

บทคัดย่อ

ความเป็นกรดของของเหลวในท่อ epididymis มีความสำคัญต่อการพัฒนาและคงความสมบูรณ์ของเชื้ออสุจิ ซึ่งมีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ในเพศชาย ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ Na^+/H^+ exchanger isoform 3 (NHE3) ยังมีน้อย นอกจากนี้การศึกษานี้เกี่ยวกับการ expression ของ NHE3 ในส่วนต่างๆของท่อ epididymis ยังมีข้อขัดแย้งกันอยู่

วัตถุประสงค์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ (๑) เพื่อหา splice variants ของ NHE3 หรือ isoform อื่นๆของ NHE (๒) เพื่อศึกษาการ expression ของ NHE3, splice variants ของ NHE3 หรือ isoform อื่นๆในระบบสืบพันธุ์เพศชาย (๓) เพื่อศึกษาบทบาทของฮอร์โมนเพศชายต่อการ expression ของ NHE3 หรือ isoform อื่นๆ (๔) เพื่อศึกษาพัฒนาการของการ expression ของ NHE3 หรือ isoform อื่นๆที่อายุต่างๆหลังคลอด

วิธีทดลอง ทำการสกัด RNA และสังเคราะห์ cDNA จากอวัยวะสืบพันธุ์ของหนูแรทเพศผู้สายพันธุ์ Wistar ที่อายุต่างๆคือ วัยหย่านม (๓ สัปดาห์) วัยก่อนเจริญพันธุ์ (๕ สัปดาห์) และวัยเจริญพันธุ์ (๕ สัปดาห์) ทำการ cloning โดยวิธี DNA walking ด้วย primers ๖ คู่ซึ่งครอบคลุมร้อยละ ๕๕ ของลำดับเบสตลอดเส้น NHE3 DNA ของท่อไคหนูแรท แล้วหาลำดับเบสของผลผลิตจากการทำ PCR หากการ expression ของ NHE3 mRNA และโปรตีนในส่วนต่างๆของระบบสืบพันธุ์เพศชาย โดยการทำให้ RT-PCR, Western blotting และ immunohistochemistry ตามลำดับ

ผลการทดลอง ผลของการ cloning พบว่า NHE3 cDNA ที่ได้จากท่อ epididymis มีลำดับเบสร้อยละ ๕๕ เหมือนกับที่พบในท่อไคของหนูแรท ไม่พบว่ามี splice variants ของ NHE3 ในท่อ epididymis มีการ expression ของ NHE1 mRNA และ NHE2 mRNA ในทุกส่วนซึ่งรวมทั้งลูกอันทะของระบบสืบพันธุ์เพศชาย และไม่มีความแตกต่างเนื่องมาจากอายุ ตรงกันข้ามการ expression ของ NHE3 ขึ้นกับอายุ กล่าวคือในหนูวัยหย่านมพบการ expression ของ NHE3 ในทุกส่วนซึ่งรวมทั้งลูกอันทะของระบบสืบพันธุ์เพศชาย และมีการ expression มากที่สุดในลูกอันทะแล้วค่อยๆลดลงทางส่วนปลายท่อ epididymis แต่ในหนูที่มีอายุ ๕ และ ๕ สัปดาห์เกือบไม่พบการ expression ของ NHE3 ในลูกอันทะเลยและระดับการ expression ในส่วนต่างๆของระบบสืบพันธุ์เพศชายจะตรงกันข้ามกับที่พบในหนูวัยหย่านม

สรุป NHE3 cDNA ที่ clone ได้จากท่อ epididymis ของหนูแรทเหมือนกับที่พบในท่อไต มีการ expression ของ NHE1 และ NHE2 mRNA ในทุกส่วนของระบบสืบพันธุ์เพศชายและในทุกอายุ ตรงกันข้ามการ expression ของ NHE3 mRNA ขึ้นกับอายุ โดยพบ NHE3 มากที่สุดในลูกอ๊ณฑะของหนูวัยหย่านมและน้อยสุดในท่อ epididymis ส่วนปลาย ในหนูโต NHE3 ในลูกอ๊ณฑะลดลงอย่างมากแต่กลับเพิ่มขึ้นในส่วนปลายของท่อ epididymis ดังนั้นข้อขัดแย้งเกี่ยวกับการ expression ของ NHE3 ในท่อ epididymis ของหนูวัยเจริญพันธุ์ยังไม่สามารถอธิบายได้

ABSTRACT

Acidification of the epididymal fluid is an essential condition for the acquisition and maintenance of sperm function, and consequently male fertility. Studies on the role of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 (NHE3) in the epididymal acidification are inadequate. Further, the expression of this exchanger in the epididymis is still in controversy.

Objectives: The aims of this study are: 1) to determine whether the epididymis expresses splice variants of NHE3 or other forms of NHE; 2) to investigate the regional expressions of NHE3 and its variants or other isoforms in the male reproductive tract; 3) to evaluate the role of androgens on the expressions of NHE3 and other isoforms; 4) to determine the expressions of NHE3 and other isoforms during post-natal development.

Methods: Reproductive organs from male Wistar rats at 3 different ages, i.e. weanling (3 weeks), pre-puberty (5 weeks), and puberty (9 weeks) were used for RNA extraction and cDNA synthesis. For cDNA cloning, DNA walking technique was performed using 6 different pairs of primers that cover 95% of total length of the known sequence (rat kidney NHE3). The PCR products were then aligned and sequenced. RT-PCR, Western blotting and immunohistochemistry were performed to determine the expression of NHE3 mRNA and protein, respectively, in different regions of the male reproductive tract.

Results: cDNA cloning of NHE3 from rat epididymis revealed 99% homology to that of rat kidney NHE3. There is no evidence of splice variants of NHE3 in the epididymis. NHE1 and NHE2 mRNA were expressed in all regions of the reproductive tract including the testis, and their expressions were not different in all age groups. In contrast, that of NHE3 exhibited an age-dependent characteristic. Thus, NHE3 mRNA was found throughout the reproductive tract including the testis of the weanling rats (3 weeks). The expression was highest in the testis and decreased towards the distal regions of the epididymis. On the other hand, the expression of NHE3 mRNA in the testis of older rats (5 and 9 weeks) was barely detectable, and the pattern of expression along the reproductive tract was reversed compared to the weanling rats.

Conclusion: It is concluded that NHE3 cDNA in the rat epididymis is similar to that in the rat kidney. NHE1 and NHE2 mRNA were expressed in all regions of the male reproductive tract throughout the post-natal ages. In contrast, NHE3 mRNA was highly expressed in the testis of weanling rats, but decreased to very low level in pre- and pubertal rats. In mature rats, the conflict on the distribution of NHE3 in different regions of the epididymis has not been resolved and further investigations are required.