กระบวนการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิล และตัวบ่งชี้การงอกขยายของเซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

*ดวงกมล ภูพิชญ์พงษ์**

ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
**E-mail: cvtdmp@ku.ac.th*
รับบทความ 17 ตุลาคม 2560 ยอมรับการตีพิมพ์ 13 พฤศจิกายน 2560

บทคัดย่อ

การเจริญเติบโตของฟอลลิเคิล เป็นกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียหรือโอโอไซต์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โอโอไซต์จะถูกบรรจุอยู่ในฟอลลิเคิล และมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ฟอลลิเคิลมีความสำคัญกับเกษตรกรหรือผู้เลี้ยงสัตว์ที่ต้องการเพิ่มจำนวนลูกสัตว์ภายในฟาร์ม เนื่องจากถ้าฟอลลิเคิลมีการเจริญเติบโตที่ดี ก็มีแนวโน้มที่เกษตรกรจะได้จำนวนลูกสัตว์เพิ่มขึ้น กระบวนการนี้ถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนจากหลายแห่งและทำงานร่วมกัน ทั้งต่อมพิทูอิตารี ต่อมใต้สมอง และรังไข่ การเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์จะต้องได้ฟอลลิเคิลที่พร้อมจะตกไข่และมีคุณภาพที่ดี ดังนั้นการประเมินการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลโดยใช้การย้อมสีอิมมูโนฮิสโตเคมีจึงเป็นวิธีทางเลือกหนึ่ง เพราะมีความจำเพาะและช่วยลดระยะเวลาในการประเมินเมื่อเทียบกับวิธีย้อมสี hematoxylin และ eosin ทั่วไป ตัวบ่งชี้การงอกขายของเซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีนั้นมีหลายตัวบ่งชี้ เช่น BrdU PCNA และ Ki-67 เป็นต้น ดังนั้นการเลือกใช้ตัวบ่งชี้ที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อตัวอย่างจึงเป็นตัวแปรสำคัญในการแปรผล

คำสำคัญ: การเจริญเติบโตของฟอลลิเคิล อิมมูโนฮิสโตเคมี รังไข่

Folliculogenesis and proliferating cell detection by immunohistochemistry

*Duangkamol Phoophitphong**

Department of Veterinary Technology, Faculty of Veterinary Technology,
Kasetsart University, Bangkok, 10900
**E-mail: cvtdmp@ku.ac.th*

Received 17 October 2017, Accepted 14 Novermber 2917

Abstract

Folliculogenesis is a mechanism in female mammalian animals producing their gamete, known as oocyte. An oocyte is encircled within a follicle which is develop from the beginning to the final stage. While follicular growth, somatic cells is proliferating by increase their numbers and layers of the cells. Number and quality of follicle is beneficial for domestic farmer who need to raise their product of the farm. Folliculogenesis is regulate by hypothalamic-pituitary-ovarian axis and also several growth factors. Follicle need to be mature from primordial follicle to reach the preovulatory follicle and undergoes ovulation. In order to evaluate the proliferating cell or identify follicular stage, tissue sections can be performed by several procedures. The most common used method is immunohistochemistry (IHC) with specific antigen such as BrdU, PCNA or Ki-67. This procedure is efficacy to distinguish follicles than conventional method, hematoxylin and eosin (H&E) stain.

Keywords: Folliculogenesis, immunohistochemistry, ovary

บทนำ

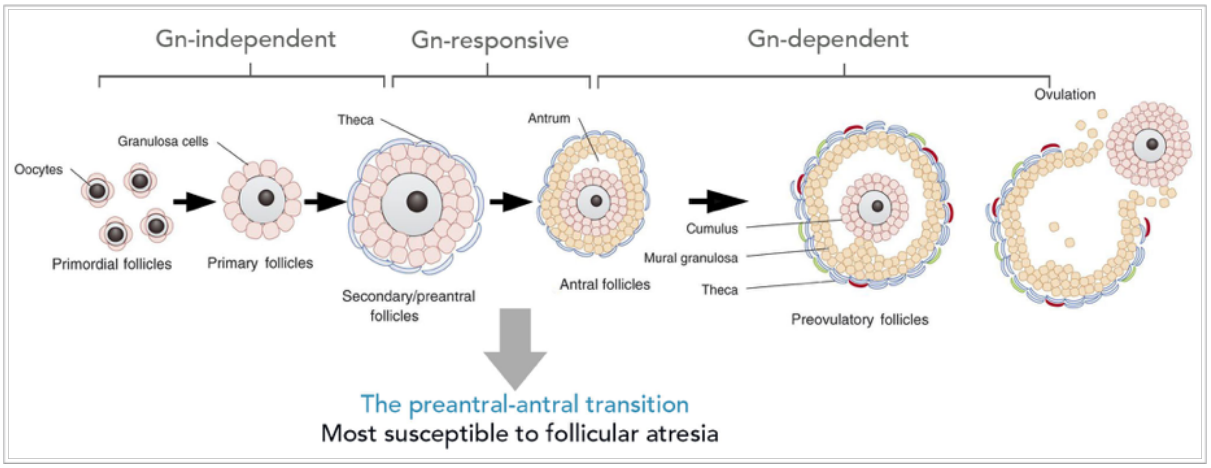
ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รังไข่เป็นอวัยวะที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา โดยเฉพาะฟอลลิเคิล (follicle) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย หรือโอโอไซต์ (oocyte) และเซลล์โซมาติก (somatic cells) ได้แก่ เซลล์กรานูโลซา (granulosa cells) และเซลล์ทีคา (theca cells) ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมดนี้ทำหน้าที่ร่วมกันในการตอบสนองต่อฮอร์โมนโกนาโดโทรปินในการสร้างและหลั่งฮอร์โมนและสารกระตุ้นการเจริญเติบโตต่างๆ เพื่อส่งผลให้ฟอลลิเคิลและโอโอไซต์มีการเจิญเติบโตและพัฒนาต่อไป แต่จะมีฟอลลิเคิลประมาณ 1% เท่านั้นที่จะสามารถเจริญเติบโตจนถึงระยะที่ตกไข่ได้ (Matsuda, et al., 2012) นักวิชาการจำนวนมากพยายามศึกษากลไกการทำงานและการควบคุมของฟอลลิเคิลในแง่ของการเจริญเติบโตและการฝ่อจากระบบฮอร์โมนต่างๆ รวมทั้งระบบการควบคุมภายในของรังไข่เอง เซลล์กรานูโลซาเป็นเซลล์ที่เข้ามามีบทบาทและมีส่วนในการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลเป็นอย่างมาก โดยทำหน้าที่ในการส่งโมเลกุลต่างๆที่จำเป็นในการพัฒนาและการรักษาสภาพของฟอลลิเคิล รวมทั้งทำให้ฟอลลิเคิลเกิดการฝ่อได้ด้วยเช่นกัน จำนวนและชนิดของฟอลลิเคิลบนรังไข่เป็นตัวบ่งชี้ของกระบวนการสร้างฟอลลิเคิล (folliculogenesis) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนและสารเร่งเจริญเติบโต (Myers, et al., 2004) การนับจำนวนฟอลลิเคิลบนเนื้อเยื่อรังไข่โดยทั่วไปจะเป็นการใช้สีย้อม hematoxylin และ eosin (H&E) แต่วิธีนี้เป็นวิธีที่ต้องใช้เวลาในการนับ ดังนั้น การใช้แอนติบอดีต่อเซลล์ที่กำลังงอกขยาย หรือเซลล์ที่กำลังอยู่ในวงรอบ (cell cycle) ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีจึงเป็นทางเลือกที่ช่วยให้สามารถนับจำนวนของฟอลลิเคิลระยะต่างๆบนเนื้อเยื่อรังไข่ได้

การเจริญเติบโตของฟอลลิเคิล

กระบวนการสร้างฟอลลิเคิล (folliculogenesis) ประกอบด้วยกระบวนการงอกขยาย (proliferation) และการตายของเซลล์ (apoptosis) ร่วมกัน (Chun and Hsueh, 1998; Robker and Richards, 1998) โดยที่การตายของฟอลลิเคิลนั้นจะเพิ่มขึ้นในระหว่างที่มีกระบวนการสร้างฟอลลิเคิลและเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ในช่วงแรกของระยะ follicular phase (Young and McNeilly, 2010) การงอกขยายและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์โซมาติกนำไปสู่การสร้างถุงน้ำในรังไข่ (antrum) โดยภายในถุงน้ำนั้นจะถูกบรรจุด้วยของเหลว ซึ่งสร้างมาจากเซลล์กรานูโลซา (Pineda, 2003) การพัฒนาของฟอลลิเคิลเริ่มต้นจากการเพิ่มขึ้นและการงอกขยายของเซลล์กรานูโลซา ซึ่งโดยทั่วไปสามารถแบ่งระยะของฟอลลิเคิลได้เป็น 4 ระยะ ดังนี้ ระยะไพรมอเดียล (primordial follicle) ระยะไพรมารี (primary follicle) ระยะทุติยภูมิ หรือระยะพรีแอน-ทรัม (secondary follicle, preantral follicle) และระยะที่สาม หรือระยะแอนทรัม (tertiary follicle, antral follicle) (Moniruzzaman and Miyano, 2010)

การเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากฟอลลิเคิลระยะพรีแอนทรัมเป็นระยะแอนทรัม (รูปที่ 1) ถูกควบคุมโดยสัญญาณต่างๆภายในรังไข่ รวมถึง สเตียรอยด์ที่เกี่ยวกับอวัยวะสืบพันธุ์ (gonadal steroid) สารเร่งการเจริญเติบโต (growth factors) และไซโตไคน์ (cytolines) (Sirotkin, 2011) ซึ่งในระยะนี้ฟอลลิเคิลจะมีความไวต่อกระบวนการตายของฟอลลิเคิลมากขึ้น

(Fortune, 2003; Orisaka, et al., 2009) ฟอลลิเคิลระยะแอนทรัมที่มีขนาดใหญ่จำเป็นต้องพึ่งพาโกนาโดโทรปินและฟอลลิเคิลในระยะส่วนใหญ่มักเกิดการฝ่อเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ฟอลลิเคิลบางใบที่สามารถพัฒนาต่อไปเป็นฟอลลิเคิลที่พร้อมจะตกไข่ และเกิดการตกไข่ตามมา (Edson, et al., 2009) ในช่วงท้ายของการพัฒนาฟอลลิเคิลเซลล์กรานูโลซาและเซลล์ทีคาจะถูกกระตุ้นและหลั่งสเตียรอยด์ เช่น แอนโดรเจนและเอสโตรเจน ฮอร์โมนเปบไทด์ พรอสตาแกลนดินและสารอื่นๆในปริมาณที่เพียงพอเพื่อใช้ในการพัฒนาของฟอลลิเคิล และส่งต่อสารสื่อสัญญาณเพื่อทำงานร่วมกับแนวแกนของต่อมไฮโปทาลามัส ต่อมใต้สมองและรังไข่ (hypothalamic-pituitary-ovarian axis) (Caárdenas and Pope, 2002) แนวแกนนี้มีความสำคัญและมีบทบาทในการทำหน้าที่ของระบบสืบพันธุ์ โดยทำการสร้างและหลั่งฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ ประกอบด้วย Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) Follicle stimulating hormone (FSH) Luteinizing hormone (Monniaux, et al.) และฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้ทำหน้าที่ในการควบคุมวงรอบการเป็นสัดผ่านทางกระบวนการตอบสนองกลับซึ่งจะเป็นไปในทางกระตุ้นหรือยับยั้ง



รูปที่ 1 ขั้นตอนการพัฒนาของฟอลลิเคิลในระยะต่างๆ ตั้งแต่ฟอลลิเคิลระยะตั้งต้น ระยะแรก ระยะสอง ระยะสาม จนถึงระยะตกไข่ (ที่มา ปรับเปลี่ยนจาก (Georges, et al., 2014; Orisaka, et al., 2009)

การตรวจประเมินการงอกขยาย ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

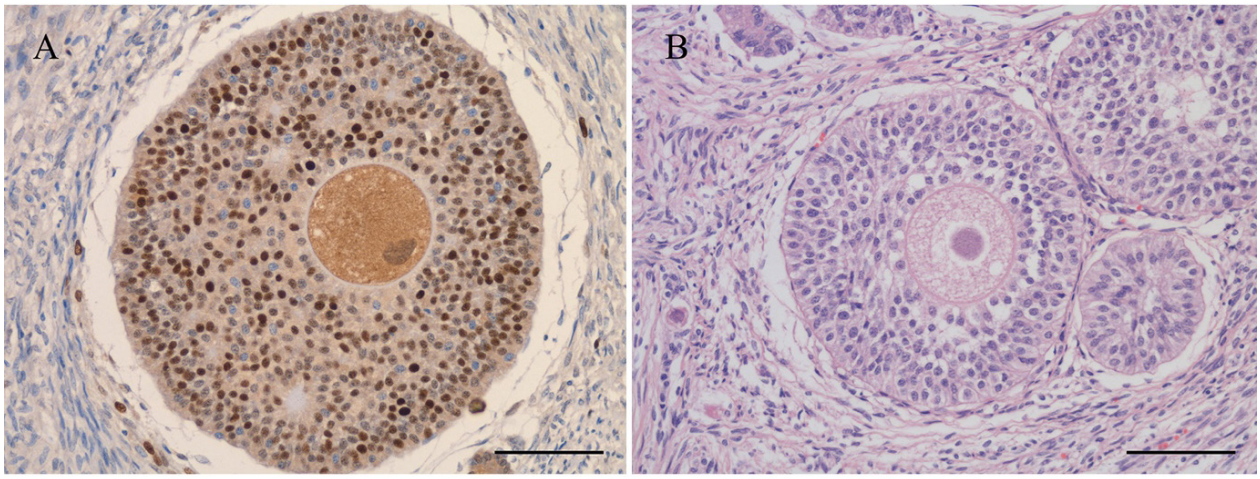
จำนวนและชนิดของฟอลลิเคิลในรังไข่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ของกระบวนการสร้างฟอลลิเคิล ซึ่งมีความสัมพันธ์กับฮอร์โมนและสารเร่งการเริญเติบโตหลายๆ ชนิด (Myers, et al., 2004) เพื่อให้การนับจำนวนของฟอลลิเคิลในเนื้อเยื่อรังไข่ทำได้สะดวกและง่ายกว่าการย้อมสี Hematoxylin and eosin (H&E) จึงมีการใช้วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีช่วยในการตรวจประเมิน ดังนี้

1) 5-bromodeoxyuridine (BrdU) เป็นสารที่มีการปรับเปลี่ยนของไพริมิดีน เพื่อให้สามารถจับกับดีเอ็นเอได้ วิธีนี้เป็นการตรวจมาตรฐานสูงสุด (gold standard) โดยทำการฉีด BrdU นี้เข้าไปภายในช่องท้องของสัตว์ทดลอง (Gratzner, 1982) มีการใช้ BrdU เป็นตัวบ่งชี้การงอกขยายของเซลล์ในระยะ

S-phase แต่อย่างไรก็ตามการใช้ BrdU ยังมีข้อเสียหลายอย่าง เช่น ต้องมีการจับบังคับและฉีดสารเข้าไปในสัตว์มีชีวิต เป็นสารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) และไม่เหมาะสำหรับการศึกษาทางด้านความเป็นพิษต่อหน่วยพันธุกรรม (Muskhelishvili, et al., 2003)

2) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) เป็นโปรตีนเสริมของ DNA polymerase δ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นในการสังเคราะห์ DNA (Wood and Shivji, 1997) มีการใช้ PCNA ครั้งแรกในปี 1978 หลังจากนั้นก็ได้มีการใช้เป็นตัวบ่งชี้การงอกขยายของเซลล์มานานหลายปีเพื่อทดแทนการใช้ BrdU การแสดงออกของ PCNA จะเพิ่มขึ้นในระยะ G1 และสูงสุดในระยะ S แล้วลดลงในระยะ G2 และ M จึงมรการใช้ PCNA ในงานวิจัยพื้นฐานและเป็นเครื่องช่วยวินิจฉัยสำหรับพยาธิศัลยกรรมอย่างแพร่หลาย (Kato, et al., 2002) มีงานวิจัยเปรียบเทียบการใช้แอนติเจน PCNA ในการทำอิมมูโนฮิสโตเคมีและการย้อมสี H&E ทั่วไปในรังไข่หนู (Muskhelishvili, et al., 2005; Picut, et al., 2008) จากการเปรียบเทียบระหว่าง 2 วิธีนี้ พบว่า การใช้ PCNA สามารถลดระยะเวลาในการนับเซลล์ได้มากถึง 46% (Muskhelishvili, et al., 2005) นอกจากนี้ มีการวิจัยโดยใช้ PCNA ในรังไข่สุกรพบว่ายังไม่สามารถแยกระบุชนิดของฟอลลิเคิลขนาดเล็กได้ชัดเจน (Tomanek and Chronowska, 2006) เนื่องจากมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง ได้แก่ จำนวนของเซลล์ที่กำลังงอกขยายในเนื้อเยื่อ ความเข้มข้นของแอนติบอดี วิธีการกระตุ้นคืนสภาพผิวแอนติเจนด้วยความร้อนและชนิดของสารคงสภาพที่เลือกใช้ (Muskhelishvili, et al., 2005) อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยที่ใช้ PCNA ในรังไข่สุกร (รูปที่ 2) และสามารถแยกชนิดของฟอลลิเคิลระยะต่างๆได้ โดยใช้เทคนิคคืนสภาพแอนติเจนด้วยความร้อน (Phoophitphong, et al., 2012) แต่อย่างไรก็ตามความเข้มของการติดสีนั้นยังมีความแปรปรวนอยู่ เนื่องมาจากปัจจัยอื่นๆ เช่น ระยะของวงรอบเซลล์ สาร fixative และการคืนสภาพแอนติเจนเป็นต้น (Wood and Shivji, 1997)

3) Ki-67 เป็นโปรตีนแบบ non-histone ของนิวเคลียส ซึ่งจะปรากฏในเซลล์ที่กำลังมีการงอกขยายและไม่พบในเซลล์ที่อยู่ในระยะพัก การแสดงออกของ Ki-67 จะพบได้ในระยะท้ายของช่วง G1 ระยะ S ระยะ G2 และระยะ M ของวงรอบเซลล์ ดังนั้น Ki-67 จึงเป็นอีกตัวบ่งชี้หนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจประเมินการงอกขยายของเซลล์ได้ ทั้งเซลล์ที่ลักษณะเป็นเนื้องอกและไม่ใช่เนื้องอกในสัตว์หลายๆชนิด (Endl, et al., 2001) โดยมีงานวิจัยหลายงานที่นำ Ki-67 มาใช้วินิจฉัยในระบบสืบพันธุ์และกลุ่มเนื้องอกทั้งในมนุษย์และสัตว์ (Choudhury, et al., 2011; Lombardi, et al., 2014) นอกจากนั้น Ki-67 ยังมีสหสัมพันธ์กับดัชนีการแบ่งตัวที่ได้จากการนับลักษณะของ mitotic figures แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดในแง่ของ cross-species reactivity อยู่บ้าง และได้มีการพัฒนาโดยการใช้ monoclonal antibody (MIB-5) ในปัจจุบัน



รูปที่ 2 การใช้แอนจิเจนต่อเซลล์ที่กำลังงอกขยาย (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (A) เปรียบเทียบกับการย้อมสีด้วย hematoxylin และ eosin (B) ของฟอลลิเคิลระยะพรีแอนทรัม

การย้อมสีสไลด์เนื้อเยื่อด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการประเมินจำนวนเซลล์ที่กำลังมีการงอกขยาย ทั้งในงานวิจัยหรือการพยากรณ์โรคในสัตว์ป่วยที่เป็นเนื้องอกหรือมะเร็ง อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้ตัวบ่งชี้เซลล์ที่กำลังงอกขยายที่เหมาะสมต้องพิจารณาถึงข้อดีและข้อเสียของแต่ละตัวบ่งชี้ด้วยเช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

Caárdenas, H. and Pope, W. F. 2002. Control of ovulation rate in swine. J. Anim. Sci. 80: E36-E46.

Choudhury, M., Goyal, S. and Pujani, M. 2011. A cytohistological study of Ki-67 expression in ovarian tumors. Indian J. Pathol. Microbiol. 54: 21-24.

Endl, E., Hollmann, C. and Gerdes, J. 2001. Antibodies against the Ki-67 protein: assessment of the growth fraction and tools for cell cycle analysis. Methods. Cell. Biol. 63: 399-418.

Fortune, J. E. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. Anim. Reprod. Sci. 78: 135-163.

Georges, A., Auguste, A., Bessière, L., Vanet, A., Todeschini, A.-L. and Veitia, R. A. 2014. FOXL2: a central transcription factor of the ovary. J. Mol. Endocrinol. 52: R17-R33.

Gratzner, H. G. 1982. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. Science 218: 474-475.

Kato, T., Kameoka, S., Kimura, T., Nishikawa, T. and Kobayashi, M. 2002. C-erbB-2 and PCNA as prognostic indicators of long-term survival in breast cancer. Anticancer Res. 22: 1097-1103.

Lombardi, L. A., Simoes, R. S., Maganhin, C. C., Baracat, M. C., Silva-Sasso, G. R., Florencio-Silva, R., Soares Jr, J. M. and Baracat, E. C. 2014. Immunohistochemical evaluation of proliferation, apoptosis and steroidogenic enzymes in the ovary of rats with polycystic ovary. Rev. Assoc. Med. Bras. (1992) 60: 349-356.

Matsuda, F., Inoue, N., Manabe, N. and Ohkura, S. 2012. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. J. Reprod. Dev. 58: 44-50.

Moniruzzaman, M. and Miyano, T. 2010. Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. J. Reprod. Dev. 56: 559-566.

Monniaux, D., Drouilhet, L., Rico, C., Estienne, A., Jarrier, P., Touze, J. L., Sapa, J., Phocas, F., Dupont, J., Dalbies-Tran, R. and Fabre, S. 2012. Regulation of anti-Mullerian hormone production in domestic animals. Reprod. Fertil. Dev. 25: 1-16.

Muskhelishvili, L., Latendresse, J. R., Kodell, R. L. and Henderson, E. B. 2003. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohisto-chemistry and in situ hybridization for histone mRNA. J. Histochem. Cytochem. 51: 1681-1688.

Muskhelishvili, L., Wingard, S. K. and Latendresse, J. R. 2005. Proliferating cell nuclear antigen-a marker for ovarian follicle counts. Toxicol. Pathol. 33: 365-368.

Myers, M., Britt, K. L., Wreford, N. G., Ebling, F. J. and Kerr, J. B. 2004. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. Reproduction 127: 569-580.

Orisaka, M., Tajima, K., Tsang, B. K. and Kotsuji, F. 2009. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. J. Ovarian. Res. 2: 9.

Phoophitphong, D., Wangnaitham, S., Srisuwatanasagul, S. and Tummaruk, P. 2012. The use of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immuno-staining technique to determine number and type of follicles in the gilt ovary. Livest. Sci. 150: 425-431.

Picut, C. A., Swanson, C. L., Scully, K. L., Roseman, V. C., Parker, R. F. and Remick, A. K. 2008. Ovarian follicle counts using proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and semi-automated image analysis in rats. Toxicol. Pathol. 36: 674-679.

Robker, R. L. and Richards, J. S. 1998. Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. Biol. Reprod. 59: 476-482.

Sirotkin, A. V. 2011. Growth factors controlling ovarian functions. J Cell Physiol 226: 2222-2225.

Tomanek, M. and Chronowska, E. 2006. Immuno-histochemical localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the pig ovary. Folia Histochem. Cytobiol. 44: 269-274.

Wood, R. D. and Shivji, M. K. 1997. Which DNA polymerases are used for DNA-repair in eukaryotes? Carcinogenesis 18: 605-610.

Young, J. M. and McNeilly, A. S. 2010. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. Reproduction 140: 489-504.