

**บทความวิจัย (Research Article)****การสร้างและทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ที่แสดงออกยีนแสงสีเขียว (*Gfp*) ร่วมกับยีน *SQSTM1/p62* เพื่อใช้ในการค้นหาสารควบคุมกลไกเซลล์กินตัวเอง (autophagy modulator)**

วิภาวรรณ ศิริกุลพานิชย์<sup>1\*</sup> และ ปฐมพงษ์ บวรเรืองฤทธิ์<sup>2</sup>

**Establishment and characterization of stable cell-based model expressing *Gfp/SQSTM1/p62* for autophagy modulator screening**

Wipawan Sirigulpanit<sup>1\*</sup> and Pathompong Bowornruangrit<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chonburi 20131

<sup>2</sup> Anatomy Department, Faculty of Sciences, Mahidol University, Bangkok 10400

\* Correspondence to: wipawans@go.buu.ac.th

**Naresuan Phayao J. 2020;14(1): 33-46.**

Received; 4 October 2020; Revised: 5 December 2020; Accepted: 19 April 2021

**บทคัดย่อ**

กระบวนการเซลล์กินตัวเอง มีบทบาทสำคัญในโรคหลายชนิด รวมทั้งมะเร็ง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเซลล์ BHK-21 ที่มีการแสดงออกของยีนแสงสีเขียว (*Gfp*) ร่วมกับยีน *SQSTM1/p62* สำหรับเป็น cell-based model ในการหาสารควบคุมกระบวนการเซลล์กินตัวเอง stable BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) cell line ในการศึกษาที่ถูกนำมาทดสอบโดยใช้ Rapamycin และ Chloroquine ซึ่งเป็น autophagy modulators การหมุนเวียนของโปรตีน *SQSTM1/p62* ใช้วัดการทำงานของกระบวนการเซลล์กินตัวเอง โดยการศึกษาพบว่าโปรตีน *SQSTM1/p62* สามารถพบได้ในเซลล์ที่เจริญในสภาวะปกติที่ระดับพื้นฐาน การเหนี่ยวนำ autophagy จะเพิ่มการสลายโปรตีน *SQSTM1/p62* จึงลดระดับ โปรตีน *SQSTM1/p62* ในเซลล์ ขณะการลดหรือยับยั้ง autophagy จะพบโปรตีน *SQSTM1/p62* สะสมเพิ่มขึ้นจึงเพิ่มระดับ โปรตีน *SQSTM1/p62* ในเซลล์ การศึกษานี้บ่งชี้ว่า stable BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) cell line สามารถใช้และมีประสิทธิภาพสำหรับการวิเคราะห์การทำงานของกระบวนการ autophagy

**คำสำคัญ:** กระบวนการเซลล์กินตัวเอง, สารควบคุมกระบวนการเซลล์กินตัวเอง, เซลล์ที่แสดงออกยีนแสงสีเขียว (*Gfp*) ร่วมกับยีน *SQSTM1/p62*

<sup>1</sup> คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

<sup>2</sup> ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10400

## Abstract

Autophagy plays a key role in a number of diseases, including cancer. This study aimed to generate a stable BHK-21 cell line containing a green fluorescent protein gene (*Gfp*) and sequestosome 1 gene (*SQSTM1/p62*) for a cell-based model to screen autophagy modulator. Stable BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) cell line was established in this study then examined for effectiveness in an autophagy modulator screening assay using rapamycin and chloroquine known autophagy modulators. The *SQSTM1/p62* protein turnover has been measured as autophagy activity. The results showed that *SQSTM1/p62* protein is active in normal growing conditions at basal level. An induction of autophagy, however, increase the degradation of *SQSTM1/p62* protein causes *SQSTM1/p62* protein reduction in cells while a decrease or block of this pathway causes *SQSTM1/p62* protein accumulation which increases *SQSTM1/p62* protein level in cells. This study indicated that stable BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) cell line is available and efficient for use in an autophagy activity analysis.

**Keywords:** Autophagy, Autophagy modulator, Stable cell-based model expressing *Gfp/SQSTM1/p62*

## บทนำ

การรวมตัวกันของโปรตีนหรือออกานเนลล์ต่างๆ ภายในเซลล์ ตลอดจนเชื้อโรคต่างๆ ที่มีขนาดใหญ่จนไม่สามารถทำลายได้ด้วย proteasome จากการศึกษพบว่าเซลล์จะมีการใช้กระบวนการเซลล์กินตัวเอง (autophagy) ซึ่งพบว่าเป็นกระบวนการเดียวที่สามารถกำจัดการรวมตัวแบบนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุดเพื่อรักษาสมดุลภายในเซลล์ autophagy มีการค้นพบครั้งแรกในยีสต์และจากการศึกษาในปัจจุบันยืนยันว่า autophagy พบในเซลล์ eukaryote ทุกชนิด [1] โดยทั่วไปการเกิด autophagy โดยสมบูรณ์นั้นประกอบด้วยหลายขั้นตอน เริ่มตั้งแต่ induction, vesicle nucleation, vesicle elongation, completion, docking และ fusion จนกระทั่ง degradation และ recycling [2] เมื่อเริ่มกระบวนการเกิด autophagy เซลล์จะถูกกระตุ้นให้สร้าง autophagosome และจากการศึกษาพบว่าเยื่อหุ้ม autophagosome มีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญคือ microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3 (MAP1-LC3 หรือ LC3s) ในมนุษย์พบยีน LC3s สามชนิด ได้แก่ LC3A, LC3B และ LC3C โดย LC3A จะพบในบริเวณ perinuclear และนิวเคลียส ขณะที่ LC3B จะพบกระจายทั่วไปในส่วนไซโตพลาสซึม และในบริเวณนิวเคลียส ส่วน LC3C พบในไซโตพลาสซึม และนิวเคลียส ยกเว้นบริเวณนิวเคลียส การพบการกระจายตัวที่ต่างกันเช่นนี้อาจบ่งบอกหน้าที่ที่

แตกต่างกันในกระบวนการ autophagy [3] การศึกษาในปัจจุบัน LC3B เป็นโปรตีนที่มีการศึกษามากที่สุด โดยพบว่าโปรตีน LC3B สร้างจากโปรตีน proLC3B ซึ่งมีขนาด 30 kDa โดยจะมีเอนไซม์ Atg4 สร้างได้เป็นโปรตีน LC3B-I ซึ่งอยู่ในรูปอิสระ หากเกิดการสร้าง autophagosome โปรตีน LC3B-I ซึ่งอยู่ในรูปอิสระจะถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ Atg7 และเอนไซม์ Atg3 มีผลให้โปรตีน LC3B-I เกิดการจับกับ phosphatidylethanolamine (PE) ได้เป็นโปรตีน LC3B-II [4] โดยพบโปรตีน LC3B-II ได้ทั้งภายในและภายนอกเยื่อหุ้ม autophagosome ส่วนด้านในเยื่อหุ้มจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไฮโดรเลส ขณะที่ส่วนด้านนอกเยื่อหุ้มจะอยู่ในส่วนไซโตพลาสซึม [5]

ดังนั้นการพบ โปรตีน LC3B-II ในเยื่อหุ้มของ autophagosome จึงใช้เป็นสัญลักษณ์ของ autophagy (autophagy maker) ซึ่งบ่งบอกการทำงานของ autophagy ได้ โดยมีการศึกษาทั้งในระดับคลินิกและในเซลล์ชนิดต่างๆ [6] ATG7 เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในกระบวนการ autophagy โดยจะกระตุ้นการสร้าง ATG5-ATG12-ATG16 complex ซึ่งจะรวมกับโปรตีน LC3B-II มีบทบาทสำคัญในการสร้าง autophagosome ขณะที่ส่วน SQSTM1/p62 ที่เป็น adaptor protein จะจับอย่างเฉพาะเจาะจงกับโปรตีนที่จำเพาะหลายๆชนิด โดยการใช้ส่วนที่เรียกว่า ubiquitin-binding domain แล้วทำให้โปรตีนเหล่านั้นจับกับโปรตีน LC3B-II ที่เยื่อหุ้มด้านในของ autophagosome ผ่านบริเวณที่เรียกว่า LC3 interacting region (LIR) มีผลให้เกิด sequestration ของ

โปรตีนหรือโมเลกุลใน autophagosome และเกิดการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในไลโซโซม [7] การหมุนเวียนของโปรตีน SQSTM1/p62 (SQSTM1/p62 turnover) สามารถนำมาใช้เป็น autophagy marker

โดยการศึกษาพบว่า ในเซลล์ที่เจริญเติบโตที่สภาวะปกติจะมีระดับโปรตีน SQSTM1/p62 ในระดับพื้นฐาน แต่เมื่อมีการเหนี่ยวนำให้เกิด autophagy จะพบการสลายของโปรตีน SQSTM1/p62 เพิ่มขึ้น หากลดหรือยับยั้ง autophagy SQSTM1/p62 จะมีการรวมตัวกันมากขึ้น ดังนั้นการหมุนเวียนของโปรตีน SQSTM1/p62 จึงช่วยจำแนกสารหรือโมเลกุลที่เป็น autophagy modulator ได้ [8-9] จะอย่างไรก็ตาม โมเลกุลหรือโปรตีนหลายชนิดโปรตีนของ autophagy ถูกศึกษาและนำมาใช้เป็น autophagy marker แต่การเปลี่ยนจากโปรตีน LC3B-I ไปเป็นโปรตีน LC3B-II โดยการจับกับ phosphatidylethanolamine (PE) ถูกยอมรับอย่างกว้างขวางว่าเป็นการบ่งชี้การสร้าง autophagosome ขณะที่ โปรตีน SQSTM1/p62 ก็มีความสำคัญมากเช่นกัน เนื่องจากทำหน้าที่เป็นตัวรับของโปรตีน LC3B-II ในการย่อยสลายของ ubiquitinated proteins และ organelles ในระหว่างเกิด autophagy นอกจากนี้ยังพบโมเลกุลหรือโปรตีนอื่นๆ ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ autophagy เช่น Atg6 (Beclin-1), Atg1 (ULK1, ULK2) และ Atg2 (Atg2A, Atg2B) เป็นต้น [7] จากการศึกษาพบว่าเซลล์จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ autophagy ในหลายๆสภาวะ เช่น การอดอาหาร, การขาด growth factor และ immune factor และความบกพร่องของกระบวนการเกิด autophagy ภายในเซลล์จึงทำให้เกิดโรคหลายๆชนิด เช่น มะเร็ง โรคเกี่ยวกับการเสื่อมของเซลล์ประสาท และ โรคติดเชื้อชนิดต่างๆ [10] สำหรับบทบาทของ autophagy ในโรคมะเร็ง พบว่ามีการศึกษาการเกิด autophagy ในเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ [11] โดยการศึกษาพบว่าทั้งเซลล์ทั่วไปและเซลล์มะเร็งหลายๆ ชนิดจะถูกกระตุ้นให้เกิด autophagy ในสภาวะดังต่อไปนี้ เช่น การขาดสารอาหาร metabolic stress endoplasmic reticulum (ER)-stress การฉายแสง และการได้รับยาต้านมะเร็ง ความเกี่ยวข้องของการเกิด autophagy กับโรคมะเร็งมีการค้นพบเมื่อ ค.ศ.1999

โดยพบว่าใน autophagy ที่เรียกว่า *Beclin1* (*Becn1* หรือ *Atg6*) สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งและถูกเรียกว่าเป็น tumor suppressor ยีน [12] ซึ่งหากมีการยับยั้งการแสดงออกของยีนนี้หรือลดการแสดงออกของยีนนี้อาจทำให้เกิดมะเร็งได้ ผลการศึกษาส่วนใหญ่พบว่าการเหนี่ยวนำให้เกิด autophagy ในเซลล์จะเกี่ยวข้องกับยีน mammalian target of rapamycin complex 1 (*mTORC1*) ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ต่างๆ [13] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (signaling pathway) ที่สำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุม autophagy โดยพบว่า PI3K-Akt pathway ซึ่งเป็นสัญญาณของเซลล์ ที่สำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ มีความผิดปกติในมะเร็งหลายๆชนิดที่พบในมนุษย์ โดยจากการศึกษา PI3K-Akt pathway จะทำหน้าที่ควบคุมยีน *mTORC1* จากการศึกษาพบว่า PI3K-Akt pathway มีผลลดการแสดงออกของยีน *TSC1/TSC2 complex* ซึ่งเป็น tumor suppressor ยีนที่พบได้ในมะเร็งหลายๆชนิดด้วย [14] และ PI3K-Akt pathway ยังสามารถลดการแสดงออกของยีน *mTORC1* มากขึ้นโดยการยับยั้งโปรตีนที่จับกับยีน *mTORC1* เช่น Rheb ซึ่งพบว่าเมื่อให้เซลล์รอดชีวิต (pro-survival) ในเซลล์มะเร็ง [15] การศึกษาในปัจจุบันได้มีการค้นพบยาต้านมะเร็งชนิดใหม่ๆ โดยเฉพาะยาหรือสารในกลุ่มที่เรียกว่าสารควบคุมกระบวนการเซลล์กินตัวเอง (autophagy modulator) ทั้งที่สามารถกระตุ้นการเกิด autophagy เช่น rapamycin ที่มีผลยับยั้งยีน *mTORC1* จึงสามารถกระตุ้นการเกิด autophagy ช่วยให้เซลล์มีชีวิตรอดจาก metabolic stress หรือ hypoxic stress, irinotecan และ bevacizumab หรือ สารที่สามารถยับยั้งการเกิด autophagy เช่น chloroquine (CQ) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น lysosomotropic weak base และจะอยู่ในรูป monoprotinated chloroquine ซึมผ่านเข้าสู่ไลโซโซม แล้วเปลี่ยนไปเป็นรูป diprotinated chloroquine และจะติดอยู่ภายในไลโซโซม protonated chloroquine มีผลเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดของไลโซโซม ทำให้ยับยั้งการสลายของ autophagosome ในไลโซโซม ทำให้ไม่เกิด autophagy completion

จึงยับยั้ง autophagy [16] และ hydroxychloroquine (HCQ)

โดยปัจจุบันมีการนำยาหรือสารเหล่านี้มาใช้เพื่อรักษาโรคมาเร็งหลายๆ ชนิด [11] High content screening (HCS) และ high throughput screening (HTS) เป็น cell-based model ที่สามารถนำมาใช้เพื่อการค้นหาและตรวจสอบสารยับยั้งต่างๆ ชนิดที่เป็น autophagy modulator วิธีนี้ได้รับการยอมรับว่าเป็น in vitro assay ที่มีประสิทธิภาพสูงมากและมีการประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายในหลายๆ โรคไม่เฉพาะแต่โรคมาเร็ง เช่น การค้นหาหาตัวไวรัสโดยใช้ dengue replicon ที่มีการแสดงออกของยีนไวรัสร่วมกับยีนแสงสีเขียว (*Gfp*) [17] สำหรับ screening assay ที่ใช้ค้นหา autophagy modulator โดยมากจะมีการใช้โปรตีน LC3s เป็น autophagy maker โดยมีการนำยีน LC3 conjugate กับเอนไซม์หลายๆชนิด เช่น luciferase (Luc)-based screening assay [18] ส่วนการนำยีน LC3 จับคู่กับยีนของแสงสีต่างๆ เช่น *Gfp* และ *Rfp* เพื่อสร้างเป็น cell-based model ในเซลล์หลายๆชนิดก็เป็นที่ยอมรับเช่นกัน [19] โดยในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยทำการพัฒนา High-Throughput screening assay โดยสร้างเซลล์ (cell-based model) ที่มีการแสดงออกของยีนแสงสีเขียว (*Gfp*) ร่วมกับยีน *SQSTM1/p62* ภายในเซลล์ baby hamster kidney (BHK-21) โดย stable BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) cell line ที่สร้างได้ถูกทดสอบคุณสมบัติ และประยุกต์ใช้โดยการทดสอบกับสารมาตรฐานที่เป็น autophagy modulator

## วัสดุและวิธีการ

**การสร้าง cell-based model ที่มีการแสดงออกของยีน *Gfp/SQSTM1/p62***

สกัด RNA จากเซลล์ BHK-21 ด้วย Trizol แล้วนำ RNA มาทำ reverse transcription โดยใช้ total RNA 100 ng, dNTP Mix 10  $\mu$ M, 5xReaction buffer, RevertAid™ Reverse transcriptase, Primer reverse 5  $\mu$ M (1:1000) incubate reaction ที่ 42°C, 60 นาที และ 70°C, 10 นาที แล้วนำ RT reaction ที่ได้มาทำ PCR โดยใช้ RT reaction 2  $\mu$ l, dNTP Mix 2  $\mu$ M, 10xHF buffer with  $MgCl_2$ , High Fidelity

enzyme mix, Primer *SQSTM1/p62* forward และ reverse 10  $\mu$ M (1:1000) incubate reaction ที่ 94°C, 1 นาที และ 94°C, 30 วินาที, 55°C, 30 วินาที, 72°C, 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ 72°C, 10 นาที แล้วนำขึ้น PCR ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bgl*II และ *Sa*II แล้วต่อเข้ากับพลาสมิด pCMV-GFP/*SQSTM1/p62* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันด้วยเอนไซม์ *T<sub>4</sub>* DNA ligase และได้เป็น พลาสมิด pCMV-GFP/*SQSTM1/p62* นำพลาสมิด pCMV-GFP/*SQSTM1/p62* ที่ได้มา transfect เข้าสู่เซลล์ BHK-21 โดยวิธี Electroporation (285 Volts, 1100  $\mu$ F, 500 Ohms, 1 pulse) นำเซลล์ transfected BHK-21 มาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มีการเติม FBS 10% และ G418 (0.98 mg/ml) ใน 6-well plate โดยมีการสังเกตแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์หัวกลับ (Eclipse TS100 fluorescent inverted microscope, Nikon, USA) ทุกๆ วัน นานประมาณ 4-5 สัปดาห์ และต้องมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2-3 วัน และเมื่อพบว่าเซลล์มีการแสดงแสงสีเขียวมากกว่า 90% จะทำการแยกเซลล์ออกมาด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsinization) และย้ายมาเลี้ยงใน 24-well plate โดยมีการสังเกตแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์หัวกลับทุกๆ วัน เมื่อพบว่าเซลล์มีการแสดงแสงสีเขียวมากกว่า 98% จะ trypsinization และย้ายมาเลี้ยงใน 96-well plate โดยมีการสังเกตแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ทุกๆ วัน เมื่อพบว่าเซลล์มีการแสดงแสงสีเขียว 100% จะ trypsinization และทำการแช่แข็งเซลล์ด้วย 5% DMSO high purity grade

**การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*)**

**การเตรียมเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*)**

นำเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่แช่แข็งไว้ มาละลายและเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มีการเติม FBS 10% ใน flask 150  $cm^2$  ที่ 37°C ในตู้ 5%  $CO_2$  เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการ subculture เซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) ทุก 5 วัน จนครบ 40 passages เก็บแช่แข็งเซลล์ด้วย 5% DMSO high purity grade ในทุก passage และแบ่งเซลล์ passage

ที่ 10, 20, 30 และ 40 จำนวน 100000 เซลล์ เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ต่อไป

#### ทดสอบการสร้างโปรตีน GFP/SQSTM1/p62 ด้วย flow cytometry

นำเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) ของ passage ที่ 10, 20, 30 และ 40 ที่ได้จากการเตรียมเซลล์ มาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มีการเติม FBS 10% ใน flask 25 cm<sup>2</sup> ที่ 37°C ในตู้ 5% CO<sub>2</sub> แล้วทำการชุดและเก็บเซลล์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์ทั้งหมดมาทำการ dilute 1:100 ใส่ในหลอดฟลูออเรสเซนซ์ นำไปวิเคราะห์ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ของโปรตีน GFP/SQSTM1/p62 เฉลี่ยต่อเซลล์ (GFP/SQSTM1/p62 intensity/cell) ด้วยเครื่อง flow cytometry (FACScan, USA)

#### ทดสอบการสร้างโปรตีน SQSTM1/p62 ด้วย Western Blot

นำเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) ของ passage ที่ 10, 20, 30 และ 40 ที่ได้จากการเตรียมเซลล์ มาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มีการเติม FBS 10% ใน flask 25 cm<sup>2</sup> ที่ 37°C ในตู้ 5% CO<sub>2</sub> แล้ว trypsinization ที่เวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์ทั้งหมดมาทำการสกัดโปรตีนด้วย complete cell extraction buffer นำส่วนสกัดมาแยกโปรตีนด้วย 10% SDS-PAGE gel แล้วทำการย้อมโปรตีนด้วย primary rabbit anti-mouse monoclonal antibody ต่อ SQSTM1/p62 (1:1000) (Abcam, USA) และ secondary goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody (1:2000) (Abcam, USA) และวิเคราะห์อัตราส่วนโปรตีน SQSTM1/p62 ต่อ  $\beta$ -actin โดยโปรแกรม ImageJ

#### การหาปริมาณ RNA copy ของ SQSTM1/p62 ด้วยวิธี Real-time RT-PCR

นำเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) ของ passage ที่ 10, 20, 30 และ 40 ที่ได้จากการเตรียมเซลล์มาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มีการเติม FBS 10% ใน flask 25 cm<sup>2</sup> ต่อที่ 37°C ในตู้ 5% CO<sub>2</sub> แล้ว trypsinization ที่เวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์ทั้งหมด

ทำการสกัด RNA ด้วย Trizol<sup>TM</sup> และหาปริมาณ RNA ด้วย Real-time RT-PCR โดยมีวิธีพอสังเขปดังนี้ ใช้ total RNA 10 ng, 2x Quantitect Reaction buffer, Quantitect RT enzyme master mix, dNTP Mix 10  $\mu$ M, Primer reverse 5  $\mu$ M (1:1000) incubate reaction ที่ 42°C, 60 นาที และ 70°C, 10 นาที แล้วนำ RT reaction ที่ได้มาทำ PCR โดยใช้ RT reaction 2  $\mu$ l, 2x Quantitect Reaction buffer, Quantitect PCR enzyme master mix, SYBR Green dye I, dNTP Mix 10  $\mu$ M, Primer SQSTM1/p62 realtime forward และ reverse 5  $\mu$ M (1:1000) incubate reaction ที่ 94°C, 1 นาที และ 94°C, 30 วินาที, 55°C, 30 วินาที, 72°C, 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ 72°C, 10 นาที โดยวิเคราะห์ปริมาณ RNA copy ของ SQSTM1/p62 ด้วย Biorad CFX96 qPCR system

#### การทดสอบเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) กับ autophagy modulator

นำเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) มาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มีการเติม FBS 10% ใน flask 25 cm<sup>2</sup> นาน 24 ชั่วโมงที่ 37°C ในตู้ 5% CO<sub>2</sub> แล้วนำมาบ่มกับ rapamycin (500 nM) และ/หรือ chloroquine (50 nM) นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายภาพการแสดงออกของโปรตีน GFP/SQSTM1/p62 ของเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) ไว้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์หัวกลับ แล้วทำการชุดและเก็บเซลล์นำไปวิเคราะห์ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของโปรตีน GFP/SQSTM1/p62 เฉลี่ยต่อเซลล์ (GFP/SQSTM1/p62 intensity/cell) ด้วยเครื่อง flow cytometry และระดับโปรตีน SQSTM1/p62 ด้วย western blot ตามวิธีดังกล่าวไปข้างต้น

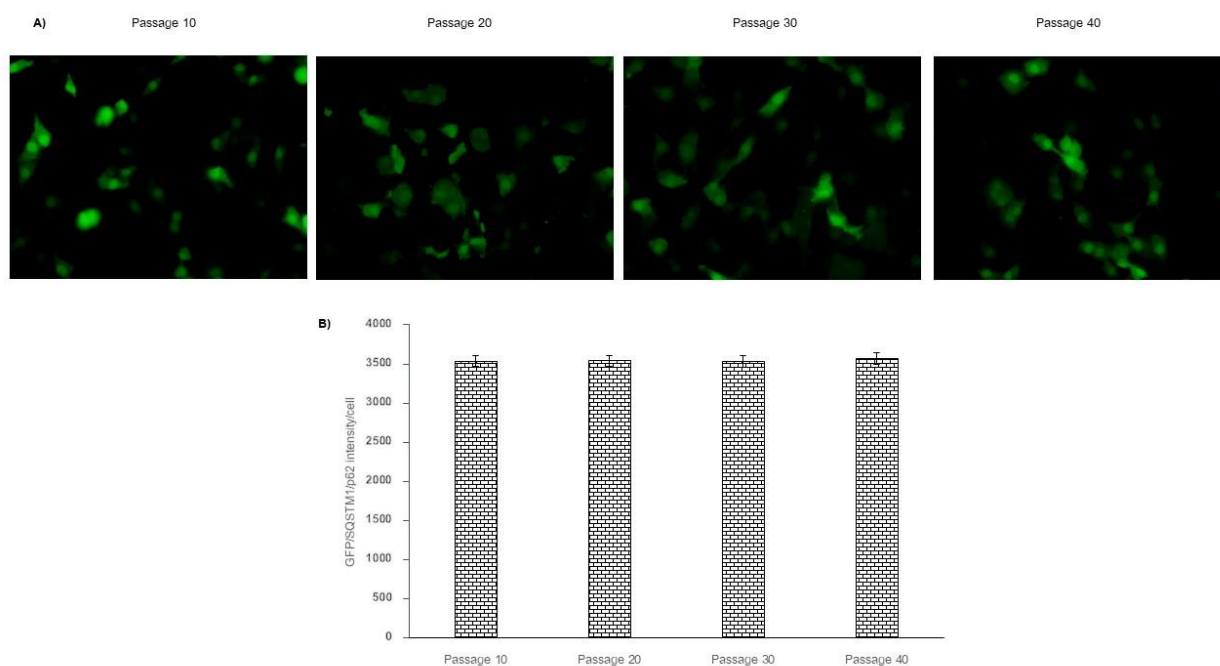
#### การวิเคราะห์สถิติ

ข้อมูลที่ได้แสดงเป็น mean $\pm$ SD ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ One-way ANOVA โดยใช้โปรแกรม GraphPad prism software version 8 และมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

## ผลการศึกษา

### ผลการสร้างและคัดเลือกเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน GFP/SQSTM1/p62

มีการแสดงออกของโปรตีน GFP/SQSTM1/p62 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์หัวกลับพบว่าเซลล์ BHK-21 มีการแสดงออกของโปรตีน GFP/SQSTM1/p62 ที่ passage 10, 20, 30 และ 40 (รูป 1 A)



รูป 1 A) ภาพแสดงเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่ Passage 10, 20, 30 และ 40 โดยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์หัวกลับ (x20) B) ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของโปรตีน GFP/SQSTM1/p62 ต่อเซลล์ (GFP/SQSTM1/p62 intensity/cell) ที่ Passage 10, 20, 30 และ 40 โดย flow cytometry (mean±SD)

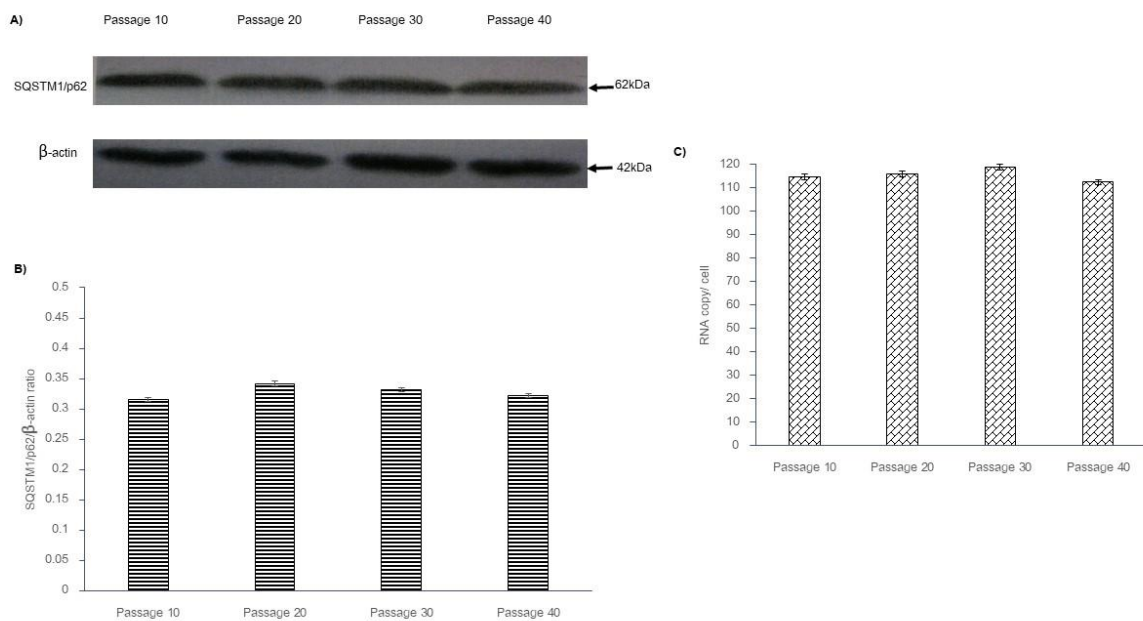
### ผลการทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*)

#### ผลการสร้างโปรตีน GFP/SQSTM1/p62 วิเคราะห์ด้วย flow cytometry

มีการแสดงออกของโปรตีน GFP/SQSTM1/p62 ในเซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่ passage 10, 20, 30 และ 40 โดยมี GFP/SQSTM1/p62 intensity/cell แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูป 1 B)

### ผลการสร้างโปรตีน SQSTM1/p62 วิเคราะห์ด้วย Western Blot

พบการสร้างโปรตีน SQSTM1/p62 ของเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) และอัตราส่วนโปรตีน SQSTM1/p62/ $\beta$ -actin ที่ passage 10, 20, 30 และ 40 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีขนาดโปรตีน SQSTM1/p62 ประมาณ 62 kDa และ  $\beta$ -actin ประมาณ 42 kDa (รูป 2 A และ B)



**รูป 2** A) ภาพแสดงโปรตีน SQSTM1/p62 ของเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่ Passage 10, 20, 30 และ 40 โดย western blot B) อัตราส่วนโปรตีน SQSTM1/p62 ต่อ  $\beta$ -actin (mean $\pm$ SD) วิเคราะห์ด้วย ImageJ (mean $\pm$ SD) C) RNA copy ของ *SQSTM1/p62* ของเซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่ Passage 10, 20, 30 และ 40 โดย real-time RT-PCR (mean $\pm$ SD)

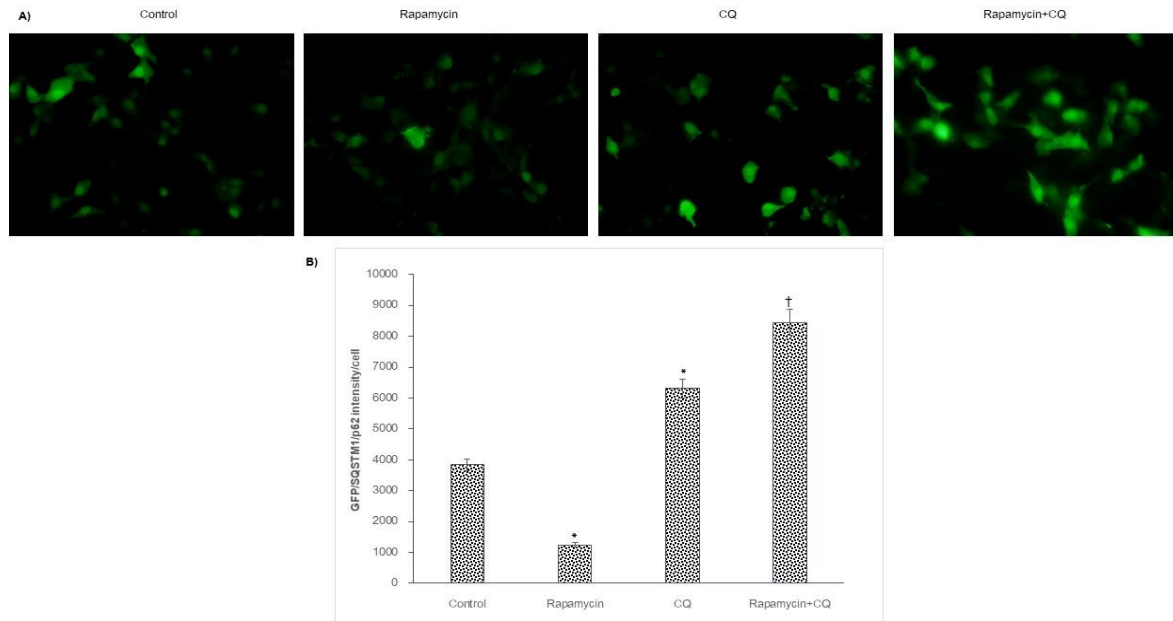
#### ผลการหาปริมาณ RNA copy ของ *SQSTM1/p62* ด้วยวิธี Real-time RT-PCR

ปริมาณของ RNA copy ของ *SQSTM1/p62* ในเซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่ passage 10, 20, 30 และ 40 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูป 2 C)

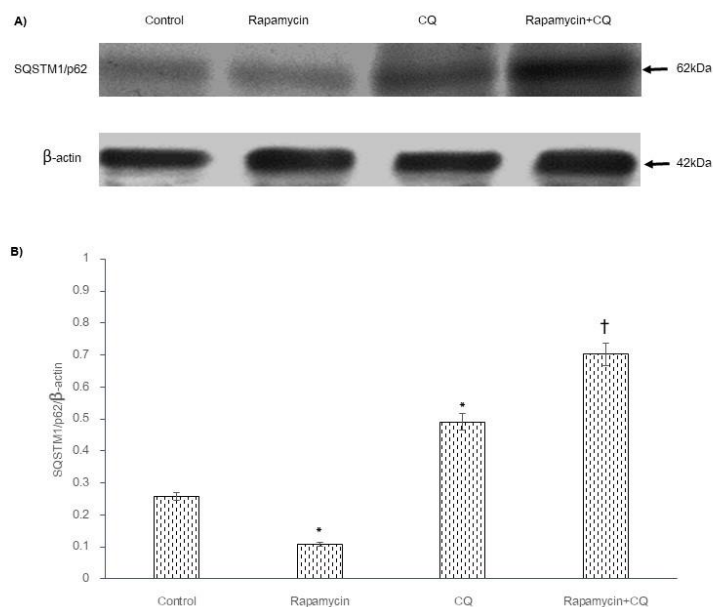
#### ผลการทดสอบเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) กับ autophagy modulator

เซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่บ่มกับ rapamycin ที่ความเข้มข้น 500 nM พบว่า GFP/SQSTM1/p62 intensity/cell และอัตราส่วนโปรตีน SQSTM1/p62 ต่อ  $\beta$ -actin ต่ำกว่า control (บ่มกับ 0.02% DMSO เท่านั้น) ขณะที่เซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่

บ่มกับ chloroquine ที่ความเข้มข้น 50 nM พบว่า GFP/ SQSTM1/p62 intensity/cell และอัตราส่วนโปรตีน SQSTM1/p62 ต่อ  $\beta$ -actin สูงกว่า control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูป 3 B และ 4 B,  $P < 0.05$ ) และเซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่มีการบ่มกับทั้ง rapamycin และ chloroquine พบว่า GFP/ SQSTM1/p62 intensity/cell และอัตราส่วนโปรตีน SQSTM1/p62 ต่อ  $\beta$ -actin สูงกว่าเซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่บ่มกับ rapamycin อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูป 3 B และ 4 B,  $P < 0.05$ ) ซึ่งผลทั้งหมดสอดคล้องกับการแสดงออกของโปรตีน GFP/SQSTM1/p62 เมื่อสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์หัวกลับ (รูป 3 A) และ ระดับโปรตีน SQSTM1/p62 โดย western blot (รูป 4 A)



**รูปที่ 3** A) ภาพแสดงเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่บ่มกับ rapamycin (500 nM) และ/หรือ chloroquine (CQ) (50 nM) นาน 24 ชั่วโมง โดยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์หัวกลับ (x20) B) ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของโปรตีน GFP/SQSTM1/p62 ต่อเซลล์ (GFP/SQSTM1/p62 intensity/cell) บ่มกับ rapamycin (500 nM) และ/หรือ chloroquine (CQ) (50 nM) นาน 24 ชั่วโมง วิเคราะห์โดย flow cytometry (mean±SD, \* $P<0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control (บ่มกับ 0.02% DMSO) และ † $P<0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่บ่มกับ rapamycin หรือ chloroquine อย่างเดียว)



**รูปที่ 4** A) ภาพแสดงโปรตีน SQSTM1/p62 ของเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่บ่มกับ rapamycin (500 nM) และ/หรือ chloroquine (CQ) (50 nM) นาน 24 ชั่วโมง วิเคราะห์โดย western blot B) อัตราส่วนโปรตีน SQSTM1/p62 ต่อ β-actin ของเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) (Mean±SEM, \* $P<0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control และ † $P<0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่บ่มกับ rapamycin หรือ chloroquine อย่างเดียว)

## วิจารณ์

ผลการสร้าง cell-based model ที่มีการแสดงออกของยีน *Gfp/SQSTM1/p62* เริ่มต้นด้วยการตัดต่อยีน *SQSTM1/p62* เข้าสู่พลาสมิด pCMV-GFP ได้เป็นพลาสมิด pCMV-GFP/SQSTM1/p62 แล้วนำเข้าสู่ *E.coli* ด้วย วิธี electroporation จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนพลาสมิด pCMV-GFP/SQSTM1/p62 ใน *E.coli* จนได้ปริมาณที่มากพอ ในการใช้ในการทดลองขั้นต่อไป และทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pCMV-GFP/SQSTM1/p62 พบว่ามีความถูกต้อง เพื่อสร้างเป็น stable cell line ที่มีการแสดงออกของยีน *Gfp/SQSTM1/p62* มีการนำพลาสมิด pCMV-GFP/SQSTM1/p62 ที่ทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์เรียบร้อยแล้ว มา transfect เข้าสู่เซลล์ BHK-21 โดยวิธี electroporation

ผลการทดลองพบว่า เซลล์มีจำนวน positive เซลล์ คือเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน GFP/SQSTM1/p62 เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์หัวกลับ ประมาณ 90% หลังจากการ transfect ใน 48 ชั่วโมง ต่อมาเพื่อคัดเลือกเฉพาะเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน *Gfp/SQSTM1/p62* ในเซลล์ BHK-21 โดยการเติม G418 ด้วยหลักการ ที่ว่า เซลล์ที่มียีน *Gfp/SQSTM1/p62* จะสามารถเจริญเติบโตได้เนื่องจากมีความทนต่อ G418 เพราะมียีนในเซลล์ที่ต้านความเป็นพิษของ G418 (neomycin resistance gene) ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มียีน *Gfp/SQSTM1/p62* จะตาย เนื่องจากไม่มียีนในเซลล์ที่ต้านความเป็นพิษของ G418 นั้นเอง โดยการเติม G418 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ G418 ในการคัดเลือกเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน *Gfp/SQSTM1/p62* ในเซลล์ BHK-21 คือ 0.98 mg/ml ใน 6-well plate โดยมีการสังเกตการแสดงออกของโปรตีนแสงสีเขียว (GFP) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ทุกๆ วัน นานประมาณ 4-5 สัปดาห์ และต้องมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2-3 วัน และทำการเปลี่ยนภาชนะการเลี้ยงเซลล์ไปเรื่อยๆ จนกระทั่งพบว่าเซลล์มีการแสดงออกของโปรตีนแสงสีเขียวมากกว่า 100% ผลการทดลองพบว่าสามารถคัดเลือกเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน *Gfp/SQSTM1/p62* ในเซลล์ BHK-21 ได้ และมีการ

เลี้ยงเซลล์อย่างต่อเนื่องจาก passage 1 ถึง 40 โดยพบการแสดงออกของโปรตีน GFP/SQSTM1/p62 ในเซลล์ BHK-21 ที่ Passage 10, 20, 30 และ 40 (รูป 1A )

เมื่อได้ stable cell line ของ BHK-21 ที่มีการแสดงออกของยีน *Gfp/SQSTM1/p62* ซึ่งเรียกว่า BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) ในการศึกษาขั้นนี้แล้วการทดลองขั้นต่อมา คือการทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) โดยผลการทดลองพบว่า เซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่ passage 10, 20, 30 และ 40 มีระดับความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของโปรตีน GFP/SQSTM1/p62 ต่อเซลล์ (GFP/SQSTM1/p62 intensity/cell) ที่ 24 ชั่วโมง แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี flow cytometry (รูป 1 B) เมื่อวิเคราะห์การสร้างโปรตีน SQSTM1/p62 ด้วย western blot ก็พบการแสดงออกของโปรตีน SQSTM1/p62 ที่ passage 10, 20, 30 และ 40 (รูป 2 A) และ อัตราส่วนโปรตีน SQSTM1/p26 ต่อ  $\beta$ -actin แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยโปรตีน SQSTM1/p62 มีขนาด 62 kDa ต่อมาทำการทดลองการหาปริมาณ RNA copy ของ SQSTM1/p26 ด้วยวิธี Real-time RT-PCR ในเซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p26*) passage ที่ 10, 20, 30 และ 40

โดยการทดลองพบว่าระดับ RNA copy ที่ 24 ชั่วโมง แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูป 2 C) ซึ่งสอดคล้องกับระดับความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของโปรตีน GFP/SQSTM1/p26 ต่อเซลล์ และโปรตีน SQSTM1/p26 ในเซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p26*) ทำให้แน่ใจได้ว่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของโปรตีน GFP/SQSTM1/p26 ต่อเซลล์ ที่พบเป็นผลมาจากการแสดงออกร่วมกันระหว่างยีน *Gfp* และ *SQSTM1/p26* ที่แท้จริง โดยจะพบว่าในภาวะปกติ คือการที่เซลล์ได้รับสารอาหารเพียงพอและไม่มีปัจจัยมากระตุ้นให้เกิด autophagy จะพบระดับการแสดงออกของโปรตีน SQSTM1/p62 ได้ในระดับพื้นฐาน [7] นอกจากนี้จากการทดลองพบว่าสัญญาณของฟลูออเรสเซนซ์ไม่ลดลงแม้จะมีการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องก็ตาม โดยทั่วไปเซลล์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์อย่างต่อเนื่องนานกว่า

130 วัน อาจพบการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ [20-21] และความไม่คงตัวของเซลล์ ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีน ที่อาจหายหรือลดลงไป [22-23] อันเป็นผลจากการเกิด population heterogeneity ของเซลล์

โดยพบว่า intrinsic heterogeneity สามารถเกิดจากการแยกกันของยีนในระหว่างการแบ่งเซลล์ และ spontaneous mutation จากคู่เบสเดี่ยว จนนำไปสู่การเรียงตัวของโครโมโซมที่ผิดปกติ [24-25] การทดลองทั้งหมดจึงสรุปได้ว่าเซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่สร้างในการทดลองนี้ไม่พบผลของ population heterogeneity และ ยีน *Gfp* ในเซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) มีความคงตัวสูง แม้จะมีการเพาะเลี้ยงเซลล์อย่างต่อเนื่องเช่นในการทดลองนี้ ก็ไม่พบการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ดังนั้น เซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) จึงมีความคงตัวของ การแสดงออกของยีน *Gfp/SQSTM1/p62* ซึ่งเหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อทดสอบและศึกษากระบวนการ autophagy

ในการทดลองสุดท้ายของการวิจัย คือ การประยุกต์ใช้ cell-based model ในการทดสอบกับ autophagy modulator ได้แก่ rapamycin (autophagy inducer) และ chloroquine (autophagy inhibitor) ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน พบว่าเซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่บ่มกับ rapamycin ที่ความเข้มข้น 500 nM พบว่า GFP/SQSTM1/p62 intensity/cell และ อัตราส่วนโปรตีน SQSTM1/p26 ต่อ  $\beta$ -actin ต่ำกว่า control ขณะที่เซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่บ่มกับ chloroquine ที่ความเข้มข้น 50 nM พบว่า GFP/SQSTM1/p62 intensity/cell และอัตราส่วนโปรตีน SQSTM1/p26 ต่อ  $\beta$ -actin สูงกว่า control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3B และ 4B,  $P<0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์ชนิดต่าง ๆ [26-28] ที่พบว่าการแสดงออกของโปรตีน SQSTM1/p62 ลดลงหลังการบ่มกับ rapamycin และเพิ่มขึ้นหลังการบ่มกับ chloroquine เมื่อเปรียบเทียบกับ control ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมดบ่งชี้ว่า การบ่มเซลล์กับ rapamycin จะกระตุ้นการเกิด autophagosome โดยการยับยั้ง mTOR เลียนแบบภาวะการขาดสารอาหาร

ซึ่งมีผลกระตุ้นการเกิด autophagy ในเซลล์ จึงเพิ่มการสลายของโปรตีน SQSTM1/p62 จึงลดระดับโปรตีน SQSTM1/p62 ซึ่งการสลายของโปรตีน SQSTM1/p62 กระตุ้นการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ chloroquine มีผลลดการเกิด autophagy ในเซลล์ โดยยับยั้งกระบวนการเปลี่ยน autophagosome ให้ไปเป็น autolysosome ผลก็คือ ลดระดับ autolysosome แต่เพิ่มการคั่งของ autophagosome และเพิ่มการคั่งของโปรตีน SQSTM1/p62 จึงเพิ่มระดับโปรตีน SQSTM1/p62 ซึ่งการรวมตัวของโปรตีน SQSTM1/p62 กระตุ้นการเพิ่มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์อย่างมีนัยสำคัญ

นอกจากนี้การทดลองพบว่า เซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่มีการบ่มกับทั้ง rapamycin และ chloroquine พบว่า GFP/SQSTM1/p62 intensity/cell และอัตราส่วนโปรตีน SQSTM1/p26 ต่อ  $\beta$ -actin สูงกว่าเซลล์ BHK-21(*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่บ่มกับ rapamycin หรือ chloroquine เพียงอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูป 3B และ 4B,  $P<0.05$ ) ซึ่งก็สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ [29] ที่พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่พบการแสดงออกของโปรตีน SQSTM1/p62 ในระดับพื้นฐาน การรวมตัวของโปรตีน LC3II และ SQSTM1/p62 เพิ่มขึ้นหลังการเติม chloroquine โดยเซลล์ทั่วไปจะมีความไวในระดับปานกลางในการยับยั้ง autophagy หลังการเติม chloroquine แต่ chloroquine มีผลอย่างชัดเจนในการเปลี่ยนของโปรตีน LC3B-II การรวมตัวของโปรตีน SQSTM1/p62 การเกาะกลุ่มของไลโซโซม และการคั่งของ lipid droplet ซึ่งบ่งบอกการยับยั้งไลโซโซม ขณะที่การบ่มเซลล์กับ rapamycin จะกระตุ้นการเกิด autophagosome โดยการยับยั้งยีน *mTOR* ดังที่กล่าวไป

แต่การบ่มเซลล์กับทั้ง chloroquine และ rapamycin ส่งผลให้เกิดการบวมของไลโซโซม และการคั่งของ lipid droplet อย่างชัดเจน ซึ่งบ่งบอกการยับยั้งไลโซโซมที่ระดับสูง ทำให้พบการรวมตัวของโปรตีน SQSTM1/p62 ในเซลล์มากขึ้นกว่าการบ่มเซลล์กับ chloroquine หรือ rapamycin เพียงอย่างเดียว โดยทั่วไปเซลล์จะอาศัย lipid droplet ที่เก็บกรดไขมันเพื่อมาใช้เป็นพลังงานในภาวะการขาด

สารอาหาร [30] Lippincott-Schwartz และคณะ แสดงให้เห็นว่าการดื้อไขมันจะถูกปล่อยจาก lipid droplet โดยกระบวนการสลายไขมัน และรวมเข้ากับ lipid droplet และไมโทคอนเดรียสำหรับกระบวนการหายใจโดยใช้ออกซิเจน [31] การบ่มเซลล์กับทั้ง chloroquine และ rapamycin จะมีผลให้เยื่อหุ้มของไลโซโซมไม่คงตัวจึงเกิดการสลายของไลโซโซมมากขึ้น และทำให้ lipid droplet เกิดการรวมตัว อีกทั้งยังยับยั้งการสลายของ lipid droplet จึงมีผลทำให้การทำงานของไมโทคอนเดรียในกระบวนการหายใจโดยใช้ออกซิเจนต่ำลง เนื่องจากขาดกรดไขมัน ส่วนกลไกของกรดไขมันหลังการบ่มด้วย chloroquine และ rapamycin ที่มีผลเปลี่ยนแปลงไมโทคอนเดรียมีการศึกษาเพิ่มเติม [31-32]

การหมุนเวียนของโปรตีน SQSTM1/p26 เป็นวิธีทางเลือกที่มีการใช้อย่างกว้างขวางในการติดตามการทำงานของ autophagy โดย western blot อย่างที่กล่าวไป แต่สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงเมื่อวิเคราะห์การหมุนเวียนของโปรตีน SQSTM1/p26 คือมีการรายงานว่า ภายใต้สภาวะบางอย่าง เช่น การขาดแคลน amino acid เซลล์บางชนิดจะกระตุ้น autophagy ในระดับสูง จึงเพิ่มการสลายของโปรตีน SQSTM1/p26 ในไลโซโซม แต่ที่ steady-state ที่พบ normal autophagy พบว่าระดับของโปรตีน SQSTM1/p26 ไม่เปลี่ยนแปลง เพราะการย่อยสลายถูกทดแทนโดยการสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ [8] เช่นเดียวกับการวิเคราะห์โปรตีน LC3 ด้วย western blot การวัด autophagic flux โดยใช้การหมุนเวียนของโปรตีน SQSTM1/p26 ด้วย western blot ต้องการการทดลองที่มี และไม่มีของ protein synthesis inhibitor เช่น cycloheximide เพื่อยับยั้งการสังเคราะห์ใหม่ของโปรตีน SQSTM1/p26 ดังนั้น เมื่อใช้วิธีการทดสอบนี้ในเซลล์ และต้องการศึกษากลไกของสารต่างๆ ต่อกระบวนการ autophagy จึงควรมีการเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีน SQSTM1/p26 ด้วย western blot ในสภาวะการเติม และไม่เติม cycloheximide ซึ่งจะช่วยให้ได้ผลการศึกษาที่ชัดเจนยิ่งขึ้น และมีการศึกษาที่แนะนำ ให้วิเคราะห์การหมุนเวียนของโปรตีน SQSTM1/p26 โดย western blot ร่วมกับระดับของ LC3 Lipidation เพื่อยืนยันการเปลี่ยนแปลงใน autophagic flux [8, 33-34]

นอกจากนี้เซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่สร้างได้จากการศึกษานี้ อาจยังมีข้อจำกัดเช่นเดียวกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน GFP ที่พบได้ทั่วไป เช่น การแสดงออกของโปรตีน GFP ต้องการออกซิเจน และมีความไวต่อกรด [35] ดังนั้นการประยุกต์ใช้เซลล์จากการศึกษานี้ สำหรับบางสภาวะที่ขาดออกซิเจน หรือมีความเป็นกรดสูง เช่น tumor condition อาจมีผลลดการแสดงออกของโปรตีน GFP และใช้ศึกษาได้เฉพาะ tagged protein ที่สนใจในเซลล์เท่านั้น ไม่สามารถใช้ในการศึกษา biomolecule อื่นๆ เช่น DNA RNA และ lipids ในเซลล์ได้โดยตรง และการกระตุ้นสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของโปรตีน GFP อาจมีผลกระตุ้นสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของส่วนประกอบอื่น ๆ ภายในเซลล์ หรือในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่เรียกว่า autofluorescence หากสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของโปรตีน GFP เกิด overlap กับ autofluorescence จะทำให้ยากแก่การวิเคราะห์

แม้จะมีข้อจำกัดของการศึกษานี้ดังที่กล่าวไป แต่จากผลการทดลองทั้งหมดจึงอาจสรุปได้ว่า การประยุกต์ใช้ cell-based model กับสารมาตราฐาน ได้แก่ rapamycin (autophagy inducer) และ chloroquine (autophagy inhibitor) พบว่าสามารถใช้เซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) ที่สร้างขึ้นจากการวิจัยนี้ เพื่อการทดสอบเบื้องต้น (screening test) กับสารที่อาจมีคุณสมบัติการเป็น autophagy modulator โดยอาจประยุกต์ใช้กับสารหลายๆชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ซึ่งจะช่วยประหยัดเวลาเพราะสามารถทดสอบกับสารที่มีมากมายหลายชนิดในคราวเดียว อีกทั้งการวิเคราะห์ผลมีความน่าเชื่อถือ นอกจากนี้อาจนำเซลล์ BHK-21 (*Gfp/SQSTM1/p62*) ตลอดจนพลาสมิด pCMV-GFP/SQSTM1/p62 ที่ถูกสร้างในการศึกษานี้ ไปดัดแปลงเพื่อใช้ในการศึกษาอีก และหน้าที่ของกระบวนการ autophagy ภายในเซลล์ ได้อย่างหลากหลายต่อไปด้วย ผู้วิจัยเสนอให้มีการขยายผลการวิจัยและประยุกต์ใช้ โดยเฉพาะการนำพลาสมิด pCMV-GFP/SQSTM1/p62 ที่สร้างได้ไป transfect เข้าเซลล์ชนิดต่างๆ โดยเน้นการใช้เทคนิค flow cytometry อย่างที่ใช้ในการทดลองนี้ ร่วมกับ imaging flow cytometry ซึ่งถูกใช้สำหรับการวิเคราะห์ขั้นสูงเพื่อวัด

autophagic flux ในเซลล์ที่มีชีวิต โดยเฉพาะเซลล์ที่ไม่เกาะกับพื้นผิว เช่น เซลล์เม็ดเลือด โดยขณะ flow cytometry ประเมินความเข้มของสัญญาณทั้งหมดในเซลล์ imaging flow cytometry ซึ่งเป็นการรวมของ flow cytometry กับกล้องจุลทรรศน์จะถ่ายภาพของเซลล์ที่แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ไว้ และเป็นผลให้บริเวณที่พบสัญญาณภายในเซลล์จะสังเกตเห็นและวัดได้ ส่วนสารตั้งต้นของ autophagy ที่เป็น fluorescently-tagged เช่น โปรตีน GFP-SQSTM1/p26 เช่นในการทดลองนี้สามารถใช้เป็นโปรตีนสำหรับการวัด autophagic flux โดย flow cytometry และ imaging flow cytometry ซึ่งการสลายของโปรตีน GFP-SQSTM1/p26 กระตุ้นการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์อย่างมีนัยสำคัญ [36-37] นอกจากนี้อาจดัดแปลงให้เซลล์มีการแสดงออกของโปรตีน mRFP/mCherry-GFP-SQSTM1/p62 ที่ช่วยประเมิน autophagic flux ได้โดยตรง และแยกความแตกต่างระหว่าง autophagosome และไลโซโซมได้

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เลขที่สัญญา 8/2562

### เอกสารอ้างอิง

1. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011; 469: 323-35.
2. Liu B, Cheng Y, Liu Q, Bao JK, Yang JM. Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. *Acta Pharmacol Sin.* 2010 Sep;31(9):1154-64.
3. Koukourakis MI, Kalamida D, Giatromanolaki A, Zois CE, Sivridis E, Pouliliou S, et al. Autophagosome proteins LC3A, LC3B and LC3C have distinct subcellular distribution kinetics and expression in cancer cell lines. *PLoS One.* 2015 Sep; 17;10(9): e0137675 doi: 10.1371
4. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 2000; 408: 488–92.
5. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006; 441: 880-84.
6. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000; 19(21): 5720-28.
7. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Arozena JMA, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2006; 12(1): 1-222.
8. Sahani MH, Itakura E, Mizushima N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy* 2014; 10: 431–41.
9. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. SQSTM1/p62 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol* 2005; 171: 603–14.

10. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009; 43: 67-93.
11. Maycotte P, Thorburn A. Autophagy and cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2011; 11: 127–37.
12. Janku F, McConkey DJ, Hong DS, Kurzrock R. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 528–39.
13. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 2011; 18: 571–80.
14. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 2010; 584: 1287–95.
15. Elwira S, Dagmar K. The role of AKT/mTOR pathway in stress response to UV-irradiation: implication in skin carcinogenesis by regulation of apoptosis, Autophagy and Senescence. *Int J Mol Sci.* 2013 Aug; 14(8): 15260–85.
16. Homewood CA, Warhurst DC, Peters W, Bagga VC. Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine. *Nature* 1972; 235(5332): 50–52.
17. Leardkamolkarn V, Sirigulpanit W. Establishment of a stable cell line coexpressing dengue virus-2 and green fluorescent protein for screening of antiviral compounds. *Journal of Biomolecular Screening* 2012; 17(2): 183-93.
18. Farkas T, Hoyer-Hansen M, Jaattela M. Identification of novel autophagy regulators by a luciferase-based assay for the kinetics of autophagic flux. *Autophagy* 2009; 5: 1018–25.
19. Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent tagged LC3. *Autophagy* 2007; 3: 452–60.
20. Beckmann TF, Krämer O, Klausing S, Heinrich C, Thüte T, Büntemeyer H, et al. Effects of high passage cultivation on CHO cells: a global analysis. *Appl Microbiol Biot* 2012; 94(3): 659–71.
21. Valente KN, Lenhoff AM, Lee KH. Expression of difficult-to-remove host cell protein impurities during extended Chinese hamster ovary cell culture and their impact on continuous bioprocessing. *Biotechnol Bioeng* 2015; 112(6): 1232–42.
22. Ko P. Probing the importance of clonality: single cell subcloning of clonally derived CHO cell lines yields widely diverse clones differing in growth, productivity, and product quality. *Biotechnol Prog* 2018; 34(3): 624–34.
23. Davies SL, Lovelady CS, Grainger RK, Racher AJ, Young RJ, James DC. Functional heterogeneity and heritability in CHO cell populations. *Biotechnol Bioeng* 2013;110(1):260–74.
24. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985 ; 260: 3440–50.
25. Zhang AY, Yi F, Teggatz EG, Zou AP. Enhanced production and action of cyclic ADP-ribose during oxidative stress in small bovine coronary arterial smooth muscle. *Microvasc Res.* 2004; 67: 159–67.

26. Iwai-Kanai E, Yuan H, Huang C, Sayen MR, Perry-Garza CN, Kim L, et al. A method to measure cardiac autophagic flux in vivo. *Autophagy* 2008; 4(3): 322-29.
27. Liu WJ, Luo MN, Tan J, Chen W, Huang LZ, Yang C, et al. Autophagy activation reduces renal tubular injury induced by urinary proteins. *Autophagy* 2013; 10(2): 243-56  
DOI: 10.4161/auto.27004
28. Cai Y, Jiajing Cai, Ma Q, Xu Y, Zou J, Xu L, et al. Chloroquine affects autophagy to achieve an anticancer effect in EC109 esophageal carcinoma cells *in vitro*. *Oncol Lett.* 2018; 15(1): 1143–48.
29. Hsu SPC, Kuo JS, Chiang HC, Wang HE, Wang YS, Huang CC, et al. Temozolomide, sirolimus and chloroquine is a new therapeutic combination that synergizes to disrupt lysosomal function and cholesterol homeostasis in GBM cells . *Oncotarget.* 2018; 9(6): 6883–96.
30. Cabodevilla AG, Sanchez-Caballero L, Nintou E, Boiadjeva VG, Picatoste F, Gubern A, et al. Cell survival during complete nutrient deprivation depends on lipid droplet-fueled beta-oxidation of fatty acids. *J Biol Chem.* 2013; 288: 27777–88.
31. Rambold AS, Cohen S, Lippincott-Schwartz J. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev Cell.* 2015; 32: 678–92.
32. Wrighton KH. Lipid metabolism: fatty acids on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015; 16: 204.
33. Rodríguez-Arribas M, Yakhine-Diop SM, Gonzalez-Polo RA, Niso-Santano M, Fuentes JM. Turnover of lipidated LC3 and autophagic cargoes in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 2017;587:55–70.
34. Tooze SA, Dooley HC, Jefferies HB, Joachim J, Judith D, Lamb CA, et al. Assessing mammalian autophagy. *Methods Mol Biol.* 2015;1270:155–165.
35. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Ann Rev Biochem.* 1998;67: 509–44.
36. Larsen KB, Lamark T, Øvervatn A, Harneshaug I, Johansen T, Bjørkøy G. A reporter cell system to monitor autophagy based on SQSTM1/p62. *Autophagy* 2010; 6: 784–93. doi: 10.4161/auto.6.6.12510.
37. Klionsky D, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-ghiso JA, Ahn HJ, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2016; 8: 445–544. doi: 10.4161/auto.19496.