

ผลของแคดเมียมและคอปเปอร์ต่อการแสดงออกของยีน Metallothionein ในปลานิล

Effects of Cadmium and Copper on Metallothionein Gene Expression in

Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ดวงใจ พิสุทธิธาราชชัย^{1*} และธนกร เหมะสกล²

Duangjai Pisuttharachai^{1*} and Tanakorn Haemasaton²

บทคัดย่อ

ปลานิลเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีการเลี้ยงทุกภาคของประเทศไทย ดังนั้นปลานิลจึงเป็นตัวอย่างที่ดีในการศึกษาสารตกค้างโลหะหนักในแหล่งน้ำ Metallothionein (MT) เป็นโปรตีนที่สามารถจับกับโลหะหนักได้หลายชนิด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของแคดเมียมและคอปเปอร์ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกันต่อการแสดงออกของยีน MT ในปลานิล โดยแช่ปลาในน้ำผสมแคดเมียม (0.25 และ 2.50 ไมโครกรัมต่อลิตร) และคอปเปอร์ (25 และ 250 ไมโครกรัมต่อลิตร) นาน 1 2 4 และ 8 ชั่วโมง เก็บเนื้อเยื่อตับ สกัด Total RNA แล้วสังเคราะห์ First strand cDNA เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าแคดเมียม 0.25 ไมโครกรัมต่อลิตรสามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนภายใน 1 ชั่วโมง ขณะที่คอปเปอร์ 25 ไมโครกรัมต่อลิตร จะมีการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับนาน 2 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีน MT สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีววิทยาเพื่อประเมินการปนเปื้อนของแคดเมียมและคอปเปอร์ในแหล่งน้ำได้ โดยการแสดงออกของยีน MT มีความไวต่อแคดเมียมมากกว่าคอปเปอร์

คำสำคัญ: ยีนเมทัลโลไธโอนีน แคดเมียม คอปเปอร์ ตับ ปลานิล

¹ อ.ดร., สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมงและทรัพยากรทางน้ำ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ ชุมพร 86160

² อ., สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมงและทรัพยากรทางน้ำ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ ชุมพร 86160

¹ Lecturer, Dr., Fishery Science and Aquatic Resources, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Prince of Chumphon Campus, 86160

² Lecturer, Fishery Science and Aquatic Resources, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Prince of Chumphon Campus, 86160

* Corresponding author: E-mail address: duangjai.pisut06@gmail.com

Abstract

Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the economic aquaculture which is widely cultured in Thailand. Therefore, it is suitable as a test animal for detecting heavy metal contamination in natural waters. Metallothionein (MT) is a metal-binding protein and its expression is stimulated by essential metal as well as toxic metals. The purpose of this study was to compare cadmium and copper exposure at different concentrations and time periods on expression of MT gene in tilapia. Fish were exposed to cadmium (0.25 and 2.50 $\mu\text{g/L}$) and copper (25 and 250 $\mu\text{g/L}$) for 1, 2, 4 and 8 hrs. Liver tissues were collected at each time point for total RNA extraction. Subsequently, first strand cDNA was synthesized and used as template in the PCR reaction. Expression of MT gene was detected using RT-PCR technique. Results indicated that gene expression was induced within 1 hour of exposure to cadmium (0.25 $\mu\text{g/L}$), while that for copper exposure (25 $\mu\text{g/L}$) was 2 hrs. In conclusion, MT gene can be used as biomarker for detecting cadmium and copper contamination in natural waters. MT expression is more sensitive to cadmium than copper exposure.

Keywords: Metallothionein, Cadmium, Copper, Liver, *Oreochromis niloticus*

บทนำ

ปัจจุบันโลหะหนักมีการปนเปื้อนลงสู่ธรรมชาติสิ่งแวดล้อมในทุก ๆ วัน จากการขยายตัวของภาคอุตสาหกรรม ซึ่งมีผลกระทบอย่างมากต่อสิ่งมีชีวิตและระบบนิเวศ แคดเมียมและคอปเปอร์จัดเป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูง และมีการปนเปื้อนในแหล่งน้ำหลายพื้นที่ทั่วโลก [1] ในประเทศไทยพบว่าตะกอนดินบริเวณชายฝั่งทะเลของอ่าวไทยตอนบนมีการปนเปื้อนของโลหะหนักแคดเมียมและคอปเปอร์เกินค่ามาตรฐาน มีค่าเฉลี่ย 2.05 และ 16.21 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยแคดเมียมพบมากบริเวณปากน้ำท่าจีน และคอปเปอร์พบมากบริเวณปากน้ำเจ้าพระยา [2] แคดเมียมและคอปเปอร์สามารถสะสมอยู่ในสัตว์น้ำที่อาศัยอยู่ในแหล่งที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักทั้งสองชนิดได้ ซึ่งปลาเป็นสัตว์น้ำที่มีความไวสูงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับแคดเมียมและคอปเปอร์ในน้ำ โดยโลหะหนักเหล่านี้มีผลกระทบทำให้ปลาเกิดการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ อัตราการสืบพันธุ์ลดลง เกิดโรคได้ง่าย มีผลต่อพฤติกรรม และอัตราเมตาบอลิซึม [3-6] ในประเทศไทยปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีการเลี้ยงอย่างกว้างขวางในแหล่งน้ำทั่วทุกภูมิภาค ดังนั้นปลานิลจึงนับเป็นตัวอย่างที่ดีในการใช้เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนโลหะหนักในแหล่งน้ำ

ปัจจุบันการศึกษาทางการแสดงออกของยีน (Gene Expression) ที่ได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนได้ ซึ่งให้ผลรวดเร็วและใช้ตัวอย่างปริมาณไม่มากในการตรวจสอบ ในสิ่งมีชีวิตที่มีการแสดงออกเมื่อถูกกระตุ้นด้วยโลหะหนักคือ ยีน Metallothionein (MT) ซึ่งเป็นโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ 6 – 7 kDa มีหมู่ thiol (-SH) อยู่ใน cysteine ทำให้สามารถจับกับโลหะหนักได้ [7] ดังนั้นจึงเกี่ยวข้องกับการควบคุมสมดุลของโลหะหนักที่มีความจำเป็นต่อเซลล์ (Essential Metals) กำจัดโลหะที่เป็นพิษ (Toxic metals) ป้องกันการเกิดความเครียด และปกป้องเซลล์ประสาท [8] ในสัตว์น้ำยีน MT ถูกค้นพบครั้งแรกในปลา *Sebastes seboides* [9] สำหรับปลาในสกุล *Oreochromis* มีรายงานแล้วว่า คอปเปอร์ แคดเมียม ปรอท นิกเกิล ตะกั่ว สังกะสี เหล็ก แมงกานีส และ โครเมียม สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน MT ในตับของปลาได้ [10-12] และมีการแสดงออกของยีนมากกว่าในกล้ามเนื้อ [13-14] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ตับเป็นอวัยวะที่มีความไวต่อโลหะหนักมากกว่าไตและเหงือก [15] ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกเนื้อเยื่อตับในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน MT และจากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาโดยมากแล้วจะศึกษาถึงชนิดของโลหะหนักที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน MT แต่ยังไม่มียานการศึกษาเปรียบเทียบผลของแคดเมียมและคอปเปอร์ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกันต่อการแสดงออกของยีน MT ในตับปลานิล

วิธีการวิจัย

1. การทดสอบสัตว์ทดลองด้วยแคดเมียมและคอปเปอร์

ปลานิลที่ใช้ในการทดลองมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 115.50 ± 0.31 กรัม นำมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 40 x 90 x 45 เซนติเมตร จำนวน 4 ตู้ ๆ ละ 8 ตัว แต่ละตู้บรรจุน้ำ 90 ลิตร พร้อมให้อากาศอย่างเพียงพอ จากนั้นเติมแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 2.50 ไมโครกรัมต่อลิตร และ คอปเปอร์ที่ระดับความเข้มข้น 25 และ 250 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 1 ตู้

2. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและการสกัด Total RNA

เก็บเนื้อเยื่อตับโดยสุ่มปลานิลที่แช่ในน้ำผสมแคดเมียมและคอปเปอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลานาน 1 2 4 และ 8 ชั่วโมง ช่วงเวลาละ 2 ตัว (1 ตัว คือ 1 ซ้ำ) ใส่หลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Trizol reagent 500 ไมโครลิตร แล้วบดเนื้อเยื่อด้วย Homogenizer เมื่อบดละเอียดแล้วจึงดูดเอาสารละลายดังกล่าวใส่ในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Trizol reagent อีก 500 ไมโครลิตร จากนั้นสกัด Total RNA ตามวิธีของบริษัท Molecular center, Inc โดยมีรายละเอียดดังนี้ ใช้เข็มฉีดยาขนาด 24G และกระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร ดูดสารละลายของตัวอย่างทั้งหมดขึ้นลง 3 - 5 นาที เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เติม Chloroform 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องอีก 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดส่วนใสซึ่งเป็นชั้นของ Total RNA ใส่ในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม Isopropyl alcohol 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดสารละลายด้านบนทิ้งแล้วเติม 75% Ethanol 1 มิลลิลิตร เพื่อเก็บรักษาตะกอน Total RNA ให้ได้นาน ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกระทั่งใช้

นำ Total RNA ที่เก็บใน 75% Ethanol ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นดูดเอาส่วน 75% Ethanol ออก เหลือเฉพาะตะกอนสีขาว ตกให้แห้งแล้วเติม DEPC water เพื่อละลาย Total RNA ที่ได้ โดยปริมาณ DEPC water ที่ใส่แต่ละตัวอย่างจะแตกต่างกันตามปริมาณ Total RNA ที่สกัดได้ วัดปริมาณความเข้มข้นของ Total RNA ด้วยเครื่อง NanoDrop™ Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

3. การสังเคราะห์ first strand cDNA (Complementary DNA)

การสังเคราะห์ First strand cDNA ใช้ชุดสำเร็จรูป Revert Aid M-MuLV Reverse Transcriptase kit (Fermentas) โดยมีขั้นตอนดังนี้ เติม Oligo (dt)₂₀ primer 0.5 ไมโครลิตร ลงในหลอด PCR จากนั้นเติมตัวอย่าง Total RNA และ Nuclease-free water ที่แปรผันตามปริมาณความเข้มข้นของ Total RNA โดยปริมาณ Total RNA กำหนดให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 ไมโครกรัม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วจึงแช่ในน้ำแข็งนาน 1 นาที เติม iScript select reaction mix 2 ไมโครลิตร และ iScript reverse transcriptase 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เก็บ First strand cDNA ที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่านำมาใช้

4. การทำ Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

โดยใช้ First strand cDNA ของแต่ละตัวอย่างเป็นต้นแบบ (Template) และใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่มีความจำเพาะต่อยีน MT และ β -actin (ตารางที่ 1) ซึ่งสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย First strand cDNA 1.0 ไมโครลิตร 10 μ M Forward Primer 1.0 ไมโครลิตร 10 μ M Reverse Primer 1.0 ไมโครลิตร 10X Taq Buffer 2.5 ไมโครลิตร 2.5 mM MgCl₂ 0.8 ไมโครลิตร 2.5 mM dNTP 2.5 ไมโครลิตร 5 unit Taq DNA Polymerase 0.1 ไมโครลิตร (Fermentas) และ Distilled water 17.0 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 25.9 ไมโครลิตร จากนั้นเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยเครื่อง Thermal cycler machine

โดยกำหนดให้สภาวะการทำงานดังนี้ ช่วงแรก (Denaturing) ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ ช่วงที่สอง (Annealing) ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 30 วินาที 25 รอบ และช่วงที่สาม (Extension) ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์และขนาดไพรเมอร์ของยีน MT และ β -actin

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-----> 3'	ขนาดผลิตภัณฑ์ (PCR product) (bp)	อ้างอิง (Accession Number)
MT-Forward	GCCAAGACTGGAACCTGC	129	EU005543
MT-Reverse	GCACACGCAGCCAGAGGC		
β -actin-Forward	ACCACCACAGCCGAGAGGGA	500	EF206801
β -actin-Reverse	CCCAACCAAACGCCCAACAA		

5. การตรวจยืนยันขนาดผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบผลการแสดงออกของยีน MT และ β -actin ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1X TBE และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ จากนั้นจึงตรวจสอบแถบผลิตภัณฑ์ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ประเมินและวิเคราะห์ความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการ densitometry analysis โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่าย image J (National Institutes of Health) และใช้ β -actin ในการ normalize การแสดงออกของยีนเป้าหมาย นำข้อมูลการแสดงออกของยีนเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแคดเมียมหรือคอปเปอร์ที่ช่วงโมเมนต์เดียวกันแต่ต่างระดับความเข้มข้นมาวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วย *t*-test และทดสอบความแตกต่างภายในกลุ่มที่แช่แคดเมียมหรือคอปเปอร์ที่ช่วงโมเมนต์ต่างกัน โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยในแต่ละช่วงเวลาด้วยวิธี DMRT โดยโปรแกรม The SAS system for window version 6.12 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

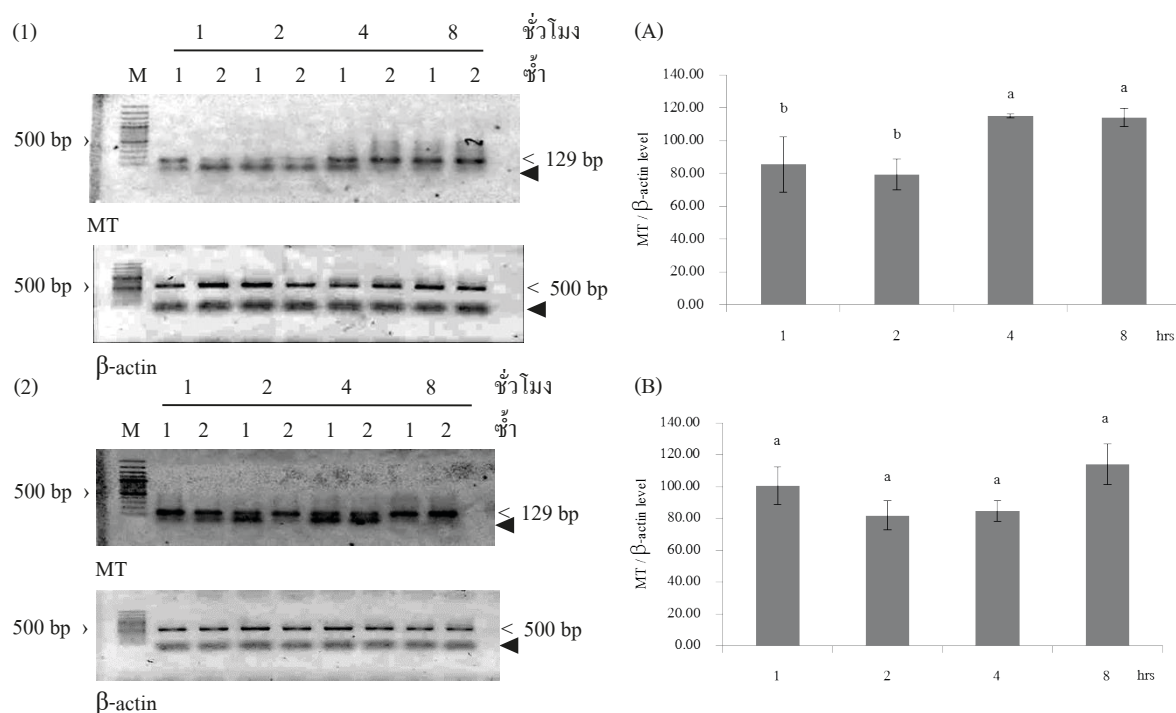
ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

1. ผลการออกแบบไพรเมอร์เพื่อการยืนยันขนาดผลิตภัณฑ์

จากการสกัด Total RNA แล้วสังเคราะห์ First strand cDNA จากเนื้อเยื่อตับปลานิลที่ได้รับโลหะหนักแคดเมียมและคอปเปอร์ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน แล้วใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน MT ในการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยเครื่อง Thermal cycler machine พบว่า มีการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับ ตามการทดลองของ Cheung *et al.* [10] และ Cheung *et al.* [11] ที่รายงานว่า แคดเมียมและคอปเปอร์สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน MT ในตับของปลาสกุล *Oreochromis* ได้ โดยแถบผลิตภัณฑ์ของยีน MT ในทุกตัวอย่างของการทดลองมีขนาด 129 bp ส่วนยีน β -actin ซึ่งเป็น Housekeeping gene ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมภายใน (Internal Control) ของการทดลองนี้มีขนาด 500 bp ตรงตามที่ได้ออกแบบตำแหน่งไพรเมอร์ไว้ สำหรับการทำปฏิกิริยา RT-PCR พบว่า เกิดแถบ DNA บริเวณด้านล่างของเจล ซึ่งอาจเกิดจากการจับกันเองของไพรเมอร์ (Primer Dimer) อันเนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ช่วงที่สอง (Annealing) อาจไม่เหมาะสม ทำให้การทำงานของไพรเมอร์เกิดความไม่จำเพาะเจาะจงได้ หรืออาจเกิดจากความเข้มข้นของไพรเมอร์ในปฏิกิริยามากเกินไปทำให้เกิดการจับกันเองของไพรเมอร์ได้

2. ผลของแคดเมียมต่อการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับปลานิลด้วยเทคนิค RT-PCR

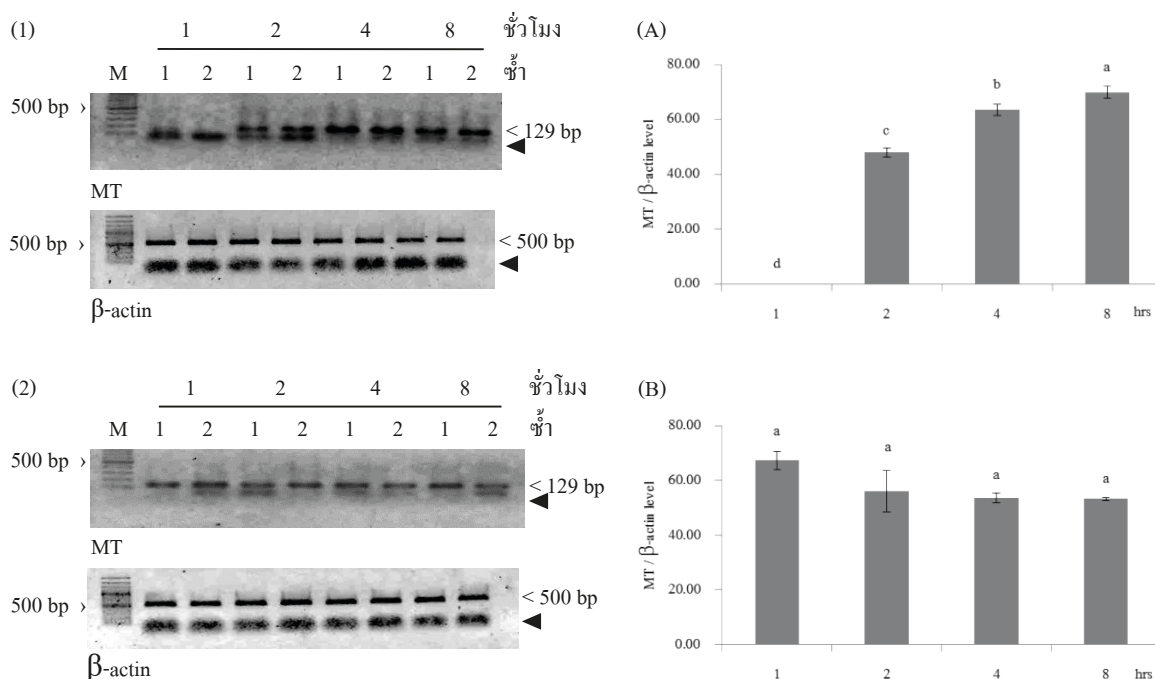
ผลของแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกันต่อการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับปลานิล พบว่า มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการได้รับแคดเมียมที่นานขึ้น โดยการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับที่ได้รับแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง จะมีการแสดงออกของยีน MT น้อยกว่าที่ระยะเวลา 4 และ 8 ชั่วโมง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สอดคล้องกับการทดลองของ Utampongsa [16] รายงานว่าการแสดงออกของ MT mRNA ในตับปลาดุกเพียนขาวมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการได้รับแคดเมียมที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากการยับยั้งของเซลล์กับแคดเมียมที่สะสมมากขึ้นในเซลล์ตับ สำหรับเนื้อเยื่อตับปลานิลที่ได้รับแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 2.50 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณมากขึ้น 10 เท่า พบว่า การแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับที่ระยะเวลาต่างกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ภาพที่ 1) ซึ่งอาจเกิดจากภาวะอิ่มตัวของเนื้อเยื่อในการสะสมแคดเมียมหรือเกิดกลไกการขับสารพิษที่มากเกินไปของตัวปลาจึงทำให้การแสดงออกของยีน MT ไม่แตกต่างกัน [17-18] และเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับปลานิลที่ได้รับแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 2.50 ไมโครกรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงเดียวกัน พบว่าทุกช่วงเวลาของการได้รับแคดเมียมมีการแสดงออกของยีน MT ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) (ภาพที่ 3)



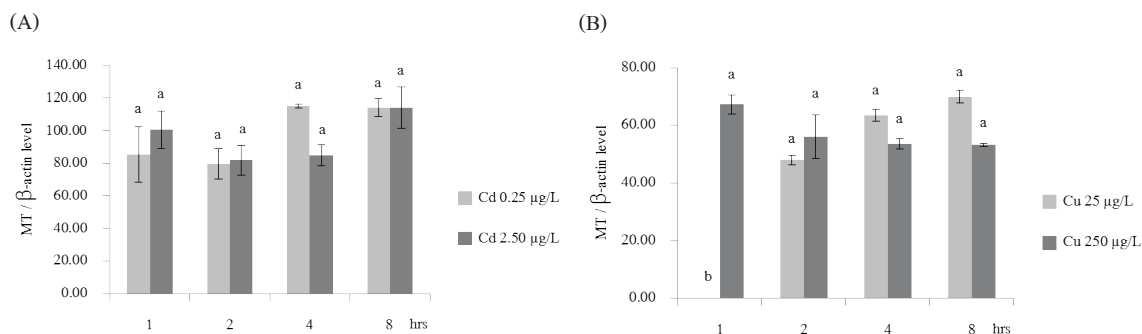
ภาพที่ 1 การแสดงออกของยีน MT และ β -actin ด้วยเทคนิค RT-PCR ในเนื้อเยื่อตับปลานิลที่แช่ในน้ำผสมแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0.25 (1) และ 2.50 (2) ไมโครกรัมต่อลิตรเป็นเวลานาน 1 2 4 และ 8 ชั่วโมง (M = Marker, $\blacktriangleleft$ = Primer dimer) และ กราฟการแสดงออกของยีน MT (จากการวัดความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการ densitometry analysis โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่าย image J) ในเนื้อเยื่อตับปลานิลที่แช่ในน้ำผสมแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0.25 (A) และ 2.50 (B) ไมโครกรัมต่อลิตรเป็นเวลานาน 1 2 4 และ 8 ชั่วโมง ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3. ผลของคอปเปอร์ต่อการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับปลานิลด้วยเทคนิค RT-PCR

ผลของคอปเปอร์ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกันต่อการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับปลานิลพบว่า การแสดงออกของยีน MT มีความสัมพันธ์กับทั้งระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับคอปเปอร์ โดยปลานิลที่ได้รับคอปเปอร์ที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อลิตร นาน 1 ชั่วโมง ไม่พบการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับ แต่จะเริ่มมีการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับคอปเปอร์นาน 2 4 และ 8 ชั่วโมง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 2) สำหรับความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน MT กับระดับความเข้มข้นที่ได้รับคอปเปอร์ พบว่าปลานิลที่ได้รับคอปเปอร์ที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อลิตร นาน 1 ชั่วโมง ไม่มีการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับ แต่ปลานิลที่ได้รับคอปเปอร์ที่ระดับความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อลิตร มีการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ที่ได้รับคอปเปอร์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สอดคล้องกับการทดลองของ Pederson *et al.* [19] รายงานว่าการแสดงออกของยีน MT ในเหงือกปลู *Carcinus maenas* จะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของคอปเปอร์ที่ได้รับ สำหรับที่ระยะเวลา 2 4 และ 8 ชั่วโมง พบว่าการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับปลานิลที่ถูกกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ที่ระดับความเข้มข้น 25 และ 250 ไมโครกรัมต่อลิตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) (ภาพที่ 3) อาจเนื่องจากระยะเวลาการได้รับคอปเปอร์ที่นานขึ้นทำให้เกิดภาวะอัมตของโลหะหนักในเนื้อเยื่อหรือเกิดกลไกการขับสารพิษที่มากเกินไปเช่นเดียวกับแคดเมียม



ภาพที่ 2 การแสดงออกของยีน MT และ β -actin ด้วยเทคนิค RT-PCR ในเนื้อเยื่อตับปลานิลที่แช่ในน้ำผสมคอปเปอร์ที่ระดับความเข้มข้น 25 (1) และ 250 (2) ไมโครกรัมต่อลิตรเป็นเวลานาน 1 2 4 และ 8 ชั่วโมง (M = Marker, $\blacktriangleleft$ = Primer dimer) และกราฟการแสดงออกของยีน MT (จากการวัดความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการ densitometry analysis โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่าย image J) ในเนื้อเยื่อตับปลานิลที่แช่ในน้ำผสมคอปเปอร์ที่ระดับความเข้มข้น 25 (A) และ 250 (B) ไมโครกรัมต่อลิตรเป็นเวลานาน 1 2 4 และ 8 ชั่วโมง ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 3 กราฟเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน MT (จากการวัดความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการ densitometry analysis โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่าย image J) ในเนื้อเยื่อตับปลานิล เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแคดเมียม (A) หรือ คอปเปอร์ (B) ต่างระดับความเข้มข้นที่ชั่วโมงเดียวกัน ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบความไวของแคดเมียมและคอปเปอร์ต่อการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับปลานิล พบว่าแคดเมียมมีความไวในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับปลานิล ได้ดีกว่าคอปเปอร์ เนื่องจากระดับความเข้มข้นของแคดเมียมที่ใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน MT น้อยกว่าระดับความเข้มข้นของคอปเปอร์ โดยระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการได้รับแคดเมียมต่ำสุดที่กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับ คือ 0.25 ไมโครกรัมต่อลิตร นานเพียง 1 ชั่วโมง สำหรับคอปเปอร์ที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อลิตร จะมีการแสดงออกของยีน MT เมื่อได้รับนาน 2 ชั่วโมงขึ้นไป สอดคล้องกับการทดลองของ Cho *et al.* [15] รายงานว่า แคดเมียมมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน MT ในปลา *Hemibarbus mylodon* ดีกว่าคอปเปอร์และสังกะสี

สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับคอปเปอร์มีผลต่อการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับปลานิล สำหรับแคดเมียมการแสดงออกของยีน MT จะมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ได้รับแคดเมียมเท่านั้น การได้รับแคดเมียมหรือคอปเปอร์ในระดับความเข้มข้นที่สูงหรือระยะเวลานานเกินไปจะมีผลต่อการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับไม่แตกต่างกัน อาจเกิดจากภาวะอิมมูนตัวของโลหะหนักในเนื้อเยื่อหรือเกิดกลไกการขับสารพิษที่มากเกินไปของตัวปลา นอกจากนี้ยังพบว่าแคดเมียมมีความไวในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับปลานิล ได้ดีกว่าคอปเปอร์

เอกสารอ้างอิง

- [1] Reiley, M.C. (2007). "Science, policy, and trends of metals risk assessment at EPA: How understanding metals bioavailability has changed metals risk assessment at US EPA", *Aquatic Toxicology*. 84(2), 292-298.
- [2] Rermumri, S., Kareas, S. and Wongsontam, K. (2009). "Heavy metals contamination in seawater and sediment in the upper gulf of Thailand", In *Proceedings of 47th Kasetsart University Annual Conference: Natural Resources and Environment*. Bangkok. 221-228.

- [3] Handya, R.D., Sims, D.W., Giles, A., Campbella, H.A. and Musondaa, M.M. (1999). "Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper", **Aquatic Toxicology**. 47(1), 23-41.
- [4] Wu, S.M., Lin, H.C. and Yanga, W.L. (2008). "The effects of maternal Cd on the metallothionein expression in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae", **Aquatic Toxicology**. 87(4), 296-302.
- [5] Wang, L.L., Song, L.S., Ni, D.J., Zhang, H. and Liu, W.Q. (2009). "Alteration of metallothionein mRNA in bay scallop *Argopecten irradians* under cadmium exposure and bacteria challenge", **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. 149(1), 50-57.
- [6] Hollis, L., McGeer, J.C., McDonald, D.G. and Wood, C.M. (1999). "Cadmium accumulation, gill Cd binding, acclimation, and physiological effects during long term sublethal Cd exposure in rainbow trout", **Aquatic Toxicology**. 46(2), 101-119.
- [7] Hylland, K., Haux, C., Hogstrand, C., Sletten, K. and Andersen, R.A. (1994). "Properties of cod metallothionein, its presence in different tissues and effects of Cd and Zn treatment", **Fish Physiology and Biochemistry**. 13(1), 81-91.
- [8] Wang, W.C., Mao, H., Ma, D.D. and Yang, W.X. (2014). "Characteristics, functions, and applications of metallothionein in aquatic vertebrates", **Frontiers in Marine Science**. 34(1), 1-12.
- [9] Olafson, R.W. and Thompson, J.A.J. (1974). "Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates", **Marine Biology**. 28(2), 83-86.
- [10] Cheung, A.P.L., Lam, T.H.J. and Chan, K.M. (2004). "Regulation of Tilapia metallothionein gene expression by heavy metal ions", **Marine Environmental Research**. 58(2-5), 389-394.
- [11] Cheung, P.L.A., Kwok, L.L.V. and Chan, K.M. (2005). "Tilapia metallothionein genes: PCR-cloning and gene expression studies", **Biochimica et Biophysica Acta**. 1731(3), 191-201.
- [12] Chatterjee, S., Datta, S., Das, T.K., Veer, V., Mishra, D., Chakraborty, A., Chattopadhyay, B., Datta, S., Mukhopadhyay, S.K. and Gupta, D.K. (2016). "Metal accumulation and metallothionein induction in *Oreochromis niloticus* grown in wastewater fed fishponds", **Ecological Engineering**. 90, 405-416.
- [13] Chan, P.C., Shiu, C.K.M., Wong, F.W.Y., Wong, J.K.Y., Lam, K.L. and Chan, K.M. (2004). "Common carp metallothionein-1 gene: cDNA cloning, gene structure and expression studies", **Biochimica et Biophysica Acta**. 1676, 162-171.
- [14] Lin, C.H., John, J.A., Ou, L.W., Chen, J.C., Lin, C.H. and Chang, C.Y. (2004). "Cloning and characterization of metallothionein gene in ayu *Plecoglossus altivelis*", **Aquatic Toxicology**. 66, 111-124.
- [15] Cho, Y.S., Lee, S.Y., Kim, K.Y., Bang, I.C., Kim, D.S. and Nam, Y.K. (2008). "Gene structure and expression of metallothionein during metal exposures in *Hemibarbus mylodon*", **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 71(1), 125-137.
- [16] Utarnpongsa, S. (2003). **Effect of Cadmium on Metallothionein mRNA in Silver Carp, *Puntius gonionotus***. Master of Science Degree. Mahidol University.

- [17] Langston, W.J., Chesman, B.S., Burt, G.R., Pope, N.D. and McEvoy, J. (2002). “Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: an indicator of environmental quality?”, **Marine Environmental Research**. 53, 263-293.
- [18] Basha, P.S. and Rani, A.U. (2003). “Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia)”, **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 56, 218-221.
- [19] Pedersen, S.N., Lundebye, A.K. and Depledge, M.H. (1997). “Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals”, **Aquatic Toxicology**. 37(2-3), 183-200.