

同源 GnRH 对无血清培养鸡卵泡颗粒细胞孕酮分泌的作用

汪琳仙 刘金中 张才乔

(北京农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要 选用产蛋规律的鸡, 在一个产蛋序列中, 排卵前 1~3 h 剖腹收集各级卵泡, 分离颗粒层建立卵泡颗粒细胞无血清单层贴壁培养模型。在此基础上, 用不同剂量鸡促性腺激素释放激素 (GnRH-II) 单独处理或与羊 LH(oLH) 协同处理, 并使用 GnRH-Antagonist (GA), 以观察 GnRH-II 对颗粒细胞孕酮分泌的影响。研究获得了以下结果: (1) GnRH-II 对鸡不同卵泡 (F₁、F₃、F₅) 颗粒细胞孕酮分泌均有促进作用, 并呈现剂量-反应关系; (2) GnRH-II 对 oLH 促鸡卵泡颗粒细胞孕酮的分泌有明显的协同作用; (3) GnRH-拮抗物使 GnRH-II 的促卵泡颗粒细胞孕酮分泌作用受到阻断。

关键词 GnRH-II, 孕酮, 鸡, 卵泡颗粒细胞, 无血清培养

早已证实下丘脑产生的 GnRH 通过调节垂体促性腺激素的合成和分泌, 间接作用于性腺。而 Ripple 等 (1976)^[1] 对去垂体大鼠注射 GnRH 发现 GnRH 对卵巢有直接作用。Heber 等 (1978)^[2] 证实了大鼠卵巢上存在 GnRH 受体。Clark 等 (1982)^[3] 体外试验观察到 GnRH 可使排卵前的卵泡颗粒细胞孕酮分泌量增加 2~3 倍。Aten 等 (1986)^[4] 还在鼠卵巢内发现了 GnRH 样肽。近年来有关卵巢调控的内在机制已被广泛研究, 在猪、牛、人等均有不少报道, 但在禽类方面却较少。GnRH 对禽类卵巢是否有直接作用, 禽类卵泡细胞是否存在 GnRH 受体, 尚不清楚。仅见 Hertelandy (1982)^[5] 报道了 mGnRH 对 oLH 促鸡卵泡颗粒细胞孕酮分泌有协同作用。我们在 1990 年用短期细胞悬浮培养法初步观察到单用鸡 GnRH 能刺激鸡卵泡颗粒细胞分泌孕酮^[6]。本试验旨在进一步证实同源 GnRH 对鸡卵泡颗粒细胞孕酮分泌的直接作用。以丰富比较内分泌学内容, 并为研究禽类卵巢的自分泌调控积累资料。

1 材料和方法

1.1 材料

试验鸡: 选择产蛋规律连产 6~7 个蛋以上的红海赛鸡, 在一个产蛋序列中, 排卵前 1~3 h, 剖腹取出卵泡 (F₁、F₃、F₅) 用于试验。每次试验用鸡 6~8 只, 试验重复 3 次以上。

主要试剂: 鸡 GnRH-II 由英国 Dr. Sharp 实验室赠送。胶原酶 (II 型)、胰岛素 (Ins)、

* 本文属国家自然科学基金资助项目的内容之一。

** 收稿日期 1995-01-26。

转铁蛋白 (Tf) 和牛血清白蛋白 (BSA) 均为 Sigma 公司产品。McCoy's 5A 培养基及 Ham's F₁₂ 培养基自 Gibco 公司。GnRH-Antagonist (GA) 由中国科学院动物研究所刘以训教授赠送 (系 Dr. N. C. Ling 实验室产品)。孕酮放免测定药盒为上海内分泌研究所产品。

1.2 方法

1.2.1 卵泡颗粒细胞无血清单层贴壁培养模型的建立: 将卵泡分离颗粒层, 用 0.1% 胶原酶消化 5~7 min, 终止反应收集颗粒细胞, 用 0.1% 台盼兰染液检查细胞存活数 (90% 以上), 并计数按 2×10^4 细胞/孔接种到 24 孔培养板内, 所用培养液是无血清 MF 完全培养液 (即 McCoy's 5A 和 Ham's F₁₂, 等量培养液并加有谷氨酰胺 2 mmol/L, HEPES 1.75 mmol/L, BSA 0.1%, 青霉素 10 万 I.U./L, 链霉素 10 万 I.U./L, Ins 10 μ g/ml, Tf 5 μ g/ml)。放入培养箱中, 在含 5% CO₂ 的空气、38℃、饱和湿度的条件下培养 4~5 h 细胞开始贴壁, 约 20 h 细胞全部贴壁, 生长良好 (见图 1)。

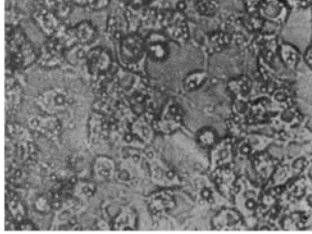


图 1 鸡卵泡颗粒细胞无血清贴壁培养 20 h 显微照片。10×25

Fig. 1 Follicular granulosa cells cultured for 20h in serum-free culture media. (10×25)

1.2.2 激素处理: 颗粒细胞培养 20 h 后, 换培养液 1 次, 在培养液中加入孕酮前体物孕烯醇酮 (10^{-7} mmol/L), 然后用 GnRH-II、oLH 或 GA 对培养的颗粒细胞进行不同处理。处理后继续培养 4 h, 分别收集细胞培养液, 保存于 -20℃ 的冰箱中, 待检孕酮含量。

1.2.3 孕酮含量检测: 采用放射免疫分析法 (RIA)。标记物为 ³H-孕酮, 样品回收率为 95%。参照 Asem (1983) 方法^[7]。

2 结果和讨论

2.1 不同剂量的 GnRH 对卵泡颗粒细胞孕酮分泌的作用

试验结果见图 2。GnRH 在 62.5 ng 到 1000 ng 之间测得培养液中孕酮含量均高于对照, 剂量增大到 250 ng 以上测得孕酮含量显著或极显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) 高于对照组。结果表明, 在无血清贴壁培养条件下, GnRH-II 对鸡卵泡 (F₁) 颗粒细胞孕酮分泌有促进作用, 而且呈现剂量-反应关系。

2.2 GnRH-II 对不同卵泡 (F₁、F₂、F₃) 颗粒细胞孕酮分泌的作用

试验结果见图 3。对 F₁, GnRH-II 在 100 ng 时颗粒细胞的孕酮分泌量 (25.76 ng) 显著高于对照 (22.04 ng); 而 GnRH-II 500 ng 时, 其孕酮分泌量 (30.68 ng) 极显著高于对照。对于 F₂, GnRH-II 500 ng 时, 颗粒细胞的孕酮分泌量 (16.28 ng) 极显著高于对照 (9.0 ng)。对于 F₃, GnRH-II 500 ng 时, 颗粒细胞的孕酮分泌量 (16.9 ng) 显著高于对

照 (8.5ng)。

结果表明, 在本试验条件下, GnRH-II 对 F_1 、 F_3 和 F_5 颗粒细胞均有促孕酮分泌的作用, 该结果与我们用细胞短期孵育法试验的结果相一致^[6]。而本试验采用无血清贴壁培养细胞, 并在激素处理前换培养液, 可以消除内源 LH 的影响。结果还提示, 各级卵泡颗粒细胞对 GnRH-II 的灵敏性有所不同, 从对 GnRH 不同剂量反应的效果来看 F_1 对 100ng GnRH 表现效果显著, 对 500ng 效果极显著。而 F_3 对 100ng GnRH 其反应效果不显著, 对 500ng 才极显著。而 F_5 对 500ng GnRH 效果才显著。其敏感性似乎 $F_1 > F_3 > F_5$, 这可能与不同卵泡所含孕酮合成酶的活性差异有关。Amstrong 观察到随卵泡成熟孕酮合成酶活性增加^[4]。

2.3 GnRH-II 对 oLH 促卵泡颗粒细胞孕酮分泌的影响

试验结果见图 4。从各级卵泡 (F_1 、 F_3 、 F_5) 来看, 单加 GnRH-II 500ng 处理, 其颗粒细胞孕酮分泌量显著或极显著高于对照组。单加 oLH 50ng, 其颗粒细胞均极显著高于对照组。当同时加入 GnRH-II 和 oLH 时, 其孕酮分泌量不仅显著高于对照组, 而且均高于单加 GnRH-II 或 oLH 处理组。

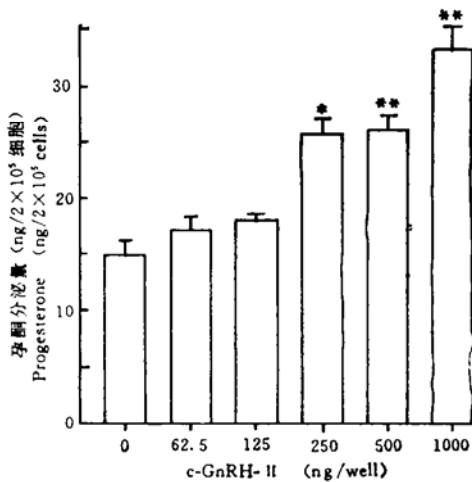


图 2 不同剂量的鸡 GnRH-II 对鸡卵泡 (F_1) 颗粒细胞孕酮分泌的作用。

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;

平均数 ± 标准误 ($n = 4$)

Fig. 2 Effect of different concentration of cGnRH-II on progesterone secretion by cultured granulosa cells from chicken F_1 follicles.

The data indicated mean ± SE; $n = 4$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Compared to control)

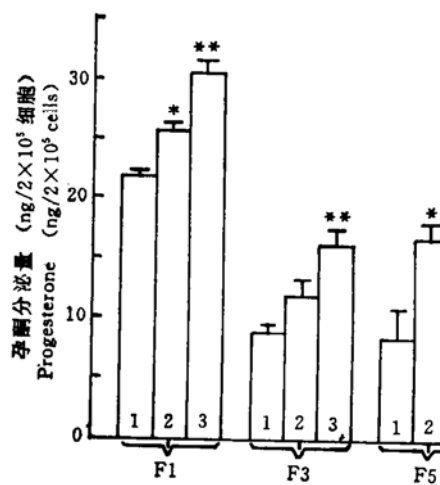


图 3 鸡 GnRH-II 对不同卵泡 (F_1 、 F_3 、 F_5) 颗粒细胞孕酮分泌的作用。

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;

平均数 ± 标准误 ($n = 8$)

Fig. 3 Effect of cGnRH-II on progesterone secretion by cultured granulosa cells from F_1 , F_3 and F_5 stage follicles.

The data indicated mean ± SE, $n = 8$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

(Compared to control)

1. Control; 2. 100ng GnRH;

3. 500ng GnRH

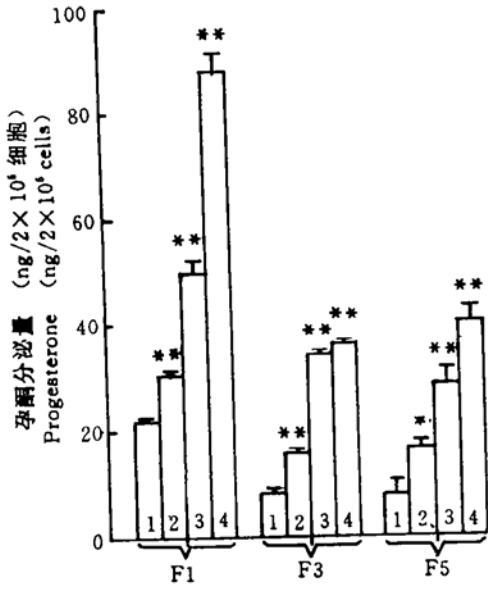


图4 鸡 GnRH-II 对 LH 促鸡卵泡 (F₁ 和 F₅) 颗粒细胞孕酮分泌的影响。
* P<0.05, ** P<0.01,
平均数±标准误 (n = 8)

Fig. 4 Effect of cGnRH-II on LH-stimulated progesterone secretion by cultured granulosa cells from F₁, F₃ and F₅ stage follicles.
The data indicated mean±SE, n = 8; *P<0.05, **P<0.01 (Compared to control)

- 1. Control; 2. 500ng GnRH;
- 3. 50ng oLH; 4. 500ng GnRH + 50ng oLH

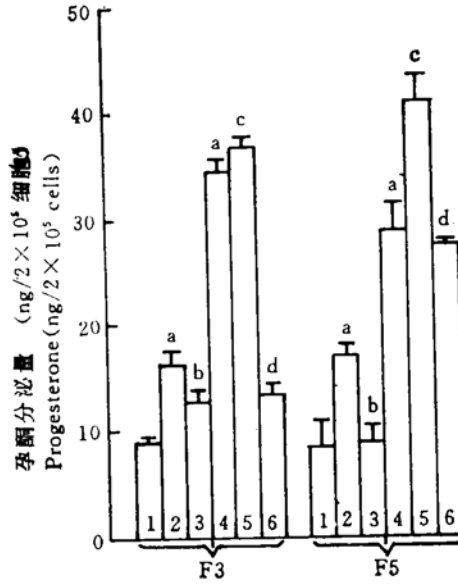


图5 GnRH/Ant (拮抗剂)对鸡 GnRH-II 促孕酮分泌的影响。
a: 表示与对照差异显著,
ba:P<0.05; dc:P<0.01
平均数±标准误 (n = 8)

Fig. 5 Inhibitory effect of GnRH-Ant(GA) on cGnRH-II induced progesterone secretion by cultured granulosa cells from F₃ and F₅ stage follicles.

- The data indicated mean + SE, n = 8;
a: Indicated significant difference Compared to control;
ba:P<0.05; dc:P<0.01
- 1. Control; 2. 500ng GnRH;
 - 3. GnRH + GA; 4. 50ng oLH;
 - 5. GnRH + oLH; 6. GnRH + oLH + GA

结果表明 GnRH-II 对 oLH 促鸡卵泡颗粒细胞孕酮的分泌有协同作用。该结果与 Hertelerdy 用 mGnRH 的试验结果相一致^[5],但条件有所不同。Hertelerdy 的是在细胞培养液中先加 mGnRH 30min 后再加 oLH 处理的结果。

2.4 GnRH-拮抗物 (GA) 对 GnRH-II 促孕酮分泌作用的影响

试验结果见图5。从 F₃ 和 F₅ 来看,在培养液中单加 GnRH-II,颗粒细胞的孕酮分

泌量显著高于对照组。但同时加入 GnRH-II 和 GA, 颗粒细胞孕酮分泌量显著低于单加 GnRH-II。同样, 用 GnRH-II 和 oLH 协同处理时, 颗粒细胞孕酮分泌量显著高于对照组。而同时加入 GA, 颗粒细胞孕酮分泌量均显著低于协同处理组。这些结果表明, GA 对 GnRH-II 促孕酮分泌的作用起到了阻断效果。这与刘以训等 (1990)^[9]报道的 GA 阻断 GnRH 促恒河猴卵巢的颗粒细胞甾体激素合成的结果相似。GA 能阻断 GnRH 的作用, 表明 GnRH-II 可能是通过颗粒细胞的受体起作用时的, 有待进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Ripple R H. Inhibition of HCG induced ovarian and uterine weight augmentation in the immature rat by analogues of GnRH. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 1976, 152:432.
- [2] Heber D et al. Ovary receptor binding activity of gonadotropin releasing hormone in rat. *Am J. physiol.*, 1978, 4:227.
- [3] Clark M R. Stimulation of progesterone and prostaglandin E accumulation by luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) and LHRH analogs in rat granulosa cells. *Endocrinology*, 1982, 110:146.
- [4] Aten R F et al. Ovarian gonadotropin-releasing hormone-like protein (s): demonstration and characterization. *Endocrinology*, 1986, 118(3):961~967.
- [5] Hertelendy F et al. Synergistic effects of gonadotropin releasing hormone on LH-stimulated progesterone production in granulosa cells of the domestic fowl. *Gen Comp Endocr*, 1982, 48:117~122.
- [6] 张海峰, 汪琳仙. 鸡促性腺激素释放激素对鸡卵泡颗粒细胞孕酮分泌的影响. *北京农业大学学报*, 1993, 19(2):87~91.
- [7] Asem E K et al. Effects of forskolin on progesterone and cyclic adenosine monophosphate production in avian granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 1983, 29:1098~1104.
- [8] Armstrong DG. Changes in 3β -hydroxy-5-steroid dehydrogenase activity in granulosa tissue during the ovulatory cycle of the laying hen. *J. Endocr.*, 1985, 106:269~273.
- [9] 刘以训, 胡召元等. GnRH α 对恒河猴颗粒细胞离体下甾体激素形成的双向作用. *中国科学*, 1990, 11:1144~1151.

**EFFECT OF HOMOLOGOUS GONADOTROPIN RELEASING
HORMONE ON PROGESTERONE SECRETION OF
GRANULOSA CELLS FROM CHICKEN
FOLLICLES IN SERUM-FREE MEDIUM**

Wang Linxian, Liu Jinzhong, Zhang Caiqiao

(College of Biological Sciences Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract

Laying hens were killed 1-3h before the expected time of ovulation at the beginning of a laying sequence. The follicles (F₁, F₃, F₅) were collected and the follicular granulosa cells were isolated with collogonase. Serum-free culture model of granulosa cells was established to evaluate the effect of chicken gonadotropin releasing hormone (GnRH-II) on progesterone secretion of granulosa cells. Granulosa cells cultured for 20h were treated with GnRH-II, oLH and GnRH-antagonist (GA) for 4h. The media were collected for measuring progesterone by radioimmunoassay. The following results were obtained: GnRH-II alone enhanced progesterone secretion of granulosa cells from F₁, F₃, F₅, and it presented dose-response relationship; GnRH-II has a synergetic effect on oLH-stimulated progesterone secretion of granulosa cells, and these actions of GnRH-II could be blocked by GA.

Key words GnRH-II, Progesterone, Granulosa cells, Chicken follicles, Serum-free culture

《畜牧兽医学报》1997年征订启事

《畜牧兽医学报》是中国畜牧兽医学会主办,《畜牧兽医学报》编委会、中国农业科学院畜牧研究所编辑出版的全国畜牧兽医学术刊物。创刊于1956年7月。读者对象为大、专院校的师生和各级畜牧兽医生产、科研工作者等。主要栏目包括畜牧和兽医两大学科,刊登较高水平的学术论文和专业研究报告以及对生产实践具有指导性和启发性的文章。

本学报主张发扬民主,提倡不同学术观点的自由讨论,使其成为一个百花齐放、百家争鸣的学术园地,并以此团结广大的畜牧兽医科学工作者,促进其沟通情报和学术交流,以期达到不断提高我国的畜牧兽医科技水平之目的。

本学报为双月刊,每期96页、订价4.00元。国内总发行:北京报刊发行局。国内统一刊号:CN11-1985/s。全国各地邮局均可订阅。邮发代号:82-453;国外代号:BM446。编辑部地址:北京市海淀区圆明园西路2号中国农科院畜牧研究所。邮政编码:100094。电话:62581177-3088。

《畜牧兽医学报》编辑部