

绵羊妊娠期胎儿垂体促性腺激素细胞的发生发育与 血浆 B-LH 浓度的变化关系

崔胜 张建超 曹兴元 刘佳利

(中国农业大学 生物学院, 北京 100094)

摘要 为了研究绵羊胚胎期垂体中促性腺激素细胞的发育及功能变化,分别在胎儿发育的第 60、90、120 天和出生期采集垂体和血液,利用免疫荧光标记和生物学测定方法研究了垂体中促黄体激素 亚单位(LH_β)的表达和血液中 LH 生物活性的变化。结果证明:在胚胎发育的第 60 天,在腺垂体可观察到少量散在的 LH_β 阳性细胞;在胎儿发育的 90 d, LH_β 阳性细胞率显著高于 60 d ($P < 0.01$) 时,且均匀分布于整个腺垂体;在胎儿发育的 120 d, LH_β 阳性细胞率达到高峰,但出生期又显著降低。胚胎发育过程中,垂体的 LH_β 细胞阳性率与血液中 B-LH 浓度呈现相似的变化趋势,且无显著的性别差异。以上研究证明绵羊垂体促性腺激素细胞的功能在胚胎中期之后最活跃,在后期垂体中 LH_β 阳性细胞率和血浆 B-LH 浓度都有降低,这种波动可能与胎儿垂体-性腺轴的负反馈调节机制的建立有关。

关键词 绵羊; 胎儿; 垂体; 促性腺激素细胞; 促黄体激素 亚单位

中图分类号 Q 492.5; Q 492.6

文章编号 1007-4333(2003)01-0095-04

文献标识码 A

Ontogeny of the fetal pituitary gonadotrophes and its relation to plasma LH_β concentration during gestation in sheep

Cui Sheng, Zhang Jianchao, Cao Xingyuan, Liu Jiali

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

Abstract In order to determine the ontogeny of the fetal pituitary LH_β expression and its relation to the plasma LH_β concentrations of the fetuses during gestation, the pituitary glands and blood samples of fetuses and postnatal lambs were collected at day 60, 90, 120 of gestation and the first day after birth, respectively. The expression of pituitary LH_β was then detected by immunofluorescences and plasma LH_β measured by bioassay (BA). The results demonstrated that very few scattered LH_β immunopositive cells were first detected in the pituitary gland on 60 d. By 90 d of gestation, there was a significant increase ($P < 0.01$) in the number of LH_β immunopositive cell which widely distributed throughout the anterior pituitary gland. However, there was a peak in the number of LH_β immunopositive cells at 120 d, which followed by a decline in the new-born lamb. The changing pattern of plasma B-LH concentrations was similar to the number of LH_β immunopositive cells and there was no obvious differences between male and female fetuses, at any age. These results suggest that the proliferation and differentiation of pituitary endocrinal cells occurs before the mid-gestation, and the regulating effects of gonadal steroid hormone on the anterior pituitary gland gets matured after the middle stage of the foetal development, although the related mechanisms need to be elucidated further.

Key words sheep; fetus; pituitary; gonadotrophes; LH

成年动物的生殖能力主要依赖于下丘脑-垂体-性腺轴的建立和完善,垂体处于轴系的中间环节,分泌的促性腺激素是参与生殖的重要激素。另外,胚胎移植、克隆与转基因动物等现代动物生物工程的研究和生产中遇到的一些难点,如胚胎早期丢失和流产等均与动物母体和胚胎体内激素的变化密切相关。因此,作者及其合作者曾研究了绵羊垂体中 LH

和 FSH 的细胞类型以及这 2 种激素与性激素之间的关系^[1~4],结果证明绵羊胚胎发育中期血浆促性腺激素(FSH 和 LH)浓度达到一个峰值,达到性成熟的水平。胚胎后期下降到一个较低水平,并持续到初情期。另外,有关动物体内 LH 含量的测定采用的 RIA 方法,虽然能比较精确地测定体内 LH 含量,但由于垂体前叶合成和分泌的 LH 与其受体结合的

收稿日期: 2002-12-27

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170693);教育部重点资助项目(01018)

作者简介:崔胜,教授,博士生导师,主要从事动物生殖与发育生物学研究,E-mail:cuisheng@mail.cau.edu.cn

能力、血浆中的半衰期等方面的差异^[5],RIA测定不能真实反映机体的生物活性(B-LH)。人、猪等动物体内 LH(LH的免疫活性)与B-LH有较大差异^[6-8],而B-LH的测定更能准确反映LH的生理功能。但是,在动物胚胎发育过程中垂体促性腺激素细胞的发生发育与胚胎循环液中B-LH的变化规律还不清楚。本研究拟从此角度进行探讨。

1 材料和方法

1.1 试剂和药品

α LH 抗血清由英国生殖生物学中心 A. S. McNeilly 教授赠送;FITC 标记驴抗兔 IgG 购自英国 SAPU 公司;睾酮放射免疫试剂盒购自中国原子能科学研究院; α LH 标准品 NIDDK- α LH-I-3 由日本东京农工大学 Taya 教授赠送;HAM'S/F12 和低糖 DMEM 培养基为 HYCLONE 公司产品;胰岛素转铁蛋白硒盐(ITS)培养基(含胰岛素 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、转铁蛋白 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、亚硒盐 $30 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及肽球蛋白、牛血清白蛋白片段(BSA)、谷氨酰胺、青霉素和链霉素等均购自 SIGMA 公司);24 孔培养板为 NUNC 公司产品。

1.2 实验动物

选择健康成年母绵羊 32 只,利用 PGF₂ 同期发情^[1,3],经自然交配后随机分成 4 组。分别在妊娠第 60、90 和 120 天对妊娠绵羊麻醉后按常规剖腹产方法将胚胎移出子宫后,经脐动脉采集胚胎血液,手术采集垂体;对于新生羔羊(出生后第 2 天)麻醉后经心脏采血后采集垂体组织。所有血样经离心分离血浆,在 -20°C 冷冻保存备用;所有的垂体组织用 4% 多聚甲醛固定后,按常规方法进行石蜡包埋。

1.3 LH 生物学测定

利用国际通用的 LH 刺激小鼠睾丸间质细胞分泌睾酮的方法来检测 LH 的生物学活性。步骤简述如下:取 56 周龄、体重(22 ± 2)g 的昆明小鼠睾丸实质组织,充分剪碎后加入胰蛋白酶-EDTA 消化液(含胰蛋白酶 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,EDTA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37°C 水浴振荡消化;离心弃上清液,加入培养基充分混合后再次离心,弃上清液。如此反复 2 次后,加入细胞培养液将细胞稀释到 10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,加 24 孔培养板后,在 CO₂ 培养箱中(O₂95%,CO₂5%, 37°C)培养。每一样品和标准品进行三孔平行培养测定。18 h 后细胞贴壁,去除培养液,每孔先加入新的 ITS 培养基 1.0 mL 后,加入不同剂量的 LH 标准品,LH 剂量分别为 0.1、0.3、1.0、3.0、10.0 和 30.0 ng $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。同时分别加

入 30 μL 的待测羊血清,培养 24 h 后收集培养液。

用放射免疫(RIA)方法测定睾酮(T)浓度。¹²⁵I-T 放射免疫测定盒购自中国原子能科学研究院同位素研究所。绘制 LH 和睾酮分泌量标准曲线;经统计处理模拟 S 型曲线的方程为 $x = -\ln((1 - y/7.6922)/1.077)$, x 为 LH 的质量浓度, y 为睾酮浓度;根据加入 30 μL 胚胎血清刺激间质细胞所分泌的睾酮量计算各妊娠时期胚胎 B-LH 浓度。

1.4 LH 的免疫荧光标记

对包埋的垂体组织作连续切片(厚 5 μm),将每第 10 张组织切片贴裱于经 APES 处理的载玻片后进行:1)对组织切片按常规方法脱蜡精水化;2)0.05 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris 缓冲液(TBS)漂洗后加 25% 的正常驴血清封闭 30 min;3)TBS 漂洗后加兔抗羊 LH 抗血清(1:500 稀释度),对照组滴加稀释后的正常兔血清(TBS 稀释:1:200),在 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱过夜;4)TBS 清洗后,加 FITC 标记驴抗兔 IgG(1:20),在湿盒中孵育 2 h;5)TBS 漂洗后,以 Hecchst 进行复染,显示细胞核;6)用 25% 的甘油封片。

1.5 细胞计数与统计

所有 LH 染色的垂体组织切片,在显微镜下选择垂体四周和中央共 5 个区域,用目镜计数器在高倍镜(10 \times 40)下计数,分别计算单位面积内的细胞总数和 LH 免疫组化染色阳性细胞,计算 LH 细胞阳性率。对于计数结果用 T 检验方法进行显著性检验($P < 0.05$ 为差异显著)。

2 结果

2.1 胎儿垂体中促性腺激素细胞的发生及变化

绵羊胚胎发育的 60、90、120 d 及新生期,垂体促性腺激素细胞经 LH 阳性标记观察(图 1)发现其数量一直上升(为 1.92%—4.7%—10.5%—8.3%)。雌性胎儿与雌性新生羔羊垂体 LH 阳性细胞率的变化呈相似的趋势,在发育的各个时期无显著的性别间差异($P > 0.05$) (图 2)。这一结果证明,在绵羊胎儿发育过程中,垂体促性腺激素细胞发生于胎儿发育的 60 d 前后,在胎儿发育中期功能最为活跃,在胚胎后期处于相对抑制状态。

2.2 绵羊胎儿血浆中 B-LH 的变化(图 3)

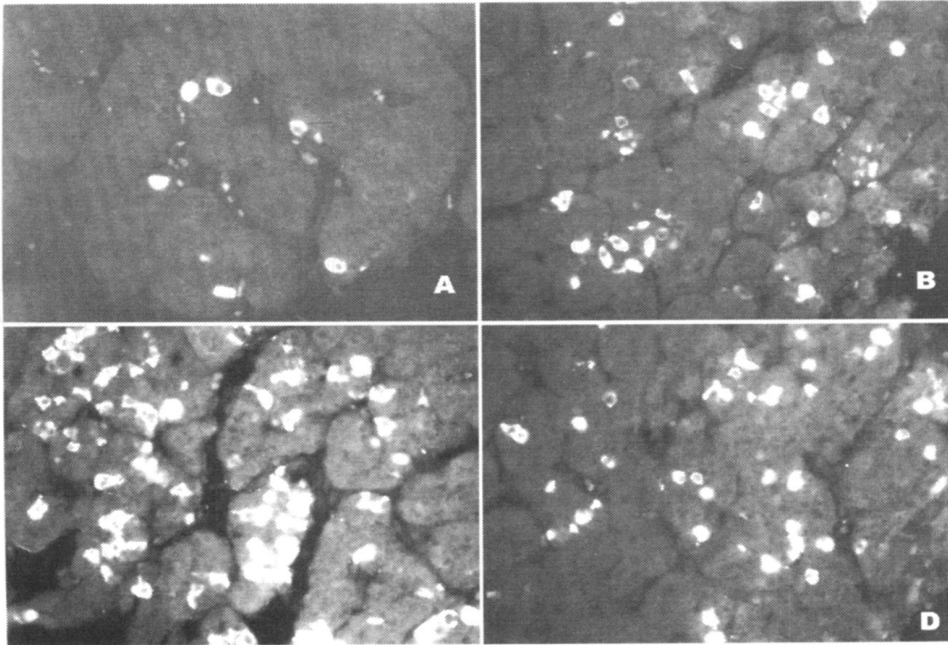
雄性胎儿发育早期(60 d),血浆 B-LH 质量浓度较低(4.41 ± 0.84) ng $\cdot \text{mL}^{-1}$,到中期(90 d)上升到(8.55 ± 0.78) ng $\cdot \text{mL}^{-1}$,但其后至新生期,血浆 B-LH 含量无显著变化。雌性胚胎血浆中 B-LH 的变化与

雄性胚胎具有相似趋势 ($P > 0.05$) ,但后期的第 120 天显著高于雄性胚胎 ($P < 0.05$) 。

3 讨 论

本研究用免疫荧光方法在发育至 60 d 的胎儿垂体中可检测到少量 LH β 阳性细胞。另外,我们前期的研究结果已证明绵羊的 FSH 和 LH 由同一种细胞分泌^[9]。由此证明,在绵羊胎儿发育过程中,垂体

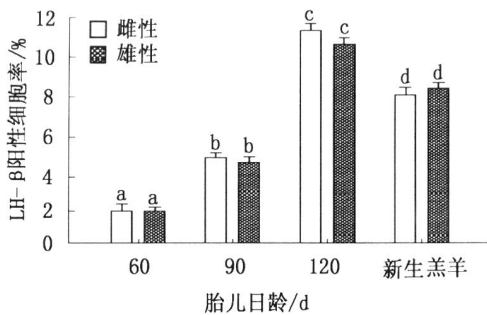
促性腺激素细胞发生于胚胎早期,比我们原先的报道早 10 d^[1,2]。随着胎儿的发育和垂体促性腺激素细胞的增殖,促性腺激素细胞的比率和密度增加,并持续到胚胎发育的 120 d。另外,促性腺激素细胞比率的变化与血浆 B-LH 含量的变化趋势相似。由此可以推论:在胚胎发育的早期,垂体促性腺激素细胞具有分泌功能,血浆 B-LH 含量的变化也与促性腺激素细胞数目变化有关。



A. 60 d,少量(占垂体细胞总数的 1.92%) ,散在分布; B. 90 d,显著增加(占 4.7%) ,均匀分布; C. 120 d,明显增加(占 10.5%) ; D. 新生期,下降(8.3%)

图 1 绵羊各胎龄垂体的阳性细胞(LH β 免疫荧光标记)的数量变化($\times 400$)

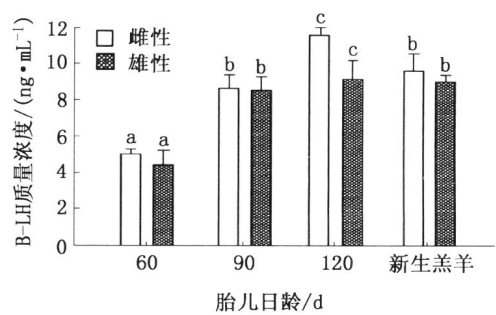
Fig. 1 Immunopositive cells in the pituitary gland of sheep fetuses



($n = 4$; 字母不同者差异显著, $P < 0.05$)

图 2 绵羊胚胎垂体中 LH β 的阳性细胞率

Fig. 2 Changes of LH β immunopositive cells in the pituitary gland of sheep fetuses



($n = 4$; 字母不同者为差异显著, $P < 0.05$)

图 3 不同发育时期绵羊胚胎血浆 B-LH 质量浓度

Fig. 3 Changes of plasma B-LH concentration in sheep fetuses

大多数哺乳动物的胚胎发育过程中,血浆促性腺激素的浓度在胚胎发育中期达到最高,而在早期和后期较低^[1]。本实验结果证明绵羊垂体促性腺激素细胞数目在胚胎发育的60 d之后升高,在120 d达到最高,这与血浆中LH的测定一致。目前,对胚胎早期垂体促性腺激素细胞增殖和分化的调控机理不十分清楚。但已知绵羊胎儿的GnRH神经元出现在35 d,并于50 d出现在正中隆起^[1],这时下丘脑与垂体门脉已经形成^[5],说明LH阳性细胞率的升高可能是与下丘脑分泌的GnRH的调节有关。

在胚胎发育后期至出生期,垂体促性腺激素细胞阳性率和血浆B-LH浓度均降低,且无显著的性别差异。一般认为,胚胎发育中期之后,垂体促性腺激素细胞数量的减少和功能的相对抑制与胚胎血液中性激素的负反馈调节机制有关。例如在胚胎发育的中期和后期,外源雌二醇可抑制LH的分泌,外源GnRH却可促进LH的释放;但在胚胎早期,外源雌二醇并不影响垂体促性腺激素细胞的增殖和分泌功能。再有,Cui用免疫双标技术证实,80%以上的促性腺激素细胞可以表达雌激素受体,说明雌激素直接调节促性腺激素的分泌^[3]。推测绵羊下丘脑-垂体-性腺轴可能建立于胚胎发育的中期,胚胎中期之后垂体促性腺激素细胞阳性率以及血浆B-LH浓度的降低可能是由于性腺激素的反馈调节作用所致^[1,2]。

利用本实验建立的绵羊B-LH测定方法对绵羊胚胎血液中LH的测定结果表明,在胚胎发育过程中B-LH的变化趋势与血浆中FLH的浓度(RIA测定法)变化相一致^[9]。另外,胎儿血浆中的B-LH浓度均低于所报道的FLH浓度。这与人^[6]、恒河猴^[7]和猪^[8]血浆B-LH的研究结果相似,并由此说明本实验建立的绵羊B-LH的测定方法可靠。虽然本B-LH测定法的灵敏度低于RIA,但B-LH浓度更能客观地反映其生理功能的变化。

4 结 论

在胚胎发育过程中,垂体中LH阳性细胞发生于胚胎发育的早期;垂体促性腺激素细胞的增殖和分化过程主要发生在胎儿发育的中期之前;垂体促

性腺激素细胞的功能活动在胚胎中期之后最为活跃;在胎儿后期垂体中LH阳性细胞率和血浆B-LH浓度的降低可能与胎儿垂体-性腺轴的负反馈调节机制的建立有关。

Dr A. F. Parlow, National Hormone and Pituitary Program, California 90509, USA, 日本东京农工大学 Taya 教授为本研究提供了部分 α LH标准品;英国生殖生物学中心 A. S. McNeilly 教授惠赠 α LH抗血清,在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Brooks A N, Hagan D M, Cui S, et al. Prenatal gonadotrophins in the sheep [J]. *Ani Reprod Sci*, 1996, 42: 471 ~ 481
- [2] Cui S, Brooks J, McNeilly A S. Changes in pituitary estrogen receptors during the oestrous cycle in ewe [J]. *J Endocrinol*, 1996, 144 (suppl): 342
- [3] Cui S, McNeilly A S, Brooks A N. Immunohistochemical distribution of estrogen receptor and luteinizing hormone B subunit in the ovine pituitary gland during fetal development [J]. *J Neuroendocrinol*, 1998, 10: 713 ~ 718
- [4] Brooks J, Cui S, Tortorese D J, et al. Pituitary receptors for GnRH, oestradiol and prolactin and the control of gonadotrophin secretion in the ewe [J]. *Reprod Dom Ani*, 1999, 34: 134 ~ 138
- [5] Vasantha P, Scott C C, Inese Z B. An improved in vitro bioassay for follicle stimulating hormone (FSH): suitable for measurement of FSH in unextracted human serum [J]. *Endocrinology*, 1987, 121: 1089 ~ 1098
- [6] Kaplan S L, Grumbach M M. The ontogenesis of human foetal hormones: Luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) [J]. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1976, 81: 808
- [7] Resko J A, Ellinwood W E. Negative feedback regulation of gonadotropin secretion by androgens in fetal rhesus macaques [J]. *Biol Reprod*, 1985, 33: 346 ~ 352
- [8] Michael M N, Vandalem J L, Georges H, et al. The ontogeny of hypothalamic pituitary function in the pig: I. Pituitary LH and FSH in the fetus and neonate [J]. *Mol cell Endocrinol*, 1985, 39: 119 ~ 124
- [9] 崔胜, 夏国良. 绵羊垂体促性腺激素细胞的细胞类型以及在发情周期内的变化 [J]. *中国农业大学学报*, 1998, 3: 114 ~ 118