แอนเน็กซิน

พรรณี หนูซื่อตรง, วท.บ.*

บทคัดย่อ annexins เป็นกลุ่มของ Ca^{2+} -dependent phospholipid binding protiens แต่ละชนิดประกอบด้วย homologous amphiphilic α-helices ของกรดอะมิโน 4-6 สาย น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32000-39000 กลไกการออกฤทธิ์เริ่มต้นจากปริมาณแคลเซียมไอออนที่เพิ่มขึ้นไปเร่งให้ annexins จับกับขั้วลบของ phospholipid ทำให้มีการจัดเรียงตัวใหม่เป็น trimers, hexamers และ higher aggregates แผ่ขยายไปรอบๆ receptors มีผลยับยั้งการทำงานของ phospholipid binding protiens เช่น ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phosphokinase C (PKC) และ phospholipase (PLases) ในปฏิกิริยาการกระตุ้น Cl^- conductance และยังมีผลต่อปฏิกิริยาอื่นๆ ได้แก่ยับยั้งการแข็งตัวของเลือดทำให้เกิดกระบวนการ exocytosis ของฮอร์โมนและสารสื่อประสาท

Abstract **Annexins : Ca^{2+} – dependent membrane binding proteins**

Punnee Nusuetrong, M.Sc. *

The annexins are a family of Ca^{2+} -dependent phospholipid binding proteins. Each annexin, molecular weight 32000-39000, is composed of 4-6 homologous amphiphilic α-helices. It acts by binding to the annionic phospholipid surface in elevation of Ca^{2+} concentration then organizes into trimers, hexamers, and higher aggregates; and ultimately forms an extended hexagonal array around the target protein (s). The resultant inhibits phospholipid binding proteins such as inhibition phosphokinase (PKC) and phospholipase (PLases) in activated Cl^- conductance and in other reactions: anticoagulant, hormone and neurotransmitter exocytosis.

(MJS 1996 ; 3 : 95 - 99)

บทนำ

แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) เป็นแร่ธาตุที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของร่างกายหลายอย่าง โดยแคลเซียมไอออนทำหน้าที่เป็น secondary messenger ภายในเซลล์จับกับ Ca^{2+} -binding proteins ในไซโตพลาสซึมหรือที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้านไซโตพลาสซึมแล้วเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (conformation) เป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ไปมีผลต่อปฏิกิริยาต่างๆ มากมายทั้งภายในและภายนอกเซลล์ Ca^{2+} -binding proteins แบ่งออกได้หลายกลุ่ม (family) ที่รู้จักกันดีได้แก่ Ca^{2+} /calmodulin-

* ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
* Department of Physiology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University.

dependent protein kinase (protein kinase C) ในขบวนการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบและกล้ามเนื้อหัวใจ [1], troponin C ในการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย[2], guanine nucleotide-binding proteins (G-protein) ในขบวนการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด[3] นอกจากนี้ inositol polyphosphate isomer ซึ่งจัดเป็น Ca^{2+} -binding proteins ชนิดหนึ่งสามารถทำหน้าที่เป็น Ca^{2+} -mobilizing secondary messenger โดยการเปิด Ca^{2+} channel เพื่อให้มีการหลั่งฮอร์โมนบางชนิด เช่น insulin[4]

ในปี ค.ศ. 1980 เริ่มมีการค้นพบ Ca^{2+} -binding proteins ตัวใหม่ๆ หลายชนิดจึงมีชื่อเรียกแตกต่างกันมากมายเช่น lipocortin, calpactin, endonexin, calelectrin, synexin, chromobindin และ placenta anticoagulant protein เป็นต้น แต่ต่อมาพบว่า Ca^{2+} -binding proteins เหล่านี้มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกันและควรจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันCrumpton และ Dedman ร่วมกับนักวิทยาศาสตร์อื่นๆ ตั้งชื่อ Ca^{2+} -binding proteins กลุ่มนี้ตามคุณสมบัติที่สามารถจับและรวมตัวแนบเข้า (annex) กับเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เรียกว่า **annexins**[5]

Annexins พบได้ทั้งในพืชสัตว์ชั้นต่ำสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม รวมทั้งในคน มีทั้งหมด 13 ชนิด ได้แก่ annexin I-VIII, XI และ XIII พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและคน annexin IX และ X พบในสัตว์ชั้นต่ำ เช่น Drosophila ส่วน annexin XII พบใน hydra และพืช อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของ annexins ในแต่ละ species มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น[6] annexins สามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ให้การตอบสนองทางสรีรวิทยาที่เฉพาะเจาะจงตามสัญญาณการกระตุ้นหรือสิ่งเร้าจากภายนอกเซลล์ เช่น สารสื่อประสาท หรือ growth factor เป็นต้น

โครงสร้างและคุณสมบัติ

ผลจากการศึกษาด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis แสดงให้เห็นว่า annexins มีมวลสาร (molecular mass) ที่วัดตามลำดับของ cDNA ได้ตั้งแต่ 18 ถึง 335 หากแบ่งประเภทของ annexins ตามน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) อาจแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกมีน้ำหนักประมาณ 70000 เรียกว่า p70 กลุ่มที่ 2 มีน้ำหนักระหว่าง 32000-39000[7] ได้แก่ annexin I และ annexin II โครงสร้าง annexins ประกอบด้วยกรดอะมิโน 4 ถึง 8 สายแต่ละสายมีกรดอะมิโน 60-80 ตัวลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกันอยู่ 40-70% ดังแสดงในรูปที่ 1 โมเลกุลของ annexins แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ปลายด้านหนึ่งเป็น carboxyl terminal (C-terminal) ที่จับกับแคลเซียมไอออน มีลักษณะเป็น amphiphilic α-helices ลักษณะเด่นของส่วนนี้คือทนต่อสภาวะการเปลี่ยนแปลงต่างๆ (stable) ภายในเซลล์ได้ดี ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งเป็น amino terminal (N-terminal) มีการเรียงลำดับและจำนวนของกรดอะมิโนตามชนิดและหน้าที่ต่อเซลล์ เป็นส่วนที่ควบคุมการทำงานของเซลล์ เช่น protein kinase C และ tyrosine kinase จึงไวต่อปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ proteolysis, phosphorylation หรือทำปฏิกิริยากับโปรตีนอื่นๆ ได้ดี[8] ขณะเดียวกันก็สามารถถูกยับยั้งได้โดย acetyl group[9]

ผลจากการศึกษาทาง x-ray crystallography พบว่า annexins มีจำนวน Ca^{2+} -binding sites ไม่เท่ากันขึ้นกับจำนวนสายของกรดอะมิโนของ annexins แต่ละชนิด เช่น annexin V มี Ca^{2+} -binding sites 4 แห่ง สามารถยับยั้งการแข็งตัวของเลือด ระดับในกระแสเลือดสูงประมาณ 0-50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบมากบริเวณเซลล์บุผิวของเส้นเลือดประมาณ 2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

แบบจำลองโครงสร้างโมเลกุลของ annexins มี 2 ลักษณะ ลักษณะแรกเป็น helix cylinder ได้แก่ annexin V มีคุณสมบัติเป็น water-soluble ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมดรวม 4 สาย แต่ละสายมี 5 homologous amphiphilic α-helices (A ถึง E) จัดเรียงตัวเป็นเกลียวเวียนไปทางขวารวมกันเป็นรูปทรงกลมเรียกว่า superhelices superhelices ทั้ง 4 สายมีส่วน hydrophobic cores และส่วน polar amino acids ม้วนตัวเป็นแนวระนาบ โดยหันส่วนที่มีขั้ว (ส่วนหาง) ออกด้านนอก แบบจำลองที่สองมีลักษณะเป็น TIM barrel model ประกอบด้วย 5 α-helices เช่นเดียวกัน แต่จะใช้ส่วน hydrophilic ของ amphipathic

A, C และ D helices ทำมุมน้อยกว่า 90 องศากับแนวระนาบ ส่วนที่เหลือคือ ส่วน hydrophobic B และ E หันออกด้านนอก ดังนั้นเมื่อ annexins เจาะเข้าไปในชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์จะทำให้มีลักษณะเหมือน hollow screw[10] สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ต่อไป แบบจำลองนี้สามารถนำมาใช้อธิบายกลไกการเกิดปฏิกิริยาของ annexin VII ได้

annexins สามารถแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ได้เช่น annexin I ที่มี 2 รูป (form) แบบแรกเป็น regular form สกัดจากเยื่อหุ้มเซลล์โดยใช้ EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) แบบที่ 2 สกัดออกได้โดยใช้ detergents หรือทำให้เกิด phosphorylation ด้วย tyrosine kinase ของ epidermal growth factor receptor[11] นอกจากนั้นยังพบว่า annexin I และ II ยังสามารถจับกับกลูโคสได้อีกด้วย

จากการศึกษา annexins ตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบันพบว่ามีคุณสมบัติที่สำคัญๆ อยู่หลายประการ เช่น annexin I ใน alveolar macrophages มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด superoxide (O^-_2) จากปฏิกิริยาของ NADPH oxidase โดยแสดงผลในการยับยั้ง cell proliferation เช่นเดียวกับผลของยาหรือฮอร์โมน glucocorticoids[12] และยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation)[13] ผลจากการศึกษาที่ปอดกระต่ายพบ annexins 2 ชนิด คือ 33 kDa และ 36 Kda phospholipid biuding protein และพบ 36 kDa มากในช่วงใกล้คลอด ทั้งนี้เชื่อว่ามีความสำคัญในการพัฒนาของปอดและช่วยในการสร้าง pulmonary surfactant[14] และจากการศึกษาที่ secretory granules ต่างๆ พบว่า annexins มีฤทธิ์ช่วยในขบวนการ exocytosis ของฮอร์โมนจากต่อมต่างๆ เช่น chromaffin cells ของต่อมหมวกไตส่วนนอก[15] beta cells ของตับอ่อน[16] นอกจากนี้ยังพบว่า annexins มีคุณสมบัติเป็น voltage-dependention channels เนื่องจากมีความต่างศักย์เกิดขึ้นภายหลังที่มีแคลเซียมไอออนเพิ่มขึ้นภายในเซลล์ได้แก่ annexin VII เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการค้นพบ annexin II ในนิวเคลียส[17-19] เชื่อว่าทำหน้าที่คล้ายๆ กับ ribosome ในการขนส่งสารภายในนิวเคลียสและอาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการกระตุ้นเอนไซม์ DNA polymerase

กลไกการออกฤทธิ์

บริเวณของกรดอะมิโนของ annexins ที่สำคัญในการทำปฏิกิริยากับ phospholipid membrane ได้แก่ serine/threonine หรือ tyrosine subunit ในตำแหน่งหนึ่งตำแหน่งใดของ N-terminal เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนต่ำ annexins จะอยู่ในรูปของ soluble monomer หากปริมาณแคลเซียมไอออนภายในเซลล์มีความเข้มข้นมากกว่า 10^{-9} โมล annexins จะจับกับแคลเซียมไอออน มีผลให้ annexins จับกับขั้วลบของ phospholipid membrane เกิดการจัดเรียงตัวใหม่และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็น trimers, hexamers และ higher aggregates ตามลำดับ แผ่ขยายไปเป็นแถบเหมือนผลึกล้อมรอบ receptors ทำให้คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป เช่น annexin IV มีผลเปลี่ยนแปลงความเหลว (fluidity)[20] และปรับเปลี่ยนการกระจายตัวของ phospholipid ไปมีผลยับยั้ง translocation ของ phospholipid-dependentproteinkinase (PKC) และ phospholipase (PLases) จึงเกิดภาวะสมดุลย์ระหว่าง phosphorylation และ dephosphorylation มีการกระตุ้น ion channals เพิ่มมากขึ้น ทำให้ epithelium Cl^- conductance เพิ่มขึ้น [21-22] ซึ่งอาจนำไปปรับปรุงใช้รักษาความผิดปกติในการขนส่งสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้เช่นโรค cystic fibrosis สำหรับ annexin V จะออกฤทธิ์โดยแย่งจับ phosphatidylserine lysosomes ของเกร็ดเลือดจาก factor Xa ทำให้ thrombin-stimulated platelets อยู่ในสภาพ inactive จึงมีผลยับยั้งการแข็งตัวของเลือด [23]

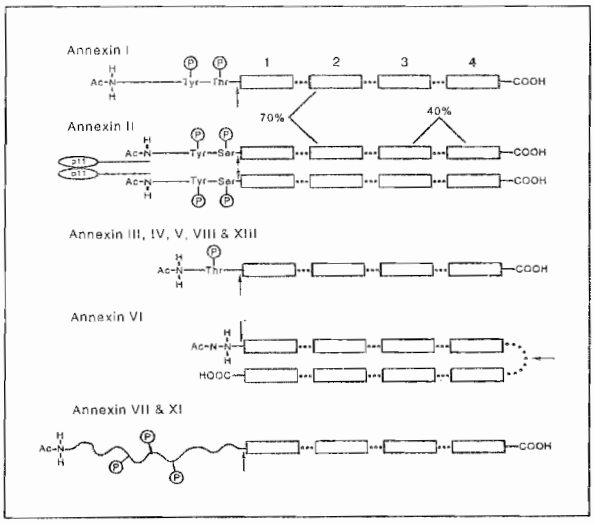
annexin II มีการเรียงตัวที่แตกต่างไปจาก annexins ชนิดอื่นๆ คือมีการเรียงตัวเป็น bivalent heterotetramer $(ANX II)_2 (p11)_2$ โดยที่ p11 subunit จับกันเป็น dimer และส่วนของ C-terminal ของ peptide นี้จะจับกับ N-terminal ของ p11 จึงมีปฏิกิริยาพอดีกับ actin filament หรือเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ตามชนิดของสิ่งเร้านั้นๆ annexins ชนิดนี้ทำงานได้โดยเมื่อมีการเพิ่มของปริมาณแคลเซียมไอออน ทำให้ $(p11)_2$

จับกับ $(ANX II)_2$ เปิดด้าน active sites ให้จับกับ actin filament เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อตามมา

annexins มีคุณสมบัติจับกับ phospholipid ที่เป็นกรดได้ดี ค่า dissociation constants (Kd) เป็นนาโนโมลและจับกับ phospholipid ที่มีประจุลบได้ดีเรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยได้ดังต่อไปนี้คือ

phosphatidic acid > phosphatidyl serine > phosphatidylinositol

แต่ก็ยังมี annexins บางตัวที่ยังสามารถจับกับ phosphatidylethanoolamine ซึ่งไม่มีประจุได้ อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามี annexins ตัวใดเลยที่สามารถจับกับ phosphatidylcholine ได้[24]



รูปที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของ annexins แต่ละโมเลกุลมีลำดับของโปรตีน เหมือนกันอยู่ 40-70% ส่วน N-terminal มีความแตกต่างทั้งความยาว และตำแหน่งของ tyrosine, serine/threonine phosphorylation ลูกศรบอกตำแหน่งที่สามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ (จาก Kaetzel MA และ Dedman JR, 1995)

สรุป

annexins เป็นกลุ่มของ Ca^{2+} -dependent phospholipid binding proteins แต่ละโมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโน 4-6 สาย แต่ละสายมีกรดอะมิโน 60-80 ตัว มีทั้งหมด 13 ชนิด พบได้ทั้งในพืช สัตว์ชั้นต่ำ และคน เริ่มออกฤทธิ์เมื่อปริมาณแคลเซียมไอออนภายในเซลล์เพิ่มขึ้นจะกระตุ้นให้ annexins ทำปฏิกิริยารวมตัวกับขั้วลบของ phospholipid แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ได้สารประกอบเชิงซ้อนไปมีผลเกิดปฏิกิริยาตอบสนองทางสรีรวิทยามากมายเพื่อควบคุมการทำงานระดับเซลล์ ได้แก่ ion conductances, การรวมตัวของ vesicles และ cytoskeleton, ยับยั้ง phospholipase A_2 และยับยั้งการแข็งตัวของเลือด นับเป็น Ca^{2+} -binding proteins อีกกลุ่มหนึ่งที่มีผลต่อปฏิกิริยาต่างๆ ภายในเซลล์มากมาย การศึกษา annexins ชนิดต่างๆ ยังนำไปสู่การประยุกต์ทางการแพทย์เพื่อรักษาพยาธิสภาพบางชนิดเช่น cystic fibrosis เป็นต้น การค้นคว้าวิจัยในเรื่องของ Ca^{2+} -binding proteins กลุ่มนี้จึงน่าเป็นอีกแง่มุมหนึ่งของแคลเซียมไอออนที่มีประโยชน์ต่อวงการแพทย์ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Yazawa M, Vorherr T, James P, Carafoli E, and Yagi K. Binding of calcium by calmodulin : influence of the calmodulin binding domain of the plasma membrane calcium pump. Biochemistry 1992; 31 (12): 3171-6.
2. Gulati J, Sonnenblick E, and Babu A. The role of troponin C in the length dependence of Ca^{2+} -sensitive force of mammalian skeletal and cardiac muscles. J Physiol 1991; 441: 305-24.
3. Manning DR and Brass LF. The role of GTP -binding proteins in platelet activation. Thrombosis & Haemostasis 1991; 66 (4): 393-9.
4. Rossetti L, Giaccari A, and DeFronzo RA. Glucose toxicity. Diabetes Care 1990; 13 (6): 610-24.
5. Crumpton MJ, and Dedman JR. Protein terminology tangle. Nature 1990; 345: 212.
6. Raynal P, and HB Pollard. Annexins : the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium and phospholipid binding protein. Biochim Biophy Acta 1994; 1197: 68.
7. Klee CB. Ca^{2+} -dependent phospholipid (and membrane-) binding proteins. Biochemistry 1988; 27 (18): 6645-53.
8. Kartzet MA, and Dedman JR. Annexins : novel Ca^{2+} -dependent regulators of membrane function. Int Union Physiol, Sci/Am, Physiol Soc 1995; 10: 171-6.
9. Funnaloshi T, Hendridkxon LE, Mc Mullen BA, and Fuzidawa K. Primary structure of human placental anticoagulant protein. Biochemistry 1987; 26: 8087-92.

10. Andree HAM, Reuteling Sperger CPM, Hemker HC, Hermens WT, and Willems GM. Binding of vascular and anticoagulant α (VAC α) to plannar phospholipid bilayers. J Biol Chem 1990; 265: 4923-28.
11. Sheets EE, Giugni TD, Coates GG, Schlaepter DD, and Haigler HT Epidermal growth factor dependent phosphorylation of a 35-kilodalton protien in placenta membrane. Biochemistry 1987; 26: 1164-72.
12. Maridonneauparini I, Erroasfa M, and Russomarie F. Inhibition of O^-_2 generation by dexamethazone is mimicked by lipocortin I in aveolar macrophages. J Clin Invest 1989; 83: 1936-40.
13. Whitehouse BJ. Lipocortins, mediators of the anti-inflammatory action of corticosterriods. J Endocrinol 1989; 123: 363-6.
14. Tsao FHC, Chen X, and Vu VX. Immunocharacterization and development regulation of rabbit lung calcium-dependent phospholipid-binding proteins. Biochim Biophy Acta 1994; 1213: 91-9.
15. Roth D, Morgan A, and Burgoyne RD. Identification of a key domain in annexin and 14-3-3 proteins that stimulate calcium-dependent exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells. FEBS 1993; 320(3): 207-10.
16. Ohnisni M, Tokuda M, Masaki T et al. Involvement of annexin-I in glucose-induced insulin secretion in rat pancreatic islets. Endocrinology 1995; 136(6): 2421-6.
17. Sun J, Salem HH, and Bird P. Nucleolar and cytoplasmic localization of annexin V. FEBS Lette 1992; 314: 425-9.
18. Koster JJ, Boastead CM, Middleton CA, and Walker JH. The sub-cellular localization of annexin V in cultured chick-embryo fibroblasts. Biochem J 1993; 291: 595-600.
19. Mizotani A, Usuda N, Tokumitsu H et al. CAP-50, a newly identified annexin, localized in nuclei of cultured fibroblast 3y1 cells. J biol Chem 1992; 267: 13498-504.
20. Sobota A, Bandorowicz J, Jezierski A, and Sikorski AF. The effect of annexin IV and VI on the fluidity of phosphotidylserine\ phosphatidyl choline bilayers studied with the use of 5-deoxylsterate spin label. FEBS Lett 1993; 315: 178-82.
21. Kaetzel MA, Chan HC, Dubinsky WP, Dedman JR, and Nelson DJ. Role for annexin IV in epithelium cell function. J Biol Chem 1994; 269(7): 5297-302.
22. Chang HC, Kaetzel MA, Gotter AL et al. Annexin IV inhibits calmodulin dependent protein kinase II activated chloride conductance. J Biol Chem 1994; 269(51): 32464-8.
23. Thiagarajan P, and Tait JF. Binding of annexin V/placental antico-agulant protein I to platelets. J Biol Chem 1990; 265: 17420-3.
24. Khanna NC, Helwig ED, Kkefbuchi NW, Fitzpatrick S, Bajwa R, and Waisman DM. Purification and characterization of annexin proteins from bovine lung. Biochemistry 1990; 29: 4852-62.

เฉลยคำตอบ

เฉลยรูปที่ 1-2 ผู้ป่วย acute myelogenous leukemia มักจะมาด้วย nonspecific symptom เช่น มีไข้ อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร เสมียร์เลือดผู้ป่วยรายนี้พบเซลล์เหมือน monoblast และมี gum infiltration น่าจะเป็นโรค AML (M5) ยืนยันการวินิจฉัยโดย ทำ bone marrow aspiration ยืนยันชนิดของเซลล์ได้โดยทำ histochemical staining โดยย้อม Sudan black B, Napthyl butyrate esterase

Monoblast และ monocyte ให้ Napthyl butyrate esterase +, ถ้าเป็น pure monoblast Sudan black B จะ negetive ส่วน myeloblast และ promyelocyte ให้สี Sudan black B +, แต่ Napthyl butyrate esterase -.

เฉลยรูปที่ 3 นึกถึงภาวะ Pelger Huet anomaly และ Pseudopelger Huet anomaly

Pelger Huet anomaly เป็น benign dominant inherited defect ของ PMN ถ้าเป็น homozygous gene นิวเคลียส จะมีลักษณะเป็นนิวเคลียสเดี่ยว กลม และ eccentric เซลล์มีการทำงานปกติ

Pseudopelger Huet anomaly พบในภาวะดังต่อไปนี้

1. Drug induce ได้แก่ Colchicine, Sulfonamide
2. AML
3. Myelodysplastic syndrome
4. Myelofibrosis

เฉลยรูปที่ 4 ใช้เทคนิค ELISA (enzyme - linked immunosorbent assay) ตรวจหา zeta - globin chain ในเลือด (จากงานวิจัย ของ ผศ.รัชนี อัศวรุ่งนิรันดร์ และคณะ พบว่าการทดสอบนี้มี sensitivity เท่ากับ 100% และ specificity เท่ากับ 99.5%)

อุบัติการของ α - thalassemia 1 ในกรุงเทพมหานครพบได้ร้อยละ 3.5