

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ในท่อนำไข่ของสุกร ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

ไพศาล เทียนไทย*

Abstract

Paisan Tienthai*

AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF ANTI-APOPTOTIC BCL-2 IN THE PIG'S OVIDUCT DURING THE OESTROUS CYCLE

The purpose of this study was to determine the localization of Bcl-2 protein in porcine oviducts. Anti-human Bcl-2 monoclonal antibody was used to localize Bcl-2 protein immunohistochemically in the uterotubal junction (UTJ), isthmus and ampulla of pre-ovulatory (n=10) and post-ovulatory (n=10) sows. The Bcl-2 protein was detected in quantity in the intracytoplasm of the epithelial cells, some types of leukocytes in the epithelial layer and in the subepithelial connective tissue, in fibroblasts, as well as smooth muscle cells of the UTJ, isthmus and ampulla in the pre-ovulatory period. In contrast, the expression of Bcl-2 was lower in the oviduct tissues during the post-ovulatory period. Based on these observations, it might be suggested that Bcl-2 could play a role in the proliferation and differentiation of pig oviduct tissues during the proestrus to oestrous phases.

Keywords : Bcl-2, oviduct, pig

Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330

*Corresponding author

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

ไพศาล เทียนไทย*

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ในท่อไข่ของสุกรด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ในท่อไข่ของสุกรในระยะก่อนการตกไข่ (n=10) และระยะหลังการตกไข่ (n=10) ผลการศึกษาพบว่า Bcl-2 ปรากฏอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของท่อไข่ โดยการติดสีเข้มจะพบในท่อไข่ระยะก่อนการตกไข่มากกว่าระยะหลังการตกไข่ ซึ่งการปรากฏของ Bcl-2 จะพบที่เซลล์เยื่อของท่อไข่ เซลล์เม็ดเลือดขาวบางชนิดซึ่งอยู่ในชั้นเยื่อและในชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อ เซลล์ fibroblast และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของผนังท่อไข่ จากผลการศึกษาพบว่า Bcl-2 อาจมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเจริญเปลี่ยนแปลงทั่วไปของเซลล์เยื่อและส่วนประกอบอื่นๆ ภายในท่อไข่ของสุกร โดยเกิดขึ้นในระยะโปรเอสตรัสถึงระยะเอสตรัสซึ่งเป็นระยะก่อนการตกไข่

คำสำคัญ : Bcl-2 ท่อไข่ สุกร

บทนำ

ท่อไข่มีบทบาทสำคัญในระบบสืบพันธุ์สุกร โดยท่อไข่แต่ละส่วนมีหน้าที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับวงจรการเป็นสัดและกลไกในการปฏิสนธิ การผสมพันธุ์ในสุกรจะเกิดขึ้นในช่วงที่สุกรเพศเมียเป็นสัดหนึ่ง ซึ่งเป็นระยะก่อนการตกไข่ โดยตัวสุกจะเคลื่อนที่เข้าไปที่บริเวณรอยต่อของปีกมดลูกและท่อไข่ (uterotubal junction, UTJ) พร้อมทั้งจะเกิดกระบวนการคาปาซิเตชัน (Hunter et al., 1998) เมื่อถึงระยะตกไข่ โอโอไซต์เคลื่อนที่ผ่านท่อไข่ส่วน ampulla มาถึงบริเวณรอยต่อระหว่างท่อไข่ส่วน isthmus และ ampulla (ampullary-isthmus junction, AIJ) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการปฏิสนธิในสุกร (Hunter, 1988) หลังจากการปฏิสนธิตัวอ่อนจะเจริญและเคลื่อนที่ภายใน isthmus เป็นระยะเวลาหนึ่งก่อนที่ตัวอ่อนจะไปฝังตัวในผนังมดลูก ดังนั้น ท่อไข่ในแต่ละส่วนจึงต้องมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับตัวสุก โอโอไซต์และตัวอ่อนในระยะแรก โดยเซลล์เหล่านี้จะสัมผัสกับเซลล์เยื่อและของเหลวที่อยู่ภายในท่อที่เกิดจากการหลั่งของเซลล์คัลลัสและการซึมผ่านจากชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อ (Rodriguez-Martinez et al., 2001)

โปรตีนในกลุ่ม Bcl-2 family มีหน้าที่ทั้งกระตุ้นและยับยั้ง โดยกลุ่มที่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น (proapoptotic proteins) ประกอบด้วย Bax, Bok และ Bak สำหรับกลุ่มที่ทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการเสื่อมตายของเซลล์ (anti-apoptotic proteins)

คือ Bcl-x, Bcl-w และ Bcl-2 (Gibson et al., 1996) Bcl-2 พบได้ที่ smooth endoplasmic reticulum, perinuclear membrane และ mitochondrial membrane (Monaghan et al., 1992) มีหน้าที่สนับสนุนการมีชีวิตรอดสำหรับเซลล์หลายชนิด โดยขัดขวางการหลั่งของ cytochrome c และ apoptosis-inducing factor (AIF) จาก mitochondria ซึ่งเป็นสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ (Kluck et al., 1997) ในระบบทางเดินสืบพันธุ์เพศเมีย การแสดงออกของ Bcl-2 ในมดลูกระยะ proliferative phase มีผลในการยับยั้งการเสื่อมตายของเซลล์เยื่อของมดลูก (Otsuki et al., 1994) ในรังซึ่งเป็นอวัยวะที่อยู่ใกล้ชิดกับมดลูก จะพบการปรากฏของ Bcl-2 ซึ่งมีอิทธิพลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ multinucleated syncytiotrophoblast (Wei et al., 2005) และการแสดงออกของ Bcl-2 ในรังไข่มีผลทำให้ฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์มีจำนวนมากขึ้น ขณะที่จำนวนฟอลลิเคิลที่กำลังฝ่อตัวมีจำนวนลดลง (Morita et al., 1999) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาการปรากฏของ Bcl-2 โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในบริเวณ UTJ และท่อไข่ส่วน isthmus และ ampulla ของสุกรในระยะก่อนการตกไข่และหลังตกไข่ เพื่อเป็นพื้นฐานความรู้ที่สำคัญทางสรีรวิทยาเกี่ยวกับกลไกการป้องกันการเสื่อมตายในท่อไข่สุกร

วัสดุและวิธีการ

สัตว์ทดลองและการเก็บท่อนำไข่

แม่สุกรสุขภาพสมบูรณ์เพศสายพันธุ์ Swedish Landrace x Swedish Yorkshire อายุประมาณ 1.5-2.5 ปี น้ำหนัก 200-250 กก. และลำดับครอกที่ 2-4 จำนวน 20 ตัว รับซื้อมาจากฟาร์มในวันที่ย่านมและนำมาเลี้ยงที่คอกสุกรของภาควิชาสัตวศาสตร์และเอนูเวชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์แห่งสวีเดน แม่สุกรทุกตัวได้รับน้ำและอาหารอย่างเพียงพอตามมาตรฐานของประเทศสวีเดน และเลี้ยงไว้ใกล้ชิดกับสุกรพ่อพันธุ์ตลอดเวลา ตรวจคัดแม่สุกรด้วยวิธีการกดหลัง (back-pressure) ทุกเช้าและเย็น เมื่อแม่สุกรแสดงอาการเป็นสัดหนึ่ง จะใช้เครื่องอัลตราซาวด์แบบเรียลไทม์-โหมด ตรวจการตกไข่ของแม่สุกรโดยการสอดโพรบผ่านทางทวารหนัก (Soede et al., 1992) โดยตรวจทุก 4 ชม. ตั้งแต่แม่สุกรแสดงการเป็นสัด จนกระทั่งพบว่าฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ (ประมาณ 0.8 ซม. ถึง 1 ซม.) เริ่มหายไปบางส่วน จึงระบุว่าเป็นระยะตกไข่

แม่สุกรที่อยู่ในระยะก่อนตกไข่ (ก่อนการตกไข่ประมาณ 10-12 ชม. จำนวน 10 ตัว) และระยะหลังตกไข่ (หลังการตกไข่ตามธรรมชาติประมาณ 18-20 ชม. จำนวน 10 ตัว) ทำให้อย่างสงบตามจรรยาบรรณสัตวแพทย์ เปิดผ่าเพื่อเก็บอวัยวะสืบพันธุ์ของแม่สุกร ข้างและแยกท่อนำไข่ โดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ UTJ, isthmus และ ampulla แล้วแช่ไว้ใน 4% paraformaldehyde นำตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้มาผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์เพื่อใส่ลงในบล็อกพาราฟิน ตัดชิ้นเนื้อขนาด 4 ไมโครเมตร ย้อมด้วยสี hemotoxylin และ eosin เพื่อตรวจสอบภาพโดยทั่วไปของท่อนำไข่แต่ละส่วน ก่อนจะนำไปทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี

การย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีโดยวิธี streptavidin-peroxidase complex ใช้ monoclonal mouse anti-Bcl-2 antibody (M0887, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ (Mentschel and Claus, 2003) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ขจัดพาราฟิน จากนั้นแช่ในสารละลาย 3% hydrogen peroxide ในเมทานอล เพื่อยับยั้งปฏิกิริยา peroxidase ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที นำตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงใน 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0) แล้วต้มให้เดือดในไมโครเวฟ (800 วัตต์) 3 ครั้งๆ ละ 3-5 นาที แล้วหยด

normal horse serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ที่ความเข้มข้น 1:10 ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หยด Bcl-2 antibody ที่ความเข้มข้น 1:40 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C. ประมาณ 20-22 ชม. หยด horse biotinylated anti-mouse IgG (Vector Laboratories) ที่ความเข้มข้น 1:400 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วหยด horseradish peroxidase streptavidin (Vector Laboratories) ที่ความเข้มข้น 1:400 ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ทำให้เกิดสีโดยการหยด 0.05% 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, DakoCytomation) ประมาณ 2-5 นาที แล้วย้อมทับด้วย Meyer's hematoxylin ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง โดยอวัยวะที่ได้ทราบผลว่ามีการติดสีบวกของ Bcl-2 คือ ต่อมน้ำเหลือง (Meda et al., 2003) ของสุกรเป็นตัวควบคุมบวก ขณะที่ตัวควบคุมลบจะใช้ mouse IgG1 monoclonal antibody (DakoCytomation) แทนที่ Bcl-2 antibody

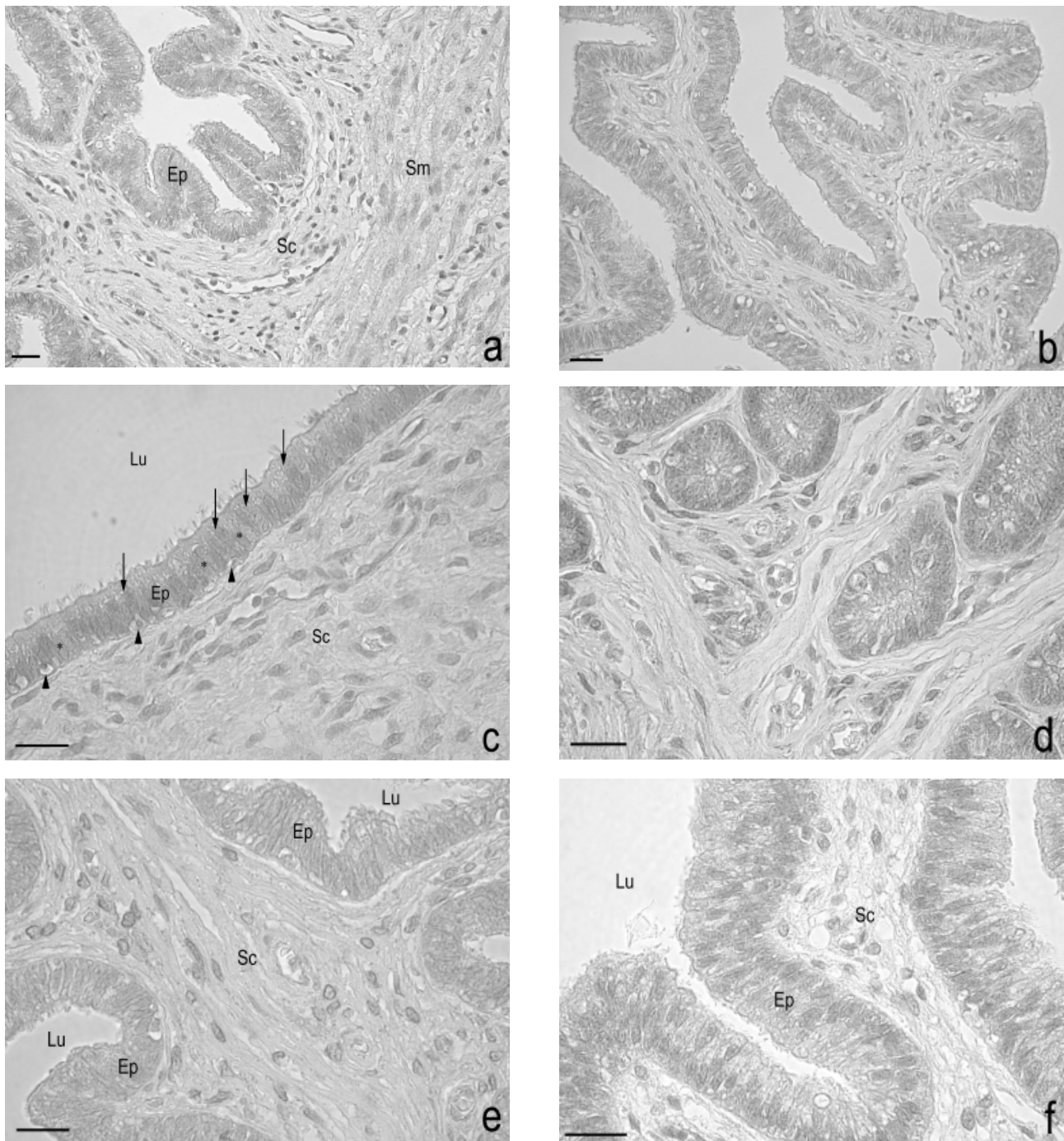
การประเมินผลการติดสี

ท่อนำไข่ประกอบด้วยชั้นต่างๆ คือ ชั้น endosalpinx (ประกอบด้วยเซลล์เยื่อท่อนำไข่และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้เยื่อ) ชั้น myosalpinx (ประกอบด้วยเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ) และชั้น serosa ที่ต่อเนื่องไปกับเยื่อเมสซอสาลปีนซ์ ในการศึกษานี้ จะตรวจดูการติดสีของเซลล์ในชั้นเยื่อ เซลล์ต่างๆ ที่อยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ โดยจะจำแนกความเข้มของการติดสีในส่วนต่างๆ ของท่อนำไข่ทั้ง 3 ส่วน ดังกล่าว โดยแบ่งเป็นเกรด -, +, ++ และ +++ ตามลำดับ

ผล

การติดสีของ Bcl-2 จะปรากฏในเซลล์ต่างๆ ของท่อนำไข่แต่ละส่วนทั้งระยะก่อนตกไข่และระยะหลังตกไข่ โดยให้ผลบวกติดสีเหลืองน้ำตาลจนถึงน้ำตาลเข้มในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อ เซลล์เม็ดเลือดขาวที่อยู่ในเยื่อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้เยื่อ รวมทั้งเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ โดยท่อนำไข่ระยะก่อนการตกไข่ (รูปที่ 1a) จะพบระดับความเข้มของการติดสีจะใกล้เคียงกับตัวควบคุมบวก และการปรากฏผลบวกของ Bcl-2 จะเข้มมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับท่อนำไข่ในระยะหลังตกไข่ (รูปที่ 1b) ดังแสดงในตารางที่ 1

การติดสีของเซลล์เยื่อในชั้น UTJ (รูปที่ 1c-d) ท่อนำไข่ส่วน isthmus (รูปที่ 1e) และ ampulla (รูปที่ 1f) ในระยะก่อนตกไข่ จะปรากฏที่ไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อ ซึ่งใน UTJ จะพบการติดสีในเซลล์ที่มีซิเลีย (ciliated cell)



รูปที่ 1 แสดงการติดสีของ Bcl-2 ในท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ของสุกร; (a) การปรากฏของ Bcl-2 ในเนื้อเยื่อชั้นต่างๆ ของท่อนำไข่ส่วน ampulla ในระยะก่อนการตกไข่ เปรียบเทียบกับ (b) การติดสีของ Bcl-2 ใน ampulla ระยะหลังตกไข่; (c) Bcl-2 ที่ปรากฏในเยื่อของ UTJ ในระยะก่อนการตกไข่ โดยเฉพาะในเซลล์ที่มีซีเลีย (ลูกศร) เปรียบเทียบกับเซลล์ค้ำหลัง (ดอกจันทน์) และเซลล์คล้ายเม็ดเลือดขาวซึ่งอยู่ภายในชั้นเยื่อ (หัวลูกศร); (d) การติดสีของเซลล์ต่างๆ ในชั้นใต้เยื่อของ UTJ ในส่วนที่ติดกับมดลูก ระยะก่อนการตกไข่; สำหรับ (e) ท่อนำไข่ส่วน isthmus และ (f) ท่อนำไข่ส่วน ampulla ระยะก่อนตกไข่ที่กำลังขยายสูงขึ้นจะพบการแสดงออกของ Bcl-2 ที่ชัดเจนในชั้นเยื่อซึ่งปรากฏทั้งเซลล์ที่มีซีเลียและเซลล์ค้ำหลัง; Lu = lumen, Ep = epithelium, Sc = subepithelium connective tissue, Sm = smooth muscle layer; bar = 20 ไมโครเมตร

ตารางที่ 1 แสดงระดับความเข้มของการติดสีย้อมในการแสดงออกของ Bcl-2 ในเนื้อเยื่อชั้นต่างๆ ของท่อไข่สุกร

ระยะ	เซลล์เยื่อบุ			เซลล์เม็ดเลือดขาวในชั้นเยื่อบุและใต้เยื่อบุ			เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ		
	UTJ	IST	AMP	UTJ	IST	AMP	UTJ	IST	AMP
ก่อนการตกไข่	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
หลังการตกไข่	+	+	+	+/++	+/++	+/++	++	++	++

ความเข้มของการติดสีย้อม: - ไม่พบการติดสี, + พบการติดสีอ่อน, ++ พบการติดสีปานกลาง, +++ พบการติดสีเข้ม

UTJ = uterotubal junction, IST = isthmus, AMP = ampulla, CNT = connective tissue

เป็นส่วนใหญ่ ขณะที่การติดสีของเซลล์เยื่อบุของ isthmus และ ampulla จะพบทั้งเซลล์ที่มีซีเลียและเซลล์คัดหลั่ง (secretory cell) ซึ่งในชั้นเยื่อบุของท่อไข่จะพบการติดสีย้อมปรากฏที่เซลล์รูปร่างกลมที่เคลื่อนที่ขึ้นมาแทรกกระหว่างเซลล์เยื่อบุด้วย สำหรับการติดสีของเซลล์ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ชั้นเยื่อบุ พบว่าเซลล์รูปร่างคล้ายกระสวย (fibroblast) ติดสีเข้มเด่นชัด และเซลล์ชนิดอื่นที่ติดสีจะมีลักษณะกลมหรือเซลล์รูปไข่ อย่างไรก็ตาม พบเซลล์บางชนิดในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ไม่สามารถระบุได้ซึ่งไม่พบการติดสี ขณะที่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของ UTJ และท่อไข่ส่วนต่างๆ จะปรากฏผลบวกในระดับความเข้มที่ใกล้เคียงกัน

วิจารณ์

รายงานการวิจัยนี้เป็นครั้งแรก ได้ศึกษาการแสดงออกของ Bcl-2 ในท่อไข่สุกร โดยผลการศึกษพบว่าเซลล์ต่างๆ ที่ประกอบรวมกันเป็นท่อไข่มีการปรากฏของ Bcl-2 ซึ่งการติดสีในระดับที่เข้มจะพบในเนื้อเยื่อของท่อไข่ระยะก่อนการตกไข่มากกว่าระยะหลังการตกไข่ ซึ่งระดับของการแสดงออกของ Bcl-2 อาจเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของท่อไข่สุกรซึ่งเปลี่ยนแปลงตามวงจรการเป็นสัด ที่น่าสนใจ คือ การปรากฏของ Bcl-2 ในบริเวณที่กักเก็บตัวอสุจิหรือ UTJ อาจมีผลในการป้องกันการเสื่อมตายของตัวอสุจิที่มารวมกันอยู่ระยะเวลาหนึ่งก่อนเคลื่อนที่ขึ้นไปปฏิสนธิ ในสุกรนั้น การผสมจริงหรือผสมเทียมในแม่สุกรจะต้องทำในช่วงที่สุกรเป็นสัดหนึ่ง ซึ่งการตกไข่จะเกิดขึ้นประมาณ 24-48 ชม. หลังการเป็นสัดหนึ่ง โดยช่วงเวลาดังกล่าวตัวอสุจิจะต้องมีชีวิตรอดและมีประสิทธิภาพในการปฏิสนธิกับโอโอไซต์ (Mburu et al., 1996) การปรากฏของ Bcl-2 ในท่อไข่ส่วนอื่นๆ ทั้งในระยะก่อนการตกไข่และหลังตกไข่ อาจเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ตามปกติของ Bcl-2 ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุและเซลล์อื่นๆ ของท่อไข่ ซึ่งเกิดขึ้นโดยการ

เหนี่ยวนำของฮอร์โมนที่เปลี่ยนแปลงตามวงจรการเป็นสัดของสุกร

Piek และคณะ (2001) รายงานการปรากฏของ Bcl-2 ในท่อไข่ของมนุษย์ โดยผลการติดสีจะพบในไซโตพลาสซึมของเซลล์คัดหลั่งเป็นส่วนใหญ่ ขณะที่เซลล์ที่มีซีเลียจะพบการติดสีอ่อนหรือไม่พบการติดสี และยังระบุว่า Bcl-2 เกี่ยวข้องกับความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ เช่นเดียวกับอวัยวะที่มีเยื่อบุอื่นๆ ถึงแม้ว่า ผลของการติดสีบวกของ Bcl-2 ในเซลล์เยื่อบุท่อไข่ของมนุษย์จะมีความแตกต่างกับการติดสีที่ปรากฏในท่อไข่ของสุกรซึ่งปรากฏทั้งในเซลล์ที่มีซีเลียและเซลล์คัดหลั่ง อย่างไรก็ตาม Bcl-2 โปรตีนที่พบในท่อไข่สุกรอาจเกี่ยวข้องกับการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุในขั้นตอนของการเจริญเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์

มีรายงานการวิจัยจำนวนมากศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของวงจรการเป็นสัดกับการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเยื่อบุท่อไข่ของสัตว์ปศุสัตว์ เช่น แกะ (Hollis et al., 1984), โค (Nayak and Ellington, 1977) รวมทั้งในสุกร (Abe and Oikawa, 1992) ระดับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุ ทั้งการแบ่งตัวแบบไมโทซิสและการสร้าง secretory granules ของท่อไข่จะพบได้สูงสุดในระยะเอสตรัส (Hollis et al., 1984; Buih et al., 1989) โดยสัมพันธ์กับระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนเอสโตรเจน และโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือด (Abe and Oikawa, 1993) นอกจากนี้ Hagiwara (1995) รายงานว่าท่อไข่จัดเป็นอวัยวะที่มีการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในอัตราที่สูงมาก โดยเฉพาะใน ampulla และ infundibulum ในระยะเอสตรัส ดังนั้นการติดสีอย่างเด่นชัดของ Bcl-2 ในท่อไข่ส่วน ampulla ในระยะก่อนการตกไข่จึงระบุได้ว่า Bcl-2 จะแสดงออกในกลุ่มเซลล์ที่มีการเจริญเปลี่ยนแปลงอย่างมาก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้สัมพันธ์กับการกระตุ้นของฮอร์โมนจากรังไข่

ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ระบุว่าระดับเอสโตรเจนที่สูงขึ้นในระยะ proliferation phase มีผลต่อการแสดงออกของ Bcl-2 ในชั้น endometrium ของมดลูก (Otsuki et al., 1994; Koh et al. 1995) ถึงแม้ว่า UTJ และ isthmus ส่วนท้ายจะมีการเพิ่มของจำนวนเซลล์และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ค่อนข้างต่ำมาก แต่พบว่าท่อนำไข่ส่วนดังกล่าวนี้จะมีการสร้าง secretory granules อย่างมากในระยะโปรเอสตรัสถึงเอสตรัส และมีความสัมพันธ์กับหน้าที่หลักของท่อนำไข่ที่มีบทบาทต่อการเก็บรักษาตัวสุจิ การคาปาซิเตชันของตัวสุจิ และการพัฒนาการของโอโอไซต์ (Rodriguez-Martinez et al., 2001) การปรากฏของ Bcl-2 ที่เยื่อของท่อนำไข่บริเวณดังกล่าวนี้อาจมีความเกี่ยวข้องกับเหตุการณ์ดังกล่าวข้างต้น การแสดงออกของ Bcl-2 ซึ่งปรากฏอย่างชัดเจนในเซลล์เยื่อของท่อนำไข่บริเวณ UTJ และส่วนท้ายของ isthmus นั้น จึงเป็นไปได้ว่ากระบวนการยับยั้งการเสื่อมตายของ Bcl-2 อาจป้องกันการตายของตัวสุจิและทำให้ตัวสุจิมีชีวิตอยู่รอดยาวนานขึ้น ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการช่วยรักษาสภาพการอยู่รอดของเซลล์เนื้ออกหรือเซลล์มะเร็ง และพบอัตราการเสื่อมตายของเซลล์ในระดับต่ำ ถึงแม้ว่า กลไกในการยับยั้งการเสื่อมตายของ Bcl-2 ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีในระดับอณูชีววิทยานั้นคือ การขัดขวางการหลั่งของ cytochrome c จาก mitochondria ซึ่งมีผลทำให้ปฏิกิริยาของ caspase ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ไม่เกิดขึ้น (Kluck et al., 1997) แต่กลไกที่แน่นอนของ Bcl-2 ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการป้องกันการตายของตัวสุจินั้น ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

รายงานวิจัยของ Piek และคณะ (2001) จะมุ่งเน้นไปที่การติดสีของ Bcl-2 ในเซลล์เยื่อของท่อนำไข่เท่านั้นโดยไม่ได้ระบุถึงเซลล์อื่นๆ ที่ปรากฏผลบวกในท่อนำไข่ของมนุษย์ นั่นคือ เซลล์ที่เคลื่อนไปอยู่ที่ชั้นเยื่อ เซลล์ที่อยู่ในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อ และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ซึ่งผลการติดสีดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้ รายงานการวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการกระจายตัวและชนิดของเซลล์ต่างๆ ในท่อนำไข่สุกร (Jiwakanon et al., 2005) ได้ระบุว่าเซลล์ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อท่อนำไข่ประกอบด้วย fibroblast และเซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน คือ lymphocyte ซึ่งส่วนใหญ่เป็น B-lymphocyte และ plasma cell ส่วนเซลล์ชนิดอื่น คือ macrophage, neutrophil, eosinophil และ mast cell มีจำนวนเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ ยังระบุอีกว่าเซลล์ที่เคลื่อนที่ขึ้นไปแทรกตัวในชั้นเยื่อท่อนำไข่อยู่ในกลุ่มของ lymphocytes (ทั้ง B- และ T-lymphocytes) เป็นที่

ทราบกันดีว่า ในการศึกษาการแสดงออกของ Bcl-2 นั้น อยะที่จะใช้เป็นตัวควบคุมบวกคือ ต่อมทอนซิล และต่อมน้ำเหลือง โดย Bcl-2 ปรากฏอยู่บริเวณ marginal zone ของ lymphoid follicle ซึ่งเป็นบริเวณที่พบ B-lymphocyte และ plasma cell ส่วน germinal zone ซึ่งเป็นบริเวณที่พบเซลล์อ่อนของ B-lymphocyte และบริเวณ medullary cords ซึ่งเป็นบริเวณที่พบ T-lymphocyte ไม่พบการติดสีหรือติดสีจาง (Meda et al., 2003) จึงเป็นไปได้ว่า เซลล์ที่มีลักษณะค่อนข้างกลมหรือรูปไข่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อและในชั้นเยื่อของท่อนำไข่สุกรที่ปรากฏการแสดงออกของ Bcl-2 อาจเป็น B-lymphocyte และที่ไม่ติดสีอาจเป็น T-lymphocyte ซึ่งต้องยืนยันโดยการย้อมโดยการใช้อินดิคเตอร์ที่จำเพาะต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวเหล่านี้ในการศึกษาครั้งต่อไป นอกจากนี้ มีรายงานการวิจัยพบการแสดงออกของ Bcl-2 ใน fibroblast ที่พบในอวัยวะต่างๆ ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณเพื่อให้เซลล์ข้างเคียงมีชีวิตอยู่รอดยาวนานขึ้นเช่นกัน (Mayorga et al., 2004) ดังนั้นจึงไม่น่าแปลกใจที่พบการปรากฏของ Bcl-2 ใน fibroblast ของท่อนำไข่สุกร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ โครงการวิจัยเงินทุนคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี พ.ศ. 2548 ที่สนับสนุนเงินทุนในการวิจัย คุณศิลป์ชัย เพียรชอบ และคุณวิฑูรย์ มะบุตร ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการตัดสินใจ การย้อมชิ้นเนื้อ และการเตรียมสารเคมีในห้องปฏิบัติการ น.สพ. เดิมสิทธิ ปลายสิทธิ์ สัตวแพทย์ประจำโรงพยาบาลปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม สำหรับการเก็บตัวอย่างต่อมน้ำเหลืองสุกร

เอกสารอ้างอิง

- Abe, H. and Oikawa, T. 1992. Examination by scanning electron microscopy of oviductal epithelium of the prolific Chinese Meishan pig at follicular and luteal phases. *Anat. Rec.* 233: 399-408.
- Abe, H. and Oikawa, T. 1993. Effects of estradiol and progesterone on the cytodifferentiation of epithelial cells in the oviduct of the newborn golden hamster. *Anat. Rec.* 235: 390-398.
- Buhi, W.C., Vallet, J.L. and Bazer, F.W. 1989. De novo synthesis and release of polypeptides from cycle and early pregnant porcine oviductal tissue in explant culture. *J. Exp. Zool.* 252: 79-88.

- Gibson, L., Holmgreen, S.P., Huang, D.C., Bernard, O., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sutherland, G.R., Baker, E., Adams, J.M. and Cory, S. 1996. Bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 13: 665-675.
- Hagiwara, H. 1995. Electron microscopic studies of ciliogenesis and ciliary abnormalities in human oviduct epithelium. *Ital. J. Anat. Embryol.* 100 (suppl. 1): 451-459.
- Hollis, D.E., Frith, P.A., Vaughan, J.D., Chapman, R.E. and Nancarrow, C.D. 1984. Ultrastructural changes in the oviductal epithelium of Merino ewes during the estrous cycle. *Am. J. Anat.* 171: 441-456.
- Hunter, R.H.F. 1988. The Fallopian tubes: Their role in fertility and infertility. Springer Verlag, New York. 191 pp.
- Hunter, R.H.F., Huang, W.T. and Holtz, W. 1998. Regional influences of the fallopian tubes on the rate of boar sperm capacitation in surgically inseminated gilts. *J. Reprod. Fertil.* 114: 17-23.
- Jiwakanon, J., Persson, E., Kaeoket, K. and Dalin, A.M. 2005. The sow endosalpinx at different stages of the oestrous cycle and at anoestrus: Studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system. *Reprod. Dom. Anim.* 40: 28-39.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. and Newmeyer, D.D. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275: 1132-1136.
- Koh, E.A., Illingworth, P.J., Duncan, W.C. and Critchley, H.O. 1995. Immunolocalization of Bcl-2 protein in human endometrium in the menstrual cycle and stimulated early pregnancy. *Hum. Reprod.* 10: 1557-1562.
- Mayorga, M., Bahi, N., Ballester, M., Comella, J.X. and Sanchis, D. 2004. Bcl-2 is a key factor for cardiac fibroblast resistance to programmed cell death. *J. Biol. Chem.* 279: 34882-34889.
- Mburu, J.N., Einarsson, S., Lundeheim, N. and Rodriguez-Martinez, H. 1996. Distribution, number and membrane integrity of spermatozoa in the pig oviduct in relation to spontaneous ovulation. *Anim. Reprod. Sci.* 45: 109-121.
- Meda, B., Frost, M., Newells, J., Bohling, S.D., Huebner-Chan, D.R., Perkins, S.L., Lim, M.S., Medeiros, L.J. and Elenitoba-Johnson, K.S. 2003. Bcl-2 is consistently expressed in hyperplastic marginal zones of the spleen, abdominal lymph nodes, and ileal lymphoid tissue. *Am. J. Sur. Pathol.* 27: 888-894.
- Mentschel, J. and Claus, R. 2003. Increased butyrate formation in the pig colon by feeding raw potato starch leads to a reduction of colonocyte apoptosis and a shift to the stem cell compartment. *Metabolism* 52: 1400-1405.
- Monaghan, P., Robertson, D., Amos T.A., Dyer, M.J., Mason D.Y. and Greaves, M.F. 1992. Ultrastructural localization of Bcl-2 protein. *J. Histochem. Cytochem.* 40: 1819-1825.
- Morita, Y., Perez, G.I., Maravei, D.V., Tilly, K.I. and Tilly, J.L. 1999. Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresis and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis in vitro. *Mol. Endocrinol.* 13: 841-850.
- Nayak, R.K. and Zimmerman, D.R. 1977. Ultrastructural and ultracytochemical cyclic changes in the bovine uterine tube (oviduct) epithelium. *Am. J. Vet. Res.* 38: 157-168.
- Otsuki, Y., Misaki, O., Sugimoto, O., Ito, Y., Tsujimoto, Y. and Akao, Y. 1994. Cyclic bcl-2 gene expression in human uterine endometrium during the menstrual cycle. *Lancet* 344: 28-29.
- Piek, J.M., Diest P.J., Verheijen, R.H. and Kenemans, P. 2001. Cell cycle-related proteins p21 and bcl-2: makers of differentiation in the human Fallopian tube. *Histopathology* 38: 481-482.
- Rodriguez-Martinez H., Tienthai P., Suzuki K., Funahashi H., Ekwall H. and Johannisson A. 2001. Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reprod. Suppl.* 58: 129-45.
- Soede, N.M., Wetzels, C.C.H., Zondag, W., de Koning, M.A.I. and Kemp, B. 1995. Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rates and accessory sperm count in sows. *J. Reprod. Fert.* 104: 99-106.
- Wei, P., Jin, X., Zhang, X.S., Hu Z.Y., Han, C.S. and Liu, Y.X. 2005. Expression of Bcl-2 and p53 at the fetal-maternal interface of rhesus monkey. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3(1): 1-4.