

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 菜鴨卵巢濾泡細胞生長及類固醇生成調控機制之研究(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2313-B-002-131-

執行期間：92年08月01日至93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：郭文旺 費軫尹 陶若蘭

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 2 日

## 中文摘要

本研究首先製備類固醇合成酵素 P450scc、 $3\beta$ -HSD 與 P450aromatase 三種抗體，並利用菜鴨 (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，採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  $3\beta$ -HSD、 $17\beta$ -HSD 與 P450aromatase 酵素活性，以瞭解菜鴨卵巢濾泡細胞類固醇內分泌素之分泌模式。並進一步瞭解生長因子對類固醇分泌的影響。

結果如下：

一、P450scc、 $3\beta$ -HSD 與 P450aromatase 三種抗體可應用於西方墨染法，以供辨識牛、豬、羊、鴨等之類固醇內分泌素生成組織。

二、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  $3\beta$ -HSD 與  $17\beta$ -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  $17\beta$ -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。

三、EGF 及 IGF-1 會刺激粒性細胞分泌孕酮；TGF- $\beta$  會抑制之；而 FGF 則沒有影響。

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，其類固醇內分泌素分泌有所差異；而濾泡各種細胞間之交互作用，仍積極進行中。

關鍵詞：菜鴨、卵巢濾泡、類固醇內分泌素。

## 英文摘要

The purpose of this study was to prepare the steroidogenic enzymes-- P450scc,  $3\beta$ -HSD, and P450arom, and also to establish the isolation techniques 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 expression of  $3\beta$ -HSD,  $17\beta$ -HSD and P450arom in follicular cells were studied by *in vitro* cell culture system. Finally, the effect of growth factors on steroids production also will be examined.

Results showed as follow:

1. The polyclonal antibodies of P450scc,  $3\beta$ -HSD and P450aromatase obtained can recognize the steroid-producing tissues of cattle, pig, goat and duck by using Western blotting.

2. The progesterone was the main steroid produced by granulosa cell, and testosterone was the second one. The progesterone level and enzyme activities of  $3\beta$ -HSD and  $17\beta$ -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. The main steroids produce from theca interna cell was testosterone and estradiol. The F4/5 follicles exhibited the highest basal testosterone and estradiol secretion as well as enzyme activities of  $17\beta$ -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.

3. The EGF and IGF-1 could stimulate the progesterone production from granulosa cells *in vitro*, and TGF- $\beta$  did not. The FGF has no any effect in this part.

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 interactions between different layers are 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分泌素之合成。家禽濾泡中之粒性細胞 (granulosa cell) 所分泌之孕酮 (progesterone, P<sub>4</sub>), 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, E<sub>2</sub>), 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分泌素的能力, 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 P450scc (cytochrome P450 side-chain cleavage) 及 P450<sub>17 $\alpha$</sub>  (P450 17 $\alpha$ -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 P450aromatase (P450arom) 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 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase)、17 $\beta$ -HSD (17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase) 及 P450arom, 以探究菜鴨卵巢濾泡細胞類固醇內分泌素之分泌模式。並探討生長因子對類固醇分泌的可能影響。

## 材料與方法

本研究共分為三部分, 分述如下:

### 試驗一: 抗體之製備

首先以牛之 P450scc 及 3 $\beta$ -HSD 基因序列設計一對引子對, 利用牛黃體細胞為材料萃取其 mRNA, 經反轉錄合成 cDNA 以進行聚合酶鏈鎖反應, 將擴增之產物與蛋白質表現載體 pET29a 進行接合, 並轉形至大腸桿菌 (*E. coli*) 複製質體。表現載體經限制酶截切及核酸定序後確認胺基酸讀碼。再將此質體轉形至勝任細胞 BL21(DE3), 以誘導重組蛋白質的大量表現。經分離及純化即獲得抗原。

選擇約 2 公斤的紐西蘭大白兔，將背上的毛剃光，第一週以弗氏完全佐劑 (Freund's complete adjuvant) 與抗原分別取 1 ml 以 1:1 之比例混合均勻，用 2.5 ml 的針筒於背上以皮內注射法 (intradermal injection) 免疫；注射免疫原時，沿著脊椎兩側施打，一次約施打 10 個注射點。約在兩週後進行第二次免疫，以弗氏不完全佐劑與抗原混合均勻施打，約免疫四次後，即開始採血，並追蹤其血清之抗體力價。

## 試驗二：菜鴨卵巢濾泡三細胞模式之探討

本試驗利用體外培養系統，進行菜鴨卵巢濾泡三細胞之類固醇內分泌，及其合成酵素活性之分析。類固醇內分泌包括孕酮、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 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD 及 P450arom。

### 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  $\times$  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<sup>5</sup> 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<sup>5</sup> 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<sup>5</sup> cells/well)。在 37°C，含 5% CO<sub>2</sub> 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 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD 及 P450 $\alpha$ rom 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。

#### 試驗三：生長因子對菜鴨卵巢濾泡粒性細胞類固醇合成之影響

一、濾泡細胞之分離與解離，細胞體外培養，內分泌素分析及統計分析等與試驗二同。

二、所測試之生長因子包括表皮生長因子 (hEGF)、類胰島素生長因子-1 (IGF-1)、纖維母細胞生長因子 (FGF) 及轉型生長因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )，其添加濃度為 0, 1, 10 及 100 ng/ml。

### 結果與討論

#### 試驗一：

由於 P450 $\alpha$ cc 和 3 $\beta$ -HSD 的抗原分為粗略 (crude) 與純化 (pure) 抗原，所以收集到的抗血清也分為 crude antiserum (CA) 與 pure antiserum (PA)；圖一分別為利用西方墨染法篩檢 P450 $\alpha$ cc、3 $\beta$ -HSD 與 StAR 抗體之結果。P450 $\alpha$ cc 多株抗體的 CA 力價可達 20,000 倍，但是因為抗原混雜的蛋白質較多，所以其抗體辨識的雜質亦較多；而 PA 雖然力價只有到 10,000 倍，但專一性較高。3 $\beta$ -HSD 之免疫也使用粗略和純化抗原，故得到的多株抗體也分為 pure antiserum (PA) 和 crude antiserum (CA)。3 $\beta$ -HSD 抗體的力價比較高，其 CA 或 PA 力價皆可達 100,000 倍；但 CA 的辨認到的雜質比較多，不若 PA 的純。

為了確定抗體的確是能辨識抗原，使用兩種方法以為鑑定，一為利用西方墨染法讓抗體直接對其抗原做辨認，結果顯示 P450 $\alpha$ cc 及 3 $\beta$ -HSD 抗體能直接辨認其重組蛋白；而粗略和純化抗原都為相同的濃度下，抗體對純化抗原的辨識性比較大，所以所辨識到的條帶 (band) 會比較強。另一是以西方墨染法用抗體去

辨認山羊黃體細胞株之前，先將 P450scc 及  $3\beta$ -HSD 的抗原和分別與其抗體作用數小時，使抗體能夠與充分與抗原結合；結果顯示因為部分抗體已經與抗原結合，所以辨認到呈現的條帶，會比控制組（未與抗原作用之抗體）來得容易。此多株抗體可以辨認的動物品種有牛、山羊、豬以及鴨；在本試驗利用幾種不同動物種別的類固醇表現組織（牛腎上腺細胞、山羊黃體細胞與豬腎上腺細胞）進行辨識，P450scc 都可以在 52 kDa 的位置表現（圖二及圖三）。

以上多株抗體在利用於辨識菜鴨類固醇生成細胞時，皆常容易辨認到其他蛋白質，而且所需要的蛋白質量也比牛或羊的蛋白質多 2 倍以上，才能順利辨識到；可能是因為此多株抗體的來源皆以牛的基因序列為模式；相對之下，家禽與牛的 StAR、P450scc 和  $3\beta$ -HSD 基因序列上的相似度較低，所以造成抗體辨識上的困難。這也是後續菜鴨的試驗中，最常面臨的問題，而造成試驗上的困擾。

## 試驗二：

### 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 活化細胞膜上之腺苷環酶（adenylyl cyclase），使細胞內環腺苷單磷酸（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 ( $P < 0.05$ )。

上述結果顯示，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。顯見菜鴨卵巢之三種濾泡細胞，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<sup>5</sup> 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<sup>5</sup> 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) 3 $\beta$ -HSD 酵素活性

3 $\beta$ -HSD 酵素活性之測定，為間接測定由 <sup>3</sup>H-P<sub>5</sub> 轉變為 <sup>3</sup>H-P<sub>4</sub> 所得之結果。由濾泡細胞體外培養 3 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -HSD 酵素。由此可知，菜鴨卵巢濾泡細胞之 3 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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分泌素是以孕固酮及雌二醇為主，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固酮之



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 $\beta$ -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 $\beta$ -HSD 酵素活性，則解釋了幾無孕酮分泌的原因。

### (二) 17 $\beta$ -HSD 酵素活性

17 $\beta$ -HSD 酵素活性之測定，為間接測定由 <sup>3</sup>H-P<sub>5</sub> 轉變為 <sup>3</sup>H-T 所得之結果。在 17 $\beta$ -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 $\beta$ -HSD 基礎酵素活性顯著增高 (P<0.05)，且以最成熟濾泡 F1 之 17 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\alpha$ -hydroxylase。

17 $\alpha$ -hydroxylase 作用於孕酮，合成雄固烯二酮，再由 17 $\beta$ -HSD 作用而得孕酮，因此 17 $\beta$ -HSD 酵素活性可作為細胞合成孕酮能力之指標。本研究利用菜鴨卵巢濾泡內膜及外膜細胞所得之 17 $\beta$ -HSD 酵素活性，與 Kato *et al.* (1995) 針對來亨雞所得之 17 $\alpha$ -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)。細胞所分泌孕酮量之多寡，與 17 $\beta$ -HSD 酵素活性高低有關。本研究發現，內膜細胞為分泌孕酮之主要細胞，孕酮分泌能力及對 LH 刺激之反應性，隨濾泡的成熟度而下降，而其 17 $\beta$ -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 $\beta$ -HSD 酵素，決定了細胞之孕酮分泌量。

### (三) P450arom 酵素活性

P450arom 酵素活性之測定，為間接測定由 <sup>3</sup>H-P<sub>5</sub> 轉變為 <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> 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分泌素之功能，然其角色仍有待進一步之研究。

### 試驗三：

於體外培養系統中添加 hEGF 100 ng/mL 與混合 F1 粒性細胞共培養，並於 4、6、12、24 及 48 小時測定其分泌之孕酮( $P_4$ )量 (圖四)。結果顯示，在培養 12 小時之後，粒性細胞基礎  $P_4$  分泌量即顯著的被抑制 ( $P < 0.05$ )；故混合 F1 粒性細胞仍可作為一良好的 EGF 抑制類固醇研究之細胞模式，以供後續試驗之用。

由前面的結果，已知 EGF 可抑制粒性細胞之  $P_4$  基礎分泌量，若 oLH 與 hEGF 及粒性細胞共培養時，hEGF 在 4 小時並沒有抑制效果，意即粒性細胞產生的  $P_4$  仍受到 oLH 作用而有被刺激的情形。但到了培養 12 小時以後，hEGF 開始對 oLH 所刺激的  $P_4$  量產生影響，hEGF 可以將由 oLH 所刺激的  $P_4$  產量抑制到約一半；在培養 24 小時後，hEGF 可抑制 oLH 所刺激的  $P_4$  產量約三分之二；到了培養 48 小時，抑制量幾乎達 100% (圖五)。

依據文獻指出，家禽卵巢細胞會表現數種生長因子，除了 EGF 以外，尚有 IGF、FGF 以及 TGF  $\beta$  等。目前已知粒性細胞或膜性細胞皆會分泌 IGF (Onagbesan *et al.*, 1994)，以旁分泌或自分泌的形式影響細胞，而 TGF  $\beta$  主要由膜性細胞分泌 (Law *et al.*, 1995)。至於 FGF 目前仍未知其分泌自何處。鑒於以上資料皆來自於蛋雞，而無蛋鴨的相關研究，因此我們便測定這幾種生長因子對菜鴨粒性細胞類固醇生成之影響。

將菜鴨粒性細胞分別與 IGF-I、FGF 以及 TGF  $\beta$  共同培養 24 小時後，測定其  $P_4$  分泌量。結果顯示，粒性細胞分泌的  $P_4$  產量會隨著 IGF-I 之添加量而漸增；FGF 則不影響粒性細胞分泌  $P_4$  之能力；而 TGF  $\beta$  則會顯著地抑制粒性細胞分泌  $P_4$  的產量 (圖六)。

由試驗結果得知 EGF 可抑制粒性細胞之 P<sub>4</sub> 基礎分泌量，若 oLH 與 hEGF 及粒性細胞共培養時，hEGF 在 4 小時並沒有抑制效果，意即粒性細胞產生的 P<sub>4</sub> 仍受到 oLH 作用而有被刺激的情形。但到了培養 12 小時以後，hEGF 開始對 oLH 所刺激的 P<sub>4</sub> 量產生影響，hEGF 可以將由 oLH 所刺激的 P<sub>4</sub> 產量抑制到約一半；在培養 24 小時後，hEGF 可抑制 oLH 所刺激的 P<sub>4</sub> 產量約三分之二；到了培養 48 小時，抑制量幾乎達 100%（圖五）。這與 hEGF 抑制粒性細胞基礎 P<sub>4</sub> 分泌量的結果有點差異，雖然 hEGF 也在培養 12 小時就有抑制 P<sub>4</sub> 基礎分泌量的效果，與 hEGF 抑制由 oLH 所刺激的 P<sub>4</sub> 分泌量的時間相同，但是 hEGF 抑制基礎分泌量的效果卻只有四分之一，而 hEGF 抑制 oLH 刺激的 P<sub>4</sub> 產量卻可達二分之一，顯示 hEGF 抑制由 oLH 所刺激之 P<sub>4</sub> 量的效果較佳。hEGF 抑制 oLH 的作用都比 hEGF 直接抑制粒性細胞 P<sub>4</sub> 基礎分泌的效果來的大，如果 hEGF 光是抑制粒性細胞的基礎 P<sub>4</sub> 分泌量，那麼 hEGF 抑制之粒性細胞被 oLH 所刺激的 P<sub>4</sub> 產量效果，應該會比 hEGF 直接抑制其基礎分泌量要來的差；但是試驗結果卻顯示了 hEGF 抑制 oLH 所刺激的 P<sub>4</sub> 產量效果比其抑制粒性細胞 P<sub>4</sub> 基礎分泌量效果好，暗示 hEGF 對粒性細胞被 oLH 所刺激的 P<sub>4</sub> 生成之影響路徑可能除了像抑制其基礎產量外，還有作用於別的途徑。

在其他生長因子方面，IGF-I 是家禽主要表現的 IGF 形式，而其對於菜鴨粒性細胞類固醇生成之影響與蛋雞 (Lovell *et al.*, 2002) 或其他哺乳動物 (Pescador *et al.*, 1999; Gilter *et al.*, 2001) 相似，都有加強之效果；而 FGF 的結果則與蛋雞中促進的結果有所差異 (Pulley *et al.*, 1986)，目前尚未知究竟卵巢中的 FGF 是由何處所產生的，只能確定 FGF 也有使家禽粒性細胞與膜性細胞增生的能力 (Roberts and Ellis, 1999)。至於 TGF  $\beta$  是屬於細胞凋亡因子，目前對其真正在卵巢上的生理意義並不清楚，據推論是與排卵時泡列徑破裂之所需，而其抑制類固醇生成之生理意義也不甚明瞭 (Johnson, 1990)。

其實目前對於眾多生長因子在家禽卵巢濾泡中所扮演的角色並未完全明瞭，只能了解這些生長因子能促進濾泡細胞於快速生長期時能夠充分的獲得增生。另外，許多報告指出，脊椎動物卵巢濾泡的細胞凋亡比例，可以被卵巢自行分泌的生長因子所抑制例如 IGF-I、FGF、EGF 及 TGF- $\alpha$  等 (Hsueh *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1996; Kaipia *et al.*, 1997)；而家禽的未被選擇進入體系的體系前濾泡會發生濾泡閉鎖，而細胞凋亡是濾泡閉鎖必經的過程 (Hsueh *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1996)，因此生長因子應與濾泡如何進入體系有所關聯。然而，這些生長因子於家禽卵巢上之生理意義，仍有待進一步研究。

## 結 論

本研究利用體外培養系統，發現菜鴨卵巢濾泡中之粒性細胞以合成孕酮為主，孕酮次之，其分泌量及 3 $\beta$ -HSD 與 17 $\beta$ -HSD 酵素活性，以最成熟即將排卵的 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。內膜細胞主要合成孕酮及雌二醇，其分泌量及 17 $\beta$ -HSD 與

P450arom 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。此外，內膜細胞雖無孕酮分泌能力，然其 3 $\beta$ -HSD 酵素活性在體外培養的過程中可被引發，推測應為後續類固醇之生成，需先經由孕酮合成之途徑所導致。濾泡中之外膜細胞以合成雌二醇為主，其分泌量及 P450arom 酵素活性以 F2 為最高；此外，外膜細胞幾乎無孕酮及睪固酮分泌能力，但其 17 $\beta$ -HSD 酵素活性在體外培養的過程中可被引發，此一表現，可能因雌二醇之合成，需先經由睪固酮生成之途徑而造成。

在生長因子影響方面，發現 EGF 及 IGF-1 會刺激菜鴨卵巢濾泡粒性細胞分泌孕酮；TGF- $\beta$  會抑制之；而 FGF 則沒有影響。另外，我們獲得到 P450scc 及 3 $\beta$ -HSD 抗體，且可應用於除了鴨以外之其他數種動物上。

#### 參考文獻

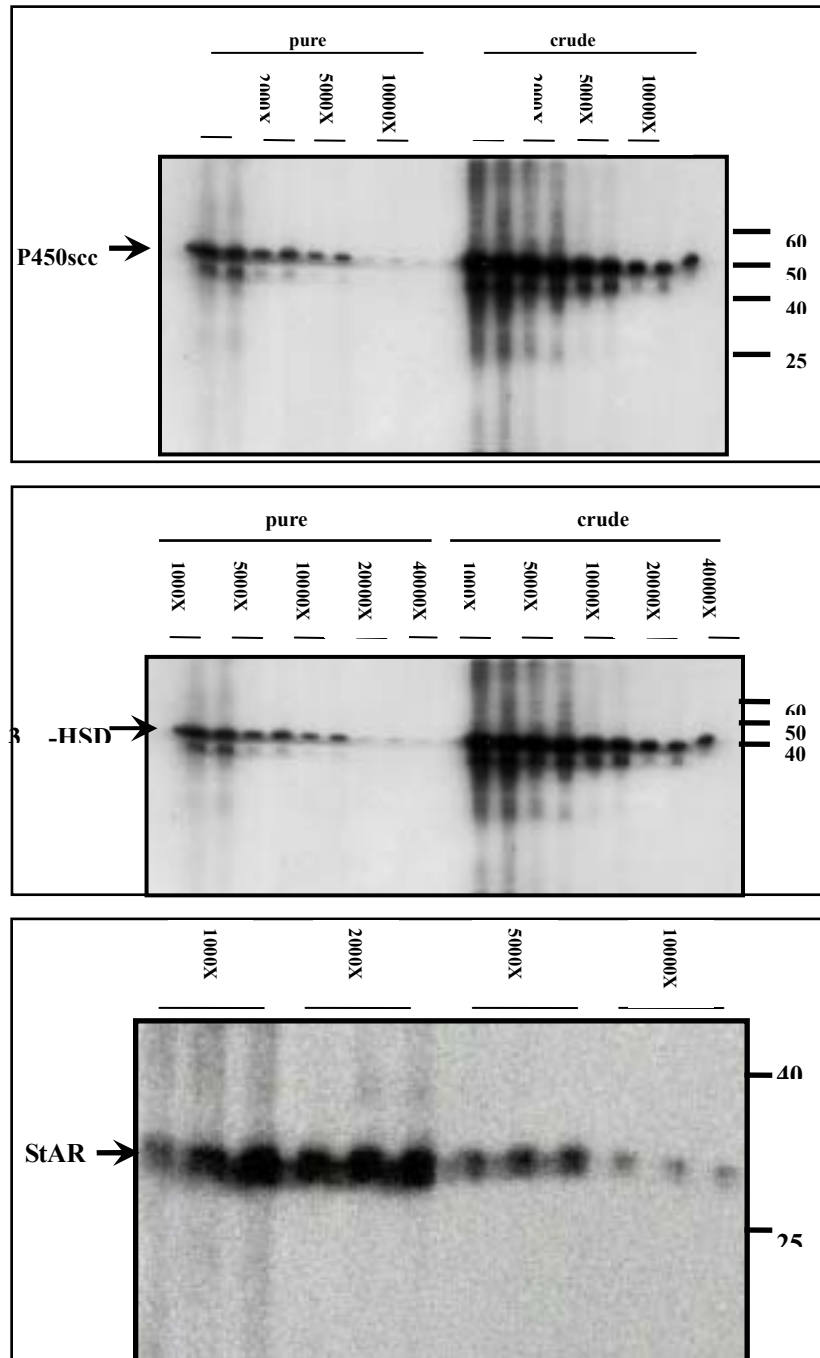
- 吳兩新、王惠玲、方世偉、莊榮輝、章淑貞、黃森源與林仁壽。1989。牛乳中助孕素酵素免疫微滴盤法之建立。國立台灣大學農學院研究報告 29:173-183。
- 陳玉燕、吳兩新與趙明杰。1997。睪固酮酵素免疫分析法之建立與應用。動物園學報 9:1-13。
- 劉世華、洪金俊、林仁壽與陳榮華。1985。母豬血清雌素二醇放射免疫分析法之建立。中畜會誌 14 (4):236。
- Armstrong, D. G. 1982. 3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -steroid dehydrogenase activity in the rapidly growing ovarian 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 $\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase: mechanism of stimulation of 17 $\beta$ -estradiol formation from estrogen by 5 $\alpha$ -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 stimuable 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.
- Gilster, C, D.S. Tannetta, N.P. Groome and P.G. Knight. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. 2001. Biol. Reprod. 65:1020-1028.
- 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.
- Johnson, A.L., J.T. Bridgman and B. Wagner. 1996. Characterization of a chicken luteinizing hormone receptor (cLH-R) cDNA, and expression of cLH-R mRNA in the ovary. *Biol. Reprod.* 55:304-309.
- Kato, M., K. Shimada, N. Saito, K. Noda and M. Ohta. 1995. Expression of P450<sub>17 $\alpha$ -hydroxylase</sub> and P450<sub>aromatase</sub> genes in isolated granulosa, theca interna and theca externa layers of chicken ovarian follicles during follicular growth. *Biol. Reprod.* 52 : 405-410.
- Law, A. S., D. W. Burt and D. G. Armstrong. 1995. Expression of transforming growth factor-mRNA in chicken ovarian follicular tissue. *Gen. Comp. Endocrinol.* 98:227-233.
- 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.
- Onagbesan, O.M., W. Gullick, I. Woolveridge and M.J. Peddie. 1994. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptors, epidermal-growth -factor-like and transforming-growth-factor-like peptides in chicken ovarian follicles. *J. Reprod. Fertil.* 102:147-153.
- Pescador, N., D.M. Stocco and B.D. Murphy. 1999. Growth factor modulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinization in the pig ovary. *Biol. Reprod.* 60:1453-1461.
- 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.

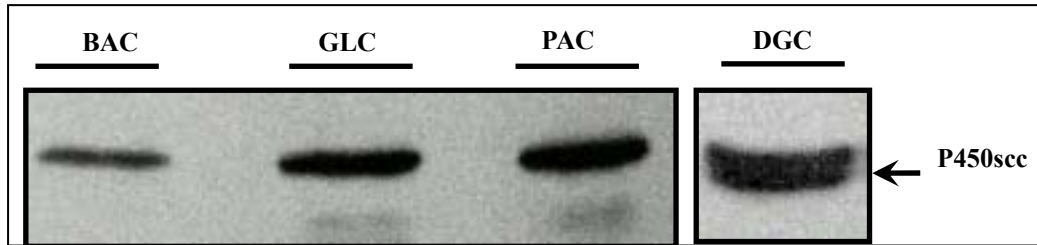
#### 計畫成果自評

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，仍進一步研究證實中。

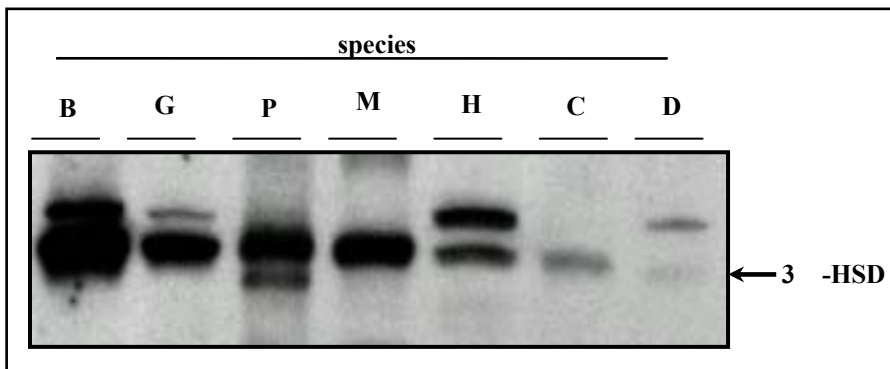
在類固醇酵素活性之測定方面，本研究係以添加定量放射性之 P<sub>5</sub> (<sup>3</sup>H-P<sub>5</sub>) 於細胞培養液中，藉由測定欲觀察之酵素，利用 <sup>3</sup>H-P<sub>5</sub> 所合成產物之放射量，評估該酵素之相對活性，本方法係為一間接測定法。另外，本計畫利用重組蛋白及合成 peptide，已成功製備了 P450<sub>scc</sub> 及 3  $\beta$ -HSD 之抗體。至於 P450<sub>arom</sub> 抗體部分，本研究已初步獲得，正鑑定其特性中。



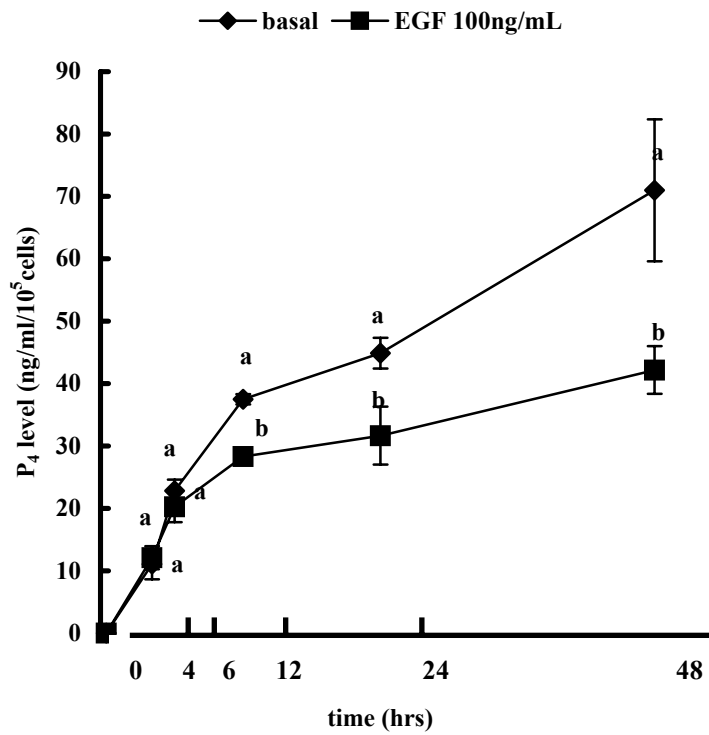
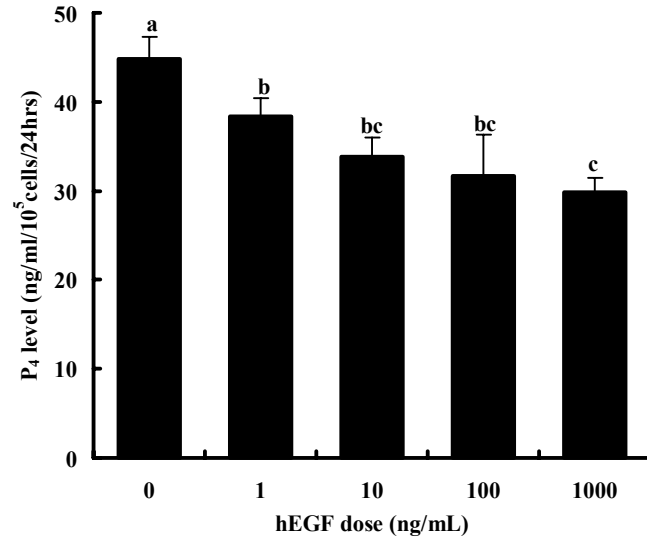
圖一、循序稀釋P450scc (上圖)、 $3\beta$ -HSD (中圖) 與StAR (下圖) 多株抗體濃度以決定供西方墨染法之適當稀釋倍數。Pure與crude意指該抗體來自經管柱純化與粗略萃取的P450scc重組蛋白作為免疫原，細胞來源為牛黃體細胞。



圖二、P450scc抗體專一辨識物種試驗。此抗體可辨識牛腎上腺細胞(B)、山羊黃體細胞(G)、豬腎上腺細胞(P)以及鴨卵巢濾泡粒性細胞(D)。

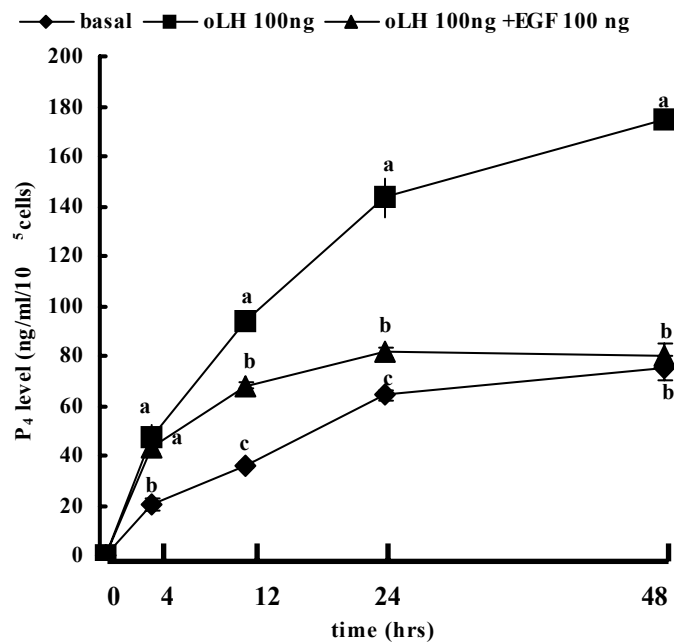
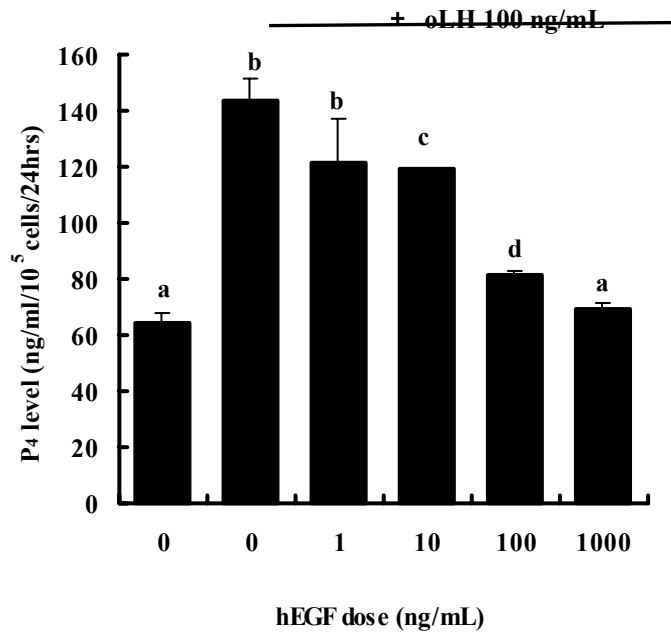


圖三、 $3\beta$ -HSD抗體專一辨識物種試驗。此抗體可辨識牛黃體細胞(B)、山羊黃體細胞(G)、豬腎上腺細胞(P)、小鼠萊迪氏細胞(M)、人類腎上腺細胞(H)、雞卵巢濾泡膜性細胞(C)以及萊鴨卵巢濾泡膜性細胞(D)。

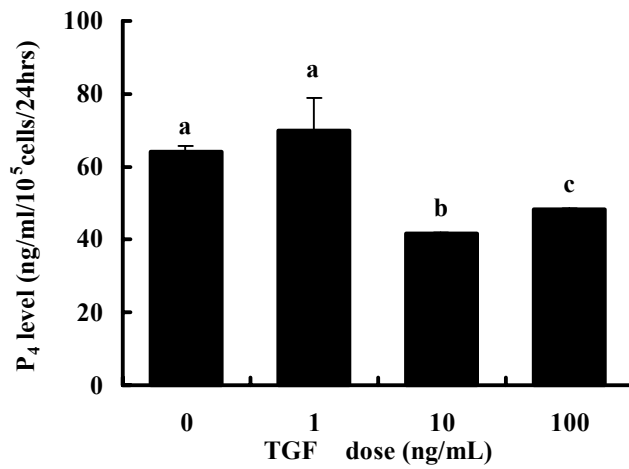
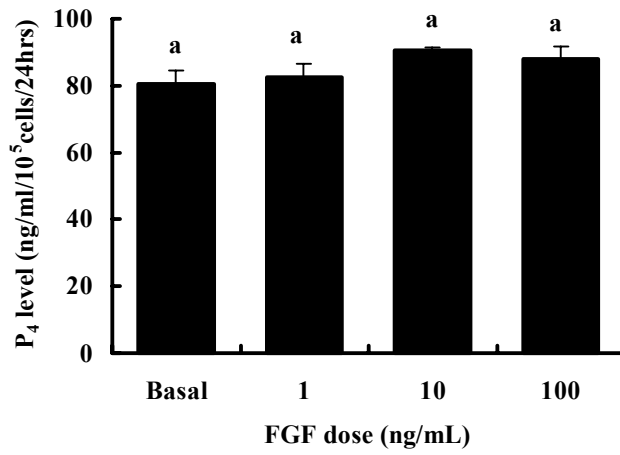
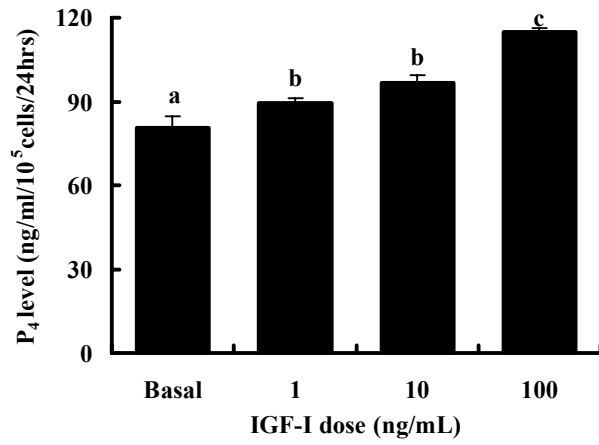


圖四、hEGF對於菜鴨卵巢F1濾泡粒性細胞孕酮 (P<sub>4</sub>) 分泌量之劑量反應 (上圖)。hEGF對於菜鴨卵巢F1濾泡混合粒性細胞孕酮 (P<sub>4</sub>) 分泌量之時程反應 (下圖)。不同EGF劑量間 (上圖) 或同一時程點之組間 (下圖) 無相同字母者，表差異顯著 (P < 0.05)。





圖五、hEGF與oLH共培養對於菜鴨卵巢F1濾泡粒性細胞孕酮(P<sub>4</sub>)分泌量之劑量反應(上圖)及時程反應(下圖)。不同EGF劑量間(上圖)或同一時程點之組間(下圖)無相同英文字母者，表差異顯著(P < 0.05)。



圖六、IGF-I、FGF以及TGF $\beta$ 對於菜鴨卵巢F1濾泡粒性細胞孕酮(P<sub>4</sub>)分泌量之劑量反應。組間無相同字母者，表差異顯著(P < 0.05)。