

ผลของความเครียดจากความร้อนต่ออัตราการมีชีวิตรอด และการแสดงออกของยีน
ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคขาวลำพูน และโคลูกผสมขาวลำพูน
Effect of Heat Stress on Survival Rate and Gene Expression in Fibroblast Cells
of Khao Lamphum and Crossbred Khao Lamphun Cattle

ธรรมบุญ ธานี กมลทิพย์ สอนศิริ และพยุงค์ศักดิ์ อินตะวิชา*

Thammanoon Thanee, Kamonthip Sonsiri and Payungsuk Intawicha*

สาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา พะเยา 56000

¹Division of Animal Science, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao, Thailand 56000

*Corresponding author: payungsuk.in@up.ac.th, payungsuk@hotmail.com

Received: October 8, 2019

Revised: March 9, 2020

Accepted: March 24, 2020

Abstract

The study aimed to determine the survival rate and gene expression in fibroblast cells from Khao Lamphum, crossbred Khao Lamphun-Angus and Khao Lamphun-Charolais cattle under heat stress. The fibroblast cells were collected from 9 female cows' ears and then were cultured at a temperature of 38.5°C. Study 1: cell survival rate of fibroblast cells were cultured under high temperature conditions at 42°C for 6, 24 and 48 hours. Result showed survival rate of Khao Lamphun cattle (n=3) were 99.59, 98.73 and 92.88%, respectively, which was higher than crossbred Khao Lamphun-Angus (n=3) as 98.73, 95.70 and 88.61%, respectively and Khao Lamphun-Charolais (n=3) as 99.53, 96.36 and 88.85%, respectively ($P<0.05$). The relation between duration and survival rate were related in positive direction Khao Lamphum (0.896), Khao Lamphun-Angus (0.647) and Lamphun-Charolais (0.862), respectively. Study 2: gene expression in heat tolerance (*Bcl-2*, *HSP90* and *HSP70*) after fibroblast cells exposed to heat stress at 42°C at 6, 12, and 24 hours. The mRNA expression levels were evaluated using the RT-PCR method measurable concentrations of *Bcl-2*, *HSP90* and *HSP70*. *Bcl-2*, *HSP90* and *HSP70* gene were all expressed when cultured under high temperature conditions at 42°C. In conclusions, survival rate of fibroblast cell under high temperature conditions the Khao Lamphun was higher than of crossbred cattle. When cell exposed to high temperature cell expressed of gene that related to heat tolerance, which allows the crossbred cattle adapting to the tropical environment of Thailand.

Keywords: gene expression, hyperthermia, cell fibroblast, crossbred cattle, Khao Lamphum cattle

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจสอบอัตราการมีชีวิตรอด และการแสดงออกของยีนในเซลล์ไฟโบร بلاสต์ โคขาวลำพูน โคลูกผสมขาวลำพูน-แองกัส และโคลูกผสมขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ ภายใต้อุณหภูมิร้อน เซลล์ไฟโบร بلاสต์ ถูกเก็บจากชิ้นเนื้อใบหูของโคเพศเมีย จำนวน 9 ตัว จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5°C.

การศึกษาที่ 1 ศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบร بلاสต์หลังจากได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 42 °C. เป็นเวลา 6, 24 และ 48 ชั่วโมง กลุ่มโคขาวลำพูน (n=3) มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 99.59, 98.73 และ 92.88 ตามลำดับ สูงกว่าโคลูกผสมขาวลำพูน-แองกัส (n=3) ร้อยละ 98.73, 95.70 และ 88.61 ตามลำดับ และโคลูกผสมขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ (n=3) ร้อยละ 99.53, 96.36 และ 88.85 ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) สหสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาได้รับความร้อน กับอัตราการมีชีวิตรอด พบว่ากลุ่มโคลูกผสม ทั้ง 3 พันธุ์ หลังจากฮีทช็อกมีความสัมพันธ์กันในทิศทางเชิงบวก โคขาวลำพูน เท่ากับ 0.896 โคลูกผสมขาวลำพูน-แองกัส เท่ากับ 0.647 และ โคลูกผสมขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ เท่ากับ 0.862 ตามลำดับ

การศึกษาที่ 2 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัวให้ทนร้อนของเซลล์ภายใต้อุณหภูมิร้อน *Bcl-2*, *HSP90* และ *HSP70* ด้วยเทคนิค Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เซลล์ไฟโบร بلاสต์หลังจากฮีทช็อกที่อุณหภูมิ 42°C. เป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ถูกนำมาสกัด total RNA แล้วนำ total RNA ที่ได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA และทำการเพิ่มปริมาณยีน *Bcl-2*, *HSP90* และ *HSP70* และยีน *β-actin* ถูกใช้เป็นยีนกลุ่มควบคุม พบว่าเซลล์ไฟโบร بلاสต์ ทุกกลุ่มมีการแสดงออกของยีน *Bcl-2*, *HSP90* และ *HSP70* หลังจากได้รับความร้อน สรุปว่าเซลล์ไฟโบร بلاสต์ของโคพื้นเมืองขาวลำพูน ภายใต้อุณหภูมิร้อนที่ 42°C. มีอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์สูงกว่าโคลูกผสม และเซลล์

มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการปรับตัวให้ทนต่อความร้อนที่เพิ่มขึ้น ซึ่งจะช่วยให้โคเนื้อพันธุ์พื้นเมืองและลูกผสมพื้นเมืองสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพในเขตร้อนชื้นของประเทศไทยได้

คำสำคัญ: การแสดงออกของยีน อุณหภูมิร้อน เซลล์ไฟโบร بلاสต์ โคลูกผสม โคขาวลำพูน

คำนำ

สภาวะความเครียดจากความร้อน (Heat stress) ทำให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพสัตว์ ประสิทธิภาพการผลิต และลดความสามารถในการถ่ายทอดพันธุกรรม (Dobson and Smith, 2000) ความเครียดจากความร้อนเป็นปัญหาสำคัญของการผลิตปศุสัตว์ในประเทศไทย เนื่องจากการเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยส่วนใหญ่จะใช้พันธุ์สัตว์ที่มาจากเขตนานเข้ามาเลี้ยงเพื่อให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น การเลี้ยงโคเนื้อให้ได้เนื้อที่มีไขมันแทรกซึ่งเป็นที่ต้องการของตลาด ทำโดยการนำเข้าโคเนื้อสายเลือดยุโรปมาเลี้ยงหรือมาผสมกับโคพันธุ์พื้นเมือง อย่างไรก็ตามการนำเข้าโคเนื้อสายเลือดยุโรปมาเลี้ยงในสภาพอากาศร้อนชื้นของประเทศไทย ส่งผลกระทบทำให้โคเนื้อมีการกินอาหาร และประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์ลดลง (Wolfenson *et al.*, 2000) การนำเข้าโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูนเป็นแม่พันธุ์พื้นฐานเป็นอีกหนึ่งวิธีแก้ปัญหาสำหรับผลิตโคลูกผสมพื้นเมือง 2 สายพันธุ์ (โคลูกผสมขาวลำพูน-แองกัส และโคลูกผสมขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์) เพื่อให้ได้ลูกเพศเมียที่มีลักษณะสมบูรณ์พันธุ์สูง เจริญเติบโตดี และสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพอากาศร้อนชื้นของประเทศไทยได้ และลูกเพศผู้สำหรับนำไปเลี้ยงเป็นโคขุน การนำเทคโนโลยีด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล (Molecular genetics) มาประยุกต์ใช้ในการค้นหายีนเครื่องหมายพันธุกรรม (Genetic marker) ที่สัมพันธ์กับลักษณะการทนต่อความร้อน ซึ่งแนวทางนี้ช่วยเพิ่มความแม่นยำในการปรับปรุงสายพันธุ์ สามารถแก้ไขปัญหการผลิตโคเนื้อไขมันแทรกในเขตร้อนของเมืองไทยได้ (Lerdweeraphon, 2017)

การศึกษาก่อนหน้านี้มีรายงานว่าผิวหนังเป็นส่วนที่ช่วยปกป้องโครงสร้างอวัยวะภายในจากสภาพแวดล้อมภายนอก ในผิวหนังมีเซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นองค์ประกอบซึ่งอยู่ในส่วนของหนังแท้ (Doljanski, 2004) มีบทบาทสำคัญทางสรีรวิทยา และมีการตอบสนองต่อการปรับตัวทางชีวเคมีของเซลล์ (Singh *et al.*, 2014) งานวิจัยของ Lee *et al.* (2016) รายงานว่าเมื่อเซลล์สัมผัสกับอุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดความเครียดเนื่องจากความร้อนขึ้น จากนั้นเซลล์จะเกิดการถอดรหัสของยีน และการสังเคราะห์โปรตีน เพื่อให้เกิดการปรับตัวให้อยู่รอด และยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์ (Apoptosis) (Vogel *et al.*, 1997; Colmont *et al.*, 2001)

ยีน *Bcl-2* ฮีตช็อคโปรตีน 90 (*HSP90*) และฮีตช็อคโปรตีน 70 (*HSP70*) เป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัว และควบคุมยับยั้งการตายของเซลล์ภายใต้อุณหภูมิร้อน โดยมีบทบาทหน้าที่แตกต่างกันคือ 1) ยีน *Bcl-2* ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการตายของเซลล์ในไมโทคอนเดรีย โดยยีน *Bcl-2* จะถูกเคลื่อนย้ายไปยังส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของไมโทคอนเดรียเพื่อรักษาความคงตัว (Mitochondrial integrity) เพื่อควบคุมการหลั่งของ Cytochrome C จากไมโทคอนเดรีย (Prayong *et al.*, 2007) 2) ฮีตช็อคโปรตีน 90 ทำหน้าที่ควบคุมการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (Signaling proteins) ให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้ เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต (Neckers *et al.*, 1999; Neckers, 2002; Maloney and Workman, 2002) และ 3) ฮีตช็อคโปรตีน 70 เป็นกลุ่มที่ป้องกันการตายของเซลล์ และการเกาะกลุ่มของโปรตีน ช่วยซ่อมแซมป้องกันเซลล์ไม่ให้เกิดความเสียหายให้สามารถกลับมาทำหน้าที่ได้ถูกต้องเหมือนเดิม (Lerdweeraphon, 2017) โดยยีน 3 กลุ่มนี้ มีความสำคัญ

ต่อการควบคุมสมดุลระหว่างการสร้าง และการกำจัดโปรตีนภายในเซลล์ เมื่อเผชิญกับสภาวะความเครียด เช่น การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิความร้อน เป็นต้น

การศึกษาก่อนหน้านี้ของ Lee *et al.* (2016) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการตายของเซลล์ภายใต้อุณหภูมิความร้อนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคพื้นเมือง (Taiwan yellow) และโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน (Holsteins) ผ่านการฮีตช็อคที่อุณหภูมิ 42°C. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มโคพื้นเมืองมีปริมาณของยีน *Bcl-2* และฮีตช็อคโปรตีน 70 สูงกว่าโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน แสดงให้เห็นว่าโคพื้นเมืองมีการปรับตัวให้ทนต่อความร้อนได้ดีกว่าโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน นอกจากนี้ Deb *et al.* (2014) ทำการศึกษาการอัตราการมีชีวิตรอด และการแสดงออกของฮีตช็อคโปรตีน 90 หลังจากฮีตช็อคที่อุณหภูมิ 42°C. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในโค Sahiwal (*Bos indicus*) และโค Frieswal (*Bos indicus* × *Bos taurus*) พบว่ากลุ่มโค Sahiwal มีอัตราการมีชีวิตรอด และปริมาณการแสดงออกของฮีตช็อคโปรตีน 90 สูงกว่าโค Frieswal แสดงให้เห็นว่าความเครียดจากความร้อนมีผลทำให้เซลล์มีชีวิตลดลงในโคลูกผสมมากกว่าโคพื้นเมือง ถึงแม้ว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผิวหนัง แต่ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และการตอบสนองต่อความเครียดจากความร้อนในระดับเซลล์โคพื้นเมืองยังมีน้อย ดังนั้นการศึกษารังนี้มีจุดประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการทนร้อนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และการแสดงออกของยีนควบคุมยับยั้งการตายของเซลล์ (*Bcl-2*, *HSP90*, *HSP70*) ในโคพื้นเมืองและโคลูกผสมพื้นเมืองภายใต้อุณหภูมิร้อน เพื่อเป็นฐานข้อมูลที่สำคัญสำหรับนักวิจัย และเป็นแนวทางการคัดเลือกพันธุ์โคเนื้อทนร้อนในสภาพภูมิอากาศร้อนขึ้นในประเทศไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

เซลล์ไขกระดูกของโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูนระดับสายเลือดพันธุ์พื้นเมือง 50% และพันธุ์ขาวลำพูน 50% และลูกผสมพื้นเมืองเพศเมียทั้งหมด 9 ตัว ได้แก่ โคขาวลำพูนจำนวน 3 ตัว ระดับสายเลือดพันธุ์พื้นเมือง 50% และพันธุ์ขาวลำพูน 50% (จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา) และโคลูกผสมขาวลำพูน-แองกัสระดับสายเลือดพันธุ์ขาวลำพูน 50% และพันธุ์แองกัส 50% จำนวน 3 ตัว และโคลูกผสมขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ระดับสายเลือดพันธุ์ขาวลำพูน 50% และพันธุ์ชาร์โรเลส์ 50% จำนวน 3 ตัว (จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์แพร่) โดยปฏิบัติตามข้อกำหนดในจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทดลองทางวิทยาศาสตร์ สภาวิจัยแห่งชาติ และภายใต้คำแนะนำของคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้ทดลอง ศูนย์สัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยพะเยา เลขที่ UP-AE60-01-01-001

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีและสารตั้งต้นที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้คือ DMEM media (Catalogue No.11855-084), Fetal bovine serum Catalogue No.10437-028 Antibiotic-antimycotic Catalogue No.15240-062 Phosphate buffer saline Catalogue No.10010-23 Trypsin-EDTA 0.05% Catalogue No.25200-056 Trypan blue stain 0.4% Catalogue No.15250-061 ผลิตโดยบริษัท กิ๊ปไทย จำกัด และบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด

การเก็บตัวอย่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์

แม่โคถูกนำเข้าสู่ของบั้งคั้บจากนั้นทำความสะอาดบริเวณไขกระดูกด้วยสำลีชุบเอทานอล 70% (V/V) และตัดชิ้นเนื้อไขกระดูกขนาด 1 ซม. นำมาเก็บไว้ในสารละลาย

Phosphate Buffer Saline (PBS) เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการสาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์

นำชิ้นเนื้อที่ได้จากไขกระดูกมาทำความสะอาดอีกครั้ง แล้วใช้มีดตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ในสภาพปลอดเชื้อ แล้วล้างบ้นเหวียงที่ความเร็ว 3,000 rpm ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที และดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง ทำการล้างแบบเดิมด้วย PBS อีก 2 รอบ และนำตัวอย่างใส่ในจานนำไปเลี้ยงในตู้บ่ม 5% CO₂ จากนั้นย่อยด้วย Trypsin (0.025% (W/V) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกเป็นเซลล์เดี่ยว นำเซลล์มาล้าง Trypsin ออกโดย 10% FBS-DMEM โดยการปั่นเหวียงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที แล้วนำมาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS-DMEM ในตู้บ่ม 5% CO₂ เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนนำไปเก็บรักษาโดยการแช่แข็งตามวิธีการของ Intawicha *et al.* (2009)

การทำฮีทช็อกเซลล์ไฟโบรบลาสต์

เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะถูกนำมาทำฮีทช็อกตามวิธีของ Lee *et al.* (2016) โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เก็บแช่แข็ง (Freeze) ไว้ถูกนำมาละลาย (Thaw) ที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 25 วินาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์มาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มี 10% FBS DMEM ที่อุณหภูมิ 38.5°C. ในตู้บ่ม 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจะทำการฮีทช็อกที่อุณหภูมิ 42°C. ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน คือ 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

การศึกษาการแสดงออกของยีน

นำเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากการฮีทช็อกมาศึกษาการแสดงออกของยีนโดยทำการสกัด total RNAs โดยใช้ RNA extraction kit (Geneaid RT050) นำ total RNA

เพื่อหา First strand cDNA โดยการใช้ total RNA 20 µg จากนั้นเติม DNase I 2 µL, DNase I 3 µL 10× Buffer, RNasin 0.25 µL, ddH₂O 4.75 µL ภายใต้อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นทำ PCR homologous cDNA จากฐานข้อมูลของ GenBank ในการตรวจหาการแสดงออกของยีนใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสแบบย้อนกลับ (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) โดยมีรอบการทำ PCR ดังนี้ เริ่มต้นด้วยกระบวนการ Predenaturing 95°ซ. เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นทำปฏิกิริยา 40 รอบ มีรายละเอียดดังนี้ Denaturing ที่อุณหภูมิ 95°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 58°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที Final extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 5 นาที และทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 4°ซ. หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยานำ PCR product ไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน 1.5% Agarose ที่ย้อมด้วย Ethidium bromide ภายใต้แสง UV light ตามวิธีการของ Intawicha *et al.* (2009)

Table 1 Sequence and fragment size of the pairs of primers used for RT-PCR

SL. No.	Gene	Primer sequence	Fragment size (bp)	NCBI/Reference
1	<i>Bcl-2</i>	F: ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA R: TACAGCTCCACAAAGGCGTC	137	NM_001166486.1
2	<i>HSP70</i>	F: AACATGAAGAGCGCCGTGGAGG R: GTTACACACCTGCTCCAGCTCC	171	Bhanuprakash <i>et al.</i> (2016)
3	<i>HSP90</i>	F: GCATTCTCAGTTCATTGGCTATCC R: GTCCTTCTTCTCTCCTCCTCTTC	190	NM_001012670.1
4	<i>β-actin</i>	F: AGGCATCCTGACCCTCAAGTA R: GCTCGTTGTAGAAGGTGTGGT	95	Singh <i>et al.</i> (2014)

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลถูกนำมาวิเคราะห์แบบ (One-way ANOVA) ด้วยโปรแกรม R 64 bit version 3.6.1 (Dalgaard, 2002) และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธีดันแคน (Duncan's New Multiple Range Test, DMRT) โดยกำหนดความเชื่อมั่นที่ 95% (P-value<0.05) แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

การศึกษาที่ 1: อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคลูกผสมพื้นเมือง

จากการศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่อุณหภูมิแตกต่างกันพบว่า อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคลูกผสมพื้นเมืองเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5°ซ. ในกลุ่มโคขาวลำพูน (n=3)

กลุ่มโคลูกผสมชาวลำพูน-แองกัส (n=3) และกลุ่มโคลูกผสมชาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ (n=3) มีค่าร้อยละ 98.06, 97.26 และ 98.12 ตามลำดับ (P=0.566; Table 2) เมื่อเซลล์ถูกฮีทช็อกที่อุณหภูมิ 42°C. เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์กลุ่มโคชาวลำพูน กลุ่มโคลูกผสมชาวลำพูน-แองกัส และกลุ่มโคลูกผสมชาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ มีค่าร้อยละ 99.59, 98.73 และ 99.53 ตามลำดับ

(P=0.234; Table 2) หลังจากนั้นฮีทช็อกต่อเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของกลุ่มโคชาวลำพูน มีอัตราการมีชีวิตรอดสูงสุดร้อยละ 98.73 และ 92.88 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มโคลูกผสมชาวลำพูน-แองกัส และกลุ่มโคลูกผสมชาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ มีอัตราการมีชีวิตรอดร้อยละ 95.70 และ 88.61 และ 96.36 และ 88.85 ตามลำดับ (P<0.05; Table 2)

Table 2 Survival rate of fibroblast cells from Thai-native and crossbred beef cattle after heat shock at 42°C for 0, 6, 24 and 48 h

Time (cell/ml)	% Survival rate			P-value
	KLC (N=3)	KAC (N=3)	KCC (N=3)	
SCC	98.06±0.93	97.26±1.20	98.12±1.00	0.566
6 h	99.59±0.52	98.73±0.71	99.53±0.57	0.234
24 h	98.73±0.16 ^a	95.70±0.53 ^b	96.36±0.60 ^b	<0.010
48 h	92.88±1.62 ^a	88.61±0.75 ^b	88.85±1.54 ^b	<0.014

^{a,b} values in the same row with different superscripts differ (P<0.05)

KLC = Khao Lamphun cattle; KAC = Khao Lamphun-Angus cattle; and KCC = Khao Lamphun-Charolais cattle;

SCC = Start counting cell

ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาฮีทช็อกกับอัตราการมีชีวิตรอดหลังจากฮีทช็อก

จากผลการศึกษาระยะเวลาการฮีทช็อกกับอัตราการมีชีวิตรอดของโคชาวลำพูน โคลูกผสม-ชาวลำพูน-แองกัส และโคลูกผสมชาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาฮีทช็อกกับอัตราการมีชีวิตรอด

ของกลุ่มโคลูกผสมทั้ง 3 พันธุ์ หลังจากฮีทช็อกมีความสัมพันธ์กันในทิศทางเชิงบวก โดยโคชาวลำพูนเท่ากับ 0.896 (Figure 1A) โคลูกผสมชาวลำพูน-แองกัสเท่ากับ 0.647 (Figure 1B) และโคลูกผสมชาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ เท่ากับ 0.862 (Figure 1C) ตามลำดับ

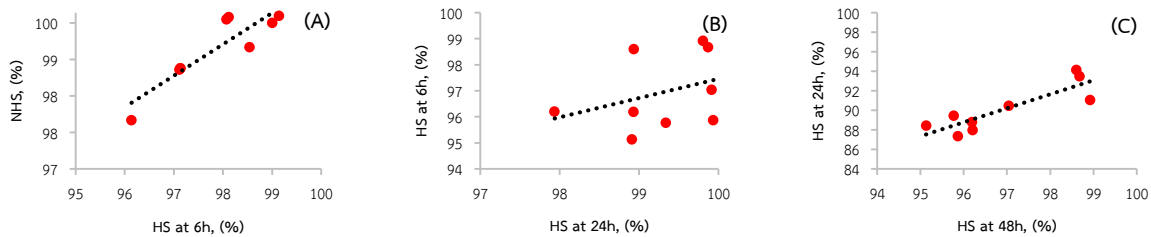


Figure 1 Linear regression of duration and survival rate in three beef cattle breeds were [A] = non heat shock with heat shock at 6h ($Y = 0.6017X + 40.426$; $R^2 = 0.803$), [B] = heat shock at 6h with heat shock at 24h ($Y = 0.7411X + 23.354$; $R^2 = 0.506$), [C] = heat shock at 24 with heat shock at 48h ($Y = 1.4309X - 48.584$; $R^2 = 0.743$)

การศึกษาที่ 2: การแสดงของยีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์

กลุ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคขาวลำพูน โคลูกผสมขาวลำพูน-แองกัส และโคลูกผสมขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ หลังจากฮีทช็อกที่อุณหภูมิ 42°C. เป็นเวลา 0, 6 และ 24 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีน *Bcl-2* (Figure 2A) และ *HSP90* (Figure 2B) เมื่อเทียบกับกลุ่มยีน *β-actin* ซึ่งเป็นยีนควบคุม (Figure 2D) การแสดงออกของยีน *HSP70* พบว่าเซลล์ทุกกลุ่มมีการแสดงออกของยีน *HSP70* ที่แตกต่างกันในแต่ละ

ระยะเวลาที่ได้รับความร้อน คือ หลังจากฮีทช็อกที่อุณหภูมิ 42°C. ชั่วโมงที่ 0 ไม่มีการตอบสนองต่อการแสดงออกของยีน *HSP70* (Figure 2C) เมื่อเซลล์ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 42°C. เป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคมีการแสดงออกของยีน *HSP70* (Figure 2C) เมื่อเปรียบเทียบกับยีน *β-actin* (Figure 2D) ซึ่งเป็นกลไกการทำงานของเซลล์ในการป้องกันหรือยับยั้งการตายของเซลล์หลังจากได้รับความเครียดจากความร้อน

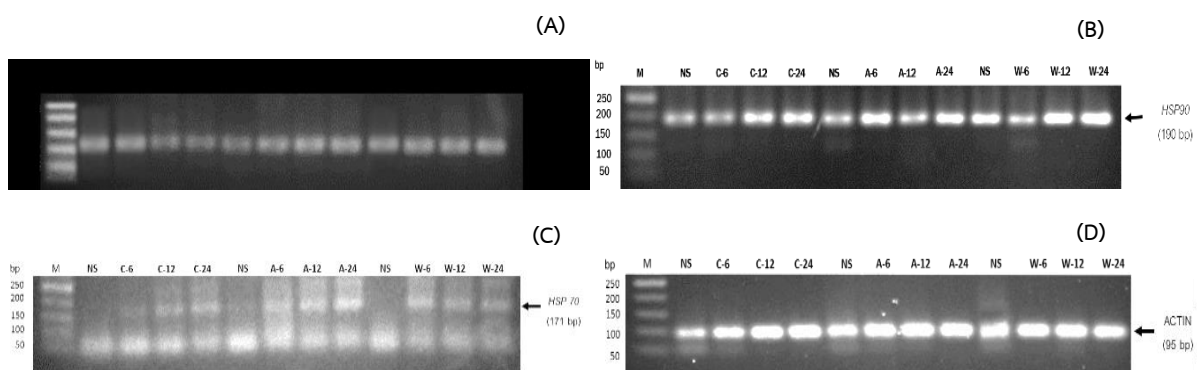


Figure 2 *Bcl-2*, *HSP90* and *HSP70* gene expression of fibroblast from Khao Lamphun and crossbred beef cattle after heat shock at 42°C for 0h, 12h, 24h. *β-actin* gene was used as a control. C = Khao Lamphun-Charolais; A = Khao Lamphun-Angus; W = Khao Lamphun NS = Non Heat Shock

วิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมือง และโคลูกผสมพื้นเมืองหลังจากฮีทช็อก พบว่ากลุ่มโคพื้นเมืองมีอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่าโคลูกผสมพื้นเมือง จากผลการทดลองสอดคล้องกับ Wu *et al.* (2017) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการทนร้อนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคอินเดีย (*Bos indicus*) สามารถทนร้อนดีกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคยุโรป (*Bos Taurus*) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Koatdoka *et al.* (2006) ศึกษาเปรียบเทียบกลไกทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการทนร้อนในโคเขตร้อนและโคเขตหนาว พบว่าโคเขตร้อนมีการทนร้อนได้ดีกว่าโคเขตหนาวเมื่ออยู่ในสภาวะอากาศร้อนเนื่องจากมีความสามารถในการควบคุมกลไกทางสรีรวิทยา (อัตราการหายใจ อัตราการขับเหงื่อ และผลจาก THI) ที่แตกต่างกัน จากผลการศึกษาระยะเวลาการฮีทช็อกกับอัตราการมีชีวิตรอดของโคขาวลำพูน โคลูกผสม-ขาวลำพูนแองกัส และโคลูกผสมขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับอัตราการมีชีวิตรอดพบว่ากลุ่มโคลูกผสมทั้ง 3 พันธุ์ หลังจากฮีทช็อกมีความสัมพันธ์กันในทิศทางเชิงบวก โดยโคขาวลำพูนเท่ากับ 0.896 (Figure 1A) โคลูกผสมขาวลำพูน-แองกัสเท่ากับ 0.647 (Figure 1B) และโคลูกผสมขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ เท่ากับ 0.862 (Figure 1C) ตามลำดับ เนื่องจากโคอินเดีย (*Bos indicus*) ทนอากาศร้อนได้ดีกว่าโคยุโรป (*Bos Taurus*)

จากการศึกษาการตอบสนองของยีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากฮีทช็อกที่อุณหภูมิ 42°C. พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคพื้นเมือง และโคลูกผสมพื้นเมืองมีการตอบสนองต่อยีน *Bcl-2* ฮีทช็อกโปรตีน 90 และฮีทช็อกโปรตีน 70 ภายใต้อุณหภูมิร้อน งานวิจัยของ Lee *et al.* (2016) ได้ศึกษาการทนร้อนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพันธุ์ Taiwan yellow (*Bos indicus*) และโคพันธุ์

Holstein (*Bos taurus*) พบว่ากลุ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคพันธุ์ Taiwan yellow มีปริมาณโปรตีน *Bcl-2* สูงกว่า โคพันธุ์ Holstein แสดงให้เห็นว่า *Bcl-2* มีบทบาทสำคัญในการปรับตัวของเซลล์โดยมีกลไกควบคุมทางไมโทคอนเดรีย ซึ่งยีน *Bcl-2* จะถูกเคลื่อนย้ายไปยังส่วนเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรียเพื่อรักษาความคงตัวของ (Mitochondrial integrity) เพื่อควบคุมการปล่อย Cytochrome C จากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโตซอลภายในเซลล์ (Hu and Kavanagh, 2003) โดย anti-apoptotic ยีน *Bcl-2* และ *Bcl-XL* จะยับยั้งการปล่อยของ Mitochondrial factors และควบคุมขบวนการ Hyperphosphorylation ทำให้ยับยั้งการกระตุ้นของยีน *Bax* และ *Bak* (De Thonel and Eriksson, 2005)

นอกจากนี้ Deb *et al.* (2014) ศึกษาการทนร้อนของโคพันธุ์ Sahiwal (*Bos indicus*) และโคพันธุ์ Frieswal (*Bos-indicus* x *Bos taurus*) ต่อการแสดงออกของฮีทช็อกโปรตีน 90 พบว่าโคพันธุ์ Sahiwal มีปริมาณฮีทช็อกโปรตีน 90 สูงกว่าโคพันธุ์ Frieswal เพื่อควบคุมอุณหภูมิของร่างกาย และเพิ่มความอยู่รอดของเซลล์ภายใต้อุณหภูมิความร้อน ซึ่งฮีทช็อกโปรตีน 90 มีหน้าที่หลักในการควบคุมการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โดยฮีทช็อกโปรตีน 90 จะทำงานร่วมกับฮีทช็อกโปรตีน 70 และเซพโรนอื่นๆ เพื่อรักษาความอยู่รอดของเซลล์ Collier *et al.* (2006) ชี้ให้เห็นว่าสาเหตุที่โคกลุ่ม *Bos indicus* มีความสามารถในการปรับตัวให้อยู่รอดภายใต้อุณหภูมิร้อนได้ดีกว่าโคกลุ่ม *Bos Taurus* เนื่องจากระดับของ HSP ในเซลล์ เมื่อเซลล์อยู่ภายใต้สภาวะความเครียดจากความร้อนทำให้เซลล์สร้างโปรตีนกลุ่มแชพโรน (Chaperones) ที่เรียกว่า ฮีทช็อกโปรตีน (Heat Shock Protein, HSP) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ช่วยรักษาสภาพโปรตีนภายในเซลล์ (Basirico *et al.*, 2011) ซึ่งเซลล์ที่สร้างฮีทช็อกโปรตีนในปริมาณมากจะแสดงถึงการทนต่อความร้อนได้ดี

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในกลุ่มโคขาวลำพูน กลุ่มโคลูกผสมขาวลำพูน-แองกัส และกลุ่มโคลูกผสมขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ ภายใต้อุณหภูมิความร้อน พบว่ากลุ่มโคขาวลำพูนมีอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่ากลุ่มโคลูกผสมขาวลำพูน-แองกัส และกลุ่มโคลูกผสมขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ การแสดงออกของยีน *Bcl-2*, *HSP90* และ *HSP70* หลังจากฮีทช็อกที่อุณหภูมิ 42°C. เป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มโคพื้นเมือง และโคลูกผสมพื้นเมือง มีการตอบสนองและมีการแสดงออกของยีน *Bcl-2*, *HSP90* และ *HSP70* เมื่อเปรียบเทียบกับยีน *β-actin* (ยีนควบคุม)

ข้อเสนอแนะ

1. การถ่ายทอดองค์ความรู้ทางวิชาการ วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และนวัตกรรม โดยส่งเสริมการวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตด้านสายพันธุ์โคที่ทนร้อนให้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศและเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันมากยิ่งขึ้น

2. การถ่ายทอดองค์ความรู้ให้กับเกษตรกร โดยการใช้นวัตกรรมยกระดับสายพันธุ์โคเนื้อที่ทนร้อนจะช่วยให้เกษตรกรได้ลูกโคเนื้อที่เป็นพันธุ์ลูกผสม มีการเจริญเติบโตดีขึ้น จำหน่ายได้ราคาสูงขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยพะเยา (ผด25600439) ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา และศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์แพร่ ที่สนับสนุนสัตว์ทดลองเพื่อเก็บตัวอย่างนำมาศึกษา และขอขอบคุณคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่สนับสนุนสถานที่ห้องปฏิบัติการ ในการทำงานวิจัยครั้งนี้ และ

สุดท้ายขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน ที่สละเวลาช่วยกันทำงานวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Basirico, L., P. Morera, V. Primi, N. Lacetera, A. Nardone and U. Bernabucci. 2011. Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactating cows. **Cell Stress Chaperones** 16(4): 441-448.
- Bhanuprakash, V., U. Singh, G. Sengar, B. Sajjanar, B. Bhusan, T.V. Raja, R. Alex, S. Kumar, R. Singh, A. Kumar and R.R. Alyethodi. 2016. Differential effect of thermal stress on Hsp70 expression, nitric oxide production and cell proliferation among native and crossbred dairy cattle. **J. Therm Biol.** 59: 18-25.
- Collier, R.J., G.E. Dahl and M.J. VanBaale. 2006. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. **J. Dairy Sci.** 89(4): 1244-1253.
- Colmont, C., S. Michelet, D. Guivarch and G. Rousselet. 2001. Urea sensitizes mIMCD3 cells to heat shock-induced apoptosis: protection by NaCl. **Am. J. Physiol Cell Physiol** 280(3): 614-620.
- Dalgaard, P. 2002. **Introductory Statistics with R**. New York: Springer. 364 p.
- De Thonel, A. and J.E. Eriksson. 2005. Regulation of death receptors-relevance in cancer therapies. **Toxicol Appl Pharmacol.** 207(2): 123-132.

- Deb, R., B. Sajjanar, U. Singh, S. Kumar, R. Singh, G. Sengar and A. Sharma. 2014. Effect of heat stress on the expression profile of Hsp90 among Sahiwal (*Bos indicus*) and Frieswal (*Bos indicus* × *Bos taurus*) breed of cattle: A comparative study. **Gene** 536(2): 435-440.
- Dobson, H. and R.F. Smith. 2000. What is stress and how does it affect reproduction. **Anim. Reprod Sci.** 61: 743-752.
- Doljanski, F. 2004. The sculpturing role of fibroblast-like cells in morphogenesis. **Perspect. Biol. Med.** 47(3): 339-356.
- Hu, W. and J.J. Kavanagh. 2003. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. **Lancet Oncology** 4(12): 721-729.
- Intawicha, P., Y.W. Ou, N.W. Lo, S.C. Zhang, Y.Z. Chen, T.A. Lin, H.L. Su, H.F. Guu, M.J. Chen, K.H. Lee, Y.T. Chiu and J.C. Ju. 2009. Characterization of embryonic stem cell lines derived from New Zealand white rabbit embryos. **Cloning Stem Cells** 11(1): 27-38.
- Koatdoke, U., S. Katawatin, S. Srimaraks, M. Duangiinda and Y. Phasuk. 2006. Comparative study of physiological responses related with thermotolerance between *Bos indicus* and *Bos taurus*. **Khon Kaen Agriculture Journal** 34(4): 347-354. [in Thai]
- Lee, J.W., H. Li, H.Y. Wu, S.S. Liu and P.C. Shen. 2016. Improved cellular thermotolerance in cloned Holstein cattle derived with cytoplasts from a thermotolerant breed. **Theriogenology** 85(4): 709-717.
- Lerdweeraphon, W. 2017. The roles of heat shock proteins 70 in enhancing the productive performances of livestock animals. **Chiang mai Veterinary Journal** 15(1): 1-14. [in Thai]
- Maloney, A. and P. Workman. 2002. Hsp90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. **Expert. Opin. Biol. Ther.** 2(1): 3-24.
- Neckers, L. 2002. Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. **Trends Mol. Med.** 8(4 Suppl): S55-61.
- Neckers, L., E. Mimnaugh and T.W. Schulte. 1999. Hsp90 as an anti-cancer target. **Drug. Resist. Updat.** 2(3): 165-172.
- Prayong, P., N. Weerapreeyakul and S. Barusrux. 2007. Apoptosis: pathway and assay. **Journal of Health Research** 21(3): 227-238. [in Thai]
- Singh, A.K., R.C. Upadhyay, D. Malakar, S. Kumar and S.V. Singh. 2014. Effect of thermal stress on HSP70 expression in dermal fibroblast of zebu (Tharparkar) and crossbred (Karan-Fries) cattle. **J. Therm. Biol.** 43: 46-53.

Vogel, P., E. Dux and C. Wiessner. 1997.
Evidence of apoptosis in primary
neuronal cultures after heat shock.

Brain Research 764(1): 205-213.

Wolfenson, D., Z. Roth and R. Meidan. 2000.
Impaired reproduction in heat stressed
cattle: basic and applied aspects.

Anim Reprod Sci. 60-61: 535-547.

Wu, H.Y., S.Y. Peng, H. Li, J.W. Lee, P. Kesorn,

H.H. Wu, J.C. Ju and P.C. Shen. 2017.

Ear fibroblasts derived from Taiwan yellow
cattle are more heat resistant than those
from Hostein cattle. **J. Therm. Biol.**

66: 56-62.