

# 卵泡刺激素和雌激素对培养的鸡胚卵巢生殖细胞增殖的影响

解美娜, 张才乔\*, 米玉玲, 曾卫东

(浙江大学 动物科学学院, 浙江 杭州 310029)

**摘要:** 在动物体内多种激素共同调控着卵巢生殖细胞的生长、发育和成熟, 其中促性腺激素起着至关重要的作用。本实验建立了鸡胚(18日胚龄)卵巢构建生殖细胞和体细胞的共培养模型, 并研究卵泡刺激素(FSH)、 $17\beta$ 雌二醇( $E_2$ )以及二者联合处理对生殖细胞增殖的影响。结果发现 FSH (0.25 ~ 1.0 IU/mL)、 $E_2$  (10 ~ 1 000 ng/mL) 处理 48 h 后均可显著促进生殖细胞的增殖, FSH 与  $E_2$  共同处理作用更加显著且高于其单独处理组, 表明 FSH 和  $E_2$  可协同刺激鸡胚卵巢生殖细胞的增殖, FSH 可能是通过促进雌激素或其受体的合成而发挥作用。

**关键词:** 卵泡刺激素; 雌激素; 生殖细胞; 鸡胚; 卵巢

中图分类号: Q45 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 5853(2004)01 - 0053 - 04

## Effects of Follicle-stimulating Hormone and Estrogen on Development of Embryonic Chicken Germ Cell *in Vitro*

XIE Mei-na, ZHANG Cai-qiao, MI Yu-ling, ZENG Wei-dong

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** The proliferation, development and maturation of ovarian germ cells are regulated by multiple hormones, among which gonadotropins play a key role. In this study a germ-somatic cell coculture model of 18-day-old chicken embryo ovarian cells was established to evaluate effects of follicle-stimulating hormone (FSH) and  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) alone or in combination on germ cell proliferation. Results showed that FSH (0.25 - 1 IU/mL) and  $E_2$  (10 - 1 000 ng/mL) both showed a notable increment in germ cells number after 48 h treatment. Furthermore, FSH manifested a synergistic effect with  $E_2$  in stimulating germ cell proliferation. These results indicated that FSH might interact with estrogen to promote embryonic ovarian germ cell proliferation. FSH might exert its action by stimulating the synthesis of estrogen or expression of its receptors.

**Key words:** Follicle-stimulating hormone; Estrogen; Germ cell; Chicken embryo; Ovary

卵母细胞的发育是一个复杂的调控过程, 下丘脑和腺垂体分泌的激素(促性腺激素释放激素、促性腺激素)以及卵巢内调节因子(性激素、卵巢肽类激素和生长因子)控制着生殖细胞的增殖、分化和凋亡。FSH 细胞最早出现在 D4.5 鸡胚垂体中, 在 D6.5 鸡胚左侧卵巢中即可出现 FSH 受体表达, 其表达量随鸡胚的发育而逐渐增加, 相应地刺激卵巢性激素的合成, 并促进卵母细胞的发育。有关 FSH 对卵巢颗粒细胞分化、激素分泌及卵泡体外增

殖的作用已进行了较多的研究。FSH 能促进许多哺乳动物卵母细胞的体外成熟 (Junk et al, 2003; Schoevers et al, 2003; Choi et al, 2000) 和未成熟小鼠腔前卵泡的体外发育 (Wang et al, 2001)。此外, FSH 还能刺激体外培养鸡胚卵巢 DNA 和 P450arom mRNA 合成 (Velazquez et al, 1997; Gomez et al, 2001), 促进细胞增殖及类固醇激素分泌 (Pedernera et al, 1999; Mendez et al, 1998)。在鸟类中, 雌激素被认为在性腺分化中起关键性作

\* 收稿日期: 2003 - 06 - 23; 接受日期: 2003 - 10 - 17

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (302352); 国家自然科学基金资助项目 (30371051)

\* 通讯作者, E-mail: cqzhang@zju.edu.cn

用。在 D3.5 和 4.5 雌性或雄性鸡胚性腺中即可检测出 ER $\alpha$  mRNA (Smith et al, 1997), D5.5 ~ 6.5 鸡胚性腺可分泌雌激素, D7.5 的性腺已存在 ER 蛋白。1 日龄雏鸡的卵巢体细胞和初级卵母细胞中可检测到 ERs (Mendez et al, 1999)。我们先前的实验发现 16 日龄以前鸡胚左侧卵巢中 FSHR mRNA 水平始终维持较低水平, 从 18 日龄开始稳步上升, 在出壳后 1 d 内达到高峰 (Mao et al, 2000)。单独游离培养生殖细胞因缺乏体细胞的支持而难以在无血清培养液中长时间存活。但在无血清 ITS 培养体系中体细胞与生殖细胞共培养后, 生殖细胞以贴壁生长的体细胞为基质, 生长良好且便于观察, 对外界激素作用敏感, 可作为评价激素、药物、毒物内分泌作用的体外培养模型。本实验采用此实验模型, 研究了 FSH 和 E<sub>2</sub> 对 18 日龄鸡胚卵巢生殖细胞体外发育的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

艾维茵鸡胚 (购自杭州正大肉鸡中心), 在 38 °C, 60% 湿度条件下孵化至 18 日胚龄。

### 1.2 细胞培养模型的建立

取出 18 日胚龄鸡胚卵巢, 用生理盐水冲洗后将卵巢剪成 1 mm<sup>3</sup> 左右的小块, 用 1 mg/mL 胶原酶 (GIBCOBRL) 在 37 °C 消化 2 次, 第一次 15 min, 第二次 10 min, 100 目滤网过滤, 滤液离心 (1 000 r/min, 10 min), 重复 3 次。取少量细胞悬液加入等体积 0.1% 台盼兰, 用血球计数板计数, 细胞存活率在 90% 以上。细胞按 5 × 10<sup>4</sup> 个/孔的密度接种到 96 孔细胞培养板 (Nunc)。培养液为无血清的 McCoy's 5A 培养液, 其中添加胰岛素 (10 μg/mL)、转铁蛋白 (5 μg/mL) 和亚硒酸钠 (3 × 10<sup>-8</sup> mol/L) (ITS 培养液), 培养同时用猪 FSH (0.25 ~ 1.0 IU/mL, 宁波激素制品厂) 和 E<sub>2</sub> (1 ~ 1 000 ng/mL, Sigma) 处理, 对照组仅添加生长因子, 每个处理组 4 孔。将细胞放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养 (39 °C, 5% CO<sub>2</sub>)。实验重复 3 次。

### 1.3 细胞生长状况的观察

观察细胞贴壁状况及细胞的增殖和形态变化, 培养 48 h 后, 每孔选 4 个视野用显微数字成像系统 (Pixera Pro 150ES, Pixera 公司) 拍照, 用图象分析软件 Simple PCI (Compix, Inc.) 测量生殖细胞的直径并计数。

## 1.4 数据分析

所得数据采用 SAS (6.12 版本) 软件中 GLM 过程进行方差分析及 Duncan's 多重比较, 检验误差为 5% 和 1% 水平。

## 2 结果

刚分离的卵巢细胞中, 包含生殖细胞 (主要是卵原细胞和部分初级卵母细胞)、颗粒细胞、类固醇生成细胞和上皮细胞等, 其中生殖细胞直径较大, 体细胞直径相对较小。培养 24 h 细胞基本贴壁, 其中体细胞包括颗粒细胞及上皮细胞等均贴在培养板底部, 呈梭状生长; 培养 48 h 基本铺满整个板底, 生殖细胞呈圆形或椭圆形紧贴生长于其上。细胞在无血清但添加生长因子的培养体系中可存活 10 d 以上。

培养 48 h 后, FSH、E<sub>2</sub> 及 E<sub>2</sub> + FSH 处理组生殖细胞直径未见显著变化, 但 FSH 和 E<sub>2</sub> 处理组生殖细胞较对照组轮廓更清晰、立体感更强 (图 1)。FSH (0.25 ~ 1 IU/mL) 处理组生殖细胞数目显著增多 ( $F_{3,12} = 15.68, P < 0.01$ ) (图 2)。1 ng/mL 的 E<sub>2</sub> 处理后生殖细胞数目无明显改变, 但 10 ~ 1 000 ng/mL E<sub>2</sub> 处理组生殖细胞数目显著增多 ( $F_{4,15} = 40.58, P < 0.01$ ) (图 3)。所有 E<sub>2</sub> + FSH (0.5 IU/mL) 处理组生殖细胞数目均显著高于对照组 ( $F_{4,15} = 70.77, P < 0.01$ ), 且在 E<sub>2</sub> 浓度高于 10 ng/mL 时, 细胞数目显著高于 0.5 IU/mL FSH 或相应 E<sub>2</sub> 单独处理组 ( $F_{9,30} = 42.04, P < 0.05$ ); 并在保持 FSH 浓度不变的情况下, 随 E<sub>2</sub> 浓度的升高细胞数目也增多 (图 3)。

## 3 讨论

禽类卵巢内有雌激素的特异核结合位点, 且雌激素受体蛋白大量存在于鸡胚左侧卵巢皮质内 (Andrews et al, 1997), 预示着雌激素在生殖细胞分化和发育中起着关键性的作用。雌激素的生理作用是由 ER 调控的, 哺乳动物和鸟类中均可检测出两种 ER 亚型。禽类的 ER cDNA 与人的 ER 具有同源性 (> 80%) (Krust et al, 1986)。在鸟类及其他脊椎动物中, 芳香化酶是雌激素合成中的一个关键酶。芳香化酶基因在性腺性别分化期间只在雌性鸡胚中表达, 而在雄性中表达量极低。ER 基因的表达最早在 D3.5 鸡胚性腺中即可检测出。E<sub>2</sub> 处理早期鸡胚会刺激 ER $\alpha$  和 P450arom mRNA 在性腺中的

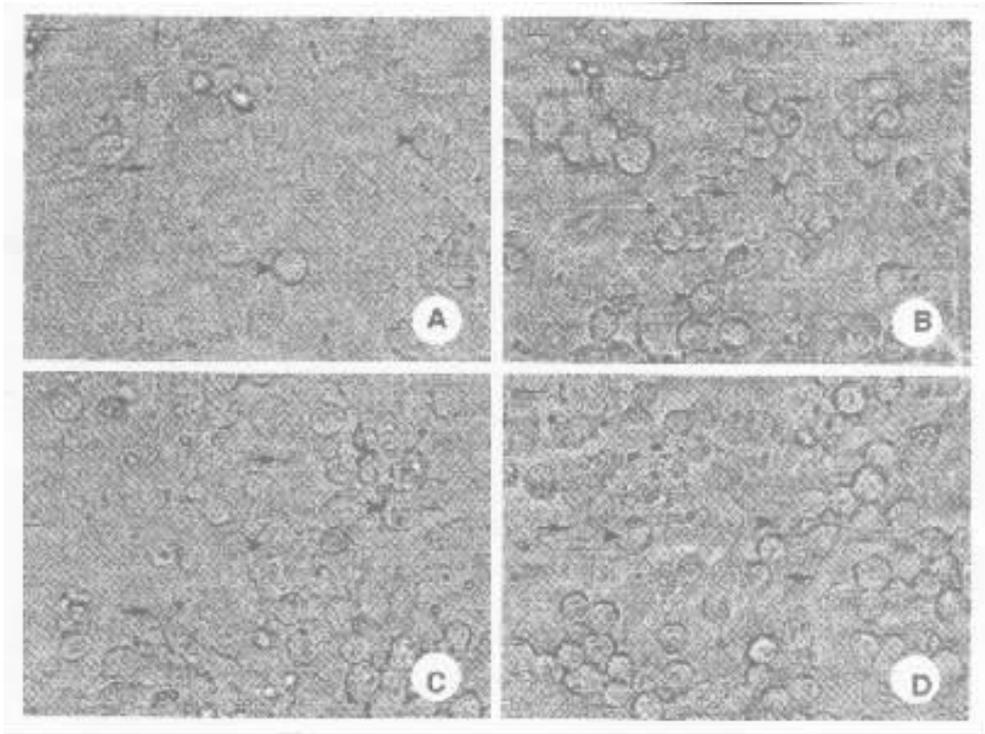


图 1 FSH 和 E<sub>2</sub> 处理后鸡胚卵巢生殖细胞的形态变化

Fig.1 Morphological changes of embryonic chicken ovarian germ cells after treatment with FSH and E<sub>2</sub> in serum-free medium for 48 hours

标尺 10 μm (Bar 10 μm); →示体细胞 (Somatic cell); ▶示生殖细胞 (Germ cell)

- A. 对照组卵巢细胞 (Ovarian cells of control group);
- B. 0.5 IU/mL FSH 处理组卵巢细胞 (Ovarian cells of 0.5 IU/mL FSH-treated group);
- C. 100 ng/mL E<sub>2</sub> 处理组卵巢细胞 (Ovarian cells of 100 ng/mL E<sub>2</sub>-treated group);
- D. 0.5 IU/mL FSH + 100 ng/mL E<sub>2</sub> 处理组卵巢细胞 (Ovarian cells of 0.5 IU/mL FSH combined with 100 ng/mL E<sub>2</sub>-treated group)

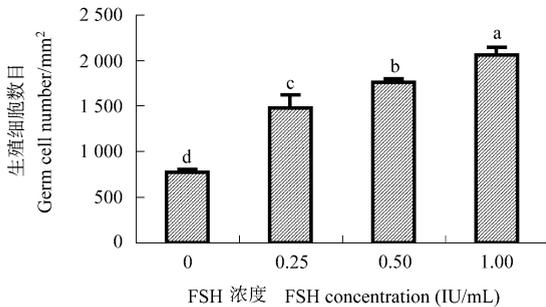


图 2 FSH 对无血清培养 48 h 的鸡胚卵巢生殖细胞增殖数目的影响

Fig.2 Effect of FSH on germ cell proliferation of chicken ovary after 48 h in serum-free medium

不同字母表示差异显著 (Duncan's 多重比较:  $P < 0.05$ ,  $n = 4$ )

Bars with different superscripts were statistically different (Duncan's test:  $P < 0.05$ ,  $n = 4$ )

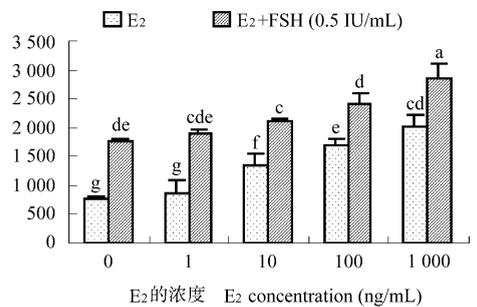


图 3 E<sub>2</sub> 和 FSH 对无血清培养 48 h 的鸡胚卵巢生殖细胞增殖数目的单独和联合作用

Fig.3 Effect of E<sub>2</sub> alone and in combination with FSH on germ cell proliferation of chicken ovary in serum-free medium

表达 (Nishikemi et al, 2000; Sakimura et al, 2002)。哺乳动物中, ER 存在于颗粒细胞与黄体细胞, 在小鼠和人未成熟卵母细胞中也检测出 ER mRNA (Revelli et al, 1996)。本实验中  $E_2$  对培养的鸡胚卵巢生殖细胞增殖的显著刺激提示,  $E_2$  可能通过刺激 ER $\alpha$  和 P450arom mRNA 的表达或直接与生殖细胞上的 ER 结合而发挥作用。

卵巢雌激素的合成主要受腺垂体分泌的 FSH 的调控。FSH 是由动物垂体前叶嗜碱性细胞合成和分泌的一种糖蛋白类促性腺激素, 对雌性动物有刺激卵泡发育、促进排卵的作用。Pedrera et al (1999) 用 hFSH 处理体外培养的 D8 ~ 18 鸡胚卵巢, 发现 hFSH 能促进 D15、18 卵巢总细胞数增加, 培养液中  $E_2$  和睾酮分泌增多。此外, 也有报道 hFSH 和 rhFSH 促使体外培养 D18 鸡胚卵巢细胞

P450arom mRNA 表达增加 (Gomez et al, 2001)。在本实验中, FSH 能够提高鸡胚卵巢生殖细胞的增殖活性, 生殖细胞数目显著增加, 且存在剂量效应关系, 同时细胞的立体感增强, 说明 FSH 可促进生殖细胞的发育。FSH 的作用途径可能是通过促进 P450arom 合成量增加促进雄激素转化成雌激素, 也可能直接与体细胞 FSH 受体相结合通过细胞间的信号传导而间接促进生殖细胞的增殖。FSH 能促进雌激素合成以及 FSH 和  $E_2$  均可促进 P450arom mRNA 的表达可解释 FSH 与  $E_2$  的协同作用。

本实验通过体外鸡胚卵巢体细胞和生殖细胞共培养为生殖细胞体外培养提供了一个良好模型, 同时证明一定浓度的 FSH 和  $E_2$  均能提高生殖细胞的增殖活性, 并且具有协同作用。

## 参考文献:

- Andrews JE, Smith CA, Sinclair AH. 1997. Site of Estrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **108**: 182-190.
- Choi YH, Carnevale EM, Seidel GE, Squires EL. 2000. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199 [J]. *Theriogenology*, **56**: 661-670.
- Gomez Y, Velazquez PN, Peralta-Delgado I, Mendez MC, Vilchis F, Juarez-Oropeza MA, Pedrera E. 2001. Follicle-stimulating hormone regulates steroidogenic enzymes in cultured cells of the chick embryo ovary [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **121**: 305-315.
- Junk SM, Dharmarajan A, Yovich JL. 2003. FSH priming improves oocyte maturation, but priming with FSH or hCG has no effect on subsequent embryonic development in an *in vitro* maturation program [J]. *Theriogenology*, **59**: 1741-1749.
- Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bomert JM, Chambon P. 1986. The chicken oestrogen receptor sequence: Homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors [J]. *EMBO. J.*, **5**: 891-897.
- Mao X, Zhang CQ, Saito N, Shimada K. 2000. Expression of messenger ribonucleic acids of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in the embryonic and posthatch gonads of chicken [J]. *Jpn. Poult. Sci.*, **37** (4): 212-220.
- Mendez MC, Tamez L, Candido A, Reyes-Esparza JA. 1998. Follicle stimulating hormone increases somatic and germ cell number in the ovary during chick embryo development [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **111**: 207-215.
- Mendez MC, Chavez B, Echeverria O, Vilchis F, Vazquez-Nin GH, Pedrera E. 1999. Evidence for estrogen receptor expression in germ cell and somatic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken [J]. *Cell Tissue Res.*, **298**: 145-152.
- Nishikimi H, Kansaku K, Saito N, Usami M, Ohno Y, Shimada K. 2000. Sex differentiation and mRNA expression of P450arom and AMH in gonads of the chicken [J]. *Molecular Reproduction and Development*, **55**: 20-30.
- Pedrera E, Solis L, Peralta I, Velazquez PN. 1999. Proliferation and steroidogenic effects of follicle-stimulating hormone during chick embryo gonadal development [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **116**: 213-220.
- Revelli A, Pacchioni D, Cassoni P, Bussolati G, Massobrio M. 1996. *In situ* hybridization study of messenger RNA for estrogen receptor and immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the human ovary [J]. *Gynecol. Endocrinol.*, **10**: 177-186.
- Sakimura M, Tsukada A, Usami M, Hanzawa S, Saito N, Ohno Y, Shimada K. 2002. Effect of estradiol and nonylphenol on mRNA expression of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and cytochrome P450 aromatase in the gonad of chicken embryos [J]. *Journal of Poultry Science*, **39** (4): 302-309.
- Schoevers EJ, Kidson A, Verheijden JH, Bevers MM. 2003. Effect of follicle-stimulating hormone on nuclear and cytoplasmic maturation of sow oocytes *in vitro* [J]. *Theriogenology*, **59**: 2017-2028.
- Smith CA, Andrews JE, Sinclair AH. 1997. Gonadal sex differentiation in chicken embryos: Expression of estrogen receptor and aromatase genes [J]. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **60**: 295-302.
- Velazquez PN, Peralta I, Pedrera E. 1997. Proliferative effect *in vitro* of follicle-stimulating hormone on the left ovary of the chick embryo [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **105**: 40-49.
- Wang HB, Xia GL, Li ML, Guo Y. 2001. Effect of recombinant human follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor on the development of oocyte-granulosa complexes of immature mice *in vitro* [J]. *Developmental and Reproductive Biology*, **10** (1): 21-30.