2 ซึ่งก็คือ SLIGKV แล้วทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อเวลาผ่านไป 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ โดยทำแบบซ้ำ 3 ครั้ง ทำให้ได้ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ซึ่งมีปริมาณมากพอที่จะนำไปทดสอบในขั้นต่อไป โดยทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไว้ในรูปของการระเหิดแห้ง

4.1.3 ผลการตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Lowry

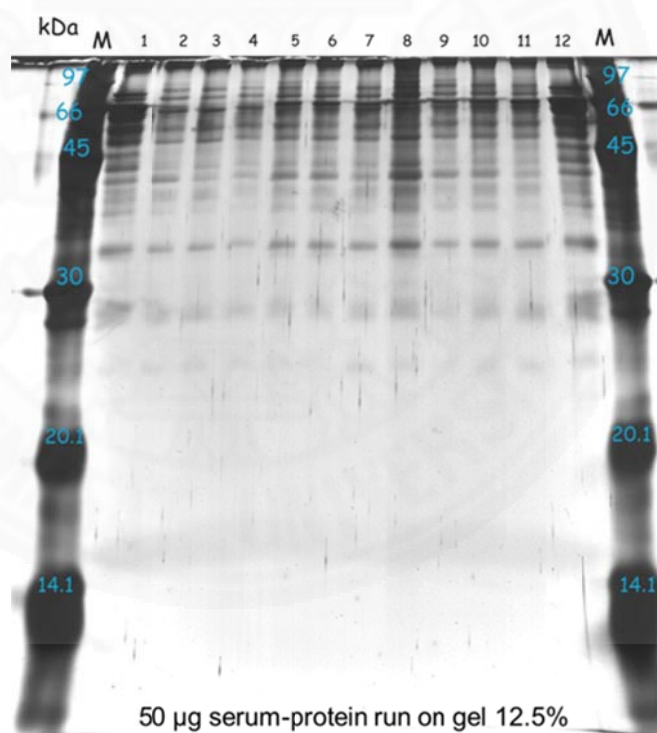
เมื่อนำตัวอย่างที่เก็บได้ทั้ง 12 ตัวอย่าง มาทำการวัดหาปริมาณโปรตีนจากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในแต่ละตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค.) จะทำให้ได้ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายตัวอย่างทั้ง 12 ตัวอย่างออกมา ซึ่งค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้มีค่าเพียงพอที่จะนำไปทำการแยกโปรตีนในขั้นตอนต่อไปได้ โดยความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละตัวอย่างจะได้ค่าตามที่แสดงไว้ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างทั้ง 12 ตัวอย่าง หลังจากที้นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

กลุ่ม control 48 ชั่วโมง	ความเข้มข้นของโปรตีน ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
ตัวอย่างที่ 1	5.213
ตัวอย่างที่ 2	10.676
ตัวอย่างที่ 3	5.502
กลุ่มเซลล์ทดสอบ 48 ชั่วโมง	ความเข้มข้นของโปรตีน ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
ตัวอย่างที่ 1	6.369
ตัวอย่างที่ 2	9.508
ตัวอย่างที่ 3	5.791
กลุ่ม control 72 ชั่วโมง	ความเข้มข้นของโปรตีน ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
ตัวอย่างที่ 1	5.271
ตัวอย่างที่ 2	6.543
ตัวอย่างที่ 3	7.179
กลุ่มเซลล์ทดสอบ 72 ชั่วโมง	ความเข้มข้นของโปรตีน ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
ตัวอย่างที่ 1	7.815
ตัวอย่างที่ 2	5.907
ตัวอย่างที่ 3	8.161

4.1.4 ผลการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการย้อมสีด้วยเงิน

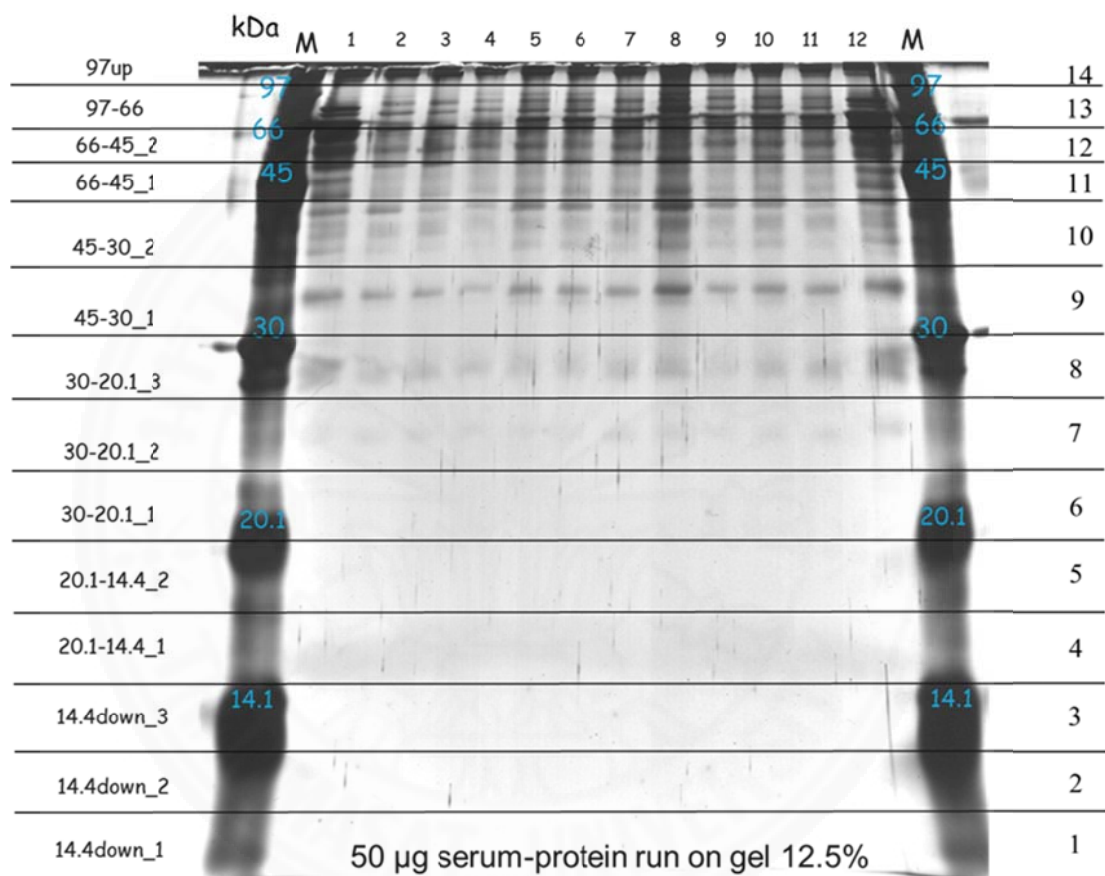
ในการทำ SDS-PAGE นั้น การรันตัวอย่างแต่ละตัวอย่างจำเป็นต้องปรับความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเท่ากันคือ 50 μg ทำให้มีการเปิดต้ปริมาณในแต่ละตัวอย่างแตกต่างกันไป (ภาคผนวก ง) ก่อนจะปรับปริมาตรให้เท่ากันด้วยน้ำกลั่น ซึ่งจากการรัน gel electrophoresis ทำให้สามารถแยกโปรตีนออกจากกันด้วยขนาดของโมเลกุล แล้วจึงนำไปย้อมสีด้วยเงิน ซึ่งจะเห็นได้ว่าแถบเจลในส่วนของเซลล์ที่กระตุ้น PAR2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีการแสดงออกของโปรตีนที่สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเทียบกับกลุ่มของ control 48 ชั่วโมงเหมือนกัน และพบว่าที่ 72 ชั่วโมงผ่านไปเซลล์ที่มีการกระตุ้นด้วย PAR2 จะมีการแสดงออกของโปรตีนที่สูงกว่ากลุ่มของ control 72 ชั่วโมงเล็กน้อย และเมื่อเทียบกันระหว่างที่เวลา 48 ชั่วโมงกับ 72 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าเมื่อเวลาผ่านไปจะพบว่าเซลล์ที่มีการกระตุ้นด้วย PAR2 จะมีการแสดงออกของโปรตีนลดลง ซึ่งเจลที่ได้นี้จะถูกนำไปตัดแบ่งเป็นส่วนๆ เพื่อย่อยในขั้นตอนต่อไป



รูปภาพที่ 4.2 รูปภาพแสดงเจลที่ได้จากการทำ SDS-PAGE และย้อมด้วยเงินแล้วเมื่อหมายเลข 1, 8, 12 คือ กลุ่มเซลล์ทดสอบ 48 ชั่วโมง 3 ตัวอย่าง, หมายเลข 5, 6, 7 คือ กลุ่ม control 48 ชั่วโมง 3 ตัวอย่าง, หมายเลข 2, 3, 4 คือกลุ่ม control 72 ชั่วโมง 3 ตัวอย่าง และหมายเลข 9, 10, 11 คือ กลุ่มเซลล์ทดสอบ 72 ชั่วโมง 3 ตัวอย่าง

4.1.5 ผลการย่อยโปรตีนภายในเจล

เจลที่ได้จากการรัน SDS-PAGE จะถูกนำไปแบ่งเป็นส่วนย่อยๆตามขนาดของมวลโมเลกุลโปรตีนของโปรตีนมาตรฐานจำนวน 14 ส่วน ทำให้ได้เจลที่ต้องตัดออกมา 168 ส่วนแล้วทำการตัดเจลออกเป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อนำไปทำการย่อยโปรตีนภายในเจลด้วย trypsin ก่อนจะทำการสกัดเอาโปรตีนที่ย่อยแล้วออกมาเพื่อนำไปเข้าเครื่อง LC-MS ต่อไป



รูปภาพที่ 4.3 รูปภาพแสดงการแบ่งเจลออกเป็นชิ้นๆ 14 ส่วนตามขนาดมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ก่อนที่จะทำการตัดเจลออกเป็นชิ้นเล็กๆ

4.1.6 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS

โปรตีนที่สกัดได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS ซึ่งเป็นการแยกสารด้วยเทคนิค UPLC โดยการใช้ acetonitrile ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวชะสารผ่านคอลัมน์ แล้วสารที่แยกได้จะเข้าสู่เครื่อง mass spectrometry โดยมีการทำให้สารกลายเป็นไอออนแล้วทำการวัดมวลด้วยเครื่องวิเคราะห์มวลแบบ quadrupole และ time of flight แล้วจึงประมวลผลออกมาเป็นข้อมูลดิบ โดยใช้โปรแกรม MaxEnt 3 ที่อยู่ใน MassLynx 4.0 ซึ่งมีการตั้งค่าตัวแปร (parameter) ได้แก่ Ensemble 1, Iterations 50 และ auto peak width determination จากนั้นจะมีการเปลี่ยนข้อมูลดิบที่ได้จาก LC-MS เพื่อตรวจหา peptide และปริมาณ ด้วยโปรแกรม DeCyder MS จากนั้นข้อมูลที่ได้จะถูกนำไปค้นหาชนิดของโปรตีนด้วยซอฟต์แวร์ Mascot ซึ่งจะเป็นการค้นหาในฐานข้อมูลของ NCBI โดยจะทำการตั้งค่าตัวแปรของซอฟต์แวร์ Mascot ได้แก่ taxonomy (*Oryctolagus cuniculus*); enzyme (trypsin); variable modifications (carbamidomethyl, oxidation of methionine residues); mass values (monoisotopic); protein mass (unrestricted); peptide mass tolerance (1 Da); fragment mass tolerance (± 0.4 Da), peptide charge state (1+, 2+ and 3+), max missed cleavages (1) and instrument = ESI-QUAD-TOF ซึ่งการบอกชนิดของโปรตีนจะต้องมีอย่างน้อย 1 peptide ที่มีค่า Mascot score สอดคล้องกับ $p < 0.05$ โดยข้อมูลชนิดของโปรตีนที่ได้จากการค้นหาพบว่ามีโปรตีนทั้งหมด 310 ชนิด (ภาคผนวก จ.) จากนั้นข้อมูลที่ได้กลุ่ม control 48 และ 72 ชั่วโมง กับข้อมูลกลุ่มเซลล์ทดสอบ 48 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งได้ทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละกลุ่ม เนื่องจากการทดลองเป็นการทำซ้ำ 3 ครั้ง ด้วยกระต่ายคนละตัว คนละเวลา แต่ใช้เซลล์ชนิดเดียวกัน ซึ่งกระต่ายแต่ละตัวอาจมีการแสดงออกต่อการกระตุ้นไม่เหมือนกัน ดังนั้นเราจึงทำการเลือกค่าของระดับโปรตีนแต่ละชนิดที่มีการแสดงออกสูงสุดในแต่ละกลุ่มแต่ละช่วงเวลา เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการวิเคราะห์ผลที่ได้จากการกระตุ้น PAR2 ด้วย SLIGKV ต่อไป (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ตารางแสดงโปรตีน 310 ชนิดที่ได้จากการตรวจวัดด้วยวิธี LC-MS พร้อมแสดงค่าระดับโปรตีนที่ได้ในแต่ละกลุ่มและแต่ละช่วงเวลา

Protein name	GI number	Peptide	ID score	Ctrl 48	Test 48	Ctrl 72	Test 72
1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-4	q 655723203	INGDK	6.76	5.47	0.00	0.00	0.00
2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	q 655871337	AAPSDSLPR	20.34	2.98	1.08	6.14	2.66
activating transcription factor 7-interacting protein 1	q 655830818	MEASFGSPSK	20.65	9.83	5.03	3.50	3.00
ADP-ribosylation factor-like protein 14	q 655853124	MGLLSSK	15.90	6.23	6.19	6.53	5.28
ADP-ribosylation factor-like protein 4D	q 655871534	EFVQSVPTK	20.58	2.14	3.48	3.69	3.58
aldose reductase (EC 1.1.1.21)	q 164757	AIADK	3.13	6.22	3.16	5.69	5.01
alpha-1 type V collagen	q 17864004	VTKFLXR	18.74	8.00	6.76	8.10	6.04
alpha-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1	q 291413419	APTTK	7.74	2.18	2.60	3.00	3.38
amine oxidase [flavin-containing] B	q 655875525	KFVGSGQVSR	16.69	0.68	0.00	6.71	3.15
AMP deaminase 2	q 655847632	DFYNIR	20.43	3.13	-0.28	4.59	4.42
amyloid-like protein 1	q 655889027	MGPASPAARGLGR	9.59	5.80	5.87	5.17	5.84
ankyrin repeat domain-containing protein 12	q 291394114	LRNRNCLELK	9.15	6.56	6.15	6.44	6.07
ankyrin repeat domain-containing protein 39	q 291386257	DLLAA	16.89	5.73	4.37	4.17	4.27
antigen KI-67	q 655723488	RQRTVPR	28.43	4.91	0.26	5.86	6.12
apoptosis-stimulating of p53 protein 2	q 655860022	ENGVNSPR	32.31	7.67	0.00	9.35	0.00
arylacetamidodeacetylase	q 291400011	INOHMPEESR	12.87	9.83	8.86	9.02	8.77
aspartylaminopeptidase	q 291392287	GPVIK	0.97	4.96	5.13	5.40	5.61
ataxin-1	q 291409238	ALSTGLDYSPPSAPR	3.74	5.39	5.59	4.90	4.51
atrial natriuretic peptide-converting enzyme	q 655604684	ASGAR	3.97	4.26	8.50	8.10	4.57
basic proline-rich protein	q 655883405	HVRGAAPRAK	5.25	3.37	0.00	5.21	4.75
beta-1,3-galactosyltransferase 6	q 655875818	HXEVR	11.97	6.61	4.05	7.75	3.97
brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1	q 655894091	AGAFC	5.76	0.00	2.63	3.19	3.88
brain-specific angiogenesis inhibitor 2	q 655880043	YLKSLR	25.44	7.23	6.56	8.51	7.10
breast cancer type 2 susceptibility protein	q 291408657	NASLISTLKK	14.61	4.35	3.00	2.27	2.11
bridging integrator 3	q 655890007	KFGSVFPSLNMAVK	18.91	9.83	7.90	9.40	8.83
BTB/POZ domain-containing protein 1	q 655893577	FTVNR	10.17	6.09	6.15	7.14	6.75
butyrophilin subfamily 3 member A2	q 655891687	DHVTR	8.52	7.62	6.29	6.66	6.28
butyrophilin-like protein 10	q 655898075	GAAGEREVAGR	8.02	8.82	8.35	8.35	8.55
calcium and integrin-binding protein 1	q 655884854	GGSGSR	1.48	3.63	5.72	1.61	5.57
calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	q 655851143	APPGV	10.83	0.00	4.25	4.19	0.00
CAP-Gly domain-containing linker protein 4	q 655617903	XGILK	0.05	5.03	2.97	6.90	2.38
catenin delta-1	q 655603842	TATPSDPR	31.89	2.44	3.03	1.06	2.98
CCR4-NOT transcription complex subunit 1	q 291390224	LKVGVDPK	20.20	5.09	0.00	6.31	4.91

ตารางที่ 4.2 (ต่อเนือง)

CCR4-NOT transcription complex subunit 3	q 655711400	SNRLDLQTR	17.46	4.19	4.59	6.07	5.38
centlein	q 291397378	AAKKK	8.34	2.25	0.00	5.09	5.14
centriole, cilia and spindle-associated protein	q 291413360	GPAEEDTEAR	9.56	4.16	2.86	5.39	5.06
centromere protein C	q 655857975	KAKGNMEK	7.33	0.00	5.77	0.00	0.00
centrosomal protein of 192 kDa	q 655835705	SGNSR	7.89	4.67	4.98	4.69	4.47
centrosomal protein of 290 kDa	q 655750513	ASGILTSEK	19.60	9.66	8.58	8.98	8.13
centrosomal protein of 83 kDa	q 291389735	TMDEK	4.82	0.00	-0.07	4.66	4.61
cerebral cavernous malformations 2 protein	q 655711134	GKKAFVSPiR	13.41	7.64	7.38	7.35	7.44
chaperonin Cct6	q 3201994	MAAVKTLNPKAEVAR	10.58	7.30	7.02	6.97	7.70
chordin	q 46394860	AAEGS	5.16	4.51	0.00	0.34	2.80
chromodomain-helicase-DNA-binding protein 9	q 655780334	AGGHK	6.67	0.00	2.35	6.19	0.00
coiled-coil domain-containing protein 168	q 655832875	GVLTk	8.15	0.00	2.89	1.43	3.31
collagen alpha-1(III) chain	q 291391890	KWWTDSGAEK	19.57	6.23	6.55	6.76	5.89
collagen alpha-1(VII) chain	q 655834367	GVDGDKGPR	20.09	4.35	0.00	0.00	0.00
complement component C1q receptor	q 291388940	AEAPLAMR	18.02	7.14	1.74	6.25	5.40
contactin-associated protein-like 2	q 655814994	NGVNR	6.00	4.96	5.76	6.67	6.14
cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 beta	q 291395831	SPPVR	7.80	5.28	0.44	0.00	2.39
cyclin-dependent kinase 13	q 655837714	QMGMTDDVSTVKAPR	17.37	8.54	7.95	8.76	9.23
cyclin-dependent kinase-like 3	q 291387332	MLKKDSKR	10.79	6.37	7.35	6.34	5.84
cyclooxygenase-2	q 2109297	VAKASIDQSR	9.42	2.84	0.00	0.00	2.96
cytochrome P450 2B5	q 655889591	TSSWRHR	18.49	3.80	4.08	4.01	1.72
cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme	q 299843	GLPSR	12.35	0.00	0.00	6.24	6.40
cytosolic carboxypeptidase-like protein 5	q 655619153	RLAEG	5.79	5.20	4.50	4.76	4.32
DDB1- and CUL4-associated factor 5	q 655872951	AGTSHK	4.56	0.00	6.39	3.76	0.00
dehydrogenase/reductase SDR family member 9	q 291391688	TFDEK	2.16	0.00	3.47	3.19	5.33
deleted in malignant brain tumors 1 protein	q 655868343	YTRIPSR	13.11	5.91	4.80	6.70	6.65
deoxyguanosine kinase, mitochondrial	q 291386516	MAAGR	6.55	7.91	0.00	6.93	0.00
deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 1	q 291409939	ATGGK	3.61	3.18	1.00	2.78	5.44
dermatan-sulfate epimerase-like protein	q 291394469	VDGGK	1.19	9.06	8.68	9.36	8.51
dihydropyrimidinase-related protein 2	q 655886401	KSLVTSLR	25.43	0.00	0.42	6.68	0.00
disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 33	q 655720327	APPSR	2.24	2.04	2.08	0.00	0.00
disks large homolog 5	q 655865971	EMLVNEAPGK	16.05	7.01	7.63	8.44	7.55
DNA replication licensing factor MCM4	q 291387933	GTPVR	8.65	0.00	0.00	5.62	6.64
DNA replication licensing factor MCM5	q 291389916	AGITTTLSNR	17.29	6.28	8.31	8.17	5.55
DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1	q 291386401	HMMGK	19.45	0.00	0.00	1.42	5.50

ตารางที่ 4.2 (ต่อเนือง)

dnaJ homolog subfamily B member 2	q 655829566	AGTQGGARGDAAER	13.91	3.36	0.99	3.17	3.20
Down syndrome cell adhesion molecule-like protein 1	q 291383807	MGGSR	2.41	5.21	5.02	5.44	3.92
dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 5	q 291402789	NQOQPP	17.15	9.11	2.27	1.63	10.98
dystroglycan	q 1546	APITR	6.01	4.98	0.00	5.05	2.30
E3 SUMO-protein ligase EGR2	q 655866541	NGVAGDGMINIDMTGEK	10.51	2.77	4.44	5.83	2.16
E3 ubiquitin-protein ligase UBR2	q 291396211	SGGDK	0.36	3.24	3.39	6.82	3.18
echinoderm microtubule-associated protein-like 3	q 655882065	VASGQTAGVDK	21.22	8.80	1.33	2.87	4.37
echinoderm microtubule-associated protein-like 6	q 655608491	GPEVSGIWPK	16.71	0.00	0.00	3.10	0.00
ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 2	q 655877894	DMEEAKEK	18.09	5.89	4.85	7.20	7.99
etoposide-induced protein 2.4 homolog	q 655601210	ATAGH	6.42	2.36	0.00	3.87	4.84
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	q 655899077	DRLSQSK	16.31	7.28	4.71	6.02	7.60
exocyst complex component 3	q 291413979	KALETDKK	21.77	7.50	6.77	6.90	8.29
FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 2	q 655896959	ALTADLPR	36.24	10.23	7.41	9.05	9.45
flap endonuclease GEN homolog 1	q 291387124	VDTEASK	7.95	5.63	6.94	7.51	7.07
forkhead-associated domain-containing protein 1	q 655889711	LYLDMSK	11.27	2.30	6.57	6.32	3.03
galanin receptor type 2	q 655893211	DTLGAAASWR	8.40	6.23	6.17	6.69	6.02
gamma-aminobutyric acid receptor subunit gamma-1	q 291385730	GKVLAR	16.45	5.74	7.72	5.38	0.00
gamma-aminobutyric acid receptor subunit rho-2	q 655842396	VFPDGHVLYSMR	18.62	4.81	6.16	5.98	5.38
glycine receptor subunit alpha-2	q 655874782	GRTSGYDAR	7.74	7.06	0.00	0.00	0.00
golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	q 655599774	KMGVGK	19.33	1.55	0.95	2.42	7.25
golgin subfamily A member 2	q 655883143	SEETR	4.97	5.90	7.48	8.42	6.96
golgin subfamily A member 7B	q 291404595	GLLLTDPVERGMR	13.04	5.68	5.58	5.87	5.80
hemicentin-1	q 655861395	EAQISDTGR	12.46	5.55	5.23	7.08	7.61
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	q 655857504	GAAAGGRGGTR	11.65	7.05	6.32	0.00	0.00
hexokinase-1	q 655866353	GELSS	2.96	4.02	3.68	3.48	2.81
histone H2AX	q 291412992	APSGGK	9.97	6.56	4.10	6.25	4.58
HMG box transcription factor BBX	q 291400739	KKSKMDR	10.34	7.38	7.09	7.21	6.73
homeobox A2	q 217418305	RVEIAALLDLTER	10.46	5.56	0.00	4.66	4.72
hyccin	q 291394527	QGHSK	2.51	2.14	0.00	6.25	0.24
immunoglobulin heavy chain	q 2407675	MTGWISGAR	19.82	5.12	4.89	4.77	5.05
initiation factor 4-gamma	q 404775	GGPGGELPR	28.09	6.47	0.60	0.00	5.22
integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C	q 655896440	GDVISVEK	36.79	6.97	6.48	7.78	6.99
inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain3	q 11041718	AVSQGKTAGLVK	10.15	4.70	0.47	-0.16	2.57
interleukin-17 receptor E	q 655890253	VASDASGLQR	9.23	5.42	7.06	8.24	7.19
interleukin-25	q 291403577	ASEDGPLNSR	23.35	1.39	4.05	5.43	0.00

ตารางที่ 4.2 (ต่อเนือง)

junctophilin-3	q 655895734	LGARAEPR	24.40	1.41	4.43	9.20	1.80
kalirin	q 291400523	ETSER	13.77	0.49	4.32	5.58	4.51
KAT8 regulatory NSL complex subunit 3	q 655605830	IPTLIDR	23.16	5.81	7.04	7.38	6.30
keratinocyte proline-rich protein	q 655720360	VGGPR	10.06	3.53	5.53	3.99	6.75
kin of IRRE-like protein 1	q 655845986	AIVPR	9.04	2.64	1.80	3.90	4.31
kin of IRRE-like protein 3	q 655601124	AIPGGK	4.02	0.00	0.00	3.98	0.00
kinesin-like protein KIF18B	q 655872885	LOAEVAALR	12.54	4.18	1.13	4.18	3.85
kinesin-like protein KIF21A	q 655830923	AGAQQKLRIIPVAR	13.65	7.78	7.78	7.95	6.26
kinesin-like protein KIF3B	q 655710947	EKDAAEMLGAK	11.39	7.93	7.67	7.68	7.73
laminin subunit beta-1	q 655826280	QRADEAKQNAOGVLLK	12.68	8.47	7.96	8.32	8.53
leiomodin-3	q 655835440	ISKLDPKK	14.53	6.59	4.19	0.00	0.00
leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT3	q 291389008	GLMCQAPEK	14.95	6.86	6.83	7.55	7.57
leucine-rich repeat-containing protein 16A	q 655839935	EFIFV	19.68	7.35	0.00	0.00	0.00
leucine-rich repeat-containing protein 42	q 655849337	TPMAAEPR	31.16	4.08	5.19	2.07	5.81
leucine-rich repeat-containing protein 47	q 655903044	ADGER	1.15	0.00	5.03	0.00	3.51
leucine-rich repeat-containing protein 7	q 655848837	ASMTK	2.05	2.67	0.00	3.49	0.00
leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	q 655648141	VDFLKK	10.23	5.41	4.84	5.50	5.40
leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 3	q 655896719	TRDGAGR	3.78	5.55	5.65	5.59	3.55
limbin	q 655894138	ATRAAAVDR	14.14	3.59	-0.35	7.79	2.17
lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	q 655856289	LLASKSEGIR	18.46	6.78	7.05	5.81	5.62
liver carboxylesterase 2	q 655789062	MVGANDK	8.27	5.43	5.94	5.57	6.07
low-density lipoprotein receptor-related protein 2	q 655827806	DNVPNLR	28.39	0.50	0.00	7.12	0.00
low-density lipoprotein receptor-related protein 6	q 291392624	QAVVK	10.95	4.76	0.00	5.85	7.11
lysine-specific demethylase 4A	q 291399081	MTLISPLMLK	21.53	3.83	4.07	3.81	2.72
lysine-specific demethylase 5A	q 291392891	ATAAK	3.55	0.00	5.66	5.49	3.76
lysine--tRNA ligase	q 291390507	ASGGK	3.13	1.51	3.03	1.32	2.70
macrophage mannose receptor 1	q 291402242	DAPSK	7.80	3.91	3.42	5.57	3.34
major facilitator superfamily domain-containing protein 4	q 291402529	EDASSLPR	13.42	9.19	6.41	8.58	8.42
MAP7 domain-containing protein 2	q 291407180	HAGGK	5.22	0.00	0.00	3.69	3.72
melanoma-associated antigen 10	q 655883975	EMATGCAR	17.41	6.51	6.37	8.21	7.20
melanoma-associated antigen B1	q 655875299	AGSSQVSLR	10.23	6.57	3.69	4.97	0.32
metabotropic glutamate receptor 6	q 30526186	RLMETPNAR	17.25	8.53	8.93	7.93	8.46
metal transporter CNNM2	q 291404753	MIVGEEKK	17.67	7.21	5.64	3.91	6.26
methylcytosine dioxygenase TET3	q 655606222	GDEGR	1.48	5.14	2.89	1.98	4.26
methyltransferase-like protein 23	q 655893113	AEGPG	16.84	0.68	0.00	0.00	3.90

ตารางที่ 4.2 (ต่อเนือง)

microsomal glutathione S-transferase 2	gi 655856627	GLGNYFGFQVGRAR	15.95	5.55	6.10	5.88	6.41
microtubule-associated tumor suppressor candidate 2	gi 655884556	RFEALR	23.10	9.45	9.64	10.05	9.73
minor histocompatibility antigen H13	gi 291388754	FFPANFPNR	8.94	3.47	0.00	0.00	3.52
mirror-image polydactyly gene 1 protein	gi 655864527	ATEAK	6.30	4.56	3.72	3.67	4.30
mitogen-activated protein kinase-binding protein 1	gi 655863134	LFSGVANAR	21.28	3.98	0.79	-0.33	2.73
multidrug resistance-associated protein 2	gi 1430907	RLDSVTR	29.06	7.59	6.76	7.04	7.85
mutS protein homolog 5	gi 655840208	AAVLSR	17.01	3.58	2.43	2.37	3.04
N-acetylglutamate synthase, mitochondrial	gi 655872057	GTGGSR	6.38	6.48	5.12	6.64	2.84
N-acetyllactosaminide beta-1,6-N-acetylglucosaminyl-transferase	gi 655839615	PSSVR	11.74	3.39	1.96	1.23	1.96
NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 9	gi 655895677	MKGVAL	17.60	2.54	0.98	6.21	1.23
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	gi 655884340	EAGGVXGDCLRK	13.65	6.15	4.94	4.64	3.99
nance-Horan syndrome protein	gi 655874963	DSGDMSVR	8.54	5.41	0.00	0.00	0.00
nebulin	gi 655827380	YKLDHEK	23.58	8.30	7.68	7.57	7.99
neurogenic locus notch homolog protein 3	gi 655892589	APEGGGGR	19.16	5.25	3.38	5.36	0.00
neurotrypsin	gi 655856668	SVTKL	3.43	5.36	0.00	0.00	0.00
nucleoporin GLE1	gi 291413511	PSEGR	7.04	3.71	3.03	2.03	0.00
nucleus accumbens-associated protein 2-like	gi 655902835	SCVLIR	20.27	5.17	4.60	5.48	5.01
olfactory receptor 4F3/4F16/4F29	gi 655864757	KMKVAMQRLVSK	19.74	6.67	8.30	10.02	7.68
olfactory receptor 6C3	gi 291389342	NOQVKQAFK	16.28	0.00	3.82	0.47	0.00
olfactory receptor 6N1	gi 291397687	TGILG	10.85	0.00	5.21	4.85	0.00
orphan sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter	gi 655899530	QTALPAVTSMLK	15.40	8.04	7.80	8.23	8.06
partitioning defective 3 homolog	gi 655883082	OYSSLPR	18.36	8.92	8.24	9.06	6.61
PDZ domain-containing protein 8	gi 291404885	DTALTR	3.50	5.81	2.91	6.30	4.13
PH and SEC7 domain-containing protein 1	gi 655867639	HGSEPR	4.30	3.44	4.54	6.42	3.84
PHD finger protein 3	gi 655841954	MMGPLSQASR	15.39	0.00	4.09	8.70	0.00
phenylalanine--tRNA ligase, mitochondrial	gi 291409403	TIGGDLVEK	15.76	2.01	5.35	3.35	0.03
phenylethanolamine N-methyltransferase	gi 291405952	TAVGV	15.43	1.11	4.92	3.45	2.18
phosphatidate phosphatase LPIN2	gi 291394157	LSSDQIAKLK	20.95	7.69	6.81	7.85	7.18
phospholipase D2	gi 655869014	EMPSLPR	20.33	6.10	5.11	6.24	4.93
pleckstrin homology domain-containing family A member 7	gi 655884287	MSSEERR	14.60	6.48	5.80	6.83	6.67
pleckstrin homology domain-containing family G member 4B	gi 655894709	RADLDGPR	21.11	4.94	1.43	9.02	0.00
pleckstrin homology domain-containing family G member 5	gi 655851909	EPAGSSGKSHR	8.31	3.96	3.62	5.60	1.48
pleckstrin homology domain-containing family H member 1	gi 655872988	APGTPR	8.32	4.94	0.00	7.57	7.17
plexin-B3	gi 655891459	QVTLVPR	26.43	9.22	7.58	7.50	9.84
polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11	gi 655844906	MMGSVTVR	12.19	0.00	7.33	0.00	5.34

ตารางที่ 4.2 (ต่อเนือง)

potassium voltage-gated channel subfamily G member 2-like	gi 655897432	LRCCAPVR	17.62	5.28	0.00	5.74	0.00
prefoldin subunit 6	gi 291396025	DLSKSMSGROK	14.37	7.84	7.78	6.87	7.01
pre-mRNA cleavage complex 2 protein Pcf11	gi 291384167	DGPTK	8.81	4.24	4.22	6.04	2.46
pre-rRNA processing protein FTSJ3	gi 291406359	GVGRK	1.51	1.11	0.00	1.16	3.38
probable ATP-dependent RNA helicase DDX60	gi 655601761	IASKK	4.50	3.64	0.00	6.36	0.00
proline-rich transmembrane protein 3	gi 291412466	GPHGGPGLSR	11.46	0.00	0.00	0.00	5.99
prosaposin	gi 655866264	VAPVK	0.97	7.65	7.33	7.48	7.38
protein ERGIC-53	gi 291394426	MAGSR	4.14	0.00	2.76	0.00	5.73
protein FAM24A	gi 655891237	LSSSYDFAR	20.85	3.75	2.52	6.09	0.00
protein FAM3B	gi 655897876	SIGEKPVLRAPTPK	16.86	8.34	7.95	8.67	8.97
protein FAM60A	gi 291392455	AGPSLKTTLKPKK	19.21	6.37	4.33	7.64	6.93
protein KIBRA	gi 291387788	SMSSLSPR	12.87	4.64	2.88	5.53	5.07
protein lin-52 homolog	gi 655873628	EMTRGK	5.55	5.85	5.53	5.83	5.19
protein lin-9 homolog	gi 655861075	EMNTEAEKLK	11.16	5.68	5.78	5.96	6.04
protein salvador homolog 1	gi 291403842	LSAPSYLAR	10.87	6.39	7.79	8.09	6.88
protein SET	gi 655605517	SAPAAK	2.67	2.06	0.34	5.12	2.22
protein SFI1 homolog	gi 655873986	AVLHRALR	16.88	6.37	5.84	5.34	6.19
protein SZT2 isoform X1	gi 655850007	SPLDMASGR	20.49	9.09	8.62	8.91	8.81
protein unc-80 homolog	gi 291392147	ATISGCHR	17.89	8.67	8.89	8.09	4.18
protein YIPF2	gi 291414140	ATATS	7.16	3.63	3.85	0.00	1.97
putative calcium influx channel TRPC1A	gi 5759114	QCKMFAK	8.24	5.91	4.94	8.07	4.94
putative helicase MOV-10	gi 655847377	MKPGSEISK	13.64	2.78	0.00	3.98	3.19
pyruvate kinase PKLR	gi 291397825	AALGPK	3.71	0.00	4.60	4.48	3.37
rab5 GDP/GTP exchange factor	gi 291412103	GNPPR	0.20	2.59	3.33	4.22	4.62
RAC-gamma serine/threonine-protein kinase	gi 291402088	LFELILMEDIK	14.19	5.88	6.23	5.58	6.90
ralGTPase-activating protein subunit alpha-1	gi 655864858	ATMLTDK	14.07	1.57	0.00	7.32	0.91
rap guanine nucleotide exchange factor 2	gi 655879031	SSF GK	1.74	0.00	7.11	6.18	0.00
ras-related protein Rab-4A	gi 655892959	RDLDAER	24.19	2.78	7.50	6.69	1.48
ras-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	gi 655838005	KEGER	13.35	5.35	5.86	5.42	5.85
regulator of G-protein signaling 3	gi 291408507	AGGSR	10.70	4.27	0.00	0.00	2.82
remodeling and spacing factor 1	gi 291384198	AAAAR	6.21	4.31	2.92	3.26	4.81
retinal-specific ATP-binding cassette transporter	gi 655850611	GNGFAGEGKGVA	7.86	4.61	1.89	5.49	0.00
rho guanine nucleotide exchange factor 11 isoform X1	gi 655846044	MIHEGPLTWR	10.78	6.08	4.87	4.88	4.22
rho guanine nucleotide exchange factor 11 isoform X2	gi 655846047	SSNSK	6.53	4.73	3.43	4.27	4.40
rho guanine nucleotide exchange factor 17	gi 655603065	LADVLSR	35.23	8.42	10.73	8.14	5.74

ตารางที่ 4.2 (ต่อเนือง)

rho guanine nucleotide exchange factor 37	gi 291387609	GNSSR	6.82	10.25	10.60	9.79	10.16
rhomboid domain-containing protein 3	gi 291409850	GPGPP	4.86	0.00	3.42	0.00	4.75
RING finger protein 17	gi 655832053	MMNEIQK	21.46	0.00	5.52	3.79	1.12
scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130	gi 655831460	QLGCGSALK	14.25	1.47	0.00	1.63	8.08
scm-like with four MBT domains protein 1	gi 291393845	HVDTR	10.15	5.18	5.61	6.39	5.72
scm-like with four MBT domains protein 2	gi 655858862	AVVKIVR	6.50	4.70	5.46	5.92	6.62
secreted frizzled-related protein 2	gi 12964790	QGGELVITSVK	2.07	2.54	1.36	2.79	5.18
semaphorin-3B	gi 291393721	SAAHW	2.16	5.92	6.86	7.16	5.12
semaphorin-3E	gi 655837884	VTAPSDDR	18.41	2.50	3.44	6.29	2.92
semaphorin-3F	gi 655834600	TMTISSK	8.38	0.96	3.01	6.32	2.66
serine/arginine repetitive matrix protein 1	gi 655600452	AAPNPSPPR	9.30	6.46	6.53	6.84	7.07
serine/threonine-protein kinase TAO2	gi 655810364	PAGGR	14.93	7.05	7.19	6.80	7.61
serine/threonine-protein kinase VRK2	gi 291386755	DPVAVQAK	17.55	5.42	3.49	2.10	4.60
serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta	gi 655601668	AAKGPAALSAACR	4.26	7.34	5.03	7.81	5.73
serine-protein kinase ATM	gi 655601741	AADIR	2.86	3.66	2.20	7.08	3.98
serum albumin precursor	gi 29653363	IVTDLTK	33.55	8.02	6.83	7.57	7.32
SH3 domain-containing protein 19	gi 655856254	TRPVPGWTAARR	16.84	7.36	6.47	7.47	7.55
SH3-containing GRB2-like protein 3-interacting protein 1	gi 655848931	CEPASTDLR	12.77	8.04	7.50	6.88	7.10
skeletal muscle myosin heavy chain MyHC-EO/III	gi 12003423	LVTLMTR	22.65	4.15	4.63	6.13	4.73
SLC2A4 regulator	gi 655850626	AVEASLPR	40.16	8.35	8.39	8.02	9.55
small G protein signaling modulator 3	gi 655884470	TMPSNACFASVDSIGVPLR	12.95	5.27	4.88	4.82	5.60
small nuclear ribonucleoprotein G	gi 291386619	GNSIIMLEALER	17.42	8.06	7.34	7.68	7.28
smoothelin	gi 291406856	SLSVLSPR	29.94	4.80	3.49	5.96	3.21
sodium channel alpha-subunit	gi 1022714	QVSNR	7.19	6.78	6.02	5.84	5.90
sodium/hydrogen exchanger 9B1	gi 655857006	ATVQG	3.89	5.46	3.03	5.43	0.00
sodium-dependent serotonin transporter	gi 291405441	GVAGDK	5.31	6.21	3.90	5.42	2.38
sodium-glucose cotransporter-like protein	gi 473969	FGGSR	10.30	0.00	4.16	2.16	0.00
specifically androgen-regulated gene protein	gi 655860517	SGSYSLPR	18.03	5.42	6.31	5.68	6.23
sterile alpha motif domain-containing protein 9	gi 655837551	LVKLLIGNR	15.24	4.68	4.56	4.57	1.68
stromal membrane-associated protein 2	gi 291399174	MTGKSVK	12.61	5.44	5.90	5.85	6.15
structural maintenance of chromosomes protein 3	gi 291404811	AATGK	14.83	4.11	5.98	5.13	5.42
synapsin-1	gi 655898109	MFGSTEMR	15.88	6.07	5.64	6.25	5.58
synemin	gi 655886501	RSPGPGSPDR	10.10	4.29	3.01	2.37	2.16
synergin gamma	gi 655870155	DKAFPAAFPPTGAIPOK	14.27	8.49	7.79	7.43	8.61
TATA-binding protein-associated factor 172	gi 655866957	DAVETNEK	8.53	6.02	3.78	6.07	4.93

ตารางที่ 4.2 (ต่อเนือง)

T-cell surface glycoprotein CD3 delta chain	gij655891880	RILDPIXGKYSCETAGDSAKK	3.55	7.10	6.92	7.59	8.17
tetratricopeptide repeat protein 28	gij655882780	DGTSSLPR	15.93	7.55	6.29	4.44	5.27
thrombin	gij165741	ENLDRDIALMK	14.91	2.50	0.00	2.76	2.83
titin	gij1208922	NAVGVSLPR	31.27	6.42	5.19	5.78	6.87
toll-like receptor 12	gij291408842	LPPALR	13.23	8.13	0.00	0.00	0.00
toll-like receptor 2	gij21429694	AAIKS	5.16	2.08	3.18	1.93	0.00
TOX high mobility group box family member 3	gij655780330	AIGEK	6.11	0.12	3.85	5.58	2.52
transcription factor 15	gij291388780	RAGGAGSVVVVR	13.58	3.18	0.00	5.03	0.00
transcription factor E2F5	gij655680006	LGGAGGGGSSR	27.27	0.00	0.00	0.11	5.76
transcription factor TFIIIB component B" homolog	gij655882478	EEIGLVEK	14.69	1.48	0.00	5.04	8.18
transcription termination factor 1	gij291411432	AAPGSK	7.40	3.79	3.89	7.04	3.97
transcriptional regulator ATRX	gij655606321	AGNIK	4.77	4.49	3.96	3.70	5.19
transient receptor potential cation channel subfamily M member 3	gij291383356	NSGLK	9.10	1.62	2.55	7.70	2.28
transmembrane protease serine 11D	gij291401731	NNAAK	10.52	3.33	0.00	4.35	4.23
transmembrane protein 119	gij291411783	AGGPR	1.35	3.13	4.93	0.00	7.30
transmembrane protein 132A	gij291385429	AAAAPR	1.03	0.00	0.00	5.68	5.36
trichohyalin	gij655889995	LLSSXPPPPTQVPR	15.00	7.49	6.91	7.61	7.66
trinucleotide repeat-containing gene 6C protein	gij655898982	OQEQKQLLK	32.41	0.00	9.97	9.87	7.43
tripartite motif-containing protein 2	gij655856112	IGSGKLMGPK	19.25	5.70	5.59	5.21	5.61
tripartite motif-containing protein 46	gij655846344	AGAIK	8.98	4.60	0.93	0.28	3.56
tumor protein D55	gij291383266	LGDVKKSATFR	18.92	0.00	7.76	7.57	5.57
twinfilin-1	gij655830076	QKMLYAATRATLK	9.34	7.53	7.33	7.11	7.47
tyrosine-protein kinase Lyn	gij291387985	DAWEIPR	21.63	4.38	3.89	4.03	5.16
tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	gij655891867	GVVMLNR	17.32	0.00	6.13	3.05	2.75
U8 snoRNA-decapping enzyme	gij291399631	AGSGK	0.70	4.14	3.18	4.25	6.01
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 28	gij655601547	VSVYLLTGLELYQK	9.10	8.37	7.90	8.81	8.60
ubiquitin-conjugating enzyme E2 G1	gij655869905	RKVARCVR	17.36	0.00	2.21	4.97	0.00
UBX domain-containing protein 10	gij291399368	TRPSLPR	37.95	2.56	4.01	5.64	4.98
UHRF1-binding protein 1	gij655753330	AGIIK	8.58	4.94	4.70	6.29	6.95
uncharacterized protein C12orf60 homolog	gij655830776	MSSELEKDKER	13.86	2.58	1.22	3.20	0.27
uncharacterized protein C19orf47 homolog	gij655895122	SMLLDLNR	14.92	6.65	6.04	6.35	5.35
uncharacterized protein C6orf222 homolog	gij655842561	KPSSEAPR	27.58	0.00	0.00	6.91	0.00
uncharacterized protein ENSP00000372125	gij291392661	AAESLRLR	14.63	0.00	9.21	9.35	6.62
uncharacterized protein KIAA0947 homolog	gij655894030	AAPVAK	4.80	7.66	4.47	3.53	1.62
uncharacterized protein KIAA1107 homolog	gij655848167	KIVKSGLSQK	13.62	10.55	9.29	9.70	9.45

ตารางที่ 4.2 (ต่อเนือง)

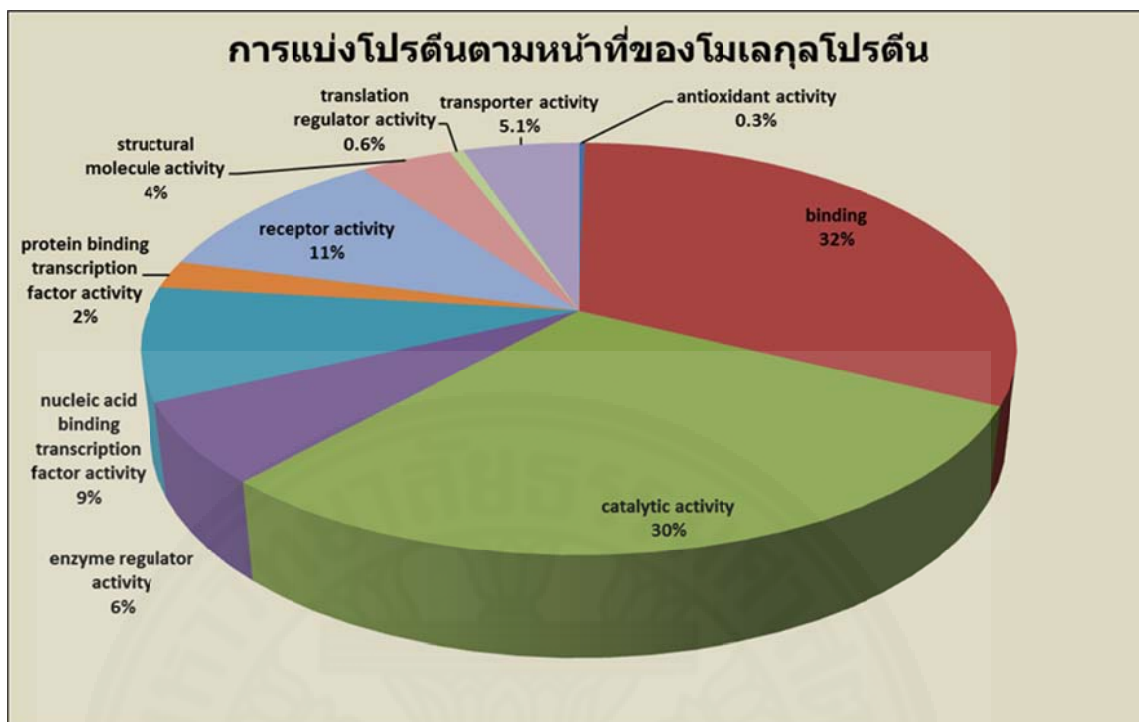
uncharacterized protein LOC100347513	q 655861020	TLDXEEGGPR	13.93	6.52	6.17	6.27	6.44
uncharacterized protein LOC103344996	q 655886103	MAARGRSGLGLGR	17.72	4.66	5.59	7.03	6.42
uncharacterized protein LOC103346189	q 655896195	KAGSGGAGAGAAVFRFR	26.90	4.65	4.80	5.97	5.57
uncharacterized protein LOC103347125	q 655901384	DGVSLGLSR	17.20	0.00	5.49	1.75	2.05
uncharacterized protein LOC103351904	q 655876906	GTAVISVTAHPGEK	40.55	4.70	4.67	5.96	5.43
uncharacterized protein LOC103352183	q 655880925	LXTHSGPECGLTKK	20.87	5.41	5.61	6.07	5.17
unconventional myosin-XVIIIa	q 291405461	QTHSKEMESR	20.76	7.59	7.27	7.21	7.40
UPF0420 protein C16orf58 homolog	q 291410995	ATVSAATATWLVK	14.51	2.59	0.00	1.35	0.00
UPF0602 protein C4orf47 homolog	q 291385999	GISGK	11.43	3.58	5.88	5.93	4.14
usherin	q 655860261	GVIEK	2.98	4.38	0.00	3.81	2.67
verprolin	q 655868841	CEALSPR	23.42	1.75	6.16	6.01	4.06
vitelline membrane outer layer protein 1 homolog	q 291405209	GNAER	1.58	3.08	0.00	0.00	0.00
vomeronasal type-2 receptor 116	q 655895465	MATAANGNGTQIK	24.56	7.26	6.45	7.75	8.84
V-set and immunoglobulin domain-containing protein 10-like	q 655899394	SLNLTVADLPR	15.17	4.31	5.58	6.49	4.42
WD repeat and HMG-box DNA-binding protein 1	q 291403904	EQQELLMKMLALSCK	17.24	6.36	6.20	6.49	6.78
WD repeat domain-containing protein 83	q 291415821	GHAGK	1.39	0.00	3.85	3.04	0.00
YTH domain-containing protein 1	q 655857955	LSSSVRAVRK	7.09	5.71	3.61	7.45	6.34
zinc finger and BTB domain-containing protein 11	q 291400760	HGLKLHOSLHOSQK	13.68	7.05	6.45	7.89	8.99
zinc finger FYVE domain-containing protein 1	q 291406824	AVPSR	5.44	6.92	1.57	2.02	3.31
zinc finger homeobox protein 3	q 655795593	TMELSPR	16.89	6.68	6.65	6.25	6.64
zinc finger MYND domain-containing protein 15	q 291405203	AGA EK	4.54	6.84	6.60	7.21	7.51
zinc finger protein 18	q 655868583	GMFGDEEPGR	14.82	7.29	0.43	1.05	3.04
zinc finger protein 214	q 655602660	GFSKSSK	7.10	6.24	5.79	5.97	5.80
zinc finger protein 268	q 655894252	SNLTDHOR	7.63	4.85	0.92	2.08	0.00
zinc finger protein 416	q 291411343	HCSAKDSL R	14.09	2.10	0.93	2.55	2.51
zinc finger protein 462	q 655600422	ARIK	9.11	3.86	5.93	6.86	5.23
zinc finger protein 574	q 291412129	ATPTK	8.03	0.00	1.25	0.00	1.76
zinc finger protein 658	q 655894510	TATPK	4.39	7.45	1.24	0.87	2.05
zinc finger protein 717	q 655835533	IHTGGKPHGCNK	13.41	7.01	8.93	10.65	9.47
zinc finger SWIM domain-containing protein 8	q 291404146	KIPLGPSEMSTM R	13.27	7.06	6.96	6.74	7.15
zinc finger X-chromosomal protein	q 291407237	EVGLP	3.41	3.31	5.97	6.56	5.52
zymogen granule membrane protein 16	q 655898136	PGGGK	2.32	5.99	6.44	5.16	2.64

หมายเหตุ ค่าที่ได้จากตารางเป็นค่า log ฐาน 2

4.1.7 ผลการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics analysis)

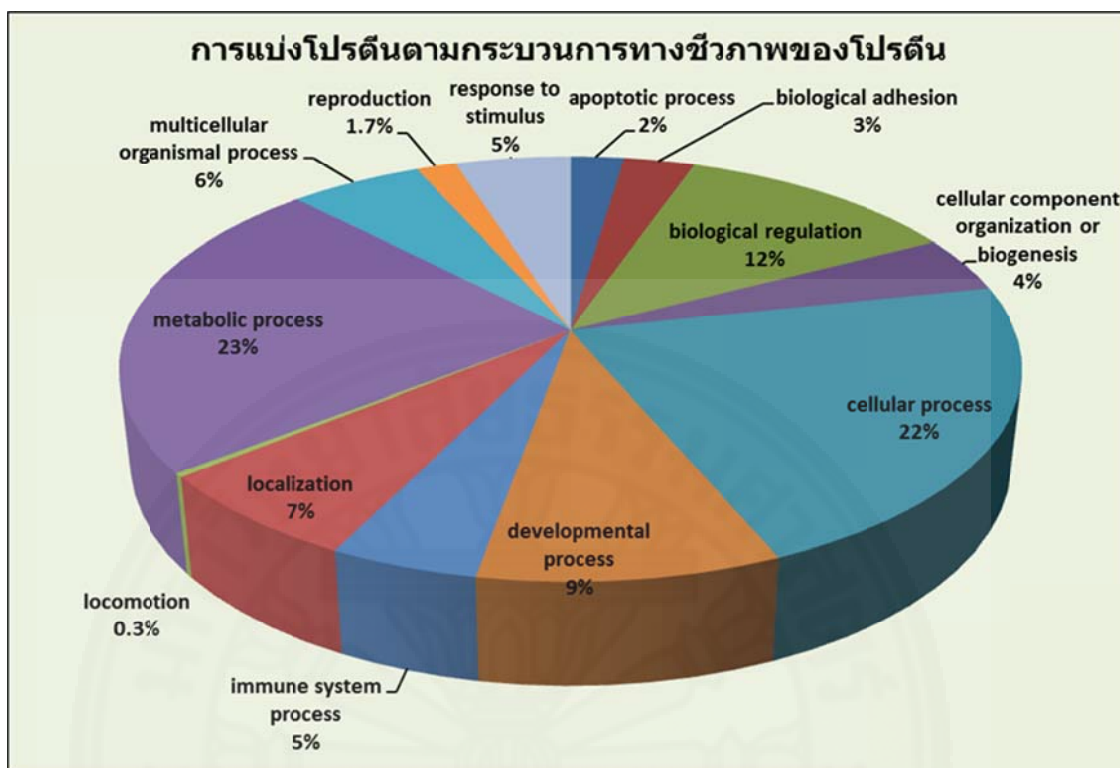
โปรตีนที่ได้ทั้ง 310 ชนิดหลังจากได้ค่าตัวแทนในการวิเคราะห์แล้วจะถูกนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรมชีวสารสนเทศ (bioinformatics program) ต่างๆ โดยเริ่มจากการจำแนกหน้าที่, ความเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพ และการเป็นส่วนประกอบของเซลล์ของโปรตีน 310 ชนิดด้วยโปรแกรม PANTHER (<http://pantherdb.org/>) แล้วจึงทำการแยกโปรตีนที่เหมือนหรือแตกต่างกันในกลุ่มเซลล์ทดสอบเมื่อเทียบกับกลุ่ม control ในแต่ละช่วงเวลา ด้วยการใช้โปรแกรม Jvenn (<http://bioinfo.genotoul.fr/jvenn/index.html>) โดยจะทำการแยกเปรียบเทียบเป็น กลุ่ม control 48 ชั่วโมงเทียบกับกลุ่มเซลล์ทดสอบ 48 ชั่วโมง, กลุ่ม control 72 ชั่วโมงเทียบกับกลุ่มเซลล์ทดสอบ 72 ชั่วโมง และกลุ่มเซลล์ทดสอบ 48 ชั่วโมงเทียบกับกลุ่มเซลล์ทดสอบ 72 ชั่วโมงแล้วจึงทำการหาความสัมพันธ์ของโปรตีนที่พบด้วยโปรแกรม STITCH 4.0 (<http://stitch.embl.de/>)

เราจะทำการจำแนกโปรตีน 310 ชนิดที่ได้หลังจากที่มีการกระตุ้น PAR2 ด้วย SLIGKV โดยดูจากหน้าที่ของโมเลกุลโปรตีน (molecular function), ความเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพ (biological process) และการเป็นส่วนประกอบของเซลล์ (cellular component) โดยใช้โปรแกรม panther (<http://pantherdb.org/>) เมื่อเราทำการแบ่งโปรตีนทั้ง 310 ชนิดตามหน้าที่ของโมเลกุลโปรตีน (รูปภาพที่ 4.4) จะพบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ที่พบจะมีหน้าที่ใน การทำหน้าที่ในการจับกัน (binding) สูงถึง 32% รองลงมาจะมีหน้าที่ใน การเร่งการทำงาน (catalytic activity) 30% ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มนี้มีปริมาณโปรตีนรวมสูงถึง 2 ใน 3 ของโปรตีนที่ตรวจพบทั้งหมด ซึ่งหน้าที่ในกลุ่มอื่นๆนอกจากนี้ ได้แก่ การทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor activity) 11%, ทำหน้าที่เป็นปัจจัยในการถอดรหัสโดยจับกับกรดนิวคลีอิก (nucleic acid binding transcription factor activity) 9%, ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมเอนไซม์ (enzyme regulator activity) 6%, ทำหน้าที่ในการขนส่ง (transporter activity) 5.1%, ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลโครงสร้าง (structural molecule activity) 4%, ทำหน้าที่เป็นปัจจัยในการถอดรหัสโดยจับกับโปรตีน (protein binding transcription factor activity) 2%, ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการแปลรหัส (translation regulator activity) 0.6% และ ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) 0.3% ตามลำดับ



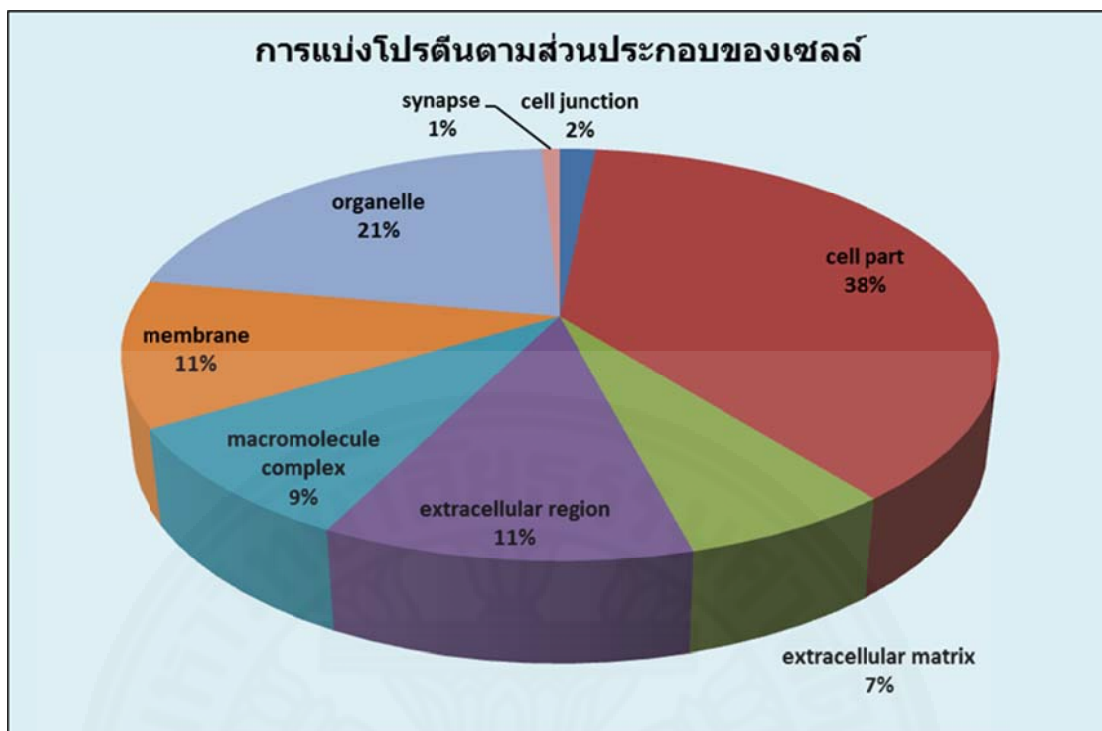
รูปภาพที่ 4.4 รูปภาพแสดงการแบ่งโปรตีนตามหน้าที่ของโมเลกุลโปรตีน จากโปรตีนจำนวน 310 ชนิด (<http://pantherdb.org/>)

เมื่อเราทำการจำแนกโปรตีนทั้ง 310 ชนิดที่พบตามกระบวนการทางชีวภาพ (biological process) ของโปรตีน จะพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของโปรตีนตามกระบวนการทางชีวภาพได้เป็นกลุ่มใหญ่ๆ ทั้งหมด 13 กลุ่ม ได้แก่ กระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolic process) 23%, กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ (cellular process) 22%, กระบวนการควบคุมทางชีวภาพ (biological regulation) 12%, กระบวนการเจริญเติบโต (developmental process) 9%, การบอกตำแหน่ง (localization) 7%, กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเซลล์หลายเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (multicellular organismal process) 6%, การตอบสนองต่อการกระตุ้น (response to stimulus) 5%, กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (immune system process) 4%, กระบวนการสร้างส่วนประกอบของเซลล์ (cellular component organization or biogenesis) 4%, การยึดติดทางชีวภาพ (biological adhesion) 3%, กระบวนการ apoptosis (apoptotic process) 2%, การสืบพันธุ์ (reproduction) 1.7% และ การเคลื่อนที่ (locomotion) 0.3% (รูปภาพที่ 4.5)



รูปภาพที่ 4.5 รูปภาพแสดงการแบ่งโปรตีนตามกระบวนการทางชีวภาพของโปรตีน จากโปรตีนจำนวน 310 ชนิด (<http://pantherdb.org/>)

เมื่อเราทำการจำแนกโปรตีนทั้ง 310 ชนิดที่พบตามส่วนประกอบของเซลล์ (cellular component) จะพบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ 2 ใน 3 ของทั้งหมดจะพบเป็นส่วนหนึ่งของเซลล์ (cell part) สูงถึง 38% และพบที่ออร์แกเนลล์ (organelle) สูงถึง 21% นอกนั้นก็ยังสามารถพบได้ทั่วไป ได้แก่ พบที่เยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) 11%, พบที่บริเวณภายนอกของเซลล์ (extracellular region) 11%, พบเป็นโมเลกุล complex ขนาดใหญ่ (macromolecule complex) 9 %, พบในของเหลวภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) 7%, พบที่รอยต่อของเซลล์ (cell junction) 2% และพบที่จุดประสานประสาท (synapse) 1% ตามลำดับ (รูปภาพที่ 4.6)



รูปภาพที่ 4.6 รูปภาพแสดงการแบ่งโปรตีนตามส่วนประกอบของเซลล์จากโปรตีนจำนวน 310 ชนิด (<http://pantherdb.org/>)

โปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS ทั้ง 310 ชนิดจะถูกนำมา คำนวณหาจำนวนเท่า (fold) ของการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนในแต่ละชนิด เมื่อเทียบกับ 2 ช่วงเวลา โดยเทียบกับระหว่างกลุ่ม control 48 ชั่วโมงกับกลุ่มทดสอบ 48 ชั่วโมง และเทียบกับ ระหว่างกลุ่ม control 72 ชั่วโมงกับกลุ่มทดสอบ 72 ชั่วโมง ซึ่งผลที่ได้จากการคำนวณหาจำนวนเท่า ของการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนและความเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพจะถูกแสดงไว้ให้เห็น ในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ตารางแสดงจำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน 310 ชนิด เมื่อทำกับเทียบกับระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มทดสอบในแต่ละช่วงเวลา

Protein name	UniprotKB	Biological process	log ₂ fold 48 Hr.	log ₂ fold 72 Hr.
1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-4	Q15147	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	5.47*	0.00
2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	P09543	Metabolism process	2.77*	2.30*
activating transcription factor 7-interacting protein 1	Q6VMQ6	-	1.95*	1.17*
ADP-ribosylation factor-like protein 14	Q8N4G2	Cellular process, Localization, Metabolism process	1.01*	1.24*
ADP-ribosylation factor-like protein 4D	P49703	Cellular process, Localization, Metabolism process	1.63	1.03*
aldose reductase (EC 1.1.1.21)	P15121	Localization, Metabolism process	1.97*	1.14*
alpha-1 type V collagen	P20908	Biological adhesion, Biological regulation, Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Developmental process, Immune system process, Localization, Multicellular organismal process, Response to stimulus	1.18*	1.34*
alpha-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1	Q9NSC7	Metabolism process	1.19	1.13
amine oxidase [flavin-containing] B	P27338	Apoptotic process, Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Developmental process, Metabolism process	0.68*	2.13*
AMP deaminase 2	Q01433	Metabolism process	11.22*	1.04*
amyloid-like protein 1	P51693	Cellular process	1.01	1.13
ankyrin repeat domain-containing protein 12	Q6UB98	-	1.07*	1.06*
ankyrin repeat domain-containing protein 39	Q53RE8	-	1.31*	1.02
antigen KI-67	P46013	-	18.54*	1.04

ตารางที่ 4.3 (ต่อเนือง)

apoptosis-stimulating of p53 protein 2	Q13625	Apoptotic process, Cellular process, Developmental process	7.67*	9.35
arylacetamideacetylase	P22760	Metabolism process	1.11*	1.03*
aspartylaminopeptidase	Q9ULA0	-	1.03	1.04
ataxin-1	P54253	-	1.04	1.09*
atrial natriuretic peptide-converting enzyme	Q9Y5Q5	-	2.00	1.77*
basic proline-rich protein	P02812	Metabolism process	3.37*	1.10*
beta-1,3-galactosyltransferase 6	Q96L58	Metabolism process	1.63*	1.95*
brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1	Q9UHR4	Cellular process	2.63	1.22
brain-specific angiogenesis inhibitor 2	D3ZN99	Cellular process, Developmental process, Immune system process, Localization, Multicellular organismal process, Reproduction, Response to stimulus	1.10*	1.20*
breast cancer type 2 susceptibility protein	P51587	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	1.45*	1.08*
bridging integrator 3	Q9NQY0	-	1.25*	1.06*
BTB/POZ domain-containing protein 1	Q9H0C5	Metabolism process	1.01	1.06*
butyrophilin subfamily 3 member A2	P78410	Cellular process, Developmental process, Localization, Metabolism process, Response to stimulus	1.21*	1.06*
butyrophilin-like protein 10	A8MVZ5	Cellular process, Developmental process, Localization, Metabolism process, Response to stimulus	1.06*	1.02
calcium and integrin-binding protein 1	Q99828	Cellular process, Metabolism process	1.57	3.46
calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	Q7Z7J9	-	4.25	4.19*
CAP-Gly domain-containing linker protein 4	Q8N3C7	Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Developmental process, Localization, Metabolism process	1.70*	2.90*
catenin delta-1	O60716	Biological adhesion, Cellular process	1.24	2.80
CCR4-NOT transcription complex subunit 1	A5YKK6	Metabolism process	5.09*	1.29*
CCR4-NOT transcription complex subunit 3	O75175	Biological regulation, Metabolism process	1.09	1.13*
centlein	Q9NXG0	-	2.25*	1.01

ตารางที่ 4.3 (ต่อเนือง)

centriole, cilia and spindle-associated protein	Q6IQ19	-		1.46*	1.13*
centromere protein C	Q03188	-		5.77	0.00
centrosomal protein of 192 kDa	Q8TEP8	-		1.07	1.05*
centrosomal protein of 290 kDa	O15078	-		1.13*	1.10*
centrosomal protein of 83 kDa	Q9Y592	Cellular process		0.07*	1.01*
cerebral cavernous malformations 2 protein	Q9BSQ5	-		1.04*	1.01
chaperonin Cct6	P40227	Cellular component organization and biogenesis		1.04*	1.10
chordin	Q9H2X0	Biological adhesion, Cellular process, Reproduction		4.51*	8.18
chromodomain-helicase-DNA-binding protein 9	Q3L8U1	Biological regulation, Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Metabolism process		2.35	6.19*
coiled-coil domain-containing protein 168	Q8NDH2	-		2.89	2.31
collagen alpha-1(III) chain	P02461	Biological regulation, Cellular process, Developmental process, Immune system process, Localization, Multicellular organismal process, Response to stimulus		1.05	1.15*
collagen alpha-1(VII) chain	Q02388	Biological regulation, Cellular process, Developmental process, Immune system process, Localization, Multicellular organismal process, Response to stimulus		4.35*	0.00
complement component C1q receptor	Q9NPY3	Biological adhesion, Cellular process, Developmental process, Immune system process		4.11*	1.16*
contactin-associated protein-like 2	Q9UHC6	Biological adhesion, Biological regulation, Cellular process, Developmental process, Immune system process, Localization, Metabolism process, Multicellular organismal process, Response to stimulus		1.16	1.09*
cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 beta	P18850	Cellular process, Developmental process, Immune system process, Multicellular organismal process		11.94*	2.39
cyclin-dependent kinase 13	Q14004	Cellular process, Developmental process, Metabolism process, Multicellular organismal process		1.07*	1.05
cyclin-dependent kinase-like 3	Q8IWW4	Cellular process, Metabolism process, Multicellular organismal process		1.15	1.08*
cyclooxygenase-2	P35354	Metabolism process		2.84*	2.96

ตารางที่ 4.3 (ต่อเนือง)

cytochrome P450 2B5	P12789	-	1.07	2.34*
cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme	P05108	-	0.00	1.02
cytosolic carboxypeptidase-like protein 5	Q8NDL9	Cellular process, Metabolism process	1.15*	1.10*
DDB1- and CUL4-associated factor 5	Q96JK2	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	6.39	3.76*
dehydrogenase/reductase SDR family member 9	Q9BPW9	Metabolism process	3.47	1.67
deleted in malignant brain tumors 1 protein	Q9UGM3	Cellular process, Immune system process, Localization, Metabolism process	1.23*	1.01*
deoxyguanosine kinase, mitochondrial	Q16854	Metabolism process	7.91*	6.93*
deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 1	Q9H147	-	3.19*	1.96
dermatan-sulfate epimerase-like protein	Q8IZU8	-	1.04*	1.10*
dihydropyrimidinase-related protein 2	Q16555	Metabolism process	0.42	6.68*
disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 33	Q9BZ11	Developmental process	1.02	0.00
disks large homolog 5	Q8TDM6	Cellular process, Developmental process	1.09	1.12*
DNA replication licensing factor MCM4	P33991	Cellular process, Metabolism process	0.00	1.18
DNA replication licensing factor MCM5	P33992	Cellular process, Metabolism process	1.32	1.47*
DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1	O95602	Cellular process, Metabolism process	0.00	3.87
dnaJ homolog subfamily B member 2	P25686	-	3.37*	1.01
Down syndrome cell adhesion molecule-like protein 1	Q8TD84	Apoptotic process, Biological adhesion, Cellular process, Developmental process, Immune system process, Metabolism process, Multicellular organismal process	1.04*	1.39*
dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 5	Q13163	Biological regulation, Cellular process, Cellular process, Metabolism process, Response to stimulus	4.01*	6.75

ตารางที่ 4.3 (ต่อเนือง)

dystroglycan	Q14118	Biological adhesion, Cellular process	4.98*	2.19*
E3 SUMO-protein ligase EGR2	P11161	-	1.60	2.69*
E3 ubiquitin-protein ligase UBR2	Q8IWW8	-	1.05	2.15*
echinoderm microtubule-associated protein-like 3	Q32P44	-	6.59*	1.52
echinoderm microtubule-associated protein-like 6	Q6ZMW3	-	0.00	3.10*
ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 2	Q16206	Metabolism process	1.21*	1.11
etoposide-induced protein 2.4 homolog	O14681	-	2.36*	1.25
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	P55884	Cellular process, Metabolism process	1.55*	1.26
exocyst complex component 3	O60645	Cellular process, Localization	1.11*	1.20
FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 2	O94887	Biological regulation, Metabolism process	1.38*	1.04
flap endonuclease GEN homolog 1	Q17RS7	Cellular process, Metabolism process	1.23	1.06*
forkhead-associated domain-containing protein 1	B1AJZ9	-	2.85	2.09*
galanin receptor type 2	O43603	Cellular process	1.01*	1.11*
gamma-aminobutyric acid receptor subunit gamma-1	Q8N1C3	Cellular process, Developmental process, Localization	1.35	5.38*
gamma-aminobutyric acid receptor subunit rho-2	P28476	Cellular process, Developmental process, Localization, Multicellular organismal process	1.28	1.11*
glycine receptor subunit alpha-2	P23416	Cellular process, Developmental process, Localization, Multicellular organismal process	7.06*	0.00
golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	Q9H4G4	Immune system process, Reproduction	1.64*	3.00
golgin subfamily A member 2	Q08379	-	1.27	1.21*

ตารางที่ 4.3 (ต่อเนือง)

golgin subfamily A member 7B	Q2TAP0	-	1.02*	1.01*
hemicentin-1	Q96RW7	Cellular process, Developmental process, Metabolism process	1.06*	1.07
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	O14979	Developmental process, Multicellular organismal process	1.12*	0.00
hexokinase-1	P19367	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	1.09*	1.24*
histone H2AX	P16104	Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Metabolism process	1.60*	1.36*
HMG box transcription factor BBX	Q8WY36		1.04*	1.07*
homeobox A2	O43364	Biological regulation, Developmental process, Metabolism process, Multicellular organismal process, Reproduction	5.56*	1.01
hyccin	Q9BYI3	-	2.14*	26.04*
immunoglobulin heavy chain	-	-	1.05*	1.06
initiation factor 4-gamma	Q04637	Apoptotic process, Biological regulation, Developmental process, Metabolism process	10.79*	5.22
integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C	Q9H0C8	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	1.08*	1.11*
inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain3	Q06033	Biological regulation, Metabolism process	10.11*	15.66
interleukin-17 receptor E	Q8NFR9	Biological regulation, Cellular process, Response to stimulus	1.30	1.15*
interleukin-25	Q9H293	Cellular process, Immune system process	2.91	5.43*
junctophilin-3	Q8WXH2	-	3.14	5.12*
kalirin	O60229	Biological regulation, Cellular process, Immune system process, Metabolism process, Multicellular organismal process, Response to stimulus	8.90	1.24*
KAT8 regulatory NSL complex subunit 3	Q9P2N6	-	1.21	1.17*
keratinocyte proline-rich protein	Q5T749	Metabolism process	1.57	1.69
kin of IRRE-like protein 1	Q96J84	Biological adhesion, Developmental process	1.46*	1.11
kin of IRRE-like protein 3	Q8IZU9	Biological adhesion, Developmental process	0.00	3.98*
kinesin-like protein KIF18B	Q86Y91	Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Metabolism process	3.71*	1.09*
kinesin-like protein KIF21A	Q7Z4S6	Cellular process, Metabolism process	1.00*	1.27*

ตารางที่ 4.3 (ต่อเนือง)

kinesin-like protein KIF3B	O15066	Cellular process, Metabolism process	1.03*	1.01
laminin subunit beta-1	P07942	Biological adhesion, Cellular process, Developmental process, Multicellular organismal process	1.06*	1.03
leiomodlin-3	Q0VAK6	Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Developmental process, Multicellular organismal process	1.57*	0.00
leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT3	Q9NZU0	Biological adhesion, Biological regulation, Cellular process, Developmental process	1.00*	1.00
leucine-rich repeat-containing protein 16A	Q5VZK9	Immune system process, Metabolism process, Response to stimulus	7.35*	0.00
leucine-rich repeat-containing protein 42	Q9Y546	-	1.27	2.80
leucine-rich repeat-containing protein 47	Q8N1G4	Metabolism process	5.03	3.51
leucine-rich repeat-containing protein 7	Q96NW7	-	2.67*	3.49*
leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	Q9P2J5	-	1.12*	1.02*
leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 3	Q8N6C8	Cellular process, Immune system process, Response to stimulus	1.02	1.58*
limbin	Q86UK5	-	10.16*	3.58*
lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	P50851	-	1.04	1.03*
liver carboxylesterase 2	O00748	Metabolism process	1.09	1.09
low-density lipoprotein receptor-related protein 2	P98164	-	0.50*	7.12*
low-density lipoprotein receptor-related protein 6	O75581	Biological regulation, Cellular process, Developmental process, Multicellular organismal process, Response to stimulus	4.76*	1.22
lysine-specific demethylase 4A	O75164	Metabolism process, Reproduction	1.06	1.40*
lysine-specific demethylase 5A	P29375	Metabolism process	5.66	1.46*
lysine--tRNA ligase	Q15046	Metabolism process	2.00	2.04
macrophage mannose receptor 1	P22897	Immune system process, Localization	1.14*	1.67*

ตารางที่ 4.3 (ต่อเนือง)

major facilitator superfamily domain-containing protein 4	Q8N468	-		1.43*	1.02*
MAP7 domain-containing protein 2	Q96T17	Cellular component organization and biogenesis, Cellular process		0.00	1.01
melanoma-associated antigen 10	P43363	Apoptotic process, Cellular process, Developmental process, Reproduction		1.02*	1.14*
melanoma-associated antigen B1	P43366	Apoptotic process, Cellular process, Developmental process, Reproduction		1.78*	15.30*
metabotropic glutamate receptor 6	O15303	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process, Multicellular organismal process, Response to stimulus		1.05	1.07
metal transporter CNNM2	Q9H8M5	-		1.28*	1.60
methylcytosinedioxygenase TET3	O43151	-		1.78*	2.15
methyltransferase-like protein 23	Q86XA0	-		0.68*	3.90
microsomal glutathione S-transferase 2	Q99735	Cellular process, Metabolism process		1.10	1.09
microtubule-associated tumor suppressor candidate 2	Q5JR59	-		1.02	1.03*
minor histocompatibility antigen H13	Q8TCT9	Cellular process, Metabolism process		3.47*	3.52
mirror-image polydactyly gene 1 protein	Q8TD10	-		1.23*	1.17
mitogen-activated protein kinase-binding protein 1	O60336	Biological regulation, Developmental process, Localization, Metabolism process		5.02*	8.19
multidrug resistance-associated protein 2	Q92887	Immune system process, Localization, Metabolism process, Response to stimulus		1.12*	1.11
mutS protein homolog 5	O43196	Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Metabolism process		1.47*	1.28
N-acetylglutamate synthase, mitochondrial	Q8N159	Metabolism process		1.27*	2.34*
N-acetyllactosaminide beta-1,6-N-acetylglucosaminyl-transferase	P97402	Metabolism process		1.73*	1.59
NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 9	Q7RTR0	Apoptotic process, Developmental process, Immune system process, Metabolism process, Response to stimulus		2.60*	5.04*

ตารางที่ 4.3 (ต่อเนือง)

NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	P56556	Metabolism process	1.24*	1.16*
nance-Horan syndrome protein	Q6T4R5	-	5.41*	0.00
nebulin	P20929	-	1.08*	1.06
neurogenic locus notch homolog protein 3	Q9UM47	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	1.55*	5.36*
neurotrypsin	P56730	Apoptotic process, Biological adhesion, Biological regulation, Cellular process, Developmental process, Immune system process, Localization, Metabolism process	5.36*	0.00
nucleoporin GLE1	Q53GS7	Biological regulation, Localization, Metabolism process	1.23*	2.03*
nucleus accumbens-associated protein 2-like	Q96BF6	Metabolism process	1.12*	1.09*
olfactory receptor 4F3/4F16/4F29	Q6IEY1	Biological regulation, Cellular process, Multicellular organismal process, Response to stimulus	1.24	1.30*
olfactory receptor 6C3	Q9NZP0	-	3.82	0.47*
olfactory receptor 6N1	Q8NGY5	-	5.21	4.85*
orphan sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter NTT5	Q9GZN6	Cellular process, Localization, Multicellular organismal process	1.03*	1.02*
partitioning defective 3 homolog	Q8TEW0	-	1.08*	1.37*
PDZ domain-containing protein 8	Q8NEN9	-	2.00*	1.53*
PH and SEC7 domain-containing protein 1	A5PKW4	-	1.32	1.67*
PHD finger protein 3	Q92576	-	4.09	8.70*
phenylalanine--tRNA ligase, mitochondrial	O95363	Metabolism process	2.66	109.10*
phenylethanolamine N-methyltransferase	P11086	Metabolism process	4.43	1.58*
phosphatidate phosphatase LPIN2	Q92539	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	1.13*	1.09*
phospholipase D2	O14939	Cellular process	1.20*	1.27*
pleckstrin homology domain-containing family A member 7	Q6IQ23	-	1.12*	1.02*

ตารางที่ 4.3 (ต่อเนือง)

pleckstrin homology domain-containing family G member 4B	Q96PX9	Biological regulation, Cellular process, Immune system process, Metabolism process, Multicellular organismal process, Response to stimulus	3.45*	9.02*
pleckstrin homology domain-containing family G member 5	O94827	-	1.09*	3.78*
pleckstrin homology domain-containing family H member 1	Q9ULM0	-	4.94*	1.06*
plexin-B3	Q9ULL4	Developmental process	1.22*	1.31
polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11	Q8NCW6	Metabolism process	7.33	5.34
potassium voltage-gated channel subfamily G member 2-like	Q9UJ96	Biological regulation, Cellular process, Localization	5.28*	5.74*
prefoldin subunit 6	O15212	Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Metabolism process	1.01*	1.02
pre-mRNA cleavage complex 2 protein Pcf11	O94913	Cellular process, Metabolism process	1.00*	2.46*
pre-rRNA processing protein FTSJ3	Q8IY81	-	1.11*	2.90
probable ATP-dependent RNA helicase DDX60	Q8IY21	-	3.64*	6.36*
proline-rich transmembrane protein 3	Q5FWE3	Metabolism process	0.00	5.99
prosaposin	P07602	-	1.04*	1.01*
protein ERGIC-53	P49257	Localization	2.76	5.73
protein FAM24A	A6NFZ4	-	1.49*	6.09*
protein FAM3B	P58499	Cellular process	1.05*	1.04
protein FAM60A	Q9NP50	-	1.47*	1.10*
protein KIBRA	Q8IX03	-	1.61*	1.09*
protein lin-52 homolog	Q52LA3	-	1.06*	1.12*
protein lin-9 homolog	Q5TKA1	Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Metabolism process	1.02	1.01

ตารางที่ 4.3 (ต่อเนือง)

protein salvador homolog 1	Q9H4B6	Cellular process, Metabolism process	1.22	1.18*
protein SET	Q01105	Apoptotic process, Biological regulation, Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Developmental process, Metabolism process	2.06*	2.30*
protein SFI1 homolog	A8K8P3	-	1.09*	1.16
protein SZT2 isoform X1	Q5T011	-	1.05*	1.01*
protein unc-80 homolog	Q8N2C7	-	1.03	1.94*
protein YIPF2	Q9BWQ6	-	1.06	1.97
putative calcium influx channel TRPC1A	Q9TUN9	-	1.20*	1.63*
putative helicase MOV-10	Q9HCE1	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	2.78*	1.25*
pyruvate kinase PKLR	P30613	-	4.60	1.33*
rab5 GDP/GTP exchange factor	Q9UJ41	Biological regulation, Localization, Metabolism process	1.29	1.10
RAC-gamma serine/threonine-protein kinase	Q9Y243	Apoptotic process, Biological regulation, Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Developmental process, Metabolism process, Reproduction	1.06	1.24
ralGTPase-activating protein subunit alpha-1	Q6GYQ0	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process, Response to stimulus	1.57*	8.09*
rap guanine nucleotide exchange factor 2	Q9Y4G8	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	7.11	6.18*
ras-related protein Rab-4A	P20338	Biological regulation, Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Localization	2.70	4.51*
ras-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	Q13972	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	1.09	1.08
regulator of G-protein signaling 3	P49796	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	4.27*	2.82
remodeling and spacing factor 1	Q96T23	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	1.48*	1.48
retinal-specific ATP-binding cassette transporter	P78363	Cellular process, Localization, Metabolism process	2.44*	5.49*
rho guanine nucleotide exchange factor 11 isoform X1	O15085	Metabolism process	1.25*	1.16*

ตารางที่ 4.3 (ต่อเนือง)

rho guanine nucleotide exchange factor 11 isoform X2	O15085	Metabolism process	1.38*	1.03
rho guanine nucleotide exchange factor 17	Q96PE2	-	1.28	1.42*
rho guanine nucleotide exchange factor 37	A1IGU5	-	1.03	1.04
rhomboid domain-containing protein 3	Q9Y3P4	Biological regulation, Localization, Metabolism process	3.42	4.75
RING finger protein 17	Q9BXT8	-	5.52	3.40*
scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130	Q86VB7	Cellular process, Localization, Metabolism process	1.47*	4.96
scm-like with four MBT domains protein 1 isoform X1	Q9UHV3	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	1.08	1.12*
scm-like with four MBT domains protein 2 isoform X2	Q5VUG0	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	1.16	1.12
secreted frizzled-related protein 2	Q96HF1	Biological regulation, Cellular process, Response to stimulus	1.87*	1.86
semaphorin-3B	Q13214	Cellular process, Developmental process, Immune system process, Multicellular organismal process	1.16	1.40*
semaphorin-3E	O15041	Cellular process, Developmental process, Immune system process, Multicellular organismal process	1.37	2.16*
semaphorin-3F	Q13275	Cellular process, Developmental process, Immune system process, Multicellular organismal process	3.12	2.37*
serine/arginine repetitive matrix protein 1	Q8IYB3	Metabolism process	1.01	1.03
serine/threonine-protein kinase TAO2	Q9UL54	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process, Response to stimulus	1.02	1.12
serine/threonine-protein kinase VRK2	Q86Y07	Biological regulation, Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Developmental process, Metabolism process	1.55*	2.19
serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform	P30154	Metabolism process	1.46*	1.36*
serine-protein kinase ATM	Q13315	Cellular process, Metabolism process, Response to stimulus	1.66*	1.78*
serum albumin precursor	P02768	-	1.17*	1.03*
SH3 domain-containing protein 19	Q5HYK7	-	1.14*	1.01

ตารางที่ 4.3 (ต่อเนื่อง)

SH3-containing GRB2-like protein 3-interacting protein 1	Q9BQI5	-		1.07*	1.03
skeletal muscle myosin heavy chain MyHC-EO/III	Q9GJP9	-		1.11	1.30*
SLC2A4 regulator	Q9NR83	Metabolism process		1.00	1.19
small G protein signaling modulator 3	Q96HU1	Biological regulation, Cellular component organization and biogenesis, Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Localization, Metabolism process		1.08*	1.16
small nuclear ribonucleoprotein G	P62308	Metabolism process		1.10*	1.05*
smoothelin	P53814	Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Developmental process		1.37*	1.85*
sodium channel alpha-subunit	-	-		1.13*	1.01
sodium/hydrogen exchanger 9B1	Q4ZJI4	-		1.81*	5.43*
sodium-dependent serotonin transporter	P31645	Cellular process, Localization, Multicellular organismal process		1.59*	2.28*
sodium-glucose cotransporter-like protein	Q8WWX8	Localization, Metabolism process		4.16	2.16*
specifically androgen-regulated gene protein	Q9BW04	-		1.16	1.10
sterile alpha motif domain-containing protein 9	Q5K651	-		1.03*	2.72*
stromal membrane-associated protein 2	Q8WU79	Biological adhesion, Biological regulation, Cellular process, Metabolism process		1.08	1.05
structural maintenance of chromosomes protein 3	Q9UQE7	Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Metabolism process		1.45	1.06*
synapsin-1	P17600	Cellular process, Localization, Multicellular organismal process		1.07*	1.12*
synemin	O15061	Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Developmental process		1.42*	1.10*
synergin gamma	Q9UMZ2	-		1.09*	1.16
TATA-binding protein-associated factor 172	O14981	-		1.59*	1.23*
T-cell surface glycoprotein CD3 delta chain	P04234	Cellular process, Immune system process, Metabolism process, Response to stimulus		1.03*	1.08

ตารางที่ 4.3 (ต่อเนือง)

tetratricopeptide repeat protein 28	Q96AY4	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	1.20*	1.19
thrombin	Q28731	-	2.50*	1.02
titin	Q8WZ42	Biological adhesion, Cellular process	1.24*	1.19
toll-like receptor 12	Q6QNU9	Biological adhesion, Cellular process, Multicellular organismal process	8.13*	0.00
toll-like receptor 2	O60603	Cellular process	1.53	1.93
TOX high mobility group box family member 3	O15405	-	31.76	2.21*
transcription factor 15	Q12870	Developmental process	3.18*	5.03*
transcription factor E2F5	Q15329	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process, Reproduction	0.00	50.39
transcription factor TFIIIB component B ¹ homolog	A6H8Y1	Biological regulation, Metabolism process	1.48*	1.62
transcription termination factor 1	Q15361	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	1.03	1.77*
transcriptional regulator ATRX	P46100	Biological regulation, Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Metabolism process	1.13*	1.40
transient receptor potential cation channel subfamily M member 3	Q9HCF6	Localization	1.58	3.37*
transmembrane protease serine 11D	O60235	Apoptotic process, Biological regulation, Developmental process, Immune system process, Localization, Metabolism process, Multicellular organismal process, Response to stimulus	3.33*	1.03*
transmembrane protein 119	Q4V9L6	-	1.57	7.30
transmembrane protein 132A	Q24JP5	-	0.00	1.06*
trichohyalin	Q07283	-	1.08*	1.01
trinucleotide repeat-containing gene 6C protein	Q9HCJ0	-	9.97	1.33*
tripartite motif-containing protein 2	Q9C040	Metabolism process	1.02*	1.08
tripartite motif-containing protein 46	Q7Z4K8	Metabolism process	4.96*	12.90
tumor protein D55	Q96J77	-	7.76	1.36*
twinfilin-1	Q12792	Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Developmental process	1.03*	1.05

ตารางที่ 4.3 (ต่อเนือง)

tyrosine-protein kinase Lyn	P07948	Apoptotic process, Biological adhesion, Biological regulation, Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Developmental process, Immune system process, Localization, Locomotion, Metabolism process, Multicellular organismal process, Response to stimulus	1.13*	1.28
tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	P18031	Metabolism process	6.13	1.11*
U8 snoRNA-decapping enzyme	Q96DE0	-	1.30*	1.41
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 28	Q96RU2	-	1.06*	1.02*
ubiquitin-conjugating enzyme E2 G1	P62253	Cellular process, Metabolism process	2.21	4.97*
UBX domain-containing protein 10	Q96LJ8	Cellular process	1.57	1.13*
UHRF1-binding protein 1	Q6BDS2	-	1.05*	1.10
uncharacterized protein C12orf60 homolog	Q810N5	-	2.11*	11.99*
uncharacterized protein C19orf47 homolog	Q8R3Y5	-	1.10*	1.19*
uncharacterized protein C6orf222 homolog	Q8CC96	-	0.00	6.91*
uncharacterized protein ENSP00000372125	A6NCN8	-	9.21	1.41*
uncharacterized protein KIAA0947 homolog	-	-	1.71*	2.18*
uncharacterized protein KIAA1107 homolog	-	-	1.14*	1.03*
uncharacterized protein LOC100347513	-	-	1.06*	1.03
uncharacterized protein LOC103344996	-	-	1.20	1.10*
uncharacterized protein LOC103346189	-	-	1.03	1.07*
uncharacterized protein LOC103347125	-	-	5.49	1.17
uncharacterized protein LOC103351904	-	-	1.01*	1.10*

ตารางที่ 4.3 (ต่อเนือง)

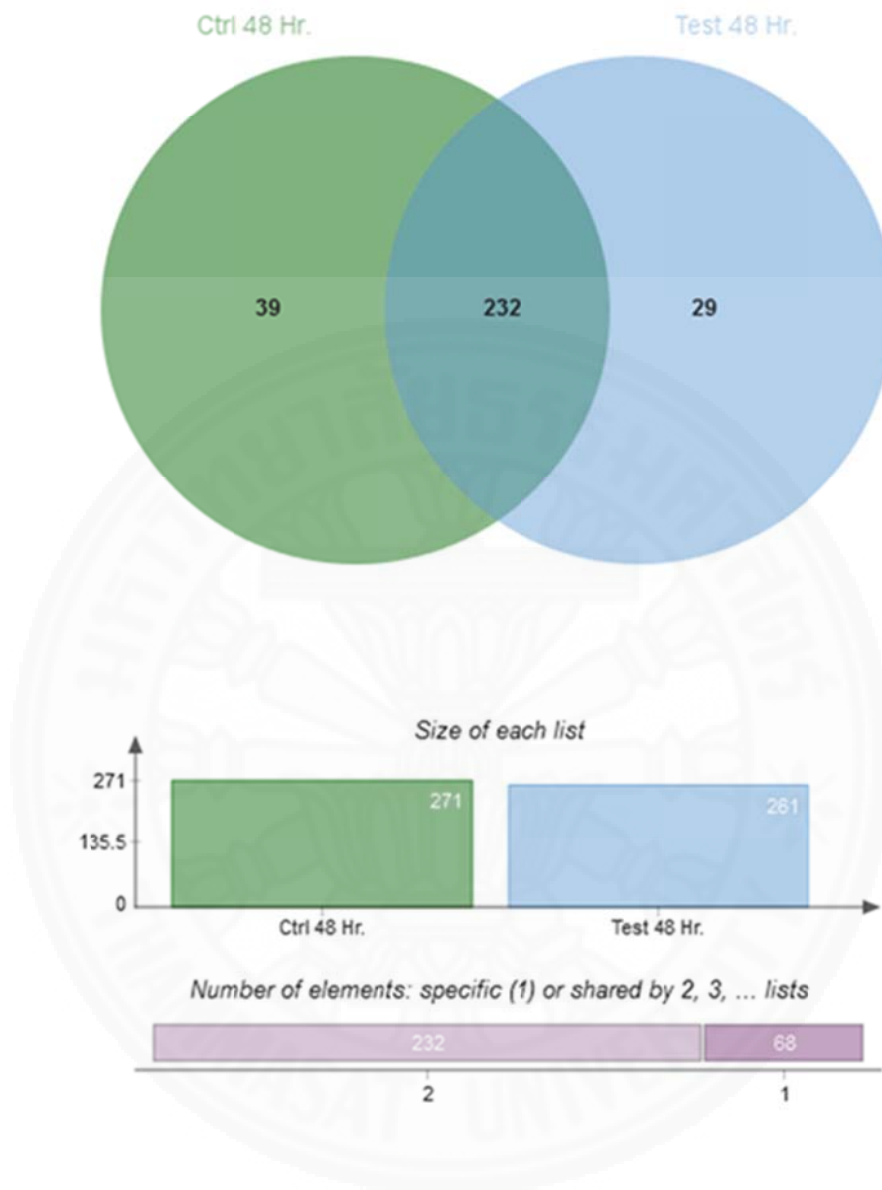
uncharacterized protein LOC103352183	-	-	1.04	1.17*
unconventional myosin-XVIIIa	Q92614	Biological regulation, Cellular component organization and biogenesis, Cellular process, Developmental process, Localization, Metabolism process, Multicellular organismal process	1.05*	1.03
UPF0420 protein C16orf58 homolog	A0A0A1WEY8	-	2.59*	1.35*
UPF0602 protein C4orf47 homolog	Q3U1D9	-	1.64	1.43*
usherin	O75445	Biological adhesion, Cellular process, Developmental process, Multicellular organismal process	4.38*	1.43*
verprolin	P37370	-	3.52	1.48*
vitelline membrane outer layer protein 1 homolog	Q7Z5L0	-	3.08*	0.00
vomeronasal type-2 receptor 116	E9Q6I0	Cellular process, Localization, Response to stimulus	1.13*	1.14
V-set and immunoglobulin domain-containing protein 10-like	Q8N0Z9	Cellular process, Developmental process, Metabolism process, Multicellular organismal process	1.30*	1.47*
WD repeat and HMG-box DNA-binding protein 1	O75717	Biological regulation, Metabolism process	1.03*	1.05
WD repeat domain-containing protein 83	Q9BRX9	Cellular process	3.85	3.04*
YTH domain-containing protein 1	Q96MU7	Metabolism process	1.58*	1.18*
zinc finger and BTB domain-containing protein 11	O95625	Biological regulation, Metabolism process	1.09*	1.14
zinc finger FYVE domain-containing protein 1	Q9HBF4	Cellular process	4.40*	1.64
zinc finger homeobox protein 3	Q15911	Apoptotic process, Biological regulation, Cellular component organization and biogenesis, Developmental process, Immune system process, Metabolism process, Reproduction, Response to stimulus	1.00*	1.06
zinc finger MYND domain-containing protein 15	Q9H091	Biological regulation, Metabolism process	1.04*	1.04
zinc finger protein 18	P17022	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	16.91*	2.88
zinc finger protein 214	Q9UL59	Biological regulation, Metabolism process	1.08*	1.03*

ตารางที่ 4.3 (ต่อเนือง)

zinc finger protein 268	Q14587	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	5.29*	2.08*
zinc finger protein 416	Q9BWM5	Biological regulation, Metabolism process	2.25*	1.02*
zinc finger protein 462	Q96JM2	Biological regulation, Metabolism process	1.54	1.31*
zinc finger protein 574	Q6ZN55	Biological regulation, Metabolism process	1.25	1.76
zinc finger protein 658	Q5TYW1	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	6.02*	2.35*
zinc finger protein 717	Q9BY31	Biological regulation, Cellular process, Metabolism process	1.28	1.12*
zinc finger SWIM domain-containing protein 8	A7E2V4		1.02*	1.06
zinc finger X-chromosomal protein	P17010	Biological regulation, Metabolism process	1.81	1.19*
zymogen granule membrane protein 16	O60844	-	1.08	1.96*

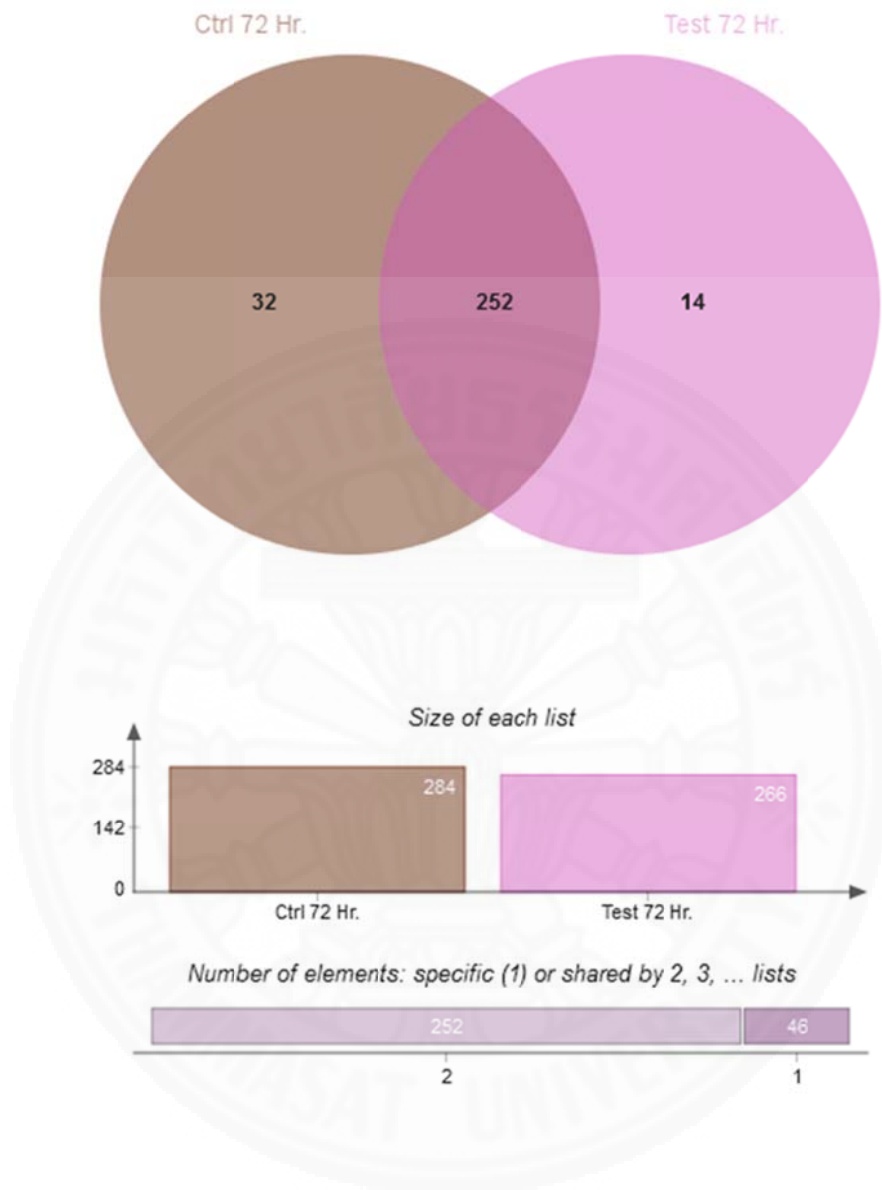
หมายเหตุ : ค่าที่มี * ในตารางหมายถึงลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มคอนโทรลเป็นจำนวนเท่า ส่วนค่าที่ไม่มี * หมายถึงเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มคอนโทรลเป็นจำนวนเท่า ซึ่งค่าตัวเลขที่แสดงในตารางเป็นค่าของ \log_2 และความเกี่ยวข้องของโปรตีนกับกระบวนการทางชีวภาพได้มากจากการใช้โปรแกรม PANTHER (<http://pantherdb.org/>)

เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนของโปรตีนในกลุ่ม control 48 ชั่วโมงเทียบกับเซลล์กลุ่มทดสอบ 48 ชั่วโมง จะเห็นว่าโปรตีนในกลุ่ม control 48 ชั่วโมง มีจำนวนทั้งหมด 271 ชนิด และโปรตีนในกลุ่มเซลล์ทดสอบ 48 ชั่วโมงมีจำนวน 261 ชนิด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบชนิดของโปรตีนในทั้ง 2 กลุ่ม จะพบว่าโปรตีนที่พบเฉพาะในกลุ่ม control 48 ชั่วโมง 39 ชนิด ซึ่งหมายความว่าโปรตีนเหล่านี้มีการลดระดับการสร้างโปรตีนลง เมื่อมีการกระตุ้น PAR2 ด้วย SLIGKV ทำให้ไม่พบโปรตีนเหล่านี้ในกลุ่มเซลล์ทดสอบ และมีโปรตีนที่พบเฉพาะเซลล์ในกลุ่มทดสอบ จำนวน 29 ชนิด ซึ่งหมายความว่าโปรตีนเหล่านี้มีการเพิ่มระดับการสร้างขึ้น เมื่อมีการกระตุ้น PAR2 ด้วย SLIGKV ทำให้โปรตีนเหล่านี้ถูกพบแต่ในกลุ่มเซลล์ทดสอบ นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอีก 232 ชนิดที่พบได้ในทั้งกลุ่ม control และกลุ่มเซลล์ทดสอบ (รูปภาพที่ 4.7) เมื่อวิเคราะห์ดูจากกระบวนการทางชีวภาพจะพบว่าโปรตีน 300ชนิดที่พบในกลุ่มcontrolและกลุ่มเซลล์ทดสอบที่ช่วงเวลา 48 ชั่วโมงนี้ ส่วนใหญ่จะพบว่ามีข้องเกี่ยวกับกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเซลล์และกระบวนการ metabolism รวมกันประมาณ 45% นอกจากนี้ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ยังพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนหลายชนิดในปริมาณหลายเท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มคอนโทรล ได้แก่ TOX high mobility group box family member 3 (TOX3), apoptosis-stimulating of p53 protein 2 (TP53BP2) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการกระบวนการ apoptosis หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ อย่างเช่น toll-like receptor 12 (TLR12), interleukin-25 (IL25) และ cyclooxygenase-2 (PTGS2) นอกจากนี้ยังมีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการย้ายที่ของเซลล์อย่างเช่น dystroglycan (DAG1) และ chordin (CHRD) ด้วย



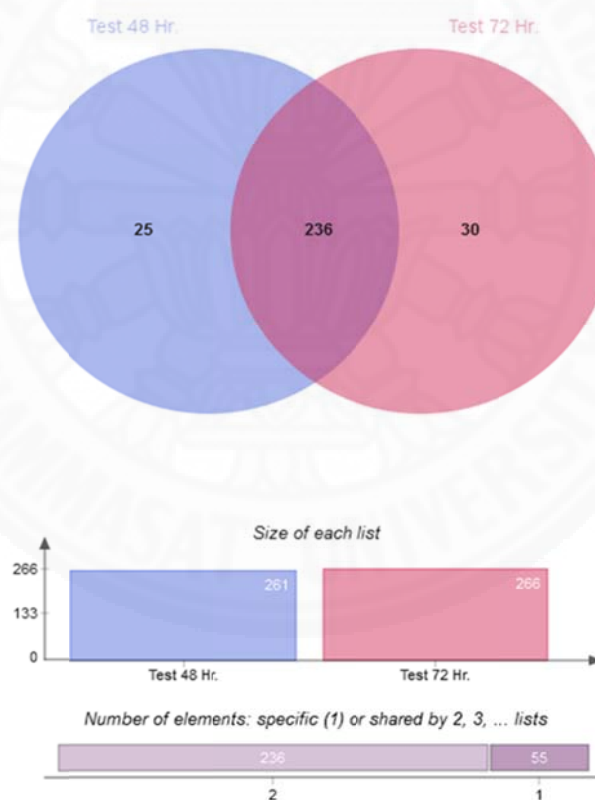
รูปภาพที่ 4.7 ภาพรูปภาพแสดงการเปรียบเทียบจำนวนของโปรตีนในกลุ่ม control 48 ชั่วโมงเทียบกับเซลล์กลุ่มทดสอบ 48 ชั่วโมง (<http://bioinfo.genotoul.fr/jvenn/index.html>)

เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนของโปรตีนในกลุ่ม control 72 ชั่วโมงเทียบกับเซลล์กลุ่มทดสอบ 72 ชั่วโมงจะเห็นว่าโปรตีนในกลุ่ม control 72 ชั่วโมง มีจำนวนทั้งหมด 284 ชนิด และโปรตีนในกลุ่มเซลล์ทดสอบมีจำนวน 266 ชนิด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบชนิดของโปรตีนในทั้ง 2 กลุ่ม จะพบว่าโปรตีนที่พบเฉพาะในกลุ่ม control 72 ชั่วโมง 32 ชนิด ซึ่งหมายความว่าโปรตีนเหล่านี้ถูกลดระดับการสร้างลงเมื่อมีการกระตุ้น PAR2 ด้วย SLIGKV ทำให้ไม่พบโปรตีนเหล่านี้ในกลุ่มเซลล์ทดสอบ และมีโปรตีนที่พบเฉพาะเซลล์ในกลุ่มทดสอบ จำนวน 14 ชนิด ซึ่งหมายความว่าโปรตีนเหล่านี้มีการเพิ่มการสร้างขึ้น เมื่อมีการกระตุ้น PAR2 ด้วย SLIGKV ทำให้โปรตีนเหล่านี้ถูกพบแต่ในกลุ่มเซลล์ทดสอบ นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอีก 252 ชนิดที่พบได้ในทั้งกลุ่ม control และกลุ่มเซลล์ทดสอบ (รูปภาพที่ 4.8) เมื่อวิเคราะห์ดูจากกระบวนการทางชีวภาพจะพบว่าโปรตีน 298 ชนิดที่พบในช่วงเวลา 72 ชั่วโมงนี้ ส่วนใหญ่จะพบที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเซลล์และกระบวนการ metabolism รวมกันประมาณ 46% นอกจากนี้ในช่วงเวลา 72 ชั่วโมง ยังพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนหลายชนิดในปริมาณหลายเท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มคอนโทรล ได้แก่ apoptosis-stimulating of p53 protein 2 (TP53BP2) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุม apoptosis หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ อย่างเช่น interleukin-25 (IL25) และ scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130 (CD163) นอกจากนี้ยังมีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการย้ายที่ของเซลล์อย่างเช่น chordin (CHRD) ด้วย



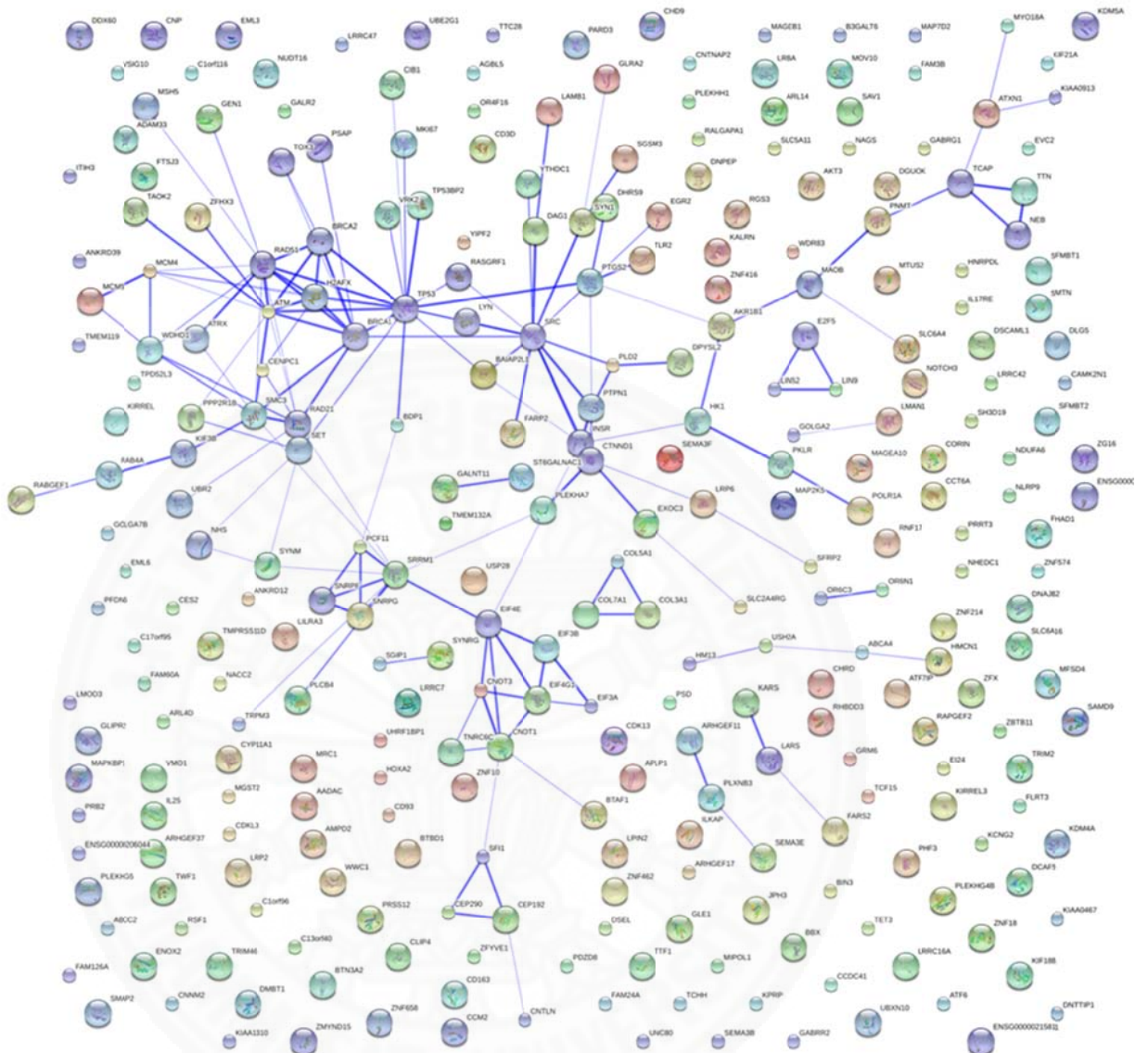
รูปภาพที่ 4.8 ภาพรูปภาพแสดงการเปรียบเทียบจำนวนของโปรตีนในกลุ่ม control 72 ชั่วโมงเทียบกับเซลล์กลุ่มทดสอบ 72 ชั่วโมง (<http://bioinfo.genotoul.fr/jvenn/index.html>)

เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนของโปรตีนในกลุ่มเซลล์ทดสอบ 48 ชั่วโมงเทียบกับ เซลล์กลุ่มทดสอบ 72 ชั่วโมง จะเห็นว่าโปรตีนในกลุ่มเซลล์ทดสอบ 48 ชั่วโมง มีจำนวนทั้งหมด 261 ชนิด และโปรตีนในกลุ่มเซลล์ทดสอบมีจำนวน 266 ชนิด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบชนิดของโปรตีนในทั้ง 2 กลุ่ม จะพบว่าโปรตีนที่พบเฉพาะในกลุ่มเซลล์ทดสอบ 48 ชั่วโมง 25 ชนิด ซึ่งหมายความว่าโปรตีนเหล่านี้ถูกสร้างขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง หลังมีการกระตุ้น PAR2 ด้วย SLIGKV และถูกใช้จนหมดไปหรือหยุดการสร้างเมื่อเวลาผ่านไปอีก 24 ชั่วโมง ทำให้ไม่พบโปรตีนเหล่านี้ในกลุ่มเซลล์ทดสอบ 72 ชั่วโมง และมีโปรตีนที่พบเฉพาะเซลล์ในกลุ่มทดสอบ 72 ชั่วโมง จำนวน 30 ชนิด ซึ่งหมายความว่าโปรตีนเหล่านี้ถูกสร้างขึ้นทีหลังอย่างช้าๆเมื่อเวลาผ่านไปถึง 72 ชั่วโมง หลังมีการกระตุ้น PAR2 ด้วย SLIGKV ทำให้โปรตีนเหล่านี้ถูกพบแต่ในกลุ่มเซลล์ทดสอบ 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอีก 236 ชนิดที่พบได้ในทั้งกลุ่ม control และกลุ่มเซลล์ทดสอบ (รูปภาพที่ 4.9)



รูปภาพที่ 4.9 ภาพรูปแสดงการเปรียบเทียบจำนวนของโปรตีนในกลุ่มเซลล์ทดสอบ 48 ชั่วโมงเทียบกับเซลล์กลุ่มทดสอบ 72 ชั่วโมง (<http://bioinfo.genotoul.fr/jvonn/index.html>)

เมื่อทำการวิเคราะห์โปรตีนที่ได้จากเทคนิค LC-MS จำนวน 310 ชนิด โดยทำการหาหมายเลข UniprotKB ของโปรตีนแต่ละชนิดก่อน ซึ่งหมายเลขนี้สามารถหาได้จากการนำหมายเลข GI ไปทำการเปลี่ยนเป็นหมายเลข UniprotKB ได้ที่เว็บไซต์ (<http://www.uniprot.org/>) แล้วจึงนำหมายเลข UniprotKB ที่ได้มาใส่ลงในโปรแกรม STITCH 4.0 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่ตรวจพบจำนวน 310 ชนิด (<http://stitch.embl.de/>) แล้วทำการเลือกหน้าที่ของโปรตีนเหล่านี้ที่พบในมนุษย์ เนื่องจากในกระต่ายโปรตีนเหล่านี้ยังไม่มีผู้ใดได้ทำการศึกษาถึงหน้าที่และความสัมพันธ์เอาไว้มากนัก จึงทำการเลือกหน้าที่ของโปรตีนเหล่านี้ในมนุษย์แทน ซึ่งจะพบว่าโปรตีน 285 ชนิดที่พบในมนุษย์ ส่วนที่เหลือจะเป็นโปรตีนที่ยังไม่มีผู้ใดได้ทำการศึกษาถึงหน้าที่การทำงานหรือเป็นโปรตีนที่พบแต่ในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่ไม่ใช่มนุษย์ โดยหลังจากที่เราได้แผนภาพความสัมพันธ์ของโปรตีนออกมาแล้ว (รูปภาพที่ 4.10) จะเห็นว่าโปรตีนที่ได้จะมีการโยงความสัมพันธ์ระหว่างกัน ซึ่งเส้นสีน้ำเงินที่เห็นจะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน โดยเส้นสีน้ำเงินยิ่งเข้มหรือยิ่งหนาแสดงว่ามีค่า confident score สูง ส่วนเส้นสีน้ำเงินที่มีสีอ่อนหรือเส้นบางแสดงว่ามีค่า confident score ที่ต่ำ ซึ่งโปรแกรมได้ทำการตั้งค่า confident score ไว้ที่ 0.400 ซึ่งเป็นระดับปานกลาง โดยความสัมพันธ์ที่โปรแกรมหาให้จะมาจากค่าต่างๆเหล่านี้เช่น การอยู่ในจีโนมเดียวกัน (neighborhood in the genome), การรวมกันของยีน (gene fusion), การเกิดร่วมกันข้ามจีโนม (co-occurrence across genomes), การแสดงออกพร้อมกัน (co-expression), ข้อมูลทางการทดลองหรือทางชีวเคมี (experimental/biochemical data), ความสัมพันธ์ในฐานข้อมูลของ curated (association in curated databases), การกล่าวถึงร่วมกันในบทคัดย่อของ PubMed (co-mentioned in PubMed abstracts) และการทำนายปฏิกิริยา (predicted interactions) นอกจากนี้โปรแกรมยังค้นหาโปรตีนตัวกลางหรือโปรตีนที่มีความสัมพันธ์ร่วมกันกับโปรตีนทั้ง 310 ชนิดของเราเพื่อโยงความสัมพันธ์ร่วมกันซึ่งจะแสดงให้เห็นเป็นวงกลมสีม่วงเข้ม โดยจากรูปภาพที่ 4.10 จะพบว่าโปรตีนที่ได้จากการวิจัยจะมีความสัมพันธ์กันเป็นกลุ่มใหญ่ๆกับโปรตีนดังต่อไปนี้ กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีน Cellular tumor antigen p53 (TP53), กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีน Breast cancer type 1 susceptibility protein (BRCA1), กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีน Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (SRC), กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแปลรหัสพันธุกรรมอย่าง Eukaryotic translation initiation factor 4E (EIF4E), กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีน Prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2) และกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ย่อยอื่นๆ



รูปภาพที่ 4.10 รูปภาพแสดงความสัมพันธ์กันระหว่างโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์จำนวน 310 ชนิด ด้วยเทคนิค LC-MS ภายหลังจากที่มีการกระตุ้น PAR2 ด้วย SLIGKV โดยโปรแกรม STITCH 4.0 (<http://stitch.embl.de/>) ซึ่งเป็นโปรแกรมสำหรับหาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน

ในส่วนของโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีน Cellular tumor antigen p53 (TP53) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการเกิดมะเร็ง (tumor suppressor) ในเนื้อเยื่อหลายชนิด โดยจะกระตุ้นให้การเจริญเติบโตหยุดหรือเกิด apoptosis ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ โปรตีน p53 เกี่ยวข้องกับการควบคุม cell cycle ซึ่งจะไปยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ด้วยการควบคุมกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการนี้ โดยหนึ่งในยีนที่ถูกกระตุ้นนี้ก็คือตัวยับยั้งของ cyclin-dependent kinase นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้เกิด apoptosis ได้โดยกระตุ้นการแสดงออกของ BAX และ FAS antigen หรือยับยั้งการแสดงออกของ Bcl-2 (107-109) โดยพบว่า p53 สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-6 ได้ (110) นอกจากนี้ยังพบว่า IL-6 ยังสามารถยับยั้งยีน p53 tumor suppressor ได้ (111) นอกจากนี้ยังพบว่า p53 ยังสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน cyclooxygenase 2 (COX-2, PTGS2) โดยที่ COX-2 สามารถยับยั้ง apoptosis ที่เกิดจาก p53 ได้ (112) จากความสัมพันธ์ที่ได้จากโปรแกรม stitch จะพบว่ามียีนโปรตีนหลายชนิดที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีน p53 นี้ ได้แก่ apoptosis-stimulating of p53 protein 2 (TP53BP2), Antigen KI-67 (MKI67), DNA replication licensing factor MCM4 (MCM4), Histone H2AX (H2AFX), Serine-protein kinase ATM (ATM), serine/threonine-protein kinase VRK2 (VRK2), Transcription factor TFIIIB component B" homolog (BDP1), Calcium and integrin-binding protein 1 (CIB1), ras-specific guanine nucleotide-releasing factor 1 (RASGRF1), Tyrosine-protein kinase Lyn (LYN), Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1(BAIAP2L1), Protein SET (SET) และ Prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2)

ในส่วนของความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 กับ apoptosis-stimulating of p53 protein 2 (ASPP2, TP53BP2) ซึ่ง ASPP2 เป็น 1 ใน 3 สมาชิกของ apoptosis-stimulating proteins of p53 ประกอบด้วย ASPP1, ASPP2 และ iASPP มีหน้าที่ในการควบคุม apoptosis ผ่าน p53 และสมาชิกอื่นในกลุ่มของมัน (p63 และ p73) โดย ASPP1 และ ASPP2 จะเพิ่มความสามารถของ p53 ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน pro-apoptotic แต่ไม่ใช่นิวคลีโอไทด์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้ง cell cycle แต่ iASPP จะยับยั้ง (113-114) โดย ASPP1 และ ASPP2 นั้นเป็นตัวยับยั้งมะเร็งที่สำคัญ ซึ่งมีการแสดงออกที่ลดลงในมะเร็งหลายๆชนิดของมนุษย์ (115) โดยมีงานวิจัยที่ใช้หนูซึ่งไม่มี ASPP2 แบบ heterozygous จะมีโอกาสเกิดมะเร็งสูงกว่าหนูปกติ แสดงให้เห็นว่า ASPP2 เป็นตัวยับยั้งมะเร็ง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาต่อไปโดยพบว่า ASPP2 และ p53 มีการทำงานร่วมกันในการทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งมะเร็ง โดยที่ ASPP2 สามารถจับกับ p53 ได้ (116-119) ในส่วนของความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 กับโปรตีน Antigen KI-67 (MKI67) ซึ่งเป็น nuclear protein ที่พบในเซลล์ที่มีการเพิ่มจำนวน จึงคาดว่าโปรตีนนี้มีความจำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell

proliferation) (120) โดยจากการศึกษาพบว่ามีการแสดงออกร่วมกันระหว่าง p53 กับ MKI67 ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก, มะเร็งตับอ่อน และการเกิดมะเร็งจากแผลในช่องปาก (121-123) สำหรับโปรตีน DNA replication licensing factor MCM4 (MCM4), DNA replication licensing factor MCM5 (MCM5) นั้น จะทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบ MCM complex (MCM2-7) ซึ่งจำเป็นสำหรับการถ่ายแบบดีเอ็นเอ (DNA replication) ในขั้นตอนเริ่มต้นและการต่อสายให้ยาวขึ้นในเซลล์ยูคาริโอต (eukaryotic cell) (124) โดยพบว่ามีการแสดงออกร่วมกันกับ MKI67 (125)

สำหรับโปรตีน Histone H2AX (H2AFX) เป็น histone H2A ชนิดหนึ่งสามารถแทนที่ histone H2A ใน nucleosome ได้ โดยที่ nucleosome จะทำหน้าที่ห่อและบีบอัดโครโมโซมให้กลายเป็น chromatin นอกจากนี้ histone ยังมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการถอดรหัส, การซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair), การถ่ายแบบของดีเอ็นเอ และความเสถียรของโครโมโซม (126) ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับโปรตีน p53 โดยโปรตีน p53 ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง ser15 สามารถจับกับ H2AX ได้ (127) โดยโปรตีน H2AX พบว่าสัมพันธ์กับโปรตีน CENPC ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ CENPA-NAC (nucleosome-associated) complex โดย complex นี้จะมีบทบาทสำคัญในการประกอบกันเป็น kinetochore protein, การดำเนินไปของกระบวนการ mitosis และการแยกตัวของโครโมโซม (128-129)

ในส่วนของโปรตีน Serine-protein kinase ATM (ATM) ซึ่งเป็น Serine/threonine protein kinase ที่จะกระตุ้นการส่งสัญญาณ checkpoint ของ double strand breaks (DSBs), apoptosis และความเครียดที่เป็นพิษต่อยีนอย่างเช่น ultraviolet A light (UVA) ดังนั้นจึงมีบทบาทในการเป็นตัวรับรู้เมื่อมี DNA damage นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณและการควบคุม cell cycle แล้วยังอาจมีบทบาทในการเป็นตัวยับยั้งมะเร็งด้วย ยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับโปรตีน p53 โดยสามารถเติมหมู่ฟอสเฟตให้โปรตีน p53 ได้ (130-134) ส่วนโปรตีน Structural maintenance of chromosomes protein 3 (SMC3) นั้น มีหน้าที่เป็นส่วนประกอบหลักของ cohesion ซึ่งเป็น complex ที่จำเป็นสำหรับ chromosome cohesion ในระหว่าง cell cycle (135-136) โดยพบว่ามีความสัมพันธ์กับโปรตีน ATM เนื่องจากโปรตีน ATM สามารถเติมหมู่ฟอสเฟตให้โปรตีน SMC3 ได้ (137) สำหรับโปรตีน serine/threonine-protein kinase VRK2 หรือ Vaccinia-related kinase 2 ซึ่งเป็นสมาชิกของ Ser-Thr kinase ที่ประกอบด้วยสมาชิก 3 ตัว คือ VRK1, VRK2 และ VRK3 แต่มีเพียง 2 ตัวที่มีความสามารถในการ catalize คือ VRK1 และ VRK2 ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า VRK2 มีความสัมพันธ์กับระดับของ estrogen และ progesterone receptor ที่สูง แต่มีความสัมพันธ์แบบผกผันกันกับ ERBB2 ในมะเร็งเต้านมของมนุษย์ (138) โดย

VRK2 มี 2 ไอโซฟอร์ม (isoform) คือ VRK2A ซึ่งประกอบด้วย 508 กรดอะมิโน พบใน cytoplasm โดยฝังอยู่ใน endoplasmic reticulum และ VRK2B ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มที่สั้นกว่าถูกสร้างมาจากการ alternate splicing จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า VRK2A สามารถควบคุมเส้นทางการส่งสัญญาณ โดยจะรวมกับ JIP1 ที่เป็น scaffold protein ซึ่งจะลดการตอบสนองต่อ hypoxia และ IL-1 β ผ่าน TAK-1 ได้ โดยทำให้ JNK ไม่สามารถไปกระตุ้น c-Jun ทำให้ไม่มีการถอดรหัสดีเอ็นเอเกิดขึ้น (139) นอกจากนี้ยังพบว่า VRK2A สามารถควบคุม intrinsic apoptotic pathway ได้ 2 ทาง โดยผ่านการจับกับ Bcl-xL โดยตรง ซึ่งจะสร้าง complex ระหว่าง Bcl-xL และ Bax ส่งผลให้มีการลดลงของการเกิด apoptosis นอกจากนี้ VRK2A มีบทบาทในการเป็นตัวควบคุมเชิงลบต่อการแสดงออกของ Bax ทำให้การเกิด apoptosis ลดลง (140) ในส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง p53 กับ VRK2 พบว่าทั้ง 2 ไอโซฟอร์มของ VRK2 สามารถ catalyze ส่วนของ N-terminal domain และเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ p53 ได้ที่ตำแหน่ง Thr¹⁸ (141)

สำหรับโปรตีน Calcium and integrin-binding protein 1 (CIB1) ซึ่งเป็นโปรตีนขนาด 22 kDa ที่มีลำดับที่สำคัญเหมือนกันกับ calmodulin และ Calcium binding protein อื่นๆ มีบทบาทในการควบคุมกระบวนการของเซลล์มากมาย ไม่ว่าจะเป็น การแบ่งตัวของเซลล์, การเปลี่ยนแปลงของเซลล์, การอพยพของเซลล์, การสร้างเส้นเลือด (angiogenesis) และ apoptosis (142) โดยพบว่าโปรตีน CIB1 มีความสัมพันธ์กับโปรตีน p53 ในเรื่องการแบ่งตัวของเซลล์ (143-144) ในส่วนของความสัมพันธ์กับโปรตีน Transcription factor TFIIIB component B' homolog (BDP1) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการถอดรหัสของ RNA polymerase III มีความสำคัญในการถอดรหัสของ RNA polymerase III ทั้ง 3 ชนิด (145) พบว่าสัมพันธ์กับ p53 โดยมีงานวิจัยที่พบว่า p53 สามารถจับกับ TFIIIB ได้โดยจะยับยั้งการถอดรหัสของ RNA polymerase III (146-147) ส่วนโปรตีน Pre-mRNA cleavage complex 2 protein Pcf11 (PCF11) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ pre-mRNA cleavage complex II จากการวิเคราะห์ไม่พบว่ามีสัมพันธ์กับ TFIIIB อย่างชัดเจน

ส่วนของโปรตีน ras-specific guanine nucleotide-releasing factor 1 (RASGRF1) ทำหน้าที่ในการช่วยในการแลกเปลี่ยนของ GDP ที่จับอยู่กับ Ras โดย GTP (148) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าโปรตีน p53 สร้าง complex ขนาดใหญ่รวมกันกับ polo-like kinase 1 (Plk1) และโปรตีน RASGRF1 ซึ่งสมมติฐานว่า Plk1 และ RASGRF1 มีส่วนร่วมในการฟื้นฟูทำให้ cell cycle ที่หยุดอยู่ให้ดำเนินต่อไปโดยการจับกันกับ p53 ซึ่งจะทำให้เกิดการนำเอาหมู่ฟอสเฟตออกจาก p53 ที่ตำแหน่ง Ser¹⁵ (149) ส่วนโปรตีน Tyrosine-protein kinase Lyn (LYN) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็น Non-receptor tyrosine-protein kinase ทำหน้าที่ส่งผ่านสัญญาณจาก receptor ที่อยู่บนผิวของ

เซลล์ มีบทบาทสำคัญต่างๆมากมาย ไม่ว่าจะเป็น ควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งแบบที่มีมาแต่กำเนิดหรือแบบที่เกิดขึ้นภายหลัง, การสร้างเม็ดเลือด (hematopoiesis), การตอบสนองต่อ growth factor และ cytokine โดยมีบทบาทในการตอบสนองของ B-cell ไม่ว่าจะเป็นการควบคุม การเปลี่ยนแปลง, การเจริญเติบโต, การรอดชีวิตและการตายของ B-cell รวมทั้งยังเป็น downstream ของ receptor ทางภูมิคุ้มกันต่างๆ แล้วยังมีบทบาทในการตอบสนองต่อการอักเสบของ lipopolysaccharide ที่มาจากแบคทีเรีย (150-151) ซึ่งจากความสัมพันธ์ที่แสดงโดยโปรแกรม พบว่ามีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าโปรตีน p53 สามารถจับกับโปรตีน LYN ได้ ส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับ p53 และกระตุ้นการถอดรหัสของ p53 นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน LYN ยังสามารถยับยั้งการส่งโปรตีน p53 ออกไปยัง cytoplasm ส่งผลให้เกิดการทำลายโปรตีน p53 ด้วยการเกิด ubiquitination จากผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า LYN สามารถกระตุ้น p53 แล้วยังสามารถควบคุม p53 ได้ด้วยผ่าน Mdm2 (152)

ในส่วนของโปรตีน Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1 (BAIAP2L1) หรือ Insulin receptor tyrosine kinase substrate (IRTKS) โดยจากการศึกษาวิจัยพบว่า BAIAP2L1 ทำหน้าที่เป็น adaptor protein สามารถควบคุมกลุ่มของ actin ในระหว่างการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้ (153) นอกจากนี้ยังพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการย้ายที่ของเซลล์ (cell migration) ผ่านการกระตุ้นของ SRC (154) นอกจากนี้ยังพบว่า BAIAP2L1 ยังสามารถยับยั้ง apoptosis ผ่าน p53 ได้และยังลดการถอดรหัสของ p53 ด้วย โดยจะทำการจับกับ p53 โดยตรงแล้วกระตุ้นให้เกิดการทำลายของ p53 ผ่านการเกิด ubiquitination (155)

ในส่วนของโปรตีน Protein SET (SET) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่หลากหลาย มีความเกี่ยวข้องกับ apoptosis, การถอดรหัส, การประกอบกันเป็น nucleosome และ histone chaperoning (156-158) พบว่า SET มีความสัมพันธ์กับ p53 เนื่องจาก SET สามารถที่จะจับกับ p53 เพื่อและทำการยับยั้งการถอดรหัสของยีนที่เป็นเป้าหมายของ p53 ซึ่งทำให้เกิดการขัดขวางการหยุด cell cycle และ apoptosis (159) ในส่วนของโปรตีนอื่นที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีน SET อย่างโปรตีน Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform (PPP2R1B) ซึ่งจะถอดรหัสได้ออกมาเป็น เบต้า-ไอโซฟอร์ม ของหน่วยย่อย (subunit) A ของ serine/threonine protein phosphatase 2A (PP2A) โดย PP2A เป็น holoenzyme ที่ประกอบไปด้วย 3 หน่วยย่อย ได้แก่ หน่วยย่อย 65 kD structural/regulatory A (PR65/A), หน่วยย่อย 36 kD catalytic C (PP2Ac) และ หน่วยย่อย variable regulatory B (160) โดย PP2A จะทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการหลายอย่าง เช่น การเปลี่ยนแปลงของเซลล์, การเพิ่มจำนวนของเซลล์

(proliferation) และ apoptosis ด้วยการยับยั้งหมู่ฟอสเฟตออก (161) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าโปรตีน SET สามารถทำปฏิกิริยากันกับ Serine/threonine-protein phosphatase 2A ได้ (162)

ส่วนของโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับ Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (SRC) ซึ่งเป็น Non-receptor protein tyrosine kinase ซึ่งถูกกระตุ้นได้จากตัวรับของเซลล์ต่างๆหลายชนิด รวมทั้งตัวรับทางด้านระบบภูมิคุ้มกัน, ตัวรับสำหรับการเกาะติด, G protein-coupled receptor ตลอดจนตัวรับ cytokine โดย SRC มีบทบาทในการส่งสัญญาณเพื่อควบคุมกระบวนการทางชีวภาพรวมถึง การถอดรหัสของยีน, การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน, การเกาะติดของเซลล์, apoptosis, การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของ cell cycle (cell cycle progression), การอพยพ และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (163-165) โดยจากโปรแกรม stitch จะพบว่ามีโปรตีนหลายชนิดที่มีความสัมพันธ์กับ SRC ได้แก่ FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 2 (FARP2), dystroglycan (DAG1), Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1 (BAIAP2L1), YTH domain-containing protein 1 (YTHDC1), tyrosine-protein kinase Lyn (LYN), Synapsin-1 (SYN1), Phospholipase D2 (PLD2), tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1 (PTPN1) และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน Catenin delta-1 (CTNND1)

โดยในส่วนของโปรตีน FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 2 (FARP2) ซึ่งมีหน้าที่เป็น guanine nucleotide exchange factor ซึ่งกระตุ้น RAC1 มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อ class 3 semaphorin และการสร้างใหม่ของ actin cytoskeleton (166) พบว่ามีความสัมพันธ์กับ SRC ใน adherens junction pathway (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04520) ส่วนของโปรตีน dystroglycan (DAG1) ซึ่งเป็นส่วนประกอบภายในของเยื่อหุ้มเซลล์ของ dystrophin-glycoprotein complex (DCG) ซึ่งเป็น transmembrane protein complex โครงสร้างของ dystroglycan ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ alpha และ beta โดยที่ α -dystroglycan จะเป็นโปรตีนตัวรับบนผิวของเซลล์สำหรับ basement membrane (BM) proteins อย่างเช่น laminin, perlecan และ agrin ซึ่ง glycoproteins เหล่านี้จะจับกับ glycan ที่อยู่บน α -dystroglycan และจะจับกับ β -dystroglycan ที่เป็น transmembrane protein ส่วน β -dystroglycan จะจับกับ dystrophin ที่อยู่ใน cytoplasm ซึ่งจะจับกับ actin cytoskeleton และ adaptor molecule ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณอีกที (167) ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับ SRC ในการสร้าง podosome ใน myoblast โดยที่ DAG1 เป็นส่วนประกอบของ podosome และการสร้าง podosome ถูกควบคุมโดย Non-

receptor protein tyrosine kinase อย่างเช่น SRC และ Rho family GTPases จากงานวิจัยพบว่า การแสดงออกที่มากขึ้นของ DAG1 จะยับยั้งการสร้าง podosome แต่เมื่อเกิดการผ่าเหล่าของ DAG1 ที่ tyrosine ตำแหน่งที่ 890 ซึ่งเป็น substrate ของ SRC จะทำให้เกิดการสร้าง podosome ขึ้นได้ (168) ในส่วนของโปรตีน Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1 (BAIAP2L1) หรือ Insulin receptor tyrosine kinase substrate (IRTKS) โดยจากการศึกษาวิจัยพบว่า BAIAP2L1 ทำหน้าที่เป็น adaptor protein สามารถควบคุมกลุ่มของ actin ในระหว่างการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้ (169) นอกจากนี้ยังพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการ migration ผ่านการกระตุ้นของ SRC (170) ในส่วนของโปรตีน YTH domain-containing protein 1 (YTHDC1) ซึ่งสามารถจับกับ N6-methyladenosine (m6A)-containing RNAs โดยที่ M6A มีบทบาทสำคัญในการเกิด mRNA splicing, ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและเกิดความเสถียรขึ้น นอกจากนี้ยังควบคุมการเลือกบริเวณที่จะเกิด alternate splicing (171-173) โดยพบว่ามีความสัมพันธ์กับ SRC เนื่องจาก SRC นั้นจะควบคุม YTHDC1 โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง tyrosine (tyrosine phosphorylation) (174) ในส่วนของโปรตีน synapsin-1 (SYN1) ซึ่งเป็น neuronal phosphoprotein ที่หุ้ม synaptic vesicle, จับกับ cytoskeleton และเชื่อว่ามีหน้าที่ในการควบคุมการปล่อยสารสื่อประสาท (neurotransmitter) (175) ซึ่งพบว่า SYN1 สามารถจับกันกับ SRC ได้ (176) ส่วนโปรตีน Phospholipase D2 (PLD2) ซึ่งอาจมีบทบาทควบคุม cytoskeleton และ endocytosis (177-178) พบว่าสามารถจับกันกับ SRC ได้ (179) ส่วนโปรตีน tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1 (PTPN1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบว่ามีเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของ insulin โดยจะไปทำการยับยั้ง insulin receptor ส่งผลให้เกิดการหยุดการส่งสัญญาณของอินซูลิน (180-181) นอกจากนี้ยังพบว่า PTPN1 มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการส่งสัญญาณของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และควบคุมการส่งสัญญาณของ cytokine โดยการเอาหมู่ฟอสเฟตออก (dephosphorylation) จาก janus kinase 2 (JAK2) และ non-receptor tyrosine-protein kinase 2 (TYK2) นอกจากนี้ยังเป็นตัวกระตุ้น transcription 5 (STAT5) (182-185) ในส่วนของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ Catenin delta-1 (CTNND1) นั้น จะพบว่ามีโปรตีน Secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) ทำหน้าที่ในการควบคุม Wnt signaling ผ่านการทำปฏิกิริยากับ Wnt โดยตรง ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ทำให้ SFRP2 มีบทบาทในการเป็นสารยับยั้งการเกิดมะเร็ง (186-187) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับโปรตีน Low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) โดยเป็นตัวยับยั้ง Wnt signaling ซึ่ง LRP6 เป็น co-receptor ของ Wnt ligand ร่วมกับ frizzled (Fz) receptor ซึ่ง Wnt-Fz-LRP6 complex จะดึงโปรตีน disheveled (Dvl) เข้ามาทำให้เกิดการย้ายหมู่ฟอสเฟตของ LRP6 เกิดการกระตุ้นและดึง

Axin complex เข้ามายัง receptor ซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งการย้ายหมู่ฟอสเฟตไปยัง β -catenin โดย Axin ทำให้ β -catenin เคลื่อนที่เข้าสู่ nucleus เกิดการจับกับ TCF/LEF ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมายของ Wnt ซึ่งจะทำให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์, การรอดชีวิตของเซลล์, การเคลื่อนที่ของเซลล์ และการสร้างเส้นเลือดใหม่ (188-190) ส่วนโปรตีน Exocyst complex component 3 (EXOC3) จะเป็นส่วนประกอบของ exocyst complex ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การเชื่อมกันของ exocytic vesicle และ plasma membrane โดย EXOC3 พบว่ามีความสัมพันธ์กับ Catenin delta-1 (CTNND1) โดยควบคุม E-cadherin โดยตรงผ่านการทำปฏิกิริยากับ β -catenin (191) ซึ่งโปรตีน CTNND1 จะพบว่ามีความสัมพันธ์กับ SRC ใน adheren junction pathway (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04520) ผ่านการเติมหมู่ฟอสเฟตของ SRC (192-194)

ในส่วนของโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีน Breast cancer type 1 susceptibility protein (BRCA1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่เป็นตัวยับยั้งมะเร็ง ซึ่งช่วยในการซ่อมแซม ดีเอ็นเอที่ถูกทำลายและทำลายเซลล์ที่ ดีเอ็นเอไม่สามารถซ่อมแซมได้ โดยจะมีส่วนช่วยให้เกิดการดำเนินไปของ cell cycle สำหรับเซลล์ปกติและทำให้ cell cycle หยุดลงเมื่อมีการสัมผัสรังสี มีส่วนช่วยในการควบคุมการถอดรหัสโปรตีน p21 เพื่อตอบสนองต่อ ดีเอ็นเอที่เสียหาย ดังนั้นจึงมีบทบาทในการช่วยให้เกิดความเสถียรสำหรับสารพันธุกรรมของเซลล์ ซึ่งถ้าเกิดการผ่าเหล่าของยีนที่สร้างโปรตีนนี้ จะทำให้ ดีเอ็นเอที่เสียหายไม่สามารถซ่อมแซมได้อย่างเหมาะสม เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้ (195-197) ซึ่งจากโปรแกรม stitch 4.0 มีโปรตีนที่ได้จากงานวิจัยของเราที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีน BRCA1 นี้ ได้แก่ serine-protein kinase ATM (ATM), histone H2AX (H2AFX), structural maintenance of chromosomes protein 3 (SMC3) โดยพบว่าโปรตีน serine-protein kinase ATM (ATM) มีความสัมพันธ์กับโปรตีน BRCA1 โดยโปรตีน ATM นอกจากจะมีความสัมพันธ์กับโปรตีน p53 แล้วยังทำหน้าที่ในการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่โปรตีน BRCA1 เพื่อตอบสนองต่อ ดีเอ็นเอที่เสียหายด้วย (198-200) ส่วนความสัมพันธ์ของโปรตีน BRCA1 กับโปรตีน H2AFX ซึ่งเป็น histone ชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซม ดีเอ็นเอ พบว่าเป็นโปรตีนที่ถูกโปรตีน ATM เติมหมู่ฟอสเฟตให้เหมือนกันรวมทั้งยังพบโปรตีน H2AFX และ BRCA1 ร่วมกันในบริเวณที่มีการเสียหายของ ดีเอ็นเอเกิดขึ้น (201-202) ส่วนของโปรตีน SMC3 ที่เป็นส่วนประกอบของ cohesion พบว่ามีความสัมพันธ์กับโปรตีน BRCA1 ในฐานข้อมูลของ curated ว่าสามารถจับกันได้ โดยจากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่ากลุ่มของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ BRCA1 นี้ส่วนใหญ่จะพบว่ามีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ ดีเอ็นเอ

ในส่วนของโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการแปลรหัสพันธุกรรม ได้แก่ ได้แก่ Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B (EIF3B), initiation factor 4-gamma (EIF4G1), CCR4-NOT transcription complex subunit 1 (CNOT1), CCR4-NOT transcription complex subunit 3 (CNOT3), TATA-binding protein-associated factor 172 (BTAF1), trinucleotide repeat-containing gene 6C protein (TNRC6C) และ serine/arginine repetitive matrix protein 1 (SRRM1)

เมื่อดูความสัมพันธ์ที่ได้จากโปรแกรมพบว่าในส่วนของโปรตีน trinucleotide repeat-containing gene 6C protein (TNRC6C) ซึ่งมีบทบาทในการเกิด gene splicing ของ RNA โดย micro-RNAs (miRNAs) มีความจำเป็นสำหรับการยับยั้งการแปลรหัสของ miRNA ที่เข้าคู่กับ mRNA โดย argonaute protein โดยทำหน้าที่เป็น scaffolding protein ทำงานร่วมกับ argonaute แล้วไปจับกับ mRNA ที่เข้าคู่แล้วยังสามารถดึงดูด CCR4-NOT and PAN deadenylase complexes (203-204) ทำให้เห็นว่าโปรตีนนี้มีความสัมพันธ์กับ CCR4-NOT transcription complex subunit 1 (CNOT1) และ CCR4-NOT transcription complex subunit 3 (CNOT3) ซึ่ง CNOT1 และ CNOT3 เป็น scaffolding component ของ CCR4-NOT complex ซึ่งเป็น 1 ใน mRNA deadenylases หลัก และเชื่อมโยงกับกระบวนการของเซลล์หลากหลาย รวมถึง mRNA degradation, การยับยั้ง miRNA, ยับยั้งการแปลรหัสในระหว่างเริ่มแปลรหัสและควบคุมการถอดรหัสทั่วไป (205-209) พบว่ามีความสัมพันธ์กับ TATA-binding protein-associated factor 172 (BTAF1) ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสโดยทำงานร่วมกับ TATA binding protein (TBP) โดยจะทำการนำ TBP ออกจาก TATA box (210) ซึ่งสัมพันธ์กับ CNOT1 โดยพบว่าเป็นตัวยับยั้งสำหรับการถอดรหัสเหมือนกันโดยจะทำการยับยั้งที่ยีนต่างกัน (211)

ในส่วนของโปรตีน Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B (EIF3B) เป็นส่วนประกอบของ eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับการเริ่มต้นในการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis) โดย eIF-3 complex จะเกี่ยวข้องกันกับ 40S ribosome และทำการดึงดูด eIF-1, eIF-1A, eIF-2 และ eIF-5 เพื่อสร้าง 43S pre-initiation complex (43S PIC) ซึ่ง eIF-3 complex ยังทำการดึงดูด mRNA มายัง 43S PIC (212) พบว่ามีความสัมพันธ์กับโปรตีน Eukaryotic translation initiation factor 4E (EIF4E) โดยพบว่า EIF3B และ EIF4E สามารถจับกันได้โดยเป็นตัวเริ่มในการสร้างโปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่ามี ความสัมพันธ์กับโปรตีน initiation factor 4-gamma (EIF4G1) โดยโปรตีน EIF4E สามารถจับกับ EIF4G1 ได้ด้วย (213-214) แล้วในส่วนโปรตีน CNOT1 ที่มีความสัมพันธ์กับ EIF4E นั้น เนื่องมาจากมี

ความเกี่ยวข้องกันในเรื่องการยับยั้งการสร้างโปรตีน ซึ่งโปรตีน EIF4E มีบทบาทในการเริ่มการสร้างโปรตีน (215) ในส่วนของโปรตีน serine/arginine repetitive matrix protein 1 (SRRM1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นส่วนของ pre- และ post-splicing multiprotein mRNP complexes เกี่ยวข้องกับการจัดการ pre-mRNA โดยพบว่ามีความสัมพันธ์กับโปรตีน EIF4E ในฐานข้อมูลของ curated (216-218)

ในส่วนของโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีน cyclooxygenase-2 (Prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2, COX-2) โดย COX-2 เป็น enzyme ที่ทำหน้าที่ catalyze ในกระบวนการสร้าง prostaglandins, PGs และ Thromboxane, TX โดยจะเปลี่ยน arachidonic acid ให้เป็น PGG₂ และ PGH₂ ซึ่ง PGH₂ จะถูกเปลี่ยนให้เป็นสาร PGD₂, PGE₂, PGF₂α, PGI₂ หรือ prostacyclin และ TXA₂ ด้วย enzyme ที่แตกต่างกัน (219) ซึ่งพบว่ามีสัมพันธ์กับโปรตีนอื่นๆ อย่างชัดเจนอีก 2 ชนิด ได้แก่ dehydrogenase/reductase SDR family member 9 (DHRS9) และ toll-like receptor 2 (TLR2) โดยโปรตีน DHRS9 ซึ่งเป็น 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase มีหน้าที่เปลี่ยน 3-alpha-tetrahydroprogesterone (allopregnanolone) ให้เป็น dihydroxyprogesterone และเปลี่ยน 3-alpha-androstanediol ให้เป็น dihydroxyprogesterone พบว่ามีการโยงความสัมพันธ์กับ PTGS2 โดยมีงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการยับยั้ง DHRS9 จะทำให้การแสดงออกของ PTGS2 เพิ่มขึ้น (220-221) ส่วนโปรตีน toll-like receptor 2 (TLR2) ซึ่งมีหน้าที่ทำงานร่วมกับ toll-like receptor 1 (TLR1) และ toll-like receptor 6 (TLR6) ในการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันสืบทอด (innate immunity) ต่อ lipoprotein ของแบคทีเรีย (222) แล้วยังสามารถทำงานผ่าน MYD88 และ TRAF6 นำไปสู่การกระตุ้น NF-kappa-B ทำให้เกิดการตอบสนองต่อการอักเสบและการหลั่ง cytokine รวมทั้งทำให้เกิด apoptosis ในการตอบสนองต่อ lipoprotein (223) ซึ่งจะเห็นได้ว่าโปรตีนที่กล่าวไปในกลุ่มนี้จะมี ความเกี่ยวข้องกับการอักเสบโดยตรง

ในส่วนของโปรตีนกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ย่อยอื่นๆ ซึ่งได้แก่ aldose reductase (AKP1B1), amine oxidase [flavin-containing] B (MAOB), sodium-dependent serotonin transporter (SLC6A4), phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT), titin (TTN), Hexokinase-1(HK1), DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1 (POLR1A) และ Pyruvate kinase PKLR (PKLR) จากความสัมพันธ์ที่ได้พบว่า titin เป็นส่วนประกอบหลักในการทำหน้าที่ของกล้ามเนื้อลาย (straight muscle) โดยจะเชื่อมต่อกับส่วนของ microfilament ช่วยในการปรับสมดุลของแรงระหว่าง 2 ส่วนของ sarcomere และในเซลล์ที่ไม่ใช่กล้ามเนื้อนั้นดูเหมือนว่าจะมี

บทบาทในการหดตัวและแยกตัวของโครโมโซมระหว่างกระบวนการ mitosis (224) ส่วน titin นั้นจะมีความสัมพันธ์กับ telethonin (TCAP) โดยจะประกอบกับ telethonin ที่ซึ่งเป็น sacromeric protein ที่ N-terminal ของ titin (225) ซึ่งจะพบว่า TCAP มีความสัมพันธ์กับ phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) เนื่องจากยีน TCAP นั้นพบอยู่บนโครโมโซม 17q12 ซึ่งอยู่ติดกันกับยีน PNMT (226) ซึ่งหน้าที่ของโปรตีน PNMT นั้น จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยน norepinephrine ให้เป็น epinephrine ในกระบวนการสร้างสารกลุ่ม catecholamines (227) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ amine oxidase [flavin-containing] B (MAOB) ที่เป็นเอนไซม์ที่พบในการสลาย สารในกลุ่ม catecholamines (228-229) นอกจากนี้ MAOB พบว่ามีความสัมพันธ์โดยตรงกับ serotonin เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่เกี่ยวกับ metabolism ของ neuroactive และ vasoactive amine โดย serotonin เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ซึ่งมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าเมื่อขาด MAOB จะทำให้ระดับของ serotonin สูงขึ้น(230)ส่วน aldose reductase (EC 1.1.1.21) (AKR1B1) นั้นพบว่ามีความสัมพันธ์กับ MAOB เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกระบวนการ metabolism ของสารกลุ่ม catecholamine เหมือนกัน (231-232) นอกจากนี้ Sodium-dependent serotonin transporter (SLC6A4, 5-HTT) ยังมีความสัมพันธ์กับ serotonin โดยการทำหน้าที่ขนส่ง serotonin จากร่อง synapse กลับสู่บริเวณปลาย synapse เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ (233-234) ในส่วนของโปรตีน Pyruvate kinase PKLR (PKLR) ซึ่งมีบทบาทในกระบวนการ glycolysis พบว่ามีความสัมพันธ์กับโปรตีน DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1 (POLR1A) ผ่าน purine metabolism pathway (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa00230) โดยโปรตีน POLR1A จะช่วยเร่งการถอดรหัสจาก DNA ไปเป็น RNA โดยใช้ 4 ribonucleoside triphosphate เป็น substrate นอกจากนี้โปรตีน PKLR ยังพบว่าสัมพันธ์กับโปรตีน hexokinase-1 (HK1) ผ่านกระบวนการ glycolysis ด้วยซึ่ง HK1 เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้น้ำตาลกลูโคส (glucose)

จากผลที่ได้ในการหาความสัมพันธ์ของโปรตีนด้วยโปรแกรม STITCH 4.0 จากโปรตีนจำนวน 310 ชนิด ที่ได้มาหลังจากทำการกระตุ้น PAR2 ด้วย peptide สังเคราะห์ SLIGKV แล้วจะสามารถกระตุ้นให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบให้เกิดการสร้างโปรตีนที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพที่สำคัญต่างๆหลายกลุ่ม ไม่ว่าจะเป็น โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis, โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสและแปลรหัสสารพันธุกรรม, โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินไปหรือการหยุด cell cycle, โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของเซลล์ และรวมถึงโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบด้วย

4.2 การอภิปรายผล

จากผลที่ได้เมื่อทำการกระตุ้น PAR2 บนผิวเซลล์กล้ามเนื้อเรียบด้วย SLIGKV เปปไทด์ที่จำเพาะกับ PAR2 ทำให้โปรตีนทั้งหมดจำนวน 310 ชนิด โดยพบว่ามีโปรตีน 135 ชนิด ที่มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของระดับโปรตีนมากกว่า 2 เท่า มาจากกลุ่มที่ได้เปรียบเทียบกับ 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเซลล์คอนโทรล 48 ชั่วโมงเทียบกับกลุ่มเซลล์ทดสอบ 48 ชั่วโมง และกลุ่มเซลล์คอนโทรล 72 ชั่วโมงเทียบกับกลุ่มเซลล์ทดสอบ 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.3) ซึ่งเมื่อใช้โปรแกรม STITCH 4.0 (<http://stitch.embl.de/>) ซึ่งเป็นโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ จะทำให้เราสามารถหาความสัมพันธ์ของโปรตีนที่ได้จากการวิจัยนี้โดยพบว่าโปรตีนที่ได้จากการวิจัยมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพที่สำคัญหลายกลุ่มดังนี้

4.2.1 โปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ

จากการวิจัยพบว่ามีกลุ่มของโปรตีนบางชนิดที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ซึ่งโปรตีนในกลุ่มนี้มีการเปลี่ยนแปลงระดับการสร้างโปรตีนที่มากกว่า 2 เท่า เมื่อมีการกระตุ้น PAR2 ได้แก่ amine oxidase [flavin-containing] B (MAOB), Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130 (CD163), Cyclooxygenase-2 (PTGS2), complement component C1q receptor (CD93) และ interleukin-25 (IL-25) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับโปรตีนหรือสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบต่างๆนอกจากนี้ยังมีโปรตีนบางชนิดที่มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบแต่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนไม่ถึง 2 เท่า อย่างเช่น Toll-like receptor 2 (TLR2) และ interleukin-17 receptor E (IL-17RE) (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ตารางแสดงโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนเมื่อเทียบกับ control สูงกว่า 2 เท่า และหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของโปรตีนนั้นๆ

Protein name	Function	ID score	Ctrl 48 hr.	Test 48 hr.	log ₂ fold 48 hr.	Ctrl 72 hr.	Test 72 hr.	log ₂ fold 72 Hr.
Cyclooxygenase-2 (PTGS2),	Stimulate inflammation	9.42	2.84	0	2.84*	0	2.96	2.96
amine oxidase [flavin-containing] B (MAOB)	Catalyze vasoactive amine	16.69	0.67	0	0.67*	6.71	3.15	3.56*
Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130 (CD163)	Phagocyte hemoglobin/haptoglobin complex	14.25	1.47	0	1.47*	1.62	8.07	6.45
complement component C1q receptor (CD93)	Phagocyte immune complex	18.02	7.13	1.73	5.40*	6.24	5.4	0.84*
interleukin-25 (IL-25)	Stimulate inflammation	23.35	1.39	4.05	2.66	5.43	0	5.43*
Toll-like receptor 2 (TLR2)	Stimulate inflammation	5.16	2.07	3.17	1.10	1.92	0	1.92*
interleukin-17 receptor E (IL-17RE)	Stimulate inflammation	9.23	5.41	7.05	1.64	8.24	7.19	1.05*

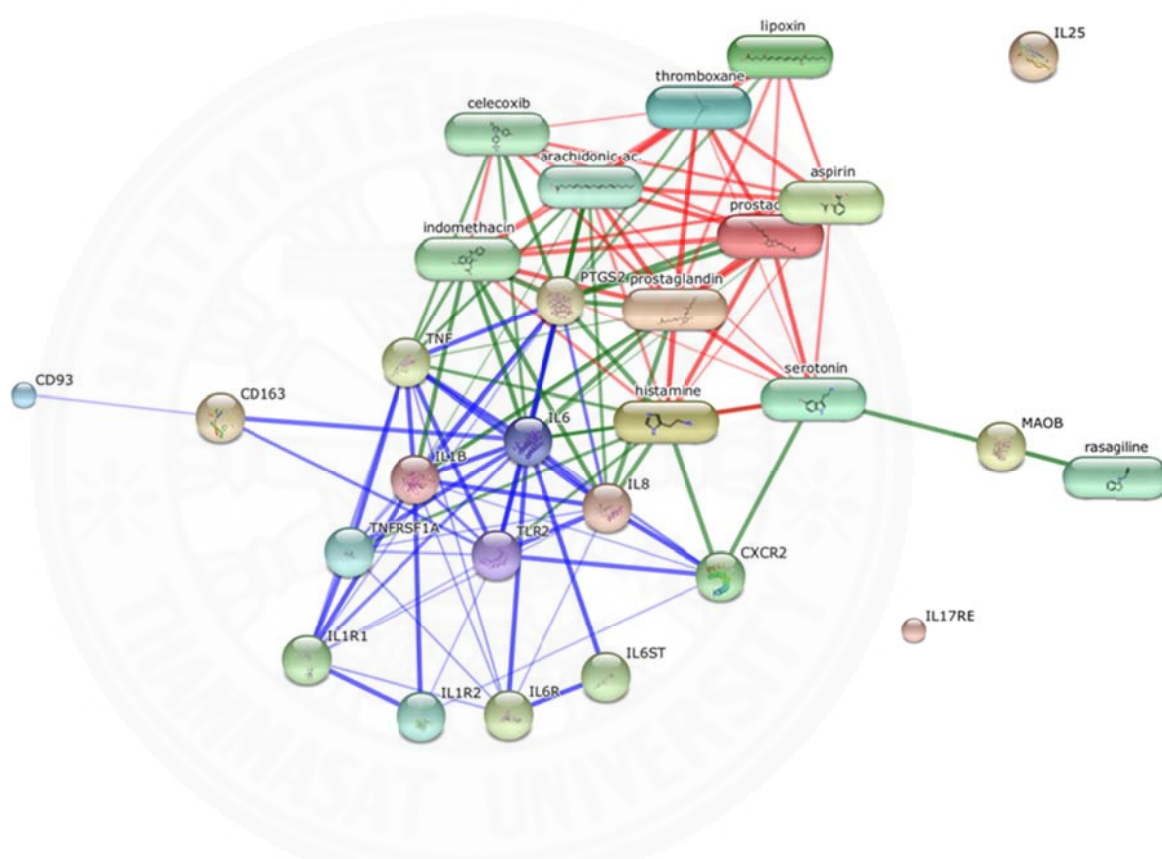
หมายเหตุ ค่าในตารางเป็นค่า log₂ ฐาน 2 และ * หมายถึงมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับ control

จากตาราง 4.4 จะพบว่าโปรตีนที่มีโปรตีน 7 ชนิดที่พบว่ามีมีความเกี่ยวข้องกับการกระบวนการอักเสบแล้วมีการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนที่มากกว่า 2 เท่า ซึ่งเมื่อดูระดับการเปลี่ยนแปลงแล้วจะพบว่าโปรตีน 2 ชนิดที่มีการลดระดับลงเมื่อเทียบกับ control ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ได้แก่ โปรตีน MAOB และ CD93 โดยหน้าที่ของโปรตีน MAOB นี้สามารถสลายสารที่เป็น neuroactive และ vasoactive amine อย่างเช่น serotonin ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้ (235) ดังนั้นการกระตุ้น PAR2 จึงมีบทบาทในการลดการสร้างโปรตีนที่สามารถสลายสารในกลุ่ม neuroactive และ vasoactive amine ได้ ซึ่งสารในกลุ่มนี้ก็มีบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ส่วนของโปรตีน complement component C1q receptor (CD93) พบว่าเป็น receptor สำหรับ C1q, MBL และ SPA มีหน้าที่ในการช่วยเพิ่มความสามารถในการ phagocytosis ให้กับ monocyte และ macrophage ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมจากร่างกาย ซึ่งเป็นกลไกในการปกป้องร่างกาย โดยพบว่า 48 ชั่วโมงหลังกระตุ้น PAR2 มีการลดระดับของโปรตีน MAOB และ CD93 ลง 0.67 และ 5.4 ตอบสนองต่อการอักเสบแต่ก็มีงานวิจัยหลายงานที่แสดงให้เห็นถึงบทบาทของ PTGS2 ในการต้านการอักเสบ อย่างเช่นสารในกลุ่ม electrophilic fatty acid ที่ถูกสร้างขึ้นระหว่างการอักเสบ สามารถควบคุมการตอบสนองต่อการอักเสบ โดย electrophilic oxo-derivatives (EFOX) จาก omega-3 fatty acids docosahexaenoic acid (DHA) และ docosapentaenoic acid (DPA) ซึ่งถูกสร้างมาจาก PTGS2 สามารถทำหน้าที่เป็น peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ)

โดยยับยั้งการผลิต cytokine ที่ทำให้เกิดการอักเสบและ nitric oxide (236-239) นอกจากนี้สารในกลุ่ม PGs ต่างๆ ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากการเปลี่ยน PGH2 ซึ่งรู้จักกันดีว่ามีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบ (240) แต่ก็มีงานวิจัยหลายงานที่แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติในการต้านการอักเสบของสารในกลุ่ม PGs อย่าง PGE2 หรือ PGD2 (241-243) นอกจากนี้ PTGS2 ยังมีความเกี่ยวข้องในการลด apoptosis จากโปรตีน TP53 ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ในส่วนของโปรตีน Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130 (CD163) นั้น ซึ่งมีบทบาทในการเป็นสารต้านการอักเสบ โดยเป็น receptor ที่มีบทบาทในการกำจัด hemoglobin/haptoglobin complex โดย macrophage เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อถูกทำลายจาก Hemoglobin ซึ่งจากงานวิจัยของเราซึ่งพบว่าโปรตีน PTGS2 และ CD163 มีระดับของโปรตีนที่ 48 ชั่วโมง ลดลง 2.84 และ 1.47 เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับ control แล้วมีการเพิ่มขึ้น 2.96 และ 6.45 เท่าตามลำดับ ที่เวลา 72 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับ control ซึ่งอาจแสดงถึงบทบาทของ PAR2 ในระยะยาว (long term effect) ที่มีผลในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีน PTGS2 และ CD163 ได้ ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการอักเสบจากการทำงานของโปรตีน PTGS2 และยังสามารถส่งผลให้มีการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน CD163 อีกด้วย

กลุ่มสุดท้ายจะเป็นกลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีน ซึ่งพบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมงมีการเพิ่มสูงขึ้น แล้วที่ 72 ชั่วโมงมีการลดลง เมื่อทำการเทียบกับคอนโทรล ซึ่งกลุ่มนี้พบโปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ IL-25, IL-17RE และ TLR2 โดยส่วนของโปรตีน IL-25 หรือเรียกอีกชื่อว่า IL-17E สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-8 ซึ่งเป็น cytokine ที่ช่วยให้เกิดการอักเสบแล้วยังสามารถกระตุ้น NF- κ B ได้ (244) ในส่วนของโปรตีน Toll-like receptor 2 (TLR2) ซึ่งทำงานผ่าน MYD88 และ TRAF6 ทำให้เกิดการกระตุ้น NF- κ B เกิดการหลั่ง cytokine อย่างเช่น IL-1 β , IL-6, และ IL-8 รวมทั้งตอบสนองต่อการอักเสบได้ (245-246) ส่วนโปรตีน Interleukin-17 receptor E (IL17RE) ซึ่งเป็น receptor จำเพาะสำหรับ IL-17C ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ, chemokine และสารต้านจุลชีพต่างๆ ซึ่งอาจส่งสัญญาณผ่านวิถี NF- κ B และ MAPK (247-248) ซึ่งผลที่ได้จากการวิจัยพบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมงพบระดับ IL-25, TLR2 และ IL17RE สูงขึ้น 2.66, 1.10 และ 1.64 เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มคอนโทรล ซึ่งชี้ให้เห็นถึงการตอบสนองต่อการอักเสบหลังจากกระตุ้น PAR2 แต่ผลที่ 72 ชั่วโมงพบว่ามีการลดระดับของโปรตีนทั้ง 3 ชนิด 5.43, 1.92 และ 1.05 เท่า ซึ่งบางโปรตีนอย่าง IL-25 และ TLR2 ลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้เมื่อเทียบกับกลุ่มคอนโทรล อาจเป็นไปได้ว่าการกระตุ้น PAR2 อาจส่งผลในระยะสั้นต่อการสร้างโปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้ ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และอาจก่อให้เกิดการกระตุ้นการอักเสบที่เพิ่มสูงขึ้นได้

เมื่อนำโปรตีนทั้ง 7 ชนิดมาทำการหาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนด้วยโปรแกรม STITCH 4.0 แล้วทำการใส่สารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบลงไปเพื่อช่วยในการหาความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบอย่าง histamine, serotonin, TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, lipoxin, aspirin, thromboxane, prostaglandin และ prostacyclin ลงไป พบว่าได้ความสัมพันธ์ดังรูป (รูปภาพที่ 4.11)



รูปภาพที่ 4.11 ภาพแสดงความสัมพันธ์ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ 7 ชนิด หลังทำการใส่สารเคมีหรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบลงไปเพื่อช่วยในการหาความสัมพันธ์ (สัญลักษณ์วงกลมแสดงถึงโปรตีน และสัญลักษณ์แคปซูลแสดงถึงสารเคมี ส่วนเส้นสีแดงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารเคมีกับสารเคมี, เส้นสีเขียวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารเคมีกับโปรตีน และเส้นสีน้ำเงินแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน)

จากรูปจะพบว่าโปรตีน MAOB มีการโยงความสัมพันธ์กับ serotonin ที่เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ส่วนโปรตีนอื่นอย่าง PTGS2 พบว่ามีความเกี่ยวข้องมากมากับการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ อย่างสารในกลุ่ม prostaglandins เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่สร้างสารในกลุ่มนี้อยู่แล้ว แล้วโปรตีนอื่นๆอย่าง CD93, CD 163 และ TLR2 ก็พบว่าการโยงความสัมพันธ์กับสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบอย่าง proinflammatory cytokine แต่ว่ามีโปรตีน 2 ชนิด ได้แก่ IL-25 และ IL-17RE ไม่พบว่าการโยงความสัมพันธ์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าโปรตีน 2 ชนิดนี้ยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษาไว้มากนักถึงบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ดังนั้นจากผลการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการสนับสนุนบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของโปรตีน IL-25 และ IL-17RE ว่าเป็นโปรตีนใหม่ที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการอักเสบ เมื่อมีการกระตุ้น PAR2 เกิดขึ้น

4.2.2 โปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับ apoptosis และ proliferation

จากงานวิจัยพบว่า มีโปรตีนอีกกลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนที่มากกว่า 2 เท่าซึ่งโปรตีนในกลุ่มนี้พบว่าส่วนใหญ่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis และมีบางโปรตีนบางชนิดที่มีความเกี่ยวข้องกับการ proliferation ของเซลล์ โดยเราพบว่าในกลุ่มนี้มีโปรตีน 11 ชนิด ได้แก่ Cyclooxygenase-2 (PTGS2), Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1 (BAIAP2L1), Protein SET (SET), Apoptosis-stimulating of p53 protein 2 (TP53BP2), serine/threonine-protein kinase VRK2 (VRK2), Calcium and integrin-binding protein 1 (CIB1) และ Antigen KI-67 (MKI67), TOX high mobility group box family member 3 (TOX3), dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MAP2K5), low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) และ calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1 (CAMK2N1) (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 ตารางแสดงโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนเมื่อเทียบกับ control สูงกว่า 2 เท่า และหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการ apoptosis และ proliferation ของโปรตีนนั้นๆ

Protein name	Function	ID score	Ctrl 48 hr.	Test 48 hr.	log ₂ fold 48 hr.	Ctrl 72 hr.	Test 72 hr.	log ₂ fold 72 Hr.
Cyclooxygenase-2 (PTGS2)	Inhibit apoptosis	9.42	2.84	0	2.84*	0	2.96	2.96
Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1 (BAIAP2L1)	Inhibit apoptosis	5.76	0	2.63	2.63	3.19	3.88	0.69
Protein SET (SET)	Inhibit apoptosis	2.67	2.06	0.34	1.72*	5.12	2.22	2.90*
Apoptosis-stimulating of p53 protein 2 (TP53BP2)	Stimulate apoptosis	32.31	7.67	0	7.67*	9.35	0	9.35*
serine/threonine-protein kinase VRK2 (VRK2)	Inhibit apoptosis	17.55	5.42	3.49	1.93*	2.10	4.60	2.50
Calcium and integrin-binding protein 1 (CIB1)	Inhibit apoptosis	1.48	3.63	5.72	2.09	1.61	5.57	3.96
TOX high mobility group box family member 3 (TOX3)	Inhibit apoptosis	6.11	0.12	3.85	3.73	5.58	2.52	3.06*
dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MAP2K5)	Inhibit apoptosis	17.15	9.11	2.27	6.84*	1.63	10.98	9.35
low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6)	Inhibit apoptosis and proliferation	10.95	4.76	0	4.76*	5.85	7.11	1.26
calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1 (CAMK2N1)	Stimulate Cell cycle arrest	10.83	0	4.25	4.25	4.19	0	4.19*
Antigen KI-67 (MKI67)	proliferation	28.43	4.91	0.26	4.65*	5.86	6.12	0.26

หมายเหตุ ค่าในตารางเป็นค่า log₂ ฐาน 2 และ * หมายถึงมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับ control

จากตาราง 4.5 จะพบว่าโปรตีนที่มีโปรตีน 11 ชนิดที่พบว่ามีค่าความสัมพันธ์กับกระบวนการ apoptosis และ proliferation แล้วมีการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนที่มากกว่า 2 เท่า ซึ่งเมื่อดูระดับการเปลี่ยนแปลงแล้วจะพบว่าโปรตีน 2 ชนิดที่มีการลดระดับลงเมื่อเทียบกับ control ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ได้แก่ โปรตีน SET และ TP53BP2 ซึ่งโปรตีน SET เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่หลากหลาย รวมถึงเกี่ยวข้องกับ apoptosis พบว่า SET สามารถที่จะจับกับ TP53 เพื่อทำการยับยั้งกระบวนการ acetylation ของ TP53 ทำให้เกิดการยับยั้ง cell cycle arrest และ apoptosis ที่เกิดจาก p53 ซึ่งเป็นบทบาทในการกระตุ้นการเกิดมะเร็ง (159) แต่ว่ามีงานวิจัยบางงานที่แสดงให้เห็นถึงบทบาทในการเป็นตัวยับยั้งมะเร็งของโปรตีน SET โดยพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ในช่วงของ G1/S เฟสใน cell cycle และยังยับยั้ง MEK/ERK pathway จากการกระตุ้นโดยปัจจัยภายนอกได้ (249) ในส่วนหน้าที่ของโปรตีน Apoptosis-stimulating of p53

protein (TP53BP2) พบว่ามีบทบาทในการควบคุม apoptosis โดยจะเพิ่มความสามารถของ p53 ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน pro-apoptotic แล้วยังยับยั้งความสามารถของ APPBP1 ในการช่วยให้เกิดการ conjugate ของ NEDD8 กับ CUL1 ดังนั้นจึงเป็นการกระตุ้นให้เกิด apoptosis และ ชัดขวาง cell cycle progression ที่เฟส G2/M (114, 250) ทำให้เห็นถึงบทบาทในการเป็นตัวยับยั้ง มะเร็งของโปรตีน TP53BP2 ซึ่งมีการแสดงออกที่ลดลงในมะเร็งหลายๆชนิดของมนุษย์ (115) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาต่อไปโดยพบว่า TP53BP2 และ p53 มีการทำงานร่วมกันในการทำหน้าที่ เป็นตัวยับยั้งมะเร็ง โดยที่ ASPP2 สามารถจับกับ p53 ได้ (116-119) โดยพบว่าจากผลการวิจัยทั้ง โปรตีน SET และ TP53BP2 นี้มีการลดระดับลงที่เวลา 48 ชั่วโมง 1.72 และ 7.67 เท่าตามลำดับและ ที่เวลา 72 ชั่วโมงลดลง 2.9 และ 9.35 เท่าตามลำดับเมื่อเทียบกับ control ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการ กระตุ้น PAR2 จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสร้างโปรตีน TP53BP2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยส่งเสริมให้ เกิดการ apoptosis แล้วพบว่าโปรตีน SET นั้นแม้จะมีการลดลงของระดับโปรตีน แต่พบว่าเมื่อเวลา ผ่านไปมีการสร้างของโปรตีนนี้เพิ่มสูงขึ้น โดยพบว่าในกลุ่มทดสอบที่ 72 ชั่วโมงมีระดับโปรตีนสูงกว่า 48 ชั่วโมง 6.52 เท่า ซึ่งจากผลที่ได้เป็นไปได้ว่า PAR2 อาจมีบทบาทในการยับยั้งการเกิด apoptosis ผ่านการยับยั้ง TP53BP2 แล้วอาจมีผลต่อโปรตีน SET ในระยะยาวเมื่อเวลาผ่านไปโปรตีนชนิดนี้จึง ค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นทำให้ cell survival มากขึ้นแล้วอาจส่งผลต่อเซลล์โดยทำให้มีการลดลงของ apoptosis ได้

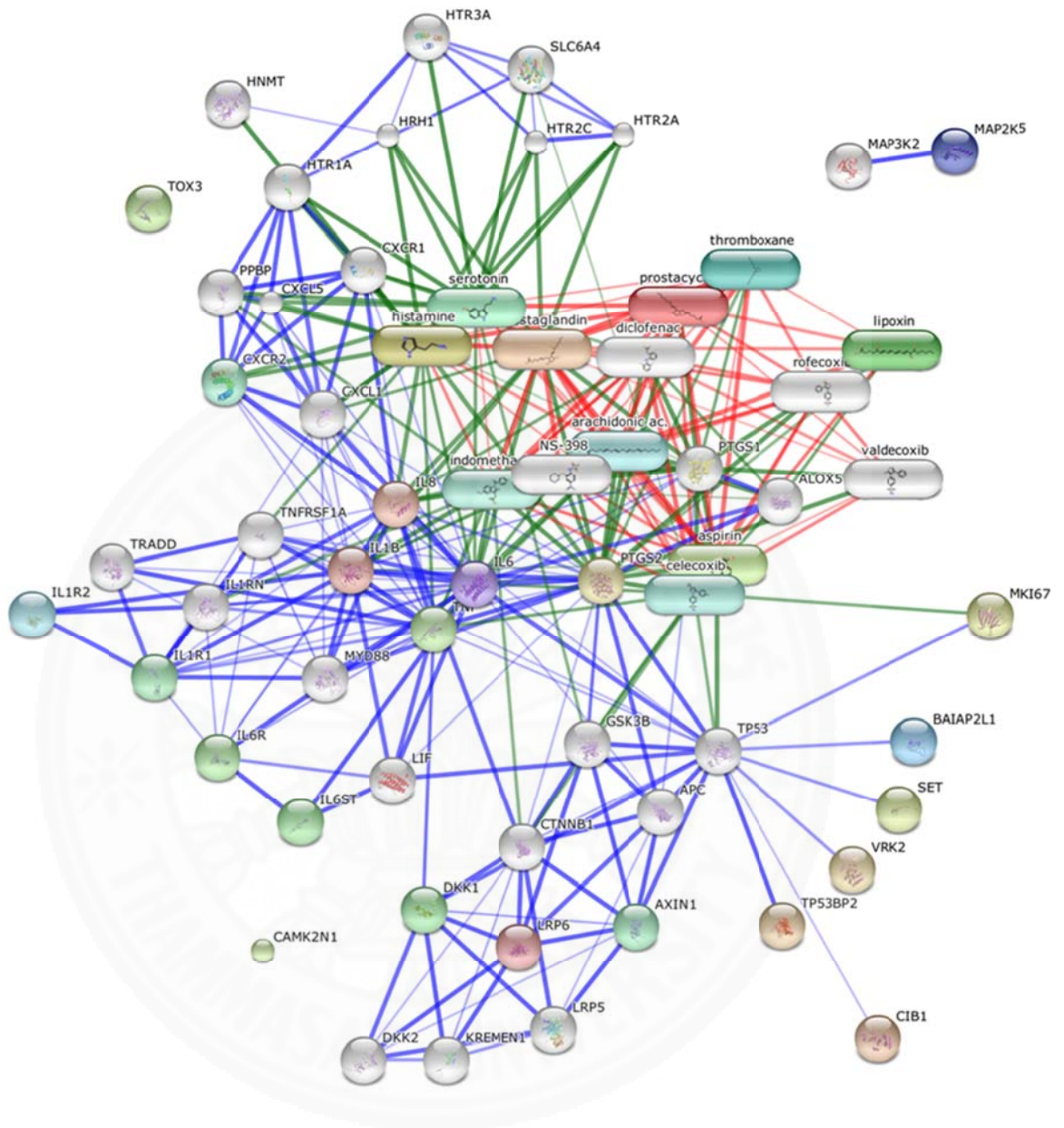
กลุ่มต่อมาจะพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีน ซึ่งพบว่า มีการเพิ่ม สูงขึ้นมากกว่า 2 เท่า ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง โดยพบโปรตีน 2 ชนิดในกลุ่มนี้ ได้แก่ BAIAP2L1 และ CIB1 ซึ่งโปรตีน brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1 (BAIAP2L1) โดยจากการศึกษาวิจัยพบว่าหน้าที่ของ BAIAP2L1 สามารถควบคุมกลุ่มของ actin ในระหว่างการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้ (47) นอกจากนี้ยังพบว่ามีข้องเกี่ยวกับการย้ายที่ของ เซลล์ (cell migration) ผ่านการกระตุ้นของ Src (154) ในส่วนของการเกิดเนื้องอก (tumorigenesis) นั้นมีรายงานพบว่ามีส่วนช่วยในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผ่านการกระตุ้นวิถี (pathway) EGFR-ERK ในมะเร็งของเซลล์ตับ (hepatocellular carcinoma) (251) นอกจากนี้ยังมี รายงานว่าพบการเพิ่มสูงขึ้นของ BAIAP2L1 ในมะเร็งรังไข่ (ovarian cancers) (252) ในส่วนของ ความสัมพันธ์กับโปรตีน p53 พบว่า BAIAP2L1 สามารถจับกับ p53 ส่งผลให้เกิดการยับยั้ง apoptosis ได้ (253) ส่วนโปรตีน CIB1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่หลากหลาย ซึ่งมีงานวิจัยที่พบว่า CIB1 มีความเกี่ยวข้องกับการลด apoptosis โดย CIB1 สามารถทำปฏิกิริยากับ SK1 (sphingosine kinase 1) ช่วยในการย้าย SK1 ไปยัง plasma membrane ซึ่ง SK1 เป็นโปรตีนที่ช่วยในการเพิ่ม จำนวนของเซลล์, ป้องกัน apoptosis ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย TNF α และช่วยในการเกิดเนื้องอก

(254) จากการวิจัยพบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมงมีการเพิ่มระดับของโปรตีน BAIAP2L1 และ CIB1 ขึ้น 2.63 และ 2.09 เท่าตามลำดับ แล้วที่เวลา 72 ชั่วโมงมีการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีน 2 ชนิดนี้ 0.69 และ 3.96 ตามลำดับ จากผลที่ได้นี้อาจชี้ให้เห็นว่าเมื่อ PAR2 ถูกกระตุ้นส่งผลให้เกิดการสร้างโปรตีน BAIAP2L1 และ CIB1 ขึ้นมาทันที แสดงถึงการส่งผลในระยะสั้น (short term effect) ของ PAR2 ที่มีต่อโปรตีน BAIAP2L1 ซึ่งจากหน้าที่ของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้อาจส่งผลทำให้มีการลดลงของ apoptosis หรือมี cell survival เพิ่มขึ้นได้

กลุ่มต่อมาจะพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีน ซึ่งพบว่า มีการเพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 2 เท่า ที่เวลา 48 และลดลงที่เวลา 72 ชั่วโมง โดยพบโปรตีน 2 ชนิดในกลุ่มนี้ ได้แก่ TOX3 และ CAMK2N1 โดยหน้าที่ของ TOX3 ซึ่งเป็น transcriptional coactivator ของ p300/CBP-mediated transcription complex โดยกระตุ้นที่บริเวณ cAMP response element (CRE) ซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิด apoptosis โดยกระตุ้นให้มีการถอดรหัสยีนที่ป้องกัน apoptosis และยับยั้งการถอดรหัสยีนที่กระตุ้นให้เกิด apoptosis (255) ส่วนโปรตีน CAMK2N1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งโปรตีน Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CAMK2) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเมื่อมีการแสดงออกของ CAMK2N1 สูง จะพบว่ามี การยับยั้งการเจริญเติบโตของ colon adenocarcinoma โดยการหยุด cell cycle ที่ S-phase และเมื่อมีการแสดงออกลดลงของ CAMK2N1 พบว่ามี การเร่งการเจริญเติบโตของเนื้องอกพร้อมทั้งมีการดำเนินของ cell cycle (256) จากผลการวิจัยพบว่า ที่เวลา 48 ชั่วโมง โปรตีน TOX3 และ CAMK2N1 มีการเพิ่มระดับสูงขึ้น 3.73 และ 4.25 เท่าตามลำดับ แล้วเมื่อเวลาผ่านไปที่ 72 ชั่วโมงพบว่ามี การลดระดับของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดลง 3.06 และ 4.19 เท่าตามลำดับ เท่า ซึ่งจากผลการวิจัยแสดงให้เห็นถึงบทบาทของ PAR2 ในการส่งผลระยะสั้นต่อโปรตีน TOX3 ในการทำให้เซลล์มีชีวิตรอด โดยอาจลด apoptosis ได้ นอกจากนี้พบว่าใน control ที่มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน CAMK2N1 นั้น จะส่งผลให้เซลล์มี cell cycle arrest มากขึ้น แต่ในกลุ่มเซลล์ทดสอบที่มีการลดลงของโปรตีนนี้จะส่งผลให้เซลล์มี cell cycle arrest น้อยลง อาจมีส่วนช่วยให้เซลล์มีการตายน้อยลงและรอดชีวิตเพิ่มมากขึ้น ซึ่งผลสอดคล้องกับผลที่ได้จากโปรตีนอื่นๆ

กลุ่มสุดท้ายจะพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีน ซึ่งพบว่า ที่ 48 ชั่วโมงจะมีการลดระดับโปรตีนลง แล้วจึงเพิ่มขึ้นที่เวลา 72 ชั่วโมง โดยพบโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มนี้ 5 ชนิด ได้แก่ PTGS2, VRK2, MAP2K5, LRP6 และ MKI67 ซึ่งหน้าที่ของโปรตีน PTGS2 สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน p53 ได้ ซึ่งจะทำให้เกิดการยับยั้ง apoptosis ที่เกิดจากโปรตีน TP53 (257-258) ส่วนของโปรตีน VRK2 ซึ่งมี 2 ไอโซฟอร์ม (isoform) คือ VRK2A ซึ่งประกอบด้วย 508 amino acid

พบใน cytoplasm โดยฝังอยู่ใน endoplasmic reticulum และ VRK2B ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มที่สั้นกว่า ถูกสร้างมาจากการ alternate splicing ซึ่งหน้าที่ของ VRK2A สามารถควบคุม intrinsic apoptotic pathway ได้ 2 ทาง โดยผ่านการจับกับ Bcl-xL โดยตรง ซึ่งจะสร้าง complex ระหว่าง Bcl-xL และ Bax ส่งผลให้มีการลดลงของการเกิด apoptosis นอกจากนี้ VRK2A มีบทบาทในการเป็นตัวควบคุมเชิงลบต่อการแสดงออกของ Bax ทำให้การเกิด apoptosis ลดลง (140) ส่วนโปรตีน dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase5 (MAP2K5) เป็นโปรตีนที่สามารถปฏิกิริยากับ ERK5 ได้ ซึ่ง ERK5 ที่ถูกกระตุ้นจะเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสแล้วกระตุ้น transcription factor ที่เรียกว่า MEF2C ได้ซึ่งส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการถอดรหัสยีน c-jun ซึ่งสามารถยับยั้ง apoptosis และทำให้ cell cycle ดำเนินไปได้ (259) แต่ใน endothelial cell พบว่า Kruppel-like factors 4 (KLF4) ซึ่งเป็นอีกเป้าหมายของ ERK5 สามารถกระตุ้นให้เกิด vasoprotective effect ไม่ว่าจะเป็นผลของการต่อต้านการอักเสบ, การลด apoptosis และลดการสร้างเส้นเลือดใหม่ (sprouting angiogenesis) (260) ส่วนของโปรตีน low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) ซึ่งเป็น receptor ร่วมกับ frizzled receptor สำหรับจับกับ Wnt ligand ซึ่งส่งผลให้ จำนวนของเซลล์ (proliferation marker) (263) จากผลการวิจัยพบว่าโปรตีน PTGS2, VRK2, MAP2K5, LRP6 และ MKI67 มีการลดระดับลง 2.84, 1.93, 6.84, 4.76, 4.65 เท่าตามลำดับ แล้วจึงเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง 2.96, 2.50, 9.35, 1.26 และ 0.26 เท่าตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า PAR2 มีบทบาทในระยะยาวต่อการสร้างโปรตีนหลายชนิดอย่าง PTGS2, VRK2, MAP2K5, LRP6 และ MKI67 ซึ่งอาจส่งผลให้มี cell survival มากขึ้น และอาจส่งผลให้เกิดการ apoptosis ที่ลดลงได้ นอกจากนี้ยังมีผลในการช่วยเกี่ยวกับการ proliferation ของเซลล์อีกด้วย



รูปภาพที่ 4.12 ภาพแสดงความสัมพันธ์ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis และ proliferation 11 ชนิด หลังทำการใส่สารเคมีหรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบลงไปเพื่อช่วยในการหาความสัมพันธ์

จากรูปที่ 4.12 เมื่อทำการหาความสัมพันธ์ของโปรตีนด้วยโปรแกรม stitch 4.0 โดยใส่สารเคมีหรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบลงไปด้วย จะพบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้ อย่าง TP53BP2, C1B1, VRK2, SET, BAIAP2L1 และ PTGS2 จะมีการโยงความสัมพันธ์ไปยังโปรตีน TP53 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis โดยโปรตีน TP53 ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการเกิดมะเร็ง ที่สามารถกระตุ้นกระบวนการ apoptosis โดยกระตุ้นการแสดงออกของ BAX และ FAS antigen หรือยับยั้งการแสดงออกของ Bcl-2 (107-109) ส่วนโปรตีน LRP6 นั้นจะมีการโยงความสัมพันธ์มายังโปรตีน TP53 ผ่านโปรตีนอื่น โดยจากรูปจะพบว่าโปรตีน PTGS2 จะเป็นโปรตีนที่เป็นศูนย์กลางในการเชื่อมระหว่างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis นอกจากนี้ยังพบว่ามีโปรตีน TOX3, CAMK2N1 และ MAP2K5 ซึ่งไม่สามารถโยงความสัมพันธ์มายังกลุ่มความสัมพันธ์หลักได้ อาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน 3 ชนิดนี้ ยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษาไว้มากนักถึงบทบาทที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis หรือ proliferation ดังนั้นจากผลการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการสนับสนุนบทบาทที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis หรือ proliferation ของโปรตีน TOX3, CAMK2N1 และ MAP2K5 ว่าเป็นโปรตีนใหม่ที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับ apoptosis หรือ proliferation เมื่อกระตุ้น PAR2 เกิดขึ้น

4.2.3 โปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการย้ายที่ของเซลล์

เราพบว่าเมื่อกระตุ้น PAR2 ด้วย SLIGKV พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนที่มากกว่า 2 เท่า ของโปรตีนบางชนิดที่มีความเกี่ยวข้องกับการ migration ของเซลล์ จำนวน 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ catenin delta-1 (CTNND1), chordin (CHRD), dystroglycan (DAG1) และ golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1 (GLIPR2)

ตารางที่ 4.6 ตารางแสดงโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนเมื่อเทียบกับ control สูงกว่า 2 เท่า และหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการ migration ของโปรตีนนั้นๆ

Protein name	Function	ID score	Ctrl 48 hr.	Test 48 hr.	log ₂ fold 48 hr.	Ctrl 72 hr.	Test 72 hr.	log ₂ fold 72 Hr.
catenin delta-1 (CTNND1)	Inhibit migration	31.89	2.44	3.02	0.58	1.06	2.98	1.92
chordin (CHRD)	Inhibit migration	5.16	4.51	0	4.51*	0.34	2.80	2.46
dystroglycan (DAG1)	Inhibit migration	6.01	4.97	0	4.97*	5.04	2.30	2.74*
golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1 (GLIPR2)	Stimulate migration	19.33	1.55	0.94	0.61*	2.42	7.25	4.83

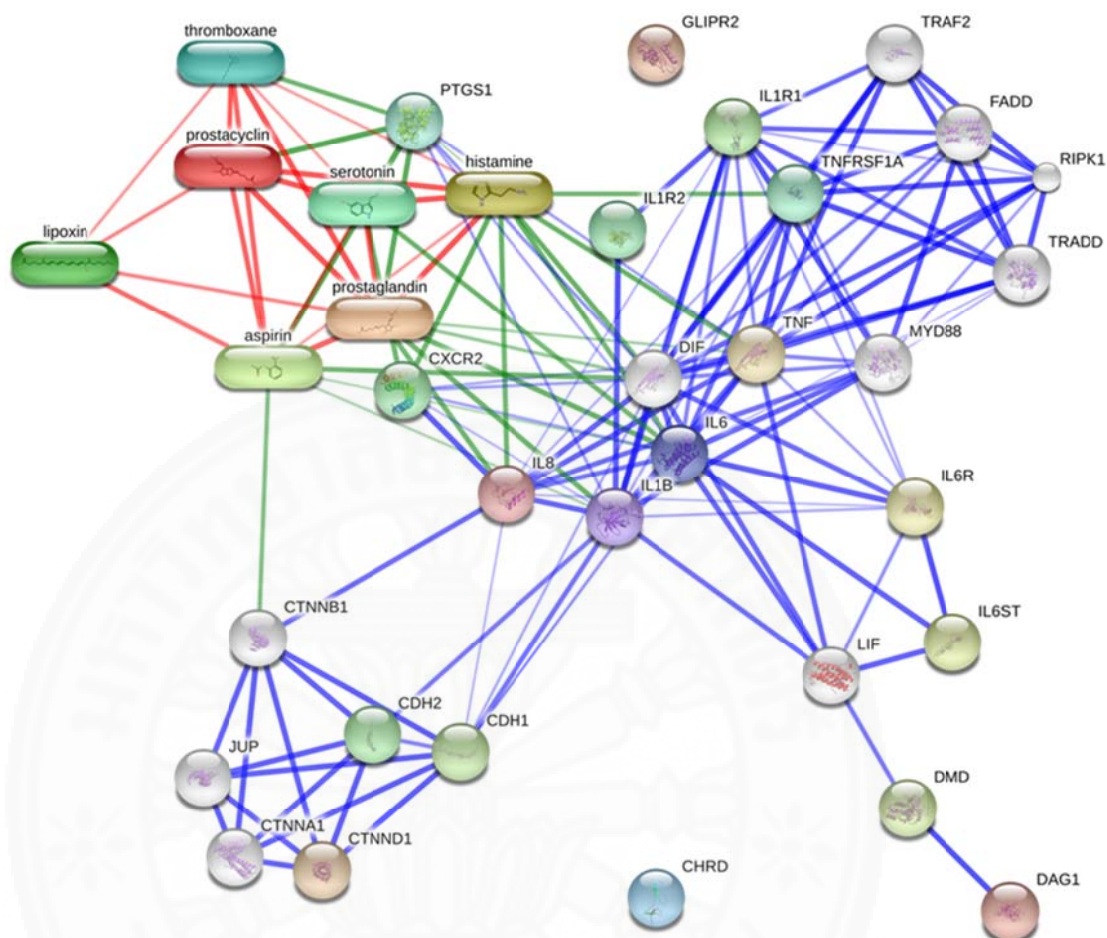
หมายเหตุ ค่าในตารางเป็นค่า log ฐาน 2 และ * หมายถึงมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับ control

จากตาราง 4.5 จะพบว่าโปรตีนมีโปรตีน 4 ชนิดที่พบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับ การ migration ของเซลล์ แล้วมีการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนที่มากกว่า 2 เท่า ซึ่งพบว่าโปรตีน catenin delta-1 (CTNND1) พบว่าโปรตีน lipid phosphate phosphatase3 (LPP3) สามารถ กระตุ้น β -catenin/LEF-1 ผ่านการทำงานร่วมกันกับ PTEN ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ของวิถี Wnt อย่างเช่น fibronectin เพื่อกระตุ้นให้ endothelial cell เกิดการ migration และมีการ สร้าง branching point structure ที่เป็นจุดเด่นของการเกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ได้ โดย โปรตีน CTNND1 จะไปทำการจับกับ LPP3 เพื่อควบคุมการส่งสัญญาณของ β -catenin/LEF-1 ผ่านวิถี Wnt ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการ migration ของเซลล์ (264) จากผลการวิจัยพบว่า ซึ่งจาก ผลการวิจัยพบว่าระดับของโปรตีน CTNND1 ที่เวลา 48 ชั่วโมงมีการเพิ่มระดับเล็กน้อย 0.58 เท่า แล้วที่เวลา 72 ชั่วโมงพบว่า มีการเพิ่มระดับขึ้น 1.92 เท่า แต่เมื่อเทียบดูระหว่างที่กลุ่มทดสอบ 48 และ 72 ชั่วโมงแล้ว พบว่าระดับของโปรตีนนี้แทบไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลง มากเป็นส่วนของกลุ่มคอนโทรลที่มีการลดระดับลง 1.38 เท่า เมื่อเวลาผ่านไปอาจเกิดจากโปรตีนนี้ เป็นโปรตีนที่จำเป็นต้องใช้สำหรับการดำรงชีพของเซลล์ทำให้ control มีการใช้หมดไป ส่วนในกลุ่ม ทดสอบอาจแสดงถึงบทบาทของ PAR2 ในการคงสภาพความสามารถในการสร้างโปรตีน CTNND1

กลุ่มของโปรตีน CHR1 และ GLIPR2 ที่มีการลดระดับลงที่ 48 ชั่วโมง แล้วจึงมี การเพิ่มระดับโปรตีนขึ้นที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งโปรตีน chordin (CHR1) พบว่ามีการแสดงออกของ chordin ของมนุษย์ซึ่งเป็นตัวควบคุมของ bone morphologic proteins (BMPs) ในหลายอวัยวะ เช่น ตับ, cerebellum และในระบบสืบพันธุ์เพศหญิง (265) ซึ่งต่อมาพบว่า chordin มีการลดระดับ การแสดงออกลงใน epithelium ovary cancer และ epithelium cancer cell line เมื่อเทียบกับ เนื้อเยื่อและ ovarian surface epithelium (OSE) ปกติ ซึ่งเมื่อทำการทดสอบผลของ chordin ที่มี ต่อ cell line ของมะเร็ง 2 ชนิด อย่าง BG1 และ PEO14 พบว่าความสามารถในการเคลื่อนที่และบุกรุก ของเซลล์มะเร็งลดลงอย่างมาก แต่เมื่อทำการทดสอบการเกาะติดของเซลล์ PEO14 จะพบว่าเพิ่ม สูงขึ้นเมื่อมี chordin (266) ส่วนโปรตีน golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1 (GLIPR2) ซึ่งยังไม่มีการศึกษามากนักเกี่ยวกับโปรตีนนี้ แต่ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาถึงผลของ GLIPR2 ในการตอบสนองต่อการเกิด epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) และการ ย้ายที่ของเซลล์ใน HK-2 cell line ซึ่งพบว่าเมื่อมีการแสดงออกของ GLIPR2 ที่สูง พบว่ามีการเกิด EMT และการ migration ของเซลล์เพิ่มขึ้น ผ่านการกระตุ้น ERK1/2 (267) จากผลการวิจัยพบว่าที่ เวลา 48 ชั่วโมงโปรตีน CHR1 และ GLIPR2 มีการลดระดับลง 4.51 และ 0.61 เท่าตามลำดับ แล้ว เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง มีการเพิ่มระดับ 2.46 และ 4.83 เท่าตามลำดับ อาจแสดงให้เห็นถึง บทบาทของ PAR2 ที่มีผลในระยะสั้นต่อการยับยั้งการสร้างโปรตีน CHR1 ซึ่งอาจจะส่งผลให้มีการ

migration ของเซลล์เพิ่มขึ้น เนื่องจากเป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการ migration ของเซลล์ และยังแสดงถึงบทบาทในระยะยาวต่อการสร้างโปรตีน GLIPR2 ของ PAR2 ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการ migration เซลล์ได้

นอกจากนี้สำหรับโปรตีน dystroglycan (DAG1) ซึ่งเป็นส่วนประกอบภายในของเยื่อหุ้มเซลล์ของ dystrophin-glycoprotein complex (DCG) ซึ่งเป็น transmembrane protein complex โครงสร้างของ dystroglycan ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ alpha และ beta โดยที่ α -dystroglycan จะเป็น receptor บนผิวของเซลล์ สำหรับ basement membrane (BM) proteins อย่างเช่น laminin, perlecan และ agrin ซึ่ง glycoproteins เหล่านี้จะจับกับ glycan ที่อยู่บน α -dystroglycan และจะจับกับ β -dystroglycan ที่เป็น transmembrane protein ส่วน β -dystroglycan จะจับกับ dystrophin ที่อยู่ใน cytoplasm ซึ่งจะจับกับ actin cytoskeleton และ adaptor molecule ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณอีกที (268) มีหลายงานวิจัยที่รายงานว่า การบกพร่องของ α -dystroglycan มีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งเต้านม, มะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็งในช่องปาก และมะเร็งต่อมลูกหมาก (269-272) แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด มีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงหน้าที่ในการยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งของ laminin-binding glycans ที่อยู่บน α -dystroglycan โดยในเซลล์มะเร็ง laminin-binding glycans จะลดลง ซึ่งการลดลงนี้จะส่งผลให้เกิด cell migration มากขึ้น โดยมีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกที่ลดลงของ β 3-N-acetylglucosaminyltransferase-1 (β 3GnT1) และเมื่อทำการเพิ่มการแสดงออกของ β 3GnT1 ในเซลล์มะเร็ง จะมีการเพิ่มของ laminin-binding glycans กลับคืนมาและลดการเกิดมะเร็ง ซึ่งจากงานวิจัยพบว่า β 3GnT1 มีความสำคัญในการสังเคราะห์ laminin-binding glycans โดยการสร้าง complex กับ LARGE ดังนั้นการจับกันของ laminin-binding glycans กับ laminin หรือ โมเลกุลในการเกาะติดอื่นๆใน BM จะทำให้มีการลุกลามของเซลล์มะเร็งลดลง โดยยับยั้งการ phosphorylation ของ ERK/AKT ที่กระตุ้นโดย extracellular matrix (ECM) แสดงถึงบทบาทของ DAG1 ในการเป็นตัวควบคุมการ migration ของเซลล์ (273) ซึ่งจากงานวิจัยพบว่า โปรตีน DAG1 ที่เวลา 48 ชั่วโมงมีการลดระดับของโปรตีน DAG1 ลง 4.97 เท่าจนตรวจไม่พบ และเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง พบว่าระดับโปรตีนลดลง 2.74 เท่า จากผลที่ได้นี้อาจแสดงบทบาทของ PAR2 ที่ส่งผลกระทบสั้นในการยับยั้งการสร้างโปรตีน DAG1 ซึ่งอาจจะส่งผลให้มีการย้ายที่ของเซลล์เพิ่มขึ้น เนื่องจากเป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการย้ายที่ของเซลล์

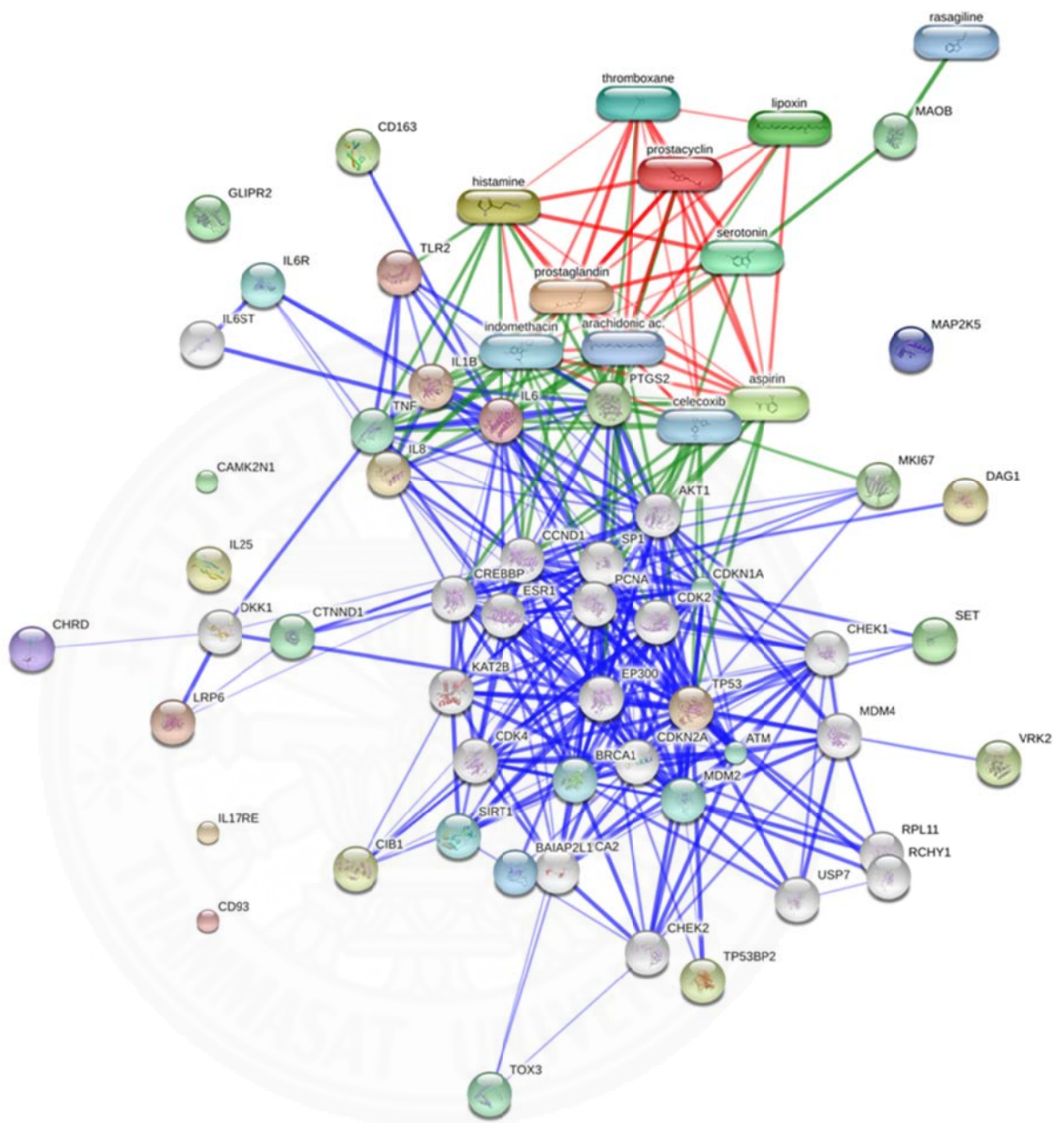


รูปภาพที่ 4.13 ภาพแสดงความสัมพันธ์ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการ migration ของเซลล์ 4 ชนิด หลังทำการใส่สารเคมีหรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบลงไปเพื่อช่วยในการหาความสัมพันธ์

จากรูปที่ 4.13 เมื่อทำการหาความสัมพันธ์ของโปรตีน 4 ชนิดนี้ โดยใช้โปรแกรม stitch 4.0 ซึ่งทำการใส่สารเคมีและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบลงไปด้วย พบว่าโปรตีน DAG1 และ CTNND1 สามารถโยงความสัมพันธ์ได้ แล้วพบว่ามีความสัมพันธ์กับกลุ่มของ proinflammatory cytokine ผ่านโปรตีนตัวอื่น ส่วนโปรตีนอีก 2 ชนิด อย่าง CHRD และ GLIPR2 ซึ่งไม่สามารถโยงความสัมพันธ์ได้ อาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน 2 ชนิดนี้ ยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษาไว้มากนัก ถึงบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการ migration ของเซลล์ ดังนั้นจากผลการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการสนับสนุน

บทบาทที่เกี่ยวข้องกับการ migration ของโปรตีน CHRD และ GLIPR2 ว่าเป็นโปรตีนใหม่ที่พบว่ามี ความสัมพันธ์การ migration เมื่อมีการกระตุ้น PAR2 เกิดขึ้น

เมื่อเราทำการนำเอาโปรตีนทั้ง 3 กลุ่ม อันได้แก่ กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ 7 ชนิด, กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการ apoptosis และ proliferation 11 ชนิด และกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการ migration ของเซลล์ 4 ชนิด มาทำการหาความสัมพันธ์ร่วมกันด้วยโปรแกรม stitch 4.0 จะพบว่า โปรตีนทั้ง 3 กลุ่ม ส่วนใหญ่สามารถโยงความสัมพันธ์กันได้ (รูปภาพที่ 4.14) โดยกลุ่มโปรตีนที่ เกี่ยวข้องกับการอักเสบ จะพบว่ามีความสัมพันธ์กับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบอย่าง proinflammatory cytokine หรือ สารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบอย่าง prostaglandins ส่วน โปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม apoptosis และ proliferation จะมีความสัมพันธ์กับโปรตีน TP53 หรือ p53 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยให้เกิดการ apoptosis เป็นส่วนใหญ่ แต่ก็สามารถโยงความสัมพันธ์มายังสารในกลุ่ม proinflammatory cytokine, prostaglandins และ สารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบอื่นๆได้ ผ่าน ความสัมพันธ์กับโปรตีนชนิดอื่นๆ อย่างเช่น Dickkopf-related protein 1 (DKK1) ส่วนสารในกลุ่ม migration ก็เช่นกัน จะพบว่ามีสัมพันธ์ผ่านกลุ่มของ proinflammatory cytokine ผ่าน โปรตีนชนิดอื่นๆ อย่างเช่น G1/S-specific cyclin-D1 (CCND1) ซึ่งสุดท้ายแล้วจะพบว่า มีโปรตีน 6 ชนิดที่โปรแกรม stitch 4.0 ไม่มีการโยงความสัมพันธ์ให้ ได้แก่ IL-25, IL-17RE, CAMK2N1, MAP2K5, GLIPR2 และ CD63 ซึ่งจากรูปที่ 4.11 จะพบว่า CD63 ยังสามารถโยงความสัมพันธ์กับ CD193 ได้ และจากรูปที่ 4.12 จะพบว่าโปรตีน MAP2K5 สามารถโยงความสัมพันธ์กับโปรตีน MAP3K2 ได้ แต่ก็ยังไม่พบความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องมายังกลุ่มความสัมพันธ์หลักอย่างการอักเสบหรือ apoptosis ได้ ในส่วนของโปรตีน TOX3 ซึ่งจากรูปที่ 4.12 ไม่พบว่ามีสัมพันธ์ แต่เมื่อทำการหา ความสัมพันธ์รวม 3 กลุ่มแล้ว พบว่าสามารถโยงความสัมพันธ์มายังกลุ่ม apoptosis ได้โดยมี ความสัมพันธ์มายังโปรตีน TP53 ผ่านโปรตีน Breast cancer type 1 susceptibility protein (BRCA1) และ Breast cancer type 2 susceptibility protein (BRCA2) ซึ่งจากผลที่ได้นี้ทำให้ สุดท้ายแล้วพบว่าโปรตีน IL-25, IL-17RE, CAMK2N1, MAP2K5 และ GLIPR2 ซึ่งไม่สามารถโยง ความสัมพันธ์ได้ จากผลการวิจัยนี้อาจแสดงให้เห็นความเป็นไปได้ว่าโปรตีนทั้ง 5 ชนิดนี้ อาจเป็น โปรตีนใหม่ที่พบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ, apoptosis, proliferation และ migration ที่สามารถสร้างได้จากเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ผ่านการกระตุ้น PAR2 ที่อยู่บนผิวของเซลล์



รูปภาพที่ 4.14 ภาพแสดงความสัมพันธ์ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ, apoptosis และ migration ของเซลล์ จำนวน 22 ชนิด หลังทำการใส่สารเคมีหรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบลงไปเพื่อช่วยในการหาความสัมพันธ์

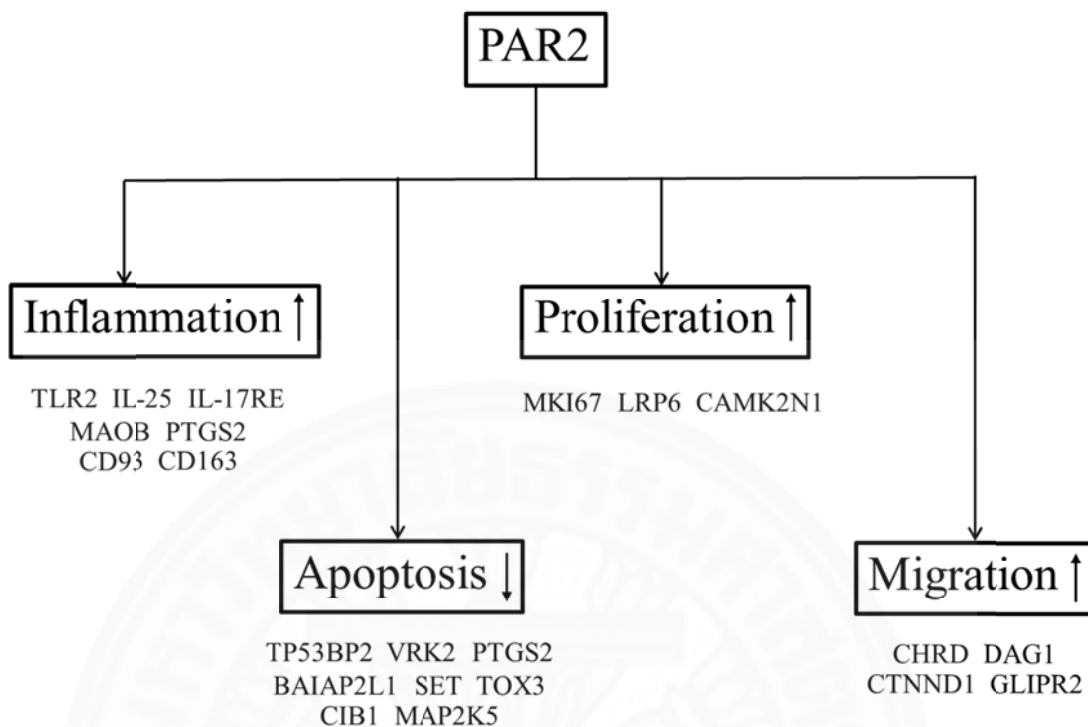
จากผลที่ได้จากการวิจัยทำให้เราสามารถนำโปรตีนจากทั้ง 3 กลุ่ม มาทำการสร้าง pathway ในการส่งสัญญาณของ PAR2 ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบทางเดินอาหารเมื่อมีการกระตุ้นเกิดขึ้นจากเอนไซม์ protease ที่มีความจำเพาะอย่าง trypsin, mast cell tryptase และ coagulation factors ต่างๆ ที่พบได้ทั่วไปในทางเดินอาหารหรือในสภาวะที่มีการอักเสบเกิดขึ้นในทางเดินอาหารจากโรคที่มีการอักเสบเรื้อรังของทางเดินอาหารอย่างเช่น IBD โดยจากรูปจะพบว่าการกระตุ้น PAR2 ด้วย SLIGKV มีส่วนช่วยให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากทางเดินอาหารมีการรอดชีวิตที่สูงขึ้นและอาจทำให้ apoptosis ที่ลดลงเมื่อทำให้เซลล์อดสารอาหาร โดยเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของโปรตีน TP53 โดยตรงจากการทำงานของโปรตีน PTGS2, SET และ BAIAP2L1 ที่ถูกสร้างเพิ่มสูงขึ้นรวมถึงเพิ่มการสร้างของโปรตีนที่มีความจำเป็นใน proliferation ของเซลล์อย่างโปรตีน MKI67, MAP2K5, LRP6 หรือลดการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการ proliferation ของเซลล์อย่าง CAMK2N1 นอกจากนี้ยังเพิ่มการสร้างโปรตีนอย่าง VRK2 ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม apoptosis ผ่านการกระตุ้น Bcl-XL และยับยั้งโปรตีน Bax แล้วยังเพิ่มการสร้างโปรตีนที่มีส่วนช่วยในการกระตุ้น Bcl-2 promotor ในการยับยั้ง apoptosis อย่าง TOX3 การรวมถึงยับยั้ง apoptosis เมื่อมีการกระตุ้นด้วย TNF ผ่านการทำงานของ TRAF2 จากการทำงานของ CIB1 จากผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นถึงบทบาทของ PAR2 ในการช่วยให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบในงานเพาะเลี้ยงมีการรอดชีวิตที่สูงขึ้น และอาจลด apoptosis ได้ รวมทั้งอาจส่งผลกระทบต่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบมีการ proliferation มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆหลายงานที่แสดงถึงบทบาทของ PAR2 ในการลด apoptosis เมื่อถูกกระตุ้น เช่น งานวิจัยของ Lablokov V. และคณะที่พบว่าเมื่อกระตุ้น PAR2 จะช่วยลด apoptosis ที่เกิดจาก cytokine อย่าง IFN- γ และ TNF α ผ่าน MEK1/2 และ PI3K รวมทั้งมีความเกี่ยวข้องเล็กน้อยกับ MCL-1 และ BAD (274) ยังมีงานวิจัยอื่นอีกที่สนับสนุนบทบาทของ PAR2 ในการลด apoptosis เช่น การลด apoptosis ของ glioblastoma ผ่านการควบคุมโปรตีน p53 (275) และการลด apoptosis มะเร็งปอดผ่านการเพิ่มการแสดงออกของ EGFR (276) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่สนับสนุนว่าการกระตุ้น PAR2 ส่งผลให้เกิดการ proliferation ของเซลล์ผ่านการกระตุ้นของ PKC α ส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณไปยังปลายทางของวิถีซึ่งก็คือ ERK1/2 และ NF-kB (277)

จากผลที่ได้จากการวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าหลังการกระตุ้น PAR2 ด้วย SLIGKV นั้นส่งผลให้เกิดการตอบสนองต่อการอักเสบโดยสร้างโปรตีนหลายชนิดที่มีความเกี่ยวข้องกับการกระบวนการอักเสบไม่ว่าจะเป็น การลดการสร้างโปรตีน MAOB ที่สามารถทำลายสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบอย่าง serotonin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม vasoactive amine ในทางตรงกันข้ามยังสามารถเพิ่มการสร้างโปรตีนที่มีเกี่ยวข้องกับการสร้างสารต่างๆในกระบวนการอักเสบอย่างโปรตีน PTGS2 ที่จำเป็นต่อการสร้างสารกลุ่ม prostaglandin และ thromboxane A2 และโปรตีนอย่าง TLR2, IL25

และ IL17RE ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้าง cytokine ต่างๆที่ก่อให้เกิดการอักเสบอย่าง IL-1 β , IL-6, และ IL-8 ด้วยการกระตุ้นผ่านวิถีของ NF-kB นอกจากนี้การกระตุ้น PAR2 ยังลดการตอบสนองต่อการอักเสบด้วยการลดการสร้างโปรตีนที่เป็น receptor บนผิวของ monocyte หรือ macrophage ซึ่งช่วยในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเพื่อลดการอักเสบ อย่าง CD93 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการกระตุ้น PAR2 จะมีการกระตุ้นหรือลดการสร้างโปรตีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการอักเสบซึ่งที่ผ่านมามีการศึกษาวิจัยมากมายที่แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการกระตุ้น PAR2 เกิดขึ้นจะส่งผลให้เกิดการอักเสบ เช่น งานวิจัยของ Lohman RJ และคณะที่ศึกษาว่า antagonist ของ PAR2 ซึ่งก็คือ GB88 สามารถลดการอักเสบเฉียบพลันและการอักเสบเรื้อรังในลำไส้ของหนูได้ (278) หรืองานวิจัยของ Tripathi T และคณะที่แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ serine protease ที่ปล่อยออกมาจากจุลชีพเมื่อมีการติดเชื้อที่ดวงตา สามารถกระตุ้น PAR2 ให้มีกาตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันและการอักเสบได้ (279) ซึ่งจากหลักฐานทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้น PAR2 สามารถสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบได้

จากผลที่ได้จากการวิจัยนี้ที่แสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการกระตุ้น PAR2 ด้วย SLIGKV เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง จะพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการ migration ของเซลล์ ซึ่งจะพบว่าการกระตุ้น PAR2 จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหลายๆอย่างที่มีผลต่อการ migration ของเซลล์ไม่ว่าจะเป็น การกระตุ้นให้สร้างโปรตีน GLIPR2 ที่ส่งผลให้เกิด migration ของเซลล์ผ่านวิถี ERK1/2 รวมทั้งลดการสร้างโปรตีนที่เป็นตัวยับยั้งการ migration ของเซลล์อย่างเช่น DAG1 ที่มีผลต่อการ migration ของเซลล์ผ่านวิถี ERK/Akt และ CHRD ที่เป็นตัวยับยั้งของ BMPs นอกจากนี้ยังสามารถคงสภาพความสามารถในการสร้างโปรตีน CNTTD1 ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆที่ผ่านมาซึ่งพบว่าการกระตุ้น PAR2 จะส่งผลให้เกิดการ migration ของเซลล์เพิ่มสูงขึ้น เช่น งานวิจัยของ Morris DR ซึ่งพบว่าการกระตุ้น PAR2 ด้วย factor VIIa และ Xa สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเต้านมเพิ่มการ migration และการบุกรุกได้ (280), งานวิจัยของ Shpacovitch VM ซึ่งพบว่าการกระตุ้น PAR2 สามารถเพิ่มการ migration ของเซลล์ได้ (281), งานวิจัยของ Zhou F และคณะที่ศึกษาว่า Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) ซึ่งเป็นส่วนประกอบในชาเขียวสามารถขัดขวางการเพิ่มจำนวนและการ migration ของ human colon cancer SW620 cell ที่ถูกกระตุ้นด้วย PAR2-AP และ factor VIIa ได้ (282)

จากผลที่ได้จากการวิจัยนี้ซึ่งใช้เทคนิคทาง proteomics ในการวิเคราะห์นั้น ทำให้เราเห็นถึงบทบาทและหน้าที่ในการสร้างโปรตีนของ PAR2 ซึ่งพบว่ามียบทบาทเป็นได้ทั้ง long term effect และ short term effect สำหรับโปรตีนแต่ละชนิด ซึ่งโปรตีนเหล่านั้นพบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและกระบวนการอื่นๆ อย่างการ apoptosis, proliferation และ migration ซึ่งจากผลการวิจัยนี้สามารถนำไปทำการศึกษาต่อได้ถึงบทบาทของโปรตีนแต่ละชนิดที่ถูกสร้างขึ้นมาหลังจากการกระตุ้น PAR2 โดยจากผลที่ได้สามารถนำมาสร้างเป็นแผนภาพสรุปรวมที่ แสดงให้เห็นว่าภายหลังจากการกระตุ้น PAR2 เซลล์กล้ามเนื้อเรียบสามารถสร้างโปรตีนอะไรออกได้บ้างแล้วมีความเกี่ยวข้องกับหน้าที่อะไร (รูปภาพที่ 4.15) ซึ่งพบว่า การกระตุ้น PAR2 จะทำให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบทำการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยจะทำให้มีการตอบสนองต่อการอักเสบที่เพิ่มขึ้น อย่าง TLR2, IL-25, IL-17RE, MAOB, PTGS2, CD93 และ CD163 ซึ่งเซลล์กล้ามเนื้อเรียบยังสามารถยับยั้งหรือสร้างโปรตีนที่อาจมีผลให้เกิด apoptosis ลดลง ได้แก่ TP53BP2, VRK2, PTGS2, BAIAP2L1, SET, TOX3, CIB1 และ MAP2K5 ซึ่งตรงกันข้ามกับการลดลงของ apoptosis ยังสามารถสร้างโปรตีนที่ส่งผลให้มีการเพิ่ม proliferation ของเซลล์ได้ด้วย อย่าง MKI67, LRP6 และ CAMK2N1 นอกจากนี้ยังสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของ migration ด้วย อย่าง CHRDR, DAG1, CTNND1 และ GLIPR2 ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ยังจำเป็นต้องมีการ ยืนยันด้วยเทคนิคอื่นๆ ให้แน่ใจว่าเป็นโปรตีนเหล่านี้จริง โดยโปรตีนเหล่านี้ยังสามารถนำไปศึกษาต่อ เพื่อยืนยันถึงหน้าที่และบทบาทของโปรตีนนั้นๆ ที่มีต่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหรือเซลล์อื่นๆ ได้



รูปภาพที่ 4.15 รูปภาพแสดงผลสรุปรวมกลุ่มของโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เมื่อทำการกระตุ้น PAR2

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการกระตุ้น protease-activated receptor 2 ที่อยู่บนผิวเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ทางเดินอาหารของกระต่ายด้วยเปปไทด์สังเคราะห์ SLIGKV ซึ่งพบการหลั่งโปรตีนออกมาจำนวน 310 ชนิด โดยจากโปรตีนที่ได้เหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ได้แก่ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ อย่างเช่น toll-like receptor 2 และ cyclooxygenase-2 โปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis และการ proliferation ของเซลล์ อย่างเช่น TOX high mobility group box family member 3, apoptosis-stimulating of p53 protein 2 และ antigen KI-67 โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการ migration ของเซลล์ เช่น chordin และ dystroglycan ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการทำให้เราเข้าใจกลไกและหน้าที่พื้นฐานของกล้ามเนื้อเรียบและ Protease-activated receptors 2 ในการหลั่งโปรตีนมากขึ้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยในครั้งนี้ได้มีการกระตุ้น PAR2 แล้วทำการหาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่มีการหลั่งออกมาจากเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งควรทำวิจัยเพิ่มเติมเพื่อระดับการแสดงออกของยีนต่างๆ หลังการกระตุ้น PAR2 ใน cell lysate ควบคุมไปด้วยผลที่ได้จากการวิจัยนี้เป็นเพียงผลที่มาจากคัดกรองด้วยเทคนิคทาง proteomics อย่าง LC-MS เท่านั้น ซึ่งต้องทำการยืนยันผลของโปรตีนที่ได้ด้วยเทคนิคอื่นๆ อย่าง western blot หรือ ELISA นอกจากนี้โปรตีนบางชนิดที่ได้จากการกระตุ้น PAR2 มีความเกี่ยวข้องกับ apoptosis หรือ proliferation ของเซลล์ ควรยืนยันด้วยเทคนิค flow cytometry ซึ่งทำการย้อมสารเรืองแสงเพื่อดู marker ของการตายอย่าง annexin V/PI assay และทำการวัด proliferation ของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay นอกจากนี้ควรทำการทดสอบ migration ด้วยการใช่มicroscopy ในการดู migration ของเซลล์อย่าง time-lapse microscopy video ที่สามารถทำการบันทึกการ migration ของเซลล์ซึ่ง

ปกติจะมีการเคลื่อนเข้ามาแล้วมาเร่งความเร็วในการดูได้ อย่างวิธี 2D Migration Gap Closure Assays ในการดูความต่างของการ migration ระหว่างเซลล์ที่มีการกระตุ้นกับเซลล์ที่ไม่มีการกระตุ้น โดยสามารถดูอัตราการ migration ได้ตามเวลาจริง



รายการอ้างอิง

1. Tortora GJ, Derrickson B. Principles of anatomy and physiology. 12th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2009.
2. Sikorski K, Chmielewski S, Olejnik A, Wesoly JZ, Heemann U, Baumann M, et al. STAT1 as a central mediator of IFN- γ and TLR4 signal integration in vascular dysfunction. *JAKSTAT*. 2012; 1(4): 241-9.
3. Saetta M, Turato G. Airway pathology in asthma. *Eur Respir J Suppl*. 2001; 34: 18s-23s.
4. Bradding P, Walls AF, Holgate ST. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117(6): 1277-84.
5. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161(5): 1720-45.
6. Vrees MD, Pricolo VE, Potenti FM, Cao W. Abnormal motility in patients with ulcerative colitis: the role of inflammatory cytokines. *Arch Surg*. 2002; 137: 439-445.
7. Khan I, Blennerhassett MG, Kataeva GV, Collins SM. Interleukin 1 beta induces the expression of interleukin 6 in rat intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 1995; 108: 1720-1728.
8. Salinithone S, Singer CA, Gerthoffer WT. Inflammatory gene expression by human colonic smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004; 287(3): G627-37.
9. Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, et al. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(12): 6642-6.
10. Loubakos A, Yuan YP, Jenkins AL, Travis J, Andrade-Gordon P, Santulli R, et al. Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas*

gingivalis leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. *Blood*. 2001; 97(12): 3790-7.

11. Scarborough RM, Naughton MA, Teng W, Hung DT, Rose J, Vu TK, et al. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J Biol Chem*. 1992; 267(19): 13146-9

12. Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev*. 2004; 84(2): 579-621.

13. Kawabata A, Matsunami M, Sekiguchi F. Gastrointestinal roles for proteinase-activated receptors in health and disease. *Br J Pharmacol*. 2008; 153 (Suppl 1): S230-40.

14. Rasmussen UB, Vouret-Craviari V, Jallat S, Schlesinger Y, Pagès G, Pavirani A, et al. cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization. *FEBS Lett*. 1991; 288(1-2): 123-8.

15. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. 1991; 64(6): 1057-68.

16. Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(20): 9208-12.

17. Nystedt S, Larsson AK, Aberg H, Sundelin J. The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression. *J Biol Chem*. 1995; 270(11): 5950-55.

18. Saito A, Osuga Y, Yoshino O, Takamura M, Hirata T, Hirota Y, et al. TGF- β 1 induces proteinase-activated receptor 2 (PAR2) expression in endometriotic stromal cells and stimulates PAR2 activation-induced secretion of IL-6. *Hum Reprod*. 2011; 26(7): 1892-8.

19. Borensztajn K, Stiekema J, Nijmeijer S, Reitsma PH, Peppelenbosch MP, Spek CA. Factor Xa stimulates proinflammatory and profibrotic responses in fibroblasts via protease-activated receptor-2 activation. *Am J Pathol.* 2008; 172(2): 309-20.
20. He S, Peng Q, Walls AF. Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate in vivo by human mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine. *J Immunol.* 1997; 159(12): 6216-25.
21. Malamud V, Vaaknin A, Abramsky O, Mor M, Burgess LE, Ben-Yehudah A, et al. Tryptase activates peripheral blood mononuclear cells causing the synthesis and release of TNF-alpha, IL-6 and IL-1 beta: possible relevance to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2003; 138(1-2): 115-22.
22. De Campo BA, Henry PJ. Stimulation of protease-activated receptor-2 inhibits airway eosinophilia, hyperresponsiveness and bronchoconstriction in a murine model of allergic inflammation. *Br J Pharmacol.* 2005; 144(8): 1100-8.
23. Nhu QM, Shirey KA, Pennini ME, Stiltz J, Vogel SN. Proteinase-activated receptor 2 activation promotes an anti-inflammatory and alternatively activated phenotype in LPS-stimulated murine macrophages. *Innate Immun.* 2012; 18(2): 193-203.
24. Shpacovitch VM, Brzoska T, Buddenkotte J, Stroh C, Sommerhoff CP, Ansel JC, et al. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce cytokine release and activation of nuclear transcription factor kappa B in human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol.* 2002; 118(2): 380-5.
25. Nichols HL, Saffeddine M, Theriot BS, Hegde A, Polley D, El-Mays T, et al. β -Arrestin-2 mediates the proinflammatory effects of proteinase-activated receptor-2 in the airway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(41): 16660-5.
26. Kawabata A. Gastrointestinal functions of protease-activated receptors. *Life Sci.* 2003; 74: 247-254.
27. O'Brien PJ, Molino M, Kahn M, Brass LF. Protease activated receptors: theme and variations. *Oncogene.* 2001; 20(13): 1570-81.

28. Rasmussen UB, Vouret-Craviari V, Jallat S, Schlesinger Y, Pagès G, Pavirani A, et al. cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization. *FEBS Lett.* 1991; 288(1-2): 123-8.
29. Nystedt S, Larsson AK, Aberg H, Sundelin J. The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression. *J Biol Chem.* 1995; 270(11): 5950-55.
30. Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, et al. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature.* 1997; 386(6624): 502-6.
31. Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, et al. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(12): 6642-6.
32. Ossovskaya VS, Bunnnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev.* 2004; 84(2): 579-621.
33. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* 1991; 64(6): 1057-68.
34. Scarborough RM, Naughton MA, Teng W, Hung DT, Rose J, Vu TK, et al. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J Biol Chem.* 1992; 267(19): 13146-9.
35. Nystedt S, Emilsson K, Larsson AK, Strömbeck B, Sundelin J. Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *Eur J Biochem.* 1995; 232(1): 84-9.
36. Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(20): 9208-12.

37. Nystedt S, Larsson AK, Aberg H, Sundelin J. The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression. *J Biol Chem.* 1995; 270(11): 5950-55.
38. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature.* 1998; 394(6694): 690-4.
39. Vu TK, Wheaton VI, Hung DT, Charo I, Coughlin SR. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature.* 1991; 353(6345): 674-7.
40. Bouton MC, Jandrot-Perrus M, Moog S, Cazenave JP, Guillin MC, Lanza F. Thrombin interaction with a recombinant N-terminal extracellular domain of the thrombin receptor in an acellular system. *Biochem J.* 1995; 305 (Pt 2): 635-41.
41. Ishii K, Hein L, Kobilka B, Coughlin SR. Kinetics of thrombin receptor cleavage on intact cells. Relation to signaling. *J Biol Chem.* 1993; 268(13): 9780-6.
42. Gerszten RE, Chen J, Ishii M, Ishii K, Wang L, Nanevycz T, et al. Specificity of the thrombin receptor for agonist peptide is defined by its extracellular surface. *Nature.* 1994; 368(6472): 648-51.
43. Nanevycz T, Ishii M, Wang L, Chen M, Chen J, Turck CW, et al. Mechanisms of thrombin receptor agonist specificity. Chimeric receptors and complementary mutations identify an agonist recognition site. *J Biol Chem.* 1995; 270(37): 21619-25.
44. Nanevycz T, Wang L, Chen M, Ishii M, Coughlin SR. Thrombin receptor activating mutations. Alteration of an extracellular agonist recognition domain causes constitutive signaling. *J Biol Chem.* 1996; 271(2): 702-6.
45. Lerner DJ, Chen M, Tram T, Coughlin SR. Agonist recognition by proteinase-activated receptor 2 and thrombin receptor. Importance of extracellular loop interactions for receptor function. *J Biol Chem.* 1996; 271(24): 13943-7.
46. Maryanoff BE, Santulli RJ, McComsey DF, Hoekstra WJ, Hoey K, Smith CE, et al. Protease-activated receptor-2 (PAR-2): structure-function study of receptor activation

by diverse peptides related to tethered-ligand epitopes. *Arch Biochem Biophys.* 2001; 386(2): 195-204.

47. Hollenberg MD, Saifeddine M, al-Ani B, Kawabata A. Proteinase-activated receptors: structural requirements for activity, receptor cross-reactivity, and receptor selectivity of receptor-activating peptides. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997; 75(7): 832-41.

48. Scarborough RM 1, Naughton MA, Teng W, Hung DT, Rose J, Vu TK, et al. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J Biol Chem.* 1992; 267(19): 13146-9.

49. Blackhart BD, Emilsson K, Nguyen D, Teng W, Martelli AJ, Nystedt S, et al. Ligand cross-reactivity within the protease-activated receptor family. *J Biol Chem.* 1996; 271(28): 16466-71.

50. Hung DT, Vu TH, Nelken NA, Coughlin SR. Thrombin-induced events in non-platelet cells are mediated by the unique proteolytic mechanism established for the cloned platelet thrombin receptor. *J Cell Biol.* 1992; 116(3): 827-32.

51. Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(2): 504-8.

52. Wang H, Ubl JJ, Stricker R, Reiser G. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 283(5): C1351-64.

53. Corvera CU, Déry O, McConalogue K, Böhm SK, Khitin LM, Caughey GH, et al. Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. *J Clin Invest.* 1997; 100(6): 1383-93.

54. Corvera CU, Déry O, McConalogue K, Gamp P, Thoma M, Al-Ani B, et al. Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors-1 and -2. *J Physiol.* 1999; 517 (Pt 3): 741-56.

55. DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Déry O, Mullins RD, Bunnett NW. beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol.* 2000; 148(6): 1267-81.
56. Kong W, McConalogue K, Khitin LM, Hollenberg MD, Payan DG, Böhm SK, et al. Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(16): 8884-9.
57. Belham CM, Tate RJ, Scott PH, Pemberton AD, Miller HR, Wadsworth RM, et al. Trypsin stimulates proteinase-activated receptor-2-dependent and -independent activation of mitogen-activated protein kinases. *Biochem J.* 1996; 320 (Pt 3): 939-46.
58. DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Déry O, Mullins RD, Bunnett NW. beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol.* 2000; 148(6): 1267-81.
59. Bretschneider E, Kaufmann R, Braun M, Wittpoth M, Glusa E, Nowak G, et al. Evidence for proteinase-activated receptor-2 (PAR-2)-mediated mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 1999; 126(8): 1735-40.
60. Kanke T, Macfarlane SR, Seatter MJ, Davenport E, Paul A, McKenzie RC, et al. Proteinase-activated receptor-2-mediated activation of stress-activated protein kinases and inhibitory kappa B kinases in NCTC 2544 keratinocytes. *J Biol Chem.* 2001; 276(34): 31657-66.
61. Namkung W, Han W, Luo X, Muallem S, Cho KH, Kim KH, et al. Protease-activated receptor 2 exerts local protection and mediates some systemic complications in acute pancreatitis. *Gastroenterology.* 2004; 126(7): 1844-59.
62. Nguyen TD, Moody MW, Steinhoff M, Okolo C, Koh DS, Bunnett NW. Trypsin activates pancreatic duct epithelial cell ion channels through proteinase-activated receptor-2. *J Clin Invest.* 1999; 103(2): 261-9.
63. Nishiyama T, Nakamura T, Obara K, Inoue H, Mishima K, Matsumoto N, et al. Up-regulated PAR-2-mediated salivary secretion in mice deficient in muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 320(2): 516-24.

64. Nishikawa H, Kawai K, Tanaka M, Ohtani H, Tanaka S, Kitagawa C, et al. Protease-activated receptor-2 (PAR-2)-related peptides induce tear secretion in rats: involvement of PAR-2 and non-PAR-2 mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 312(1): 324-31.
65. Kawabata A, Kinoshita M, Nishikawa H, Kuroda R, Nishida M, Araki H, et al. The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection. *J Clin Invest.* 2001; 107(11): 1443-50.
66. Nishikawa H, Kawai K, Nishimura S, Tanaka S, Araki H, Al-Ani B, et al. Suppression by protease-activated receptor-2 activation of gastric acid secretion in rats. *Eur J Pharmacol.* 2002; 447(1): 87-90.
67. Vergnolle N, Macnaughton WK, Al-Ani B, Saifeddine M, Wallace JL, Hollenberg MD. Proteinase-activated receptor 2 (PAR2)-activating peptides: identification of a receptor distinct from PAR2 that regulates intestinal transport. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(13): 7766-71.
68. Cuffe JE, Bertog M, Velázquez-Rocha S, Dery O, Bunnett N, Korbmacher C. Basolateral PAR-2 receptors mediate KCl secretion and inhibition of Na⁺ absorption in the mouse distal colon. *J Physiol.* 2002; 539 (Pt 1): 209-22.
69. Kirkland JG, Cottrell GS, Bunnett NW, Corvera CU. Agonists of protease-activated receptors 1 and 2 stimulate electrolyte secretion from mouse gallbladder. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 293(1): G335-46.
70. Kawabata A, Matsunami M, Sekiguchi F. Gastrointestinal roles for proteinase-activated receptors in health and disease. *Br J Pharmacol.* 2008; 153 (Suppl 1): S230-40.
71. Sekiguchi F, Hasegawa N, Inoshita K, Yonezawa D, Inoi N, Kanke T, et al. Mechanisms for modulation of mouse gastrointestinal motility by proteinase-activated receptor (PAR)-1 and -2 in vitro. *Life Sci.* 2006; 78(9): 950-7.

72. Mulè F, Baffi MC, Cerra MC. Dual effect mediated by protease-activated receptors on the mechanical activity of rat colon. *Br J Pharmacol.* 2002; 136(3): 367-74.
73. Mulè F, Pizzuti R, Capparelli A, Vergnolle N. Evidence for the presence of functional protease activated receptor 4 (PAR4) in the rat colon. *Gut.* 2004; 53(2): 229-34.1
74. Sato K, Ninomiya H, Ohkura S, Ozaki H, Nasu T. Impairment of PAR-2-mediated relaxation system in colonic smooth muscle after intestinal inflammation. *Br J Pharmacol.* 2006; 148(2): 200-7.
75. Mulè F, Baffi MC, Falzone M, Cerra MC. Signal transduction pathways involved in the mechanical responses to protease-activated receptors in rat colon. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 303(3): 1265-72.
76. Cocks TM, Sozzi V, Moffatt JD, Selemidis S. Protease-activated receptors mediate apamin-sensitive relaxation of mouse and guinea pig gastrointestinal smooth muscle. *Gastroenterology.* 1999; 116(3): 586-92.
77. Sekiguchi F, Saito S, Takaoka K, Hayashi H, Nagataki M, Nagasawa K, et al. Mechanisms for prostaglandin E2 formation caused by proteinase-activated receptor-1 activation in rat gastric mucosal epithelial cells. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73(1): 103-14.
78. Kawao N, Nagataki M, Nagasawa K, Kubo S, Cushing K, Wada T, et al. Signal transduction for proteinase-activated receptor-2-triggered prostaglandin E2 formation in human lung epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 315(2): 576-89.
79. Cenac N, Coelho AM, Nguyen C, Compton S, Andrade-Gordon P, MacNaughton WK, et al. Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. *Am J Pathol.* 2002; 161(5): 1903-15.
80. Cenac N, Garcia-Villar R, Ferrier L, Larauche M, Vergnolle N, Bunnett NW, et al. Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in mice: possible

involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability. *J Immunol.* 2003; 170(8): 4296-300.

81. Fiorucci S, Mencarelli A, Palazzetti B, Distrutti E, Vergnolle N, Hollenberg MD, et al. Proteinase-activated receptor 2 is an anti-inflammatory signal for colonic lamina propria lymphocytes in a mouse model of colitis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(24): 13936-41.

82. Schmidlin F, Amadesi S, Dabbagh K, Lewis DE, Knott P, Bunnett NW, et al. Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. *J Immunol.* 2002; 169(9): 5315-21.

83. Marty I, Péclat V, Kirdaite G, Salvi R, So A, Busso N. Amelioration of collagen-induced arthritis by thrombin inhibition. *J Clin Invest.* 2001; 107(5): 631-40.

84. Ferrell WR, Lockhart JC, Kelso EB, Dunning L, Plevin R, Meek SE, et al. Essential role for proteinase-activated receptor-2 in arthritis. *J Clin Invest.* 2003; 111(1): 35-41.

85. Cunningham MA, Rondeau E, Chen X, Coughlin SR, Holdsworth SR, Tipping PG. Protease-activated receptor 1 mediates thrombin-dependent, cell-mediated renal inflammation in crescentic glomerulonephritis. *J Exp Med.* 2000; 191(3): 455-62.

86. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernández JA, Castellino F, Rosen ED, et al. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med.* 2003; 9(3): 338-42.

87. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001; 344(10): 699-709.

88. Fiorucci S, Mencarelli A, Palazzetti B, Distrutti E, Vergnolle N, Hollenberg MD, et al. Proteinase-activated receptor 2 is an anti-inflammatory signal for colonic lamina propria lymphocytes in a mouse model of colitis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(24): 13936-41.

89. Ryan GB, Majno G. Acute inflammation. A review. *Am J Pathol.* 1977; 86(1): 183-276.
90. Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res.* 1996; 32(4): 733-42.
91. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, eds. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.* 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005: 75.
92. Murphy HS, Ward PA. Inflammation. In: Rubin E, et al, eds. *Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundation of Medicine.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 40-83.
93. Korfmacher WA. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discov Today.* 2005; 10(20): 1357-67.
94. Parisi N, Metodieva G, Metodiev MV. Pseudopodial and β -arrestin-interacting proteomes from migrating breast cancer cells upon PAR2 activation. *J Proteomics.* 2013; 80:91-106.
95. Stetson LC, Dazard JE, Barnholtz-Sloan JS. Protein markers predict survival in glioma patients. *Mol Cell Proteomics.* 2016. pii: mcp.M116.060657.
96. Paone G, Leone V, Conti V, De Marchis L, Ialleni E, Graziani C, et al. Blood and sputum biomarkers in COPD and asthma: a review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016; 20(4): 698-708.
97. Sriwai W, Mahavadi S, Al-Shboul O, Grider JR, Murthy KS. Distinctive G protein-dependent signaling by protease-activated receptor 2 (PAR2) in smooth muscle: feedback inhibition of RhoA by cAMP-independent PKA. *PLoS One.* 2013; 8(6): e66743.
98. Murthy KS, Makhlof GM. Phosphoinositide metabolism in intestinal smooth muscle: preferential production of Ins(1,4,5)P₃ in circular muscle cells. *Am J Physiol.* 1991; 261(6 Pt 1): G945-51.

99. Murthy KS, Makhlouf GM. Opioid mu, delta, and kappa receptor-induced activation of phospholipase C-beta 3 and inhibition of adenylyl cyclase is mediated by Gi2 and G(o) in smooth muscle. *Mol Pharmacol.* 1996; 50(4): 870-7.
100. Kuemmerle JF, Murthy KS. Coupling of insulin-like growth factor-1 receptor kinase to Gi2 in human intestinal smooth muscle. *J Biol Chem.* 2001; 276(10): 7187-94.
101. Lowry OH, Rosbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265.
102. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
103. Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 1987; 8: 93-99.
104. Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc.* 2006; 1(4): 1852-8.
105. Johansson C, Samskog J, Sundström L, Wadensten H, Björkesten L, Flensburg J. Differential expression analysis of *Escherichia coli* proteins using a novel software for relative quantitation of LC-MS/MS data. *Proteomics.* 2006; 6(16): 4475-85.
106. Thorsell A, Portelius E, Blennow K, Westman-Brinkmalm A. Evaluation of sample fractionation using micro-scale liquid-phase isoelectric focusing on mass spectrometric identification and quantitation of proteins in a SILAC experiment. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007; 21(5): 771-8.
107. Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(26): 15335-40.
108. Guo A, Salomoni P, Luo J, Shih A, Zhong S, Gu W, et al. The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2000; 2(10): 730-6.

109. Vogt M, Butz K, Dymalla S, Semzow J, Hoppe-Seyler F. Inhibition of Bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein. *Oncogene*. 2006; 25(29): 4009-15.
110. Santhanam U, Ray A, Sehgal PB. Repression of the interleukin 6 gene promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88(17): 7605-9.
111. Brailo V, Vucicevic-Boras V, Lukac J, Biocina-Lukenda D, Zilic-Alajbeg I, Milenovic A, et al. Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012; 17(1): e10-5.
112. Choi EM, Heo JI, Oh JY, Kim YM, Ha KS, Kim JI, et al. COX-2 regulates p53 activity and inhibits DNA damage-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 328(4): 1107-12.
113. Bergamaschi D, Samuels Y, Jin B, Duraisingham S, Crook T, Lu X. ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(3): 1341-50.
114. Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh JK, Zhong S, et al. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell*. 2001; 8(4): 781-94.
115. Sullivan A, Lu X. ASPP: a new family of oncogenes and tumour suppressor genes. *Br J Cancer*. 2007; 96(2): 196-200.
116. Vives V, Su J, Zhong S, Ratnayaka I, Slee E, Goldin R, et al. ASPP2 is a haploinsufficient tumor suppressor that cooperates with p53 to suppress tumor growth. *Genes Dev*. 2006; 20(10): 1262-7.
117. Kampa KM, Acoba JD, Chen D, Gay J, Lee H, Beemer K, et al. Apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) heterozygous mice are tumor-prone and have attenuated cellular damage-response thresholds. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106(11): 4390-5.

118. Zhang P, Zhang Y, Gao K, Wang Y, Jin X, Wei Y, et al. ASPP1/2-PP1 complexes are required for chromosome segregation and kinetochore-microtubule attachments. *Oncotarget*. 2015; 6(39): 41550-65.
119. Gorina S, Pavletich NP. Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science*. 1996; 274(5289): 1001-5.
120. Miele A, Medina R, van Wijnen AJ, Stein GS, Stein JL. The interactome of the histone gene regulatory factor HiNF-P suggests novel cell cycle related roles in transcriptional control and RNA processing. *J Cell Biochem*. 2007; 102(1): 136-48.
121. Verma R, Gupta V, Singh J, Verma M, Gupta G, Gupta S, et al. Significance of p53 and ki-67 expression in prostate cancer. *Urol Ann*. 2015; 7(4): 488-93.
122. Kim H, Park CY, Lee JH, Kim JC, Cho CK, Kim HJ. Ki-67 and p53 expression as a predictive marker for early postoperative recurrence in pancreatic head cancer. *Ann Surg Treat Res*. 2015; 88(4): 200-7.
123. Humayun S, Prasad VR. Expression of p53 protein and ki-67 antigen in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinomas: An immunohistochemical study. *Natl J Maxillofac Surg*. 2011; 2(1): 38-46.
124. Ishimi Y. A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J Biol Chem*. 1997; 272(39): 24508-13.
125. 19. Chung E, Heimiller J, Leinwand LA. Distinct cardiac transcriptional profiles defining pregnancy and exercise. *PLoS One*. 2012; 7(7): e42297.
126. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*. 2000; 10(15): 886-95.
127. Al Rashid ST, Dellaire G, Cuddihy A, Jalali F, Vaid M, Coackley, et al. Evidence for the direct binding of phosphorylated p53 to sites of DNA breaks in vivo. *Cancer Res*. 2005; 65(23): 10810-21.

128. Gascoigne KE, Takeuchi K, Suzuki A, Hori T, Fukagawa T, Cheeseman IM. Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the requirement for CENP-A nucleosomes. *Cell*. 2011; 145(3): 410-22.
129. Gopalakrishnan S, Sullivan BA, Trazzi S, Della Valle G, Robertson KD. DNMT3B interacts with constitutive centromere protein CENP-C to modulate DNA methylation and the histone code at centromeric regions. *Hum Mol Genet*. 2009; 18(17): 3178-93.
130. Kozlov SV, Graham ME, Peng C, Chen P, Robinson PJ, Lavin MF. Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J*. 2006; 25(15): 3504-14.
131. Bhoumik A, Takahashi S, Breitweiser W, Shiloh Y, Jones N, Ronai Z. ATM-dependent phosphorylation of ATF2 is required for the DNA damage response. *Mol Cell*. 2005; 18(5): 577-87.
132. Lee JH, Paull TT. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science*. 2004; 304(5667): 93-6.
133. Kang J, Ferguson D, Song H, Bassing C, Eckersdorff M, Alt FW, et al. Functional interaction of H2AX, NBS1, and p53 in ATM-dependent DNA damage responses and tumor suppression. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(2): 661-70.
134. Takagi M, Delia D, Chessa L, Iwata S, Shigeta T, Kanke Y, et al. Defective control of apoptosis, radiosensitivity, and spindle checkpoint in ataxia telangiectasia. *Cancer Res*. 1998; 58(21): 4923-9.
135. Sumara I, Vorlaufer E, Gieffers C, Peters BH, Peters JM. Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol*. 2000; 151(4): 749-62.
136. Terret ME, Sherwood R, Rahman S, Qin J, Jallepalli PV. Cohesin acetylation speeds the replication fork. *Nature*. 2009; 462(7270): 231-4.
137. Luo H, Li Y, Mu JJ, Zhang J, Tonaka T, Hamamori Y, et al. Regulation of intra-S phase checkpoint by ionizing radiation (IR)-dependent and IR-independent phosphorylation of SMC3. *J Biol Chem*. 2008; 283(28): 19176-83.

138. Fernández IF, Blanco S, Lozano J, Lazo PA. VRK2 inhibits mitogen-activated protein kinase signaling and inversely correlates with ErbB2 in human breast cancer. *Mol Cell Biol.* 2010; 30(19): 4687-97.
139. Blanco S, Sanz-García M, Santos CR, Lazo PA. Modulation of interleukin-1 transcriptional response by the interaction between VRK2 and the JIP1 scaffold protein. *PLoS One.* 2008; 3(2): e1660.
140. Monsalve DM, Merced T, Fernández IF, Blanco S, Vázquez-Cedeira M, Lazo PA. Human VRK2 modulates apoptosis by interaction with Bcl-xL and regulation of BAX gene expression. *Cell Death Dis.* 2013; 4:e513.
141. Blanco S, Klimcakova L, Vega FM, Lazo PA. The subcellular localization of vaccinia-related kinase-2 (VRK2) isoforms determines their different effect on p53 stability in tumour cell lines. *FEBS J.* 2006; 273(11): 2487-504.
142. Armacki M, Joodi G, Nimmagadda SC, de Kimpe L, Pusapati GV, Vandoninck S, et al. A novel splice variant of calcium and integrin-binding protein 1 mediates protein kinase D2-stimulated tumour growth by regulating angiogenesis. *Oncogene.* 2014; 33(9): 1167-80.
143. Dehennaut V, Loison I, Boulay G, Van Rechem C, Leprince D. Identification of p21 (CIP1/WAF1) as a direct target gene of HIC1 (Hypermethylated in cancer 1). *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 430(1): 49-53.
144. Yoon KW, Cho JH, Lee JK, Kang YH, Chae JS, Kim YM, et al. CIB1 functions as a Ca(2+)-sensitive modulator of stress-induced signaling by targeting ASK1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(41): 17389-94.
145. Schramm L, Pendergrast PS, Sun Y, Hernandez N. Different human TFIIIB activities direct RNA polymerase III transcription from TATA-containing and TATA-less promoters. *Genes Dev.* 2000; 14(20): 2650-63.
146. Cairns CA, White RJ. p53 is a general repressor of RNA polymerase III transcription. *EMBO J.* 1998; 17(11): 3112-23.

147. Chesnokov I, Chu WM, Botchan MR, Schmid CW. p53 inhibits RNA polymerase III-directed transcription in a promoter-dependent manner. *Mol Cell Biol.* 1996; 16(12): 7084-8.
148. Giglione C, Gonfloni S, Parmeggiani A. Differential actions of p60c-Src and Lck kinases on the Ras regulators p120-GAP and GDP/GTP exchange factor CDC25Mm. *Eur J Biochem.* 2001; 268(11): 3275-83.
149. Chen J, Dai G, Wang YQ, Wang S, Pan FY, Xue B, et al. Polo-like kinase 1 regulates mitotic arrest after UV irradiation through dephosphorylation of p53 and inducing p53 degradation. *FEBS Lett.* 2006; 580(15): 3624-30.
150. Gauld SB, Cambier JC. Src-family kinases in B-cell development and signaling. *Oncogene.* 2004; 23(48): 8001-6.
151. O'Laughlin-Bunner B, Radosevic N, Taylor ML, Shivakrupa, DeBerry C, Metcalfe DD, et al. Lyn is required for normal stem cell factor-induced proliferation and chemotaxis of primary hematopoietic cells. *Blood.* 2001; 98(2): 343-50.
152. Ren X, Cao C, Zhu L, Yoshida K, Kharbanda S, Weichselbaum R, et al. Lyn tyrosine kinase inhibits nuclear export of the p53 tumor suppressor. *Cancer Biol Ther.* 2002; 1(6): 703-8.
153. Millard TH, Dawson J, Machesky LM. Characterisation of IRTKS, a novel IRSp53/MIM family actin regulator with distinct filament bundling properties. *J Cell Sci.* 2007; 120(Pt 9): 1663-72.
154. Chen G, Li T, Zhang L, Yi M, Chen F, Wang Z, et al. Src-stimulated IRTKS phosphorylation enhances cell migration. *FEBS Lett.* 2011; 585(19): 2972-8.
155. Wang KS, Chen G, Shen HL, Li TT, Chen F, Wang QW, et al. Insulin receptor tyrosine kinase substrate enhances low levels of MDM2-mediated p53 ubiquitination. *PLoS One.* 2011; 6(8): e23571.
156. Kato K, Okuwaki M, Nagata K. Role of Template Activating Factor-I as a chaperone in linker histone dynamics. *J Cell Sci.* 2011; 124(Pt 19): 3254-65.

157. Kadota S, Nagata K. Silencing of IFN-stimulated gene transcription is regulated by histone H1 and its chaperone TAF-I. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(12): 7642-53.
158. Beresford PJ, Zhang D, Oh DY, Fan Z, Greer EL, Russo ML, et al. Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem.* 2001; 276(46): 43285-93.
159. Kim JY, Lee KS, Seol JE, Yu K, Chakravarti D, Seo SB. Inhibition of p53 acetylation by INHAT subunit SET/TAF- β represses p53 activity. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(1): 75-87.
160. Mumby MC, Walter G. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev.* 1993; 73(4): 673-99.
161. Schönthal AH. Role of PP2A in intracellular signal transduction pathways. *Front Biosci.* 1998; 3:D1262-73.
162. Adler HT, Nallaseth FS, Walter G, Tkachuk DC. HRX leukemic fusion proteins form a heterocomplex with the leukemia-associated protein SET and protein phosphatase 2A. *J Biol Chem.* 1997; 272(45): 28407-14.
163. Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997; 13:513-609.
164. Cartwright CA, Kamps MP, Meisler AI, Pipas JM, Eckhart W. pp60c-src activation in human colon carcinoma. *J Clin Invest.* 1989; 83(6): 2025-33.
165. Rosen N, Bolen JB, Schwartz AM, Cohen P, DeSeau V, Israel MA. Analysis of pp60c-src protein kinase activity in human tumor cell lines and tissues. *J Biol Chem.* 1986; 261(29): 13754-9.
166. Kubo T, Yamashita T, Yamaguchi A, Sumimoto H, Hosokawa K, Tohyama M. A novel FERM domain including guanine nucleotide exchange factor is involved in Rac signaling and regulates neurite remodeling. *J Neurosci.* 2002; 22(19): 8504-13.
167. Barresi R, Campbell KP. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci.* 2006; 119(Pt 2): 199-207.

168. Thompson O, Kleino I, Crimaldi L, Gimona M, Saksela K, Winder SJ. Dystroglycan, Tks5 and Src mediated assembly of podosomes in myoblasts. *PLoS One*. 2008; 3(11): e3638.
169. Millard TH, Dawson J, Machesky LM. Characterisation of IRTKS, a novel IRSp53/MIM family actin regulator with distinct filament bundling properties. *J Cell Sci*. 2007; 120(Pt 9): 1663-72.
170. Chen G, Li T, Zhang L, Yi M, Chen F, Wang Z, et al. Src-stimulated IRTKS phosphorylation enhances cell migration. *FEBS Lett*. 2011; 585(19): 2972-8.
171. Zhang Z, Theler D, Kaminska KH, Hiller M, de la Grange P, Pudimat R, et al. The YTH domain is a novel RNA binding domain. *J Biol Chem*. 2010; 285(19): 14701-10.
172. Xu C, Wang X, Liu K, Roundtree IA, Tempel W, Li Y, et al. Structural basis for selective binding of m6A RNA by the YTHDC1 YTH domain. *Nat Chem Biol*. 2014; 10(11): 927-9.
173. Xu C, Liu K, Ahmed H, Loppnau P, Schapira M, Min J. Structural basis for the discriminative recognition of N6-methyladenosine RNA by the human YT521-B homology domain family of proteins. *J Biol Chem*. 2015; 290(41): 24902-13.
174. Rafalska I, Zhang Z, Benderska N, Wolff H, Hartmann AM, Brack-Werner R, et al. The intranuclear localization and function of YT521-B is regulated by tyrosine phosphorylation. *Hum Mol Genet*. 2004; 13(15): 1535-49.
175. Südhof TC. The structure of the human synapsin I gene and protein. *J Biol Chem*. 1990; 265(14): 7849-52.
176. Onofri F, Giovedi S, Kao HT, Valtorta F, Bongiorno Borbone L, De Camilli P, et al. Specificity of the binding of synapsin I to Src homology 3 domains. *J Biol Chem*. 2000; 275(38): 29857-67.

177. Colley WC, Sung TC, Roll R, Jenco J, Hammond SM, Altshuler Y, et al. Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr Biol*. 1997; 7(3): 191-201.
178. Lopez I, Arnold RS, Lambeth JD. Cloning and initial characterization of a human phospholipase D2 (hPLD2). ADP-ribosylation factor regulates hPLD2. *J Biol Chem*. 1998; 273(21): 12846-52.
179. Ahn BH, Kim SY, Kim EH, Choi KS, Kwon TK, Lee YH, et al. Transmodulation between phospholipase D and c-Src enhances cell proliferation. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(9): 3103-15.
180. Salmeen A, Andersen JN, Myers MP, Tonks NK, Barford D. Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *Mol Cell*. 2000; 6(6): 1401-12.
181. Seely BL, Staubs PA, Reichart DR, Berhanu P, Milarski KL, Saltiel AR, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor. *Diabetes*. 1996; 45(10):1379-85.
182. Adachi M, Sekiya M, Arimura Y, Takekawa M, Itoh F, Hinoda Y, et al. Protein-tyrosine phosphatase expression in pre-B cell NALM-6. *Cancer Res*. 1992; 52(3): 737-40.
183. Yi T, Cleveland JL, Ihle JN. Identification of novel protein tyrosine phosphatases of hematopoietic cells by polymerase chain reaction amplification. *Blood*. 1991; 78(9): 2222-8.
184. Myers MP, Andersen JN, Cheng A, Tremblay ML, Horvath CM, Parisien JP, et al. TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem*. 2001; 276(51): 47771-4.
185. Aoki N, Matsuda T. A cytosolic protein-tyrosine phosphatase PTP1B specifically dephosphorylates and deactivates prolactin-activated STAT5a and STAT5b. *J Biol Chem*. 2000; 275(50): 39718-26.

186. Kongkham PN, Northcott PA, Croul SE, Smith CA, Taylor MD, Rutka JT. The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma. *Oncogene*. 2010; 29(20): 3017-24.
187. Roth W, Wild-Bode C, Platten M, Grimmel C, Melkonyan HS, Dichgans J, et al. Secreted Frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells. *Oncogene*. 2000; 19(37): 4210-20.
188. Polakis P. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012; 4(5). pii: a008052.
189. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009; 17(1):9-26.
190. Herbst A, Jurinovic V, Krebs S, Thieme SE, Blum H, Göke B, et al. Comprehensive analysis of β -catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/ β -catenin signaling. *BMC Genomics*. 2014; 15:74.
191. Langevin J, Morgan MJ, Sibarita JB, Aresta S, Murthy M, Schwarz T, et al. Drosophila exocyst components Sec5, Sec6, and Sec15 regulate DE-Cadherin trafficking from recycling endosomes to the plasma membrane. *Dev Cell*. 2005; 9(3): 365-76.
192. Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, Lee SR, et al. E-cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011: 567305.
193. Mariner DJ, Anastasiadis P, Keilhack H, Böhmer FD, Wang J, Reynolds AB. Identification of Src phosphorylation sites in the catenin p120ctn. *J Biol Chem*. 2001; 276(30): 28006-13.
194. Piedra J, Miravet S, Castaño J, Pálmer HG, Heisterkamp N, García de Herreros A, et al. p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(7): 2287-97.

195. Friedenson B. The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC Cancer*. 2007; 7: 152.
196. Morris JR, Solomon E. BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genet*. 2004; 13(8): 807-17.
197. Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev*. 2000; 14(8): 927-39.
198. Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science*. 1999; 286(5442): 1162-6.
199. Gatei M, Scott SP, Filippovitch I, Soronika N, Lavin MF, Weber B, et al. Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA1. *Cancer Res*. 2000; 60(12): 3299-304.
200. Tibbetts RS, Cortez D, Brumbaugh KM, Scully R, Livingston D, Elledge SJ, et al. Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev*. 2000; 14(23): 2989-3002.
201. Ray A, Mir SN, Wani G, Zhao Q, Battu A, Zhu Q, et al. Human SNF5/INI1, a component of the human SWI/SNF chromatin remodeling complex, promotes nucleotide excision repair by influencing ATM recruitment and downstream H2AX phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 2009; 29(23): 6206-19.
202. Mallery DL, Vandenberg CJ, Hiom K. Activation of the E3 ligase function of the BRCA1/BARD1 complex by polyubiquitin chains. *EMBO J*. 2002; 21(24):6755-62.
203. Zipprich JT, Bhattacharyya S, Mathys H, Filipowicz W. Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *RNA*. 2009; 15(5): 781-93.

204. Fabian MR, Cieplak MK, Frank F, Morita M, Green J, Srikumar T, et al. miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nat Struct Mol Biol.* 2011; 18(11):1211-7.
205. Albert TK, Lemaire M, van Berkum NL, Gentz R, Collart MA, Timmers HT. Isolation and characterization of human orthologs of yeast CCR4-NOT complex subunits. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(3):809-17.
206. Winkler GS, Mulder KW, Bardwell VJ, Kalkhoven E, Timmers HT. Human Ccr4-Not complex is a ligand-dependent repressor of nuclear receptor-mediated transcription. *EMBO J.* 2006; 25(13): 3089-99.
207. Fabian MR, Frank F, Rouya C, Siddiqui N, Lai WS, Karetnikov A, et al. Structural basis for the recruitment of the human CCR4-NOT deadenylase complex by tristetraprolin. *Nat Struct Mol Biol.* 2013; 20(6): 735-9.
208. Zheng X, Dumitru R, Lackford BL, Freudenberg JM, Singh AP, Archer TK, et al. Cnot1, Cnot2, and Cnot3 maintain mouse and human ESC identity and inhibit extraembryonic differentiation. *Stem Cells.* 2012; 30(5): 910-22.
209. Takahashi A, Kikuguchi C, Morita M, Shimodaira T, Tokai-Nishizumi N, Yokoyama K, et al. Involvement of CNOT3 in mitotic progression through inhibition of MAD1 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 419(2): 268-73.
210. Chicca JJ 2nd, Auble DT, Pugh BF. Cloning and biochemical characterization of TAF-172, a human homolog of yeast Mot1. *Mol Cell Biol.* 1998; 18(3): 1701-10.
211. Song W, Solimeo H, Rupert RA, Yadav NS, Zhu Q. Functional dissection of a Rice Dr1/DrAp1 transcriptional repression complex. *Plant Cell.* 2002; 14(1): 181-95.
212. Chaudhuri J, Chakrabarti A, Maitra U. Biochemical characterization of mammalian translation initiation factor 3 (eIF3). Molecular cloning reveals that p110 subunit is the mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* protein Prt1. *J Biol Chem.* 1997; 272(49): 30975-83.

213. Harris TE, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Rhoads RE, Lawrence JC Jr. mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin. *EMBO J.* 2006; 25(8): 1659-68.
214. Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR. Amino acid-induced stimulation of translation initiation in rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1999; 277(6 Pt 1): E1077-86.
215. Zekri L, Kuzuoğlu-Öztürk D, Izaurralde E. GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *EMBO J.* 2013; 32(7): 1052-65.
216. Blencowe BJ, Issner R, Nickerson JA, Sharp PA. A coactivator of pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* 1998; 12(7): 996-1009.
217. Eldridge AG, Li Y, Sharp PA, Blencowe BJ. The SRm160/300 splicing coactivator is required for exon-enhancer function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(11): 6125-30.
218. McCracken S, Lambermon M, Blencowe BJ. SRm160 splicing coactivator promotes transcript 3'-end cleavage. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(1): 148-60.
219. Clària J. Cyclooxygenase-2 biology. *Curr Pharm Des.* 2003; 9(27): 2177-90.
220. Chetyrkin SV, Belyaeva OV, Gough WH, Kedishvili NY. Characterization of a novel type of human microsomal 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase: unique tissue distribution and catalytic properties. *J Biol Chem.* 2001; 276(25): 22278-86.
221. Busch H, Camacho-Trullio D, Rogon Z, Breuhahn K, Angel P, Eils R, et al. Gene network dynamics controlling keratinocyte migration. *Mol Syst Biol.* 2008; 4:199.
222. Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell.* 2007; 130(6): 1071-82.
223. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science.* 1999; 285(5428): 736-9.

224. Mayans O, van der Ven PF, Wilm M, Mues A, Young P, Fürst DO, et al. Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature*. 1998; 395(6705): 863-9.
225. Knöll R, Linke WA, Zou P, Miodic S, Kostin S, Buyandelger B, et al. Telethonin deficiency is associated with maladaptation to biomechanical stress in the mammalian heart. *Circ Res*. 2011; 109(7): 758-69.
226. Valle G, Faulkner G, De Antoni A, Pacchioni B, Pallavicini A, Pandolfo D, et al. Telethonin, a novel sarcomeric protein of heart and skeletal muscle. *FEBS Lett*. 1997; 415(2): 163-8.
227. Crispo JA, Ansell DR, Ubriaco G, Tai TC. Role of reactive oxygen species in the neural and hormonal regulation of the PNMT gene in PC12 cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2011; 2011: 756938.
228. Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev*. 2004; 56(3): 331-49.
229. Rao F, Wessel J, Wen G, Zhang L, Rana BK, Kennedy BP, et al. Renal albumin excretion: twin studies identify influences of heredity, environment, and adrenergic pathway polymorphism. *Hypertension*. 2007; 49(5): 1015-31.
230. Bortolato M, Godar SC, Alzghoul L, Zhang J, Darling RD, Simpson KL, et al. Monoamine oxidase A and A/B knockout mice display autistic-like features. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013; 16(4): 869-88.
231. Goldstein DS, Eisenhofer G, Kopin IJ. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 305(3): 800-11.
232. Kawamura M, Eisenhofer G, Kopin IJ, Kador PF, Lee YS, Tsai JY, et al. Aldose reductase, a key enzyme in the oxidative deamination of norepinephrine in rats. *Biochem Pharmacol*. 1999; 58(3): 517-24.

233. Brenner B, Harney JT, Ahmed BA, Jeffus BC, Unal R, Mehta JL, et al. Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. *J Neurochem.* 2007; 102(1): 206-15.
234. Ahmed BA, Jeffus BC, Bukhari SI, Harney JT, Unal R, Lupashin VV, et al. Serotonin transamidates Rab4 and facilitates its binding to the C terminus of serotonin transporter. *J Biol Chem.* 2008; 283(14): 9388-98.
235. Squires LN, Jakubowski JA, Stuart JN, Rubakhin SS, Hatcher NG, Kim WS, et al. Serotonin catabolism and the formation and fate of 5-hydroxyindole thiazolidine carboxylic acid. *J Biol Chem.* 2006; 281(19): 13463-70.
236. Groeger AL, Cipollina C, Cole MP, Woodcock SR, Bonacci G, Rudolph TK, et al. Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids. *Nat Chem Biol.* 2010; 6(6): 433-41.
237. Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med.* 1999; 5(6): 698-701.
238. Serhan CN, Chiang N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *Br J Pharmacol.* 2008; 153 (Suppl 1): S200-15.
239. Musiek ES, Brooks JD, Joo M, Brunoldi E, Porta A, Zannoni G, et al. Electrophilic cyclopentenone neuroprostanes are anti-inflammatory mediators formed from the peroxidation of the omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *J Biol Chem.* 2008; 283(29): 19927-35.
240. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(5): 986-1000.
241. Frolov A, Yang L, Dong H, Hammock BD, Crofford LJ. Anti-inflammatory properties of prostaglandin E2: deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 exacerbates non-immune inflammatory arthritis in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013; 89(5): 351-8.

242. Birrell MA, Maher SA, Dekkak B, Jones V, Wong S, Brook P, et al. Anti-inflammatory effects of PGE2 in the lung: role of the EP4 receptor subtype. *Thorax*. 2015; 70(8): 740-7.
243. Murata T, Aritake K, Tsubosaka Y, Maruyama T, Nakagawa T, Hori M, et al. Anti-inflammatory role of PGD2 in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(13): 5205-10.
244. Lee J, Ho WH, Maruoka M, Corpuz RT, Baldwin DT, Foster JS, et al. IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1. *J Biol Chem*. 2001; 276(2): 1660-4.
245. Oosting M, Berende A, Sturm P, Ter Hofstede HJ, de Jong DJ, Kanneganti TD, et al. Recognition of *Borrelia burgdorferi* by NOD2 is central for the induction of an inflammatory reaction. *J Infect Dis*. 2010; 201(12): 1849-58.
246. Wang Q, Dziarski R, Kirschning CJ, Muzio M, Gupta D. Micrococci and peptidoglycan activate TLR2-->MyD88-->IRAK-->TRAF-->NIK-->IKK-->NF-kappaB signal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8. *Infect Immun*. 2001; 69(4): 2270-6.
247. Song X, Zhu S, Shi P, Liu Y, Shi Y, Levin SD, et al. IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens. *Nat Immunol*. 2011; 12(12): 1151-8.
248. Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A, Luis E, Lin Z, Jeet S, Lesch J, et al. IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nat Immunol*. 2011; 12(12): 1159-66.
249. Fukukawa C, Shima H, Tanuma N, Okada T, Kato N, Adachi Y, et al. The oncoprotein I-2PP2A/SET negatively regulates the MEK/ERK pathway and cell proliferation. *Int J Oncol*. 2005; 26(3): 751-6.
250. Chen Y, Liu W, Naumovski L, Neve RL. ASPP2 inhibits APP-BP1-mediated NEDD8 conjugation to cullin-1 and decreases APP-BP1-induced cell proliferation and neuronal apoptosis. *J Neurochem*. 2003; 85(3): 801-9.

251. Wang YP, Huang LY, Sun WM, Zhang ZZ, Fang JZ, Wei BF, et al. Insulin receptor tyrosine kinase substrate activates EGFR/ERK signalling pathway and promotes cell proliferation of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2013; 337(1): 96-106.
252. Chao A, Tsai CL, Jung SM, Chuang WC, Kao C, Hsu A, et al. BAI1-associated protein 2-like 1 (BAIAP2L1) is a potential biomarker in ovarian cancer. *PLoS One.* 2015; 10(7): e0133081.
253. Wang KS, Chen G, Shen HL, Li TT, Chen F, Wang QW, et al. Insulin receptor tyrosine kinase substrate enhances low levels of MDM2-mediated p53 ubiquitination. *PLoS One.* 2011; 6(8): e23571.
254. Jarman KE, Moretti PA, Zebol JR, Pitson SM. Translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane is mediated by calcium- and integrin-binding protein 1. *J Biol Chem.* 2010; 285(1): 483-92.
255. Dittmer S, Kovacs Z, Yuan SH, Siszler G, Kögl M, Summer H, et al. TOX3 is a neuronal survival factor that induces transcription depending on the presence of CITED1 or phosphorylated CREB in the transcriptionally active complex. *J Cell Sci.* 2011; 124(Pt 2): 252-60.
256. Wang C, Li N, Liu X, Zheng Y, Cao X. A novel endogenous human CaMKII inhibitory protein suppresses tumor growth by inducing cell cycle arrest via p27 stabilization. *J Biol Chem.* 2008; 283(17): 11565-74.
257. Corcoran CA, He Q, Huang Y, Sheikh MS. Cyclooxygenase-2 interacts with p53 and interferes with p53-dependent transcription and apoptosis. *Oncogene.* 2005 Feb 24; 24(9): 1634-40.
258. Choi EM, Heo JI, Oh JY, Kim YM, Ha KS, Kim JI, et al. COX-2 regulates p53 activity and inhibits DNA damage-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 328(4): 1107-12.

259. Kato Y, Kravchenko W, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J.* 1997; 16(23): 7054-66.
260. Ohnesorge N, Viemann D, Schmidt N, Czymai T, Spiering D, Schmolke M, et al. Erk5 activation elicits a vasoprotective endothelial phenotype via induction of Kruppel-like factor 4 (KLF4). *J Biol Chem.* 2010; 285(34): 26199-210.
261. Wang X, Adhikari N, Li Q, Hall JL. LDL receptor-related protein LRP6 regulates proliferation and survival through the Wnt cascade in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 287(6): H2376-83.
262. Wang X, Xiao Y, Mou Y, Zhao Y, Blankesteyn WM, Hall JL. A role for the beta-catenin/T-cell factor signaling cascade in vascular remodeling. *Circ Res.* 2002; 90(3): 340-7.
263. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182(3): 311-22.
264. Humtsoe JO, Liu M, Malik AB, Wary KK. Lipid phosphate phosphatase 3 stabilization of beta-catenin induces endothelial cell migration and formation of branching point structures. *Mol Cell Biol.* 2010; 30(7): 1593-606.
265. Millet C, Lemaire P, Orsetti B, Guglielmi P, François V. The human chordin gene encodes several differentially expressed spliced variants with distinct BMP opposing activities. *Mech Dev.* 2001; 106(1-2): 85-96.
266. Moll F, Millet C, Noël D, Orsetti B, Bardin A, Katsaros D, et al. Chordin is underexpressed in ovarian tumors and reduces tumor cell motility. *FASEB J.* 2006; 20(2): 240-50.
267. Huang S, Liu F, Niu Q, Li Y, Liu C, Zhang L, et al. GLIPR-2 overexpression in HK-2 cells promotes cell EMT and migration through ERK1/2 activation. *PLoS One.* 2013; 8(3): e58574.

268. Barresi R, Campbell KP. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci.* 2006; 119(Pt 2): 199-207.
269. Muschler J, Levy D, Boudreau R, Henry M, Campbell K, Bissell MJ. A role for dystroglycan in epithelial polarization: loss of function in breast tumor cells. *Cancer Res.* 2002; 62(23): 7102-9.
270. Jing J, Lien CF, Sharma S, Rice J, Brennan PA, Górecki DC. Aberrant expression, processing and degradation of dystroglycan in squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer.* 2004; 40(14): 2143-51.
271. Sgambato A, De Paola B, Migaldi M, Di Salvatore M, Rettino A, Rossi G, et al. Dystroglycan expression is reduced during prostate tumorigenesis and is regulated by androgens in prostate cancer cells. *J Cell Physiol.* 2007; 213(2): 528-39.
272. Martin PT. Congenital muscular dystrophies involving the O-mannose pathway. *Curr Mol Med.* 2007; 7(4): 417-25.
273. Bao X, Kobayashi M, Hatakeyama S, Angata K, Gullberg D, Nakayama J, et al. Tumor suppressor function of laminin-binding alpha-dystroglycan requires a distinct beta3-N-acetylglucosaminyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(29): 12109-14.
274. Iablockov V, Hirota CL, Peplowski MA, Ramachandran R, Mihara K, Hollenberg MD, et al. Proteinase-activated receptor 2 (PAR2) decreases apoptosis in colonic epithelial cells. *J Biol Chem.* 2014; 289(49): 34366-77.
275. Luo R, Wang X, Dong Y, Wang L, Tian C. Activation of protease-activated receptor 2 reduces glioblastoma cell apoptosis. *J Biomed Sci.* 2014; 21:25.
276. Huang SH, Li Y, Chen HG, Rong J, Ye S. Activation of proteinase-activated receptor 2 prevents apoptosis of lung cancer cells. *Cancer Invest.* 2013; 31(9): 578-81.
277. Wu B, Zhou H, Hu L, Mu Y, Wu Y. Involvement of PKC α activation in TF/VIla/PAR2-induced proliferation, migration, and survival of colon cancer cell SW620. *Tumour Biol.* 2013; 34(2): 837-46.

278. Lohman RJ, Cotterell AJ, Suen J, Liu L, Do AT, Vesey DA, Fairlie DP. Antagonism of protease-activated receptor 2 protects against experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012; 340(2): 256-65.
279. Tripathi T, Alizadeh H. Role of protease-activated receptors 2 (PAR2) in ocular infections and inflammation. *Receptors Clin Investig.* 2014; 1(6): e2991.
280. Morris DR, Ding Y, Ricks TK, Gullapalli A, Wolfe BL, Trejo J. Protease-activated receptor-2 is essential for factor VIIa and Xa-induced signaling, migration, and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006; 66(1): 307-14.
281. Shpacovitch VM, Varga G, Strey A, Gunzer M, Mooren F, Buddenkotte J, et al. Agonists of proteinase-activated receptor-2 modulate human neutrophil cytokine secretion, expression of cell adhesion molecules, and migration within 3-D collagen lattices. *J Leukoc Biol.* 2004; 76(2): 388-98.
282. Zhou F, Zhou H, Wang T, Mu Y, Wu B, Guo DL, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits proliferation and migration of human colon cancer SW620 cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin.* 2012; 33(1): 120-6.
283. Schaffner F, Ruf W. Tissue factor and PAR2 signaling in the tumor microenvironment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(12): 1999-2004.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1000 ml
1. กระบอกตวง (measurement cylinder) ขนาด 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 ml
 2. กรรไกร
 3. กรวยแก้ว (glass funnel)
 4. จานเพาะเลี้ยงขนาด 6 หลุม (6-well plate)
 5. ปิเปตต์ปลอดเชื้อ (stripette) ขนาด 5 และ 10 ml บริษัท Corning Incorporated
 6. Pasteur pipette
 7. automatic pipette ขนาด P2, P20, P200 และ P1000
 8. เครื่องดูดสาร new KATASPIR model
 9. ตู้ปลอดเชื้อ (safety carbinet class II) รุ่น NU440SPEC บริษัท NUAIRE
 10. ตู้บ่มเพาะเชื้อภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO2 incubator)
 11. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น ROTOFIX 32 บริษัท Hettich
 12. จานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาด 10 เซนติเมตร
 13. ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 ml
 14. คีมปากคีบ (forceps)
 15. เครื่องเขย่า (vortex) สำหรับเพลท รุ่น micromixer MX4 บริษัท FINEPCR

16. เครื่องเขย่าสำหรับหลอดทดลอง รุ่น fine vortex บริษัท FINEPCR
 17. เครื่องบ่ม (incubator) รุ่น vs84805FN
 18. เครื่องปั่นเหวี่ยง (ultracentrifuge) รุ่น spectrafuge 24D บริษัท Labnet International, Inc.
 19. เครื่องปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge) รุ่น MIKRO 20 บริษัท Hettich
 20. เครื่องชั่งน้ำหนัก ความละเอียด 2 ตำแหน่ง รุ่น PA4102 บริษัท OHAUS
 21. เครื่องชั่งน้ำหนัก ความละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น PA214 บริษัท OHAUS
 22. เครื่อง microplate reader รุ่น RT-2100C บริษัท Rayto Life and Analytical Sciences Co., Ltd.
 23. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
 24. เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (speed vacuum microcentrifuge) รุ่น AES 1010 บริษัท Savant
 25. เครื่องสแกนเจล รุ่น GS-710 Callibrated Imaging Densitometer บริษัท BIO-RAD
 26. นาโนคอลัมน์ รุ่น PepSwift monolithic column บริษัท Dionex
 27. เครื่อง UPLC รุ่น nanoACQUITY UPLC system บริษัท Waters
 28. เครื่อง mass spectrometry รุ่น SYNAPT™ HDMS™ system บริษัท Waters
 29. ตู้เย็นแช่แข็ง อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส รุ่น HLT 1386-VBA บริษัท Revco
 30. ตู้เย็นแช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น FC-28 บริษัท กรุงเทพมหานครไฟฟ้า
- จำกัด
31. ตู้เย็นแช่เย็น อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส
 32. นาฬิกาจับเวลา
 33. ซ้อนตักสาร
 34. พลาสติกสำหรับห่ออาหาร
 35. กระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์

36. microcentrifuge tube
37. ปิเปตต์ทีป (pipette tips) ขนาด 2, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
38. ชุดรัน gel electrophoresis รุ่น AE-6530 บริษัท ATTO Corperation
39. แหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้าสำหรับรันเจล รุ่น AE-8130 myPower 300 บริษัท ATTO Corperation
40. กล้องจุลทรรศน์
41. ไขมีดสำหรับตัดเจล
42. จานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุม (96-well plate)
43. เครื่องปิเปตต์อัตโนมัติ (stripettor) บริษัท Corning Incorporated

2. สารเคมี

1. acetic acid ($C_2H_4O_2$) น้ำหนักโมเลกุล 60 g/mol บริษัท Labscan Asia จำกัด
2. acetonitrile (CH_3CN , ACN) น้ำหนักโมเลกุล 41.05 g/mol บริษัท Labscan Asia จำกัด
3. acetone (C_3H_6O) น้ำหนักโมเลกุล 58.08 g/mol บริษัท Labscan Asia จำกัด
4. อะคริลาไมด์ (C_3H_5NO) น้ำหนักโมเลกุล 71.08 g/mol บริษัท GE Healthcare UK Ltd.
5. $(NH_4)HCO_3$ น้ำหนักโมเลกุล 79.056 g/mol บริษัท Sigma-Aldrich, Inc.
6. BSA (bovine serum albumin) น้ำหนักโมเลกุล 66,399 Da
7. CO_2
8. คลอโรฟอร์ม (chloroform, $CHCl_3$) น้ำหนักโมเลกุล 119.38 g/mol บริษัท Labscan Asia จำกัด
9. copper sulfate ($CuSO_4$) น้ำหนักโมเลกุล 249.68 g/mol บริษัท Fisher Scientific UK Ltd.

10. dithiothritol (DTT) น้ำหนักโมเลกุล 154.25 g/mol บริษัท USB ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) บริษัท GIBCO
12. C₂H₅OH น้ำหนักโมเลกุล 46.07 g/mol บริษัท Labscan Asia จำกัด
13. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, C₁₀H₁₄N₂NaO₈•2H₂O) น้ำหนักโมเลกุล 372.24 g/mol บริษัท USB Cooperation ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. fetal bovine serum บริษัท GIBCO
15. Folin-ciocaltean phenol reagent บริษัท CARLO ERBA Reagents
16. gentamycin sulfate 50 mg/ml บริษัท Mediatech, Inc.
17. hydrogen peroxide (H₂O₂) น้ำหนักโมเลกุล 34.0147 g/mol บริษัท Labscan Asia จำกัด
18. iodoacetamide (IAA) น้ำหนักโมเลกุล 184.96 g/mol บริษัท GE Healthcare UK Ltd.
19. โปรตีนมาตรฐาน (low molecular weight protein standard marker) บริษัท Amersham Biosciences
20. ไนโตรเจนเหลว
21. CH₃OH น้ำหนักโมเลกุล 32.00 g/mol บริษัท Labscan Asia จำกัด
22. น้ำบริสุทธิ์นาโน (nano pure water)
23. เปปไทด์สำหรับกระตุ้น PAR2 (PAR2-activating peptide, SLIGKV) บริษัท Bachem Americas, Inc.
24. AgNO₃ น้ำหนักโมเลกุล 169.87 g/mol บริษัท Applichem GmbH ประเทศเยอรมนี
25. Na₂CO₃ น้ำหนักโมเลกุล 105.99 g/mol บริษัท EC
26. SDS (sodium dodecyl sulfate, C₁₂H₂₅O₄SNa) น้ำหนักโมเลกุล 288.38 g/mol บริษัท Pacific Science Co., Ltd.

27. sodium thiosulfate pentahydrate น้ำหนักโมเลกุล 248.18 g/mol บริษัท USB Coperation ประเทศสหรัฐอเมริกา

28. น้ำปราศจากเชื้อ (sterile water) ผลิตจากเครื่องกลั่นของไปโอเทค

29. tartaric acid ($C_4H_6O_6$) น้ำหนักโมเลกุล 150.09 g/mol บริษัท CARLO ERBA Reagents

30. Tris-HCl น้ำหนักโมเลกุล 121.4 g/mol บริษัท Merek KGaA

31. trypsin (trypsin Seq. Grade Modified) บริษัท Promega Coperation

32. TEMED (tetramethylethylenediamine, $C_6H_{16}N$) น้ำหนักโมเลกุล 116.24 g ต่อโมล บริษัท USB Coperation ประเทศสหรัฐอเมริกา

33. 37% formaldehyde solution บริษัท บริษัท Sigma-Aldrich, Inc.

34. formic acid (CH_2O_2)

ภาคผนวก ข**ข้อมูลการวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง****1. การเตรียมสารสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน****1.1 การเตรียมสารละลาย A ปริมาตร 100 ml**

1.1.1 เตรียม copper tartratecarbonate (CTC) (0.2% CuSO_4 + 0.4% tatic acid 100 ml

ซึ่ง CuSO_4 0.2 g และ tatic acid 0.4 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วทำการปรับปริมาตรเป็น 100 ml

1.1.2 เตรียม 20% Na_2CO_3 50 ml

ซึ่ง 10 g Na_2CO_3 ละลายในน้ำกลั่น แล้วทำการปรับปริมาตรเป็น 50 ml

1.1.3 เตรียม 0.8 N NaOH 50 ml

ซึ่ง NaOH 1.6 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วทำการปรับปริมาตรเป็น 50 ml

1.1.4 เตรียม 5% SDS 50 ml

ซึ่ง SDS 2.5 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วทำการปรับปริมาตรเป็น 50 ml

1.1.5 เตรียมสารละลาย A ปริมาตร 100 ml

ผสมสารละลาย CTC 12.5 ml, 20% Na_2CO_3 12.5 ml, 0.8 N NaOH 25 ml และ 5% SDS 50 ml เข้าด้วยกัน แล้วเก็บไว้ในที่ที่ไม่มีแสง

1.2 การเตรียมสารละลาย B ปริมาตร 30 ml

1.2.1 ใช้สาร folin-ciocalteau phenol 5 ml

1.2.2 น้ำกลั่น 25 ml

1.2.3 ผสม folin-ciocalteau phenol และน้ำกลั่นเข้าด้วยกัน เก็บไว้ในที่มืด

1.3 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับทำกราฟมาตรฐาน

ทำการชั่งสาร BSA (bovine serum albumin) ปริมาณ 2 mg ละลายในน้ำกลั่น 1 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสารสำหรับการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

2.1 การเตรียม 0.1% SDS ปริมาตร 50 ml

ทำการปิเปต 5% SDS 1 ml แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 49 ml

2.2 การเตรียม 1X SDS running buffer

ทำการปิเปต 10X SDS ปริมาตร 100 ml เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 ml

3. การเตรียมสารสำหรับการย้อมเจลด้วยเงิน

3.1 fixing solution 500 ml

ประกอบไปด้วย 50% methanol, 12% acetic acid และ 37% formaldehyde ซึ่งเตรียมได้โดยใช้ methanol 250 ml, acetic acid 60 ml และ formaldehyde 250 μ l แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ 500 ml

3.2 washing solution 1000 ml

ประกอบไปด้วย 35% ethanol เตรียมได้โดยใช้ ethanol 350 ml แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ 1000 ml

3.3 sensitizing solution 500 ml

ประกอบไปด้วย 0.02% sodium thiosulfate ซึ่งเตรียมได้โดยการชั่ง sodium thiosulfate 0.1 g แล้วทำการเติมน้ำกลั่นให้ได้ 500 ml

3.4 staining solution 500 ml

ประกอบไปด้วย 0.2% silver nitrate ซึ่งเตรียมได้โดยการชั่ง silver nitrate 1 g แล้วทำการเติมน้ำกลั่นให้ได้ 500 ml

3.5 developing solution 500 ml

เตรียมได้โดยใช้ sodium carbonate 30 g, 0.02% sodium thiosulfate 10 ml และ 37% formaldehyde 250 μ l แล้วทำการเติมน้ำกลั่นให้ได้ 500 ml

3.6 stopping solution

เตรียมได้โดยชั่ง sodium EDTA 7.3 g แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ 500 ml

4. การเตรียมสารสำหรับการย่อยโปรตีนภายในเจล

4.1 เตรียม 20 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 50 ml

ชั่งสาร $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 79.06 mg ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 ml

4.2 เตรียม 10 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 50 ml

เติม 20 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 25 ml แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 25 ml

4.3 เตรียม 10 mM DTT ใน 10 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 10 ml

ชั่งสาร DTT 15.425 mg แล้วละลายใน 10 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ ปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml

4.4 เตรียม 10 mM IAA ใน 10 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 10 ml

ชั่งสาร DTT 18.4 mg แล้วละลายใน 10 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ ปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml

4.5 เตรียม 50% acetonitrile ใน 10 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 5 ml

เติม 100% acetonitrile 2.5 ml ผสมกับ 20 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 2.5 ml

4.6 เตรียม 10 ng trypsin ใน 50% acetonitrile ใน 10 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$

เติม 50% acetonitrile ใน 10 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 2 ml ลงใน 20 μ g trypsin

4.7 เตรียม 30% acetonitrile ปริมาตร 5 ml

เติม 100% acetonitrile 1.5 ml แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 3.5 ml

4.8 เตรียม 0.2% formic acid ปริมาตร 50 ml

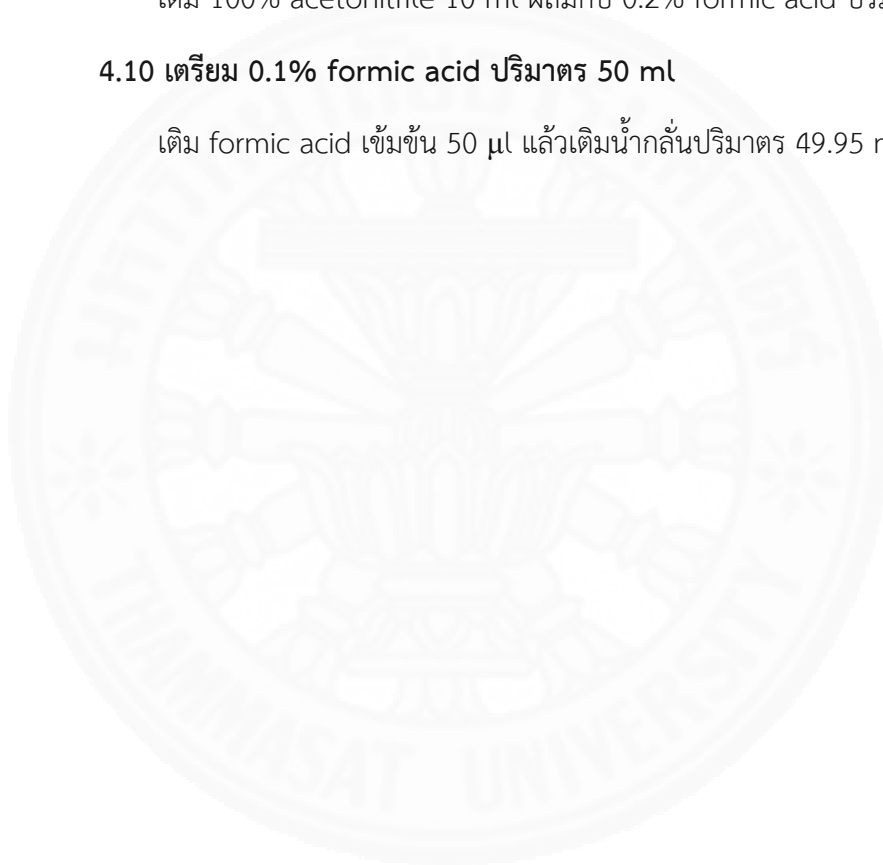
เติม formic acid เข้มข้น 100 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 49.9 ml

4.9 เตรียม 50% acetonitrile ใน 0.1% formic acid ปริมาตร 20 ml

เติม 100% acetonitrile 10 ml ผสมกับ 0.2% formic acid ปริมาตร 10 ml

4.10 เตรียม 0.1% formic acid ปริมาตร 50 ml

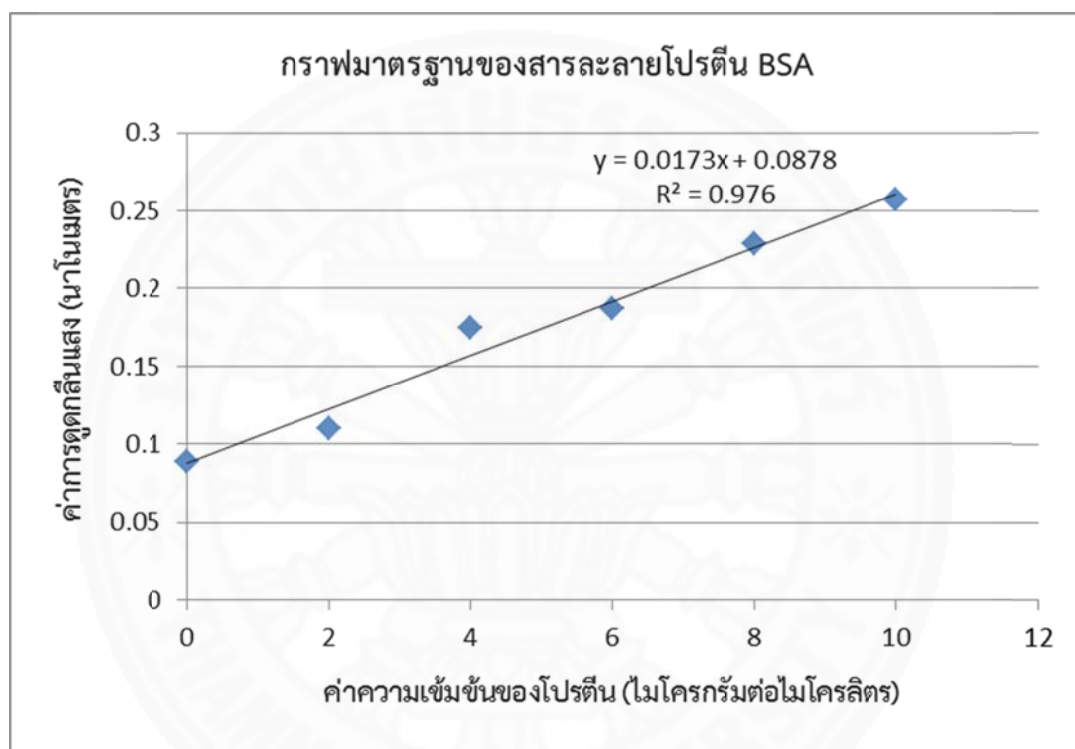
เติม formic acid เข้มข้น 50 μ l แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 49.95 ml



ภาคผนวก ค

ข้อมูลการวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง

1. กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน



รูปภาพภาคผนวกที่ ค.1 รูปภาพแสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA

2. ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ 12 ตัวอย่าง

ตารางภาคผนวกที่ ค.1 ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทั้ง 12 ตัวอย่าง (nm)

กลุ่ม control 48 ชั่วโมง	ค่าการดูดกลืนแสง (nm)
ตัวอย่างที่ 1	0.178
ตัวอย่างที่ 2	0.2725
ตัวอย่างที่ 3	0.183
กลุ่มเซลล์ทดสอบ 48 ชั่วโมง	ค่าการดูดกลืนแสง (nm)
ตัวอย่างที่ 1	0.198
ตัวอย่างที่ 2	0.2523
ตัวอย่างที่ 3	0.188
กลุ่ม control 72 ชั่วโมง	ค่าการดูดกลืนแสง (nm)
ตัวอย่างที่ 1	0.179
ตัวอย่างที่ 2	0.201
ตัวอย่างที่ 3	0.212
กลุ่มเซลล์ทดสอบ 72 ชั่วโมง	ค่าการดูดกลืนแสง (nm)
ตัวอย่างที่ 1	0.223
ตัวอย่างที่ 2	0.190
ตัวอย่างที่ 3	0.229

ภาคผนวก ง

ข้อมูลการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

1. ข้อมูลปริมาณของโปรตีนในแต่ละตัวอย่างที่ใช้ในการทำ SDS-PAGE

ตารางที่ ง.1 ตารางแสดงปริมาณ (μl) ที่ต้องใช้ในการปรับให้แต่ละตัวอย่างมีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากันที่ 50 ไมโครลิตร ก่อนจะปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากันที่ 10 μl

กลุ่ม control 48 ชั่วโมง	ปริมาณ (μl)
ตัวอย่างที่ 1	9.59
ตัวอย่างที่ 2	4.68
ตัวอย่างที่ 3	9.09
กลุ่มเซลล์ทดสอบ 48 ชั่วโมง	ปริมาณ (μl)
ตัวอย่างที่ 1	7.85
ตัวอย่างที่ 2	5.26
ตัวอย่างที่ 3	8.63
กลุ่ม control 72 ชั่วโมง	ปริมาณ (μl)
ตัวอย่างที่ 1	9.49
ตัวอย่างที่ 2	7.64
ตัวอย่างที่ 3	6.96
กลุ่มเซลล์ทดสอบ 72 ชั่วโมง	ปริมาณ (μl)
ตัวอย่างที่ 1	6.40
ตัวอย่างที่ 2	8.46
ตัวอย่างที่ 3	6.13

ภาคผนวก จ

ข้อมูลชนิดและปริมาณของโปรตีนในตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค

LC-MS

ตารางที่ จ.1 ตารางแสดงข้อมูลดิบที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS ของโปรตีนทั้งหมดจำนวน 310 ชนิด

Protein name	GI number	Peptide	ID Score	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Test	Test	Test	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Test	Test	Test
				48 No.1	48 No.2	48 No.3	48 No.1	48 No.2	48 No.3	72 No.1	72 No.2	72 No.3	72 No.1	72 No.2	72 No.3
1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-4	gi 655723203	INGDK	6.76	5.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	gi 655871337	AAPSDSLPR	20.34	0.00	2.98	0.00	1.08	0.71	0.00	6.14	0.00	0.00	0.00	0.00	2.66
activating transcription factor 7-interacting protein 1	gi 655830818	MEASFGSPSK	20.65	9.83	0.00	3.20	4.08	1.39	5.03	3.50	3.11	1.54	0.00	3.00	2.23
ADP-ribosylation factor-like protein 14	gi 655853124	MGLLSK	15.90	6.15	6.23	5.77	5.28	5.09	6.19	5.58	4.78	6.53	4.72	5.28	4.00
ADP-ribosylation factor-like protein 4D	gi 655871534	EFVQSVPTK	20.58	1.08	1.33	2.14	0.00	2.60	3.48	0.17	3.69	0.00	1.27	3.58	1.32
aldose reductase (EC 1.1.1.21)	gi 164757	AIADK	3.13	0.00	6.22	1.78	3.16	2.96	2.57	0.97	1.99	5.69	1.16	4.01	5.01
alpha-1 type V collagen	gi 17864004	VTKFLXR	18.74	6.54	5.99	8.00	6.42	5.79	6.76	4.51	8.10	6.76	5.18	5.47	6.04
alpha-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1	gi 291413419	APTTK	7.74	0.00	0.00	2.18	2.60	0.00	0.00	0.00	3.00	0.00	0.00	0.00	3.38
amine oxidase [flavin-containing] B	gi 655875525	KFVGSGQVSR	16.69	0.68	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.71	0.00	5.46	3.15	0.00	0.00
AMP deaminase 2	gi 655847632	DFYNIR	20.43	3.13	0.00	1.25	-0.28	0.00	0.00	4.59	0.00	3.29	4.42	0.00	2.29
amyloid-like protein 1	gi 655889027	MGPASPAARGLGR	9.59	4.88	5.62	5.80	5.32	5.87	0.00	4.97	5.17	5.03	4.68	5.84	4.95
ankyrin repeat domain-containing protein 12	gi 291394114	LRNRNACLEK	9.15	6.03	6.31	6.56	5.76	5.83	6.15	5.74	6.44	4.98	5.11	6.07	5.68
ankyrin repeat domain-containing protein 39	gi 291386257	DLLAA	16.89	5.73	4.79	4.14	4.18	3.88	4.37	2.95	4.17	3.43	3.10	4.27	4.05
antigen KI-67	gi 655723488	RQRTVPR	28.43	2.93	0.00	4.91	0.26	0.00	0.00	4.41	1.61	5.86	5.50	1.28	6.12
apoptosis-stimulating of p53 protein 2	gi 655860022	ENGVNSPR	32.31	0.00	7.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.35	0.00	0.00	0.00	0.00
arylacetylamide deacetylase	gi 291400011	INQHMPEESR	12.87	9.20	9.40	9.83	8.14	8.47	8.86	8.60	9.02	8.44	8.85	8.77	7.52
aspartyl aminopeptidase	gi 291392287	GPVIK	0.97	2.33	4.96	4.29	0.00	5.13	4.50	4.34	0.00	5.40	2.87	5.61	2.92
ataxin-1	gi 291409238	ALSTGLDYSPSPAPR	3.74	5.39	4.40	3.88	4.48	5.59	2.47	4.90	3.22	4.61	4.51	3.57	4.37
atrial natriuretic peptide-converting enzyme	gi 655604684	ASGAR	3.97	0.00	0.00	4.26	5.19	0.00	8.50	8.10	0.00	3.97	0.00	0.00	4.57
basic proline-rich protein	gi 655883405	HVRGAAPRAK	5.25	0.00	0.00	3.37	0.00	0.00	0.00	5.21	4.09	2.37	0.00	4.75	0.00
beta-1,3-galactosyltransferase 6	gi 655875818	HXEVR	11.97	3.71	6.61	2.81	0.00	3.16	4.05	2.67	0.00	7.75	3.20	3.97	2.50

ตารางที่ จ.1 (ต่อเนือง)

brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1	gi 655894091	AGAFC	5.76	0.00	0.00	0.00	2.63	0.00	0.00	0.00	0.00	3.19	3.80	0.00	3.88
brain-specific angiogenesis inhibitor 2	gi 655880043	YLYLSLR	25.44	7.23	5.02	7.16	6.02	6.01	6.56	8.51	6.92	7.03	6.90	7.10	7.02
breast cancer type 2 susceptibility protein	gi 291408657	NASLISTLKK	14.61	4.35	0.00	0.00	0.00	0.00	3.00	2.27	0.00	1.56	2.11	0.00	0.00
bridging integrator 3	gi 655890007	KFGSVFPSLNMAVK	18.91	8.59	9.83	9.07	7.90	7.80	7.34	7.96	8.40	9.40	8.83	8.78	7.86
BTB/POZ domain-containing protein 1	gi 655893577	FTVNR	10.17	6.09	5.66	6.05	6.15	5.56	6.08	5.46	6.67	7.14	5.38	6.75	6.41
butyrophilin subfamily 3 member A2	gi 655891687	DHVTR	8.52	7.62	6.87	4.78	6.29	5.83	4.48	4.07	2.79	6.66	5.02	6.28	5.81
butyrophilin-like protein 10	gi 655898075	GAAGEREVAGR	8.02	8.02	8.18	8.82	7.64	7.59	8.35	7.89	8.35	5.23	5.91	8.55	7.91
calcium and integrin-binding protein 1	gi 655884854	GGSGSR	1.48	0.91	2.71	3.63	2.35	2.07	5.72	1.61	0.00	0.06	5.57	2.77	1.30
calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	gi 655851143	APPGV	10.83	0.00	0.00	0.00	2.26	0.00	4.25	4.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CAP-Gly domain-containing linker protein 4	gi 655617903	XGILK	0.05	0.00	5.03	3.11	1.18	0.00	2.97	0.00	6.90	0.00	2.38	2.28	0.00
catenin delta-1	gi 655603842	TATPSDPR	31.89	0.00	2.44	0.00	0.21	0.48	3.03	0.50	1.06	0.86	0.91	0.00	2.98
CCR4-NOT transcription complex subunit 1	gi 291390224	LKVGVDPK	20.20	5.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.38	0.00	6.31	1.49	0.00	4.91
CCR4-NOT transcription complex subunit 3	gi 655711400	SNRLDLQTR	17.46	4.19	3.98	4.02	4.59	3.40	4.50	4.67	3.63	6.07	5.38	4.07	4.13
centlein	gi 291397378	AAKKK	8.34	2.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.09	2.98	0.00	0.00	5.14	0.00
centriole, cilia and spindle-associated protein	gi 291413360	GPAEEPTEAR	9.56	0.00	1.27	4.16	0.00	1.11	2.86	3.61	2.27	5.39	5.06	2.90	0.00
centromere protein C	gi 655857975	KAKGNMEK	7.33	0.00	0.00	0.00	0.00	5.18	5.77	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
centrosomal protein of 192 kDa	gi 655835705	SGNSR	7.89	2.82	4.67	4.42	3.51	3.88	4.98	4.69	4.24	3.73	2.90	4.47	3.18
centrosomal protein of 290 kDa	gi 655750513	ASGILTSEK	19.60	9.25	9.66	7.56	7.17	8.58	7.72	7.14	7.70	8.98	6.85	8.13	6.74
centrosomal protein of 83 kDa	gi 291389735	TMDEK	4.82	0.00	0.00	0.00	-0.07	0.00	0.00	3.43	0.00	4.66	4.47	0.00	4.61
cerebral cavernous malformations 2 protein	gi 655711134	GKKAFVSPiR	13.41	7.00	7.34	7.64	5.86	7.16	7.38	7.09	7.35	3.54	5.55	7.44	6.43
chaperonin Cct6	gi 3201994	MAAVKTLNPKAEVAR	10.58	0.00	0.00	7.30	6.94	6.72	7.02	6.49	6.97	6.94	6.82	7.70	6.37
chordin	gi 46394860	AAEGS	5.16	3.62	2.33	4.51	0.00	0.00	0.00	0.34	0.00	0.00	0.00	2.80	0.00
chromodomain-helicase-DNA-binding protein 9	gi 655780334	AGGHK	6.67	0.00	0.00	0.00	2.35	0.00	0.00	6.19	0.00	3.88	0.00	0.00	0.00
coiled-coil domain-containing protein 168	gi 655832875	GVLTK	8.15	0.00	0.00	0.00	2.89	0.00	2.63	0.00	0.00	1.43	0.00	3.31	3.13
collagen alpha-1(III) chain	gi 291391890	KWWTDSGAEK	19.57	6.21	6.14	6.23	6.07	4.72	6.55	6.17	5.11	6.76	5.81	5.45	5.89

ตารางที่ จ.1 (ต่อเนือง)

collagen alpha-1(VII) chain	gi 655834367	GVDGDKGPR	20.09	3.22	0.00	4.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
complement component C1q receptor	gi 291388940	AEAPLAMR	18.02	0.00	0.00	7.14	0.00	0.00	1.74	6.08	2.48	6.25	1.21	0.00	5.40
contactin-associated protein-like 2	gi 655814994	NGVNR	6.00	4.96	4.48	3.01	5.76	5.41	5.69	5.33	3.32	6.67	6.14	3.33	4.43
cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 beta	gi 291395831	SPPVR	7.80	5.28	1.05	0.00	0.00	0.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.39
cyclin-dependent kinase 13	gi 655837714	QMGMTDDVSTVKAPR	17.37	7.71	8.02	8.54	7.95	7.82	6.55	7.24	8.76	8.49	9.23	9.23	6.91
cyclin-dependent kinase-like 3	gi 291387332	MLKKDSKR	10.79	6.31	6.02	6.37	7.35	5.01	5.31	5.54	6.34	6.32	5.24	5.84	5.50
cyclooxygenase-2	gi 2109297	VAKASIDQSR	9.42	2.84	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.96
cytochrome P450 2B5	gi 655889591	TSSWRHR	18.49	3.80	1.98	1.52	0.00	1.00	4.08	4.01	0.74	-0.75	0.40	1.72	0.00
cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme	gi 299843	GLPSR	12.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.24	0.00	0.00	6.40
cytosolic carboxypeptidase-like protein 5	gi 655619153	RLAEG	5.79	0.00	5.20	5.15	0.00	4.50	3.53	0.00	4.76	2.17	2.73	3.73	4.32
DDB1- and CUL4-associated factor 5	gi 655872951	AGTSHK	4.56	0.00	0.00	0.00	0.00	6.39	0.00	0.00	0.00	3.76	0.00	0.00	0.00
dehydrogenase/reductase SDR family member 9	gi 291391688	TFDEK	2.16	0.00	0.00	0.00	3.47	0.00	3.47	0.00	0.00	3.19	4.07	0.00	5.33
deleted in malignant brain tumors 1 protein	gi 655868343	YTRIPSR	13.11	5.91	4.21	4.87	4.80	4.55	4.48	6.23	5.24	6.70	6.65	5.14	4.33
deoxyguanosine kinase, mitochondrial	gi 291386516	MAAGR	6.55	7.91	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.93	0.00	0.00	0.00
deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 1	gi 291409939	ATGGK	3.61	-0.19	3.18	1.89	-0.08	1.00	0.94	0.04	2.46	2.78	0.00	3.60	5.44
dermatan-sulfate epimerase-like protein	gi 291394469	VDGGK	1.19	9.06	7.51	8.91	7.67	8.68	8.67	8.34	9.36	7.66	7.52	8.51	7.38
dihydropyrimidinase-related protein 2	gi 655886401	KSLVTSLR	25.43	0.00	0.00	0.00	0.42	0.00	0.00	0.00	0.00	6.68	0.00	0.00	0.00
disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 33	gi 655720327	APPSR	2.24	2.04	0.00	0.00	0.00	0.00	2.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
disks large homolog 5	gi 655865971	EMLVNEAPGK	16.05	7.01	6.77	3.71	7.63	6.92	7.00	6.98	5.34	8.44	6.29	7.55	6.58
DNA replication licensing factor MCM4	gi 291387933	GTPVR	8.65	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.62	0.00	0.00	6.64
DNA replication licensing factor MCM5	gi 291389916	AGITTTLSNR	17.29	0.44	0.00	6.28	4.33	4.01	8.31	8.17	0.53	5.16	0.00	5.55	0.00
DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1	gi 291386401	HMMGK	19.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.42	0.00	-0.10	0.00	0.00	5.50
dnaJ homolog subfamily B member 2	gi 655829566	AGTQGGARGDAAER	13.91	0.00	3.36	1.10	0.99	0.00	0.00	3.17	1.58	0.00	0.00	3.20	-0.06

ตารางที่ จ.1 (ต่อเนือง)

Down syndrome cell adhesion molecule-like protein 1	gij 291383807	MGGSR	2.41	3.14	5.21	4.26	5.02	4.72	0.00	5.44	0.00	0.00	3.92	0.00	0.00
dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 5	gij 291402789	NQOGPP	17.15	8.40	9.11	1.32	0.84	0.00	2.27	0.73	1.63	-1.34	0.00	10.98	-0.01
dystroglycan	gij 1546	APITR	6.01	4.98	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.05	0.00	0.00	0.00	2.30
E3 SUMO-protein ligase EGR2	gij 655866541	NGVAGDGMINDMTGEK	10.51	2.77	0.00	0.00	4.39	1.23	4.44	3.58	0.40	5.83	1.31	0.00	2.16
E3 ubiquitin-protein ligase UBR2	gij 291396211	SGGDK	0.36	3.24	1.37	0.00	1.97	3.39	3.04	6.82	3.87	3.73	2.92	0.00	3.18
echinoderm microtubule-associated protein-like 3	gij 655882065	VASGQTAGVDK	21.22	8.80	4.17	3.79	1.08	0.81	1.33	2.57	0.72	2.87	1.24	2.36	4.37
echinoderm microtubule-associated protein-like 6	gij 655608491	GPEVSGIWPK	16.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.10	0.00	0.00	0.00
ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 2	gij 655877894	DMEEAKEK	18.09	5.89	1.49	4.03	2.41	4.85	2.13	7.20	3.54	7.06	7.99	4.18	5.73
etoposide-induced protein 2.4 homolog	gij 655601210	ATAGH	6.42	0.00	2.36	2.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.87	0.00	0.00	4.84
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	gij 655899077	DRLSQSK	16.31	5.56	7.28	4.80	4.71	3.46	4.11	6.02	4.51	5.71	7.60	4.48	5.47
exocyst complex component 3	gij 291413979	KALETDKK	21.77	6.50	2.78	7.50	4.15	5.27	6.77	6.90	6.23	5.38	5.55	7.13	8.29
FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 2	gij 655896959	ALTADLPR	36.24	9.98	7.67	10.23	6.33	6.95	7.41	9.05	8.17	4.27	7.11	9.45	8.38
flap endonuclease GEN homolog 1	gij 291387124	VDTEASK	7.95	0.00	0.00	5.63	6.94	6.94	0.00	7.51	6.26	7.09	7.07	6.55	6.74
forkhead-associated domain-containing protein 1	gij 655889711	LYLDMSK	11.27	1.82	0.95	2.30	4.52	3.84	6.57	6.32	3.28	3.55	0.00	3.03	0.17
galanin receptor type 2	gij 655893211	DTLGAAASWR	8.40	0.00	6.23	0.00	6.00	6.17	0.00	0.00	2.61	6.69	6.02	0.00	2.59
gamma-aminobutyric acid receptor subunit gamma-1	gij 291385730	GKVLAAR	16.45	0.97	5.74	0.00	0.00	0.00	7.72	0.66	0.00	5.38	0.00	0.00	0.00
gamma-aminobutyric acid receptor subunit rho-2	gij 655842396	VFPDGHVLYSMR	18.62	0.00	4.81	0.00	6.16	5.14	5.43	5.32	0.00	5.98	0.00	0.00	5.38
glycine receptor subunit alpha-2	gij 655874782	GRTSGYDAR	7.74	7.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ จ.1 (ต่อเนือง)

golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	gi 655599774	KMGVGK	19.33	1.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.95	2.42	0.00	1.35	0.00	2.98	7.25
golgin subfamily A member 2	gi 655883143	SEETR	4.97	0.00	5.77	5.90	7.48	6.14	5.41	8.42	6.71	7.23	6.80	6.96	0.00
golgin subfamily A member 7B	gi 291404595	GLLLTDPVERGMR	13.04	5.32	5.49	5.68	4.77	5.07	5.58	4.90	5.44	5.87	4.93	5.80	4.90
hemiceitin-1	gi 655861395	EAQISDTGR	12.46	5.55	4.35	5.13	5.23	4.99	4.94	7.08	5.56	6.92	7.61	5.29	5.16
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	gi 655857504	GAAAGGRGGTR	11.65	7.05	0.00	0.00	6.32	0.00	3.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hexokinase-1	gi 655866353	GELSS	2.96	2.09	4.02	0.00	3.15	2.97	3.68	0.00	0.00	3.48	2.43	0.00	2.81
histone H2AX	gi 291412992	APSGGK	9.97	3.45	6.56	0.00	4.10	3.06	3.45	3.53	1.16	6.25	4.18	1.25	4.58
HMG box transcription factor BBX	gi 291400739	KKSKMDR	10.34	6.68	6.35	7.38	6.32	6.25	7.09	4.68	6.61	7.21	5.79	6.73	5.97
homeobox A2	gi 217418305	RVEIAALLDLTER	10.46	5.56	0.00	1.45	0.00	0.00	0.00	2.69	0.90	4.66	4.72	0.00	2.57
hyccin	gi 291394527	QGHSK	2.51	1.36	0.00	2.14	0.00	0.00	0.00	6.25	2.77	1.83	0.00	0.00	0.24
immunoglobulin heavy chain	gi 2407675	MTGWISGAR	19.82	3.78	4.24	5.12	4.89	2.86	4.06	4.18	4.51	4.77	4.10	5.05	4.09
initiation factor 4-gamma	gi 404775	GGPGGELPR	28.09	0.00	6.47	0.00	0.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.22	0.00	0.00
integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C	gi 655896440	GDVISVEK	36.79	6.97	6.14	4.72	6.28	6.48	5.31	4.45	5.18	7.78	5.83	6.07	6.99
inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain3	gi 11041718	AVSQKTAGLVK	10.15	4.70	2.17	0.00	-0.03	0.47	0.00	0.00	0.00	-0.16	0.00	0.00	2.57
interleukin-17 receptor E	gi 655890253	VASDASGLQR	9.23	4.28	5.42	2.52	6.66	4.60	7.06	3.47	1.32	8.24	5.51	0.00	7.19
interleukin-25	gi 291403577	ASEDGPLNSR	23.35	0.00	1.39	0.00	0.06	1.56	4.05	5.43	2.92	0.00	0.00	0.00	0.00
junctophilin-3	gi 655895734	LGARAEPR	24.40	0.36	0.00	1.41	2.68	4.43	0.00	9.20	7.95	0.00	-0.05	1.80	0.00
kalirin	gi 291400523	ETSER	13.77	0.49	0.00	0.00	4.32	3.80	2.68	4.46	0.00	5.58	2.86	4.43	4.51
KAT8 regulatory NSL complex subunit 3	gi 655605830	IPTLIDR	23.16	5.81	3.09	5.68	0.00	4.70	7.04	7.38	5.38	7.19	6.30	5.74	5.24
keratinocyte proline-rich protein	gi 655720360	VGGPR	10.06	3.53	0.00	2.91	5.53	0.00	0.00	2.86	3.16	3.99	6.75	0.00	2.80
kin of IRRE-like protein 1	gi 655845986	AIVPR	9.04	0.00	2.64	0.00	1.80	0.00	0.00	0.00	0.00	3.90	0.00	3.69	4.31
kin of IRRE-like protein 3	gi 655601124	AIPGGK	4.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.98	0.00	0.00	0.00
kinesin-like protein KIF18B	gi 655872885	LQAEVAALR	12.54	4.18	1.05	4.01	1.04	0.00	1.13	4.18	1.85	3.15	0.00	0.87	3.85
kinesin-like protein KIF21A	gi 655830923	AGAQQKLRIIPVAR	13.65	7.78	5.77	6.67	6.08	6.62	7.78	6.05	7.95	7.71	5.83	6.26	5.85
kinesin-like protein KIF3B	gi 655710947	EKDAAEMLGAK	11.39	7.36	7.93	0.00	0.00	7.67	0.00	7.11	7.68	7.43	6.51	7.73	7.33

ตารางที่ จ.1 (ต่อเนือง)

laminin subunit beta-1	gi 655826280	ORADEAKQNAQGVLLK	12.68	7.15	0.00	8.47	7.96	7.83	0.00	7.65	8.32	7.44	7.51	8.53	6.98
leiomodrin-3	gi 655835440	ISKLDPKK	14.53	6.59	0.00	0.00	0.00	0.00	4.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT3	gi 291389008	GLMCAPEK	14.95	6.86	6.73	6.04	6.83	6.01	5.99	6.77	7.55	6.16	6.53	7.47	7.57
leucine-rich repeat-containing protein 16A	gi 655839935	EFIFV	19.68	7.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
leucine-rich repeat-containing protein 42	gi 655849337	TPMAAEPR	31.16	0.00	4.08	0.00	2.26	0.00	5.19	2.07	1.19	-0.92	5.81	1.18	2.26
leucine-rich repeat-containing protein 47	gi 655903044	ADGER	1.15	0.00	0.00	0.00	-0.14	0.00	5.03	0.00	0.00	0.00	3.51	0.00	0.00
leucine-rich repeat-containing protein 7	gi 655848837	ASMTK	2.05	0.00	2.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.49	0.00	0.00	0.00	0.00
leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	gi 655648141	VDFLKK	10.23	4.99	5.41	4.63	4.84	0.00	0.00	4.34	4.32	5.50	5.40	4.65	4.36
leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 3	gi 655896719	TRDGAGR	3.78	5.37	4.47	5.55	1.76	4.28	5.65	4.41	5.23	5.59	2.00	3.36	3.55
limbin	gi 655894138	ATRAAAVDR	14.14	0.84	3.59	0.00	-0.35	0.00	0.00	0.00	0.00	7.79	-0.14	0.00	2.17
lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	gi 655856289	LLASKSEGIR	18.46	4.95	6.78	5.92	5.07	7.05	6.20	5.45	5.81	5.78	4.72	5.62	3.95
liver carboxylesterase 2	gi 655789062	MVGANDK	8.27	4.93	5.43	0.00	5.22	0.00	5.94	4.89	0.00	5.57	5.21	6.07	0.00
low-density lipoprotein receptor-related protein 2	gi 655827806	DNVNLNR	28.39	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.12	0.00	5.75	0.00	0.00	0.00
low-density lipoprotein receptor-related protein 6	gi 291392624	QAVWK	10.95	4.76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.85	7.11	0.00	2.92
lysine-specific demethylase 4A	gi 291399081	MTLISPLMLK	21.53	3.83	1.41	0.00	0.00	4.07	3.05	0.00	3.30	3.81	2.72	2.02	2.68
lysine-specific demethylase 5A	gi 291392891	ATAAK	3.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.66	5.49	2.58	2.89	0.00	3.76	0.00
lysine--tRNA ligase	gi 291390507	ASGGK	3.13	0.00	1.51	0.00	3.03	0.00	1.75	0.00	1.32	-0.57	0.00	1.29	2.70
macrophage mannose receptor 1	gi 291402242	DAPSK	7.80	2.32	3.91	3.65	2.19	2.55	3.42	3.37	5.57	0.76	2.45	3.34	3.16
major facilitator superfamily domain-containing protein 4	gi 291402529	EDASSLPR	13.42	6.75	3.73	9.19	6.41	5.34	4.97	7.87	8.03	8.58	8.22	8.42	6.96
MAP7 domain-containing protein 2	gi 291407180	HAGGK	5.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.69	0.00	3.34	3.72
melanoma-associated antigen 10	gi 655883975	EMATGCAR	17.41	5.88	6.51	2.43	6.14	6.37	6.36	5.32	4.61	8.21	6.30	7.20	5.56
melanoma-associated antigen B1	gi 655875299	AGSSQVSLR	10.23	6.57	0.00	1.17	2.49	0.59	3.69	0.47	0.00	4.97	-0.02	0.00	0.32

ตารางที่ จ.1 (ต่อเนือง)

metabotropic glutamate receptor 6	gi 30526186	RLMETPNAR	17.25	8.12	8.38	8.53	7.77	7.90	8.93	6.77	7.93	6.10	5.04	8.46	7.86
metal transporter CNNM2	gi 291404753	MIVGEEKK	17.67	7.21	5.53	0.93	0.00	3.08	5.64	3.91	0.00	-1.50	5.02	0.00	6.26
methylcytosine dioxygenase TET3	gi 655606222	GDEGR	1.48	5.14	2.00	2.91	2.89	2.35	2.61	1.98	1.92	0.22	0.11	2.74	4.26
methyltransferase-like protein 23	gi 655893113	AEGPG	16.84	0.68	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.90	1.61	0.00
microsomal glutathione S-transferase 2	gi 655856627	GLGNYFGFQVGRAR	15.95	5.55	5.52	5.34	6.10	5.24	4.52	0.00	5.69	5.88	6.41	6.26	4.06
microtubule-associated tumor suppressor candidate 2	gi 655884556	RFEEALR	23.10	9.45	7.21	7.90	9.64	9.36	7.36	6.47	7.88	10.05	7.16	9.73	8.99
minor histocompatibility antigen H13	gi 291388754	FFPANFPNR	8.94	3.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.52
mirror-image polydactyly gene 1 protein	gi 655864527	ATEAK	6.30	0.00	4.56	4.54	2.95	3.72	0.00	3.67	3.53	1.99	0.00	4.30	0.00
mitogen-activated protein kinase-binding protein 1	gi 655863134	LFSGVANAR	21.28	3.98	0.00	2.17	0.00	0.79	0.00	0.00	0.00	-0.33	2.73	0.00	0.42
multidrug resistance-associated protein 2	gi 1430907	RLDSVTR	29.06	6.67	3.55	7.59	4.80	5.98	6.76	7.04	6.57	5.34	5.99	7.20	7.85
mutS protein homolog 5	gi 655840208	AAVLSR	17.01	3.58	0.00	0.00	0.00	0.76	2.43	0.00	0.00	2.37	3.04	0.00	1.51
N-acetylglutamate synthase, mitochondrial	gi 655872057	GTGGSR	6.38	6.48	4.68	1.78	1.97	1.70	5.12	6.64	4.22	1.40	2.60	2.60	2.84
N-acetyllactosaminide beta-1,6-N-acetylglucosaminyl-transferase	gi 655839615	PSSVR	11.74	3.39	3.02	2.21	1.96	0.49	0.00	0.00	1.23	0.00	1.96	0.00	1.72
NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 9	gi 655895677	MKGVAL	17.60	2.47	2.54	1.13	-0.22	0.00	0.98	0.00	6.21	0.00	0.24	0.00	1.23
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	gi 655884340	EAGGVXGDCLRK	13.65	3.55	3.90	6.15	4.94	4.08	1.91	4.64	2.82	3.99	3.99	3.80	3.82
nance-Horan syndrome protein	gi 655874963	DSGDMSVR	8.54	5.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
nebulin	gi 655827380	YKLDHEK	23.58	8.30	6.03	7.10	5.60	7.39	7.68	5.85	7.57	4.71	6.99	7.99	5.82
neurogenic locus notch homolog protein 3	gi 655892589	APEGGGGR	19.16	5.25	0.00	0.00	3.38	0.43	0.00	1.95	0.00	5.36	0.00	0.00	0.00
neurotrypsin	gi 655856668	SVTKL	3.43	5.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
nucleoporin GLE1	gi 291413511	PSEGR	7.04	3.71	0.00	0.00	0.00	0.00	3.03	2.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
nucleus accumbens-associated protein 2-like	gi 655902835	SCVLIR	20.27	5.17	2.08	4.35	4.06	2.38	4.60	5.48	4.19	4.12	5.01	2.69	0.00
olfactory receptor 4F3/4F16/4F29	gi 655864757	KMKVAMQRLVSK	19.74	6.66	6.67	5.30	8.30	7.37	6.73	6.00	3.54	10.02	5.94	7.68	7.06
olfactory receptor 6C3	gi 291389342	NQQVKQAFK	16.28	0.00	0.00	0.00	0.00	3.27	3.82	0.00	0.47	0.00	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ จ.1 (ต่อเนือง)

olfactory receptor 6N1	gi 291397687	TGILG	10.85	0.00	0.00	0.00	0.00	5.21	0.00	4.34	0.00	4.85	0.00	0.00	0.00
orphan sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter NTT5	gi 655899530	QTALPAVTSSMLK	15.40	7.72	7.07	8.04	6.63	5.80	7.80	7.57	8.23	7.77	7.40	8.06	6.42
partitioning defective 3 homolog	gi 655883082	QYSSLPR	18.36	8.92	0.00	7.74	5.22	7.13	8.24	9.06	6.94	7.88	5.47	6.61	5.74
PDZ domain-containing protein 8	gi 291404885	DTALTR	3.50	5.81	0.00	0.00	0.00	2.91	0.00	2.78	0.00	6.30	4.01	0.00	4.13
PH and SEC7 domain-containing protein 1	gi 655867639	HGSEPR	4.30	3.44	0.00	1.31	0.00	4.33	4.54	6.42	4.44	5.86	3.40	0.00	3.84
PHD finger protein 3	gi 655841954	MMGPLSQASR	15.39	0.00	0.00	0.00	0.73	0.00	4.09	7.53	8.70	0.00	0.00	0.00	0.00
phenylalanine--tRNA ligase, mitochondrial	gi 291409403	TIGGDLVEK	15.76	2.01	0.00	0.00	0.00	5.35	5.33	0.57	3.35	0.54	0.00	0.00	0.00
phenylethanolamine N-methyltransferase	gi 291405952	TAVGV	15.43	1.11	0.00	0.00	1.86	4.92	4.36	3.45	0.00	1.00	1.96	0.00	2.18
phosphatidate phosphatase LPIN2	gi 291394157	LSSDQIAKLK	20.95	5.33	7.33	7.69	6.06	6.42	6.81	7.10	7.85	4.32	6.45	6.63	7.18
phospholipase D2	gi 655869014	EMPSLPR	20.33	5.73	5.87	6.10	2.43	5.11	0.00	3.39	5.97	6.24	3.88	4.93	4.01
pleckstrin homology domain-containing family A member 7	gi 655884287	MSSEERR	14.60	6.07	6.17	6.48	6.06	5.80	5.74	6.32	6.83	6.48	5.79	6.67	5.78
pleckstrin homology domain-containing family G member 4B	gi 655894709	RADLDGPR	21.11	4.94	0.00	0.00	1.43	0.00	0.85	0.00	0.00	9.02	0.00	0.00	0.00
pleckstrin homology domain-containing family G member 5	gi 655851909	EPAGSSGKSHR	8.31	0.00	3.96	0.00	0.00	3.62	0.00	0.00	4.04	5.60	1.48	0.00	0.00
pleckstrin homology domain-containing family H member 1	gi 655872988	APGTPR	8.32	4.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.57	0.00	5.41	7.17	0.00	0.00
plexin-B3	gi 655891459	QVTLVPR	26.43	9.22	7.97	8.64	5.83	7.58	5.89	7.43	7.50	2.33	6.67	9.84	6.57
polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11	gi 655844906	MMGSVTVR	12.19	0.00	0.00	0.00	7.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.34	0.00	0.00
potassium voltage-gated channel subfamily G member 2-like	gi 655897432	LRCCAPVR	17.62	5.19	5.28	4.10	0.00	0.00	0.00	5.48	4.01	5.74	0.00	0.00	0.00
prefoldin subunit 6	gi 291396025	DLSKSMGRQK	14.37	5.99	7.84	7.83	7.39	7.78	6.74	6.80	6.01	6.87	6.83	6.68	7.01
pre-mRNA cleavage complex 2 protein Pcf11	gi 291384167	DGPTK	8.81	4.24	0.00	0.00	0.00	4.22	0.84	0.00	6.04	0.11	2.46	0.00	0.00
pre-rRNA processing protein FTSJ3	gi 291406359	GVGRK	1.51	0.00	1.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.16	0.00	0.00	3.38

ตารางที่ จ.1 (ต่อเนือง)

probable ATP-dependent RNA helicase DDX60	gi 655601761	IASKK	4.50	0.00	3.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.36	0.00	0.00	0.00	0.00
proline-rich transmembrane protein 3	gi 291412466	GPHGGPGLSR	11.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.99
prosaposin	gi 655866264	VAPVK	0.97	7.40	5.71	7.65	4.73	4.85	7.33	7.48	5.56	6.63	4.05	5.30	7.38
protein ERGIC-53	gi 291394426	MAGSR	4.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.76	0.00	0.00	0.00	5.73	0.00	0.00
protein FAM24A	gi 655891237	LSSSYDFAR	20.85	2.66	3.72	3.75	0.00	0.23	2.52	6.09	3.49	0.00	0.00	0.00	0.00
protein FAM3B	gi 655897876	SIGEKVLRAPTPK	16.86	7.74	7.56	8.34	7.95	7.89	6.19	8.04	8.67	7.83	6.61	8.97	7.48
protein FAM60A	gi 291392455	AGPSLKTTLKPKK	19.21	6.37	0.00	0.00	0.00	0.00	4.33	4.74	6.00	7.64	0.00	6.93	0.00
protein KIBRA	gi 291387788	SMSSLSPR	12.87	4.64	0.00	0.00	2.88	2.54	2.75	0.00	3.23	5.53	5.07	0.00	4.27
protein lin-52 homolog	gi 655873628	EMTRGK	5.55	5.12	5.40	5.85	5.53	0.00	5.44	4.56	5.83	5.47	0.00	0.00	5.19
protein lin-9 homolog	gi 655861075	EMNTEAECLK	11.16	5.68	0.00	5.46	5.78	0.00	6.45	0.00	5.58	5.96	4.64	6.04	0.00
protein salvador homolog 1	gi 291403842	LSAPSYLAR	10.87	4.02	6.39	0.00	5.44	4.26	7.79	6.71	8.09	6.37	6.01	6.88	5.37
protein SET	gi 655605517	SAPAAK	2.67	0.00	2.06	1.56	0.34	0.00	0.00	0.00	5.12	-0.52	0.00	0.00	2.22
protein SFI1 homolog	gi 655873986	AVLHRALR	16.88	2.70	0.00	6.37	5.84	2.93	5.54	3.83	0.00	5.34	4.42	6.19	3.38
protein SZT2 isoform X1	gi 655850007	SPLDMASGR	20.49	8.34	8.89	9.09	8.19	8.33	8.62	8.34	8.91	8.58	8.05	8.81	8.30
protein unc-80 homolog	gi 291392147	ATISGCHR	17.89	8.67	4.54	4.77	3.41	2.90	8.89	8.09	3.87	2.07	2.68	4.18	3.86
protein YIPF2	gi 291414140	ATATS	7.16	3.63	1.06	1.02	0.99	0.54	3.85	1.60	0.00	0.00	0.00	1.97	0.12
putative calcium influx channel TRPC1A	gi 5759114	QCKMFAK	8.24	2.20	5.91	5.33	3.19	1.59	4.94	3.82	8.07	0.76	2.76	4.94	4.35
putative helicase MOV-10	gi 655847377	MKPGSEISK	13.64	0.00	0.00	2.78	0.00	0.00	0.00	2.17	1.44	3.98	3.02	1.02	3.19
pyruvate kinase PKLR	gi 291397825	AALGPK	3.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.60	4.48	0.00	0.00	0.00	3.37	0.00
rab5 GDP/GTP exchange factor	gi 291412103	GNPPR	0.20	0.00	0.00	2.59	2.15	0.00	3.33	1.73	2.71	4.22	1.86	4.31	4.62
RAC-gamma serine/threonine-protein kinase	gi 291402088	LFELILMEDIK	14.19	5.30	4.03	5.88	6.23	5.97	5.65	4.71	5.44	5.58	5.18	6.90	5.79
ral GTPase-activating protein subunit alpha-1	gi 655864858	ATMLTDK	14.07	1.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.32	0.00	0.91	0.00
rap guanine nucleotide exchange factor 2	gi 655879031	SSFGK	1.74	0.00	0.00	0.00	7.11	0.00	6.81	6.18	0.00	4.37	0.00	0.00	0.00
ras-related protein Rab-4A	gi 655892959	RDLDAER	24.19	2.78	0.00	0.00	2.56	7.50	0.00	2.88	0.00	6.69	1.48	0.00	0.00
ras-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	gi 655838005	KEGER	13.35	0.00	5.35	5.21	5.32	5.86	4.34	0.00	5.42	5.22	5.13	5.85	0.00
regulator of G-protein signaling 3	gi 291408507	AGGSR	10.70	4.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.82
remodeling and spacing factor 1	gi 291384198	AAAAR	6.21	2.41	2.16	4.31	0.86	2.92	2.12	1.47	2.89	3.26	1.55	3.99	4.81

ตารางที่ จ.1 (ต่อเนือง)

retinal-specific ATP-binding cassette transporter	gj 655850611	GNGFAGEGKGVVA	7.86	0.00	0.00	4.61	1.04	0.00	1.89	5.49	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00
rho guanine nucleotide exchange factor 11 isoform X1	gj 655846044	MIHEGPLTWR	10.78	4.17	6.08	0.00	4.42	4.87	4.79	3.97	0.00	4.88	4.22	0.00	3.86
rho guanine nucleotide exchange factor 11 isoform X2	gj 655846047	SSNSK	6.53	2.83	4.73	4.31	3.19	0.00	3.43	4.09	4.27	2.30	3.46	4.40	3.10
rho guanine nucleotide exchange factor 17	gj 655603065	LADVLSR	35.23	0.00	8.42	5.73	7.08	9.59	10.73	7.43	6.64	8.14	3.97	3.71	5.74
rho guanine nucleotide exchange factor 37	gj 291387609	GNSR	6.82	8.48	9.62	10.25	9.34	9.69	10.60	9.64	9.79	8.02	9.13	10.16	9.35
rhomboid domain-containing protein 3	gj 291409850	GP	4.86	0.00	0.00	0.00	2.17	3.42	0.00	0.00	0.00	0.00	4.75	0.00	0.00
RING finger protein 17	gj 655832053	MMNEIQK	21.46	0.00	0.00	0.00	0.94	2.48	5.52	3.79	0.00	2.78	0.00	0.00	1.12
scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130	gj 655831460	QLGCGSALK	14.25	0.79	0.00	1.47	0.00	0.00	0.00	1.63	0.00	0.00	0.00	2.28	8.08
scm-like with four MBT domains protein 1	gj 291393845	HVDTR	10.15	5.18	4.77	4.99	0.00	5.61	0.00	0.00	5.67	6.39	4.84	5.72	5.29
scm-like with four MBT domains protein 2	gj 655858862	AVVKIVR	6.50	4.69	4.70	0.00	5.46	0.00	5.33	4.52	5.92	5.26	4.89	6.62	4.95
secreted frizzled-related protein 2	gj 12964790	QGGELVITSVK	2.07	-0.18	2.54	0.00	0.00	1.36	0.00	0.83	0.00	2.79	0.66	0.00	0.00
semaphorin-3B	gj 291393721	SAAHW	2.16	5.92	2.53	0.00	3.18	3.75	6.86	0.00	3.88	7.16	5.12	1.76	4.88
semaphorin-3E	gj 655837884	VTAPSDDR	18.41	2.50	0.00	2.42	0.00	0.00	3.44	1.52	6.29	3.82	1.68	0.00	2.92
semaphorin-3F	gj 655834600	TMTISSK	8.38	0.00	0.96	0.00	3.01	0.00	2.73	0.00	0.00	6.32	2.66	0.00	2.02
serine/arginine repetitive matrix protein 1	gj 655600452	AAPNPSPPR	9.30	6.02	6.46	5.34	4.82	6.06	6.53	6.56	6.84	6.58	6.11	7.07	6.16
serine/threonine-protein kinase TAO2	gj 655810364	PAGGR	14.93	4.78	6.95	7.05	5.64	6.74	7.19	5.91	6.80	4.71	6.13	7.61	6.15
serine/threonine-protein kinase VRK2	gj 291386755	DPVAVQTAK	17.55	5.42	1.72	3.09	1.57	3.49	0.00	0.00	1.64	2.10	1.41	4.60	3.40
serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform	gj 655601668	AAKGPAASAACR	4.26	7.34	3.43	7.01	4.44	5.03	4.99	7.81	6.08	6.72	0.00	5.73	0.00
serine-protein kinase ATM	gj 655601741	AADIR	2.86	1.07	3.66	2.63	2.20	0.00	0.00	4.37	7.08	2.10	2.60	3.98	0.81
serum albumin precursor	gj 29653363	IVTDLTK	33.55	7.76	8.02	6.07	6.50	6.83	6.25	5.73	6.64	7.57	5.18	6.58	7.32
SH3 domain-containing protein 19	gj 655856254	TRPVPGWTAARR	16.84	6.42	6.00	7.36	6.47	6.43	0.00	6.03	7.47	6.11	0.00	7.55	6.15
SH3-containing GRB2-like protein 3-interacting protein 1	gj 655848931	CEPASTDLR	12.77	7.29	6.57	8.04	6.79	6.30	7.50	6.48	6.88	5.93	7.10	6.47	6.25

ตารางที่ จ.1 (ต่อเนือง)

skeletal muscle myosin heavy chain MyHC-EO/II	gj 12003423	LVTLMTR	22.65	0.00	4.15	3.89	4.51	4.63	0.00	0.00	4.53	6.13	3.63	4.73	3.51
SLC2A4 regulator	gj 655850626	AVEASLPR	40.16	7.32	8.35	7.66	7.16	8.39	7.91	7.34	8.02	4.39	7.78	9.55	7.52
small G protein signaling modulator 3	gj 655884470	TMPSNACFASVDSIGVPRLR	12.95	4.74	5.27	4.88	4.88	0.00	3.85	4.82	0.00	4.18	0.00	5.60	0.00
small nuclear ribonucleoprotein G	gj 291386619	GNSIIMLEALER	17.42	8.06	4.65	7.09	5.41	7.30	7.34	5.27	7.57	7.68	6.85	7.03	7.28
smoothelin	gj 291406856	SLSVLSPR	29.94	1.76	4.26	4.80	3.15	1.14	3.49	0.00	5.96	0.00	0.00	3.21	1.64
sodium channel alpha-subunit	gj 1022714	QVSNR	7.19	5.73	6.78	5.35	0.00	6.02	0.00	0.00	0.00	5.84	5.47	0.00	5.90
sodium/hydrogen exchanger 9B1	gj 655857006	ATVQG	3.89	5.46	0.00	0.00	0.00	3.03	0.00	0.00	0.00	5.43	0.00	0.00	0.00
sodium-dependent serotonin transporter	gj 291405441	GVAGDK	5.31	6.21	0.00	3.54	2.30	0.00	3.90	0.00	5.42	0.00	0.00	2.38	0.00
sodium-glucose cotransporter-like protein	gj 473969	FGGSR	10.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.16	2.16	1.06	0.00	0.00	0.00	0.00
specifically androgen-regulated gene protein	gj 655860517	SGSYSLPR	18.03	4.48	4.60	5.42	2.49	5.60	6.31	5.29	5.11	5.68	4.55	6.23	3.74
sterile alpha motif domain-containing protein 9	gj 655837551	LVKLLIGNR	15.24	4.68	0.00	1.72	0.00	0.00	4.56	2.14	0.00	4.57	1.68	0.00	1.55
stromal membrane-associated protein 2	gj 291399174	MTGKSVK	12.61	0.00	5.44	0.00	5.90	5.79	5.34	5.58	5.13	5.85	4.92	6.15	5.63
structural maintenance of chromosomes protein 3	gj 291404811	AATGK	14.83	3.55	3.86	4.11	5.98	5.08	0.00	3.46	4.95	5.13	3.43	0.00	5.42
synapsin-1	gj 655898109	MFGSTEMR	15.88	6.01	5.42	6.07	4.27	4.32	5.64	6.25	5.83	5.96	5.58	5.20	4.45
synemin	gj 655886501	RSPGPGSPDR	10.10	4.29	0.00	0.00	2.11	3.01	2.30	0.00	0.00	2.37	0.85	0.00	2.16
synergin gamma	gj 655870155	DKAFPAAFPTGAIPQK	14.27	0.00	6.33	8.49	7.79	0.00	0.00	0.00	5.93	7.43	7.20	8.61	6.91
TATA-binding protein-associated factor 172	gj 655866957	DAVETNEK	8.53	5.25	6.02	4.13	3.69	3.78	3.28	6.07	4.48	4.93	4.49	4.93	3.93
T-cell surface glycoprotein CD3 delta chain	gj 655891880	RILDPIXGKYSCETAGDSAKK	3.55	0.00	6.60	7.10	6.92	6.92	6.73	0.00	7.59	7.24	7.62	8.17	6.23
tetratricopeptide repeat protein 28	gj 655882780	DGTSSLPR	15.93	0.00	0.00	7.55	6.29	0.00	0.00	0.00	0.00	4.44	5.27	0.00	0.00
thrombin	gj 165741	ENLDRDIALMK	14.91	2.50	0.00	2.17	0.00	0.00	0.00	2.76	0.44	1.55	2.83	0.00	2.13
titin	gj 1208922	NAVGVSLPR	31.27	5.45	6.42	5.67	3.77	3.87	5.19	5.37	5.78	5.50	5.19	4.81	6.87
toll-like receptor 12	gj 291408842	LPPALR	13.23	8.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
toll-like receptor 2	gj 21429694	AAKS	5.16	2.08	0.00	0.00	0.35	0.00	3.18	1.93	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
TOX high mobility group box family member 3	gj 655780330	AIGEK	6.11	0.12	0.00	0.00	3.85	1.36	0.00	5.58	0.00	3.28	0.00	2.52	0.00
transcription factor 15	gj 291388780	RAGGAGSVWVR	13.58	3.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.03	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ จ.1 (ต่อเนือง)

transcription factor E2F5	gi 655680006	LGGAGGGGGSSR	27.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11	0.00	0.00	5.76
transcription factor TFIIIB component B" homolog	gi 655882478	EEIGLVEK	14.69	0.00	1.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.04	0.00	0.00	0.00	8.18
transcription termination factor 1	gi 291411432	AAPGSK	7.40	3.79	2.25	3.61	3.89	0.95	0.00	4.95	1.58	7.04	3.97	1.02	2.56
transcriptional regulator ATRX	gi 655606321	AGNIK	4.77	3.50	4.49	4.08	3.64	3.96	3.55	2.36	3.70	0.00	0.00	3.94	5.19
transient receptor potential cation channel subfamily M member 3	gi 291383356	NSGLK	9.10	0.00	0.00	1.62	0.35	0.00	2.55	7.70	0.00	5.13	0.05	0.00	2.28
transmembrane protease serine 11D	gi 291401731	NNAAK	10.52	0.00	3.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.35	0.00	3.32	4.23
transmembrane protein 119	gi 291411783	AGGPR	1.35	0.00	3.13	0.00	3.56	2.65	4.93	0.00	0.00	0.00	7.30	0.00	3.98
transmembrane protein 132A	gi 291385429	AAAAPR	1.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.68	0.00	0.00	5.36
trichohyalin	gi 655889995	LLSSXPPPPTQVPR	15.00	7.10	7.35	7.49	6.91	6.63	6.83	7.03	7.61	7.31	6.60	7.66	6.61
trinucleotide repeat-containing gene 6C protein	gi 655898982	QOEQKQLLK	32.41	0.00	0.00	0.00	3.25	9.97	3.67	0.00	0.00	9.87	7.43	0.00	7.09
tripartite motif-containing protein 2	gi 655856112	IGSGKLMGPK	19.25	5.21	5.25	5.70	5.56	5.59	0.00	4.80	5.21	1.90	4.49	5.61	4.98
tripartite motif-containing protein 46	gi 655846344	AGAIK	8.98	4.60	0.92	1.48	0.62	0.00	0.93	0.28	0.00	-0.99	0.46	1.67	3.56
tumor protein D55	gi 291383266	LGDVKKSATFR	18.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.76	0.00	0.00	7.57	1.04	0.00	5.57
twinfilin-1	gi 655830076	QKMLYAATRATLK	9.34	6.42	7.16	7.53	6.76	7.33	6.61	6.61	7.11	6.32	6.39	7.47	6.71
tyrosine-protein kinase Lyn	gi 291387985	DAWEIPR	21.63	2.15	4.38	1.87	1.97	2.54	3.89	2.20	4.03	4.00	1.72	3.69	5.16
tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	gi 655891867	GVVMLNR	17.32	0.00	0.00	0.00	0.31	6.13	5.95	1.77	3.05	0.00	2.75	0.00	2.23
U8 snoRNA-decapping enzyme	gi 291399631	AGSGK	0.70	4.14	0.00	0.00	3.18	1.95	1.34	3.33	0.00	4.25	6.01	0.00	3.56
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 28	gi 655601547	VSVYLLTGLELYQK	9.10	8.31	8.37	7.36	7.23	7.05	7.90	7.54	7.95	8.81	8.60	7.73	7.30
ubiquitin-conjugating enzyme E2 G1	gi 655869905	RKVARCVR	17.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.21	0.00	0.00	4.97	0.00	0.00	0.00
UBX domain-containing protein 10	gi 291399368	TRPSLPR	37.95	0.00	2.56	0.00	0.35	0.00	4.01	0.00	0.00	5.64	3.43	0.00	4.98
UHRF1-binding protein 1	gi 655753330	AGIIK	8.58	1.55	0.00	4.94	0.00	0.00	4.70	6.29	0.00	5.44	6.95	0.00	0.51
uncharacterized protein C12orf60 homolog	gi 655830776	MSSELEKDKER	13.86	0.00	0.00	2.58	1.22	0.00	0.00	2.91	1.05	3.20	0.27	0.00	0.00
uncharacterized protein C19orf47 homolog	gi 655895122	SMLLDLNLK	14.92	6.47	6.65	5.05	5.54	6.04	5.32	0.00	5.22	6.35	4.20	5.35	0.00
uncharacterized protein C6orf222 homolog	gi 655842561	KPSSEAPR	27.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.91	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ จ.1 (ต่อเนือง)

uncharacterized protein ENSP00000372125	gi 291392661	AAESLRLR	14.63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.21	9.35	5.89	0.00	0.00	6.62	0.00
uncharacterized protein KIAA0947 homolog	gi 655894030	AAPVAK	4.80	7.66	0.00	2.01	3.10	4.47	0.00	1.28	3.53	0.00	1.62	0.00	0.00
uncharacterized protein KIAA1107 homolog	gi 655848167	KIVKSGLSQK	13.62	9.74	9.95	10.55	8.73	9.15	9.29	9.18	9.70	8.93	9.37	9.45	7.54
uncharacterized protein LOC100347513	gi 655861020	TLDXEEGGPR	13.93	5.98	4.52	6.52	5.97	6.17	6.12	5.80	6.27	6.13	5.06	6.44	5.76
uncharacterized protein LOC103344996	gi 655886103	MAARGRSGGLGR	17.72	4.66	4.21	4.59	4.68	5.59	3.86	4.59	6.42	7.03	0.00	6.42	4.33
uncharacterized protein LOC103346189	gi 655896195	KAGSGGAGAAVRFRR	26.90	4.54	4.65	3.39	4.34	4.80	4.54	5.37	5.38	5.97	5.11	5.57	4.78
uncharacterized protein LOC103347125	gi 655901384	DGVSLGLSR	17.20	0.00	0.00	0.00	0.63	5.49	4.66	1.75	0.95	0.00	2.05	0.00	1.36
uncharacterized protein LOC103351904	gi 655876906	GTAVISVTAHPGEK	40.55	4.56	4.70	0.00	4.52	4.67	3.59	5.96	5.36	5.70	3.75	5.43	4.84
uncharacterized protein LOC103352183	gi 655880925	LXTHSGPECGLTKK	20.87	4.30	4.98	5.41	5.08	5.00	5.61	4.68	6.07	4.59	4.71	5.17	4.77
unconventional myosin-XVIIIa	gi 291405461	QTHSKEMESR	20.76	5.93	7.59	7.54	6.65	7.27	0.00	7.05	7.21	6.44	6.82	7.40	7.27
UPF0420 protein C16orf58 homolog	gi 291410995	ATVSAATATWLVK	14.51	2.59	2.16	0.00	0.00	0.00	0.00	1.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UPF0602 protein C4orf47 homolog	gi 291385999	GISGK	11.43	3.58	0.00	0.00	3.22	5.88	3.66	0.00	1.18	5.93	3.88	0.00	4.14
usherin	gi 655860261	GVIEK	2.98	4.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.81	0.00	0.00	0.00	0.00	2.67
verprolin	gi 655868841	CEALSPR	23.42	0.05	0.00	1.75	4.06	1.29	6.16	6.01	0.60	1.79	0.00	4.06	0.23
vitelline membrane outer layer protein 1 homolog	gi 291405209	GNAER	1.58	3.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
vomeronasal type-2 receptor 116	gi 655895465	MATAAANGNGTQIK	24.56	7.26	4.13	7.23	5.99	5.90	6.45	7.75	6.87	7.66	8.84	6.94	7.02
V-set and immunoglobulin domain-containing protein 10-like	gi 655899394	SLLNLTVDLPR	15.17	1.59	4.31	1.60	4.87	3.60	5.58	3.11	6.49	6.33	4.02	0.00	4.42
WD repeat and HMG-box DNA-binding protein 1	gi 291403904	EQQELLMKMLALSCK	17.24	5.87	6.36	5.57	6.12	6.20	5.88	6.15	6.44	6.49	0.00	6.78	6.13
WD repeat domain-containing protein 83	gi 291415821	GHAGK	1.39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.85	2.71	0.00	3.04	0.00	0.00	0.00
YTH domain-containing protein 1	gi 655857955	LSSSVRAVRK	7.09	4.98	3.80	5.71	3.61	0.00	2.70	0.00	0.00	7.45	5.45	6.34	5.70
zinc finger and BTB domain-containing protein 11	gi 291400760	HGLKLHQSLHQSQK	13.68	5.94	7.05	5.03	6.45	4.59	5.22	6.14	6.07	7.89	8.99	5.70	4.79
zinc finger FYVE domain-containing protein 1	gi 291406824	AVPSR	5.44	6.92	2.54	2.40	0.51	0.65	1.57	1.18	2.02	0.00	0.76	0.00	3.31
zinc finger homeobox protein 3	gi 655795593	TMELSPR	16.89	5.26	6.31	6.68	5.85	6.65	4.57	6.02	6.25	5.51	5.61	6.64	5.73
zinc finger MYND domain-containing protein 15	gi 291405203	AGA EK	4.54	6.84	6.64	4.30	6.60	6.34	4.80	6.72	4.79	7.21	7.51	6.66	6.00

ตารางที่ จ.1 (ต่อเนือง)

zinc finger protein 18	g 655868583	GMFGDEEPGR	14.82	7.29	2.71	0.00	0.43	0.00	0.00	0.69	0.00	1.05	0.42	0.00	3.04
zinc finger protein 214	g 655602660	GFSKSSK	7.10	5.78	6.00	6.24	5.79	5.45	5.62	5.16	5.97	5.85	4.19	5.80	5.73
zinc finger protein 268	g 655894252	SNLTDHQR	7.63	4.85	1.39	1.56	0.92	0.60	0.00	0.15	2.08	0.00	0.00	0.00	0.00
zinc finger protein 416	g 291411343	HCSAKDSLRL	14.09	0.00	1.32	2.10	-0.20	0.93	0.00	1.45	2.55	0.00	0.32	0.00	2.51
zinc finger protein 462	g 655600422	ARIK	9.11	3.86	0.00	2.61	5.93	5.04	4.02	3.05	6.86	6.06	0.00	0.00	5.23
zinc finger protein 574	g 291412129	ATPTK	8.03	0.00	0.00	0.00	1.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.76
zinc finger protein 658	g 655894510	TATPK	4.39	7.45	0.00	0.00	1.24	0.00	0.00	0.87	0.60	0.00	0.00	0.00	2.05
zinc finger protein 717	g 65583533	IHTGGKPHGCNK	13.41	6.73	4.41	7.01	8.43	6.05	8.93	5.21	7.36	10.65	9.47	5.62	9.14
zinc finger SWIM domain-containing protein 8	g 291404146	KIPLGPSEMSTMRL	13.27	5.65	7.06	6.92	5.93	6.96	5.82	6.74	6.49	5.89	6.20	7.15	6.40
zinc finger X-chromosomal protein	g 291407237	EVGLP	3.41	3.31	0.00	0.00	5.97	0.00	2.15	4.47	0.00	6.56	3.60	5.52	5.28
zymogen granule membrane protein 16	g 655898136	PGGGK	2.32	5.99	0.00	1.80	0.25	6.44	4.19	1.29	5.16	-0.30	0.48	2.64	1.27

หมายเหตุ : ค่าตัวเลขที่แสดงในตารางเป็นค่าของ log ฐาน 2

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ พ.ต. สรทศ โปสุวรรณ
 วันเดือนปีเกิด 9 พฤศจิกายน 2524
 ตำแหน่ง นายทหารเทคนิคการแพทย์ กองพยาธิวิทยา โรงพยาบาล
 พระมงกุฎเกล้า

ผลงานทางวิชาการ

1. นำเสนอความก้าวหน้าทางงานวิจัย เรื่อง บทบาทของ Protease-Activated Receptor 2 ในการหลั่งโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยเซลล์กล้ามเนื้อเรียบทางเดินอาหาร เมื่อวันที่ 12 ธันวาคม 2558 คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
2. นำเสนอความก้าวหน้าทางงานวิจัย เรื่อง บทบาทของ Protease-Activated Receptor 2 ในการหลั่งโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยเซลล์กล้ามเนื้อเรียบทางเดินอาหาร เมื่อวันที่ 14 ธันวาคม 2557 คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ประสบการณ์ทำงาน พ.ศ. 2546-ปัจจุบัน นายทหารเทคนิคการแพทย์
 แผนกธนาคารเลือด กองพยาธิวิทยา โรงพยาบาลพระ
 มงกุฎเกล้า