

รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ของ insulin-like growth factor system ที่มีต่อการ
เคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือดขาว
ชนิดลิมโฟไซต์ ของโคนม

โดย ผศ.ดร. ศิริรักษ์ จันทกรู และคณะ

เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2550

สัญญาเลขที่ MRG4880108

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ของ insulin-like growth factor system ที่มีต่อการเคลื่อน
ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ ของโคนม

คณะผู้วิจัยสังกัด

- | | |
|-----------------------------|------------------------|
| 1. ผศ.ดร. ศิริรักษ์ จันทกรู | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| 2.รศ. ดร. สุมาลี บุญมา | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

ฤทธิ์ของ insulin-like growth factor system ที่มีต่อการเคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ ของโคนม

ศิริรักษ์ จันทกรุ , สุมาลี บุญมา, B. Anne Croy^b

^aคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร ลาดยาว กทม 10903

^bDepartment of Anatomy and Cell Biology Queen's University, Kinston Ontario Canada K7L 3N6

Insulin-like growth factor (IGF-1) เป็นสารที่สำคัญที่พบในกระแสเลือดและ ในต่อมน้ำนมของโค การพบ IGF-R1 receptor บนผิวของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ แสดงถึงบทบาทของ IGF-1 ที่มีต่อการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ เมื่อมีการติดเชื่อในร่างกาย เซลล์ลิมโฟไซต์ จะตอบสนองการกระตุ้นจาก antigen โดยการแบ่งตัวและการเคลื่อนไปยังบริเวณที่มีการรุกราน การศึกษานี้ทดสอบใน in vitro เพื่อหาฤทธิ์ของ IGF-1 ที่มีต่อการเคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ของโคนมทั้งในการยึดเกาะกับ high endothelial venule และ การเคลื่อนที่ตอบสนอง chemokine CCL-5 ผลการทดสอบไม่พบการเกาะของเซลล์ลิมโฟไซต์บนเนื้อเยื่อ peripheral lymph node ในการตรวจสอบการเคลื่อนที่สู่ CCL-5 พบว่าจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์โคที่อยู่ในระยะให้นมทุกกลุ่มมีค่าต่ำกว่า ค่าที่ได้จากโคที่อยู่ในระยะแห้งนม การให้ IGF-1 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ที่เคลื่อนสู่ CCL-5 ให้มากกว่ากลุ่มควบคุม แต่จำนวนของเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ได้รับการกระตุ้นจาก Concanavalin A มีแนวโน้มที่จะตอบสนองต่อการให้ IGF-1 แสดงให้เห็นอิทธิพลของ IGF-1 ที่มีผลต่อ effector มากกว่า naïve cells

คำสำคัญ Insulin-like growth factor, เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์, การเคลื่อนของเซลล์, โคนม

Abstract

Effects of insulin-like growth factor system in migration of bovine lymphocytes

Sirirak Chantakru^a, Sumalee Boonmar^a, B. Anne Croy^b

^a*The Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Chatuchak Lad Yoa Bangkok, 10903 Thailand*

^b*Department of Anatomy and Cell Biology Queen's University, Kinston Ontario Canada K7L 3N6*

Insulin-like growth factor (IGF-1) is one of major molecules present in serum and mammary gland of dairy cows.. Expression of a specific receptor for IGF-1 on bovine lymphocytes suggests its role on lymphocyte function. As microbial invades into body lymphocytes are activated by antigen . Activated lymphocytes start proliferation and increases migratory ability. This study aims to determine in vitro effects of IGF-1 on both lymphocyte adhesion and migration followed chemokine CCL-5. The results showed no lymphocyte adhesion was found on frozen sections of peripheral lymph nodes. Migrating lymphocytes from cows in dry period were significantly higher in numbers than those from cows of lactation periods. Numbers of migrating lymphocytes were not different between IGF-1 treated and control groups. However after activated with Concanavalin A numbers of migrating lymphocytes treated with IGF-1 were apparently higher than non- treated group but the numbers between were not significantly different. It suggests IGF-1 affects predominantly on effector cells.

Keywords Insulin-like growth factor, lymphocytes, migration. dairy cows

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

สัญญาเลขที่ MRG4880108

1. ชื่อโครงการ ฤทธิ์ของ insulin-like growth factor system ที่มีต่อการเคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ ของโคนม
Effects of insulin-like growth factor system in migration of bovine lymphocytes

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
ชื่อ นางสาว. ศิริรักษ์ จันทกร

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

.ที่อยู่ 50 ถ. พหลโยธิน จตุจักร บางเขน กรุงเทพมหานคร 10900

หมายเลขโทรศัพท์ 02-579-7539 02-5790058-9 ต่อ 6212

E=mail fvetsrc@ku.ac.th

3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย ชีววิทยาของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์
(Lymphocyte Biology)

5. ระยะเวลาดำเนินงาน2 ปี.....

6. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

ปัญหาการเกิดโรคเต้านมอักเสบเป็นปัญหาสำคัญในโคนม นอกจากการจัดการที่ดีแล้ว การป้องกันโรคนี้เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะภูมิคุ้มกันต่อมน้ำนมจากเซลล์เม็ดเลือดขาวในต่อมน้ำนม โดยที่เซลล์เม็ดเลือดขาวจะเคลื่อนจากอวัยวะในต่อมน้ำเหลืองเข้าสู่ต่อมน้ำนม จากรายงานพบว่าจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocyte เป็นเซลล์ที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างภูมิคุ้มกันมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาการให้นม ภาวะใกล้คลอดจะเกิดการไวต่อการติดเชื้อเนื่องจากมี T lymphocyte จำนวนน้อยกว่าช่วงเวลาอื่น สัดส่วนของ T lymphocytes ในต่อมน้ำนมจะมีการควบคุมจากสารเคมีที่ผลิตจากต่อมน้ำนมโดยตรง Insulin-like growth factor (IGF-1) เป็นสารที่สำคัญที่พบในกระแสเลือดและในต่อมน้ำนมของโค และพบIGF-R1 receptor บนผิวของ lymphocyte การศึกษาครั้งนี้ จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของIGF-1 ที่มีต่อการเคลื่อนของเซลล์ lymphocyte

7. วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ IGF-1 ที่มีต่อ การ adhesion ของ lymphocyte
- 2) เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ IGF-1 ที่มีต่อ การเคลื่อนที่ ของ lymphocyte

8. ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษากระทำในโคสาวเพศเมียที่โตเต็มที่จำนวน 5 ตัว โดยเก็บตัวอย่างจากเลือดใน
ระยะก่อนการผสมพันธุ์ ปริมาณ 20 มิลลิตร การทดลองจะทำ 3 ซ้ำ

การทดลองที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ของ IGF-1 และ IGF-binding protein ที่มีต่อ การยึดเกาะ ของ
ลิมโฟไซต์ โดยวิธี in vitro adhesion assay ตามวิธีของ Stamper-Woodruff (1976)

วิธีทดลอง 1) แยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดตาม density gradient โดยใช้สาร Ficoll-Plaque
ตามด้วยการปั่นแยก

2) เลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเติม IGF-1 หรือไม่เติม

3) นำเซลล์ที่ได้มาตรวจหาการ adhesion ของ lymphocyte บน เนื้อเยื่อจาก

Peripheral lymph node

4) นับจำนวนเซลล์ต่อ 1 high endothelial venules (HEV) จำนวน 100 HEV ต่อ
slide

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าที่ได้จะเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มดังต่อไปนี้ ด้วย วิธี ANOVA

กลุ่มที่ 1 ที่ได้รับ IGF-1 (50 ng/ml)

กลุ่มที่ 2 ที่ได้รับ IGF-1 (100 ng/ml)

กลุ่มที่ 3 ไม่ได้รับ IGF-1

ความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติจะตัดสินที่ค่า $p < 0.05$

การทดลองที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ของ IGF-1 ที่มีต่อ การเคลื่อนที่ ของลิมโฟไซต์

โดยวิธี in vitro migration assay ดัดแปลงจากวิธีของ Wilson et al. (2002)

วิธีทดลอง

การศึกษาเปรียบเทียบการเคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ตอบสนองต่อสาร CCL-
5 ของโคที่อยู่ระยะต่างๆของการให้นมและระยะแห้งนม

1) แยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดตาม density gradient โดยใช้สาร Ficoll-Plaque

2) นำเซลล์ที่ได้มาตรวจหาการเคลื่อน ของ lymphocyte ตอบสนองต่อการให้
chemokine CCL-5 ใน migrating chamber

3) นับเซลล์ที่เคลื่อนผ่านไปยังหลุมด้านล่าง

การศึกษาเปรียบเทียบการเคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ ตอบสนองต่อสาร
CCL-5 ของโคหลังการได้รับ IGF-1

1) แยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดตาม density gradient โดยใช้สาร Ficoll-Plaque

2) เลี้ยงเซลล์ในจานเพาะแบ่งเป็นกลุ่มที่เติม IGF-1 และกลุ่มควบคุมที่ไม่เติม IGF-1

3) นับเซลล์ที่เคลื่อนผ่านไปยังหลุมด้านล่าง

การศึกษาเปรียบเทียบการเคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย
Concanavalin A ตอบสนองต่อสาร CCL-5 ของโคหลังการได้รับ IGF-1

- 1) แยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดตาม density gradient โดยใช้สาร Ficoll-Plaque
- 2) เลี้ยงเซลล์ใน RPMI 1640 ที่เติม Concanavalin A ที่ขนาด 20 $\mu\text{g/ml}$ 72 ชั่วโมง
- 3) เลี้ยงเซลล์ในงานเพาะแบ่งเป็นกลุ่มที่เติม IGF-1 และกลุ่มควบคุมที่ไม่เติม IGF-1
- 3) นับเซลล์ที่เคลื่อนผ่านไปยังหลุมด้านล่าง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าที่ได้จะเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มดังต่อไปนี้ ด้วย วิธี Analysis of Variance

(ANOVA)

กลุ่มที่ 1 ที่ได้รับ IGF-1 (100 ng/ml)

กลุ่มที่ 2 ไม่ที่ได้รับสารทั้งสองชนิด

ความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติจะตัดสินที่ค่า $p < 0.05$

9. ผลที่ได้รับ

9.1 การทดสอบฤทธิ์ของ IGF-1 และ IGF-binding protein ที่มีต่อ การยึดเกาะ ของลิมโฟไซต์ โดยวิธี in vitro adhesion assay

ผลการทดสอบ

ไม่พบการเกาะของการยึดเกาะ ของลิมโฟไซต์บนเนื้อเยื่อ peripheral lymph nodes

9.2 การทดสอบฤทธิ์ของ IGF-1 ที่มีต่อ การเคลื่อนที่ ของลิมโฟไซต์โดยวิธี in vitro migration assay

ผลการทดสอบ

9.2.1 ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ที่เคลื่อนผ่านแผ่นกรองเพื่อตอบสนองต่อ chemokine CCL-5 ในโคที่อยู่ในระยะให้นมทุกกลุ่มมีค่าต่ำกว่า ค่าที่ได้จากโคที่อยู่ในระยะแห้งนม

9.2.2 เซลล์ลิมโฟไซต์ที่ได้รับ IGF-1 ขนาด 100 ng/ml สามารถเคลื่อนผ่านแผ่นกรองตอบสนองต่อ CCL-5 ได้ในจำนวนที่ใกล้เคียงกับเซลล์ที่ไม่ได้รับ IGF-1

9.2.3 จำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ได้รับ IGF-1 หลังการเลี้ยงใน Concanavalin A สามารถเคลื่อนผ่านแผ่นกรองตอบสนองต่อ CCL-5 มีจำนวนมากกว่า จำนวนเซลล์ที่ไม่ได้รับ IGF-1 แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

สัญญาเลขที่ MRG4880108

โครงการ: ฤทธิ์ของ insulin-like growth factor system ที่มีต่อการเคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือดขาว
ชนิดลิมโฟไซต์ของโคนม

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ของ insulin-like growth factor system ที่มีต่อการเคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือด
ขาวชนิดลิมโฟไซต์ของโคนม

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ. ดร. ศิริรักษ์ จันทครุ

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา: รศ. ดร. สุมาลี บุญมา

รายงานตั้งแต่ช่วงวันที่ 1 มิถุนายน พศ. 2548 ถึงวันที่ 31 พฤษภาคม พศ. 2550

การดำเนินงาน ☐ ได้ดำเนินงานตามแผนที่วางไว้
☒ ได้ดำเนินงานล่าช้ากว่าแผนที่วางไว้
☐ ได้เปลี่ยนแผนที่วางไว้ดังนี้

รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการตามแผนงานโดยสรุป

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่ วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
1) เพื่อศึกษาฤทธิ์ ของ IGF-1 ที่มีต่อ การ adhesion ของ lymphocyte	การทดสอบการยึด เกาะของเซลล์ลิมโฟ ไซต์บนendothelial cell ที่แยกจาก เนื้อเยื่อเต้านม	การทดสอบการยึดเกาะของเซลล์ ลิมโฟไซต์บนhigh endothelial venule เป็น parotid lymph node	ไม่พบการยึดเกาะของเซลล์ เม็ดเลือดขาวบนเนื้อเยื่อ lymph node
2) เพื่อศึกษาฤทธิ์ ของ IGF-1 ที่มีต่อ การ migration lymphocyte	การทดสอบการ เคลื่อนที่ของเซลล์ลิม โฟไซต์ตอบสนองต่อ chemokine CCL-5	การทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ ลิมโฟไซต์ที่ได้รับการกระตุ้นและ ไม่ได้รับการกระตุ้นจาก IGF-1 ตอบสนองต่อ chemokine CCL-5	จำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ ได้รับการกระตุ้นและไม่ได้รับ การกระตุ้นจาก IGF-1ในการ ตอบสนองต่อ chemokine CCL-5 ไม่มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญ

ขอบเขตของการวิจัย

การทดสอบจะทำในโคนมพันธุ์ขาวดำหรือลูกผสม เป็นโคสาวจำนวน 5 ตัว ทุกตัวต้องม
การตรวจว่าเป็นโคที่มีสุขภาพดี โดยในแต่ละตัวจะเก็บตัวอย่างเลือด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
โคทั้งหมดเป็นโคที่เลี้ยงในฟาร์มสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน

วิธีวิจัย

การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดตามdensity gradient โดยใช้สาร Ficoll-Plaque

- 1) นำเลือดที่ได้จากการเจาะเก็บจากหลอดเลือดดำ jugular มาเจือจางด้วย 100 mM Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 2 เท่า ของปริมาตรของเลือด
- 2) เติมน้ำละลายPBS ลงบน Ficoll-plaque นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1600 rpm นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 3) ดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวใส่ลงใน 10 ml PBS ปั่นด้วยความเร็ว 3500 rpm 10 นาที
- 4) ทำซ้ำขั้นตอนข้างต้น 2 ครั้ง และ เก็บเซลล์ลงใน RPMI 1640 culture media
- 5) นับจำนวนเซลล์ที่ได้ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ hemocytometer

การทดสอบเพื่อศึกษาฤทธิ์ของ insulin-like growth factor-1 (IGF-1)ที่มีต่อ การ adhesion ของ lymphocyte

การทดสอบได้ใช้การยึดเกาะของเซลล์ลิ้มโฟไซต์บน high endothelial venule(HEV) ของต่อมน้ำเหลืองส่วน parotid โดยวิธี in vitro adhesion assay ซึ่งทำภายใต้สภาวะ dynamic ที่มีการไหลของ cell suspension ผลการยึดเกาะวัดจากจำนวนเซลล์ต่อ HEV และนำมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม สำหรับการทดลองที่ทดสอบฤทธิ์ของ IGF-1 จะเติม IGF-1 ที่ความเข้มข้น 50 หรือ 100 ng/ml ลงใน cell suspension และทิ้งไว้ที่ 37 °C นาน 30 นาทีก่อนนำมาทดสอบ

การเก็บและเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองที่ได้จากโค

- 1) เก็บparotid lymph node จากโคที่เข้าโรงฆ่า เก็บต่อมน้ำเหลืองที่อุณหภูมิประมาณ 10 °C จากนั้นนำต่อมน้ำเหลืองที่ได้นำมาตัดเก็บเฉพาะบริเวณ paracortex ซึ่งเป็นบริเวณที่พบ HEV ชิ้นเนื้อเยื่อมีขนาดประมาณ 100X100X 50 มิลลิเมตร
- 2) นำเนื้อเยื่อใส่ลงใน mold เติมน้ำแข็ง medium แล้วนำ mold แช่ลงใน isopropanol ที่ทำให้เย็นจัดด้วยไนโตรเจนเหลว
- 3) เมื่อเนื้อเยื่อและ freezing mediumแข็งตัว แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

การตัดเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองเพื่อใช้ในการทดสอบวิธี in vitro adhesion assay

- 1) นำเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองที่เก็บไว้ ด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อcryostatที่ความหนา 10 ไมครอน ที่อุณหภูมิ -30 °C
- 2) นำsection วางลงบนcoverglass และนำไปเก็บที่ อุณหภูมิ 4 °C

- 3) การตัดเนื้อเยื่อท่อน้ำเหลือง จะทำการนำเซลล์เม็ดเลือดขาวมาทดสอบประมาณ 1 ชั่วโมง
- 4) จะใช้ section จำนวน 3 section ต่อ ตัวอย่างเลือด 1 ตัวอย่าง
- 5) การทดสอบแต่ละครั้งใช้ section จากเนื้อเยื่อบล็อกเดียวกันทั้งหมด

การทดสอบการยึดเกาะของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์บน high endothelial venules

- 1) นำเซลล์ที่ได้จากวิธีข้างต้น มาเติมลงใน 8 well culture plate หลุมละ 1×10^6 เซลล์
- 2) ตรวจหาการยึดเกาะ ของเซลล์ลิมโฟไซต์ บน โดยหยดเซลล์ลงบนเนื้อเยื่อที่ตัดจาก parotid lymph node ที่อยู่บน coverslip วางบน rocker ที่ โยกด้วยความถี่ 120 ครั้ง ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที
- 3) นำสไลด์ที่ได้ไปจุ่มล้างเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะออกด้วย 100mM PBS และคงสภาพด้วย 3% glutaraldehyde เป็นเวลา 30 นาที ที่ อุณหภูมิ 4°C และ ต่อจากนั้น permeate เนื้อเยื่อด้วย 70% ethanol เป็นเวลา 60 นาที ที่ อุณหภูมิ 4°C และย้อมด้วย 1 % toluidine blue 3 วินาที
- 4) นับจำนวนเซลล์ต่อ 1 high endothelial venules (HEV) จำนวน 20 HEV ต่อ section

การศึกษาเปรียบเทียบการเคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ตอบสนองต่อสาร CCL-5 ของโคที่อยู่ระยะต่างๆของการให้นมและระยะแห้งนม

เซลล์เม็ดเลือดชนิดลิมโฟไซต์ที่แยกเก็บจากเลือดนำไปเติมลงใน transwell ช่องด้านบน และมี สารละลาย CCL-5 ที่ความเข้มข้น 100 ng/ml ปริมาตร 500 μl ในช่องด้านล่าง.และ นำเข้าตู้บ่มที่มี 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นเก็บของเหลวจากช่อง ด้านล่างและนับจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วย hemocytometer

การศึกษาเปรียบเทียบการเคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ ตอบสนองต่อสาร CCL-5 ของโคหลังการได้รับ IGF-1

วิธีที่ 1 เซลล์เม็ดเลือดชนิดลิมโฟไซต์ที่แยกเก็บจากเลือดนำไป

นับจำนวนเซลล์และปรับให้ได้จำนวนเซลล์ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์มาบ่มกับ IGF-1 ทันทีเป็นเวลา 30 หรือ 90 นาที หลังจากนั้นย้ายเซลล์เม็ดเลือดชนิดลิมโฟไซต์ลงใน transwell ช่อง ด้านบนและมี สารละลาย CCL-5 ที่ความเข้มข้น 200 ng/ml ปริมาตร 500 μl ในช่องด้านล่าง. และนำเข้าตู้บ่มที่มี 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นเก็บของเหลวจากช่อง ด้านล่างและนับจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วย hemocytometer

วิธีที่ 2 เซลล์เม็ดเลือดชนิดลิมโฟไซต์ที่แยกเก็บจากเลือดนำไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์

RPMI1640 ที่เติม 10% fetal calf serum และ Concanavalin A ที่ขนาด 20 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ลิมโฟไซต์จากขวดเลี้ยงเซลล์ นับจำนวนเซลล์และปรับให้ได้จำนวน เซลล์ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์มาบ่มกับ IGF-1 เป็นเวลา 30 หรือ 90 นาที หลังจากนั้นย้ายเซลล์เม็ดเลือดชนิดลิมโฟไซต์ลงใน transwell ช่องด้านบนและมี สารละลาย

CCL-5 ที่ความเข้มข้น 200 ng/ml ปริมาตร 500 μ l ในช่องด้านล่าง.และนำเข้าตู้บ่มที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นเก็บของเหลวจากช่องด้านล่างและนับจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วย hemocytometer

ผลงานวิจัยที่ได้รับ

1) การทดสอบการยึดเกาะของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ที่แยกได้จากเลือดของโคนม โดยวิธี **in vitro adhesion assay**

1.1) การทดสอบการยึดเกาะของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ที่แยกได้จากเลือดของโคนม ที่อยู่ในระยะให้นมและระยะแห้งนม โดยวิธี **in vitro adhesion assay**

ผลการทดสอบการยึดเกาะของเซลล์ลิมโฟไซต์ที่แยกจากเลือดพบว่า จำนวนเฉลี่ยของลิมโฟไซต์ต่อHEV ที่ได้จากโคที่อยู่ในระยะให้นมมีค่าสูงกว่า เซลล์ที่ได้จากระยะแห้งนม แต่ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์มีค่าต่ำ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ต่อHEVที่ได้จากโคที่อยู่ในระยะให้นมและระยะแห้งนมที่ยึดกับเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลือง

โค	จำนวนโค	จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อ HEV
โคนมที่อยู่ในระยะให้นม	3	0.30 $\pm$ 0.47
โคนมที่อยู่ในระยะแห้งนม	3	0

1.2) การทดสอบฤทธิ์ของ IGF-1 ที่มีต่อ การยึดเกาะ ของเซลล์ลิมโฟไซต์ บน high endothelial venules โดยวิธี **in vitro adhesion assay**

ผลการทดสอบการยึดเกาะของเซลล์ลิมโฟไซต์ที่แยกจากเลือดของโคสาวที่ไม่ตั้งท้องพบว่า ไม่มีการยึดเกาะของลิมโฟไซต์ที่ไม่ได้รับ IGF-1 ที่ได้รับ IGF-1 ขนาดความเข้มข้น50 ng/ml และ ที่ได้รับ IGF-1 ขนาดความเข้มข้น100 ng/ml เป็นเวลา 30 นาที(ตารางที่ 2และ 3)

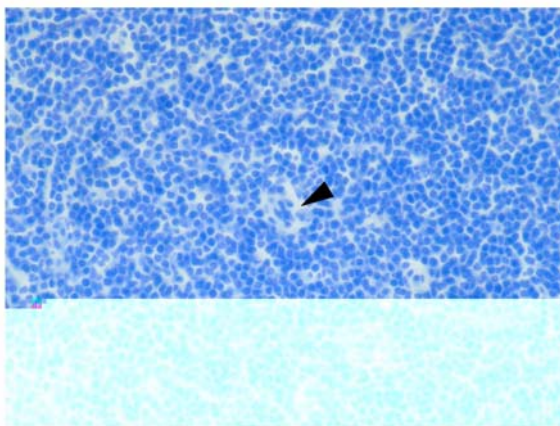
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ต่อHEVที่ไม่ได้รับและได้รับ IGF-1 ที่ขนาดความเข้มข้น50 ng/ml

โค หมายเลข	IGF-1	จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อ HEV
4606	0 ng/ml	0
	50 ng/ml	0
4402	0 ng/ml	0
	50 ng/ml	0
4622*	0 ng/ml	0

	50 ng/ml	0
4468*	0 ng/ml	0
	50 ng/ml	0

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ต่อ HEV ที่ไม่ได้รับและได้รับ IGF-1 ที่ขนาดความเข้มข้น 50 ng/ml และ 100 ng/ml

โค หมายเลข	IGF-1	จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อ HEV
4539	0 ng/ml	0
	50 ng/ml	0
	100 ng/ml	0
4518	0 ng/ml	0
	50 ng/ml	0
	100 ng/ml	0
4415	0 ng/ml	0
	50 ng/ml	0
	100 ng/ml	0



ภาพที่ 1 แสดง high endothelial venule (หัวลูกศร) ที่มี endothelial cell เป็น cuboidal cell

2) การศึกษาเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์

ตอบสนองต่อ chemokine CCL-5

2.1) การศึกษาเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ตอบสนองต่อสาร CCL-5 ของโคที่อยู่ระยะต่างๆของการให้นมและระยะแห้งนม

ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกจากเลือดของโคที่อยู่ในระยะต่างๆของการให้นมพบว่า ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ที่เคลื่อนผ่านแผ่นกรองเพื่อตอบสนองต่อ chemokine CCL-5 ในโคที่อยู่ในระยะให้นมทุกกลุ่มมีค่าต่ำกว่า ค่าที่ได้จากโคที่อยู่ในระยะแห้งนม แต่ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ได้จากโคที่อยู่ในระยะการให้นมทุกระยะมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ที่ได้จากโคที่อยู่ในระยะการให้นมที่แตกต่างกันเคลื่อนที่ผ่านแผ่นกรองตอบสนองต่อ chemokine CCL-5

ระยะการให้นม	จำนวนโค	วันที่ของระยะการให้นม	จำนวนเม็ดเลือดขาวเฉลี่ยที่เคลื่อนผ่านแผ่นกรอง $\times 10^4$ cells/มล จากการทดสอบสองครั้งในเลือดแต่ละตัวอย่าง	จำนวนเม็ดเลือดขาวเฉลี่ยที่เคลื่อนผ่านแผ่นกรอง $\pm$ S.D. $\times 10^4$ cells/มล
ระยะต้น	2	2 60	2.5 10.0	6.25 ± 5.30^a
ระยะกลาง	4	111 152 159 171	1.5 10.3 5.12 3.18	5.03 ± 3.30^a
ระยะท้าย	5	208 212 225 227 275	17.5 1.5 5.8 7.5 8.0	8.06 ± 5.86^a
ระยะแห้งนม	2	320 335	4.25 35	19.62 ± 21.7^b

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนเม็ดเลือดขาวเฉลี่ยที่เคลื่อนผ่านแผ่นกรองที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

2.2) การศึกษาเปรียบเทียบการเคลื่อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ที่ได้รับ IGF-1

ตอบสนองต่อสาร CCL-5

2.2.1) การทดสอบเวลาและขนาดความเข้มข้นที่เหมาะสมของการให้ IGF-1 ในการบ่มเซลล์ลิมโฟไซต์

ในการทดสอบ เซลล์ลิมโฟไซต์ที่เก็บจากเลือดของลูกโคเพศผู้อายุประมาณ 6 เดือน เนื่องจากไม่ต้องการให้มีอิทธิพลของฮอร์โมนเพศในการศึกษา นำเซลล์ที่ได้จากแต่ละตัวอย่างมาแยกออกเป็น 4 ส่วน โดยแต่ละส่วนใช้เวลาในการบ่มและความเข้มข้นของ iGF-1 ที่แตกต่างกันดังตารางที่ 5

ผลการทดสอบพบว่า เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ที่เคลื่อนผ่านแผ่นกรอง หลังจากการบ่ม 30 นาทีกับ RPMI 1640 ที่ไม่ผสม IGF-1 และผสม IGF-1 ไม่มีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เช่นเดียวกันกับผลที่พบจากการบ่ม เป็นเวลา 90 นาที พบว่า เซลล์ลิมโฟไซต์ที่ได้รับ IGF-1 ขนาด 100 ng/ml สามารถเคลื่อนผ่านแผ่นกรองเมื่อตอบสนองต่อ CCL-5 ได้ในจำนวนที่ใกล้เคียงกับเซลล์ที่ไม่ได้รับ IGF-1 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์เคลื่อนที่ผ่านแผ่นกรองตอบสนองต่อ chemokine CCL-5 หลังจากการบ่มกับ IGF-1 ที่ขนาดความเข้มข้นต่างๆและเวลาต่างๆกัน

ขนาดของ IGF-1	จำนวนโค	ระยะเวลาที่บ่ม	จำนวนเม็ดเลือดขาวเฉลี่ยที่เคลื่อนผ่านแผ่นกรอง $\pm$ S.D. $\times 10^4$ cells/มล.
0	3	30 นาที	2.58 $\pm$ 1.26
100 ng/ml	3	30 นาที	1.47 $\pm$ 1.30
0	3	90 นาที	5.58 $\pm$ 2.36
100 ng/ml	3	90 นาที	4.58 $\pm$ 2.24

2.2.2) การทดสอบผลของการให้ IGF-1 ในการเคลื่อนที่ของเซลล์ลิมโฟไซต์หลังการกระตุ้นด้วย Concanavalin A

เนื่องจากผลในการทดลองที่ 2.2.1 ที่พบว่า IGF-1 ไม่สามารถเพิ่มความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ลิมโฟไซต์ในกระแสเลือดได้ คาดว่าอาจเป็นเพราะเซลล์ที่ตอบสนองต่อ IGF-1 ในการเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีการอักเสบน่าจะเป็นเซลล์ effector ที่ได้รับการกระตุ้นจาก antigen แล้ว การทดสอบนี้จึงตรวจผลของ IGF-1 ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวที่แยกจากเลือดของลูกโคเพศผู้และรับการกระตุ้นจาก Concanavalin A lectin (ConA) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ผลการทดสอบพบว่า เซลล์ลิมโฟไซต์หลังได้รับการกระตุ้นด้วย ConA มีแนวโน้มที่เพิ่มความสามารถในการเคลื่อนที่เมื่อได้รับ IGF-1 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับ IGF-1 แม้ว่าจำนวนเซลล์เฉลี่ยจะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญก็ตาม (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ได้รับ ConA เคลื่อนที่ผ่านแผ่นกรองตอบสนองต่อ chemokine CCL-5 หลังจากการบ่มกับ IGF-1

ขนาดของ IGF-1	จำนวนโค	ระยะเวลาที่บ่ม	จำนวนเม็ดเลือดขาวเฉลี่ยที่เคลื่อนผ่านแผ่นกรอง $\pm$ S.D. $\times 10^4$ cells/มล.
0	3	90 นาที	10.0 $\pm$ 5.0
100 ng/ml	3	90 นาที	12.3 $\pm$ 7.5

จากผลทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ลิมโฟไซต์ตอบสนองต่อ CCL-5 พบว่าการตอบสนองต่อ IGF-1 เพื่อเพิ่มความสามารถในการเคลื่อนที่จะเกิดขึ้นได้ดีกว่าในเซลล์ลิมโฟไซต์ผ่านการกระตุ้นด้วย ConA เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (ตารางที่ 5 และ 6)

สรุปและวิจารณ์

ผลของinsulin-like growth factor ที่มีต่อการทำงานของเซลล์หลายชนิดโดยเฉพาะเซลล์ลิมโฟไซต์ จากรายงานการพบ receptor ของโมเลกุลนี้ในเซลล์ลิมโฟไซต์.(Nielsen et al., 2003) บ่งชี้บทบาทของโมเลกุลนี้ในการทำงานของเซลล์ชนิดนี้ เนื่องจากIGF-1 มีความสำคัญในการสร้างน้ำนมในโคนม (Baumrucker and Erondur, 2000) ระดับของ IGF-1 ผันแปรตามระยะการให้นม (Sharma et al., 1994) จากผลการทดสอบพบว่าเซลล์ลิมโฟไซต์ในการตอบสนองต่อ chemokine CCL-5 (RANTES) ซึ่งเป็น chemotactic substance ที่เหนี่ยวนำเซลล์ลิมโฟไซต์และเป็นสารสำคัญที่สร้างขึ้นในเนื้อเยื่อเต้านมที่เกิดการอักเสบ (Pareek et al., 2005) พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนผ่านโดยเซลล์จากโคที่อยู่ในระยะให้นมระยะท้ายมีการตอบสนองที่กว่าเซลล์จากโคระยะให้นมอื่นๆแต่ต่ำกว่าเซลล์ของโคที่อยู่ในระยะแห้งนม ความแตกต่างนี้อาจเป็นผลมาจากที่โคที่อยู่ในระยะแห้งนมมีสัดส่วนของเซลล์ที่สามารถตอบสนองต่อ CCL-5 มากกว่าโคที่อยู่ในระยะให้นม ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับระดับIGF-1 ที่พบว่าระดับ IGF-1 ในระยะแห้งนมมีค่าสูงกว่าระยะอื่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วงใกล้คลอด เมื่อพิจารณาผลของการให้ IGF-1 ในระดับที่สูงกว่าระดับปกติ(100 ng/ml) ที่พบในกระแสเลือดในโคนมในระยะที่ให้นม กลับพบว่าเซลล์ลิมโฟไซต์จากโคที่อายุน้อยไม่ตอบสนองต่อการให้ IGF-1 (ตารางที่ 4 และ 5) จากรายงานที่พบว่าเซลล์effector ที่ได้รับการกระตุ้นจาก antigen มี IGF-1 receptor มากกว่าnaïve cells (Walsh and O'Conner, 2000) แสดงว่าจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ตอบสนองต่อ IGF-1 น่าจะเกิดจากสัดส่วนเซลล์ลิมโฟไซต์ที่เป็น effector ที่พบในกระแสเลือด ในการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วย ConA สามารถเพิ่มการตอบสนองได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น แม้ว่าความแตกต่างของจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนผ่านระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับ IGF-1 จะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่การตอบสนองในกลุ่มที่ได้รับ IGF-1 จะมีแนวโน้มสูงกว่า

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าบทบาทของ IGF-1 ต่อการทำงานของเซลล์ลิมโฟไซต์ในโคนมเป็นไปโดยอ้อม ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงภาวะภูมิคุ้มกัน ปัจจัยอื่นๆที่อาจส่งผลต่อการตอบสนองของเซลล์ลิมโฟไซต์ในโคนมที่อยู่ในระยะการให้นมและแห้งนมได้แก่ ระดับฮอร์โมนโปรแลคติน เอสตราไดออล และ โปรเจสเตอโรน และกลไกระดับโมเลกุลที่มีผลต่อการทำงานของเซลล์ซึ่งควรทำการศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Baumrucker CR, Erondur NE. Insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine mammary gland and milk. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. 2000; 5: 53-64.
- Nielsen L, Røntved CM, Nielsen MO, Norup LR, Ingvarsen KL. Leukocyte from heifers at different ages express insulin and insulin-like growth factor-1(IGF-1) receptors. Domest. Anim. Endocrinol. 2003 25: 231-238
- Pareek R, Wellnitz O, Van Dorp R, Burton J, Kerr D. Immunorelevant gene expression in LPS-challenged bovine mammary epithelial cells. J. Appl. Genetics. 2005 46: 71-77
- Sharma BK, Vandehaar MJ, Ames NK. Expression of insulin-like growth factor-1 in cows at different stages of lactation and in late lactation cows treated with somatotropin. J. Dairy. Sci. 1994. 77: 2232-2241.
- Walsh PT, O'Conner R. The insulin-like growth factor-I receptor is regulated through CD28 and protects activated T cells from apoptosis. Eu. J. Immunol. 2000;30: 1010-1018.

ปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินงาน

- 1) ปัญหาขาดเครื่องมือที่ต้องการ
- 2) ปัญหาที่ไม่สามารถหาตัวอย่างเนื้อเยื่อเต้านมโคหรือ Peyer's patches ได้จึงจำเป็นต้องทดสอบบน lymph node
- 3) ปัญหาเกี่ยวกับเทคนิคในการทดลอง พบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวไม่ยึดเกาะกับ section

ความเห็นและข้อเสนอแนะ

- 1) เพื่อยืนยันผลการทดลอง จึงควรทดสอบสัดส่วนของเซลล์ที่มี IGF-1 receptor และ receptor ต่อ CCL-5 ในโคนมที่อยู่ในระยะต่างๆของการให้นม ด้วยวิธี flow cytometry
- 2) การทดสอบฤทธิ์ของ IGF-1 ที่มีต่อการยึดเกาะต้องใช้ model ใหม่โดยใช้ผลของการยึดเกาะของเซลล์ลิมโฟไซต์ต่อ Extracellular matrix protein ได้แก่ fibronectin, laminin และ collagen type II

outputที่ได้จากโครงการ

ไม่มี ชื่อผลงานที่จะตีพิมพ์ Roles of insulin-like growth factor –1 on migration of peripheral blood lymphocytes in dairy cows

วารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ Journal of Dairy Science

เวลาที่คาดว่าจะตีพิมพ์ ยังไม่สามารถระบุได้