

内源性和外源性雌二醇对绵羊 黄体溶解的作用

张 家 骅

(西北农业大学兽医系)

A. P. F. Flint

P. G. Weston

J. E. Hixon

(英国伦敦动物协会动物研究所)

(美国依利诺大学兽医学院)

摘 要 20只绵羊随机按双因子试验设计分为4个处理组, 双因子为X-射线照射卵巢选择性破坏卵泡和埋植雌二醇。X-射线照射使发情周期黄体期延长, 雌二醇使这种作用逆转。子宫内膜催产素受体浓度决定于黄体溶解发生的时间, 即黄体溶解较早发生羊只子宫内膜催产素受体浓度低于黄体溶解发生较晚或尚未发生的羊只。催产素和PGFM均呈现明显的分泌波。雌二醇处理缩短PGFM峰值间隔时间、延长催产素峰值间隔时间, 可能存 在一种不依赖于催产素的PGF₂α释放; 雌二醇对这种不依赖于催产素的PGF₂α释放有着重要作用。

关键词 黄体溶解, 催产素, 催产素受体, 前列腺素F₂α代谢物, 雌二醇

中图分类号 S857.21

产生于黄体的孕酮是控制绵羊发情周期的重要激素之一。在黄体期孕酮通过对促性腺激素分泌的负反馈调节而抑制排卵, 随着黄体溶解, 孕酮浓度下降, 发情和排卵等现象相继出现。因此, 黄体溶解在绵羊生殖过程中是一个十分重要的环节。然而, 对黄体溶解的机理至今了解甚少。

在绵羊发情周期的黄体期中期, 外源性雌激素可以使黄体溶解提前发生^[1]; 而使用X射线照射破坏能产生雌激素的卵泡, 功能性黄体的寿命延长^[2]。雌激素诱导黄体溶解的作用之一是雌激素能刺激子宫催产素受体(rOT)的生成^[3]。而在雌激素诱导黄体溶解的过程中, 催产素受体的增加发生在催产素和前列腺素F₂α(PGF₂α)分泌波出现之前^[3]。本试验的目的是测定雌激素诱导绵羊子宫催产素受体生成、前列腺素释放和对黄体的溶解作用。

1 材料和方法

1.1 试验动物及处理

20只成年母羊按双因子实验设计随机分为4个处理组, 双因子分别为X-射线照射破

坏卵巢卵泡和雌二醇埋植。手术在发情周期第8d进行,使用X-射线轮流照射双侧卵巢,照射剂量为15Gy。未照射组只将卵巢从切口处拉出腹腔外放置与卵巢照射相同的时间(20 min)。在手术中同时安置颈静脉导管和对不同组羊只肘内侧胸部皮下埋植雌二醇硅胶管或空管。羊只复苏后置于代谢笼中,血样经颈静脉导管采集。在发情周期的第7和第8d每天采集1次,第9d采集2次,从第10~17d每1.5h采集1次。所有的血样用于孕酮放射免疫测定;每天一个样品用于雌二醇浓度测定。在黄体溶解(孕酮水平连续低于 0.3 ng/mL)前72h内或实验结束前72h内所采集的血样用于前列腺素代谢物(PGFM)和催产素(OT)测定。所有羊只第17d经颈静脉注射T-61,使羊快速致死剖取出子宫,分离子宫肉阜和肉阜间子宫内膜用于rOT测定。

1.2 放射免疫测定

孕酮放射免疫测定按照文献[4]所描述的方法进行。测定灵敏度为 0.12 ng/mL ,分析内和分析间变异系数分别为9.3%和17.5%。

雌二醇抗血清由O.D. Sherwood博士提供。血样经Sephadex LH-20柱层析后进行放射免疫测定。标记雌二醇层析后回收率为 $86.0 \pm 1.1\%$;测定灵敏度为 0.3 pg/mL ;摘除卵巢羊混合血样中雌二醇含量为 $1.2 \pm 0.1\text{ pg/mL}$,在同样血样中加入5,10和25 pg标准雌二醇后测值分别为 5.4 ± 0.4 , 10.1 ± 1.1 和 $22.0 \pm 1.4\text{ pg}$ 。分析内和分析间变异系数分别为16.1%和18.0%。

PGFM抗血清由K. Kirtor博士提供。测定方法按照Mitchell等(1975)修改过的步骤进行。 ^3H -PGFM的提取回收率为88.4%;非标记PGFM 50, 75和100 pg加入测定系统后其测值分别为45, 58和89 pg。测定灵敏度为 32 pg/mL ;分析内和分析间变异系数分别为12.3%和16.5%。

OT抗血清由A.P.F. Flint博士提供,OT的碘标记采用文献[5]所介绍的方法。提取酸化血浆中的OT使用弗勒氏陶土(Fuller's earth),用丙酮将吸附有OT的弗勒氏陶土洗涤后,在洗液中加入乙醚和蒸馏水,静置后保存水相溶液,干燥后溶于测定用缓冲液进行放射免疫测定。 ^{125}I -OT提取率为 $70.6 \pm 1.2\%$;测定灵敏度为 0.73 pg/管 ;酸化血液中加入5, 10和25 pg非标记OT后,分别可回收 4.20 ± 0.53 , 8.06 ± 0.92 和 $17.11 \pm 1.30\text{ pg}$;分析内和分析间变异系数分别为8.63%和11.38%。

1.3 子宫rOT测定

用于rOT测定的样品制备及受体测定采用文献[6]所描述的方法。本实验在 25°C 条件下经60 min反应达到平衡并得到最高特异性结合。在此反应系统中,阴道、肠道、肌肉和肝组织与标记催产素不发生特异性结合;当子宫样品含量在 $0 \sim 200\text{ }\mu\text{g}$ 范围内逐渐增加时,特异性结合的能力线性增加($r = 0.99$);当在反应系统中不断增加非标记催产素量时,超过10 pmol非标记催产素即可全部置换结合的标记催产素;当标记催产素的用量增加至 5.0 nmol/L 时,Scatchard分析的特异性结合亦呈线性关系($r = 0.98$),解离常数(K_d)为 1.35 nmol/L ,每毫克蛋白的最大结合能力为 302.8 fmol 。

1.4 统计分析

按双因子试验设计分析不同处理因子对激素含量和受体水平的影响。OT和PGFM分泌峰值和频率使用Pulsar程序决定[7]。OT和PGFM峰值重迭定义为出现PGFM峰

值的样品, 其 OT 含量也处于峰值水平。

2 结果

2.1 不同处理对黄体重量和黄体溶解的影响

所有接受外源性雌激素处理的羊在试验期内均表现发情行为并发生黄体溶解; 在没有用外源性雌激素处理的羊中, 用X-射线照射卵巢的羊只有1只发生黄体溶解, 而没有用X-射线照射的羊有4只发生黄体溶解。埋植雌激素降低了黄体重量 ($P<0.01$), 而最重的黄体出现在没有埋植雌激素但卵巢被X-射线照射过的羊, 这说明雌激素和X-射线对黄体重量的影响存在互作。

埋植雌激素后血中雌二醇浓度迅速增加, 然后降低并维持在 $4\sim 10\text{ pg/mL}$ 水平, 此浓度明显高于埋植空硅胶管羊只雌二醇水平 ($P<0.01$, 图1)。埋植雌二醇羊只平

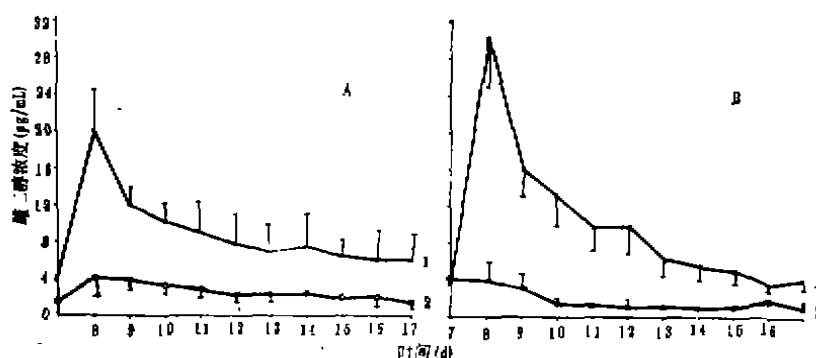


图1 埋植雌二醇 (1) 和埋植空硅胶管羊只 (2) 血中雌二醇水平
A. 卵巢未经X-射线照射; B. 卵巢经X-射线照射

均孕酮水平低于埋植空硅胶管羊只 ($P<0.01$), 由于雌二醇埋植组孕酮浓度下降早于非雌二醇埋植组, 说明在影响孕酮水平上雌二醇和时间存在互作 ($P<0.01$, 图2)。

2.2 PGFM和催产素水平及峰值

PGFM 和催产素均出现明显的分泌波。雌二醇埋植使总催产素峰值数目减少 ($P<0.05$), 而使峰值间间隔时间延长 ($P<0.01$), 雌二醇对 PGFM 峰值数目无明显影响, 但却使其峰值间间隔时间缩短 ($P<0.01$)。埋植雌二醇和不埋植雌二醇的羊只 PGFM 峰值与催产素峰值重迭的百分数分别为41%和53%。雌二醇和X-射线对 PGFM 峰值间隔时间的影响有存在互作的趋势 ($P=0.07$)。因为受X-射线照射而没有埋植雌二醇的羊只 PGFM 峰值间隔时间特别长 (表1)。

2.3 子宫催产素受体浓度

雌二醇埋植组羊只两种子宫组织样中催产素浓度均较低 ($P<0.01$, 表2)。由于雌激素处理组羊只黄体溶解普遍较早, 回归分析表明, 屠宰时子宫催产素受体浓度与黄体溶解距屠宰时的时间长短呈负相关 (图3)。

表1 OT及PGFM峰值、重迭峰值及峰值间隔时间

处 理	OT 峰值数	PGFM 峰值数	重迭 峰值数	峰值间隔时间	
				OT	PGFM ^a
无X-射线照射 空硅胶管埋植	37	18	7	8.4±1.1	15.2±2.6
无X-射线照射 埋植雌二醇	24 ^b	17	7	14.4±1.9 ^c	11.1±1.6 ^d
X-射线照射 空硅胶管埋植	35	16	11	10.3±1.4	22.4±1.9
X-射线照射 ^a 雌二醇埋植	22 ^b	22	9	12.7±1.6 ^c	11.0±1.4 ^d

注: a. 该组两只羊由于黄体溶解较早, 分别只有黄体溶解前48和57 h内的样品供OT和PGFM测定; b. 雌二醇的作用是降低OT峰值数 ($P<0.05$); c. 雌二醇的作用是增加催产素峰值间隔时间 ($P<0.01$); d. 雌二醇的作用是降低PGFM峰值间隔时间 ($P<0.01$); e. 雌二醇和X-射线对PGFM峰值间隔时间的影响有存在互作的趋向 ($P=0.07$)。

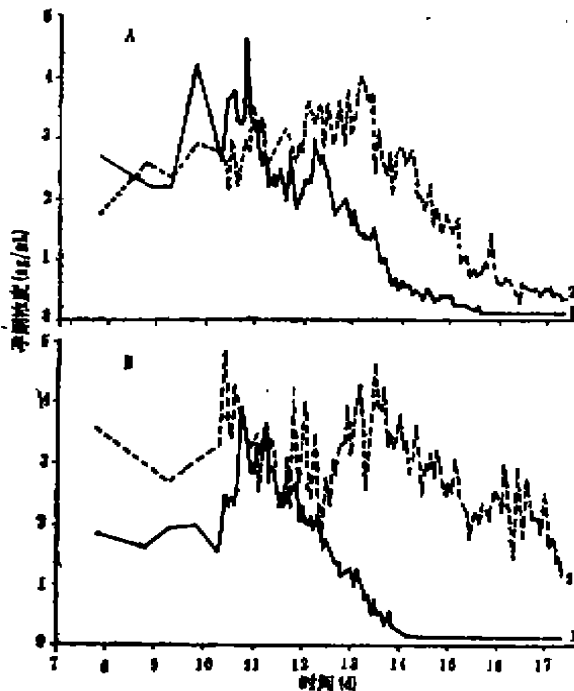


图2 埋植雌二醇 (1) 和埋植空硅胶管
羊只 (2) 血中孕酮浓度

A. 卵巢未经X-射线照射; B. 卵巢经X-射线照射

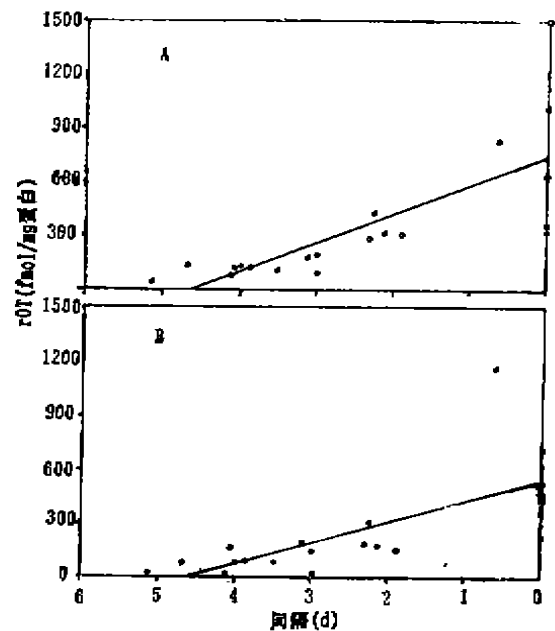


图3 催产素浓度与黄体溶解距屠宰
间隔时间的关系

A. 子宫内孕, $Y = -9.6783x + 743.4875$

B. 肉阜间子宫内孕, $Y = -4.8184x + 538.8657$

3 讨 论

3.1 X-射线照射卵巢和埋植雌二醇对黄体溶解的影响

X-射线可以破坏三级、二级和绝大多数初级卵泡, 因此消除了雌二醇的来源, 但是

表2 不同处理组羊只子宫催产素受体浓度

(fmol/mg蛋白)

处 理	子宫内阜		内阜间子宫内阜	
	不理植雌二醇	理植雌二醇*	不理植雌二醇	理植雌二醇*
无X-射线照射	543 ± 241	145 ± 41	305 ± 106	91 ± 31
X-射线照射	633 ± 132	123 ± 22	564 ± 157	108 ± 30

* 雌二醇的作用是降低子宫催产素受体浓度 ($P < 0.01$)。

X-射线既不影响黄体细胞的组织学结构,也不影响其分泌孕酮的功能^[8]。用X-射线照射而没有埋植雌二醇的羊只中只有一只黄体发生溶解,全组平均黄体重量最大,这些结果与 Karsch 等所报道的X-射线使黄体溶解延迟一致^[2]。使用外源性雌二醇后,绝大多数羊黄体溶解、黄体重量减轻,这说明雌二醇可以逆转由X-射线所造成的黄体溶解延迟的作用。雌二醇的作用可能是增加了PGF_{2α}的释放^[9],也可能是增强了黄体对PGF_{2α}的敏感性。

3.2 X-射线照射卵巢与埋植雌二醇对PGFM和催产素分泌的影响

在黄体溶解时,PGFM分泌波开始出现。埋植雌二醇使PGFM峰值间隔时间缩短,而黄体溶解提前发生。雌二醇增加PGF_{2α}分泌频率的原因可能是由于催产素受体增加,磷脂酶A₂和前列腺素合成酶系活性增强;黄体溶解时孕酮浓度下降也可能是PGF_{2α}分泌频率增加的原因。

催产素可以刺激PGF_{2α}分泌^[10]。基于这一事实,有人提出催产素是绵羊子宫PGF_{2α}分泌的诱因^[11],而在本实验中,接受和未接受外源性雌激素处理羊分别只有41%和53%的PGFM峰值与催产素峰值重迭,这说明除了催产素外可能还存在其它诱发PGF_{2α}分泌的因素。雌二醇增加了PGF_{2α}的分泌频率但却未增加PGFM与催产素峰值重迭的机率,这说明雌二醇、或者对雌二醇敏感的其它因子也可以刺激PGF_{2α}的释放。在这种情况下释放的PGF_{2α}也可以使孕酮浓度开始下降,而不涉及催产素与催产素受体的相互作用。

催产素在整个采样期均有分泌波出现。在黄体退化之前出现的催产素分泌波可能由幅度很低的PGF_{2α}引起^[12],而这种低幅度分泌的PGF_{2α}并不能引起黄体溶解。黄体期催产素不能激发PGF_{2α}分泌的原因可能是由于高浓度的催产素抑制催产素受体的产生^[13],黄体期孕酮和雌激素也可能抑制催产素受体的形成。本试验中,雌二醇增加催产素峰值间隔时间,这可能是由于雌二醇影响了大黄体细胞对PGF_{2α}的灵敏性或是改变了由其他因素调节的大黄体细胞分泌催产素的功能。不断增加的PGF_{2α}分泌波也有降低黄体受PGF_{2α}刺激分泌催产素的敏感性的作用^[12,14],同时由PGF_{2α}引起的黄体溶解使黄体细胞不断老化也将催产素峰值出现的间隔时间延长。

3.3 子宫催产素受体浓度的变化

埋植雌激素羊只子宫催产素浓度较低,这是由于这些羊只大多较早发生黄体溶解,在第17d采取子宫样时,已是黄体溶解的数日之后。子宫催产素受体浓度与黄体溶解距采样时间的长短呈明显的负相关,也就是说,黄体溶解发生的时间距采取子宫组织样时

越近或是在采样时黄体溶解尚未发生, 这些子宫样品中催产素受体的浓度较高。因此, 本实验中子宫催产素受体浓度的变化可能不是雌二醇的直接作用, 而是整个机体内分泌状态的一种反应。上述结果与 Roberts 等^[10]、Sheldrick, Flint^[6]所报道的结果一致, 即子宫内膜催产素受体浓度在黄体期最低, 黄体溶解时增加, 发情时最高, 发情后迅速下降。

4 结 论

X-射线破坏卵泡使绵羊发情周期黄体期延长, 这种作用可以由外源性雌二醇所逆转。在第17 d 所测到的催产素受体浓度决定于黄体溶解发生的时间, 即黄体溶解发生越早, 催产素受体浓度越低; 黄体溶解发生越晚或在采取子宫样时尚未发生, 催产素受体浓度越高。催产素和 PGFM 均呈现分泌波, 外源性雌激素缩短 PGFM 峰值间隔, 延长催产素峰值间隔。可能存在有一种不依赖于催产素诱导的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 分泌。对于这种不依赖于催产素的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 分泌, 雌二醇可能发挥十分重要的作用。

参 考 文 献

- 1 Hawk H W, Bolt D J. Luteolytic effect of estradiol-17 β when administered after mid-cycle in the ewe. *Biol Reprod*, 1970, (2), 275~278
- 2 Karsch F J et al. Maintenance of ovine corpora lutea in the absence of ovarian follicles. *Endocrinology*, 1970, 87, 1228~1236
- 3 Hixon J E, Flint A P F. Effects of a luteolytic dose of estradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ secretion in sheep. *J Reprod Fert*, 1987, 79, 457~467
- 4 Weston P G, Hixon J E. Effects of in vivo prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ administration on in vitro progesterone synthesis by bovine corpora lutea. *Biol Reprod*, 1980, 22, 259~268
- 5 Sheldrick E L et al. Delayed luteal regression in ewes immunized against oxytocin. *J reprod Fert*, 1980, 59, 37~42
- 6 Sheldrick E L, Flint A P F. Endocrine control of uterine oxytocin receptors in the ewe. *J Endocrinology*, 1985, 106, 249~258
- 7 Merriam G R, Wachter K W. Algorithms for the study of episodic hormone secretion. *Am J Physiol*, 1982, 243, E310~E318
- 8 Hixon J E et al. Failure of prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ to cause luteal regression in ewes after destruction of ovarian follicles by X-irradiation. *Biol Reprod*, 1975, 13, 126~135
- 9 Knickerbocker J J et al. Uterine prostaglandin and blood flow response to estradiol-17 β in cyclic cattle. *Prostaglandins*, 1986, 31, 757~776
- 10 Roberts J S et al. Oxytocin stimulated release of prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ from ovine endometrium in vitro. Correlation with estrous cycle and oxytocin-receptor binding. *Endocrinol*, 1976, 99, 1091~1097
- 11 Flint A P F et al. Luteal oxytocin. Characteristics and control of synchronous episodes of oxytocin and $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretion at luteolysis in ruminants. *Domestic Animal Endocrinology*, 1990, 7, 111~124
- 12 Lamsa J C et al. Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ -stimulated release of ovarian oxytocin in the sheep in vivo. Threshold and dose dependency. *Biol Reprod*, 1989, 40, 1215~1223

- 13 Flint A P F, Sheldrick E L. Continuous infusion of oxytocin prevents induction of oxytocin receptor and blocks luteal regression in cyclic ewes. *J Reprod Fert*, 1985, 75: 623~631
- 14 Watkins W B, Moore L G. Effect of systemic intravenous infusion of PGF_{2α} and 13, 14 dihydro-15-keto-prostaglandin F_{2α} during the oestrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Prostaglandins*, 1987, 22: 443~453

The Effects of Endogenous and Exogenous Estradiol on Luteolysis in Sheep

Zhang Jiahua

(Department of Veterinary Medicine, Northwestern Agricultural University)

A.P.F. Elint

(Institute of Zoology, Zoological Society of London, UK)

P.G. Weston J.E. Hixon

(Department of Veterinary Biosciences, College of Veterinary Medicine,
University of Illinois at Champaign-Urbana, USA)

Abstract Twenty ewes were randomly assigned to one of four treatment groups of a 2 × 2 factorially-designed experiment. The factors were destruction of follicles by selective irradiation of the ovaries and the administration of an estradiol implant. X-irradiation prolonged the luteal phase of the estrous cycle. This effect of irradiation was reversed by estradiol. Concentrations of oxytocin receptor observed on the 17th day depended on the time of luteolysis; the ewes whose luteolysis occurred earlier had lower concentrations of oxytocin receptor in endometrium than the ewes whose luteolysis occurred later or did not occur. Pulsatile release patterns in the secretion of oxytocin and PGFM were observed. Estradiol-treatment shortened the intervals between the PGFM peaks and prolonged the intervals between the oxytocin peaks. It seems possible that oxytocin-independent PGF_{2α} release may exist under the conditions of this study. Estradiol may have an important role in regulating this oxytocin-independent PGF_{2α} release.

Key words luteolysis, oxytocin, oxytocin receptor, PGFM, estradiol