



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การตรวจหาเซลล์มีฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ (ELH), กระตุ้นการเจริญเติบโต (GH), และฮอร์โมนคล้ายอินซูลิน (In) ในเชิงปริมาณและคุณภาพ ในระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์ของหอยเป่าชื่อ *Halotis asinina* (Linnaeus)

Immunolocalization of Egg-laying Hormone (ELH), Growth Hormone (GH) and Insulin-Liked Hormone (InH) in the Neural Ganglia and Reproductive Organs of *Halotis asinina* (Linnaeus)

โดย ผศ.ดร.พรจันทร์ สายทองดี

ธันวาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

โครงการ การตรวจหาเซลล์มีฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ (ELH), กระตุ้นการเจริญเติบโต (GH), และฮอร์โมนคล้ายอินซูลิน (In) ในเชิงปริมาณและคุณภาพ ในระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์ของหอยเป่าชื่อ *Halotis asinina* (Linnaeus)

ผู้วิจัย

ผศ.ดร.พรจันทร์ สายทองดี

สังกัด

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

การตรวจหาเซลล์และการกระจายของเซลล์ที่มี egg-laying hormone (ELH) growth hormone (GH) และ insulin-like hormone (InH) ในปมประสาท (cerebral (CG) pleuropedal (PG) และ visceral (VG)) และอวัยวะสืบพันธุ์ (รังไข่และอัณฑะ) ของหอยเป่าชื่อ *Haliotis asinina* (Linnaeus) โดยใช้เทคนิค immunohistochemistry แบบ immunoperoxidase ผลการทดลอง พบเซลล์ที่มี ELH และ GH ในปมประสาท CG PG และ VG ขณะที่พบเซลล์ที่มี InH เฉพาะในปมประสาท PG เท่านั้น ลักษณะของเซลล์ที่มีฮอร์โมนเหล่านี้จัดเป็น neurosecretory cells (NS) ที่มี eccentric nuclei และมี granules จำนวนมากใน cytoplasm เซลล์ประสาทที่ย้อมติดสี มีทั้งชนิด NS1 และ NS2 ซึ่งเซลล์ชนิดที่ 1 มีขนาดใหญ่และมี euchromatic nucleus ที่มี nucleolus เต็ม ส่วนเซลล์ชนิดที่ 2 มีขนาดเล็กกว่าและมี heterochromatin หนาที่ขอบของ nucleus ขนาดของเซลล์ที่มี ELH เฉลี่ยประมาณ $9 \times 15 \mu\text{m}$ เซลล์ที่มี GH มีขนาดเฉลี่ย $9 \times 11 \mu\text{m}$ ส่วนเซลล์ที่มี InH มีขนาดประมาณ $10 \times 14 \mu\text{m}$ การกระจายของเซลล์พบว่า ในปมประสาท CG มีเซลล์ที่มี ELH จำนวนมากบริเวณขอบด้านข้างตอนบนและขอบด้านในตอนล่าง ขณะที่ในปมประสาท PG มีเซลล์เหล่านี้ที่ขอบด้านในและด้านข้างของ dorsal horn ที่ขอบด้านข้างของ ventral horn และที่ขอบบนของ body ซึ่งเป็นรอยต่อระหว่าง horn ข้างซ้ายและขวาของปมประสาท PG ส่วนในปมประสาท VG จะพบเซลล์ที่มี ELH อยู่ที่ขอบล่าง เซลล์ที่มี GH ในปมประสาท CG พบมีจำนวนมากที่ขอบด้านในของปมประสาท ส่วนในปมประสาท PG พบที่ขอบด้านข้างของ ventral horn และที่ขอบบนของ body ส่วนเซลล์ที่มี InH มีจำนวนน้อยมากโดยพบที่ขอบด้านข้างส่วนล่างของ dorsal horn ของปมประสาท PG นอกจากนี้พบ immunoreactivity ต่อ InH ในแขนงประสาทที่บริเวณ medulla ของปมประสาท CG และ PG ด้วย ในการศึกษาปริมาณเซลล์ พบเซลล์ที่มี ELH มีจำนวนมากที่สุดในปมประสาท PG (เฉลี่ย 530 / 4760 เซลล์ต่อ section) รองลงมาในปมประสาท CG (เฉลี่ย 266 / 1386 เซลล์ต่อ section) และ VG (เฉลี่ย 33 / 175 เซลล์ต่อ section) ตามลำดับ เซลล์ที่มี GH ในปมประสาท CG (เฉลี่ย 130 / 1362 เซลล์ต่อ section) มีจำนวนมากกว่าของปมประสาท PG (เฉลี่ย 116 / 4677 เซลล์ต่อ section) ส่วนเซลล์ที่มี InH พบจำนวนน้อยมาก อยู่ในปมประสาท PG (เฉลี่ย 3 / 4,500 เซลล์ต่อ section) ในการตรวจหาเซลล์ที่ย้อมติดสีในอวัยวะสืบพันธุ์ พบ ELH ในเซลล์ไข่ระยะปลาย (mature oocytes) ในเซลล์บริเวณ trabecula และ capsule ของรังไข่และอัณฑะ นอกจากนี้พบ GH ในเซลล์ไข่ระยะต้น (oocytes stage 1 และ 2) ในเซลล์บริเวณ trabecula และ capsule ของรังไข่และอัณฑะ จากผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า 1) เซลล์ประสาท ที่มี ELH, GH และ InH เป็น NS1 และ NS2 2) เซลล์ของปมประสาท PG CG และ VG อาจเป็นแหล่งผลิต ELH ขณะที่ CG และ PG อาจเป็นแหล่งผลิต GH ด้วย 3) เซลล์ของปมประสาท PG อาจเป็นแหล่งหนึ่งของ InH 4) เซลล์ในรังไข่และอัณฑะอาจเป็นทั้งอวัยวะเป้าหมายและแหล่งผลิตของ ELH และ GH

Abstract

Immunohistochemistry was used to localize the distribution and investigate the characteristics of egg-laying hormone (ELH), growth hormone (GH), and insulin-like hormone (InH) containing neurons in the neural ganglia (cerebral (CG), pleuropedal (PG) and visceral ganglia (VG)) and the gonad (ovary and testis) of a tropical abalone, *Haliotis asinina* (Linnaeus). The ELH-immunoreactive neurons were localized in CG, PG and VG, and in the ovary and testis. The immunoreactive-GH neurons were localized in all three ganglia whilst the immunoreactive InH neurons were scarcely detected only in the PG. All labelled neurons had eccentric nuclei and contained numerous granules in their cytoplasm. The larger cell, ovoidshaped nuclei with mostly euchromatin and the smaller cell, round-shepe nuclei with mostly patches of heterochromatin at the rim, are classified as NS1 and NS2, respectively. The average size of ELH, GH, and InH-containing neurons are 9x15 μm , 9x11 μm , and 10x14 μm , respectively. The intense ELH- immunoreactive cells concentrated in the upper lateral edge and lower medial edge of CG, the medial and lateral edge of dorsal horn, the lateral edge of ventral horn and the upper edge of body connecting between the right-left horns of PG, and the lower medial edge of VG. The intense GH-immunoreactive cells concentrated in the medial edge of CG, the lateral edge of ventral horn and the upper edge of the body of PG, and mild GH-immunoreactivity cells were detected in the lower edge of VG. Few intense InH-immunoreactive cells were localized only in the upper lateral edge of PG whereas intense InH immunoreactivity was prominently detected in the neuropils of CG and PG. The ELH-containing cells were most numerous in the PG (about 530 / 4760 cells/ section) than in the CG (about 266/ 1386 cells/ section), while they were least numerous in the VG (about 33/175 cells/ section). The number of GH-containing cells were more numerous in the CG (about 130/1362 cells/ section) than in the PG (about 116/4677 cells/ section) and VG (about 15/186 cells/ section). In the ovary and testes, the ELH-immunoreactivity could be detected in the mature oocytes, primary spermatocytes, the cells within the capsule, and the granular and follicular cells in the trabeculae whilst the GH-immunoreactivity could be detected in early stage oocytes and cells in the trabeculae. The results indicate that: 1) the ELH, GH, and InH –containing cells are the neurosecretory cells. 2) the cerebral, pleuropedal and visceral ganglia may be the main sources of ELH-producing cells whereas the cerebral and pleuropedal ganglia may also be the sources of GH- producing cells. 3) pleuropedal ganglion may be one of the sources of InH-producing cells. 4) the cells of ovary and testes also have ELH and GH wherein some may be produced locally by gonadal ELH and GH-cells, respectively.

Key words: abalone, neural ganglia, gonad, egg-laying hormone, growth hormone, insulin-like hormone

เนื้อหางานวิจัย

หอยเป่าฮือเป็นสัตว์ทะเลที่เจริญเติบโตช้าและการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์จนพร้อมหลังของเพศผู้และเมีย มักมีช่วงเวลาไม่ตรงกัน ทำให้ต้องศึกษาเซลล์ที่คาดว่าจะมีหน้าที่สร้างและหลั่งฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮือ *Halotis asinina* (Linnaeus) ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเจริญเติบโตได้แก่ Growth hormone (GH) และ Insulin-like hormone (InH) และฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ และการหลั่งเซลล์สืบพันธุ์ ได้แก่ egg-laying hormone (ELH) ดังนั้นจึงได้ดำเนินการตรวจหาฮอร์โมน GH, InH และ aELH ในเซลล์ของเนื้อเยื่อระบบประสาท และระบบสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮือ

การตรวจหาเซลล์และการกระจายของเซลล์ที่มี ELH GH และ InH ในระบบประสาทได้แก่ปมประสาท cerebral ,pleuropedal และ visceral และในระบบสืบพันธุ์ได้แก่ รังไข่และอวัยวะ ของหอยเป่าฮือ *H. asinina* ใช้เทคนิค immunohistochemistry แบบ immunoperoxidase (Biotin-Streptavidin Complex) ระดับจุลทรรศน์ธรรมดา (แทนแผนการเดิมที่ใช้เทคนิคแบบ fluorescent ซึ่งพบว่ามี autofluorescent รบกวนมาก เป็นอุปสรรคทำให้แยกเซลล์ที่ย้อมติดได้ยาก ส่วนเทคนิคแบบ peroxidase anti-peroxidase ที่กำหนดไว้ในแผน พบว่าไม่สามารถแสดงรูปร่างเซลล์ที่ย้อมติดให้เห็นชัดเจนได้)

วิธีการทดลอง

นำเนื้อเยื่อปมประสาท cerebral pleuropedal และ visceral และอวัยวะสืบพันธุ์ ได้แก่ รังไข่และอวัยวะ แช่ใน Bouin's fixative หลังจาก dehydration แล้ว นำตัวอย่างมาฝังใน paraffin จากนั้นนำตัวอย่างมาตัด section ให้มีความหนาประมาณ 5 μm นำ sections วางบน slide แล้วย้อมแบบ immunoperoxidase (Biotin-streptavidin complex) เนื้อเยื่อจะถูกห้าม endogenous peroxidase โดยการแช่ใน H_2O_2 และถูกห้าม nonspecific absorption ต่อ antibody ด้วยการแช่ใน normal goat serum และ bovine serum albumin หลังจากนั้นแช่ใน primary antibodies ได้แก่ polyclonal mouse anti-aELH, polyclonal rabbit anti-GH และ monoclonal mouse anti-InH antibodies แล้วใช้ goat anti-rabbit หรือ goat anti-mouse IgG ที่ถูก conjugated ด้วย biotin เป็น secondary antibody แล้วนำไปจับกับ streptavidin-HRP ต่อมาตรวจหาเซลล์ที่ถูกติดฉลากโดยใช้ hydrogen peroxide และ NovaRED solution เป็น substrate จากเทคนิคนี้ เซลล์ (เช่นเซลล์ประสาทที่มี secretory granules) ที่จำเพาะต่อ antibody probes จะติดสีแดง และตามด้วยการย้อมแสดงโครงสร้างเซลล์ด้วย hematoxylin จากนั้นนำ slide ที่ย้อมไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

ในกลุ่มคอนโทรล มีขั้นตอนย้อมเหมือนกัน ยกเว้นแทนที่ primary antibodies ด้วย preimmune serum หรือ blocking solution ซึ่งเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาไม่พบการติดสีแดงในเซลล์

ผลการทดลอง

ระบบประสาท: anti-aELH

ปมประสาท Cerebral

เมื่อ sections ของเนื้อเยื่อปมประสาท Cerebral ย้อมด้วย anti-aELH พบว่าเซลล์ในชั้น cortex แสดงการติดสีแดง (ภาพที่ 1c, d) โดยเซลล์ย้อมติดสีส่วนใหญ่มีการกระจายในปมประสาทอยู่บริเวณขอบด้านข้างตอนบน และขอบด้านในตอนบนล่างของปมประสาท ซึ่งสามารถจำแนกชนิดเซลล์ที่ติดสีออกได้เป็น 2 ชนิดคือ neurosecretory cell type 1 (NS1) และ neurosecretory cell type 2 (NS2) (ภาพที่ 1 e, f) โดย NS1 เป็นเซลล์รูปไข่หรือปิรามิด ขนาดเฉลี่ย $9 \times 16 \mu\text{m}$ มี eccentric euchromatic nucleus รูปไข่ที่มี nucleolus เด่น และมีกลุ่มของ granule เล็ก ๆ ที่ย้อมติดสีแดงมีจำนวนมากใน cytoplasm ส่วน NS2 เป็นเซลล์ค่อนข้างกลม มีขนาดเล็กกว่า NS1 เฉลี่ย $7 \times 10 \mu\text{m}$ มี nucleus กลม และ heterochromatin หนาที่ขอบของ nucleus มี granule เล็ก ๆ ติดสีแดงจับกลุ่มแน่นใน cytoplasm เมื่อตรวจดูจำนวนเซลล์ประสาทจาก midsection ปมประสาท พบเซลล์ที่มี ELH เฉลี่ย 266 / 1386 เซลล์ต่อ section นอกจากย้อมติดสีที่เซลล์แล้ว พบมีการติดสีใน blood sinus ของ capsule ที่หุ้มรอบปมประสาทด้วย ส่วน control section ย้อมไม่ติดสี (ภาพที่ 1 b)

ปมประสาท Pleuropedal

เมื่อย้อม sections ปมประสาท pleuropedal ด้วย anti-aELH พบเซลล์ติดสีอยู่กระจายอยู่ในบริเวณ cortex ที่ขอบบนของ body ขอบด้านในกับขอบด้านนอก dorsal horn และ ขอบด้านนอก ventral horn (ภาพที่ 2a, 4b) เซลล์ประสาทที่ติดสีในปมประสาทนี้ ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิดเหมือนกับเซลล์ที่พบใน cerebral ganglion คือมีทั้ง NS1 และ NS2 (ภาพที่ 2e, f) เมื่อตรวจดู midsection ปมประสาท PG พบเซลล์ที่มี ELH เฉลี่ย 530 / 4760 เซลล์ต่อ section นอกจากนี้ยังพบเซลล์ของ statocyst ย้อมติดสีด้วย (ภาพที่ 2g)

ปมประสาท Visceral

พบเซลล์ที่ติดสีมี ELH กระจายอยู่ในชั้น cortex (ภาพที่ 3a) ที่บริเวณขอบด้านล่างของปมประสาท visceral (ภาพที่ 3a, c, 4c) เซลล์ประสาทที่ติดสีในปมประสาทนี้ มีทั้ง NS1 และ NS2 เมื่อตัดปมประสาท VG midsection พบเซลล์ที่มี ELH เฉลี่ย 33 / 175 เซลล์ต่อ section

ระบบสืบพันธุ์ : anti-aELH

เนื้อเยื่อรังไข่ของหอยเป่าอื้อย้อมด้วย anti-aELH พบว่าแคปซูลของรังไข่และแผ่น trabeculae ติดสีเข้ม (ภาพที่ 5a, c-f) โดยการเกิดสีเป็นแบบจุดเข้ม และแบบเส้นใยบาง ๆ ใน capsule และแผ่น trabeculae ซึ่งเป็นแผ่นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ยื่นจาก capsule เข้าไปข้างใน (ภาพที่ 5c, d) ซึ่งอาจเป็นกึ่งประสาท หรือเซลล์กล้ามเนื้อ และ granular cells (ภาพที่ 5e, f) นอกจากนี้เซลล์ไข่ stage IV และ V

(mature oocytes) แสดงการติดสีเข้มใน cytoplasm แต่ไม่มีใน jelly coat (ภาพที่ 5c, d) ในอัตราที่ตรวจพบการติดสีแบบเป็นเส้นใยบาง ๆ บริเวณแคปซูลที่หุ้มอวัยวะ และในแผ่น trabeculae (ภาพที่ 6b-d)

ระบบประสาท: anti-GH

ปมประสาท Cerebral

เมื่อย้อม sections ของเนื้อเยื่อปมประสาท cerebral ด้วย anti-GH พบว่าเซลล์ในชั้น cortex ติดสีแดง ส่วนมากเซลล์ที่ติดสีกระจายอยู่บริเวณขอบด้านในตลอดความยาวของปมประสาท (ภาพที่ 7b, 8) จากลักษณะของเซลล์เป็นเซลล์ NS₁ และ NS₂ เช่นเดียวกัน เมื่อตัด midsection ปมประสาทพบเซลล์ที่มี GH เฉลี่ย 130 / 1362 เซลล์ต่อ section นอกจากนี้พบมีการติดสีใน blood sinus ของ capsule ของปมประสาทด้วย (ภาพที่ 7b)

ปมประสาท Pleuropedal

ในปมประสาท pleuropedal เมื่อย้อม sections ด้วย anti-GH พบเซลล์ติดสีอยู่ในชั้น cortex ส่วนมากอยู่ที่บริเวณขอบด้านบนของ body และขอบด้านนอก ventral horn เซลล์ที่ติดสีเป็นชนิดเดียวกับเซลล์ที่ติดสีในปมประสาท cerebral คือ NS₁ และ NS₂ (ภาพที่ 7c, 8b) เมื่อตัด midsection ปมประสาทพบเซลล์ที่มี GH เฉลี่ย 116 / 4677 เซลล์ต่อ section

ปมประสาท Visceral

Section เนื้อเยื่อปมประสาท visceral ย้อมด้วย anti-GH พบเซลล์มีการติดสีค่อนข้างจางและมีจำนวนน้อย โดยพบใน cortex ที่ขอบล่างของปมประสาท (ภาพที่ 7d, 8c) เซลล์ประสาทที่ติดสีเป็น NS₁ และ NS₂ ที่มีขนาดเล็ก (ภาพที่ 7d) เมื่อตรวจดูจาก midsection ปมประสาทเฉลี่ย 15/186 เซลล์ต่อ section

ระบบสืบพันธุ์: anti-GH

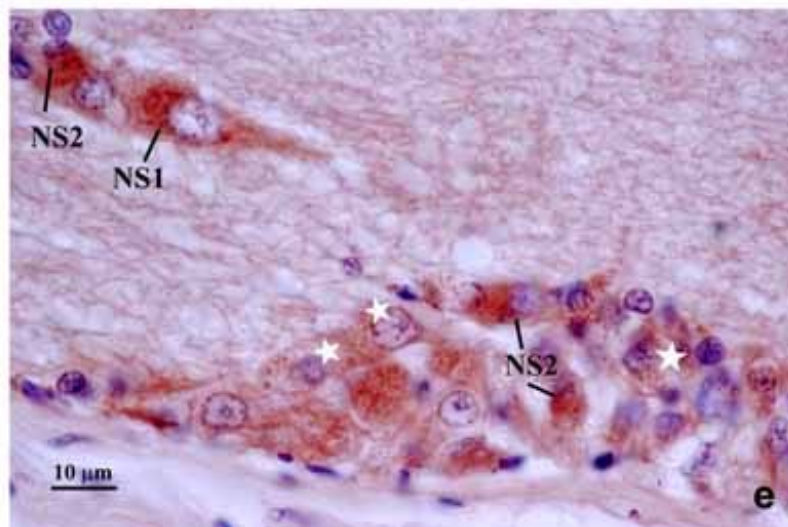
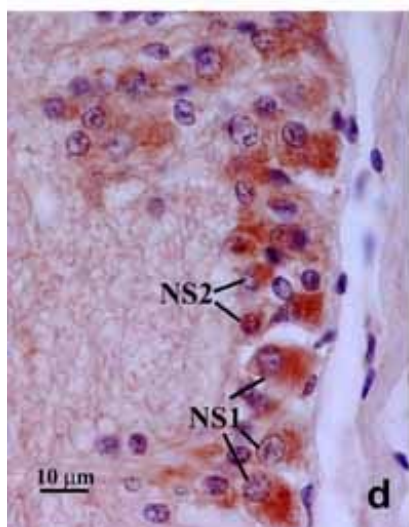
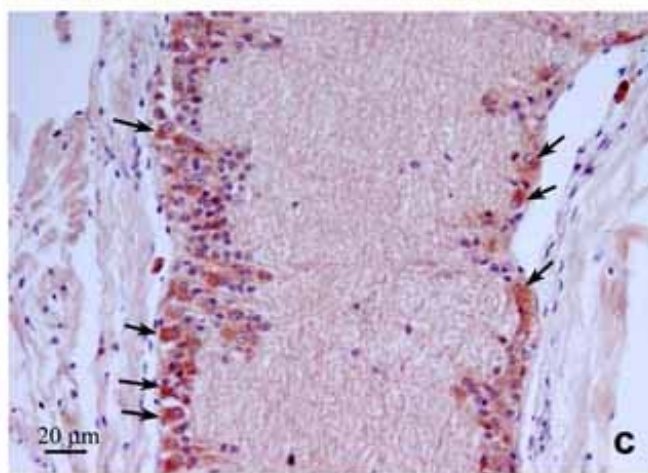
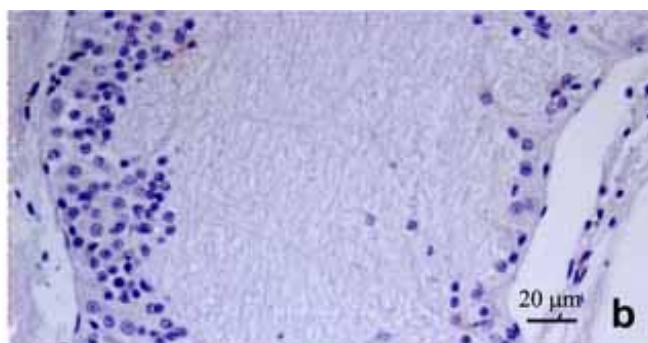
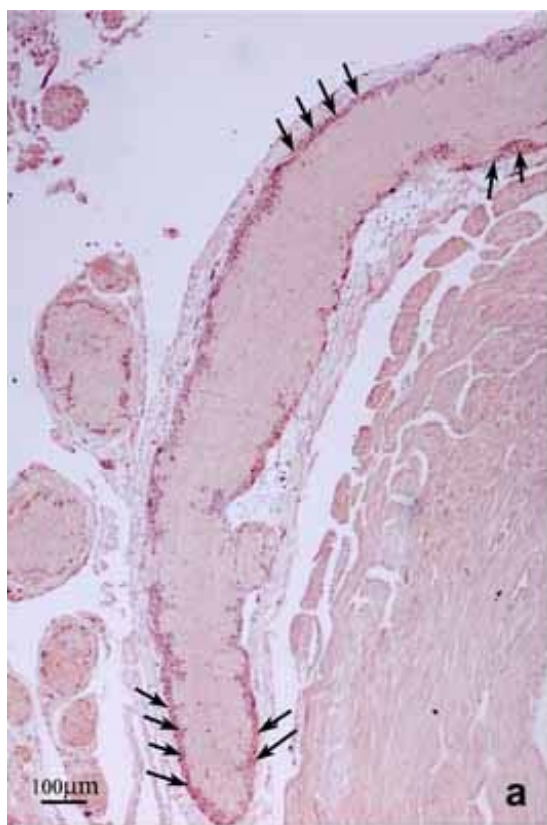
เมื่อย้อม sections เนื้อเยื่อรังไข่ของหอยเป่าฮือ ด้วย anti-GH พบว่ามีการติดสีเข้มใน follicular cells และเซลล์ไข่ stage I, II (ภาพที่ 9a, c-f) ส่วน section เนื้อเยื่ออวัยวะพบมีการติดสีของเส้นใยบาง ๆ บริเวณแคปซูลที่หุ้มอวัยวะ และการติดสีใน primary spermatocytes (ภาพที่ 10b-d)

ระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์: anti-InH

เมื่อย้อม sections ปมประสาท ด้วย anti-InH พบมีการติดสีในปมประสาท cerebral และ pleuropedal โดยการติดสีของ section ปมประสาท CG พบที่แขนงประสาทใน medulla (ภาพที่ 11a) ส่วนปมประสาท PG มีการติดสีเข้มของแขนงประสาทใน medulla และเซลล์ใน cortex ซึ่งเซลล์ที่ติดสีมีจำนวนน้อยมาก ๆ เมื่อตรวจดูจาก midsection ปมประสาท เฉลี่ย 3 / 4,500 เซลล์ต่อ section เป็นเซลล์ชนิด NS₁ (ภาพที่ 11c, d) ไม่พบการติดสีในปมประสาท visceral และในเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์

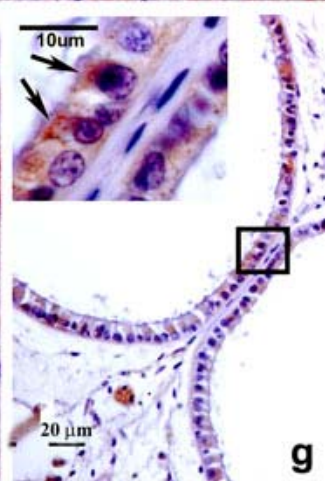
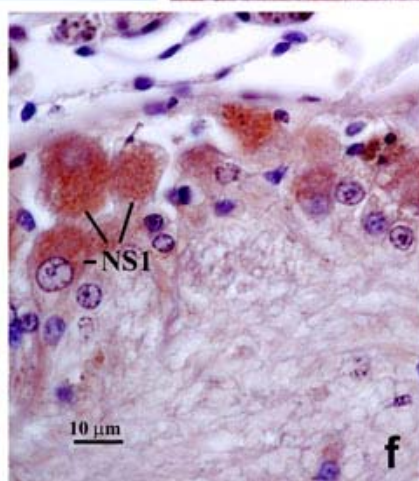
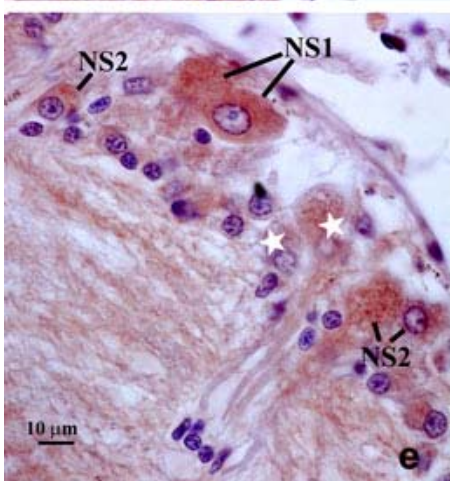
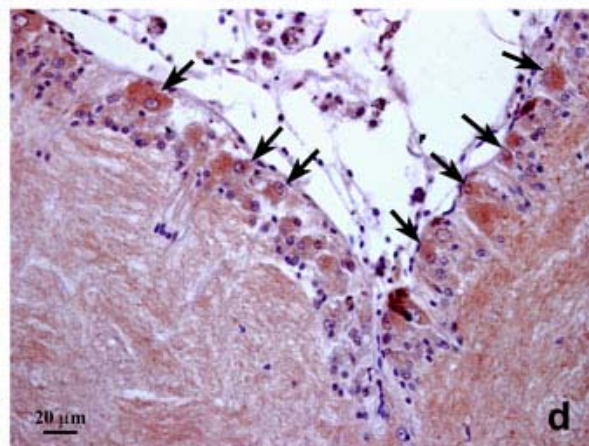
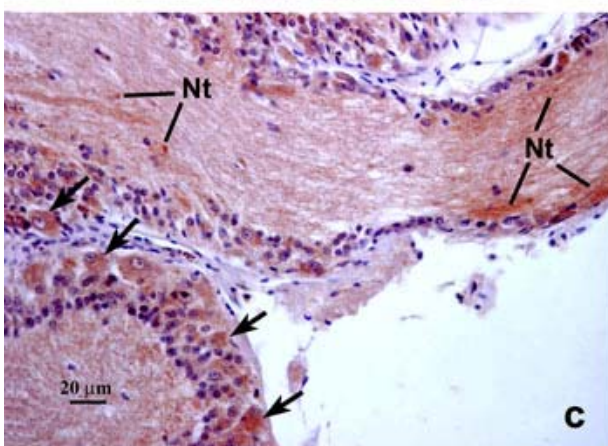
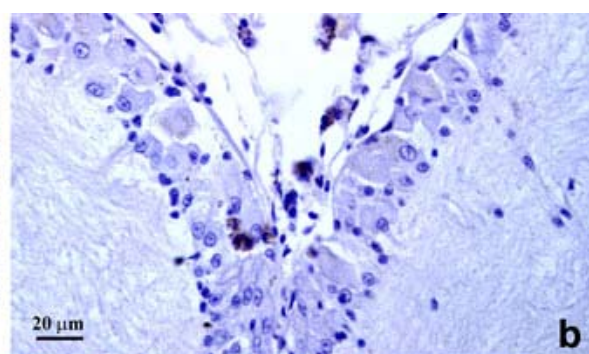
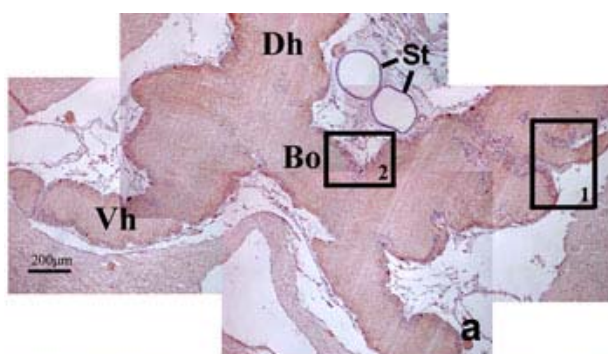
ภาพที่ 1 paraffin sections ของปมประสาท cerebral ของหอยเป่าฮื้อตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วยวิธี immunoperoxidase

- a) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำของปมประสาท cerebral ที่ย้อมด้วย anti-egg laying hormone (anti-ELH) โดยใช้ Novared substrate แสดงจุดสีแดง (ลูกศร) เป็นตำแหน่งของเซลล์ที่มี ELH กระจายอยู่ที่ขอบของ cortex
- b) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดง control section ของปมประสาท cerebral ที่ย้อมด้วย preimmune serum ไม่พบการติดสีในเซลล์และเนื้อเยื่อของปมประสาท
- c) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดงตำแหน่งของเซลล์ที่ย้อมติดสี (ลูกศร) บ่งการมี ELH อยู่ในเซลล์
- d, e) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงสุดแสดงการติดสีมี ELH ในเซลล์ของปมประสาท ซึ่งจำแนกเซลล์ที่ติดสีมี 2 ชนิด คือ neurosecretory cell type 1 (NS₁) และ neurosecretory cell type 2 (NS₂) โดยมีกลุ่มเซลล์ไม่ติดสี (*) อยู่รอบ ๆ



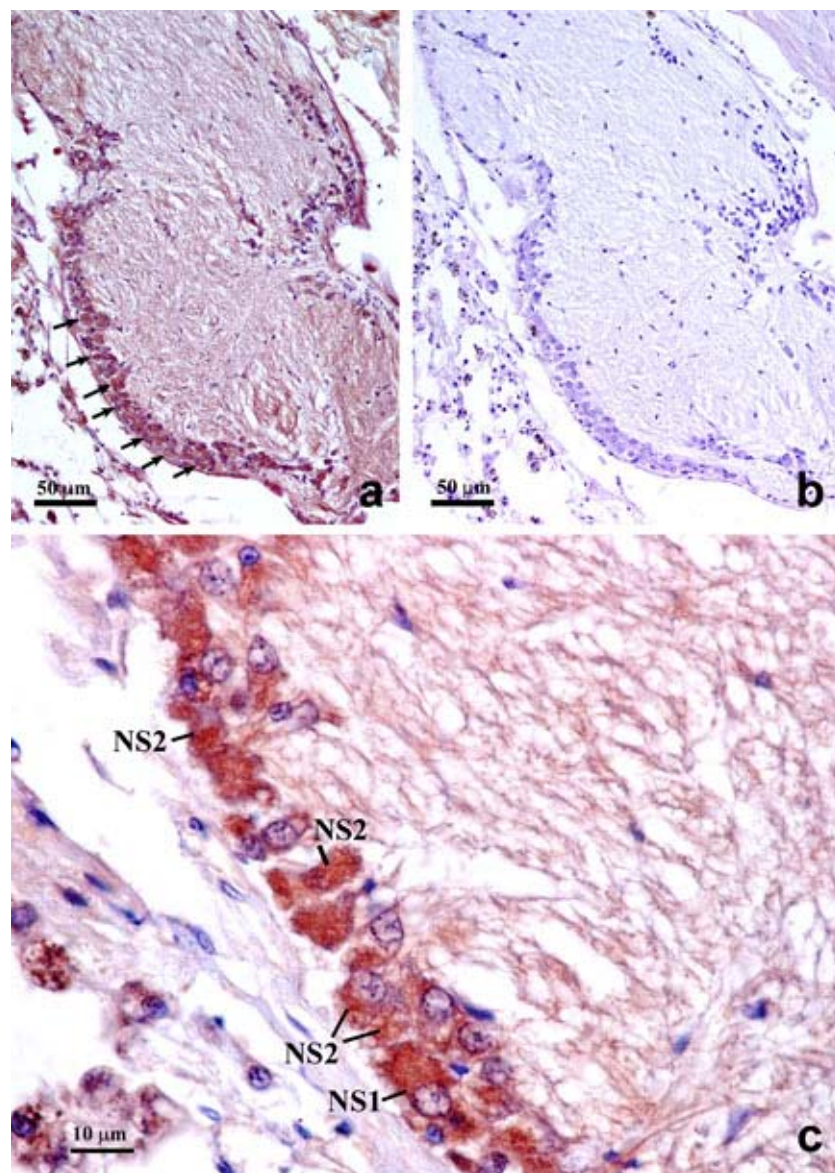
ภาพที่ 2 paraffin sections ของปมประสาท pleuropedal ของหอยเป่าฮือตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วยวิธี immunoperoxidase

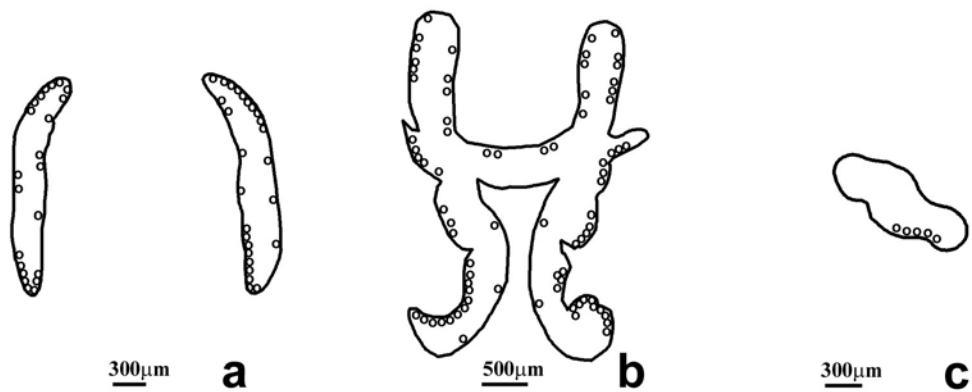
- a) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำของปมประสาท pleuropedal ที่ย้อมด้วย anti-ELH มีการย้อมติดสีที่บริเวณ Dorsal horn (Dh), Ventral horn (Vh), Body (Bo) และ Statocyst (St)
- b) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดง control section ของปมประสาท pleuropedal ที่ย้อมด้วย preimmune serum ไม่พบการติดสีในเนื้อเยื่อของระบบประสาท
- c, d) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางจากบริเวณกรอบสี่เหลี่ยมหมายเลข 1 และ 2 ในภาพ a ตามลำดับ แสดงการติดสีมี ELH ใน Neurosecretory cells (ลูกศร) ที่ส่วน cortex และ Neurite (Nt) ที่ medulla ของปมประสาท
- e, f) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงสุดแสดงเซลล์ย้อมติดสีมี ELH ในบาง neurosecretory cells ซึ่งเป็นเซลล์ชนิด NS₁, NS₂ และแสดงเซลล์ไม่ติดสี (*)
- g) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางของ statocyst และภาพแทรกขยายกรอบสี่เหลี่ยมแสดงเซลล์ของ statocyst (ลูกศร) ย้อมติดสีซึ่งบ่งการมี ELH อยู่ในเซลล์



ภาพที่ 3 paraffin sections ของปมประสาท visceral ของหอยเป่าฉีดตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วยวิธี immunoperoxidase

- a) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางของ section ปมประสาท visceral ย้อมด้วย anti-ELH แสดงตำแหน่งของเซลล์ที่ติดสี อยู่ใน cortex ขอบล่าง (ลูกศร)
- b) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางของปมประสาท visceral ย้อมด้วย preimmune serum ไม่พบการติดสี
- c) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงสุดแสดงการติดสีมี ELH ใน neurosecretory cells ซึ่งเป็นเซลล์ชนิด NS₁ และ NS₂



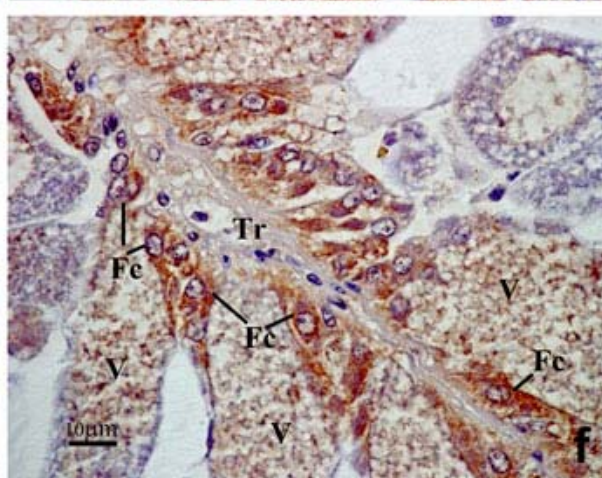
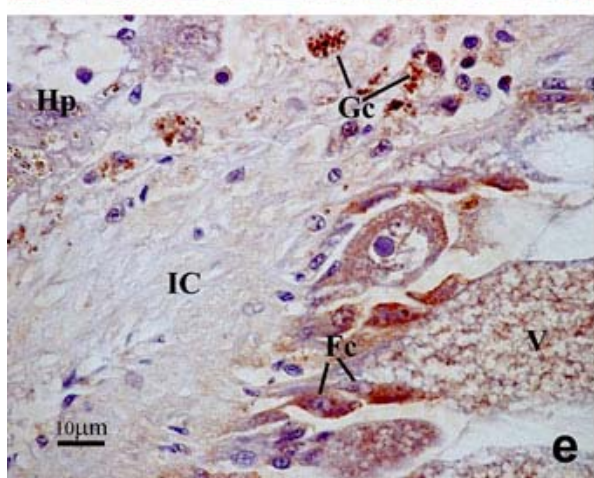
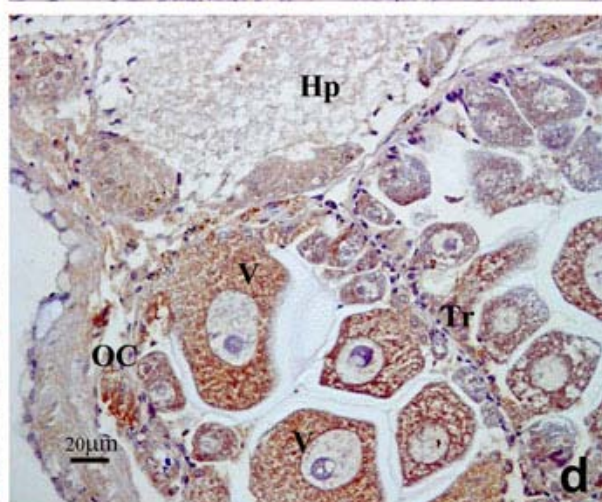
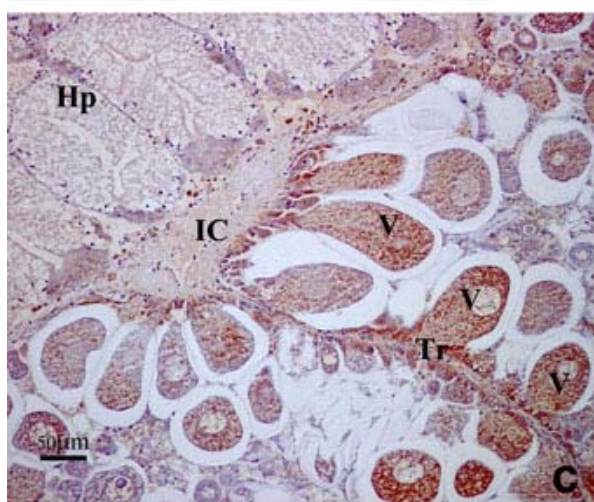
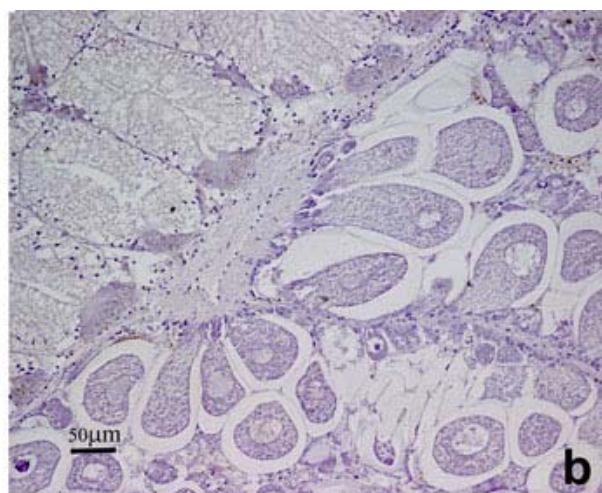
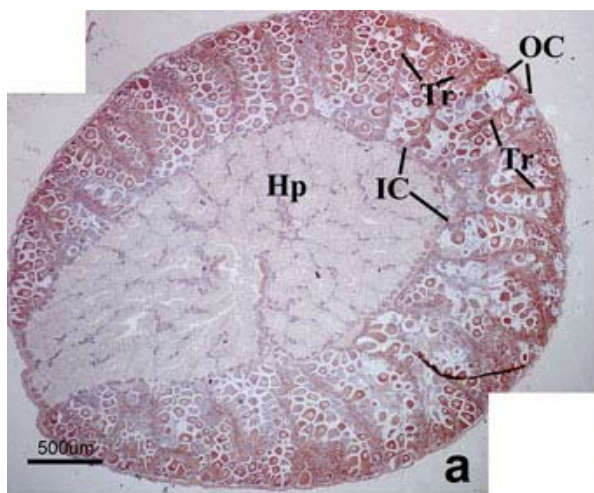


ภาพที่ 4 ภาพวาด sections ของปมประสาท cerebral (a) pleuropedal (b) และ visceral (c) เมื่อย้อมด้วย anti-ELH แสดงตำแหน่งและการกระจายของเซลล์ย้อมติดสี

- a) เซลล์ที่ติดสีกระจายอยู่บริเวณขอบด้านในตลอดความยาวของปมประสาท cerebral
- b) เซลล์ที่ติดสีอยู่บริเวณขอบบนของ body และขอบด้านในกับขอบด้านนอก dorsal horn และขอบด้านนอก ventral horn ของปมประสาท pleuropedal
- c) เซลล์ที่ติดสีอยู่บริเวณขอบด้านล่างของปมประสาท visceral

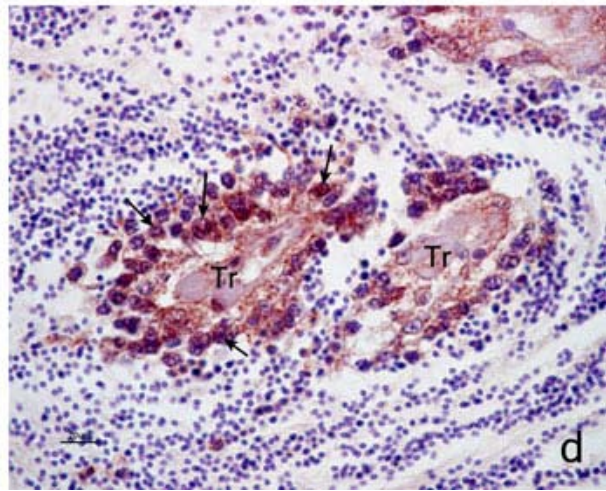
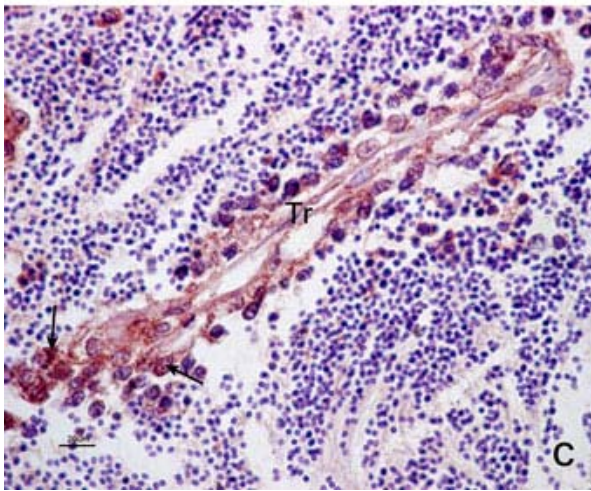
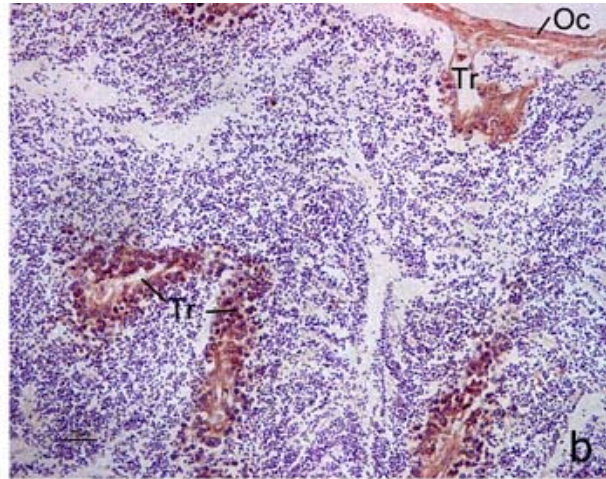
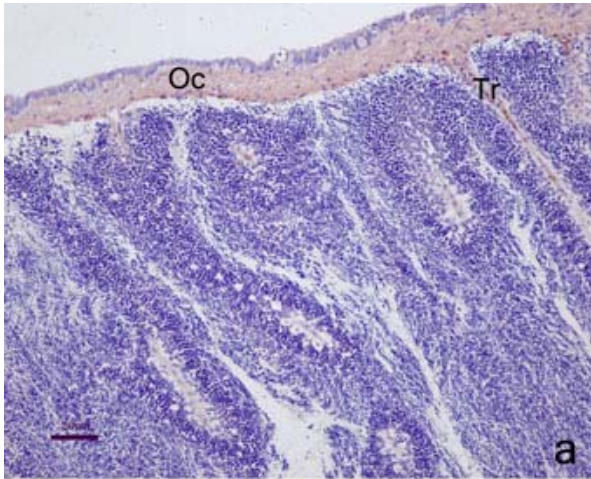
ภาพที่ 5 Paraffin section ของเนื้อเยื่อสืบพันธุ์เพศเมีย (รังไข่) ของหอยเป่าฮือตัวเต็มวัย ที่ย้อมด้วยวิธี immunoperoxidase

- a) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดง section ของรังไข่ที่ย้อม anti-ELH แสดงการติดสีที่บริเวณ capsule ส่วนนอก (OC) และ trabecular (Tr) ไม่มีการติดสีที่ capsule ส่วนใน (IC) และ Hepatopancreas (Hp)
- b) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางของรังไข่แสดง control section ย้อมด้วย preimmune serum แสดงการย้อมไม่ติดสี
- c, d) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางของรังไข่ แสดงการย้อมติดสีมี ELH ใน capsule ส่วนนอก (OC) trabeculae (Tr) และในเซลล์ไข่ Stage V
- e, f) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงสุดของรังไข่ แสดงการย้อมติดสีมี ELH ใน granulated cells (Gc) และ follicular cells (Fc)



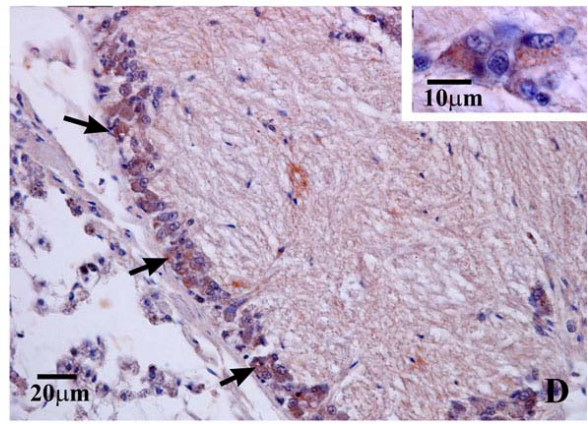
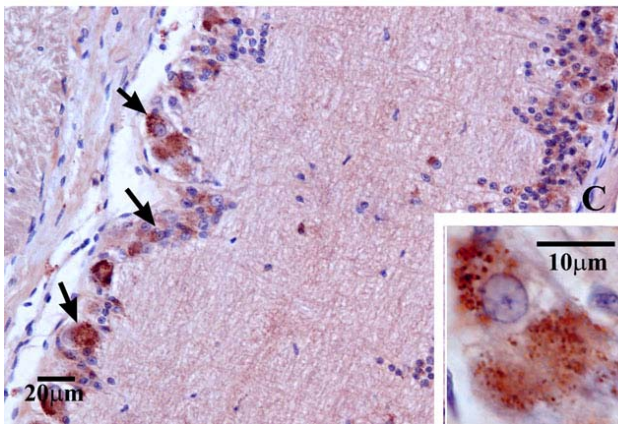
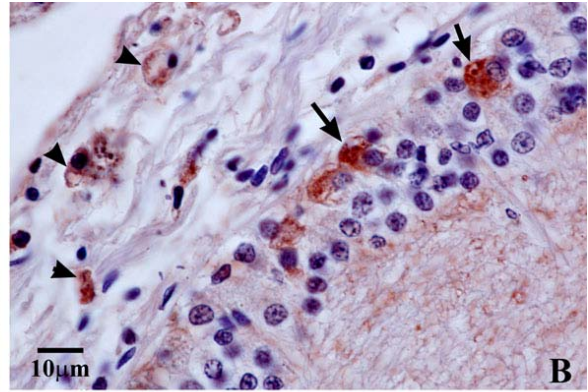
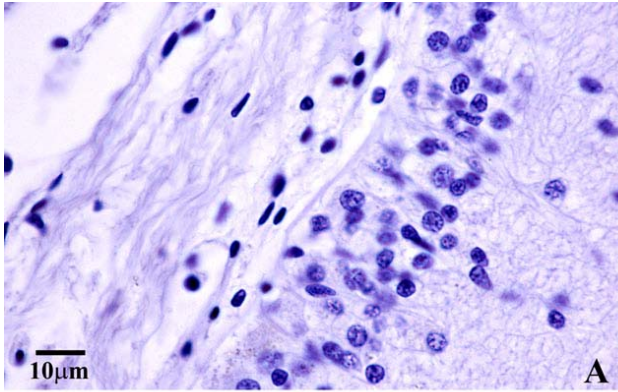
ภาพที่ 6 Paraffin sections ของเนื้อเยื่อสืบพันธุ์เพศผู้ (อัณฑะ) ของหอยเป่าอีตัวเต็มวัย ที่ย้อมด้วยวิธี immunoperoxidase

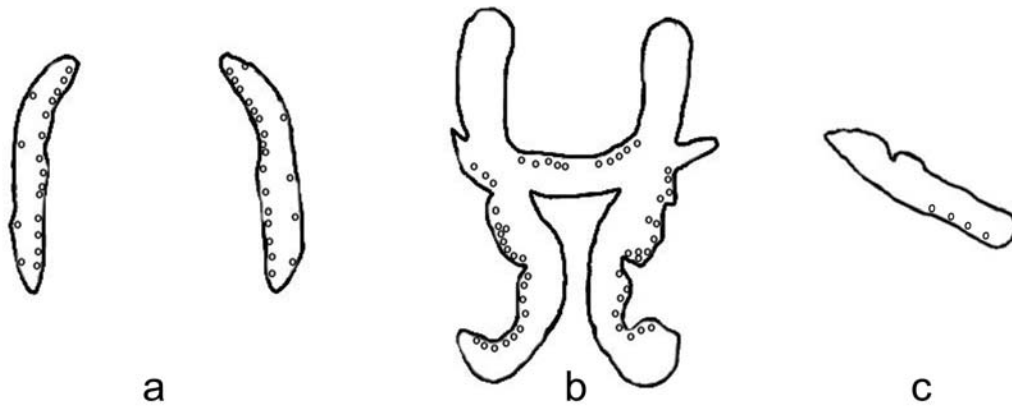
- a) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดง control section ของอัณฑะที่ย้อมด้วย preimmune serum แสดงย้อมไม่ติดสี
- b) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดง section ของอัณฑะที่ย้อมด้วย anti-ELH แสดงย้อมติดสีที่บริเวณ Capsule ส่วนนอก (Oc) และ Trabeculae (Tr)
- c, d,) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงสุดแสดงการย้อมติดสีมี ELH ใน primary spermatocytes (ลูกสร)



ภาพที่ 7 Paraffin sections ของเนื้อเยื่อปมประสาท Cerebral (ภาพa,b) Pleuropedal (ภาพ c) และVisceral (ภาพd)

- a) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงสุดแสดง control section ของปมประสาท cerebral ที่ย้อมด้วย pre-immune serum ไม่มีการติดสี
- b) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงสุดของปมประสาท cerebral ย้อมด้วย anti growth hormone (anti GH)แสดงการย้อมติดสีมี GH ใน Neurosecretory cells (ลูกศร) ที่บริเวณ cortex และ ใน blood sinus (หัวลูกศร) ที่แคปซูลของปมประสาท Pleuropedal
- c) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดงการย้อมติดสีมี GH ใน Neurosecretory cells (ลูกศร) ของปมประสาท Pleuropedal
- d) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดงการย้อมติดสีเจือจางใน Neurosecretory cells โดยภาพแทรกถ่ายกำลังขยายสูงสุดแสดงเซลล์ที่ย้อมติดสีมี GH ปริมาณน้อยในเซลล์



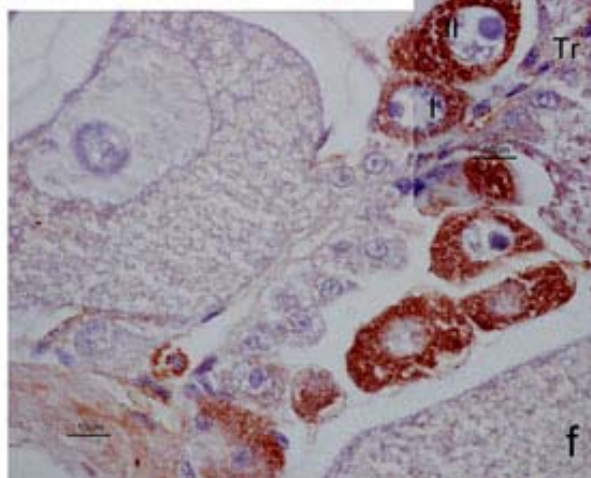
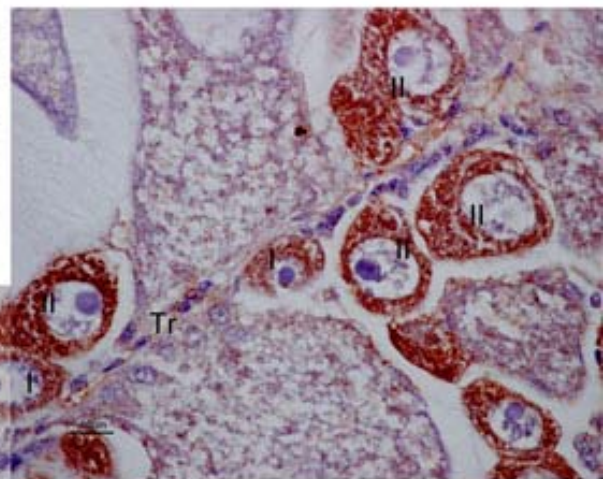
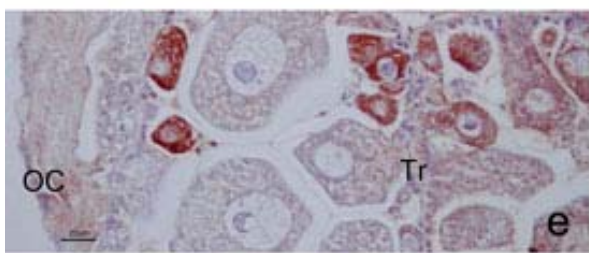
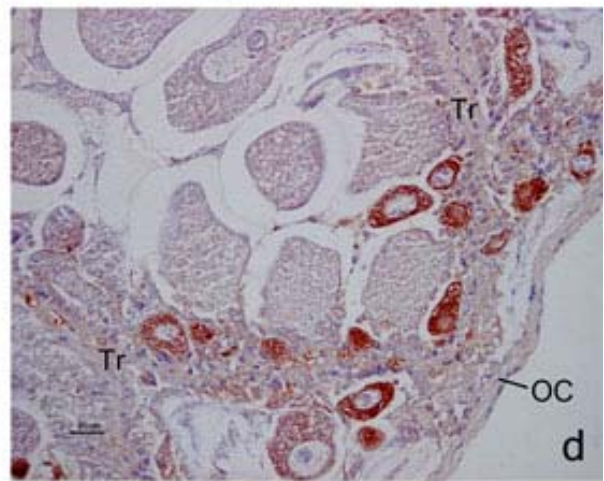
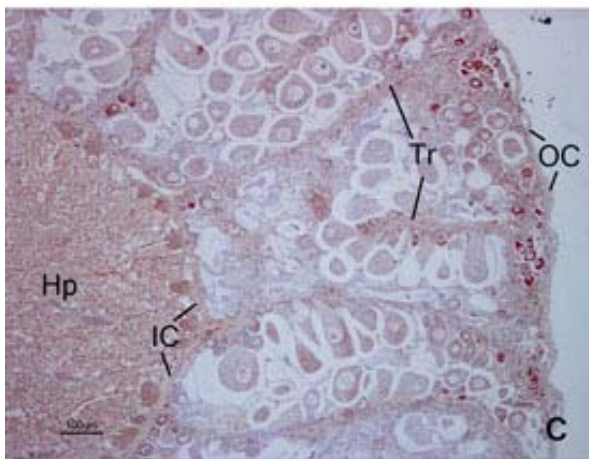
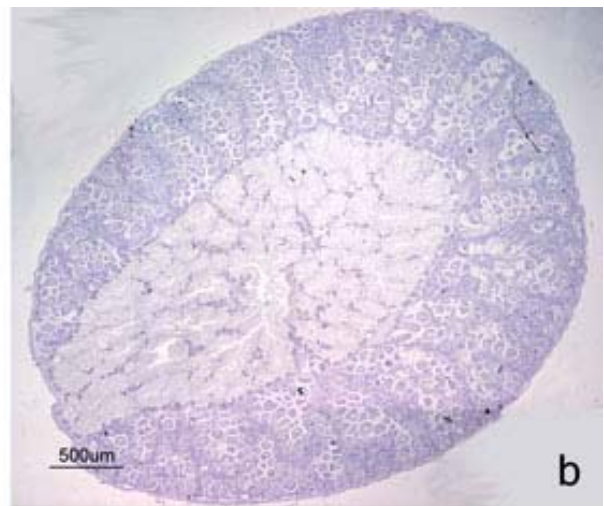
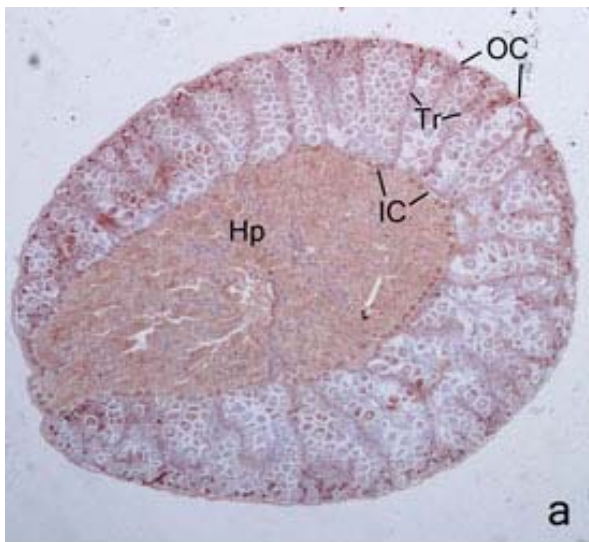


ภาพที่ 8 ภาพวาด sections ของปมประสาท cerebral (a) pleuropedal (b) และ visceral (c) เมื่อย้อมด้วย anti GH แสดงตำแหน่งและการกระจายของเซลล์ Neurosecretory ที่ย้อมติดสี

- a) เซลล์ที่ติดสีส่วนมากกระจายอยู่บริเวณขอบด้านในตลอดความยาวของปมประสาท cerebral
- b) เซลล์ที่ติดสีอยู่บริเวณขอบด้านบนของ body และขอบด้านนอก ventral horn ของปมประสาท pleuropedal
- c) เซลล์ที่ติดสีอยู่ที่ขอบล่างของปมประสาท visceral

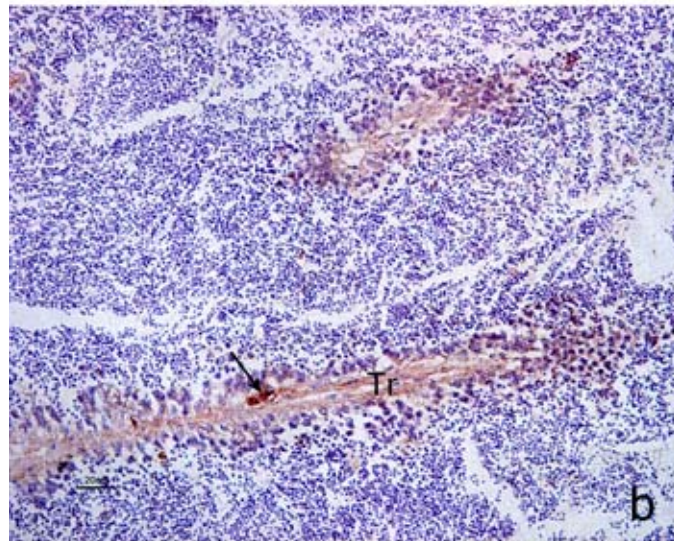
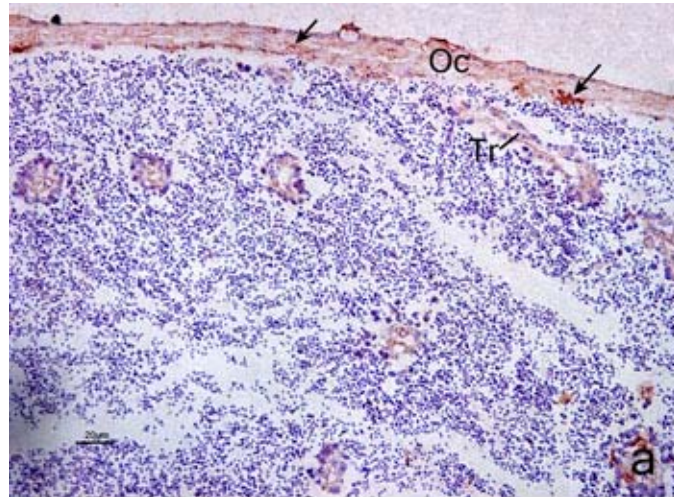
ภาพที่ 9 Paraffin sections เนื้อเยื่อตับพันธ์เพศเมีย (รังไข่) ของหอยเป่าฮือตัวเต็มวัย ที่ย้อมด้วยวิธี immunoperoxidase

- a) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดง section ของรังไข่ ย้อมด้วย anti-GH มีการติดสี (OC = Outer capsule, Tr = Trabeculae, Hp = Hepatopancreas, IC = Inner capsule)
- b) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดง control section ของรังไข่ที่ย้อมด้วย pre-immune serum ซึ่งไม่มีการติดสี
- c, d, e) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางของ section รังไข่ แสดงการติดสีในเซลล์ไข่ระยะ I และ II และ ใน Trabeculae ซึ่งบ่งถึงการมี GH
- f) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงสุดแสดงการติดสีมี GH ในเซลล์ไข่ระยะ I และ II และใน Trabeculae



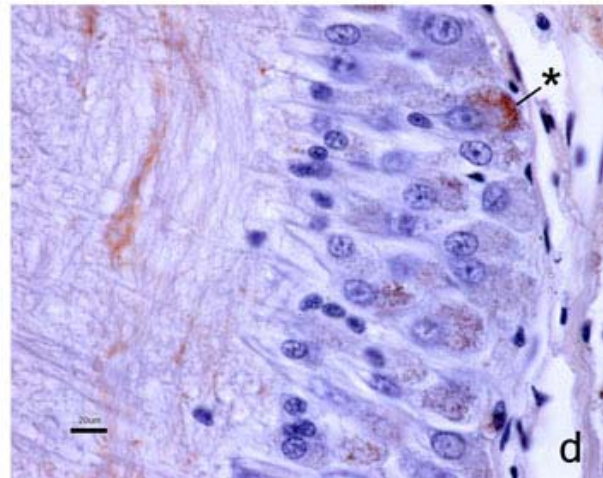
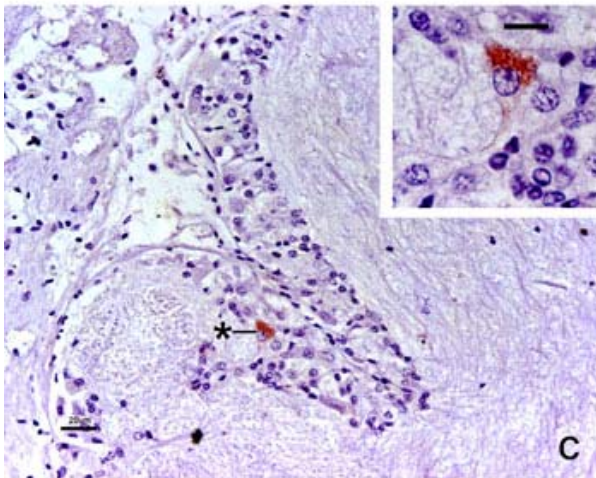
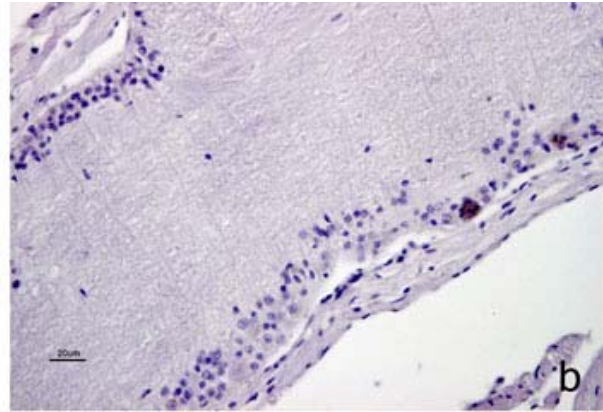
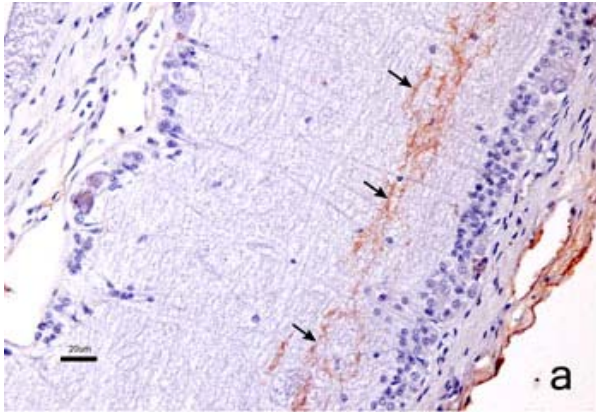
ภาพที่ 10 Paraffin sections ของเนื้อเยื่อตับพันธุ์เพศผู้ (อันทะ) ของหอยเป่าฮื้อตัวเต็มวัย ที่ย้อมด้วยวิธี immunoperoxidase

- a) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดง section ของอันทะที่ย้อมด้วย anti-GH มี การติดสีบริเวณ capsule (Ca) และ trabeculae (Tr)
- b) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดงเซลล์ ของ Trabeculae (arrow) ที่ย้อมติดสีมี GH



ภาพที่ 11 Paraffin sections ของเนื้อเยื่อปมประสาท cerebral (รูป a, b) และ pleuropedal (รูป c, d) ของหอยเป่าฮือตัวเต็มวัย ที่ย้อมด้วยวิธี immunoperoxidase

- a) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดง section ของปมประสาท cerebral ย้อมด้วย anti-insulin-like hormone (InH) แสดงการติดสีบ่งว่ามี InH ที่ nerve fibers ในชั้น medulla ของปมประสาท แต่ไม่พบการติดสีในเซลล์ของปมประสาท
- b) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดง control section ของปมประสาท cerebral ที่ย้อมด้วย pre-immune serum ซึ่งไม่มีการติดสี
- c) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดง section ของปมประสาท pleuropedal ที่ย้อมด้วย anti-InH แสดงการย้อมติดสีของบางเซลล์ (*) บริเวณ cortex ของปมประสาทแสดงว่าเซลล์นี้มี InH รูปแทรกเป็นภาพถ่ายกำลังขยายสูงสุดแสดง neurosecretory cell ที่ย้อมติดสี
- d) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงสุดแสดงการติดสี ใน neurosecretory cell type 1 (*) ซึ่งบ่งว่ามี InH ในเซลล์ที่ติดสี



สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ได้ศึกษาลักษณะของเซลล์และตำแหน่งที่การกระจายตัวของเซลล์ที่มี egg-laying hormone (ELH) growth hormone (GH) และ insulin-like hormone (InH) ในปมประสาท cerebral (CG) pleuropedal (PG) และ visceral (VG) ของหอยเป่าชื่อ *Halotis asinina* (Linnaeus) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นเซลล์ที่ผลิตและหลั่งฮอร์โมนดังกล่าว เนื่องจากพบว่าเซลล์ที่ย้อมติดสีเหล่านี้ มีลักษณะเด่นของ nucleolus ใน euchromatic nucleus และการมีกลุ่มของ granule ย้อมติดสีใน cytoplasm จากลักษณะที่พบนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่าเซลล์ที่ย้อมติดสีนี้เป็น neurosecretory cells (NS) ชนิด NS1 และ NS2 (Thongkukiatkul et al. 2001, Upatham et al., 2001) ขณะที่ NS3 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กที่สุด และเซลล์ประสาทขนาดใหญ่ (NR1) รวมถึงเซลล์ประสาทขนาดรองลงมา (NR2-4) ย้อมไม่ติดสี จากผลการศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลสรุปได้ว่าเซลล์ที่มี ELH พบใน PG มากกว่า CG และ VG ในอัตราส่วน 6.5:4.5:1 แม้ว่าร้อยละของเซลล์ย้อมติดสีเมื่อใช้ anti-ELH พบใน VG มากกว่า CG และ PG ส่วนเซลล์ที่มี GH พบใน CG มากกว่า PG และ VG ในอัตราส่วน 7.6:6.8:1 และร้อยละของเซลล์ติดสีก็พบใน CG มากกว่า VG และ PG ด้วย

นอกจากนี้ยังพบการติดสีของ anti-ELH และ GH ในแขนงประสาทและ blood sinus ในปมประสาท CG และ PG ซึ่งสามารถบ่งชี้ว่า NS น่าจะผลิตฮอร์โมนแล้วส่งไปยังอวัยวะเป้าหมายโดยผ่านทางแขนงประสาทและทางระบบหลอดเลือด ผลการศึกษานี้คล้ายกับที่มีการศึกษา ELH ในหอยเป่าชื่อ *H. rubra* (Cummins et al. 2001) แม้ว่าไม่มีการศึกษาใน VG ก็ตาม Hahn (1994) จำแนกชนิดของเซลล์ปมประสาท CG ของ *H. discus hamai* โดยใช้ความจำเพาะในการย้อมเซลล์ ได้ 4 ชนิด (A, B, C, D) โดยชนิด A และ B จัดเป็น Neurosecretory cells ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างและเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ในรังไข่ การศึกษาโดย Yahata (1973) แสดงการมี ELH มากใน PG และ VG ที่สามารถกระตุ้นการวางไข่ของ *Nordotis discus* เมื่อฉีดหอยด้วยของเหลวที่ได้จากการสกัดปมประสาททั้ง 2 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้

ส่วนงานวิจัยที่มีผลการศึกษาแตกต่างกัน ได้แก่ การศึกษากลุ่มหอยชั้นสูงกว่า เช่น การศึกษา CDCH ในหอย *Lymnaea* ที่มีคุณสมบัติสามารถกระตุ้นการตกไข่ได้เหมือน ELH สร้างโดยกลุ่มเซลล์ที่อยู่บริเวณส่วนท้ายของ CG (Van Minnen et al., 1992) นอกจากนี้การศึกษาใน *Aplysia* พบว่า bag cells ใน VG ผลิต ELH (Nambu and Scheller, 1986)

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา พบ ELH ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของ trabeculae ด้วย (Cummins et al. 2001; Champoo et al. 2001) แต่ไม่มีรายงานบ่งชี้เกี่ยวกับโครงสร้างชนิดเซลล์ที่มี ELH นี้ เพียงคาดว่าอาจเป็น granular cells (Apisawetakan et al., 2001) เพราะเป็นเซลล์ที่มีการกระจายมากใน inner capsule และ มีการกระจายอยู่บ้างใน outer capsule ของรังไข่ จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบแน่ชัดว่าเซลล์ที่มี ELH ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน trabeculae เป็น granular cells จึงมีความเป็นไปได้ว่าเนื้อเยื่อรังไข่อาจได้รับ ELH จากปมประสาท CG PG และ VG ที่ส่งมาทาง axons ไปยัง capsule และ trabeculae

ของอวัยวะสืบพันธุ์ หรือมีเซลล์สร้าง ELH อยู่ในเนื้อเยื่อรังไข่เองด้วย นอกจากนี้ยังพบ ELH ในเซลล์ไข่มุม mature oocytes ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า ELH และ/หรือ neuropeptide ที่รวมมีอยู่ด้วย อาจมีบทบาทกระตุ้นการเจริญของเซลล์ไข่ระยะปลาย การศึกษาในหอยชั้นสูงกว่าก็มีรายงานการตรวจพบ ELH ในท่ออวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียแต่ไม่พบในรังไข่ (Choate et al., 1993 & Van Minnen et al., 1989) มีความเป็นไปได้ว่า ELH ที่พบในเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์อาจเป็น isotype ที่ต่างกันกับ ELH ที่พบในเนื้อเยื่อประสาท (Fisher et al., 1988) ELH ในหอยเป่าชื่อ *H. rubra* แสดงความเหมือน (homology) ในระดับ Nucleotide สูงมากกับ CDCH ของ *L. stagnalis* และมี homology ประมาณ 56% กับ ELH ของ *A. californica* (Wang & Hanna 1998) การศึกษาลำดับ cDNA ของ ELH ที่มาจากเนื้อเยื่อประสาททั้งหมดของหอยเป่าชื่อหลาย species รวมทั้ง *H. asinina* พบว่ามี homology กันเกือบทั้งหมด (Hanna et al., 2000) ดังนั้นสิ่งที่น่าสนใจอีกอย่างหนึ่งคือ ELH ที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อรังไข่ที่ย้อมด้วย antibody ต่อ ELH จากเนื้อเยื่อประสาทเป็น isotype ชนิดเดียวกันหรือแตกต่างกันจากของเนื้อเยื่อประสาท ซึ่งจากรายงานการวิเคราะห์ Western blot โดยใช้ antibody ต่อ ELH ตรวจแถบโปรตีนที่สกัดจากปมประสาท CG PG และเนื้อเยื่อรังไข่ของ *H. rubra* พบว่ามี pattern ของ immunogenic band ที่แตกต่างกันเล็กน้อย (Cummins et al., 2001) ซึ่งอาจเป็นความแตกต่างกันที่ isotype ของ ELH หรือขั้นตอนกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนที่ระดับ preprohormone ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับการเปรียบเทียบ cDNA ที่ clone จากเนื้อเยื่อระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งซึ่งน่าจะมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

หนังสืออ้างอิง

- Apisawetakan S, Chanpoo M, Wanichanon C, Linthong V, Kruatrachue M, Upatham ES, Pumthong T, Sobhon P (2001) Characterization of trabecular cells in the gonad of *Haliotis asinina* Linnaeus. J Shellfish Res 20:717-724
- Choate JV, Kruger TE, Micci MA, Blankenship JE (1993) Isolation of an egg-laying hormone-binding protein from the gonad of *Aplysia californica* and its localization in oocytes. J Comp Physiol 173:475-483
- Chanpoo M, Apisawetakan S, Thongkukiatkul A, Wanichanon C, Linthong V, Kruatrachue M, Upatham ES, Pumthong T, Hanna PJ, Sobhon P (2001) Localization of egg-laying hormone in the gonads of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. J Shellfish Res 20:725-731
- Cummins S, Thongkukiatkul A, Hanna PJ (2001) Location of egg-laying hormone in reproductive structures and neurons of *Haliotis rubra* (Leach) using antibodies raised against recombinant fusion proteins. J Shellfish Res 20:705-710

- Fisher JM, Sossin W, Newcomb R, Scheller RH (1998) Multiple neuropeptides derived from a common precursor are differentially packaged and transported. *Cell* 54:813-822
- Hanna PJ, Chai Z, Cummins SF, Huang B (2000) Application of molecular biology to abalone fisheries and aquaculture. *J Med Appl Malacol* 10: 133-144
- Hahn KO (1994) The neurosecretory staining in the cerebral ganglia of the Japanese abalone (ezoawabi), *Haliotis discus hannai*, and its relationship to reproduction. *Gen Comp Endocrinol* 93:295-303
- Fisher JM, Sossin W, Newcomb R, Scheller RH (1988) Multiple neuropeptides derived from a common precursor are differentially packaged and transported. *Cell* 54:813-822
- Nambu JR, Scheller RH (1986) Egg-laying hormone genes of *Aplysia*: evolution of the ELH gene family. *J Neurosci* 6:2026-2036
- Thongkukiatkul A, Sobhon P, Upatham ES, Kruatrachue M, Wanichanon C, Chitramvong YP, Pumthong T (2001) Ultrastructure of neurosecretory cells in the cerebral and pleuropedal ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus. *J Shellfish Res* 20: 733-741
- Upatham ES, Thongkukiatkul A, Kruatrachue M, Wanichanon C, Chitramvong YP, Sahavacharin S, Sobhon P (2001) Classification of neurosecretory cell, neuron, and neuroglia in the cerebral ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus by light microscopy. *J Shellfish Res* 17:737-742
- Van Minnen J, Dirks RW, Vreugdenhil E, Van Diepen J (1989) Expression of the egg-laying hormone genes in peripheral neurons and exocrine cells in the reproductive tract of the mollusk, *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience* 33:35-46
- Van Minnen J, Schallig HD, Ramkema MD (1992) Identification of putative egg-laying hormone containing neuronal systems in gastropod molluscs. *Gen Comp Endocrinol* 86:96-102
- Wang L, Hanna PJ (1998) Isolation, cloning and expression of a gene encoding an egg-laying hormone of the blacklip abalone (*Haliotis rubra* Leach) *J Shellfish Res* 17:785-793
- Yahata T (1973) Induced spawning of abalone (*Nordotis discus* Reeve) injected with ganglionic suspensions. *Bull Jap Soc Sci Fish* 39:1117-1122

Acknowledgments: This research was supported financially by the Thailand Research Fund.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

P. Saitongdee, S. Apisawetakan, N. Anunruang, T. Poomthong, P. Hanna, and P. Sobhon
2005. Egg-laying hormone immunoreactivity in the neural ganglia and ovary of *Haliotis asinina*
Linnaeus. Invertebrate Neuroscience, 5:165-172.

ผลงานที่รอตีพิมพ์

P. Saitongdee, S. Apisawetakan, T. Poomthong, S. Cummins, S. York, P. Hanna, and P.
Sobhon. The presence of growth-hormone –like factor in abalone using immunohistochemistry
and western blotting. (in preparation)

ภาคผนวก

Reprint :

P. Saitongdee, S. Apisawetakan, N. Anunruang, T. Poomthong, P. Hanna, and P. Sobhon

2005. Egg-laying hormone immunoreactivity in the neural ganglia and ovary of *Haliothis asinina*

Linnaeus. Invertebrate Neuroscience, 5:165-172.