

ความสัมพันธ์ของอะพอพอโทซิสในเซลล์แกรนูโลซ่าต่อคุณภาพโอโอไซต์ของสุกร  
The Regulation of Apoptosis in Granulosa Cell to Quality of Porcine Oocytes

กรรณิการ์ วงษ์พานิชย์<sup>1</sup>

บทคัดย่อ

อะพอพอโทซิสเป็นรูปแบบหนึ่งของการเสื่อมสลายของเซลล์ ที่เกิดขึ้นตามปกติในขั้นตอนของการเจริญพัฒนาของเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เซลล์จะมีลักษณะหดตัว ผนังเซลล์โป่งพอง โครมาตินจับตัวแน่นและมีการแตกเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ในสุกรพบว่าเซลล์แกรนูโลซ่าของอะทริติกฟอลลิเคิลร้อยละ 99 มีรูปแบบการเสื่อมสลายของเซลล์แบบอะพอพอโทซิส ลักษณะทางชีวเคมีและสัณฐานวิทยาของอะพอพอโทซิสพบได้ในเซลล์แกรนูโลซ่าของอะทริติกฟอลลิเคิล และยังคงมีการศึกษาการกระตุ้นอะพอพอโทซิสและวิถีของสัญญาณภายในเซลล์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แกรนูโลซ่า ปัจจุบันมีการค้นพบปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ในอะทริติกฟอลลิเคิล เช่น Fas ligand (FasL) และ Fas, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  และ receptors (TNFRs), (TRAIL) และ receptors การศึกษากลไกการตายแบบอะพอพอโทซิสระดับโมเลกุลในเซลล์แกรนูโลซ่าของสุกรนี้จัดเป็นข้อมูลสำหรับการประเมินประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์และคุณภาพของโอโอไซต์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ในสุกร

คำสำคัญ : อะพอพอโทซิส เซลล์แกรนูโลซ่า

Apoptosis is a program of cell death that plays a significant role in almost tissue development and homeostasis of the organism. The characteristics of apoptosis are membrane blebbing, chromatin condensation and DNA fragmentation. During follicular growth and development, more than 99% of follicles disappear, mainly due to apoptosis of granulosa cells in porcine. Both biochemical and morphological characteristics of apoptosis were observed in granulosa cells of atretic follicles. Apoptotic stimuli and intracellular signal transduction pathways involved in the apoptosis of granulosa cells remain to be determined. To date, many apoptosis related factors have been associated in follicular atresia, including death ligands and receptors, Fas ligand (FasL) and Fas, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and its receptors (TNFRs), (TRAIL) and its receptors. The study of molecular mechanism in porcine granulosa cell apoptosis is data for estimate the reproductive performance and oocyte quality, and could be used for improve the reproductive efficiency and porcine breeding.

Keywords : apoptosis, granulosa cell

<sup>1</sup> อาจารย์, สาขาทรัพยากรเกษตรชีวภาพ คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร ต.เชิงเคอ อ.เมือง จ.สกลนคร 47000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำนำ

การศึกษาด้านระบบสืบพันธุ์ของสัตว์มีความสำคัญมากในด้านปศุสัตว์ บทบาทของระบบสืบพันธุ์คือเพื่อการดำรงเผ่าพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ และเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต ดังนั้นการศึกษาจึงเกิดขึ้นอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับหน้าที่และกลไกการทำงานของระบบสืบพันธุ์ เช่น การเจริญของฟอลลิเคิล การตกไข่ และการเสื่อมสลายของคอร์ปัสลูเทียม เป็นต้นระหว่างที่มีการพัฒนาและการเจริญของโอโอไซต์ มีเพียงประมาณร้อยละ 1 เท่านั้นที่จะถูกคัดเลือกและเกิดการตกไข่ต่อไป (Manabe *et al.*, 2003) จำนวนไข่ที่ตกมีความเกี่ยวข้องกับพันธุกรรมสัตว์ คุณภาพอาหาร และสภาพสิ่งแวดล้อม ซึ่งเรียกว่า “อัตราการตกไข่” อัตราการตกไข่นี้มีความสำคัญในการชีวิตประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์ของสัตว์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสุกร และเป็นปัจจัยที่มีผลต่อจำนวนลูกต่อครอก นอกจากปัจจัยจากอัตราการตกไข่แล้ว จำนวนลูกต่อครอกหรือผลิตผลยังขึ้นอยู่กับความพร้อมของมดลูกในช่วงการตั้งท้องและความสมบูรณ์ในการพัฒนาตัวอ่อนด้วย นักวิจัยหลายท่านได้ทำการศึกษาและวิจัยปัจจัยที่มีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่ออัตราการตกไข่ เช่น มีจำนวนฟอลลิเคิลเท่าไรที่เกิดการตายและเสื่อมสลายไปในระหว่างการเกิดขบวนการอะทรีเซีย (Atresia) และมีความสัมพันธ์อย่างไรกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) — อะพอพโทซิสเป็นรูปแบบหนึ่งของการตายของเซลล์แบบมีโปรแกรมไว้แล้ว (programmed cell death) ของสิ่งมีชีวิต มีลักษณะที่เฉพาะคือ มีการบวมของเซลล์ เปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ นิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน โครมาตินหนาตัวขึ้น และดีเอ็นเอแตกเป็นท่อน กระบวนการกำจัดเศษซากเซลล์จะไม่ทำให้เกิดการกระตุ้นให้เนื้อเยื่อข้างเคียงเกิดความเสียหายซึ่งแตกต่างจากการตายแบบการตายเฉพาะส่วนหรือเนโครซิส (necrosis) (Nakayama *et al.*, 2000; Tilly, 1996; Hughes and Gorospe, 1991)

การเกิดขบวนการอะทรีเซียในรังไข่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีลักษณะของเซลล์แกรนูโลซา (granulosa cell) เกิดอะพอพโทติก บอดี้ (apoptotic bodies) ผนังของแกรนูโลซาลอกหลุด จากนั้นที่เบซัลเมมเบรน (basal membrane) เริ่มแตกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ (cell debris) และพบแมคโครฟาจ (macrophages) ที่บริเวณสโตรมา (stromal area) ของรังไข่และในแอนทรัมของฟอลลิเคิล (antrum of the follicle) จนในที่สุดฟอลลิเคิลก็เสื่อมสลายไป การเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของเซลล์แกรนูโลซา ในระยะเริ่มต้นของอะทรีเซีย (early of Atresia) เป็นการทำงานของกลไกอะพอพโทซิส อย่างไรก็ตามไม่เพียงแต่เกิดขึ้นที่เซลล์แกรนูโลซาเท่านั้นการเกิดอะพอพโทซิสยังพบได้ในระยะการเจริญและพัฒนาของคอร์ปัสลูเทียมได้ด้วย (McCormack *et al.*, 1998; Okano *et al.*, 2006)

## การพัฒนาของฟอลลิเคิล

ระหว่างการพัฒนาของตัวอ่อน ไพมอดีลเจิมเซลล์ (primordial germ cell) เคลื่อนที่จากบริเวณถุงไข่แดง (yolk sac) มายังบริเวณไฮด์กัท (hind gut) ถึง genital ridge หลังจากการแบ่งตัวแบบไมโอซิสครั้งที่ 1 (meiotic division) ที่เกิดขึ้นในไพมอดีลเจิมเซลล์ จากนั้นไพมารีโอโอไซต์ (primary oocyte) เริ่มเรียงตัวในระยะ diplotene ของไมโอซิสและอยู่ในฟอลลิเคิลแล้วเจริญเป็นไพมอดีลฟอลลิเคิล (primordial follicles) มีการพัฒนาและเจริญต่อไปจนถึงระยะการตกไข่ (ovulation) หลังจากการคลอดแล้วจะพบ 5 ล้านไพมอดีลฟอลลิเคิลในรังไข่ของสุกร ต่อมาในช่วงชีวิตที่เริ่มมีการสืบพันธุ์ของสุกรมีเพียงประมาณ 1,600 โอโอไซต์หรือประมาณ 0.14% ของไพมอดีลฟอลลิเคิลเท่านั้นที่จะเกิดการตกไข่ (Black and Erickson, 1968) ส่วนที่เหลือจะเสื่อมสลายไป ดังนั้นโอโอไซต์ที่จะเกิดการตกไข่จึงมีความสัมพันธ์กับการเกิดการตายของไพมอดีลฟอลลิเคิลและคุณภาพของโอโอตส์ส่งผลต่อความสำเร็จด้านการสืบพันธุ์ของสุกร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ฟอลลิคูลา อะทรีเซีย (follicular atresia)

ก่อนที่จะมีการกล่าวถึง cell death ligand และ receptor ที่เป็นปัจจัยทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส เพื่อให้เกิดความเข้าใจยิ่งขึ้นผู้เรียบเรียงจะอธิบายการเจริญพัฒนาและการเกิดอะทรีเซียของฟอลลิเคิลฟอสซิงเขปกล่าวคือ โฟโมเดียมฟอลลิเคิลในสุกรใช้เวลา 84 วัน ในการพัฒนาไปเป็นฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์หรือกราฟิเนียนฟอลลิเคิล (graafian follicle) และหลังจากนั้น 19 วัน จะเจริญเติบโตและขยายขนาดขึ้นอีกประมาณ 10 มิลลิเมตร (Morbeck *et al.*, 1992) ในขบวนการคัดเลือกฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์จะเริ่มตั้งแต่วันที่ 13 และ 14 ของวงรอบการเป็นสัดของสุกร (Clark *et al.*, 1982) ระยะการเจริญของฟอลลิเคิลสมบูรณ์ในขั้นสุดท้ายและพร้อมที่จะตกไข่จะมีขนาดประมาณ 3 ถึง 10 มิลลิเมตร หรือมีขนาดขยายเพิ่มเฉลี่ยประมาณ 1.14 มิลลิเมตรต่อวัน (Dailey *et al.*, 1976) และในวันที่ 16 ของวงรอบการเป็นสัด ฟอลลิเคิลเข้าสู่ระยะที่ 3 (tertiary follicle) มีประมาณ 160 ถึง 200 ใบเจริญในรังไข่ หลังจากนั้น 150-190 ใบ จะเสื่อมสลายไป ซึ่งขั้นตอนนี้เรียกว่า อะทรีเซียดัง Figure 1 (Guthrie *et al.*, 1995) ซึ่งจะเกิดขึ้นได้ตลอดเวลาในระหว่างที่มีการพัฒนาและเจริญของฟอลลิเคิล และส่วนใหญ่จะฝ่อหรือเสื่อมก่อนจะมีขนาด 6 มิลลิเมตรในสุกร (Foxcroft and Hunter, 1985; Morbeck *et al.*, 1992) จนในวันที่ 21 ของวงรอบการเป็นสัด มีอัตราการตกไข่โดยเฉลี่ยประมาณ 10 ใบ อย่างไรก็ตามอัตราการตกไข่ยังมีความสัมพันธ์กับพันธุ์ของสุกรด้วย เช่นสุกรหมยซานซึ่งเป็นสุกรพื้นเมืองของประเทศจีน มีอัตราการตกไข่สูงที่สุดประมาณ 30 ใบ และมีอัตราลูกดกมากกว่าสุกรในสายพันธุ์ยุโรป (Miller *et al.*, 1998) นอกจากนี้อัตราการตกไข่ยังมีความสัมพันธ์กับการพัฒนาและการเสื่อมสลายของฟอลลิเคิลด้วย

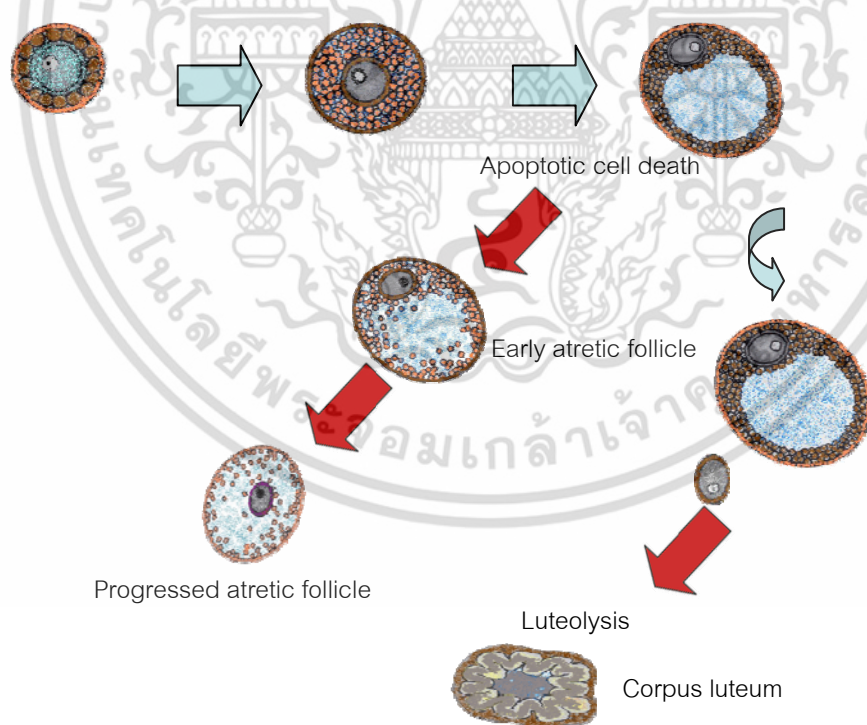


Figure 1 Schematic illustration of growth and development of mammalian follicle, follicular atresia, luteogenesis and luteolysis. (Matsuda-Minehata *et al.*, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### อะพอพโทซิสในเซลล์แกรนูโลไซ์ (Apoptosis in Granulosa cell)

การพัฒนาและเจริญของฟอลลิเคิลในสุกร ร้อยละ 99 ของฟอลลิเคิลทั้งหมดจะเสื่อมสลายไป มีเพียงประมาณ ร้อยละ 1 เท่านั้นที่จะเจริญเติบโตเต็มที่และเข้าสู่ภาวะการตกไข่ต่อไป ฟอลลิคูลา อะทริเชีย จะถูกชักนำให้เกิดขึ้นโดย ขบวนการอะพอพโทซิสในเซลล์แกรนูโลไซ์ โดยเซลล์เกิดการสูญเสียปริมาตร (loss of cell volume) เยื่อหุ้มเซลล์หดแฟบ (plasma membrane blebbing) นิวเคลียสรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) โครมาตินเกาะกลุ่ม (chromatin aggregation) และดีเอ็นเอถูกย่อยเป็นชิ้นเล็ก (endonucleocytic degradation of DNA into nuclear-somal fragments) (Nakayama *et al.*, 2000; Tilly, 1996; Hughes and Gorospe, 1991) การเกิดอะพอพโทซิสในเซลล์แกรนูโลไซ์ ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในกลุ่มนักวิจัย รายงานการเกิดอะพอพโทซิสในสุกรพบว่ามีความสัมพันธ์กับวิถีของ death ligand และ receptors เช่น Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  และ receptors, Fas-ligand และ receptors, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) และ receptors ในบางเซลล์ death ligand-receptor จะมี "decoy" เพื่อจับกับ ligand และชักนำให้เกิดอะพอพโทซิสในเซลล์แกรนูโลไซ์ได้ โดยทั่วไปการตายของเซลล์สามารถจำแนกได้ 3 แบบ แบบที่เกิดขึ้นในเซลล์แกรนูโลไซ์จัดเป็นแบบที่ 2 (Type II apoptosis cell) หรือวิถีที่มีไมโทคอนเดรียกับอะพอพโทซิสเป็นตัวกลาง (Manabe *et al.*, 2003) ดัง Figure 2

อะพอพโทซิสมีการควบคุมอยู่ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ทำให้เกิดการตายและกลุ่มที่ยับยั้งการตาย ซึ่งการทำงานของทั้งสองจะเกิดขึ้นในร่างกายของสิ่งมีชีวิต แต่การเกิดขึ้นน้อยเกินไปอาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งในขบวนการเกิดมะเร็งได้ (Lee and Bernstein, 1995) ในทางตรงกันข้ามหากมีการกระตุ้นให้เกิดการตายมากเกินไปก็จะเป็นสาเหตุของการเกิดโรคได้เช่นกัน เช่น โรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น (Vito *et al.*, 1996; De La Monte *et al.*, 1997)

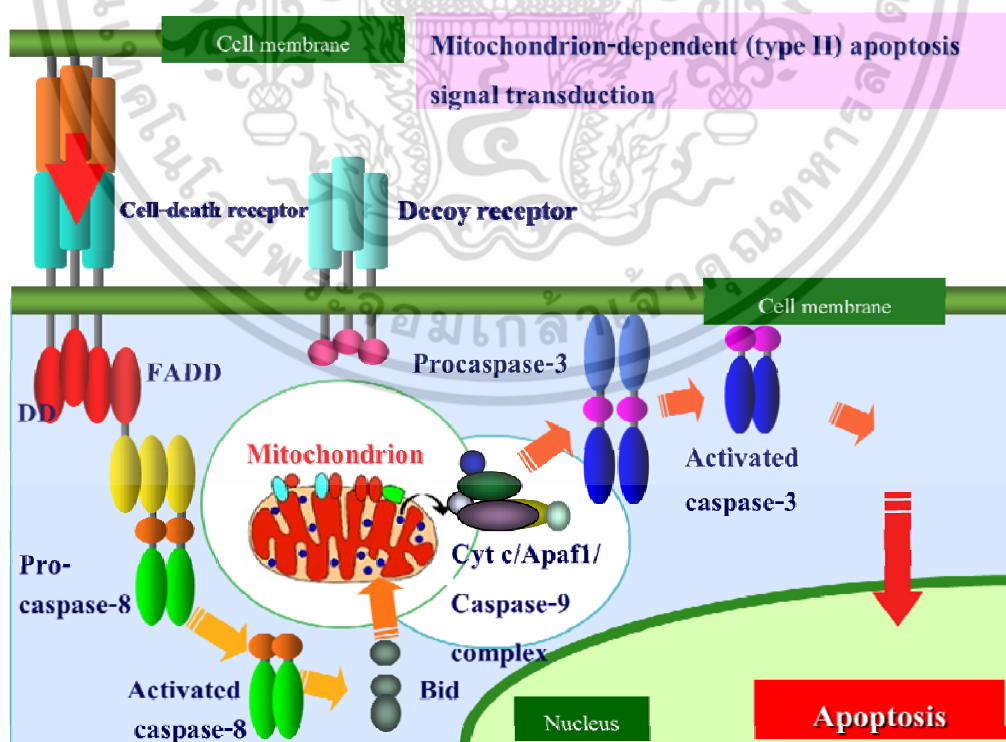


Figure 2 Mitochondrion-dependent (type II) apoptosis signal transduction. (Manabe *et al.*, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### วิธีการเกิดอะพอพโทซิสในเซลล์แกรนูโลไซท์ของสุกร เริ่มจาก

1. cell death ligand จับกับ cell death receptor ที่ประกอบด้วย death domain (DD)
2. DD ของ cell death receptor ทำปฏิกิริยากับ DD ของ adaptor protein (Fas-associated death domain: FADD)
3. FADD ทำงาน และเกิดการ ทำงานของ procaspase -8 หรือ FLICE
4. procaspase-8 เริ่มมีการแบ่งตัวแล้ว Bid-protein หลังจากไซโตโครมซีของไมโทคอนเดรีย ไซโตโครมซีและ ATP อีสาระของ apoptotic protease-activating factor-1 หรือ Apaf -1 เกิดการรวมตัวกันของไซโตโครมซี, Apaf -1 และ pro-caspase -9 เป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนเรียกว่า อะพอพโทโซม (apoptosome) ทำให้ pro-caspase -9 สามารถแยกย่อยให้เป็นเอนไซม์ที่พร้อมทำงานก็คือ caspase 9 จากนั้นกระตุ้น effector caspases ให้ทำงานและเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดอะพอพโทซิส ขึ้นดัง Figure 2 ในระบบสืบพันธุ์การเสื่อมสลายของเซลล์แกรนูโลไซท์ หรืออะทรีเซียในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สามารถอธิบายโดยการเกิดอะพอพโทติกเซลล์ในเซลล์แกรนูโลไซท์ได้ (Nakayama *et al.*, 2000; Tilly, 1996; Hughes and Gorospe, 1991) นักวิจัยได้ทำการศึกษาทั้งด้านเนื้อเยื่อวิทยา เซลล์วิทยา และชีวเคมี เพื่อหาความสัมพันธ์การเกิดเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสกับการเสื่อมสลายของฟอลลิเคิล โดยวิธี terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated biotinylated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling (TUNEL) และศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ผลการศึกษาพบว่า ในฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์ (healthy follicle) ไม่พบอะพอพโทติกเซลล์ในเซลล์แกรนูโลไซท์ ส่วนในระยะเริ่มต้นของอะทรีติกฟอลลิเคิล (Early stage of atresia) พบเซลล์อะพอพโทติก ที่บริเวณด้านในของผนังฟอลลิเคิล และในระยะสุดท้ายของอะทรีติกฟอลลิเคิล (late stage of atresia) ก็พบเซลล์อะพอพโทติกเป็นจำนวนมากที่ผนังด้านในของฟอลลิเคิล (Maeda *et al.*, 2007)

Cell death ligand และ receptor ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอะพอพโทซิสในเซลล์แกรนูโลไซท์ ได้แก่

#### Fas ligand และ Fas system

Fas Ligand (FasL หรือ Apo1L หรือ CD95L) และ Fas (Apo 1 หรือ CD95) จัดอยู่ในแฟมิลีของโปรตีนที่มีโครงสร้างคล้ายกับ TNF ที่สามารถชักนำให้เกิดอะพอพโทซิสในหนูเรท FasL และ Fas system มีความสัมพันธ์การเกิดอะพอพโทซิสในเซลล์แกรนูโลไซท์และเซลล์ลูเทียม (Juengel *et al.*, 1993; Guthrie *et al.*, 1995; Sakamaki *et al.*, 1997) FasL เป็นตัวกลางที่สำคัญในการกระตุ้น T-lymphocyte และ NK cell และชักนำให้เกิดอะพอพโทซิสในเซลล์เป้าหมาย

การแสดงออกของ FasL และ Fas ในเซลล์แกรนูโลไซท์มีรายงานในสัตว์หลายชนิด เช่น มนุษย์ หนู โค และสุกร ทั้ง FasL และ Fas มีการแสดงออกในเซลล์แกรนูโลไซท์และอะพอพโทซิสสามารถถูกชักนำโดย FasL และ Fas ได้ (Yonehara *et al.*, 1989; Ellis *et al.*, 1991; Inoue *et al.*, 2003) ในมนุษย์พบการแสดงออกของ Fas ในระยะต้นของอะทรีเซียและสูงขึ้นในระยะอะทรีเซีย (Cohen, 1997)

#### TNF $\alpha$ และ TNF receptor

TNF $\alpha$  สามารถชักนำให้เกิดทั้งเซลล์ตาย (cell death) และเซลล์มีชีวิต (cell proliferation) และสามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้งกับ TNF receptor (TNFR)-1 และ TNFR2 โดยเกิดวิถีขึ้นตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. TNFR  $\alpha$  จับบริเวณ extracellular ของ TNFR1 ที่ประกอบด้วย death domain (DD)
2. ภายในเซลล์ DD ของ receptor เข้าทำปฏิกิริยากับ DD ของ adaptor protein (TNF receptor-เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

associated death domain protein: TRADD)

3. DD ของ TRADD จับกับ DD ของ adaptor protein ชนิดอื่นคือ FADD (Fas-associated death domain protein)

4. FADD กระตุ้นการทำงานของ procaspase-8 แล้วชักนำให้เกิดอะพอพโทซิสในทางตรงกันข้ามเมื่อ TNF $\alpha$  แสดงเป็นกลุ่มที่ยับยั้งการเกิดอะพอพโทซิส ในวิถีภายในเซลล์ด้วย TNFR1 เกิดขบวนการดังนี้

1. TNF $\alpha$  จับบริเวณ extracellular ของ TNFR1 ที่ประกอบด้วย death domain (DD)

2. ภายในเซลล์ของ DD ของ receptor เข้าทำปฏิกิริยากับ DD ของ adaptor protein

(TNF receptor-associated death domain protein: TRADD)

3. TRADD บริเวณ DD จับกับ DD ของ receptor interacting protein (RIP)

4. RIP ทำปฏิกิริยากับ TNF receptor-associated factors (TRAF2)

5. จากนั้นเกิดปฏิกิริยาของ TNFR2 ด้วย nuclear factor (NF)-KB แล้วเกิดการแสดงออกของยีนที่ยับยั้งการเกิดอะพอพโทซิส

TRADD และ RIP จึงเป็นกุญแจสำคัญที่อยู่ในขั้นตอนของ TNFR1 signaling process และ TNFR2 เป็นตัวชี้วัดที่ดีของ TNF $\alpha$ -dependent cell proliferation

วิถีภายในของ TNFR2 มีขั้นตอนดังนี้

1. TNF $\alpha$  จับกับ extracellular domain ของ TNFR2

2. TRAF2 ไม่สามารถจับโดยตรงกับ TNFR1 แต่ TRAF2 สามารถจับโดยตรงกับ TNFR2 จากนั้นเกิดปฏิกิริยาระหว่าง TNFR2 กับ TRAF2

3. NF-KB ถูกกระตุ้น แล้วเกิดการแสดงออกของยีนได้ทั้งกลุ่มกระตุ้นเซลล์ซึ่งมีชีวิตหรือยับยั้งการเกิดอะพอพโทซิส (Nakayama *et al.*, 2000)

ในการเลี้ยงเซลล์แกรนูโลไซต์ที่เตรียมจากฟอลลิเคิลที่มีแอนทรม์ (antral follicle) ขนาดใหญ่ของรังไข่ในสุกรพบว่า TNF $\alpha$  สามารถชักนำให้เกิดเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายได้ (Prange-Kiel *et al.*, 2001) อย่างไรก็ตามยังไม่มีที่ยืนยันได้อย่างชัดเจนว่า TNF $\alpha$  เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสหรือปัจจัยที่ทำให้เซลล์มีชีวิต

นอกจากนี้ มีการศึกษา TNFR2 และ TRAF2 ในฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์ พบว่า TNF $\alpha$  และ TRAF2 mRNAs ตรวจพบที่บริเวณผนังด้านนอกของเซลล์แกรนูโลไซต์และไม่พบเซลล์อะพอพโทติก ส่วนอะทรีติกฟอลลิเคิลในระยะเริ่มต้น (Early atretic stage) มีการติดสีของ TRAF2 และระดับ mRNA ต่ำ และการแสดงออกของ TNFR2 ลดลงในตำแหน่งที่พบอะพอพโทซิส นอกจากนี้ยังพบว่า TNFR1 ติดสีจาง นั้นแสดงว่า TNF $\alpha$  และ receptor และ TNFR2 เป็นโปรตีนหลักที่พบในเนื้อเยื่อของรังไข่ และเป็นตัวสำคัญในการชักนำสัญญาณการมีชีวิต (survival signals) ของเซลล์แกรนูโลไซต์ ในระหว่างที่มีการพัฒนาฟอลลิเคิลของสุกร (Manabe *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2007)

#### TRAIL และ TRAIL-receptor

TRAIL มีความสัมพันธ์กับอะพอพโทซิส หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งคือ Apo2L มีหน้าที่และลำดับอะมิโนคล้ายกับ FasL และ TNF $\alpha$  ซึ่งพบการแสดงออกในหลายอวัยวะในร่างกาย TRAIL จะทำปฏิกิริยากับ receptor ในกลุ่มของ TNFR (Golstein, 1997; Inoue *et al.*, 2003) การศึกษาใน *in vitro* พบว่า TRAIL สามารถชักนำให้เกิดอะพอพโทซิสและเซลล์มีชีวิตได้ (Nagata *et al.*, 1997; Golstein, 1997; Schulze-Osthoft, 1998; Ashkenazi and Dixit, 1998) ในวิถีการเกิด

เซลล์ตายมีความสัมพันธ์ของ TRAIL และ TRAILRs คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. TRAIL จับกับ receptor ของ DR4 (TNF-related apoptosis-inducing ligand; TRAILR1) หรือ DR5 (TRAILR2) ที่ extracellular domain
2. Intracellular DD ของ receptor ทำปฏิกิริยากับ DD ของตัวจับอะพอพโทซิส (adaptor protein) หรือ TRADD
3. DD ของ TRADD จับกับ DD ของตัวจับโปรตีนอื่นอีกเช่น FADD
4. FADD จับกับ procaspase-8

5. เกิดการกระตุ้น caspase cascade แล้วชักนำให้เกิดอะพอพโทซิสขึ้นภายในเซลล์

ส่วนวิถีสัญญาณของเซลล์สิ่งมีชีวิต (cell proliferation signal pathway) เกิดขึ้นตามลำดับดังนี้

1. TRAIL จับกับ extracellular domain ของ DR4 หรือ DR5
2. Intracellular DD ของ receptor จับกับ DD ของ proliferation – adaptor protein หรือ RIP
3. DD ของ RIP จับกับ DD ของ receptor
4. NK-KB ถูกกระตุ้น แล้วเกิดการแสดงออกของยีนทำให้เซลล์มีชีวิต

และพบว่า intracellular adaptor protein (TRADD และ RIP) เป็นโปรตีนสำคัญที่เป็นจุดเปลี่ยนของ cell death และ cell proliferation และการแสดงออกของ TRADD เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีของ TRAIL (Manabe *et al.*, 2007)

นอกจากนี้ที่หมักวิจัยและผู้เรียบเรียง พบว่าการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในเซลล์แกรนูโลไซตมีความสัมพันธ์กับตัวยับยั้งการทำงานของ procaspase-8 และ procaspase-9 ในรังไข่สุกร (Matsuda-Minehata *et al.*, 2007; Matsuda-Minehata *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2008) เช่น cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP) cFLIP มีโครงสร้างที่คล้ายกับ procaspase-8 มี 2 ลักษณะ คือ ลักษณะสั้น (cFLIP short form หรือ cFLIP<sub>s</sub>) และลักษณะยาว (cFLIP long form หรือ cFLIP<sub>l</sub>) แต่ทำหน้าที่ตรงข้ามกับ procaspase-8 คือเป็นโปรตีนที่ยับยั้งการเกิดอะพอพโทซิส (Goto *et al.*, 2004) การแสดงออกของ cFLIP ในเซลล์แกรนูโลไซตของสุกรพบว่า cFLIP<sub>l</sub> มีการแสดงออกสูงในเซลล์แกรนูโลไซตของฟอลลิเคิลที่ความสมบูรณ์และลดลงในช่วงที่มีการสลายตัวของฟอลลิเคิล และมีการแสดงออกน้อยในอะทริติกฟอลลิเคิล (Matsuda-Minehata *et al.*, 2005) และยังพบว่า x-linked inhibitory of apoptosis protein (XIAP) มีบทบาทเป็นโปรตีนยับยั้งการกระตุ้น procaspase-9 เพื่อไม่ให้เกิดอะพอพโทซิสได้เช่นกัน โดยพบการแสดงออกสูงที่สุดในฟอลลิเคิลสมบูรณ์และพบน้อยในอะทริติกฟอลลิเคิล (Cheng *et al.*, 2008)

## สรุป

อะพอพโทซิสเป็นแบบการตายของเซลล์ที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาและรักษาสมดุลในหลายอวัยวะของสิ่งมีชีวิต และมีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของฟอลลิเคิลในรังไข่โดยเฉพาะในสุกรที่จำนวนฟอลลิเคิลมีผลต่ออัตราการตกไข่ การเสื่อมสลายของฟอลลิเคิลมีความสัมพันธ์กับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสโดยมีตัวควบคุมหลายชนิดที่ทำให้เกิดการตายหรือเกิดอะทริติกฟอลลิเคิล ด้วยวิถีเหนี่ยวนำของ cell death ligand และ receptor เช่น Fas-ligand และ receptor, TNF $\alpha$  และ receptor, TRAIL และ receptor ความสมดุลของเซลล์สิ่งมีชีวิตและเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์แกรนูโลไซตมีผลต่อความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิล แต่หากขาดความสมดุลจากการเหนี่ยวนำและการยับยั้งการเกิดอะพอพโทซิสแล้วจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของเซลล์แกรนูโลไซตและคุณภาพของโอโอไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารทงสวนไวสาหรับการเขงานเพือการศึกษาเทานัน ไมอนุญาตเทานาไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- Ashkenazi, A. and V.M. Dixit. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Sci.* 281: 1305-1308.
- Black, J.L. and B.H Erickson. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *Anat. Rec.* 161: 45-55.
- Cheng, Y., M. Nakayama, N. Inoue, F. Minehata, Y. Goto, A. Maeda, H. Jin, K. Wongpanit, S. Nakagawa, J.Y. Li and N. Manabe. 2007. Roles of tumor necrosis factor (TNF)-in granulosa cell apoptosis during follicular atresia in porcine ovaries. *Morphol.* 2: 50-55.
- Cheng, Y., A. Maeda, Y. Goto, F. Matsuda, T. Miyano, N. Inoue, K. Sakamaki and N. Manabe. 2008. Changes in expression and localization of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) in follicular granulosa cells during atresia in porcine ovaries. *J. Reprod. Dev.* 54: 454-459.
- Clark, J.R., S.G. Brazier, L.M. Wiginton, G.R. Stevenson and L.F. Tribble. 1982. Time of ovarian follicle selection during the porcine estrous cycle. *Theriogenology* 18: 697-709.
- Cohen, G.M. 1997. Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochim. J.* 326: 1-16.
- Dailey, R.A., J.R. Clark, R.B. Staigmiller, N.L. First, A.B. Chapman and L.E. Casida. 1976. Growth of new follicles following electrocautery in four genetic groups of swine. *J. Anim. Sci.* 43: 175-183.
- De La Monte, S.M., Y.K. Sohn and J.R. Wands. 1997. Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's Disease. *J. Neurol. Sci.* 152: 73-83.
- Ellis, R.E., J.Y. Yuan and H.R. Horvitz. 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell. Bio.* 17: 663-698.
- Foxcroft, G.R. and M.G. Hunter. 1985. Basic physiology of follicular maturation in the pig. *J. Reprod. Fertil.* 33: 1-19.
- Golstein, P. 1997. Cell death: TRAIL and its receptors. *Curr. Biol.* 7: 750-753.
- Goto, Y., F. Matsuda-Minehata, N. Inoue, T. Matsui, A. Maeda and N. Manabe. 2004. Porcine (*Sus scrofa*) cellular FLICE-like inhibitory Protein (cFLIP): Molecular cloning and comparison with the human and murine cFLIP. *J. Reprod. Dev.* 50: 549-555.
- Guthrie, H.D., B.S. Cooper, G.R. Welch, A.D. Zakaria and L.A. Johnson. 1995. Atresia in follicles grown after ovulation in the pig: measurement of increased apoptosis in granulosa cells and reduced follicular fluid estradiol-17 $\beta$ . *Biol. Reprod.* 52: 920-927.
- Guthrie, H.D., R.W. Grimes, B.S. Cooper and J.M. Hammond. 1995. Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. *J. Anim. Sci.* 73: 2834-2844.
- Hughes, F.M. and W.C. Gorospe. 1991. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cell: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinol.* 129: 2415-2422.
- Inoue, N., N. Manabe, T. Matsui, A. Maeda, S. Nakagawa, S. Wada and H. Miyamoto. 2003. Roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling pathway in granulosa cell apoptosis during atresia in pig ovaries. *J. Reprod. Dev.* 49: 313-321.
- Juengel, J.L., H.A. Garverick, A.L. Johnson, R.S. Youngquist and M.F. Smith. 1993. Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinol.* 132: 249-254.
- Lee, J.M. and A. Bernstein. 1995. Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene. *Cancer Metastasis Revie.* 14: 149-161.
- Maeda, A., N. Inoue, F. Matsuda-Minehata, Y. Goto, Y. Cheng, and N. Manabe. 2007. The role of interleukin-6 in the regulation of granulosa cell apoptosis during follicular atresia in pig ovaries. *J. Reprod. Dev.* 53(3): 481-490.
- Manabe, N., N. Inoue, T. Miyano, K. Sakamaki, M. Sugimoto and H. Myamoto. 2003. Ovarian follicle selection in mammalian ovaries: regulatory mechanisms of granulosa cell apoptosis during follicular atresia. In: Leung P.K. and E. Adashi (eds.), *The Ovary*, 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier Science Publishers. 369-385.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Manabe, N., Y. Goto, F. Matsuda-Minehata, N. Inoue, A. Maeda, K. Sakamaki and T. Miyano. 2004. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: Regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *J. Reprod. Dev.* 50: 493-514.
- Manabe, N., N. Inoue, F. Minehata, Y. Goto, A. Maeda, Y. Cheng, H. Jin, K. Wongpanit, S. Nakagawa and J.Y. Li. 2007. Role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and receptor system in granulosa cell apoptosis during follicular atresia in porcine ovaries. *Morphol.* 2: 41-49.
- Matsuda-Minehata, F., Y. Goto., N. Inoue and N. Manabe. 2005. Changes in expression of anti-apoptotic protein, cFLIP, in granulosa cell during follicular atresia in porcine ovaries. *Mol. Reprod. Dev.* 72:145-151.
- Matsuda-Minehata, F., N. Inoue, Y. Goto and N. Manabe. 2006. The regulation of ovarian granulosa cell death by pro- and anti-apoptotic molecules. *J. Reprod. Dev.* 52: 695-705.
- Matsuda-Minehata, F., Y. Goto, N. Inoue, K. Sakamaki, P.J. Chedrese and N. Manabe. 2007. Anti-apoptotic activity of porcine cFLIP in ovarian granulosa cell lines. *Mol Reprod Dev.* 74(9): 1165-70.
- Matsuda-Minehata, F., N. Inoue, Y. Goto, A. Maeda, Y. Cheng, K. Sakamaki, and N. Manabe. 2008. cFlip regulates death receptor-mediated apoptosis in an ovarian granulosa cell line by inhibiting procaspase-8 cleavage. *J. Reprod. Dev.* 54(5): 314-320.
- McCormack, J.T., M.G. Friederichs, S.D. Limback and G.S. Greenwald. 1998. Apoptosis during spontaneous luteolysis in the cyclic golden hamster: Biochemical and morphological evidence. *Biol. Reprod.* 58: 255-260.
- Miller, A.T., H.M. Picton, J. Craigon and M.G. Hunter. 1998. Follicle dynamics and aromatase activity in high-ovulating Meishan sows and in Large-White hybrid contemporaries. *Biol. Reprod.* 58: 1372-1378.
- Morbeck, D.E., K.L. Esbenshade, W.L. Flowers and J.H. Britt. 1992. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biol. Reprod.* 47: 485-491.
- Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell.* 88: 355-365.
- Nakayama, M., N. Manabe, S. Nishihara and H. Miyamoto. 2000. Species specific differences in apoptotic cell localization in granulosa and theca interna cells during follicular atresia in porcine and bovine ovaries. *J. Reprod. Dev.* 46: 147-156.
- Okano, A., H. Kishi, H. Takahashi and M. Takahashi. 2006. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces apoptosis in culture porcine luteal cells. *J. Reprod. Dev.* 52: 301-306.
- Prange-Kiel, J., C. Kreutzkamm, U. Wehrenberg, and G.M. Rune. 2001. Role of tumor necrosis factor in preovulatory follicles of Swine. *Biol Reprod.* 65: 928-935.
- Sakamaki, K., H. Yoshida, Y. Nishimura, S.I. Nishikawa, N. Manabe and S. Yonehara. 1997. Involvement of Fas antigen in ovarian follicular atresia and luteolysis. *Mol. Reprod. Dev.* 47: 11-18.
- Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg and M.E. Peter. 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 254: 439-459.
- Tilly, J.L. 1996. Apoptosis and ovarian function. *Rev. Reprod.* 1: 162-17.
- Vito, P., E. Lacanà and L. D'Adamo. 1996. Interfering with Apoptosis: Ca<sup>2+</sup>-Binding Protein ALG-2 and Alzheimer's Disease Gene ALG-3. *Science* 271: 521-525.
- Yonehara, S., A. Ishii and M.A. Yonehara. 1989. Cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 169: 1747-1756.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้