

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

葉酸對產蛋雞卵巢濾泡生長,類固醇生成,產蛋性能和蛋品質之影響(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-389-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學畜產學系暨研究所

計畫主持人：吳兩新

計畫參與人員：張克勝 邱智賢

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國92年6月2日

中文摘要

本研究計劃分二年進行，其目的在探討活性葉酸：(1) 對蛋雞濾泡細胞生長及性類固醇合成之影響；(2) 對產蛋雞之產蛋性能及蛋品質之影響。

第一年利用產蛋週期中之蛋雞，取其卵巢濾泡細胞進行體外培養，檢測大濾泡(F1)之粒性細胞，添加不同濃度葉酸及激性腺素(oLH、c-AMP)，對其性類固醇合成之影響。初步結果顯示 Na₂FA 與 CaFA 形式葉酸對雞隻卵巢濾泡粒性細胞之孕酮(P₄)分泌之影響並不顯著。而在合併 0.1 ug/ml oLH 處理時，僅 CaFA 的濃度在 0.1~1 ug/ml 時對於 LH 刺激的 P₄ 分泌具有抑制作用；Na₂FA 並沒有明顯作用。在合併處理 100 uM cAMP 者，CaFA 對於 cAMP 所誘發的 P₄ 分泌隨著 CaFA 的濃度上升而受到抑制；而 Na₂FA 對於 cAMP 誘發的 P₄ 分泌亦沒有影響。此種差異有待進一步研究。

關鍵詞：活性葉酸、卵巢濾泡、孕酮

英文摘要

The objectives of this two-year studies is to investigate the effects of active folate on : (1) ovarian steroidogenesis of ovarian follicular cell. (2) egg productive performance and egg quality of laying hen.

The first year, the ovarian follicles of laying hen are cultured in vitro. Granulosa cells taken from large ovarian follicular cells (F1) were stimulated by folates and gonadotropin, such as oLH、8-bromo-cAMP to evaluate the ability of progesterone production. The preliminary results showed that two types of folate-Na₂FA 與 CaFA could not change the progesterone secretion from granulosa cells in vitro. In combine with oLH trial, addition of 0.1~1 ug/ml CaFA could inhibited the progesterone secretion from granulosa cells, but did not observe in Na₂FA treatment. In combine with 100 uM cAMP trial, CaFA decreased the progesterone production from granulosa cells with increasing CaFA dosage. This phenomenon did not show in Na₂FA treatment. This difference in progesterone production between CaFA and Na₂FA treatments is required further study.

Key words: Folate, ovarian follicle, progesterone

前言

各種不同成熟度之排卵前濾泡的類固醇製造能力互有差異，乃因排卵前濾泡的膜細胞，包括內膜及外膜細胞 (theca interna and theca externa cells)，與粒性細胞中含有不同的類固醇合成酵素所致。在排卵前濾泡的 LYF 中，內膜細胞主要合成孕酮，而外膜細胞主要合成雌二醇，但隨著濾泡逐漸發育成熟，其合成孕酮和雌二醇的能力會隨之下降。粒性細胞以分泌孕酮為主，而以 F1 之含量為最高 (Porter *et al.*, 1989)。綜合以上文獻顯示，家禽卵巢濾泡細胞，其類固醇內泌素合成能力與濾泡成熟度有關，且不同時期濾泡所受激性腺素的調控也有所不同，在未進入體系前是受激濾泡素 (FSH) 調控，而進入排卵前體系後，則受 LH 調控；另外，卵巢細胞在不同時濾泡時期的類固醇合成能力不只受到激性腺素控制，也會受到彼此的控制；而且在進入體系前之濾泡細胞尚會因受到數種生長因子作用而被抑制其類固醇生成能力，但在進入體系後生長因子對其類固醇能力或細胞生長的影響則未明。

葉酸 (Folacin) 是指由蝶醯麩胺酸 (pteroylglutamic acid, PGA) 及其衍生物組成的一群物質，其還原型態 (reduced form) 的四氫葉酸 (tetrahydrofolic acid, THF) 是動物體內許多單一碳單位 (single-carbon unit, C₁) 的轉移及代謝所不可或缺的活性輔酶 (active coenzyme)。THF 及其多種 C₁ 取代物在核酸合成 (Huennekens, 1968)、DNA 複製、細胞分裂及數種胺基酸代謝上扮演非常重要的角色 (Stokstad and Koch, 1967)。因此快速生長及高度再生的組織 (卵巢濾泡、胚胎、血球及小腸粘膜等) 對葉酸的需要量特別高。雞是飼養的禽畜中最容易缺乏葉酸的動物 (McDowell, 1989)，種雞缺乏會造成胚胎的畸形及孵化率的降低 (Sunde *et al.*, 1950)，蛋雞如果葉酸供應不足，會損害輸卵管對動情素的反應及其形成白蛋白的能力 (Anderson and Jackson, 1975; Burns and Jackson, 1979)，小雞則易導致巨紅血球性貧血 (macrocytic anemia)、紅血的核體異常、生長遲緩、羽毛發育不良及滑健症 (Scott *et al.*, 1982; Maxwell *et al.*, 1988)。

雞隻需要的葉酸主要來自飼糧，而大部分存在於單味原料中的葉酸是含多麩胺酸的結合型 (Cropper and Scott, 1966)，正常的動物腸道蛋白無法將其水解，而是由一些存在於腸道的共軛酶 (conjugases: pteroylpolyglutamyl carboxypeptidases) 將其水解成單麩胺酸的葉酸才能通過小腸刷狀緣膜 (brush-border)；而且這種葉酸在貯存及製造時容易被氧化，家禽對其利用率有限，大約只有 20 ~ 30% (Luswigshafen *et al.*, 1992)。化學合成的葉酸為氧化型 (oxidized form)，在小腸粘膜吸收後需經二氫還原酶 (dihydrofolate reductase; DHFR) 還原成 THF。

葉酸近年來在人醫方面的研究如火如荼，很多報告證實葉酸對於防止胎兒神經管畸形 (Scott *et al.*, 1995; Kuskelly *et al.*, 1996; Fleming, 2001) 和預防心血管疾病 (Boushey *et al.*, 1995; Nygard *et al.*, 1999) 有重要的功效。同時還能降低直腸癌 (Kim, 1999)、防止膽固醇變壞 (Nakano *et al.*, 2001) 與預防老年癡呆症的發生 (Ames, 1998; Coudill, 2000)。因此，美國政府通過 FDA 要求 (Food Standards, 1996) 規定從 1998 年一月一日起生產的穀類食品的業者要在產品中添加 140 µg/100g 的葉酸。而產蛋雞有一相當有效的葉酸保存及遞送系統，能把吸收到血液中的葉酸透過卵巢濾泡細胞膜上的受體居間內胞飲作用 (membrane receptor-mediated endocytosis) 轉送入卵黃中 (Kamen and Capdevila, 1986)，貯

積在蛋黃中的葉酸與血漿中的葉酸量成正比 (Sherwood *et al.* 1993)。由於卵巢濾泡細胞負有合成及分泌性類固醇內泌素之作用；因此，葉酸是否也會影響濾泡的生長及性類固醇內泌素 (P₄, T 及 E₂) 之合成，迄今未明？

在所有雞需要的維生素中，葉酸是最少被研究的一種 (Maxwell *et al.*, 1988)，而有關不同葉酸來源在家禽方面的研究相當有限。故本研究分二年進行旨在探討：(1) 家禽濾泡細胞類固醇合成與濾泡生長是否與飼糧中葉酸有關，(2) 活性葉酸的添加是否能提高血漿中葉酸濃度，進而提高蛋的葉酸含量，生產高葉酸之機能性產品。本報告僅將第一年之初步成果分述如下。

材料與方法

一、蛋雞之飼養及犧牲

性成熟 (22 週) 白色來航蛋雞，以頸椎脫臼方式犧牲，剖腹將其卵巢取出 F1 之排卵前濾泡，以供進行顆粒細胞層剝離及培養。

二、粒性細胞之分離

參考 Porter *et al.* (1989) 及 Nitta *et al.* (1991) 方法，將取出之 F1 浸泡於冰冷之生理食鹽水中，剝除濾泡外之結締組織及血管，以解剖刀片在濾泡壁上切出開口，將濾泡由此開口撕開，撕下膜性細胞層，再將膜性細胞層內、卵黃外之粒性細胞層剝下，經含 collagenase 之細胞解離液消化後，即可得到粒性細胞。

三、細胞培養

經解離液消化所得之細胞離心 10 分鐘後，以主要成份為 M199 之細胞培養液清洗兩次並懸浮細胞後，將細胞懸浮液與 trypan blue 以 1:1 染色，利用血球計數板，計算細胞存活數。培養時，每處理使用 1×10^5 cells/ml，於 37°C 下培養。

四、葉酸之添加處理

培養蛋雞卵巢濾泡粒性後，以對照組及實驗組，包括添加兩種不同形式葉酸 CaFA(5-methyl tetrahydrofolic) 及 Na₂FA(5-formyl tetrahydrofolic)、oLH、8-bromo-cAMP 等藥物刺激，收集 4、24、48 小時對照組及實驗組之細胞培養液，分別分析細胞培養液之 P₄ 含量。

五、類固醇分析

孕酮之酵素免疫分析應用吳等(1989)之方法，測定粒性細胞培養液中類固醇 P₄ 含量之變化。其分析內 (intra-assay) 與分析間 (inter-assay) 變異係數 (coefficient of variation) 分別為 9.46% 及 11.45%，靈敏度 (sensitivity) 為 0.52 ng/ml。

六、統計分析

細胞培養每次試驗之處理組均為三重覆，分析所得之數據依統計分析系統 (statistics analysis system, SAS) 進行統計分析，使用一般線性模式 (general linear model, GLM) 程序進行變異分析，並以最小自乘平均值 (least squares means) 進一步比較各組間差異之顯著性。

結果與討論

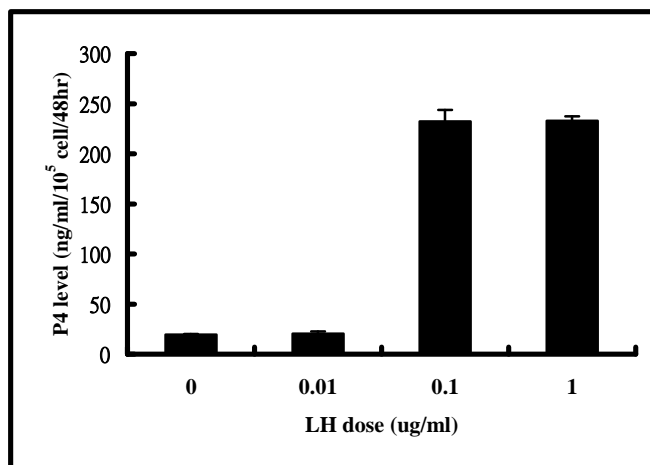
雞之卵巢濾泡粒性細胞 (granulosa cell) 是禽類分泌性內泌素的主要細胞，並且受到自體分泌之孕酮 (progesterone, P₄) 正回饋作用。正常粒性細胞分泌 P₄ 的能力受到 LH 的促進。而本次實驗所建立之雞粒性細胞，能夠被 oLH 誘發其 P₄ 的分泌 (圖一)。所以本次以雞為動物模式 (animal model) 能夠反映正常生理作用，並作為後續試驗參考之用。試驗中以兩種不同形式的葉酸，Na₂FA 及 CaFA，添加

在粒性細胞培養系統中，經檢測不同形式的葉酸對於雞之粒性細胞分泌 P₄ 的影響。結果顯示，Na₂FA 形式的葉酸，僅在 0.001 ug/ml 時會促進粒性細胞 P₄ 的分泌，而添加高量(0.01-10 ug/ml)並沒有顯著的影響(圖二)。雖然同為活性葉酸 THFA，但不同形式的活性葉酸對於激性類固醇分泌的影響卻不相同。CaFA 形式的葉酸在 0.001-10ug/ml 下，對於 P₄ 的分泌之影響並不顯著(圖三)。在 LH 刺激的情形下，粒性細胞的 P₄ 分泌，同樣因為葉酸的形式不同而有差異。以 Na₂FA、CaFA 兩種形式的葉酸同時添加外源的 LH，顯示 CaFA 的濃度在 0.1~1ug/ml 時對於 LH 促進的 P₄ 分泌具有抑制作用。但當 CaFA 的濃度達到 10 ug/ml 時卻失去抑制之作用，而恢復 LH 所誘導的 P₄ 分泌(圖四)。然而 Na₂FA 對於 LH 所誘發的 P₄ 分泌並沒有明顯作用(資料未顯示)。在添加 cAMP 方面，CaFA 對於 100 uM cAMP 所誘發的 P₄ 分泌，隨著 CaFA 的濃度上升而受到抑制(圖五)；而 Na₂FA 對於 cAMP 誘發的 P₄ 分泌並沒有影響(圖六)。

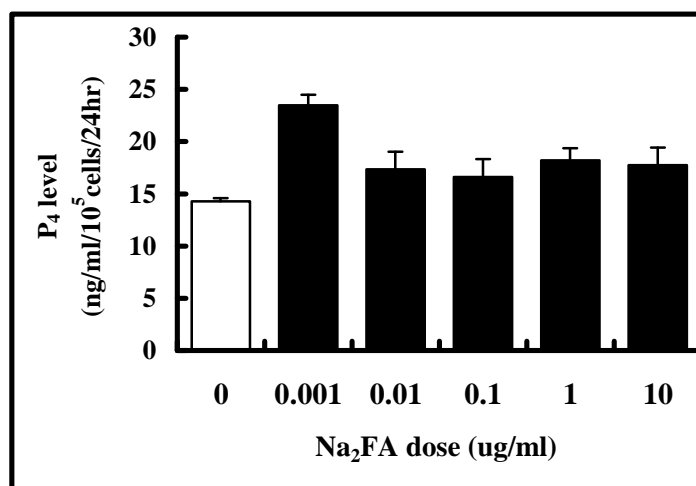
綜合本研究之初步結果可知，在體外培養之情形下，CaFA 及 Na₂FA 兩種活性葉酸對於雞卵巢濾泡粒性細胞之 P₄ 分泌，其影響並不顯著；而在 oLH 或 cAMP 合併處理時，則僅發現 CaFA 可抑制粒性細胞之 P₄ 分泌，其原因有待進一步探討。

主要參考文獻

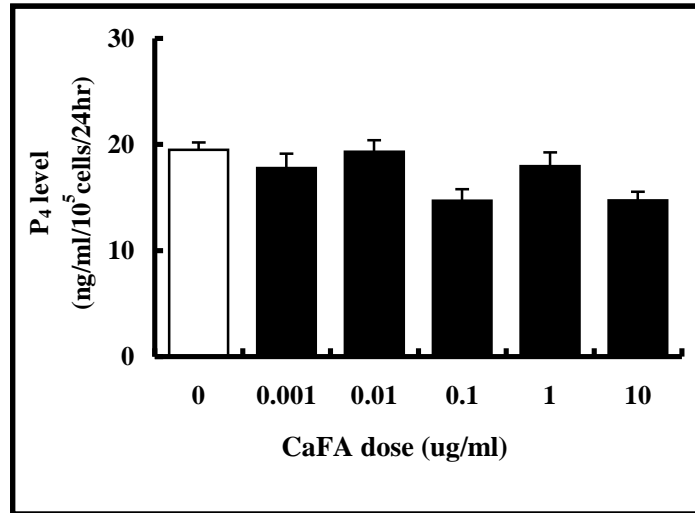
- 吳兩新、王惠玲、方世偉、莊榮輝、章淑貞、黃森源與林仁壽。1989。牛乳中助孕素酵素免疫微滴盤法之建立。國立台灣大學農學院研究報告 29:173-183。
- Akita, E. M. and S. Nakai. 1992. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *J. Food Sci.* 57: 629—634
- Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Nitta, H., Y. Osawa and J. M. Bahr. 1991. Multiple steroidogenic cell populations in the thecal layer of preovulatory follicles of the chicken ovary. *Endocrinology* 129:2033-2040.
- Porter, T. E., B. M. Hargis, J. L. Silsby and M.E. Halawani. 1989. Differential steroid production between theca interna and theca externa cells: a three-cell model for follicular steroidogenesis in avian species. *Endocrinology* 125:109-116.
- Sherwood, T A., R.L. Alphin, W . W Saylor and H. B. White III. 1993. Folate metabolism and deposition in eggs by laying hen. *Arch. Biochem. Biophys.* 307:66-72.
- Vohteristo, L., V. Olliainen and P. Varo. 1997. Liquid chromatographic. Determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg and dairy products consumed in Finland. *J. AOAC Int.* 80:373—378.
- White III H. B., E. F.Nnwaysir, S.P. Komara, D. A. Anderson, S.J. Chang, T.A. Sherwood, R.L. Alphin, and W. W. Saylor. 1992. Effect of riboflavin-binding protein deficiency on riboflavin metabolism in the laying hen. *Arch. Biochem. Biophys.* 295:29-34.



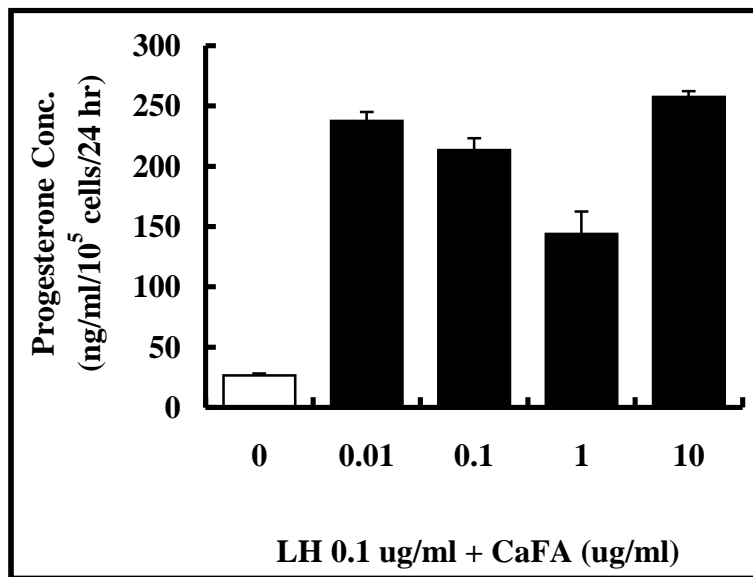
圖一、雞卵巢粒性細胞對 oLH 刺激之孕酮分泌的劑量反應。



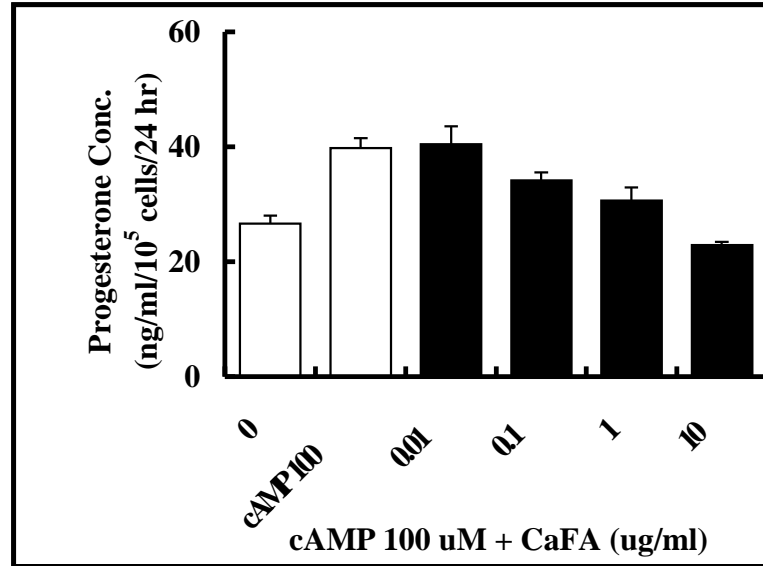
圖二、Na₂FA 形式的葉酸添加對雞卵巢粒性細胞孕酮分泌的影響。



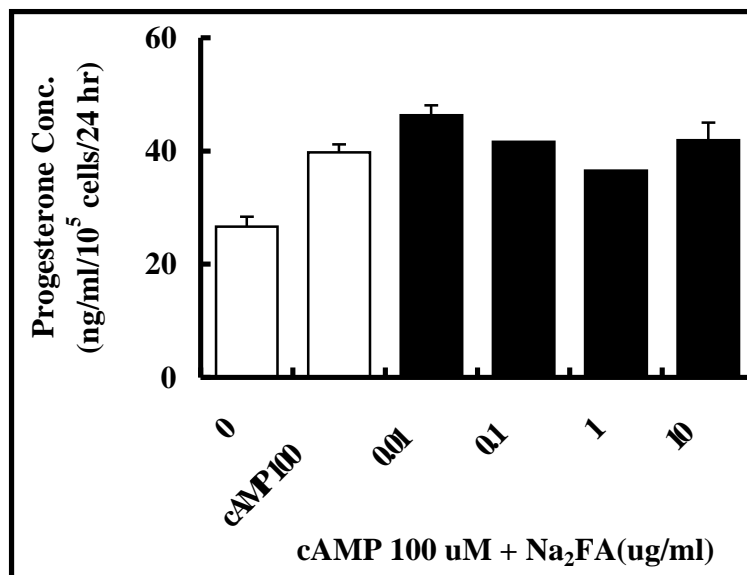
圖三、CaFA 形式葉酸對雞卵巢粒性細胞孕酮分泌的影響。



圖四、CaFA 形式葉酸合併 0.1 ug/ml LH 處理，對雞卵巢粒性細胞孕酮分泌的影響。



圖五、不同濃度之 CaFA 合併 100 uM cAMP 處理，對雞卵巢粒性細胞孕酮分泌的影響。



圖六、Na₂FA 形式的葉酸合併 100 uM cAMP 處理，對雞卵巢粒性細胞孕酮分泌的影響。

計畫成果自評

本研究第一年已成功建立雞卵巢濾泡粒性細胞之體外培養系統，同時也初步發現 CaFA 及 Na₂FA 兩種活性葉酸對於雞卵巢濾泡粒性細胞之 P₄ 基礎分泌，其影響並不顯著；而在 oLH 或 cAMP 合併處理時，則僅發現 CaFA 可抑制粒性細胞之 P₄ 分泌，其原因有待進一步探討。

前述結果乃得自餵飼一般日糧之雞隻所得，另外，本研究正進行餵飼不同含量葉酸之試驗，未來將由取自不同處理組之雞隻所獲得之濾泡，再進行體外培養試驗，以比較葉酸對粒性細胞之基礎或受 LH/cAMP 刺激之 P₄ 分泌，有否不同。