

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

山羊黃體細胞凋亡之研究

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-064

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：吳兩新 台灣大學畜產學系

計畫參與人員：邱智賢 台灣大學畜產學系

一、中文摘要

本研究之目的是利用山羊黃體細胞株(GLC-D)，於體外培養(in vitro) 模式下，檢測相關內分泌素對此細胞株分泌孕酮能力，以及對細胞凋亡之作用，進而瞭解相關內分泌素對於黃體細胞分泌孕酮及調控其細胞凋亡之機制。本試驗應用本研究室所發展之山羊黃體細胞株(GLC-D)，於 40 培養系統下，添加不同之類固醇內分泌素(E2、B、F、T 以及 DHT 等)，檢測其對細胞株之孕酮(progesterone)分泌量與分析其細胞凋亡現象。初步結果顯示，(E2)100ng/ml 可明顯抑制此細胞株分泌孕酮之能力，在添加受質之處理組中雌素二醇依然具有抑制效果，顯示雌素二醇可能牽涉抑制類固醇生成酵素之作用。此外，添加雌素二醇之處理組經 24 小時培養後，具有誘發細胞凋亡之現象，其 DNA fragmentation 隨時間而有增加之趨勢，且利用 TUNEL 標幟其 3'端 DNA 片段，發現隨時間之增加其紅色螢光標幟之細胞有明顯增加。然其分子作用機制，則需更進一步探討。

關鍵詞：山羊、細胞株、細胞凋亡

Abstract

The purpose of this study was determine the effects of hormones on progesterone production and apoptosis induction of carpine luteal cell line by using in vitro strategy. Furthermore, to

examine the hormone effect on life span of corpus luteum and ability of steroidogenesis. In this study, we use a caprine luteal cell line (GLC-D) with temperature sensitive SV40 virus, which established in our laboratory. In 40 culture system, we found that the treatment of estrogen(100ng/ml) for 24 hours can induce apoptosis of this cell line, and decrease progesterone production from this cell line. The inhibition effect of E2 may include inhibition steroidogenesis enzyme synthesis. In conclusion, the results demonstrated that the inhibition of steroidogenesis could induced apoptosis of carpine luteal cell line, and increase DNA fragmentation and 3'end labeling DNA fragment, the mechanism is not clear yet and further studies will be done.

Keywords: goat, cell line, apoptosis

二、緣由與目的：

細胞凋亡(apoptosis)是細胞本身活化自我毀滅的機制，為維持身體持恆狀態(homeoestasis)之重要生理現象。當細胞遭受外來刺激或傷害，在無法修復之情況下，便會啟動細胞凋亡程式，產生一連串之變化，諸如細胞圓起脫落(detaching)、細胞膜內膜外翻(inner out)、脫水(dehydration)、泡狀化(bebbing)、細胞骨架重組(cytoskeleton reorganization)及核質濃縮(nuclear condensation)，且其內核核酸酵素(endonuclease)的活性增加，將 DNA 截切成 180-200 鹼基對(base pair)或其倍

數之 DNA 片段，而且細胞碎裂成凋亡小體(apoptotic body) (Kenny, *et al.*, 1994; Kiess and Gallaher, 1998)。因此與細胞凋亡之分辨上，可利用洋膠電泳(agarose gel)檢測是否有 DNA 片段階梯現象的產生而分辨之。

本研究室於86年已成功建立對溫度敏感之 SV40 病毒轉型細胞株，此一細胞株之若干生理特性已初步獲得鑑定(邱等, 1997)。近年來，生物醫學界利用腫瘤病毒與致癌基因所建立之顆粒(granulosa)及黃體細胞株(luteal cell line)，為研究不同類固醇基因的表現與調控，提供了良好的模式。因此本研究擬利用此一 GLC-D 細胞株，以探討黃體解體時相關內分泌之調控與訊息傳導之機制。

目前，有關黃體解體之細胞內機轉尚未完全明瞭，然在形態學上黃體解體的表現具有細胞凋亡之現象(Sawyer *et al.*, 1990)。歸納與黃體解體有關之文獻(Thompson, 1994; Kiess and Gallaher., 1998)，我們推測黃體細胞凋亡之可能機轉如下：

1.內分泌於細胞凋亡上所扮演的角色：如在動情週期中源自濾泡的雌素二醇(estrodiol, E_2) 睪固酮(testosterone, T)及源自子宮內膜之 PGF_2 ，可能都與誘發黃體細胞凋亡有關。又依本研究室初步之結果顯示， E_2 & T (1×10^{-10} ug/ml) 添加於體外培養山羊黃體細胞 4 小時後，即可顯著抑制山羊黃體細胞(採自動情週期中期)孕酮之分泌，故其可能與黃體解體有關？另外，就黃體細胞而言，刺激黃體之類固醇生合成(Amsterdam *et al.*, 1997)之因子存在時，是否可阻止細胞凋亡的啟動？因此孕酮(或激黃體物質)的持續存在與黃體細胞凋亡之關係為何？是本研究的另一重點。

2.涉及 PGF_2 之路徑：雖然已知 PGF_2 是一種解黃體的物質，但其作用路徑是經由 cAMP 第二信使之 PKA(protein kinase A)、PKC(protein kinase C)或

Tyrosine kinase 路徑，先使黃體細胞之類固醇相關酵素活性如 P450_{scc} 及 3-HSD 下降，進而類固醇分泌(孕酮, P4)下降，再轉而造成細胞凋亡？或者是先使細胞凋亡後，其孕酮分泌才下降？亦是本研究的另一重點。利用相關訊息傳導路徑之活化劑與抑制劑將可探討其間之相互關係。

因此，控制黃體細胞凋亡便成為正常週期及懷孕期間之卵巢功能的重要指標，這對於啟動細胞凋亡與刺激類固醇生合成具有極大的關係，而濾泡與黃體細胞的細胞凋亡並不會在整個細胞週期上同時發生，且對於已進入細胞凋亡期的細胞，是否依然具有類固醇生合成能力，而其類固醇相關酵素活性為何？也是我們所欲探討的重點。

三、結果與討論：

在體外培養系統中，利用本研究室所建立之對溫度敏感山羊黃體細胞株進行其 DNA 合成活性變化之情形，在先前的研究中，我們利用對溫度敏感的 SV40 山羊黃體細胞株(GLC-D)，此細胞株在 34 時可持續分裂生長，但是當溫度提高至 40 時，細胞不再生長分裂。我們利用 3H -thymidine 併入法分析發現，在 34 及 40 下培養 24 小時後，40 培養組其 3H -thymidine 含量明顯低於 34 處理組，顯示此一細胞株在不同溫度處理下，34 培養組具有合成 DNA 之能力，且使細胞增生，而在 40 時，細胞不再分裂生長，且具有合成孕酮(progesterone)之能力，然而細胞隨培養時間至 48 小時後，在洋菜膠電泳中呈現低分子量之 DNA 片段，而且在雌二醇 E_2 (100ng)及睪固酮 T(100ng)處理組中亦顯示有細胞凋亡之現象發生(圖一)。為瞭解此一細胞株之凋亡速率，我們將細胞培養於 34 並給予 3H -thymidine，24 小時後移至 40 培養，並添加不同之類固醇及激性腺素刺激之，然後計算攝入細胞內 3H -thymidine 的保留能力。結果顯

示，當細胞由 34 移至 40 後，生長明顯減緩，且細胞內殘留之 ^3H -thymidine 也迅速減少，顯示細胞凋亡增加。且在添加 forskolin 及 A23187 組中，會加速溫度改變所誘發之細胞凋亡，而添加 LH 及 pregnenolone 組則會減緩之（資料未顯示）。同時在西方墨染法的結果亦發現，培養於 34 之細胞有 Large T antigen 之表現，而於 34 移至 40 培養 24 小時後，則無法檢測到 Large T antigen 的存在（資料未顯示），這些結果顯示，山羊黃體細胞之類固醇生成與細胞凋亡現象應具有一定程度之相關性。

綜合上述之實驗結果有兩點結論：

1. SV40 T 抗原轉型之山羊黃體細胞株在 40 的培養條件下，會隨著時間的增加而以細胞凋亡之方式進行死亡。
2. 此一細胞凋亡之現象，可利用激黃體物質如 LH 及 pregnenolone 而減緩其細胞凋亡之現象。
3. 利用雌二醇(E2)與睪固酮(T)可加速此細胞株細胞凋亡現象的產生。

四、計畫成果自評：

本研究之目的在利用體外(*in vitro*) 模式，探討細胞株的 DNA 合成速率與細胞凋亡之 DNA 片段產生，以瞭解調控山羊黃體細胞凋亡(apoptosis)的機轉，進而建立研究細胞凋亡之模式。

本研究主要發現激黃體物質可降低山羊黃體細胞株細胞凋亡速率，而雌素二醇(E2)與睪固酮(T)則具有促進細胞株細胞凋亡之現象。因此，激黃體物質以及雌素二醇(E2) 與睪固酮(T)對於黃體解體時之細胞凋亡應佔有一重要之地位。

本研究結果顯示，利用本研究室建立之山羊黃體細胞株將可提供研究細胞凋亡機制之模式，且對於調控黃體細胞凋亡之研究可提供更有力之證據。

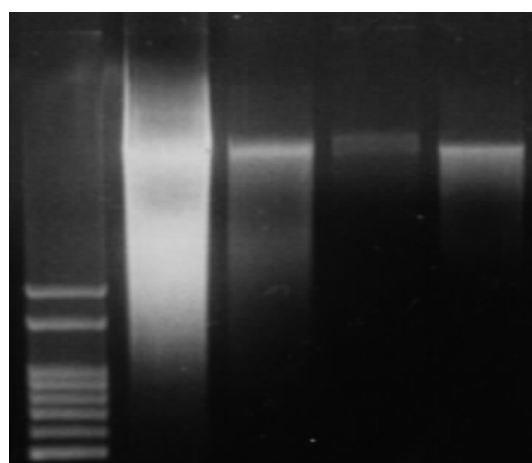
五、參考文獻：

1. 邱智賢、吳兩新、林仁壽。1997。應用對溫度敏感之 SV-40 病毒建立山羊

黃體細胞株。中國畜牧學會會誌 26 (增刊): 125。

2. Amsterdam, A., A. Dantes, N. Selvaraj, and D. Aharoni 1997. Apoptosis in steroidogenic cells: structure- function analysis. Steroids 62:207-211.
3. Kenny, N. R.E. Williams and L.B. Keln. 1994. Spontaneous apoptosis of cells prepared from the nonregressing corpus luteum. Biochem. Cell Biol. 72:531-536.
4. Kiess W. and B. Gallaher. 1998. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. Europ. J. Endocr. 138:482-491.
5. Sawyer, H.R., K.D. Niswender, T.D. Braden and G.D. Niswender 1990. Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF₂. Domest. Anim. Endocrinol 7:229-238.
6. Thompson, E.B. 1994. Apoptosis and steroid hormone. Mol. Endocr. 8(6):665-673.

M E2 T 34 40



圖一、GLC-D 山羊黃體細胞株在 34 及 40、雌二醇(100ng/ml) 與 睪固酮(100ng/ml) 處理 48 小時後之 DNA 片段發生情形。