

อัตราการมีชีวิตรอด และการแสดงออกของยีน *HSP70* ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคเนื้อ 3 พันธุ์ ภายใต้อุณหภูมิความร้อน

Survival Rates and Heat Shock 70 Gene Expression in the Fibroblast Cell Lines of 3 Types of Beef Cattle Bred under Hydrothermal Conditions

ธรรมบุญ ธาณี¹ และพยุงค์ อินตะวิชา^{1*}
Thammanoon Thanee¹ and Payungsuk Intawicha^{1*}

บทคัดย่อ

ยีนฮีตช็อกโปรตีน 70 (heat shock protein, *HSP70*) มีบทบาทสำคัญในการปรับตัว การอยู่รอด และการตอบสนองต่อความร้อนของเซลล์โคเนื้อ การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อทราบถึงอัตราการมีชีวิตรอด และการแสดงออกของ *HSP70* ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากโคลูกผสมชาวลำพูน-แองกัส ชาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ และชาวลำพูน ภายใต้อุณหภูมิความร้อน เซลล์ไฟโบรบลาสต์ถูกเก็บจากใบหู จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส การศึกษาที่ 1 อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ของกลุ่มโคพื้นเมืองชาวลำพูนสูงกว่า (ร้อยละ 97.73±0.16 และ 93.33±1.90) กลุ่มโคลูกผสมชาวลำพูน-แองกัส (ร้อยละ 96.36±0.35 และ 88.88±1.31) และกลุ่มโคลูกผสมชาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ (ร้อยละ 96.70±0.44 และ 89.16±1.37) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การศึกษาที่ 2 การแสดงออกของยีน *HSP70* ด้วยวิธี RT-PCR ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากฮีตช็อกที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ในทุกกลุ่มมีการแสดงออกของยีน *HSP70* แสดงให้เห็นถึงกลไกการตอบสนองต่อความร้อนระดับเซลล์ของทั้งโคพื้นเมืองและโคลูกผสม สรุปได้ว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคพื้นเมืองชาวลำพูนเมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส มีอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์สูงกว่าโคลูกผสม และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคทุกกลุ่มมีการแสดงออกของยีน *HSP70* เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส แสดงถึงกลไกการทำงานระดับเซลล์ของโคเนื้อที่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพในเขตร้อนชื้นของประเทศไทยได้

คำสำคัญ: การแสดงออกของยีนฮีตช็อกโปรตีน 70 ภายใต้อุณหภูมิความร้อน เซลล์ไฟโบรบลาสต์ โคลูกผสมชาวลำพูน

Abstract

Gene Heat shock proteins (*HSP70*) play an important role in the adaptation to survival and heat response of cells. The purpose of this study was to determine the effect of hot temperatures on the survival rates and gene expression of fibroblast cells from Khao Lamphun cattle, crossbreed Khao Lamphun-Angus cattle and Khao Lamphun-Charolais cattle. The fibroblast cells were cultured in a 5% CO₂ incubator at 38.5°C. *Study 1:* The cell survival rate of fibroblast cells was determined after culture under hydrothermal conditions at 42°C for 24 and 48 hours. The cells of Khao Lamphun cattle (97.73±0.16 and 93.33±1.90 percent) showed a viability rate higher than that of crossbreed Khao Lamphun-Angus cattle (96.36±0.35 and 88.88±1.31 percent) and Khao Lamphun-Charolais (96.70±0.44 and 89.16±1.37 percent; $p < 0.05$). *Study 2:* The *HSP70* gene expression of fibroblast cells after exposure to the hot temperature of 42°C for 6, 12 and 24 hours was evaluated using the RT-PCR method. It was found that *HSP70* gene was expressed in all groups. This demonstrated the mechanism of cellular heat response of both native and crossbred cattle. In conclusion, the growth rate of fibroblast cells increased during *in vitro* culture. The survival rate of fibroblast cells under hydrothermal conditions from Khao Lamphun cattle was higher than that of fibroblast cells from crossbred cattle. The fibroblast cells of Khao Lamphun and crossbred cattle showed *HSP70* gene expression under hot conditions, which suggests that the fibroblast cells of beef cattle should be able to tolerate heat and adapt to the tropical conditions of Thailand.

Keywords: *HSP70* gene expression, under hyperthermia, cell fibroblast, crossbreeding beef cattle

¹ สาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา อ. เมือง จ. พะเยา 56000

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

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

คำนำ

การเลี้ยงโคเนื้อเป็นอาชีพเสริมสามารถสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรได้อย่างดี ปัจจุบันมีการนำโคเนื้อจากต่างประเทศเข้ามาปรับปรุงพันธุ์เพื่อผลิตโคเนื้อคุณภาพที่มีคุณภาพเนื้อดี และเป็นที่ต้องการของตลาด โดยโคเนื้อคุณภาพที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทย ได้แก่ โคลูกผสมชาร์โรเลส์ และโคลูกผสมแองกัส (เรื่องยศ พิลานันท์ และวันชัย อินทิแสง, 2559) นอกจากนี้กรมปศุสัตว์มีการปรับปรุงพันธุ์โคลูกผสมโดยใช้โคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูนเป็นแม่พันธุ์ฐานสำหรับผลิตโคลูกผสมพื้นเมือง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ โคลูกผสมชาวลำพูน-แองกัส และโคลูกผสมชาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ เพื่อให้ได้ลูกเพศเมียที่มีลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์สูงเจริญเติบโตดี แต่อย่างไรก็ตามการนำโคที่มีสายเลือดยุโรปสูงมาเลี้ยงยังมีข้อจำกัดในเรื่องสภาพอากาศร้อนชื้นของประเทศไทย อาจส่งผลให้โคนั้นมีการกินอาหาร การเจริญเติบโต และประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์ลดลง ดังนั้นการนำโคลูกผสมพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูนมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์จะทำให้โคสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพอากาศร้อนชื้นของประเทศไทยได้ มีรายงานว่าผิวหนังเป็นส่วนที่ช่วยปกป้องโครงสร้างอวัยวะภายในจากสภาพแวดล้อมภายนอก ในผิวหนังมีเซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นองค์ประกอบซึ่งอยู่ในส่วนของหนังแท้ (Fanny, 2004) โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์มีบทบาทที่สำคัญทางสรีรวิทยา (Singh et al., 2014) หรือการตอบสนองต่อการปรับตัวทางชีวเคมีของเซลล์ (Fujita, 1999) ความเครียดจากความร้อน (heat stress) ซึ่งจะส่งผลต่อสุขภาพ ความสามารถในการสืบพันธุ์ และประสิทธิภาพการผลิต (Dobson and Smith, 2000) มีรายงานว่าความเครียดจากความร้อนส่งผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของลูกสุกรลดลง (Wegner et al., 2014) ส่งผลให้โคนมลดปริมาณน้ำนม (Ravagnolo et al., 2000) และลดความสมบูรณ์พันธุ์ (Sartori et al., 2004) มีรายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในหลอดทดลองจากเซลล์ไขกระดูกของสุกรพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์มีการแบ่งตัวเพิ่มสูงขึ้นร้อยละ 94.9 ± 0.52 ถึง 97.8 ± 1.21 (Changqing et al., 2014) Csermely et al. (1998) รายงานว่า เมื่อเซลล์ในร่างกายได้รับความเครียดจากความร้อนส่งผลให้เซลล์มีการแสดงออกของยีนในกลุ่มของฮีตช็อกโปรตีน เพื่อผลิตฮีตช็อกโปรตีนสำหรับกลไกป้องกันและการเกาะกลุ่มของโปรตีน (protein aggregation) และช่วยรักษาโครงสร้างของโปรตีนที่เสียหายให้กลับมามีความเสถียรภาพปกติ (Basirico et al., 2011) โดยกลุ่มฮีตช็อกโปรตีน (heat shock proteins: HSPs) มีอยู่ 5 ชนิดตามน้ำหนักโมเลกุล (molecular weights) ได้แก่ HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 และ HSP40 ซึ่งแต่ละชนิดมีหน้าที่แตกต่างกันไป โดย HSP70 เป็นตัวแรกที่มีการตอบสนองเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นโดยความเครียดจากความร้อน (Kregel, 2002) การศึกษาก่อนหน้านี้ของ Wu et al. (2017) ได้ทำการศึกษาก่อนหน้าของความร้อนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพันธุ์ Taiwan yellow (*Bos indicus*) และโคพันธุ์ Holstein (*Bos taurus*) พบว่า กลุ่มโคทั้ง 2 พันธุ์มีการแสดงออกของยีน HSP70 หลังจากถูกกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามการศึกษาการแสดงออกของยีน HSP70 ในโคชาวลำพูนและโคลูกผสมยังไม่มีรายงาน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทราบถึงอัตราการมีชีวิตรอด และการแสดงออกของยีนฮีตช็อกโปรตีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากโคลูกผสมชาวลำพูน-แองกัส ชาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ และชาวลำพูน ภายใต้อุณหภูมิความร้อน เพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกโคเนื้อคุณภาพดีที่สามารถเลี้ยงในสภาพอากาศร้อนของเมืองไทยต่อไป

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

ทำการศึกษาคอกในโคลูกผสมพื้นเมืองเพศเมียทั้งหมด 9 ตัว ได้แก่ โคชาวลำพูน (3 ตัว) โคลูกผสมชาวลำพูน-แองกัส (3 ตัว) และโคลูกผสมชาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ (3 ตัว) จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา และสถานีวิจัยทดสอบพันธุ์สัตว์แพร่ สำหรับทำงานวิจัย โดยปฏิบัติตามข้อกำหนดในจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทดลองทางวิทยาศาสตร์ สภาวิจัยแห่งชาติ และภายใต้คำแนะนำของคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้ทดลอง ศูนย์สัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยพะเยา เลขที่ UP-AE60-01-01-001

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีและสารตั้งต้นที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ คือ DMEM media; Catalogue No. 11855-084, fetal bovid 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 และ trypan blue stain 0.4%; Catalogue No. 15250-061 ผลิตจากบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด

การเก็บตัวอย่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์

นำโคเข้าของบั้งคัแล้วทำความสะอาดบริเวณใบหูด้วยสำลีชุบ 70% (V/V) ethanol จากนั้นตัวอย่างชิ้นเนื้อใบหูขนาด 1 เซนติเมตรจะถูกตัด และเก็บไว้ในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) เพื่อนำกลับมาเพาะเลี้ยงที่ห้องปฏิบัติการของสาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์

หลังจากนำชิ้นเนื้อที่ได้จากใบหูของโคมาทำความสะอาดอีกรอบแล้ว ใช้มีดตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ในสภาพปลอดเชื้อ แล้วล้างบั้งเหียงที่ความเร็ว 3,000 rpm ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที และดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง ทำการล้างแบบเดิมด้วย PBS อีก 2 รอบ และนำตัวอย่างใส่ในจาน นำไปเลี้ยงในตู้บ่ม 5% CO₂ จากนั้นย่อยด้วย trypsin (0.025% (W/V) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกเป็นเซลล์เดี่ยว นำเซลล์มาล้าง trypsin ออกโดย 10% FBS-DMEM โดยการบั้งเหียงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที แล้วนำมาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS-DMEM ในตู้บ่ม 5% CO₂ เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวน นำไปเก็บรักษาโดยการแช่แข็งตามวิธีการของ Intawacha et al. (2009)

การทำอีทซ็อคเซลล์ไฟโบรบลาสต์

เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะถูกนำมาทำอีทซ็อคตามวิธีของ Lee et al. (2016) โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เก็บแช่แข็ง (freeze) ไว้จะถูกนำมาละลาย (thaw) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์มาเพาะเลี้ยงในจานอาหารที่มี 10% FBS DMEM ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ในตู้บ่ม 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจะทำการอีทซ็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลาที่แตกต่างกันคือ 6 ชั่วโมง 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง

การศึกษาการแสดงออกของยีน

นำเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากการอีทซ็อคมาศึกษาการแสดงออกของยีน โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบย้อนกลับ (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) โดยมีรอบการทำ PCR ดังนี้ เริ่มต้นด้วยกระบวนการ pre-denaturing 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 40 รอบ มีรายละเอียดดังนี้ denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ chilli อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา นำ PCR product ไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน ในการตรวจหาการแสดงออกของยีน โดยทำการสกัด total RNAs โดยใช้ RNA extraction kit (Geneaid RT050) นำ total RNA ของโคเนื้อหา first strand cDNA โดยการใช้ 20 µg of total RNA จากนั้นเติม 2 µL of DNase I, 3 µL of DNase I 10× buffer, 0.25 µL of RNasin, 4.75 µL of ddH₂O ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นหา PCR homologous cDNA จากฐานข้อมูลของ GenBank และตรวจดู PCR product ใน 1.5% Agarose ที่ย้อมด้วย ethidium bromide ภายใตแสง UV light ตามวิธีการของ Intawicha et al. (2009)

การออกแบบการทดลอง การทดลองแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาอัตราการแบ่งเซลล์และอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคลูกผสมพื้นเมือง

ข้อมูลอัตราการแบ่งเซลล์ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ถูกนำมาวิเคราะห์ในแต่ละเวลาของการเพาะเลี้ยง คือ 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบอัตราการแบ่งเซลล์ในแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ โดยตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วยการใช้น้ำยาย้อมสี trypan blue ข้อมูลอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ถูกนำมาวิเคราะห์หลังจากเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อประเมินอัตราการมีชีวิตรอดโดยใช้น้ำยาย้อมสี trypan blue

การทดลองที่ 2 ศึกษาการตอบสนองของยีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคลูกผสมพื้นเมืองถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียสในตู้บ่ม 5% CO₂ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มที่ 2 เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในตู้บ่ม 5% CO₂ เป็นระยะเวลา 6 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างเซลล์มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ primers ดังแสดงใน Table 1

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	HSP70	F: AACATGAAGAGCGCCGTGGAGG R: GTTACACACCTGCTCCAGCTCC	171	(Bhanuprakash et al., 2016)
3	β -ACTIN	F: AGGCATCCTGACCCCTCAAGTA R: GCTCGTTGTAGAAGGTGTGGT	95	(Singh et al., 2014)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วยวิธี One-way ANOVA ด้วยโปรแกรม R 64 bit (version 3.5.1) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan (Duncan New Multiple Range Test: DMRT) โดยกำหนดความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$) แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 ศึกษาอัตราการแบ่งเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมืองและโคลูกผสม

อัตราการแบ่งเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมืองและโคลูกผสมที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส พบว่า อัตราการแบ่งเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูนที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากเริ่มนับเซลล์ครั้งแรก 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นร้อยละ 0.42, 23.37 และ 70.65 ตามลำดับ ($p > 0.05$; Table 2) อัตราการแบ่งเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูน-แองกัสที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากเริ่มนับเซลล์ครั้งแรก 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นร้อยละ 0.47, 23.59 และ 71.04 ตามลำดับ ($p > 0.05$; Table 2) และอัตราการแบ่งเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากเริ่มนับเซลล์ครั้งแรก 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นร้อยละ 0.44, 24.08 และ 71.97 ตามลำดับ ($p > 0.05$; Table 2)

Table 2 Cell division rates in Thai-native and crossbred beef cattle after culture for 1 and 2 days.

Day of culture	% Growth rate			P-value
	WL (n=3)	WL-AG (n=3)	WL-CHA (n=3)	
SCC (cell/ml)	122,667	124,333	126,000	
2 h after SCC (cell/ml)	0.42% (123,183)	0.47% (124,918)	0.44% (126,563)	0.711
24 h (cell/ml)	23.37% (151,333)	23.59% (153,667)	24.08% (156,333)	0.702
48 h (cell/ml)	70.65% (209,333)	71.04% (212,667)	71.97% (216,667)	0.963

WL = Chao Lamphun, WL-AG = Chao Lamphun-Angus, WL-CHA = Chao Lamphun-Charolais.

SCC = start counting cell.

การศึกษาลักษณะนิพิตา (Morphology) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคลูกผสมขาวลำพูนพันธุ์แท้ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แสดงใน Figure 1A และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคลูกผสมขาวลำพูน-แองกัส และโคลูกผสมขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ (Figure 1B, C) Abdian et al. (2015) ได้ทำการทดลองโดยใช้ตัวอย่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากมนุษย์ (Human Dermal Fibroblasts: HDFs) เป็นเซลล์ชนิด dermis ที่มีต้นกำเนิดพบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั้งหมด อีกทั้งยังเป็นเซลล์ที่สามารถทำได้โดยมีการแบ่งตัวที่ดีและสามารถเลี้ยงได้ง่ายในหลอดทดลอง โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 10% FBS-DMEM ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะ (Penicillin / Streptomycin 1%) เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโต 80 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ทำการแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มี Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) และกลุ่มที่ไม่มี bFGF พบว่า หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ HDFs พบว่าเซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นทุก 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าช่วงระยะเวลาที่ 24 ถึง 120 ชั่วโมง HDFs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีและไม่มี bFGF มีอัตราการแบ่งตัวไม่ต่างกัน (Schuldiner et al., 2000) นอกจากนี้การแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ชนิด ได้แก่ Morphogenesis (กระบวนการทำให้เซลล์ที่แบ่งตัวสามารถจัดระเบียบช่วงของการเจริญเติบโต) และ Mitogens (สารกระตุ้นที่ไม่จำเพาะที่กระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวอยู่ในรูปของโปรตีน) ซึ่งปัจจัย

เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตของสัตว์ นอกจากนี้ในทางแพทย์ยังชี้ให้เห็นว่าปัจจัยการแบ่งตัวของเซลล์เหล่านี้สามารถนำไปใช้ทดลองสำหรับหลายโรคของมนุษย์ (Agha et al., 2016)

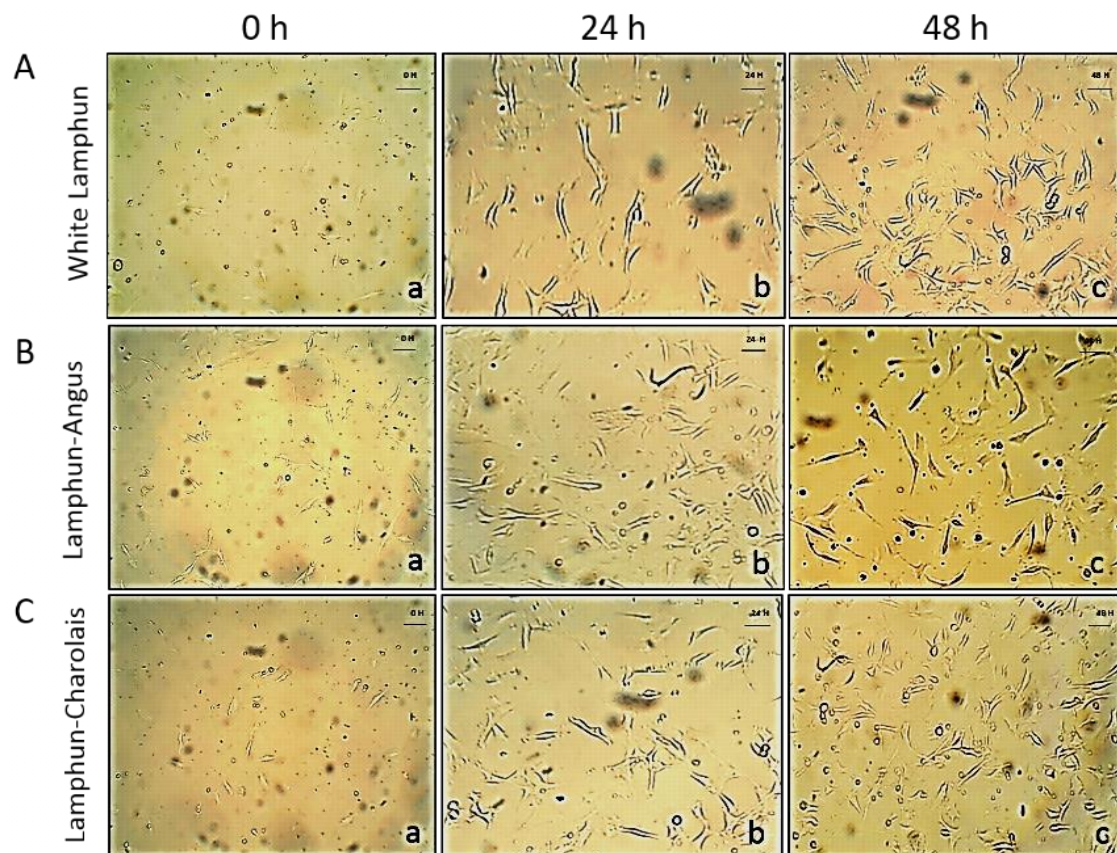


Figure 1 Morphology of fibroblast cell of cattle after cell culture. A: Population of fibroblast cells in Khao Lamphun cattle at 0 h (Aa), 24 h (Ab) and 48 h (Ac); B: Population of fibroblast cells in Chao Lamphun-Angus cattle at 0 h (Ba), 24 h (Bb) and 48 h (Bc); C: Population of fibroblast cells in Chao Lamphun-Charolais at 0 h (Ca), 24 h (Cb) and 48 h (Cc).

การตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

หลังจากแยกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจดูการรอดชีวิตโดยใช้น้ำยาย้อมสี trypan blue พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคลูกผสมขาวลำพูนเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 0 ชั่วโมง มีลักษณะเกาะติดกับจานซึ่งมีรูปร่างเป็นกระสวยตามลูกศรสีแดง (Figure 2A) หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์มีลักษณะลอย มีรูปร่างทรงกลมตามลูกศรสีแดง (Figure 2B) ซึ่งเซลล์ที่มีลักษณะลอยเป็นเซลล์ที่มีการรอดชีวิตต่ำ เมื่อนำตัวอย่างเซลล์มาตรวจนับและประเมินการมีชีวิตรอดด้วยน้ำยาย้อมสี trypan blue พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคลูกผสมขาวลำพูนเพาะเลี้ยงระยะเวลา 0 ชั่วโมง ย้อมติดสีน้ำเงินน้อยกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงระยะเวลา 24 ชั่วโมง ตามลูกศรสีแดง ซึ่งเซลล์ที่ย้อมติดสีน้ำเงินเป็นเซลล์ตาย ส่วนเซลล์ที่มีลักษณะทรงกลมใสเป็นเซลล์ที่รอดชีวิตสูง โดยตรวจนับจำนวนเซลล์ และนำเสนอในรูปแบบร้อยละ (Figure 2C, D)

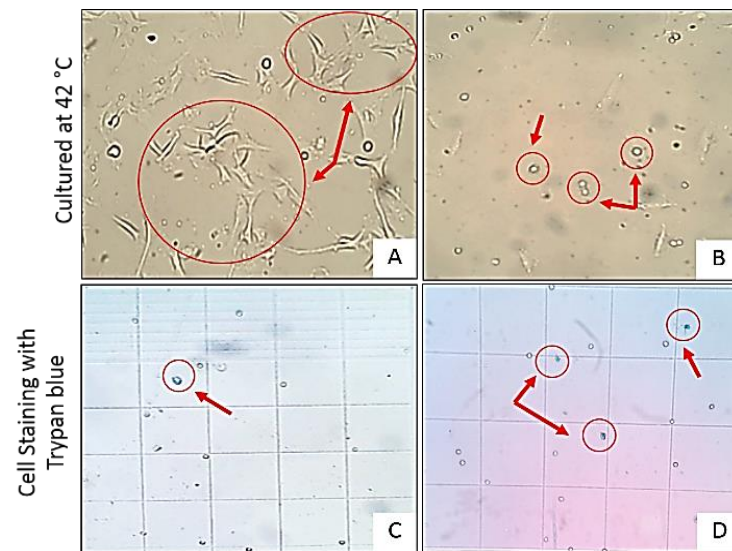


Figure 2 Survival rate of cell after culture at 42 °C were determined with trypan blue. A: morphology of adherent fibroblast cell before heat shock; B: after heat shock fibroblast cell will suspension in culture medium; C-D: dead cell was stained with trypan blue.

อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์โคลูกผสมพื้นเมืองภายใต้อุณหภูมิความร้อน

จากการศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคลูกผสมพื้นเมืองก่อนฮีทช็อกที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของกลุ่มโคขาวลำพูน โคลูกผสมขาวลำพูน-แองกัส และโคลูกผสมขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ มีอัตราการมีชีวิตรอดร้อยละ 99.86 ± 0.06 , 99.73 ± 0.33 และ 99.92 ± 0.01 ตามลำดับ ($p > 0.05$; Table 3) หลังจากฮีทช็อกที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของกลุ่มโคขาวลำพูนมีอัตราการมีชีวิตรอดสูงที่สุด คือร้อยละ 97.73 ± 0.16 และ 93.33 ± 1.90 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มโคลูกผสมขาวลำพูน-แองกัส และกลุ่มโคลูกผสมขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ มีอัตราการมีชีวิตรอดร้อยละ 96.36 ± 0.35 และ 88.88 ± 1.31 , 96.70 ± 0.44 และ 89.16 ± 1.37 ตามลำดับ ($p < 0.05$; Table 3) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Deb et al. (2014) ซึ่งทำการศึกษาผลของความเครียดจากความร้อนในโคพันธุ์ Sahiwal (*Bos indicus*) และโคพันธุ์ Frieswal (*Bos indicus* × *Bos taurus*) พบว่า โคพันธุ์ Sahiwal มีอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่าโคพันธุ์ Frieswal ซึ่งคล้ายคลึงกันกับงานวิจัยของ Wu et al. (2017) ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการทนร้อนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพันธุ์ Taiwan yellow (*Bos indicus*) และโคพันธุ์ Holstein (*Bos taurus*) พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคพันธุ์ Taiwan yellow สามารถทนร้อนดีกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคพันธุ์ Holstein

Table 3 Survival rate of fibroblast cells from Thai-native and crossbred beef cattle after heat shock at 42 °C for 0, 24 and 48 h.

Time interval (h)	% Survival rate			P-value
	WL (n=3)	WL-AG (n=3)	WL-CHA (n=3)	
NSH (cell/ml)	99.86 ± 0.06	99.73 ± 0.33	99.92 ± 0.01	0.504
HS 24 h (cell/ml)	97.73 ± 0.16^a	96.36 ± 0.35^b	96.70 ± 0.44^b	<0.05
HS 48 h (cell/ml)	93.33 ± 1.90^a	88.88 ± 1.31^b	89.16 ± 1.37^b	<0.05

^{a, b} Percent in the column with different in superscript differ significantly ($P < 0.05$).

WL = Khao Lamphun, WL-AG = Khao Lamphun-Angus, WL-CHA = Khao Lamphun-Charolais.

NHS = non heat shock, HS = heat shock.

การทดลองที่ 2 การศึกษาการตอบสนองของยีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์

จากการศึกษาการตอบสนองของยีนฮีตช็อกโปรตีน 70 (*HSP70*) ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยมีการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการวัดการแสดงออกของยีน *HSP70* อย่างจำเพาะ ซึ่งไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ เมื่อนำมาเพิ่มจำนวน DNA ของยีน *HSP70* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ cDNA ชุด Tetra cDNA Synthesis Kit พบว่า DNA ของยีน *HSP70* ที่ได้ มีความยาว 171 คู่เบส เมื่อทำการเปรียบเทียบการตอบสนองของยีน *HSP70* ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูน โคลูกผสมขาวลำพูน-แองกัส และโคลูกผสมขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ หลังจากฮีตช็อกที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ชั่วโมงที่ 0 ไม่มีการตอบสนองต่อการแสดงออกของยีน *HSP70* (Figure 3A) เมื่อฮีตช็อกที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคทั้ง 3 กลุ่ม มีการแสดงออกของยีน *HSP70* ในสภาพที่เซลล์ได้รับความร้อนจะส่งผลทำให้เซลล์มีการแสดงออกของยีน *HSP70* เพื่อผลิต *HSP70* ในกระบวนการป้องกันไม่ให้โปรตีนในเซลล์ถูกทำลายและช่วยให้โปรตีนที่เสียสภาพไปสามารถคืนสภาพและทำงานได้ปกติ (จักรกริช เจริญศิลป์ และคณะ, 2555) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ภายใต้อุณหภูมิความร้อน เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคทั้ง 3 กลุ่มมีการแสดงออกของยีน *HSP70* (Figure 3A) ซึ่งให้เห็นว่าเซลล์ผิวหนังของโคมีกลไกในการตอบสนองต่อความร้อน นอกจากนี้ Collier et al. (2006) ได้รายงานไว้ว่า โคกลุ่ม *Bos indicus* มีความสามารถในการทนความร้อนได้ดีกว่าโคกลุ่ม *Bos Taurus* โดยเมื่อเซลล์อยู่ภายใต้สภาวะความเครียดจากความร้อน ยีน *HSP* จะมีการแสดงออกเพื่อสร้างฮีตช็อกโปรตีน สำหรับช่วยรักษาสภาพโปรตีนภายในเซลล์ (Basirico et al., 2011) ให้สามารถทนต่อความร้อนได้ (Kregel, 2002) ระดับการแสดงออกของยีน *HSP70* จากเซลล์อาจเป็นตัวชี้วัด (biomarker) การทนต่อความร้อนของโคเนื้อลูกผสมสำหรับเลี้ยงในสภาพอากาศของประเทศไทยได้ (Basirico et al., 2011)

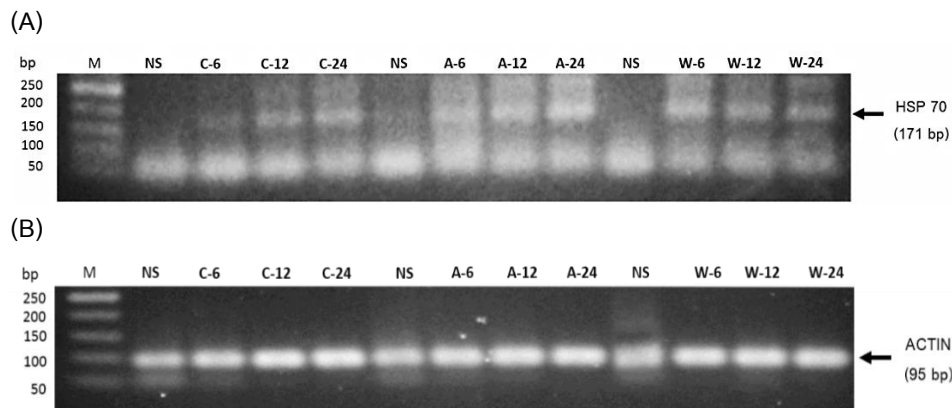


Figure 3 *HSP70* gene expression of fibroblast from Thai-native and crossbred beef cattle after heat shock at 42 °C for 0 h, 12 h and 24 h. β -actin gene were served at control.

C = Khao Lamphun-Charolais, A = Khao Lamphun-Angus, W = Khao Lamphun.

NS = non heat shock.

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่า อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส มีการแบ่งตัวที่เพิ่มสูงขึ้นในโคลูกผสมขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์ โคลูกผสมขาวลำพูน-แองกัส และโคพื้นเมืองขาวลำพูนไม่ต่างกัน ภายใต้อุณหภูมิความร้อน เซลล์ของโคขาวลำพูนมีอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่าโคลูกผสมขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์และโคลูกผสมขาวลำพูน-แองกัส ทั้งนี้โคทุกกลุ่มมีการแสดงออกของยีน *HSP70* หลังจากได้รับอุณหภูมิความร้อน

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยพะเยา ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา และศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์แพร่ ที่สนับสนุนสัตว์ทดลองเพื่อเก็บตัวอย่างในการนำมาศึกษา และขอขอบพระคุณคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่สนับสนุนสถานที่ห้องปฏิบัติการในการทำงานวิจัยครั้งนี้ และสุดท้ายขอขอบพระคุณผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่สละเวลาช่วยกันทำงานวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- จักรกริช เจริญศิลป์, สุภร กตเวทิน, ยุพิน ผาสุข และสุรางคนา สุขเลิศ. 2555. การตอบสนองทางสรีรวิทยาและปริมาณ HSP70 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคพื้นเมืองไทยต่อสภาพอากาศในรอบวัน. *แก่นเกษตร* 40 (2): 377-380.
- เรืองยศ พิลานันท์ และวันชัย อินทิแสง. 2559. สมรรถภาพการผลิตของโคลูกผสมพื้นเมือง×โคนันแอ่งกัสระดับสายเลือดต่าง ๆ เมื่อได้รับฟางข้าวและกากแป้งมันสำปะหลังหมัก. *แก่นเกษตร*. 44 (1): 425-431.
- Abdian, N., Dehkordi, P. G., Chaleshtori, M. H., Arjenaki, M. G., Doosti, A., and Amiri, B. 2015. Comparison of human dermal fibroblasts (HDFs) growth rate in culture media supplemented with or without basic fibroblast growth factor (bFGF). *Cell Tissue Bank* 16: 487-495.
- Agha, E., Kosanovic, D., Schermuly, R. T., and Bellusci, S. 2016. Role of fibroblast growth factors in organ regeneration and repair. *Semin Cell Dev Biol.* 53: 76-84.
- Basirico, L., Morera, P., Primi, V., Lacetera, N., Nardone, A., and Bernabucci, U. 2011. Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactating cows. *Cell Stress Chaperones* 16: 441-448.
- Bhanuprakash, V., Singh, U., Sengar, G., Sajjanar, B., Bhusan, B., Raja, T. V., Alex, R., et al. 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.
- Changqing, L., Guo, Y., Taofeng, L., Xiangchen, L., Weijun, G., and Yuihui, M. 2014. Establishment and genetic characteristics analysis of *in vitro* culture a fibroblast cell line derived from Wuzhishan miniature pig. *Cryobiology* 68: 281-287.
- Collier, R. J., Dahl, G. E., and VanBaale, M. J. 2006. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89: 1244-1253.
- Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z., and Nardai, G. 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function and clinical applications a comprehensive review. *Pharmacol Therapeut* 79: 129-168.
- Deb, R., Sajjanar, B., Singh, U., Kumar, S., Singh, R., Sengar G., and Sharma, A. 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: 435-440.
- Dobson, H., and Smith, R. F. 2000. What is stress, and how does it affect reproduction. *Anim Reprod Sci.* 60-61: 743-752.
- Fanny, D. 2004. The sculpturing role of fibroblast-like cells in morphogenesis. *Perspect Biol. Med.* 47: 339-356.
- Fujita, J. 1999. Cold shock response in mammalian cells. *J. Mol Microb Biotech.* 1: 243-255.
- Intawicha, P., Ou, Y. W., Lo, N. W., Zhang, S. C., Chen, Y. Z., Lin, T. A., Su, H. L., et al. 2009. Characterization of embryonic stem cell lines derived from New Zealand white rabbit embryos. *Cloning Stem Cells* 11: 27-38.
- Kregel, K. C. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl Physiol.* 92: 2177-2186.
- Lee, J. W., Li, H., Wu, H. Y., Liu, S. S., and Shen, P. C. 2016. Improved cellular thermotolerance in cloned Holstein cattle derived with cytoplasts from a thermotolerant breed. *Theriogenology* 85: 709-717.
- Ravagnolo, O., Misztal, I., and Hoogenboom, G. 2000. Genetic component of heat stress in dairy cattle, development of heat index function. *J. Dairy Sci.* 83: 2120-2125.
- Sartori, R., Haughian, J. M., Shaver, R. D., Rosa, G. J., and Wiltbank, M. C. 2004. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy Sci.* 87: 905-920.
- Schuldiner, M., Yanuka, O., Eldor, J. I., Melton, D. A., and Benvenisty, N. 2000. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *PNAS* 97: 11307-11312.
- Singh, A. K., Upadhyay, R. C., Malakar, D., Kumar, S., and Singh, S. V. 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.
- Wegner, K., Lambertz, C., Das, G., Reiner, G., and Gauly, M. 2014. Climatic effects on sow fertility and piglet survival under influence of a moderate climate. *Animal* 8: 1526-1533.
- WU, H. Y., Peng, S. Y., Li, H., Lee, J. W., Kesorn, P., Wu, H. H., Ju, J. C., and Shen, P. C. 2017. Ear fibroblast derived from Taiwan yellow cattle are more heat resistant than those from Holstein cattle. *J. Therm Biol.* 66: 56-62.

วันรับบทความ (Received date) : 29 มี.ค. 61

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 11 ก.ค. 61

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ต.ค. 61