



แบบรายงานการวิจัย
ทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่/นักวิจัยใหม่

เรื่อง ผลของอายุต่อการแสดงออกของตัวรับฟอลลิเคิลสติมิวเลติงฮอร์โมนและ
เอปปีนในอัณฑะลิงแสม

Effect of Age on the Expression of Follicle Stimulating Hormone
Receptor (FSHR) and Eppin in Macaque Testes

โดย

อาจารย์ สพ.ญ.ดร.สร้อยสุดา โชติมานุกุล

ศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.เกวลิ ฉัตรตรงค์ (อาจารย์ที่ปรึกษา)

ภาควิชาสัตวศาสตร์ เหนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่) ประจำปีงบประมาณ 2561 และได้รับความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างจาก ผศ.น.สพ.ดร.ชลวัฒน์ พัชรินทร์ศักดิ์ และ น.สพ.ธราธร เข้มทอง

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	6
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	6
1.3 วิธีการดำเนินการวิจัย	7
บทที่ 2 การศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
บทที่ 3 วิธีการศึกษา	
3.1 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในเนื้อเยื่อ testis ลิงแสม ก่อนวัยเจริญพันธุ์และวัยเจริญพันธุ์	10
3.2 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในเนื้อเยื่อ testis และ caudal epididymis ลิงแสมในวัยเจริญพันธุ์	17
บทที่ 4 การวิเคราะห์ข้อมูล	
4.1 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในเนื้อเยื่อ testis ลิงแสม ก่อนวัยเจริญพันธุ์และวัยเจริญพันธุ์	27
4.2 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในเนื้อเยื่อ testis และ caudal epididymis ลิงแสมในวัยเจริญพันธุ์	27
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	29
เอกสารอ้างอิง	31

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	การควบคุมของฮอร์โมน GnRH ที่ hypothalamus ในการสังเคราะห์ฮอร์โมน FSH และ LH จาก anterior pituitary gland	8
รูปที่ 2	การควบคุมการทำงานของอวัยวะโดยฮอร์โมน FSH และ LH ในกระบวนการสร้างตัวอสุจิและกระบวนการสร้างฮอร์โมนเพศผู้ตามลำดับ โดยมีกระบวนการควบคุมย้อนกลับอย่างเป็นอิสระต่อกัน	9
รูปที่ 3	ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ testis โดยใช้ Biopsy gun	11-13
รูปที่ 4	แสดงตัวอย่าง Protein ladder (Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder) ที่ 12% gel Tris-Glycine	14
รูปที่ 5	โปรตีนที่แยกได้จาก SDS-PAGE (M, J, S)	15
รูปที่ 6	Western blot analysis ของโปรตีน FSHR จาก testis ลิงแสม ้วยเจริญพันธุ์ ที่ molecular weight ~70-75 kDa	16
รูปที่ 7	กราฟ standard curve ความเข้มข้นของโปรตีน FSHR	18
รูปที่ 8	SDS-PAGE gel ที่แยกขนาด FSHR protein เทียบกับ protein marker	19
รูปที่ 9	The Mini Trans-Blot [®]	19
รูปที่ 10	PVDF membrane ที่ activate ใน methanol	20
รูปที่ 11	ขั้นตอนการโปรตีนจากแผ่นเจลไปยัง membrane ด้วยเครื่อง The Mini Trans-Blot [®]	21
รูปที่ 12	ขั้นตอนการ block membrane ด้วย 5% BSA	21
รูปที่ 13	เครื่องถ่ายภาพ ChemiDoc [™] XRS+ (BIO-RAD)	22
รูปที่ 14	SDS-PAGE FSHR protein (M, 1C-3C)	23
รูปที่ 15	SDS-PAGE FSHR protein (M, 10C-4C)	23
รูปที่ 16	SDS-PAGE FSHR protein (M, 1T-2T)	24
รูปที่ 17	SDS-PAGE FSHR protein (M, 10T-3T)	24

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 18	Western blot analysis ของโปรตีน FSHR และโปรตีน beta Actin จาก Caudal epididymis (M, 1C-3C)	25
รูปที่ 19	Western blot analysis ของโปรตีน FSHR และโปรตีน beta Actin จาก Caudal epididymis และ Testis (M, 10C-2T)	25
รูปที่ 20	Western blot analysis ของโปรตีน FSHR และโปรตีน beta Actin จาก Testis (M, 10T-3T)	26
รูปที่ 21	ตัวอย่าง band ของ Anti-beta Actin antibody (ab 8227) molecular weight 40 kDa ที่ใช้เป็น control	26
รูปที่ 22	แสดงปริมาณโปรตีน FSHR และ beta Actin โดยใช้โปรแกรม ImageJ T = testis, C = caudal epididymis	27-28

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มีและความสำคัญของปัญหา

การควบคุมประชากรสัตว์มีความสำคัญในแง่ของสวัสดิภาพสัตว์ และเกี่ยวข้องกับความปลอดภัยของมนุษย์ที่อยู่ในบริเวณเดียวกับสัตว์ซึ่งอาศัยอยู่ตามธรรมชาติ (Takeshita et al., 2017) ปัจจุบันในประเทศไทยมีการเพิ่มจำนวนประชากรของลิงมะแคคอย่างรวดเร็วจนในธรรมชาติ รวมไปถึงในสวนสัตว์เปิด ทำให้เกิดปัญหาสำคัญในระดับประเทศ รวมไปถึงปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญคือโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน เช่น โรคพิษสุนัขบ้า ดังนั้นจึงนำไปสู่การคิดค้นและพัฒนาวิธีการคุมกำเนิดลิงแสม เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งกระบวนการสร้างตัวอสุจิ แต่ไม่ส่งผลต่อการผลิตฮอร์โมนเพศผู้ (androgen) เนื่องจากสัตว์ที่มีพฤติกรรมการดำรงชีวิตอยู่ร่วมกันเป็นฝูงจำเป็นจะต้องมีจำฝูง ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีความสัมพันธ์อย่างยิ่งกับพฤติกรรมการสืบพันธุ์ ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการเป็นจำฝูง ได้แก่ ความแข็งแรงของร่างกาย ความสามารถในการต่อสู้ มวลกล้ามเนื้อในร่างกาย ล้วนแล้วแต่มีความสัมพันธ์กันระดับฮอร์โมนเพศผู้ (Bribiescas, 2001) ดังนั้นตัวผู้ที่จะดำรงชีวิตเป็นจำฝูงคุมฝูงอยู่ได้ จำเป็นที่จะต้องมียกระดับฮอร์โมนเพศผู้ที่สูงกว่าตัวผู้ตัวอื่นๆ ในฝูง (Higham et al., 2013) วิธีการคุมกำเนิดโดยการผ่าตัดทำหมันในเพศผู้โดยวิธีการตัดอวัยวะออก (castration) จะส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมทางสังคมในฝูงลิง (Takeshita et al., 2017) จึงไม่ใช่วิธีการคุมกำเนิดที่เหมาะสมในลิง ในขณะที่การตัดท่อนำน้ำเชื้อ (vasectomy) สามารถนำมาใช้คุมกำเนิดลิงได้ เนื่องจากไม่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนเพศ แต่อย่างไรก็ตามต้องมีขั้นตอนการจัดการที่ซับซ้อน และลิงยังมีความเสี่ยงต่อการวางยาเสพติดด้วย ผู้วิจัยจึงมีแนวทางที่จะศึกษาถึงวิธีการในการคุมกำเนิดโดยการระบุเป้าหมายจำเพาะในระดับโมเลกุล เพื่อให้เกิดการยับยั้งอย่างจำเพาะที่ follicle stimulating hormone receptor (FSHR) ในอวัยวะ ซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายของ follicle stimulating hormone (FSH) ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างตัวอสุจิโดยตรง แนวทางในการคิดค้นยาคุมกำเนิดที่สามารถยับยั้ง FSHR อย่างจำเพาะ จำเป็นที่จะต้องมีความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับเซลล์เป้าหมายของยาคุมกำเนิดดังกล่าว ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาการถึงการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในของอวัยวะของลิงแสม เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนายาคุมกำเนิดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง FSHR อย่างจำเพาะต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในเนื้อเยื่อ testis ของลิงแสมในช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์และช่วงวัยเจริญพันธุ์
2. ศึกษาการแสดงออกและปริมาณโปรตีน FSHR ในเนื้อเยื่อ testis และ caudal epididymis ของลิงแสมในช่วงวัยเจริญพันธุ์

1.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

1.3.1 ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.3.2 วิธีการศึกษา แบ่งเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1: ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในเนื้อเยื่อ testis ลิงแสมก่อนวัยเจริญพันธุ์และวัยเจริญพันธุ์

1. เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ testis ลิงแสมก่อนวัยเจริญพันธุ์และวัยเจริญพันธุ์ โดยวิธีการทำ biopsy
2. สกัดโปรตีน FSHR จากตัวอย่างเนื้อเยื่อ testis
3. ตรวจวัดปริมาณโปรตีน FSHR
4. ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FSHR โดยวิธี western blot analysis

ส่วนที่ 2: ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในเนื้อเยื่อ testis และ caudal epididymis ลิงแสมในวัยเจริญพันธุ์

1. เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ testis และ caudal epididymis ลิงแสมในวัยเจริญพันธุ์ จากการทำหมันโดยวิธี castration
2. สกัดโปรตีน FSHR จากตัวอย่างเนื้อเยื่อ testis และ caudal epididymis
3. ตรวจวัดปริมาณโปรตีน FSHR
4. ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FSHR โดยวิธี western blot analysis

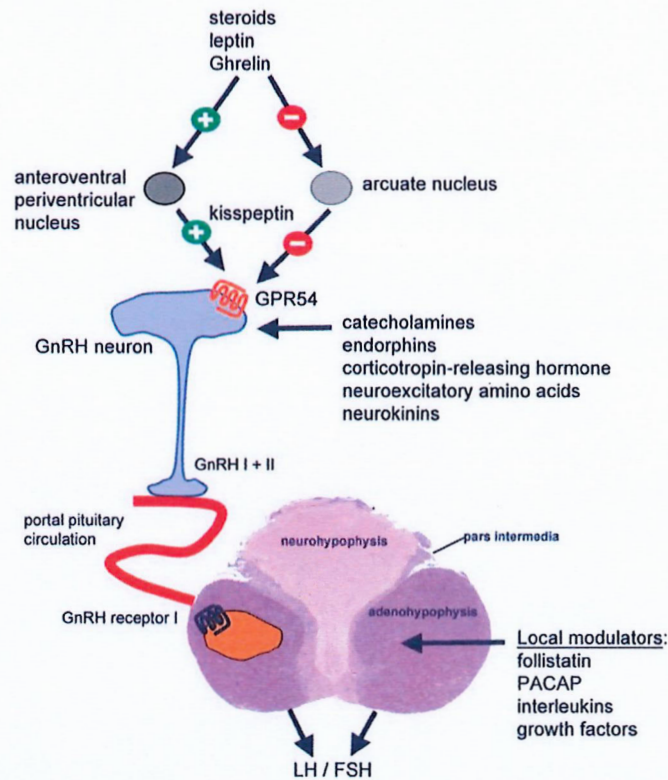
1.3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน FSHR ในเนื้อเยื่อ testis และ caudal epididymis จากผลของการทำ western blot analysis โดยใช้โปรแกรม ImageJ และทำการเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของโปรตีน FSHR ใน testis และ caudal epididymis โดย independent t-test

1.3.4 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

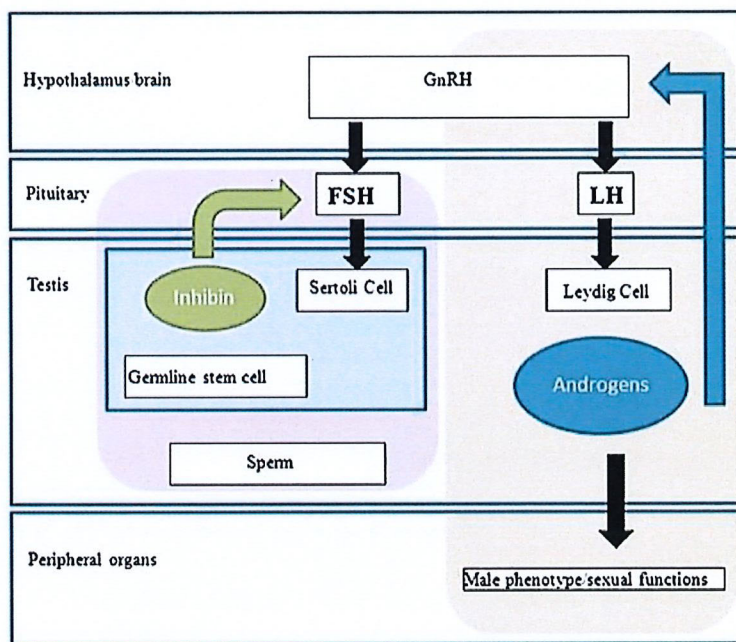
บทที่ 2 การศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กระบวนการในการสืบพันธุ์ของสัตว์เพศผู้เกี่ยวข้องกับการทำงานของฮอร์โมนในร่างกาย ซึ่งมีการทำงานเป็นวงจรที่เรียกว่า Hypothaloma-Hypophyseal-Gonadal Loop โดย hypothalamus จะมีการหลั่งฮอร์โมน GnRH จาก GnRH neuron ไปกระตุ้นต่อมใต้สมอง (pituitary gland) ซึ่งต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland) จะหลั่งฮอร์โมนที่สำคัญเกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์คือ follicle stimulating hormone (FSH) และ luteinizing hormone (LH) โดยผ่านการควบคุมของยีนหลายชนิด (Weinbauer et al., 2008) ตามรูปที่ 1



รูปที่ 1 การควบคุมของฮอร์โมน GnRH ที่ hypothalamus ในการสังเคราะห์ฮอร์โมน FSH และ LH จาก anterior pituitary gland (Weinbauer et al., 2008)

ในระบบสืบพันธุ์เพศผู้ฮอร์โมน LH จะไปกระตุ้น Leydig cell ภายในอัณฑะให้มีการหลั่งฮอร์โมนเพศผู้ (androgen) ในขณะที่ฮอร์โมน FSH ไปกระตุ้นที่ Sertoli cell ภายในอัณฑะซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการสร้างตัวสุจิ (spermatogenesis) (Schlatt and Ehmcke, 2014) ตามรูปที่ 2



รูปที่ 2 การควบคุมการทำงานของอวัยวะโดยฮอร์โมน FSH และ LH ในกระบวนการสร้างตัวอสุจิและกระบวนการสร้างฮอร์โมนเพศผู้ตามลำดับ โดยมีกระบวนการควบคุมย้อนกลับอย่างเป็นอิสระต่อกัน (Schlatt and Ehmcke, 2014)

ฮอร์โมน FSH จึงมีความสำคัญต่อระบบสืบพันธุ์เพศผู้ เนื่องจากเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างและการพัฒนาของตัวอสุจิ ฮอร์โมน FSH จะออกฤทธิ์ได้ต่อเมื่อจับกับตัวรับ FSH (FSHR) ซึ่งอยู่ที่ Sertoli cells ในอวัยวะของเพศผู้ (Heckert and Griswold, 1991; Yan et al., 2015) โดยพบว่าตำแหน่ง extracellular domain (ECD) ของ FSHR มีความจำเพาะและสำคัญต่อการจับกันระหว่าง FSH และ FSHR (Dias and Van Roey, 2001; Kene et al., 2005) ตำแหน่ง ECD ของ FSHR จึงเป็นเป้าหมายสำคัญในการพัฒนายาคูมกำเนิดที่ออกฤทธิ์อย่างจำเพาะในการยับยั้งกระบวนการสร้างตัวอสุจิ (Abdennebi et al., 2003; Yan et al., 2015) มีการศึกษาทั่วโลกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างตัวอสุจิอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในคนและในหนู (Oduwale et al., 2018) โดยมีรายงานว่า Sertoli cells มีการพัฒนาอย่างมากตั้งแต่ช่วงที่ยังเป็นตัวอ่อนฟัตัส เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับกระบวนการสร้างตัวอสุจิเมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ ทั้งนี้ยังมีผลการศึกษาที่หลากหลายซึ่งเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ FSHR ในช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์และในวัยเจริญพันธุ์ ดังนั้นเพื่อยืนยันถึงการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในอวัยวะของลิงแสม จึงทำการศึกษารายการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในลิงแสมแต่ละช่วงอายุ รวมไปถึงในเนื้อเยื่อที่มีโอกาสแสดงโปรตีน FSHR ที่จะเกี่ยวข้องกับการสร้างตัวอสุจิ ทั้งนี้ก็เพื่อที่จะนำไปสู่การพัฒนาการกำเนิดที่ออกฤทธิ์อย่างจำเพาะกับ FSHR และให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งกระบวนการสร้างตัวอสุจิในลิงแสมต่อไป

บทที่ 3 วิธีการศึกษา

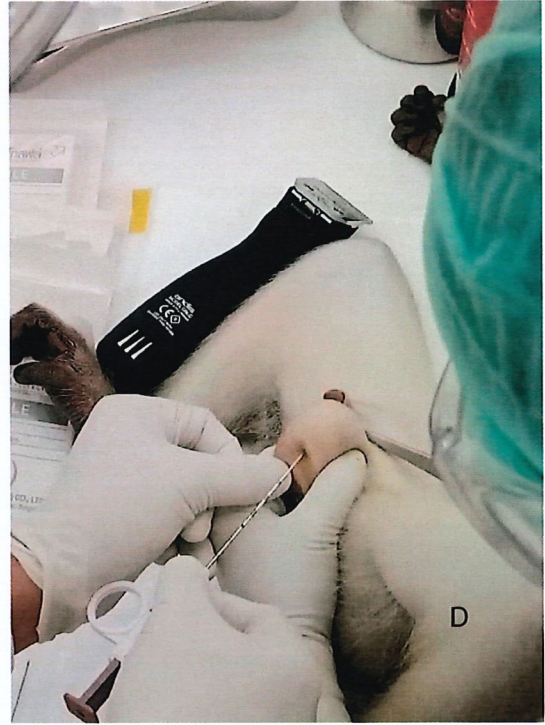
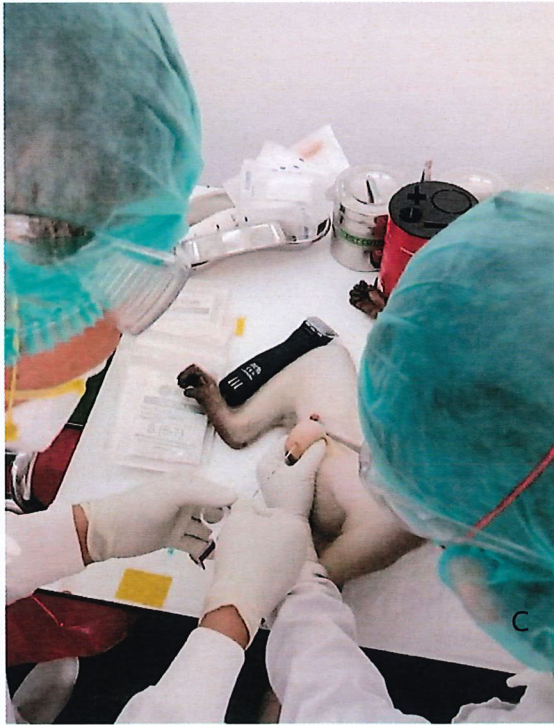
3.1 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในเนื้อเยื่อ testis ลิงแสมก่อนวัยเจริญพันธุ์และวัยเจริญพันธุ์

1. สัตว์ทดลอง

ลิงแสมเพศผู้ ก่อนวัยเจริญพันธุ์ อายุ 3 ปี 5 เดือน น้ำหนัก 3.72 กิโลกรัม และลิงแสมเพศผู้ วัยเจริญพันธุ์ อายุ 6 ปี 7 เดือน น้ำหนัก 10.13 กิโลกรัม จากศูนย์วิจัยไพรเมทแห่งชาติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถูกเลือกมาใช้ในการศึกษา ทำการวางยาสลบด้วย Ketamine 3 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เข้ากล้ามเนื้อ และ Medetomidine 0.15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เข้ากล้ามเนื้อ และให้ยาลดปวด Tolfenamic acid 4 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ Tramadol 4 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เข้าใต้หนัง (Protocol Review No. 1975002)

2. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ testis โดยวิธี biopsy

ลิงที่ได้ทำการวางยาสลบแล้วถูกนำเข้ามาในบริเวณตำแหน่งที่จะทำการเก็บเนื้อเยื่อ testis และทำความสะอาดรอบๆ บริเวณที่จะทำการเก็บตัวอย่างโดยวิธี aseptic technique ทำการเก็บตัวอย่างด้วยวิธีปลอดเชื้อ โดยใช้ Biopsy gun รุ่น SuperCore™ Semi-Automatic Biopsy Instrument ขนาด 20 G x 9 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างที่ตำแหน่ง cranial part ของ testis โดยดัน testis ให้มาอยู่ติดกับ scrotal sac และระวังไม่ให้โดน epididymis และหลอดเลือด (รูปที่ 3) หลังจากแทงเข็มและตัดชิ้นเนื้อเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ทำการกดห้ามเลือดด้วยก๊อชปลอดเชื้อ แตะฆ่าเชื้อและนำลิงกลับไปยังห้องพักฟื้น เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้มาใน Eppendorf แช่ใน ice box ที่อุณหภูมิ -20 °C จากนั้นนำชิ้นเนื้อกลับมาที่ห้องปฏิบัติการ แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อรอสกัดโปรตีนในขั้นตอนถัดไป







รูปที่ 3 (A-I) ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ testis โดยใช้ Biopsy gun

3. การสกัดโปรตีน (Protein extraction)

ทำการสกัดโปรตีน โดยใส่ชิ้นเนื้อ testis, Ripa buffer (Thermo Scientific™, cat. no. 89900) และ protease inhibitor ลงในหลอด tissue homogenizing จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง homogenizer (Minilyse®, Bertin Instruments) แล้วปั่นด้วยความเร็ว 5,000 rpm 30 วินาที 3 รอบ จากนั้นดูดส่วนใสใส่ใน eppendorf แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rcf 10 นาที 4 °C แล้วจึงดูดส่วนใสใส่ eppendorf เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอตรวจต่อไป

4. การวัดปริมาณโปรตีน (Protein concentration)

ตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี bichoninic acid assay (BCA) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific)

5. Western blot analysis

1) SDS PAGE Preparation

เตรียม 12% SDS-PAGE gel

2) Loading and running gel

- โหลดตัวอย่างโปรตีนที่วัดความเข้มข้นแล้วปริมาณ 5 µg ลงในแต่ละเวลของ SDS-PAGE gel และโหลด protein marker ที่ขนาด molecular weight ลงในเวล (รูปที่ 4)
- นำโปรตีน FHSR มาแยกขนาดโดยใช้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เป็นระยะเวลา 180 นาที ที่ 120 volt (รูปที่ 10) นำแผ่นเจลไปถ่ายรูปด้วยเครื่อง ChemiDoc™ XRS+ (Bio-rad)



รูปที่ 4 แสดงตัวอย่าง Protein ladder (Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder) ที่ 12% gel Tris-Glycine

3) ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปสู่ PVDF membrane โดยใช้เครื่อง The Mini Trans-Blot® (BIO-RAD)

โดยต้องทำการ activate PVDF ด้วย methanol 3 นาที ทำการ transfer โปรตีนจากเจลไปยัง PVDF membrane ที่ 350 mA, 50-60 volt เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

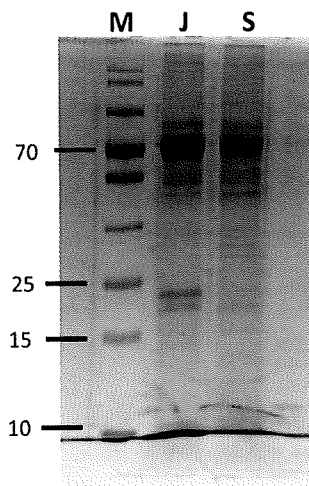
- ล้าง membrane ด้วย TBS-T 1 รอบ รอบละ 5 นาที
- Block membrane ด้วย 5% BSA บ่ม 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
- ล้าง membrane ด้วย TBS-T 3 รอบ รอบละ 5 นาที
- บ่ม Primary antibody: Anti-FSH-R antibody (ab150557), 1:1000 (v/v) ที่ 4°C ซ้ำมคืน
- ล้าง membrane ด้วย TBS-T 3 รอบ รอบละ 10 นาที

- บ่ม Secondary antibody: Goat Anti-Rabbit IgG, HRP-conjugate (cat. #12-348), 1:5000 (v/v)
- ล้าง membrane ด้วย TBS-T 3 รอบ รอบละ 10 นาที
- บ่ม ECL substrate (Western Lightning® ECL Pro) 5 นาที
- นำไปดูผลภายใต้เครื่องถ่ายภาพ ChemiDoc™ XRS+ (BIO-RAD)

6. ผลการทดลอง

6.1 12% SDS-PAGE

โปรตีนที่สกัดจากเนื้อเยื่ออัมพาตหลังผสมก่อนวัยเจริญพันธุ์และวัยเจริญพันธุ์ สามารถแยกได้จาก SDS-PAGE (รูปที่ 6)



รูปที่ 5 โปรตีนที่แยกได้จาก SDS-PAGE (M, J, S)

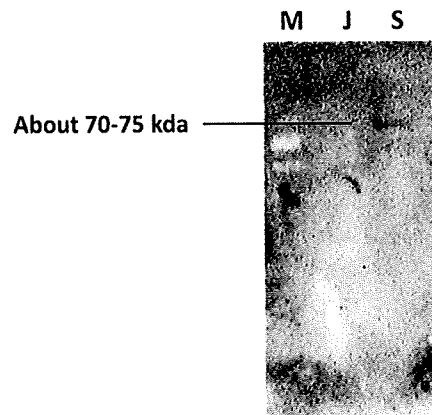
M = Protein marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa Catalog number: 26616)

J = ก่อนวัยเจริญพันธุ์

S = วัยเจริญพันธุ์

6.2 Immunoblot

ผล Western blot analysis ของโปรตีน FSHR พบการแสดงออกของโปรตีน FSHR ใน testis จากการ
ทำ biopsy ลิ้นแสมวัยเจริญพันธุ์ ที่ molecular weight ~70-75 kDa แต่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน FSHR
ใน testis ของลิ้นแสมก่อนวัยเจริญพันธุ์ (รูปที่ 7)



รูปที่ 6 Western blot analysis ของโปรตีน FSHR จาก testis ลิ้นแสมวัยเจริญพันธุ์ ที่ molecular weight
~70-75 kDa

M = Protein marker (Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder Lot:

00648852 Pub: No. MAN0011772)

J = ก่อนวัยเจริญพันธุ์, Protein concentration 5 μ g/well

S = วัยเจริญพันธุ์, Protein concentration 5 μ g/well

3.2 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในเนื้อเยื่อ testis และ caudal epididymis ลิงแสมในวัยเจริญพันธุ์

1. สัตว์ทดลอง

ลิงแสมเพศผู้ วัยเจริญพันธุ์ จำนวน 10 ตัว อายุระหว่าง 6-9 ปี น้ำหนักระหว่าง 6-8 กิโลกรัม ที่จะทำหมันโดยวิธีการ castration จากศูนย์วิจัยไพรเมทแห่งชาติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถูกเลือกมาใช้ในการศึกษา

2. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ testis และ caudal epididymis

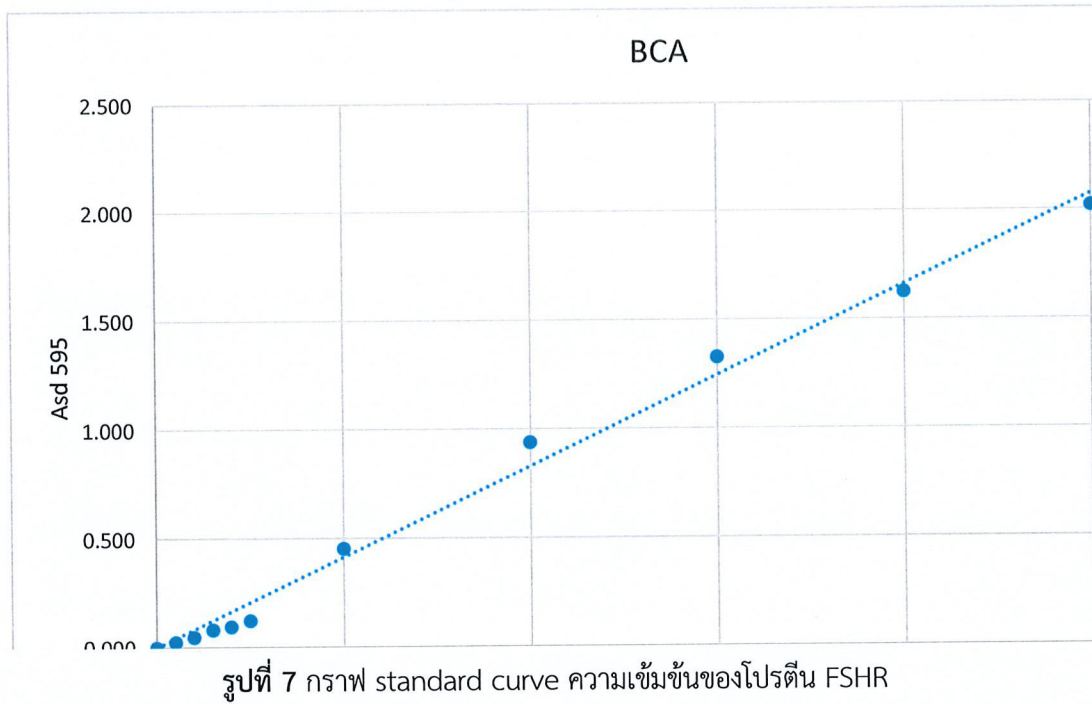
เมื่อได้อัตมาแล้วทำการชั่งน้ำหนักและตัดเปิดเยื่อ tunica vaginalis จากนั้นใช้กรรไกรตัดแยกโครงสร้างของ testis ออกจาก epididymis รวมทั้งแยกเส้นเลือดออก ตัดเนื้อเยื่อ testis ให้มีขนาดประมาณ 0.5x0.5x0.5 เซนติเมตร และ ตัดเนื้อเยื่อส่วน caudal epididymis เก็บในหลอด cryotube จากนั้นทำการแช่ลงในถัง liquid nitrogen เมื่อถึงห้องปฏิบัติการทำการเก็บตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อรอสกัดโปรตีนในขั้นตอนถัดไป

3. การสกัดโปรตีน (Protein extraction)

ชั่งน้ำหนักชิ้นเนื้อ testis และ caudal epididymis จากนั้นใช้ใบมีดตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อให้มีขนาดเล็ก แล้วใส่ลงในหลอด tissue homogenizing เพื่อทำการสกัดโปรตีน โดยใส่ Ripa buffer (Thermo Scientific™, cat. no. 89900) และ protease inhibitor นำไปเข้าเครื่อง homogenizer (Minilyse®, Bertin Instruments) ปั่นด้วยความเร็ว 5,000 rpm 30 วินาที 3 รอบ จากนั้นดูดส่วนใสใส่ใน eppendorf แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rcf 10 นาที 4 °C แล้วจึงดูดส่วนใสใส่ eppendorf เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอตรวจต่อไป

4. การวัดปริมาณโปรตีน (Protein concentration)

ตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี bichoninic acid assay (BCA) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) โดยทำ 3 ซ้ำ เทียบกับค่า standard curve (รูปที่ 9)



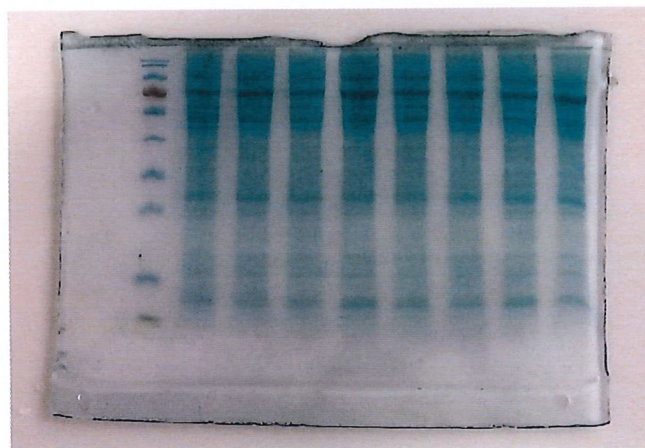
5. Western blot analysis

2) SDS PAGE Preparation

เตรียม 12% SDS-PAGE gel

4) Loading and running gel

- โหลดตัวอย่างโปรตีนที่วัดความเข้มข้นแล้วปริมาณ 5 μg ลงในแต่ละเวลของ SDS-PAGE gel และโหลด protein marker ที่ขนาด molecular weight ลงในเวลา
- นำโปรตีน FHSR มาแยกขนาดโดยใช้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เป็นระยะเวลา 180 นาที ที่ 120 Volt (รูปที่ 10) นำแผ่นเจลไปถ่ายรูปรูปด้วยเครื่อง ChemiDoc™ XRS+ (Bio-rad)



รูปที่ 8 SDS-PAGE gel ที่แยกขนาด FSHR protein เทียบกับ protein marker

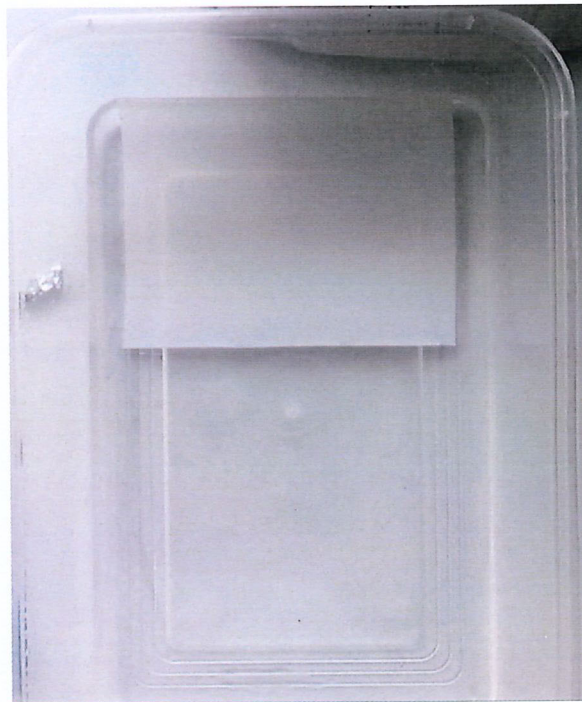
- ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปสู่ PVDF membrane โดยใช้เครื่อง The Mini Trans-Blot® (BIO-RAD) (รูปที่ 11) โดยต้องทำการ activate PVDF ด้วย methanol 3 นาที (รูปที่ 12) ทำการ transfer โปรตีนจากเจลไปยัง PVDF membrane ที่ 350 mA, 50-60 volt เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (รูปที่ 13)

BIO-RAD

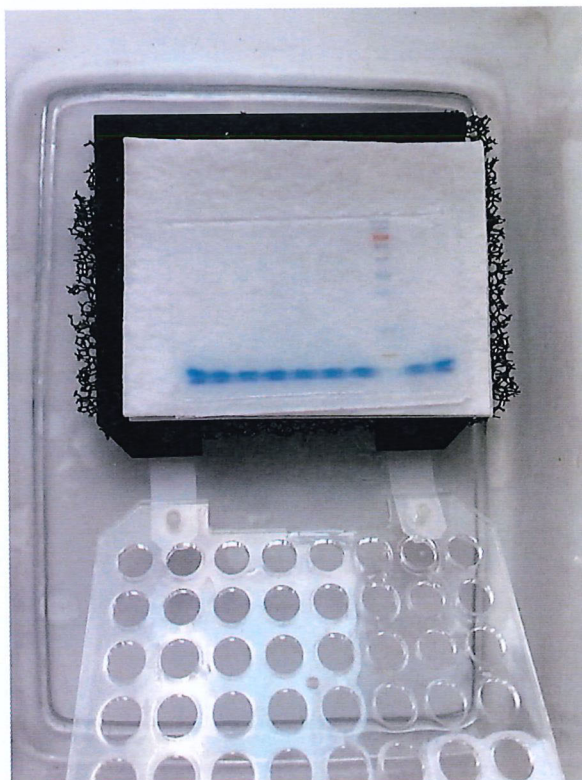


รูปที่ 9 The Mini Trans-Blot®

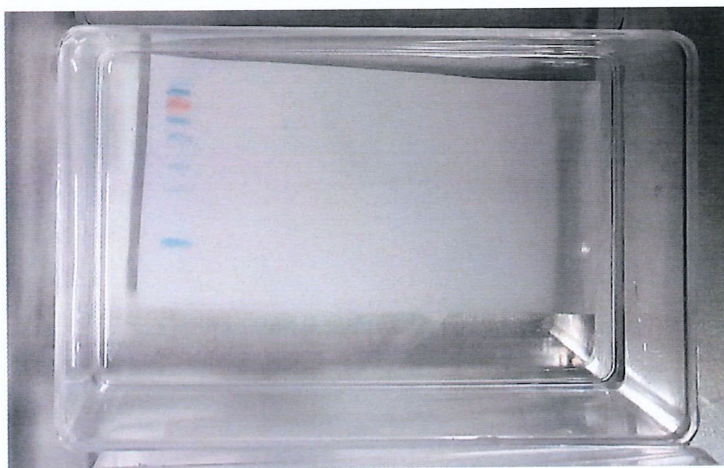
- ล้าง membrane ด้วย TBS-T 1 รอบ รอบละ 5 นาที
- Block membrane ด้วย 5% BSA บ่ม 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 14)
- ล้าง membrane ด้วย TBS-T 3 รอบ รอบละ 5 นาที
- บ่ม Primary antibody: Anti-FSH-R antibody (ab150557) + Anti-beta Actin antibody (ab8227), 1:1000 (v/v) ที่ 4°C ซ้ำมคืน
- ล้าง membrane ด้วย TBS-T 3 รอบ รอบละ 10 นาที
- บ่ม Secondary antibody: Goat Anti-Rabbit IgG, HRP-conjugate (cat. #12-348), 1:5000 (v/v)
- ล้าง membrane ด้วย TBS-T 3 รอบ รอบละ 10 นาที
- บ่ม ECL substrate (Western Lightning® ECL Pro) 5 นาที
- นำไปดูผลภายใต้เครื่องถ่ายภาพ ChemiDoc™ XRS+ (BIO-RAD) (รูปที่ 15)



รูปที่ 10 PVDF membrane ที่ activate ใน methanol



รูปที่ 11 ขั้นตอนการโปรตีนจากแผ่นเจลไปยัง membrane ด้วยเครื่อง The Mini Trans-Blot®



รูปที่ 12 ขั้นตอนการ block membrane ด้วย 5% BSA

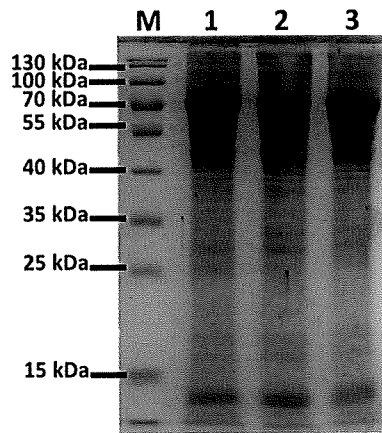


รูปที่ 13 เครื่องถ่ายภาพ ChemiDoc™ XRS+ (BIO-RAD)

6. ผลการทดลอง

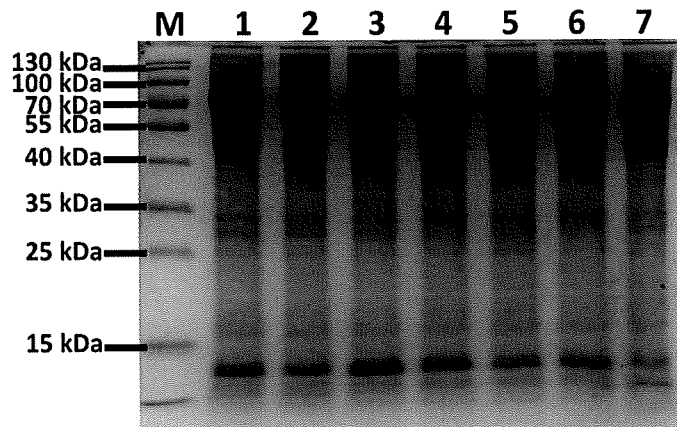
6.1 12% SDS-PAGE

โปรตีนที่สกัดจากเนื้อเยื่อ testis และ caudal epididymis ล้างแสมก่อนวัยเจริญพันธุ์ จำนวน 10 ตัว สามารถแยกได้จาก SDS-PAGE (รูปที่ 16-19)



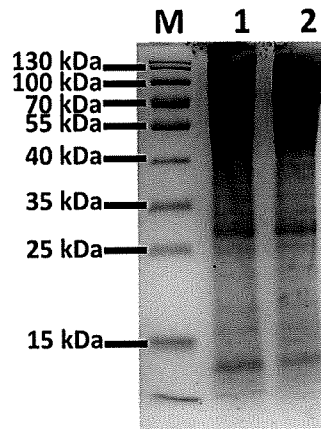
รูปที่ 14 SDS-PAGE FSHR protein (M, 1C-3C)

M = Protein marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa Catalog number: 26616), Lens 1-3: 1C-3C (C = caudal epididymis)



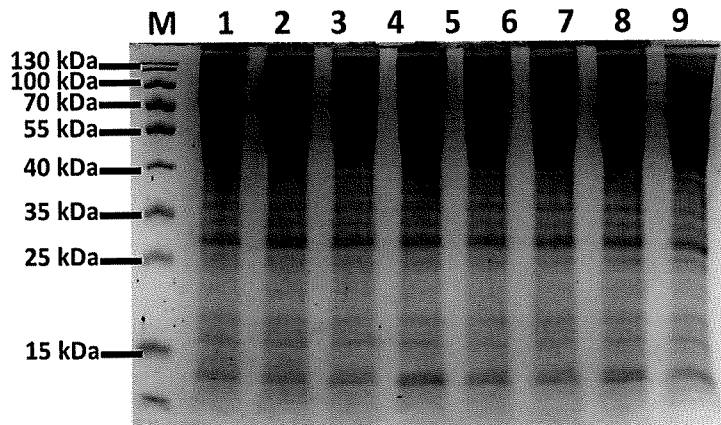
รูปที่ 15 SDS-PAGE FSHR protein (M, 10C-4C)

M = Protein marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa Catalog number: 26616), Lens 1-7: 10C-4C (C = Caudal epididymis)



รูปที่ 16 SDS-PAGE FSHR protein (M, 1T-2T)

M = Protein marker (PageRuler™ Prestained Protein L3adder, 10 to 180 kDa Catalog number: 26616), Lens 1-2: 1T-2T (T = Testis)

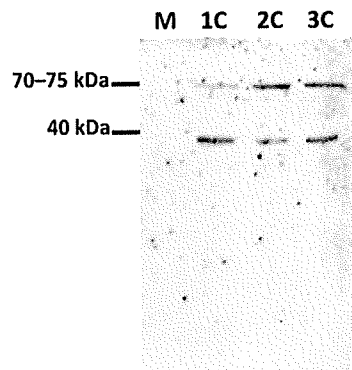


รูปที่ 17 SDS-PAGE FSHR protein (M, 10T-3T)

M = Protein marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa Catalog number: 26616), Lens 1-9: 10T-3T (T = Testis)

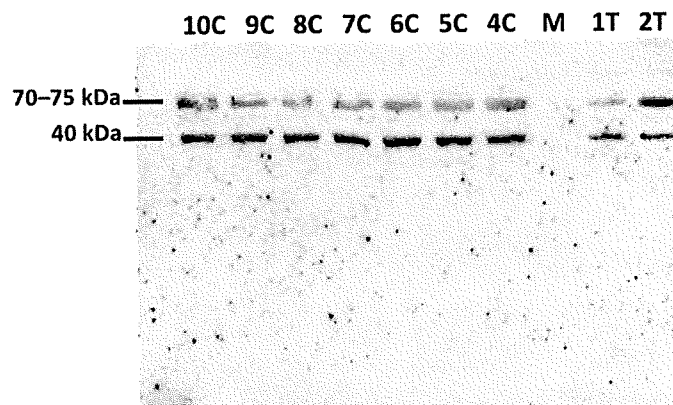
6.2 Immunoblot

ผล Western blot analysis ของโปรตีน FSHR พบการแสดงออกของโปรตีน FSHR ทั้งใน testis และ caudal epididymis ที่ molecular weight ~70-75 kDa โดยทำการเปรียบเทียบกับ control คือโปรตีน beta Actin ที่มี molecular weight 40 kDa (รูปที่ 20-23)



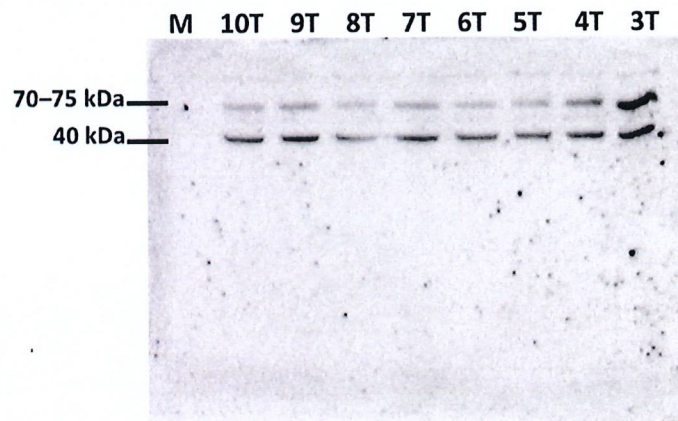
รูปที่ 18 Western blot analysis ของโปรตีน FSHR และโปรตีน beta Actin จาก Caudal epididymis (M, 1C-3C)

M = Protein marker, C = Caudal epididymis

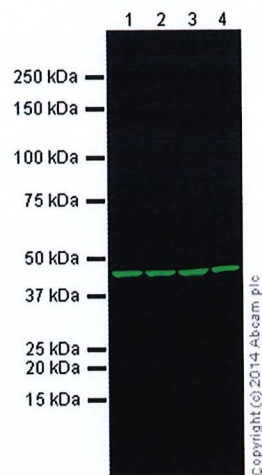


รูปที่ 19 Western blot analysis ของโปรตีน FSHR และโปรตีน beta Actin จาก Caudal epididymis และ Testis (M, 10C-2T)

M = Protein marker, T = Testis



รูปที่ 20 Western blot analysis ของโปรตีน FSHR และโปรตีน beta Actin จาก Testis (M, 10T-3T)
M = Protein marker, T = Testis



รูปที่ 21 ตัวอย่าง band ของ Anti-beta Actin antibody (ab 8227) molecular weight 40 kDa ที่ใช้เป็น control

บทที่ 4 การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในเนื้อเยื่อ testis ลิงแสมก่อนวัยเจริญพันธุ์และวัยเจริญพันธุ์

ใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistic) ในการอธิบายถึงการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในเนื้อเยื่อ testis ลิงแสมก่อนวัยเจริญพันธุ์และวัยเจริญพันธุ์

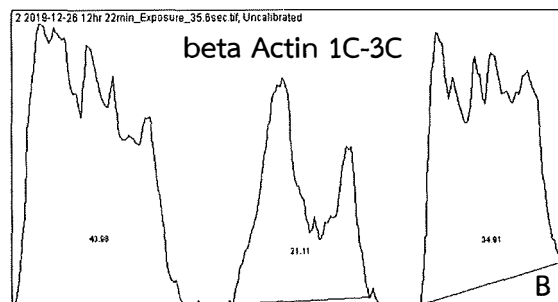
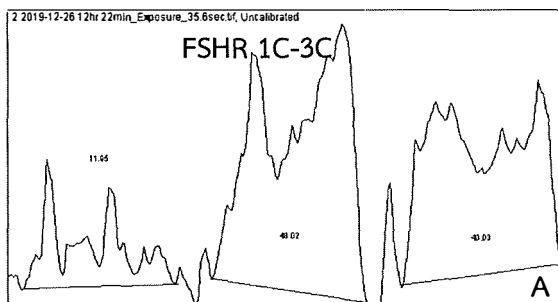
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

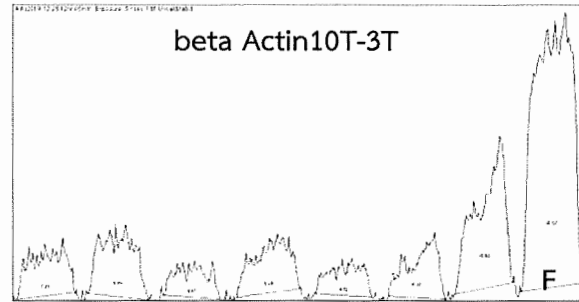
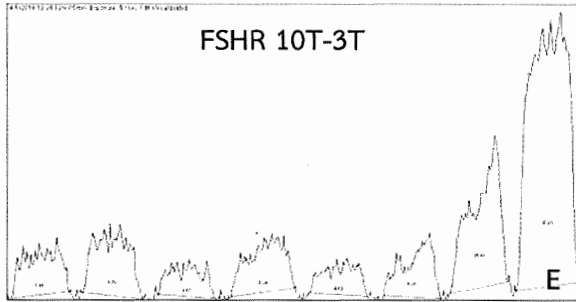
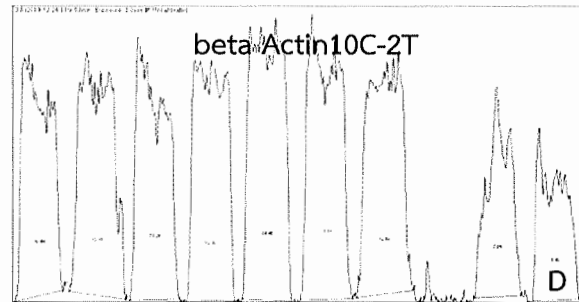
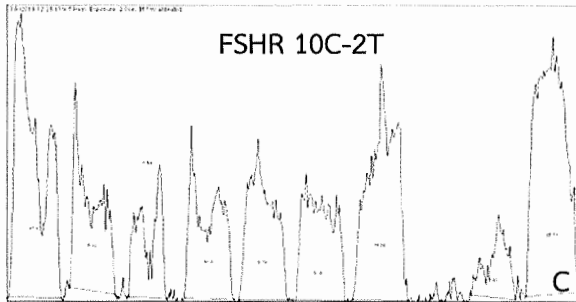
จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FSHR โดยวิธี Western blot analysis พบการแสดงออกโปรตีน FSHR ในลิงแสมวัยเจริญพันธุ์ โดยพบว่ามี molecular weight ~70-75 kDa ในขณะที่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในลิงแสมก่อนวัยเจริญพันธุ์

4.2 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในเนื้อเยื่อ testis และ caudal epididymis ลิงแสมในวัยเจริญพันธุ์

วัดปริมาณโปรตีน FSHR ที่ต้องการศึกษา และปริมาณโปรตีน beta Actin ที่เป็น control ในเนื้อเยื่อ testis และ caudal epididymis โดยใช้โปรแกรม ImageJ analysis (รูปที่ 18) จากนั้นทำการคำนวณปริมาณโปรตีน FSHR โดยการ normalized ด้วยโปรตีน beta Actin

ทำการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน FSHR ในเนื้อเยื่อ testis และ epididymis ทางสถิติโดยใช้ Independent t-test





รูปที่ 22 (A-F) แสดงปริมาณโปรตีน FSHR และ beta Actin โดยใช้โปรแกรม ImageJ

T = testis, C = caudal epididymis

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ Independent t-test แล้วพบว่า ปริมาณโปรตีน FSHR ในเนื้อเยื่อ testis และ caudal epididymis ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษา

ส่วนที่ 1 ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในเนื้อเยื่อ testis ลิงแสมก่อนวัยเจริญพันธุ์และวัยเจริญพันธุ์ ที่ได้จากการทำ biopsy พบว่าเมื่อนำมาทำ Western blot analysis พบการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในลิงที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์เท่านั้น ซึ่งก็สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าการส่งสัญญาณจากฮอร์โมน FSH ผ่าน pathway ของ cAMP เกิดขึ้นน้อยใน Sertoli cells ที่มาจากลิงก่อนวัยเจริญพันธุ์ (Majumdar et al, 2012) ซึ่งอาจสามารถอธิบายถึงการที่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน FSHR ใน testis ลิงก่อนวัยเจริญพันธุ์ในการศึกษานี้ แต่ทั้งนี้เนื่องจากได้ทำการศึกษาลิงก่อนวัยเจริญพันธุ์เพียงตัวอย่างเดียว จึงอาจไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้วิเคราะห์ทางสถิติในเชิงปริมาณ และในขณะเดียวกันเนื้อเยื่อที่ได้มาจากการทำ biopsy มีขนาดเล็กมากซึ่งสัมพันธ์กับอัตราส่วนของลิงก่อนวัยเจริญพันธุ์ที่ขนาดเล็กเช่นกัน จึงอาจทำให้ไม่สามารถได้ตัวแทนที่ดีที่สุดในการศึกษาโปรตีนเป้าหมายที่ต้องการ ในขณะที่การแสดงออกของโปรตีน FSHR สามารถตรวจพบได้จากตัวอย่าง testis ลิงแสมวัยเจริญพันธุ์ที่ได้มาจากการทำ biopsy ซึ่งมี molecular weight ~70-75 kDa สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่อธิบายถึงกลไกการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ spermatogenesis ซึ่งพบในวัยเจริญพันธุ์ (Dreff et al., 2007) ทั้งนี้ถึงแม้ว่ากลุ่มตัวอย่าง testis ลิงในวัยเจริญพันธุ์ที่ได้มาจากการทำ biopsy มีเพียง 1 ตัวเช่นเดียวกัน แต่ก็ได้มีการยืนยันการแสดงออกของโปรตีน FSHR ในลิงแสมวัยเจริญพันธุ์ใน ส่วนที่ 2 ของการศึกษานี้

ส่วนที่ 2 ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FSHR ใน testis และ caudal epididymis พบว่ามี การแสดงออกของโปรตีน FSHR ในโครงสร้างทั้งสองส่วน ที่ molecular weight ~70-75 kDa เช่นเดียวกัน ทั้งนี้จึงเป็นการยืนยันได้ว่าโปรตีน FSHR มีการแสดงออกจริงที่ testis รวมไปถึงที่ caudal epididymis ด้วย โดยเมื่อทำการคำนวณปริมาณโปรตีนโดยใช้โปรแกรม ImageJ analysis โดยมีการ normalized ค่าปริมาณโปรตีน FSHR ด้วย beta Actin ซึ่งเป็น control และนำค่าโปรตีน FSHR ที่ได้ทำการ normalized แล้วจาก testis และ caudal epididymis มาเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่า ปริมาณโปรตีน FSHR ที่ได้จาก testis และ caudal epididymis ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงให้เห็นว่าโปรตีน FSHR อาจไม่ได้มีความสำคัญแต่เพียงตำแหน่งของ Sertoli cells ที่เกี่ยวข้องต่อกระบวนการ spermatogenesis เท่านั้น แต่โปรตีน FSHR ที่พบที่ตำแหน่งของ caudal epididymis อาจมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการ epididymal differentiation และ sperm maturation ด้วยเช่นกัน (Zhang et al., 1997) ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะนำไปสู่การคิดค้นและพัฒนาายาคูมกำเนิดที่ยับยั้งอย่างจำเพาะกับ FSHR โดยคาดหวังว่ายาคูมกำเนิดนี้จะสามารถยับยั้งได้ทั้งกระบวนการ spermatogenesis และกระบวนการ sperm maturation พร้อมกันทั้งสองกระบวนการ เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการคุมกำเนิดลิงแสมเพศผู้ต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

อาจเพิ่มตัวอย่างในกลุ่มลิงก่อนวัยเจริญพันธุ์ เพื่อที่จะได้มีความน่าเชื่อถือในแง่ของการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณทางสถิติ นอกจากนี้ตัวอย่างที่ได้จากการทำ biopsy มีปริมาณของเนื้อเยื่อที่เก็บมาได้น้อย ดังนั้นเพื่อให้เป็นตัวแทนที่ดีของโปรตีนที่ต้องการศึกษา อาจพิจารณาเลือกเก็บตัวอย่างที่ได้มาจากการทำหมันโดยวิธีการ castration ซึ่งจะให้ได้ปริมาณโปรตีนที่มากเพียงพอต่อการนำมาศึกษาต่อได้

เอกสารอ้างอิง

- Abdennebi, L., Chun, E.Y., Jammes, H., Wei, D. and Remy, J.J. 2003. Maintenance of sexual immaturity in male mice and bucks by immunization against N-terminal peptides of the follicle-stimulating hormone receptor. *Biol. Reprod.* 68: 323-327.
- Abel, M.H., Baban, D., Lee, S., Charlton, H.M. and O'Shaughnessy, P.J. 2009. Effects of FSH on testicular mRNA transcript levels in the hypogonadal mouse. *J. Mol. Endocrinol.* 42(4): 291-303.
- Bribiescas, R.G. 2001. Reproductive ecology and life history of the human male. *Am. J. Phys. Anthropol. Suppl.* 33: 148-176.
- Denis, O., Villalobos, H.R. and Struelens, M.J. 2010. The problem of resistance. *Antibiotic and Chemotherapy.* 24-48.
- Dias, J.A. and Von Roey, P. 2001. Structural biology of human follitropin and its receptor. *Arch. Med. Res.* 32: 510-519.
- Dreef, H.C., Van Esch, E. and De Rijk, E.P. 2007. Spermatogenesis in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*): a practical guide for routine morphological staging. *Toxicol. Pathol.* 35(3):395-404.
- Durlej, M., Knapczyk-Stwora, K., Duda, M., Galas, J. and Slomczynska, M. 2011. The Expression of FSH Receptor (FSHR) in the Neonatal Porcine Ovary and its Regulation by Flutamide. *Reproduction in Domestic Animals.* 46(3): 377-384.
- Hanberger, H., Skoog, G., Ternhag, A. and Giske, C.G. 2014. Antibiotic consumption and antibiotic stewardship in Swedish hospitals. *Upsala Journal of Medical Sciences.* 119(2): 154-161.
- Heckert, L.L. and Griswold, M.D. 1991. Expression of follicle-stimulating hormone receptor mRNA in rat testes and Sertoli Cells. *Mol. Endocrinol.* 5(5): 670-677.
- Higham, J.P., Heistermann, M., Maestripieri, D. 2013. The endocrinology of male rhesus macaque social and reproductive status: A test of the challenge and social stress hypotheses. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 67(1): 19-30.
- Johnston, H., Baker, P.J., Abel, M., Charlton, H.M., Jackson, G., Fleming, L., Kumar, T.R. and O'Shaughnessy, P.J. 2004. Regulation of Sertoli cell number and activity by follicle-

- stimulating hormone and androgen during postnatal development in the mouse. *Endocrinology*. 145(1): 318-329.
- Kene, P.S., Behere, D.V. and Mahale, S.D. 2005. Secondary structure analysis of synthetic peptides of the extracellular domain of the human follicle-stimulating hormone receptor. *J. Pept. Res.* 66(6): 375-381.
- Majumdar, S.S., Sandra, K., Bhattacharya, I. and Plant, T.M. 2012. Insufficient androgen and FSH signaling may be responsible for the azoospermia of the infantile primate testes despite exposure to an adult-like hormonal milieu. *Hum. Reprod.* 27(8): 2515-2525.
- Naz, R.K., Gupta, S.K., Vyas, H.K. and Talwar, A.G. 2005. Recent advances in contraceptive vaccine development: a mini-review. *Hum. Reprod.* 20: 3271-3283.
- Oduwole, O.O., Peltoketo, H. and Huhtaniemi, I.T. 2018. Role of Follicle-Stimulating Hormone in Spermatogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 9: 763.
- Pontis, H.G. 2016. Protein and carbohydrate separation and purification. *Methods of analysis carbohydrate metabolism in photosynthetic organisms*.
- Sayers, N. and Hanyaloglu, A.C. 2018. Intracellular Follicle-Stimulating Hormone Receptor Trafficking and Signaling. *Front Endocrinol.* 9.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. and D'Ari, R. 2007. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*. 189(23).
- Takehita, R.S.C., Huffman, M.A., Kinoshita, K. and Bercovitch, F. 2017. Effect of castration on social behavior and hormones in male Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Physiol Behav.* 181: 43-50.
- Teow, S.Y., Mualif, S.A., Omar, T.C., Wei, C.Y., Yusoff, N.M. and Ali, S.A. 2013. Production And purification of polymerization-competent HIV-1 capsid protein p24 (CA) in NiCo21(DE3) *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.*
- Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A. and Wilson, G.S. 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosen bioelectron.* 16(1-2): 121-131.
- Yan, P., He, W., Wu, Y., Chen, Z., He, H., Ni, B., Zhang, J., Yang, X., Shen, Z., Fu, X., Linag, Z. and Li, J. 2015. Enhanced suppression of fertility can be achieved by priming with FSHR and Eppin and further boosting with their B-cell epitope peptides. *Am. J. Reprod. Immunol.* 74(2): 156-168.

Zhang, T., Guo, C.X., Hu, Z.Y. and Liu, Y.X. 1997. Localization of plasminogen activator and inhibitor, LH and androgen receptors and inhibin subunits in monkey epididymis. Mol. Hum. Reprod. 3(11): 945-952.

Zhang X., Hong S., Kang Y., Zheng Y., Sun H. and Xu C. 2014. Expression and purification of the extracellular domain of the human follicle-stimulating hormone receptor using Escherichia coli. J. Obstete. Gynaecol. Res. 40: 501-508.

ลงชื่อ สโรบลก ไชยภนกุล ผู้รับทุน
อ.สพ.ญ.ดร. สโรบลก ไชยภนกุล
วันที่ 27 / ๗๑ / 2563

ลงชื่อ 1/นส อิมม อาจารย์อาวุโส
(อ.สพ.ญ.ดร. เอลิ นัตตวงค์)
วันที่ 27 / ๗๑ / 63