

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

山羊卵巢濾泡發育與閉鎖調控機制之研究

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-181

執行期限：89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

主持人：吳兩新 台灣大學畜產學系

一、中文摘要

本研究係選用台灣山羊，以腹正中線剖腹術摘取卵巢，利用解剖顯微鏡摘取 1-3 mm 大小之濾泡，利用酵素解離法將濾泡解離成單離濾泡細胞，來探討性腺內分泌素，對其孕酮(progesterone, P4)分泌及類固醇生成酵素之影響。初步結果顯示：在動情素方面，添加雌二醇(estradiol, E2) 0.1、1 及 10 ug/ml，無論是基礎與 oLH(10 ng)刺激組，均顯著減少濾泡細胞 P4 之分泌量；且具有抑制 P450 側鏈截切酵素的表現。在雄性素方面，添加睪固酮(testosterone, T)0.1、1 ug/ml，無論是基礎與 oLH(10 ng)刺激組，均可抑制 P4 之分泌。

關鍵詞：山羊、濾泡細胞、孕酮、類固醇生成酵素

Abstract

The purpose of this study was to examine the effect of estradiol and testosterone on progesterone production from caprine follicle cells *in vitro* culture system. The data demonstrated that estradiol could act directly on follicle cell to reduce the secretion of progesterone and expression of P450scc enzyme, and testosterone also could decrease progesterone production in basal and oLH-treated groups. This results implied that the interaction of estradiol and testosterone may play important roles in regulating the steroidogenesis of follicle cell, thus, determining the life span of the follicle.

Keywords: goat, follicle cell, progesterone, steroidogenesis enzyme.

二、緣由與目的：

在具 21 天動情週期之家畜如牛、豬，當週期第十六天左右，血流中動情素開始上升，孕酮濃度恰好逐漸降低；當動情素達高峰，繼之出現 LH 潮湧，隨之開始新的動情週期(Cupps, 1991)。在豬方面，動情素被認為有激黃體作用，甚至應用外源動情素注射，具有延長新母豬黃體之壽命(Geisert *et al.*, 1987)。然而，在體外培養中，則發現雌二醇抑制大與小黃體細胞孕酮之分泌，且可能是經由抑制 3β -HSD 活性所致(Tekpetey and rmstrong, 1991)。但對牛而言，使用外源性動情素處理母牛，可以消解其黃體而重新發情(Niswender *et al.*, 1965)。在牛的週期中，動情素主要由濾泡產生，因為濾泡在黃體化後就不再表現 P450 17α 酵素，是以黃體不能產生雄性素與動情素(Rodgers *et al.*, 1986)。而將黃體以外的濾泡摧毀，可以延長牛黃體之壽命(Villa-Godoy *et al.*, 1981)。凡此皆暗示，動情素在牛動情週期中可能扮演解黃體之角色。在體外的培養系統，Williams and Marsh (1978) 指出動情素與雄性素均能抑制受 LH 刺激的孕酮分泌，且雄性素的作用可能是先轉變成動情素後再發生的。郭(1993)利用細胞體外培養系統，亦發現動情素與雄性素能拮抗 LH 和 cAMP 對牛黃體細胞的刺激作用，尤以睪固酮和雌二醇為然。前者降低 P450scc 酵素總量及減弱 3β -HSD 酵素活性；後者則抑制 3β -HSD 酵素活性，卻不影響 P450scc 酵素總量，顯示二者有各自作用的方式。然而，在山羊濾泡細胞方面，則未有任何資料可考。而此種現象在山羊之濾泡細胞又如何，亦是值得探究的問題。本研究之目的是建立濾泡細胞體外培養系統，並利用外源性內分泌素（如 E2 及 T... 等）處理卵巢濾泡細胞，以探究其對濾泡細

胞類固醇生成反應之調控路徑。

三、結果與討論：

(1) oLH對新鮮山羊濾泡細胞分泌孕酮之影響：

山羊濾泡細胞經酵素解離後，在 M199 (含 20 mM HEPES; sodium bicarbonate 2.9 g/L; 100 units penicillin/ml and 100 ug streptomycin/ml, pH 7.2-7.4) 的培養系統下，立即與以外源性 oLH 0、1 與 10 ng/ml 刺激，在刺激 24 及 48 小時後，收集培養液，檢測其中 P4 之含量。結果顯示，在刺激 24 小時後 P4 即呈現良好之劑量反應，且 oLH 10 ng/ml 之劑量即能顯著刺激濾泡細胞之 P4 分泌($p<0.05$)，如圖 1 所示。因此在往後之試驗刺激系統，便以添加 oLH 10 ng/ml 為其刺激劑量並收集培養 24 小時後之培養液，以進一步進行性腺類固醇對山羊濾泡細胞之基礎及刺激之孕酮分泌反應。

(2) 雌素二醇(estradiol, E2)對山羊濾泡細胞分泌孕酮之影響：

山羊濾泡細胞解離後，於 M199 培養系統下，探討 E2 對山羊濾泡細胞孕酮生成之抑制作用。先前，我們比較了 oLH 對山羊濾泡細胞孕酮分泌之劑量與時程反應，因此我們決定以 oLH 10 ng/ml 之適當刺激作用下，利用不同劑量之 E2 (0、0.1、1 及 10 ug/ml)，比較 E2 對山羊濾泡細胞之基礎及在 oLH 10 ng/ml 刺激下之抑制劑量反應。由 24 小時之結果顯示，E2 0.1 ug/ml 即具有明顯抑制山羊濾泡細胞對 oLH 10 ng/ml 之刺激孕酮分泌量，且對於其基礎分泌量之抑制作用 1 ug/ml 即有顯著性差異。然在 E2 的劑量反應方面，隨著劑量之增加，E2 的抑制作用愈趨明顯，如圖 2 與 3 所示。

(3) 睪固酮(testosterone, T)對山羊濾泡細胞分泌孕酮之影響

山羊濾泡細胞於 M199 培養系統下，以 oLH 0 及 10 ng/ml 刺激濾泡細胞之孕酮分泌，同時添加 T 0.1、1 及 10 ug/ml，以觀察 24 小時之孕酮分泌量，24 小時結果顯示，T 0.1 ug/ml 即具有抑制山羊濾泡細胞之 oLH 10 ng/ml 之刺激孕酮分泌量且對於其基礎

分泌量之抑制作用 1 ug/ml 即有顯著性差異

綜合以上試驗結果：(1) E2 具有特異性地抑制山羊濾泡細胞基礎及受 oLH 刺激之孕酮分泌，其有效劑量為 0.1-10 ug/ml，且隨著劑量之增加而其抑制效果愈趨明顯。(2) T 具有抑制山羊濾泡細胞基礎及受 oLH 刺激之孕酮分泌，其有效劑量為 0.1-1 ug/ml。

本試驗使用山羊濾泡細胞，來探討類固醇本身自我調節內分泌素之生成，與其激素間之交互作用。實驗之山羊濾泡細胞乃為採自正常動情週期之台灣母山羊，自濾泡解離成單離細胞後立即以試驗處理，因此保有其原本之功能及特性，能受 oLH 刺激且具有良好之劑量及時程反應，顯示為一良好之實驗材料，利用此新鮮山羊濾泡細胞之初代培養，測試類固醇包括動情素及雄性素，初步發現可有效抑制 oLH 10 ng/ml 的刺激效果，而且 10 ug/ml 則更為明顯，甚至濾泡細胞的基礎分泌量都被抑制。因此，對於動情週期間山羊卵巢濾泡中粒性(granulosa)及內膜(theca)細胞的生長、發育及閉鎖時，參與其類固醇生成(steroidogenesis)的調控機轉，逐步進行研究，將可瞭解其調控細胞凋亡基因產物之表現與消長。

顯然，在每種動物間其類固醇生成間之交互作用都有其調節適應的方式，然 E2 及其他類固醇對於山羊濾泡細胞之作用點及其扮演之生理角色為何，期間是否涉及酵素 P450_{scc} 或 3 β -HSD 及有關基因之調控，則有待進一步深究。

四、計畫成果自評：

本研究之目的在建立山羊濾泡細胞體外 (*in vitro*) 培養模式，進行山羊濾泡細胞的類固醇生成酵素及孕酮分泌量等變化，以瞭解調控山羊濾泡細胞類固醇生成之機轉，進而研究山羊濾泡細胞生長與死亡之模式。

本研究主要發現動情素具有抑制濾泡細胞分泌孕酮之能力，且可抑制類固醇生成酵素之表現。而雄性素亦具有抑制濾泡細胞分泌孕酮之能力。而利用本研究室建立之山羊濾泡細胞體外培養系統，將可提供研究濾泡細胞生長死亡及類固醇生成調控機制之

模式，且對於調控濾泡細胞類固醇生成之研究將可提供有力之研究模式。

五、參考文獻：

郭應誠。1993。cAMP 調節類固醇生成基因表現之細胞特異性機制。國立台灣大學畜產學研究所 博士論文。台北。

Geisert, R.D., M.T. Zavy, R.P. Wettemann and B.G. Biggers. 1987. Length of pseudopregnancy and pattern of uterine protein release as influenced by time and duration of oestrogen administration in the pig. *J. Reprod. Fertil.* 79:163-172.

Niswender, G.P., C.C. Katenbach, R.R. Schuway, J.M. Wiltbank and D.R. Zimmerman. 1965. Alteration of ovarian activity in cycling beef heifers with small, daily injections of estradiol. *J. Ani. Sci.* 24:986-989.

Rodgers, R.T., H.F. Rodgers, P.F. Hall, M.R. WWaterman and E.R. Simpson. 1986. Immunolocalization of cholesterol side-chain-cleavage cytochrome P-450 and 17 α -hydroxylase cytochrome P-450 in bovine ovarian follicles. *J. Reprod. Fert.* 78:627-638.

Tekpetey F.R. and D.T. Armstrong. 1991. Steroidogenic responses of rat and pig luteal cells to estadiol-17B and catechol-estrogens in vitro. *Biol. Reprod.* 45:498-505.

Villa-Godoy, A., J.J. Ireland, J.A. Wortman, N.K. Ames and R.L. Fogwell. 1981. Luteal function in heifers following destruction of ovarian follicles at three stages of diestrus. *J. Anim. Sci.* 53:372(abstract).

Williams, M.T. and J.M. Marsh. 1978. Estradiol inhibition of luteinizing hormone stimulated progesterone synthesis in isolated bovine luteal cells. *Endocrinology* 103:1611-1618.

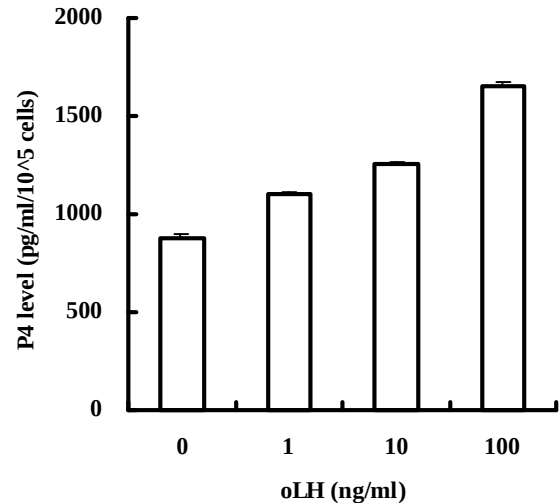


圖 1. 不同劑量之 oLH 對山羊濾泡細胞刺激 24 小時後孕酮分泌之劑量反應(n=3)。

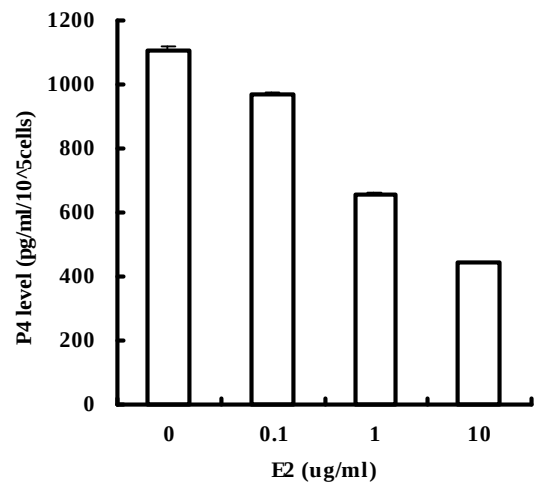


圖 2. 雌素二醇(E2)處理 24 小時後對新鮮山羊濾泡細胞孕酮分泌之影響。E2 添加 0, 0.1, 1 及 10 ug/ml 對山羊濾泡細胞在基礎孕酮分泌之影響(n=3)。

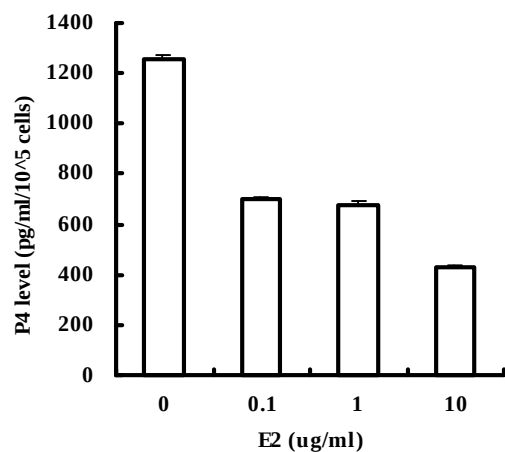


圖 3. 雌素二醇(E2)抑制新鮮山羊濾泡細胞在添加 oLH 10 ng/ml 系統下經培養 24 小時後之孕酮分泌之劑量反應 (n=3)。

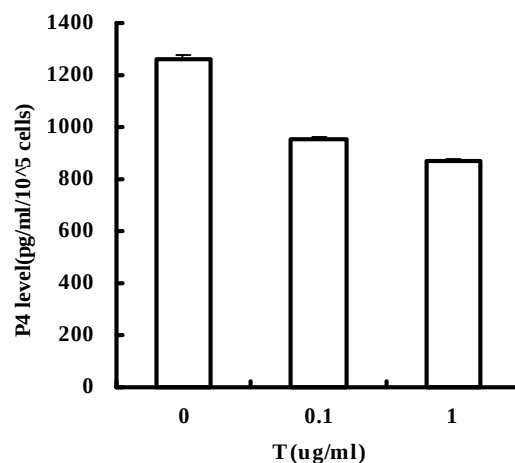


圖 5. 睪固酮(T)抑制新鮮山羊濾泡細胞在添加 oLH 10 ng/ml 系統下經培養 24 小時後孕酮分泌之劑量反應(n=3)。

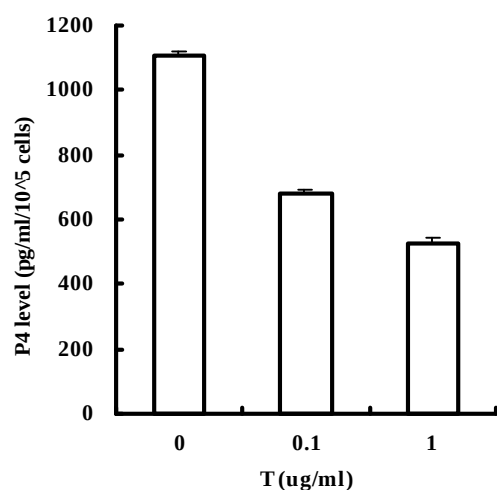


圖 4. 睪固酮(T)處理 24 小時後對新鮮山羊濾泡細胞孕酮分泌之影響。T 添加 0, 0.1, 及 1 ug/ml 對山羊濾泡細胞在基礎孕酮分泌之影響(n=3)。