

Abstract

In mammal, uterus plays an important role in the successful production of new offspring. Failure of normal uterine function may cause delayed uterine involution, embryonic loss and low conception rate, resulting in remarkable economic loss in livestock sector. Heat stress is one of the main factors that affected fertility of lactating dairy cows. However, the understanding of the effect of heat stress on endometrial physiology has still been unclear. The objective of the present study was to investigate the effect of an elevated temperature on gene expression in bovine endometrium triggered by exposure to the bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS). Cultures of mixed epithelial and stromal cells were grown to confluence (9 days) in 24 well plates at 37°C (control temperature) and 40.4°C for 24h (acute heat exposure) and 40.4°C at the beginning (prolonged heat exposure) prior to treat with (LPS; 100 ng/ml) for 12h. The mRNA expression of *ALOX12*, *HSPA5*, *IL8*, *IL1B*, *S100A8*, *PTGES* and *AKR1B1* were investigated using quantitative real-time PCR with reference genes *RN18S1* and *ACTB*. The secretory protein of IL8 and PGF_{2α} was measured using ELISA. Treatments were replicated 3 times and experiments conducted on four separate occasions. As expected, LPS altered the mRNA expression of *ALOX12*, *IL8*, *IL1B*, *S100A8*, *PTGES*, *AKR1B1* and the secretion of IL8 and PGF_{2α} ($P < 0.01$). The acute heat exposure decreased secretory IL8 and PGF_{2α} ($P < 0.05$), while the prolonged heat exposure decreased *S100A8* expression and secretory PGF_{2α} ($P < 0.05$). On the other hand, Heat shock 70 kDa protein 5 (*HSPA5*) was not altered by neither heat exposure nor LPS. Indeed, mixed model analysis data showed that the expression of *IL8*, *S100A8*, *PTGES* were inhibited by acute heat exposure in LPS treated endometrial cells, whereas the prolonged heat exposure decreased *AKR1B1* expression significantly ($P = 0.006$). Moreover, both acute and prolonged heat exposure up-regulated the secretion of PGF_{2α} ($P < 0.01$). Regarding the non-LPS treated group, an elevated temperature decreased *S100A8* expression and the secretion of IL8 and PGF_{2α} ($P < 0.05$) while only the prolonged heat exposure increased *AKR1B1* expression ($P = 0.015$). These results suggest that the elevated temperature condition in bovine mixed endometrial cell culture system was capable of compromising the expression of immune response genes as well as altering prostaglandin synthesis and secretion that can detrimentally affect normal endometrial functions.

Keywords: endometrial cell culture, cattle, gene expression, elevated temperature condition, lipopolysaccharide

บทคัดย่อ

มดลูกเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญต่อการผลิตลูกในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การทำงานที่ผิดปกติของมดลูกอาจส่งผลต่อการยืดระยะมดลูกเข้าสู่หลังคลอด การสูญเสียศักยภาพระยะต้นและอัตราการผสมติดต่ำ ซึ่งส่งผลต่อความสูญเสียทางเศรษฐกิจในวงการปศุสัตว์ ภาวะความเครียดที่เกิดจากความร้อนเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อภาวะเจริญพันธุ์ของแม่โคให้นม อย่างไรก็ตามความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับผลของภาวะความเครียดที่เกิดจากความร้อนต่อสรีรวิทยาการทำงานของมดลูกยังไม่แน่ชัด วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้คือเพื่อศึกษาผลของสภาวะการเพิ่มอุณหภูมิต่อการแสดงออกของยีนจากเซลล์เยื่อบุผนังมดลูกวัวที่ได้รับสารพิษจากแบคทีเรียชนิดไลโปโพลีแซคคาไรด์ ทำการเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผนังมดลูกวัวเป็นระยะเวลา 9 วัน โดยแบ่งเป็นสามกลุ่มตามสภาวะการเพิ่มอุณหภูมิ 37°C (สภาวะควบคุม) และที่อุณหภูมิ 40.4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สภาวะการเพิ่มอุณหภูมิเฉียบพลัน) และที่อุณหภูมิ 40.4°C ตั้งแต่เริ่มเลี้ยงเซลล์ (สภาวะการเพิ่มอุณหภูมิระยะยาว) จากนั้นจึงให้สารไลโปโพลีแซคคาไรด์ (100นก./มล.) เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ทำการตรวจปริมาณ mRNA ของยีน *ALOX12*, *HSPA5*, *IL8*, *IL1B*, *S100A8*, *PTGES* and *AKR1B1* ด้วยวิธี qPCR โดยใช้ยีน *RN18S1* และ *ACTB* อ้างอิงและตรวจปริมาณโปรตีน *IL8* และ *PGF_{2α}* โดยวิธี ELISA และทำการเลี้ยงเซลล์จำนวน 4 ครั้งโดยในแต่ละครั้งจะมีจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำต่อหนึ่งกลุ่มการทดลอง ผลการศึกษาพบว่าสารไลโปโพลีแซคคาไรด์จะไปเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *ALOX12*, *IL8*, *IL1B*, *S100A8*, *PTGES*, *AKR1B1* and และปริมาณโปรตีน *IL8* and *PGF_{2α}* ($P < 0.01$) ในขณะที่เซลล์เยื่อบุผนังมดลูกอยู่ในสภาวะการเพิ่มอุณหภูมิเฉียบพลันลดการหลั่ง *IL8* และ *PGF_{2α}* ($P < 0.05$) แต่สภาวะการเพิ่มอุณหภูมิระยะยาวจะลดการแสดงออกของยีน *S100A8* และการหลั่งของ *PGF_{2α}* ($P < 0.05$) ตรงกันข้ามกับยีน Heat shock 70 kDa protein 5 (*HSPA5*) ซึ่งไม่ตอบสนองกับการให้ไลโปโพลีแซคคาไรด์และสภาวะการเพิ่มความร้อน จากผลการวิเคราะห์แบบ Mixed model พบว่าการแสดงออกของยีน *IL8*, *S100A8*, *PTGES* จะถูกยับยั้งโดยสภาวะการเพิ่มอุณหภูมิเฉียบพลัน ในกลุ่มเซลล์เยื่อบุผนังมดลูกที่ได้รับไลโปโพลีแซคคาไรด์ ส่วนสภาวะการเพิ่มอุณหภูมิระยะยาวจะไปลดการแสดงออกของยีน *AKR1B1* ($P = 0.006$) นอกจากนี้สภาวะการเพิ่มอุณหภูมิทั้งสองแบบสามารถเพิ่มการหลั่ง *PGF_{2α}* ($P < 0.01$) และเมื่อเปรียบเทียบผลของสภาวะการเพิ่มอุณหภูมิในกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับไลโปโพลีแซคคาไรด์ พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิจะไปลดการแสดงออกของยีน *S100A8* และการหลั่ง *IL8* and *PGF_{2α}* ($P < 0.05$) ในขณะที่การแสดงออกของยีน *AKR1B1* จะเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะการเพิ่มอุณหภูมิระยะยาว ($P = 0.015$) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสภาวะการเพิ่มอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผนังมดลูกโคมีผลต่อการลดลงของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและการสร้างและหลั่งสารโปรสตาแกลนดินซึ่งจะส่งผลกระทบด้านลบต่อการทำงานของมดลูก การศึกษาครั้งนี้

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผนังมดลูก โค การแสดงออกของยีน สภาวะการเพิ่มอุณหภูมิ ไลโปโพลีแซคคาไรด์