รหัสโครงการ: MRG4780028

ชื่อโครงการ: โครงการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยง สัณฐานวิทยา และลักษณะโปรตีนที่หลั่งจากเซลล์บุท่อนำไข่และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่สุกร

ชื่อนักวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มยุวา อารีกิจเสรี
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม

E-Mail Address: Maijackee@hotmail.com, Maijackee@yahoo.com

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์บุท่อนำไข่ (porcine oviductal epithelial cells: POEC) เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (cumulus cells: CC) และเซลล์แกรนูโลซ่าสุกร (granulosa cells: GC) ในสูตรอาหารที่เหมาะสมและปลอดเชื้อ พร้อมศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ในสภาพธรรมชาติ (*in vivo*) และสภาพเพาะเลี้ยง (*in vitro*) แล้วเก็บสารที่เซลล์หลั่งเพื่อศึกษารูปแบบของโปรตีนที่เซลล์หลั่งสู่อาหารเพาะเลี้ยงในช่วงเวลาต่างๆ สุดท้ายได้ทดสอบสารหลั่งที่แช่แข็งต่อการเกิด acrosome reaction ในเซลล์อสุจิวัว

ผลการวิจัยพบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร M199, RPMI 1640 และ DMEM ที่เสริมด้วย 10% heat treated fetal calf serum (HTFCS) บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์และมีความชื้นสูง ให้ผลการเพาะเลี้ยงที่ดีมีเปอร์เซ็นต์รอดตายของเซลล์สูง สามารถทำได้จริง ไม่สิ้นเปลืองเวลาและประหยัดค่าใช้จ่าย สัณฐานวิทยาของ POEC ในสภาพธรรมชาติในระยะฟอลลิคูล่าพบว่าเนื้อเยื่อบุชั้นในท่อนำไข่ส่วนแอมพูล่ามีเซลล์บุท่อนำไข่ที่มีซีเลียอยู่เป็นจำนวนมาก ในขณะที่ระยะลูเตียวมีเซลล์ที่มีซีเลียจำนวนน้อยกว่า แต่มีเซลล์รูปร่างกลมที่ไม่มีซีเลียและมีไมโครวิลไลสั้นๆ อยู่ด้านบนของเซลล์นั้น มีจำนวนมากขึ้น ในสภาพเพาะเลี้ยงพบว่า POEC ส่วนมากเกาะรวมกลุ่มกันอยู่ เซลล์มีรูปร่างยาวมีซีเลียอยู่ด้านบนและเรียงตัวชั้นเดียวและมีเซลล์รูปร่างกลมที่ไม่มีซีเลียเกาะรวมอยู่ด้วย เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นานขึ้นพบว่าเซลล์ได้หลุดแยกออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ เพิ่มมากขึ้น สำหรับเซลล์ไข่สุกรที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ (COCs) ที่เจาะได้จาก รังไข่มีขนาด 89 ถึง 145 ไมโครเมตร แยกได้ 4 ชนิดคือ เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบเกาะแน่น เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วนและเซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบ คิดเป็น 19.87, 18.13, 28.88 และ 33.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่ง COCs มีขนาดเซลล์ทั้ง 4 ชนิดเรียงตามลำดับข้างต้นเท่ากับ 144.68 $\pm$ 8.79, 122.82 $\pm$ 4.78, 106.20 $\pm$ 8.72 และ 89.16 $\pm$ 5.69 ไมโครเมตร ส่วน GC ที่อยู่ในถุงไข่มีรูปร่างกลมอยู่รวมเป็นกลุ่มและเพาะเลี้ยงได้ดีในอาหารสูตร M199, RPMI 1640 และ DMEM และเมื่อเพาะเลี้ยงยาวนานขึ้นเซลล์ก็ยังมีรูปร่างกลมเช่นเดิมและแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ มีขนาดเซลล์ 6 ถึง 8 μm เมื่อนำ COCs ชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เลือกคือ M199 ที่เสริมด้วย 10% HTFCS และเสริมด้วยฮอร์โมนและเพาะเลี้ยงที่สภาพเดิมนาน 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบเกาะคงแน่น CC ได้คลี่แยกออกจากเซลล์ไข่ ส่วนเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้นนั้น CC เกิดการ

กระจายตัวออก และเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบเกาะแน่นที่คลื่อออกแล้วนั้นเซลล์ที่เคยมีรูปร่างกลมเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นคล้ายรูปหยดน้ำตาหันด้านปลายแหลมของเซลล์แทงเข้าแทรกเมมเบรนของเซลล์ไข่ ส่วนเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น CC ได้กระจายตัวออกและหลุดออกจากเซลล์ไข่ แสดงว่าเซลล์ไข่ทั้งสองชนิดสามารถเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไข่สุก (matured oocyte) ได้ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วยฮอร์โมนดังกล่าว

การศึกษารูปแบบของโปรตีนที่เซลล์หลั่งด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ารูปแบบโปรตีนที่สร้างขึ้นจากเซลล์ทั้งสองชนิดมีความคล้ายคลึงกันมาก โดยพบแถบโปรตีนที่น่าสนใจมีขนาดประมาณ 17, 22 kDa และที่มีขนาดมากกว่า 220 kDa ในสารหลั่งจากเซลล์ทั้งสองที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงนาน 48, 72, 96 ชั่วโมง

ผลจากการบ่มเซลล์อสุจิวัวแช่แข็งกับสารหลั่ง POEC และ CC+GC เพื่อประเมินคุณภาพของสารหลั่งที่แช่แข็งในระยะ 1 ถึง 3 เดือน ต่อการเตรียมความพร้อมของเซลล์อสุจิ พบว่าเซลล์อสุจิวัวที่บ่มกับสารหลั่ง POEC ที่ไม่ได้แช่แข็ง และที่แช่แข็งนาน 1 เดือน ถึง 3 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การเกิด acrosome reaction เท่ากับ 78.44 $\pm$ 7.25, 75.78 $\pm$ 4.41, 65.22 $\pm$ 5.59, 50.56 $\pm$ 6.25 ตามลำดับ และกลุ่มที่เซลล์อสุจิวัวบ่มกับสารหลั่ง CC+GC ที่ไม่ได้แช่แข็ง และที่แช่แข็งนาน 1 เดือน ถึง 3 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การเกิด acrosome reaction เท่ากับ 88.67 $\pm$ 4.03, 82.22 $\pm$ 3.46, 71.00 $\pm$ 3.16, 58.56 $\pm$ 4.69 ตามลำดับ โดยต่างจากกลุ่มที่ไม่บ่มกับหลั่ง ที่เกิด acrosome reaction เพียง 3.89 $\pm$ 3.72 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการทดลองนี้ทำให้เกิดความเข้าใจมากขึ้นถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและธรรมชาติของเซลล์ POEC และ CC+GC ในสภาพธรรมชาติและสภาพเพาะเลี้ยง ข้อมูลนี้มีความสำคัญต่อการศึกษาสารที่เซลล์หลั่งและองค์ประกอบทางชีวเคมีของเซลล์ โดยมีความสำคัญมากในการใช้เซลล์เพื่อเสริมในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อใช้ในการทำปฏิสนธิในหลอดแก้วต่อไป

Project Code: MRG4780028

Project Title: Study on *in vitro* culture technique, morphology and characterization of secretory protein from porcine oviductal epithelial and cumulus cells.

Investigator: Assist. Prof. Dr. Mayuva Areekijseree

E-Mail Address: Maijackee@hotmail.com, Maijackee@yahoo.com

Project Period: 2 years

Abstract

The objectives of this research were to study the morphology and structure of porcine oviductal epithelial cells (POEC), cumulus-oocyte complexes (COCs) and granulosa cells (GC). They were investigated *in vivo* and *in vitro* conditions using scanning electron microscopy (SEM) and inverted microscopy. The protein pattern of their secretion were studied and determined ability of acrosome reaction with bovine sperm.

From *in vivo* study, the mucosal surfaces of the POEC at the follicular and luteal phases were examined to observe the cell types and cellular populations. At the follicular phase, the POEC contained a great number of high ciliated cells, whereas those at the luteal phase consisted of lesser number and were filled up with numerous of round shaped non-ciliated cells with short microvilli on the apical surface. This change in morphological features of POEC seemed to serve well on their functions as oocyte transporters at follicular phase. Meanwhile, the GC in the follicular fluid was also round in shape and found as clusters. From *in vitro* study, the POEC contained columnar ciliated cells and spherical shaped non-ciliated cells. Both non-ciliated cells and ciliated cells appeared either in groups or distributing among each other. However, the isolation of cells was observed after culture for 48 h.

COCs were round in shape, surrounded by zona pellucida with layers of cumulus cells ranging between 89.16-144.68 μm in size. They were morphologically classified into 4 types based on the accumulation and arrangement of cumulus cells around the oocytes. These were intact-, multi-, partial-cumulus cell layers and completely denuded oocyte at the percentage composition of 19.87%, 18.13 %, 28.88 % and 33.12 %, respectively. The mean diameters of four types of COCs were found that, the mean diameter of intact cumulus cell layer from the healthy antral follicle was significantly different from those of multi cumulus cell layer, partial cumulus cell layer and completely denuded oocyte (144.68 $\pm$ 8.79 μm, 122.82 $\pm$ 4.78 μm, 106.20 $\pm$ 8.72 μm and 89.16 $\pm$ 5.69 μm, respectively). Interestingly, changes in the morphology of COCs were observed after culturing for 24 h. In Type I COCs the cumulus cell layer was peel off from the oocyte, but the cell shape was

still round. Moreover, it was also found that COCs Type II contained expanded cumulus cell shape, while the cells remained intact on the surface of the oocytes. After 24 h of culture of COCs in the culture M199 medium, it was observed that the round shape CC, which attached to the surface of the oocyte before adapted themselves into a teardrop-like shape. They had a pointy, conical end that clearly stuck into the oocyte. Meanwhile, the elongated CC of COCs Type II was detached from the oocyte surface. The GC in the follicular fluid was also round in shape and found as clusters. After culturing in *in vitro* for 48 h, no change in morphology was observed. The GC appeared in smaller clusters were present as single cells and their sizes ranged form 6-8 μm.

The results from SDS-PAGE to determine secretion proteins from POEC when cultured in the M199 medium for 48, 72, 96 h showed a similar pattern. From the comassie blue-stained gels, the protein bands sized about 17, 22, and > 220 kDa were observed. These protein bands were also found in the CC cultured in the same conditions media and periods of time.

The ability of frozen secretion proteins from POEC and CC+GC (storage for 1, 2 or 3 months) in inducing acrosome reaction of bovine spermatozoa was determined. The percentage of the tested groups (added with POEC: storage for 1, 2 or 3 months) were 78.44 $\pm$ 7.25, 75.78 $\pm$ 4.41, 65.22 $\pm$ 5.59, 50.56 $\pm$ 6.25, respectively. Meanwhile the percentage of the other tested groups (added with CC+GC: storage for 1, 2 or 3 months) were 88.67 $\pm$ 4.03, 82.22 $\pm$ 3.46, 71.00 $\pm$ 3.16, 58.56 $\pm$ 4.69 respectively. It was higher than those of the controlled groups (without secretion proteins). Comparison of percentage between two groups was statistically analyzed and the results indicated that it was significantly different.

The results obtained from this study allow us to have a better understanding of the morphology and nature of cells under both *in vivo* and *in vitro* conditions. This information is also important for the study of their secretions and biochemical compositions, which is of great importance to the use of cells as feeder cells in *in vitro* fertilization in current studies.