รายงานการวิจัย

เรื่อง

ไดฮัยโดรโฟเลทรีดักเทสในเซลล์มะเร็งของคนและสารต้านเอ็นซัยม์

DIHYDROFOLATE REDUCTASE IN HUMAN TUMOR CELLS AND ITS INHIBITOR

สุนันท์ พงษ์สามารถและคณะ

ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

612.0151
ร451
ค.1

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน

ปี พ.ศ. 2525-2526

รายงานการวิจัย

เรื่อง

ไดฮัยโดรโฟเลทรีดัก เทสใน เซลล์มะ เร็งของคนและสารต้าน เอ็นซัยม์

Dihydrofolate Reductase in Human Tumor Cells and Its Inhibitor

โดย

รศ.ดร. สุนันท์ พงษ์สามารถ

ผศ. เครือวัลย์ เอกรักษาศิลป์ชัย

รศ. ปิยา บุรณศิริ

ผศ.ดร. สินธุ์ชัย แก้วกิติชัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน

ปีงบประมาณ 2525-2526

คณะ เภสัชศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มิถุนายน 2528

บทคัดย่อ

สมรรถนะของ เอ็นซัยม์ไดฮัยโดรโฟเลทรีดักเทสจาก เนื้อ เยื่อมะ เร็งของทาง เดินอาหาร ได้แก่ ผนังทวาร ลำไส้ใหญ่ กระ เพาะ มะ เร็งของไต มะ เร็งของปอด และมะ เร็งของ เต้านมของคน หลังจากแยกให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยโปรตามีนซัล เฟท และทำการวิ เคราะห์โดย วิธีส เปคโตรโฟโต เมตริก แอส เส พบว่า เนื้อ เยื่อมะ เร็งทุกชนิดมี เอ็นซัยม์ไดฮัยโดรโฟเลท รีดัก เทสอยู่ในระดับสูง เมื่อ เปรียบ เทียบกับ เอ็นซัยม์ เดียวกันนี้ ซึ่งไม่สามารถตรวจพบใน เนื้อ เยื่อ ปกติ เกือบทั้งหมด การศึกษาโดยวิธี เมทโธ เทรก เซท ไต เตรชั่น ในการวัดปริมาณของ เอ็นซัยม์ ในมะ เร็งของไตและกระ เพาะอาหาร พบว่าใน เนื้อ เยื่อมะ เร็งของไตและกระ เพาะอาหารของ คนป่วยมี เอ็นซัยม์ไดฮัยโดรโฟเลทรีดัก เทส 1.29×10^{-12} และ 3.34×10^{-13} โมล/กรัม เนื้อ เยื่อ ตามลำดับ หรือ เท่ากับ 5.09×10^{-14} และ 1.07×10^{-14} โมล/มก. โปรตีน ตามลำดับ ค่า เทินโอ เวอร์ นัม เบอร์ ของ เอ็นซัยม์จาก เนื้อ เยื่อมะ เร็งของไต มะ เร็งของกระ เพาะ เปรียบกับ เอ็นซัยม์จากตับหนูมีค่า เท่ากับ 36,345, 15,421 และ 5,154 ตามลำดับ การศึกษา การห้าม เอ็นซัยม์โดยยา เมทโธ เทรก เซท พบว่าความ เข้มข้นของ เมทโธ เทรก เซท ที่สามารถ ห้าม เอ็นซัยม์ได้ 50% (I_{50}) จาก เนื้อ เยื่อมะ เร็งของไต มะ เร็งของกระ เพาะมีค่า 9.68×10^{-12} M และ 9.00×10^{-12} M ตามลำดับ ขณะที่ค่า I_{50} ของ เมทโธ เทรก เซท ที่ห้าม เอ็นซัยม์จากตับหนูมีค่า 7.13×10^{-10} M ผลที่ได้แสดงให้ เห็นว่าการทำงานของไดฮัยโดร- โฟ เลทรีดัก เทสใน เนื้อ เยื่อมะ เร็งของคนมีสมรรถนะการทำงานสูงกว่าและ เอ็นซัยม์มีความไวต่อ การถูกห้ามด้วย เมทโธ เทรก เซท ได้ดีกว่า เอ็นซัยม์ในตับหนู

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABSTRACT

Dihydrofolate reductase activity of partially purified enzyme, by protamine sulfate precipitation, from human cancerous tissues of gastro-intestinal tract (such as rectum, colon, stomach), kidney, lung and breast was determined by spectrophotometric assay. It was observed that all of cancerous tissues contain high level of dihydrofolate reductase compared to the same enzyme, which could not be detected in almost all of the normal tissues. The methotrexate titration assay was used to measure the enzyme concentration in kidney and stomach cancers. It was found that human cancerous tissues of kidney and stomach contain dihydrofolate reductase 1.29×10^{-12} and 3.34×10^{-13} mole/gm. tissue , respectively, or equel to 5.09×10^{-14} and 1.07×10^{-10} mole/mg. protein,respectively. The turnover number of dihydrofolate reductase from cancerous tissues of kidney and stomach compared to rat liver enzyme were 36,345, 15,421, and 5,154,respectively. The enzyme inhibition by methotrexate was also studied. The concentrations of methotrexate required for 50% inhibition (I_{50}) to the enzyme from kidney and stomach cancers were 9.68×10^{-12} M and 9.00×10^{-12} M, respectively. The I_{50} value observed in rat liver enzyme was 7.13×10^{-10} M. The results suggested that dihydrofolate reductase activity of human cancerous tissues were higher and the enzyme was more sensitive to be inhibited by methotrexate than the enzyme of rat liver.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2525-2526 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้สนับสนุนงานวิจัยนี้ดังต่อไปนี้

1. รศ.ดร. ประโชติ เปล่งวิทยา หัวหน้าภาควิชาชีว เคมี คณะเภสัชศาสตร์ ที่ให้ความร่วมมือและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้ให้สำ เร็จลงได้

2. ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคุณโสมสิริ ศิริบุญ หัวหน้าห้องผ่าตัดที่ให้ความร่วมมืออย่างดียิ่งในการจัด เก็บตัวอย่าง เนื้อ เยื่อมะ เร็ง

3. แผนกพยาธิวิทยาและ พล.ต.ต. ไพฑูรย์ หลิมรัตน์ ผู้บังคับการสถาบันนิติ เวช วิทยา โรงพยาบาลตำรวจ ที่ให้ความกรุณา เกี่ยวกับการจัด เก็บตัวอย่าง เนื้อ เยื่อมะ เร็งและ เนื้อ เยื่อปกติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
ชื่อเรื่องและชื่อผู้วิจัย	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
กิตติกรรมประกาศ	iv
สารบัญเรื่อง	v
สารบัญตาราง	vii
สารบัญรูป	viii
บทนำ	1
วัสดุและวิธีวิจัย	14
สารเคมี	14
เครื่องมือ	14
น้ำยาทดลอง	15
วิธีวิจัย	16
- การเก็บตัวอย่าง	16
- การเตรียมเอ็นซัยม์	16
- วิธีทดสอบสมรรถนะของเอ็นซัยม์	17
- การวิเคราะห์โดย Methotrexate Titration	17
ผลการทดลอง	18
สมรรถนะของเอ็นซัยม์ไดฮัยโดรโฟเลทรีดัก เทสใน เนื้อเยื่อมะเร็ง	18
การหาปริมาณเอ็นซัยม์โดยวิธี Methotrexate Titration	18
การศึกษา Methotrexate Inhibition ของ Dihydrofolate Reductase จากเนื้อเยื่อมะเร็งของไตและกระเพาะคน	38
การศึกษาค่า Turnover Number ของ Dihydrofolate Reductase จากเนื้อเยื่อมะเร็งของไตและกระเพาะคน	43

หน้า

วิจารณ์และสรุป..... 44

สมรรถนะของ dihydrofolate reductase ในเนื้อเยื่อมะเร็ง..... 44

ผลของ methotrexate ต่อ dihydrofolate reductase..... 45

การเปรียบเทียบสมรรถนะโดยเอ็นซัยม์ turnover number..... 46

การห้ามของ methotrexate ต่อ dihydrofolate reductase จากเนื้อเยื่อมะเร็งของไตและกระเพาะ..... 47

เอกสารอ้างอิง..... 49

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. คุณสมบัติบางอย่างของ dihydrofolate reductase จากแหล่งต่าง ๆ 4-6
2. เอ็นซัยม์จลนศาสตร์ของ dihydrofolate reductase จากแหล่งต่าง ๆ 10
3. เปรียบเทียบ dihydrofolate reductase activity ในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของผนังทวาร..... 19
4. เปรียบเทียบ dihydrofolate reductase activity ในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของลำไส้ใหญ่..... 20
5. เปรียบเทียบ dihydrofolate reductase activity ในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของกระเพาะ..... 21
6. เปรียบเทียบ dihydrofolate reductase activity ในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของไต..... 22
7. เปรียบเทียบ dihydrofolate reductase activity ในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของปอด..... 23
8. เปรียบเทียบ dihydrofolate reductase activityในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของเต้านม..... 24
9. ปริมาณและ activity ของ dihydrofolate reductase ในเนื้อเยื่อมะเร็งและในตับหนู..... 39
10. เปรียบเทียบความเข้มข้นของ methotrexate ที่ห้าม 50% ของเอ็นซัยม์ไดฮัยโดรโฟเลทรีดักเทสในเนื้อเยื่อมะเร็งและตับหนู..... 42

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. เปรียบเทียบลำดับกรดอมิโนของ dihydrofolate reductase จากแหล่งต่าง ๆ 7-8

2. การห้ามของ dihydrofolate reductase จากเนื้อเยื่อมะเร็งของไต เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ methotrexate เอ็นซัยม์ (4 units) titrate กับ methotrexate ที่เพิ่มความเข้มข้นตามลำดับ..... 26-27

3. ผลของ methotrexate 1.935 x 10^{-11} M ต่อ activity ของ dihydrofolate reductase (ไต) ที่จุดตัดบนแกนนอนเท่ากับปริมาณของเอ็นซัยม์ 106.7 µl (activity 20.37 nmole/min/ml) ซึ่งสมมูลย์กับ methotrexate..... 28-29

4. การห้ามของ dihydrofolate reductase จากเนื้อเยื่อมะเร็งของกระเพาะ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ methotrexate เอ็นซัยม์ (0.72 unit) titrate กับ methotrexate ในความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ..... 30-31

5. ผลของ methotrexate (12 x 10^{-12} M) ต่อ activity ของ dihydrofolate reductase ที่จุดตัดบนแกนนอนเท่ากับปริมาณเอ็นซัยม์ 160 µl (activity 3.6 nmole/min/ml) จากกระเพาะซึ่งสมมูลย์กับ mathotrexate..... 32-33

6. การห้าม dihydrofolate reductase จากเนื้อเยื่อตับหนู เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ methotrexate เอ็นซัยม์ (8.28 units) titrate กับ methotrexate ในความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ..... 34-35

7. ผลของ methotrexate (6.65 x 10^{-10} M) ต่อ activity ของ dihydrofolate reductase ที่จุดตัดบนแกนนอนเท่ากับปริมาณของเอ็นซัยม์ 27.5 µl (activity 301 nmole/min/ml) จากตับหนู ซึ่งสมมูลย์กับ methotrexate..... 36-37

รูปที่ หน้า

8. การห้ามของ dihydrofolate reductase จากเนื้อเยื่อตับหนู เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ methotrexate เอ็นซัยม์ (4 units) titrate กับ methotrexate ในความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ activity ของเอ็นซัยม์ลดลง 50% (I_{50}) ที่ความเข้มข้นของ methotrexate เท่ากับ 7.13×10^{-10} M 40-41

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

เอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase (EC 1.5.1.3) เป็นเอ็นซัยม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชั่นของ dihydrofolate หรือ folate ได้เป็น tetrahydrofolate พร้อมกับการเกิดออกซิเดชั่นของ reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) หรือ reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) ไปเป็น nicotinamide adenine dinicleotide phosphate (NADP) หรือ nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) ตามลำดับ tetrahydrofolate เป็น cofector ที่สำคัญของเอ็นซัยม์หลายตัวที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิค ได้แก่ purine และ thymidylate เป็นต้น นอกจากนี้ชีวสังเคราะห์ของกรดอมิโนบางตัวได้แก่ glycine และ methionine ก็ต้องการ tetrahydrofolate ด้วย เอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase ได้รับความสนใจศึกษากันมาก เนื่องจากเป็นเอ็นซัยม์ตัวสำคัญที่เป็นเป้าหมายที่ถูกห้ามได้ด้วยยาพวกเคมีบำบัดหลายชนิด (1,2) ได้แก่ amethopterin หรือ methotrexate (MTX) ซึ่งใช้บำบัดโรคมะเร็งหลายชนิด trimethoprim ใช้บำบัดโรคติดเชื้อบางชนิดและ pyrimethamine ใช้บำบัดโรคมาเลเรีย เป็นต้น

การศึกษา dihydrofolate reductase สามารถแยกออกมาได้บริสุทธิ์หรือค่อนข้างบริสุทธิ์จากเชื้อบัคเตรีและจากเซลล์ของสัตว์ทดลองชนิดต่าง ๆ ได้มีการศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติของเอ็นซัยม์จากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ Streptococcus faecium(3,4) Lactobacillus casei (5,6) Diplococcus pneumoniae (7) Escherichia coli (8,9,10) Ehrlich ascite cells(11,12) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว L1210 ของหนู (murine lymphoma L1210) (13,14) Sarcoma 180 cells (15) ต่อมทัยมัสของลูกวัว (calf thymus) (16) ตับไก่ (chicken liver) (17,18,19) ตับวัว (bovine liver) (20,21,22) ตับหมู (porcine liver) (23) ตับและม้ามของหนูถีบจักร (mouse liver and spleen) (24) ตับและลำไส้เล็กของหนูตะเภา (guinea pig liver and intestine) (25) เป็นต้น

จากการศึกษา dihydrofolate reducatse ในบักเตรีชนิดต้านยา methotrexate คือ Streptococcus faecium พบมีเอ็นซัยม์อยู่ 2 isozyme (26,27) dihydrofolate reductase ที่แยกได้จาก Streptococcus faecium var duran strain A มีเอ็นซัยม์ซึ่งให้ชื่อว่า mutant enzyme หรือ isoenzyme II ซึ่งพบว่ามีการเคลื่อนที่ใน polyacrylamide gel electrophoresis ได้น้อยกว่าอีกตัวหนึ่งที่ให้ชื่อว่า wild enzyme หรือ isoenzyme I ซึ่งเป็นเอ็นซัยม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ dihydrofolate reductase ที่พบในสเตรน (strain) ของStreptococcus faecium var duran ATCC 8043 ซึ่งเป็นเชื้อที่ไวต่อการฆ่าด้วยยา methotrexate และพบว่า isoenzyme II มีคุณสมบัติเหมือนกับ dihydrofolate reductase ในเซลล์สัตว์คือสามารถ reduce พวก folate ได้เช่นเดียวกับ dihydrofolate ให้เป็น tetrahydrofolate แต่การ reduction ของ folate เกิดขึ้นด้วยอัตราเร็วที่ช้ากว่า dihydrofolate ส่วน isoenzyme I สามารถ reduce เฉพาะ dihydrofolate เท่านั้นไม่ reduce พวก folate (26) และในอีกการศึกษาหนึ่งในเชื้อ Streptococcus faecium strain ที่ต้านยา methotrexate เช่นกันพบมี 2 isozyme เรียกเป็น Form I และ Form II (27)การศึกษาใน Lactobacillus casei strain ที่ต้านยา methotrexate พบมีอยู่เป็น 2 isozyme เช่นกัน ให้ชื่อเป็น Form I และ Form II (30) ในเชื้อ strain ต้านยา methotrexate ของ Escherichia coli (RT 500) สามารถแยกได้ 2 isozyme โดยวิธีโครมาโตกราฟีด้วย methotrexate affinity colume (10) การต้านยาของเชื้อบักเตรีอาจเกิดโดยการเปลี่ยนแปลงภายในยีนของบักเตรีทำให้เพิ่มการเลือกสร้างเอ็นซัยม์เพิ่มขึ้นอีกตัวหนึ่งที่ไม่ใช่เอ็นซัยม์ตัวที่พบมีอยู่มากตามปกติในเชื้อที่ไวต่อยาตัวดั้งเดิม (28) การเปลี่ยนแปลงของเชื้อทำให้ต้านยาเช่นนี้เป็นวิธีหนึ่งที่ทำให้จุลชีพเพิ่มความสามารถของมันให้ทนอยู่ได้และสามารถจะใช้สาร folate ที่มีอยู่จึงทำให้เพิ่มระดับของ isoenzyme II ให้มากขึ้นในบักเตรีที่ต้านยาเมื่อเทียบกับพวก wild หรือ sensitive strain ของบักเตรี ยิ่งกว่านั้นยังพบว่าในเซลล์ของบักเตรี Escherichia coli ที่ติดเชื้อไวรัสT-even bacteriophage จะมีเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase สูงกว่าเชื้อปกติถึง 20 เท่าและเอ็นซัยม์ทั้งสองก็มีคุณสมบัติหลายอย่างต่างกัน (29) ในเซลล์ของสัตว์ก็พบความสัมพันธ์คล้าย ๆ กันนี้ใน methotrexate-resistant subline ของ

Ehrlich ascite carcinoma พบมีสมรรถนะของ dihydrofolate reductase มากกว่าประมาณ 14 เท่าของเซลล์เดิมของมันที่ไวต่อยา (31) เซลล์เพาะเลี้ยงของ mouse sarcoma 180 พบมีปริมาณของ dihydrofolate reductase มากขึ้นเมื่อเซลล์เพิ่มการต้านยา methotrexate (32,33) ในเซลล์ของ mouse leukemia ที่เพาะเลี้ยงพบว่าเพิ่มระดับของ dihydrofolate reducatse ในเซลล์ที่ต้านยา methotrexate ขึ้นมากกว่าในเซลล์ของ parent strain (34,35)

Dihydrofolate reductase ที่ศึกษาในบักเตรีและเซลล์ของสัตว์พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในขนาดระหว่าง 15,000-30,000 ดัลตันขึ้นกับแหล่งที่มาของเอ็นซัยม์ (36) และการทำงานของเอ็นซัยม์ พบว่ามี pH optimum แตกต่างกันอยู่ในช่วง pH 4 จนถึง pH มากกว่า 7 แล้วแต่ชนิดและแหล่งที่มาของเอ็นซัยม์ คุณสมบัติเหล่านี้และค่า turnover number ซึ่งแสดงถึงความสามารถของเอ็นซัยม์ที่เปลี่ยนปริมาณเป็น moles ของ dihydrofolate ให้เป็น tetrahydrofolate/นาที/mole ของเอ็นซัยม์ ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 1

เนื่องจากความสำคัญของเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase ของการเป็นเอ็นซัยม์เป้าหมายของยาต้านมะเร็งคือ methotrexate และ ยาต้านเชื้อได้แก่ trimethoprim และ pyrimethamine ดังกล่าวแล้วทำให้มีผู้สนใจศึกษาโครงสร้างโดยละเอียดของเอ็นซัยม์นี้อย่างมาก เพื่อต้องการเข้าใจอย่างลึกซึ้งถึงกลไกการห้ามเอ็นซัยม์ของยาเหล่านี้ มีรายงานเกี่ยวกับโครงสร้างการเรียงตัวของกรดอมิโนของเอ็นซัยม์ทั้งจากบักเตรีได้แก่ Escherichia coli (10) Lactobacillus casei (6), Streptococcus faecium (4,37) และ Neisseria gonorrhoeae (57) เป็นต้น และจากเซลล์สัตว์ได้แก่ chicken liver (19) porcine liver (23) bovine liver (22) และ murine L1210 lymphoma (14) เป็นต้น การเปรียบเทียบการเรียงตัวของกรดอะมิโนในโครงสร้างของ dihydrofolate reductase จากแหล่งต่าง ๆ ดังกล่าวได้รวบรวมไว้ในรูปที่ 1 การศึกษาโครงสร้างของเอ็นซัยม์ในเนื้อเยื่อของสัตว์ทำได้ไม่สะดวกเท่าการศึกษาในเซลล์ของบักเตรี เนื่องจากมีเอ็นซัยม์อยู่น้อยมากในเนื้อเยื่อของเซลล์สัตว์ (18) เนื้อเยื่อตับจึงเป็นอวัยวะที่นำมาศึกษากันมาก เพราะเป็นอวัยวะที่พบมีเอ็นซัยม์สูง

ตารางที่ 1 คุณสมบัติบางอย่างของ dihydrofolate reductase จากแหล่งต่าง ๆ

แหล่งของ Dihydrofolate reductase	ขนาดโมเลกุล (Molecular weight)	pH optima	Turnover number moles/min/mole of enzyme
Escherichi coli B strain MP1428 MTX-resistant	17,300 (8) (equilibrium sedimentation) 16,810 (8) (amino acid composition)	6.5 (8)	600 ± 50 (8) (MTX - titration)
E. coli (RT 500) MTX-resistant			
isozyme I		7.0 (10)	1,800 (10)
isozyme II		- (10)	126 (10)
Lactobacillus casei MTX-resistant			
isozyme I	14,900 (5) (gel filtration, electrophoresis, ultracentrifugation)	6.5 (5)	180 (5) (molecular weight)
isozyme II	15,000 (30) (electrophoresis)		
Streptococcus faecium MTX-resistant			
isozyme I	20,000 (27) (equilibrium sedimentation)	6.5 (27)	6,000(27) (molecular weight)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติบางอย่างของ **dihydrofolate reductase** จากแหล่งต่าง ๆ (ต่อ)

แหล่งของ Dihydrofolate reductase	ขนาดโมเลกุล (Molecular weight)	pH optima	Turnover number moles/min/mole of enzyme
Streptococcus faecium var. durans strain A MTX-resistant			
isoenzyme I (wild type)	28,000 (26) (equilibrium sedimentation)	5.8 (26)	8,000 (26) (molecular weight)
isoenzyme II(mutant type)	20,000 (26) (equilibrium sedimentation)	5.8 (26)	900 (26) (molecular weight)
Streptococcus faecium R.		6.7 (3)	
Neisseria gonorrhoeae	18,000 (58) (electrophoresis) 17,731 (58) (amino acid composition)	6.4 (58)	14,403 (58)
Bovine liver	22,100 (21) (equilibrium sedimentation) 21,500 (21) (amino acid composition)	4.8,5.0,6.2 (21)	
	22,500 (20) (equilibrium sedimentation)		578 (20) (MTX-titration)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติบางอย่างของ dihydrofolate reductase จากแหล่งต่าง ๆ (ต่อ)

แหล่งของ dihydrofolate reductase	ขนาดโมเลกุล (Molecular Weight)	pH optima	Turnover number moles/min/mole of enzyme
Mouse liver	20,000(24) (gel filtration)	4.5-5.5 (24)	940 (24) (MTX-titration)
Mouse spleen	20,000 (24) (gel filtration)	7.5-8.5 (24)	940 (24) (MTX-titration)
L 1210 lymphoma MTX-resistant	20,000 (13) (gel filtation)	8.3 (13)	940 (24) (MTX-titration)
Ehrlich ascites carcinoma		5.9,7.6 (11)	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```
     1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20

BL  Val Arg Pro Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly Ile Gly Lys Asn Gly
PL  Val Arg Pro Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly Ile Gly Lys Asn Gly
ML  Val Arg Pro Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly Ile Gly Lys Asn Gly
CL  Val Arg Ser Leu Asn Ser Ile Val Ala Val Cys Gln Asn Met Gly Ile Gly Lys Asp Gly
NG  Met Leu Lys Ile Thr Ile Ile Ala Ala Cys Ala Glu Asn Leu Cys Ile Gly Ala Gly Asn
EC          Met Ile Ser Leu Ile Ala Ala Leu Ala Val Asp Arg Val Ile Gly Met Glu Asn
LC              Thr Ala Phe Leu Trp Ala Gln Asn Arg Asp Gly Leu Ile Gly Lys Asp Gly
SF II       Met Phe Ile Ser Met Trp Ala Gln Asp Lys Asn Gly Leu Ile Gly Lys Asp Gly
SF I        Met Leu Ala Ala Ile Trp Ala Gln Asp Glu Asn Gly Leu Ile Gly Lys Glu Asp

    21  22  23  24  25  26  27  28  29  30  31  32  33  34  35  36  37  38  39  40

BL  Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe Gln Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Val
PL  Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Tyr Lys Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr
ML  Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe Lys Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr
CL  Asn Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Tyr Lys Tyr Phe Gln Arg Met Thr Ser Thr
NG  Ala Met Pro Trp His     Ile Pro Glu Asp Phe Ala Phe Phe Lys Val Tyr Thr Leu
EC  Ala Met Pro Trp Asn     Leu Pro Ala Asp Leu Ala Trp Phe Lys Arg Asn Thr Leu
LC  His Leu Pro Trp His     Leu Pro Asp Asp Leu His Tyr Phe Arg Ala Gln Thr Val
SF IILeu Leu Pro Trp Arg    Leu Pro Asn Asp Met Arg Phe Phe Arg Glu His Thr Met
SF I Gln Leu Pro Trp Arg    Leu Pro Asn Asp Leu Lys Phe Phe Lys Gln Met Thr Glu Ala

    41  42  43  44  45  46  47  48  49  50  51  52  53  54  55  56  57  58  59  60

BL  Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln Asn Leu Val Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Phe Ser Ile
PL  Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln Asn Leu Val Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Phe Ser Ile
ML  Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln Asn Leu Val Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Phe Ser Ile
CL  Ser His Val Glu Gly Lys Gln Asn Ala Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile
NG              Gly Lys         Pro Val Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Glu Ser Leu
EC          Asn     Lys         Pro Val Ile Met Gly Arg His Thr Trp Glu Ser Ile
LC              Gly Lys         Ile Met Val Val Gly Arg Arg Thr Tyr Glu Ser Phe
SF II           Asp     Lys     Ile Leu Val Met Gly Arg Lys Thr Tyr Glu Gly Met
SF I            Asn             Thr Leu Val Met Gly Arg Lys Thr Phe Glu Gly Met

    61  62  63  64  65  66  67  68  69  70  71  72  73  74  75  76  77  78  79  80

BL  Pro Glu Lys Asn Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu Lys
PL  Pro Glu Lys Asn Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu Lys
ML  Pro Glu Lys Asn Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu Lys
CL  Pro Glu Lys Asn Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu Lys
NG  Pro             Lys Pro Leu Pro Gly Arg Arg Asn Ile Val Ile Ser Arg Gln Ala Asp
EC  Gly             Arg Pro Leu Pro Gly Arg Lys Asn Ile Ile Leu Ser Ser Gln Pro Gly
LC  Pro     Lys     Arg Pro Leu Pro Glu Arg Thr Asn Val Val Leu Thr His Gln Glu Asp
SF IIGly    Lys     Leu Ser Leu Pro Tyr Arg His Ile Ile Val Leu Thr Thr Gln Lys Asp
SF I Gly    (Lys)   (Arg)Pro Leu (Pro)

    81  82  83  84  85  86  87  88  89  90  91  92  93  94  95  96  97  98  99 100

BL  Glu Pro Pro Lys Gly Ala His Phe Leu Ala Lys Ser Leu Asp Aps Ala Leu Glu Leu Ile
PL  Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ala Lys Ser Leu Asp Asp Ala Leu Lys Leu Thr
ML  Glu Pro Pro Arg Gly Ala His Phe Leu Ala Lys Ser Leu Asp Asp Ala Leu Arg Leu Ile
CL  Glu Ala Pro Lys Gly Ala His Tyr Leu Ser Lys Ser Leu Asp Asp Ala Leu Ala Leu Leu
NG  Tyr Cys Ala Ala Gly Ala     Glu Thr Val Ala Ser Leu Glu Val Ala Leu Ala Leu Cys
EC  Thr Asp     Asp Arg Val      Thr Trp Val Lys Ser Val Asp Glu Ala Ile Ala Ala Cys
LC  Tyr Gln Ala Gln     Gly Ala Val Val Val His Asp Val Ala Ala Val Phe Ala Tyr Ala
SF IIPhe Lys Val Glu Lys Asn Ala Glu Val Leu His Ser Ile Asp Glu Leu Leu Ala Tyr Ala
SF I

   101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120

BL  Glu Asp Pro Glu Leu Thr Asn Lys Val Asp Val Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val
PL  Glu Gln Pro Glu Leu Lys Asp Lys Val Asp Met Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val
ML  Glu Gln Pro Glu Leu Ala Ser Lys Val Asp Met Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val
CL  Asp Ser Pro Glu Leu Lys Ser Lys Val Asp Met Val Trp Ile Val Gly Gly Thr Ala Val
NG  Ala Gly Ala Glu Ala             Val     Ile Met         Gly Gly Ala     Gln Ile
EC  Gly Asp Val Pro                     Glu Ile Met Val Ile Gly Gly Gly     Arg Val
LC  Lys Gln His Leu Asp Gln             Glu     Leu Val Ile Ala Gly Gly Ala Gln Ile
SF IILys Asp Ile Pro Glu                Asp     Ile Tyr Val Ser Gly Gly Ser Arg Ile
SF I

   121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140

BL  Tyr Lys Glu Ala Met Asn Lys Pro Gly His Val Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln
PL  Tyr Lys Glu Ala Met Asn Lys Pro Gly His Ile Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Lys
ML  Tyr Glu Gln Ala Met Asn Glu Pro Gly His Leu Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln
CL  Tyr Lys Ala Ala Met Glu Lys Pro Ile Asn His Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Leu His
NG  Tyr Gly Gln Ala Met         Pro Leu Ala Thr Asp Leu Arg Ile Thr Glu Val Asp Leu
EC  Tyr Glu Gln Phe Leu Pro Lys             Ala Gln Lys Leu Tyr Leu Thr His Ile Asp Ala
LC  Phe Thr Ala Phe Lys Asp Asp     Val     Asp Thr Leu Leu Val Thr Arg Leu Ala Gly
SF IIPhe Gln Ala Leu Leu            Pro Glu Thr Lys Ile Ile Trp Arg Thr Leu Ile Asp Ala
SF I

   141 142 143 144 145 146 147 148     149 150 151 152 153 154             155

BL  Glu Phe Glu Ser Asp Ala Phe Phe     Pro Glu Ile Asp Phe Glu             Lys
PL  Glu Phe Glu Ser Asp Thr Phe Phe     Pro Glu Ile Asp Leu Glu             Lys
ML  Glu Phe Glu Ser Asp Thr Phe Phe     Pro Glu Ile Asp Leu Gly             Lys
CL  Glu Phe Glu Ser Asp Thr Phe Phe     Pro Glu Ile Asp Tyr Lys             Asp
NG  Ser Val Glu Gly Asp Ala Phe Phe     Pro Glu Ile Asp Arg Thr His Trp Arg Glu
EC  Gln Val Glu Gly Asp Thr His Phe     Pro Asp Tyr Glu Pro Asp Asp Trp Glu Ser
LC  Ser Phe Glu Gly Asp Thr Lys Met Ile Pro     Leu Asn Trp Asp Asp Phe Thr Lys
SF IIGlu Phe Glu Gly Asp Thr        Phe Ile Gly Glu Ile Asp Phe Thr Ser Phe Glu Leu
SF I

            156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172

BL          Tyr Lys Leu Leu Pro Glu Tyr Pro Gly Val Pro Leu Asp Val Gln Glu Glu
PL          Tyr Lys Leu Leu Ser Glu Cys Ser Gly Val Pro Ser Asp Val Gln Glu Glu
ML          Tyr Lys Leu Leu Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Glu Val Gln Glu Glu
CL          Phe Lys Leu Leu Thr Glu Tyr Pro Gly Val Pro Ala Asp Ile Gln Glu Glu
NG  Ala Glu     Arg:        Thr Glu                             Arg Arg Val Ser Ser
BC  Val Phe Ser Glu Phe His Asp Ala                             Asp Ala Gln Asn Ser
LC  Val Ser Ser Arg Thr Val Glu Asp                                 Thr Asn Pro Ala
SF IIVal Glu Glu His Glu Gly Ile                        Val Asn Gln Glu     Asn Gln Tyr
SF I                                                       (Met)Asp Glu Lys Asn Pro Tyr

   173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186

BL  Lys Gly Ile Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asn
PL  Lys Gly Ile Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asn
ML  Asp Gly Ile Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Lys Asp
CL  Asp Gly Ile Gln Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Gln Lys Ser Val Leu Ala Gln
NG  Lys Gly Val Ala Tyr Thr Phe Val His Tyr Leu Gly Lys
EC          His Ser Tyr Cys Phe Glu Ile Leu Glu Arg Arg
LC          Leu Thr His Thr Tyr Glu Val Trp Gln Lys Lys Ala
SF IIPro His Arg Phe Gln Lys Trp Gln Lys Met Ser Lys Val Val
SF I Ala His            Gln Phe Glu Thr Tyr Gln Arg Lys Arg Lys
```

การศึกษาเอ็นซัยม์จลนศาสตร์ของ dihydrofolate reductase ได้มีการศึกษาใน S. faecium (3,27) E. coli (8) การศึกษาเอ็นซัยม์จาก E. coli B (strain MP 1428)พบว่ามีความสามารถออกซิไดส์ NADPH ได้เร็วกว่า NADH ถึง 5.1 เท่า และไม่ทำหน้าที่รีดิวส์ folic acid มีการศึกษาเอ็นซัยม์ในเซลล์สัตว์ได้แก่ chicken liver (38) calf thymus (16)และจากเซลล์มะเร็ง Ehrlich ascite carcinoma (11) การศึกษาเอ็นซัยม์จลนศาสตร์ของเอ็นซัยม์จากแหล่งต่าง ๆ พบมีค่า Km ต่าง ๆ กันดังที่ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 2

สารห้ามเอ็นซัยม์โดยทั่ว ๆ ไปคือพวก organic mercurials ซึ่งจะมีผลต่อ sulfhydryl group ในโครงสร้างโปรตีนของเอ็นซัยม์ได้แก่ p-chloromercuribenzoate (PMB) มีรายงานว่าห้ามการทำงานของ dihydrofolate reductase ของ S. faecium (3) ทั้ง phenylmercuric acetate และ PMB พบว่าห้ามการทำงานของ isoenzyme I ของ S. faecium (26) แต่เอ็นซัยม์นี้ไม่ถูกห้ามด้วย methylmercuric bromide หรือ methylmercuric iodide ในขณะที่ isoenzyme II ไม่ถูกห้ามด้วยสาร mercurials ดังกล่าวทั้งหมด แต่จะถูกห้ามโดย urea (26)ซึ่งเป็นสารที่มีผลต่อ hydrogen bonding ของโครงสร้างโปรตีนในขณะที่ urea มีผลกระตุ้นเล็กน้อยต่อ dihydrofolate reductase isozyme I จาก L. casei (5)ผลของ organic mercurials ต่อ dihydrofolate reductase ของเซลล์สัตว์มีรายงานว่าไปกระตุ้น dihydrofolate reductase ของ Ehrlich ascite cells(12) และ murine L1210 lymphoma ของ mouse liver และ spleen (24) กระตุ้นเพียงเล็กน้อยต่อ guinea pig liver และ small intestine (25) ซึ่งป้องกันได้โดย EDTA ในขณะที่ไม่พบว่ากระตุ้นเอ็นซัยม์จากบักเตรี E. coli (29) ที่พบต่างออกไปคือ dihydrofolate reductase จาก bovine liver จะถูกห้ามด้วย PMB รวมทั้งสารพวก mercuric chloride และ ethylmercuribromide(21) สารพวกที่ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเสียรูปได้แก่ urea และ quanidine HCl มีรายงานว่าการกระตุ้น dihydrofolate reductase จากเซลล์สัตว์ได้แก่ Ehrlich ascites (12) murine L1210 lymphoma (13) chicken liver (39) mouse liver และ spleen (24) guinea pig liver และ small intestine (25) ส่วน methyl mercuribromideไม่กระตุ้นเอ็นซัยม์นี้ทั้งจาก mouse liver และ spleen (24) และ guinea pig liver

ตารางที่ 2 เอ็นซัยม์จลนศาสตร์ของ dihydrofolate reductase จากแหล่งต่าง ๆ

แหล่งของ Dihydrofolate reductase	ค่า Km ต่อ substrate			
	Folate	Dihydrofolate	NADPH	NADH
Proteus vulgaris		2.4×10^{-5}M (40)	2.8×10^{-5}M (40)	
Escherichia coli Strain MP 1428		0.44×10^{-6}M(8)	6.45×10^{-6}M(8)	320×10^{-6} M(8)
MTX-resistant				
Escherichia Strain M 48-34		2.6×10^{-5}M (40)	1.0×10^{-5}M (40)	
Streptococcus faecium R.		4.0×10^{-6}M (3)	4.6×10^{-5}M(3)	
Streptococcus faecium		7×10^{-6} M (27)	2×10^{-5} M (27)	
MTX-resistant				
Staphylococcus aureus strain 209		2.0×10^{-5} M (40)	1.8×10^{-5} M(40)	
Neisseria gonorrhoeae		2×10^{-6}M (58)	10×10^{-6} M(58)	
Chicken liver	4.4×10^{-6} M (17)	5.69×10^{-6}M(38)		
Ehrlich ascite carcinoma	7.4×10^{-6}M (11)	1.5×10^{-6} M(11)		
Murine L1210 lymphoma		1×10^{-6} M (13)	1.2×10^{-6} M(13)	
MTX-resistant		0.30×10^{-6}M(45)	1.36×10^{-6}M(45)	

และ small intestine (25)

สาร antifolates ได้แก่ 2,4-diaminopteridines และ 2,4-diaminopyrimidines มีเอ็นซัยม์เป้าหมายที่สำคัญคือ dihydrofolate reductase สารพวกนี้พบว่าห้ามอย่างแรงต่อเอ็นซัยม์นี้จากบัก เตรี (40) และเอ็นซัยม์จากเนื้อเยื่อของสัตว์ได้แก่ เอ็นซัยม์จาก chicken liver (38,41) mouse liver, kidney และ spleen (24,42) guinea pig liver และ small intestine (25) sheep liver (43) calf thymus (16) bovine liver (20,21) และเอ็นซัยม์จากเซลล์มะเร็งได้แก่ human leukemic leukocytes (44) Ehrlich ascite carcinoma (11) และ L1210 murine leukemia (13,45) การศึกษาการห้ามของ methotrexate (MTX หรือ amethopterin) ต่อเอ็นซัยม์จากตับหนูพบว่าการห้ามของ MTX เป็นแบบ stoichiometric (42) หมายถึงปฏิกิริยาการห้ามที่เกิดขึ้นโดยสารซึ่งสามารถจับได้แน่นมากกับเอ็นซัยม์ได้เป็น enzyme-inhibitor complex ซึ่งมีค่า dissociation constant น้อยมากและขณะที่สารละลายปฏิกิริยามีความเข้มข้นของเอ็นซัยม์อยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อเทียบกับปริมาณของสารห้ามซึ่งมีไม่มากพอที่จะทำให้เกิดการห้ามเอ็นซัยม์ได้ทั้งหมด โดยสารห้ามที่มีอยู่ในปฏิกิริยาจะอยู่ในรูปที่จับกับเอ็นซัยม์ทั้งหมด จากการศึกษาใน Ehrlich ascite cells (11) พบว่าการห้ามของ MTX เป็นแบบ stoichiometric โดยมี folate หรือ dihydrofolate เป็น substrate ที่ pH 5.9 และยังพบว่ามีการห้ามของ MTX จะจับกับเอ็นซัยม์ได้แน่นและห้ามได้แรงที่ pH 5.9 มากกว่าที่ pH 7.6 การห้ามของเอ็นซัยม์จะสามารถทำให้หายไปได้ เมื่อกำจัดสารห้ามคือ MTX ออกโดยวิธีการ dialysis ใน folic acid (42) เอ็นซัยม์ก็จะกลับทำงานได้ใหม่

การศึกษา dihydrofolate reductase ในเชื้อบัก เตรีที่ต้านยา antifolate พบว่าในเชื้อที่ต้านยาจะมีระดับของ dihydrofolate reductase เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อเดิมที่ไวต่อยา ปรากฏการณ์เช่นนี้พบในเชื้อบัก เตรีต้านยาหลายชนิดได้แก่ S. faecium ที่ต้านยา pyrimethamine, chlorguanide triazine, trimethoprim และ amethopterin (MTX) พบมีการเพิ่มระดับเอ็นซัยม์ทั้ง dihydrofolate reductase และ thymidylate synthetase เพิ่มเป็น 2-40 เท่า (46) ในเชื้อที่เป็น amethopterin-resistant strain ของ Diplococcus pneumoniae พบมีระดับของ dihydrofolate reductase สูงถึง 120 เท่าของเชื้อ wild type (7) เชื้อของ amethopterin-resistant

mutant ของ E. coli พบมีระดับของเอ็นซัยม์นี้อยู่สูงกว่าเชื้อที่ไวต่อยา (8) ปรากฏการณ์เช่นเดียวกันนี้พบได้เช่นกันใน เซลล์มะเร็งที่ต้านยาบางชนิดได้แก่ใน เซลล์ mouse sarcoma 180 ชนิดที่เป็น amethoptein-resistant sublines พบว่าระดับของ dihydrofolate reductase เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์เพิ่มการต้านยา (32,33) ใน เซลล์ของ mouse leukemia L1210 พบมีการเพิ่มระดับของ dihydrofolate reductase เมื่อเซลล์ต้านยา (34,35) ใน MTX-resistant subline ของ Ehrlich ascite carcinoma พบมีระดับเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase เพิ่มมากกว่าเป็น 14 เท่าของที่พบใน เซลล์เดิมที่ไวต่อยา (31)

เอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase ที่ศึกษาในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของสัตว์ทดลอง พบว่าอวัยวะที่มีเอ็นซัยม์สูงสุดในหนูตะเภา (guinea pig) คือในตับและไต ในขณะที่ตรวจพบเอ็นซัยม์นี้น้อยมากในไขกระดูก (bone marrow) ลำไส้เล็ก (small intestine) และม้าม (spleen) โดยวิธีวิเคราะห์เดียวกันนี้ไม่สามารถตรวจพบเอ็นซัยม์ในกล้ามเนื้อ (47) ใน เซลล์สมองของกระต่ายและของหนูขาว (rat) พบมีเอ็นซัยม์นี้อยู่ในระดับต่ำมากสามารถวิเคราะห์ได้โดยวิธี radiochemical assay พบมีประมาณ 15% ของที่พบในตับ (48,49) ใน เซลล์ leukocyte ตามปกติจะไม่สามารถตรวจพบ dihydrofolate reductase แต่สามารถตรวจพบเอ็นซัยม์นี้ได้ในคนไข้ acute leukemia (44) การศึกษาใน เซลล์เนื้องอกของสมองหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งโดยไวรัส avian sarcoma จะทำให้เซลล์มะเร็งของสมองมีระดับของ dihydrofolate reductase เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่าของเอ็นซัยม์ที่พบในตับหนู (50) ซึ่งตามปกติเอ็นซัยม์นี้ในสมองหนูพบมีระดับสูงในช่วงอายุ 19 วันที่เป็นตัวอ่อนอยู่ในครรภ์ และจะค่อย ๆ ลดลงจนกระทั่งคลอดและจนถึงวันที่ 20 หลังจากคลอดจะมีอยู่ในระดับต่ำสุด ปรากฏการณ์เช่นนี้สามารถพบได้เช่นเดียวกันเมื่อเหนี่ยวนำเชื้อบักเตรี E.coli B ด้วยไวรัส T-even phage หรือ T5 พบมีเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase เพิ่มขึ้น (29) การศึกษาใน เซลล์มะเร็งของสมองคนสามารถตรวจพบว่ามี dihydrofolate reductase (51) ทำให้เพิ่มความหวังของการใช้ยาต้านมะเร็ง MTX ในการรักษามะเร็งของสมองคนได้

การศึกษาในหนูตะเภาพบว่าหลังจากฉีดยาต้านมะเร็ง MTX ให้แก่สัตว์ทดลองแล้วสามารถตรวจพบยา MTX สะสมอยู่ในตับและไตได้นานอย่างน้อยถึง 14 วัน แต่ไม่สามารถตรวจพบยาโดยวิธีวิเคราะห์เดียวกันในไขกระดูก ลำไส้เล็กและม้ามแม้จะวิเคราะห์อยู่นานจน

ถึงวันที่ 14 หลังให้ยา MTX ก็ตาม (47) ทำให้คาดว่า dihydrofolate reductase ในตับหรือไตของหนูตะเภามีความไวต่อการห้ามของ MTX ได้มากกว่าเอ็นซัยม์จากลำไส้เล็กจึงทำให้การจับของยา MTX กับเอ็นซัยม์ในตับหรือไตจับได้แน่นกว่าและสะสมอยู่มากเป็นเวลานานในอวัยวะตับและไต แต่จากการศึกษาต่อมาพบว่าเอ็นซัยม์จากตับและลำไส้เล็กของหนูตะเภามีความไวพอ ๆ กันในการถูกห้ามด้วยยา MTX (25) โดยมีค่า 50% inhibition (I_{50}) เท่ากับ 3×10^{-5} M และ 2×10^{-5} M ตามลำดับ

ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจหาระดับของเอ็นซัยม์ dihydrofolate ruductase จากคนไข้โรคมะเร็งที่อวัยวะต่าง ๆ ที่พบมากในประเทศไทย ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางของการใช้ยาต้านมะเร็ง MTX ในการรักษามะเร็งของอวัยวะต่าง ๆ ให้มีประสิทธิภาพที่สุด ป้องกันการเสี่ยงใช้ยาที่ไม่ได้ผลและเพื่อหลีกเลี่ยงอาการพิษของยาที่อาจเกิดขึ้นแก่คนไข้มะเร็งด้วยการใช้ยาที่ไม่ได้ผลโดยไม่จำเป็น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัสดุและวิธีวิจัย

1. สารเคมี

Bromine water,Lithium sulfate, Phosphoric acid, Sodium molybdate, Sodium tungstate, Copper sulfate, Sodium carbonate, Potassium dihydrogen phosphate, dipotassium hydrogen phosphate, Hydrochloric acid, Sodium hydroxide, Potassium hydroxide, 2-Mercaptoethanol, สารทั้งหมดเป็นชนิด extra pure grade จากบริษัท E. Merck Darmstadt, Geramany.

Folic acid, Protamine sulfate grade X, Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) type I, Trizma base Sigma chemical Company, St. Louis, U.S.A.

Sodium dithionite, Potassium chloride, Ethylene diamine tetracetate (EDTA) ทั้งหมดเป็นชนิด laboratory reagent grade จากบริษัท May and Baker Ltd. Dagenham, England

Sodium acetate เป็นชนิด reagent grade จากบริษัท Hopkin and Williams

Methotrexate (MTX) เป็นชนิด laboratory chemical จาก Ben Venue Laboratories, Inc., Bedford, Ohio, U.S.A.

Sodium-potassium tartrate เป็นชนิด reagent grade จากบริษัท Fluka-Garantie, Buchs, Switzerland

2. เครื่องมือ

2.1 Spectrophotometer model UV. 240 ของบริษัท Shimadzu, Japan

2.2 Polytron Kinematica GmbH, Switzerland

2.3 Rifrigerated centrifuge, Hitach, Japan

3. น้ำยาทดลอง

3.1 0.1 M Potassium phosphate buffer pH 6.8 มี 0.1 mM EDTA

ละลาย EDTA 37.224 มก. ลงในสารละลายผสมของ 1 M KH_2PO_4 51 มล. และ 1 M K_2HPO_4 49 มล. ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร ปรับ pH 6.8 ด้วย 1 M KOH หรือ 1 M phosphoric acid

3.2 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.9

ละลาย sodium acetate 8.204 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร ปรับ pH 5.9 ด้วย 1 M acetic acid

3.3 3.6 M Potassium chloride

ละลาย potassium chloride 26.83 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 100 มล.

3.4 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.3

ละลาย Trizma base 6.055 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร ปรับ pH 7.3 ด้วย 0.1 MHCl

3.5 1 M 2-mercaptoethanol

เติม 2-mercaptoethanol 7 มล. ลงในน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 100 มล.

3.6 3 mM NADPH

ละลาย NADPH 3 มก. ในสารละลายแช่เย็น 4°ซ ของ 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.3 1มล. เตรียมใช้ภายใน 1วัน

032285

3.7 Dihydrofolate (DHF) substrate

สารละลาย dihydrofolate เตรียมจาก folic acid ตามวิธีของ Friedkin et al (52) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Futterman (53) วัดความเข้มข้นของสารละลาย dihydrofolate โดยใช้ค่า E. (340 nm) = 6,500 M^{-1} cm^{-1} (49)

3.8 Methotrexate (MTX) inhibitor

เตรียมสารละลาย MTX โดยละลาย 0.01363 กรัม MTX ใน 1-2 หยด 1 N NaOHเติมน้ำจนครบปริมาตร 100 มล. วัดความเข้มข้นของสารละลาย MTX โดยใช้ค่า E (257 nm) = 23,150 M^{-1} cm^{-1} (8)

4. วิธีวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่าง ตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติได้รับความกรุณาจากแผนกนิติเวช รพ. ตำรวจ เป็นเนื้อเยื่อที่ได้จากอวัยวะที่เหลือจากการชันสูตรศพผู้ตายทันทีด้วยอุบัติเหตุภายใน 1 ชั่วโมง โดยตัดเนื้อเยื่อเก็บแช่แข็งที่ -20°ซ ทันทีจนกว่าจะนำมาทดลอง

ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งได้รับความอนุเคราะห์จากแผนกศัลย์ศาสตร์ รพ. จุฬาลงกรณ์ และ รพ. ตำรวจ โดยเก็บเนื้อที่ตัดทิ้งจากคนไข้โรคมะเร็ง นำเนื้อเยื่อแช่แข็งที่ -20°ซ ทันทีที่ตัดออกจากร่างกายคนไข้ จนถึงเวลานำมาทดลอง

4.2 การเตรียมเอ็นซัยม์ นำเนื้อเยื่อที่ต้องการทดลองออกมาทิ้งไว้ในน้ำแข็งจนเนื้อเยื่ออ่อนตัวลงจึงนำมาชั่งน้ำหนักและบดละเอียดในสารละลาย 0.1 M potassium phosphate buffer pH 6.8 ที่มี 0.1 mM EDTA โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 2 เท่าของน้ำหนักเนื้อเยื่อ, บดเนื้อเยื่อให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง homogenizer (Polytron Kinematica GnbH, Switzerland) นาน 1 นาทีด้วยแรงหมุน 6,000 รอบ/นาทีโดยใช้ช่วงเวลาบดช่วงละ 30 วินาที ในภาชนะแช่น้ำแข็ง ตกตะกอนเนื้อเยื่อที่บดละเอียดแล้วใน refrigerated centrifuge ที่ 36,000 xg นาน 30 นาที นำสารละลายใสมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนกรดนิวคลีอิคและโปรตีนขนาดใหญ่ออกด้วย 2% protamine sulfate ปริมาตร 0.2 เท่า ของสารสกัด กวนให้เข้ากันเบา ๆ นาน 20 นาที เมื่อตกตะกอน

จนสมบูรณ์แล้วนำสารแขวนตะกอนไปปั่นเอาตะกอนออกใน refrigerated centrifuge ที่ 36,000 xg นาน 10 นาที นำสารละลายใสของสารสะกัดเอ็นซัยม์มาศึกษาคุณสมบัติของเอ็นซัยม์ ความเข้มข้นของโปรตีนที่สะกัดจากเนื้อเยื่อวิเคราะห์โดยวิธีของ Lowry et al (54)

4.3 วิธีทดสอบสมรรถนะของเอ็นซัยม์ (Enzyme Assay) ในสารละลายของปฏิกิริยาปริมาตร 3 มล. ประกอบด้วย 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.9, 0.6 M KCl, 33 µM dihydrofolate, 50 µM NADPH และเอ็นซัยม์ 200 µl เริ่มปฏิกิริยาด้วยการเติมเอ็นซัยม์ วัด enzyme activity โดยวัดการลดค่า absorbance ที่ 340 nm เมื่อ NADPH รีดิวซ์ dihydrofolate ได้เป็น tetrahydrofolate และ NADP (55) โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (Shimadzu, model UV 240) วัดปฏิกิริยาที่ 37^{o}ซ โดยใช้ค่า molar extinction coefficient 12,300 $M^{-1}cm^{-1}$ ที่ 340 nm ในการคำนวณ activity ของเอ็นซัยม์ (56) ค่า 1 Unit activity ของเอ็นซัยม์เท่ากับปริมาณเอ็นซัยม์ที่รีดิวซ์ 1 nmole สับสเตรท/ นาที ภายใต้สภาวะการวิเคราะห์มาตรฐานนี้

4.4 การวิเคราะห์โดย Methotrexate Titration (Methotrexate Titration Assay) การ titration ของ dihydrofolate reductase ด้วย methotrexate (MTX) ซึ่งเป็นสารห้ามเอ็นซัยม์ที่สามารถจับได้แน่นที่โมเลกุลของเอ็นซัยม์โดย 1 โมเลกุลของ MTX จะจับกับ 1 โมเลกุลของเอ็นซัยม์ทำให้สามารถวัดปริมาณความเข้มข้นของเอ็นซัยม์ที่สมมูลย์กับความเข้มข้นของ MTX (11,27) การวิเคราะห์ทำโดย tritrate เอ็นซัยม์ด้วย MTX ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2 x 10^{-12} M โดยในสารละลายปฏิกิริยา 3 มล. ประกอบด้วย 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.9), 0.6 M KCl 50 µM NADPH เอ็นซัยม์ 200 µl อุ่นสารละลายปฏิกิริยาที่มีเอ็นซัยม์กับ MTX ที่ 37^{o}ซ นาน 3 นาที แล้วจึงเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติม dihydrofolate ลงในสารละลายปฏิกิริยาจนได้ความเข้มข้น 33 µM dihydrofolate ค่าที่ลดลงของเอ็นซัยม์ activity เมื่อเพิ่ม MTX นำมาหาความเข้มข้นของเอ็นซัยม์ที่สมมูลย์กับ MTX เมื่อปฏิกิริยาถูกห้ามโดยสมบูรณ์ (27)

ผลการทดลอง

1. สมรรถนะของเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase ในเนื้อเยื่อมะเร็ง

การทดสอบสมรรถนะของเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase ในเนื้อเยื่อมะเร็งของคนชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ เนื้อเยื่อปกติชนิดเดียวกัน ในตารางที่ 3 แสดง activity ของ dihydrofolate reductase ของเนื้อเยื่อมะเร็งจากผนังทวาร (rectum) เปรียบเทียบกับ เนื้อเยื่อปกติ พบว่า เนื้อเยื่อมะเร็งของผนังทวารมี activity ของ dihydrofolate reductase ในขณะที่ เนื้อเยื่อผนังทวารปกติไม่สามารถตรวจพบ ตารางที่ 4 แสดง activity ของ dihydrofolate reductase จาก เนื้อเยื่อมะเร็งของลำไส้ใหญ่ (colon) พบว่ามี enzyme activity ตรวจพบได้ในขณะที่ เนื้อเยื่อลำไส้ใหญ่ปกติจำนวน 3 ตัวอย่าง ไม่สามารถตรวจพบเอ็นซัยม์ ตารางที่ 5 แสดง activity ของเอ็นซัยม์ที่ตรวจพบใน เนื้อเยื่อมะเร็งของกระเพาะ (stomach) เปรียบเทียบกับตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติ 7 ตัวอย่างไม่พบเอ็นซัยม์ใน 6 ตัวอย่าง ส่วนอีก 1 ตัวอย่างพบมี enzyme activity ซึ่งมีปริมาณที่ต่ำกว่าใน เนื้อเยื่อมะเร็ง ตารางที่ 6 แสดง activity ของ dihydrofolate reductase ใน เนื้อเยื่อมะเร็งของไต (kidney) ในขณะที่ เนื้อเยื่อปกติจำนวน 3 ตัวอย่างไม่สามารถตรวจพบ เอ็นซัยม์ ตารางที่ 7 แสดง activity ของ dihydrofolate reductase ในเนื้อเยื่อมะเร็งของปอด (lung) เปรียบเทียบ เนื้อเยื่อของปอดปกติ 3 ตัวอย่าง มี 1 ตัวอย่างที่พบว่ามี dihydrofolate reductase activity ในปริมาณที่ต่ำกว่า เนื้อเยื่อมะเร็งและอีก 2 ตัวอย่างตรวจไม่พบ เอ็นซัยม์ ตารางที่ 8 แสดง dihydrofolate reductase activity ใน เนื้อเยื่อมะเร็งของ เต้านม (breast) มี enzyme activity ตรวจพบได้ จากตัวอย่าง 6 ตัวอย่างในขณะที่ เนื้อเยื่อปกติ 2 ตัวอย่างไม่สามารถตรวจพบ activity ของ dihydrofolate reductase โดยวิธีการทดลองนี้

2. การหาปริมาณเอ็นซัยม์โดยวิธี methotrexate titration

สารละลายปฏิกิริยาของเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase กับ methotrexate ในความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน ดังที่กำหนดไว้ ผสมให้ทำปฏิกิริยานาน 3 นาที แล้วจึงเริ่ม

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบ dihydrofolate reductase activity ในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของผนังทวาร

ORGAN	DIAGNOSIS	Sample No.	Protein conc. (mg/ml)	DHFR ACTIVITY		
				Activity/ml (n mole/min/ml)	Specific Activity (n mole/min/mg protein)	Activity/g. tissue (n mole/min/g. tissue)
RECTUM	CA[a]	1	10.08	7.30	0.724	18.285
	CA	2	9.24	3.70	0.400	8.768
	CA	3	12.50	1.60	0.128	3.986
	N[b]	1	7.42	0	0	0
	N	2	7.04	0	0	0
	N	3	9.35	0	0	0
	N	4	11.00	0	0	0
	N	5	9.00	0	0	0
	N	6	11.00	0	0	0
	N	7	15.25	0	0	0

a CA = CARCINOMA

b N = NORMAL TISSUE

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบ dihydrofolate reductase activity ในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของลำไส้ใหญ่

ORGAN	DIAGNOSIS	Sample No.	Protein conc. (mg/ml)	DHFR ACTIVITY		
				Activity/ml (n mole/min/ml)	Specific Activity (n mole/min/mg protein)	Activity/g. tissue (n mole/min/g. tissue)
COLON	CA[a]	1	8.25	7.32	0.89	23.340
	N[b]	1	15.00	0	0	0
	N	2	9.25	0	0	0
	N	3	10.00	0	0	0

a CA = CARCINOMA

b N = NORMAL TISSUE

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบ dihydrofolate reductase activity ในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของกระเพาะ

ORGAN	DIAGNOSIS	Sample No.	Protein conc. (mg/ml)	DHFR ACTIVITY		
				Activity/ml (n mole/min/ml)	Specific Activity (n mole/min/mg protein)	Activity/g. tissue (n mole/min/g. tissue)
STOMACH	CA[a]	1	17.83	4.00	0.224	7.292
	CA	2	21.78	3.60	0.165	5.195
	N[b]	1	22.50	0	0	0
	N	2	22.50	0	0	0
	N	3	18.00	0	0	0
	N	4	23.51	0	0	0
	N	5	12.03	0	0	0
	N	6	9.56	0	0	0
	N	7	10.34	1.30	0.126	2.694

a CA = CARCINOMA

b N = NORMAL TISSUE

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบ dihydrofolate reductase activity ในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของไต

ORGAN	DIAGNOSIS	Sample No.	Protein conc. (mg/ml)	DHFR ACTIVITY		
				Activity/ml (n mole/min/ml)	Specific Activity (n mole/min/mg protein)	Activity/g. tissue (n mole/min/g. tissue)
KIDNEY	CA[a]	1	11.00	20.37	1.850	46.964
	N[b]	1	24.00	0	0	0
	N	2	30.00	0	0	0
	N	3	26.00	0	0	0

a CA = CARCINOMA

b. N = NORMAL TISSUE

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบ dihydrofolate reductase activity ในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของปอด

ORGAN	DIAGNOSIS	Sample No.	Protein conc. (mg/ml)	DHFR ACTIVITY		
				Activity/ml (n mole/min/ml)	Specific Activity (n mole/min/mg protein)	Activity/g. tissue (n mole/min/g. tissue)
LUNG	CA[a]	1	12.25	5.73	0.468	7.350
	N[b]	1	13.0	0	0	0
	N	2	12.25	0	0	0
	N	3	14.0	2.10	0.148	4.270

a CA = CARCINOMA

b N = NORMAL TISSUE

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบ dihydrofolate reductase activity ในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของเต้านม

ORGAN	DIAGNOSIS	Sample No.	Protein conc. (mg/ml)	DHFR ACTIVITY		
				Activity/ml (n mole/min/ml)	Specific Activity (n mole/min/mg protein)	Activity/g. tissue (n mole/min/g. tissue)
BREAST	CA[a]	1	11.00	5.73	0.521	9.508
	TUMOR	2	10.50	6.95	0.662	8.980
	CA	3	9.00	3.66	0.407	7.978
	CA	4	10.00	2.80	0.280	6.689
	CA	5	7.25	3.05	0.421	6.395
	CA	6	13.50	3.48	0.257	6.179
	N[b]	1	17.50	0	0	0
	N	2	13.00	0	0	0

a CA = CARCINOMA

b N = NORMAL TISSUE

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

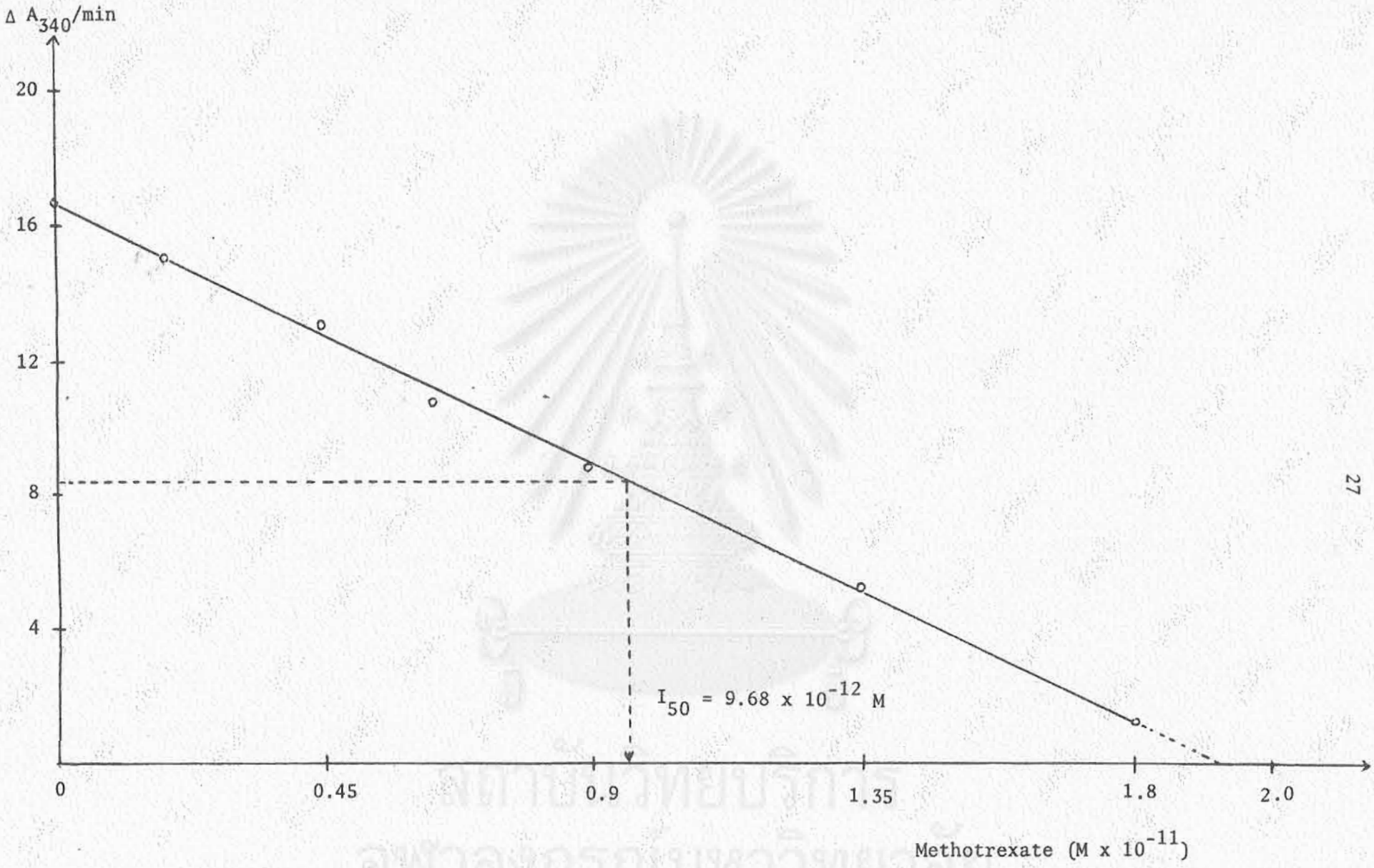
ปฏิกิริยาการทำงานของ เอ็นซัยม์โดย เติม substrate คือ dihydrofolate และวัดปฏิกิริยา ที่ได้จากการทดลองพบว่า การห้ามของ methotrexate ต่อ เอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase ที่ เกิดขึ้น เป็นแบบ stoichiometric inhibition (42) โดย 1 โมเลกุล ของ เอ็นซัยม์มี 1 binding site ของ methotrexate เมื่อ เขียนกราฟระหว่าง activity กับความ เข้มข้นของ inhibitor คือ methotrexate จะได้กราฟ เส้นตรงดังที่ได้แสดงไว้ใน รูปที่ 2 แสดงการห้ามของ methotrexate ต่อ dihydrofolate reductase จาก เนื้อ เยื่อ มะ เร็งของไต ใช้ความ เข้มข้นสูงสุดที่ห้าม เอ็นซัยม์ เท่ากับ 1.935×10^{-11} M เป็นความ เข้มข้นคงที่มาให้ทำปฏิกิริยาโดย เพิ่มความ เข้มข้นของ เอ็นซัยม์ขึ้น เรื่อย ๆ ดังที่กำหนดไว้ นำ activity ของ เอ็นซัยม์ทที่ เพิ่มขึ้นมา เขียนกราฟต่อความ เข้มข้นของ เอ็นซัยม์ที่ เพิ่มขึ้นจะได้กราฟ เส้นตรงดัง ที่แสดงไว้ในรูปที่ 3 จุดตัดบนแกนนอนมีค่า เท่ากับ 106.7 µl ของ เอ็นซัยม์ที่สมมูลย์กับ MTX 1.935×10^{-11} M เมื่อนำมาคำนวณพบว่ามีปริมาณ เอ็นซัยม์ เท่ากับ 5.09×10^{-14} mole/mg protein หรือ เท่ากับ 1.29×10^{-12} mole/g tissue

จากรูปที่ 4 แสดงกราฟ methotrexate titration ของ เอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase จาก เนื้อ เยื่อมะ เร็งของกระ เพาะ แสดงการห้าม เอ็นซัยม์ เป็นแบบ stoichiometric inhibition ได้กราฟ เส้นตรง ใช้ความ เข้มข้นของ methotrexate เท่ากับ 12.0×10^{-12} M เป็นความ เข้มข้นคงที่มาทำปฏิกิริยากับ เอ็นซัยม์ที่ เพิ่มความ เข้มข้นขึ้น เรื่อย ๆ นำค่า activity ที่ เพิ่มขึ้นมา เขียนกราฟกับค่าความ เข้มข้นของ เอ็นซัยม์ที่ เพิ่มขึ้น พบว่าได้กราฟ เส้นตรงดังที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 5 ที่จุดตัดบนแกนนอน เท่ากับ 160 µl เป็นปริมาณของ เอ็นซัยม์ ที่สมมูลย์กับ 12.0×10^{-12} M methotrexate เมื่อคำนวณปริมาณของ เอ็นซัยม์จาก เนื้อ เยื่อ มะ เร็งของกระ เพาะจะได้ เท่ากับ 1.07×10^{-14} mole/mg proteinหรือ เท่ากับ 3.34×10^{-13} mole/g tissue

จากการทดลองโดย เปรียบ เทียบ dihydrofolate reductase จากตับหนู พบว่า การห้ามของ methotrexate ต่อ dihydrofolate เป็นแบบ stoichiometric inhibition เช่น เดียวกัน เมื่อ เขียนกราฟระหว่าง activity กับความ เข้มข้นของ methotrexate จะได้ กราฟ เส้นตรงในช่วงความ เข้มข้นต่ำ ๆ ของ methotrexate ซึ่ง inhibitor ทั้งหมดจับ อยู่กับ เอ็นซัยม์ ดังได้แสดงไว้ในรูปที่ 6 ค่าความ เข้มข้นสูงสุดของ methotrexate 6.65×10^{-10} M ใช้ เป็นความ เข้มข้นคงที่ของ inhibitor มาทำปฏิกิริยาโดย เพิ่มความ

รูปที่ 2 การห้ามของ dihydrofolate reductase จาก เนื้อเยื่อมะ เร็งของไต เมื่อ เพิ่มความ เข้มข้นของ methotrexate เอ็นซัยม์ (4 units) titrate กับ methotrexate ที่ เพิ่มความ เข้มข้นขึ้นตามลำดับ

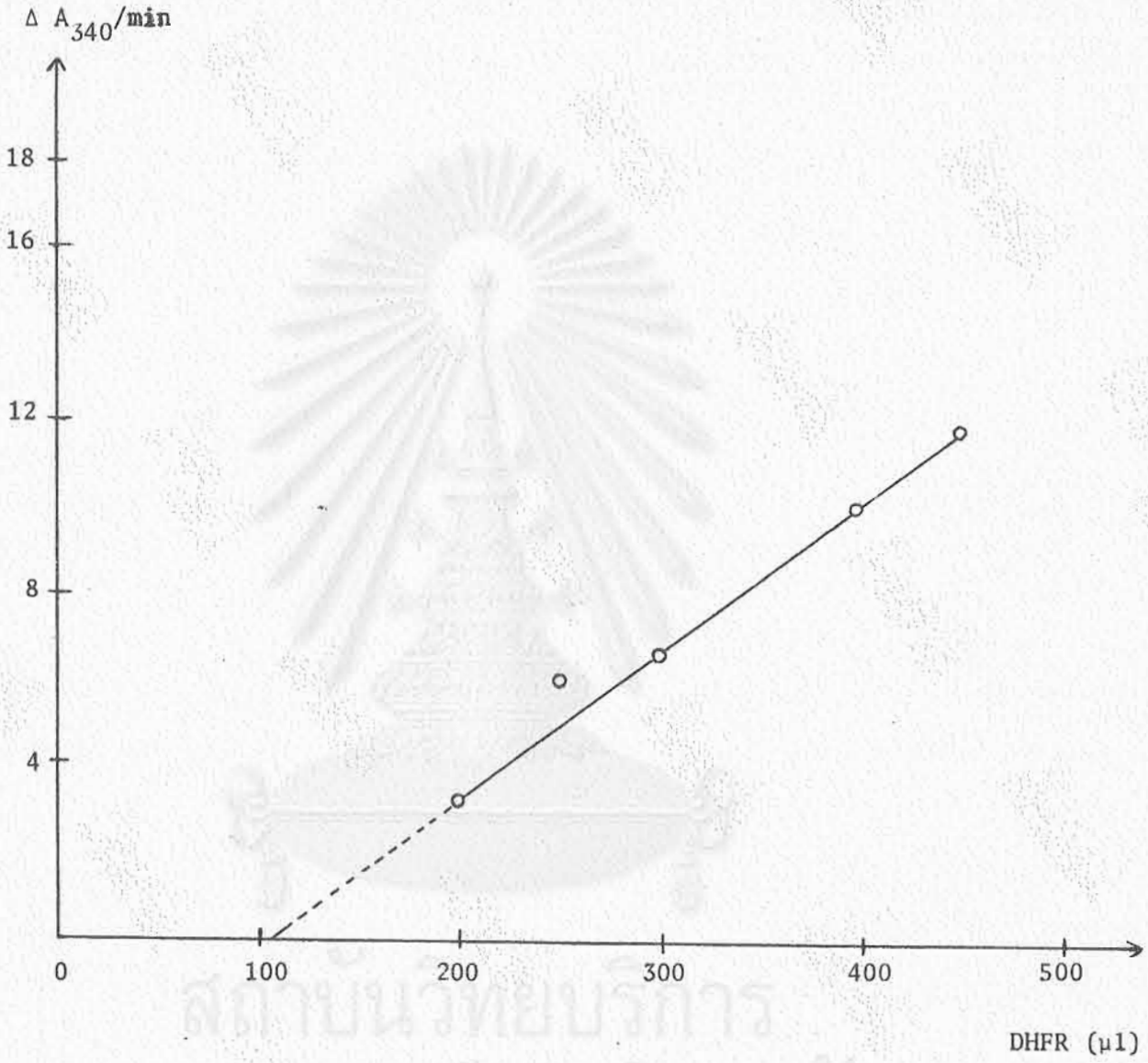
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


Δ A340/min
20
16
12
8
4
0
0.45
0.9
1.35
1.8
2.0
I50 = 9.68 x 10-12 M
Methotrexate (M x 10-11)

รูปที่ 2

รูปที่ 3 ผลของ methotrexate 1.935×10^{-11} M ต่อ activity ของ dihydrofolate reductase (ไต) ที่จุดตัดบนแกนนอน เท่ากับปริมาณของ เอ็นซัยม์ 106.7 µl (activity 20.37 nmole/min/ml) ซึ่งสมมูลย์กับ methotrexate

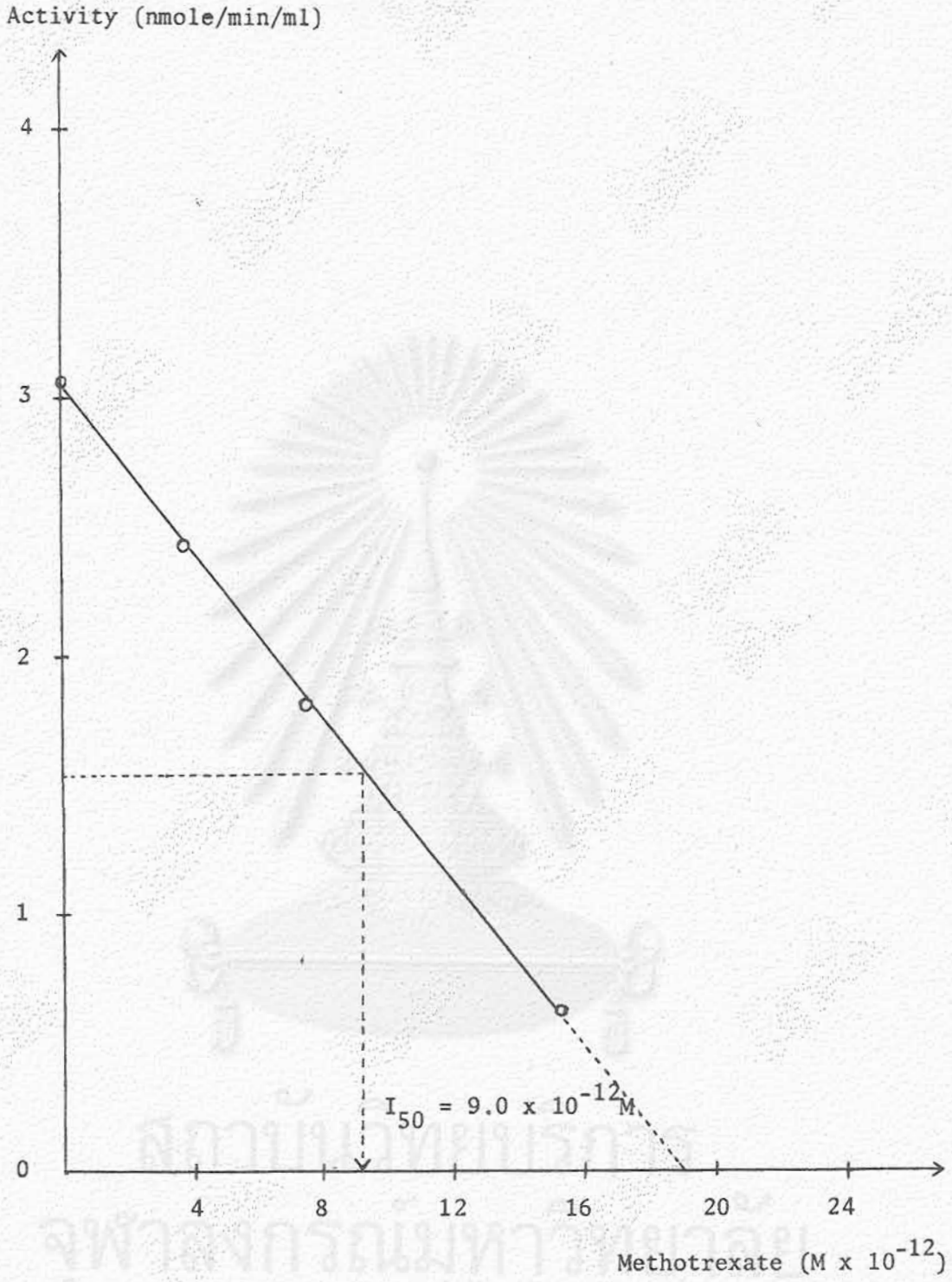
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



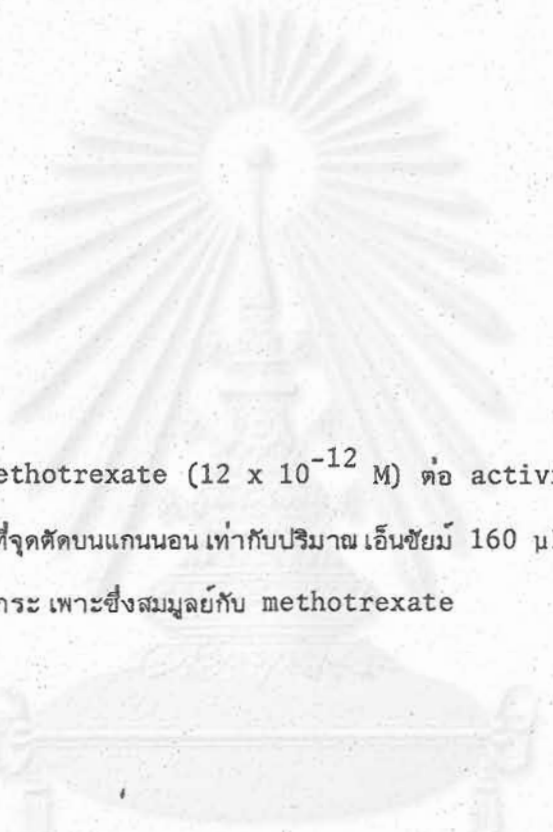
รูปที่ 3

รูปที่ 4 การห้ามของ dihydrofolate reductase จาก เนื้อ เยื่อมะ เร็งของกระ เพาะ เมื่อ เพิ่มความ เข้มข้นของ methotrexate เอ็นซัยม์ (0.72 unit) titrate กับ methotrexate ในความ เข้มข้น เพิ่มขึ้นตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

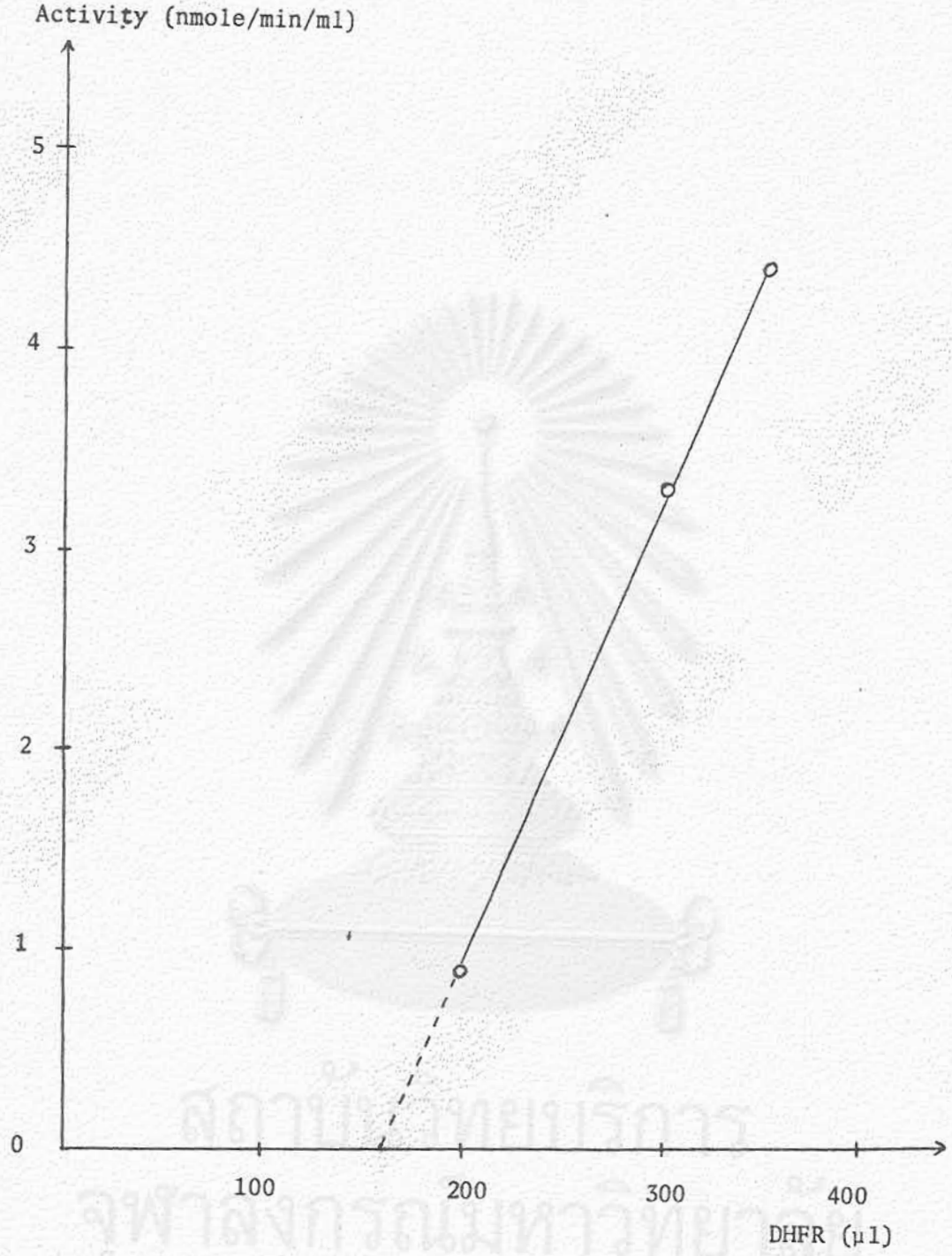

Activity (nmole/min/ml)
4
3
2
1
0
I_{50} = 9.0 x 10^{-12} M.
4
8
12
16
20
24
Methotrexate (M x 10^{-12})

รูปที่ 4



รูปที่ 5 ผลของ methotrexate (12×10^{-12} M) ต่อ activity ของ dihydrofolate reductase ที่จุดตัดบนแกนนอน เท่ากับปริมาณเอ็นซัยม์ 160 µl (activity 3.6 nmole/min/ml) จากกระเพาะซึ่งสมมูลย์กับ methotrexate

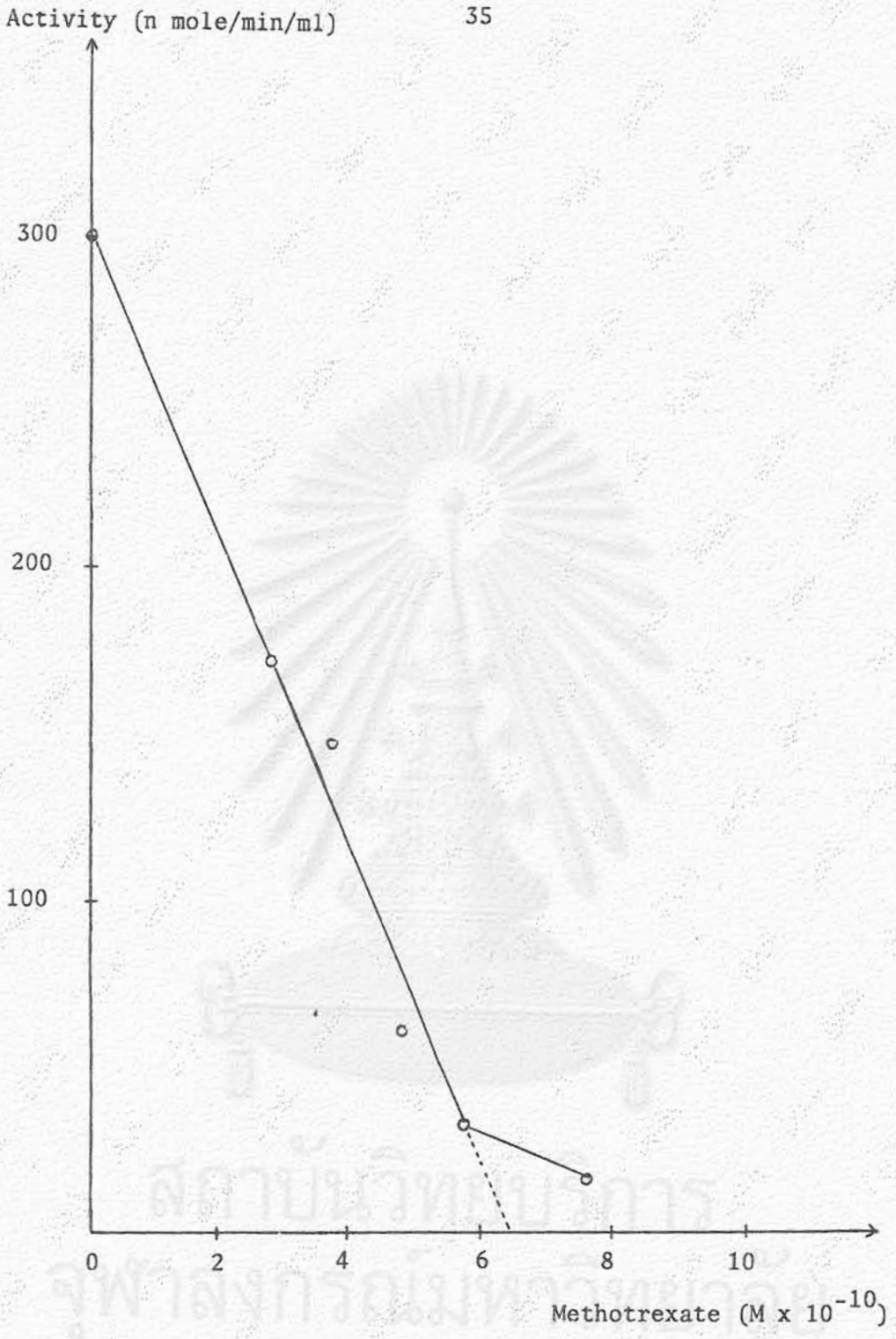
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5

รูปที่ 6 การห้าม dihydrofolate reductase จากเนื้อเยื่อตับหนู เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ methotrexate เอ็นซัยม์ (8.28 units) titrate กับ methotrexate ในความเข้มข้น เพิ่มขึ้นตามลำดับ

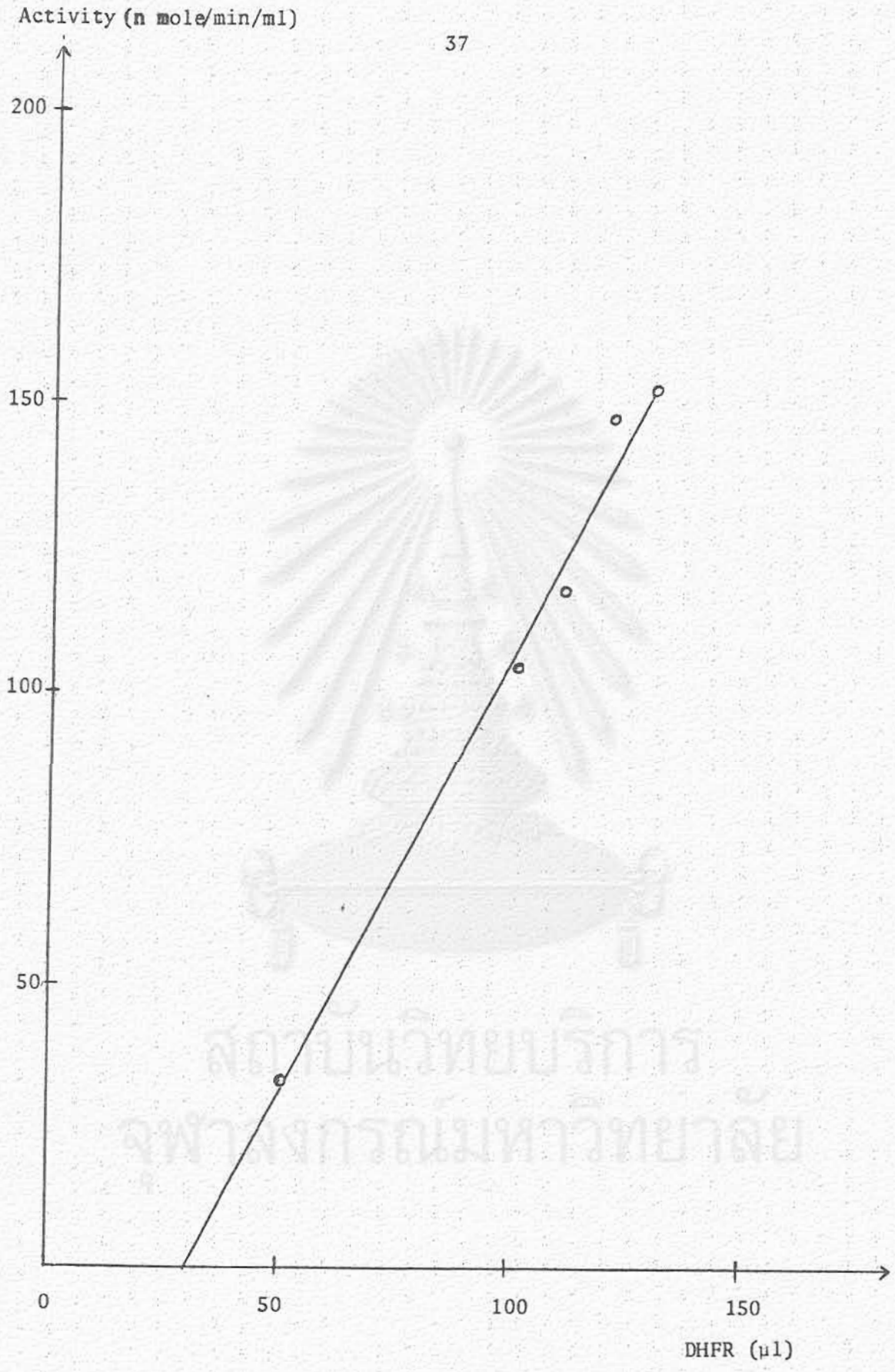
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


Activity (n mole/min/ml)
300
200
100
0
2
4
6
8
10
Methotrexate (M x 10^{-10})

รูปที่ 6

รูปที่ 7 ผลของ methotrexate (6.65×10^{-10} M) ต่อ activity ของ dihydrofolate reductase ที่จุดตัดบนแกนนอน เท่ากับปริมาณของ เอ็นซัยม์ 27.5 µl (activity 301 nmole/min/ml) จากตับหนูซึ่งสมมูลย์กับ methotrexate

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7

เข้มข้นของเอ็นซัยม์ขึ้นเรื่อย ๆ กราฟที่เขียนระหว่างค่า activity กับความเข้มข้นของเอ็นซัยม์ แสดงไว้ในรูปที่ 7 ซึ่งได้กราฟเส้นตรงมีจุดตัดบนแกนนอนที่ปริมาณเอ็นซัยม์เท่ากับ 27.5 µl สมมูลย์กับ 6.65×10^{-10} M methotrexate เมื่อคำนวณปริมาณเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase จากตับหนูจะได้เท่ากับ 9.10×10^{-13} mole/mg protein หรือเท่ากับ 1.06×10^{-10} mole/g tissue

การหาปริมาณและ activity ของเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase ของเนื้อเยื่อมะเร็งของไตและกระเพาะโดยวิธี MTX titration และวิธี spectrophotometry ตามลำดับ แสดงไว้ในตารางที่ 9

3. การศึกษา methotrexate inhibition ของ dihydrofolate reductase จากเนื้อเยื่อมะเร็งของไตและกระเพาะคน

การห้ามของสารต้านเอ็นซัยม์ methotrexate ซึ่งสามารถจับได้แน่นกับโมเลกุลของเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase พบว่าเกิดขึ้นในแบบที่เรียกว่า stoichiometric inhibition เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ methotrexate จะได้ค่า activity ของเอ็นซัยม์ลดลง สามารถเขียนกราฟระหว่าง activity ของเอ็นซัยม์กับความเข้มข้นของ methotrexate ที่เพิ่มขึ้นได้กราฟเส้นตรงดังแสดงไว้ในรูปที่ 2,4 และ 8 ซึ่งเป็นการห้ามของ methotrexate ต่อเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase จากเนื้อเยื่อมะเร็งของไต มะเร็งของกระเพาะ และเนื้อเยื่อตับหนู ตามลำดับ ความเข้มข้นของ methotrexate ที่สามารถห้าม 50% ของ activity ของเอ็นซัยม์ (I_{50}) มีค่าเท่ากับ 9.68×10^{-12} M เมื่อใช้เอ็นซัยม์จากเนื้อเยื่อมะเร็งของไต 4 units I_{50} มีค่าเท่ากับ 9.00×10^{-12} M เมื่อใช้เอ็นซัยม์จากเนื้อเยื่อมะเร็งของกระเพาะ 0.72 unit และมีค่าเท่ากับ 7.13×10^{-10} M เมื่อใช้เอ็นซัยม์จากตับหนู 4 units ตามลำดับ

ค่า I_{50} ของ methotrexate ที่ห้ามเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase จากเนื้อเยื่อมะเร็งของไตและมะเร็งของกระเพาะคน เปรียบเทียบกับเอ็นซัยม์จากเนื้อเยื่อตับหนูได้แสดงไว้ในตารางที่ 10

ตารางที่ 9 ปริมาณและ activity ของ dihydrofolate reductase ในเนื้อเยื่อมะเร็งและในตับหนู

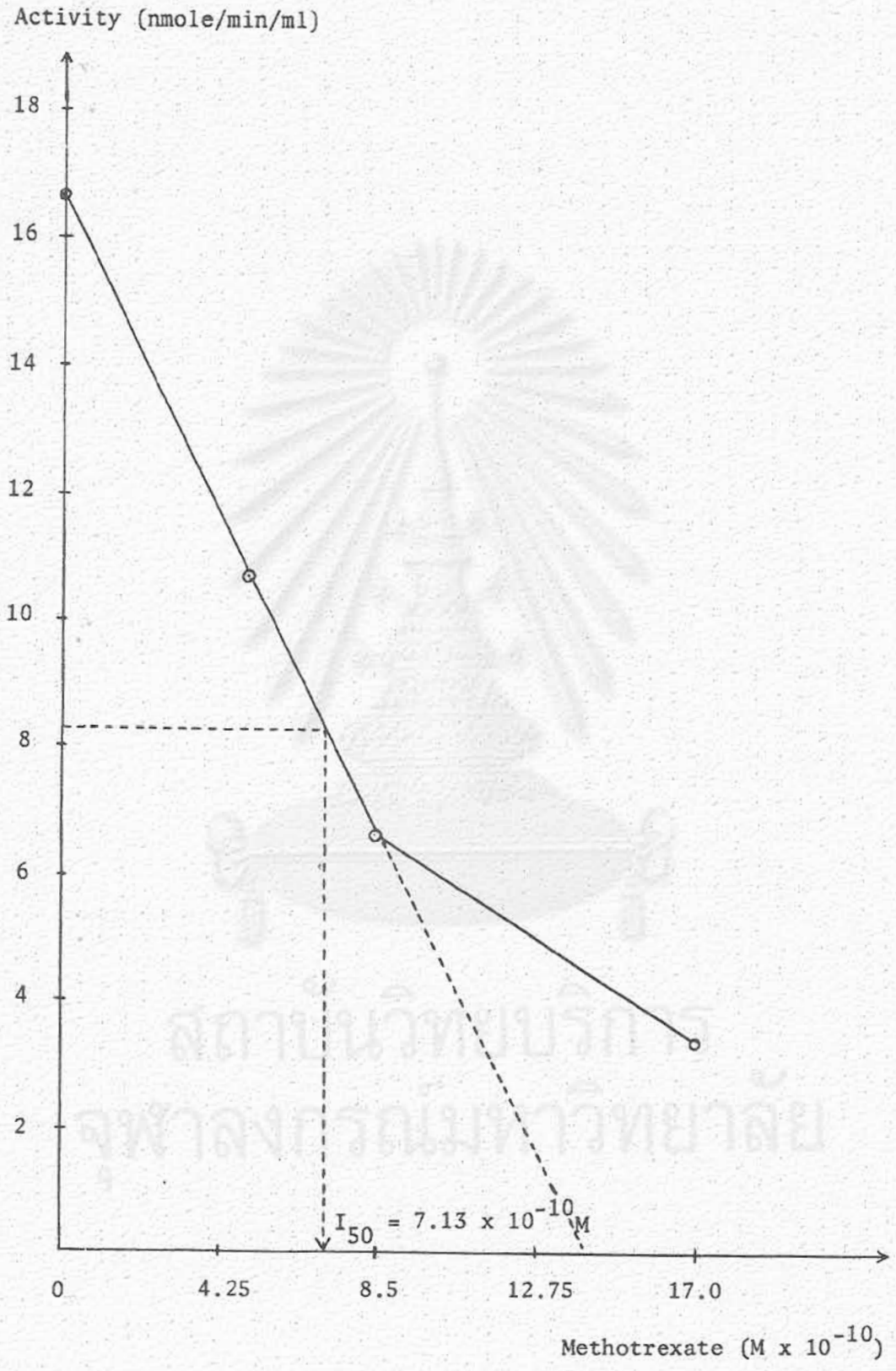
TISSUE	Dihydrofolate Reductase				
	MTX titration assay		Spectrophotometric assay		Turnover number mole/min/ mole of enzyme
	mole/g. tissue	mole/ mg. protein	mole/min/ g. tissue	mole/min/ mg protein	
Kidney (CA)	1.29×10^{-12}	5.09×10^{-14}	4.70×10^{-8}	1.85×10^{-9}	36,345
Stomach (CA)	3.34×10^{-13}	1.07×10^{-14}	5.19×10^{-9}	1.65×10^{-10}	15,421
Rat liver	1.06×10^{-10}	9.10×10^{-13}	5.48×10^{-7}	4.69×10^{-9}	5,154

CA = CARCINOMA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 การห้ามของ dihydrofolate reductase จากเนื้อเยื่อตับหนู เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ methotrexate เอ็นซัยม์ (4 units) titrate กับ methotrexate ในความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ activity ของเอ็นซัยม์ลดลง 50% (I_{50}) ที่ความเข้มข้นของ methotrexate เท่ากับ 7.13×10^{-10} M

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


Activity (nmole/min/ml)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
4.25
8.5
12.75
17.0
I_{50} = 7.13 x 10^{-10} M
Methotrexate (M x 10^{-10})

รูปที่ 8

ตารางที่ 10 เปรียบ เทียบความ เข้มข้นของ methotrexate ที่ห้าม 50% ของ เอ็นซัยม์ ไดฮัยโดรโฟเลทรีดัก เทสใน เนื้อ เยื่อมะ เร็งและในตับหนู

TISSUE	MTX required for 50% inhibition (I_{50})
Kidney (CA)	9.68×10^{-12} M[1]
Stomach (CA)	9.00×10^{-12} M[2]
Rat liver	7.13×10^{-10} M[1]

CA = CARCINOMA

1 ใช้ เอ็นซัยม์ 4 units

2 ใช้ เอ็นซัยม์ 0.7 unit

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การศึกษาค่า Turnover number ของ dihydrofolate reductase จากเนื้อเยื่อมะเร็งของไตและกระเพาะคน

Turnover number เป็นค่าที่แสดงถึงสมรรถนะของเอ็นซัยม์ที่สามารถเปลี่ยนจำนวน mole ของ substrate คือ dihydrofolate ให้เป็น product คือ tetrahydrofolate ในเวลา 1 นาที ด้วยเอ็นซัยม์ 1 mole จากการทดลองหาค่า turnover number พบว่าเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase จากเนื้อเยื่อมะเร็งของไตและมะเร็งของกระเพาะมีค่าเท่ากับ 36,345 และ 15,421 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเอ็นซัยม์จากเนื้อเยื่อตับหนูซึ่งมีค่าเท่ากับ 5,154 ดังได้แสดงไว้ในตารางที่ 9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิจารณ์และสรุป

สมรรถนะของ dihydrofolate reductase ใน เนื้อเยื่อมะ เร็ง

การศึกษา เอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase ใน เนื้อเยื่อมะ เร็งของอวัยวะทาง เดินอาหารได้แก่ ผนังทวาร (ตารางที่ 3) ลำไส้ใหญ่ (ตารางที่ 4) และกระ เพาะอาหาร (ตารางที่ 5) พบว่า เนื้อเยื่อมะ เร็ง เหล่านั้นมี เอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase อยู่ ในระดับต่าง ๆ กัน ในขณะที่ใน เนื้อเยื่อปกติไม่สามารถตรวจพบ activity ของ เอ็นซัยม์ ด้วยวิธีการวิ เคราะห์ที่ใช้นี้ นอกจากใน เนื้อเยื่อปกติของกระ เพาะอาหาร 1 ตัวอย่างที่พบมี เอ็นซัยม์อยู่ในระดับที่สามารถตรวจพบได้แต่ก็มีระดับที่ต่ำกว่าที่พบใน เนื้อเยื่อมะ เร็งของกระ เพาะ เนื่องจาก เนื้อ เยื่อปกติที่นำมาทดลองนั้นได้จากผู้ตายอุบัติ เหตุซึ่งไม่ได้มีการพิสูจน์ทางพยาธิสภาพ ของผู้ตายว่า เจ็บป่วย เป็นโรคหรือมีความผิดปกติของกระ เพาะอาหารหรือไม่ อันอาจ เป็นสา เหตุ ให้มี เอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase สูงขึ้นจนตรวจพบได้ แต่อย่างไรก็ดีระดับของ เอ็นซัยม์ของ เนื้อ เยื่อปกติที่ตรวจพบก็ยังมีระดับต่ำกว่าที่พบใน เนื้อเยื่อมะ เร็งของกระ เพาะประมาณ 2 เท่า เมื่อ เทียบ activity ของ เอ็นซัยม์ต่อกรัม เนื้อ เยื่อ activity ของ dihydrofolate reductase ที่พบใน เนื้อ เยื่อมะ เร็งของทาง เดินอาหารมีระดับแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจขึ้นกับระยะ ของการ เกิดโรค จากการศึกษาของ Duch et al (50) พบว่าการทำให้ เกิดมะ เร็งของ เนื้อ เยื่อสมองหนูโดย เหนี่ยวนำด้วย Avain sarcoma virus (ASV) จะมีระดับของ dihydrofolate reductase activity เพิ่มขึ้น เมื่อมีการ เติบโตของมะ เร็ง เพิ่มมากขึ้น

การศึกษา activity ของ เอ็นซัยม์นี้จาก เนื้อเยื่อมะ เร็งของอวัยวะอื่น ๆ ได้แก่ ไต (ตารางที่ 6) ปอด (ตารางที่ 7) และ เต้านม (ตารางที่ 8) พบว่า เนื้อ เยื่อมะ เร็งทุกชนิด มี activity ของ เอ็นซัยม์อยู่ในระดับสูงสามารถตรวจพบได้ใน เนื้อ เยื่อมะ เร็งของ เต้านม 6 ตัวอย่าง พบมี เอ็นซัยม์อยู่ในระดับสูงใกล้ เคียงกันอยู่ในช่วง 6-9 nmole/min/g tissue ใน ขณะที่ใน เนื้อ เยื่อปกติไม่สามารถตรวจพบ ใน เนื้อ เยื่อมะ เร็งของปอด 1 ตัวอย่างพบมี เอ็นซัยม์อยู่

ในระดับ เดียวกับที่พบใน เนื้อ เยื่อมะ เร็ง เต้านม ใน เนื้อ เยื่อปอดปกติ 1 ตัวอย่างพบมี เอ็นซัยม์อยู่ ในระดับที่ตรวจพบได้แต่อย่างไรก็ดี พบมี เอ็นซัยม์น้อยกว่าที่พบใน เนื้อ เยื่อมะ เร็งประมาณ 2 เท่า ใน เนื้อ เยื่อมะ เร็งของไตตรวจพบ activity ของ dihydrofolate reductase มีอยู่ใน ระดับสูงที่สุด (ตารางที่ 6) เมื่อ เทียบกับระดับของ เอ็นซัยม์ใน เนื้อ เยื่อมะ เร็งอื่น ๆ ที่ศึกษาทั้ง หมดในขณะที่ เนื้อง เยื่อปกติ 3 ตัวอย่างตรวจไม่พบ เอ็นซัยม์ เลย

ได้ เคยมีรายงานมานานแล้วว่าในคนไข้ acute leukemia และคนไข้ chronic myelogenous leukemia พบว่าใน เซลล์ เม็ด เลือดขาวมี เอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase อยู่ในระดับที่ตรวจพบได้ ในขณะที่ตรวจไม่พบ เอ็นซัยม์ใน เซลล์ chronic lymphatic leukemia หรือ เซลล์ เม็ด เลือดขาวปกติ (44)

จากการศึกษาของ Abelson et al (51) ได้รายงานการวิ เคราะห์จาก 1 ตัวอย่าง ของ เนื้อ เยื่อมะ เร็ง เต้านม (breast adenocarcinoma) พบมี activity ของ เอ็นซัยม์ อยู่ 3.5 x 10^{-14} mole/min/mg protein จะ เห็นได้ว่า specific activity ของ เอ็นซัยม์ จากมะ เร็ง เต้านมในการศึกษาครั้งนี้มีค่าสูงกว่า ทั้งนี้อาจ เนื่องจากวิธีการทำ เอ็นซัยม์ให้ บริสุทธิ์ขั้นหนึ่งนั้นต่างกันโดยการทดลองที่กล่าวถึงนั้นใช้ ammonium sulfate ในการทำ เอ็นซัยม์ ให้บริสุทธิ์ การศึกษา เนื้อ เยื่อมะ เร็งของสมองของคนพบมี activity ของ เอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase ในปริมาณสูง (50,51) ในขณะที่แทบจะไม่พบ เอ็นซัยม์นี้ เลยใน เนื้อ เยื่อ สมองปกติของสัตว์โต เต็มที่แล้ว (58,59) นอกจากนี้ใน เซลล์มะ เร็งของคนหลายชนิดที่ เพาะ เลี้ยง และ เซลล์มะ เร็งที่ เหนี่ยวนำโดย เชื้อไวรัสหลายชนิดก็พบมีระดับของ dihydrofolate reductase สูง (50) การ เพิ่มสมรรถนะของ เอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase ใน เซลล์ มะ เร็งอาจ เป็นผล เนื่องจากการ เพิ่ม activity ของ เซลล์อย่างรวด เร็วในการสร้างกรดนิวคลีอิค และโปรตีน (60,61) จากการศึกษานี้จะ เห็นได้ว่า เนื้อ เยื่อที่ เป็นมะ เร็งทุกชนิดที่นำมาศึกษาพบมี activity ของ เอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase สูงกว่าที่พบใน เนื้อ เยื่อของ เซลล์ปกติ

ผลของ methotrexate ต่อ dihydrofolate reductase

สารต้าน เอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase ตัวหนึ่งคือ methotrexate ได้ถูก นำมาใช้อย่างกว้างขวางในปัจจุบันในการรักษาโรคมะ เร็งหลายชนิดรวมทั้งมะ เร็ง เต้านมและ

มะเร็งของเม็ดเลือดขาว (62-64) methotrexate พบว่าสามารถห้ามการทำงานของเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase โดยยาจะไปจับกับเอ็นซัยม์ได้อย่างแน่นมาก เมื่อจับกันแล้วจะมีอัตราการแยกออกน้อยมาก (42) มีการจับของหนึ่งโมเลกุลของ methotrexate กับหนึ่งโมเลกุลของเอ็นซัยม์ การห้ามของยา methotrexate ต่อเอ็นซัยม์เป็นแบบที่เรียกว่า stoichiometric inhibition (42) จากปรากฏการณ์เช่นนี้ทำให้สามารถใช้ยา methotrexate มาทำการ titrate หาปริมาณของเอ็นซัยม์ใน tissue extracts ได้ (11) จากการศึกษานี้ได้ใช้วิธี methotrexate titration วัดหาปริมาณของเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase ในเนื้อเยื่อมะเร็งของอวัยวะไตและกระเพาะ พบว่ามีปริมาณเอ็นซัยม์เท่ากับ 1.29×10^{-12} mole/g. tissue หรือ 5.09×10^{-14} mole/mg. proteinและ 3.34×10^{-13} mole/g. tissue หรือ 1.07×10^{-14} mole/mg. protein ตามลำดับ การทดลอง titrate โดยเพิ่มความเข้มข้นของ MTX พบว่า activity ของเอ็นซัยม์จะลดลงโดยมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (รูปที่ 2 และ 4) ใช้ความเข้มข้นของ MTX เท่ากับ 1.935×10^{-11} M และ 12.0×10^{-12} M มา titrate กับการเพิ่มปริมาณเอ็นซัยม์จากเนื้อเยื่อมะเร็งของไตและกระเพาะตามลำดับ เพื่อหาความเข้มข้นของเอ็นซัยม์ที่สมมูลย์พอดีกับความเข้มข้นของ MTX ที่ใช้ (รูปที่ 3 และ 5) จากการทดลองที่ได้พบว่าปริมาณของเอ็นซัยม์ในเนื้อเยื่อมะเร็งของอวัยวะทั้งสองมีค่าที่ต่างกัน ทั้งนี้อาจขึ้นกับระยะของการเกิดโรคซึ่งควรจะได้มีการศึกษาต่อไป การศึกษาในอวัยวะตับหนูซึ่งเป็นอวัยวะที่มีการสร้างกรดนิวคลีอิคและโปรตีนตลอดเวลาพบว่ามีเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase อยู่ในระดับสูงเช่นกัน (รูปที่ 6,7 และตารางที่ 9) จากการศึกษาของ Abelson et al (5) จากเนื้อเยื่อมะเร็งของสมอง พบว่าการจับของ MTX กับเอ็นซัยม์มีค่าอยู่ในช่วง 10^{-14}-10^{-13} mole MTX/mg protein ซึ่งจะเห็นได้ว่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการศึกษานี้ในมะเร็งของอวัยวะไตและกระเพาะ (ตารางที่ 9) และจากตารางนี้จะเห็นได้ว่าหนึ่งมิลลิกรัมของโปรตีนของสารละลายเอ็นซัยม์จากเนื้อเยื่อมะเร็งของไตและกระเพาะที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วย protamine sulfate จะมีปริมาณของเอ็นซัยม์อยู่ในจำนวนใกล้เคียงกัน

<u>การเปรียบเทียบสมรรถนะโดยเอ็นซัยม์ turnover number</u>

การหาค่า turnover number ของเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase จากการทำ methotrexate titration ของเอ็นซัยม์จากเนื้อเยื่อมะเร็งของไต และมะเร็งของ

กระเพาะมีค่าเท่ากับ 36,345 และ 15,421 mole/min/mole of enzyme ตามลำดับดัง แสดงไว้ในตารางที่ 9 พบว่ามีค่าสูงเมื่อเทียบกับค่า turnover number ของเอ็นซัยม์ใน ตับหนูซึ่งมีค่าเท่ากับ 5,154 mole/min/mole of enzymeผลที่ได้นี้อาจเสนอแนะได้ว่าเอ็นซัยม์ ของเนื้อเยื่อในเซลล์มะเร็งมีสมรรถนะที่สูงกว่าในการทำงานของมันซึ่งอาจเป็นผลมาจากการ เพิ่มการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของอวัยวะที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็งซึ่งมีการสร้าง กรดนิวคลีอิคและโปรตีนสูงอย่างรวดเร็ว (60,61) นั่นเอง

<u>การห้ามของ methotrexate ต่อ dihydrofolate reductase จากเนื้อเยื่อมะเร็งของ ไตและกระเพาะ</u>

การทดลองหาความสามารถในการห้ามเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase จากเนื้อเยื่อมะเร็งของไตและของกระเพาะได้แสดงไว้ในรูปที่ 2 และ 4 ตามลำดับ ค่าความ เข้มข้นของ methotrexate ที่สามารถห้ามการทำงาน 50% ของเอ็นซัยม์มีค่าเท่ากับ 9.68×10^{-2} M และ 9.00×10^{-12} M ตามลำดับ (ตารางที่ 10) ความสามารถการห้ามเอ็นซัยม์ โดย methotrexate เปรียบเทียบกับตับหนูได้แสดงไว้ในรูปที่ 8 และตารางที่ 10 I_{50} ของ เอ็นซัยม์ในตับหนูเท่ากับ 7.13×10^{-10} M จากผลการทดลองนี้แสดงว่าเอ็นซัยม์จากเนื้อเยื่อ มะเร็งมีความไวต่อการห้ามด้วย MTX ได้ดีกว่าเอ็นซัยม์จากตับหนู

เนื่องจาก methotrexate เป็นยาที่นิยมใช้เพื่อยับยั้งการเจริญของมะเร็งหลายชนิด (64) แต่ยานี้ดูเหมือนจะทำให้เซลล์มีการพัฒนาเกิดการต้านยาขึ้นได้โดยเกิดเนื่องจากการเปลี่ยน แปลงที่การผ่านเข้าเซลล์ (65,66) หรือการเปลี่ยนแปลงการลดการจับของเอ็นซัยม์กับ MTX (67-69) ได้มีผู้พยายามใช้ยา MTX ในขนาดสูงมาก ๆ เพื่อการรักษาโดยเชื่อว่ายาในขนาด สูง ๆ จะป้องกันหรือทำให้การต้านยาเกิดขึ้นช้าลง (70,71) และการใช้ยาในขนาดสูงมากเช่นนี้ ได้มีผู้พยายามศึกษาเพื่อใช้ leucovorin และสารอื่น ๆ ช่วยแก้พิษของยาต่อเซลล์ปกติ (72-74) จากการศึกษาครั้งนี้เป็นการยืนยันว่าในเนื้อเยื่อมะเร็งที่นำมาทดลองนี้มีการเพิ่มของเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase และเอ็นซัยม์นี้ที่ศึกษาในเนื้อเยื่อมะเร็งของไตและกระเพาะของ คนไข้พบว่ามีความไวต่อการถูกห้ามด้วยยา methotrexate ดังนั้นการที่จะใช้ยา methotrexate เพื่อต้านมะเร็งของอวัยวะต่าง ๆ ที่มีเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase จึงน่าจะกระทำ ได้ผลดี

งานวิจัยนี้น่าจะได้มีการศึกษาต่อไปอีกดังต่อไปนี้คือ

1. ความสัมพันธ์ของระยะการเกิดมะเร็งกับปริมาณของเอ็นซัยม์ dihydrofolate reductase จะทำให้ได้ข้อมูลในการใช้ยาให้ได้ผลดีที่สุดในระยะใดของการเกิดโรค ถ้าในแต่ละระยะของโรคมี activity ของเอ็นซัยม์ต่างกัน

2. ศึกษาสาร antimetabolites อื่น ๆ ที่อาจมีผลห้ามการทำงานของ dihydrofolate reductase ในเนื้อเยื่อมะเร็งของคนได้

3. ศึกษาคุณสมบัติอื่น ๆ ของเอ็นซัยม์จากเนื้อเยื่อมะเร็งของคนไข้เพิ่มเติมให้มากกว่านี้

4. ศึกษาเอ็นซัยม์จากตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งของอวัยวะต่าง ๆ เพิ่มเติมให้มากขึ้น ซึ่งการศึกษานี้อาจต้องใช้เวลานานมากในการรอคอยตัวอย่างซึ่งขึ้นอยู่กับว่าจะมีคนไข้มาให้ศึกษาหรือไม่จึงไม่สามารถกระทำได้ภายในเวลาเพียง 1 หรือ 2 ปีเท่านั้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Blakley, R.L. (1981), Molecular Action and Targets for Cancer Chemotherapeutic Agents (Sartorelli, A.C., Lazo, J.S. and Bartino, T.R, Eds.) pp 303-332, Academic Press. New York.

2. Hitchings G.H. and Roth, B. (1980) Enzyme Inhibitors as Drugs. (Sandler, M. Ed.) Macmillan, London.

3. Blakley, R.L. and Mc Dougall, M.B. (1961), Dihydrofolate Reductase from Streptococcus faecalis R. J. Biol. Chem. 236(4), 1163-1167.

4. Gleisner, J.M., Peterson, D.L. and Blakley, R.L. (1974) Amino Acid Sequence of Dihydrofolate Reductase from MTX-Resistant Mutant of Streptococcus faecium and Indentification of Methionine Residues at the Inhibitor Binding. Proc. Natl. Acad. Aci. U.S.A. 71, 3001-3005.

5. Gundersen, L.E., Dunlap, R.B., Harding, N.G.L., Freisheim, J.H., Otting, F. and Huenneken, F.M. (1972) Dihydrofolate Reductase from Amithopterin-Resistant Lactobacillus casei, Biochemistry 11(6), 1018-1023.

6. Bitar, K.G., Blankenship, D.T., Walsh, K.A., Dunlap, R.B., Reddy, A.V., and Freisheim, J.H. (1977) FEBS Lett. 80(1), 119-122.

7. Sirotnak, F.M. and Salser, J.S. (1971) Dihydrofolate Reductase from Diplococcus pneumoniae. Purification, Amino Acid Composition, and N-Terminal Amino Acid Analysis, Arch. Biochem. Biophys. 145, 268-275.

8. Poe, M., Greenfield, N.J., Hirshfiels, J.M., Williams, M.N., Hoogsteen, K. (1972) Dihydrofolate Reductase. Purification and Characterization of Enzyme from an Amethopterin-Resistant Mutant of Escherichia coli. Biochemistry 11(6), 1023-1030

9. Bennett, C.D. (1974) Similarity in the Sequence of Escherichia coli Dihydrofolate Reductase with Other Pyridine Nucleotide-requiring Enzyme. Nature 248, 67-68.

10. Baccanari, D.P., Stone, D. and Kuyper, L. (1981) Effect of a Single Amino Acid Substitution on Escherichia coli Dihydrofolate Reductase Catalysis and Ligand Binding. J. Biol. Chem. 256(4), 1738-1747.

11. Bertino, J.R., Booth, B.A., Bieber, A.L., Cashmore, A., Sartorelli, A.C. (1964) Studies on the Inhibition of Dihydrofolate Reductase by the Folate Antagonists. J. Biol. Chem. 239(2), 479-485.

12. Perkins, J.P. and Bertino, J.R., (1965) Interaction of Organic Mercurial Compounds with Dihydrofolate Reductase from Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. Biochemistry 4(5), 847-853.

13. Perkins, J.P., Hillcoat, B.L. and Bertino, J.R. (1967) Dihydrofolate Reductase from a Resistant Subline of the L 1210 Lymphoma. J. Biol. Chem. 242(20), 4771-4776.

14. Stone, D.,Paterson, S.J., Raper, J.H. and Phillips, AW. (1979) The Amino Acid Sequence of Dihydrofolate Reductase from the Mouse Lymphoma L1210 J. Biol. Chem. 254(2) 480-488.

15. Hakala, M.T., Zakrzewski, S.F. and Nichol, C.A. (1961) Relation of Folic Acid Reductase to Amethopterin Resistance in Cultured Mammalian Cells. J. Biol. Chem. 236, 952-958.

16. Nath, R. and Greenberg, D.M. (1962) Dihydrofolic Acid Reductase of Calf Thymus. Biochemistry 1(3), 435-441.

17. Zakrzewski, S.F. (1960) Purification and Properties of Folic Acid Reductase from Chicken Liver. J. Biol. Chem 235(6), 1776-1779.

18. Kaufman, B.T. and Pierce, J.V. (1971) Purification of Dihydrofolate Reductase from Chicken Liver by Affinity Chromatography, Biochem. Biophys. Res. Commun. 44(3), 608-613.

19. Kumar, A.A., Blankenship, D.T., Kaufman, B.T. and Freisheim, J.H. (1980) Primary Structure of Chicken Liver Dihydrofolate Reductase. Biochemistry 19(4), 667-678.

20. Kaufman. B.T. and Kemerer, V.F. (1976) Purification and Characterization of Beef Liver Dihydrofolate Reductase. Arch. Biochem. Biophys. 172, 289-300.

21. Peterson, D.L., Gleisner, J.M., and Blakley, R.L. (1975) Bovine Liver Dihydrofolate Reductase : Purification and Properties of the Enzyme. Biochemistry 14(24), 5261-5267.

22. Lai, P-H., Pan, Y-C.E., Gleisner, J.M., Peterson, D.L., Williams, K.R. and Blakley,R.L. (1982) Structure of Dihydrofolate Reductase : Primary Sequence of the Bovine. Biochemistry 21, 3284-3294.

23. Smith, S.L.,Patric, P., Stone, D., Phillip, A.W. and Burchall, J.J. (1979) Porcine Liver Dihydrofolate Reductase : Purification, Properties and Amino Acid Sequence. J. Biol. Chem. 254(22), 11475-11484.

24. McCullough, J.L., and Bertino, J.R. (1971) Dihydrofolate Reductase from Mouse Liver and Spleen. Biochem.Pharmacol. 20, 561-574.

25. Bertino, J.R., Iannotti, A.T., Perkins, J.P. and Johns, D.G. (1966) Dihydrofolate Reductase from Guinea Pig Liver and Small Intestine. Biochem. Pharmacol. 15, 563-571.

26. Nixon, P.F. and Blakley, R.L. (1968) Dihydrofolate Reductase of Streptococcus faecium. II Purification and some Properties of Two Dihydrofolate Reductase from the Amethopterin-Resistant Mutant, Streptococcus faecium Var. Duran Strain A. J. Biol. Chem. 243(18), 4722-4731.

27. D'Souza, L., Warwick, P.E. and Freisheim, J.H. (1972) Purification and Properties of Dihydrofolate Reductase from an Amethopterin-Resistant Strain of Streptococcus faecium. Biochemistry 11(8), 1528-1534.

28. Hutchison, D.J. (1971) Antifolate Resistance and the Genetic Control of Dihydrofolate Reductase Activity. Ann. N.Y. Acad. Sci. 186, 172-181.

29. Mathews, C.K. and Sutherland, K.E. (1965) Comparative Biochemistry of Bacterial and Phage-induced Dihydrofolate Reductase. J. Biol. Chem. 240(5), 2142-2147.

30. Dumlap, R.B., Gundersen, L.E. and Huennekens, F.M. (1971) Interconversion of the Multiple forms of Dihydrofolate Reductase from Amethopterin-Resistant Lactobacillus casei. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42(5), 772-777.

31. Sartorelli, A.C., Booth, B.A. and Bertino, J.R. (1964) Folate Metabolism in Methotrexate-Sensitive and Resistant Ehrlich Ascites Cells. Arch. Biochem. Biophys. 108. 53-59.

32. Hakala, M.T. (1965) On the Role of Drug Penetration in Amethopterin Resistance of Sarcoma-180 Cells in vitro. Biochim et Biophys. Acta 102, 198-209.

33. Hakala, M.T. and Ishihara, T. (1962) Chromosomal Constitution and Amethopterin Resistance in Cultured Mouse Cells. Cancer Res. 22, 987-992.

34. Friedkin, M., Crawford, E., Humphreys, S.R. and Goldin, A. (1962) The Associate of Increased Dihydrofolate Reductase with Amethopterin Resistance in Mouse Leukemia. Cancer Res. 22, 600-606.

35. Misra, D.K., Stewart, R., Humphreys, S.R., Friedkin, M., Goldin, A. and Grawford, E.J. (1961) Increased Dihydrofolate Reductase Activity as a Possible Basis of Drug Resistance in Leukemia. Nature 189(4758), 39-42.

36. Blakley, R.L. (1969) The Biochemistry of Folic Acid Related Pteridines, Amsterdam, North-Holland Publishing Co. p 139-187.

37. Pongsamart, S., Lai, P-H., Williams,K.R. and Blakley, R.L. Unpublished results.

38. Zakrzewski, S.F. (1963) The Mechanism of Binding of Folate Analogues by Folate Reductase. J. Biol. Chem. 238(4), 1485-1490.

39. Kaufman, B.T. (1963) Activation of dihydrofolic Reductase by Urea and Formamide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 10(6), 449-453.

40. Burchall, J.J. and Hitchings, G.H. (1965) Inhibitor Binding Analysis of Dihydrofolate Reductase from Various Species. Molec. Pharmac. 1, 126-136.

41. Zakrzewski, S.F. (1960) Studies on the Substrate Specificity of Folic Acid Reductase. J. Biol. Chem. 235(6), 1780-1784.

42. Werkheiser, W.C. (1961). Specific Binding of 4-Amino Folic Acid Analogues by Folic Acid Reductase. J. Biol. Chem. 236(3), 888-893.

43. Peters,J.M. and Greenberg, D.M. (1959) Studies on Folic Acid Reduction. Biochim. et. Biophys. Acta. 32, 273-274.

44. Bertino, J.R., Gabrio, B.W. and Huennekens, F.M.. (1960). Dihydrofolate Reductase in Human Leukemic Leukocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 3, 461-465.

45. McCullough, J.L., Nixon, P.F., Bertino, J.R. (1971) Discussion Paper : Kinetic Investigation of the Reaction Mechanism of Dihydrofolate Reductase from L 1210 Cells. Ann. N.Y. Acad. Sci. 186, 131-142.

46. Freisheim, J.H., Smith, C.C. and Guzy, P.M. (1972) Dihydrofolate Reductase and Thymidylate Synthetase in Strains of Streptococcus faecium Resistant to Pyrimethamine, Chloguanidine,Triazine, Trimethoprim. and Amethopterin, Arch. Biochem. Biophys 148, 1-9.

47. Bertino, J.R., Simmons, B. and Donohue, D.M. (1964) Levels of Dihydrofolate Reductase and the Formate-Activating Enzyme Activities in Guinea Pig Tissues Before and After Amethopterin Administration. Biochem. Pharmacol. 13, 225-233.

48. Spector, R, Levy, P. and Abelson, H.T. (1977) Identification of Dihydrofolate Reductase in Rabbit Brain. Biochem. Pharmacol. 26, 1507-1511.

49. Pollock, R.J. and Kaufman, S. (1978) Dihydrofolate Reductase is Present in Brain. J. Neurochem. 30, 253-256.

50. Duch, D.S., Biger, D.D., Bowers, S.W. and Nichol, C.A. (1979) Dihydrofolate Reductase in Primary Brain Tumours, Cell Cultures of Central Nervous System Origin, and Normal Brain During Fetal and Neonatal Growth. Cancer Res. 39, 487-491.

51. Abelson, H.T., Fosburg, M., Gorka, C. and Kornblith, P. (1978) Identification of Dihydrofolate Reductase in Human Central-Nervous-System Tumours. Lancet 1, 184-185.

52. Friedkin, M., Crawford, E.J. and Misra, D. (1962) Reduction of Folate Derivatives with Dithionite in Mercaptoethanol. Fed. Proc. 21, 176.

53. Futterman, S., (1957) Enzymatic Reduction of Folic Acid and Dihydrofolic Acid to Tetrahydrofolic Acid. J. Biol. Chem. 228, 1031-1038.

54. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Rondall, R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

55. Mathews, C.K. and Huenneken, F.M. (1963) Further Studies on Dihydrofolate Reductase. J. Biol. Chem. 238(10), 3436-3442.

56. Hillcoat, B.L., Nixon, P.E., and Blakley, R.L. (1967) Effect of Substrate Decomposition on the Spectrophotometric Assay of Dihydrofolate Reductase. Anal. Biochem. 21, 178-189.

57. Baccanari, D.P., Tansik, B.L., Peterson, S.J. and Stone, D. (1984) Characterization and Amino Acid Sequence of Neisseria gonorrhoeae Dihydrofolate Reductase. J. Biol. chem. 259(19) 12291-12298.

58. Lynn, R., Rueter, M.E. and Guynn, R.W. (1977) Mammalian Brain Dihydrofolate Reductase. J. Neurochem. 29, 1147-1149.

59. Spector, R., Levy, P. and Abelson, H.T. (1977) The Development and Regional Distribution of Dihydrofolate Reductase in Rabbit Brain. J. Neurochem. 29, 919-921.

60. Goldman, D. (1974), The Mechanism of Action of Methotrexate I. Interaction with a Low-Affinity Intracellular Site Required for Maximum Inhibition of Deoxyribonucleic Acid Synthesis in L-Cell Mouse Fibroblasts. Mole. Pharmacol. 10, 257-274.

61. Kaminskass, E. (1982), Effects of Methotrexate on Ribonucleotide Pools in Growing and in Growth-arrested Tumor Cells and Antagonism by RNA Synthesis Inhibitors. J. Biol. Chem. 257(8), 4279-4284.

62. Carmo-Pereira, J., Costa, F.O. and Henriques, E. (1981) Chemotherapy of Advanced Breast Cancer : A Randomized Trial of Vincristine, Adriamycin, and Cyclophosphamide (VAC) Versus Cyclophosphamide, Methotrexate, 5-Fluorouracil, and Prednisolone (CMFP). Cancer. 48, 1517-1521.

63. Hryniuk, W.M. (1975) The Mechanism of Action of Methotrexate in Cultured L5178Y Leukemia Cells. Cancer Research 35, 1085-1092.

64. Jolivet, J., Cowan, K.H., Curt, G.A., Glendeminn, N.J. and Chabner, B.A. (1983). The Pharmacology and Clinical Use of Methotrexate. N.Engl.J.Med. 309(18):1094-1104.

65. Hill, B.T., Bailey, B.D., White, J.C.,Goldman, I.D. (1979) Characteristics of Transport of 4-Amino Antifolates and Folate Compounds by Two Lines of L5178Y Lymphoblasts, One with Impaired Transport of Methotrexate. Cancer Res. 39:2440-2446.

66. Sirotnak, F.M., Moccio, D.M., Kelleher, L.E., Goutas, L.J. (1981) Relative Frequency and Kinetic Properties of Transport-Defective Phenotypes Among Methotrexate-Resistant L1210 Clonal Cells Derived in vivo. Cancer Res. 44:4447-4452.

67. Flintoff, W.F., Essani, K, (1980) Methotrexate-Resistant Chinese Hamster Ovary Cells Contain a Dihydrofolate Reductase with an Altered Affinity for Methotrexate.Biochemistry, 19:4321-4327.

68. Jackson, R.C., Niethammer, D., (1977). Acquired Methotrexate Resistance in Lymphoblasts Resulting from Altered Kinetic Properties of Dihydrofolate Reductase. Eur. J. Cancer. 13:567-575.

69. Goldie, J.H., Krystal, G., Hartley, D., Gudauskas, G., Dedhar, S. (1980). A Methetrexate Insensitive Variant of folate Reductase Present in Two Lines of Methotrexate-Resistant L5178Y Cells. Eur. J. Cancer 16:1539-1546.

70. Hill, B.T., Dedhar, S., Goldie, J.H. (1982). Evidence that at "High" Extracellular Methotrexate Concentrations the Transport Barrier is Unlikely to be an Important Mechanism of Drug Resistance. Biochem. Pharmacol. 31:263-266.

71. Schrecker, A.W., Mead, J.A.R., Greenberg, W.H., Goldin, A. (1971) Dihydrofolate Reductase Activity of Leukemia L1210 During Development of Methotrexate Resistance. Biochem. Pharmacol 20, 716-718.

72. Hamel, E., Johnson, G., Glaubiger, D. (1981). Pharmacokinetics of Leucovorin Rescue Using a New Methotrexate-Independent Biochemical Assay for Leucovorin and N^5-Methyltetrahydrofolate. Cancer. Treat. Rep. 65:545-553.

73. Dudman, N.P.B., Slowiaczek, P., Tattersall, MHN. (1982) Methotrexate Rescue by 5-methyltetrahydrofolate or 5-formyltetrahydrofolate in Lymphoblast Cell Lines. Cancer. Res. 42:502-507.

74. Chabner, B.A., and Johns, D.G. (1972) Enzymatic Cleavage of Methotrexate Provides a Methods for Prevention of Drug Toxicity. Nature 239:395-397.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย