

# ผลของการเบียนต่อสารไซโตไคน์ในหนอนกระทู้ผัก (The Effect of Parasitization on the Cytokine of the Common Cutworm, *Spodoptera litura*)

## ประกายจันทร์ นิ่มกิ่งรัตน์

### ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



#### บทคัดย่อ

เซลล์เม็ดเลือดสีโมไซตีในระบบภูมิคุ้มกันของแมลงเป็นกลไกแรกที่ร่างกายแมลงตอบสนองเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย กลไกนี้มีสารไซโตไคน์เป็นปัจจัยหลักที่ช่วยเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน การศึกษาค้นคว้าวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับสารไซโตไคน์ของหนอนกระทู้ผักที่มีหน้าที่เสริมระบบภูมิคุ้มกันของหนอนกระทู้ผักและตรวจสอบแหล่งผลิตสารไซโตไคน์ในแมลง โดยการสกัดสารจากเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน ได้แก่ ปลายขา ไขมัน และผนังลำตัวและทดสอบสารสกัดที่ได้ในด้านการรวมกลุ่มของสีโมไซตี พบว่าปลายขาเป็นแหล่งผลิตหลักของสารไซโตไคน์ นอกจากนี้ยังพบว่าการเบียนมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของหนอนกระทู้ผักซึ่งส่งผลให้ระดับไซโตไคน์ในปลายขามีปริมาณลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารไซโตไคน์ในหนอนที่ถูกเบียนและไม่ถูกเบียนพบว่าหลังการเบียนปริมาณของสารไซโตไคน์มีปริมาณลดลง

#### บทนำ

ระบบภูมิคุ้มกันแมลงเป็นปราการด่านแรกทำหน้าที่ต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาสู่ร่างกายของแมลง เมื่อแมลงถูกเบียนปัจจัยหลักที่สามารถทำให้แมลงเบียนประสบความสำเร็จในการเบียนนั้นคือการเข้าทำลายระบบภูมิคุ้มกันของแมลงอาศัย ดังนั้นแมลงจำเป็นต้องสร้างระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพเพื่อต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอมที่แปลกปลอมต่าง ๆ กัน ซึ่งกลไกหลักที่ทำหน้าที่ต่อต้านสิ่งแปลกปลอมนี้คือ ระบบเซลล์เม็ดเลือดสีโมไซตีที่มีสารไซโตไคน์ทำหน้าที่เสริมการทำงานของระบบให้มีความมีประสิทธิภาพมากขึ้น สารไซโตไคน์ในแมลงเป็น โปรตีนหรือเปปไทด์ที่แมลงอาศัยผลิตขึ้นมีหน้าที่เป็นสารตัวกลางในการกระตุ้นสีโมไซตีในระบบภูมิคุ้มกันของแมลง เช่น ช่วยในการบวกรการจดจำ(Regconition) กระบวนการฟาโกไซโตซิส(Phagocytosis) กระบวนการอนุเคลียฟอร์มชัน(Nodule formation) กระบวนการเอนแคปซูลชัน(Encapsulation) กระบวนการโคอะกูเลชัน(Coagulation) และไซโตท็อกซิกซิตี(Citotoxicity) นอกจากนี้มีรายงานว่าสารไซโตไคน์กลุ่มENF (Aizawa et al., 2001) ยังมีหน้าที่แตกต่างออกไป เช่น ยังมีการเจริญเติบโต (Hayakawa, 1990; Hayakawa, 1991; Hayakawa, 1992) กระตุ้นให้เกิดการฟิการ (Skinner et al., 1991; Skinner et al., 1993) กระตุ้นอัตราการเต้นของหัวใจ (Furuya et al., 1999) การแพร่พันธุ์ของเซลล์ (Ohmishi et al., 2001) และระบบภูมิคุ้มกัน (Clark et al., 1997; Aizawa et al., 2002)

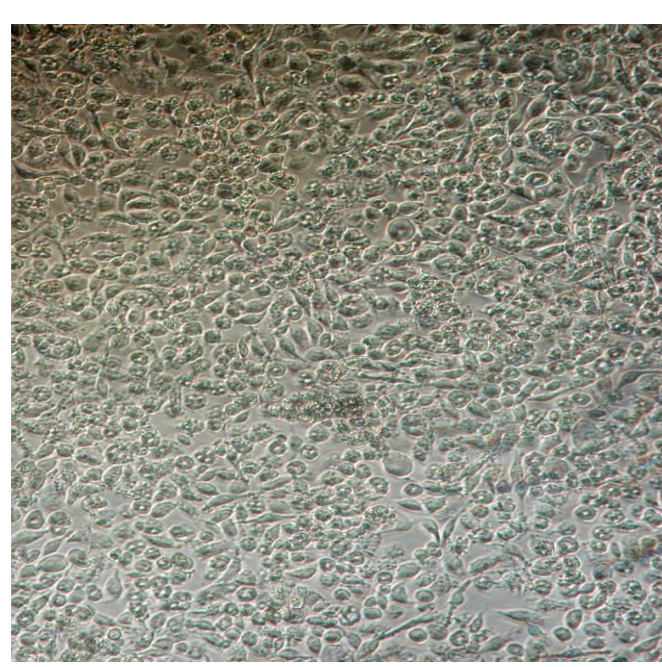
#### วิธีการทดลอง

**ผลต่อน้ำหนัก** เลี้ยงหนอนวัย 4 ด้วยอาหารเทียม กลุ่มแรกคือกลุ่มถูกเบียนด้วยแมลงเบียน *M. manilae* และกลุ่มไม่ถูกเบียน ซึ่งน้ำหนักทุกวัน น้ำหนักทั้งสองกลุ่มที่มีน้ำหนักสูงสุดมาจะเลือกและทดสอบปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตี

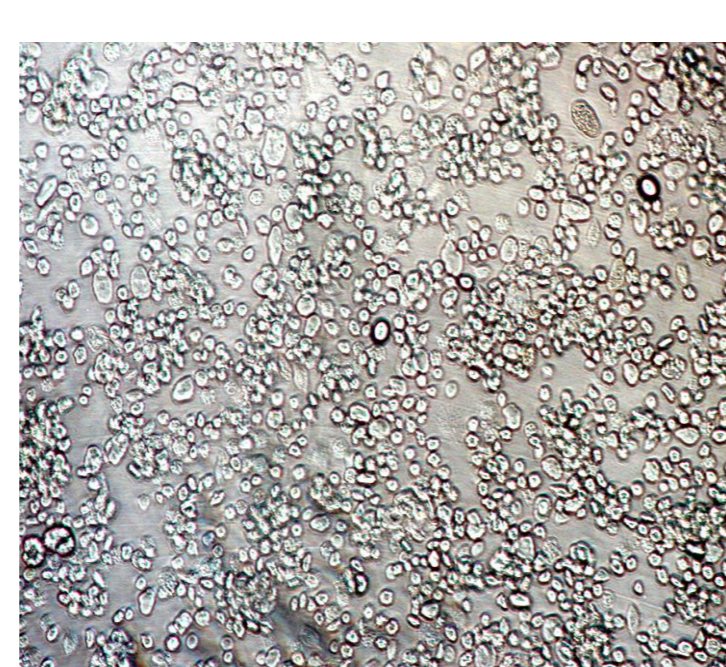
**ทดสอบการรวมกลุ่มของสีโมไซตีในเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน** เตรียมเนื้อเยื่อ 3 ชนิดได้แก่ ปลายขา ไขมัน และ ผนังลำตัวจากหนอนทั้งสองกลุ่ม

**In-vitro bioassay** ทดสอบปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตีโดยเจาะเลือดหนอนใช้เฉพาะส่วนของสีโมไซตีมาทดสอบกับสารที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ดังค่าคะแนนของการรวมกลุ่มของสีโมไซตีในระดับต่าง ๆ กัน ดังภาพที่ 1

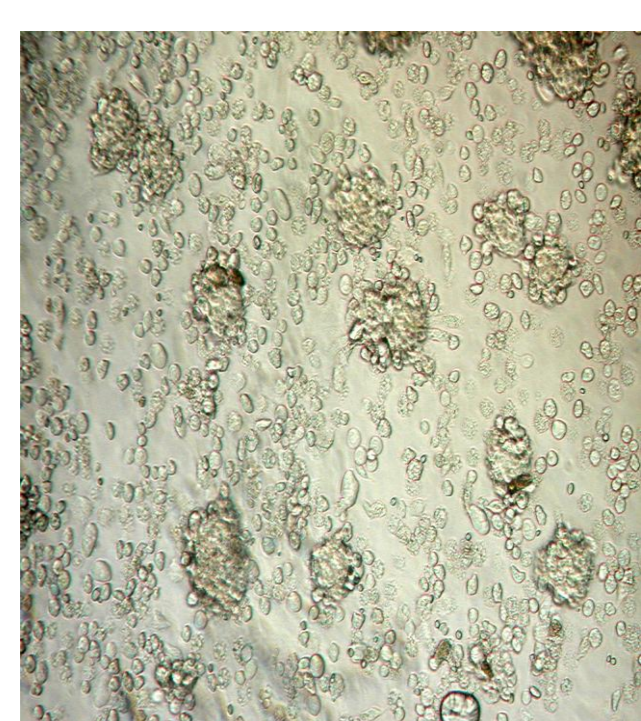
**จำแนกคุณลักษณะเบื้องต้นของไซโตไคน์ที่สกัดได้** เตรียมปลายขาของหนอนกระทู้ผักและนำไปหาค่าน้ำหนักโมเลกุลด้วยฟิวเวอรัขนาดแตกต่างกันดังนี้ 5,000 NMWL, 10,000 NMWL และ 30,000 NMWL



Aggregation Score 0/No activity



Aggregation Score 1/Low Activity



Aggregation Score 3/Medium Activity



Aggregation Score 4/Strong Activity

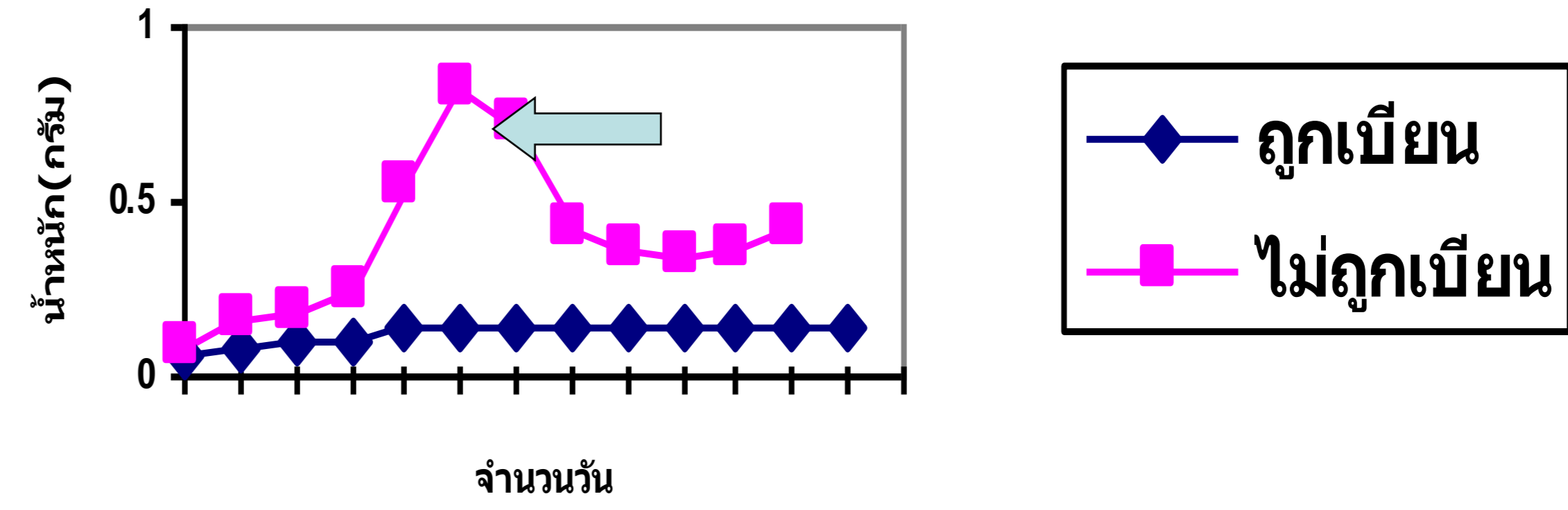
ภาพที่ 1. ค่าคะแนนของการรวมกลุ่มของสีโมไซตีในระดับต่าง ๆ กันในกระบวนการbioassay

#### ผลการทดลอง

**1.ผลต่อน้ำหนัก** น้ำหนักของหนอนที่ถูกเบียนและไม่ถูกเบียนมีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 2) น้ำหนักหนอนกลุ่มไม่ถูกเบียนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามลำดับและลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้ ซึ่งแตกต่างจากหนอนกลุ่มถูกเบียนมีน้ำหนักคงที่ตลอดช่วงอายุ นอกจากนี้เมื่อน้ำหนักหนอนเพิ่มขึ้นถึงจุดสูงสุด(ลูกศรชี้) เก็บเลือดหนอนทั้งสองกลุ่มมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้น 1 ชั่วโมงพบสีโมไซตีในหนอนกลุ่มที่ไม่ถูกเบียนเกิดปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตีส่วนสีโมไซตีจากหนอนกลุ่มที่ถูกเบียนไม่พบปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตี ดังแสดงในภาพที่ 3

**2.ทดสอบการรวมกลุ่มของสีโมไซตีในเนื้อเยื่อต่างชนิด** จากการทดสอบเนื้อเยื่อทั้งสามชนิดพบว่าปลายขาแสดงปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตีได้ชัดเจนที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบกับหนอนที่ถูกเบียนและไม่ถูกเบียนพบว่าปลายขามีความแตกต่างของการรวมกลุ่มของสีโมไซตี(ตารางที่ 1 และ 2)

**3.จำแนกคุณลักษณะเบื้องต้นของไซโตไคน์ที่สกัดได้** ปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตีจะกระจายอยู่ในทุกขนาดของฟิวเวอรั จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าในปลายขานั้นประกอบด้วยไซโตไคน์มากกว่า 1 ชนิด(ตารางที่ 3)



ภาพที่ 2. ผลกระทบของการเบียนต่อน้ำหนักหนอนกระทู้ผัก *S. litura* ที่ถูกเบียนด้วยแมลงเบียน ลูกศรชี้หมายถึงช่วงที่น้ำหนักตัวมีค่าสูงสุดในหนอนที่ไม่ถูกเบียน



หนอนถูกเบียน



หนอนที่ไม่ถูกเบียน

ภาพที่ 3. ผลกระทบของการเบียนต่อปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตี

ตารางที่ 1. การเกิดปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตีหลังจากสกัดเนื้อเยื่อสามชนิดของหนอนไม่ถูกเบียน

อัตราส่วน	ชนิดของเนื้อเยื่อ	ค่าคะแนนของการเกิดปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตีต่อเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ที่สกัดจากหนอนกลุ่มไม่ถูกเบียน			
		คอนโทรล (PBS)	ปลายขา	ไขมัน	ผนังลำตัว
1		0	3	1	3
1/2		0	3	0	3
1/4		0	2	0	2
1/8		0	2	0	2
1/10		0	1	0	1

ค่าคะแนน 0: ไม่มีปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตีเกิดขึ้น

- 1: มีปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตีต่ำ
- 2: มีปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตีชัดเจนปานกลาง
- 3: มีปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตีชัดเจนสูง

ตารางที่ 2. การเกิดปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตีหลังจากสกัดเนื้อเยื่อสามชนิดของหนอนถูกเบียน

อัตราส่วน	ชนิดของเนื้อเยื่อ	ค่าคะแนนของการเกิดปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตีต่อเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ที่สกัดจากหนอนกลุ่มถูกเบียน			
		คอนโทรล (PBS)	ปลายขา	ไขมัน	ผนังลำตัว
1		0	2	0	3
1/2		0	1	0	2
1/4		0	0	0	1
1/8		0	0	0	1
1/10		0	0	0	0

ตารางที่ 3. ทดสอบคุณลักษณะน้ำหนักโมเลกุลเบื้องต้นจากปลายขาด้วยการใช้ Ultrafree-MC centrifugal filter unit ที่มีขนาดต่างๆกัน

น้ำหนักโมเลกุล	ขนาดของฟิวเวอรั (NMWL)	ค่าคะแนนของปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตี
5,000 NMWL	Lower ( $\leq$ 5,000 NMWL)	2
	Upper ( $\geq$ 5,000 NMWL)	3
10,000 NMWL	Lower ( $\leq$ 10,000 NMWL)	2
	Upper ( $\geq$ 10,000 NMWL)	3
30,000 NMWL	Lower ( $\leq$ 30,000 NMWL)	3
	Upper ( $\geq$ 30,000 NMWL)	3
คอนโทรล	-	0

ค่าคะแนน 0: ไม่มีปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตีเกิดขึ้น

- 1: มีปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตีต่ำ
- 2: มีปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตีชัดเจนปานกลาง
- 3: มีปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตีชัดเจนสูง

#### สรุปผลการวิจัย

เมื่อสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายแมลง แมลงสามารถดักจับและส่งสัญญาณไปยังเซลล์เม็ดเลือดสีโมไซตีให้ทำหน้าที่ต่อต้านในรูปแบบต่างๆ ตัวส่งสัญญาณไปสู่เซลล์เม็ดเลือดสีโมไซตีคือสารไซโตไคน์ จากการศึกษาสารไซโตไคน์ประเภทโปรตีนและเปปไทด์จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ได้แก่ ปลายขา ไขมัน ผนังลำตัว พบว่าปลายขาเป็นแหล่งที่พบปริมาณของสารไซโตไคน์มากที่สุดในหนอนกระทู้ผัก นอกจากนี้เมื่อเจาะเลือดหนอนกระทู้ผักทั้งสองกลุ่ม พบว่ากลุ่มหนอนไม่ถูกเบียนแสดงปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตีได้อย่างชัดเจน ส่วนกลุ่มหนอนถูกเบียนไม่แสดงเกิดปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของสีโมไซตี จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเบียนมีผลต่อการลดลงของปริมาณไซโตไคน์ซึ่งส่งผลให้ระบบเซลล์เม็ดเลือดของระบบภูมิคุ้มกันของหนอนกระทู้ผักเสื่อมประสิทธิภาพลงไป

Aizawa T., Hayakawa Y., Ohmishi A., Fujitani N., Clark K.D., Strand M.R., Mura K., Koganesawa N., Kamaki Y., Demura M., Nita K. and Kawano K. (2001) Structure and activity of the insect cytokine growth-blocking peptide. Essential regions for mitogenic and homeocyte-stimulating activities are separate. *J. Biol. Chem.*, 276(34): 3183-3188.

Hayakawa Y. (1990) Juvenile hormone intercaste activity: repressive factor in the plasma of parasitized insect larvae. *J. Biol. Chem.*, 265: 10813-10816.

Hayakawa Y. (1991) Structure of a growth-blocking peptide: present in parasitized insect hemolymph. *J. Biol. Chem.*, 266: 7982-7984.

Hayakawa Y. (1992) A putative new juvenile hormone in lepidopteran insect. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 185: 1141-1147.

Skinner W.S., Dennis P.A., Li J.P., Summerfelt R.M., Carney R.L. and Quintal G.H. (1993) Isolation and Identification of paralytic peptides from hemolymph of the lepidopteran insect *Trichoplusia ni* (Hübner). *Comp. Biochem. Physiol.* 104: 133-135.

Furuya K., Hackett M., Crellin M.A., Schegg K.M., Wang H., Shabanowitz J., Hunt D.F. and Schooley D.A. (1999) A cardiotonic peptide from the southern armworm. *Spodoptera eridania*. *Peptides* 20: 53-61.

Ohmishi A., Oda Y. and Hayakawa Y. (2001) Characterization of receptors of insect cytokine, growth-blocking peptide, in human keratinocyte and insect Sf9 cells. *J. Biol. Chem.* 276(41): 37979-37979.

Clark K.D., Preh L.L. and Strand M.R. (1997) Isolation and identification of a phasmatocytotoxic peptide from the hemolymph of the lepidopteran insect *Paratropis inclusa*. *J. Biol. Chem.* 272(37): 23440-23447.

Aizawa T., Hayakawa Y., Nita K. and Kawano K. (2002) Structure and activity of insect cytokine GRP which stimulates the EGF receptor. *Mol Cell* 14(1): 1-8.