

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ข้าพเจ้า อ.ดร. ปริญญาพร หนูอุไร ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณโครงการวิจัยภายใต้ โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา สกอ. (HERP) โครงการวิจัยเรื่อง ผลทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ gonadotropin releasing hormone ต่อกระบวนการสืบพันธุ์ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* (The biological effect of synthetic gonadotropin releasing hormone on the reproductive process of *H. asinina*) รหัสโครงการ 2557A10862021 / สัญญาเลขที่ 6/2557 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 250,000 บาท (สองแสนห้าหมื่นบาทถ้วน) ระยะเวลาดำเนินงาน 2 ปี (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2556 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2558)

บทคัดย่อ

โกนาโดโทรปิน รีลีสซิงฮอร์โมน (GnRH) เป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญในการควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์ ซึ่งมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง แต่ยังไม่พบรายงานการศึกษาหน้าที่ของ GnRH ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสืบพันธุ์ในหอยเป่าชื่อ จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ *Haliothis asinina* (Has) GnRH และ buserelin ซึ่งเป็นสารจำพวก mammalian GnRH agonist ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์สืบพันธุ์ในรังไข่ระยะ proliferative หรือ ระยะ premature ด้วยวิธี *in vitro* 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) assay และศึกษาการหลังลูติในซิงฮอร์โมน และเอสโตรเจนในรังไข่และ hemolymph ของหอยเป่าชื่อเพศเมีย *H. asinina* ด้วยวิธี ELISA assay ผลของ HasGnRH และ buserelin ต่อการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์พบว่า buserelin และ HasGnRH ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่ระยะ oogonia และระยะ early oocyte ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย HasGnRH ให้ผลในการกระตุ้นได้ดีกว่า buserelin แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10^{-4} M ทำให้มีการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่น้อยลง นอกจากนี้ HasGnRH ยังมีผลกระตุ้นการหลังลูติเอสโตรเจนแบบ dose dependent และการหลังลูติในซิงฮอร์โมน จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นบทบาทที่สำคัญของ GnRH ต่อกระบวนการเจริญพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป่าชื่อ *H. asinina* จากข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการกระตุ้นการเจริญพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในช่วงวงจรการสืบพันธุ์ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ในฟาร์มเพาะเลี้ยง

คำหลัก : โกนาโดโทรปิน รีลีสซิงฮอร์โมน, *Haliothis asinina*, การเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่, วิธี BrdU

ผลผลิตที่ได้จากโครงการ

1. บทความวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ 1 เรื่อง ตามเกณฑ์ ก.พ.อ.

Nurai P, Cummins SF, Botwright NA, Sobhon P. Characterization of an abalone gonadotropin-releasing hormone and its effect on ovarian cell proliferation. *Aquaculture*. 2015; 450: 116-122.

2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ 1 เรื่อง

ปริญญาพร หนูอุไร. ผลทางชีวภาพของสารสังเคราะห์โกนาโดโทรปินรีลีสซิงฮอร์โมนต่อกระบวนการสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮื้อ *Haliotis asinina*. การประชุมใหญ่โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา ครั้งที่ 3, นครศรีธรรมราช, ประเทศไทย (วันที่ 9-11 มีนาคม 2558).

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับหน้าที่ของ GnRH ในหอยเป่าฮื้อ ซึ่งสามารถนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงหอยเป่าฮื้อ *Haliotis asinina* ในระดับมหภาคเพื่อเพิ่มผลผลิตได้ หรือนำองค์ความรู้ไปศึกษาต่อในอนาคต เช่นการดัดแปลงโครงสร้างของ GnRH เพื่อให้สามารถทำหน้าที่ในกระตุ้นพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์และอวัยวะสืบพันธุ์โดยไม่มีผลข้างเคียงต่อพ่อแม่พันธุ์ การผลิตฮอร์โมน GnRH แบบแคปซูล เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของฮอร์โมนได้ดียิ่งขึ้น และลดการบาดเจ็บของหอยเป่าฮื้อ *Haliotis asinina* จากการฉีดกระตุ้นซ้ำๆ หลายครั้ง หรืออาจต่อยอดทำการวิจัยร่วมกับบริษัทเอกชนในการนำ GnRH สังเคราะห์มาผสมกับอาหารและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมให้กับพ่อแม่พันธุ์หอยเป่าฮื้อเพื่อเร่งให้เกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้มากขึ้น ทำให้ได้ผลผลิตลูกหอยจำนวนมากขึ้น



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2557

โครงการ

ผลทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ gonadotropin releasing hormone ต่อ
กระบวนการสืบพันธุ์ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina*

The biological effect of synthetic gonadotropin releasing hormone on the
reproductive process of *H. asinina*

ดร. ปริญาพร หนูไธ

มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน 2558

รหัสโครงการ 2557A10862021

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2557

โครงการ

ผลทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ gonadotropin releasing hormone ต่อ
กระบวนการสืบพันธุ์ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina*

The biological effect of synthetic gonadotropin releasing hormone on the
reproductive process of *H. asinina*

ดร. ปริญาพร หนูไธ

มหาวิทยาลัยบูรพา

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัย
ในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อภาษาไทย	2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	3
บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	4
แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย	5
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	5
วัตถุประสงค์	12
วิธีดำเนินการวิจัย	12
ผลการวิจัย	16
อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย	19
สรุปผลการวิจัย	21
ผลผลิตที่เกิดขึ้นในช่วงที่ได้รับทุน	21
รายงานการเงิน	22
บรรณานุกรม	24
ภาคผนวก	30
ประวัตินักวิจัย	39

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยชิ้นนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักงานบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยใน
อุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และขอขอบคุณ
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อนุมัติให้ทำโครงการวิจัยนี้ ตลอดจนสนับสนุนอุปกรณ์ เครื่องมือ
และครุภัณฑ์ในการทำการวิจัยให้ลุล่วงและสำเร็จได้ด้วยดี

บทคัดย่อ

โกนาโดโทรปิน รีริสสิ่งฮอร์โมน (GnRH) เป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญในการควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์ ซึ่งมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง แต่ยังไม่พบรายงานการศึกษาหน้าที่ของ GnRH ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสืบพันธุ์ในหอยเป่าฮื้อ จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ *Haliotis asinina* (Has) GnRH และ buserelin ซึ่งเป็นสารจำพวก mammalian GnRH agonist ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์สืบพันธุ์ในรังไข่ระยะ proliferative หรือ ระยะ premature ด้วยวิธี *in vitro* 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) assay และศึกษาการหลังลูติในซิงฮอร์โมน และเอสโตรเจนในรังไข่และ hemolymph ของหอยเป่าฮื้อเพศเมีย *H. asinina* ด้วยวิธี ELISA assay ผลของ HasGnRH และ buserelin ต่อการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์พบว่า buserelin และ HasGnRH ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่ระยะ oogonia และระยะ early oocyte ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย HasGnRH ให้ผลในการกระตุ้นได้ดีกว่า buserelin แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10^{-4} M ทำให้มีการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่ลดลง นอกจากนี้ HasGnRH ยังมีผลกระตุ้นการหลังเอสโตรเจนแบบ dose dependent และการหลังลูติในซิงฮอร์โมน จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นบทบาทที่สำคัญของ GnRH ต่อกระบวนการเจริญพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* จากข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการกระตุ้นการเจริญพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในช่วงวงจรการสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* ในฟาร์มเพาะเลี้ยง

คำหลัก : โกนาโดโทรปิน รีริสสิ่งฮอร์โมน, *Haliotis asinina*, การเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่, วิธี BrdU

Abstract

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is an important regulator of reproductive function in vertebrate and invertebrate. However, knowledge of the biological function in the abalone is inadequate. Therefore, we have study the biological function of *Haliotis asinina* (Has) GnRH and buserelin, mammalian GnRH agonist, on the ovarian proliferation by *in vitro* BrdU assay. The effect of HasGnRH and buserelin on luteinizing hormone (LH) and estrogen release was also determined by ELISA technique. Groups of one-year-old female abalone were injected with HasGnRH and buserelin at doses of 10^{-6} M exhibited a stimulatory effect on ovarian maturation and oocyte proliferation ($P < 0.05$). The HasGnRH at high dose of 10^{-4} M had a lesser effect on inducing ovarian maturation and oocyte proliferation. In addition, injections of buserelin and HasGnRH stimulated estrogen secretion in the ovary and hemolymph with the dose-dependent. In contrast, injection of HasGnRH and buserelin at low doses of 250 ng/gBW promoted LH release in the hemolymph. These findings provide important knowledge on the biological function of GnRH on the reproduction which could be applied in abalone aquaculture to stimulate the ovarian maturation.

Keywords: Gonadotropin releasing hormone, *Haliotis asinina*, ovarian cell proliferation, BrdU assay

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

หอยเป่าฮือเป็นหอยทะเลฝาเดียวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและนิยมนบริโภคกันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศเช่น จีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน ออสเตรเลีย และสหรัฐอเมริกา เนื่องจากรสชาติดี มีโปรตีนสูงและไขมันน้อย ในประเทศไทยมีหอยเป่าฮือพันธุ์พื้นเมือง *H. asinina* เป็นพันธุ์ที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ เพราะมีขนาดใหญ่ อัตราส่วนระหว่างเนื้อต่อเปลือกสูง และเจริญเติบโตเร็ว การเพาะเลี้ยงหอยเป่าฮือในประเทศไทยระยะแรกไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรเนื่องจากขาดข้อมูลทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับวงจรการพัฒนารูปร่าง การสืบพันธุ์ และเทคนิคการเลี้ยง ต่อมาศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก จังหวัดระยอง และศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์สามารถเพาะพันธุ์หอยเป่าฮือชนิดนี้ได้ในระดับหนึ่ง และสามารถผลิตลูกหอยส่งต่อให้ฟาร์มนำไปเพาะเลี้ยงได้ (Singhagraiwan and Doi, 1993) ปัจจุบันมีฟาร์มเพาะเลี้ยงหอยเป่าฮือหลายแห่งในเขตชายฝั่งทะเลอ่าวไทยและอันดามัน

อย่างไรก็ตามข้อมูลทางงานวิจัยของหอยเป่าฮือส่วนใหญ่เป็นการศึกษาจากหอยเป่าฮือสายพันธุ์อื่น เช่น *H. rufescens* จากสหรัฐอเมริกา *H. discus hannai* จากญี่ปุ่น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มผลผลิตของลูกหอย เช่น การพัฒนาของตัวอ่อน การเลือกใช้อาหารที่เพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและน้ำหนักของลูกหอย สำหรับข้อมูลพื้นฐานต่างๆ เกี่ยวกับหอยเป่าฮือชนิด *H. asinina* เริ่มมีการศึกษาค้นคว้ามากขึ้น เช่นการศึกษาทางด้านชีววิทยาการสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮือในระยะต่างๆ ของวงจรการสืบพันธุ์ การศึกษากายวิภาคของระบบประสาท ปมประสาทและเซลล์ประสาทชนิดต่างๆ การศึกษาการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในระยะต้นจนถึงตัวเต็มวัย การกระตุ้นการตกไข่ในเพศเมีย จากการศึกษาเหล่านี้ทำให้ได้ทราบถึงข้อมูลที่มีความสำคัญในการปรับปรุงผลผลิตและการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮือ อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงหอยเป่าฮือยังคงประสบกับปัญหาที่เกิดจากความไม่พร้อมของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ในการผสมพันธุ์เนื่องจากระยะเวลาการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ในแต่ละเพศแตกต่างกัน ปัจจุบันนี้มียางงานการศึกษาวิจัยในหอยเป่าฮือ พบฮอร์โมนและสารสื่อประสาทต่างๆ ที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต การกระตุ้นการลงเกาะ การกินอาหาร เช่น สารสื่อประสาท GABA และ serotonin (5-HT) สารประเภท neuropeptide ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ และกระบวนการสืบพันธุ์เช่น egg laying hormone (ELH) และ gonadotropin releasing hormone (GnRH) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิจัยกันอย่างแพร่หลายเกี่ยวกับโครงสร้างระดับโมเลกุล ลำดับสารพันธุกรรม กรดอะมิโน และบทบาทหน้าที่ของ GnRH ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง รวมถึงหอยสายพันธุ์ใกล้เคียง เช่น หอยทากทะเล *Aplysia californica* หอยนางรม *Crassostrea gigas* และหอยแครง *Patinopecten yessoensis* ซึ่งปัจจุบันยังไม่พบการรายงานการศึกษาถึงหน้าที่ของ GnRH ที่สังเคราะห์จากปมประสาทต่อกระบวนการสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮือ *H. asinina*

2. แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

การนำสารสังเคราะห์ GnRH จากหอยสายพันธุ์ *H. asinina* และ mGnRH agonist มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อกระบวนการสืบพันธุ์ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* โดยแบ่งเป็นการศึกษาดังนี้ 1) ศึกษาผลของ GnRH ต่อกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์สืบพันธุ์ ด้วยวิธี 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) assay โดยศึกษาใน *in vitro* ของรังไข่ 2) ศึกษาผลของ GnRH ต่อการหลั่งเอสโตรเจนใน *H. asinina* ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ 3) ศึกษาผลของ GnRH ต่อการหลั่ง LH ใน *H. asinina* ด้วยวิธี ELISA จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมด้วยวิธีการทางสถิติ ซึ่งสารสังเคราะห์ดังกล่าวน่าจะมีผลกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์สืบพันธุ์ในรังไข่ กระตุ้นการหลั่ง LH และเอสโตรเจนของ *H. asinina* ได้ โดยเปอร์เซ็นต์ของการกระตุ้นอาจมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของ GnRH

3. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

3.1 ชีววิทยาและวงจรชีวิตของหอยเป่าชื่อ

หอยเป่าชื่อเป็นหอยทะเลฝาเดียว อยู่ในอาณาจักร Mollusca ชั้น Gastropoda ชั้นย่อย Pseudobranchia อันดับ Archaeogastropoda ครอบครัวยาลิอิดี Haliotidae สกุล Haliotis (Hahn, 1989) ในประเทศไทยมีหอยเป่าชื่อพันธุ์พื้นเมือง 3 ชนิด คือ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* กระจายอยู่ทั่วไปบริเวณชายฝั่งอ่าวไทย และอันดามัน โดย *H. asinina* เป็นพันธุ์ที่นิยมเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์เนื่องจากมีขนาดใหญ่ เปลือกยาวบาง และมีกล้ามเนื้อทำขนาดใหญ่ พบที่จังหวัดชลบุรี ระยอง ตราด และทะเลฝั่งอันดามัน อาศัยอยู่ตามโขดหินและซากปะการัง (Natewathana and Hylleberge, 1986; Tookvinnart et al., 1986; Jarayabhand and Paphavasit, 1996)

วงจรชีวิตของหอยเป่าชื่อเริ่มจากหอยเพศผู้ปล่อยน้ำเชื้อ และหอยเพศเมียปล่อยเซลล์ไข่ ลงสู่ทะเล และเกิดการผสมพันธุ์ขึ้น ซึ่งมักเกิดขึ้นในเวลากลางคืน ไข่ที่ได้รับการผสมพันธุ์จะพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะ trochophore ที่ว่ายน้ำได้ และเปลี่ยนไปเป็นระยะ veliger ภายใน 24 ชั่วโมง จากนั้นประมาณ 3-5 วัน ลูกหอยจะเริ่มลงเกาะพื้น และพัฒนาไปเป็นลูกหอยระยะ juvenile ที่มีการพัฒนาของเปลือก และเจริญต่อไปจนถึงตัวเต็มวัยขนาดประมาณ 4-5 ซม. น้ำหนักประมาณ 25-30 กรัม ซึ่งใช้เวลาการเจริญเติบโตประมาณ 1 ปี (Singhagraiwan and Doi, 1993; Jarayabhand and Paphavasit, 1996)

3.2 ระบบประสาทของหอยเป่าชื่อ

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับระบบประสาทของหอยเป่าชื่อพบว่า ระบบประสาทมีความสำคัญในการควบคุมขบวนการทางสรีรวิทยาของหอยและจะพัฒนาสมบูรณ์เมื่อหอยมีอายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป ระบบประสาทของหอยเป่าชื่อประกอบด้วยปมประสาทที่สำคัญ 3 ปม คือ 1) ปมประสาท cerebral เป็นปมประสาทขนาดใหญ่มี 2 ข้าง ด้านซ้ายและขวา วางตัวอยู่บริเวณด้านหน้าก่อนไปทางหัว มีส่วนที่เชื่อมต่อกันทั้ง 2 ข้าง เรียกว่า cerebral commissure และมีส่วนที่ติดต่อกับปมประสาท buccal และปม

ประสาท pleuropedal 2) ปมประสาท pleuropedal เป็นปมประสาทขนาดใหญ่ รูปร่างคล้ายตัวอักษร H พบอยู่กลางลำตัวบริเวณพื้นของ visceral cavity บริเวณส่วนปลายของปมประสาทพบ pedal nerve cord วางตัวเป็นแนวยาวไปจนถึงด้านหลัง 3) ปมประสาท visceral เป็นปมประสาทขนาดเล็ก รูปร่างคล้าย dumbbell วางตัวอยู่บน visceral loop ด้านหลังต่อลำไส้ (Crofts, 1929) โครงสร้างทางเนื้อเยื่อของปมประสาทประกอบด้วยเนื้อเยื่อชั้นนอก เรียกว่า cortex ซึ่งเป็นที่อยู่ของเซลล์ประสาทซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cell) แบ่งย่อยได้เป็น 3 ชนิด, เซลล์ประสาท (neuron) แบ่งย่อยได้เป็น 4 ชนิด และเซลล์ประสาทฟี่เลี้ยง (neuroglia) แบ่งย่อยได้เป็น 3 ชนิด ส่วนชั้นใน เรียกว่า medulla เป็นบริเวณที่พบเส้นใยประสาทจำนวนมาก (Upatham et al., 1998; Kruatrachue et al., 1999; Thongkukiatkul et al., 2000)

3.3 ระบบสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮื้อ

หอยเป่าฮื้อเป็นสัตว์ที่มีเพศแยก และมีการผสมพันธุ์ภายนอกร่างกาย ภาวะสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮื้อจะคลุม hepatopancreas และมีลักษณะเป็นรูปกรวยอยู่บริเวณใต้เปลือกด้านขวาของลำตัว เพศผู้มีภาวะสืบพันธุ์หรืออวัยวะสืบพันธุ์คือ ส่วนเพศเมียมีภาวะสืบพันธุ์หรือรังไข่สี่เหลี่ยม (Jarayabhand and Paphavasit, 1996) การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เกิดขึ้นโดยการหดตัวของกล้ามเนื้อ adductor บริเวณฝ่าเท้าวิ่งอยู่ตรงข้ามกับอวัยวะสืบพันธุ์ เซลล์สืบพันธุ์จะถูกปล่อยออกมาตามรูที่อยู่ตรงบริเวณด้านซ้ายของเปลือกและลงสู่หน้าทะเล (Crofts, 1929) จากการรายงานของ Apisawetakan และคณะ (1997) พบว่าอวัยวะสืบพันธุ์ของ *H. asinina* ถูกหุ้มด้วยถุงหุ้มและมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันยื่นเข้าไปในเนื้อเยื่อลักษณะเป็นแผง เรียกว่า trabeculae ซึ่งเป็นที่ยึดเกาะในการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ แต่ละ trabeculae ประกอบด้วย central capillaries ล้อมรอบด้วย collagen fibers fibroblasts, muscle cells, และ granulated cells (Apisawetakan et al., 2001) เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้แบ่งได้เป็นระยะต่างๆ ดังนี้ oogonia (Og), และ oocyte มี 5 ระยะ (Oc1-Oc5) ส่วนเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้แบ่งได้เป็นระยะต่างๆ ดังนี้ spermatogonia (Sg), primary spermatocyte (PrSc), secondary spermatocyte (SSc), spermatid มี 4 ระยะ (St1-4) และ spermatozoa (Sz) (Sobhon et al., 1999) มีรายงานการวิจัยของ Chansela และคณะ (2008) พบสารประเภท amide คือ APGW amide ในเส้นใยประสาทที่อยู่ภายในถุงหุ้มอวัยวะ และ trabeculae ของ *H. asinina* และมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเกิด spermiation ใน *H. asinina* เพศผู้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบสารประเภท neuropeptide ที่เกี่ยวข้องกับเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ และกระบวนการสืบพันธุ์ คือ เปปไทด์ ELH พบมากในปมประสาท cerebral และ pleuropedal และพบที่ถุงหุ้มอวัยวะสืบพันธุ์และ trabeculae ของหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* และ *H. rubra* เพศเมีย (Cummins et al., 2001; Saitongdee et al., 2005) และพบการกระจายตัวของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH ในเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนของปมประสาท cerebral และ pleuropedal และพบที่เซลล์ไ้ระยะ Oc1 ของหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* (Nurai et al., 2010)

วงจรสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮือเพศผู้และเพศเมียที่เลี้ยงในระบบปิดสามารถแบ่งได้เป็น 5 ระยะในรอบ 1 ปี ดังนี้ 1) ระยะ proliferative ประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์ขั้นต้น ส่วนใหญ่ติดอยู่กับ trabeculae hepatopancreas มีขนาดใหญ่ ระยะนี้จะเกิดขึ้นภายหลังจากระยะ spawning เป็นเวลา 2 เดือน 2) ระยะ premature อวัยวะสืบพันธุ์มีขนาดใหญ่ขึ้น ประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์หลายระยะและยังคงติดอยู่กับ trabeculae ระยะนี้จะใช้เวลาในการพัฒนาประมาณ 1 เดือน จากนั้นจะเข้าสู่ระยะที่ 3 คือ ระยะ mature พบเซลล์สืบพันธุ์เจริญเต็มที่ ติดอยู่กับ trabeculae ที่มีขนาดบางลง 4) ระยะ spawning เป็นระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ พบเซลล์สืบพันธุ์เจริญเต็มที่หลุดออกจาก trabeculae ในขณะที่เซลล์สืบพันธุ์ระยะต้นบางส่วนยังคงติดอยู่กับ trabeculae ที่ขยายขนาดใหญ่ และ 5) ระยะ spent เป็นระยะภายหลังจากการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ไม่พบเซลล์สืบพันธุ์เจริญเต็มที่ พบการสลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เกิดเป็นเม็ด granule อยู่ภายใน และมีเซลล์สืบพันธุ์บางส่วนติดอยู่กับ trabeculae ที่แตกกระจาย อวัยวะสืบพันธุ์มีขนาดเล็กและเปลี่ยนเป็นสีเหลืองครีม (Sobhon et al., 1999) ระบบสืบพันธุ์ของหอยเพศผู้มีการพัฒนาเร็วกว่าเพศเมีย โดยอวัยวะสืบพันธุ์ครบทุกชิ้นและเริ่มเข้าสู่ระยะ mature เมื่อหอยมีอายุได้ประมาณ 7-8 เดือน ส่วนในหอยเพศเมียเริ่มเข้าสู่ระยะ mature เมื่อหอยมีอายุประมาณ 11-12 เดือน (Apisawetakan et al., 1997; Sobhon et al., 1999) ในขณะที่หอยเป่าฮือพันธุ์ *H. tuberculata* เพศผู้ และเพศเมียจะมีการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์เต็มที่ในช่วงอายุ 2 และ 3 ปี ตามลำดับ (Hahn, 1989) อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาของการเกิดกระบวนการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ และกระบวนการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป่าฮือพันธุ์ต่างๆ มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะภูมิประเทศ สิ่งแวดล้อม อาหาร อุณหภูมิ และช่วงเวลากลางวัน กลางคืน (Counihan et al., 2001; Litaay and De Silva, 2003; Najmudeen, 2004)

3.4 ลักษณะทั่วไปของ gonadotropin releasing hormone (GnRH)

Gonadotropin releasing hormone (GnRH) หรือเรียกว่า luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) เป็นเปปไทด์ฮอร์โมน ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Gorbman and Sower, 2003) GnRH ถูกสร้างจากโปรตีนสายยาวที่เรียกว่า GnRH preprohormone จากนั้นเกิดกระบวนการ posttranslational modification ให้ได้เป็น active form ของ GnRH (Seeburge and Adelman, 1984) GnRH ถูกค้นพบครั้งแรกจากสมองของหมู และตั้งชื่อว่า mammalian GnRH (mGnRH) (Amoss et al., 1971) ปัจจุบันพบโครงสร้างปฐมภูมิของ GnRH ทั้งสิ้น 33 ชนิด ประกอบด้วย GnRH ที่ค้นพบจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังจำนวน 15 ชนิด และ GnRH ที่ค้นพบจากสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังจำนวน 18 ชนิด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงโครงสร้างปฐมภูมิของ GnRH ที่พบในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง แถบที่บแสดงกรดอะมิโนส่วนอนุรักษ์ (ดัดแปลงจาก Treen et al., 2012)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vertebrates										
Mammal	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂
Guinea Pig	pGlu	Tyr	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Arg	Pro	Gly-NH ₂
Chicken-I	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly-NH ₂
Chicken-II	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly-NH ₂
Rana	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Trp	Pro	Gly-NH ₂
Seabream	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly-NH ₂
Salmon	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly-NH ₂
Medaka	pGlu	His	Trp	Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly-NH ₂
Catfish	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro	Gly-NH ₂
Whitefish	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Met	Asn	Pro	Gly-NH ₂
Dogfish	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly-NH ₂
Herring	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly-NH ₂
Lamprey-I	pGlu	His	Tyr	Ser	Leu	Glu	Trp	Lys	Pro	Gly-NH ₂
Lamprey-II	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Phe	Pro	Gly-NH ₂
Lamprey-III	pGlu	His	Trp	Ser	His	Asp	Trp	Lys	Pro	Gly-NH ₂
Invertebrates										
Tunicate-I	pGlu	His	Trp	Ser	Asp	Tyr	Phe	Lys	Pro	Gly-NH ₂
Tunicate-II	pGlu	His	Trp	Ser	Leu	Cys	His	Ala	Pro	Gly-NH ₂
Tunicate-III	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Glu	Phe	Met	Pro	Gly-NH ₂
Tunicate-IV	pGlu	His	Trp	Ser	Asn	Gln	Leu	Thr	Pro	Gly-NH ₂
Tunicate-V	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Glu	Tyr	Met	Pro	Gly-NH ₂

Tunicate-VI	pGlu			His	Trp	Ser	Lys	Gly	Tyr	Ser	Pro	Gly-NH ₂
Tunicate-VII	pGlu			His	Trp	Ser	Tyr	Ala	Leu	Ser	Pro	Gly-NH ₂
Tunicate-VIII	pGlu			His	Trp	Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Gly-NH ₂
Tunicate-IX	pGlu			His	Trp	Ser	Asn	Lys	Leu	Ala	Pro	Gly-NH ₂
Octopus	pGlu	Asn	Tyr	His	Phe	Ser	Asn	Gly	Trp	His	Pro	Gly-NH ₂
Aplysia	pGlu	Asn	Tyr	His	Phe	Ser	Asn	Gly	Trp	Tyr	Ala	Gly-NH ₂
Sepia	pGlu	Asn	Tyr	His	Phe	Ser	Asn	Gly	Trp	His	Pro	Gly-NH ₂
Owl limpet	pGlu	His	Tyr	His	Phe	Ser	Asn	Gly	Trp	Lys	Ser	Gly-NH ₂
Annelid	pGlu	Ala	Tyr	His	Phe	Ser	His	Gly	Trp	Phe	Pro	Gly-NH ₂
Sea Urchin	pGlu	Val	His	His	Arg	Phe	Ser	Gly	Trp	Arg	Pro	Gly-NH ₂
Marine worm	pGlu	Ala	Tyr	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Phe	Pro	Gly-NH ₂
Leech	pGlu	Ser	Ile	His	Trp	Ser	Arg	Ser	Trp	Gln	Pro	Gly-NH ₂
Scallop	pGlu	Asn	Phe	His	Tyr	Ser	Asn	Gly	Trp	Gln	Pro	Gly-NH ₂
Oyster	pGlu	Asn	Tyr	His	Phe	Ser	Asn	Gly	Trp	Tyr	Ala	Gly-NH ₂

โครงสร้างปฐมภูมิของ GnRH ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 10 ตัว ที่มี pyroglutamate บริเวณปลายด้าน N-terminal และมี amidated glycine ที่ปลายด้าน C-terminal (King and Millar, 1995) ยกเว้น GnRH ที่ค้นพบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังของ octopus, *Aplysia*, sepia, owl limpet, annelid, sea urchin, marine worm, leech, scallop, oyster และ abalone ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 12 ตัว (Treen et al., 2012) อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจำนวนของกรดอะมิโนจะต่างกัน แต่โครงสร้างปฐมภูมิของ GnRH มีส่วนอนุรักษ์ที่บริเวณด้าน NH₂-terminus (pGlu¹, His² and Ser⁴) และ COOH-terminus (Pro⁹ and Gly¹⁰-NH₂) (ตารางที่ 1) ตลอดวิวัฒนาการกว่า 500 ล้านปี แสดงให้เห็นว่าบริเวณเหล่านี้มีความสำคัญทางโครงสร้างและ bioactivity ของ GnRH เช่น เป็นบริเวณที่จับกับตัวรับ (receptor binding site) เป็นบริเวณที่ทนต่อ enzymatic degradation หรือบริเวณที่เกี่ยวข้องกับ receptor-mediated event (King and Millar, 1995)

จากการศึกษาของ Gorbman และ Sower ในปี ค.ศ. 2003 พบว่า GnRH ของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ตามตำแหน่งของการแสดงออกภายในสมองและหน้าที่ที่

เกี่ยวข้อง รวมถึงการวิเคราะห์ทาง phylogenetic ระดับโมเลกุล กล่าวคือกลุ่ม 1 เรียกว่า GnRH-I (หรือ mGnRH) พบบริเวณ hypothalamus กลุ่มที่ 2 คือ GnRH-II หรือเรียกว่า chicken GnRH-II (cGnRH-II) พบบริเวณ midbrain กลุ่มที่ 3 คือ GnRH-III หรือเรียกว่า salmon GnRH (sGnRH) ซึ่งพบเฉพาะใน teleost ตรงบริเวณ terminal nerve และ olfactory system ของ telencephalon (Fernald and White, 1999) กลุ่มที่ 4 คือ GnRH-IV พบบริเวณ hypothalamus และ diencephalon ของปลาทะเลโบราณ (sea lamprey) อย่างไรก็ตามได้มีรายงานการค้นพบกลุ่มใหม่ของ protostomian GnRH เรียกว่า GnRH-V ซึ่งเป็นกลุ่มที่อยู่ใน monophyletic lineage (Tsai and Zhang, 2008; Zhang et al., 2008)

Fernald และ White (1999) ได้รายงานเกี่ยวกับหน้าที่ของกลุ่ม GnRH-I ในการควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์ซึ่งมีกลไกดังนี้ GnRH สร้างจาก neurosecretory cell ใน hypothalamus และถูกหลั่งออกมาใน portal vessels เมื่อเดินทางมาจนถึงต่อมใต้สมอง GnRH จะกระตุ้นเซลล์ของต่อมใต้สมองให้มีการหลั่ง luteinizing hormone (LH) และ follicle-stimulating hormone (FSH) ซึ่งฮอร์โมนทั้งสองจะไปกระตุ้นการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ ในขณะที่ กลุ่ม GnRH-II ทำหน้าที่คล้ายกับ neurotransmitter และ neuromodulator (Jones et al., 1984) ส่วนหน้าที่ของ กลุ่ม GnRH-III ยังไม่ชัดเจน แต่ Fernald และ White (1999) เชื่อว่ามีหน้าที่คล้ายกับ GnRH-I นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยในกลุ่มของ GnRH-IV พบว่า lamprey GnRH-I (lGnRH-I) และ lGnRH-III มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสืบพันธุ์ คือ สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ steroidogenesis การตกไข่ และการกิด spermiation ใน sea lamprey ตัวเต็มวัยโดยผ่านทาง pituitary-gonadal axis (Deragon and Sower, 1994; Gazourian et al., 2000)

3.5 โครงสร้างของ GnRH ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

GnRH พบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังทั้งหมด 5 ไฟลัม ได้แก่ Mollusca, Cnidarian, Platyhelminthes, Annelida และ Arthropoda (Tsai, 2006) GnRH ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังถูกค้นพบครั้งแรกจากบริเวณปมประสาท cerebral และ neural gland ของ *Chelyosoma productum* ซึ่งเป็นสัตว์จำพวกเพรียงหัวหอม (tunicate) จึงเรียกเป็น tunicate GnRH โดยพบทั้งสิ้น 9 isoform (tGnRH-I-IX) (Powell et al., 1996; Adams et al., 2003) นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบโปรตีนที่มีลักษณะคล้าย GnRH ในปลาหมึก *Octopus vulgaris* ซึ่งเป็นพวก protostomian จัดอยู่ในไฟลัม Mollusca ชั้น cephalopod เรียกว่า octopus GnRH (octGnRH) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 12 ตัว (Iwakoshi et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาโครงสร้างของ GnRH ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่จัดอยู่ในกลุ่ม protostomian เช่น *Aplysia californica* พบโปรตีนที่มีลักษณะคล้าย GnRH เรียกว่า *Aplysia* GnRH (apGnRH) ที่มีกรดอะมิโนแตกต่างจาก octGnRH 2 ตำแหน่ง (Zhang et al., 2008) *Sepia officinalis* ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ octGnRH (Di Cristo et al., 2009) นอกจากนี้ยังพบโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH ในหอยทาก *Lottia gigantea*, ใส้เดือนทะเล *Capitella teleta* หอยเม่น *Strongylocentrotus purpuratus*, หอยนางรม *Crassostrea gigas* และหอยแครง *Patinopecten yessoensis* (Roch et al., 2011; Bigot et al., 2012; Treen et al., 2012)

มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบของยีน GnRH พบว่าในสัตว์กลุ่ม protostomian มีองค์ประกอบของยีน GnRH ที่เหมือนกันคือ ประกอบด้วยบริเวณ signal peptide, GnRH dodecapeptide และ GAP ซึ่งเหมือนกับรายงานการค้นพบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง อย่างไรก็ตามยีน GnRH ที่ค้นพบในสัตว์กลุ่มนี้ มีส่วนที่แตกต่างจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังคือ การเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโน 2 ตัวที่ปลายด้าน NH₂-terminus และบริเวณเริ่มต้นของการถอดรหัสในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังประกอบด้วยกรดอะมิโน proline แต่ในสัตว์จำพวก protostomian จะแตกต่างกันออกไป (Tsai and Zhang, 2008)

3.6 ตำแหน่งและการกระจายตัวของ GnRH ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

รายงานวิจัยหลายเรื่องพบว่า GnRH สามารถพบได้มากกว่า 1 ชนิดในอวัยวะต่างๆ ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Tsutsui ในปี ค.ศ. 1998 พบเปปไทด์ที่มีลักษณะโครงสร้างคล้าย GnRH จำนวน 2 ชนิด คือ mGnRH และ sGnRH ในปมประสาท cerebral, neural gland และผนังด้านในของ dorsal blood sinus นอกจากนี้ Di Fiore และคณะ (2000) ได้ใช้เทคนิคทาง HPLC, RIA และ mass spectrometry ตรวจพบ GnRH 2 ชนิด ในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของ *Ciona intestinalis* ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับ cGnRH-I และ mGnRH จากรายงานการศึกษาของ Iwakoshi และคณะ (2004) ด้วยวิธี immunohistochemistry และ *in situ* hybridization พบการแสดงออกของยีน octopus GnRH (octGnRH) และการกระจายตัวของเปปไทด์ในระบบประสาท ท่อน้ำไข และ oviductal gland ใน *O. vulgaris* ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Young และคณะ (1999) พบโปรตีนที่มีโครงสร้างคล้าย mGnRH ในเซลล์ของปมประสาท และเซลล์ประสาทที่มาเลี้ยงระบบสืบพันธุ์ของหอยเพศผู้ *Helisoma trivolvis* และ *Lymnaea stagnalis* ส่วนในหอย *A. californica* พบการกระจายของ tunicate-I GnRH (tGnRH-I) และ mGnRH ใน hemolymph, hemocyte และ ovotestis (Zhang et al., 2000) นอกจากนี้มีรายงานวิจัยหอย *A. californica* ที่พบการกระจายของ tGnRH-I และ octGnRH ในเซลล์ประสาทของระบบประสาท และพบเซลล์ที่ย้อมติด anti-mGnRH ใน peripheral chemosensory organ อาจแสดงให้เห็นถึงการทำหน้าที่ที่แตกต่างกันของ GnRH แต่ละชนิด เช่น เกี่ยวข้องกับการกินอาหาร การเคลื่อนไหว ระบบรับความรู้สึก และระบบประสาทอัตโนมัติ (Tsai et al., 2003; Zhang et al., 2008) นอกจากนี้ได้มีรายงานการศึกษาของ Nuurai (2010b) โดยใช้เทคนิค immunohistochemistry พบการกระจายตัวของเปปไทด์ที่มีโครงสร้างคล้ายกับ GnRH ใน *H. asinina* เพศเมีย จำนวน 2 ชนิด ซึ่งมีตำแหน่งการกระจายและปริมาณการย้อมติดสีแตกต่างกัน คือ I GnRH-III และ tGnRH-I โดยพบในเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนของปมประสาท cerebral และ pleuropedal นอกจากนี้ยังพบ I GnRH-III และ tGnRH-I ในเซลล์สืบพันธุ์ระยะเริ่มแรก และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะที่หนึ่งและสองของอวัยวะสืบพันธุ์

3.7 หน้าที่ของ GnRH ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

รายงานการวิจัยหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่า GnRH อาจทำได้หลายหน้าที่ เช่น เป็นสารสื่อประสาท สารกระตุ้นประสาท ในการควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์ และเป็นสารเคมีที่ควบคุมพฤติกรรมการสืบพันธุ์ของสัตว์ (Gorbman and Sower, 2003) ตัวอย่างเช่น native GnRH ที่สกัดจากรังไข่ สามารถ

กระตุ้นให้เกิดการหลั่งฮอร์โมนเพศใน *Ciona intestinalis* และการหลั่ง luteinizing hormone (LH) จากต่อมใต้สมองของหนู (Di Fiore et al., 2000) การฉีด tGnRH-I สังเคราะห์ สามารถกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ใน *C. intestinalis* (Terakado, 2001) การนำ mGnRH agonist มาใช้ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ aromatase และกระตุ้นการหลั่ง LH testosterone และ estradiol ซึ่งมีผลควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ไข่ และกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในสัตว์จำพวกประการัง *Euphyllia ancora* (Twan et al., 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาพบว่า I GnRH-I และ tGnRH-II อาจทำหน้าที่คล้ายกับ pheromone ในการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในลึนทะเล *Mopalia sp.* (Gorbman et al., 2003)

มีรายงานการศึกษาถึงหน้าที่ของ GnRH ในสัตว์จำพวกหอยและหมีก เช่น mGnRH สามารถกระตุ้นการหลั่งโกนาโดโทรปินส์ จากต่อมใต้สมองของปลาทอง และเหนี่ยวนำให้เกิดการวางไข่ใน *H. trivolvis* (Goldberg et al., 1993; Young et al., 1997) และมีบทบาทกระตุ้นกระบวนการสังเคราะห์ DNA ในเซลล์ไข่ของ *C. gigas* (Pazos and Mathieu, 1999) octGnRH สามารถกระตุ้นการสร้างและหลั่ง sex steroid จากรังไข่และอวัยวะ และทำให้เกิดการหดตัวของท่อหน้าไข่ของหมีก *O. vulgaris* (Kanda et al., 2006) สารสกัดจากปมประสาท cerebral และปมประสาท pedal ที่มีโครงสร้างคล้ายกับ GnRH สามารถทำให้เกิด spermatogonial proliferation ในหอยแครง *P. yessoensis* (Nakamura et al., 2007) การศึกษาถึงบทบาทของ octGnRH และ mGnRH agonist ในการกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์และกระตุ้นการตกไข่ในหอยเป่าอื้อ *H. asinina* (Nurai et al., 2010a) และการศึกษาบทบาทของสารสังเคราะห์ pyGnRH ในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการแบ่งเซลล์ spermatogonia ในอวัยวะของหอยแครง *P. yessoensis* (Treen et al., 2012)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ GnRH ต่อกระบวนการสืบพันธุ์ของหอยเป่าอื้อ *H. asinina*

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสังเคราะห์ GnRH และ mGnRH agonist

การทดลองนี้ใช้สารสังเคราะห์ GnRH จำนวน 2 ชนิด คือ HasGnRH และ mGnRH agonist (buserelin) โดย HasGnRH ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA ที่สกัดจากปมประสาท cerebral และ pleuropedal ของหอยเป่าอื้อ *H. asinina* แล้วนำมาแปลรหัสพันธุกรรมเป็นโปรตีน ซึ่งโปรตีนที่แปลรหัสได้มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับ GnRH ที่พบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาผลิตเป็นสารสังเคราะห์ ส่วน buserelin มีการรายงานการศึกษาว่าสามารถกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์และกระตุ้นการตกไข่ได้ในหอยเป่าอื้อ *H. asinina* (Nurai et al., 2010a) สารสังเคราะห์ HasGnRH ถูกผลิตขึ้นจากบริษัท Genscript (Piscataway, NJ) ซึ่งผ่านการทดสอบความบริสุทธิ์มากกว่า 90% ด้วยวิธี

high-performance liquid-chromatography (HPLC) และ mass spectrometry ส่วน buserelin ซื้อมาจาก บริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)

2. การศึกษาผลของ GnRH ต่อการแบ่งตัวของเซลล์สืบพันธุ์ ด้วยวิธี 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) assay

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการ proliferation ของเซลล์ไข่ในช่วงของการพัฒนาของรังไข่ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* โดยการใช้สาร BrdU ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ thymidine analog ซึ่งสารดังกล่าวจะเข้าไป incorporate กับ DNA ในระยะ S-phase ของกระบวนการแบ่งเซลล์

2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อรังไข่เพาะเลี้ยง

การทดลองใช้หอยเป่าชื่อเพศเมียตัวเต็มวัยที่มีช่วงวงจรสืบพันธุ์ระยะ proliferative หรือ premature อายุประมาณ 1 ปี น้ำหนักประมาณ 25-30 กรัม จากนั้นทำการตัดเนื้อเยื่อรังไข่เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร แล้วนำมาล้าง 3 ครั้ง ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย Medium 199 ปริมาณ 2 ml 10% fetal bovine serum (v/v) และ ampicillin/streptomycin 100 µg/ml จากนั้นนำมาใส่ลงใน 24-well culture plate แล้วนำไปทำการทดลองต่อไป

2.2 การทดสอบสารสังเคราะห์ GnRH และ mGnRH agonist ต่อการแบ่งตัวของเซลล์สืบพันธุ์ในเนื้อเยื่อรังไข่เพาะเลี้ยง

การทดลองแบ่งเป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง โดยแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 6 กลุ่มย่อย (n=3) ดังนี้ กลุ่มที่ 1-3 บ่มด้วย HasGnRH และกลุ่มที่ 4-6 บ่มด้วย buserelin โดยใช้ความเข้มข้น 10^{-4} , 10^{-6} และ 10^{-8} M ตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 °C และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการบ่มเนื้อเยื่อรังไข่เพาะเลี้ยงด้วย BrdU ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเนื้อเยื่อมาตรึงสภาพด้วย 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วนำไปล้างด้วย 0.1M PBS pH 7.4 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และแช่ใน 70% ethanol จากนั้นทำการขจัดน้ำออก (dehydration) ด้วย ethanol ที่ความเข้มข้น 70%, 80%, 90%, 95% (2 ครั้ง), 100% (3 ครั้ง) ตามลำดับ ขั้นตอนละ 30 นาที จากนั้นทำการ clearing โดยใช้ xylene (2 ครั้ง) ครั้งละ 30 นาที ทำการ infiltrate และฝังเนื้อเยื่อลงใน paraffin จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปตัดด้วยเครื่อง microtome ความหนาประมาณ 6 µm ชิ้นเนื้อที่ถูกตัดเป็นแผ่นบางๆ จะถูกนำไปวางลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วย สาร silane

2.3 การตรวจสอบ mitotic activity ของเซลล์สืบพันธุ์

เป็นการตรวจสอบ incorporated BrDU ในเซลล์ที่มีการแบ่งตัว ใช้เทคนิคทาง immunohistochemistry โดยดัดแปลงวิธีการบางส่วนจาก Nakamura และคณะ (2007) ดังนี้ นำชิ้นเนื้อไปขจัด paraffin ออกด้วย xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และเข้าสู่ขั้นตอนการเติมน้ำ (rehydration) ในแผ่นชิ้นเนื้อด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นจากสูงไปต่ำ ดังนี้ 100% (2 ครั้ง), 95%, 90%, 80%, 70% ตามลำดับ ขั้นตอนละ 5 นาที จากนั้นนำไปล้างด้วย 0.1M PBS pH 7.4 แล้วบ่มด้วย 0.25% Trypsin ที่ละลายใน 0.1M

PBS pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นล้างด้วย สารละลาย 0.1 M PBS, pH 7.4 ที่เติม 0.1% Tween 20 (PBST) แล้วบ่มด้วย 2N HCl ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการ neutralization ด้วยการเติม 0.05M borate buffer เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วย PBST และนำมากำจัด non-specific binding ด้วยการเติม blocking solution (5% normal goat serum ใน PBST) ตั้งทิ้งไว้ 2 ชม. ที่อุณหภูมิ 37°C หลังจากนั้นใส่ primary antibody (mouse anti-BrdU monoclonal antibody) ที่อัตราส่วน 1:100 (v/v) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชม. ส่วนกลุ่มควบคุมที่เป็น negative control จะใช้ preimmune mouse serum แทน หลังจากนั้นล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วเติม secondary antibody (anti-mouse IgG-alkaline phosphatase-conjugated) อัตราส่วน 1:250 (v/v) ที่ละลายใน 2.5% normal goat serum ใน PBST ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. แล้วล้างออก และเติม detection buffer (1M Tris-HCl และ 5M NaCl, pH 9.5) เป็นเวลา 30 นาที แล้วบ่มด้วย NBT/BCIP alkaline phosphatase substrate solution จนกระทั่งเกิดการติดสีม่วงในเซลล์ที่มีการ incorporated BrDU จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม stop buffer (1 M Tris-HCl and 0.5M EDTA, pH 8.1) เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำแผ่นเนื้อเยื่อไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ Nikon Eclipse E600 กำลังขยายปานกลางที่ต่อกับกล้องดิจิทัล Nikon DXM1200 โดยนับจำนวนของ BrdU immunopositive oogonia และ early stage oocyte เป็นเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยเทียบกับจำนวนของ oogonia และ early stage oocyte ทั้งหมด ซึ่งนับแบบสุ่มจากบริเวณที่ถ่ายภาพจำนวน 3 แผ่นชั้นเนื้อของแต่ละกลุ่ม

3. การศึกษาผลของสารสังเคราะห์ GnRH ต่อการหลั่งเอสโตรเจนในหอยเป่าฮือ *H. asinina*

การทดลองเป็นการศึกษาผลของ GnRH ต่อระดับของเอสโตรเจนในเลือดและรังไข่ของหอยเป่าฮือ *H. asinina* โดยใช้หอยเป่าฮือเพศเมียตัวเต็มวัยที่มีช่วงวงจรการสืบพันธุ์ระยะ proliferative หรือ premature อายุประมาณ 1 ปี น้ำหนักประมาณ 20-25 กรัม ความยาวเปลือกประมาณ 4 เซนติเมตร จากสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง จ.ชลบุรี จำนวนทั้งสิ้นประมาณ 25 ตัว จากนั้นทำการแบ่งการทดลองออกเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง (n=3) กลุ่มควบคุมฉีดด้วยสารละลาย Normal saline และกลุ่มทดลองฉีดด้วย HasGnRH และ buserelin ความเข้มข้น 250 500 และ 1000 ng/gBW ตามลำดับ โดยฉีดเข้าที่กล้ามเนื้อ adductor ของหอยเป่าฮือ แล้วเลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสลบหอยเป่าฮือด้วย 5% MgCl₂ (g/v) เป็นเวลา 15-20 นาที แล้วทำการเก็บตัวอย่างเลือด (hemolymph) และเนื้อเยื่อรังไข่ดังนี้

3.1 การเก็บตัวอย่างเลือด

นำตัวอย่างเลือดมาปั่นที่ความเร็ว 1000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ทำการเก็บสารละลายส่วนบน (supernatant) ที่เป็น plasma และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C จนกระทั่งทำการทดลองต่อไป

3.2 การสกัดเอสโตรเจนในเนื้อเยื่อรังไข่

ทำการสกัดเนื้อเยื่อของรังไข่ตามวิธีการของ Matsumoto และคณะ (1997) ดังนี้ ตัดเนื้อเยื่อรังไข่แยกใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติม absolute ethanol อัตราส่วน 5 ml ต่อชิ้นเนื้อ 1 กรัม บดชิ้นเนื้อให้ละเอียด ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นเติมน้ำกลั่นประมาณ 2.5 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เก็บ supernatant จากนั้นเติม n-hexane ปริมาตร 15 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น จากนั้นดูดสารละลายในชั้น hexaneทิ้ง จะเหลือเฉพาะชั้น aqueous layer ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ organic solvent ระเหย จากนั้นทำการสกัดเอสโตรเจนด้วย benzene ปริมาตร 3 ml ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ benzene ระเหยจนแห้ง จากนั้นเติม benzene/methanol ในอัตราส่วน 85:15 (v/v) แล้วนำไปศึกษาในระดับของเอสโตรเจนด้วยวิธี ELISA

3.3 การศึกษาระดับของเอสโตรเจนด้วยวิธี ELISA

การทดลองนี้จะทำการศึกษาระดับของ estradiol ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบเป็นส่วนใหญ่ของเอสโตรเจน การทดลองใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (Estradiol assay; R&D systems) หาปริมาณเอสโตรเจนในเลือดและรังไข่ โดย 96-well plate ถูกเคลือบด้วย monoclonal estradiol antibody ที่จับอยู่กับ goat anti mouse antibody จากนั้นทำการหาค่า standard ของการทดลอง โดยการเตรียม estradiol ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-3000 pg/ml) จากนั้นทำการเติม standard หรือ plasma หรือสารสกัดจากเนื้อเยื่อรังไข่ลงใน plate และเติม estradiol conjugate ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้าง plate 3 ครั้งด้วย washing buffer แล้วเติม substrate ลงใน plate ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม stop solution จากนั้นนำ plate มาอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 และ 570 nm และนำไปคำนวณหาค่า standard curve แสดงเป็นกราฟเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์ของ B/Bo กับความเข้มข้นของ standard ส่วนค่าความเข้มข้นของ estradiol ของตัวอย่างสามารถคำนวณเปรียบเทียบได้จากค่า standard ชุดทดสอบนี้มีค่า Intra และ Inter-assay variability coefficient เท่ากับ 3.6 และ 5.8 ตามลำดับ และมีค่าเปอร์เซ็นต์ cross-reactivity กับ 17 α -ethynylestradiol, 17 β -estradiol 3-Benzoate, Estriol, Estrone และ Progesterone เท่ากับ 0.07, 0.03, 0.86, 0.26 และ 0.06 ตามลำดับ

4. การศึกษาผลของสารสังเคราะห์ GnRH ต่อการหลั่ง LH ในช่วงวงจรสืบพันธุ์ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina*

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของ GnRH ต่อระดับของ LH ในเลือดของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* โดยนำตัวอย่างเลือดจากข้อ 3.1 มาศึกษาระดับของ LH ด้วยวิธี ELISA โดยการทดลองใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (LH Elisa kit; Enzo life Sciences) ดังนี้ แต่ละหลุม 96-well plate ถูกเคลือบด้วย goat anti mouse IgG antibody จากนั้นทำการหาค่า standard ของการทดลอง โดยการเตรียม LH ที่ความเข้มข้นต่างๆ (1.2-280 mIU/ml) จากนั้นทำการเติม standard หรือ plasma หรือสารสกัดจากปมประสาทลงในหลุม แล้วเติม biotinylated LH tracer และเติม monoclonal LH antibody ผสมกันตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง แล้วเติม Streptavidin-conjugate Horseradish Peroxidase ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง แล้วเติม TMB

substrate ลงในหลุม ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม stop solution จากนั้นนำ plate มาอ่านค่า การดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm และนำไปคำนวณหาค่า standard curve แสดงเป็นกราฟเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์ของ B/Bo กับความเข้มข้นของ standard ส่วนค่าความเข้มข้นของ LH ของตัวอย่างสามารถคำนวณเปรียบเทียบได้จากค่า standard ชุดทดสอบนี้มีค่า Intra และ Inter-assay variability coefficient เท่ากับ 3.9 และ 14.9 ตามลำดับ และมีค่าเปอร์เซ็นต์ cross-reactivity กับ TSH, FSH และ hCG เท่ากับ 0.3, ≤ 0.004 และ ≤ 0.004 ตามลำดับ

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

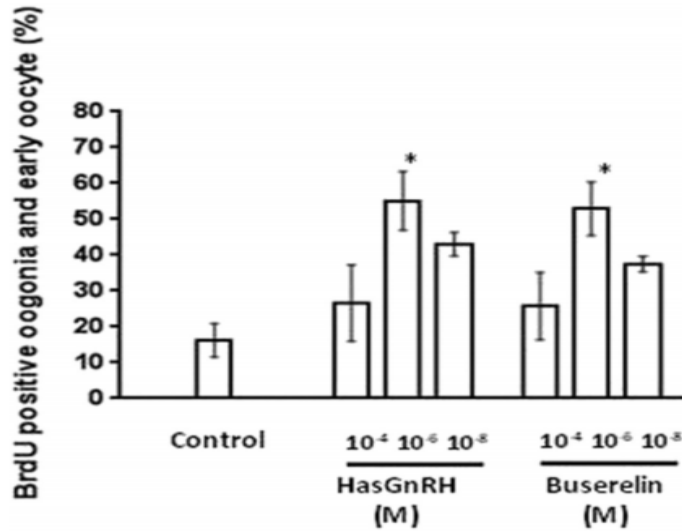
นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 12 ค่าจริงที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับ ค่ากลางบวกหรือลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm S.D.$) จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ ด้วยวิธี one-way analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับ $p < 0.05$ ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

1. ผลของ GnRH ต่อการเจริญและเพิ่มจำนวนของเซลล์สืบพันธุ์ในรังไข่ของหอยเป่าชื่อ *H.*

asinina

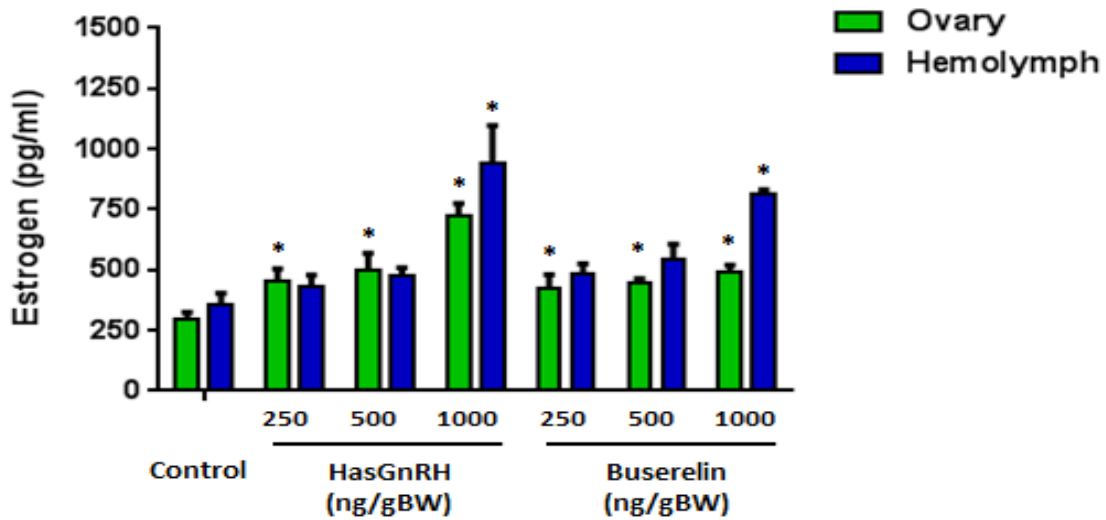
จากการทดลองบ่มเนื้อเยื่อรังไข่เพาะเลี้ยงด้วย HasGnRH และ buserelin ที่ความเข้มข้น 10^{-4} , 10^{-6} และ 10^{-8} M เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นบ่มด้วย BrdU ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษา การแบ่งตัวของเซลล์สืบพันธุ์ระยะ oogonia และ early oocyte พบว่ากลุ่มที่บ่มด้วย HasGnRH และ buserelin ที่ความเข้มข้น 10^{-8} M พบการเจริญของเซลล์ระยะ oogonia และ early oocyte จำนวนเพิ่มขึ้น เป็น 43.01 และ 37.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งพบการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์เป็น 16.19 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ HasGnRH และ buserelin เป็น 10^{-6} M พบว่าเซลล์ระยะ oogonia และ early oocyte มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 55.16 และ 52.88 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 1) อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ HasGnRH และ buserelin เป็น 10^{-4} M พบว่าเซลล์ระยะ oogonia และ early oocyte มีจำนวนการแบ่ง เซลล์สืบพันธุ์ ลดลงเป็น 26.55 และ 25.77 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มทดลองกลุ่มอื่นๆ



รูปที่ 1 ผลของ HasGnRH และ Buserelin ต่อกระบวนการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่ระยะ oogonia และ early oocyte ในเนื้อเยื่อรังไข่ของหอยเป่าฮือ *H. asinina* เส้นแนวตั้งแสดงค่า mean \pm SD (n=3). ดอกจัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2. ผลของ GnRH ต่อการหลั่งเอสโตรเจนในรังไข่และ hemolymph ของ *H. asinina*

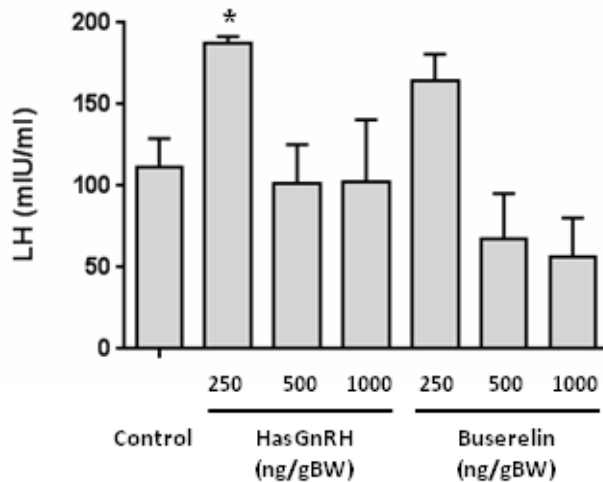
จากการทดลองฉีดด้วย HasGnRH และ buserelin ที่ความเข้มข้น 250 500 และ 1000 นาโนกรัม ต่อน้ำหนักตัว (กรัม) แล้วเลี้ยงหอยเป่าฮือ *H. asinina* ไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มที่ฉีดด้วย HasGnRH และ buserelin มีปริมาณเอสโตรเจนในรังไข่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2) โดยปริมาณเอสโตรเจนจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ HasGnRH และ buserelin ที่ได้รับ นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มที่ฉีดด้วย HasGnRH และ buserelin ที่ความเข้มข้น 250 และ 500 นาโนกรัมต่อน้ำหนักตัว (กรัม) มีปริมาณเอสโตรเจนใน hemolymph เพิ่มขึ้น และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่ฉีดด้วย HasGnRH และ buserelin ที่ความเข้มข้น 1000 นาโนกรัมต่อน้ำหนักตัว (กรัม)



รูปที่ 2 ผลของ HasGnRH และ Buserelin ต่อการหลั่งเอสโตรเจนในรังไข่ (ovary) และ hemolymph ของ *H. asinina* เส้นแนวตั้งแสดงค่า mean \pm SD (n=3). ดอกจันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3. ผลของ GnRH ต่อการหลั่ง LH ใน hemolymph ของ *H. asinina*

จากการทดลองฉีดด้วย HasGnRH และ buserelin ที่ความเข้มข้น 250 500 และ 1000 นาโนกรัม ต่อน้ำหนักตัว (กรัม) แล้วเลี้ยงหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มที่ฉีดด้วย buserelin ที่ความเข้มข้น 250 นาโนกรัมต่อน้ำหนักตัว (กรัม) มีระดับของ LH ใน hemolymph เพิ่มขึ้น และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่ฉีดด้วย HasGnRH ที่ความเข้มข้น 250 นาโนกรัมต่อน้ำหนักตัว (กรัม) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3) อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ HasGnRH เป็น 500 และ 1000 นาโนกรัมต่อน้ำหนักตัว (กรัม) ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับของ LH ใน hemolymph เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ระดับของ LH ลดลงในกลุ่มที่ฉีดด้วย buserelin 500 และ 1000 นาโนกรัมต่อน้ำหนักตัว (กรัม)



รูปที่ 3 ผลของ HasGnRH และ Buserelin ต่อการหลั่ง LH ของ *H. asinina* เส้นแนวตั้งแสดงค่า mean \pm SD (n=3). ดอกจันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาหน้าที่ของ GnRH ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่ของหอยเป่าฮือ *H. asinina* ด้วยวิธี invitro BrDU assay พบว่าทั้ง buserelin และ HasGnRH ที่ความเข้มข้น 10^{-8} M และ 10^{-6} M ให้ผลกระตุ้นการเจริญและเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่ระยะ oögonia และ early oocyte โดยที่ HasGnRH ให้ผลในการกระตุ้นที่ดีกว่าการใช้ buserelin แสดงให้เห็นว่า HasGnRH มีประสิทธิภาพในการจับกับตัวรับที่อยู่ในรังไข่ได้จำเพาะกว่า buserelin อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มปริมาณของ HasGnRH กลับส่งผลให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่ลดลง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากปริมาณ HasGnRH ที่มากเกินไปอาจทำให้เกิดการ down-regulate ตัวรับของ GnRH (Nurai et al., 2010a) หรืออาจเกิดการยับยั้งการทำงานของ GnRH โดยกระบวนการ negative feedback mechanism จากการศึกษานี้ของ GnRH ที่เกี่ยวข้องกับ การหลั่งฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์อื่น คือเอสโตรเจนและลูทีไนซิงฮอร์โมน พบว่า buserelin และ HasGnRH สามารถกระตุ้นการหลั่งเอสโตรเจนในรังไข่และ hemolymph ของหอยเป่าฮือ *H. asinina* แบบ dose dependent และสามารถกระตุ้นการหลั่งลูทีไนซิงฮอร์โมนใน hemolymph เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่ความเข้มข้น 250 นาโนกรัมต่อน้ำหนักตัว (กรัม) แต่ระดับของลูทีไนซิงฮอร์โมนใน hemolymph ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ HasGnRH เป็น 500 และ 1000 นาโนกรัมต่อน้ำหนักตัว (กรัม) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ buserelin เป็น 500 และ 1000 นาโนกรัมต่อน้ำหนักตัว

(กรัม) มีผลทำให้ระดับของลูทีไนซิงฮอร์โมนใน hemolymph ลดลง แสดงให้เห็นว่า เมื่อให้ GnRH ในระดับที่เหมาะสมมีผลทำให้ระดับของลูทีไนซิงฮอร์โมนเพิ่มสูงขึ้น เมื่อระดับของลูทีไนซิงฮอร์โมนเพิ่มสูงขึ้นอาจมีผลกระตุ้นการหลั่งเอสโตรเจนซึ่งมีผลต่อกระบวนการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่และรังไข่ ซึ่งภายหลังจากนั้นระดับของลูทีไนซิงฮอร์โมนเริ่มลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากกลไกการยับยั้งของฮอร์โมนผ่านทาง negative feedback mechanism โดย GnRH และเอสโตรเจน นอกจากนี้การทดลองพบว่าระดับของเอสโตรเจนยังคงสูงเมื่อให้ GnRH ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นถึง 1000 นาโนกรัมต่อน้ำหนักตัว (กรัม) แต่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่ระยะ oögonia และ early oocyte ลดลง อาจเป็นผลมาจากรังไข่มีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ mature ซึ่งในระยะนี้จะมีจำนวนของเซลล์ไข่ระยะ oögonia และ early oocyte ลดลง แต่พบจำนวนของเซลล์ไข่ระยะเจริญเต็มที่มากขึ้น ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนอาจมีผลกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ไข่ให้เจริญเต็มที่ จึงทำให้ระดับของเอสโตรเจนในรังไข่และ hemolymph ยังคงสูงอยู่ โดยเอสโตรเจนอาจถูกควบคุมการหลั่งผ่านทาง GnRH และ LH หรืออาจมีฮอร์โมนตัวอื่นกระตุ้นการหลั่งเอสโตรเจนโดยตรง

การศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่แสดงให้เห็นว่า GnRH มีบทบาทควบคุมการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์จำพวก mollusks โดยอาจผ่านทางกระบวนการ steroidogenesis เช่น octGnRH กระตุ้นการสร้างฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน โพรเจสเตอโรน และ เอสโตรเจน (E_2) ในรังไข่และอวัยวะของหมีก *O. vulgaris* โดยศึกษาแบบ *in vitro* (Kanda et al., 2006; De Lisa et al., 2012) rpGnRH กระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน โพรเจสเตอโรน และ E_2 ใน hemolymph ของหอยกาบ *Ruditapes philippinarum* ที่มีรังไข่และอวัยวะอยู่ในระยะเริ่มต้น (early developmental stage) (Song et al., 2015) pyGnRH กระตุ้นกระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจนและเอสโตรเจนดังกล่าวมีผลกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในอวัยวะหอยแครง *P. yessoensis* (Osada and Treen, 2013; Treen et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษากระบวนการสร้างสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่สำคัญคือกระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจนที่มีผลเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์และอวัยวะสืบพันธุ์ เช่น การศึกษาของ Matsumoto และคณะ (1997) พบโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายเอสโตรเจนในรังไข่ของ *P. yessoensis* และหอยนางรม *C. gigas* 3 รูปแบบ คือ เอสโตรน (E_1) 17β -estradiol (E_2) และ เอสโตรอล (E_3) โดย E_2 เป็นรูปแบบที่พบมากที่สุด และพบเอนไซม์ 17β -hydroxysteroid dehydrogenase (17β -HSD) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ และพบการกระจายตัวของ E_2 เอนไซม์ 3β -HSD และเอนไซม์ P450 aromatase ในเซลล์ด้านนอกที่ล้อมรอบถุง acinus ในรังไข่ของ *P. yessoensis* การศึกษาของ Osada และคณะ (2003) แสดงให้เห็นว่า E_2 ที่สร้างจากเซลล์ในรังไข่เกี่ยวข้อง

กับการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์ vitellogenin หรือ yolk protein ในเซลล์ไข่ อย่างไรก็ตาม กลไกการควบคุมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* มีความจำเป็นที่จะศึกษาต่อไปในอนาคต

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการให้สาร HasGnRH ในปริมาณที่เหมาะสมมีผลกระตุ้นเซลล์ไข่เป้าหมายซึ่งอาจเป็นเซลล์ในรังไข่ที่มีตัวรับบนผิวเซลล์ที่จำเพาะ เกิดการกระตุ้นกระบวนการเจริญพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์โดยตรงหรือกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสืบพันธุ์เพื่อไปควบคุมการเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* การศึกษางานวิจัยในอนาคต จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาบทบาทหน้าที่ของ GnRH ในการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ในแต่ละช่วงวงจรการสืบพันธุ์รวมถึงหน้าที่อื่นที่เกี่ยวข้องในหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* เพศเมียและเพศผู้ เพื่อที่จะนำ GnRH สังเคราะห์ไปประยุกต์ใช้ในการเร่งพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์หอยเป่าฮื้อในฟาร์มเพาะเลี้ยง

สรุปผลการวิจัย

สาร HasGnRH มีผลกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์สืบพันธุ์ระยะ oogonia และ early oocyte ในรังไข่ด้วยวิธี *in vitro* นอกจากนี้ HasGnRH สามารถกระตุ้นการหลั่งเอสโตรเจนในรังไข่และ hemolymph แบบ dose dependent และสามารถกระตุ้นการหลั่งลูทีนในซิงฮอร์โมนใน hemolymph ของ *H. asinina* ได้

ผลผลิตที่เกิดขึ้นในช่วงที่ได้รับทุน

1. บทความวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ 1 เรื่อง ตามเกณฑ์ ก.พ.อ.
Nurai P, Cummins SF, Botwright NA, Sobhon P. Characterization of an abalone gonadotropin-releasing hormone and its effect on ovarian cell proliferation. Aquaculture. 2015; 450: 116-122.
2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ 1 เรื่อง
ปริญญาพร หนูอุไร. ผลทางชีวภาพของสารสังเคราะห์โกนาโดโทรปินรีลีสซิงฮอร์โมนต่อกระบวนการสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮื้อ *Halotis asinina*. การประชุมใหญ่โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา ครั้งที่ 3, นครศรีธรรมราช, ประเทศไทย (วันที่ 9-11 มีนาคม 2558).

รายงานการเงิน

รายงานสรุปการเงิน ประจำปีงบประมาณ 2557

รหัสโครงการ 2557 A10862021

โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

มหาวิทยาลัยบูรพา

ผลทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ gonadotropin releasing hormone ต่อกระบวนการสืบพันธุ์ของ
หอยเป่าชื่อ *H. asinina*

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย อ.ดร.ปริญญาพร หนูอุไร

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2556 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2558

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2556 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2558

รายจ่าย

หมวด	งบประมาณรวม ทั้งโครงการ	ค่าใช้จ่ายงวด ปัจจุบัน	คงเหลือ (หรือเกิน)
1. ค่าตอบแทน	36,000	36,000	0
2. ค่าใช้สอย	177,000	174,572.49	(เหลือ) 2427.51
3. ค่าวัสดุ	12,000	14,892.08	(เกิน) 2,892.08
4. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ			
4.1 เงินทุนอุดหนุนการวิจัยเป็นค่า สาธารณูปโภคร้อยละ 10	25,000	25,000	0
รวม	250,000	250,464.57	(เกิน) 464.57

จำนวนงบประมาณที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ

1. งวดที่ 1	150,000 บาท	เมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2557
2. งวดที่ 2	100,000 บาท	เมื่อวันที่ 16 กันยายน พ.ศ. 2557
รวม	250,000 บาท	

ปริญญานนท์ นพ.อ.ร

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

วันที่ _____ 30 กันยายน 2558 _____

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

วันที่ _____

บรรณานุกรม

1. Adams, B. A., Tello, J. A., Erchegyi, J., Warby, C., Hong, D. J., Akinsanya, K. O., Mackie, G. O., Vale, W., Rivier, J. E., & Sherwood, N. M. (2003). Six novel gonadotropin-releasing hormones are encoded as triplets on each of two genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Endocrinol.*, *144*, 1907-1919.
2. Amoss, M., Burgus, R., Blackwell, R., Vale, W., Fellow, R., & Guillemin, R. (1971). Purification, amino acid composition and n-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone factor (Lrh) of ovine origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *44*, 205-210.
3. Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Pumthong, T., & Sobhon, P. (2001). Characterization of trabecular cells in the gonad of *Haliotis asinina* Linnaeus. *J. Shellfish Res.*, *20*, 717-724.
4. Apisawetakan, S., Thongkukiatkul, A., Wanichanon, C., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., & Sobhon, P. (1997). The gametogenic processes in a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *J. Sci. Soc. Thai.*, *23*, 225-240.
5. Bigot, L., Gaudin, Z. C., Rodet, F., Bernaya, B., Boudryd, P., & Favrela, P. (2012). Characterization of GnRH-related peptides from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Peptides*, *34*, 303-310.
6. Croft, D. R. (1929). *Haliotis* LMBC: *Liverpool University Press*.
7. Cummins, S., Thongkukiatkul, A., & Hanna, P. J., (2001). Location of egg-laying hormone in reproductive structures and neurons of *Haliotis rubra* (Leach) using antibodies raised against recombinant fusion proteins. *J. Shellfish Res.*, *20*, 705-710.
8. Counihan, R. T., Mc Namara, D. C., Souter, D. C., Jebreen, E. J., Preston, N. P., Johnson, C. R., & Degnan, B. M. (2001). Pattern, synchrony and predictability of spawning of the tropical abalone, *Haliotis asinina* from Heron Reef, *Australia. Mar. Ecol. Prog. Ser.*, *213*, 193-202.
9. De Lisa, E., Paolucci, M., Di Cosmo, A. (2012). Conservative nature of oestradiol signaling pathways in the brain lobes of *Octopus vulgaris* involved in reproduction, learning and motor coordination. *J. Neuroendocrinol.* *24*, 275–284.
10. Deragon, K., & Sower, S. A. (1994). Effects of lamprey gonadotropin-releasing hormone-III on steroidogenesis and spermiation in male sea lampreys. *Gen. Comp. Endocrinol.*, *95*, 363-367.
11. Di Fiore, M. M., Rastogi, R. K., Ceciliani, F., Messi, E., Botte, V., Botte, L., Pinelli, C., D'Aniello, B., & D'Aniello, A. (2000). Mammalian and chicken I forms of gonadotropin-releasing

- hormone in the gonads of a protochordate, *Ciona intestinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 2343-2348.
12. Fernald, R.D., & White, R.B. (1999). Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Front. Neuroendocrinol.*, 20, 224-240.
 13. Gazourian, L., Evans, E. L., Hanson, L., Chase, C. F. & Sower, S. A. (2000). The effects of lamprey GnRH-I, -III and analogs on steroidogenesis in the sea lamprey *Petromyzon marinus*. *Aquaculture*, 188, 147-165.
 14. Goldberg, J. I., Garofalo, R., Price, C. J., & Chang, J. P. (1993). Presence and biological activity of a GnRH-like factor in the nervous system of *Helisoma trivolvis*. *J. Comp. Neurol.*, 336, 571-582.
 15. Gorbman, A., & Sower, S. A. (2003). Evolution of the role of GnRH in animal (Metazoan) biology. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 134, 207-213.
 16. Gorbman, A., Whiteley, A., Kavanaugh, S. (2003). Pheromonal stimulation of spawning release of gametes by gonadotropin releasing hormone in the chiton, *Mopalia sp.* *Gen. Comp. Endocrinol.*, 131, 62-65.
 17. Hahn, K. O. (1989). Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods., Florida: CRC Press.
 18. Iwakoshi, E., Takuwa-Kuroda, K., Fujisawa, Y., Hisada, M., Ukena, K., Tsutsui, K., & Minakata, H. (2002). Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 291, 1187-1193.
 19. Iwakoshi, E., Ukena, K., Takuwa-Kuroda, K., Kanda, A., Tsutsui, K., & Minakata, H. (2004). Expression and distribution of octopus gonadotropin-releasing hormone in the central nervous system and peripheral organs of the octopus (*Octopus vulgaris*) by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.*, 477, 310-323.
 20. Jarayabhand, P, & Paphavasit, N. (1996). A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. *Aquaculture*, 140, 159-168.
 21. Jones, S. W., Adams, P. R., Brownstein, M. J. & Rivier, J. E. (1984). Teleost luteinizing hormone-releasing hormone: Action on bullfrog sympathetic ganglia is consistent with role as neurotransmitter. *J. Neurosci.*, 4, 420-429.
 22. Kanda, A., Takahashi, T., Satake, H., & Minakata, H. (2006). Molecular and functional characterization of a novel gonadotropin-releasing-hormone receptor isolated from the common octopus (*Octopus vulgaris*). *J. Biochem.*, 395,125-135.

23. King, J. A., & Millar, R. P. (1995). Evolutionary aspects of gonadotropin releasing hormone and its receptor. *Cell Mol. Neurobiol.*, 15, 5-23.
24. Kruatrachue, M., Thongkukiatkul, A., Sobhon, P., Upatham, E. S., Wanichanon, C., Sretarugsa, P., Chitramvong, Y., & Linthong, V. (1999). The ultrastructure of neurons and neuroglia in the cerebral and pleuro-pedal Ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus. *Science Asia*, 25, 137-142.
25. Litaay, M., & Silva, S. S. (2003). Spawning season, fecundity and proximate composition of the gonads of wild-caught blacklip abalone (*Haliotis rubra*) from Port Fairy waters, south eastern Australia Aquat. *Living Resour.*, 16, 353-361.
26. Matsumoto, T., Osada, M., Osawa, Y., & Mori, K. (1997). Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118, 811-817.
27. Najmudeen, T. M., & Victor, A. C. C. (2004). Seed production and juvenile rearing of the tropical abalone *Haliotis varia* Linnaeus 1758. *Aquaculture*, 234, 277-292.
28. Nakamura, S., Osada, M., & Kijima, A. (2007). Involvement of GnRH neuron in the spermatogonial proliferation of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Mol. Reprod. Dev.*, 74, 108-115.
29. Nateewathana, A., & Hylleberge, J., (1986). A survey on Thai abalone around Phuket Island and feasibility study of abalone culture in Thailand. *Thai. Fish. Gazette*, 39, 177-190.
30. Nurai, P., Engsusophon, A., Poomtong, T., Sretarugsa, P., Hanna, P., Sobhon, P., & Wanichanon, C. (2010a). Stimulatory effects of egg-Laying hormone and gonadotropin releasing hormone on reproduction of the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *J. Shellfish Res.*, 29, 627-635.
31. Nurai, P., Poljaroen, J., Tinikul, Y., Cummins, S., Sretarugsa, P., Hanna, P., Wanichanon, C., & Sobhon, P. (2010b). The existence of gonadotropin-releasing hormone-like peptides in the neural ganglia and ovary of the abalone, *Haliotis asinina* L. *Acta Histochem.* 112, 557-566.
32. Osada, M., Takamura, T., Sato, H., Mori, K. (2003). Vitellogenin synthesis in the ovary of scallop, *Patinopecten yessoensis*: control by estradiol-17 β and the central nervous system. *J. Exp. Zool.* 299A, 172–179.
33. Osada, M., Treen, N. (2013). Molluscan GnRH associated with reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 181, 254–258.

34. Pazos, A. J., & Mathieu, M. (1999). Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad: stimulation of gonial DNA synthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 113, 112-120.
35. Powell, J. F., Reska-Skinner, S. M., Prakash, M. O., Fischer, W. H., Park, M., Rivier, J. E., Craig, A. G., Mackie, G. O., & Sherwood, N. M. (1996). Two new forms of gonadotropin-releasing hormone in a protochordate and the evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 10461-10464.
36. Roch, J. G., Busby, R. E., Sherwood M. N. (2011). Evolution of GnRH: diving deeper. *Gen Comp Endocrinol*, 171, 1–16.
37. Saitongdee, P., Apisawetakan, S., Anunruang, N., Poomthong, T., Hanna, P. J., & Sobhon, P. (2005). Egg-laying-hormone immunoreactivity in the neural ganglia and ovary of *Haliotis asinina* Linnaeus. *Invert. Neurosci.*, 5, 165-172.
38. Singhagraiwan, T., & Doi, M. (1993). *Seed production and culture of a tropical abalone, Haliotis asinina* Linne. Thailand: The Eastern Marine Fisheries Development Center, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives.
39. Seeburg, P. H., & Adelman, J. P. (1984). Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. *Nature*, 311, 666-668.
40. Sobhon, P., Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Thongkukiatkul, A., Jarayabhand, P., Kruatrachue, M., Upatham, E. S., & Poomtong, T. (1999) Classification of germ cells, reproductive cycle and maturation of gonad in *Haliotis asinina* Linnaeus. *Science Asia*, 25, 3-21.
41. Song, Y., Miao, J., Cai, Y. & Pan, L. (2015). Molecular cloning, characterization, and expression analysis of a gonadotropin-releasing hormone-like cDNA in the clam, *Ruditapes philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B* 139, 123-128.
42. Soverchia, L., Carotti, C., Andreu-Vieyra, C., Mosconi, G., Cannella, N., Habibi, H., & Polzonetti-Magni, A. M. (2007). Role of Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the regulation of gonadal differentiation in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Mol. Reprod. Dev.*, 74:57-67.
43. Terakado, K. (2001). Induction of gamete release by gonadotropin releasing hormone in a protochordate, *Ciona intestinalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 124, 277-284.
44. Thongkukiatkul, A., Upatham, E. S., Sobhon, P., Kruatrachue, M., Chitramvong, Y. P., Wanichanon, C., Pumthong, T., & Nugranad, J. (2000). Histological studies of the pleuropedal

- ganglion, visceral ganglion and pedal cord ganglia of *Haliotis asinina*. *J. Med. Appl. Malacol.*, *10*, 111-120.
45. Tookvinart, S., Leknim, W., Donyadol, Y., Preeda-Lampabutra, Y., & Perngmak, P. (1986). *Survey on species and distribution of abalone (Haliotis spp.) in Surajthani, Nakornsrihammaraj and Songkhla provinces*. Technical Thailand: National Institute of Coastal Aquaculture, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives.
46. Treen, N., Itoh, N., Miura, H., Kikuchi, I., Ueda, T., Takahashi, K. G., Ubuka, T., Yamamoto, K., Sharp, P. J., Tsutsui, K., Osada, M. 2012. Mollusc gonadotropin-releasing hormone directly regulates gonadal functions: a primitive endocrine system controlling reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.*, *176*, 167-172.
47. Tsai, P. S., Maldonado, T. A., & Lunden, J. B. (2003). Localization of gonadotropin-releasing hormone in the central nervous system and a peripheral chemosensory organ of *Aplysia californica*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, *130*, 20-28.
48. Tsai, P. S., & Zhang, L. (2008). The Emergence and Loss of Gonadotropin-Releasing Hormone in Protostomes: Orthology, Phylogeny, Structure, and Function. *Biol. Reprod.*, *79*, 798–805.
49. Tsutsui, H., Yamamoto, N., Ito, H., & Oka, Y. (1998). GnRH-immunoreactive neuronal system in the presumptive ancestral chordate, *Ciona intestinalis* (Ascidian). *Gen. Comp. Endocrinol.*, *112*, 426-432.
50. Turgeon, J. L., & Waring, D. W. (2006). Differential expression and regulation of progesterone receptor isoforms in rat and mouse pituitary cells and L β T2 gonadotropes. *Endocrinol.*, *190*, 837-846.
51. Twan, W. H., Hwang, J. S., Lee, Y. H., Jeng, S. R., Yueh, W. S., Tung, Y. H., Wu H. F., Dufour, S., & Chang, C. F. (2006). The presence and ancestral role of gonadotropin releasing hormone in the reproduction of scleractinian coral, *Euphyllia ancora*. *Endocrinol.*, *147*, 397-406.
52. Upatham, E. S., Thongkukiatkul, A., Kruatrachue, M., Wanichanon, C., Chitramvong, V. P., Sahavacharin, S., & Sobhon, P. (1998). Classification of neurosecretory cells, neurons and neuroglia in the cerebral ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus by light microscopy. *J. Shellfish Res.*, *17*, 737-742.

53. Young, K. G., Chang, J. P., & Goldberg, J. I. (1999). Gonadotropin-releasing hormone neuronal system of the freshwater snails *Helisoma trivolvis* and *Lymnaea stagnalis*: possible involvement in reproduction. *J. Comp. Neurol.*, *404*, 427-437.
54. Young, K. G., Zalitach, R., Chang, J. P., & Goldberg, J. I. (1997). Distribution and possible reproductive role of a gonadotropin-releasing hormone-like peptide in the pond snail, *Helisoma trivolvis*. *Soc. Neurosci. Abstr.*, *23*, 696.
55. Zhang, L., Tello, J. A., Zhang, W., & Tsai, P. S. (2008). Molecular Cloning, Expression Pattern, and Immunocytochemical Localization of a Gonadotropin-Releasing Hormone-like Molecule in the Gastropod Mollusk, *Aplysia californica*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, *156*, 201-209.
56. Zhang, L., Wayne, N. L., Sherwood, N. M., Postigo, H. R., & Tsai, P. S. (2000). Biological and immunological characterization of multiple GnRH in an opisthobranch mollusk, *Aplysia californica*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, *188*, 77-89.

ภาคผนวก

ประวัตินักวิจัย

ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย): นางสาวปริญญพร หนูอุไร

ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ): Miss Parinyaporn Nuurai

ตำแหน่งปัจจุบัน : อาจารย์

หน่วยงานที่สังกัด สำนักงานจัดการศึกษา คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ที่อยู่ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา 169 ถ. ลาดยาวบางแสน ต.แสนสุข อ.

เมือง จ.ชลบุรี 20131

โทรศัพท์ 038-103167

โทรสาร 038-393497

E-mail parinyaporn@buu.ac.th

ประวัติการศึกษา

ระดับ	ปี	สถาบัน	จังหวัด
- ปริญญาตรี (วท.บ. (วิทยาศาสตร์การแพทย์))	2543-2546	มหาวิทยาลัยบูรพา	ชลบุรี
- ปริญญาเอก (ปร.ด. (กายวิภาคศาสตร์) หลักสูตรนานาชาติ)	2547-2552	มหาวิทยาลัยมหิดล	กรุงเทพมหานคร

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- สาขาเซลล์และชีววิทยาเชิงโมเลกุล (Cell and Molecular biology)

หัวหน้าโครงการวิจัย :

1. ชื่อโครงการวิจัย: Identification and localization of the gonadotropin releasing hormone-like peptide in the neural ganglia and the testis of male abalone *HALIOTIS ASININA* LINNAEUS

แหล่งทุนวิจัย : คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาปี 2553

2. ชื่อโครงการวิจัย: Molecular cloning and characterization of gonadotropin releasing hormone-like peptide in the tropical abalone, *Haliotis asinina*

แหล่งทุนวิจัย : สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี 2554-2555

3. ชื่อโครงการวิจัย: The biological effect of synthetic gonadotropin releasing hormone on the reproductive process of *H. asinina*

แหล่งทุนวิจัย : ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา สกอ ปี 2557

4. ชื่อโครงการวิจัย: The effect of gonadotropin releasing hormone on the gonadal proliferation during the reproductive cycle of tropical abalone *Haliotis asinina*

แหล่งทุนวิจัย : ทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยบูรพา ปี 2558

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

1. Chansela P, Saitongdee P, Stewart P, Soonklang, Hanna PJ, **Nuurai P**, Poomtong, Sobhon P. The tetrapeptide Apgw-amide induces somatic growth in *Haliotis asinina* Linnaeus. J. Shellfish Res. 2010; 29: 753-756.
2. Cummins FS, **Nuurai P**, Nagle TG, Degnan MB. Conservation of the egg-laying hormone neuropeptide and attractin pheromone in the spotted sea hare, *Aplysia dactylomela*. Peptide 2009; 31: 394-401.
3. Liu Z, Donald J, Hanna P, **Nuurai P**, Sobhon P. Comparative distribution of a putative egg-laying hormone in neural and reproductive tissues of four Decapoda crustaceans. Invert. Neurosci. 2009; 9: 21-28.
4. **Nuurai P**, Cummins SF, Botwright NA, Sobhon P. Characterization of an abalone gonadotropin-releasing hormone and its effect on ovarian cell proliferation. Aquaculture. 2015; 450: 116-122.
5. **Nuurai P**, Engsusophon A, Poomtong T, Sretarugsa P, Hanna P, Sobhon P, Wanichanon C. Stimulatory effects of egg laying hormone and gonadotropin releasing hormone on reproduction of the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. J. Shellfish Res. 2010; 29: 627-635.
6. **Nuurai P**, Primphon J, Seangcharoen T, Tinikul Y, Wanichanon C, Sobhon P. Immunohistochemical detection of GnRH-like peptides in the neural ganglia and testis of *Haliotis asinina*. *Microscopy Research and Technique*. 2014; 77:110-119.
7. **Nuurai P**, Poljaroen J, Tinikul Y, Cummins S, Sretarugsa P, Hanna P, Wanichanon C, Sobhon P. The existence of gonadotropin-releasing hormone-like peptides in the neural ganglia and ovary of the abalone, *Haliotis asinina* L. *Acta Histochem*. 2010; 112: 557-566.
8. Tinikul Y, Poljaroen J, **Nuurai P**, Anuracpreeda P, Chotwiwatthanakun C, Phoungpetchara I, Kornthong N, Poomtong T, Hanna PJ, Sobhon P. Existence and distribution of gonadotropin-releasing hormone-like peptides in the central nervous system and ovary of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Cell Tissue Res. 2011; 343: 579-593.

การนำเสนอผลงานวิชาการ

1. Engsusophon, A., **Nuurai, P.**, Kuanpradit, C., Chavadej, J., Sretarugsa, P., Poomtong, T., & Sobhon P. Cryopreservation of spawned sperm of abalone, *Haliotis asinina*. *Proceeding of the 32nd Anatomy Association of Thailand Annual Conference, Rayong, Thailand (April 29-May 1, 2009)*.
2. **Nuurai, P.**, Engsusophon, A., Kuanpradit, C., Poomtong, T., Wanichanon, C., and Sobhon, P. Distribution of gonadotropin releasing hormone and its role in controlling ovarian maturation of *Haliotis asinina* Linnaeus. *Proceeding of the 9th Asia-Pacific Microscopy Conference, Jeju, Korea (November 2-7, 2008)*, pp.1019-1020.
3. **Nuurai, P.**, Engsusophon, A., Poomtong, T., Sretarugsa, P., Hanna, P., Sobhon, P., and Wanichanon, C. Effects of egg laying hormone and gonadotropin releasing hormone on sex differentiation, gonadal maturation and spawning of the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *The 7th International Abalone Symposium, Pattaya, Thailand (July 19-24, 2009)*.
4. **Nuurai, P.**, and Sobhon, P. Characterization of gonadotropin releasing hormone and its effect on gonadal cell proliferation in the tropical abalone, *Haliotis asinina*. *Proceeding of the Burapha University International Conference, Pattaya, Chonburi, Thailand (July 3-4, 2014)*.
5. **ปริญญาพร หนูอุไร.** ผลทางชีวภาพของสารสังเคราะห์โกนาโดโทรปินรีลีสซิงฮอร์โมนต่อกระบวนการสืบพันธุ์ของหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinina*. การประชุมใหญ่โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา ครั้งที่ 3, นครศรีธรรมราช, ประเทศไทย (วันที่ 9-11 มีนาคม 2558).

งานวิจัยที่กำลังทำ :

1. ชื่อโครงการวิจัย: The effect of gonadotropin releasing hormone on the gonadal proliferation during the reproductive cycle of tropical abalone *Haliotis asinina*
ตำแหน่ง: หัวหน้าโครงการวิจัย
แหล่งทุนวิจัย: ทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยบูรพา ปี 2558
2. ชื่อโครงการวิจัย: The effects of dehulled-black sticky rice extract on the melanogenesis of B16F1 cell line
ตำแหน่ง: ผู้ร่วมโครงการวิจัย
แหล่งทุนวิจัย : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปี 2558



Characterization of an abalone gonadotropin-releasing hormone and its effect on ovarian cell proliferation



Parinyaporn Nuurai^a, Scott F. Cummins^b, Natasha A. Botwright^c, Prasert Sobhon^{d,*}

^a Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

^b School of Science and Education, Genecology Research Center, University of the Sunshine Coast, Maroochydore DC, Queensland 4558, Australia

^c CSIRO, Queensland Bioscience Precinct, 306 Carmody Road, St Lucia, Queensland 4067, Australia

^d Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 March 2015

Received in revised form 3 July 2015

Accepted 13 July 2015

Available online 16 July 2015

Keywords:

Gonadotropin-releasing hormone

Haliotis asinina

Haliotis laevigata

Oogonia

Oocyte

Proliferation

BrdU assay

ABSTRACT

In various animal groups, both vertebrates and invertebrates, it has been reported that gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is an important regulator of reproductive function. Knowledge of the molecular identity of a GnRH and its function in the abalone is unknown. In this study, we have characterized the abalone GnRH genes and their putative precursor sequences from the neural ganglia of sexually mature female *Haliotis asinina* and *Haliotis laevigata*. The abalone GnRH genes demonstrate high similarity with other gastropods within the proposed bioactive GnRH peptide regions (*H. asinina*: QNYHFSNGWYYPG; *H. laevigata*: QNYHFSNGWHA) but less in the GnRH-associated peptide region. An antibody generated against HasGnRH showed specific expression of the peptide within the cerebral and pleuropedal ganglia. HasGnRH was localized in type-1 neurosecretory cells that are widely distributed within the ventral and dorsal parts of the cerebral ganglion and also observed in nerve fiber bundles extending into the dorsal part of the ganglion. In the pleuropedal ganglion, HasGnRH immunoreactive cells were distributed in both ventral and dorsal horns. Nerve fibers containing HasGnRH immunoreactivity were also detected primarily within the ventral region of ventral horns of the ganglion. Synthetic HasGnRH and busserelin stimulated oogonia and oocyte proliferation in one-year-old female *H. asinina* as determined by *in vivo* and *in vitro* BrdU ovarian cell proliferation. These findings provide important knowledge into the molecular identity of the abalone GnRH and its function in stimulating oocyte proliferation that helps us to further understand the role of this peptide in molluscs which may be applied to aquaculture of this species.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The market for abalone has been growing rapidly, but abalone fisheries have been declining in most countries due to overfishing and disease (www.fishtech.com). However, a major problem is reproductive dysfunction including the change in synchronized timing of male and female gonadal maturation, as well as stress while in captivity. This has led to a requirement to replenish supply through aquaculture. This ultimately impacts on the rate of gamete production, spawning, fertilization and subsequent larval development. To enhance abalone production, many researchers have concentrated on optimizing larval development and production of artificial diets for increasing of body mass and growth rate of juveniles (Bautista et al., 2003). In addition, studies have reported the use of neuroendocrine peptides such as egg laying hormone (ELH) and a synthetic form of non-abalone gonadotropin-releasing hormone (GnRH) including mammalian GnRH

agonist, octopus GnRH and lamprey GnRH-I to stimulate ovarian maturation in adult abalone (Nuurai et al., 2010). For each peptide treatment, the gonads reached full maturation within 5–6 weeks and spawning occurred, compared to 8 weeks for control groups (Nuurai et al., 2010). However, the precise identity of each of these neuropeptide hormones has not yet been clearly defined in abalone.

GnRH plays an important role in regulating the reproductive function of many vertebrates and invertebrates (Gorbman and Sower, 2003; Tinikul et al., 2014). Up to recently, approximately 35 GnRH isoforms, including 16 from vertebrates and 19 from invertebrates have been identified (Osada and Treen, 2013; Roch et al., 2014). For invertebrates, those GnRH include those within the phyla Mollusca, Annelida, Arthropoda, Cnidaria, Platyhelminth, and Nematoda, where, it was shown that each GnRH precursor protein contains a signal peptide, a GnRH peptide, and a GnRH associated peptide (GAP) (Tsai and Zhang, 2008). This precursor protein organization is remarkably conserved with those reported in chordate species, supporting the theory which proposes that protostomian and chordate GnRHs are probably derived from the same ancestral genes (Zhang et al., 2008). The primary sequences for the vertebrate GnRH peptide consist of 10 amino acids, comprising an N-terminal pyroglutamyl residue and C-terminal

* Corresponding author.

E-mail addresses: parinyaporn@buu.ac.th (P. Nuurai), scummins@usc.edu.au (S.F. Cummins), Natasha.Botwright@csiro.au (N.A. Botwright), prasert.sob@mahidol.ac.th (P. Sobhon).

amidation (King and Millar, 1995). In contrast, GnRH peptides in some invertebrates contain 12 amino acids (Tsai, 2006; Treen et al., 2012). Despite this difference, all GnRHs share a common conserved region at the N-terminus and C-terminus, suggesting that they share a similar function in all animal phyla (Tsai, 2006).

Several studies have investigated the role of GnRH in mollusk reproduction. For example, exogenous GnRH stimulates egg-laying in pond snails (Young et al., 1997) and there is some evidence showing that GnRH is involved in spermatogonial proliferation of the scallop, *Patinopecten yessoensis* (Nakamura et al., 2007; Treen et al., 2012). It can also stimulate DNA synthesis in the gonial cells of marine bivalves (Pazos and Mathieu, 1999).

In this study, we have characterized GnRH genes encoding GnRH peptides from the neural ganglia of two abalone species, *Haliotis asinina* and *Haliotis laevigata*, then studied the spatial distribution and role of *H. asinina* GnRH in stimulating the proliferation of ovarian cells.

2. Materials and methods

2.1. Experimental animals and tissue collection

Approximately 20 sexually mature female *H. asinina* with a shell length of 4.2 ± 0.46 cm and body weight (BW) of 22.32 ± 1.68 g were obtained from Sichang Marine Science Research and Training Station, Sichang Island, Chonburi Province, Thailand. After anesthetization of the abalone with 5% MgCl₂, the cerebral and pleuropedal ganglia were dissected and rinsed with 0.1 M phosphate buffered saline (PBS). After that, total RNA was extracted from the cerebral and pleuropedal ganglia of *H. asinina* and *H. laevigata* using TRIzol® reagent (Invitrogen, USA), following the manufacturer's instruction (Chomczynski, 1993).

2.2. Identification of abalone GnRH genes

For *H. asinina*, reverse transcription was performed using SMARTScribe reverse transcriptase (Clontech, California, USA) according to the instructions. A partial-length cDNA encoding *H. asinina* GnRH was obtained by 3'-RACE using the SMARTer RACE cDNA amplification kit (Clontech, California, USA) including gene-specific primer (abGnRH-GSP primer; GCNCAGAACTACCACTTYAGCAAYGG) and nested gene-specific primers (NGSP forward primer; TTCAGCAACGGTTGGTATCC, NGSP reverse primer; TCCTGCCTGGTAGAGCAAGT). Primers were designed based on the conserved GnRH peptide sequences of *Aplysia californica* (GenBank accession no. EU204144) and *Octopus vulgaris* (GenBank accession no. AB037165). PCR reactions consisted of 36 cycles, including denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 68 °C for 30 s, extension at 72 °C for 3 min, and a final extension step of 72 °C for 5 min. PCR products were purified and cloned into a pGEM-T Easy Vector (Promega, Wis, USA). The recombinant plasmid DNA was purified using a GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) for nucleotide sequencing at 1st BASE (Singapore). For *H. laevigata*, a transcript encoding a GnRH was identified from a BLASTp search of a CNS transcriptome derived from a CNS cDNA library.

Mollusk GnRH precursors were obtained from sequences available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases. Multiple sequence alignments were prepared using precursors with MEGA5.1 (Kumar et al., 2008). Sequence presentation and shading of multiple sequence alignments was performed using the LaTeX TEXshade package (Beitz, 2000).

2.3. Immunohistochemistry of GnRH in *H. asinina*

A polyclonal antibody was generated in rats to synthetic *H. asinina* GnRH (HasGnRH) (Genscript, Piscataway, NJ, USA) using the method described by Halow and Lane (1988) and performed according to the Animal Ethics Approval 5/2556 (Burapha University). After anesthetization of the abalone with 5% MgCl₂, the cerebral ganglia,

pleuropedal ganglia and ovaries were separately dissected and fixed with Bouin's fixative for 12–16 h, then washed in 70% EtOH and dehydrated with a graded series of EtOH (70%–100%), cleared with two changes of dioxane, infiltrated and embedded in paraffin. Seven micron thick sections were cut and placed on the slides coated with (3-aminopropyl) triethoxy-silane solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated at 40 °C for 12–16 h. After incubation, tissue sections were deparaffinized with xylene and rehydrated through a graded series of ethyl alcohol (100–70%) for 5 min each. Sections were immersed in 70% ethyl alcohol containing 1% saturated lithium carbonate for 15 min, and then endogenous peroxidase was blocked by incubation in 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) in methanol for 45 min. Sections were washed three times with 0.1 M PBS containing 0.4% Triton X-100 (PBST) pH 7.4 and treated with 1% glycine in 0.1 M PBS for 5 min. Non-specific binding was blocked by incubation in blocking solution containing 10% normal goat serum in PBST for 2 h. Sections were incubated in the primary antibody (rat anti-HasGnRH) diluted with PBST at 1:200 for 12–16 h. After incubation, sections were washed three times and incubated with HRP-conjugated goat anti-rat IgG at a dilution of 1:500 for 30 min. After washing, sections were further incubated with NovaRed substrate (Vector, Burlingame, CA, USA) until optimal red color was developed. In order to visualize the cell nucleus, sections were counterstained with Meyer's hematoxylin. Sections were then observed under a Nikon Eclipse E600 microscope fitted with Nikon digital camera DXM1200. Negative controls were performed by substituting the primary antibody with preimmune rat serum.

2.4. In vivo 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) assay for ovarian cell proliferation

One-year-old adult containing proliferative stage of the ovary of *H. asinina* females with a shell length of 4.15 ± 0.21 cm and body weight (BW) of 20.65 ± 1.42 g were obtained from Sichang Marine Science Research and Training Station, Sichang Island, Chonburi Province, Thailand. Eighteen animals were divided into 6 groups ($n = 3$ in each group). Group 1 was the control group that received no injections. Groups 2 and 3 were injected intramuscular with a mammalian GnRH analog, busserelin, diluted in PBS at doses of 250 and 500 ng/g BW, respectively. Groups 4 to 6 were injected intramuscular with HasGnRH diluted in PBS at doses 250, 500 and 1,000 ng/g BW, respectively. After 24 h post-GnRH injection, the animals were injected with 1 μM BrdU (Sigma, St. Louis, MO, USA) and left for 24 h. Animals from each group were then sacrificed and gonads immediately fixed in Bouin's solution for 12–16 h. The tissue was dehydrated, embedded in paraffin and sectioned at 6 μm thickness. Immunohistochemical staining to determine incorporation of BrdU within the oogonia and early oocytes was performed according to the method described by Nakamura et al. (2007). Firstly, the sections were deparaffinized, hydrated and placed in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4). Sections were incubated in 0.25% trypsin for 6 min at 37 °C, washed with PBS containing 0.1% Tween 20 (PBST) and treated with 2 N HCl for 1 h at 37 °C. Sections were neutralized by incubation with 0.05 M borate buffer for 10 min followed by washing with PBST. Non-specific binding was blocked by incubation in 5% normal goat serum for 2 h at 37 °C. These sections were incubated in mouse anti-BrdU monoclonal antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA) at the dilution of 1:100 for 12–16 h at 37 °C. After incubation, sections were washed three times and incubated with goat anti-mouse alkaline phosphatase-conjugated-IgG at a dilution of 1:250 in PBST containing 2.5% normal goat serum for 1 h at 37 °C. Normal mouse serum was used as a control. After washing, sections were incubated with a detection buffer (1 M Tris-HCl and 5 M NaCl, pH 9.5) for 30 min and visualized with NBT/BCIP alkaline phosphatase substrate solution until a dark purple color developed. The reaction was stopped by incubation in stop buffer (1 M Tris-HCl and 0.5 M EDTA, pH 8.1) for 10 min. Sections were then observed under a Nikon Eclipse E600 microscope equipped with Nikon digital camera DXM1200. Mitotic

activity of oogonia and early oocytes were estimated in six randomly selected areas and presented as an average percentage of the number of BrdU-immunopositive cells per total number of cells in each section.

2.5. *In vitro* 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) ovarian cell proliferation assay

In vitro culture of ovarian tissue was performed according to the method described by Nakamura et al. (2007). Twenty one female *H. asinina* with the proliferative stage of the ovary was dissected from and cut into small pieces (ca. 10 mm³) in the culture medium (Medium 199/EBSS, L-Gln, HEPES 2.2 g/L, NaHCO₃ (Lonza Walkersville, USA), 10% fetal bovine serum (v/v) (GibcoBRL, NY, USA) and 100 µg/ml ampicillin/streptomycin). The tissues were placed in six-well culture plates and were divided into 7 groups (n = 3 in each group). Group 1 was the control group that received no treatment. Groups 2–4 were incubated with the HasGnRH at doses of 10⁻⁴, 10⁻⁶ and 10⁻⁸ M, respectively. Groups 5 to 7 were incubated with buserelin at doses of 10⁻⁴, 10⁻⁶ and 10⁻⁸ M, respectively. The tissues were cultured at 37 °C for 7 days in 2 ml of culture medium. All culture medium was changed every 2 days. After 7 days incubation, the cultured were treated with 1 µM BrdU for 24 h. The tissue then was fixed. The incorporations of BrdU within the oogonia and early oocytes were determined according to the same procedure as *in vivo* quantitative analysis.

2.6. Statistical analysis

The relevant data were presented as mean and standard deviation ($\bar{x} \pm S.D.$). Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Tukey's tests. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Identification of *H. asinina* GnRH gene

A GnRH transcript from female *H. asinina* was identified and conceptually translated to show the GnRH precursors (Fig. 1A). The *H. asinina*

GnRH nucleotide sequence encodes for a GnRH peptide, (HasGnRH), followed by a dibasic cleavage site and a GAP region. The deduced HasGnRH peptide consists of 12 amino acids (QNYHFSNGWYPG) and predicted to comprise an N-terminal pyroglutamyl and C-terminal amidation similar to other GnRH peptides of protostomians. The HasGnRH precursor was aligned with other known molluscan GnRH available within NCBI, showing little similarity apart from the GnRH peptide and conservation of two Cys residues in the GAP region (Fig. 1B). The *H. asinina* GnRH has been deposit into the NCBI GenBank under accession number KP719130.

3.2. Distribution of GnRH-like peptides in the cerebral and pleuropedal ganglia of female *H. asinina*

The negative control section showed no immunoreactivity (Fig. 2A) whereas HasGnRH immunoreactivity was localized in type-1 neurosecretory (NS1) cells which were scattered widely throughout the cortex of the ventral and dorsal parts of the cerebral ganglion (Fig. 2B–F). In addition, strong HasGnRH immunoreactivity was observed in nerve fiber bundles extending into the dorsal part of the cerebral ganglion (Fig. 2D and F). The negative control section showed no immunoreactivity in the pleuropedal ganglion (Fig. 3A), while numerous HasGnRH immunoreactive cells were identified to be widely distributed in both ventral and dorsal horns (Fig. 3B–F) and most were identified as NS1 cells which showed intense positive staining of granules within their cytoplasm (Fig. 3D). However, some immunopositive cells were also present in the body region of the ganglion. In addition, nerve fibers containing HasGnRH immunoreactivity were detected primarily within the ventral regions of both ventral horns of the ganglion (Fig. 3B and E).

3.3. Effect of *H. asinina* GnRH peptide on ovarian cell proliferation

Buserelin and HasGnRH peptide were injected into the adductor muscle of *H. asinina* in a 24 h treatment followed by the injection of BrdU. The 250 and 500 ng/g BW doses of buserelin showed significantly higher numbers of oogonial and early oocyte proliferation at 39% and 43%, respectively, compared with 24% for the control (Fig. 4). In

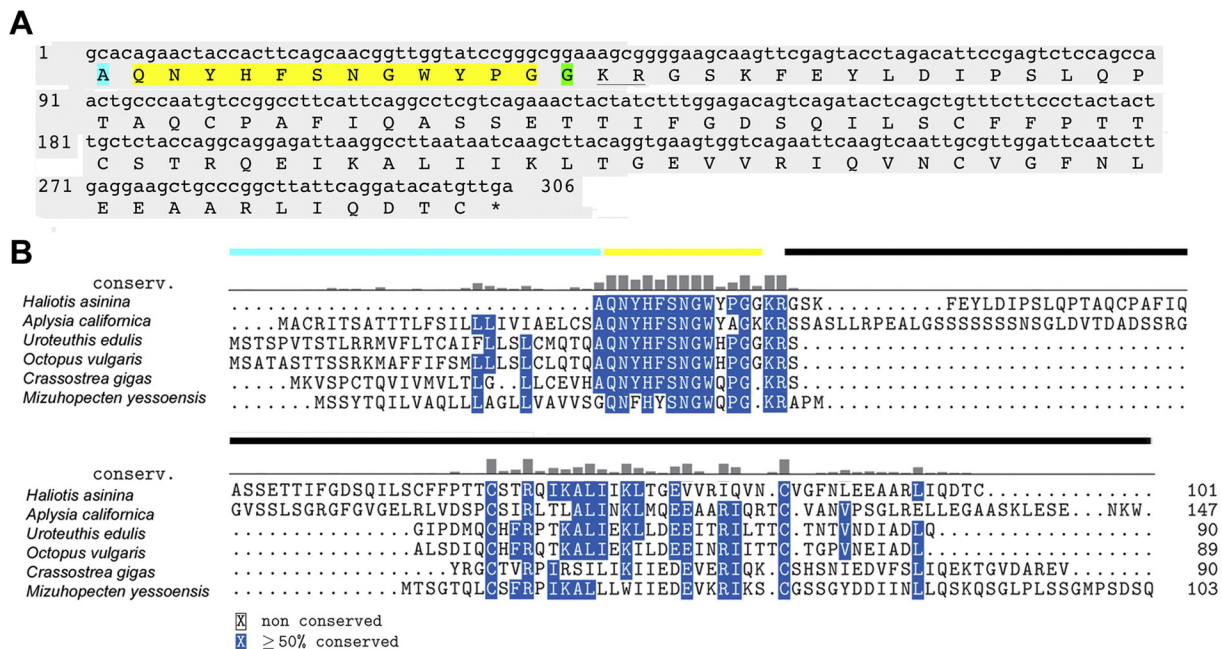


Fig. 1. Identification of *H. asinina* GnRH precursor. A. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *H. asinina* GnRH (partial) precursor. B. Alignment of *H. asinina* GnRH sequence with other mollusk GnRH precursors. An asterisk (*) indicates a stop codon and underline shows dibasic cleavage site. Light blue shading represents signal region, green represents amidated glycine, yellow represents GnRH peptide and black represents GAP region. *A. californica* (GenBank accession no. 001191482), *U. edulis* (BAH09303) *O. vulgaris* (BAB86782) *C. gigas* (ADZ17180) and *M. yessoensis* (BAH47639). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

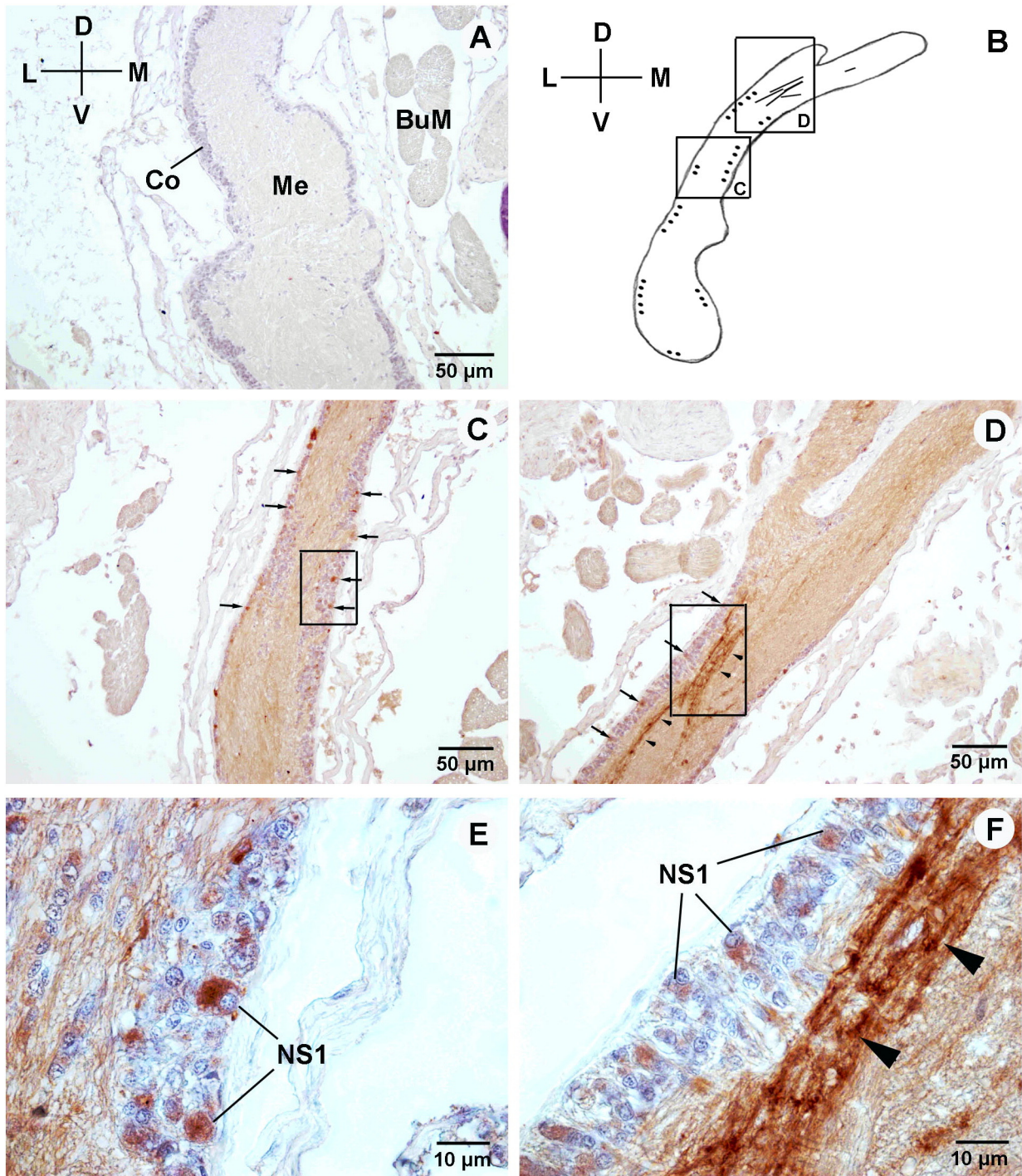
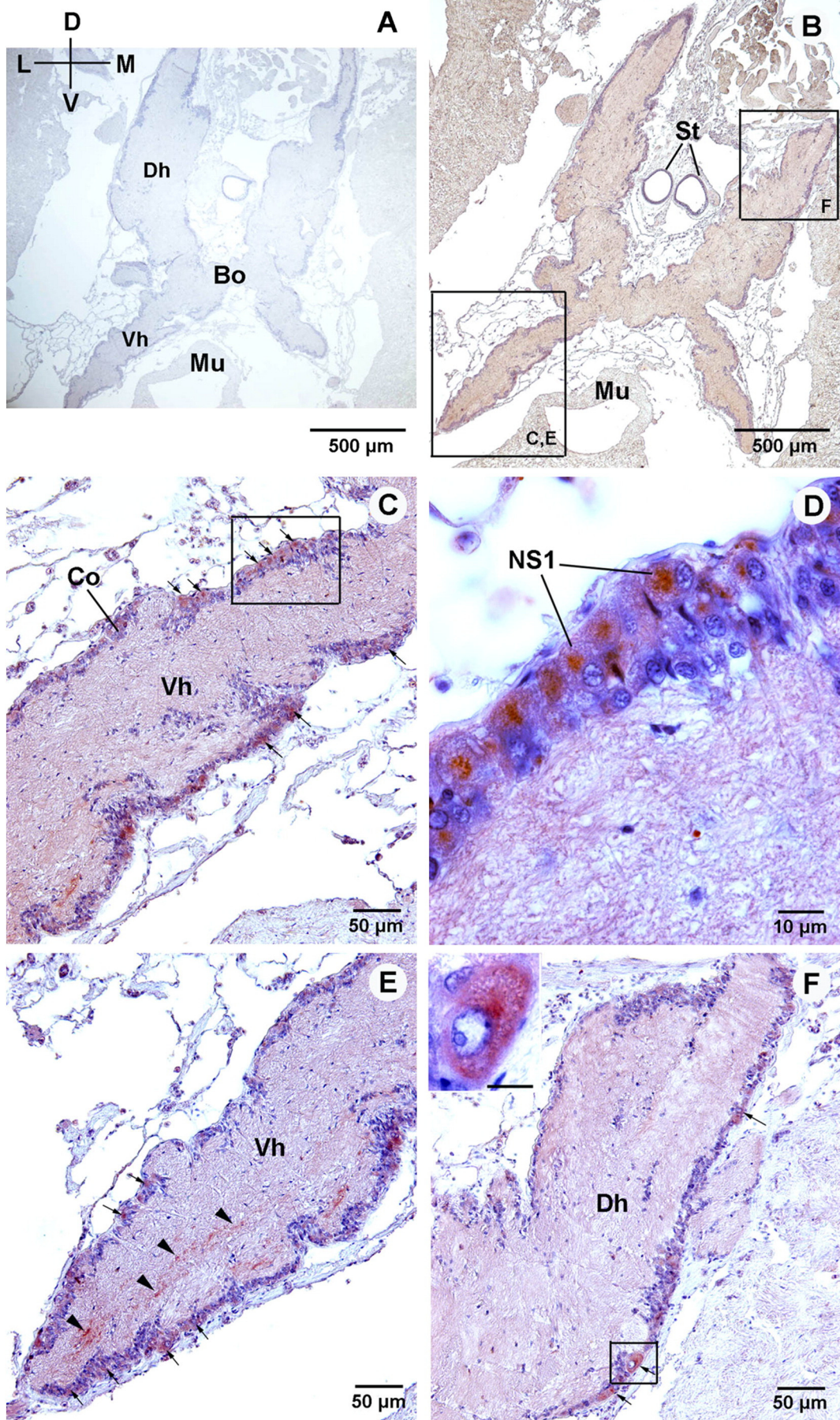


Fig. 2. Immunohistochemical localization of HasGnRH peptide in the cerebral ganglion of female *H. asinina*. A. Low-power micrograph of the negative control section showing no HasGnRH immunoreactivity (ir). B. A diagram shows the pattern of distribution of HasGnRH-ir in the whole cerebral ganglion. C and D. Medium-power micrographs of rectangular areas in B, showing the labeling of HasGnRH immunoreactive cells (arrows) and nerve fibers (arrowheads) distributed in the dorsal part of the ganglion. E. High-power micrograph magnified from C showing intense HasGnRH-ir in the cytoplasm of NS1 cells. F. High-power micrograph of rectangular area in D showing intense HasGnRH-ir within the granules of NS1 cells and nerve fibers (arrowheads) located the dorsal part of the ganglion. V, ventral; D, dorsal; M, Medial; L, lateral; Co, cortex; Me, medulla; BuM, buccal mass; NS1, neurosecretory cell type 1.

comparison, oocyte proliferation following doses of 250 and 500 ng/g BW HasGnRH peptide were significantly increased, as determined by presence of BrdU-labeled gonial cells (49% and 50%, respectively). However, administration of HasGnRH at the higher dose (1000 ng/g BW) was less effective in stimulating cell proliferation, with only a slight increase in the number of BrdU-labeled cells (28%) compared to the control.

Administration of HasGnRH and busarelin at various concentrations in the *in vitro* culture of ovarian tissue showed an increase in the number of oogonia and early oocyte proliferation. Interestingly, 1 μ M of HasGnRH and busarelin showed a significant increase in mitosis of oogonia and early oocyte proliferation at 55% and 53%, respectively, compared with 16% for the control (Fig. 5). However, administration of HasGnRH and busarelin at the higher dose (10^{-4} M) was less



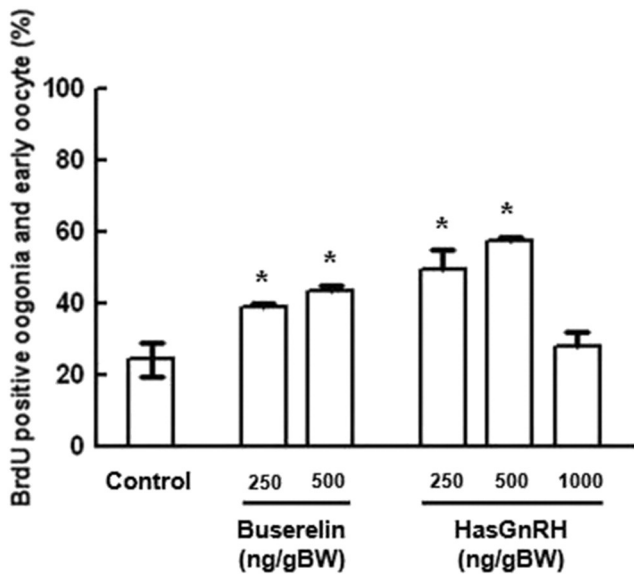


Fig. 4. *In vivo* effect of busserelin and HasGnRH on oogenesis and early oocyte proliferation in the ovary of *H. asinina* determined by BrdU labeling. Vertical bars indicate mean \pm SD ($n = 3$). Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$).

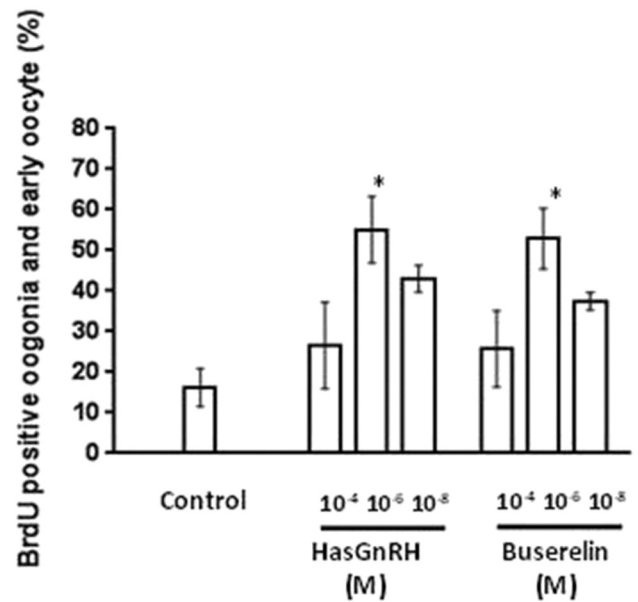


Fig. 5. *In vitro* effect of busserelin and HasGnRH on oogenesis and early oocyte proliferation in isolated ovary of *H. asinina* determined by BrdU labeling. Vertical bars indicate mean \pm SD ($n = 3$). Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$).

effective in stimulating cell proliferation, with only a slight increase in the number of BrdU-labeled cells (27% and 26%, respectively), compared to the control.

3.4. Comparison of *H. asinina* GnRH gene with the *H. laevigata*

Using the identified HasGnRH precursor, a *H. laevigata* GnRH precursor was identified from a CNS transcriptome library (Fig. 6A; Genbank accession no. KP719129). Similar to the HasGnRH precursor, the *H. laevigata* GnRH nucleotide sequence encodes a GnRH peptide, followed by a tribasic cleavage site and a GAP region. In addition, a signal peptide region can be observed. The deduced *H. laevigata* GnRH (HlaeGnRH) peptide consists of 11 amino acids (QNYHFSNGWHA), and a predicted N-terminal pyroglutamyl and C-terminal amidation similar to HasGnRH. A multiple sequence alignment of HlaeGnRH with HasGnRH, and including cleavage sites is shown in Fig. 6B. Besides 2 amino acid differences in the active peptide, HasGnRH contains an additional G residue.

4. Discussion

In this study we have identified GnRH genes present within the neural ganglia of two abalone species, *H. asinina* and *H. laevigata*. These genes encode a GnRH precursor that is likely posttranslationally processed to liberate a bioactive GnRH peptide. The HasGnRH dodecapeptide contains a non-amidated glycine with the C-terminal “Pro-Gly-NH₂” motif while HlaeGnRH consists of 11 amino acids amidated peptide. The size difference between these two abalone GnRH peptide is consistent with size variation observed in other molluscs (Bigot et al., 2012). In addition, some previously reported the protostomian GnRHs retain the pyroglutamyl N-terminal residue, but can be either 11 or 12 amino acids in length, and may not retain the amidated (Tsai and Zhang, 2008). However, the dibasic amino acids following the N-terminal glycine were present in both abalone species GnRH, a common feature within all

other molluscan GnRH known. Despite low identity outside of the GnRH associated peptide region (GAP region) between the GnRH precursors of abalone and among other mollusk, the conservation of cysteine residues suggests that they could be critical for strengthening the tertiary structure of secreted peptides. The GAP region may be functional in molluscs, although it has been speculated that it has an accessory role that would explain a low selective pressure during evolution (Bigot et al., 2012).

To investigate the presence and spatial distribution of the GnRH peptide in the *H. asinina* nervous system, we performed immunohistochemical investigation. A wide distribution of GnRH-immunoreactivity was observed throughout the cerebral and pleuropedal ganglia, specifically within cells that have been characterized as NS1. This is in agreement with previous studies that have reported the presence of a GnRH-like peptide in the ganglia of both male and female *H. asinina* (Nuurai et al., 2014). In that study, the antibody used was from octopus GnRH and tunicate I GnRH, whereas this study used an antibody generated against *H. asinina* GnRH. The relative level of HasGnRH immunoreactivity appeared to be more pronounced within the pleuropedal ganglia than that observed in the cerebral ganglion. Within the cerebral ganglia, HasGnRH immunoreactivity was most intense in dorsal region neuronal fibers that project into the ventral horn of the pleuropedal ganglion, suggesting that GnRH may be used as a signaling molecule between the two ganglia. In *Aplysia*, GnRH has been identified within the cerebral, buccal, abdominal, and pedal ganglia of the central nervous system (Jung et al., 2014). We speculate that HasGnRH may also be released into the hemolymph-vessels that innervate the ganglion, which could enable direct transport to the ovary and induce oogenesis. An investigation of the GnRH receptor in the ovary could establish whether GnRH is acting directly on the gametes, or may stimulate other downstream reproductive hormones or small molecules that regulate reproductive maturation.

Local expression of GnRH within the ovary was not investigated in this study. However, using the non-abalone GnRH-specific antibody,

Fig. 3. Immunohistochemical micrographs of HasGnRH immunoreactivity (ir) in the pleuropedal ganglion of female *H. asinina*. A. Low-power micrograph of a negative control section showing no HasGnRH-ir. B. Low-power micrograph showing HasGnRH-ir within the pleuropedal ganglion. C. Medium-power micrograph of rectangular area in B, showing the labeling of HasGnRH immunoreactive cells distributed in the cortex of the ventral horn of the ganglion (arrows). D. High-power micrograph of the rectangular area in C demonstrates strong HasGnRH-ir within the granules of NS1 cells. E. Medium-power micrograph of rectangular area in B, showing HasGnRH immunoreactive cells (arrows) and nerve fibers (arrowheads) within the ventral horns of the ganglion. F. Medium-power micrograph of rectangular area in B, showing HasGnRH immunoreactive cells (arrows) within the dorsal horns of the ganglion. Inset in F shows HasGnRH-ir in the cytoplasm of NS1 cell, with 10 μ m bar. V, ventral; D, dorsal; M, medial; L, lateral; Co, cortex; Vh, ventral horn; Dh, dorsal horn; Bo, body; Mu, Muscle; St, statocyst; NS1, neurosecretory cell type 1.

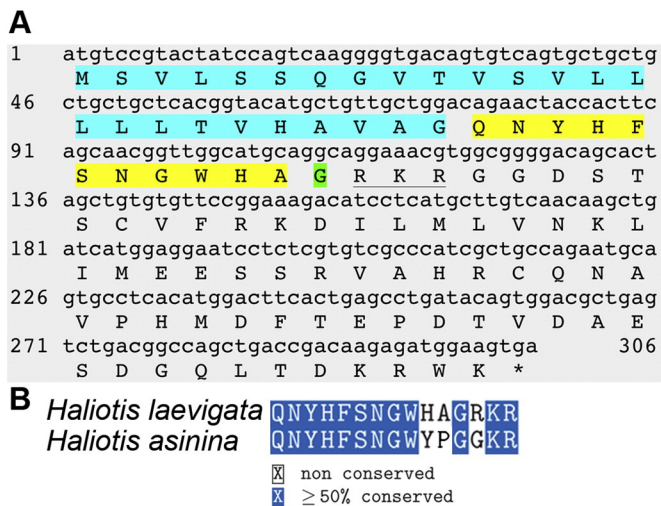


Fig. 6. Identification of *H. laevigata* GnRH precursor and comparison with *H. asinina*. A. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *H. laevigata* GnRH (full-length) precursor. An asterisk (*) indicates a stop codon and underline shows tribasic cleavage site. Light blue shading represents signal region, green represents amidated glycine, and yellow represents GnRH peptide. B. Alignment of HasGnRH with HlaeGnRH. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

we have found GnRH-immunoreactivity in the testis (Nuurai et al., 2014). We propose that the neural ganglia are the principal source of GnRH production, while GnRH synthesized locally in the testis may act as the paracrine control of gamete maturation.

Pervious functional studies of GnRH in molluscs have demonstrated a role in reproduction (Nakamura et al., 2007; Osada and Treen, 2013; Treen et al., 2012), but studies in *Aplysia* suggest that it likely is involved with diverse regulatory functions (Jung et al., 2014; Sun et al., 2012; Tsai et al., 2010). In this study, we show that busserelin and a synthetic HasGnRH peptide exhibit a similar effect on ovary, by stimulating oögonia and early oocyte proliferations. They did not affect degrees of maturation. Notably, HasGnRH is more potent than busserelin ($P < 0.05$) suggesting that the effect of HasGnRH may be more efficiently mediated through a specific cognate GnRH receptor in the ovary. Injection of HasGnRH at a relatively high dose (1000 ng/BW) has a relatively low stimulatory effect on cell proliferation compared with the less concentrated doses (500 and 250 ng/BW), suggesting that excessive HasGnRH might down-regulate a receptor, as demonstrated for other hormones (Nuurai et al., 2010). The molecular mechanism of GnRH-mediated gonial cell proliferation may be through gonadal steroidogenesis that in turn promotes cell division (Osada and Treen, 2013; Treen et al., 2012).

In summary, we have identified GnRH genes within two abalone species with each encoding a GnRH peptide that is synthesized most abundantly in the pleuropedal ganglion, by NS1 cells. We speculate that it may be released into the hemolymph-vessels innervating the ganglion, which enables transport to the ovary and then received by the estrogen-producing cells in the ovary to stimulate steroidogenesis, resulting in the induction of ovarian cell proliferation. This new understanding has provided important knowledge into the molecular identity of the abalone GnRH and its function in relation to reproduction. In practical terms, our results have indicated that stimulation of ovarian cell development with optimal doses of 250 ng/g BW HasGnRH may be a useful technique in the culture of abalone in order to accelerate the reproductive cycle in abalone aquaculture. Further experiments may now be undertaken to investigate the molecular pathways in which GnRH activates ovarian maturation.

Acknowledgments

This study was supported by grants from Thailand Research Fund (MRG 5480215), the Higher Education Research Promotion (HERP; 6/2557) and the Research and Development Fund Burapha University (Grant no. 2/2558). This work formed part of a project of the Australian Seafood Cooperative Research Centre (CRC), and received funds from the Australian Research Council (DP120104360) and Australian Government CRCs Programme, the Fisheries Research & Development Corporation and CSIRO Agriculture Flagship.

References

- Bautista, T.M., Fermin, N.A.C., Koshio, S.S., 2003. Diet development and evaluation for juvenile abalone, *Haliotis asinina*: animal and plant protein sources. *Aquaculture* 219, 645–653.
- Beitz, E., 2000. TEXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon. *Bioinformatics* 16, 135–139.
- Bigot, L., Zatylny, G.C., Rodet, F., Bernay, B., Boudry, P., Favrel, P., 2012. Characterization of GnRH-related peptides from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Peptides* 34, 303–310.
- Chomczynski, P., 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15, 532–537.
- Gorbman, A., Sower, S.A., 2003. Evolution of the role of GnRH in animal (Metazoan) biology. *Gen. Comp. Endocrinol.* 134, 207–213.
- Halow, E., Lane, D., 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Jung, L.H., Kavanaugh, S.I., Tsai, P.S., 2014. Localization of a molluscan gonadotropin-releasing hormone in *Aplysia californica* by in situ hybridization and immunocytochemistry. *Gen. Comp. Endocrinol.* 195, 132–137.
- King, J.A., Millar, R.P., 1995. Evolutionary aspects of gonadotropin releasing hormone and its receptor. *Cell. Mol. Neurobiol.* 15, 5–23.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K., 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief. Bioinform.* 9, 299–306.
- Nakamura, S., Osada, M., Kijima, A., 2007. Involvement of GnRH neuron in the spermatogonial proliferation of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 108–115.
- Nuurai, P., Engsusophon, A., Poomtong, T., Sretarugsa, P., Hanna, P., Sobhon, P., Wanichanon, C., 2010. Stimulatory effects of egg laying hormone and gonadotropin releasing hormone on reproduction of the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *J. Shellfish Res.* 29, 627–635.
- Nuurai, P., Primpchon, J., Seangcharoen, T., Tinikul, Y., Wanichanon, C., Sobhon, P., 2014. Immunohistochemical detection of GnRH-like peptides in the neural ganglia and testis of *Haliotis asinina*. *Microsc. Res. Tech.* 77, 110–119.
- Osada, M., Treen, N., 2013. Molluscan GnRH associated with reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 181, 254–258.
- Pazos, A.J., Mathieu, M., 1999. Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad: stimulation of gonial DNA synthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 112–120.
- Roch, G.J., Tello, J.A., Sherwood, N.M., 2014. At the transition from invertebrates to vertebrates, a novel GnRHlike peptide emerges in amphioxus. *Mol. Biol. Evol.* 31, 765–778.
- Sun, B., Kavanaugh, S.I., Tsai, P.S., 2012. Gonadotropin-releasing hormone in protostomes: insights from functional studies on *Aplysia californica*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 176, 321–326.
- Tinikul, Y., Poljaroen, J., Tinikul, R., Anuracpreeda, P., Chotwiwatthanakun, C., Senin, N., Poomtong, T., Hanna, P.J., Sobhon, P., 2014. Effects of gonadotropin-releasing hormones and dopamine on ovarian maturation in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and their presence in the ovary during ovarian development. *Aquaculture* 420–421, 79–88.
- Treen, N., Itoh, N., Miura, H., Kikuchi, I., Ueda, T., Takahashi, K.G., Ubuka, T., Yamamoto, K., Sharp, P.J., Tsutsui, K., Osada, M., 2012. Mollusc gonadotropin-releasing hormone directly regulates gonadal functions: a primitive endocrine system controlling reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 176, 167–172.
- Tsai, P.S., 2006. Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates: structure, function, and evolution. *Gen. Comp. Endocrinol.* 148, 48–53.
- Tsai, P.S., Zhang, L., 2008. The emergence and loss of gonadotropin-releasing hormone in protostomes: orthology, phylogeny, structure, and function. *Biol. Reprod.* 79, 798–805.
- Tsai, P.S., Sun, B., Rochester, J.R., Wayne, N.L., 2010. Gonadotropin-releasing hormone-like molecule is not an acute reproductive activator in the gastropod, *Aplysia californica*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166, 280–288.
- Young, K.G., Zalitch, R., Chang, J.P., Goldberg, J.I., 1997. Distribution and possible reproductive role of a gonadotropin-releasing hormone-like peptide in the pond snail, *Helisoma trivolvis*. *Soc. Neurosci. Abstr.* 23, 696.
- Zhang, L., Tello, J.A., Zhang, W., Tsai, P.S., 2008. Molecular cloning, expression pattern, and immunocytochemical localization of a gonadotropin-releasing hormone-like molecule in the gastropod mollusk, *Aplysia californica*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 201–209 (<http://www.fishtech.com>).