

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 88-2313-B-002-036

執行期限：87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

主持人：吳兩新 台灣大學畜產學系

一、摘要

本研究之目的在利用活體 (*in vivo*) 及體外 (*in vitro*) 模式，進行動情週期間山羊黃體的類固醇生成及血清孕酮含量等變化之檢測，以瞭解調控山羊黃體細胞凋亡 (apoptosis) 的機轉。活體 (*in vivo*) 實驗方面，利用成熟之雌性台灣山羊，檢測其動情週期各階段中的血清孕酮含量，結果顯示，在動情週期 21 天內，血清中孕酮含量於第 9-12 天內達到高峰。而體外 (*in vitro*) 培養模式，則以本研究所建立之山羊黃體細胞株，檢測其對激黃體物質之反應，結果顯示，激黃體物質可降低黃體細胞凋亡之現象。由本研究結果顯示動情週期間，山羊血清孕酮含量之變化，與黃體解體之調控機轉，將有更深入之瞭解。

關鍵詞：山羊、細胞株、細胞凋亡、孕酮

Abstract

The purpose of this study is to examine the changes of steroidogenesis in caprine corpora lutea throughout the estrous cycle by using *in vivo* and *in vitro* strategy. To achieve this program, two experiments have been devised. The mature, female Taiwan native goats are selected for this *in vivo* studies. The serum progesterone concentrations and DNA fragmentation of luteal cells will be determined in different stage of estrous cycle.

By using *in vitro* techniques to

examine the luteotropic (or luteolytic) substances responsiveness, as well as the contents of 22R-OHC and pregnenolone. Our studies demonstrated that grandotropin could act directly on luteal cell line to reduce apoptotic death in culture. By doing so, we may understand the cell growth, proliferation, and cell death in caprine corpora lutea throughout the estrous cycle as well as the mechanism of apoptosis of luteal cells in goats. Our results suggest that the interaction of grandotropin may play important roles in regulating the growth and regression of luteal cell, thus, determining the life span of the luteal cell.

Keywords: goat, cell line, apoptosis, progesterone

二、緣由與目的：

本研究之目的在利用活體 (*in vivo*) 及體外 (*in vitro*) 培養方式，以其建立一研究細胞凋亡之模式，來探討正常動情週期間山羊黃體之類固醇生成及解體時山羊黃體細胞凋亡 (apoptosis) 的調控機轉。正常細胞之生長、分化與死亡過程均是受到基因所調控，此乃細胞因應外在環境或本身內在刺激所做出的反應 (Knickerbocker *et al.*, 1988)。細胞的死亡在自然狀態下可稱為細胞程式死亡 (program cell death) 簡稱 PCD，亦稱細胞凋亡 (apoptosis) (Wyllie *et al.*, 1980)。

細胞凋亡有一特徵，即細胞質收縮而染色質 (chromatin) 會凝聚在一起；但

壞死(necrosis)或當細胞受到外力傷害時，則會先膨脹而後破裂死亡。正常細胞染色質上之 DNA 大部份保持完整，但進行細胞凋亡的細胞，其 DNA 會被截切成一有規則的片段，片段約為 180 個鹼基對或 180 的整倍數。此乃因誘發產生核酸酶 endonucleases (Arends *et al.*, 1990; Compton *et al.*, 1992)，切割特定的染色體結構所造成；而在壞死的細胞中則無法觀察到。在細胞凋亡的過程中，細胞會縮小，表面的微絨毛消失，然後變得平滑；且細胞核的染色質在核膜周圍凝縮成為片段，最後細胞斷裂成油滴狀小片 (Sawyer *et al.*, 1990)。在具有正常週期的雌性家畜，黃體(corpus luteum)是供作研究細胞凋亡相當典型的一個內分泌腺體，黃體的形成與解體 (luteolysis)是正常週期所歷經的過程。現今已知 $\text{PGF}_{2\alpha}$ (prostglandin $\text{F}_{2\alpha}$)為自然生理的解黃體物質；而懷孕的動物則必須使黃體維持，且持續分泌孕酮以維持正常懷孕。

本研究室從事家畜之懷孕診斷、類固醇生成作用(與中研院分生所鍾邦柱博士合作)及早期懷孕因子等方面之研究，已有若干心得，尤其對山羊黃體功能之維持與調節甚感興趣，期能利用活體及體外模式，瞭解正常週期山羊的黃體發育與解體之機轉。家畜之黃體係由卵巢中成熟濾泡於排卵後形成，主要由黃體細胞 (luteal cell) 所構成，黃體會隨動情週期的進行，在型態學、細胞學及類固醇合成作用方面，均有其差異性 (Kinckerbocker *et al.*, 1988)。根據近十年來，在黃體解體及細胞學方面之研究，使我們對於黃體細胞有更深入之瞭解。而黃體解體之部分機轉已在牛 (Jewnifer *et al.*, 1993)、綿羊 (Sawyer *et al.*, 1990) 及豬 (Bacci *et al.*, 1996) 等家畜被充分討論；而山羊之黃體解體與動情週期之關係，迄今尚未被述及。另外，山羊黃體在動情週期的各階段，其孕酮分泌之基礎量及對許多物質如 LH、hCG、cAMP、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 等刺激之反應

性是否亦類似於牛、綿羊及豬等家畜 (Jewnifer *et al.*, 1993)，此為本研究採用山羊做為材料的主要原因之一。

利用活體及體外模式，可以瞭解動情週期各階段之黃體功能變化，其方法包括組織學檢查、血清的孕酮分析，黃體內孕酮含量分析及動情週期間黃體重量之變化與黃體細胞內蛋白質及 DNA 片段之檢測等 (Jewnifer *et al.*, 1993)。黃體細胞之分離為體外研究黃體功能的首要步驟，本研究室現已建立之山羊黃體細胞的體外培養系統，對動情週期中期 (9-12 天) 之黃體細胞的若干細胞學 (如大小黃體細胞之體積大小) 及生化學特性 (如對激黃體物質的反應)，已有充分瞭解 (吳等, 1997)。

迄今，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類似於細胞凋亡 (Sawyer *et al.*, 1990)。在正常週期的哺乳動物，黃體解體時其結構及功能上發生若干的改變，結構上的改變包括脂肪小滴的增加、空泡化及平滑內質網的崩解與分泌顆粒的消耗；在功能上孕酮的分泌必須下降，以使得 LH 潮湧後而引發下一個動情週期；且在結構上黃體必須被移除，以備卵巢內濾泡成長及發育。

類固醇分泌細胞之細胞凋亡，可利用添加或除去一些因子而誘發之，如黃體發育期間注射 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 可導致黃體解體 (Jewnifer *et al.*, 1993)，而其他組織亦會因內分泌素作用而表現細胞凋亡，如子宮上皮細胞、乳腺細胞 (Rotello *et al.*, 1992; Lynda *et al.*, 1994)。黃體細胞的細胞凋亡是由 endocrine, paracrine 及 autocrine 的因子來調控。這些因子會決定黃體細胞發育以進入黃體期或者進入細胞凋亡，如在動情週期前期黃體發育而後期解體，黃體細胞生命延長則會持續分泌孕酮，若懷孕時則黃體會維持而成為懷孕的指標。

三、結果與討論：

本實驗之結果顯示，在具有正常動情週期之山羊其血清孕酮含量呈現正常之週期循環顯示於(圖一)，正常週期之山羊，其血清孕酮含量於 21 天內呈現高低之明顯變化，尤其於動情週期的第 9-12 天達到最高點，隨後便逐漸下降，顯示其黃體功能在合成孕酮之能力於動情週期 9-12 天時達到最高峰，且其類固醇合成能力最佳，但隨著時間的增加而逐漸喪失其合成類固醇之能力。

而在體外培養系統中，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 T 抗原建立了山羊黃體細胞株，此細胞株在 34°C 時可持續分裂生長，但是當溫度提高至 40°C 時，細胞不再生長分裂，我們利用 ³H-thymidine 併入法分析發現，在 34°C 及 40°C 下培養 24 小時後，40°C 培養組其 ³H-thymidine 含量明顯低於 34°C 處理組 (圖二)，顯示此一細胞株在不同溫度處理下，34°C 培養組具有合成 DNA 之能力，而 40°C 則沒有。此外，我們亦利用不同溫度條件處理此一細胞株，檢測其保存 ³H-thymidine 之能力，結果顯示，在 40°C 培養系統下，隨著時間的增加而降低其 ³H-thymidine 保存能力，顯示此細胞株於 40°C 處理下，細胞會逐漸死亡，然而在 22R-OHC 及 pregnenolone 處理下，可降低其細胞凋亡之速率，顯示刺激山羊黃體枝類固醇生成將可抑制其細胞凋亡之速率，然而其確實之機制為何，尚待進一步探討。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°C 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 22R-OHC 及 pregnenolone 而減緩其細胞凋亡之現象。

此研究結果將可進行黃體解體時細胞凋亡機制之研究，提供一有利之模式，以探討更有力之證據。

四、計畫成果自評：

本研究之目的在利用活體 (*in vivo*) 及體外 (*in vitro*) 模式，進行動情週期間山羊黃體的類固醇生合成及孕酮含量等變化之檢測，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。在活體試驗方面，由於山羊有季節性發情之現象，故所累積之數據不多，擬繼續補充之。

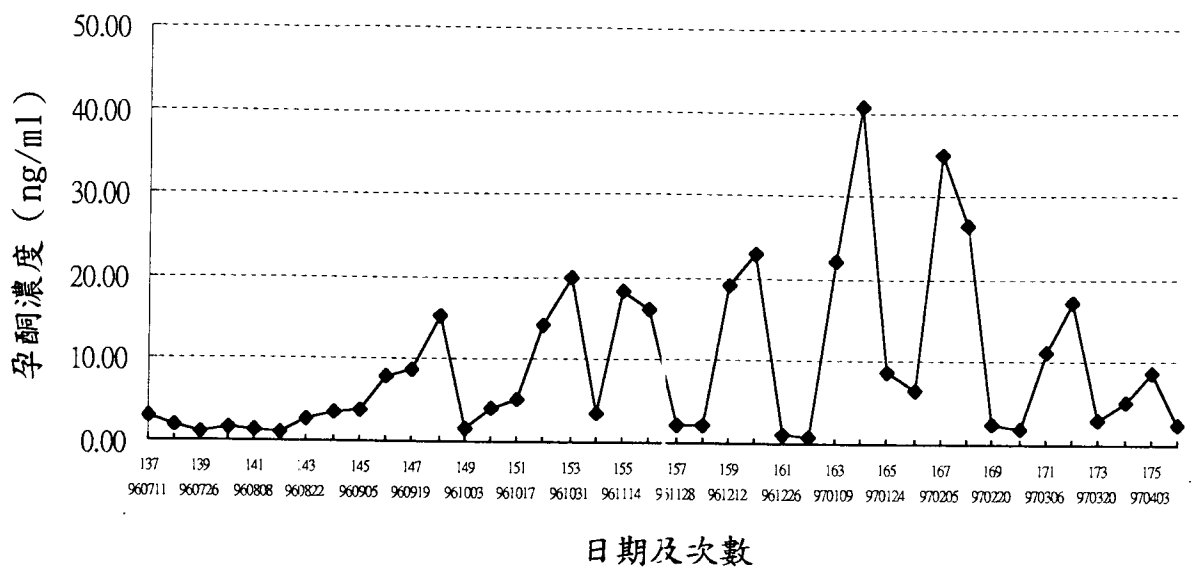
本研究主要發現激黃體物質對山羊黃體細胞株可降低其細胞凋亡之速率，因此，激黃體物質對於黃體解體時之細胞凋亡佔有一重要之地位。

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將可提供有力之證據。

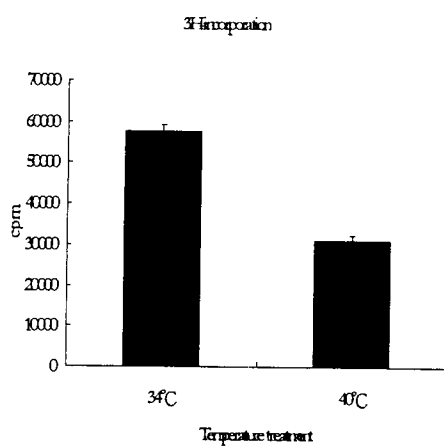
五、參考文獻：

- 吳兩新、楊鎮榮、黃政齊、林仁壽。1997。激黃體物質對山羊黃體細胞體外分泌孕酮之影響。中國畜牧學會會誌 26 (3):313-326。
- Ansterdam, A., A. Dantes, N. Selvaraj, and D. Aharoni 1997. Apoptosis in steroidogenic cells: structure- function analysis. Steroids 62:207-211
- Arénds, M.J., R.G. Morris and A.H. Wyllie 1990. Apoptosis - the role of the endonuclease. Am. J. Pathol. 136:593-608
- Bacci, M.L., A.M. Bararzzoni, M. Forni and G.L. Costerbosa 1996. In situ detection of apoptosis in regressing corpus luteum of pregnant sow: evidence of an early presence of DNA fragmentation. Domest. Anim. Endocrinol. 13(4):361-372.
- Compton, M.M. and J.A. Cidlowski 1992. Thymocyte apoptosis - a model of programmed cell death. Trends Endocrinol. Metab. 3:17-23
- Jewnifer, J.L., H.K. Garverick, A.L. Johnson, R.S. Youngquist and M.F. Smith 1993. Apoptosis during luteal regression in cattle. Endocrinology 132(1):249-254.

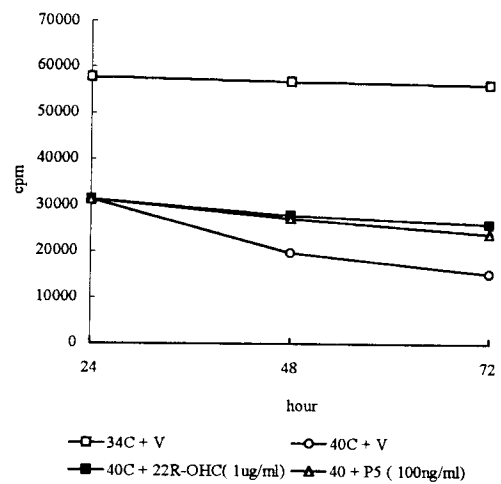
- Knickerbocker, J.J., M.C. Wiltbank and G.D. Niswender 1988. Mechanism of luteolysis in domestic livestock. *Domest. Anim. Endocrinol.* 5:91-107.
- Lynda, H.Q., V.P.A. Caroline and J.W. Colin 1994. Local regulation of mammary apoptosis in the lactating goat *Biochemical Society Transactions* 178S, 22.
- Rotello, R.J., R.C. Lieberman and L.E. Gerschenson 1992. Characterization of uterine epithelium apoptosis cell death kinetics and regulation by progesterone and RU486. *Anim. J. Pathol.* 140:449-456.
- Sawyer, H.R., K.D. Niswender, T.D. Braden and G.D. Niswender 1990. Nuclear changes in ovine luteal cells in response to $\text{PGF}_{2\alpha}$. *Domest. Anim. Endocrinol* 7:229-238
- Thompson, E.B. 1994. Apoptosis and steroid hormone. *Mol.Endo.* 8(6):665-673.
- Wyllie, A.H., J.F.R. Kerr and A.R. Currie. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68:251-306.



圖一、正常動情週期山羊之血清中孕酮濃度之變化



圖二、SV40 山羊黃體細胞株在不同溫度處理下其 DNA 合成速率。



圖三、不同溫度處理(34°C 及 40°C)對山羊黃體細胞株保存 3H-thymidine 之能力：40°C 培養條件下，22R-OHC 及 pregnenolone 處理下其 3H-thymidine 保存能力比為處理組高。