

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

菜鴨卵巢濾泡細胞生長及類固醇生成調控機制之研究(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-390-

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：費軫尹、陶若蘭

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 5 月 19 日

中文摘要

本研究第一年擬利用菜鴨 (Tsaiya duck; *Anas platyrhynchos var. domestica*) 卵巢濾泡細胞，建立卵巢濾泡三細胞分離技術，並利用體外培養卵巢濾泡三細胞，以瞭解其孕酮、睪固酮與雌二醇等類固醇，以及類固醇合成酵素 3 β -HSD、17 β -HSD 與 P450aromatase 活性，以瞭解菜鴨卵巢濾泡細胞類固醇內分泌之分泌模式。

結果顯示，菜鴨卵巢濾泡中之粒性細胞以合成孕酮為主，睪固酮次之，其基礎分泌量及 3 β -HSD 與 17 β -HSD 酵素活性，以即將排卵的 F1 最高，漸次下降至成熟度最低的 F4/5。雌二醇分泌量極低，且濾泡大小間無顯著差異。內膜細胞主要合成睪固酮及雌二醇，其基礎分泌量及 17 β -HSD 與 P450aromatase 酵素活性，皆以最小濾泡 F4/5 為最高，並隨著濾泡的逐漸成熟而下降。內膜細胞並無孕酮分泌能力。濾泡中之外膜細胞以合成雌二醇為主，其基礎分泌量及 P450aromatase 酵素活性以 F2 為最高；而外膜細胞幾乎無孕酮及睪固酮分泌能力。

本研究證實菜鴨卵巢濾泡之粒性、內膜及外膜細胞於體外各別培養時，其類固醇內分泌有所差異；而濾泡各種細胞間之交互作用，與類固醇內分泌生成途徑之關聯性，仍有待進一步研究。

關鍵詞：菜鴨、卵巢濾泡、類固醇內分泌。

英文摘要

The purpose of this study in first year was to establish the isolation technique of ovarian follicular granulosa, theca interna and theca externa cells in Tsaiya duck (*Anas platyrhynchos var. domestica*). Furthermore, in order to establish steroid hormone secretion model of ovarian follicular cells in Tsaiya duck, progesterone, testosterone and estradiol secretion as well as steroid-producing enzyme activities of 3 β -HSD, 17 β -HSD and P450arom in follicular cells were studied by *in vitro* cell culture system.

Results showed that progesterone was the primary steroid produced by granulosa cell, and testosterone was the secondary one. The progesterone level and enzyme activities of 3 β -HSD and 17 β -HSD of granulosa cell increased gradually with the follicle maturity. The estradiol secretion from granulosa cell was low, and was not significantly different between follicles. Steroid production capabilities of theca interna cell presented in testosterone and estradiol. The F4/5 follicles exhibited the highest basal testosterone and estradiol secretion as well as enzyme activities of 17 β -HSD and P450arom from theca interna cell. Both of them were declined with the follicle maturity. Besides, theca interna did not secrete progesterone. Estradiol was the main steroid secreted by theca externa. Theca externa of F2 presented the highest estradiol secretion and P450arom activity. Moreover, theca externa did not secrete progesterone and testosterone.

This study demonstrated the different abilities of steroid secretion among ovarian follicular granulosa, theca interna and theca externa cells in Tsaiya duck by individual *in vitro* culture system. However, the relationship between cellular interaction and steroidogenesis pathway is required further study.

Keywords: Tsaiya duck, ovarian follicle, steroid hormone.

前言

家禽之排卵主受排卵素 (luteinizing hormone, LH) 所調控, LH 亦可影響其濾泡細胞類固醇內泌素之合成。家禽濾泡中之粒性細胞 (granulosa cell) 所分泌之孕酮 (progesterone, P₄), 提供給內膜細胞 (theca interna cell) 做為合成睪固酮 (testosterone, T) 之原料, 而睪固酮又可提供外膜細胞 (theca externa cell) 合成雌二醇 (estradiol, E₂), 此為家禽之三細胞理論 (three-cell model) (Porter *et al.*, 1989)。此外, 膜性細胞亦具有自行合成類固醇內泌素的能力, 根據 Nitta *et al.* (1991) 所發表的多細胞理論, 內膜細胞中之間質細胞 (interstitial cell) 具有 P450_{scc} (cytochrome P450 side-chain cleavage) 及 P450_{17 α} (P450 17 α -hydroxylase) 可自行利用膽固醇合成孕酮, 並進一步將孕酮轉變為睪固酮; 而外膜細胞中之成纖維母細胞 (fibroblast), 可將內膜細胞所提供之孕酮轉變為睪固酮。此外, 外膜細胞另有一些可分泌 P450_{aromatase} (P450_{arom}) 的細胞, 能夠利用源自於成纖維母細胞或內膜之間質細胞所合成的睪固酮, 來合成雌二醇。

排卵前濾泡之類固醇合成能力, 會因細胞種類及濾泡成熟度而異。簡言之, 粒性細胞所分泌之孕酮, 以最大濾泡之分泌量最高, 並會因濾泡直徑變小而漸次下降; 內膜細胞主要合成之睪固酮, 且其分泌量以中間體積之濾泡最高; 外膜細胞所合成之雌二醇, 則會隨濾泡的逐漸成熟而下降 (Bahr *et al.*, 1983)。在家禽中, 以雞方面之研究最為透徹, 而鴨方面則尚未明瞭。

菜鴨 (Tsaiya duck; *Anas platyrhynchos var. domestica*) 為本省深具經濟價值的蛋鴨品種, 其產蛋效率優良。本研究第一年擬利用菜鴨卵巢濾泡中之粒性細胞、內膜細胞及外膜細胞進行體外培養, 分析細胞培養液中之孕酮、睪固酮及雌二醇含量及類固醇生成酵素活性, 包括 3 β -HSD (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase)、17 β -HSD (17 β -hydroxysteroid dehydrogenase) 及 P450_{arom}, 以探究菜鴨卵巢濾泡細胞類固醇內泌素之分泌模式。

材料與方法

本研究利用體外培養系統, 進行菜鴨卵巢濾泡三細胞之類固醇內泌素分泌, 及其合成酵素活性之分析。類固醇內泌素包括孕酮、睪固酮及雌二醇, 酵素活性則為合成孕酮、睪固酮及雌二醇所需之 3 β -HSD、17 β -HSD 及 P450_{arom}。

一、試驗動物

使用平均 30-50 週齡之褐色產蛋菜鴨 (Tsaiya duck; *Anas platyrhynchos var. domestica*) 共計 30 隻。利用頸椎脫臼法將鴨隻犧牲、剖腹, 自卵巢取出 F1 到 F5 濾泡。

二、濾泡細胞之分離與解離

菜鴨濾泡三細胞之分離乃參考 Porter *et al.* (1989) 及 Nitta *et al.* (1991) 方法, 略加修正而成。

(一) 粒性細胞之解離

收集所有粒性細胞層後, 每濾泡加入 2 ml 解離液 (以 M199 為主之細胞培養液, 含 0.2% collagenase, Worthington CLS 1), 於 37°C 攪拌解離 30 分鐘, 並隨時以塑膠吸管重覆吸放, 以協助打散細胞。解離後, 室溫下離心 (1000 \times g) 10 分鐘, 以 10 ml 不含 collagenase 之細胞培養液清洗及離心兩次。

(二) 內膜細胞之解離

將刮下之內膜細胞放回細胞解離液中 10 分鐘, 以幫助細胞散開, 同時以吸管間歇吸放, 做為機械式之瓦解。將解離後之細胞於室溫下離心 10 分鐘, 以 10

ml 不含 collagenase 之細胞培養液清洗及離心兩次。

(三) 外膜細胞之解離

將刮下內膜細胞後剩下之細胞層，細切為約 2 mm × 2 mm 之碎片，加入 20 ml 細胞解離液，於 37°C 下攪拌解離 30 分鐘，同時以吸管間歇吸放，做為機械式之瓦解。將解離後之細胞於室溫下離心 10 分鐘，以 10 ml 不含 collagenase 之細胞培養液清洗及離心兩次。

三、濾泡細胞之體外培養

將已清洗並離心兩次之濾泡細胞，以 10 ml 細胞培養液重新懸浮。取混合均勻的細胞懸浮液與 0.4% 錐藍 (trypan blue) 染劑，以 1:1 混合均勻，利用血球計數板 (hemacytometer)，於光學顯微鏡下觀察細胞存活率，並計算細胞總數，將細胞懸浮液以培養液稀釋為 10^5 cells/ml M199。

利用單離後之新鮮濾泡細胞進行細胞培養及刺激試驗。首先將細胞數調整為 10^5 cells/ml M199，使用 24 槽培養盤 (Costar 3524)，每槽注入 1 ml 之細胞懸浮液 (10^5 cells/well)。在 37°C，含 5% CO₂ 及 95% 空氣，95% 相對濕度之培養箱中進行培養。每處理各三重覆 (薄層分析法之細胞培養為六重覆)，分別添加不同劑量之 oLH，培養至 24 小時。培養過程中，於 0、2、4、8 及 24 小時收集部分細胞培養液，於 -20°C 冷凍保存，以備分析其中孕酮、睪固酮及雌二醇含量及其合成酵素之活性。

四、類固醇內分泌素之分析

孕酮之酵素免疫分析應用吳等(1989)之方法，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。

睪固酮之酵素免疫分析採用陳等(1997)之方法，其分析內與分析間變異係數分別為 9.91% 及 14.32%，靈敏度為 15.6 pg/ml。

雌二醇之放射免疫分析應用劉等(1985)之方法，其靈敏度 (sensitivity) 為 3.01 pg/ml，分析內與分析間變異係數分別為 12.62% 及 15.93%，回收率為 74.59%。

五、類固醇生成酵素之內分泌素之薄層分析 (thin-layer chromatography, TLC)

本方法為參考 Bolmquist *et al.* (1991) 加以修改後，進行 3 β -HSD、17 β -HSD 及 P450_{arom} 酵素活性之分析。

六、統計分析

細胞培養每次試驗之處理組均為三重覆，薄層分析法之細胞培養之處理組則為六重覆，且相同之試驗皆重覆三至五次，以增加分析之可信度。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

一、卵巢濾泡細胞之孕酮分泌

由濾泡細胞體外培養的結果中發現，經過校正 (各培養時間所收集之細胞培養液，於測定孕酮後，扣除 0 小時之基礎分泌量而得) 後之粒性細胞於體外培養 8 小時後，孕酮之基礎分泌量，已有顯著上升 ($P < 0.05$)，而在培養 24 小時後，粒性細胞所分泌之孕酮，則有極顯著之增加 ($P < 0.01$)，且以 F1 的表現最佳。同時，濾泡成熟度不同之粒性細胞所分泌的孕酮量，有顯著的差異性存在

($P < 0.01$)，濾泡成熟度愈高，其孕酮分泌能力愈強。然而，濾泡細胞中之內膜及外膜細胞之孕酮分泌基礎量，於體外培養至 24 小時的過程中，其分泌量皆無顯著差異，且膜性細胞所累積之孕酮量，於培養 24 小時後，仍小於 1 ng/ml，遠低於粒性細胞，其差異可達十至數十倍。由此可知，菜鴨卵巢濾泡細胞所分泌之孕酮，主要來自於粒性細胞，且以 F1 為多。

將粒性細胞分別與不同劑量之 oLH 共同培養，發現粒性細胞之孕酮分泌量於 oLH 100 ng/ml 時，F1 ($P < 0.01$) 到 F4/5 ($P < 0.05$) 明顯較基礎分泌量高，而 F1 之孕酮分泌，於 1 ng/ml 時已有明顯較高量之反應 ($P < 0.05$)，顯示出成熟度最高之 F1 粒性細胞，對 oLH 之刺激反應性最佳。本結果與前人在蛋雞之研究結果相同，顯示粒性細胞分泌孕酮之能力，為經由 LH 活化細胞膜上之腺環 (adenylyl cyclase)，使細胞內環腺單磷酸 (adenosine 3', 5'-mono-phosphate; cAMP) 刺激孕酮的合成 (Imai and Nalbandov, 1978; Hammond *et al.*, 1980, 1981; Gilbert *et al.*, 1980)。此外，排卵前濾泡粒性細胞之 cAMP 含量愈高，所合成及分泌之孕酮量亦愈多。然而，相同之藥物添加於內膜及外膜細胞共同培養，其孕酮分泌量卻無法被刺激，顯示排卵前濾泡之膜性細胞並無孕酮分泌能力 (Calvo and Bahr., 1981)。

二、卵巢濾泡細胞之睪固酮分泌

在睪固酮分泌方面，粒性細胞於體外培養 24 小時後，各濾泡睪固酮之基礎分泌量，已顯著增加 ($P < 0.01$)，但仍低於 250 pg/ml。濾泡細胞中之內膜細胞於體外培養 24 小時，其睪固酮分泌之累積量極為顯著 ($P < 0.01$)，尤以 F4/5 之累積分泌量可高達 3 ng/ml。而外膜細胞不論來自 F2、F3 或 F4/5，其睪固酮分泌基礎量，於體外培養 24 小時，累積量雖有顯著之增加 ($P < 0.05$)，但其分泌量相當低 (< 70 pg/ml)。因此，三種細胞間以內膜細胞所分泌之睪固酮量，遠較粒性細胞及外膜細胞高 ($P < 0.01$)。由此可知，菜鴨卵巢濾泡細胞所分泌之睪固酮，主要來自於內膜細胞。

將粒性細胞分別以不同劑量之 oLH 共同培養，發現 F1 及 F2 粒性細胞之睪固酮分泌量於 oLH 5 ng/ml 時，即與基礎量有顯著差異 ($P < 0.05$)，而 F3 及 F4/5 之睪固酮分泌，則需於 10 ng/ml 時，才有高量之反應 ($P < 0.05$)，顯示出成熟度較高之 F1 及 F2 粒性細胞，對 oLH 刺激睪固酮分泌之反應性最佳。

內膜細胞與不同劑量之 oLH 共同培養，發現 F4/5 之睪固酮分泌量於 oLH 1 ng/ml 時，即與基礎量有顯著差異 ($P < 0.01$)，而其餘濾泡 F3、F2 及 F1 之睪固酮分泌，則於 5 ng/ml 時，才有較高量之反應 ($P < 0.05$)，顯示較小濾泡之內膜細胞，對於 oLH 刺激睪固酮分泌之反應性較佳。

外膜細胞與不同劑量之 oLH 共同培養，發現濾泡外膜細胞睪固酮分泌之刺激反應不明顯，其分泌量無顯著增加，且以中間大小之 F2 及 F3 之睪固酮分泌顯著高於 F1 及 F4/5 ($P < 0.05$)。

此結果顯示，濾泡細胞之睪固酮分泌應以內膜細胞為主，且其分泌能力以成熟度最低之 F4/5 為最佳，隨著濾泡逐漸發育成熟，其分泌睪固酮的能力亦隨之下降。粒性細胞之睪固酮分泌為濾泡三細胞之次多，且其分泌能力隨著濾泡逐漸發育成熟而增加。此外，外膜細胞具有睪固酮分泌能力，其差異雖有統計上之意義，然其受 oLH 刺激之增加量有限，且與內膜細胞之睪固酮分泌量可達百倍以上之差異，因此推測，外膜細胞所分泌之睪固酮可能並不具有生理上的實質功效，而是由內膜細胞所負責。

三、卵巢濾泡細胞之雌二醇分泌

粒性細胞於體外培養 24 小時後，F2、F3 及 F4/5 濾泡雌二醇之基礎分泌量，雖有顯著增加 ($P < 0.05$)，但其濃度低於 10 pg/ml；內膜細胞於體外培養 4 小時後，各濾泡雌二醇之基礎分泌量均有顯著增加，其量低於 40 pg/ml。而外膜細胞於體外培養 24 小時後，各濾泡雌二醇之基礎分泌量，有顯著增加 ($P < 0.05$)，但亦不高於 20 pg/ml。顯見菜鴨卵巢之三濾泡細胞，分泌雌二醇之基礎能力並不強。濾泡細胞中之內膜細胞以最不成熟之 F4/5 之雌二醇分泌量最高，且隨著濾泡的發育成熟，其分泌量會隨之下降 ($P < 0.01$)。外膜細胞雌二醇分泌基礎量，以 F2 為最高。然粒性細胞及外膜細胞之雌二醇基礎分泌略低於內膜細胞，與培養 24 小時之 F4/5 內膜細胞約有 2 ~ 4 倍之差距 ($P < 0.01$)。由此推測，菜鴨卵巢濾泡細胞所分泌之雌二醇，主要應來自於內膜細胞。

將粒性細胞分別與不同劑量之 oLH 共同培養，發現 F1 及 F3 粒性細胞之雌二醇分泌量於 oLH 5 ng/ml 時，即與基礎量有顯著差異 ($P < 0.05$)，而 F2 及 F4/5 之雌二醇分泌，則需於 10 ng/ml 時，才有較高量之反應 ($P < 0.05$)，顯示 F1 及 F3 粒性細胞，對 oLH 刺激雌二醇分泌之反應性較佳。

內膜細胞與不同劑量之 oLH 共同培養，F2、F3 及以 F4/5 之雌二醇分泌量於 oLH 1 ng/ml 時，即顯著較基礎量增加 ($P < 0.05$)，而 F1 之雌二醇分泌，則需於 oLH 100 ng/ml 時，才有較高量之反應 ($P < 0.05$)，顯示濾泡之成熟度與分泌雌二醇的能力及對 LH 的反應性有關，濾泡之成熟度愈高，內膜細胞所分泌之雌二醇量愈低 ($P < 0.05$)，對 LH 的反應性也愈差。

外膜細胞與不同劑量之 oLH 共同培養，發現濾泡外膜細胞雌二醇分泌，於 oLH 5 ng/ml 時，顯著高於基礎雌二醇分泌量 ($P < 0.05$)。此外，外膜細胞以較小之 F2、F3 及 F4/5 所分泌之雌二醇為高於最大的 F1 濾泡 ($P < 0.01$)。

火雞濾泡中之雌二醇分泌以外膜細胞之 F5 為主，以 oLH 100 ng/ml 刺激時，其體外培養 5 小時之分泌量約為 15 pg/ 10^5 cells/ml，內膜細胞則無雌二醇分泌 (Porter *et al.*, 1989)。來亨雞 F4 外膜及內膜細胞之雌二醇分泌量相當，且顯著高於其他較大之濾泡，其分泌量隨著濾泡逐漸成熟而下降，粒性細胞則於 LH 潮湧時有極少量之雌二醇分泌 (Kato *et al.*, 1995)。本試驗結果顯示，菜鴨濾泡細胞之雌二醇分泌以內膜細胞為主，其雌二醇之基礎及刺激分泌能力皆以成熟度最低之 F4/5 為最高，隨著濾泡逐漸發育成熟，其分泌雌二醇的能力亦隨之下降。本研究中菜鴨之粒性細胞及外膜細胞雖然具有雌二醇分泌能力，然而其分泌能力不論為基礎或為刺激之分泌量，皆遠不如內膜細胞，且與內膜細胞之雌二醇分泌量差異可高達百倍以上，因此推測，內膜細胞應為濾泡細胞中主要分泌雌二醇之細胞。

根據 Kato *et al.* (1995) 之結果，所得到之類固醇內分泌素濃度，為三細胞分離技術建立後，唯一針對三種細胞及不同濾泡成熟度之三種類固醇內分泌素比較之文獻。其分析中所使用之單位為每 mg 蛋白質之類固醇內分泌素含量，而本研究所使用之單位為 10^5 細胞之類固醇內分泌素分泌量，倘若內膜及外膜細胞中之蛋白質含量不同，當蛋白質含量均一時，其細胞數量必然會有高低之差異，此可能為本研究的外膜細胞所分泌之雌二醇與蛋雞含量有所差異之原因。

四、卵巢濾泡細胞之類固醇生成酵素活性

(一) 3β -HSD 酵素活性

3 β -HSD 酵素活性之測定，為間接測定由 ³H-P₅ 轉變為 ³H-P₄ 所得之結果。由濾泡細胞體外培養 3 β -HSD 酵素之基礎活性的結果中發現，粒性細胞及內膜細胞於體外培養 24 小時後，各濾泡 3 β -HSD 之酵素活性，已顯著增加 (P<0.01)。而外膜細胞，在培養過程中，3 β -HSD 酵素活性皆無明顯之變化。濾泡細胞中之粒性細胞及內膜細胞，以最不成熟濾泡 F4/5 之 3 β -HSD 酵素活性最低，且隨著濾泡的發育成熟，其酵素活性會隨之增加 (P<0.01)。而外膜細胞，在培養過程中之 3 β -HSD 酵素活性於各濾泡皆極低，因此推測外膜細胞應不具有 3 β -HSD 酵素。由此可知，菜鴨卵巢濾泡細胞之 3 β -HSD 酵素活性，以粒性細胞為主，內膜細胞次之，而外膜細胞則無 3 β -HSD 酵素活性。

將濾泡細胞分別與不同劑量之 oLH 共同培養，發現粒性細胞之 3 β -HSD 酵素活性經 oLH 刺激後，於 10 ng/ml 時，即與基礎量有顯著差異 (P<0.05)，其反應為基礎活性的 3 ~ 5 倍，比內膜或外膜細胞皆高 (P<0.01)。此外，粒性細胞及內膜細胞之 3 β -HSD 酵素活性受 oLH 刺激之反應性會隨濾泡逐漸發育成熟而增加 (P<0.01)。而外膜細胞之 3 β -HSD 酵素活性，則變化較小。

本研究利用菜鴨卵巢濾泡粒性細胞所得之孕酮分泌量及 3 β -HSD 酵素活性，與前人針對來亨雞所得之結果相似 (Armstrong, 1982; Bahr *et al.*, 1983; Nitta *et al.*, 1991)。粒性細胞所分泌孕酮量之多寡，與 3 β -HSD 酵素活性大小有關。本研究發現，粒性細胞所分泌之孕酮基礎或 oLH 刺激量，隨濾泡的成熟度而增加，其 3 β -HSD 酵素活性亦呈相同之趨勢，顯示濾泡成熟度不同之粒性細胞，所具有之 3 β -HSD 酵素決定了細胞之孕酮分泌量。

此外，內膜及外膜細胞並不具有孕酮分泌能力，然內膜細胞之 3 β -HSD 酵素活性，在細胞體外培養的過程中卻具有相當的活性且可被 LH 誘發，顯示孕酮並非其最終產物，由於內膜細胞所分泌之類固醇內泌素是以孕酮及雌二醇為主，本研究在進行體外培養時，並未添加孕酮提供給內膜細胞作為合成孕酮之基質，因此內膜細胞需利用細胞培養液可能含有的脂溶性成分，或其細胞內貯存之膽固醇來合成孕酮，在此過程中導致了 3 β -HSD 酵素活性的誘發，所合成之孕酮，隨即在細胞內轉化為孕酮，使其孕酮分泌能力無法表現。而外膜細胞含有極低的 3 β -HSD 酵素活性，則解釋了幾無孕酮分泌的原因。

(二) 17 β -HSD 酵素活性

17 β -HSD 酵素活性之測定，為間接測定由 ³H-P₅ 轉變為 ³H-T 所得之結果。在 17 β -HSD 酵素活性方面，粒性細胞於體外培養 24 小時後，F1 及 F2 濾泡之 17 β -HSD 基礎酵素活性顯著增高 (P<0.05)，且以最成熟濾泡 F1 之 17 β -HSD 酵素活性最高 (P<0.01)。內膜細胞之較小濾泡 F3 及 F4/5 則於培養後 4 小時，即有顯著之增加 (P<0.05)，其 17 β -HSD 酵素活性則以 F4/5 為最高 (P<0.01)，且隨著濾泡的發育成熟，其酵素活性會隨之下降 (P<0.05)。而外膜細胞，在培養過程中，皆無明顯之變化。由此可知，菜鴨卵巢濾泡細胞之 17 β -HSD 酵素活性，以內膜細胞為主，粒性細胞次之，而外膜細胞則幾乎無 17 β -HSD 酵素活性。

將濾泡細胞分別與不同劑量之 oLH 共同培養，發現粒性細胞之 17 β -HSD 酵素活性經 oLH 刺激後，較成熟之 F1、F2 及 F3 於 10 ng/ml，與基礎量有顯著差異 (P<0.01)，而 F4/5 對 oLH 之刺激反應不明顯。不同濾泡內膜細胞之 17 β -HSD 酵素活性於 oLH 100 ng/ml 刺激後，與各別濾泡之基礎量有顯著差異 (P<0.05)，且其酵素活性以最不成熟的 F4/5 最高 (P<0.05)，並隨濾泡之成熟度而下降。外膜細胞之 17 β -HSD 酵素活性經 oLH 刺激後，除 F2 於 oLH 100 ng/ml 時，有

顯著增加外，其餘濾泡對 oLH 之刺激反應皆不明顯。

由 Robinson and Etches (1986) 在來亨雞之研究得知，體外培養 F1 ~ F5 濾泡之膜性細胞，並給與 LH 之刺激，其脫氫上雄烯酮 (dehydroepiandrosterone; DHEA) 或雄固烯二酮之分泌量以中間體積之排卵前濾泡 F2、F3 及 F4 最高，而成熟度最高的 F1 或最小的 F5，則無法分泌脫氫上雄烯酮或雄固烯二酮；然而，LH 與孕酮共同添加於培養液時，F5 分泌脫氫上雄烯酮或雄固烯二酮的能力與單獨添加物 LH 相同。LH 與孕酮或脫氫上雄烯酮共同添加於培養液時，F5 則可分泌雄固烯二酮，顯示膜性細胞具有 17 α -hydroxylase。

17 α -hydroxylase 作用於孕酮，合成雄固烯二酮，再由 17 β -HSD 作用而得孕固酮，因此 17 β -HSD 酵素活性可作為細胞合成孕固酮能力之指標。本研究利用菜鴨卵巢濾泡內膜及外膜細胞所得之 17 β -HSD 酵素活性，與 Kato *et al.* (1995) 針對來亨雞所得之 17 α -hydroxylase 基因表現結果相符。此外，菜鴨卵巢濾泡之粒性細胞也具有孕固酮分泌能力，與前人之研究結果相同 (Kato *et al.*, 1995)。細胞所分泌孕固酮量之多寡，與 17 β -HSD 酵素活性高低有關。本研究發現，內膜細胞為分泌孕固酮之主要細胞，孕固酮分泌能力及對 LH 刺激之反應性，隨濾泡的成熟度而下降，而其 17 β -HSD 酵素活性亦呈相同之趨勢，顯示濾泡成熟度不同之內膜細胞，所具有之 17 β -HSD 酵素，決定了細胞之孕固酮分泌量。

(三) P450arom 酵素活性

P450arom 酵素活性之測定，為間接測定由 $^3\text{H-P}_5$ 轉變為 $^3\text{H-E}_2$ 所得之結果。在 P450arom 酵素活性部分，粒性細胞、內膜細胞及外膜細胞於體外培養 24 小時後，各濾泡 P450arom 酵素活性均有顯著升高 ($P < 0.05$)。粒性細胞 P450arom 酵素活性以較成熟之 F1、F2 及 F3 較高。內膜細胞之最小濾泡 F4/5 則具有最大之 P450arom 酵素活性 ($P < 0.01$)，且隨著濾泡的發育成熟，其酵素活性會隨之下降。外膜細胞則是以較小濾泡 F2、F3、F4/5 之 P450arom 酵素活性較高。此外，內膜細胞之 P450arom 酵素活性為三種濾泡細胞中之最高者 ($P < 0.01$)。由此可知，菜鴨卵巢濾泡細胞之 P450arom 基礎酵素活性，以內膜細胞為主。

將濾泡細胞分別與不同劑量之 oLH 共同培養，發現粒性細胞之 P450arom 酵素活性經 oLH 100 ng/ml 刺激後，與基礎量有顯著差異 ($P < 0.05$)。內膜細胞之 P450arom 酵素活性經 oLH 刺激後，其反應於 oLH 100 ng/ml 時，與各別濾泡之基礎量有顯著差異 ($P < 0.01$)，且其酵素活性以最不成熟的 F4/5 最高，並隨濾泡之成熟度而下降。外膜細胞之 P450arom 酵素活性經 oLH 刺激後，其反應於 oLH 10 ng/ml，顯著高於各別濾泡之基礎量 ($P < 0.05$)，且以 F2 之刺激反應最顯著。

孕固酮經由 P450arom 之作用而生成雌二醇，因此 P450arom 酵素活性可作為細胞合成雌二醇能力之指標。本研究利用菜鴨卵巢濾泡所得之 P450arom 酵素活性，與前人之結果不盡相同。在火雞 (Porter *et al.*, 1989) 與來亨雞 (Nitta *et al.*, 1991) 之研究顯示，外膜細胞為雌二醇之主要分泌細胞，其分泌與 P450arom 活性隨濾泡成熟而下降。本研究之結果卻顯示雌二醇之分泌及 P450arom 酵素活性反應皆以內膜細胞為主，並會隨濾泡逐漸成熟，其分泌量及酵素活性亦隨之下降；外膜細胞雖有雌二醇之分泌及 P450arom 酵素活性反應，然而其表現量低於內膜細胞。顯示菜鴨濾泡細胞之功能與其他禽類不同。本研究結果似乎顯示，濾泡外膜細胞本身並不具有生成及分泌主要類固醇內泌素之功能，然其角色仍有待進一步之研究。

結 論

由本研究體外培養的結果得知，菜鴨卵巢濾泡細胞在三種性類固醇之分泌中扮演之角色不同：孕酮之分泌以粒性細胞為主，且其分泌量隨濾泡逐漸發育成熟而漸增；內膜細胞以分泌孕酮為主，其分泌量則隨濾泡逐漸發育成熟而漸次下降；而雌二醇之主要分泌細胞亦為內膜細胞，其分泌趨勢與孕酮相同。

菜鴨卵巢濾泡細胞中具有不同之類固醇合成酵素，導致粒性、內膜及外膜細胞之孕酮、孕酮及雌二醇分泌能力有所差異。3 β -HSD 活性之表現，以粒性細胞為主，而 17 β -HSD 及 P450arom 活性之表現，則以內膜細胞為主。外膜細胞於體外培養時之三種類固醇分泌能力或酵素活性皆不如粒性細胞與內膜細胞，但具有少許之 17 β -HSD 及 P450arom 活性表現，因此推測，外膜細胞可能扮演輔助分泌之角色。此外，外膜細胞於體內，可能接受來自內膜細胞之孕酮而合成雌二醇。

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。
- 陳玉燕、吳兩新與趙明杰。1997。孕酮酵素免疫分析法之建立與應用。動物園學報 9:1-13。
- 費軫尹、邱智賢、陳家真、吳兩新、郭應誠。2001。抗牛、豬與山羊之 3 β -羥基類固醇去氫多株抗體的製備。中國畜牧學會會誌 30:198。
- 廖崇賢、邱智賢、費軫尹、郭應誠、吳兩新。2002。類固醇生成急性調控蛋白抗血清的製備。中國畜牧學會會誌 31(4):220。
- 劉世華、洪金俊、林仁壽與陳榮華。1985。母豬血清雌素二醇放射免疫分析法之建立。中畜會誌 14(4):236。
- Armstrong, D. G. 1982. 3 β -hydroxy- Δ^5 -steroid dehydrogenase activity in the rapidly growing ovarian follicles of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). J. Endocrinol. 93:415-421.
- Bahr, J. M., S. C. Wang, M. Y. Huang and F. O. Calvo. 1983. Steroid concentrations in isolated theca and granulosa layers of pre-ovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen. Biol. Reprod. 29:326-334.
- Bolmquist, C. H., and E. Y. Hakanson. 1991. Regulation of human placental 17 β -hydroxysteroid oxidoreductase: mechanism of stimulation of 17 β -estradiol formation from estrogen by 5 α -dihydrotestosterone in homogenates and villi in vitro. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 39:735-740.
- Calvo, F. O., S. C. Wang and J. M. Bahr. 1981. LH stimable adenyl cyclase activity during the ovulatory cycle in the three largest follicles and the post-ovulatory follicle of the domestic hen. Biol. Reprod. 25:805-812.
- Gilbert, A. B., M. A. Hardie, M. M. Perry, H. R. Dick, and J. W. Wells. 1980. Cellular changes in the granulosa layer of the maturing ovarian follicle of the domestic fowl. Br. Poult. Sci. 21:257-263.
- Hammond, R. W., D. M. Olson, R. B. Frenkel, H. V. Biellier, and F. Hertelendy. 1980. Prostaglandins and steroid hormones in plasma and ovarian follicles during the ovulation cycle of the domestic hen (*Gallus domesticus*). Gen. Comp. Endocrinol. 42:195-202.
- Hammond, R. W., W. H. Burke and F. Hertelendy. 1981. Influence of follicular maturation on progesterone release in chicken granulosa cells in response to

- turkey and ovine gonadotropins. Biol. Reprod. 24 : 1048-1055.
- Imai, K., and A. V. Nalbandov. 1978. Plasma and follicular steroid levels of laying hens after the administration of gonadotropins. Biol. Reprod. 19 : 779-784.
- Kato, M., K. Shimada, N. Saito, K. Noda and M. Ohta. 1995. Expression of P450_{17 α -hydroxylase} and P450_{aromatase} genes in isolated granulosa, theca interna and theca extena layers of chicken ovarian follicles during follicular growth. Biol. Reprod. 52 : 405-410.
- Nitta, H., Y. Osawa and J. M. Bahr. 1991. Multiple steroid cell populations in the theca layer of preovulatory follicles of the chicken ovary. Endocrinology 129 (4) : 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.
- Robinson, F. E. and R. J. Etches. 1986. Ovarian steroidogenesis during follicular maturation in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). Biol. Reprod. 35 : 1096-1105.

計畫成果自評

本研究之結果已證實各別培養菜鴨卵巢濾泡之粒性、內膜及外膜細胞時，其類固醇內分泌素分泌情形之差異，而濾泡細胞間之交互作用，與類固醇內分泌素生成途徑之關聯性，仍有待進一步研究證實。

在類固醇酵素活性之測定方面，本研究係以添加定量放射性之 P₅ (³H-P₅) 於細胞培養液中，藉由測定欲觀察之酵素，利用 ³H-P₅ 所合成產物之放射量，評估該酵素之相對活性，本方法係為一間接測定法。另外，本計畫利用重組蛋白及合成 peptide，已成功製備了 P450_{scc}-3 β -HSD 與 StAR protein 之抗體(費等 2001; 廖等 2002)，若再完成 P450_{arom} 抗體之部分，未來對於解釋菜鴨卵巢類固醇酵素之表現，將有所助益。