

cGnRH对鸡卵泡膜细胞增殖的作用*

苏友强 汪琳仙

(中国农业大学生物学院,北京 100094)

摘要: 建立鸡卵泡膜细胞体外无血清贴壁培养模型,研究了鸡促性腺激素释放激素(cGnRH-Ⅰ)对鸡卵泡膜细胞增殖的作用。细胞在培养箱内预培养约24 h后进行各项处理,继续培养72 h后,分别用胰蛋白酶消化成单个细胞,然后计数。结果表明:cGnRH-Ⅰ能促进膜细胞增殖,作用效果具有剂量依赖关系;该促进作用能被GnRH拮抗剂(G-Ant)所阻断。这提示cGnRH-Ⅰ对膜细胞增殖的刺激作用有可能通过与膜细胞上特异的GnRH受体结合而起作用的。

关键词: 鸡卵泡膜细胞; 增殖; cGnRH-Ⅰ; 血清培养

中图分类号: Q492.5

促性腺激素释放激素(GnRH)除了控制垂体促性腺激素释放作用外,现有报道表明,在哺乳动物还有对卵巢的直接作用^[1~3]。GnRH对卵母细胞成熟分裂和甾类激素合成具有直接作用^[2,9];卵巢具有GnRH的结合位点^[4];在人及大鼠的卵内GnRH受体的mRNA被测定^[5];卵巢上存在有GnRH样物质^[6];大鼠卵巢GnRH基因的表达^[7]。这些研究说明卵巢水平上的GnRH或GnRH样物质具有非常重要的生理作用;这也提示卵巢有可能产生GnRH样物质,通过自分泌形式作用于卵巢。而在禽类,有关该方面研究,仅见Hetelemdg(1982)^[8]报道了哺乳动物GnRH能增强LH促鸡卵泡颗粒细胞孕酮分泌的效应。本研究室1990年以来,在研究同源GnRH(cGnRH-Ⅰ,cGnRH-Ⅱ)对鸡卵泡的作用中,已观察到cGnRH能刺激离体培养的膜细胞分泌雌激素^[9]。卵泡发育过程中,卵泡各种细胞的功能变化和其数量增殖均重要。但有关GnRH对鸡膜细胞增殖作用的研究还未见报道,本实验旨在研究cGnRH对卵泡膜细胞增殖的影响,进一步探明cGnRH在鸡卵泡发育过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 主要试剂:鸡促性腺激素释放激素(cGnRH-Ⅰ)由英国Dr. Sharp实验室赠送。胶原酶(Type-Ⅰ)、胰蛋白酶(Trypsin)、胰岛素(Ins)、转铁蛋白(Tf)、牛血清白蛋白(BSA, Fragmentv);均为Sigma公司产品。M199培养基购自GIBCO公司。GnRH拮抗剂(G-Ant [(Ac-D-phe¹ Dcpcl)phe²,D-Trp³⁻⁶]GnRH)由中科院计划生育生殖生物学开放实验室刘以训教授赠送。

实验动物:选择能连产6,7个蛋以上的White Leghorn蛋用种鸡,在一个产蛋序列开始前一个蛋产出后4~6 h,切断颈部血管放血将其杀死。剖腹取出第三及第五卵泡(F₃,F₅)立即放入冰冷的生理盐水(无菌)中备用。

1.2 方法

①膜细胞分离和无血清贴壁培养:参照 Gilbert^[10]的方法,分离相应卵泡的膜层,用培养液(M199,含10万单位青、链霉素/L;HEPES:0.42 g·L⁻¹;NaHCO₃:2.2 g·L⁻¹)漂洗三次,然后在直径为60 mm的玻璃平皿中用眼科剪迅速将其剪成1 mm³大小的组织块,并转移到50 mL离心管内,用0.1%胶原酶的恒温摇床中38°C下消化35 min;(分三次完成,第一次20 min,更换酶液;第二次10 min;第三次5 min。)之后用等体积冰冷的培养液终止反应,细胞经100目细胞筛过滤后,用50%的percoll梯度离心纯化,2 500 r·min⁻¹去上清液,加入新鲜培养液,继续离心8 min,共重复三次。所得细胞经0.1%台盼蓝染色检查活率在90%以上。膜细胞经计数后按每也4×10⁴个细胞/0.5 mL的浓度接种到24孔培养板内。所用完全培养液为由M199,内含10万单位青、链霉素/L;HEPES:0.42 g·L⁻¹;NaHCO₃:2.2 g·L⁻¹。生长因子为:InS:10 μg·mL⁻¹;Tf:5 μg·mL⁻¹;BSA:0.1%;谷氨酰胺:1.74 mmol·L⁻¹;硒酸钠(Se):3×10⁻⁸mol·L⁻¹;霍乱毒素(CT)10 μg·mL⁻¹。上述细胞置于含5%CO₂的空气,饱和湿度,38°C培养箱内培养。

②激素处理:上述膜细胞培养到完全贴壁生长后(约24 h),用培养液洗涤两次,更换新的完全培养液,然后用cGnRH-I、G-Ant处理,继续培养72 h。

③膜细胞计数:将上述细胞用PBS(0.1 mol·L⁻¹)pH7.4)洗涤两次,然后加入含0.1% Trypsin 无钙、镁离子的PBS-EDTA消化液,在37°C下消化约30 min。用含5%小牛血清的PBS终止反应。分别收集经消化分散的单个细胞,在倒置显微镜下用血细胞计数板计数。

④实验次数及数据处理:实验重复三次以上。实验数据依实验设计进行相应的统计分析。各激素处理组与对照组之间的比较采用t检验;各处理组之间互比较则用方差分析。

2 结果和讨论

2.1 cGnRH-I对鸡卵泡膜细胞增殖的作用 膜细胞培养液中单加不同剂量的cGnRH-I(25,50,100,250,500 ng·0.5 mL⁻¹(孔))对膜细胞增殖作用见图1。膜细胞经激素处理后继续培养72 h,细胞数量均相应增加。对照组细胞数目也有所增加。由初接种量4×10⁴个细胞/孔增加到(5.75±0.96)×10⁴(F₃), (6.80±0.96)×10⁴(F₅)。分别增加43.7%和70.0%。以对照组的细胞数目的平均值作为100,各激素处理组比对照组增加的百分数分别为,F₃:4.3%,16.4%,56.1%,38.6%,21.4%;F₅:34.2%,64.3%,138.0%,88.7%,49.8%。经t检验,在F₃卵泡,100 ng和250 ng处理组显著高于对照组(P<0.05);在F₅卵泡,各剂量均显著(P<0.05)或及显著(P<0.01)高于对照组,且以100 ng效果最好。该结果表明cGnRH-I对鸡卵泡细胞(F₃,F₅)增殖具有刺激作用,而且在一定范围内呈现剂量依赖关系,其中以100 ng·0.5 mL⁻¹最好。同时,小卵泡F₅(直径约10 mm)膜细胞增殖速率要比较大卵泡F₃(直径约20 mm)快,这说明小卵泡对cGnRH-I的刺激反应较为敏感。

2.2 GnRH拮抗剂(G-Ant)对cGnRH-I促卵泡膜细胞增殖作用的阻断效应 以100 ng的cGnRH-I(G100)或100 ng的cGnRH-I与G-Ant(10⁻⁵mol·L⁻¹)(G-100+G-Ant)同时处理贴壁培养的F₅卵泡的膜细胞,培养72 h后的增殖结果见图2。单加cGnRH-I(100 ng),细胞数目比对照组增加115.8%,差异极显著(P<0.01)。而G100+G-Ant处理组,细胞数目则降低到接近对照组水平,仅比对照组高6.1%,差异不显著(P>0.05);与G100处理组相比差异极显著(P<0.01)。该结果表明GnRH拮抗剂能阻断cGnRH-I对膜

细胞增殖的刺激作用;说明 cGnRH- I 对鸡卵泡膜细胞增殖的刺激作用有可能是通过与卵泡膜表面上的 cGnRH 受体结合而起作用的。鸡卵泡膜细胞表面存在特异的 cGnRH 受体, 还有待于进一步证实。

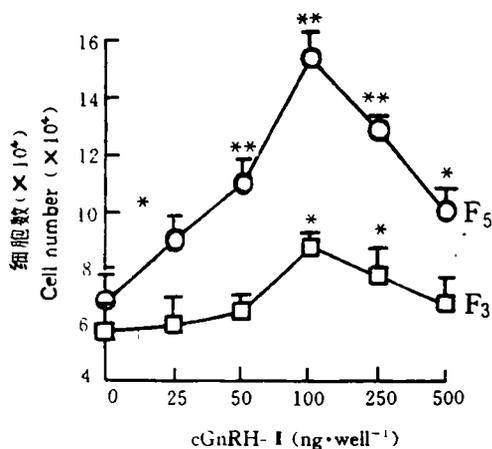


图 1 cGnRH- I 对鸡 F₃, F₅ 卵泡膜细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of cGnRH- I on the proliferation of chicken theca cells(F₃, F₅)

GnRH- I 处理 72 h 后检查结果。实验数据为平均值±标准误 (n=4)。* P<0.05; ** P<0.01(与对照组相比)。

The resulted were checked after 72 hours challenged by cGnRH- I . The value indicates Mean±SE. * P<0.05; ** P<0.01(compared to control)

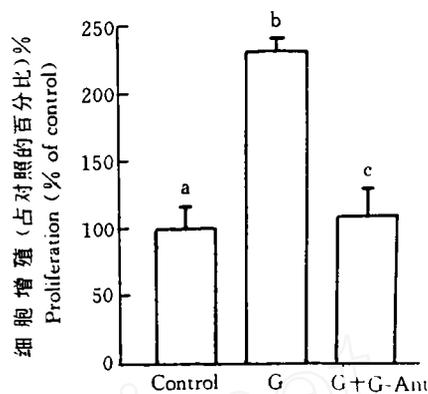


图 2 G-Ant 对 cGnRH- I 促鸡卵泡膜细胞增殖的抑制效应

Fig. 2 Inhibitory effect of G-Anton cGnRH- I -stimulating the proliferation of chicken theca cells (F₅)

处理 72 h 后检查结果。实验数据为平均值±标准误 (n=6)。b 与 a, b 与 c 差异极显著(P<0.01)

The results were checked after 72 hours challenged by cGnRH- I or cGnRH- I with G Ant. The value indicates Mean±SE (n=6). A significant difference (P<0.01)was observed between b to a and b to c.

参 考 文 献

- 1 Hsueh A J W, Jones P B S. Gonadotropin releasing hormone: extrapituitary actions and paracrine control mechanisms. *An Rev Physiol*,1983, 45:83~94
- 2 Hillensjo T. Gonadotropin-releasinf hormone agonist stimulate meiotic maturation of follicle-enclosed rat oocytes *in vitro*. *Nature*,1980,287:145~146
- 3 Hsuech A J W. Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone:direct inhibition of ovarian streoidgenesis. *Science*,1979,204:854~855
- 4 Claytn R N, Harwood J P. Gonadotropin-releasing hormone analogue binds to luteal cells and inhibits progesterone production. *Nature*,1979,282:90~92
- 5 Eidne K A. Cell specific expression of gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA in rat ovary. *Molecular and Cellular Endocr*, 1992,90:5~9

- 6 Aten R F. Ovarian gonadotropin-releasing hormone like protein(s); demonstration and characterization. *Endocrinology*, 1986, 118: 961~967
- 7 Goubau S. Partial characterization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene transcript in the rat ovary. *Endocrinology*, 1992, 130: 3094~4000
- 8 Hetelendy F et al. Synergistic effect of gonadotropin releasing hormone on LH-stimulated progesterone production in granulosa cells of the domestic fowl. *Gen Comp Endocr*, 1982, 48: 117~122
- 9 赵畅, 汪琳仙. 鸡促性腺激素对鸡卵泡膜细胞分泌雌二醇的作用. *北京农业大学学报*, 1993, (19): 87~91
- 10 Gilbert A B A. Method for separating the granulosa cells, the basal lamina and theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl. *J Reprod Fert*, 1970, 50: 179~181

Effect of Chicken Gonadotropin Releasing Hormone on the Proliferation of Theca Cells from Chicken Follicles

Su Youqiang Wang Linxian

(College of Biological Sciences, CAU, Beijing 100094)

Abstract: The model of attached serum free culture system was established to evaluate the effect of chicken gonadotropin releasing hormone (cGnrh- I) on the proliferation of theca cells from chicken follicles (F3, F5). Theca cells were challenged with different agents after 24 hours preincubation. Having been cultured for 72 hours, the theca cells were dissociated with trypsin and their number were counted. The results indicated that cGnRH- I was capable of stimulating the theca cells proliferation in a dose-dependent manner. This effect could be blocked by a GnRH- I antagonist. This suggested that the effects of cGnRH- I perhaps mediated cGnRH the binding of the specific GnRH receptors on the theca cell membrane.

Key words: chicken follicular theca cells; proliferation; cGnRH- I; serum free culture system