



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสร้างเซลล์ไลน์ชนิดเซอโทลีเซลล์และการ
เปลี่ยนแปลงให้เป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดพหุโพแทสเซียมในแมวบ้าน

โดย

ดร.น.สพ. ณรงค์ ทิพนววัฒน์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เมษายน พ.ศ. 2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสร้างเซลล์ไลน์ชนิดเซอโทลีเซลล์และการเปลี่ยนแปลงให้เป็น เซลล์ต้นกำเนิดชนิดพหุโพแทสเซียมในแมวบ้าน

ผู้วิจัย

ดร.น.สพ. ณรงค์ ทัพธวัชนะ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัยสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG6180020

ชื่อโครงการ: การสร้างเซลล์ไลน์ชนิดเซอโทลีเซลล์และการเปลี่ยนแปลงให้เป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดพหุโพแทสเซียมในแมวบ้าน

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ดร.น.สพ. ณรงค์ ทิพนววัฒน์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อีเมล: Tiptanavattana.n@gmail.com, Narong.ti@psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: พฤษภาคม พ.ศ. 2561 ถึง เมษายน พ.ศ. 2562

บทคัดย่อ:

เซลล์เซอโทลีเป็นเซลล์พุงและคำจั้นในท่อสร้างอสุจิและความสัมพันธ์กับเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในทุกระยะทั้งในด้านการกายวิภาคและสรีรวิทยา เซลล์เซอโทลีทำหน้าที่สำคัญที่คอยทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการเพิ่มจำนวนของกระบวนการสร้างอสุจิ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษถึงหน้าที่ของเซลล์ไลน์ของเซลล์เซอโทลีที่จากอวัยวะแมวบ้านเพื่อเปรียบเทียบกัน อวัยวะที่ใช้ในการศึกษาได้มาจากแมวที่มาจากบ้านตามปกติ จากนั้นทำการลอกเปลือกและเยื่อหุ้มอวัยวะออก และทำการตัดย่อยเพื่อให้ได้เซลล์อวัยวะเดี่ยวด้วยวิธี modified 2-step enzymatic digestion ในอวัยวะที่ได้จากแมวก่อนเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์จะได้รับการกระตุ้นด้วยวิธีการอดอาหาร (starvation technique) และในแมวหลังวัยเจริญพันธุ์จะใช้วิธีการใส่สารพิษที่กระตุ้นการเจริญเติบโตให้กลายเป็นเซลล์ไลน์ เซลล์ไลน์ของเซลล์เซอโทลีที่ได้จะได้รับการศึกษารูปร่างและลักษณะ รวมถึงการตรวจคุณสมบัติด้วยการย้อมสีโปรตีนไวเมนติน (vimentin) การแสดงออกของยีนที่สำคัญด้วยเทคนิค RT-PCR และตรวจสอบการทำงาน ผลการศึกษาพบว่า เซลล์ไลน์ทั้งหมดที่ได้แสดงรูปร่างที่จำเพาะกับเซลล์เซอโทลีโดยพบลักษณะเป็นกระสวย มีนิวเคลียสที่ชัดเจน และมีกลุ่มไขมันสะสมในส่วนของไซโตพลาสซึม และมีการแสดงออกเป็นบวกของโปรตีนไวเมนติน ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้ผลคือมีการแสดงออกของยีน *Vimentin*, *CLU*, *OCLN* และ *FSHR* โดยไม่พบการแสดงออกของยีน *LHR*, *HSD3B* และ *DDX4* การตรวจสอบการทำงานพบว่ามีกระบวนการเก็บกินเซลล์ (phagocytic activity) ที่ชัดเจน อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเปรียบเทียบเซลล์ไลน์ที่ passage ที่ 1, 4, 23, และ 50 พบว่า มีการแสดงออกของยีน *GDNF*, *AR*, *LIF*, *EGF*, *FGF2* และ *KITLG* ซึ่งถือเป็นยีนสำคัญที่แสดงออกถึงการผลิตสารสำคัญของเซลล์เซอโทลี การตรวจสอบการทำงานในแง่ของการผลิตฮอร์โมนพบว่าเซลล์สามารถสร้างฮอร์โมนเอสตราไดโอดได้ เพื่อทำการกระตุ้นด้วยการให้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน งานวิจัยนี้สรุปได้ว่า เซลล์ไลน์ที่ได้แสดงคุณสมบัติทางกายวิภาค สรีรวิทยา และการแสดงออกในระดับโมเลกุลของเซลล์เซอโทลีได้อย่างครบถ้วน ซึ่งทำให้เซลล์ไลน์ที่ได้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษาในระดับลึกต่อไป

คำหลัก : แมว เซลล์เซอโทลี เซลล์ไลน์

Abstract

Project Code : MRG6180020

Project Title : Immortalization of Sertoli cells and establishment of Sertoli-derived induced pluripotent stem cells in cat (*Felis catus*)

Investigator : Dr. Narong Tiptanavattana (Faculty of veterinary science, Prince of Songkla University)

E-mail Address : Tiptanavattana.n@gmail.com, Narong.ti@psu.ac.th

Project Period : May, 2018 – April, 2019

Abstract:

Sertoli cell is a supporting cell type which located in the seminiferous tubule and interacts with the all types of male germ cells via anatomy and physiology. They plays a crucial role in the regulation of proliferation phase of spermatogenesis. Therefore, the objective of this study would like to focus at the function of Sertoli cell line derived from cat. The testes from a castrated cat (4 month of age) were decapsulated and dissociated for single cell isolation by modified 2-step enzymatic digestion. The Sertoli cell were purified and enriched by modified starvation technique and continuously passaged to passage 50th. The cell line was characterized by morphology, immunofluorescence of anti-rat vimentin expression and related genes with RT-PCR and its functions. The Sertoli cell line has the distinct spindle morphology as previous study with prominent nucleoli and fat droplets in cytosol. Moreover, the cells presented vimentin in the cytoplasm and also expressed the mRNA of *Vimentin*, *CLU*, *OCN* and *FSHR* without the mRNA of *LHR*, *HSD3B* and *DDX4* expressions. For the functional activity of Sertoli cell line, the numerous of fluorescent beads were engulfed by immortalized Sertoli cells that indicated the high phagocytic activity of theirs. The Sertoli cell line at Passage 1st, 4th, 23rd and 50th also expressed mRNA of *GDNF*, *AR*, *LIF*, *EGF*, *FGF2* and *KITLG* genes as the Sertoli-produced important factors. To detection the level of estrogen production, the cat Sertoli cells produced the oestradiol level to 1.49 pg/ml after challenge with progesterone. In conclusion, this study demonstrated that the Sertoli cell line from cat at G/SSC age present the morphological and functional of true Sertoli cells and they have the ability to secrete the vital factors (e.g. GDNF, FGF2, LIF, EGF) for SSC maintenance. Therefore, our Sertoli cell line would be have advantageous useful for cat SSC culture or in-depth study of spermatogenesis.

Keywords : Cat, Sertoli cell, Cell line

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

ในปัจจุบันเทคโนโลยี assisted reproductive technology เข้ามามีบทบาทสำคัญอย่างมากในงานอนุรักษ์สัตว์ป่าหายากหรือใกล้สูญพันธุ์ โดยเฉพาะเทคโนโลยีการเก็บเซลล์สืบพันธุ์ เซลล์ต้นกำเนิดหรือ stem cell ถือเป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่จะเข้ามาช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้ นอกจากนี้อาจรวมถึงการใช้เซลล์ต้นกำเนิดเป็นต้นแบบของการศึกษาโรคและความผิดปกติในคนและสัตว์ ในแนวมีการศึกษาของ tiptanavattana et al., 2013 เกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดอวัยวะได้สำเร็จ อย่างไรก็ตามในสัตว์ที่ยังไม่สุ่วัยเจริญพันธุ์หรือมีปัญหาความไม่สมบูรณ์พันธุ์เกิดขึ้นจะไม่สามารถผลิตเซลล์สืบพันธุ์ได้ ดังนั้นเทคโนโลยีเซลล์ต้นกำเนิดชนิดพลูริโพเท้นส์ (induced pluripotent stem cell) โดยอาศัยเซลล์อื่นๆที่มีความจำเพาะ (specialized cell) เหล่านี้มาให้เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับเซลล์ต้นกำเนิดระยะคัพภะ (embryonic stem cell) เพื่อหวังผลให้มีการเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์ได้ โดยที่เทคนิคผลิต induced pluripotent stem cell นั้นเริ่มจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) แต่ได้ผลที่ค่อนข้างต่ำ (0.25-0.99%, Teotia et al., 2015) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการใช้เซลล์เซอโกลีเซลล์ (Sertoli cell) ซึ่งมีรายงานการแสดงออกของยีนที่มีความใกล้เคียงกับระยะคัพภะ (pluripotent gene) (Goel et al., 2008)

วัตถุประสงค์ของการดำเนินการวิจัยในโครงการ การสร้างเซลล์ไลน์ชนิดเซอโกลีเซลล์และการเปลี่ยนแปลงให้เป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดพลูริโพเท้นส์ในแมวบ้าน ประกอบด้วย ดังนี้

1. เพื่อต้องการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเซลล์ไลน์ชนิดเซอโกลีเซลล์ (Sertoli cell) ในแมวบ้านได้
2. เพื่อต้องการศึกษาและเปรียบเทียบอัตราความสำเร็จของการ reprogramming ระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) และเซอโกลีเซลล์
3. เพื่อต้องการสร้างเซลล์ไลน์เซอโกลีเซลล์ในแมวบ้านและสร้างกลุ่มเซลล์ที่มีความสามารถเจริญไปเป็นกลุ่มเซลล์ไพรโมเดียม เจิมเซลล์ (Primordial germ cell)
4. เพื่อต้องการขยายความร่วมมือของงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศให้เข้มแข็งได้

การดำเนินงานวิจัยในโครงการนี้ แบ่งได้ออกเป็น 2 การศึกษาหลักๆ ดังนี้

การศึกษาที่ 1 Establishment of cat Sertoli cell lineage by starvation method and immortalization มีวัตถุประสงค์ย่อยในการ สร้างเซลล์ไลน์จากเซลล์เซอโกลีในแมวบ้าน และทำการเปรียบเทียบความสามารถของวิธี starvation เทียบกับ TERT overexpression รวมถึงการวิเคราะห์ถึงคุณสมบัติในเชิงการทำงานของ เซลล์ไลน์จากเซลล์เซอโกลี

การศึกษาที่ 2 Reprogramming efficiency of harvested cell types and differentiation into germ cell lineage of domestic cat มีวัตถุประสงค์ย่อยในการประเมินประสิทธิภาพของขั้นตอนการ reprogramming ระหว่างเซลล์แต่ละชนิด และการศึกษาความสามารถและความเป็นไปได้ในการกระตุ้นกระบวนการ differentiation ให้กลายเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อสามชั้นของระยะคัพภะได้

ผลการทดลอง

(1) วัตถุประสงค์ของโครงการ

วัตถุประสงค์ของการดำเนินการวิจัยในโครงการ การสร้างเซลล์ไลน์ชนิดเซอโทลีเซลล์และการเปลี่ยนแปลงให้เป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดพลูริโพเท้นส์ในแมวบ้าน ประกอบด้วย ดังนี้

1. เพื่อต้องการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเซลล์ไลน์ชนิดเซอโทลีเซลล์ (Sertoli cell) ในแมวบ้านได้
2. เพื่อต้องการศึกษาและเปรียบเทียบอัตราความสำเร็จของการ reprogramming ระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) และเซอโทลีเซลล์
3. เพื่อต้องการสร้างเซลล์ไลน์เซอโทลีเซลล์ในแมวบ้านและสร้างกลุ่มเซลล์ที่มีความสามารถเจริญไปเป็นกลุ่มเซลล์ไพรมอเดียล เจิมเซลล์ (Primordial germ cell)
4. เพื่อต้องการขยายความร่วมมือของงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศให้เข้มแข็งได้

(2) การดำเนินงานวิจัยตามวัตถุประสงค์ในรอบปีที่ผ่านมา

การเก็บตัวอย่าง

เบื้องต้นได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างจากแมวเพศผู้ที่มาทำหมันตามปกติในโรงพยาบาลสัตว์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และโรงพยาบาลสัตว์เล็ก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2 กลุ่มคือ

1. แมวก่อนเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (อายุ 3-6 เดือน)
2. แมวเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (อายุ 1-3 ปี)

โดยทำการเก็บตัวอย่างแช่ใน irrigated saline สำหรับการขนส่งตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำการแยกตัวอย่างต่อไป

การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคและการแสดงออกของโปรตีน

นำอวัยวะข้างหนึ่งของแมว เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (อายุ 1-3 ปี) จำนวน 6 ตัว ทำการตัดเยื่อหุ้มอวัยวะ (vaginal tunic) และทำการตรึงสภาพในสารละลาย 4%(v/v) paraformaldehyde in distilled water ประมาณ 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการแช่ตัวอย่างในสารละลายบัฟเฟอร์ phosphate buffered saline (PBS) เพื่อรอการทำการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคและการแสดงออกของโปรตีนต่าง ๆ ต่อเซลล์อวัยวะชนิดต่าง ๆ จากนั้นทำการตัดชิ้นเนื้อ แล้วลงแม่พิมพ์เพื่อทำ paraffin block แล้วทำการตัดตัวอย่างความหนา 4 ไมครอน ลงบนสไลด์ที่มีการเคลือบด้วยสารเคมี silane เรียบร้อยแล้ว ทุกตัวอย่างจะนำไปย้อมสี ด้วย conventional hematoxylin and eosin เพื่อทำการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาค และทำการศึกษากการแสดงออกของโปรตีนต่าง ๆ ด้วยวิธีทาง immunohistochemistry (IHC) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. Deparaffinization ด้วยการจุ่ม xylene จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

2. Rehydration ด้วยการจุ่ม gradient concentrations of ethanol (ตามลำดับ)

โดยเริ่มจาก absolute ethanol จำนวน 1 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

95% ethanol จำนวน 1 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

70% ethanol จำนวน 1 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

50% ethanol จำนวน 1 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

จากนั้นทำการแช่ PBS จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3. Antigen retrieving process, Blocking endogenous peroxidase enzymes and non-specific และ Primary antibody incubation ซึ่งได้ทำการศึกษา preliminary study ถึงขั้นตอนและวิธีการด้วยวิธีต่าง ๆ จนได้วิธีการดังนี้

Vimentin (positive marker for Sertoli cell)

Antigen retrieving process: ใช้ความร้อนด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วยสารละลาย citric acid buffer (pH = 6.0) ที่ผสม 0.02% (v/v) Tween-20

Blocking endogenous peroxidase enzymes and non-specific: ใช้สารละลาย 1% (v/v) hydrogen peroxide in methanol 15 นาที อุณหภูมิห้อง และ 2% (w/v) BSA in PBS เป็นเวลา 15 นาที

Primary antibody incubation: บ่มแอนติบอดีใช้ mouse monoclonal anti-vimentin (1:200) 37 องศาเซลเซียส 60 นาที จากนั้นทำการบ่มด้วย Dako REAL™EnVision™detection system ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 นาที แล้วแช่ในสารละลาย DAB และย้อมสี Mayer's hematoxylin

การแยกเซลล์อวัยวะของแมว

อวัยวะแมวอีกข้างนำมาทำการย่อยให้ได้ single testicular cell suspension ด้วยวิธี modified 2-step enzymatic digestion (Tiptanavattana et al., 2013)

1. แมวก่อนเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (อายุ 3-6 เดือน)

2. แมวเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (อายุ 1-3 ปี)

เมื่อทำการตัดย่อยได้เซลล์เดี่ยวอวัยวะ นำไปทำการเพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงที่ทำการเคลือบผิววัสดุจานเพาะเลี้ยงด้วยสารละลาย 0.1% gelatin in DW โดยใส่เซลล์ลงไปด้วยความเข้มข้น 2×10^5 เซลล์ต่อมล. ในน้ำยา 10% fetal bovine serum added FM โดยเลี้ยงในตู้บ่มก๊าซ 5% CO₂ in air ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการดูดเซลล์ที่ลอยออกให้หมดโดยการล้างจานเพาะเลี้ยงด้วย 37 องศาเซลเซียส 3 รอบ

การสร้างและเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของ Sertoli cell

วิธีการ starvation technique ทำการเปลี่ยนน้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อสำหรับการทำ starvation method ด้วย 1% fetal bovine serum added FM เป็นระยะเวลา 14 วัน อย่างไรก็ตามเมื่อ

เซลล์มีการเจริญได้ 100% confluence ของจานเพาะเลี้ยง จะมีการทำ passaging ด้วย 0.25% trypsin-EDTA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 นาที โดยทำการการ passaging อย่างต่อเนื่อง จนได้เซลล์ไลน์ วิธีการ SV40, TERT และ SV40+TERT transfection ใช้วิธี lentivirus mediated gene transfer ที่ประกอบด้วย VSV-G, gap-pol, REV และ TERT จากนั้น ทำการ passaging อย่างต่อเนื่องจนได้เซลล์ไลน์

การตรวจสอบคุณสมบัติเซลล์ไลน์ของ Sertoli cell

- การตรวจรูปร่างของเซลล์ Sertoli cell ผ่านกล้องจุลทรรศน์
- การแสดงออกของยีน ด้วยวิธี conventional reverse transcriptase PCR ของยีนดังต่อไปนี้

Germ cell marker

1. DEAD-box helicase 4 (*DDX4*)
2. GDNF family receptor alpha 1 (*GFRA1*)
3. KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase (*KIT*)

Sertoli cell marker

1. Androgen receptor (*AR*)*
2. Clusterin (*CLU*)*
3. 3-Beta-hydroxysteroid dehydrogenase (*HSD3B*)*
4. Occludin (*OCLN*)*
5. Glial cell derived neurotrophic factor (*GDNF*)*
6. Vimentin (*VIM*)*
7. Luteinizing hormone receptor (*LHR*)
8. KIT ligand (*KITLG*)*
9. Leukemia inhibitory factor (*LIF*)*
10. Epidermal growth factor (*EGF*)*
11. Fibroblast growth factor-2 (*FGF2*)*

Leydig cell marker

1. Follicle stimulating hormone (*FSHR*)

* newly designs of target genes

- Immunolocalization ด้วย เทคนิค immunofluorescence ต่อ anti-vimentin

นำเซลล์ Sertoli cell Passage ที่ 5 และ 30 เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงที่ทำการเคลือบผิววัสดุ กระดาษไลต์บนจานเพาะเลี้ยงด้วยสารละลาย 0.1% gelatin in DW โดยใส่เซลล์ลงไปด้วยความเข้มข้น 2×10^5 เซลล์ต่อ มล. ในน้ำยา 10% fetal bovine serum added FM โดยเลี้ยงในตู้บ่มก๊าซ 5% CO₂ in

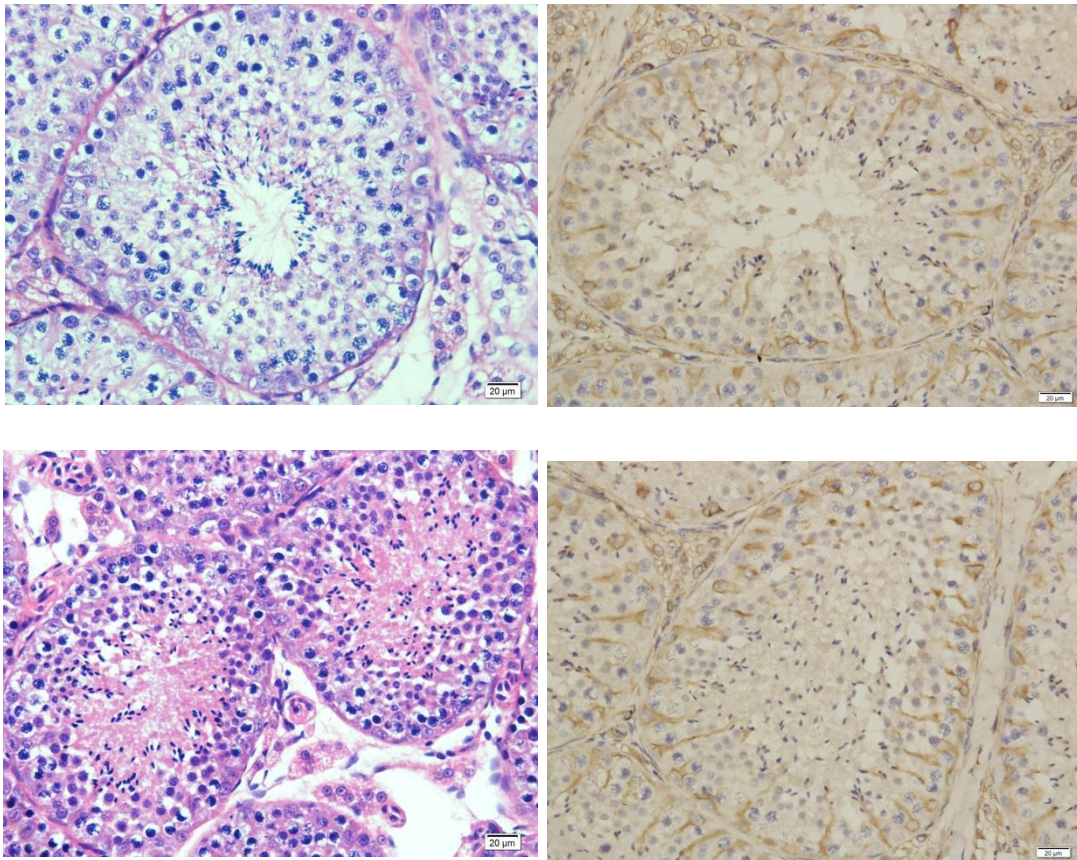
air ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรึงสภาพในสารละลาย 4% (v/v) paraformaldehyde in distilled water ประมาณ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง Blocking non-specific: ใช้ 2% (w/v) BSA in PBS เป็นเวลา 15 นาที Primary antibody incubation: ปุ่มแอนติบอดีใช้ anti-vimentin (1:100) 37 องศาเซลเซียส 60 นาที Secondary antibody incubation: ปุ่มแอนติบอดี (1:100) 37 องศาเซลเซียส 60 นาที และ nuclear staining ด้วย DAPI (1:200) 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(3) ผลงานวิจัยที่ได้รับ

อัมตะของแมวเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (อายุ 1-3 ปี) จำนวน 6 ตัว ได้ผลดังนี้

ลักษณะทางจุลกายวิภาค พบว่าอัมตะมีกระบวนการ spermatogenesis ที่สมบูรณ์ประกอบไปด้วย เซลล์ ดังต่อไปนี้ male germ cell (Spermatogonia, Spermatocytes, Spermatids) Sertoli cell และเซลล์ที่อยู่ภายนอก seminiferous tubule

ลักษณะทางจุลกายวิภาคเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน vimentin พบว่า vimentin จะมีการติดสีน้ำตาลเฉพาะบริเวณที่เป็น cytoplasm ของ Sertoli cell โดยไม่พบการ cross reaction กับเซลล์อื่น ๆ ภายใน seminiferous tubule



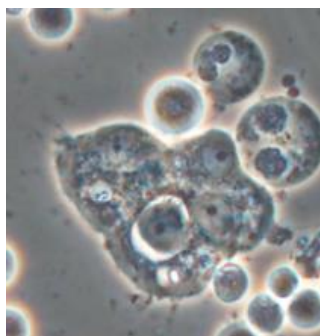
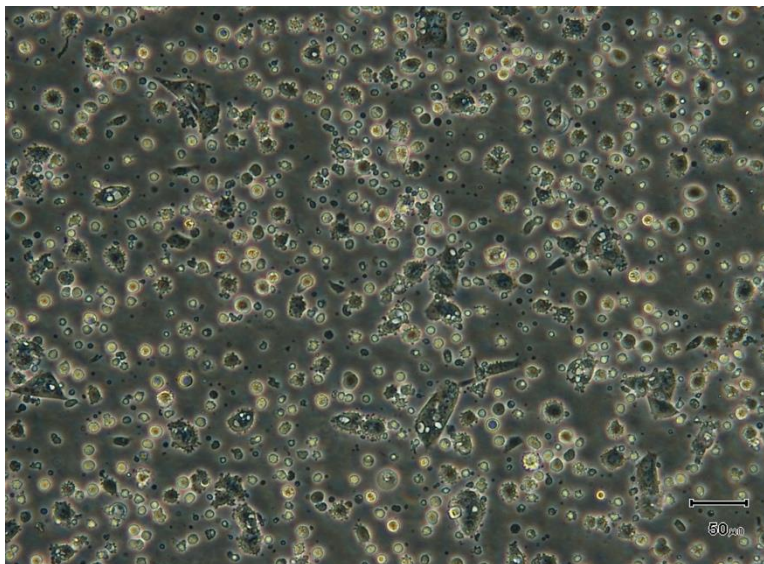
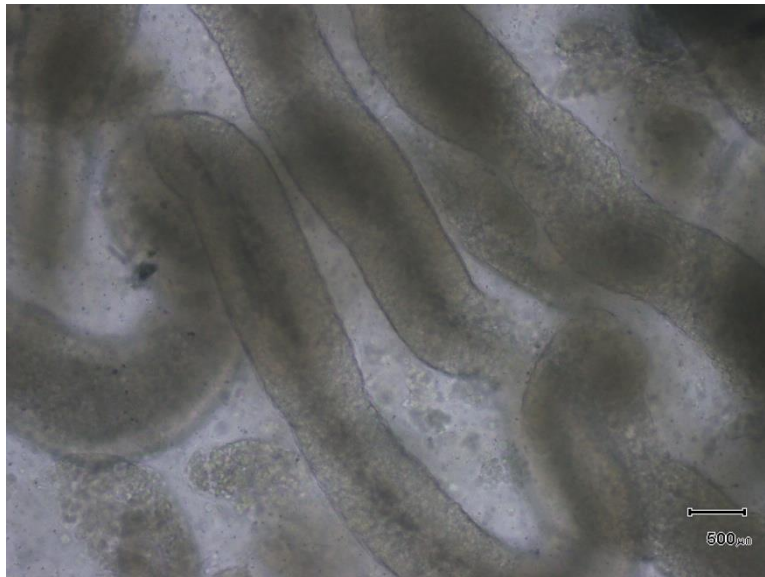
รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างการศึกษาทางจุลกายวิภาคและการแสดงของโปรตีน vimentin ด้วยเทคนิค IHC

ทำการตัดย่อยด้วยเอนไซม์ ของแมวทั้ง 2 กลุ่ม

1. แมวก่อนเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (อายุ 3-6 เดือน) จำนวน 2 ตัว
2. แมวเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (อายุ 1-3 ปี) จำนวน 6 ตัว

ผลที่ได้คือ สามารถแยกได้ single testicular cells ทั้ง 2 กลุ่ม แต่อย่างไรก็ตามพบว่า การตัดย่อยเซลล์ในกลุ่ม แมวเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ จะค่อนข้างแยกได้ single seminiferous tubule ค่อนข้างยาก

กว่า เป็นผลให้ step 1 ของ enzymatic digestion ของกลุ่มที่ 1 ใช้เวลาประมาณ 2 นาที ไม่จำเป็นต้องใช้ DNase I แต่ในขณะที่ ของกลุ่มที่ 2 ใช้เวลาประมาณ 10-15 นาที และจำเป็นต้องใช้ DNase I



รูปที่ 2 แสดงตัวอย่าง seminiferous tubule ที่ควรแยกได้หลังจากการทำ step 1 enzymatic digestion (บน) และ single testicular cells ควรแยกได้หลังจากการทำ step 2 enzymatic digestion (กลาง) ภาพแสดง Sertoli cell ก่อนทำการเพาะเลี้ยง (ล่าง)

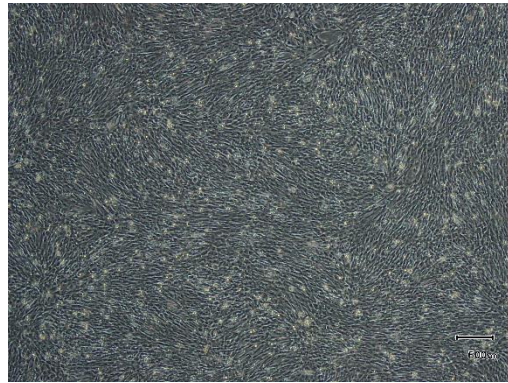
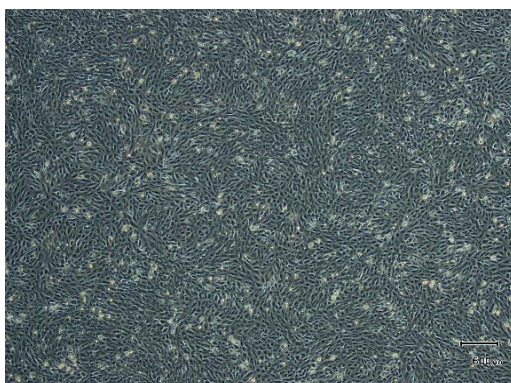
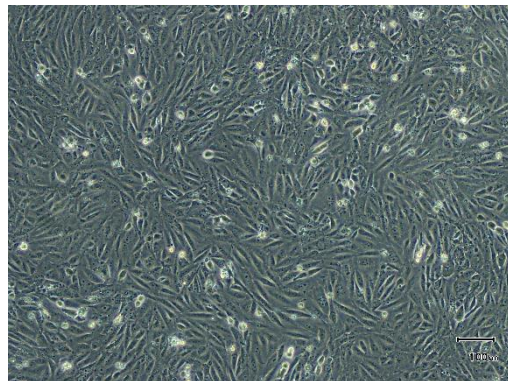
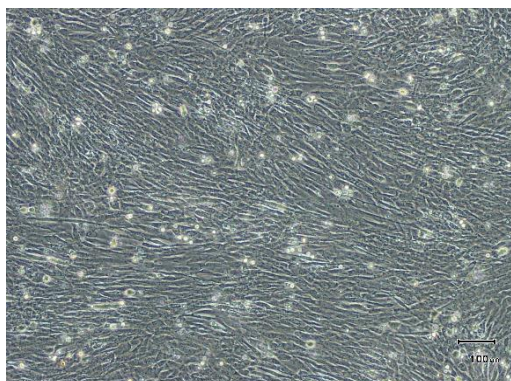
วิธีการ starvation technique

1. แมวก่อนเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (อายุ 3-6 เดือน) จำนวน 2 ตัว ได้เซลล์ไลน์ จำนวน 2 ไลน์ ได้แก่ T3 และ T4 ได้ที่มากกว่า 50 passage

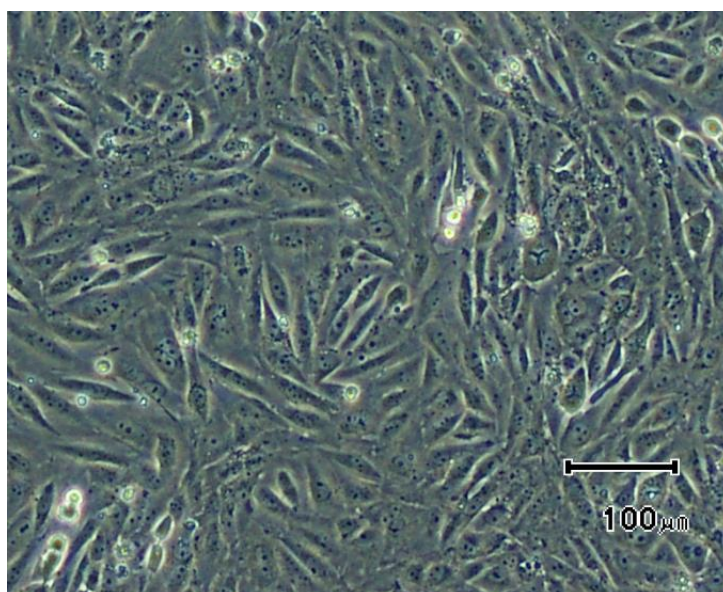
	Number of passage (% cell line obtained)						
	≤ 5	6 -10	11 -15	16 - 20	21 - 25	26 - 30	> 30
Neonatal	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)

2. แมวเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (อายุ 1-3 ปี) ได้ผลการทดลองดังนี้

	Number of passage (% cell line obtained)						
	≤ 5	6 -10	11 -15	16 - 20	21 - 25	26 - 30	> 30
Control	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
SV40	7 (100%)	2(28.57%)	2(28.57%)	2(28.57%)	2(28.57%)	2(28.57%)	2(28.57%)
SV40 + TERT	7 (100%)	1(14.29%)	1(14.29%)	1(14.29%)	1(14.29%)	1(14.29%)	1(14.29%)
TERT	7 (100%)	1(14.29%)	1(14.29%)	1(14.29%)	1(14.29%)	1(14.29%)	1(14.29%)



รูปที่ 3 แสดงตัวอย่าง ลักษณะรูปร่างของ Sertoli cell line passage ที่ 4 ของ T3 (ชาย) และ T4 (หญิง)
- การตรวจรูปร่างของเซลล์ Sertoli cell ผ่านกล้องจุลทรรศน์



รูปที่ 4 แสดงลักษณะรูปร่างของ Sertoli cell line

เซลล์มีรูปร่าง spindle shape และมีจำนวนนิวคลีโอลัสประมาณ 1-2 อันต่อเซลล์ อย่างชัดเจน และมีลักษณะของ fat droplet ที่ตำแหน่งของไซโทพลาสซึมของเซลล์

- การแสดงออกของยีน ด้วยวิธี conventional reverse transcriptase PCR

โดยได้ทำการออกแบบ primer สำหรับใช้ในโครงการด้วยโปรแกรม Primer-Blast ได้รายละเอียดดังนี้

Sertoli cell marker	ลำดับ primer (5'—3')	Product length (bps)
1. Androgen receptor (<i>AR</i>)*	FP: TGACTTCCCTCCACCTGATA	296
2. Clusterin (<i>CLU</i>)*	RP: ACTTCTGTTTCCCTTCAGCG	
	FP: TGTCAGTGGACTGTTCTGCC	420
3. 3-Beta-hydroxysteroid dehydrogenase (<i>HSD3B</i>)*	RP: TCTCCCCGTTCTTTTGACGG	
	FP: TCCCCAGTGTTTCTGATTCC	124
4. Occludin (<i>OCLN</i>)*	RP: CACCAACAAATGCACGATTC	
	FP: AGCGGCAGTGGTAACTTTGA	330
5. Glial cell derived neurotrophic factor (<i>GDNF</i>)*	RP: AGCAGCAGCCATGTAGTCTT	
	FP: GCAGTGACTCAAATATGCCAG	217
8. KIT ligand (<i>KITLG</i>)*	RP: AAGACACAACCCCGATTCT	
9. Leukemia inhibitory factor (<i>LIF</i>)*	FP: GTTGGATAAGCGTGATGGTG	336
	RP: CACTGACCCTGGAATCTTTT	
10. Epidermal growth factor (<i>EGF</i>)*	FP: TTCTCTATTACACGGCCCAG	203
	RP: GAGAGCATTGGGATTGAGGA	
11. Fibroblast growth factor-2 (<i>FGF2</i>)*	FP: CTGGTCAGAACTCTGCAAGC	391
	RP: TCGGGTGATGAACAGCCACT	
	FP: ACCCTCACATCAAACCTGCAAC	218
	RP: TCGTTTCAGTGCCACATACCA	

AR	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Sequence (5'→3')								
Forward primer	TGACTTCCCTCCACCTGATA	Plus	20	2117	2136	57.06	50.00	2.00
Reverse primer	ACTTCTGTTTCCCTTCAGCG	Minus	20	2412	2393	58.12	50.00	3.00
Product length	296							
Exon junction	2400/2401 (reverse primer) on template XM_004000575.2							
Products on intended target								

>[XM_004000575.2](#) PREDICTED: Felis catus androgen receptor (AR), mRNA

CLU	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3'
Sequence (5'->3')								complementarity
Forward primer	TGTCAGTGGACTGTTCTGCC Plus	20	1114	1133	59.89	55.00		6.00
Reverse primer	TCTCCCGTTCTTTTGACGG Minus	20	1533	1514	59.97	55.00		4.00
Product length	420							1.00
Exon junction	1122/1123 (forward primer) on template XM_003984800.2							2.00

>XM 003984800.2 PREDICTED: Felis catus clusterin (CLU), mRNA

Products on intended target

>XM_006933913.1 PREDICTED: Felis catus KIT ligand (KITLG), transcript variant X1, mRNA

Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGCGGCAGTGGTAACTTTGA	Plus	20	1221	1240	59.89	50.00	3.00
Reverse primer	AGCAGCAGCCATGTAGTCTT	Minus	20	1550	1531	59.38	50.00	4.00
Product length	330							
Exon junction	1541/1542 (reverse primer) on template XM_003981047.2							

>XM_003981047.2 PREDICTED: Felis catus occludin (OCLN), mRNA

Reverse primer GAGAGCATTGGGATTGAGGA Minus 20 599 580 56.98 50.00 3.00 0.0
0

Product length 203

Exon junction 404/405 (forward primer) on template [XM_006938581.1](#)

Products on intended target

>[XM_006938581.1](#) PREDICTED: Felis catus leukemia inhibitory factor (LIF), transcript variant X2, mRNA

GDNF

Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity	
Forward primer	GCAGTGACTCAAATATGCCAG	Plus	21	602	622	57.31	47.62	5.00	2.00
Reverse primer	AAGACACAACCCCGATTCT	Minus	20	818	799	57.05	45.00	3.00	1.00

Product length 217

Exon junction 610/611 (forward primer) on template [XM_006928045.1](#)

Products on intended target

>[XM_006928045.1](#) PREDICTED: Felis catus glial cell derived neurotrophic factor (GDNF), mRNA

product length = 217

Forward primer 1 GCAGTGACTCAAATATGCCAG 21

Template 602 622

Reverse primer 1 AAGACACAACCCCGATTCT 20

Template 818 799

FGF2

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ACCCTCACATCAAAC TGAAC	Plus	21	155	175	59.04	47.62	4.00	0.00
Reverse primer	TCGTTTCAGTGCCACATACCA	Minus	21	372	352	59.93	47.62	5.00	0.00

Product length 218

Exon junction 163/164 (forward primer) on template [XM_006930886.1](#)

Products on intended target

>[XM_006930886.1](#) PREDICTED: Felis catus fibroblast growth factor 2 (basic) (FGF2), mRNA

product length = 218

Forward primer 1 ACCCTCACATCAAAGTCAAC 21

Template 155 175

Reverse primer 1 TCGTTTCAGTGCCACATACCA 21

Template 372 352

EGF

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTGGTCAGAACTCTGCAAGC	Plus	21	1372	1392	59.47	52.38	5.00	2.00
Reverse primer	TCGGGTGATGAACAGCCACT	Minus	20	1762	1743	61.48	55.00	5.00	1.00
Product length	391								
Exon junction	1746/1747 (reverse primer) on template XM_006930906.1								

Products on intended target

>[XM_006930909.1](#) PREDICTED: Felis catus epidermal growth factor (EGF), transcript variant X4, mRNA

product length = 391

Forward primer 1 CTGGTCAGAACTCTGCAAGC 21

Template 1372 1392

Reverse primer 1 TCGGGTGAATGAACAGCCACT 20

Template 1762 1743

>[XM_006930908.1](#) PREDICTED: Felis catus epidermal growth factor (EGF), transcript variant X3, mRNA

product length = 391

Forward primer 1 CTGGTCAGAACTCTGCAAGC 21

Template 1372 1392

Reverse primer 1 TCGGGTGATGAACAGCCACT 20

Template 1762 1743

>[XM_006930907.1](#) PREDICTED: Felis catus epidermal growth factor (EGF), transcript variant X2, mRNA

product length = 391

Forward primer 1 CTGGTCAGAACTCTGCAAGC 21

Template 1372 1392

Reverse primer 1 TCGGGTGATGAACAGCCACT 20

Template 1762 1743

>[XM_006930906.1](#) PREDICTED: Felis catus epidermal growth factor (EGF), transcript variant X1, mRNA

product length = 391

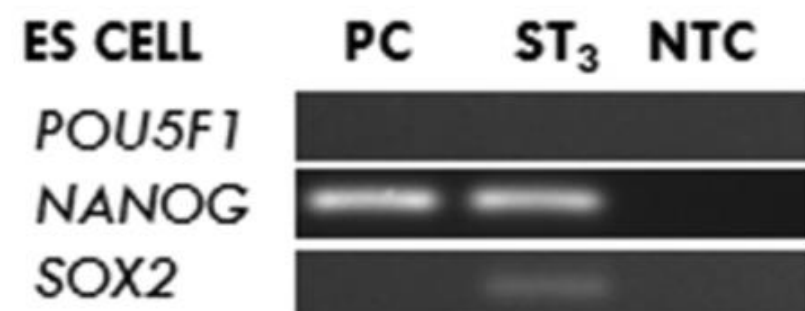
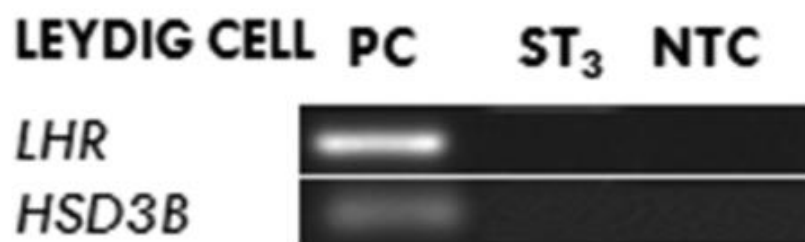
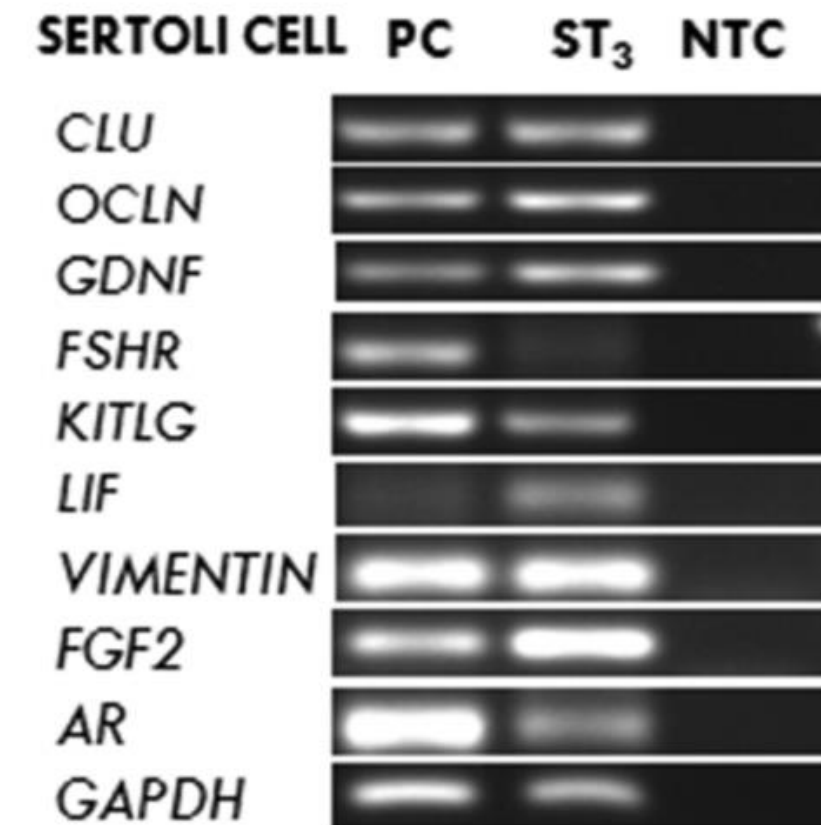
Forward primer 1 CTGGTCAGAACTCTGCAAGC 21

Template 1372 1392

Reverse primer 1 TCGGGTGATGAACAGCCACT 20

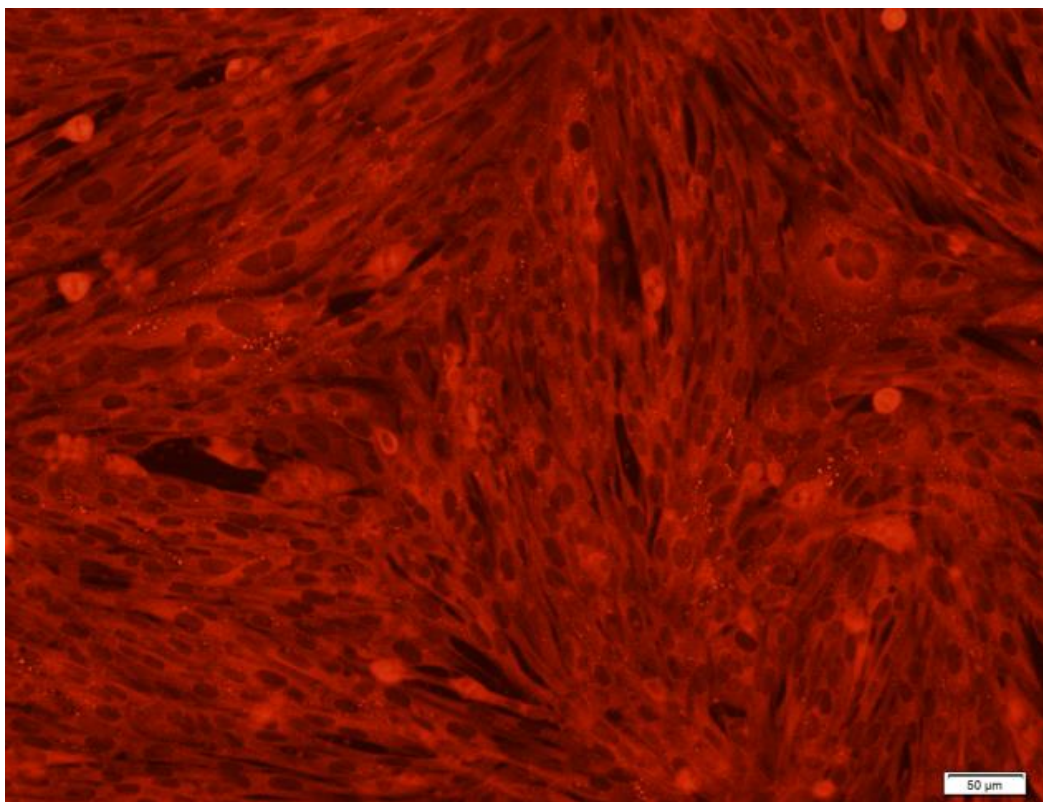
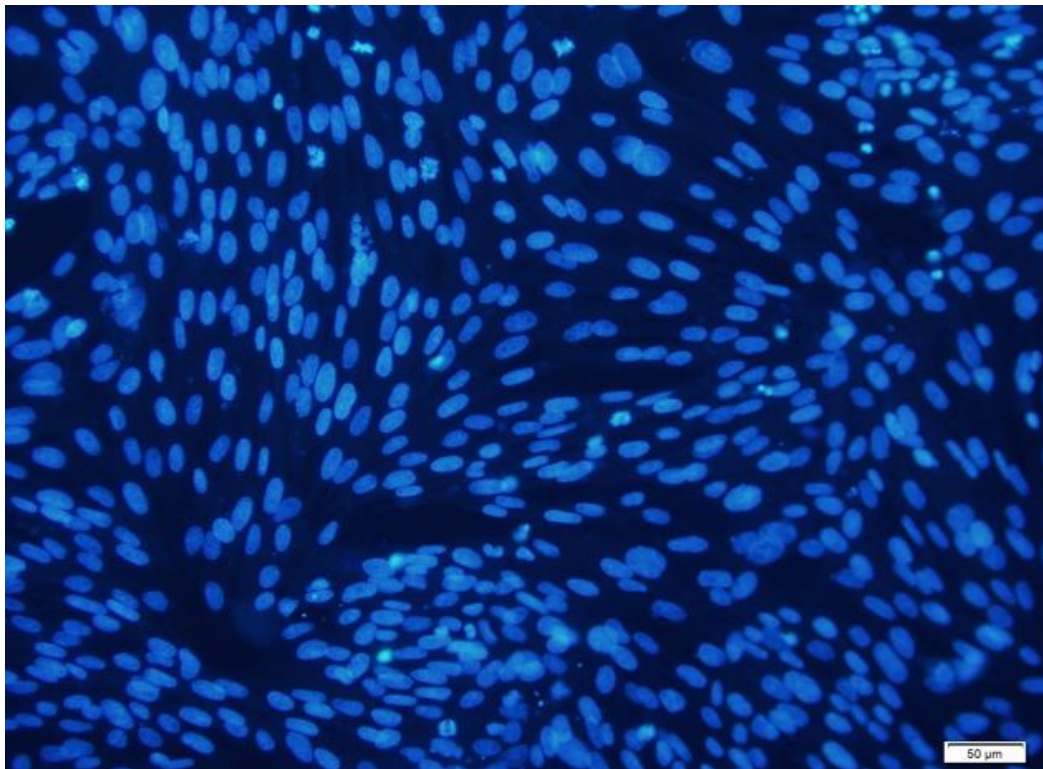
Template 1762 1743

และได้มีการทดลองทำโนเซลล์ไลน์บางส่วนได้แก่ T3 และทำการเปรียบเทียบกับ positive control คือ adult testis ได้ผลดังนี้ เซลล์ T3 พบการแสดงออกของยีน *Vimentin*, *CLU*, *OCLN*, *FSHR*, *GDNF*, *AR*, *LIF*, *EGF*, *FGF2* และ *KITLG* ดังภาพ

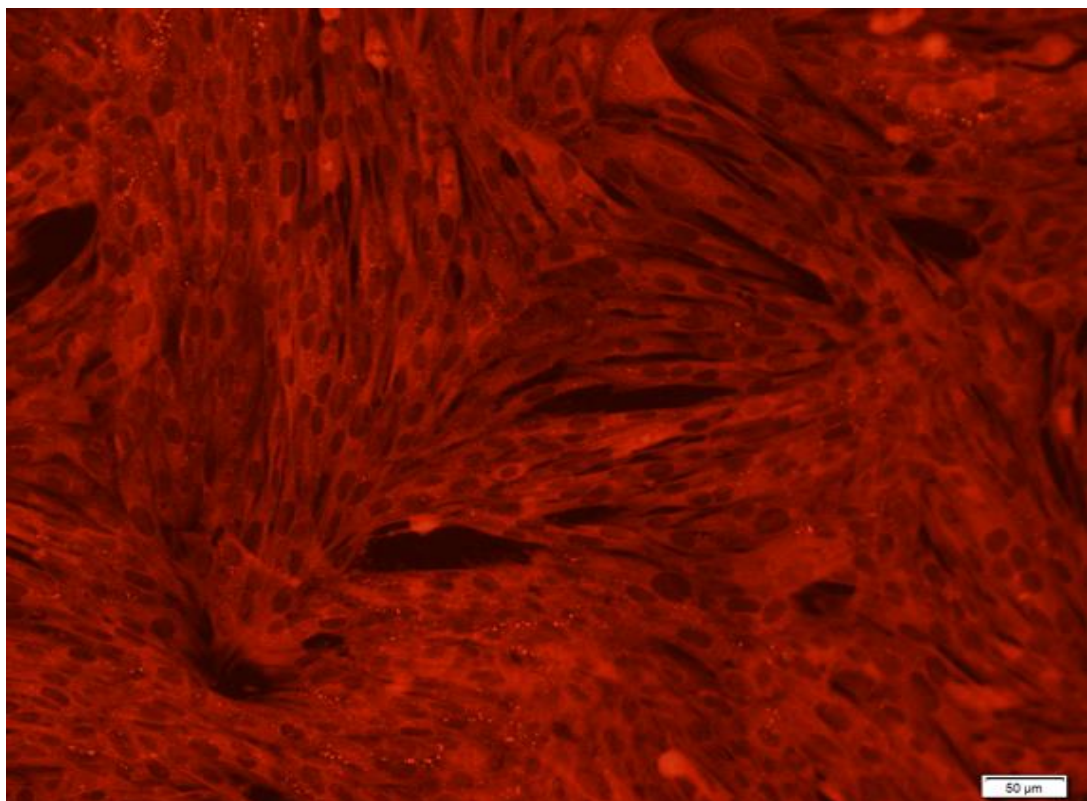
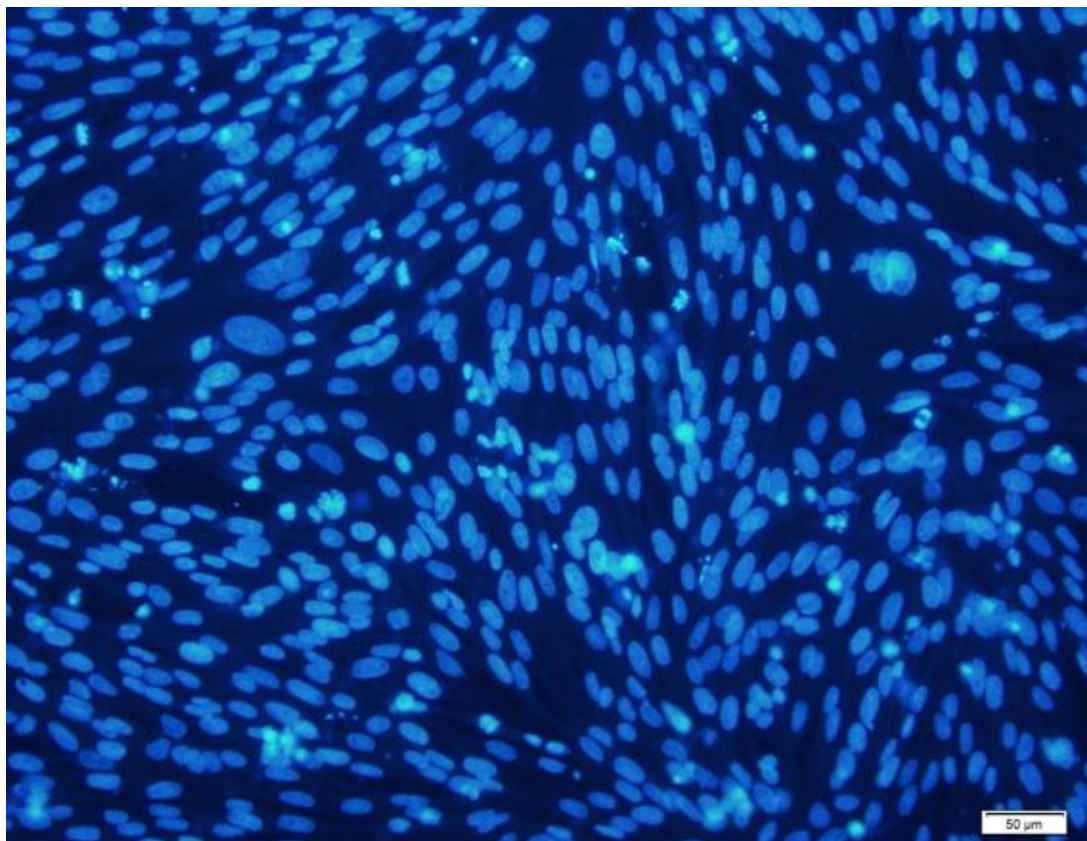


รูปที่ 5 แสดงการแสดงออกยีนต่างๆ ของเซลล์ไลน์ T3

- Immunolocalization ด้วย เทคนิค immunofluorescence ต่อ anti-vimentin ทำการย้อมสีเซลล์ Sertoli cell T3 และ T4



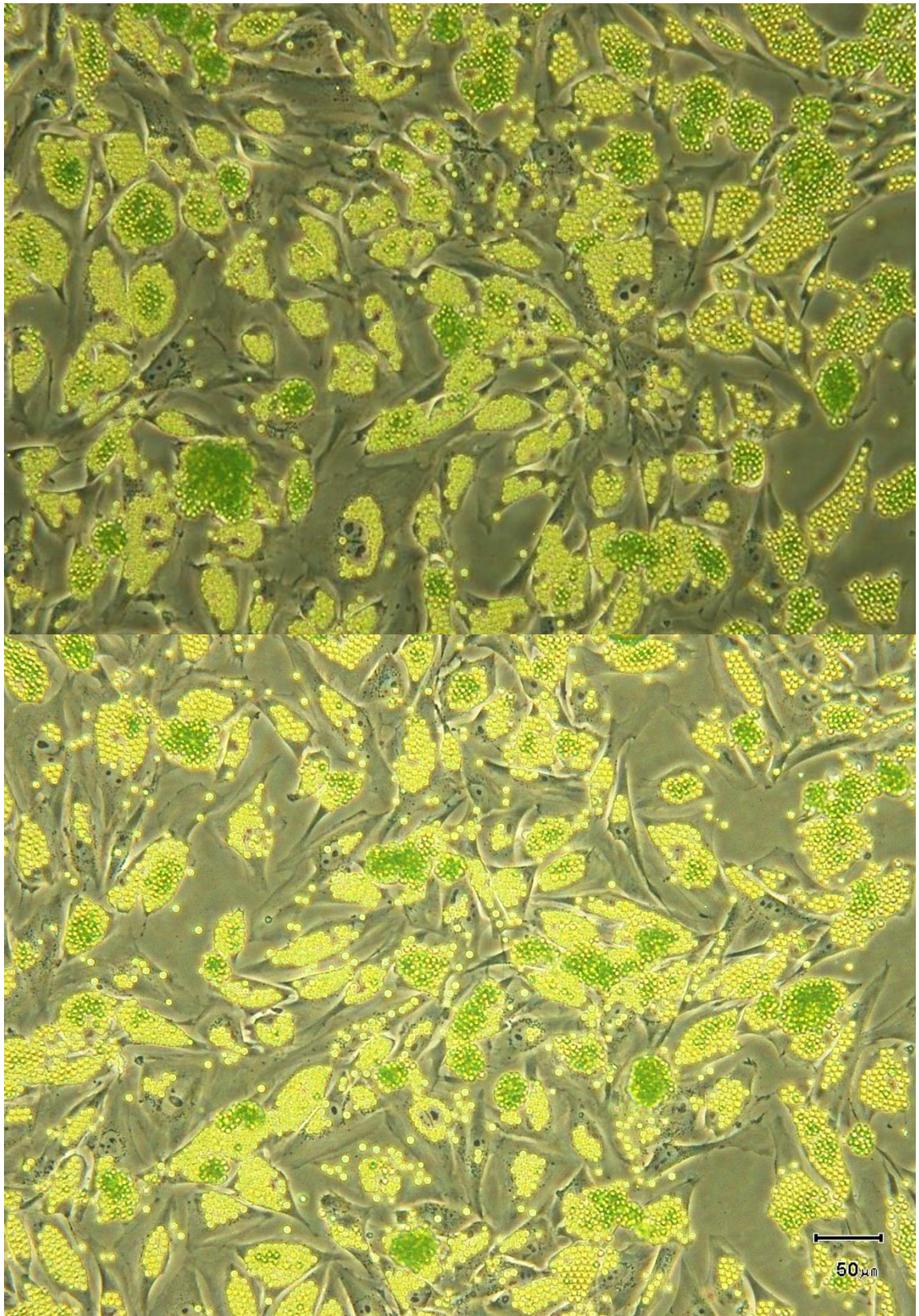
รูปที่ 6 แสดงการย้อมติดสี vimentin ของเซลล์ไลน์ T3



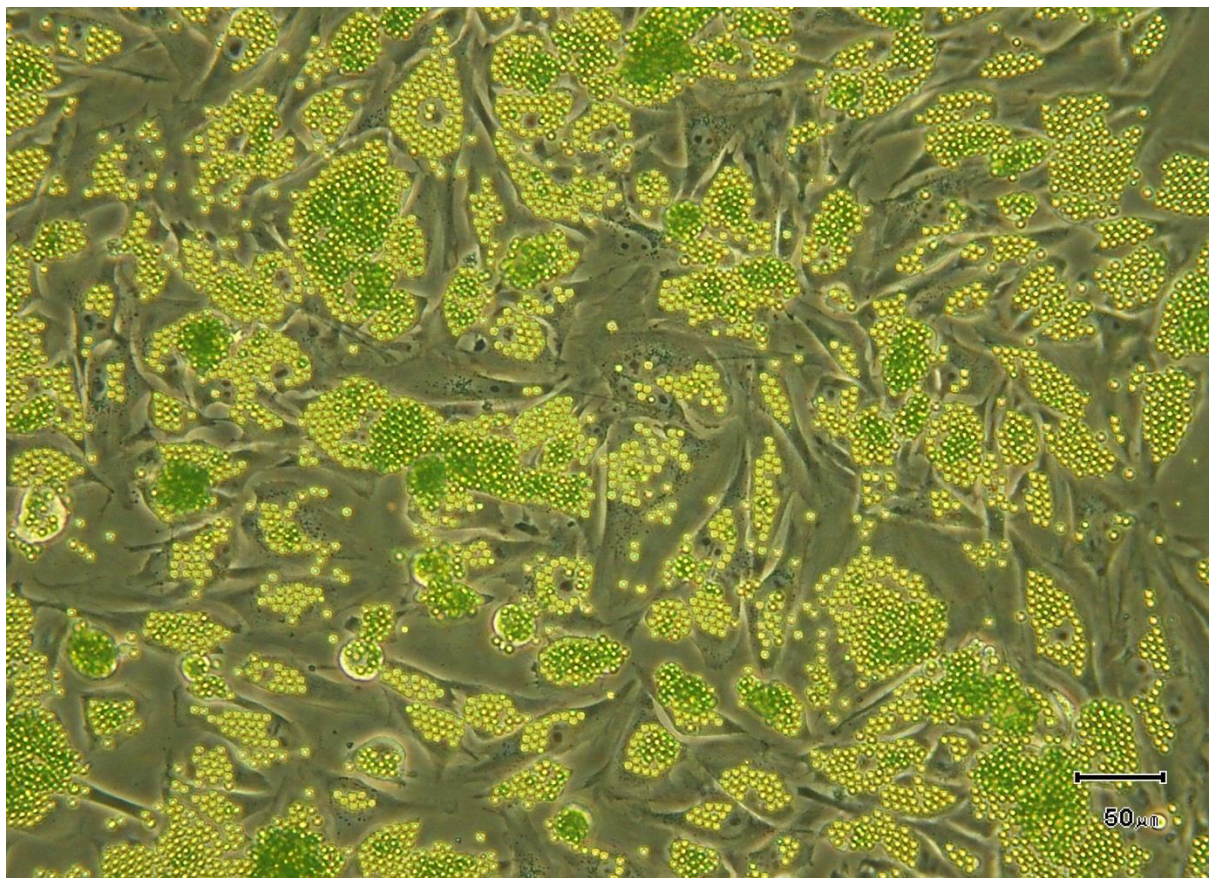
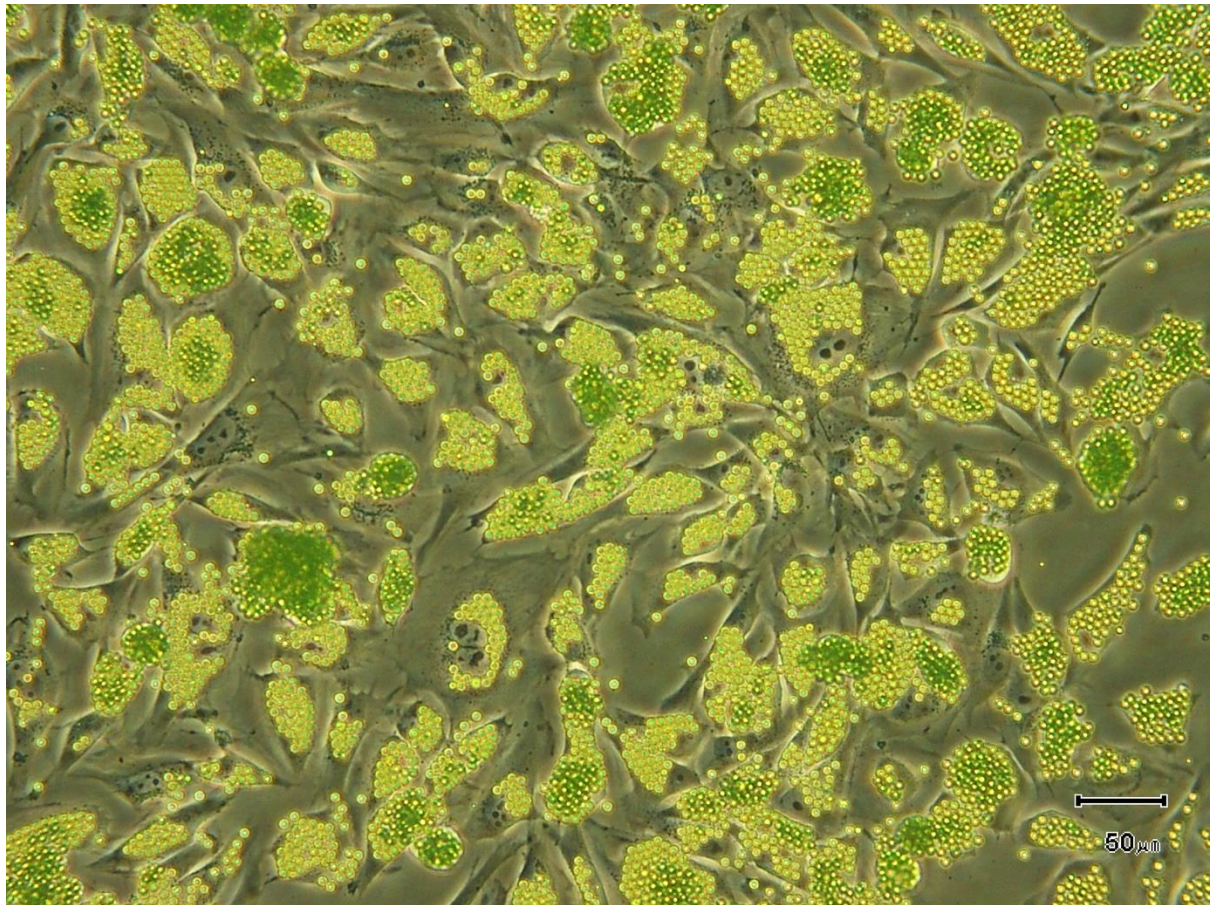
รูปที่ 7 แสดงการย้อมติดสี vimentin ของเซลล์ไลน์ T4

- การตรวจคุณสมบัติ phagocytic activity

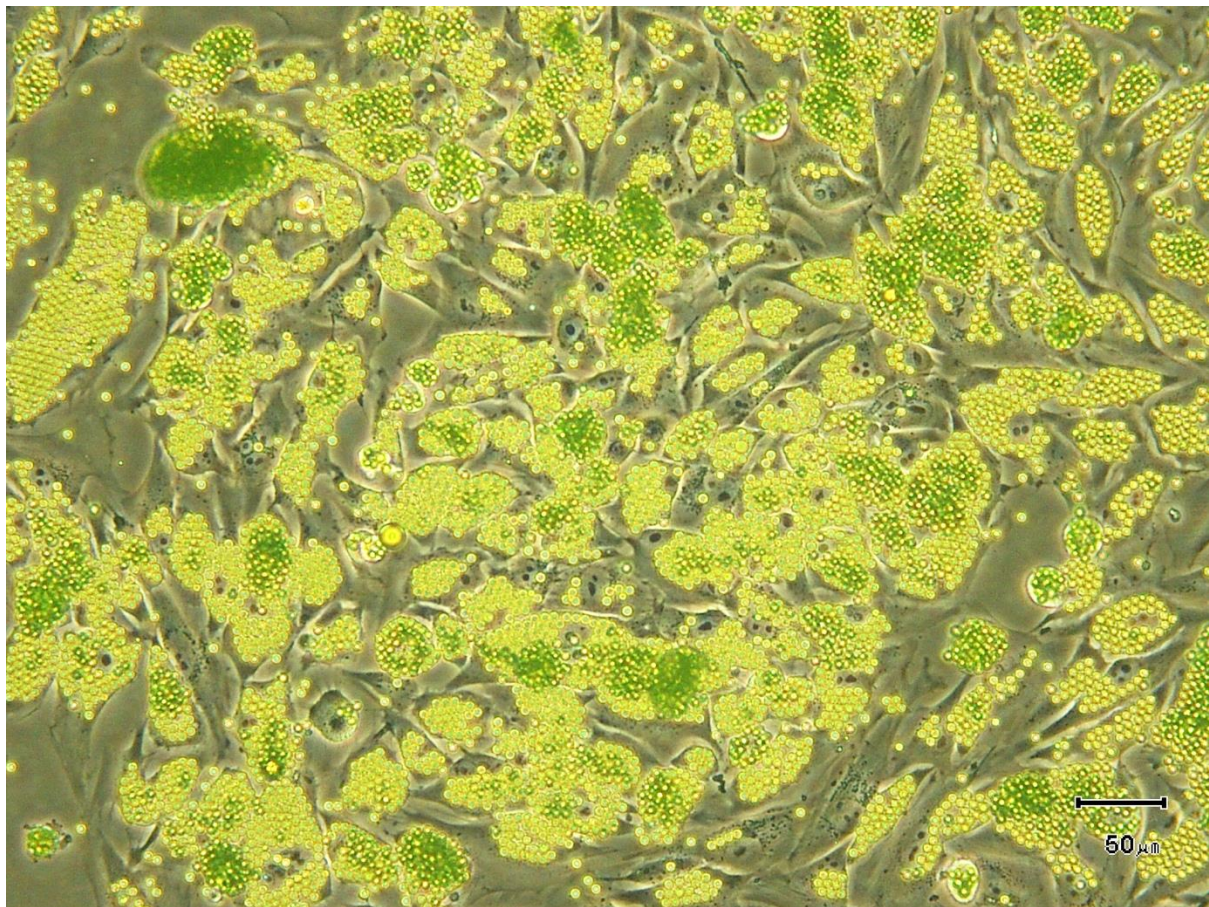
พบว่าเซลล์ไลน์ทั้งหมดที่ได้มีคุณสมบัติในการเก็บกิน fluorescent beads ได้ดี ดังรูป



รูปที่ 8 แสดงการเก็บกิน fluorescent beads ของเซลล์ไลน์ Neonatal และ 6SV40



รูปที่ 9 แสดงการเก็บกิน fluorescent beads ของเซลล์ไลน์ 7SV40 และ SVT



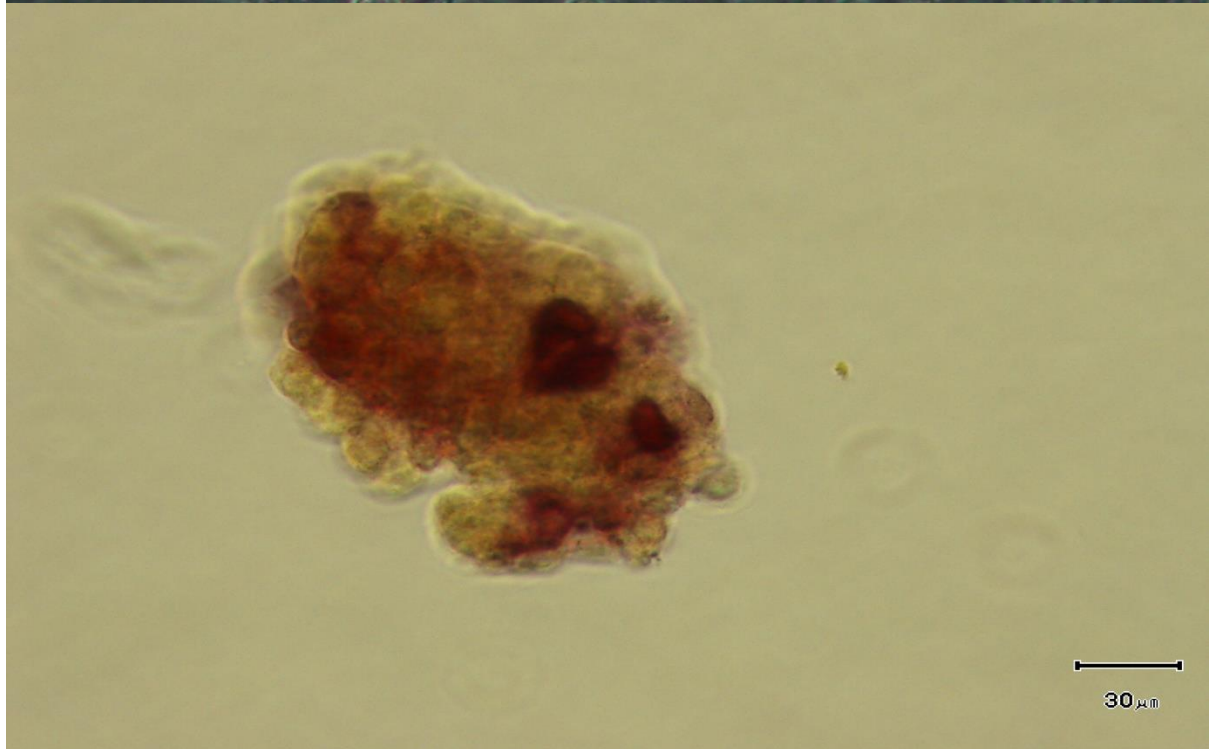
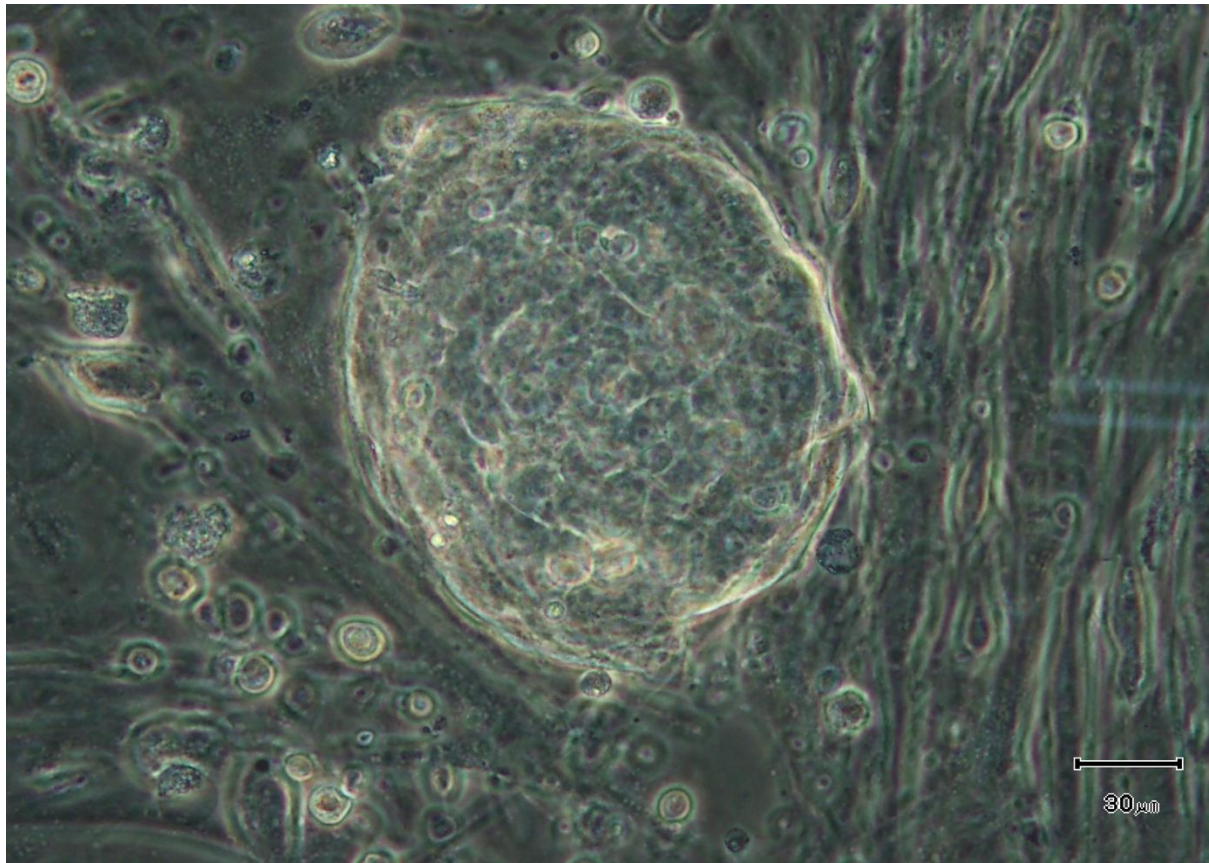
รูปที่ 10 แสดงการเก็บกิน fluorescent beads ของเซลล์ไลน์ T1

- Hormonal assay

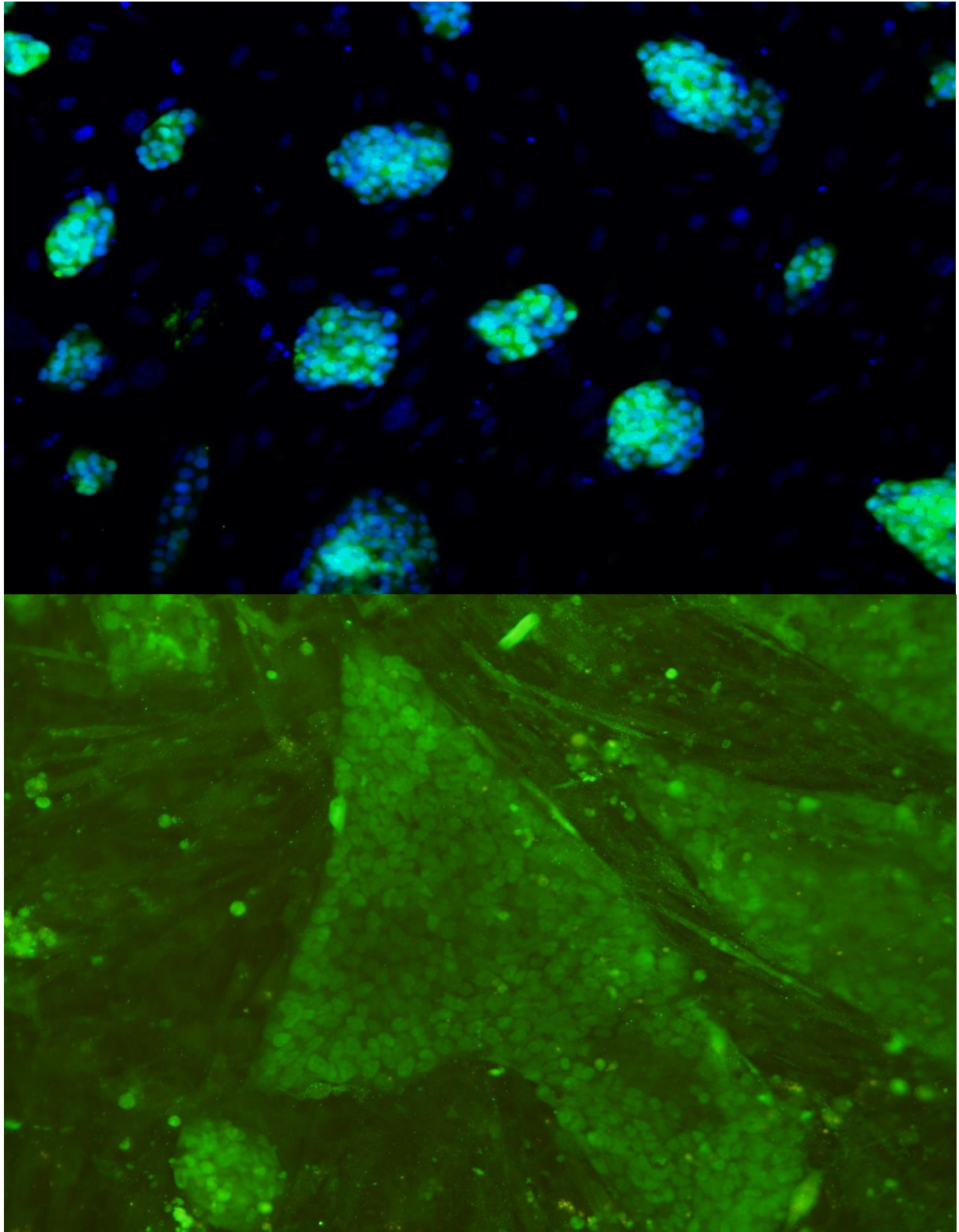
มีการตรวจวัดระดับปริมาณการสร้างฮอร์โมนเอสตราไดโอล (Estradiols) เมื่อทำการกระตุ้นด้วยการใส่ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) และ ฮอร์โมนรีคอมบิแนนท์ฮิวแมนเอฟเอสเอช (rhFSH) พบว่า สามารถสร้างปริมาณระดับฮอร์โมนเอสตราไดโอล ได้ 1.49 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

- การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดอินดิฟิวลิโพเท้นส์จากเซลล์ไลน์เซอโทลี (Sertoli cell derived induced pluripotent stem cell)

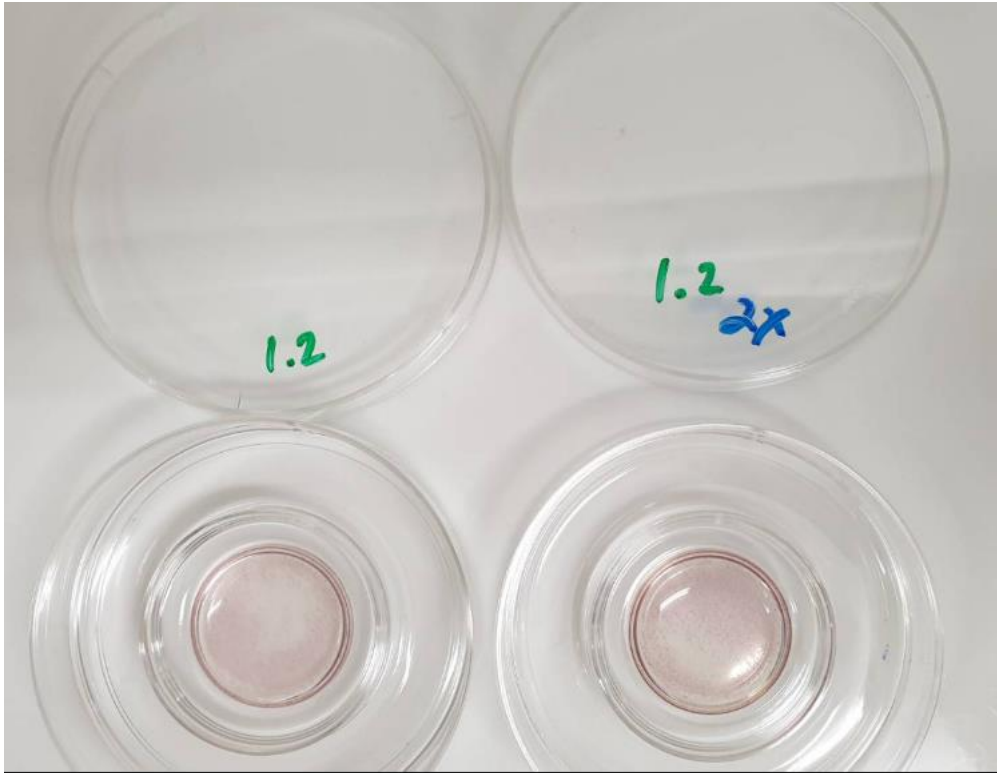
ในเบื้องต้นได้มีการทดสอบการเปลี่ยนแปลงเซลล์ให้เป็น เซลล์ต้นกำเนิดอินดิฟิวลิโพเท้นส์จากเซลล์ไลน์เซอโทลี ในเซลล์ไลน์ T3 ของ neonatal ได้ผลคือ ได้กลุ่มเซลล์ที่เป็น primary iPS cell ทั้งหมด 16 ไลน์ และมีการตรวจสอบคุณสมบัติบางไลน์ในเบื้องต้นด้วยการดูภาพ morphology, oct-4 staining และ alkaline phosphatase activity (pluripotent screening test) ได้ผลดังภาพ



รูปที่ 11 กลุ่มเซลล์ที่เป็นอินดิคัลเลอร์โพแทสเซียมจากเซลล์ไลน์เซอโทลี โดยมีลักษณะรูปร่างใกล้เคียงกับเซลล์ embryonic stem cell ซึ่งมีลักษณะมีขอบเขตชัดเจน โคโลนียกตัวขึ้น มีลักษณะหลายนิวเคลียสใน 1 นิวเคลียส (บน) และการย้อมติดสี alkaline phosphatase (แดง) ของกลุ่มเซลล์ที่มีการสุมขึ้นมา ทำการศึกษา



รูปที่ 12 กลุ่มเซลล์ที่เป็นอินดิคเตอร์โพเทนส์จากเซลล์ไลน์เซอโทลีมีการย้อมติดสี oct-4 (เขียว) ซึ่งจะพบ
การแสดงออกของโปรตีนนี้ในกลุ่มเซลล์ที่มีคุณสมบัติ pluripotency



รูปที่ 13 กลุ่มเซลล์ที่เป็นอินดิคเตอร์ของโปรตีน alkaline phosphatase (แดง) ซึ่งจะพบการแสดงออกของโปรตีนนี้ในกลุ่มเซลล์ที่มีคุณสมบัติ pluripotency

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ผลการดำเนินงานวิจัยในรอบ 1 ปี มีผลโดยสรุปดังนี้ มีการศึกษาอณูของแมวเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (อายุ 1-3 ปี) จำนวน 6 ตัว ได้ผลดังนี้ลักษณะทางจุลกายวิภาค พบว่าอณูมีกระบวนการ spermatogenesis ที่สมบูรณ์ ลักษณะทางจุลกายวิภาคเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน vimentin พบว่า vimentin จะมีการติดสีน้ำตาลเฉพาะบริเวณที่เป็น cytoplasm ของ Sertoli cell โดยไม่พบการ cross reaction กับเซลล์อื่นๆภายใน seminiferous tubule ทำการตัดย่อยอณูด้วยเอนไซม์ของแมวและสามารถแยกได้ single testicular cells ทั้ง 2 กลุ่ม และผ่านวิธีการ starvation technique ได้แมวก่อนเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (อายุ 3-6 เดือน) จำนวน 2 ตัว ได้เซลล์ไลน์ จำนวน 2 ไลน์ ได้แก่ T3 และ T4 และได้เซลล์ไลน์จากแมวเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ จำนวน 4 เซลล์ไลน์ จากวิธีการ transfection ด้วย SV40 (2 เซลล์ไลน์), TERT (1 เซลล์ไลน์) และ SV40+TERT (1 เซลล์ไลน์) ซึ่งเซลล์ ทั้งหมดได้รับการตรวจคุณสมบัติ ทั้งรูปร่างที่มีความคล้ายคลึงกับ primary Sertoli cell การแสดงออกของยีนและ mRNA ต่อยีนที่จำเพาะต่อเซลล์เซอร์โทลีทั้งในแง่โครงสร้างและการผลิตสารและฮอร์โมนสำคัญที่เป็นบวก และให้ผลลบ ต่อยีนและ mRNA ของเซลล์สืบพันธุ์และเซลล์เลย์ดิก (Leydig cell) รวมถึงมีการแสดงออกที่เป็นบวกต่อโปรตีน vimentin ซึ่งถือเป็นโปรตีนที่ค่อนข้างจำเพาะกับเซลล์เซอร์โทลี ในการตรวจสอบในด้านการทำงานพบว่าเซลล์ไลน์ที่ดีทั้งหมดให้ผลค่อนข้างดีคือ มีลักษณะของ phagocytic activity ที่ชัดเจน โดยการกินเม็ดสีเข้าไปเก็บในไซโตพลาสซึม และมีการผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ออกได้เมื่อทำการกระตุ้น

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. เผยแพร่ผลงานในฐานข้อมูลระดับนานาชาติ

Tiptanavattana, N., Tharasanit, T., Sato, Y. 2019. Functional activity of immortalized Sertoli cells derived from domestic cat (*Felis catus*). Thai J Vet Med; 49. 27-28.

2. มีการเผยแพร่ผลงานโปสเตอร์ในงานประชุมระดับนานาชาติ the 18th Chulalongkorn University Veterinary Conference (CUVC) 2019 (รหัส 04) หัวข้อ Functional activity of immortalized Sertoli cells derived from domestic cat (*Felis catus*)

3. เป็นส่วนหนึ่งของผลงานของนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในรายวิชา 314063 โครงการวิจัยปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561 เรื่อง effects of telomerase reverse transcriptase (TERT) and simian virus 40 (SV 40) gene transfer on proliferation activity of feline Sertoli cells และมีการเผยแพร่แบบปากเปล่าในงานประชุมระดับนานาชาติ the 18th Chulalongkorn University Veterinary Conference (CUVC) 2019 หัวข้อ Effects of telomerase reverse transcriptase (TERT) and simian virus 40 (SV 40) gene transfer on proliferation activity of feline Sertoli cells

4. มีการใส่ผลการศึกษาบางส่วนในเอกสารประกอบการเรียนการสอนเนื้อหาการศึกษาในระดับชั้นปริญญาตรีของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในรายวิชา 145-212 โครงสร้างและการทำงานของร่างกาย 3



ภาพงานสัมมนาของนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในรายวิชา 314063
โครงการวิจัยปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561

รางวัลการนำเสนอผลงานในที่ประชุมโครงการเสริมทักษะการวิจัย
รายวิชา 3140603 โครงการวิจัยปริญญาบัณฑิต (Senior Project)
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561

รางวัลที่ 1

กลุ่มที่ 22 ผลของการฝากถ่ายยีนส์ telomerase reverse transcriptase (TERT)
และ simian virus 40 (SV 40) ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์เซอร์ทอลีในแมว

รางวัลที่ 2 จำนวน 2 รางวัล

กลุ่มที่ 23 ความแม่นยำของวิธีการคัดกรองเบื้องต้นเพื่อวินิจฉัยโรคหัวใจในแมว

กลุ่มที่ 9 การสำรวจข้อมูลจำนวนประชากรและสาเหตุการทอดทิ้งสุนัขและแมวบนเกาะสีชัง

รางวัลที่ 3 จำนวน 2 รางวัล

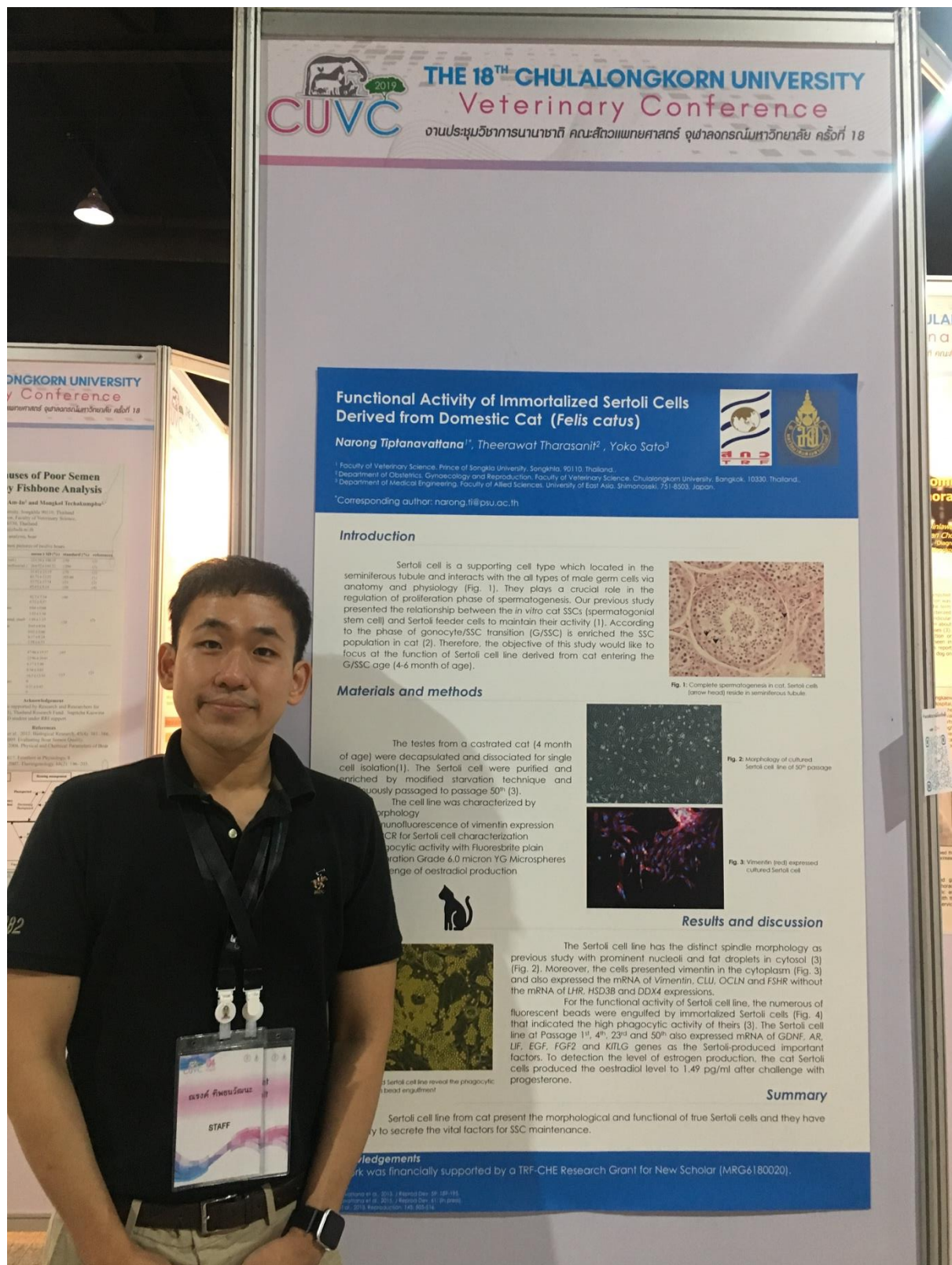
กลุ่มที่ 16 การศึกษาเบื้องต้นของโรคแท้งติดต่อในสัตว์เคี้ยวเอื้องบริเวณรอยต่อเขตอุทยาน
แห่งชาติในประเทศไทย

กลุ่มที่ 20 ผลของความหนาแน่นในสัณฐานในช่วงท้ายของการตั้งครรภ์ต่อระยะเวลาในการคลอด
น้ำหนักของลูกสุกรแรกคลอดและปริมาณน้ำนมเหลืองในแม่สุกร

*กลุ่มที่ได้รับรางวัลที่ 1 และ 2 ให้ไปนำเสนอที่งาน CUVC

**ทั้ง 5 กลุ่มให้ไปรับรางวัลที่งาน CUVC

ภาพรางวัลและกำหนดการการนำเสนอแบบปากเปล่าในงานประชุมระดับนานาชาติ the 18th
Chulalongkorn University Veterinary Conference (CUVC) 2019 หัวข้อ Effects of telomerase
reverse transcriptase (TERT) and simian virus 40 (SV 40) gene transfer on proliferation activity
of feline Sertoli cells



ภาพการเผยแพร่ผลงานโปสเตอร์ในงานประชุมระดับนานาชาติ the 18th Chulalongkorn University Veterinary Conference (CUVC) 2019 (รหัส 04) หัวข้อ Functional activity of immortalized Sertoli cells derived from domestic cat (*Felis catus*)



เวชสารสัตวแพทย์



The Thai Journal of Veterinary Medicine



ISSN 0125-6491

VOL. 49

SUPPLEMENT, 2019

Functional activity of immortalized Sertoli cells derived from domestic cat (*Felis catus*)

Narong Tiptanavattana^{1,*}, Theerawat Tharasanit², Yoko Sato³

¹Faculty of Veterinary Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand

²Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand,

³Department of Medical Engineering, Faculty of Allied Sciences, University of East Asia, Shimonoseki 751-8503, Japan

*Corresponding author: narong.ti@psu.ac.th

Keywords: cat, prepuberty, sertoli cell

Introduction

Sertoli cell is a supporting cell type which located in the seminiferous tubule and interacts with the all types of male germ cells via anatomy and physiology. They play a crucial role in the regulation of proliferation phase of spermatogenesis. Our previous study presented the relationship between the *in vitro* cat SSCs and Sertoli feeder cells to maintain their activity (1). According to the phase of gonocyte/SSC transition (G/SSC) is enriched the SSC population in cat (2). Therefore, the objective of this study would like to focus at the function of Sertoli cell line derived from cat entering the G/SSC age (4-6 month of age).

Materials and Methods

The testes from a castrated cat (4 month of age) were decapsulated and dissociated for single cell isolation by modified 2-step enzymatic digestion (1). The Sertoli cell were purified and enriched by modified starvation technique and continuously passaged to passage 50th (3). The cell line was characterized by morphology, immunofluorescence of anti-rat vimentin expression (1:200, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and related genes with RT-PCR. The functions of Sertoli cell line were observed by related genes with RT-PCR, phagocytic activity with Fluoresbrite plain Calibration Grade 6.0 micron YG Microspheres (2.6% Solids-latex; Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA) and oestradiol production of cultured medium with follitropin beta (Puregon®, Organon, The Netherlands) and progesterone (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) supplementation.

Results and Discussion

The Sertoli cell line has the distinct spindle morphology as previous study with prominent

nucleoli and fat droplets in cytosol (3) (Fig. 1A). Moreover, the cells presented vimentin in the cytoplasm (Fig. 1B) and also expressed the mRNA of Vimentin, CLU, OCLN and FSHR without the mRNA of LHR, HSD3B and DDX4 expressions.

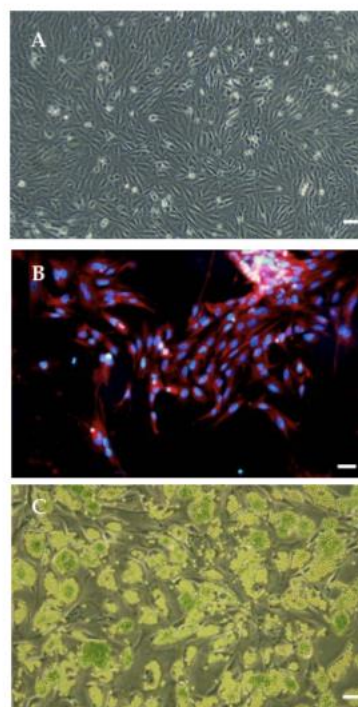


Figure 1 Characteristics of immortalized Sertoli cell in cat. The typical morphology of cat Sertoli cell was presented (A). The vimentin also was localized and indicated at intermediate filaments of the Sertoli cells (B). Phagocytic activity of Sertoli cell was presented by the fluorescent beads in cytoplasm (C). (Bar = 50 μm).

For the functional activity of Sertoli cell line, the numerous of fluorescent beads were engulfed by immortalized Sertoli cells (Fig. 1C) that indicated the high phagocytic activity of theirs (3). The Sertoli cell line at Passage 1st, 4th, 23rd and 50th also expressed mRNA of *GDNF*, *AR*, *LIF*, *EGF*, *FGF2* and *KITLG* genes as the Sertoli-produced important factors. To detection the level of estrogen production, the cat Sertoli cells produced the oestradiol level to 1.49 pg/ml after challenge with progesterone. In conclusion, this study demonstrated that the Sertoli cell line from cat at G/SSC age present the morphological and functional of true Sertoli cells and they have the ability to secrete the vital factors (e.g. *GDNF*, *FGF2*, *LIF*, *EGF*) for SSC maintenance. Therefore, our Sertoli cell line would be have advantageous useful for cat SSC culture or in-depth study of spermatogenesis.

Acknowledgements

This work was financially supported by a TRF-CHE Research Grant for New Scholar (MRG6180020).

References

1. Tiptanavattana et al., 2013. J Reprod Dev. 59: 189-195.
2. Tiptanavattana et al., 2015. J Reprod Dev. 61: (in press).
3. Sato et al., 2013. Reproduction. 145: 505-516.

Functional Activity of Immortalized Sertoli Cells Derived from Domestic Cat (*Felis catus*)

Narong Tiptanavattana^{1*}, Theerawat Tharasanit², Yoko Sato³

¹ Faculty of Veterinary Science, Prince of Songkla University, Songkhla, 90110, Thailand.,

² Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.,

³ Department of Medical Engineering, Faculty of Allied Sciences, University of East Asia, Shimonoseki, 751-8503, Japan.

*Corresponding author: narong.ti@psu.ac.th



Introduction

Sertoli cell is a supporting cell type which located in the seminiferous tubule and interacts with the all types of male germ cells via anatomy and physiology (Fig. 1). They plays a crucial role in the regulation of proliferation phase of spermatogenesis. Our previous study presented the relationship between the *in vitro* cat SSCs (spermatogonial stem cell) and Sertoli feeder cells to maintain their activity (1). According to the phase of gonocyte/SSC transition (G/SSC) is enriched the SSC population in cat (2). Therefore, the objective of this study would like to focus at the function of Sertoli cell line derived from cat entering the G/SSC age (4-6 month of age).

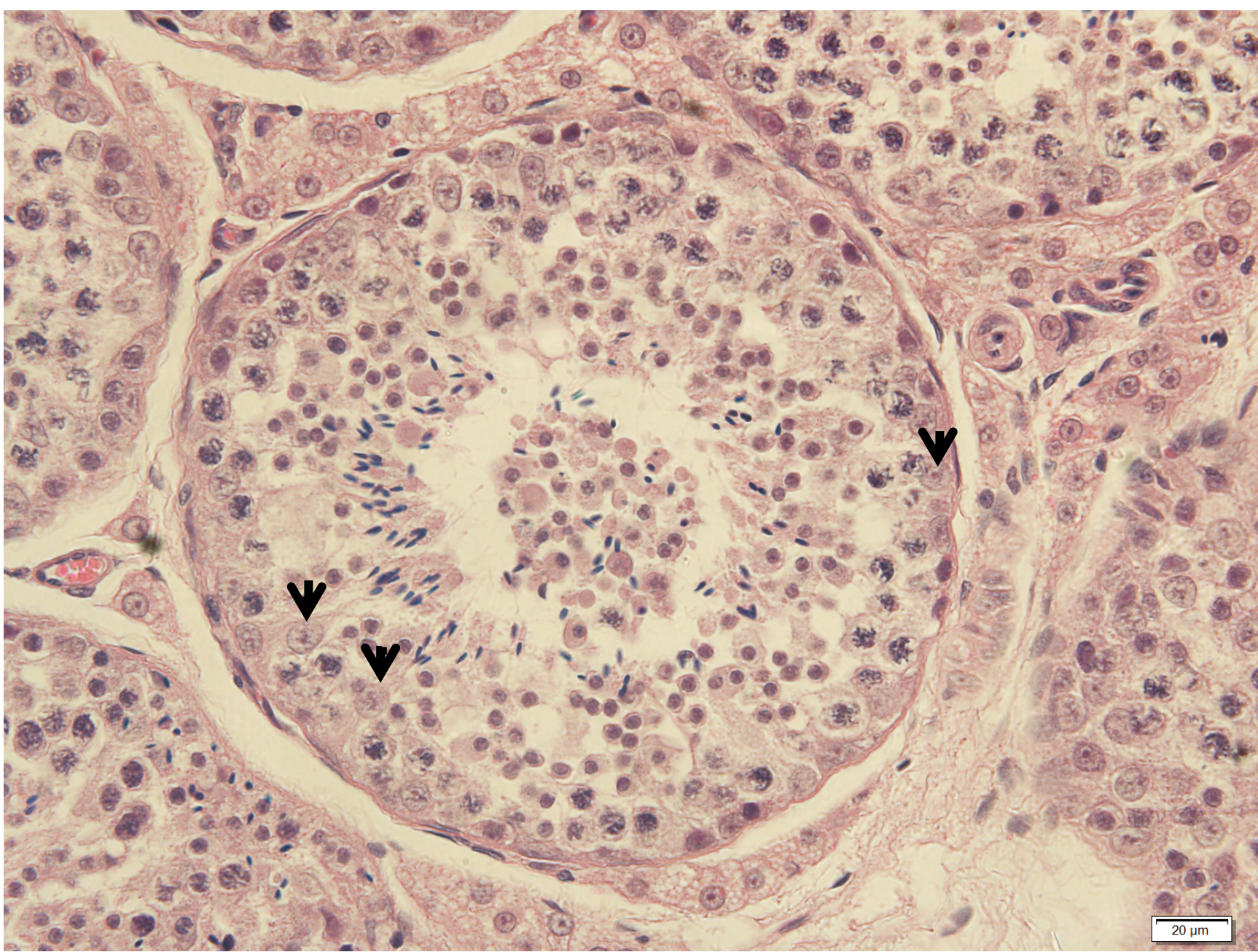


Fig. 1: Complete spermatogenesis in cat, Sertoli cells (arrow head) reside in seminiferous tubule.

Materials and methods

The testes from a castrated cat (4 month of age) were decapsulated and dissociated for single cell isolation(1). The Sertoli cell were purified and enriched by modified starvation technique and continuously passaged to passage 50th (3).

The cell line was characterized by

- Morphology
- Immunofluorescence of vimentin expression
- RT-PCR for Sertoli cell characterization
- Phagocytic activity with Fluoresbrite plain Calibration Grade 6.0 micron YG Microspheres
- Challenge of oestradiol production

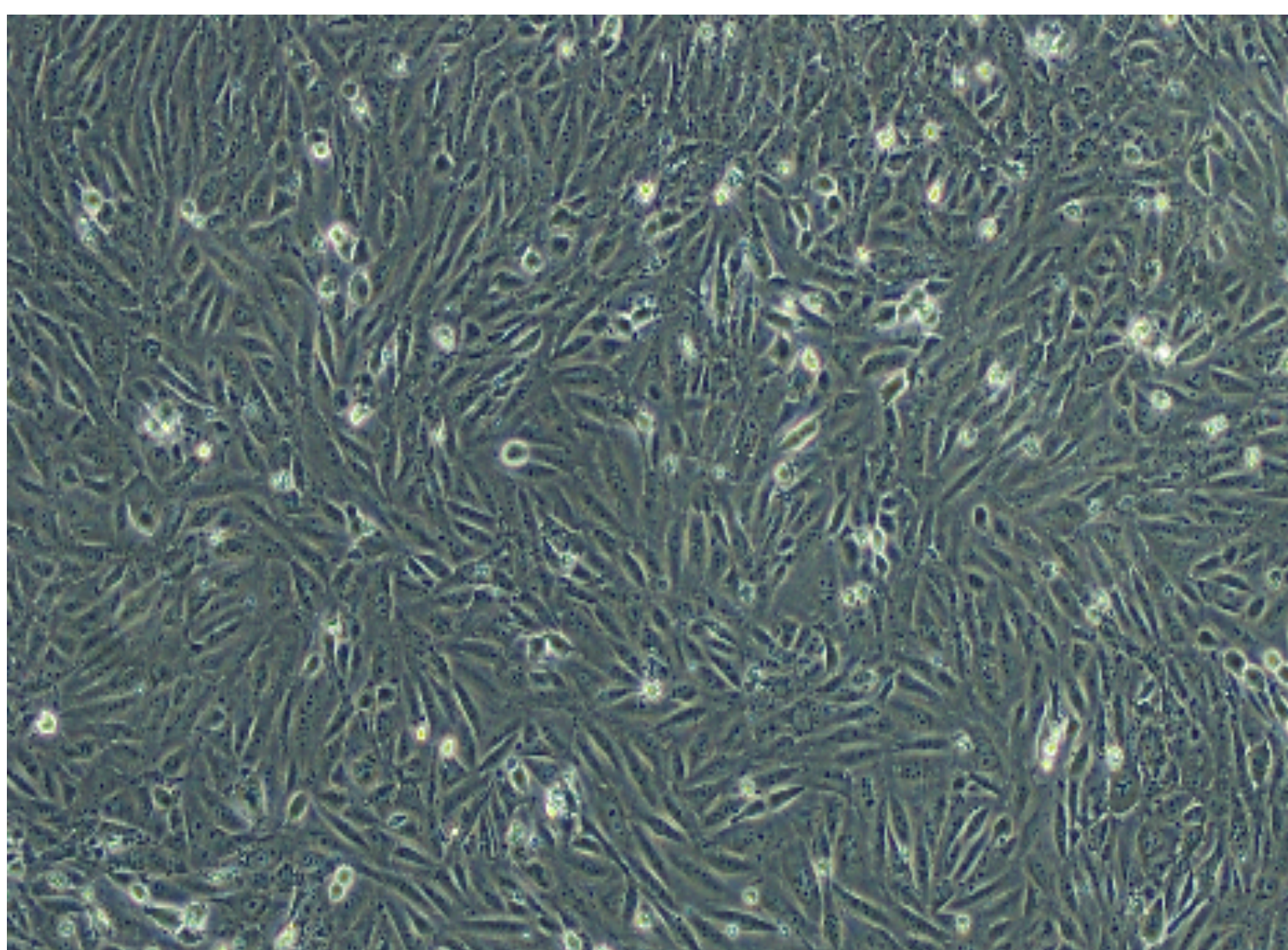
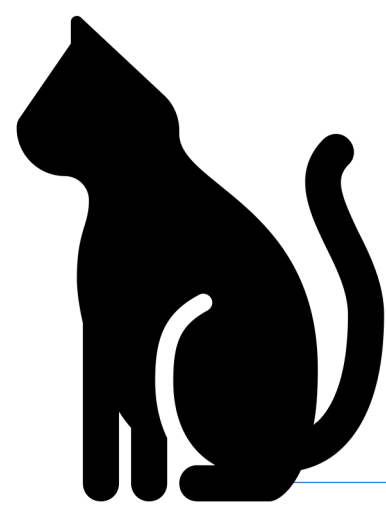


Fig. 2: Morphology of cultured Sertoli cell line of 50th passage

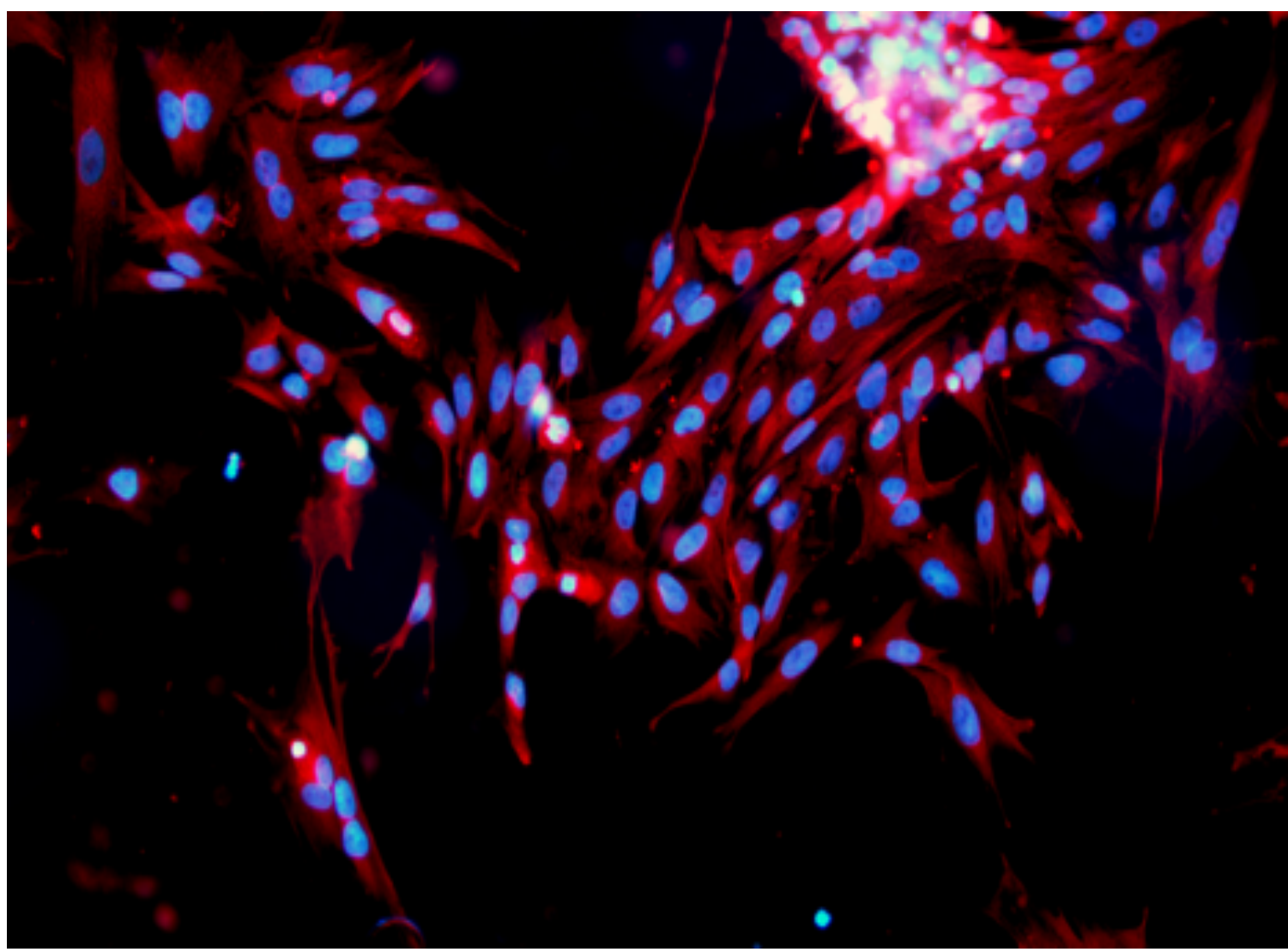


Fig. 3: Vimentin (red) expressed cultured Sertoli cell

Results and discussion

The Sertoli cell line has the distinct spindle morphology as previous study with prominent nucleoli and fat droplets in cytosol (3) (Fig. 2). Moreover, the cells presented vimentin in the cytoplasm (Fig. 3) and also expressed the mRNA of *Vimentin*, *CLU*, *OCLN* and *FSHR* without the mRNA of *LHR*, *HSD3B* and *DDX4* expressions.

For the functional activity of Sertoli cell line, the numerous of fluorescent beads were engulfed by immortalized Sertoli cells (Fig. 4) that indicated the high phagocytic activity of theirs (3). The Sertoli cell line at Passage 1st, 4th, 23rd and 50th also expressed mRNA of *GDNF*, *AR*, *LIF*, *EGF*, *FGF2* and *KITLG* genes as the Sertoli-produced important factors. To detection the level of estrogen production, the cat Sertoli cells produced the oestradiol level to 1.49 pg/ml after challenge with progesterone.

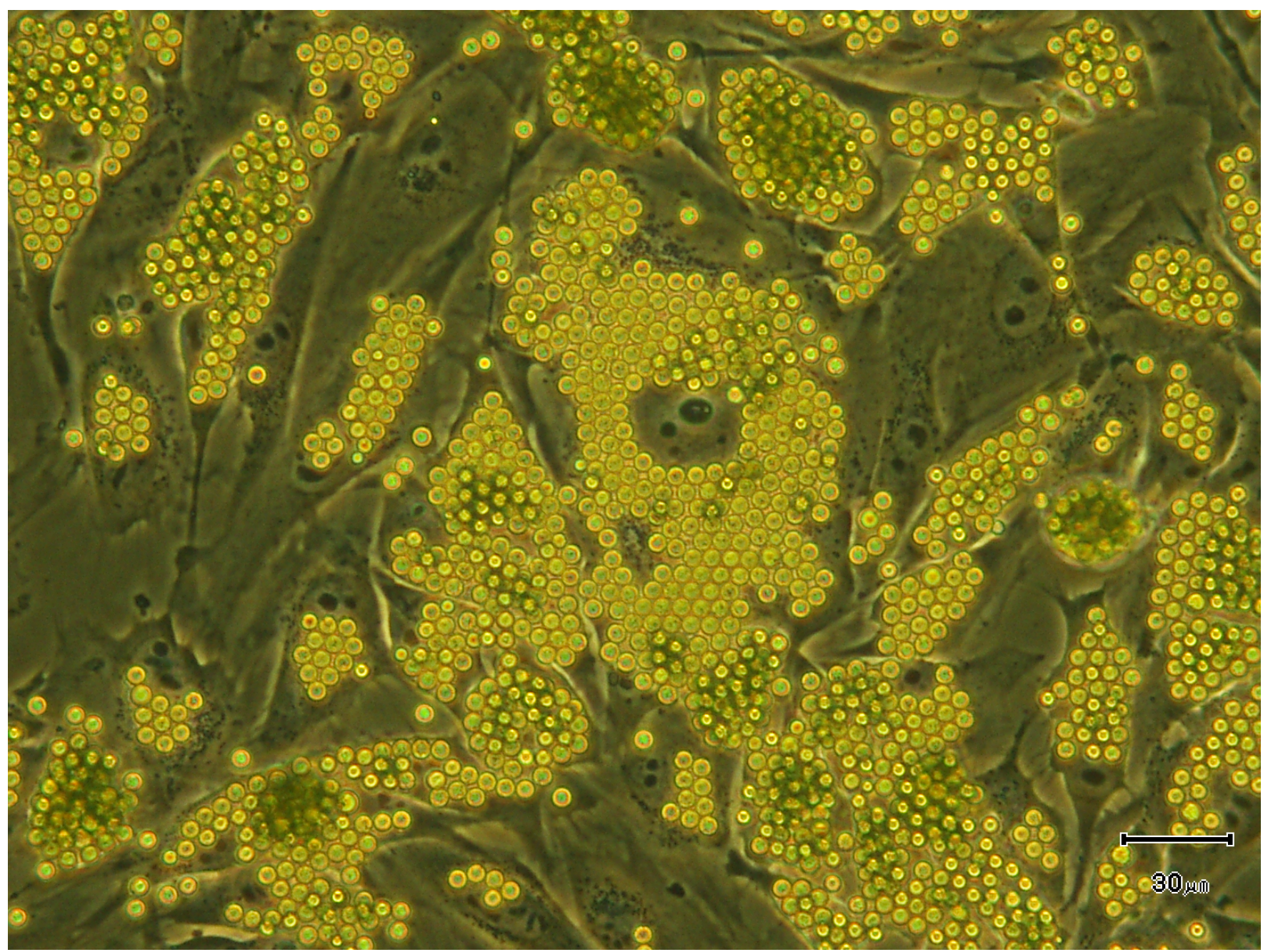


Fig. 4: Immortalized Sertoli cell line reveal the phagocytic activity with bead engulfment

Summary

Sertoli cell line from cat present the morphological and functional of true Sertoli cells and they have the ability to secrete the vital factors for SSC maintenance.

Acknowledgements

This work was financially supported by a TRF-CHE Research Grant for New Scholar (MRG6180020).

References

1. Tiptanavattana et al., 2013. J Reprod Dev. 59: 189-195.
2. Tiptanavattana et al., 2015. J Reprod Dev. 61: (in press).
3. Sato et al., 2013. Reproduction. 145: 505-516.