

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



245507



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การปรากฏของไกลโคสอะมิโนไกลแคนส์และกลไกการทำงาน
ของระบบ Fas-Fas ligand ในท่อนำไข่ของกระป๋องปลักไทย
ในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูทีเยล

โดย

ไพศาล เทียนไทย
พรชลิต อัสวชีพ

มีนาคม ๒๕๕๔



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การปรากฏของไกลโคสอะมิโนไกลแคนส์และกลไกการทำงาน
ของระบบ Fas-Fas ligand ในท่อนำไข่ของกระบือปลักไทย
ในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเทียล

โดย

ไพศาล เทียนไทย
พรชลิต อัสวชีพ

มีนาคม ๒๕๕๔

กิตติกรรมประกาศ

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์นี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี เนื่องจากได้รับการสนับสนุนจากเงินทุนโครงการวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2552 (ครั้งที่ 3) ทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

กราบขอบพระคุณ รศ.น.สพ.ดร. เกรียงยศ สัจจเจริญพงษ์ หัวหน้าภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกและอนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการของภาควิชาฯ และกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างพร้อมการบันทึกภาพเพื่อใช้ประกอบในรายงานการวิจัยฉบับนี้

ขอขอบคุณ รศ.น.สพ.ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ผลการวิจัยทางสถิติ

ขอขอบคุณ คุณพงษ์พิสุทธิ์ จิระเจริญ นิสิตมหาบัณฑิต สาขากายวิภาคศาสตร์ประยุกต์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและการดำเนินการวิจัยบางส่วน

ขอขอบคุณ คุณศิโรตม์ชัย เพียรชอบ คุณวิฑูรย์ มะบุตร และคุณจันทิมา อินทรปัญญา เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือในการตัดชิ้นเนื้อ การเตรียมอุปกรณ์ การเตรียมสีย้อม การเตรียมสารเคมีพื้นฐาน

ขอขอบคุณเจ้าของโรงฆ่าสัตว์ และผู้ที่เกี่ยวข้องทุกๆ ท่าน ที่ได้เอื้อเฟื้อและอำนวยความสะดวกให้กับคณะผู้วิจัยเข้าไปเก็บตัวอย่างของกระบือปลัก

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย)	การปรากฏของไกลโคสอะมีโนไกลแคนส์และกลไกการทำงานของระบบ Fas-Fas ligand ในท่อนำไข่ของกระบือปลักไทยในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูทีอัล
(ภาษาอังกฤษ)	The appearance of glycosaminoglycans and the regulation of Fas-Fas ligand system in Thai swamp buffalo (<i>Bubalus bubalis</i>) oviduct at the follicular and luteal phases

ชื่อหัวหน้าโครงการ

(ภาษาไทย)	รศ.น.สพ.ดร. ไพศาล เทียนไทย
(ภาษาอังกฤษ)	Assoc. Prof. Dr. Paisan Tienthai
ตำแหน่งทางวิชาการ	รองศาสตราจารย์ ระดับ 8 ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ. อังรีดุนังต์ แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0-2218-9658 โทรสาร 0-2218-9657

ชื่อผู้ร่วมโครงการ

(ภาษาไทย)	อ.น.สพ.ดร. พรชลิต อัสวชีพ
(ภาษาอังกฤษ)	Dr. Pornchalit Assawacheep
ตำแหน่งทางวิชาการ	อาจารย์ ระดับ 7 ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ. อังรีดุนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0-2218-9412 โทรสาร 0-2252-9575

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ระยะเวลาของโครงการวิจัย	1 ปี
งบประมาณรวม	400,000 บาท (สี่แสนบาทถ้วน)

ผลผลิต (Output)

1. Chivachareern, P. and Tienthai, P. 2010. Fas-L immunolocalization in Thai swamp buffalo oviduct. Proceedings of the 9th Chulalongkorn University Veterinary Annual Conference, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. Thai J. Vet. Med. Vol. 40(1), p. 113.
2. Tienthai, P., Chivachareern, P., Sajjarengpong, K. and Assavacheep, P. 2011. Fas ligand in swamp buffalo oviduct during follicular and luteal phases. Thai J. Vet. Med. 41(1): 21-29
3. Tienthai, P. 2011. Hyaluronan and sulphated glycosaminoglycans in Thai swamp buffalo oviduct at follicular and luteal phase. Reprod. Demest. Anim. (writing manuscript).

ชื่อโครงการวิจัย	การปรากฏของไกลโคสโอมิโนไกลแคนส์และกลไกการทำงานของระบบ Fas-Fas ligand ในท่อนำไข่ของกระบือปลักไทยในระยะฟอลลิคูลาร์ และระยะลูเทียล
ชื่อผู้วิจัย	ไพศาล เทียนไทย และ พรชลิต อัครวชิพ
เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ	กันยายน 2553

บทคัดย่อ

245507

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการปรากฏของไกลโคสโอมิโนไกลแคนส์ชนิดที่ไม่มีซัลเฟต (ไฮยาลูโรแนน) และชนิดที่มีซัลเฟต (syndecan-1, syndecan-2) การปรากฏของตัวรับ CD44 การปรากฏของโปรตีน Fas และ Fas ligand (FasL) รวมทั้งการแสดงออกของ FasL mRNA ภายในท่อนำไข่กระบือปลักไทย ซึ่งสัมพันธ์กับการทำงานของรังไข่ เก็บอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของกระบือปลักจากโรงฆ่าสัตว์จำนวนทั้งหมด 40 ตัว แบ่งกลุ่มของกระบือปลักออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะที่พบทางมหกายภาคของรังไข่ทั้งสองข้างคือ ระยะฟอลลิคูลาร์ (จำนวน 20 ตัว) และระยะลูเทียลช่วงกลาง (จำนวน 20 ตัว) อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียที่เก็บได้จะนำมาตรวจสอบและไม่มีคามผิดปกติทางพยาธิวิทยา จากนั้นจึงนำตัดแบ่งท่อนำไข่ออกเป็น 4 ส่วนประกอบด้วย ส่วนรอยต่อของปีกมดลูกและท่อนำไข่ (uterotubal junction, UTJ) อีสร์มีส แอมพูลลา และอินฟินิติบูลัม เก็บชิ้นเนื้อตัวอย่างส่วนหนึ่งใน 4% พาราฟอร์มัลดีไฮด์ ผ่านกระบวนการทำพาราฟิน นำมาศึกษาการปรากฏของไฮยาลูโรแนนด้วยวิธีฮิสโตเคมี ศึกษาการปรากฏของ syndecan-1, syndecan-2, CD44, Fas, FasL ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี และชิ้นเนื้ออีกส่วนหนึ่งที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จะนำมาสกัดแยก RNA เพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของ FasL mRNA ด้วยวิธี RT-PCR ผลการศึกษาเกี่ยวกับไกลโคสโอมิโนไกลแคนส์ พบการปรากฏของไฮยาลูโรแนน syndecan-1 และ syndecan-2 อย่างเด่นชัดในท่อนำไข่กระบือปลัก โดยการปรากฏของไฮยาลูโรแนนและ syndecan-2 เท่านั้นที่พบความเข้มข้นในการติดสีบวกเข้มชัดเจนในส่วน UTJ และอีสร์มีสเมื่อเปรียบเทียบกับท่อนำไข่ส่วนอื่น และปรากฏชัดเจนมากในระยะฟอลลิคูลาร์ ขณะที่ตัวรับของไฮยาลูโรแนน CD44 ปรากฏที่เซลล์เยื่อของท่อนำไข่ทุกส่วนโดยเฉพาะในระยะฟอลลิคูลาร์ สำหรับการศึกษาการทำงานของระบบ Fas-FasL พบว่า การปรากฏของโปรตีน Fas สามารถพบได้ในเยื่อผิวท่อนำไข่กระบือปลักทุกส่วน โดยไม่พบความแตกต่างในระดับความเข้มของการติดสีบวกเมื่อเปรียบเทียบในท่อนำไข่แต่ละส่วน และระหว่างระยะของวงรอบการเป็นสัด ขณะที่ การปรากฏของโปรตีน FasL ภายในท่อนำไข่กระบือส่วน UTJ และอีสร์มีสในระยะฟอลลิคูลาร์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะลูเทียลช่วงกลาง สัมพันธ์กับการแสดงออกของ FasL mRNA ซึ่งแถบความเข้มพบได้อย่างเด่นชัดใน UTJ และอีสร์มีสโดยเฉพาะระยะฟอลลิคูลาร์ โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะลูเทียลช่วงกลาง ผลการศึกษาที่ได้ระบุเป็นครั้งแรกในกระบือปลักถึงการทำหน้าที่ของไฮยาลูโรแนนซึ่งอาจทำงานร่วมกับ CD44 เพื่อรักษาการมีชีวิตรอดของเซลล์อสุจิในช่วงก่อนการตกไข่ รวมทั้งหน้าที่ของ syndecan-2 ซึ่งเป็นปัจจัยร่วมที่อาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการคาปาซิเตชันและการปลดปล่อยของเซลล์อสุจิภายในบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิ นอกจากนี้ การปรากฏของโปรตีน Fas และ FasL และการแสดงออกของ FasL mRNA ในบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิอาจเป็นข้อมูลสนับสนุนว่า ท่อนำไข่กระบือปลักมีกลไกที่จัดเป็นอวัยวะที่เรียกว่า immune privileged organ

คำสำคัญ ไฮยาลูโรแนน ชนิดแคนส์ ระบบ Fas และ Fas ligand ท่อนำไข่ กระบือปลัก

Project title	The appearance of glycosaminoglycans and the regulation of Fas-Fas ligand system in Thai swamp buffalo (<i>Bubalus bubalis</i>) oviduct at the follicular and luteal phases
Name of the investigators	Paisan Tienthai and Pornchalit Assavacheep
Month and year	September, 2010

Abstract

245507

The objectives of the present study were to investigate the localization of non-sulphated (hyaluronan), sulphated (syndecan-1, syndecan-2) glycosaminoglycans (GAGs), CD44, Fas and Fas ligand (FasL) proteins as well as the expression of FasL mRNA in the Thai swamp buffalo oviducts in relation to ovarian functions. The reproductive tracts of female swamp buffalo (n=40) were collected from local abattoirs and were classified into 2 groups by the macroscopic characteristics of both ovaries, i.e. follicular phase (n=20) and mid-luteal phase (n=20). All reproductive organs used in this study were thoroughly examined and showed no pathological conditions. The oviduct was divided into 4 parts composed of uterotubal junction (UTJ), isthmus, ampulla and infundibulum. The specimens fixed in 4% paraformaldehyde were embedded in paraffin and for determining the presence of hyaluronan by histochemistry and the presence of syndecan-1, syndecan-2, Fas and FasL proteins by Immunohistochemistry. The other oviductal specimens were kept in -20°C for isolating total RNA to study the FasL mRNA expression by RT-PCR. The results about the GAGs revealed that the hyaluronan, syndecan-1 and syndecan-2 were found in all segments of swamp buffalo oviducts, however, the strong intensity of hyaluronan and syndecan-2 were obviously found in UTJ and isthmus (as sperm reservoir) compared to the other portions, and particularly presence at follicular phase. In addition, hyaluronan receptor CD44 has been detected in all oviductal portions, particularly during follicular phase. For the Fas-FasL system, the results demonstrated that Fas protein was generally localized within the epithelial layer of every oviductal segment without any statistically significances in the intensity of positive staining. On the other hands, the appearance of FasL protein was obviously found in UTJ and isthmus during follicular phase compared to mid-luteal phase and other oviductal segments ($P<0.05$) in association with the expression of FasL mRNA which was shown in the sperm reservoir at follicular phase different from other oviductal portions and mid-luteal phase ($P<0.05$). These findings demonstrated for the first time in the swamp buffalo suggesting that the hyaluronan might function via CD44 in the maintenance of sperm viability during pre-ovulation and of syndecan-2 in the sperm capacitation and the sperm releasing in the sperm reservoir. Furthermore, the presence of Fas-FasL proteins and the expression of FasL mRNA in the sperm reservoir might support the Fas-FasL system related to the immune privilege organ in the swamp buffalo oviduct.

Keywords: Hyaluronan, Syndecans, Fas-Fas ligand system, Oviduct, Swamp buffalo

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ii
รายละเอียดของโครงการ.....	iii
บทคัดย่อภาษาไทย.....	iv
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	v
สารบัญ.....	vi
รายการตารางประกอบ.....	vii
รายการรูปประกอบ.....	viii
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 ทบทวนผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	12
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	15
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ.....	31
เอกสารอ้างอิง.....	40
การเผยแพร่ผลงานวิจัย.....	46
ตารางแสดงรายละเอียดการใช้งินงบประมาณ.....	47

รายการตารางประกอบ

	หน้า
ตารางที่ 1 ระดับความเข้มในการติดสีบวกของไฮยาลูโรแนน.....	15
ตารางที่ 2 ระดับความเข้มในการติดสีบวกโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีของ syndecan-1.....	18
ตารางที่ 3 ระดับความเข้มในการติดสีบวกโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีของ syndecan-2.....	18
ตารางที่ 4 ระดับความเข้มในการติดสีบวกโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีของ CD44.....	21
ตารางที่ 5 ระดับความเข้มในการติดสีบวกโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีของโปรตีน Fas.....	23
ตารางที่ 6 ระดับความเข้มในการติดสีบวกโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีของโปรตีน FasL.....	27

รายการรูปประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 การปรากฏทางฮิสโตเคมีของไฮyalูโรแนนในท่อน้ำไขกระดูก.....	16
รูปที่ 2 การปรากฏทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของ syndecan-1 ในท่อน้ำไขกระดูก.....	19
รูปที่ 3 การปรากฏทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของ syndecan-2 ในท่อน้ำไขกระดูก.....	20
รูปที่ 4 การปรากฏทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของ CD44 ในท่อน้ำไขกระดูก.....	22
รูปที่ 5 การติดสีบวกของโปรตีน Fas ในสไลด์ควบคุมบวกโดยใช้ต่อมน้ำเหลือง.....	23
รูปที่ 6 การปรากฏทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของโปรตีน Fas ในท่อน้ำไขกระดูก.....	24
รูปที่ 7 ระดับความเข้ม (intensity score, ค่าเฉลี่ย \pm SD) ในการติดสีบวกของโปรตีน Fas.....	25
รูปที่ 8 การติดสีบวกโดยปรากฏเห็นเป็นสีน้ำตาลของโปรตีน FasL ในสไลด์ควบคุมบวก.....	27
รูปที่ 9 การปรากฏทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของโปรตีน FasL ในท่อน้ำไขกระดูก.....	28
รูปที่ 10 ระดับความเข้ม (intensity score, ค่าเฉลี่ย \pm SD) ในการติดสีบวกของโปรตีน FasL.....	29
รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ในการแสดงออกของ FasL mRNA โดยวิธี RT-PCR ในชั้นเยื่อ ของท่อน้ำไขกระดูก.....	30
รูปที่ 12 อัตราส่วน (%) ของระดับความเข้มในการแสดงออกของ FasL: β -actin ที่ปรากฏ ในท่อน้ำไขกระดูก.....	30