

การถ่ายทอดโปรตีนจากซีรัมเข้าสู่ไข่

อุปมา เลียงสว่างวงศ์*

Liengswangwong U. Serum proteins transmission into Oviductal eggs. Chula Med J 1986 Jun; 30 (6) : 517-523

Mice of LAC-A and LAC-G strains were superovulated and eggs were collected to immunize a guinea-pig. Antisera developed by the recipient were tested for the presence of corresponding antibodies, against both mouse egg extract antigen and normal mouse serum by the Oaklay-Fulthorp technique. Results obtained demonstrated that at least 3 precipitin bands for the titration of guinea-pig antiserum against mouse egg extract and 2 precipitin bands against normal mouse serum, were visible. According to the known passage of serum albumin and globulin from the maternal circulation to oviductal eggs when administered to the mother, it is therefore concluded that both these serum proteins of maternal origin were transmitted into the eggs by first passing through layers of follicular cells and zona pellucida in antigenically-intact forms. Antiserum tested for the specificity of the globulin transmitted, by immuno-electrophoretic analysis, yielded no result.

* สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วย น้่านมมีการถ่ายทอดของโปรตีนในซีรัม (Serum protein) จากระบบหมุนเวียนโลหิตของตัวแม่ เข้าสู่ตัวอ่อนได้ ขบวนการดังกล่าวเกิดได้ทั้งระยะ ก่อนกำเนิด (Prenatal period) โดยผ่านทางรก (Placenta) และ/หรือ ระยะหลังกำเนิด (Postnatal period) โดยผ่านทางน้ำนมแม่เหลือง (Colostrum) แต่การศึกษาต่อมาพบว่าขบวนการดังกล่าว เกิดได้ในช่วงก่อนอุบัติการณ์ของชีวิตใหม่ คือช่วง ก่อนการปฏิสนธิของไข่⁽¹⁾ อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้เป็นเรื่องที่น่าสนใจและได้มีการศึกษากันต่อมา อย่างกว้างขวาง ด้วยความหวังที่ว่าโปรตีนที่ถ่ายทอด ไปนี้หากเป็นโปรตีนที่อยู่ใน Serum globulin fraction โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดที่จำเพาะต่อการ เกิดปฏิกิริยากับ Spermatozoal antigen จะมีผล ให้เกิดความล้มเหลวต่อการปฏิสนธิ อันเป็นผล โดยตรงต่อการลดอัตราการเกิดได้⁽²⁾

การถ่ายทอด Serum protein เข้าสู่ไข่ ได้มีการศึกษากันมาแล้วด้วยวิธีการ และเทคนิคต่าง ๆ กัน Mancini และคณะ⁽³⁾ ได้ทำการศึกษาโดยวิธี Autoradiography พบว่าสามารถตรวจพบ Serum albumin ที่ฉีดให้แก่หนูแรด ภายใน Ooplasm ของไข่ซึ่งอยู่ในรังไข่ (Preovulatory egg) Glass⁽⁴⁾ เป็นคนแรกที่ศึกษาถึงปรากฏการณ์ นี้ในหนูไมซ์ โดยอาศัยวิธีการและเทคนิคทั้ง Autoradiography และ Immunofluorescent technique พบว่า Serum albumin ที่ตัวแม่ได้รับ สามารถ ถ่ายทอดผ่านเข้าสู่ Ooplasm ของไข่ได้ทั้งก่อนและ หลังการปฏิสนธิ^(1,5) แต่ผู้วิจัยขณะนี้ไม่สามารถ ตรวจพบ Serum globulin ที่หนูไมซ์ได้รับ ปรากฏ ภายใน Ooplasm ของไข่ Liengswangwong และคณะ⁽⁶⁾ จึงได้ทำการศึกษาต่อมาโดยวิธี Autoradiography ในระดับกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และ

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าสามารถตรวจพบ ได้ทั้ง Serum albumin และ Serum globulin ที่หนูไมซ์ได้รับปรากฏภายใน Ooplasm ของไข่ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงการถ่ายทอดของโปรตีน โดยเฉพาะ Serum globulin จากซีรัมตัวแม่เข้าสู่ไข่ โดยที่ไม่ให้ตัวแม่ได้รับสารตัวอย่างต่าง ๆ แต่อย่างไร ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด และเป็นจุดมุ่งหมายของการวิจัยนี้

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

หนูไมซ์ (Mice) เพศเมีย สีขาวตาแดง พันธุ์ LAC-A และ LAC-G อายุประมาณ 12 สัปดาห์ หนูตะเภา (Guinea-pig) เพศผู้ สีขาวตาแดง ที่โตเต็มวัย มีน้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม

การเตรียมไข่ (Egg extract)

เนื่องจากต้องใช้ Egg extract จำนวนมาก ดังนั้นจึงได้ทำ Superovulation โดยให้หนูได้รับ ฮอร์โมน FSH (Folligon : Organon) จำนวน 4 iu ตามด้วย LH (Chorulon : Organon) จำนวน 5 iu ในเวลา 48 ชม. ต่อมาทางช่องท้อง จากนั้น ทำให้ตายด้วยการดม Ether หรือ Chloroform ในเวลา 12 ชม. หวังได้รับ LH ผ่าตัดนำหลอด มดลูก (Oviduct) ออกแช่ใน Phosphate buffered saline (PBS) ไข่จะเก็บได้จากหลอดมดลูกส่วน Ampulla โดยใช้เข็มปลายแหลมเขี่ย Ampulla ให้ขาดออกจากกัน กลุ่มของไข่จะกระจายออกสู่ PBS ทำการย่อยสลาย Follicle cell ที่ล้อมรอบ ไข่ด้วยสารละลาย Hyaluronidase (Sigma Chemical CO.) ในความเข้มข้น 100 iu/ml ล้างไข่ 2-3 ครั้งด้วย PBS ทำการย่อยสลาย Zona pellucida ด้วยสารละลาย Pronase (Koch-Light Laboratories) ในความเข้มข้น 0.5% ใน PBS ล้าง

ไข่ด้วย PBS อีก 3 ครั้ง ไข่ที่ผ่านชั้นตอนข้างต้นแล้วจะเก็บใน PBS ปริมาณน้อยที่สุดในขวดฝาเกลียว นำแช่แข็งที่อุณหภูมิ -15°C PBS สุดท้ายที่ไข่ล้างไข่จะเก็บไว้เพื่อการทดสอบต่อไป

การเตรียม Egg extract ทุกขั้นตอน ใช้วิธีการปลอดเชื้อ (Aseptic technique)

การฉีดหนูตะเภา

ก่อนทำการฉีดนำขวด Egg extract ที่แช่แข็งมาหลอมที่อุณหภูมิห้อง เขย่าแล้วนำกลับเข้าแช่แข็ง ปฏิบัติเช่นนี้หลายครั้ง เพื่อให้ไข่ละลายออกเป็นเนื้อเดียวกับ PBS (Egg homogenate) จากนั้น จึงนำ Egg homogenate ผสมกับ Freund's complete adjuvant (Difco) ปริมาตรเท่ากัน เขย่าให้เข้ากันแล้วนำฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (Subcutaneous injection) ทางด้านหลังของหนูตะเภา โดยให้กระจายเป็นหลายจุด การฉีดครั้งแรกใช้ Egg extract ประมาณ 5000 ไข่ ในปริมาตร 2 มล. ก่อนฉีดได้เจาะเก็บตัวอย่างเลือดหนูตะเภาไว้เป็นตัวอย่าง เลือดควบคุม (Normal guinea-pig serum) ให้หนูตะเภาได้รับการฉีดซ้ำต่อไป โดยมีช่วงห่างกัน 1 เดือน และใช้ Egg extract ครั้งละประมาณ 1500 ไข่ ก่อนการฉีดแต่ละครั้งทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อใช้ทดสอบหาระดับ Antibody ต่อ Egg homogenate ด้วย

ในการทดลองนี้ หนูตะเภาได้รับการฉีด 6 ครั้ง หลังการฉีดครั้งสุดท้าย 1 เดือน ตัวอย่างเลือดทั้งหมดจะเก็บโดยการทำ Cardiac puncture ปั่นแยก serum นำแช่แข็งที่ -15°C เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

การทดสอบสารตัวอย่าง

Antibody titre ในตัวอย่างเลือดหนูตะเภา ทำการทดสอบได้โดยอาศัยเทคนิคของ gel diffusion ตามวิธีการของ Oakley - Fulthorp tech-

nique (O-F technique) ซึ่งดัดแปลงโดย Morris⁽⁷⁾

การทดลองใช้หลอดแก้ว ที่มีรูกลวงกว้าง ประมาณ 2 มม. ตัดเป็นท่อนยาวประมาณ 5 ซม. หยอด Antigen หรือ Antibody ในปริมาตรเท่ากันเข้าไปในรูกลวงทางปลายทั้งสองข้างของหลอดแก้ว ซึ่งมีแท่งวุ้น (0.6% Oxoid Ionagar, Oxoid) อยู่ จากนั้นปิดปลายทั้งสองข้างด้วยขี้ผึ้ง วางหลอดแก้วในแนวนอนบนพื้นราบ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นจึงอ่านผลปฏิกิริยาของการทดสอบอ่านได้จาก แถบตะกอน (Precipitin band) ที่เกิดขึ้นภายในแท่งวุ้นในหลอดแก้ว

ในการทดลอง ได้ทำการทดสอบสารตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 1

เพื่อให้ทราบถึงความจำเพาะของสารตัวอย่าง ใน Egg homogenate และ Normal mouse serum ที่เกิดปฏิกิริยากับ Antiserum ของหนูตะเภา จึงนำสารตัวอย่างมาทดสอบด้วยวิธี Immunoelectrophoresis

ในการทดลองได้ทำการทดสอบสารตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 2

ผล

Antiserum จากหนูตะเภานำมาทดสอบกับ Egg extract และ Normal mouse serum ตัวอย่างเลือดใดให้ผลเป็น Positive result จะทำการเจือจางสารตัวอย่างนั้นลงไปกึ่งหนึ่งไปเรื่อย ๆ (Half-serial dilution) แล้วนำทดสอบในทำนองเดียวกัน

ผลจากการทดสอบด้วยวิธี O-F technique พบว่า Antiserum จากหนูตะเภาที่ฉีดด้วย Egg homogenate 6 ครั้งแรก ให้ผลเป็น Negative result ของปฏิกิริยา คือไม่เกิดแถบตะกอนแต่อย่างใด Antiserum ที่เจาะเก็บครั้งต่อ ๆ ไป ได้ให้เป็น

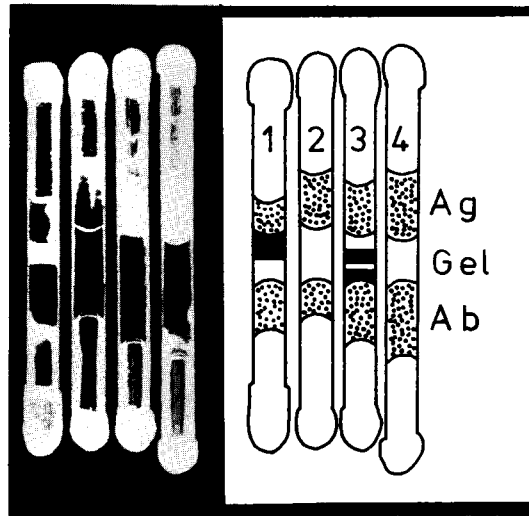


Figure 1 The illustration of the O-F titration of the following antigen (Ag) and antibody (Ab) :

No. of glass tubing	Antigen (Ag)	Antibody (Ab)
1	mouse egg extract	guinea-pig antiserum
2	mouse egg extract	normal guinea-pig serum
3	normal mouse serum	guinea-pig antiserum
4	egg washing	guinea-pig antiserum

กับ Egg extract หรือ Normal mouse serum ด้วยวิธี O-F technique เช่นกับพบว่า ไม่พบแถบตะกอนภายในหลอดแก้ว

การวิเคราะห์เพื่อตรวจหาความจำเพาะของสารตัวอย่างภายใน Egg extract และ Normal mouse serum กับ Antiserum หนูตะเภา โดยวิธี Immunoelectrophoresis พบว่าไม่สามารถตรวจพบแนวตะกอน (Precipitin line) ของปฏิกิริยาแต่อย่างใด

สรุปและวิจารณ์ผล

การทดสอบด้วยวิธี O-F technique ระหว่าง Antiserum หนูตะเภา และ Egg extract ในการฉีดครั้งแรก ๆ ไม่ให้ผลในการตรวจหาปริมาณ antibody ใน antiserum ทั้งนี้อาจเกิดจากสาเหตุที่ว่า Ag ใน Egg extract ที่ให้แก่หนูตะเภา นั้น มีปริมาณน้อยมากเกินกว่าที่จะสามารถชักนำให้หนูตะเภาสร้าง corresponding antibody ได้ หรือมิฉะนั้น อาจเกิดจากความเฉื่อยในการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย Ag ของหนูตะเภาที่ใช้ อย่างไรก็ตามเมื่อได้รับการกระตุ้นซ้ำด้วย Egg extract ในครั้งต่อ ๆ ไป หนูตะเภาสามารถผลิต antiserum ที่ตอบสนองต่อ Egg extract ได้

ในการทดสอบปฏิกิริยาระหว่าง Antiserum หนูตะเภา และ Egg extract โดยวิธี O-F technique พบแถบตะกอนอย่างน้อย 3 หรือมากกว่า แสดงว่าหนูตะเภาได้รับ Ag เข้าไปอย่างน้อย 3 ชนิด ซึ่งเข้าใจว่า Ag ดังกล่าวนี้น่าจะมาจาก Egg extract ที่ได้รับเข้าไป มิได้มาจากสิ่งแปลกปลอมที่ปะปนเข้าไปกับ Egg extract ที่ให้ ทั้งนี้เพราะว่าเมื่อให้ Antiserum ดังกล่าวทดสอบปฏิกิริยากับ PBS สุดท้ายที่ใช้ล้างไข่ในช่วงเตรียม Egg extract นั้น ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาแต่อย่างใด

การทดสอบปฏิกิริยาของ Antiserum หนูตะเภาต่อ Normal mouse serum โดยใช้ O-F technique เช่นกัน พบว่า ตรวจพบแถบตะกอนอย่างน้อย 2 แถบ แสดงว่าโปรตีนใน Egg extract ที่ฉีดแก่หนูตะเภา นั้น จะต้องมีส่วนที่เป็นสารชนิดเดียวกัน หรืออย่างน้อยเป็นสารที่มีโมเลกุลที่คล้ายกันกับโปรตีนใน Normal mouse serum ซึ่งผลการทดลองนี้ได้รับการสนับสนุนจากรายงานของ Glass and Hansan⁽⁸⁾ ที่ใช้การวิเคราะห์ด้วยวิธี Immunoelectrophoresis ทดสอบปฏิกิริยาระหว่าง Antiserum ต่อ Cumulus-oocyte mass กับ Mouse serum พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ เนื่องจากผลการทดลองของ Liengswangwong และคณะ⁽⁶⁾ โดยวิธี Autoradiographic technique ตรวจพบทั้ง Serum albumin และ Serum globulin ใน Ooplasm ของไข่ หลังจากฉีดให้แก่หนูไมซ์ และผลการทดลองของ Mancini และคณะ⁽³⁾ และผู้วิจัยคณะอื่น^(1,5) โดยใช้วิธีการและเทคนิคต่าง ๆ กันตรวจพบการถ่ายทอดผ่านของ Serum albumin จากซีรัมตัวแม่สู่ไข่ จึงเป็นไปได้ที่ว่าแม้ผลจากการทดลองนี้พบแถบตะกอนสองแถบปรากฏอย่างแจ่มแจ้ง แต่แถบตะกอนดังกล่าวต้องเกิดจากปฏิกิริยาของ Serum albumin และ Serum globulin นอกจากนี้ Serum protein ทั้งสองที่มีอยู่ใน Egg extract แล้วกระตุ้นให้หนูตะเภาสร้าง Corresponding antibody ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ Normal mouse serum ได้ นี้ ต้องมีที่มาจาก Serum ของหนูไมซ์นั่นเอง โดยการซึมจากระบบหมุนเวียนโลหิตตัวแม่ผ่านชั้นของ Follicle cell และ Zona pellucida สู่ Ooplasm.

เป็นที่น่าเสียดาย ที่การวิเคราะห์ถึงความจำเพาะของ Serum protein โดยวิธี Immunoelectrophoresis ไม่ให้ผลในการทดลอง อาจ

เนื่องจากว่าความเข้มข้นของ Antigen คือ Egg extract และ Antibody คือ Antiserum หนูตะเภาที่ใช้ในปฏิกิริยาการทดสอบมีค่าต่ำมาก เกินกว่าความไวของการทดสอบด้วยวิธีการนี้ สามารถตรวจพบได้

จากผลการวิจัยนี้ จึงพอสรุปได้ว่า แม้ผลการวิเคราะห์โดยวิธี Immunoelectrophoresis จะไม่ยืนยันผลในการทดลอง แต่การวิเคราะห์ด้วยวิธี gel diffusion ก็พอจะยืนยันได้ว่ามีโปรตีนในซีรัม 2 ชนิด คือ Serum albumin และ Serum globulin ถ่ายทอดผ่านจากระบบหมุนเวียนโลหิต

อ้างอิง

1. Glass LE. Transmission of maternal proteins into oocytes. In : *Advances in the Biosciences* 1971; 6 : 29
2. Brambell FWR. *The Transmission of Passive Immunity from Mother to Young*. Amsterdam : North-Holland Publishing, 1970.
3. Mancini RE, Vilar O, Heinrich JJ, Davison OW, Alvarez B. Transference of circulating labeled serum proteins to the follicle of the rat ovary. *J Histochem Cytochem* 1963 ; 11:80
4. Glass LE, Cons JM. Stage dependent transfer of systemically injected foreign protein antigen and radiolabel into mouse ovarian follicles. *Anat Rec* 1968 Oct; 162 : 139-156
5. Glass LE, Hanson JE. Molecular specificity in serum antigen transfer to mouse embryos cleaving in vivo. In : Hemming WA. *Materno-Foetal Transmission of Immunoglobulins*. Cambridge : Cambridge University Press, 1976, 299.

ตัวแม่ ในลักษณะที่คงสภาพของโมเลกุลเดิมที่มีคุณสมบัติในการชักนำให้สร้าง Antibody (Antigenically-intact from) เข้าสู่ไข่ ในช่วงก่อนการปฏิสนธิ และอยู่ในช่วงต้นของหลอดมดลูก

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ Dr. IG Morris, University of Wales, U.K ที่ได้ให้คำแนะนำปรึกษา ตลอดจนความคิดเห็น ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ และ ภาควิชาสัตวศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ใช้สถานที่และอุปกรณ์บางอย่างในการทำวิจัยตลอดโครงการนี้

6. Liengswangwong U, Morris IG. Transmission of circulating IgG into preovulatory mouse eggs. *J Reprod Immunol* 1980 Nov; 2 (4) : 225-233
7. Morris IG. The transmission of antibodies and normal gammaglobulins across the young mouse gut. *Proc R Soc (Biol)* 1964 May 19; 160: 276-292
8. Glass LE, Hanson JE. An immunologic approach to contraception : localization of antiembryo and antizona pellucida serum during mouse preimplantation development. *Fertil Steril* 1974 May ; 25 (5) : 484-493
9. Rafferty KA. *Methods in Experimental Embryology of the Mouse*. Baltimore : The Johns Hopkins Press, 1970.
10. Sellens MH, Jenkinson EJ. Permeability of the mouse zone pellucida to immunoglobulin. *J Reprod Fertil* 1975 Jan; 42 (1) : 153-157
11. Weir DM. *Handbook of Experimental Immunology*. 2 ed Oxford : Blackwell Scientific Press, 1973