

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง
พัฒนาการในปลาแคตฟิช (Mystus nemurus)

Effect of Endocrine Disrupting Compounds on Expression of Genes
Involving in the Development of Yellow Catfish (*Mystus nemurus*)

คณะผู้วิจัย

ดร.ลัดดา ลีละวัฒน์วัฒนา

รศ.ดร.พรทิพย์ ประพันธ์พจน์

โครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2556 รหัสโครงการ SCI560377S

สารบัญ

	หน้า
รายการรูป	2
กิตติกรรมประกาศ	3
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	4
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	5
บทนำ	6
วัตถุประสงค์	7
การตรวจเอกสาร	8
วิธีการทดลอง	16
ผลการทดลองและวิจารณ์	20
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	40
เอกสารอ้างอิง	43
ภาคผนวก	54
- การเผยแพร่ผลงานในที่ประชุมวิชาการ	

รายการรูป

รูปที่		หน้า
3.1	รูปแบบการเคลื่อนที่ของ total RNA จากตับและสมองของปลากดเหลือง	20
3.2	การตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมในการทำ realtime PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน beta-actin	23
3.3	การตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมในการทำ realtime PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน TR	24
3.4	การตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมในการทำ realtime PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน TGase2	25
3.5	การตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมในการทำ realtime PCR เพื่อเพิ่มปริมาณของยีน <i>cyp19b</i>	26
3.6	การตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมในการทำ realtime PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน DIII	27
3.7	กราฟการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ในระหว่างพัฒนาการของปลากดเหลือง	30
3.8	ผลของ BPA ต่อการแสดงออกของยีนในปลากดเหลืองอายุ 7 วันหลังการฟัก	32
3.9	ผลของ BPA ต่อการแสดงออกของยีนในปลากดเหลืองอายุ 15 วันหลังการฟัก	33
3.10	ผลของ DES ต่อการแสดงออกของยีนในปลากดเหลืองอายุ 7 วันหลังการฟัก	36
3.11	ผลของ DES ต่อการแสดงออกของยีนในปลากดเหลืองอายุ 15 วันหลังการฟัก	37

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ ประพันธ์พจน์ ที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่ได้กรุณาช่วยเหลือในการทำวิจัย รวมถึงให้คำแนะนำ และมอบข้อคิดเห็นต่าง ๆ นอกจากนี้ขอขอบคุณนางสาวเปศล โสกุล และนางสาวจิราพร ขวัญมุณี ในการช่วยเหลือการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณศูนย์ประมงน้ำจืด อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างปลาสดเหลืองในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณเงินสนับสนุนการวิจัย จากทุนเงินรายได้ ประเภททั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2556 และทุนสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รวมถึงขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี สำหรับการอนุเคราะห์เครื่องมือที่จำเป็น และพื้นที่สำหรับการทำงานวิจัย

ดร.ลัดดา ลีละวัฒน์วัฒนา

บทคัดย่อ

Endocrine disrupting compounds (EDCs) เป็นสารที่มีความสามารถในการรบกวนหรือขัดขวางการทำงานของฮอร์โมนในระบบต่อมไร้ท่อ สารเหล่านี้ถูกรายงานส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ และสัตว์ต่าง ๆ EDCs สามารถปนเปื้อนเข้าสู่แหล่งน้ำและก่อให้เกิดผลกระทบต่อสัตว์น้ำ เช่น ปลา ที่อาศัยในระบบนิเวศนั้น งานวิจัยนี้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาผลของ EDCs 2 ชนิดคือ bisphenol A (BPA) และ diethylstilbestrol (DES) ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของสัตว์น้ำ คือยีน cytochrome P450 aromatase (*cyp19*) deiodinase transglutaminase (TG-ase) และ thyroid hormone receptor (TR) โดยใช้ปลากดเหลือง (*Mytilus nemurus*) เป็นโมเดล ผลการแยกยีนบางส่วนของ *cyp19* จากสมองของปลากดเหลือง ได้ชิ้นส่วน cDNA ที่มีขนาด 414 คู่เบส และยีนนี้ถูกยืนยันเป็น *cyp19b* ชนิดที่พบมากที่สุดที่สมอง ในขณะที่ยีนบางส่วนที่แยกได้จากตับมีขนาด 446 คู่เบส ถูกยืนยันว่าเป็น deiodinase type 3 หรือ DIII และยีนขนาด 319 คู่เบส ถูกตรวจสอบว่าเป็น TG-ase2 การแสดงออกของยีนในระหว่างพัฒนาการของปลากดเหลือง พบยีนมีการแสดงออกตั้งแต่ปลาอายุ 4 วันหลังการฟัก ปลามีการแสดงออกของยีนสูงสุดเมื่อมีอายุ 16 วันหลังการฟัก และลดลงเมื่อมีอายุมากขึ้นจนถึงอายุ 30 วันหลังการฟัก เมื่อนำปลากดเหลืองมาทดสอบ BPA ที่ความเข้มข้น 0.01 10 100 และ 1000 nM เป็นเวลา 3 วัน ผลการแสดงออกของยีน พบว่าปลาอายุ 7 วันที่ได้รับสาร BPA มีการแสดงออกของ *cyp19b* ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม เมื่อปลากดเหลืองได้รับ BPA ความเข้มข้น 100 และ 1000 nM ส่วนปลากดเหลืองอายุ 15 วันที่ได้รับ BPA พบยีน *cyp19b* มีการแสดงออกต่ำกว่าชุดควบคุมเมื่อปลาได้รับ BPA ที่ระดับ 0.01 และ 10 nM ในขณะที่ยีน TG-ase2 และ TR มีการแสดงออกของยีนต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ทุกความเข้มข้นของ BPA เมื่อปลาอายุ 7 วันได้รับสาร DES ที่ระดับความเข้มข้น 1 10 50 และ 200 nM เป็นเวลา 3 วัน พบว่าปลาที่มีการแสดงออกของยีน DIII ต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ยีน TG-ase2 มีการแสดงออกต่ำกว่าชุดควบคุมที่ระดับ DES ความเข้มข้น 10 และ 200 nM นอกจากนี้ปลาอายุ 15 วันที่ได้รับ DES ความเข้มข้น 1 nM มีการแสดงออกของยีน *cyp19b* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ปลาที่ได้รับ DES ความเข้มข้น 10 50 และ 200 nM มีการแสดงออกของยีน TR ต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ถึงแม้ว่ายังไม่สามารถอธิบายกลไกที่เกิดขึ้นจากการรบกวนของสาร EDCs ต่อปลากดเหลืองอย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นการตอบสนองของปลากดเหลืองต่อสาร BPA และ DES ซึ่งบ่งบอกแนวโน้มการนำปลากดเหลืองไปใช้เป็นโมเดลในการทดสอบ หรือติดตามการปนเปื้อนของ EDCs ในแหล่งน้ำ แต่ก่อนนำสู่การประยุกต์ใช้จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้

ABSTRACT

Endocrine disrupting chemicals or EDCs are compounds that interfere the endocrine systems and cause adverse effects to human and wildlife. EDCs can release, contaminate in aquatic environment and affect directly to animals living in those ecosystems, especially to fish. This research was set up with an aim to investigate influence of bisphenol A (BPA) and diethylstilbestrol (DES) on expression of genes involved in development of fish, by using yellow catfish (*Mystus nemurus*) as model. The investigated genes include cytochrome P450 aromatase (*cyp19*), deiodinase, transglutaminase (TG-ase) and thyroid hormone receptor (TR). The partial fragment of *cyp19* was successfully isolated from brain of the adult yellow catfish. The cDNA fragment was 414 nucleotides in length and was identified as *cyp19b* which is brain type aromatase. Moreover, the partial fragment of deiodinase type3 (DIII) and tissue TG-ase or TG-ase2 were isolated from liver of the yellow catfish with the fragment length of 446 and 319 nucleotides, respectively. Expression of 4 investigated genes were determined during the yellow catfish development. The synthesis of all genes were detected since fish was 4 days old, reach the highest level at 16 days of age and decline to the age of 30 days old. After challenging the fish with BPA at concentration of 0.01, 10, 100 and 1000 nM for 3 days, the yellow catfish age of 7 days after hatched responded to the compound by reducing expression of *cyp19b* to the level that was significant difference from control group. The expression of *cyp19b* was significantly lower than the control when the fish age of 15 days after hatched was exposed to BPA at 0.01 and 10 nM. Moreover, the mRNA level of TG-ase2 and TR were significantly lower than the control in all treatment groups. When challenge the fish age of 7 days with DES at 1, 10, 50 and 200 nM for 3 days, the expression of DIII decreased whereas BPA at concentration of 10 and 200 nM could inhibit the expression of TG-ase2. Moreover, DES at 1 nM up regulated the expression of *cyp19b* in the yellow catfish age of 15 days. At 10, 50 and 200 nM of DES, the expression of TR gene was significantly lower than the control group. Although mechanism underlying the process of EDCs disruption in the yellow catfish could not explain from this study, obtained result demonstrated that the yellow catfish respond to BPA and DES. Finally, possibility of using the yellow catfish as model for EDCs testing in future was proposed. However, more experiments are required to confirm the results.