ผลของสารสกัดหยาบต้นลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) ต่อการแสดงออกของยีน Complement C3 ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ด้วยเทคนิค Real Time RT-PCR

Effect of Egg Woman (*Phyllanthus amarus*) Extract on Complement C3 Expression in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by Real Time RT-PCR Technique

ธีระพงค์ สีสมุทร์ และ นงลักษณ์ ยิ้มตระกูล*

Teerapong Seesamut and Nonglak Yimtragool*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากต้นลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) ต่อการแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับและม้ามของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ด้วยเทคนิค Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR) โดยเลี้ยงปลานิลน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 15-20 g เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยเปรียบเทียบระหว่างปลานิลที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเคลือบสารสกัดหยาบจากต้นลูกใต้ใบ ความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 1, 5 และ 10 g/kg เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าปลานิลที่ได้รับสารสกัดต้นลูกใต้ใบในแต่ละระดับความเข้มข้นมีการแสดงออกของยีน Complement C3 ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีแนวโน้มที่ความเข้มข้น 5 g/kg จะสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน Complement C3 ได้มากกว่าที่ระดับความเข้มข้นอื่น ๆ จากผลที่ได้น่าจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาและพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันในปลานิลต่อไป

คำสำคัญ : ปลานิล / ยีน Complement C3 / ลูกใต้ใบ / เทคนิค Real Time RT-PCR

Abstract

Effect of the crude extract from Egg woman (*Phyllanthus amarus*) on Complement C3 gene expression in liver and spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR). Experimental fish, 15-20 g initial weight, were fed for 3 weeks on diet containing *P. amarus* crude extract at 0 (control), 1, 5, and 10 g/kg feed. The analysis of data by ANOVA showed non-significant in every groups ($p>0.05$). The results indicated that 5 g/kg feed of Egg woman extract tend to stimulate the Complement C3 gene expression higher than other dose. The result from this study showed the benefit of Egg woman extract that can be used to improve the immune system of Nile tilapia.

Keywords : Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) / Complement C3 gene / Egg woman (*Phyllanthus amarus*) / Real Time RT-PCR

*Corresponding author. E-mail : nonglak_yim@yahoo.com

1. บทนำ

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งซึ่งมีความสำคัญมากต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดในประเทศไทย และยังเป็นที่นิยมเพาะเลี้ยงกันอย่างกว้างขวางในทั่วภูมิภาคของโลก เนื่องจากสามารถเลี้ยงได้ในทุกสภาพ และเนื้อปลามีรสชาติดี ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยมีอัตราการขยายตัวอย่างรวดเร็ว ร้อยละ 90 เป็นการเพาะเลี้ยงเพื่อบริโภคภายในประเทศ จากรายงานของ FAO เดือนสิงหาคม 2555 ประเทศไทยสามารถผลิตปลานิลได้เป็นอันดับ 4 ของเอเชีย รองจากจีน อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ ตามลำดับ (กรมประมง, 2553) การเพาะเลี้ยงปลานิลที่แพร่ขยายขึ้นทั่วโลกก็ควบคู่มากับการระบาดของเชื้อโรคหลายชนิดและส่งผลต่อผลผลิตปลานิลที่ได้ ซึ่งสาเหตุมาจากการที่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิล เลี้ยงปลาให้อยู่กันอย่างหนาแน่น และขาดการจัดการสภาพแวดล้อมที่ดี ทำให้ปลานิลติดเชื้อแล้วก่อให้เกิดโรคในปลานิลได้ โรคในปลานิลสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดหลัก คือ โรคไม่ติดเชื้อ (Non-infectious diseases) และโรคติดเชื้อ (Infectious diseases) (ชนกันต์, 2556) เชื้อสำคัญที่เกิดการระบาดในปลานิล ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* และ *Aeromonas hydrophila* เป็นต้น (Milan et al., 2009) ดังนั้นเพื่อเป็นการลดความเสียหายจากจำนวนผลผลิตที่ลดลงทำให้เกษตรกรจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีเพื่อลดอัตราการเจ็บป่วยและการตายในปลานิล แม้ว่าการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีจะช่วยลดผลกระทบจากความเสียหายที่เกิดจากปลาติดเชื้อได้ แต่การใช้สารเคมียังก่อให้เกิดการสะสมของสารเคมีในผู้บริโภค และมีการตกค้างในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติอีกด้วย จากสาเหตุดังกล่าวการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการแก้ไขปัญหายาปฏิชีวนะและสารเคมีซึ่งไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค (ชนกันต์, 2556) โดยสมุนไพรต้นลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) เป็นพืชล้มลุกอยู่ในตระกูล Euphorbiaceae ที่มีผลเป็นลูกกลมขนาดเล็กเรียงใต้ใบไปตลอดก้าน สามารถพบได้ง่ายในท้องถิ่นทั่วทุกภาคของประเทศไทย จากการตรวจสอบสารกลุ่มพฤกษเคมีในต้นลูกใต้ใบพบว่าประกอบด้วย Alkaloids, Tannins, Lignans, Flavonoids, Saponins และ Glycosides (Islam et al., 2008) มีรายงานว่าต้นลูกใต้ใบมีสรรพคุณในต้านไวรัสตับอักเสบบี (Yeh et al., 1993) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Amin et al., 2012) มีฤทธิ์ต้านการกระจายตัวของเซลล์มะเร็ง (Rajeshkumar et al., 2002) และสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus*, *S. albus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* (Dhandapani et al., 2007) อีกทั้งยังสามารถยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ที่ทำให้เกิดโรคในปลานิลได้อีกด้วย (Amin et al., 2012)

ในปัจจุบันความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลมีบทบาทสำคัญในการศึกษาวิจัยทางด้านระบบภูมิคุ้มกันโรคของสัตว์น้ำ การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไป โดยระบบคอมพลีเมนท์ (Complement system) เป็นภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Innate immunity) หรือภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Non-specific immunity) การทำงานอาศัยกลุ่มของโปรตีนประมาณ 35 ชนิด ในการเกิดปฏิกิริยาระบบคอมพลีเมนท์จะถูกกระตุ้นได้จากจุลชีพหรือจาก Antigen-antibody complex (Ag-Ig) ทำให้โปรตีนถูกกระตุ้นและเปลี่ยนจาก Inactive form เป็น Active form ซึ่งโปรตีน Complement C3 เป็นตัวกลางในระบบคอมพลีเม้นท์ จึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันและการทำลายเชื้อโรค (Claire et al., 2002)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการแสดงออกของยีน Complement C3 ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลานิล และศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับและม้ามของปลานิลที่ได้รับสารสกัดหยาบต้นลูกใต้ใบในปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยเทคนิค Real Time RT-PCR ซึ่งข้อมูลที่ได้จะมีความสำคัญอย่างยิ่งในการหาแนวทางในการป้องกันโรคในปลานิลได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

2. วิธีการ

2.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน Complement C3 ในอวัยวะต่าง ๆ

2.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากปลานิล สายพันธุ์จิตรลดา 3 ทั้งเพศผู้และเพศเมียที่โตเต็มที่และมีสุขภาพดีไม่เป็นโรค ขนาดประมาณ 400-500 g ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ จังหวัดอุตรดิตถ์ ทำให้สลบโดยนำปลาใส่ลงในน้ำที่ส่วนผสมของน้ำมันกานพลู (Clove oil) ความเข้มข้น 80 mg/L รอจนปลาไม่มีการเคลื่อนไหว หลังจากนั้นเก็บอวัยวะที่ต้องการ ได้แก่ ตับ ไต ม้าม กล้ามเนื้อ หัวใจ ลำไส้ ถุงน้ำเชื้อ และรังไข่ นำไปสกัด Total RNA ต่อไป

2.1.2 การสกัด Total RNA และการสังเคราะห์ First-strand cDNA

สกัด Total RNA จากตัวอย่างเนื้อเยื่อ โดยใช้ TRIzol reagent (Invitrogen) ปริมาตร 1 ml บดตัวอย่างให้ละเอียด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติม Chloroform 200 µl ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที ต่อจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารละลายส่วนใสที่อยู่ด้านบนใส่ลงในหลอดใหม่ เติม Isopropanol 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 rpm อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 30 นาที ล้างตะกอนด้วย 80% Ethanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 rpm อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายทิ้งให้เหลือตะกอนสีขาว แล้วตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 15 นาที ละลายตะกอนด้วย DEPC treated-water นำ Total RNA ที่สกัดได้วัดค่าความเข้มข้นโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

ทำการสังเคราะห์ First-strand cDNA จากตัวอย่าง Total RNA ที่สกัดได้ โดยใช้ Helix cript two-step RT PCR kit (Nanohelix) นำ Total RNA 1 µg เติม 10 µM dT-UPM 3 µl, dNTP Mix (each 10 mM) 2 µl และ Water (Free nuclease) 7.5 µl แล้วผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นวางบนน้ำแข็งทันที 5 นาที เติมสารละลายผสม หลอดละ 6.5 µl ลงในสารละลายที่เตรียมไว้ (มีส่วนประกอบดังนี้ 5X RT Reaction Buffer 4 µl, 0.1 M DTT 1 µl, 40 unit/µl RNase inhibitor 0.5 µl และ HelixCript Thermo Reverse Transcriptase 1 µl) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 ºC เป็นเวลา 40 นาที ต่อด้วยที่อุณหภูมิ 42 ºC เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 50 ºC เป็นเวลา 40 นาที และอุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที ตามลำดับ เก็บสารละลาย cDNA ที่ได้ ไว้ที่อุณหภูมิ -20 ºC เพื่อใช้เป็น Template สำหรับทำ Real Time RT-PCR ต่อไป

2.1.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน Complement C3

ศึกษาการแสดงออกของยีน Complement C3 โดยออกแบบ Gene-specific primers จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information, NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (XM_003450016) และใช้ยีน β-Actin เป็น internal control โดยใช้ Gene-specific primers จากรายงานการศึกษาของ Phumyu et al. (2012) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 Gene-specific primers สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real Time RT-PCR

Name	Sequences	Primer order	Product length (bp)
nC3F	5'-TGT GAG TCT ACA GTG AGG AGC-3'	Sense	196
nC3R	5'-CCC AGA TCT AAA GCC ATT CTG C-3'	Antisense	
nActinF	5'-TGG CAA TGA GAG GTT CCG-3'	Sense	95
nActinR	5'TGC TGT TGT AGG TGG TTT CG-3'	Antisense	

นำ First-strand cDNA ที่สังเคราะห์ได้จาก Total RNA ของแต่ละอวัยวะมาใช้เป็น Template ใช้สารละลายของ LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) เตรียมสารละลายผสม (มีส่วนประกอบดังนี้ 2x conc. LightCycler® 480 SYBR Green I Master 5 µl, 10 µM Primer forward 0.25 µl, 10 µM Primer reverse 0.25 µl, Water PCR grade 2.5 µl) ผสมกับ cDNA 2 µl โดยปริมาตรของสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 10 µl เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบการแสดงออกของยีน Complement C3 ด้วยเครื่อง Roche Light Cycler LC-480 Real Time PCR System (Roche) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ Pre-incubation 95 ºC เป็นเวลา 10 นาที, Amplification ที่อุณหภูมิ 95 ºC เป็นเวลา 15 วินาที ต่อด้วยอุณหภูมิ 63 ºC เป็นเวลา 15 วินาที และอุณหภูมิ 72 ºC เป็นเวลา 15 วินาที จำนวน 45 รอบ และ Cool ที่อุณหภูมิ 40 ºC เป็นเวลา 30 วินาที ทำการวิเคราะห์ Melting temperature (TM) จำแนก Specific และ Non- specific PCR product ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ถูกต้องมักจะแสดง Peak เดียวที่อุณหภูมิสูง ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการจับแบบไม่จำเพาะ (Non-specific product) หรือ Primer-dimer จะให้ Peak ที่มีขนาดกว้างที่อุณหภูมิต่ำ เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์จะได้ค่า Crossing point (Cp) โดยโปรแกรมของเครื่อง Roche Light Cycler LC-480 Real Time PCR System (Roche) จะแปลงค่า Cp เป็นค่า Real Time PCR Efficiency (E) ของยีน Complement C3 (Target gene) และ β-Actin (Reference gene) เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนด้วย Pfaffl method โดยคำนวณสัดส่วนระดับการแสดงออกของยีนจากสมการ (Pfaffl, 2001)

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{ref}})^{\text{CP Sample}}}{(E_{\text{target}})^{\text{CP Sample}}} \div \frac{(E_{\text{ref}})^{\text{CP Calibrator}}}{(E_{\text{target}})^{\text{CP Calibrator}}}$$

โดย $(E_{\text{ref}})^{\text{CP Sample}}$ คือ Real Time PCR Efficiency ของยีน β-Actin ตัวอย่างที่ 2, 3, 4, …n

$(E_{\text{target}})^{\text{CP Sample}}$ คือ Real Time PCR Efficiency ของยีน Complement C3 ตัวอย่างที่ 2, 3, 4, …n

$(E_{\text{ref}})^{\text{CP Calibrator}}$ คือ Real Time PCR Efficiency ของยีน β-Actin ตัวอย่างที่ 1

$(E_{\text{target}})^{\text{CP Calibrator}}$ คือ Real Time PCR Efficiency ของยีน Complement C3 ตัวอย่างที่ 1

2.1.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในอวัยวะต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรม SPSS ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบ One way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Duncan's multiple rang test ที่ระดับนัยสำคัญ $P<0.05$

2.2 การศึกษาผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อการแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับและม้ามของปลานิล

2.2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากต้นลูกใต้ใบ

นำต้นลูกใต้ใบ ทั้งต้นประกอบด้วย ราก ลำต้น ใบ ผล และดอก ล้างให้สะอาดแล้วหั่นให้ละเอียด นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 2 วัน หรือจนกว่าจะแห้ง บดให้ละเอียด นำไปชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำผงลูกใต้ใบแห้ง 100 กรัม แช่ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเขย่าด้วยเครื่อง Shaker ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 45 °C ตลอดเวลา กรองเศษพืชออกด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรองเบอร์ 1 อีกครั้ง แล้วนำส่วนใสไประเหยตัวทำละลายออกเพื่อให้สารสกัดเข้มข้นด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50 °C และทำให้แห้งด้วยกระบวนการ Freeze dry ที่อุณหภูมิ -50 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาบดให้ละเอียด เก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.2.2 การเตรียมอาหารปลา

อาหารที่ใช้ในการทดลอง คือ อาหารเม็ดสำเร็จรูปลอยน้ำ โปรตีนไม่น้อยกว่า 25% (ตรา ซีพี มีส่วนประกอบดังนี้ ปลาป่น กากถั่วเหลือง รำละเอียด ข้าวโพด ปลายข้าว และวิตามิน) อาหารเม็ดสำเร็จรูปจะถูกเคลือบด้วยสารสกัดจากต้นลูกใต้ใบ ในระดับความเข้มข้น 0, 1, 5 และ 10 g/kg feed ตามลำดับ โดยทำการสเปรย์สารสกัดบนอาหารเม็ดสำเร็จรูป ผึ่งลมทิ้งไว้ประมาณ 6-8 ชั่วโมง แล้วเคลือบด้วยน้ำมันพืชในอัตราส่วน น้ำมันพืช 30 ml ต่อ อาหารสำเร็จรูป 1 kg เพื่อป้องกันการละลายของสารสกัด จากนั้นเก็บอาหารที่เตรียมไว้ที่ 4 °C จนกว่าจะใช้งาน

2.2.3 การเตรียมปลานิล

ปลานิลอายุประมาณ 3 เดือน (น้ำหนักประมาณ 15-20 g) ทำการพักฟื้นและปรับสภาพปลาให้ชินกับอาหารและวิธีการเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ไม่ได้เคลือบสารสกัด วันละ 2 มื้อ เช้า-เย็น หลังจากนั้นสุ่มตัวอย่างปลานิลใส่ลงในตู้ ขนาด 30"x16"x18" (ใส่น้ำตู้ละประมาณ 120 L) ตู้ละ 10 ตัว เพื่อทำการทดลอง โดยปลานิลที่สุ่มลงในแต่ละตู้มีขนาดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)

2.2.4 การเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ประกอบด้วย 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ (ตู้) คือ

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารเม็ดสำเร็จรูป ไม่เคลือบสารสกัดลูกใต้ใบ (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารเม็ดสำเร็จรูป เคลือบสารสกัดลูกใต้ใบ 1 g/kg feed

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารเม็ดสำเร็จรูป เคลือบสารสกัดลูกใต้ใบ 5 g/kg feed

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารเม็ดสำเร็จรูป เคลือบสารสกัดลูกใต้ใบ 10 g/kg feed

ให้อาหารทดลองวันละ 2 มื้อ (เช้าและเย็น) จนอิ่ม โดยเมื่อคำนวณปริมาณการกินอาหารของปลานิลในแต่ละชุดการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.459$) ดังนี้ ชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัด 0, 1, 5, 10 g/kg feed มีอัตราการกินเท่ากับ 0.94 ± 0.04, 0.92 ± 0.03, 0.89 ± 0.04, 0.93 ± 0.04 g/ตัว/วัน (ตามลำดับ) โดยปริมาณอาหารที่กินในแต่ละวันประมาณร้อยละ 4 ของน้ำหนักตัว ระบบการเลี้ยงมีการให้อากาศและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน วันละ 20% (ควบคุมให้ค่า Dissolved oxygen อยู่ในช่วง 5-8 mg/L) เลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการเก็บข้อมูลปริมาณอาหารที่ให้ในแต่ละตู้ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น จากนั้นนำไปหาค่าเฉลี่ยเพื่อประเมินค่า น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight Gain, WG) อัตราการเจริญเติบโต (Average Daily Growth, ADG) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Food Conversion Rate, FCR) โดยคำนวณจากสูตร ดังนี้

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%) = [(น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง – น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง) / น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง] X 100

อัตราการเจริญเติบโต (g/day) = (น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง – น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง) / จำนวนวันที่ทดลอง

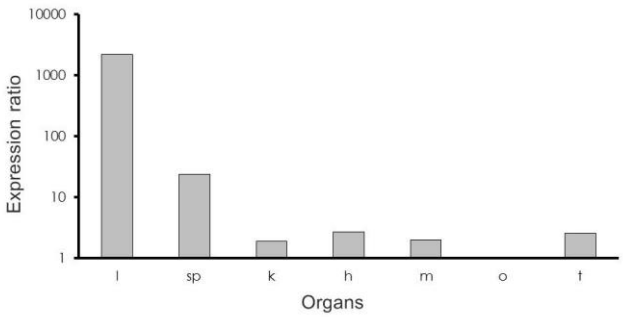
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ = น้ำหนักของอาหารที่ปลากิน / น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น

2.2.5 การศึกษาผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อการแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับและม้ามของปลานิล

เก็บตัวอย่างปลานิล ตู้ละ 3 ตัว โดยลดระดับน้ำในตู้ลง ล่อปลามาอยู่เป็นฝูงในมุมด้านหนึ่งของตู้ที่เลี้ยง แล้วสุ่มด้วยที่ตักปลาให้ได้จำนวนตู้ละ 3 ตัว โดยปลานิลแต่ละตัวจะถูกเก็บตัวอย่างทั้งตับและม้าม ดังนั้นในแต่ละชุดการทดลองจะประกอบด้วยตัวอย่างตับและม้ามอย่างละ 9 ตัวอย่าง ทำการสกัด Total RNA จากตัวอย่างและสังเคราะห์ First-strand cDNA จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีน Complement C3 และทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ตามข้อ 2.1.2-2.1.4 ตามลำดับ

3. ผลและอภิปราย

การศึกษาการแสดงออกของยีน Complement C3 (Target gene) ใน ตับ ม้าม ไต ลำไส้ กล้ามเนื้อ หัวใจ รังไข่ และถุงน้ำเชื้อ ด้วยเทคนิค Real Time RT-PCR โดยใช้ยีน β-Actin เป็น Internal control (Reference gene) และใช้รังไข่ซึ่งเป็นอวัยวะที่มีการแสดงออกน้อยที่สุดเป็นตัวเปรียบเทียบ (Calibrator) พบว่ายีน Complement C3 มีการแสดงออกในทุกอวัยวะที่ทำการศึกษา ยกเว้นลำไส้ ซึ่งในแต่ละอวัยวะนั้นมีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน โดยตับเป็นอวัยวะที่มีการแสดงออกของยีนมากกว่ารังไข่ถึง 2,223 เท่า รองลงมา คือ ม้าม เท่ากับ 25 เท่า ส่วนในอวัยวะอื่น ๆ คือ ไต หัวใจ กล้ามเนื้อ และถุงน้ำเชื้อ มีการแสดงออกของยีน Complement C3 ที่ใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 1.89 – 3 เท่า (ภาพที่ 1) ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในปลาชนิดอื่น ๆ เช่น ปลา Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) พบว่า Complement C3 มีการแสดงออกในทุก ๆ อวัยวะที่ทำการศึกษา ได้แก่ กล้ามเนื้อ ตับ ไต สมอง ตา กล้ามเนื้อ กระเพาะ และลำไส้ (Lange et al., 2004a) เช่นเดียวกับการศึกษาในปลา Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) (Lange et al., 2004b) และปลา Spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) (Ellingsen et al., 2005)



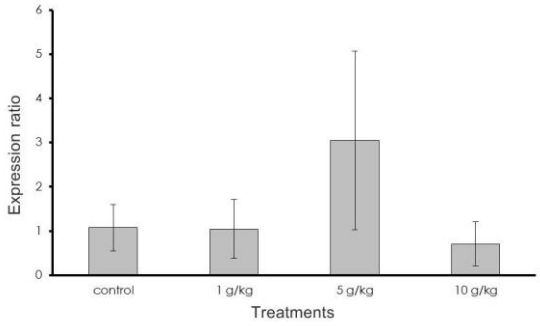
ภาพที่ 1 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน Complement C3 ในอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ตับ (l), ม้าม (sp), ไต (k), หัวใจ (h), กล้ามเนื้อ (m), รังไข่ (o) และ ถุงน้ำเชื้อ (t) แสดงข้อมูลอยู่ในรูปของ log10 และกำหนดให้รังไข่เป็น Calibrator

ตารางที่ 2 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ของปลานิลที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ (Mean ± SE, n = 3)

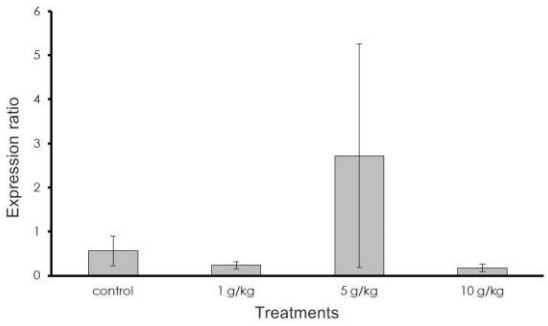
Parameters	Treatments			
	0 g/kg (Control)	1 g/kg	5 g/kg	10 g/kg
WG (%)	34.05 ± 6.75	34.43 ± 4.72	29.60 ± 7.48	30.80 ± 4.60
ADG (g/day)	0.29 ± 0.05	0.31 ± 0.02	0.25 ± 0.06	0.26 ± 0.04
FCR	1.38 ± 0.10	1.29 ± 0.08	1.32 ± 0.10	1.35± 0.12

จากการทดลองเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารเคลือบสารสกัดหยาบต้นลูกใต้ใบ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5 และ 10 g/kg feed เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p>0.05$) (ตารางที่ 2)

ผลจากการศึกษาข้างต้นพบว่าตับและม้ามเป็นอวัยวะที่มีการแสดงออกของยีน Complement C3 มากที่สุด ดังนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์ผลของการได้รับสารสกัดลูกใต้ใบต่อการแสดงออกของยีน Complement C3 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโรคของปลานิล จึงเลือกที่จะศึกษาการแสดงออกของยีนที่ตับและม้ามโดยใช้เทคนิค Real Time RT-PCR พบว่าการแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับทุกชุดทดลองมีการแสดงออกของยีนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.161$) แต่ในชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 5 g/kg feed มีระดับการแสดงออกของยีนมากที่สุด เท่ากับ 3.05 ± 2.01 ในขณะที่ชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 1 g/kg feed มีระดับการแสดงออกของยีน เท่ากับ 1.08 ± 0.52 และ 1.05 ± 0.67 ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 10 g/kg feed มีระดับการแสดงออกของยีนต่ำที่สุด คือ 0.71 ± 0.49 (ภาพที่ 2) และพบว่าผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อการแสดงออกของยีน Complement C3 ในม้ามซึ่งเป็นอวัยวะที่มีการแสดงออกของยีนรองจากตับก็ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน โดยทุกชุดการทดลองไม่มีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.245$) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 การแสดงออกของยีน Complement C 3 ในตับของปลานิล ที่ได้รับสารสกัดหยาบต้นลูกใต้ใบในปริมาณที่แตกต่างกัน และกำหนดให้ตัวอย่างในกลุ่มควบคุมเป็น Calibrator (Mean ± SE, n = 9)



ภาพที่ 3 การแสดงออกของยีน Complement C3 ในม้ามของปลานิล ที่ได้รับสารสกัดหยาบต้นลูกใต้ใบในปริมาณที่แตกต่างกัน และกำหนดให้ตัวอย่างในกลุ่มควบคุมเป็น Calibrator (Mean ± SE, n = 9)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าทั้งในการแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับและม้ามของปลานิลกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบต้นลูกใต้ใบ 5 g/kg feed มีแนวโน้มว่าจะสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน Complement C3 ได้มากกว่าชุดควบคุม (0 g/kg feed) และชุดทดลองอื่น (1 และ 10 g/kg feed) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสันธิวัฒน์ พิทักษ์ผล และคณะ (2553) รายงานว่าผลของสารสกัดหญ้าใต้ใบที่ความเข้มข้น 5 g/kg feed ทำให้กุ้งก้ามกรามมีอัตราการเจริญเติบโตและการรอดตายจากการติดเชื้อ *A. hydrophila* สูงที่สุด อีกทั้งจากรายงานของปาริชาต ผาสุก และ ปิยพร เจนการ (2553) พบว่าสารสกัดหยาบต้นลูกใต้ใบที่เคลือบอาหารเม็ดความเข้มข้น 1 g/kg feed สามารถเพิ่มปริมาณ Total immunoglobulin ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดทดลองอื่น ดังนั้นสารสกัดหยาบต้นลูกใต้ใบจึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อกระตุ้นให้ปลานิลมีระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มสูงขึ้น

4. บทสรุป

การแสดงออกของยีน Complement C3 ในอวัยวะของปลานิลพบว่าตับเป็นอวัยวะที่มีการแสดงออกมากที่สุด รองลงมา คือ ม้าม และในกล้ามเนื้อ หัวใจ ไต รังไข่ และถุงน้ำเชื้อ มีการแสดงออกของยีน Complement C3 ที่ใกล้เคียงกัน ส่วนปลานิลที่ได้รับสารสกัดหยาบต้นลูกใต้ใบในปริมาณ 5 g/kg feed มีแนวโน้มว่าจะสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน Complement C3 ได้มากที่สุด ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการการศึกษาและหาแนวทางในการป้องกันโรคในปลานิลได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ จังหวัดอุตรดิตถ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลานิลในครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. (2554). ยุทธศาสตร์การพัฒนาปลานิล (2553-2557). Retrieved March 23, 2011, from http://www.fisheries.go.th/freshwater/web3/images/download/yutasat.pdf.

ชนกันต์ จิตมนัส. (2556). ผลของผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรต่อภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น. 18(2), 257-269.

ปาริชาต ผาสุก และ ปิยพร เจนการ. (2555). ผลของสารสกัดหยาบต้นลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) ต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและการเกิด Miconuclei ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). การศึกษาด้วยตนเอง วท.บ., มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

สันธิวัฒน์ พิทักษ์ผล, ประไพ วงศ์สินคงมั่น, จารีย์ บัณสิทธิ์, ธิดารัตน์ บุญรอด และ วีรยุทธ ผรณเกียรติ. (2553). ผลของสารสกัดหญ้าใต้ใบต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแอโรโมแนส ไฮโดรฟิลา และการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของกุ้งก้ามกราม. วารสารนเรศวรพะเยา. 3(1), 15-21.

Amin, Z.A., Abdulla, M.A., Ali, H.M., Alshawsh, M.A. and Qadir, S.W. (2012). Assessment of in vitro antioxidant, antibacterial and immune activation potentials of aqueous and ethanol extracts of *Phyllanthus niruri*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(9), 1874-1877.

Claire, M., Holland, H., and Lambris J.D. (2002). The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*. 12, 399-420.

Dhandapani, R., Lakshmi, D., Balakrishnan, V., Jayakumar, S. and Anandha, K. (2007). Preliminary phytochemical investigation and antibacterial activity of *Phyllanthus amarus* Schum & Thorn. *Anc Sci Life*. 27(1), 1–5.

Ellingsen, T., Strand, C., Monsen, E., Bogwald., J. and Dalmo, R..A. (2005). The ontogeny of complement component C3 in the spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen). *Fish Shellfish immunal*. 18(5), 351-358.

Lange, S., Bambir, S., Dodds, A.W. and Magnadottir, B. (2004a). The ontogeny of complement component C3 in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) -an immunohistochemical study. *Fish & Shellfish Immunology*. 16, 359-367.

Lange, S., Bambir, S., Dodds, A.W. and Magnadottir, B. (2004b). An immunohistochemical study on complement component C3 in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Developmental and Comparative Immunology*. 28, 593-601.

Milan, G.F., Godoy, D.T., Leal, C.A.G., Yuhara, T.Y., Costa, G.M. and Figueiredo, H.C.P. (2009). Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*. 136(1-2), 180-183.

Pfaffl, W. M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research.* 29(9), 2003-2007

Phumyu, N., Boonnanuntanasarn, S., Jangprai, A., Yoshizaki, G. and Na-Nakorn, U. (2012). Puberty effects of 17α-methyltestosterone on GH-IGF-related genes of the hypothalamic-pituitary-liver-gonadal axis and other biological parameters in male, female and sex reversed Nile tilapia. *General and Comparative Endocrinology*. 177(2), 298-292.

Rajeshkumar, N.V., Joy, K.L., Kuttan, G., Ramsewak, R.S., Nair, M.G. and Kuttan, R. (2002). Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract. *J Ethnopharmacol*. 81(1), 17-22.

Yeh, S.F., Hong, C.Y., Huang, Y.L., Liu, T.Y., Choo, K.B. and Chou, C.K. (1993). Effect of an extract from *Phyllanthus amarus* on hepatitis B surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Res*. 20(3), 185-192.