

ผลของซีรัมลิงทางยาว (Macaca fascicularis) ต่อการเปลี่ยนโมเลกุลแอล-เฮซ (LH)

ในรูปของไบโอแอคทีฟและอิมมูโนแอคทีฟจากเซลล์ต่อมใต้สมอง

ของหนูขาวก่อนวัยเจริญพันธุ์ในหลอดทดลอง



นาย สดาพร เกิกเกรียงไกร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรของปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2529

ISBN 974-567-239-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

012117

SERUM FACTORS IN Macaca fascicularis ON THE CHANGE  
OF BIOACTIVE VERSUS IMMUNOACTIVE FORM  
OF LH MOLECULE FROM IMMATURE RAT  
PITUITARY CELL IN VITRO

Mr. Sathaporn Girdgriengrai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science

Department of Biology

Graduate School

Chulalongkorn University

1986

ISBN 974-567-239-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของซีรัมลิงทางยาว (Macaca fascicularis) ต่อการเปลี่ยนแปลง  
โมเลกุลแอล-เฮช (LH) ในรูปของไบโอแอคทีฟและอิมมูโนแอคทีฟ  
จากเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูขาวก่อนวัยเจริญพันธุ์ในหลอดทดลอง


โดย นาย สดาพร เกิดเกรียงไกร

ภาควิชา ชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.हरररर อดัวเร่องซัย

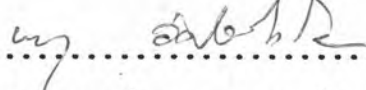


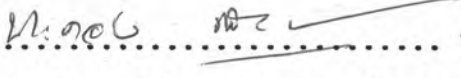
บัณฑิตวิทยาลัย จฬาลงกรณมหาวิทยาลัย อนุมัติให้แนบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการ  
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

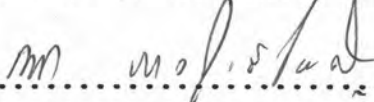
  
..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชรากัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว.พุดพิงศ์ วรวิมล)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร.हरररร อดัวเร่องซัย)

  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประคอง ตั้งประพจน์กุล)

  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ นพ.ดร.กนก ภาวะสุทธิไพศิฐ)

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของซีรัมลิงทางยาว (*Macaca fascicularis*) ต่อการเปลี่ยนแปลง  
โมเลกุลแอล-เอช (LH) ในรูปของไบโอแอกทีฟและอิมมิวโนแอกทีฟ  
จากเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูขาวก่อนวัยเจริญพันธุ์ในหลอดทดลอง

โดย นาย สถาพร เกิกเกรียงไกร

ภาควิชา ชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ทรรษา อัคร์เรืองชัย

ปีการศึกษา 2529



### บทคัดย่อ

เพื่อที่จะตรวจสอบหาปัจจัยในซีรัมลิงทางยาว (*Macaca fascicularis*) ที่ระยะต่าง ๆ ของการเจริญ 3 ระยะที่มีผลควบคุมคุณสมบัติทางไบโอและอิมมิวโนแอกทีฟของ LH โดยตั้งแบบทดลองที่ใช้ซีรัมลิงที่ 6 % จากระยะโตเต็มวัย (A) ระยะย่างเข้าวัยเจริญพันธุ์ (P) และระยะก่อนวัยเจริญพันธุ์ (I) ทั้ง 2 เพศ ตรวจสอบกับเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูขาวเพศผู้ อายุ 23-25 วัน ที่เพาะเลี้ยงไว้ ภายหลังจากพร้อนคิวเบท 48 ชั่วโมง เริ่มต้นการทดลองไปอีก 3 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 24 ชั่วโมง ตรวจสอบระดับของ rLH ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ด้วยวิธีไบโอแอสเสย์ (BA) และเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ (RIA) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า กลุ่มควบคุมหลัง rLH ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยมีอัตราส่วน BA : RIA ประมาณ 0.9-1.8 ตลอด 3 วัน ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยมีค่าไบโอแอกทีฟที่คงที่ แต่ค่าอิมมิวโนแอกทีฟของ rLH ลดลงตามช่วงเวลาของการทดลอง

กลุ่มทดลองที่ได้รับซีรัมจาก AO สามารถกระตุ้นไบโอแอกทีฟ rLH ได้สูงที่สุด เป็นผลให้มีอัตราส่วน BA : RIA ของ rLH เพิ่มขึ้นในช่วง 5-18 ใน 3 วันของการทดลอง ซีรัมจากกลุ่มอื่น ๆ ก็แสดงผลกระตุ้นไบโอแอกทีฟ rLH เช่นกัน แม้จะกระตุ้นได้น้อยกว่า ส่วนซีรัมจาก IQ ไม่มีผลต่อไบโอแอกทีฟ rLH แต่อย่างใด การตรวจวัดหาปริมาณของสเตียรอยด์ในซีรัมของทุกกลุ่มอายุที่ใช้ในการทดลองแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของเทสโทสเทอโรนต่อการกระตุ้นค่าไบโอแอกทีฟ rLH ส่วนการกระตุ้นค่าอิมมิวโนแอกทีฟ rLH มีความสัมพันธ์

กับอัตราส่วนโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจนที่ค่าอยู่ในช่วง 4 ถึง 5 ซึ่งแสดงให้เห็นในกลุ่มที่ได้รับซีรัมจาก PQ สเตียรอยด์ตัวอื่นหรืออัตราส่วนของสเตียรอยด์อื่นไม่มีความสัมพันธ์ต่อการกระตุ้นดังกล่าว

การแยกส่วนของซีรัมโดยวิธีโคเคไลซีส พบว่าสเตียรอยด์ส่วนที่รวมอยู่กับโปรตีนในซีรัมที่รับผิดชอบต่อการหลั่ง rLH ที่มีค่า BA : RIA สูงคงที่ตลอดการทดลอง ส่วนโคเคไลเซทไม่พบว่ามีส่วนต่อ BA : RIA แต่อย่างใด ระดับเทสโทสเตอโรนเพียงลำพังสอดคล้องกับการเพิ่มความไวของเซลล์ต่อมไร้ท่อต่อ GnRH ( $7.5 \times 10^{-12}$  M.) ในการกระตุ้นไปโอแอกทิวิตี rLH ส่วน GnRH เพียงลำพังในอาหารเลี้ยงเซลล์สามารถไปเพิ่มการหลั่งอิมมูโนแอกทิวิตี rLH จากเซลล์ต่อมไร้ท่อ นอกจากนั้นปริมาณของอีสโตรเจนยังมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความไวของเซลล์ต่อมไร้ท่อในการหลั่งอิมมูโนแอกทิวิตี rLH ตอบสนองต่อ GnRH แต่การมีเทสโทสเตอโรนและโปรเจสเตอโรนในระดับสูงจะไปลดความไวของเซลล์ต่อมไร้ท่อต่อ GnRH ที่ใช้กระตุ้น

จากการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงชนิดของสเตียรอยด์จากต่อมเพศหรืออัตราส่วนของสเตียรอยด์ในซีรัม ซึ่งได้แก่ เทสโทสเตอโรน อีสโตรเจน และโปรเจสเตอโรน ทั้งสามมีบทบาทในการควบคุมค่าไปโอแอกทิวิตีของ LH โมเลกุลที่หลั่งจากเซลล์ต่อมไร้ท่อทั้งทางตรงและทางอ้อม ผ่าน GnRH สเตียรอยด์ส่วนที่รวมอยู่กับพลาสมาโปรตีนยังรับผิดชอบต่อการรักษาค่าไปโอแอกทิวิตีของ LH ให้สูงอยู่ตลอด 3 วันของการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็นผลให้ค่า BA:RIA สูงอยู่ตลอด 3 วันนั่นเอง เนื่องจากอัตราส่วน BA : RIA ของ LH ถูกกำหนดตามค่าของสเตียรอยด์ และ/หรืออัตราส่วนของสเตียรอยด์ในระยะต่าง ๆ ของการเจริญดังกล่าว ค่าอัตราส่วน BA:RIA ของ LH นี้ อาจเป็นเครื่องแสดงถึงสภาพทางสรีรวิทยาที่สำคัญ หรืออาจเป็นเครื่องบ่งบอกที่มีความหมายที่ดีเมื่อมีเหตุการณ์เปลี่ยนแปลงทางสรีรสภาพใด ๆ ซึ่งจะต้องศึกษาต่อไป

Thesis Title      Serum factors in Macaca fascicularis on the change  
of Bioactive versus Immunoactive Form of LH molecule  
from Immature rat Pituitary cell in vitro

Name                Sathaporn Girdgrienggrai

Thesis Advisor    Associate Professor Hansa Asawaroengchai, Ph.D.

Department        Biology

Academic Year    1986



#### ABSTRACT

To determine factors in serum responsible for controlling LH bio and immunoactivities at 3 stages of reproductive life of Macaca fascicularis, monkey sera at 6 % from adult (A), puberty (P) and immature (I) of both sexes were tested on 23-25 days old male rat pituitary cells in culture. Culture was performed for 3 days after 48 hrs. preincubation with media changed every 24 hrs. Rat LH (rLH) level in the medium was measured by mouse Leydic cells in vitro bioassay (BA) and radioimmunoassay (RIA). The results showed that BA : RIA ratio of rLH in non-treatment group secreted into culture medium was about 0.9-1.8 throughout 3 days with constant BA-activity, RIA-activity on the other hand, declined in time of culture.

The A ♂ serum gave the highest BA-rLH stimulation resulted in the increase in BA : RIA ratio ranging from 5-18 within 3 days. Sera from the other groups also showed increase in BA-activity although at the lower degree. The IQ serum showed no effect. Steroid measurement of all sera pointed out that there was the direct relationship between

testosterone level and the stimulation of BA-activity of rLH. Stimulation of RIA-activity was found related to the low ratio of progesterone to estrogen, ranging from 4 to 5 which was evidenced in the PQ group. Other steroids or steroid ratios could not be related to changes in bio and immunoactivities of rLH molecule.

Dialysis of serum showed that protein bound steroid was responsible for the constantly high BA : RIA ratio of secreted rLH. The dialysate did not modify BA : RIA ratio of rLH, however. The sensitization of pituitary cells to GnRH ( $7.5 \times 10^{-12}$  M.) for the stimulation of BA-rLH release was also related to testosterone level in the serum. The presence of GnRH in culture medium prevented the decline of RIA-activity of rLH released by pituitary cells. Estrogen at the level higher than  $1.08 \times 10^{-15}$  M. was correlated well with the increase in degree of sensitization of pituitary cells to GnRH, in term of RIA-rLH activity release. High level of either testosterone or progesterone prevented the responsiveness of pituitary cells to GnRH for secreting RIA-rLH.

In conclusion this study has shown that sex steroids namely testosterone, estrogen and progesterone, all plays important roles directly or indirectly via GnRH, in controlling BA and RIA activities of LH molecule secreted from pituitary cells. The steroids which bind to serum protein are responsible for maintaining high BA-LH throughout 3 days of culture resulting in high BA : RIA ratio. Since BA : RIA ratio of LH molecules is designated by these steroids and/or their ratios at each stages of animal development whether this ratio of LH could be used as an indication of any physiological relevant has yet to be determined.



## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงต่อท่าน รองศาสตราจารย์ ดร.บรรณา อัครวเรืองชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาอบรม สั่งสอน ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ทางด้านวิชาการ ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว.พุดพิงศ์ วรวิมล ท่านหัวหน้าภาควิชาชีววิทยา ตลอดจนคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาฯ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ทางวิชาการและความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณตาประสิทธิ์ สงวนน้อย ที่ได้กรุณาอบรม ตักเตือน และให้กำลังใจตลอดมา ขอขอบคุณ คุณฉัตรินทร์ เกษมสังขยากร ที่ได้คำปรึกษา แนะนำ และให้กำลังใจด้วยดี ตลอดมา และเนื่องจากทุนการวิจัยครั้งนี้บางส่วนได้รับมาจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยมา ณ ที่นี้ด้วย

สุดท้ายที่จะกล่าวถึง คือผู้ที่มีความสำคัญมากที่สุดสำหรับความสำเร็จในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงสุดต่อบิดา มารดา และพี่ ๆ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทั้งทางด้านทุนทรัพย์และกำลังใจตลอดมา

สถาพร เกิดเกรียงไกร





## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ค
กิตติกรรมประกาศ .....	จ
สารบัญตาราง .....	ช
สารบัญรูปและกราฟ .....	ณ
บทที่	
1 บทนำ .....	1
หน้าที่และโครงสร้างของโกนาโดโทรปิน .....	1
การควบคุมการหลั่งโกนาโดโทรปิน .....	2
การปรากฏหลายรูปแบบของโกนาโดโทรปินโมเลกุล .....	6
วัตถุประสงค์ของการศึกษา .....	9
2 สัตว์ทดลอง สารเคมี อุปกรณ์และการทดลอง .....	10
สัตว์ทดลอง .....	10
สารเคมี .....	11
อุปกรณ์ .....	15
สารละลายที่ใช้และวิธีเตรียม .....	18
วิธีการทดลอง .....	22
การตรวจวัดหาปริมาณ rLH โดยวิธีไบโอแอสเสย์ (BA) .....	29
การตรวจหาปริมาณเทสโทสเตอโรนโดยวิธี RIA .....	32
การติดสลาก rLH ด้วยไอโอดีน-125 .....	35
การตรวจวัด rLH ด้วยวิธี RIA .....	38
การแปรผลทางสถิติ .....	40

	หน้า
บทที่	
3 การประเมินผลวิธีที่ใช้ในการตรวจวัด .....	42
4 ผลการทดลอง .....	50
5 วิจัยรณัและสรุปลผล .....	66
เอกสารอ้างอิง .....	79
ภาคผนวก .....	95
ประวัติ .....	105

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงการทำไบโอแอสเสย์ของ rLH .....	30
2	แสดงการตรวจวัดเทสโทสเทอโรนโดยวิธี RIA .....	33
3	แสดงการทำ RIA ของ rLH .....	39
4	แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเทสโทสเทอโรนต่อฮอร์โมนอื่น .....	42
5	แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ rLH ที่ตรวจสอบกับฮอร์โมนอื่น ...	43
6	แสดงปริมาณของสเตียรอยด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์จากการใส่ 6% ซีรัม ลิงทางยาว .....	50
7 ก	การทดลองที่ 1 ผลของซีรัมจากลิงทางยาวระยะต่าง ๆ ต่อ RIA-rLH .	96
7 ข	การทดลองที่ 1 ผลของซีรัมจากลิงทางยาวระยะต่าง ๆ ต่อ BA-rLH ..	97
7 ค	การทดลองที่ 1 ผลของซีรัมจากลิงทางยาวระยะต่าง ๆ ต่อค่าอัตราส่วน ของ BA : RIA-rLH .....	98
8 ก	การทดลองที่ 2 ผลของ GnRH $7.5 \times 10^{-12}$ M. ร่วมกับซีรัมลิงทางยาว ระยะต่าง ๆ ต่อค่า RIA-rLH .....	99
8 ข	การทดลองที่ 2 ผลของ GnRH $7.5 \times 10^{-12}$ M. ร่วมกับซีรัมลิงทางยาว ต่าง ๆ ต่ออัตราส่วน BA-rLH .....	100
8 ค	การทดลองที่ 2 ผลของ GnRH $7.5 \times 10^{-12}$ M. ร่วมกับซีรัมลิงทางยาว ต่ออัตราส่วน BA : RIA-rLH .....	101
9 ก	การทดลองที่ 3 ผลของส่วน Dialysable และ Non-dialysable fraction จากซีรัม PQ ต่อ RIA-rLH .....	102
9 ข	การทดลองที่ 3 ผลของส่วน Dialysable และ Non-dialysable fraction จากซีรัม PQ ต่อ BA-rLH .....	103
9 ค	แสดงค่าอัตราส่วนของสเตียรอยด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อมได้สมอง .....	104

สารบัญรูปและกราฟ

	หน้า
รูปที่	
1	แผนผังแสดงการทดลองที่ 1 ..... 26
2	แผนผังแสดงการทดลองที่ 2 ..... 27
กราฟที่	
1	แสดงปริมาณรังสี (cpm) ที่ตรวจวัดในแต่ละ fraction จากการติดสลากรLH ด้วยไอโอดีน-125 ..... 36
2	ตัวอย่างกราฟมาตรฐานของ rLH ที่ตรวจวัดด้วยวิธี RIA ..... 41
3	แสดง % CV ของ Intra assay บนกราฟมาตรฐานเทสโทสเตอโรน .. 46
4	แสดง % CV ของ Inter assay บนกราฟมาตรฐานของเทสโทสเตอโรน 47
5	แสดง % CV ของ Intra assay บนกราฟมาตรฐานของ rLH-RP-2 ซึ่งตรวจวัดโดยวิธี BA ..... 48
6	แสดง Parallelism check ของสารที่ตรวจวัดกับ rLH-RP-2 ..... 49
7	แสดงผลของซีรัมลิงระยะเต็มวัยต่อ BA-rLH และ RIA-rLH ..... 52
8	แสดงผลของซีรัมลิงระยะย่างเข้าวัยเจริญพันธุ์ต่อ BA-rLH และ RIA-rLH 54
9	แสดงผลของซีรัมลิงระยะก่อนวัยเจริญพันธุ์ต่อ BA-rLH และ RIA-rLH ... 54
10	แสดงผลของซีรัมลิงระยะโตเต็มวัยร่วมกับ GnRH $7.5 \times 10^{-12}$ M. ต่อ BA-rLH และ RIA-rLH ..... 57
11	แสดงผลของซีรัมลิงระยะย่างเข้าวัยเจริญพันธุ์ร่วมกับ GnRH $7.5 \times 10^{-12}$ M. ต่อ BA-rLH และ RIA-rLH ..... 59
12	แสดงผลของซีรัมลิงระยะก่อนวัยเจริญพันธุ์ร่วมกับ GnRH $7.5 \times 10^{-12}$ M. ต่อ BA-rLH และ RIA-rLH ..... 59
13	แสดงผลของซีรัมลิงระยะต่าง ๆ ร่วมกับ GnRH $7.5 \times 10^{-12}$ M. ต่อ RIA-rLH ..... 64

## กราฟที่

14	แสดงผลของซีรัมถึงระยะต่าง ๆ ร่วมกับ GnRH $7.5 \times 10^{-12}$ M. ต่อ RIA-rLH เป็นปริมาณสะสม .....	65
15	แสดงผลของส่วน Dialysable และ Non-dialysable fraction ต่อ BA-rLH และ RIA-rLH .....	61