

## 绵羊胎儿发育期母体和胎儿血浆中促卵泡激素的变化

曹兴元 崔胜 邵育静 杜申

(中国农业大学 生物学院, 北京 100094)

**摘要** 为了认识动物胎儿期垂体-性腺轴调节机制的发生,本研究建立了绵羊促卵泡刺激素(FSH)的生物学测定方法,并用该方法测定和研究了绵羊不同发育时期的胎儿及母体血浆中促卵泡激素 FSH 含量(B-FSH)。结果证明,在绵羊胎儿发育的早期(60 d),血浆中 B-FSH 含量较低,但在中期(60~120 d)显著升高( $P < 0.05$ ),而后期至羔羊新生期显著降低( $P < 0.05$ )。雄性胎儿中期血浆 B-FSH 含量显著高于雌性胎儿,其他时期无显著的性别差异。在妊娠 60~90 d 间,母体血浆 FSH 较高,之后显著降低( $P < 0.05$ )并持续到出生期。在胎儿发育过程中母体血浆中 B-FSH 的变化与胎儿血浆 B-FSH 的变化无显著的相关性。

**关键词** 促卵泡素;生物学测定法;绵羊;胎儿

**中图分类号** Q492.5;Q492.6

**文章编号** 1007-4333(2003)01-0099-04

**文献标识码** A

## Changes of plasma FSH concentrations of the fetuses and maternal ewes during gestation

Cao Xingyuan, Cui Sheng, Shao Yujing, Du Shen

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

**Abstract** In order to determine the ontogeny of the pituitary-gonad axis regulating mechanism during sheep fetal development, the changes of plasma FSH concentrations of the fetal and adult sheep during gestation were measured by bioassay (BA). The results demonstrated that there was a sharp increase of FSH concentration of the male fetuses from 60 to 90 d of gestation. At 120 d of gestation, FSH concentration of the fetuses kept the similar level as that of the fetuses on 90 d, which followed by a significant decrease at new birth. The changing patterns of both male and female fetuses were similar, but FSH concentrations of the male fetuses from 90 to 120 d were markedly higher ( $P < 0.05$ ) than that of the females. For the adult, FSH concentrations were significant higher at 60 and 90 d of gestation than that at 120 d and new birth. No obvious correlation was observed between the changing patterns of the fetuses and the adults during the gestation. The above results are important to elucidate the regulating mechanisms of animal reproduction and investigate the related problems in animal embryonic engineering.

**Key words** FSH; bioassay; ovine; fetus

卵泡刺激素(FSH)是动物重要的生殖激素之一,其对成年生殖活动的调节功能以及与生理条件的关系已有大量深入的研究。现有研究<sup>[1~4]</sup>证明,在绵羊胎儿发育过程中垂体促性腺激素(FSH和LH)细胞发生于胎儿早期,中期时具有免疫活性的FSH(F-FSH)浓度达到一个峰值,后期下降到一个较低水平,并持续到青春性成熟之前。另外,利用放射免疫方法(RIA)对绵羊胎儿发育过程血浆中FSH含量的分析证明,其变化与垂体的促性腺激素细胞

发育与其FSH-mRNA呈现相似的变化规律<sup>[1,4]</sup>。但是,这种FSH的变化规律如何?雌雄胎儿血液中FSH浓度的变化是否有性别差异?胎儿与母体血液中FSH含量有何变化关系?这些均是生殖生物学有待研究的问题。

现在动物体内FSH含量多用RIA法测定。但由于垂体前叶合成和分泌的FSH的受体结合能力、血浆中的半衰期等方面均存在差异<sup>[5]</sup>,所以RIA法虽能较精确地测定体内FSH含量,但并不能完全反

收稿日期:2002-09-03

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:曹兴元,硕士研究生;崔胜,教授,导师,主要从事动物生殖与发育生物学研究, E-mail: cui sheng @cau. edu. cn

映其在体内的生物活性。对于人、猪及其他动物体内 FSH(FSH 的免疫活性)与 B-FSH 之间的比较结果显示,两者存在的较大差异<sup>[6~8]</sup>,测定 B-FSH 更能准确地反映 FSH 的生理功能。但到目前还没有建立绵羊 B-FSH 的测定方法。本研究的主要目的是根据人的 B-FSH 检测模型<sup>[5]</sup>,建立绵羊 B-FSH 检测方法,并研究绵羊胎儿发育期、母体和胎儿血浆 FSH 生物学活性的变化,揭示绵羊胎儿血浆 B-FSH 的变化模式。对进一步研究胎儿下丘脑-垂体-性腺轴的发生发育和调节的机制以及解决物生物工程中遇到的一些难点如胎儿的早期丢失和流产等提供重要的实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和药品

实验用雌二醇放射免疫试剂盒购自中国原子能科学研究院;FSH 标准品 NIDDK-oFSH-RP-1 由日本东京农工大学农学部赠送;19-羟基雄烯二酮购自 SIGMA 公司。HAM'S/F12 和低糖 DMEM 培养基为 HYCLONE 公司产品。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、牛血清白蛋白片断(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

1) 选择健康成年母绵羊 32 只,用 PGF<sub>2</sub> 同期发情<sup>[1,3]</sup>,经自然交配后随机分成 4 组。分别在妊娠第 60、90、120 天,采集母体血样后 1 h 进行,麻醉按常规行剖腹产,经脐动脉采集胎儿血液;新生羔羊(出生后第 2 天)麻醉后经心脏采血。所有血样离心分离血浆, -20℃ 冷冻保存备用。

2) 5~6 周龄、体重(22±2)g 的雄性昆明小鼠购自中国科学院遗传所实验动物中心。

### 1.3 FSH 生物学活性测定

1) 培养液 由 HAM'S/F12 和低糖 DMEM 以 1:1 混合而成,添加 BSA  $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、肽球蛋白  $0.25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、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  $30 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、谷氨酰胺  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、青霉素  $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  和链霉素  $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2) 将 5~6 周龄小鼠脱臼处死,无菌条件下取出睾丸,在玻璃平皿中,分离出睾丸实质,用 PBS 平衡盐溶液清洗 5 次后剪碎并混合。加入胰蛋白酶-EDTA 消化液(胰蛋酶的最终质量浓度为  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,EDTA 质量浓度为  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),37℃ 水浴

振荡消化 5 min,移入 20℃ 水浴终止反应。收集上清液,用 150 目不锈钢网过滤后室温离心( $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ )10 min,弃去上清液后,加入培养基并充分混合后离心,再次弃去上清液。如此反复 2 次,吸取 0.1 mL 细胞悬液,用 0.1% 台盼蓝染色计算出的细胞活率为 92%。再用培养基将细胞稀释到  $10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ,并加入到 24 孔培养板上在培养箱中( $\text{O}_2$ 95%, $\text{CO}_2$ 5%,37℃)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,去除培养液并分为 2 组:1) 标准曲线组即每孔先加入新的 ITS 培养基 1.0 mL(含 19-羟基雄烯二酮  $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[4]</sup>,然后加入一系列不同剂量的 FSH 标准品:0.039、0.078、0.156、0.313、0.625、1.25 和  $2.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;2) 样品组即各孔分别加入 30  $\mu\text{L}$  的待测羊血清,培养 24 h 后收集培养液,用放射免疫方法测定雌二醇( $\text{E}_2$ )含量。通过血样中  $\text{E}_2$  含量计算出血浆 B-FSH 浓度(图 1)。

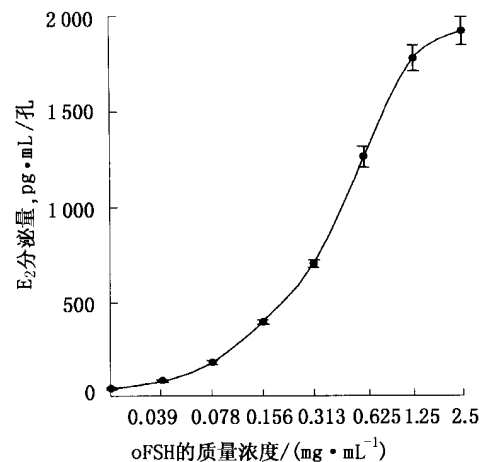


图 1 不同浓度 oFSH 对小鼠睾丸支持细胞分泌  $\text{E}_2$  的影响

Fig. 1 Effects of different doses of oFSH on  $\text{E}_2$  secretion from mouse sertoli cell

### 1.4 雌二醇放射测定

利用 RIA 测定母体和胎儿血浆中  $\text{E}_2$  含量。<sup>125</sup>I- $\text{E}_2$  放射免疫盒购自中国原子能科学研究院同位素研究所,灵敏度为  $2 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,CV 为 6.5%。

### 1.5 B-oFSH 含量的计算与统计

根据上述标准曲线(图 1)模拟出 S 形曲线的方程为:

$$x = -\ln((1 - y/22807)/0.9651)$$

其中  $x$  为 oFSH 浓度, $y$  为  $\text{E}_2$  浓度。根据加入 30  $\mu\text{L}$  不同妊娠时期胎儿和母羊血清刺激支持细胞分泌  $\text{E}_2$  量,利用该方程计算出不同妊娠时期胎儿和母羊

B-FSH 浓度。实验结果用 Student's T 检验进行统计分析并以平均值  $\pm$  标准误 (SEM) 方式来表示。

## 2 结果

### 2.1 雄性胎儿血浆中 B-FSH 的变化

60, 90, 120 d 胎儿和新生羔羊血浆 B-FSH 质量浓度分别为  $(5.03 \pm 1.35) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $n=4$ )、 $(7.57 \pm 1.12) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $n=4$ )、 $(9.19 \pm 0.34) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $n=4$ ) 和  $(4.79 \pm 0.71) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $n=4$ )。结果说明在血浆 B-FSH 含量从绵羊胎儿发育早期 (60 d) 的较低水平逐渐升高, 并持续到胎儿发育后期 (120 d) 并且下降。但在出生期, 血浆中 B-FSH 含量显著低于胎儿中期 (图 2,  $P < 0.05$ )。

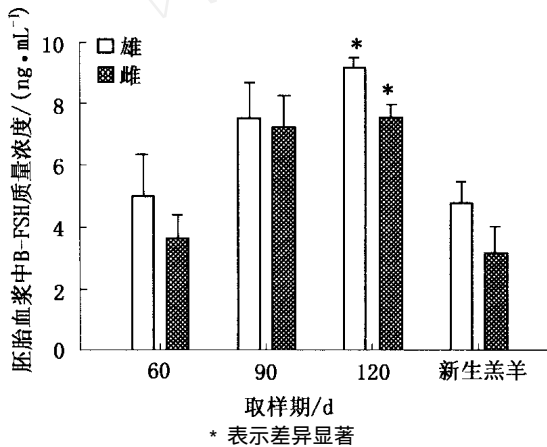


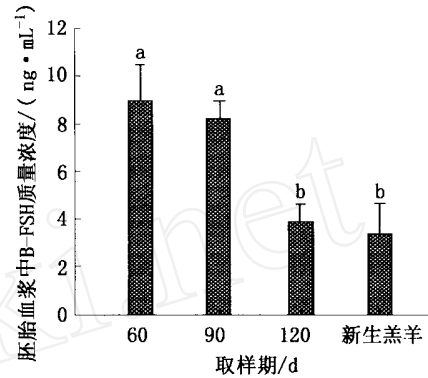
图 2 雄性和雌胎儿血浆中 B-FSH 浓度的变化  
Fig. 2 Changes of plasma B-FSH concentrations in the male and female sheep fetuses

### 2.2 雌性胎儿血浆中 B-FSH 的变化

胎儿发育的 60、90、120 d 和新生羔羊, 血浆 B-FSH 浓度分别为  $(3.67 \pm 0.75) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $n=4$ )、 $(7.26 \pm 1.03) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $n=4$ )、 $(7.58 \pm 0.43) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $n=6$ ) 和  $(3.21 \pm 0.82) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $n=4$ )。雌雄性胎儿血浆 B-FSH 变化趋势相似 (图 2), 但在胎儿后期 (120 d), 雌性胎儿血浆中 B-FSH 显著高于雄性胎儿 ( $P < 0.05$ ), 但其他时期无显著的性别间差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 不同妊娠时期母羊血清 B-FSH 的变化

胎儿发育的 60、90、120 d 和产羔后, 母体血浆 B-FSH ( $n=8$ ) 浓度分别为  $(8.98 \pm 1.49) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $(8.25 \pm 0.71) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $(3.91 \pm 0.76) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $(3.48 \pm 1.21) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由此说明在妊娠早期和中期, B-FSH 维持较高的水平, 但后期和出生期 B-FSH 显著降低 ( $P < 0.05$ , 图 3)



字母不同者表示差异显著

图 3 妊娠母羊血浆 B-FSH 浓度的变化  
Fig. 3 Changes of plasma B-FSH concentrations in the maternal ewe

## 3 讨论

1) 利用本实验建立的绵羊 B-FSH 测定方法对绵羊胎儿和母体血液中 FSH 的测定结果表明, 在胎儿发育过程中 B-FSH 的变化趋势与血浆中 FSH 的浓度 (RIA 测定法) 变化一致<sup>[9]</sup>。另外, 无论是胎儿还是成年母体绵羊, 血浆中的 B-FSH 浓度均低于所报道的 F-FSH 浓度, 这与人<sup>[6]</sup>、恒河猴<sup>[7]</sup>、和猪<sup>[8]</sup>血浆 B-FSH 的研究结果相似, 此说明本实验建立的绵羊 B-FSH 的测定方法可靠。虽然 B-FSH 测定法的灵敏度低于 RIA, 但认为更能客观地反映生理功能的变化规律。

2) 动物的生殖活动受下丘脑-垂体-性腺轴的调节, 垂体作为中间环节, 主要通过分泌促性腺激素 FSH 和 LH 影响成年动物性腺的功能。在胎儿发育期, FSH 主要影响动物性腺的发育。本研究证明胎儿发育早期 (60 d), 血浆中 FSH 含量较低, 中期 (90 ~ 120 d) 显著升高, 出生期又降低到胎儿早期的水平。胎儿血浆中 FSH 的这种变化与垂体中促性腺激素细胞数和 FSH mRNA 的变化相一致。另外, 本实验结果胎儿血浆中 FSH 的变化与母体血浆中 FSH 无显著的相关性。所以, 胎儿血浆 FSH 的升高或降低与胎儿垂体中促性腺激素细胞的功能变化有密切关系。

在绵羊胎儿发育过程中, 雌雄胎儿血浆中 B-FSH 浓度具有相似的变化趋势, 在胎儿中后期血浆 B-FSH 有显著的性别间差异, 这与 Phillips 一致<sup>[10]</sup>。一般认为, 动物胎儿中期之后血浆中促性腺激素含量的降低主要是由于性激素的反馈性调节所引起。虽然说胎儿体内性激素的来源是多方面的 (如母体

胎盘、肾上腺等),但在绵羊胎儿发育的 120 d 之前(即 95 ~ 105 d)<sup>[11,12]</sup>,雄激素的含量无显著的性别间差异,而雌性胎儿血浆雌激素浓度显著高于雄性。另外,胎儿期雄性血浆抑制素浓度为雌性胎儿的几倍<sup>[13]</sup>,并且在婴儿期也发现了相似的 F 抑制素的变化规律<sup>[17]</sup>。因此,胎儿中期之后(120 d)雌雄胎儿血浆中不同浓度的雌激素和抑制素对于垂体促性腺激素细胞的直接或间接调节作用可能是引起血浆中 B-FSH 的性别间差异的主要原因之一。

总之,本研究建立绵羊 B-FSH 检测方法,并用于检测和分析了绵羊胎儿发育的不同时期母体和胎儿血浆中生物学活性的变化。本研究结果对认识动物胎儿期下丘脑-垂体-性腺轴的调节机制、对于研究生殖生物学及动物生物工程中的胎儿早期丢失或流产等难题可资借鉴。

国家计划生育研究所张建超在血样采集中予以大力帮助; Dr A. F. Parlow(National Hormone and Pituitary Program, California 90509, USA)为本研究提供了部分 oFSH 和 oLH 标准品。在此一并致射。

### 参 考 文 献

- [1] Brooks A N, Hagan D M, Cui S, et al. Prenatal gonadotrophins in the sheep [J]. *Anim 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 Endocri*, 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]. *Neuroendocri*, 1998, 10:713 ~ 718
- [4] Brooks J, Cui S, Tortonesi D J, et al. Pituitary receptors for GnRH, oestradiol and prolactin and the control of gonadotrophin secretion in the ewe [J]. *Reprod Domes Anim*, 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: . Pituitary LH and FSH in the fetus and neonate [J]. *Molec Cellul Endocri*, 1985, 39:119 ~ 124
- [9] Sklar C A, Mueller P L, Guckman P D, et al. Hormone ontogeny in the ovine fetus: . Circulating luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in mid and late gestation [J]. *Endocrinology*, 1981, 108:874
- [10] Phillips D J, Smith P R, Heath D A, et al. Bioactive and immunoreactive FSH and immunoreactive inhibin concentrations in the ovine fetus [J]. *Endocri*, 1992, 134:287 ~ 295
- [11] Ulloa-Aguirre A, Miller C, Hyland L, et al. Production of all FSH isohormones from a purified FSH preparation by neuraminidase digestion [R]. *Biol Reprod*, 1984, 30:382
- [12] Albers N, Hart C S K, Aplan S L, et al. Hormone ontogeny in the ovine fetus: . Porcine follicular fluid "inhibins" selectively suppress plasma follicle stimulating hormone in the ovine fetus [J]. *Endocrinology*, 1989, 125:675 ~ 678
- [13] Debieve F, Beerlandt S, Hubinont C, et al. Gonadotropins, prolactin, inhibin A, inhibin B, and activin A in human fetal serum from midpregnancy and term pregnancy [J]. *Clini Endocri & Metabo*, 2000, 85:270 ~ 274