

การประเมินการเจริญเติบโตและพัฒนาของคอร์ปัส ลูเทียมแพะโดยใช้ proliferating cell nuclear antigen (PCNA) และ Ki-67 เป็นตัวบ่งชี้ การเพิ่มจำนวนของเซลล์

Evaluation of growth and development of corpus luteum in goats using proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 as markers of cell proliferation

จิรัฐติ ธรรมศิริ^{1*}, ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์^{2,3}, จารึก ญัฐฐากรกุล¹, สมจิตร กัณหาพรหม¹
และ วิลาวรรณ ขันธูแสง²

Jiratti Thammasiri^{1*}, Chainarong Navanukraw^{2,3} and Jaruk Nutthakornkul¹,
Somchit Guntaprom¹ and Vilaivan Khanthusaeng²

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์เพื่อประเมินการเจริญเติบโตและการพัฒนาของคอร์ปัส ลูเทียม (CL) โดยการวิเคราะห์โปรตีน (protein) ดีเอ็นเอ (DNA) และเปรียบเทียบผลของการใช้ proliferating cell nuclear antigen (PCNA) และ Ki-67 เป็นดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโต (Labeling Index; LI) ในช่วงวงจรการเป็นสัดของแพะ ใช้แพะเพศเมียที่ไม่ตั้งท้อง 24 ตัวอายุเฉลี่ย 12 เดือนเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผ่าตัดเปิดช่องท้องในวันที่ 3 6 9 12 และ 18 ของวงจรการเป็นสัดเพื่อเก็บ CL ซึ่งน้ำหนักสดแล้วนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพ และแช่แข็งที่ -70 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของ protein และ DNA เก็บเลือดเพื่อวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (P4) ผลการทดลองพบว่าน้ำหนักสดของ CL ปริมาณของ DNA (DNA content) และความเข้มข้นของ P4 เพิ่มขึ้นจากวันที่ 3 ถึง 6 ($P<0.05$) วันที่ 6 ถึง 9 ($P<0.05$) จากนั้นลดลงในวันที่ 12 ถึง 15 ($P<0.05$) วันที่ 15 ถึง 18 ($P<0.05$) สัดส่วนของ protein ต่อ DNA (protein/DNA ratios) พบว่ามีค่าคงที่จากวันที่ 3 ถึง 12 จากนั้นลดลงในวันที่ 15 และลดลง ($P<0.05$) ค่าที่สูงสุดในวันที่ 18 ค่าร้อยละ LI ของ PCNA มีมากในช่วงวันที่ 3 ถึง 12 จากนั้นจะลดลง ($P<0.05$) จากวันที่ 12 ถึง 15 และลดลงต่ำที่สุดในวันที่ 18 ($P<0.05$) ค่าร้อยละ LI ของ Ki-67 มากที่สุด ($P<0.05$) ในวันที่ 3 และลดลง ($P<0.05$) ในวันที่ 6 และคงที่ในวันที่ 6 ถึง 9 จากนั้นลดลง ($P<0.05$) ในวันที่ 9 ถึง 12 และจากวันที่ 12 ถึง 15 จากนั้นลดลงต่ำที่สุด ($P<0.05$) ในวันที่ 18 เมื่อเปรียบเทียบ ค่าร้อยละ LI ที่ได้จาก PCNA และ Ki-67 ภายในช่วงวันเดียวกัน (3 6 9 12 15 และ 18) พบว่า ค่าร้อยละ LI ที่ได้จาก PCNA มากกว่า Ki-67 ($P<0.05$) ในทุกๆ ช่วงวันของวงจร รูปแบบการเจริญเติบโตและพัฒนาของ CL เป็นไปอย่างรวดเร็วในวันแรกถึงวันที่ 12 ของวงจรการเป็น

¹ สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ จ.กาฬสินธุ์ 46000
Department of Animal Production Technology, Faculty of Agro-Industrial Technology, Kalasin University, Kalasin 46000

² ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

³ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน (ABRCSE) มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy (ABRCSE), Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: jiratti.th@gmail.com

สกัดจากนั้นคงที่และลดลง โดยสอดคล้องกับการเสื่อมสลายของ CL ซึ่งประเมินได้จากการวิเคราะห์ปริมาณ DNA สัดส่วนของ protein ต่อ DNA และสามารถเปรียบเทียบผลของการใช้ PCNA และ Ki-67 เป็นดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโตของ CL ได้

คำสำคัญ: คอร์ปัส ลูเทียม, การเจริญเติบโต, พีซีเอ็นเอ, เคไอ-67, แพะ

ABSTRACT: The objectives of the present study were to evaluate growth and development of corpus luteum (CL) using protein, DNA analysis and to compare the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation throughout the estrous cycle in goats. Non pregnant goats (n=24), 12 months of age were assigned for estrus synchronization. Goats CL were obtained from days 3, 6, 9, 12, 15 and 18 of estrous cycle using bilateral ovariectomy and blood samples were taken for plasma progesterone (P4) concentration. The CL was weighed, and samples of each were fixed. Additional samples of each CL were stored at -70 °C until analyzed for tissue DNA and protein. Luteal fresh weight, DNA contents and P4 increased ($P<0.05$) from days 3 to 6, days 6 to 9 and then decreased ($P<0.05$) from days 12 to 15, days 15 to 18. The ratios of protein/DNA on days 3, 6, 9 and 12 were similar, then decreased ($P<0.05$) from days 12 to 15 and day 18 was lowest ($P<0.05$). The labeling indices of PCNA were greatest on days 3 to 12, and then decreased ($P<0.05$) from days 12 to 15 and day 18 was lowest ($P<0.05$). The labeling indices of Ki-67 were greatest ($P<0.05$) on day 3 and decreased ($P<0.05$) on days 6 to 9, then decreased ($P<0.05$) from days 12 to 15 and day 18 was lowest ($P<0.05$). The comparisons of the values of PCNA and Ki-67 were greater ($P<0.05$) in PCNA than that in Ki-67 on days 3, 6, 9, 12, 15 and 18 of estrous cycle. The study was also indicated that the pattern of growth and development of CL rapidly increased from first day to day 12 of the estrous cycle, after remained and decreased according to the regression of CL. DNA content, protein/DNA ratio, PCNA and Ki-67 could be used to evaluate growth and development of CL.

Keywords: Corpus luteum, Growth, PCNA, Ki-67, Goat

บทนำ

คอร์ปัส ลูเทียม CL เป็นโครงสร้างบนรังไข่ที่ถูกพัฒนาและเปลี่ยนแปลงภายหลังจากการตกไข่ มีความสำคัญโดยทำหน้าที่สังเคราะห์ฮอร์โมน P4 เพื่อรักษาและปรับสภาพของมดลูกในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมให้เหมาะสมต่อการตั้งท้องจนกระทั่งสัตว์คลอดลูกปราศจาก CL เป็นผลให้สัตว์เกิดภาวะแท้งและวงจรรอบของการเป็นสัดผิดปกติไป (Young et al., 2000) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพศเมียที่เจริญเติบโตเต็มวัยพบว่า CL มีการเจริญเติบโตและพัฒนา รวมถึงมีการเสื่อมสลายเกิดขึ้นในช่วงวงจรรอบการเป็นสัด (Reynolds et al., 1992) การเจริญเติบโตของ CL ในโคมีอัตราที่รวดเร็วมาก น้ำหนักของ CL ในวันที่ 3 ของวงจรรอบการเป็นสัด มีค่าเฉลี่ยเพียง 640 มิลลิกรัม แต่น้ำหนักถึง 5,100 มิลลิกรัม ในวันที่ 14 เช่นเดียวกับในแกะ น้ำหนักของ CL ในวันที่ 2 ของวงจรรอบการเป็นสัด มีค่าเฉลี่ยเพียง 87.7 มิลลิกรัม แต่น้ำหนักถึง 736.3 มิลลิกรัม ในวันที่ 12 ซึ่งรูปแบบการเจริญดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับการเจริญที่รวดเร็วของเซลล์เนื้องอก (tumor) ที่ศึกษาโดยใช้การวิเคราะห์หาค่าร้อยละ

ของดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโต (Labeling Index; LI) (Jablonka-Shariff et al., 1993) ดังนั้น การศึกษาการเจริญและพัฒนาของ CL โดยการวิเคราะห์ปริมาณ protein DNA ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถนำมาประเมินการเพิ่มจำนวนและขนาดของเซลล์ที่เจริญในอัตราที่รวดเร็วได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี (immunohistochemistry) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษากิจกรรมของเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อ proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ซึ่งมีการศึกษาในโค (Zheng et al., 1994) และ (Jablonka-Shariff et al., 1993) รวมทั้งมีการนำ Ki-67 ซึ่งเป็นดัชนีชี้วัดกิจกรรมของเซลล์เช่นเดียวกันกับ PCNA สำหรับประเมินกิจกรรมของเซลล์ CL ในแพะ (Thammasiri et al., 2016) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบผลของการวิเคราะห์ LI โดยใช้ PCNA และ Ki-67 ในการทดลองเดียวกัน เพื่อประเมินการเจริญเติบโตและการพัฒนาของคอร์ปัส ลูเทียม (CL) ในแพะเพื่อให้ทราบถึงตัวชี้วัดที่มีความเหมาะสมรวมถึงผลลัพธ์ที่ได้จากตัวชี้วัดทั้ง PCNA และ Ki-67 มีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่าอื่นๆ ในงานทดลองหรือไม่อย่างไร

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้านี้เพื่อประเมินการเจริญเติบโต และการพัฒนาของ CL โดยใช้การวิเคราะห์ปริมาณ protein DNA และเปรียบเทียบผลของการใช้ PCNA และ Ki-67 เป็นดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโตในช่วงวงจรการเป็นสัดของแพะ

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

วิธีการศึกษาในงานทดลองครั้งนี้ผ่านการพิจารณาโดยคณะกรรมการจริยบรรณและมาตรฐานการเลี้ยง และการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น (Reference No. 0514.1.12.2/87) โดยในงานทดลองนี้ใช้แพะเพศเมียจำนวน 24 ตัว โดยสุ่มเก็บตัวอย่างในวันที่ 3 (4 ตัว) วันที่ 6 (4 ตัว) วันที่ 9 (4 ตัว) วันที่ 12 (4 ตัว) วันที่ 15 (4 ตัว) วันที่ 18 (4 ตัว) ของวงจรการเป็นสัด อายุเฉลี่ย 12 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 17.83 ± 0.39 กิโลกรัม มีมดโคะแน่นร่างกายนับจาก 1-5 (1=พอมแห้ง และ 5=อ้วน) ประมาณ 2.5-3.0 (Thammasiri et al., 2016) ให้อาหารขึ้นตามความต้องการโภชนาของแพะ (NRC, 2007) จัดให้น้ำและหญ้าเป็นอาหารหยาบให้กินเต็มที่

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและการตรวจสัด

เหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ Controlled Internal Drug Release (Eazi-BREED™ CIDR®) สอดเข้าช่องคลอดเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทำการตรวจสอบการเป็นสัดหลังถอน CIDR วันละ 2 ครั้งๆ ละ 30 นาที โดยใช้แพะเพศผู้ที่ตัดท่อน้ำเชื้อแล้ว (vasectomized buck) มาตรวจจัสต์ในช่วงเช้า 06.00 น. และช่วงเย็น 18.00 น. เก็บตัวอย่างเลือดเนื้อเยื่อ CL โดยการผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อเก็บรังไข่ (ovariectomy) โดยนับวันที่แสดงอาการเป็นสัดเป็นวันที่ 0 จากนั้นเก็บตัวอย่าง ในวันที่ 3 6 9 12 และ 18 ของวงจรการเป็นสัด โดยเก็บในวงจรถัดมาหลังการเหนี่ยวนำเพื่อลดอิทธิพลเนื่องจากฮอร์โมนที่ใช้ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัด

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและดีเอ็นเอ

การศึกษาปริมาณ Protein และ DNA โดยการสุ่มเนื้อเยื่อ CL ประมาณ 100 ไมโครกรัมแล้วนำไปผ่านขั้นตอนโฮโมจีไนเซชัน (homogenization) โดยเครื่อง Polytron (Brinkmann Instr., Westbury, NY) ร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ด้วยวิธี diphenylamine procedure ดัดแปลงตามวิธีของ Burton (1956) และหาปริมาณ protein ตามวิธีการ Bradford assay ดัดแปลงตามวิธีของ Bradford (1976) โดยเปรียบเทียบกับค่า DNA มาตรฐานจาก Deoxyribonucleic acid, type I จาก calf thymus และ protein มาตรฐานจาก Bovine serum albumin (BSA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) คำนวณค่าปริมาณ DNA และ protein เนื้อเยื่อ CL ซึ่งจะได้ค่าปริมาณ DNA (DNA content) เป็นดัชนีบ่งบอกการเพิ่มจำนวนเซลล์ (hyperplasia) และอัตราส่วน protein ต่อ DNA เป็นดัชนีบ่งบอกการเพิ่มขนาดเซลล์ (hypertrophy)

การวิเคราะห์ค่าดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโต

วิเคราะห์การเจริญเติบโตของ CL ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้ PCNA และ Ki-67 เป็นดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโต โดยแยกเนื้อเยื่อ CL ออกจากรังไข่ให้ได้ขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร และฝังในพาราฟิน (paraffin embedding) ตัดเนื้อเยื่อที่ผ่านการฝังพาราฟินด้วยเครื่อง microtome ประมาณ 6 ไมโครเมตร จากนั้นตรวจการแสดงออกของ PCNA ตามวิธีการของ Grazul-Bilska et al. (2007) โดยใช้ specific monoclonal antibody PCNA (MAB24R, Chemicon International, Temecula, CA) ร่วมกับ diaminobenzidine (DAB kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ตรวจการแสดงออกของ Ki-67 ตามวิธีการของ Thammasiri et al. (2016) โดยใช้ specific monoclonal antibody Ki-67 โปรตีน (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ร่วมกับ nuclear fast red (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) และ SG substrate คำนวณหาดัชนีชี้วัดการ

เจริญเติบโตจากจำนวนเซลล์ที่นิวเคลียสปรากฏการ
ย้อมติด PCNA และ Ki-67 ต่อจำนวนเซลล์

Duncan's New Multiple Range Test (Steel et al.,
1997)

การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนโพรเจสเตอโรน

เก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำ (jugular
vein) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ลงหลอดที่มีสารป้องกันการ
แข็งตัวของเลือด (EDTA solution) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วย
ความเร็ว 3,000 g เป็นเวลา 10 นาทีเก็บไว้ที่อุณหภูมิ
-20 องศาเซลเซียสจนกว่านำไปวิเคราะห์ทำการตรวจ
วัดปริมาณฮอร์โมน P4 ตามวิธีการของ Thammasiri
et al. (2016)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลน้ำหนักสด ปริมาณของ DNA
โปรตีนของเนื้อเยื่อ CL ค่าดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโต
(ร้อยละของ LI) และความเข้มข้นของ P4 ทำการ
วิเคราะห์โดยใช้ GLM procedure of SAS (2001) และ
การทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองโดยใช้

ผลการศึกษา

น้ำหนักสด ปริมาณของโปรตีนและดีเอ็นเอ

จากการทดลองพบความเข้มข้นของ DNA พบว่า
เพิ่มขึ้นจากวันที่ 3 ถึง 6 ($P<0.05$) วันที่ 6 ถึง 9
($P<0.05$) และไม่แตกต่างกันระหว่างวันที่ 9 ถึง 15
และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างวันที่ 12 และ 18 ของวง
รอบการเป็นสัดพบว่าลดลง ($P<0.05$) ดังแสดงใน
(Table 1) สัดส่วนของ protein ต่อ DNA (protein/DNA
ratios: ดัชนีชี้วัดการเพิ่มขนาดของเซลล์) พบว่าจากวัน
ที่ 3 6 9 และ 12 ไม่แตกต่างกัน จากนั้นลดลงเมื่อ
เปรียบเทียบระหว่างวันที่ 12 และ 15 และลดลง
($P<0.05$) ต่ำที่สุดในวันที่ 18 ของวงรอบการเป็นสัด
(Table 1)

Table 1 Fresh weight, protein and DNA concentrations, and Protein/DNA ratios of luteal tissue in goats on
days 3, 6, 9, 12 and 18 of the estrous cycle.

Day of the estrous cycle	Fresh weight (mg)	Protein concentration (mg/g)	DNA concentration (mg/g)	Protein/DNA ratios
3	135.08 ± 11.04 ^a	25.21 ± 0.76 ^d	2.05 ± 0.10 ^d	12.53 ± 1.36 ^{ab}
6	299.86 ± 12.62 ^d	34.75 ± 0.47 ^b	2.42 ± 0.11 ^c	14.54 ± 1.02 ^a
9	449.10 ± 11.34 ^a	42.80 ± 0.88 ^a	2.96 ± 0.11 ^{ab}	14.52 ± 0.85 ^a
12	432.07 ± 16.36 ^a	41.13 ± 1.25 ^a	3.05 ± 0.09 ^a	13.60 ± 1.14 ^a
15	385.10 ± 15.26 ^b	30.86 ± 1.11 ^c	2.91 ± 0.12 ^{ab}	10.70 ± 0.94 ^b
18	340.12 ± 19.72 ^c	20.31 ± 0.75 ^e	2.73 ± 0.10 ^{bc}	7.73 ± 0.55 ^c

a, b, c, d, e Mean ± standard error of the mean within the column are different ($P<0.05$) between day.

น้ำหนักสดของ CL (Fresh weight) ดังแสดงใน
(Table 1) และ ปริมาณของ DNA (DNA content: ดัชนี
ชี้วัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์) ความเข้มข้นของ
protein และความเข้มข้นของ P4 เพิ่มขึ้นจากวันที่ 3
ถึง 6 ($P<0.05$) วันที่ 6 ถึง 9 ($P<0.05$) และไม่แตกต่าง
กันระหว่างวันที่ 9 และ 12 จากนั้นลดลงในวันที่ 12 ถึง
15 ($P<0.05$) วันที่ 15 ถึง 18 ($P<0.05$) ของวงรอบการ
เป็นสัด (Table 2)

ค่าดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโต

ดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโต (LI; ค่าร้อยละเซลล์ที่
ย้อมติด PCNA) มีมากในช่วงวันที่ 3 ถึงวันที่ 12 จาก
นั้นจะลดลง ($P<0.05$) จากวันที่ 12 ถึง 15 และลดลง
ต่ำที่สุดในวันที่ 18 ($P<0.05$) ของวงรอบการเป็นสัด
(Table 2)

Table 2 DNA content, labeling index of PCNA and Ki-67, and P4 concentrations of luteal tissue in goats on days 3, 6, 9, 12 and 18 of the estrous cycle.

Day of the estrous cycle	DNA content (mg/CL)	PCNA (%LI)	Ki-67 (%LI)	P4 concentration (ng/mL)
3	0.28 ± 0.02 ^e	39.14 ± 1.90 ^{a†}	11.41 ± 0.24 ^{a†}	1.39 ± 0.11 ^e
6	0.73 ± 0.05 ^d	39.73 ± 1.02 ^{a†}	9.67 ± 0.19 ^{b†}	3.03 ± 0.02 ^c
9	1.33 ± 0.06 ^a	40.33 ± 0.84 ^{a†}	9.25 ± 0.40 ^{b†}	4.83 ± 0.06 ^a
12	1.32 ± 0.07 ^a	33.51 ± 1.67 ^{a†}	6.30 ± 0.20 ^{c†}	5.11 ± 0.06 ^a
15	1.12 ± 0.06 ^b	25.29 ± 0.75 ^{b†}	4.45 ± 0.10 ^{d†}	3.75 ± 0.13 ^b
18	0.90 ± 0.05 ^c	17.06 ± 0.57 ^{c†}	3.73 ± 0.09 ^{e†}	2.53 ± 0.18 ^b

a, b, c, d, e Mean ± standard error of the mean within the column are different ($P < 0.05$) between day.

†, ‡ Different superscripts in the same row indicate significant difference between PCNA and Ki-67 among day of the estrous cycle ($P < 0.05$)

ดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโต (LI; ค่าร้อยละเซลล์ที่ย้อมติด Ki-67) พบว่ามีค่ามากที่สุด ($P < 0.05$) ในวันที่ 3 และลดลง ($P < 0.05$) ในวันที่ 6 และคงที่ในวันที่ 6 ถึง

9 จากนั้นลดลง ($P < 0.05$) ในวันที่ 9 ถึง 12 และจากวันที่ 12 ถึง 15 จากนั้นจะลดลงต่ำที่สุด ($P < 0.05$) ในวันที่ 18 (Table 2)

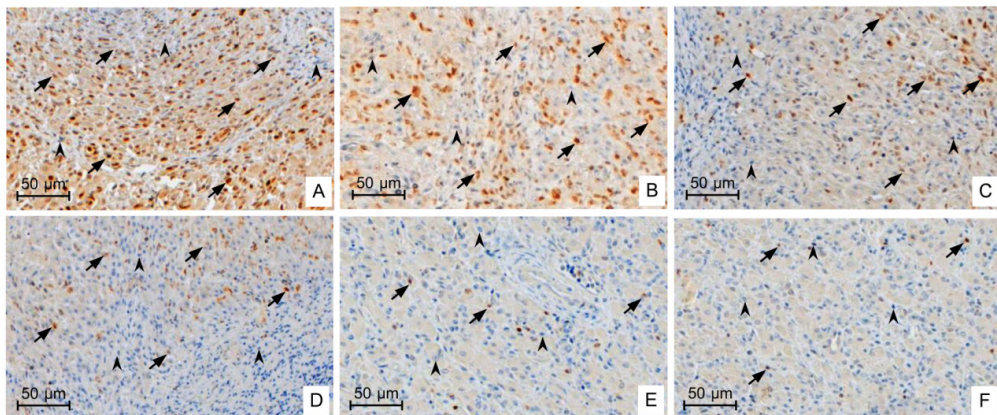


Figure 1 Immunohistochemistry of PCNA in tissue sections of CL from goats on day 3 (A), day 6 (B), day 9 (C), day 12 (D), day 15 (E) and day 18 (F) of the estrous cycle. The brownish color indicates positive PCNA staining (arrow). The blue color indicates negative PCNA staining (arrowheads). Magnification was with $\times 20$ objective.

เมื่อเปรียบเทียบค่าร้อยละ LI ที่ได้จาก PCNA และ Ki-67 ในวันเดียวกันตลอดช่วงวงรอบการเป็นสัด คือวันที่ 3 6 9 12 15 และ 18 พบว่าค่าร้อยละ LI ที่ได้จาก PCNA มีร้อยละกิจกรรมการแบ่งตัวของเซลล์ที่มากกว่า Ki-67 ($P < 0.05$) ในทุกๆ ช่วงวัน จากภาพแสดงให้เห็นถึงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ย้อมติด PCNA ซึ่งบ่ง

บอกให้ทราบถึงเซลล์กำลังมีการแบ่งตัวและกำลังเจริญเติบโตในเนื้อเยื่อ CL เซลล์ที่ย้อมติด PCNA มีมากในช่วงวันที่ 3 (A) และ 6 (B) ของวงรอบการเป็นสัดพบการย้อมติดน้อยในวันที่ 9 (C) และ 12 (D) และน้อยมากในวันที่ 15 (E) และ 18 (F) ของวงรอบการเป็นสัด (Figure 1)

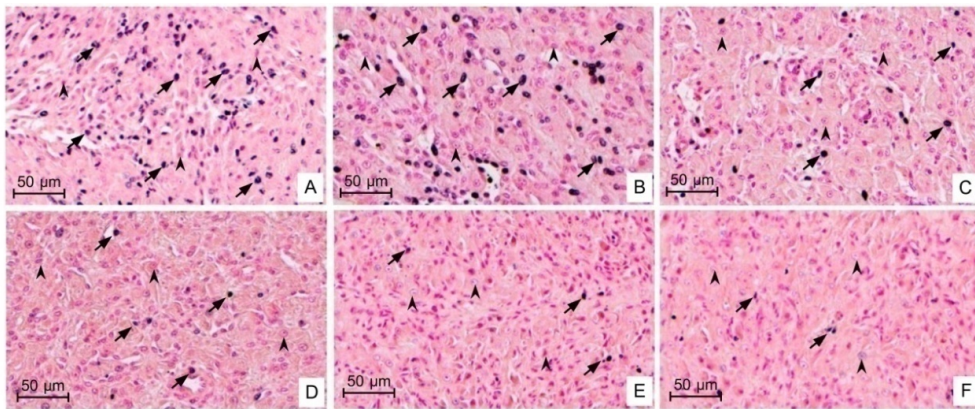


Figure 2 Immunohistochemistry of Ki-67 in tissue sections of CL from goats on day 3 (A), day 6 (B), day 9 (C), day 12 (D), day 15 (E) and day 18 (F) of the estrous cycle. The black color indicates positive Ki-67 staining (arrow). The pink color indicates negative Ki-67 staining (arrowheads). Magnification was with $\times 20$ objective.

จากภาพแสดงให้เห็นถึงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ย้อมติด PCNA ซึ่งบ่งบอกให้ทราบถึงเซลล์กำลังมีการแบ่งตัวและกำลังเจริญเติบโตในเนื้อเยื่อ CL เซลล์ที่ย้อมติด PCNA มีมากในช่วงวันที่ 3 (A) และ 6 (B) ของวงรอบการเป็นสัดพบการย้อมติดน้อยในวันที่ 9 (C) และ 12 (D) และน้อยมากในวันที่ 15 (E) และ 18 (F) ของวงรอบการเป็นสัด (Figure 2)

วิจารณ์

การประเมินลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาถูกนำมาใช้เป็นเทคนิคในการประเมินการพัฒนาของ CL ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์เนื้อเยื่อ CL ในช่วงวงรอบการเป็นสัดรวมถึงการศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อโดยวิเคราะห์กิจกรรมการแบ่งเซลล์จากดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโตโดยภาพถ่าย (Image analysis) ซึ่งมีการศึกษาในแพะ (Thammasiri et al., 2016) จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่ารูปแบบการเจริญเติบโตและพัฒนาของ CL แพะเป็นไปอย่างรวดเร็วในช่วงแรก (early luteal phase) และคงที่ในช่วงกลาง (mid luteal phase) และลดลงในช่วงท้ายของวงรอบการเป็นสัด (late luteal phase) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานประเมินการเจริญ

เติบโตและพัฒนาของ CL โดยใช้เทคนิคเดียวกันในโค (Zheng et al., 1994) และแพะ (Jablonka-Shariff et al., 1993) และแพะ (Thammasiri et al., 2016) นอกจากนี้ ระดับของ P4 จากเลือดที่เก็บในระหว่างวงรอบการเป็นสัดมีความเข้มข้นที่สอดคล้องกับการเจริญเติบโตและพัฒนาของ CL เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักสด กิจกรรมการแบ่งตัวของเซลล์ และการเพิ่มขนาดของเซลล์ นอกจากนั้นแล้วข้อมูลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ยังสามารถเปรียบเทียบวิธีการประเมินการเจริญเติบโตและพัฒนาของ CL จากกิจกรรมการแบ่งตัวของเซลล์ระหว่าง PCNA และ Ki-67 พบว่าสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโตได้ อย่างไรก็ตามการที่ ค่าร้อยละ LI ที่ได้จาก PCNA จะมีค่าที่มากกว่า Ki-67 ซึ่งเป็นผลมาจาก PCNA นั้นสามารถแสดงออกได้ทั้งในเซลล์ที่มีการแบ่งตัวใหม่และในเซลล์ที่เจริญแล้วแต่มีกระบวนการซ่อมแซม DNA โดยการกระตุ้นของ growth factor ในขณะที่ Ki-67 เป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อเซลล์ที่มีการแบ่งตัวมากกว่า (Liu et al., 2003) และ Ki-67 ตรวจพบได้เฉพาะในระยะ G1 S G2 และ M เฟส โดยไม่สามารถตรวจพบในระยะพักของเซลล์ G0 ของวัฏจักรเซลล์ (Thammasiri et al., 2016)

ดังนั้นการวิเคราะห์ protein DNA ค่าร้อยละของ LI จาก PCNA และ Ki-67 ในเนื้อเยื่อ CL แพะทำให้

ทราบถึงรูปแบบของการเจริญเติบโตและพัฒนาของ CL และได้อย่างถูกต้องและแม่นยำสูง เนื่องจากวิธีการดังกล่าวเป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับและได้นำมาใช้ในการศึกษาการเจริญเติบโตและพัฒนาของ CL อย่างแพร่หลายในสัตว์หลายชนิดทั้งในโค (Zheng et al., 1994) และ (Jablonka-Shariff et al., 1993) และแพะ (Thammasiri et al., 2016) นอกเหนือจากการวิเคราะห์ระดับฮอร์โมน P4 และเป็นข้อมูลพื้นฐานนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมวงจรการเป็นสัดโดยการให้ฮอร์โมนและการผสมเทียมในแพะได้อย่างแม่นยำและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

สรุป

จากผลการทดลองสรุปได้ว่ารูปแบบการเจริญเติบโตและพัฒนาของ CL เป็นไปอย่างรวดเร็วในวันแรกถึงวันที่ 12 ของวงจรการเป็นสัดจากนั้นจะคงที่และลดลง โดยสอดคล้องกับการเสื่อมสลายของ CL ในช่วงวงจรการเป็นสัดซึ่งประเมินได้จากการวิเคราะห์ protein DNA PCNA และ Ki-67 เป็นดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโต และเมื่อเปรียบเทียบค่าร้อยละ LI ที่ได้จาก PCNA และ Ki-67 พบว่า ค่าร้อยละ LI ที่ได้จาก PCNA มากกว่า Ki-67 ซึ่งเป็นผลมาจาก PCNA มีความจำเพาะในการแสดงออกในเซลล์ที่กิจกรรมการแบ่งตัวน้อยกว่า Ki-67

เอกสารอ้างอิง

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54.
- Burton, K. 1956. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62: 315-323.
- Grazul-Bilska, A. T., C. Navanukraw, M. L. Johnson, K. A. Vonnahme, S. P. Ford, L. P. Reynolds, and D. A. Redmer. 2007. Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. *J. Anim. Sci.* 85: 1914-1922.
- Jablonka, S. A., A. T. Grazul-Bilska, D. A. Redmer, and L. P. Reynolds. 1993. Growth and Cellular Proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Endocrin.* 4: 1871-1879.
- Liu, M., G. Lawson, M. Delos, J. Jamart, C. Ide, E. Coche. 2003. Predictive value of the fraction of cancer cells immunolabeled for proliferating cell nuclear antigen or Ki-67 in biopsies of head and neck carcinomas to identify lymph node metastasis: comparison with clinical and radiologic examinations. *Head Neck.* 25: 280-288.
- NRC. 2007. Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids. National Academies Press, Washington DC.
- Reynolds, L. P., S. D. Killilea, and D. A. Redmer. 1992. Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB. J.* 6: 886-892.
- SAS. 2001. SAS System (Release 8.2). SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Steel, R. G. D., J. H. Torrie, and D. A. Dickey. 1997. Principles and procedures of statistics a biometrical approach. 666 p.
- Thammasiri J., C. Navanukraw, S. Uriyapongson, K. Lertchunhakit, and S. Boonkong. 2016. Assessment of caprine corpora lutea growth, progesterone concentration and eNOS expression: Effect of a compensatory gain model. *Domest. Anim. Endocrinol.* 56: 45-46.
- Young, F. M., F. E. Rodger, P. J. Illingworth, and H. M. Fraser. 2000. Cell proliferation and vascular morphology in the marmoset corpus luteum. *Human Reprod.* 153: 557-566.
- Zheng, J., P. M. Fricke, and L. P. Reynolds. 1994. Evaluation of growth, cell proliferation, and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrus cycle. *Biol. Reprod.* 51: 623-632.