

1、前言

壹、一氧化氮之歷史發展

一氧化氮 (Nitric oxide, 簡稱 NO), 帶有不成對的奇數電子(較氧分子少了一個電子), 是生物體內一種重要的自由基 (Free radical)。一氧化氮在生物體內主要是一個扮演多重角色的細胞訊息分子 (Signaling molecule), 負責細胞內的運作與細胞間的連絡, 因而調控著生物體內各種不同的細胞反應, 主要功能包括: 血管平滑肌鬆弛作用(Smooth muscle relaxing)、抑制血小板凝集作用(Platelet aggregation)、神經訊息傳遞物質(Neurotransmitters)、感染免疫作用機制(Infection-induced immune reactions)與細胞凋亡(Apoptosis)等等 [1、2]。一氧化氮最早是由化學家 Joseph Priestly (氧氣的發現者) 所發現, 1772 年他利用金屬銅與硝酸的作用而合成一氧化氮($3\text{Cu} + 8\text{H}^+ + 2\text{NO}_3^- \rightarrow 3\text{Cu}^{2+} + 2\text{NO} + 4\text{H}_2\text{O}$) [3]。二十世紀初期, 陸續有學者 (Mitchell, Tannenbaum 等) 發現與証實哺乳類會產生一氧化氮 [4、5]。十幾年前, 一氧化氮被認為不過是一種毒氣分子, 常在空氣污染或抽菸吐出來之煙霧中產生, 常被世界各國的環保單位列入黑名單。1980 年代 Furchgott 和 Zawadski 首先証實乙醯膽鹼所誘發之血管鬆弛是藉由一種稱為內皮細胞分泌血管鬆弛因子 (EDRF, Endothelium-dependent relaxing factor) 所致 [6]。1987 年時, 有兩位

學者 (Palmer et al , Ignarro et al) 分別證實這種重要的血管鬆弛因子就是一氧化氮 [7、 8]。 1988 年 Palmer 報告指出一氧化氮是來自 L-精胺酸 (L-arginine) [9] , 從此以後就展開了一氧化氮轟轟烈烈的研究序幕。

貳、一氧化氮合成 (Nitric oxide synthase , NOS)

細胞會製造一氧化氮 , 這是一種生物合成的過程 , 主要依靠著一種特別的酵素稱為一氧化氮合成 (nitric oxide synthase , NOS); NOS 可將 L-精胺酸變成一氧化氮與瓜胺酸 (citruline) , NOS 依功能上分類 , 可分為二類 : Constitutive NOS(簡稱 cNOS)與 Inducible NOS(簡稱 iNOS)。依結構上分類 , 有三種不同的異構物 (Isoforms) : 即 NOS I(Brain NOS 及 Neuronal NOS , 簡稱 bNOS , nNOS) , NOS II (Inducible NOS , 簡稱 iNOS) 和 NOS III (Endothelial NOS , 簡稱 eNOS); NOS I 和 NOS III 又合稱為 cNOS , NOS II 又稱為 iNOS [10-13] (附錄一) 一般而言 , cNOS 在生物體內會保持一定的濃度 ; 而 iNOS 的含量則經常在變化 , 需求增加時其合成速率就會增加。

附錄一、各種一氧化氮合成 (NOS) 的不同命名和角色

Numerical designation	Alternative designation	Tissue expression	Enzymatic activity	Chromosome localization(human)
I	nNOS	constitutive	dependent on Ca ⁺⁺	12q24.2
II	iNOS	inducible	independent on Ca ⁺⁺	17cen-q12
III	eNOS	constitutive	dependent on Ca ⁺⁺	7q35-36

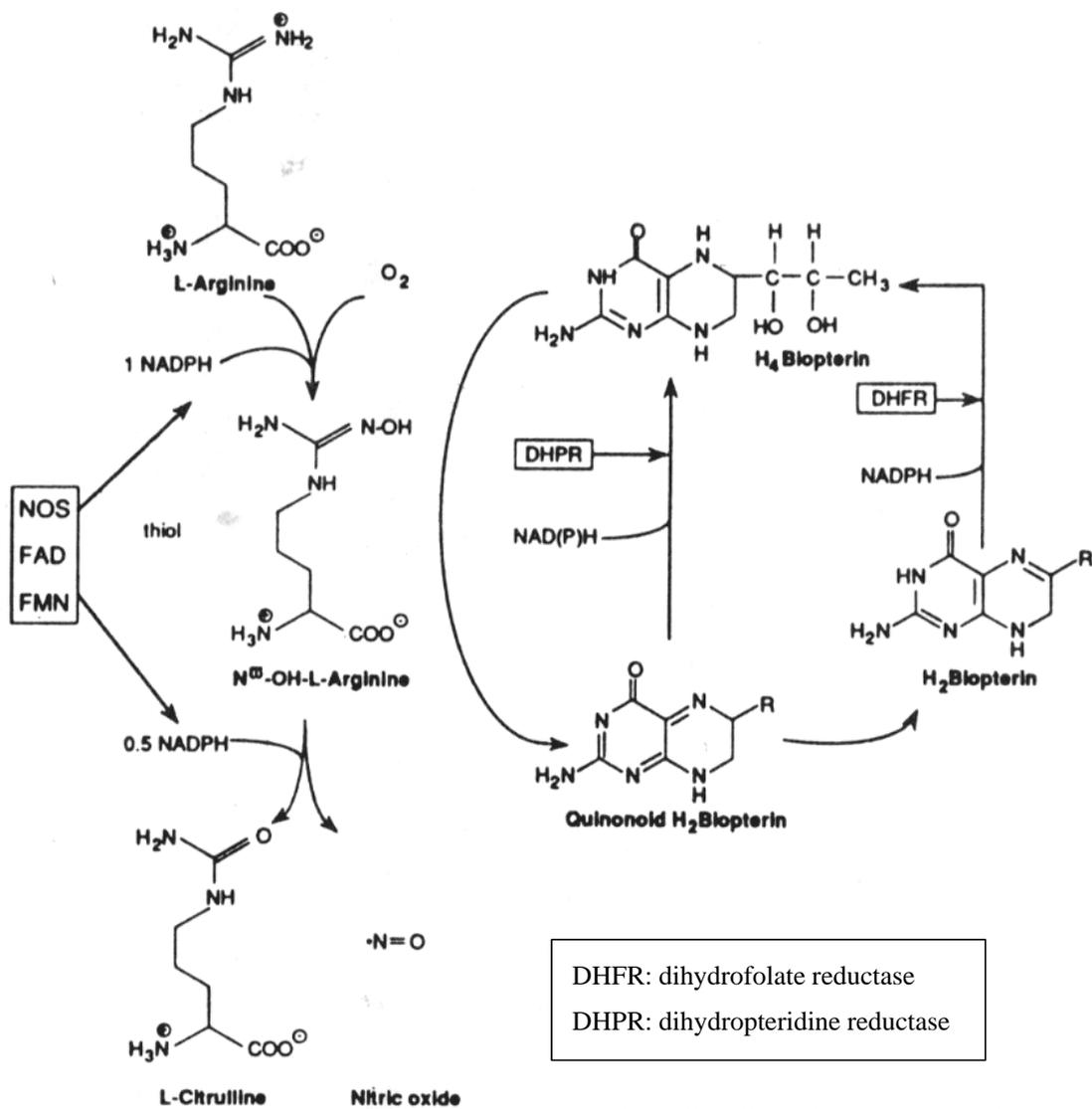
From Research Antibodies 1999 Santa Cruz Biotechnology, Inc.

NOS 活化時會形成一雙體結構 (Homodimer), 整體結構非常複雜 ; 具有類似細胞色素 P-450 (Cytochrome P-450) 的基本結構 , 且含有血基質 (Heme groups) 及氧化黃素 (Oxidizing flavins) 的成分。此外 , cNOS 和 iNOS 的結構及特性也不盡相同 , cNOS 必須依靠鈣離子 (Ca^{++}) 及鈣結合蛋白質 (Calmodulin) 的存在 , 才能行使一氧化氮的生物合成作用 , 而 iNOS 則不須鈣離子為輔因子 ; 其中 NOS 的主要運作方式就是靠電子轉移作用 (electron transfer) 來產生一氧化氮 [2, 14-15]。

簡單來說 , 一氧化氮的合成 , 是在一氧化氮合成 的作用下所促成(附錄二) [2]。需要 L-精胺酸、氧分子以及 NADPH 為原料 ; 並以 FMN/FAD、血基質與 THB (tetrahydrobiopterin) 當作輔因子 ; 如果是 cNOS 則另外需要鈣離子的存在。

參、一氧化氮的生化及生理功能

一氧化氮具有多種的生物學效應 , 大部份是與含鐵或硫醇類的蛋白質 (metal- or thiol-containing proteins) 結合而發揮作用 , 如 : 透過活化鳥嘌呤核 單磷酸環化 (Soluble guanylate cyclase), 來催化鳥嘌呤核 單磷酸 (GMP) 形成環鳥嘌呤核 單磷酸 (cyclic GMP , c-GMP) [17]。已知環鳥嘌呤核 單磷酸能傳達血管平滑肌鬆弛的訊息、抑制平滑肌細胞的成長及抑制血小板的凝集作用(Murad, 1994)。



附錄二、一氧化氮的生物合成概觀 (FASEB J. 6:3052;1992)

然而，生物系統內一氧化氮也會與氧分子、超氧化物自由基 (Superoxide anion, O_2^-) 與過渡金屬作用 (附錄三)。這些反應的產物，包括高價氮之氧化物 (Higher nitrogen oxides, NO_x)、過氧亞硝酸鹽 (Peroxynitrite, $OONO^-$) 和金屬 - 亞硝基化合物 (Metal-nitrosyl adduct, $M-NO$) 等；以上皆具有不同的生物毒性 [18]。

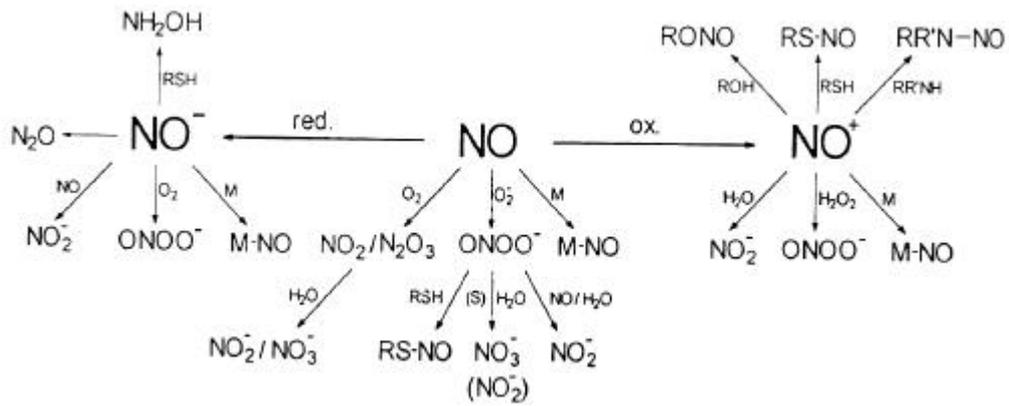
一般而言，一氧化氮合成也會受到生物體內各種分子之影響 (促進或抑制)，例如：

(1) 促進一氧化氮的產生：

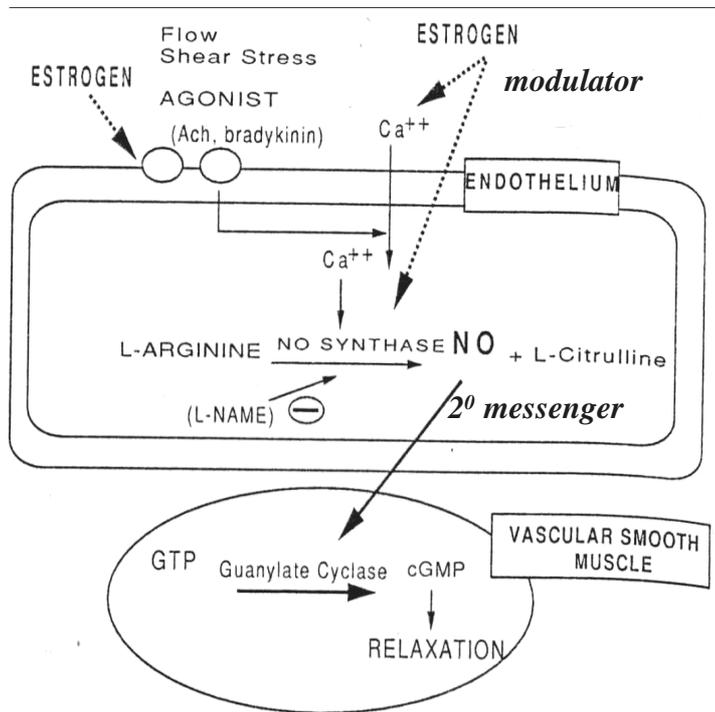
如動情素 (Estrogen) 可以強化 eNOS 的表現與反應，促進一氧化氮的產生 (附錄四)；停經後婦女心臟血管疾病之發生有急劇增加之現象，而使用動情激素治療之婦女則可減少其發生。研究指出，動情激素可能直接作用於血管壁之內皮細胞，進而影響內皮細胞的一氧化氮產生 [19]，可造成心臟血管平滑肌鬆弛因而下降其發生率。

(2) 抑制一氧化氮的產生：

自由基 (如超氧化物自由基)、血基質等會消耗一氧化氮的產生；因此，超氧化物自由基清除劑 (如超氧化歧解酶, Superoxide dismutase, SOD) 會有保護和加強一氧化氮的效應。反之，超氧化物自由基與一氧化氮反應，不但消耗一氧化氮的含量，而且產生過氧亞硝酸鹽 (Peroxynitrite)，此化合物對生物組織具有極大的破壞性 [20]，



附錄三、一氧化氮的生物學反應概觀(Feelisch M et al. 1996)

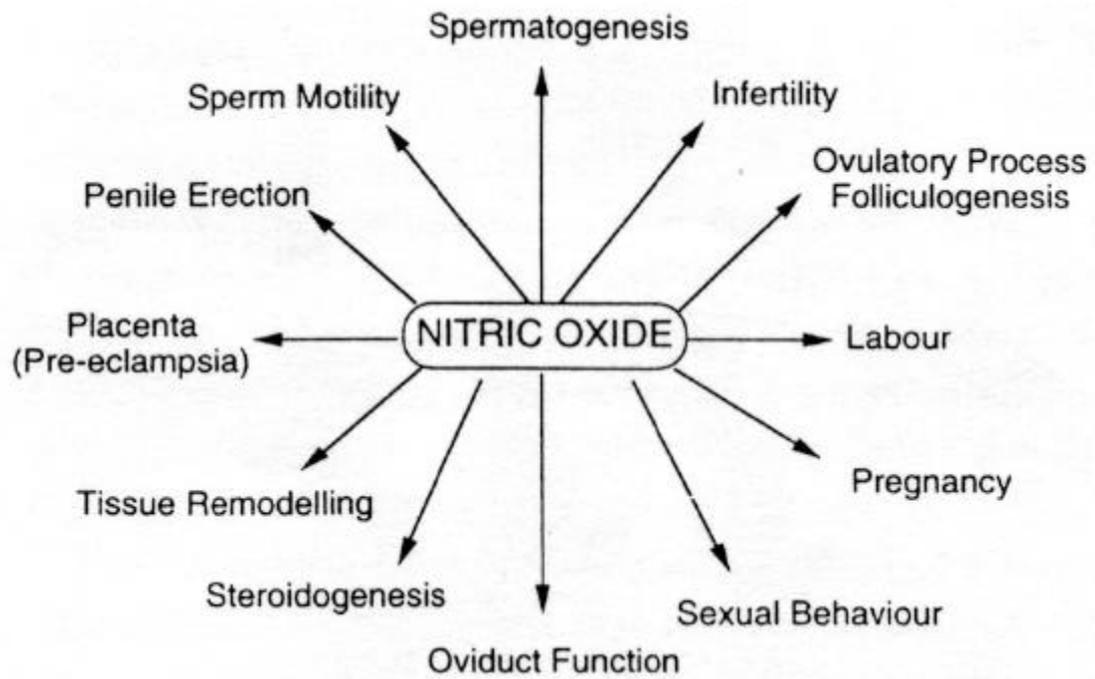


- Estrogen may modulate endothelium-dependent vasodilation through
 - 1) effects on number and/or sensitivity of cholinergic receptors,
 - 2) modification of Ca^{++} influx, and
 - 3) induction of eNOS. (White et al. Endocrine Reviews Dec 1995)

附錄四、動情素調控 eNOS 的表現與反應 [19]

肆、一氧化氮在生殖生理學上扮演的角色

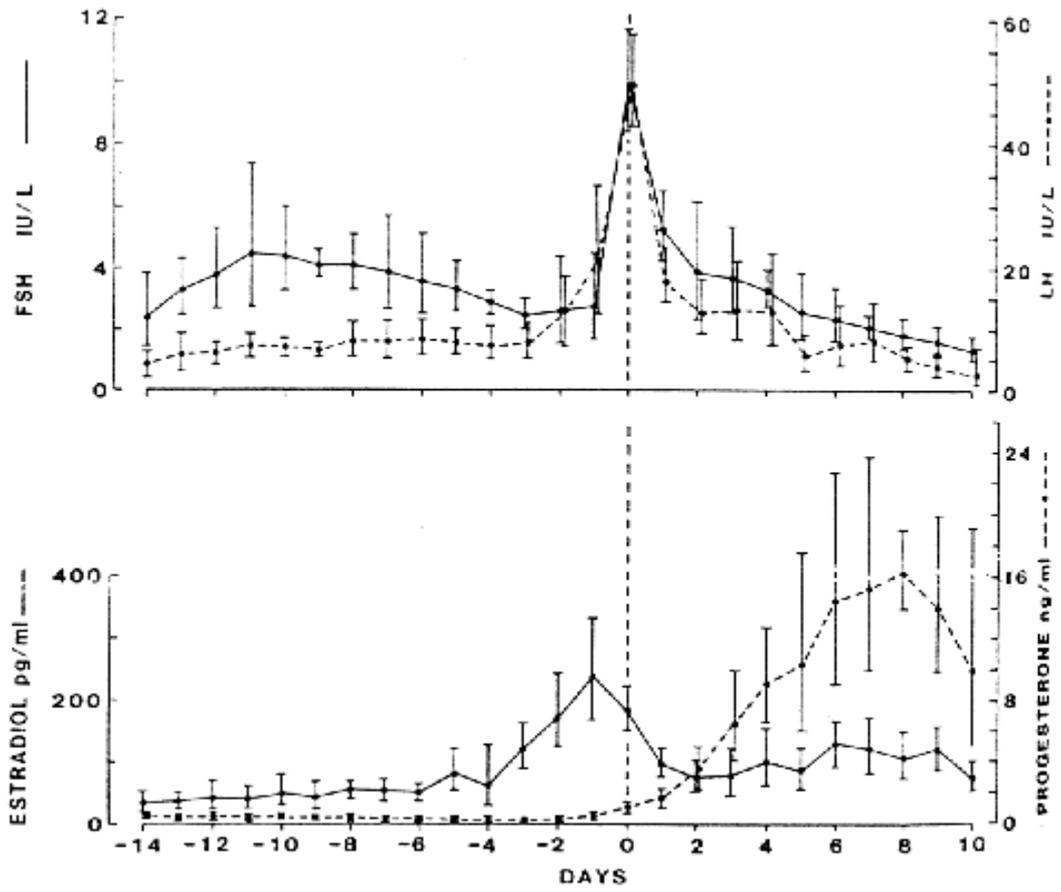
一氧化氮在生物體內，可由不同器官的多種細胞所產生，扮演著一個多種功能的角色，而且調控著不同的生物學功能，在生殖系統裡這些生理程序依然如此運作。故在過去的十年間，一氧化氮在生殖系統裡亦被認為是一個重要的訊息分子（附錄五）〔22〕。然而，NO 是一個高度不穩定的分子，而且半衰期很短，因此要從體液中直接測量相當困難。由於 NO 在體內迅速分解為硝酸鹽和亞硝酸鹽〔1, 16〕，所以體液中硝酸鹽和亞硝酸鹽之含量可視為 NO 產生釋放的指標〔16, 64, 65〕。



附錄五、一氧化氮在生殖生理學的角色 [Hum Reprod upd. 1998; 4(1)]

伍、卵巢的生理調控機制與一氧化氮

卵巢對於物種圖生存的意義是相當重要的，生育期的卵巢是一個始終在變化的動態器官，這裡面各種細胞成員在高度整合的運作下，主要的目的是為了產生可以受精的卵細胞（fertilizable ovum）和維持腺體功能以分泌性類固醇（sex steroids）〔33〕。因此，雌性哺乳動物在性成熟之後，會經由腦下垂體分泌荷爾蒙來調節而使卵巢及性器官有規律且週期性之變化；在人類稱之為月經週期，平均為 28 天（20-45 天）。相關調控之荷爾蒙包括：下視丘所釋放的黃體生成釋放激素（Luteinizing hormone-releasing hormone, LHRH），腦下垂體所分泌濾泡刺激素（Follicle-stimulating hormone, FSH）和黃體生成素（Luteinizing hormone, LH），以及卵巢所分泌的動情素（Estrogen）和黃體素（Progesterone）等〔23〕（附錄六）。



附錄六、正常月經週期 FSH , LH , E₂ , P₄ 之濃度變化 (R.I. McLachlan, et al,

1987)

腦下垂體所分泌的促性腺激素（Gonadotropin）會刺激一群組的卵巢濾泡發育成長；然而大部份的卵泡會閉鎖退化（Atresia），剩下沒有閉鎖的濾泡，最後則會排出卵細胞。研究指出，卵泡發育成長被認為是由多種因素所調控，包括：細胞素（cytokines）、生長因子（growth factors）以及局部產生的荷爾蒙（locally-produced hormones）等等；這些因子當中，一氧化氮也是備受關注的分子之一，因為一氧化氮會調節卵泡成長、凋亡（folliculogenesis, follicular apoptosis），影響排卵（ovulation）以及類固醇生成（steroid genesis）等卵巢生理功能〔24-29〕。

不孕症病人在執行試管嬰兒治療時，為了取得較多的卵子以進行體外受精；或者在鼠胚胎的相關研究，為了獲得更多的胚胎，經常須要給予高劑量的促性腺激素刺激，以獲得更多可受精的成熟卵細胞，來達成控制性超排卵（Controlled ovarian hyperstimulation, COH）的目的。在這種超排卵的情形下，一氧化氮產生之週期性改變以及合成在卵巢各種細胞成員中之週期性表現，也是值得相當關注的。

陸、研究方向及目的

首先為了要觀察控制性超排卵之荷爾蒙刺激，對於內皮性一氧化氮合成，在卵巢各種細胞成員中之週期性效應；本研究利用小白鼠

給于超排卵刺激，因而伴隨著濾泡成長、排卵以及黃體化等生殖生理程序的進展；內皮性一氧化氮合成 在卵巢各種細胞成員中，是否有細胞特定性分佈（cell-specific distribution）？是否有時程的變化（time-course changes）？

再者為了要觀察控制性超排卵刺激，對於人體內一氧化氮產生之週期性效應；本研究收集了 18 名生育期婦女，分為兩組接受觀察；一組是正常月經週期的婦女，一組是接受試管嬰兒治療，進行控制性超排卵刺激之不孕症婦女。測量受試者血中一氧化氮之氧化代謝產物與動情素、黃體素濃度之相對變化，以探討一氧化氮的產生與月經週期以及在控制性超排卵刺激下與荷爾蒙（如動情素、黃體素等）之關聯性。

II、材料：

壹、檢體：

實驗一：六至八週大之雌性小白鼠 (ICR mouse) 之卵巢。

實驗二：受試者為生育期之婦女，包括：正常月經週期的婦女與
試管嬰兒治療中，接受超排卵刺激的不孕症婦女；檢體取其空腹血液。

貳、藥品：

1. PMSG (中國化學、台灣)
2. hCG (中國化學、台灣)
3. L-N^G-nitro-D-arginine methyle ester (Sigma, USA)
4. Leuprolide Acetate Depot (武田、日本)
5. HMG (Organon, Netherlands)
6. FSH, hp (Serono, Italy)

參、試劑：

1. 一次抗體：eNOS; (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA.)
2. VECTASTAIN ABC Kit (Vector Laboratory, Burlingame, CA, USA).
3. 100% EtOH (Merck, Germany)
4. Xylene (島久藥品, Japan)

5. 10X PBS (ph:7.4):使用前稀釋成 1X , 以下為其 1 公升之配方 :

Na_2HPO_4 : 12.7g , NaH_2PO_4 H_2O : 2.74g , NaCl : 85g

(Merk, Germany)

6. 30% H_2O_2 (Merk, Germany)

7. Diaminobenzidine (Sigma, USA)

8. Mayer' s Hematoxyline (Merk, Germany)

9. Eosin (Merk, Germany)

10. Triton X-100 (Sigma, USA)

11. Agoarose (Promega, USA)

12. 4-20% SDS-PAGE gradient gels (Novex, USA)

13. Polyvinylidene difluoride membrane(PVDF membrane, Millipore
USA)

14. HRP-conjugated antimouse IgG (Amersham, USA)

15. Western blot detection kit (ECL kit, Amersham, USA)

16. Nitrate reductase (Sigma, USA)

17. NADPH (Sigma, USA)

18. Griess reagent (Merk, Germany)

肆、器材 :

1. 載玻片 (信成 , 台灣)

2. Silane Coating microslide (Tokyo, Japan)
3. 烘箱 (Merck, Germany)
4. 高壓蒸氣滅菌鍋 (Tomy Seiko, Japan)
5. 染架 (Merck, Germany)
6. 染缸 (Merk, Germany)
7. 振盪器 (Labnet, USA)
8. 微波爐 (大同 , 台灣)
9. 保溼盒 (信成 , 台灣)
10. 研磨杵 (信成 , 台灣)
11. eppendorf (Merck, Germany)
12. 96-well microtitre plate (信成 , 台灣)

伍、儀器：

1. 石臘切片機 (Sacura, Japan)
2. 光學顯微鏡 (Olympus, Japan)
3. 顯微照像數位化整合系統 (MGDS, photomicrography digitize integrate system , 中睿科技 , 台灣)
4. 純水製造機 (Millipore, USA)
5. 離心機 (Beckman, USA)
6. 水平式電泳槽 (Gibco BRL, USA)

III、方法

壹、雌性小白鼠超排卵刺激動物實驗

A、動物

自東海大學畜產所提供之六至八週大雌性小白鼠 (ICR, female mice) 經過光照適應, 飼料及水隨時補充, 並維持 12 小時光照/12 小時黑暗之週期和固定室溫的控制。雌鼠超排卵刺激依據 Hogan B 等之方法 [30] (Fig. 1); 首先將 5 IU 之馬血清促性腺激素 (pregnant mare's serum gonadotropin, PMSG) 以腹膜下注射, 刺激卵泡成長發育; 48 小時後, 再給于 5 IU 人類絨毛促性腺激素 (human chorionic gonadotropin) 腹膜下注射, 以取代黃體生成激素高峰 (LH surge) 而達成超排卵之目的。雌鼠超排卵時, 一氧化氮合成抑制的方法 [31] (Fig. 1) 是以 NOS 抑制劑(L-N^G-nitro-D-arginine methyle ester, L-NAME) 在超排卵開始之最初三天給于腹膜下注射 50 mg/mouse/24h; 而控制組之雌鼠, 不施于超排卵或 NOS 抑制之處置 (Fig. 1)。

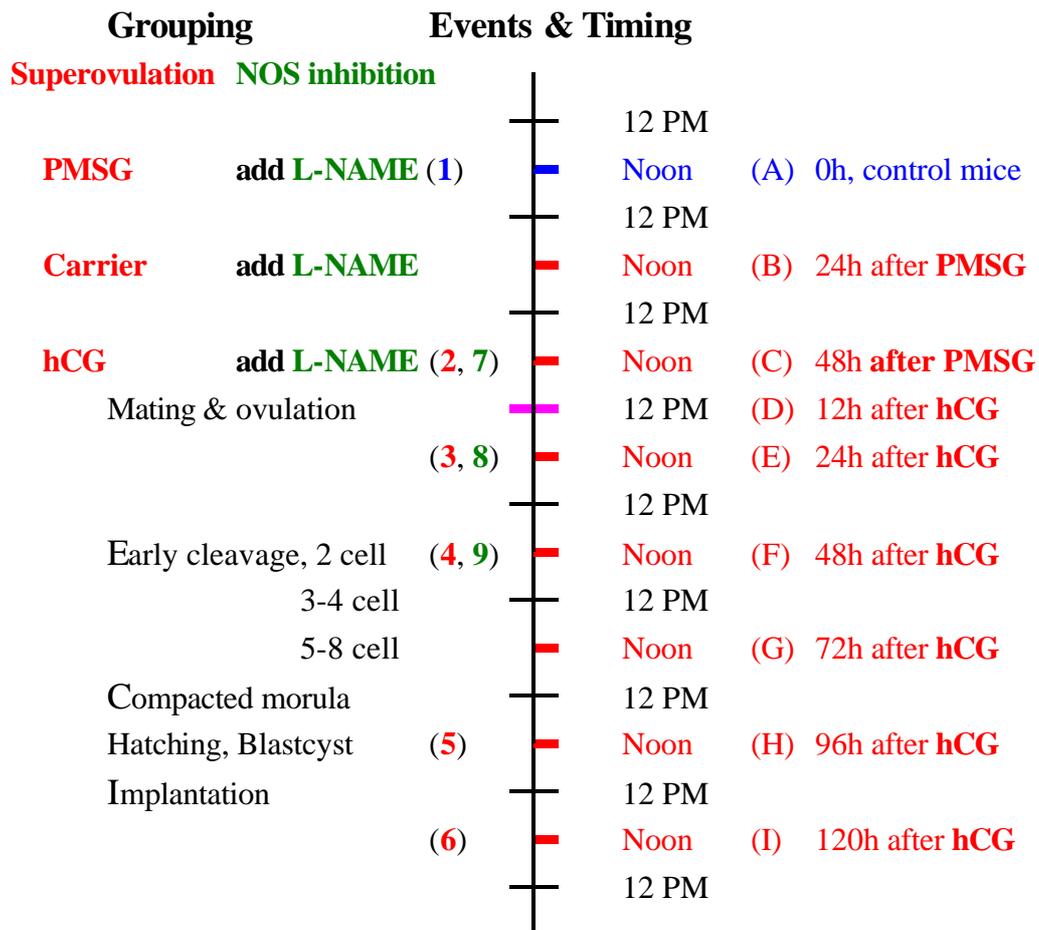


Fig. 1: The sequence of events from PMS injection to embryo implantation (30, 31)

B、檢體組織蒐集

本實驗是雌鼠在超排卵荷爾蒙刺激之處理下，利用頸椎脫臼法宰殺動物，且在不同的特定時間點犧牲以收集檢體(Fig. 1)。雌鼠的生殖系統皆小心地移除(主要包括兩套卵巢、輸卵管和子宮，以及一套子宮頸和陰道)，而且必須清除目視可見之脂肪和血管組織。生殖器官之一套，放入 4%福馬林液中固定；接著在一系列不同濃度酒精中進行脫水作用，置入二甲苯內潔淨及軟臘中浸潤，最後以石臘包埋卵巢組織，用來進行內皮性一氧化氮合成 之免疫組織化學染色 (Immunohistochemical stain, IHC)。另一套生殖器官則快速地放入液態氮中冷凍，保存在-70 中，以進行西方墨點分析 (Western blot analysis)。

C、蘇木紫伊紅染色法 (Hematoxyline & Eosine stain)

于進行免疫組織化學染色前，最初應以蘇木紫伊紅染色法染色，以用於組織之判斷及辨別各類卵巢細胞。實驗步驟如下：

1. 切片：從組織石臘塊中，製做成 4-6 μm 厚的切片，置入烘箱 40 烤乾 30 分鐘。
2. 脫臘：將切片浸泡在 xylene 中脫臘，共三缸，每缸各浸泡 3 分鐘。
3. 水化：再將切片依序浸泡於兩缸 100%、兩缸 95%、兩缸 75% 之酒精中漸次復水，每缸各浸泡 3 分鐘。

4. 沖水：取出切片靜置於流動的自來水中沖洗 3 分鐘。
5. 蘇木紫染色：將切片置於 Hematoxylene 溶液中 3 分鐘。
6. 沖水：取出切片靜置於流動的自來水中沖洗 15 分鐘。
7. 伊紅染色：將切片置於 Eosine 溶液中 1 分鐘。
8. 脫水：將切片依序浸泡於兩缸 75%、兩缸 95%、兩缸 100% 之酒精中漸次脫水，每缸各浸泡 2 分鐘。用濾紙小心吸乾切片。
9. 潔淨：之後浸泡於 xylene 中，共三缸，每缸各浸泡 2 分鐘。
10. 封片：以蓋玻片及封片膠封片即成。

D、免疫組織化學染色法 (Immunohistochemical stain)

從組織石臘塊中，製做成 4-6 μ m 厚的切片，裱貼在特殊的載玻片上 (Silane Coating microslide)，置入烘箱 40 烤乾 30 分鐘。實驗步驟如下：

1. 脫臘：將切片浸泡在 xylene 中脫臘，共三缸每缸各浸泡 3 分鐘。
2. 水化：再將切片依序浸泡於兩缸 100%、兩缸 95%、兩缸 75% 之酒精中漸次復水，每缸各浸泡 3 分鐘。
3. 搖盪浸洗：將切片浸泡於 1 \times PBS 染缸中，搖盪浸洗 5 分鐘，共二次。
4. Quench：內源性過氧化氫 壓制，將組織切片浸泡在 3% 的過氧化氫溶液中，室溫下作用 10 分鐘，以 1 \times PBS 沖洗 2 次。

5. 微波加熱：將切片浸泡於 1×PBS 之缸中，微波加熱 5 分鐘。
6. 搖盪浸洗：取出後將切片浸泡於 1×PBS 染缸中，搖盪浸洗 5 分鐘，共二次。
7. Blocking：在組織切片上，依據 VECTASTAIN ABC Kit (Vector Laboratory, Burlingame, CA, USA)之方法，加入 blocking reagent，在室溫下作用 30 分鐘，以阻斷非免疫性結合。
8. 加入一次抗體：在組織切片上，加上來自兔子之抗 eNOS 之多株抗體 (eNOS; Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA.以 1×PBS 稀釋成 1:50)，置於溼氣盒中，4 下過夜。
9. 搖盪浸洗：隔天取出切片，浸泡於 1×PBS 染缸中，搖盪浸洗 5 分鐘，共三次。
10. 加入二次抗體：在組織切片上，依據 VECTASTAIN ABC Kit (Vector Laboratory, Burlingame, CA, USA)之方法，加上來自山羊之抗兔子之二次抗體，在室溫下作用 30 分鐘。
11. 搖盪浸洗：之後將切片浸泡於 1×PBS 染缸中，搖盪浸洗 5 分鐘，共三次。
12. ABC reagent：在組織切片上，依據 VECTASTAIN ABC Kit (Vector Laboratory, Burlingame, CA, USA)之方法，加入 ABC reagent，在室溫下作用 30 分鐘。

13. 搖盪浸洗：之後將切片浸泡於 1×PBS 染缸中，搖盪浸洗 5 分鐘，共三次。
14. DAB 染色：在組織切片上，加入 DAB 染色套件包括：3-3' Diamionbenzidine，呈色劑和過氧化氫，在室溫下作用 5 分鐘。
15. 搖盪浸洗：之後將切片浸泡於 DDW 二次水染缸中，搖盪浸洗 5 分鐘，共三次。
16. 對比染色：將切片浸泡於蘇木紫 Hematoxiline 溶液中 45 秒。
17. 沖水：取出切片靜置於流動的自來水中沖洗 10 分鐘。
11. 脫水：將切片依序浸泡於兩缸 75%、兩缸 95%、兩缸 100% 之酒精中漸次脫水，每缸各浸泡 3 分鐘。
12. 潔淨：之後，浸泡於 xylene 中，共三缸，每缸各浸泡 3 分鐘。
18. 封片：以蓋玻片及封片膠封片即成。
19. 負控制片：以非免疫兔子血清取代一次抗體製做。
20. 正控制片：以人類胎兒臍帶切片來作 eNOS 之免疫染色。

E、西方墨點分析 (Western blot analysis)

為了定量內皮性一氧化氮合成，接著以西方墨點法來分析小白鼠的卵巢組織一氧化氮合成之蛋白質量。實驗步驟如下：

1. 組織溶解物的萃取(Tissue lysate extraction)：將卵巢組織加入

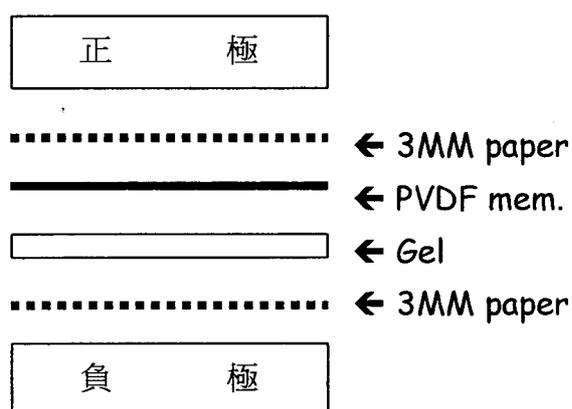
50-100 μ l 萃取溶液 (含 10 mM Tris/HCL pH=8 , 0.32M sucrose , 5 mM EDTA , 1% Triton X-100 , 2 mM dithiothreitol (DTT) , 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride) , 用研磨杵將組織均質化 , 收集細胞於 eppendorf 中冰浴 10 分鐘 , 然後在 4 $^{\circ}$ C 高速離心 14,000g , 30 分鐘 ; 收集上清液 , 保存於 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中備用 , 並以下述方法定量蛋白質。

2. 蛋白質濃度定量分析 (Protein concentration assay) (Bradford, 1976) : 取 200 μ l 的 Bio-Rad 染劑及 799 μ l 的去離子水 , 再加入 1 μ l 的待測蛋白質溶液 ; 均勻混合後 , 室溫下避光作用 5 分鐘 , 讀取波長 595nm 的吸光值。使用不同濃度的 Bovine serum albumin (BSA)(濃度由 0.1~10 μ g/ μ l) 作一標準曲線 , 分析最佳的標準迴歸直線 , 求出此直線的方程式(當此直線的迴歸分析結果之 R^2 , 0.99 時 , 此直線方程式的值始可信)。將樣本液之 O.D. 值帶入方程式 , 求出相對應的蛋白質濃度。
3. 蛋白質膠體電泳法 (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) (Molecular Cloning, second edition, 1989) : 取等量(50 μ g)之組織溶解物的萃取蛋白液 , 同時加入 6x protein loading buffer (350 mM Tris-HCl , pH 6.8 , 12 % SDS , 0.02 % bromophenolblue , 35 % glycerol , 30 % -ME (

-mercaptoethanol)), 混合均勻後, 以水浴法加熱至 98 持續加熱 7 分鐘, 再使用含有 SDS 之 8% acrylamide gel 以電泳 (electrophoresis) 的方式將蛋白質分離, 電泳的緩衝液 (SDS electrophoresis running buffer) 配方為: 25mM Tris-base, 192 mM glycine 及 0.1% SDS, 並調整其 pH 值為 8.3, 於跑電泳前新鮮配製。先以 80 伏特電壓跑 5 % stacking gel (內含 5% acrylamide, ddH₂O, 125mM Tris-HCl pH=6.8, 0.1% SDS, 0.1% Ammonium persulfate (APS), 2 ul TEMED) 20 分鐘, 再改變電壓為 120 伏特, 跑 8% running gel (內含 8% acrylamide, ddH₂O, 375mM Tris-HCl pH=8.8, 0.1% SDS, 0.1% APS, 10 ul TEMED) 分離蛋白質, 作用時間約為 1 至 1.5 小時。

4. 蛋白質轉移 (Transfer protein to PVDF membrane) (Molecular Cloning, second edition, 1989): 將 PVDF membrane (polyvinylidene difluoride membrane) 以及 3MM filter paper 裁剪至膠片大小, 以 100 % Methanol 浸潤、活化 PVDF membrane 1 至 2 分鐘後, 將 membrane 浸泡於轉印溶液中 (Transfer buffer, 包含 48 mM Tris-base, 39mM glycine, 0.037 % SDS 及 20 % methanol) 備用。取下的膠片浸泡於 Transfer buffer 中, 同時覆蓋於已活化及浸潤好之 PVDF membrane 上, 並在此二層的上下各再增加一層亦於 Transfer

buffer 中浸濕過的 3MM filter paper , 作成一個似三明治 (sandwich) 的夾層(即如下圖所示) , 放置於濕式 transfer machine 中 , 同時通以 200mA 的電流 , 於 4°C 中作用 1.5 小時 , 將蛋白質轉印到 PVDF 上。



轉印完成後 , 取下膠片及 PVDF membrane , 同時將膠片以含有 0.05% Coomassie Brilliant Blue R250 (內含 0.05% Coomassie brilliant blue R-250 , 50% Methanol, 10% Acetic acid) 染色 20 分鐘 , 再轉換膠片至脫色劑中 (Gel destain solution:5% Methanol, 7% Acetic acid) 脫色 , 置於軌道式振盪器擺動至完全脫色 , 以確定 transfer 的效能如何。

5. 免疫墨點法 (Immunoblotting) (Molecular Cloning, second edition, 1989) : 轉印好蛋白質的 PVDF membrane 先置於 blocking solution (PBS , 0.05% Tween-20 , 1% BSA , 0.05% Sodium azide (NaN₃))中 , 4°C 冰箱中均勻振盪 18 小時 , 競爭掉非特異性的蛋白質結合反應。

以 Washing buffer (0.05% PBST, 包含 PBS 及 0.05% Tween-20) 清洗二次, 再以 blocking solution 作為溶劑, 分別將欲測之一次抗體稀釋 500 倍的作用濃度, 加至 blocking 好之 PVDF membrane, 使其均勻的覆蓋於 membrane 上, 置於軌道式振盪器上於室溫振盪擺動 60 分鐘, 此時蛋白質已接上一次抗體, 我們再以適量的 0.05% PBST 清洗四次, 每次 15 分鐘, 去除未接上、多餘的一次抗體。依不同的一次抗體, 加入特異作用的二次抗體, 稀釋倍數為 5,000 倍 (anti-rabbit IgG) 於室溫下作用 60 分鐘, 反應之後, 同樣以適量的 0.05% PBST 清洗四次, 每次 15 分鐘, 以清洗掉未接合約二次抗體, 同時亦可減少背景值。由於所使用的二次抗體上連結的是過氧化酵素 (horse-radish peroxidase, HRP), 故我們使用 enhanced-chemnuminescence (ECL) 的酵素系統來偵測訊息的強弱。將 ECL 溶液 (ECL1 及 ECL2) 以體積 1:1 等比例混合, 並將含有蛋白質之 PVDF 正面沾染混合好之 ECL 溶液, 同時以保鮮膜完整包裹, 使用 Kodak Bio Max light film 壓片、洗片, 視訊息強弱而調整壓片時間長短, 以此方法來檢視細胞內欲測蛋白質的變化量。

貳、生育期婦女之控制性超排卵刺激

A、受試者：

為生育期之婦女共計 18 名，包括：經篩選具有正常月經週期的產房年輕護士 6 名；與試管嬰兒治療中接受超排卵刺激的不孕症婦女 12 名。

B、控制性超排卵刺激法：

以 long protocol 方式，實驗依據蔡教授等之方法〔32〕；自前黃體期給予半劑量的 Leuprolide Acetate Depot，以達到向下調節腦下垂體功能。再每天注射促性腺激素(連續 9 至 13 天)，同時以陰道式超音波和動情素核醫檢查來監視卵泡的成長狀況。

C、血液檢體的採取：

是在早上 8 時至 9 時，每次採取隔夜空腹血液，每個個案各採血三次。實驗分為以下兩組：

1. 控制組：三次時間點，分別為月經來潮第 3 天、第 12 天和第 21 天。
2. 超排卵組：第一次為月經來潮之第 3 天，第二次為 HCG 注射當天，亦即有二個領先卵泡大於 18 公厘，第三次為取卵後第 7 天。

D、血漿與血清：

受試者血液取出後，放入預先冷藏過的含抗凝血劑管(EDTA)和不含抗凝血劑一般生化管置於 4℃；一小時內給于 2000g 冷凍離心 15 分鐘。然後在 -70℃ 下冷凍保存。血漿用來檢測一氧化氮的氧化代謝產物硝酸鹽與亞硝酸鹽，而血清用來測定雌二醇和黃體素。

E、血清雌二醇和黃體素的測定：

由中國醫藥學院附設醫院核子醫學部以 RIA 的方法來檢測 (Coat-A-Count Estradiol, Progesterone, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA)。雌二醇檢驗敏感度 8 pg/mL，變異係數 <7.0%；黃體素檢驗敏感度 0.02 ng/mL，變異係數 <8.8%。

F、血漿一氧化氮的氧化代謝產物的測定：

一氧化氮在血液中有兩個穩定的氧化代謝產物即： NO_3^- 、 NO_2^- ，先將 NO_3^- 還原成 NO_2^- ，再利用 Griess 檢測法，來測定硝酸鹽與亞硝酸鹽的總含量 (NO_x)。

1. 加入 30 μ l plasma 加入 10 μ l NADPH (0.75 U/ml) 加入 10 μ l nitrate reductase (0.5 U/ml) 置於 96-well microtitre plate，20 分鐘室溫。
2. 加入 50 μ l Griess reagent 靜置 10 分鐘室溫。

(Griess reagent: 1 part 1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine

dihydrochloride in distilled water + 1 part 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄)

3. 接著以 micro plate reader (ELISA reader) 定量在 540 nm 的吸收波長。
4. 血漿 NO_x 的總量 (nitrite & nitrate) 即可由 NaNO₂ standard curve 算出。

參、統計

本研究統計方式採用 Student's t test 與 Linear regression analysis 進行實驗中各組之統計分析。數據以 mean ± S.E.M. 表示；當 p-value < 0.05，則視為具有顯著性之差異。

IV、結果：

壹、雌性小白鼠超排卵刺激動物實驗

小白鼠卵巢細胞的內皮性一氧化氮合成 之免疫組織化學染色：

在超排卵刺激下，小白鼠卵巢會進行濾泡成長、排卵以及黃體化 (Fig. 2)；在未給于 PMSG 及 hCG 刺激之控制組小白鼠，其內皮性一氧化氮合成 之免疫組織化學染色，就具有細胞特定性質的，在卵巢的膜細胞層 (thecal cell layer) 和基質細胞 (stromal cell) 以及卵細胞的表面皆可見到褐色的 eNOS 表現，而顆粒細胞層則無發現 (Fig. 3, Fig. 4)。在給于 PMSG 刺激後 24 小時 (Fig. 5) 48 小時 (Fig. 6)，可見形成多個 antral follicles，外圍著膜細胞層而內圍著多層的顆粒細胞層，eNOS 在少許的顆粒細胞中也開始表現，而在前述細胞甚至更為活躍。在注射 hCG 後 12 小時，褐色的 eNOS 表現，在卵巢的膜細胞層和基質細胞，依然持續存在，在基底膜旁的顆粒細胞 (mural granulosa cell) 也逐漸明顯 (Fig. 7, A, B, C, D)。注射 hCG 後 24 小時，卵巢已經排卵而且卵泡開始黃體化，可見 eNOS 染色出現在發展中的黃體 (Fig. 7, E, F, G, H)。在注射 hCG 後 48 小時、72 小時，褐色的 eNOS 表現，在卵巢的膜細胞層和基質細胞，依然持續存在，而且在發展中的黃體，可見明顯的血管內皮細胞染色以及在顆粒性黃體細胞之分散性表現 (Fig. 8)。在注射 hCG 後 96 小時、120 小時，胚胎在

子宮內著床，卵巢可見許多發育良好之黃體，在整個黃體內可見明顯褐色的 eNOS 染色 (Fig. 9)。

在同時給于超排卵以及 NOS 抑制劑 L-NAME 的小白鼠，刺激後 48 小時 antral follicles 並不明顯，褐色的 eNOS 染色在卵巢的膜細胞層和基質細胞以及卵細胞的表面皆可發現，而顆粒細胞層也無表現 (Fig. 10)。在注射 hCG 後 24 小時，依然可見 eNOS 染色出現在發展中的黃體 (Fig. 11)。而注射 hCG 後 48 小時，在卵巢可見少數卵泡有黃體化，其膜細胞層和基質細胞以及在發育中的黃體，褐色的 eNOS 表現依然持續存在 (Fig. 12, 13)。

小白鼠卵巢細胞的內皮性一氧化氮合成 之西方墨點分析：

在超排卵刺激下，小白鼠卵巢會進行濾泡成長、排卵以及黃體化；為了量化內皮性一氧化氮合成，在此一連串生殖程序下之表現，故以西方墨點分析法，來定量 eNOS 蛋白質的相對濃度 (Fig. 14, A, B)。我們觀察到 eNOS 蛋白質出現在各泳道上，包括：【Lane 1】控制組的卵巢 (no PMSG)，和【Lane 2】超排卵注射 PMSG 48 小時後、【Lane 3】注射 hCG 24 小時後、【Lane 4】注射 hCG 48 小時後、【Lane 5】注射 hCG 96 小時後、【Lane 6】注射 hCG 120 小時後；以及超排卵加以 NOS 抑制劑，包括：【Lane 7】注射 PMSG + L-NAME 48 小時後、【Lane 8】注射 hCG + L-NAME 24 小時後、【Lane 9】注

射 hCG + L-NAME 48 小時後 (Fig. 14A, Lanes 1-9) 再利用密度測定軟體，測量 eNOS 在各個不同時期的平均變化 (Fig. 14B, Table 2)。在卵泡加速發育後卵巢內 eNOS 含量，相對於控制組增加為 2 倍 (Fig. 14B, Lane 2, Table 2)；在注射 hCG 24 小時，相對於控制組更增加為 4.6 倍之多 (Fig. 14B, Lane 3, Table 2)；而後則邁入黃體的 eNOS 表現高原期，約有六至七倍 (Fig. 14B, Lanes 4-6, Table 2)，而且皆具有顯著性之差異。另外，L-NAME 對於超排卵的效應，當以 PMSG + L-NAME 刺激卵泡成長後，各泳道【Lane 7, 8, 9】相對於控制組【Lane 1】，eNOS 表現逐漸增強，尤其以 hCG + L-NAME 觸發排卵後，eNOS 表現就有顯著性差異 (Fig. 14B, Lane 7-9, Table 2)；但與前組比較 eNOS 含量顯著性較少 (Table 2)。

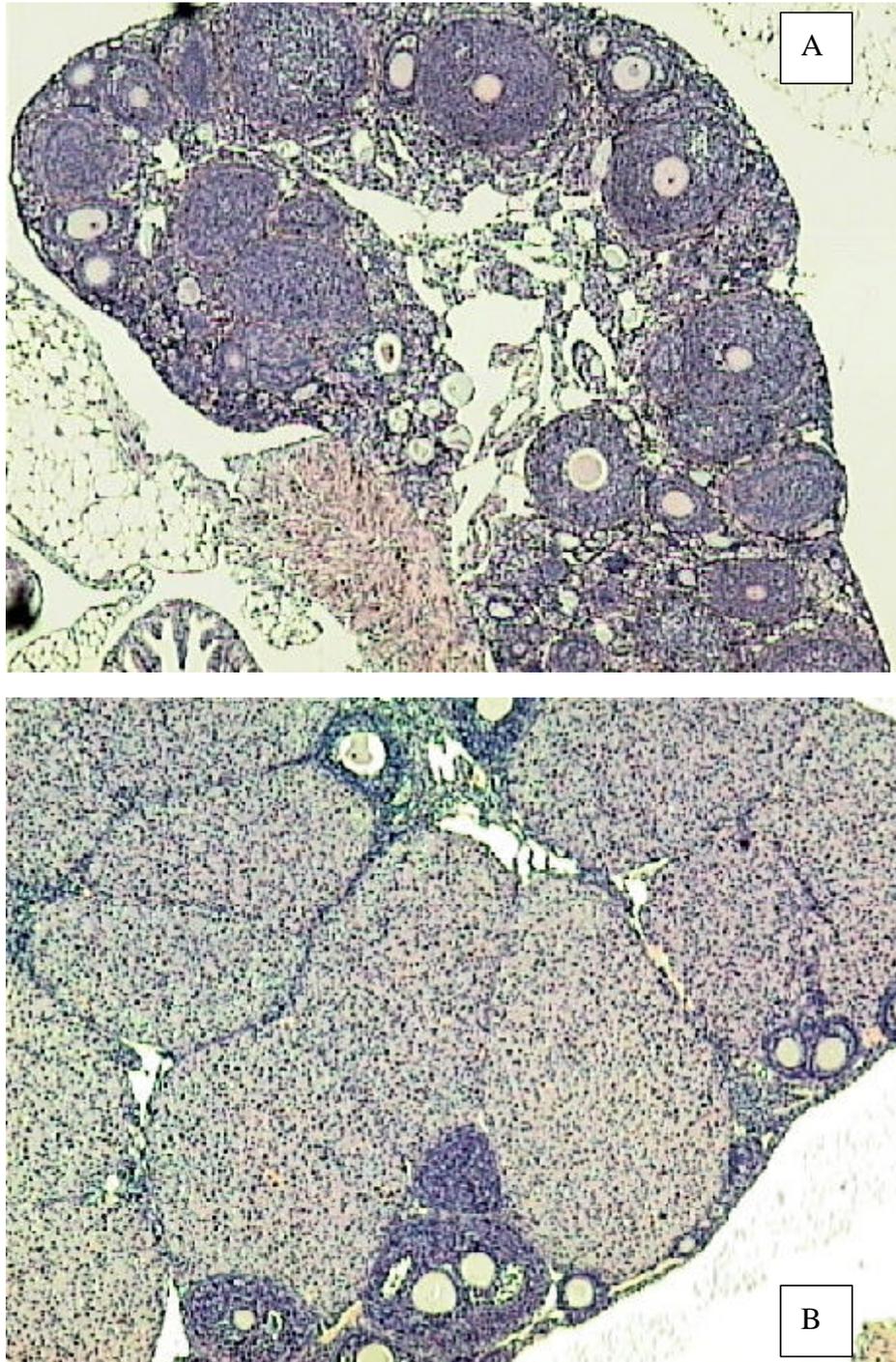


Fig. 2: HE staining of mice ovaries. A: Control mice (no PMSG) show many follicles in different developing stages including early antral follicle with multiple layers of granulosa cells surrounding a oocyte (4×25). B: Well-developed corpus luteum after super-ovulation in a pregnant mouse (120 h after hCG injection)(10×25).

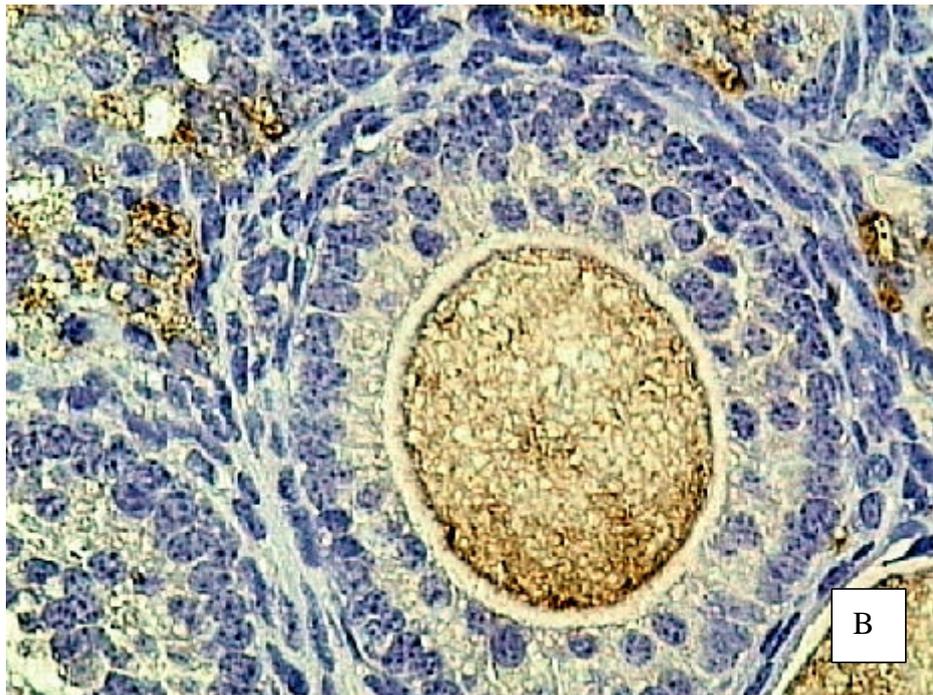
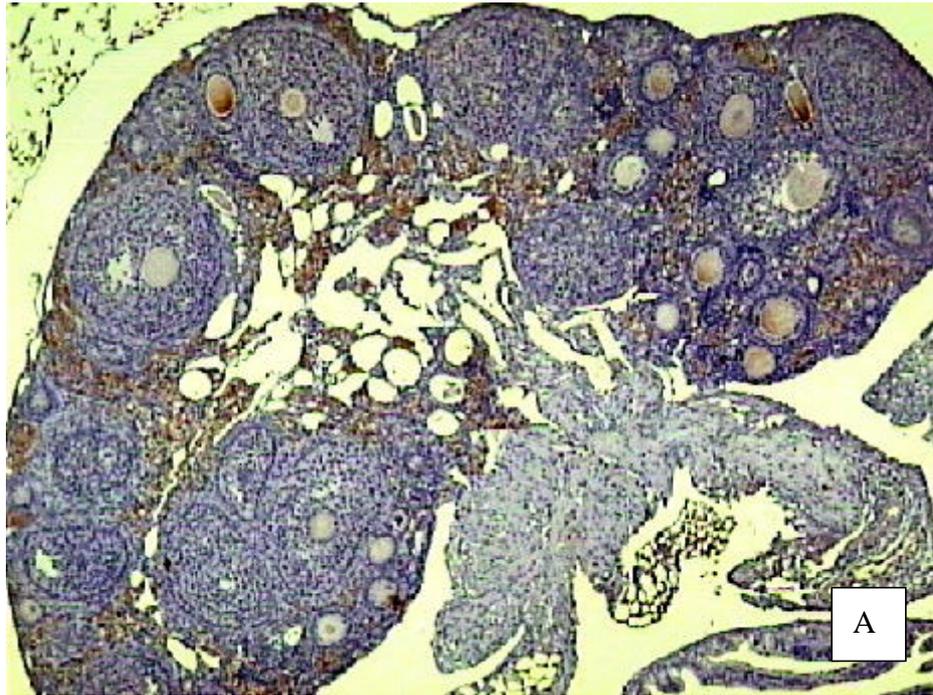


Fig. 3: Brownish immunostaining indicated the presence of eNOS in the thecal cell layer and stroma cells and on the surface of oocytes in the control mice (A, 4×25, B, 40×25).

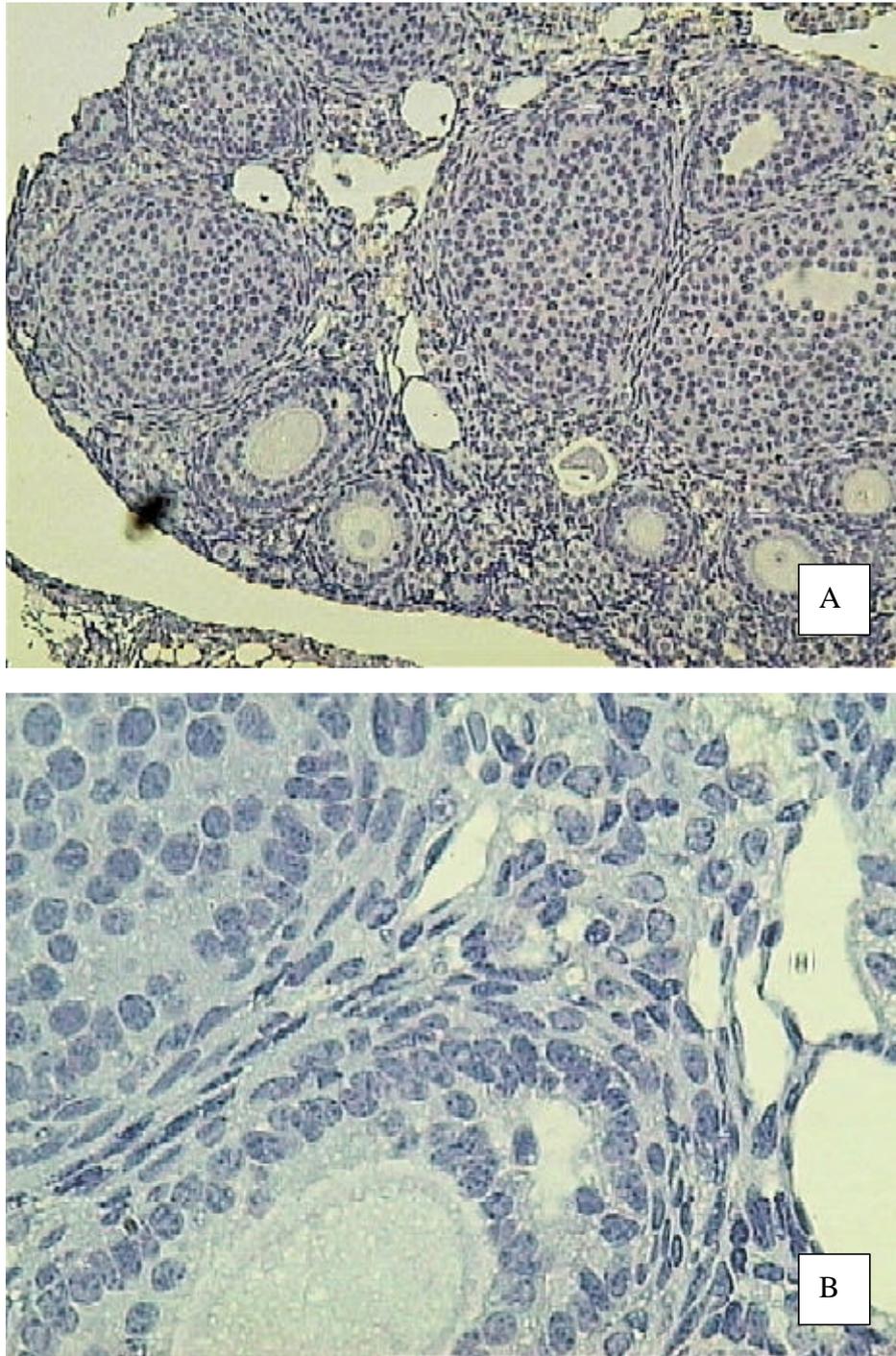


Fig. 4: Negative control of ovarian sections obtained from control mice shows no brownish immunostaining (A, 4×25, B, 40×25).

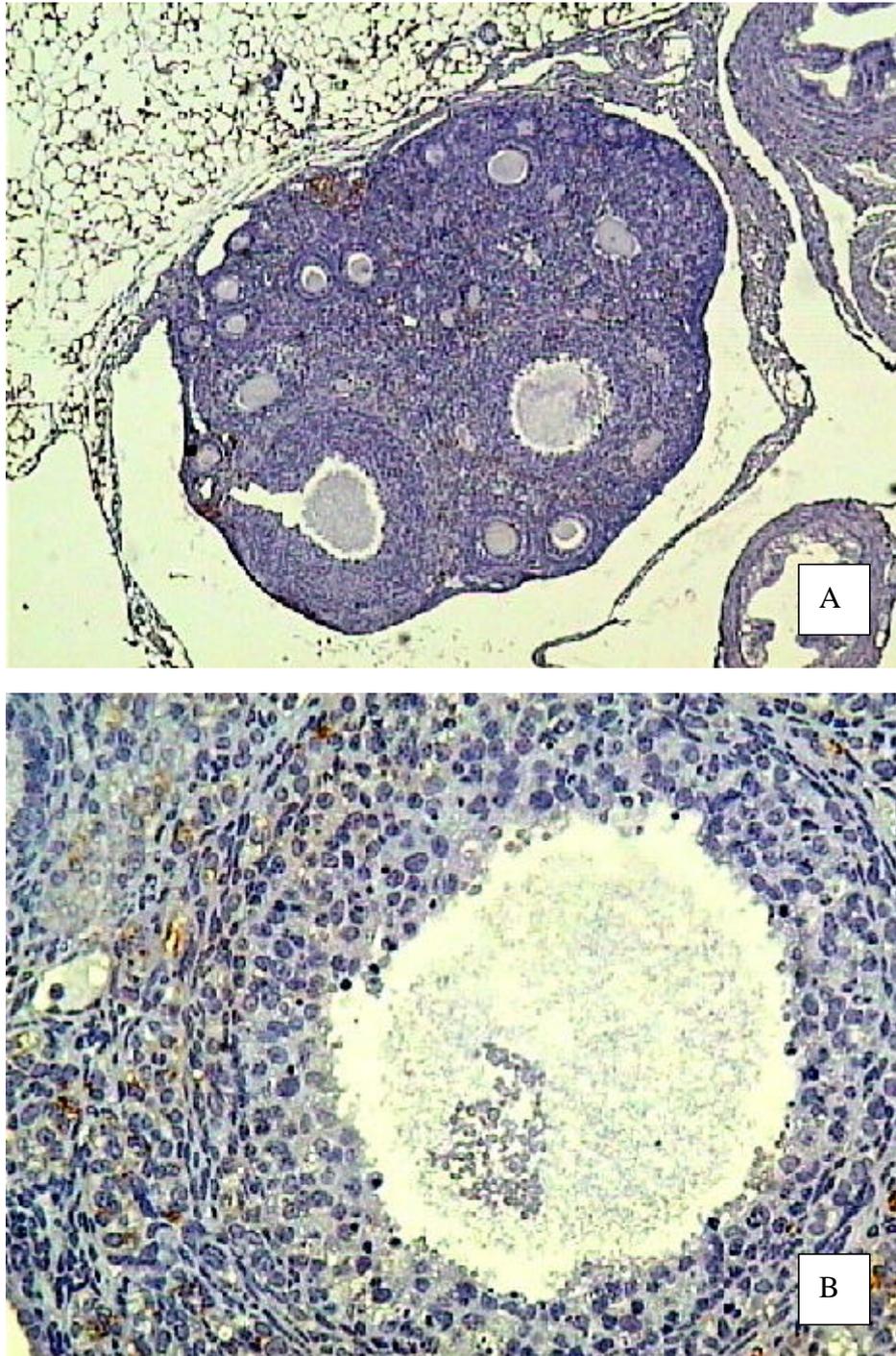


Fig. 5: Brownish immunostaining indicated the presence of eNOS in the thecal cell layer and stroma cells after stimulation of follicular development with PMSG for 24h (A, 4×25, B, 20×25).

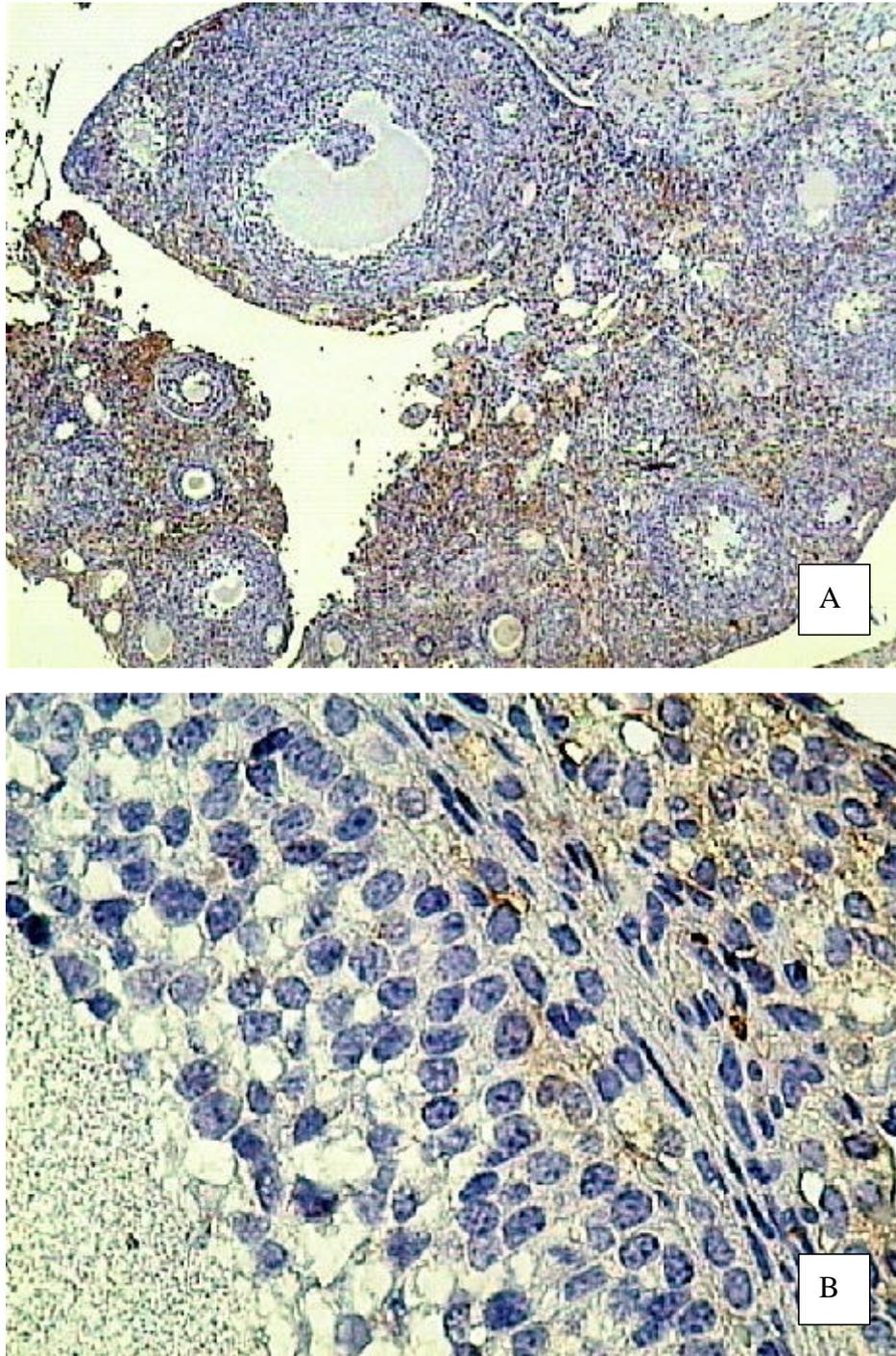


Fig. 6: Brownish immunostaining indicated the presence of eNOS in the thecal cell layer and stroma cells after stimulation of follicular development with PMSG for 48h (A, 4×25, B, 40×25). eNOS staining is present in scattered mural granulosa cells (B, 40×25).

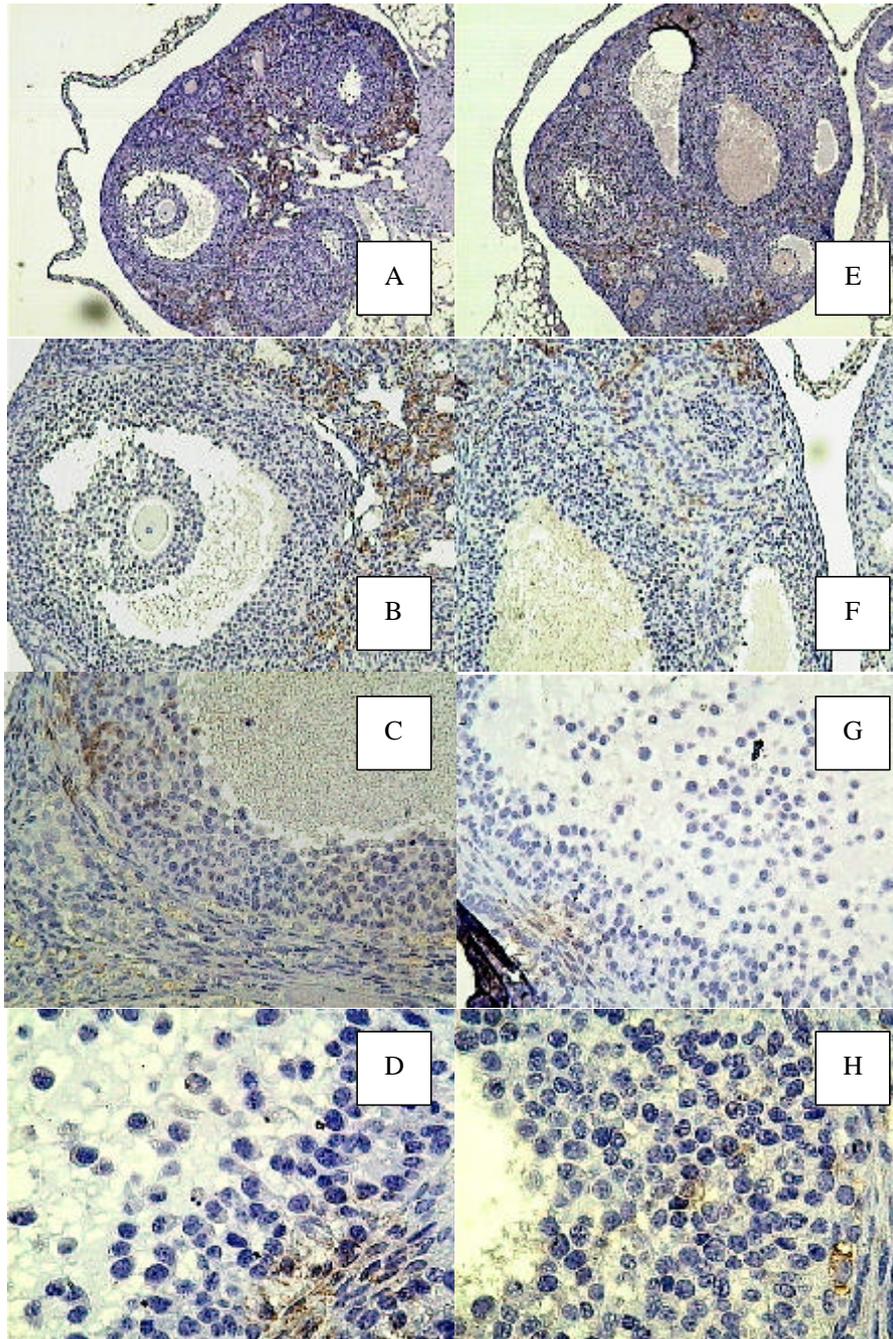


Fig. 7: After injection of hCG for 12h (A, 4×25, B, 10×25, C, 20×25, D, 40×25), brownish immunostaining in both stromal cells and thecal cell layer remained. Fig. 7C, 7D show positive staining for eNOS in mural granulosa cells, but negative in antral granulosa cells. After ovulation and luteinization, 24h post-hCG injection (E, 4×25, F, 10×25, G, 20×25, H, 40×25), immunoreactivity for eNOS was seen in the developing corpus luteum (Fig. 7H).

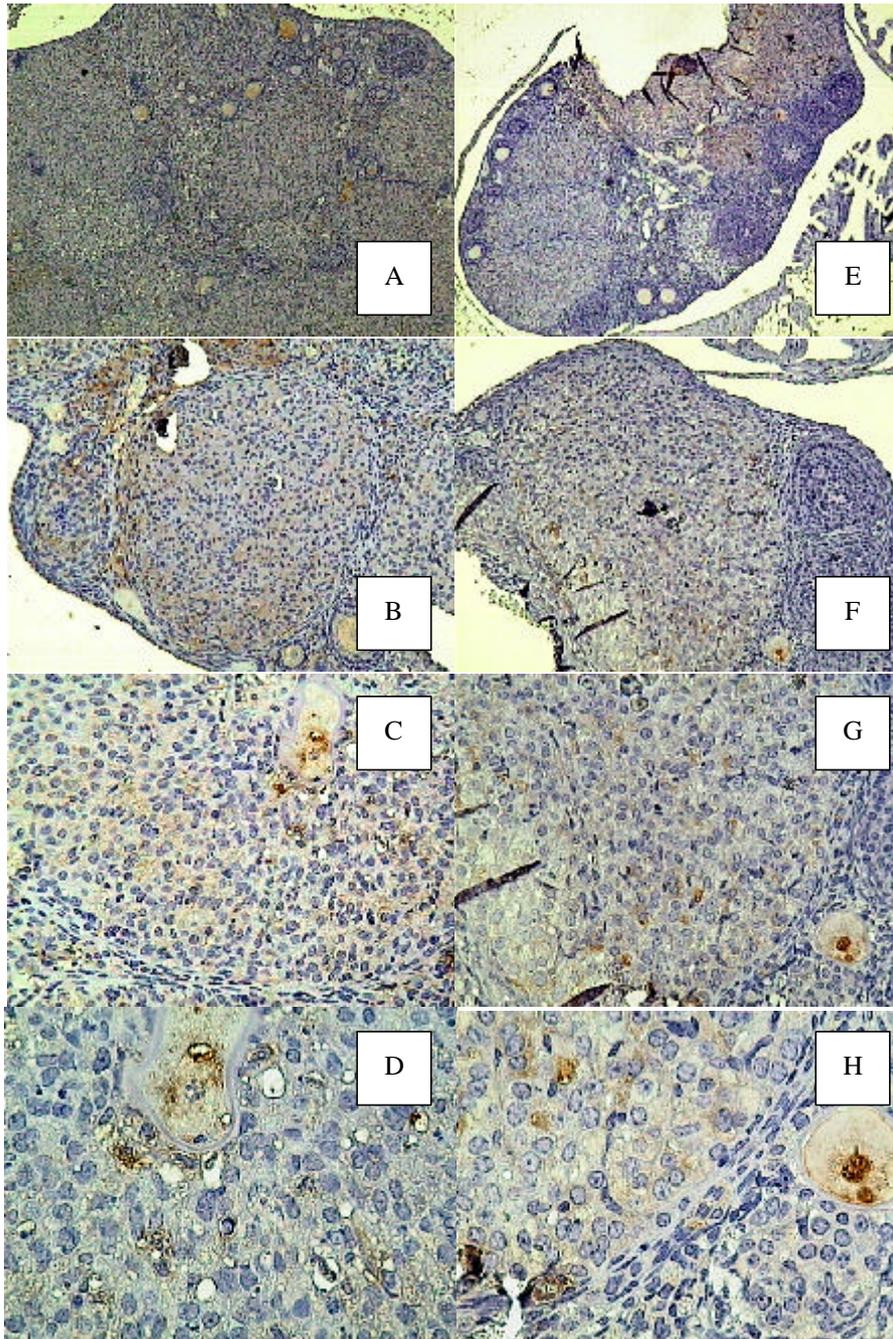


Fig. 8: After injection of hCG for 48h (A, 4×25, B, 10×25, C, 20×25, D, 40×25) and 72h (E, 4×25, F, 10×25, G, 20×25, H, 40×25), brownish immunostaining in both stromal cells and thecal cell layer remained. In the developing corpus luteum, intensely stained endothelium of the vessels and punctate staining in the granulosa luteum cells were seen.

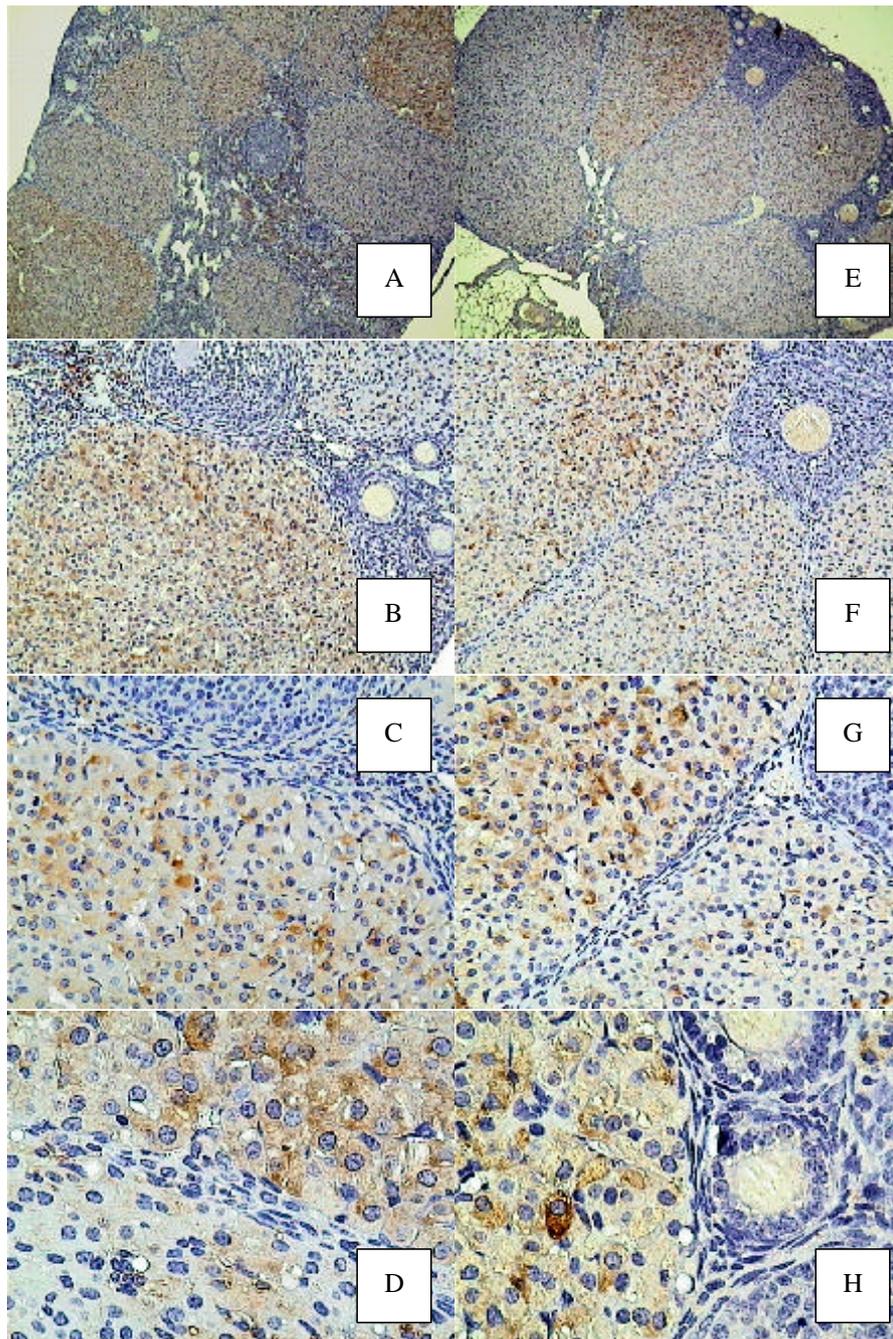


Fig. 9: After injection of hCG for 96h (A, 4×25, B, 10×25, C, 20×25, D, 40×25) & 120h (E, 4×25, F, 10×25, G, 20×25, H, 40×25), well-established corpus luteum were found. Intensely stained luteal parenchymal cells and endothelial cells for eNOS were observed in the entire corpus luteum.

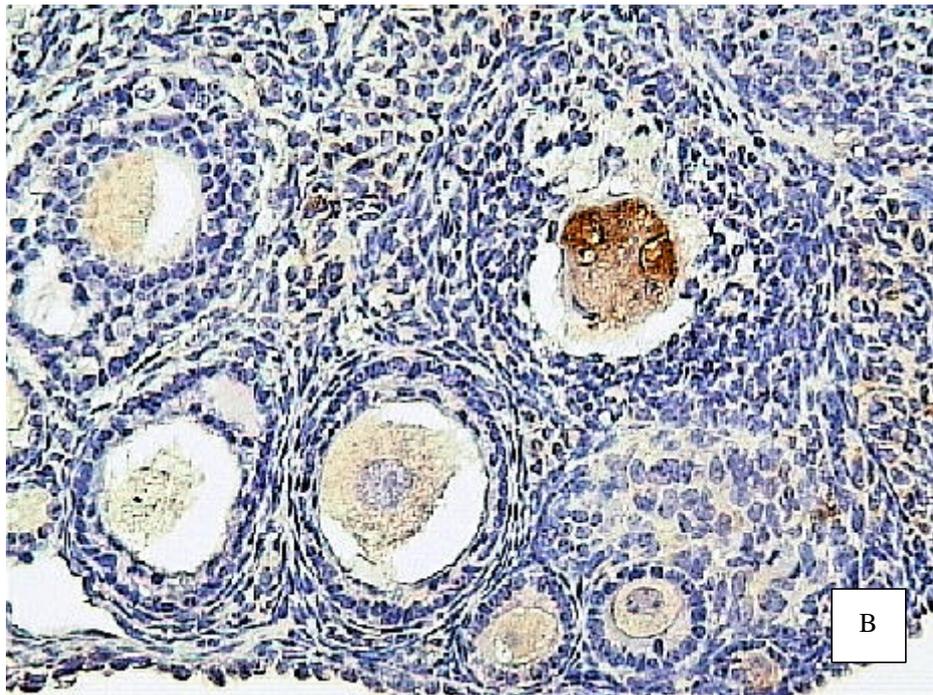


Fig. 10: Brownish immunostaining indicated the presence of eNOS in the thecal cell layer and stroma cells and on the surface of oocytes after stimulation with PMSG plus L-NAME for 48h (A, 4×25, B, 20×25).

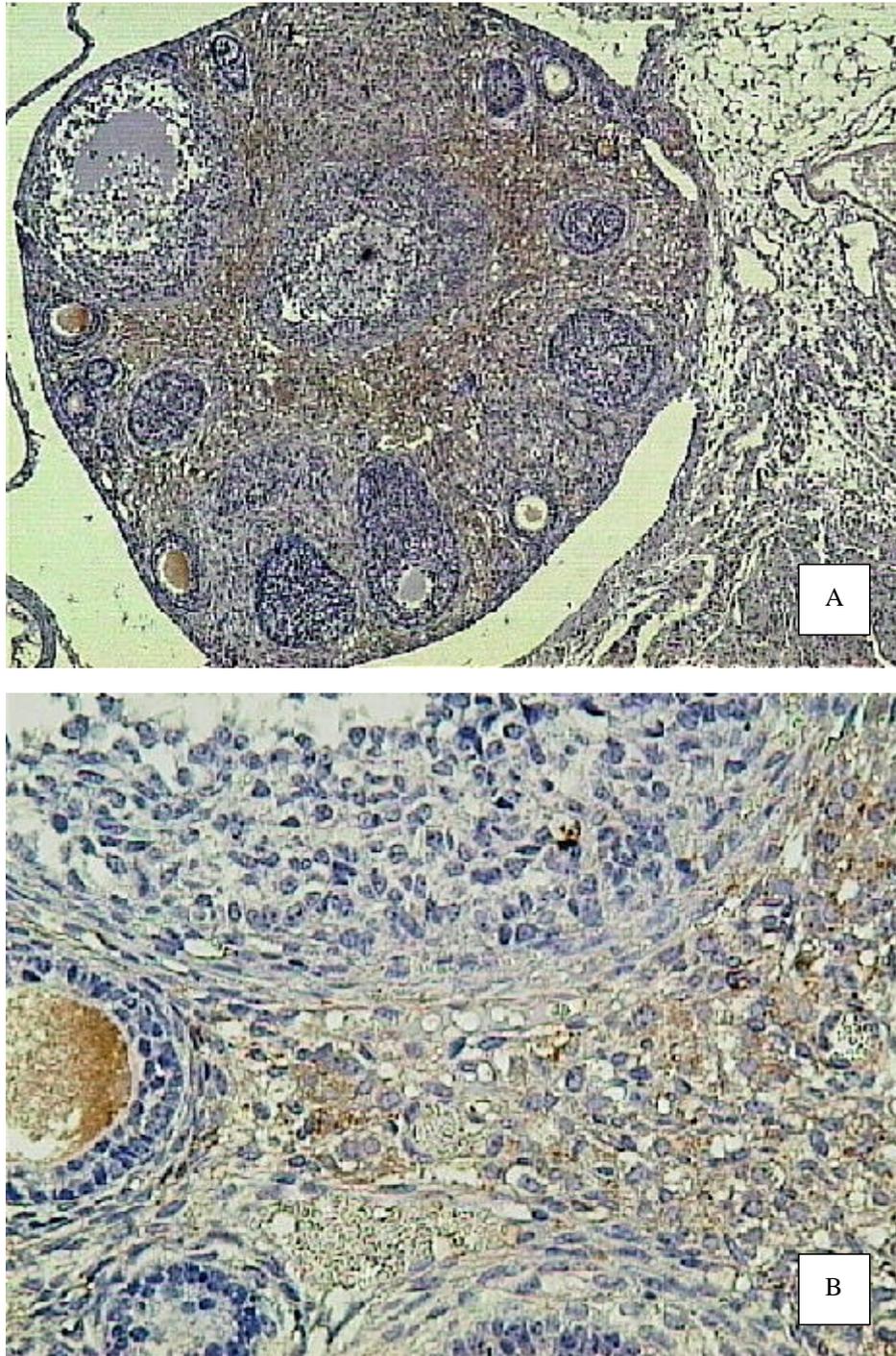


Fig. 11: Brownish immunostaining indicated the presence of eNOS in the thecal cell layer and stroma cells and on the surface of oocytes after superovulation with PMSG plus L-NAME for 48h, then hCG plus L-NAME for 24h (A, 4×25, B, 20×25).

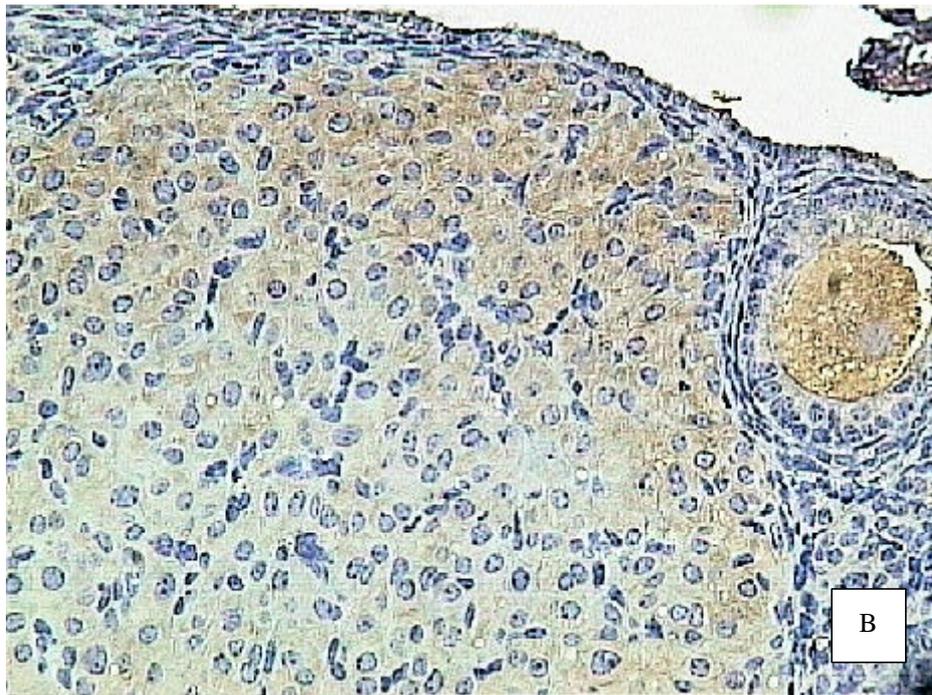
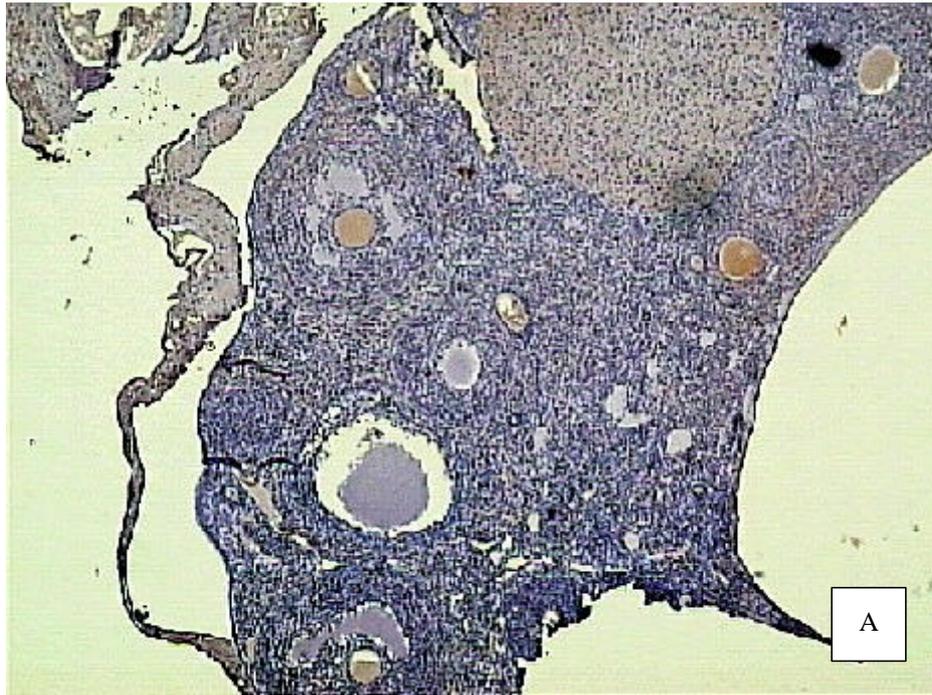


Fig. 12: Brownish immunostaining indicated the presence of eNOS in the thecal cell layer and stroma cells, and on the surface of oocytes after superovulation with PMSG plus L-NAME for 48h, then hCG plus L-NAME for 48h, ovulation and luteinization occurred (A, 4×25 B, 20×25).

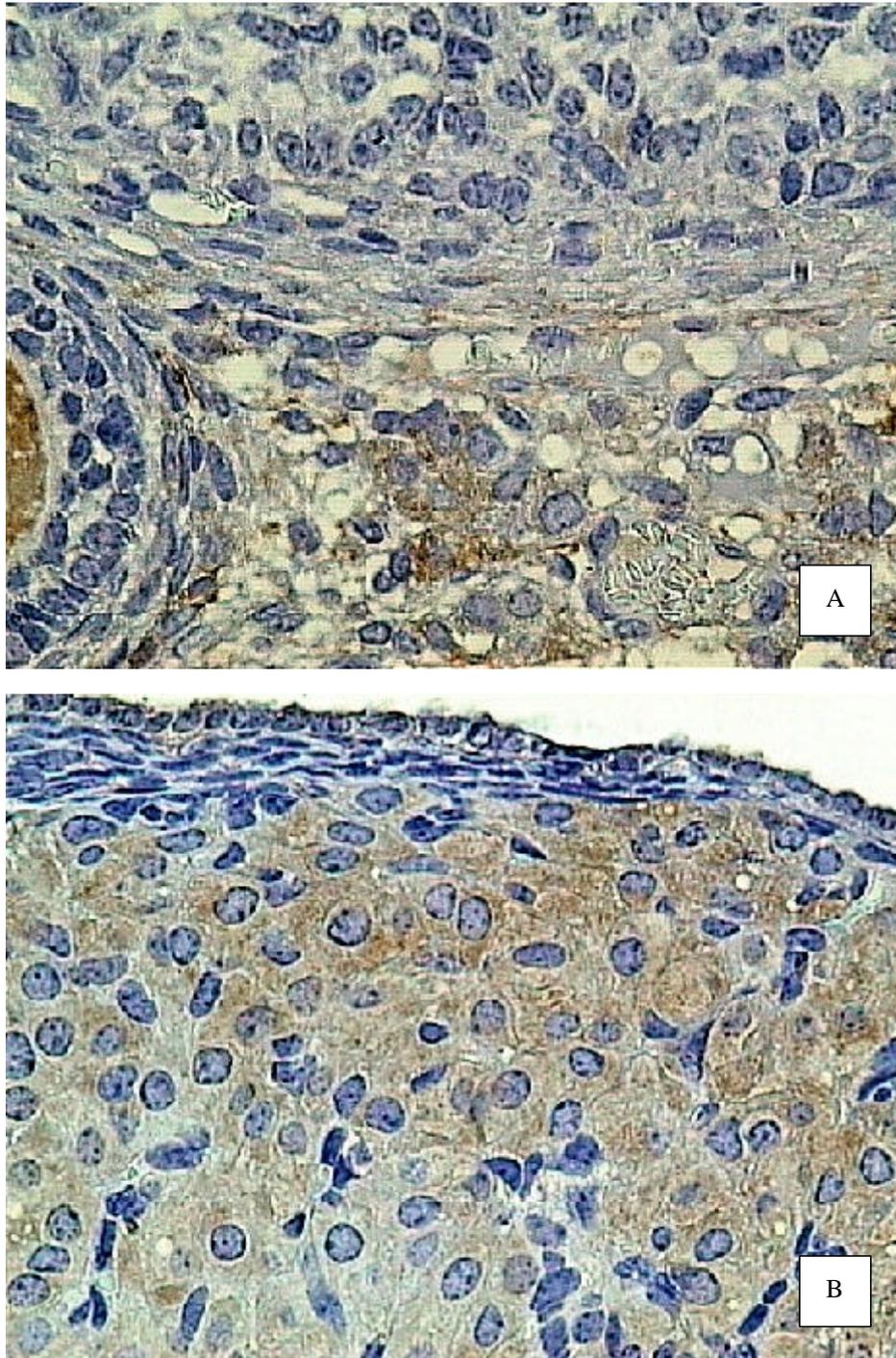


Fig. 13: Brownish immunostaining indicated the presence of eNOS in the thecal cell layer and stroma cells, and on the surface of oocytes after superovulation with PMSG plus L-NAME for 48h, then hCG plus L-NAME for 48h(A, 40×25). Immunoreactivity for eNOS was still observed in the developing corpus luteum (B, 40×25).

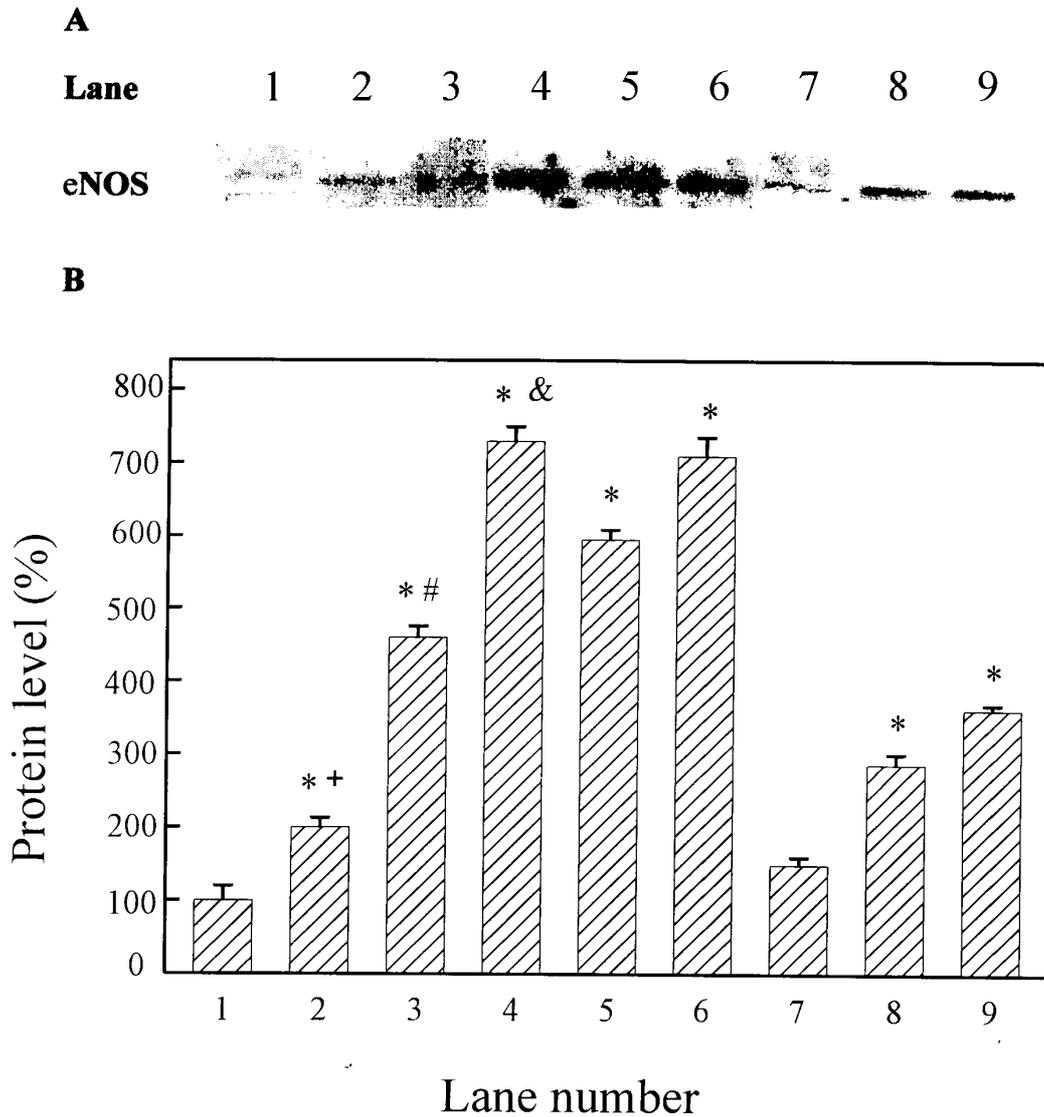


Fig. 14: Lanes are as follows: 1 = ovary from control mice (no PMSG); 2 = ovary from 48h after PMSG; 3 = ovary from 24h after hCG; 4 = ovary from 48h after hCG; 5 = ovary from 96h after hCG; 6 = ovary from 120h after hCG; 7 = ovary from 48h after PMSG + L-NAME; 8 = ovary from 24h after hCG + L-NAME; 9 = ovary from 48h after hCG + L-NAME. A: Representative Western blot of intraovarian eNOS protein expression after gonadotropin or gonadotropin plus L-NAME treatment in the mice. B: Quantitative analysis of intraovarian eNOS protein expression during follicular development, ovulation, and luteal phase. The immunoblot signals were quantitated by a densitometer, and the value for control was arbitrarily set as 1. Data points represent the mean \pm SEM. A significance level of $p < 0.05$ was used for all comparisons.

Table. 1: Quantitative analysis of intraovarian eNOS protein expression & p value.

Lane number	eNOS protein level	p value
	(%) Mean \pm SEM	
1	100 \pm 19	-
2	200 \pm 13	0.001
3	460 \pm 15	0.0001
4	730 \pm 20	0.00002
5	595 \pm 26	0.0001
6	710 \pm 14	0.00001
7	150 \pm 10	0.08
8	286 \pm 15	0.0015
9	362 \pm 7	0.0002
2 vs 7		0.039
3 vs 8		0.0012
4 vs 9		0.00007

Values are presented as mean \pm SEM.

The value for control was arbitrarily set as 100%.

A significance level of $p < 0.05$ was used for all comparisons.

貳、生育期婦女之控制性超排卵刺激

接受超排卵刺激的不孕症婦女和正常月經週期之控制組的婦女之臨床特徵如 Table. 2。

血清雌二醇和黃體素的濃度：

正常月經週期之控制組的婦女，雌二醇之血清濃度：第一次即 D₃ 之濃度評估為 16.2 ± 2.1 pg/ml, 第二次即 D₁₂, 濃度增加為 61.1 ± 7.2 pg/ml, 第三次即 D₂₁, 濃度為 47.9 ± 16.9 pg/ml, 而黃體素此時之血清濃度為 10 ± 3.2 ng/ml。而另一組接受超排卵刺激的不孕症婦女，雌二醇之血清濃度：第一次即 D₃ 之濃度評估為 12.6 ± 3.3 pg/ml, 第二次即 HCG 注射之日，濃度增加為 852 ± 121 pg/ml, 第三次即採卵後第七天, 濃度為 686 ± 146 pg/ml, 而黃體素此時之血清濃度為 188 ± 33 ng/ml (Fig. 15)。

血漿一氧化氮的氧化代謝產物之濃度：

接受超排卵刺激的不孕症婦女，一氧化氮的氧化代謝產物之血漿濃度與月經週期的關係如 (Fig. 16) 所示，分別為 8.6 ± 0.8 μ M、 13.6 ± 2.0 μ M、 9.1 ± 0.9 μ M, 而在中週期即施打 HCG 之日，NO_x 可見到有顯著性的增加，而此階段之雌二醇的血清濃度增加與一氧化氮之氧化代謝產物的血漿濃度增加，做線性迴歸分析則呈現正相關 (Fig. 17); 而正常月經週期的婦女，分別為 10.5 ± 1.7 μ M、 12.0 ± 1.3 μ M、

9.6 ± 1.3 ì M , 因人數的關係但也有增加的傾向。

Table 2. Characteristics of normally cyclic women and patients undergoing COH

	COH Group	Control Group
Parient (No.)	12	6
Age (year; mean)		
Years	25-37	22-28
Mean	32.75	24.50
Infertility		
Primary (No.)	4	
Secondary (No.)	8	
Indication		
Tubal occlusion (No.)	4	
Endometriosis (No.)	2	
Oligospermia (No.)	4	
Asthenospermia (No.)	3	
Unexplained (No.)	1	
Pregnancy		
Number	4	
Rate (%)	33.33	
OHSS (No.)	1	

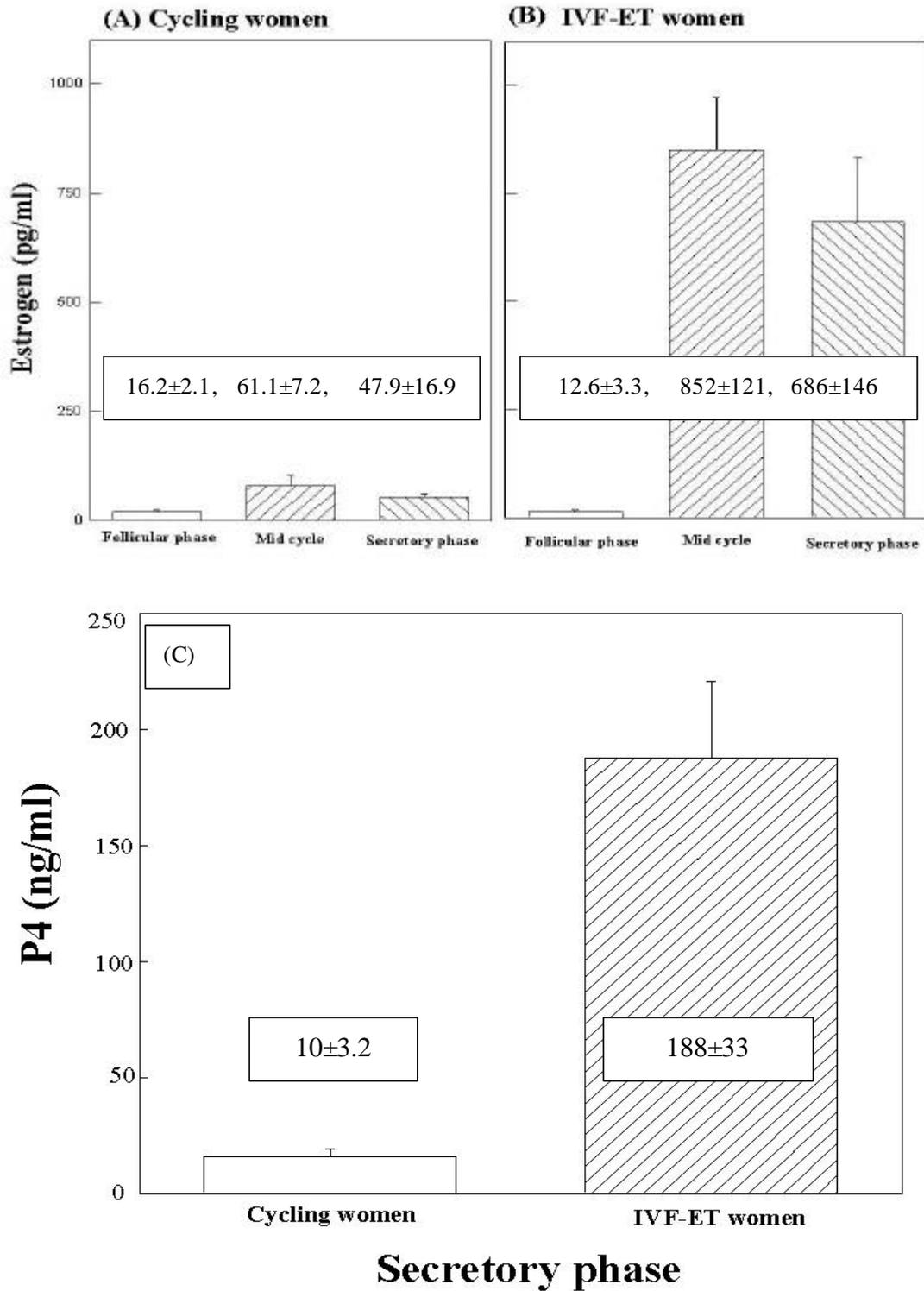


Fig. 15: Serum concentration of E₂ was shown in relation to menstrual cycle in normally cyclic women (A) and infertile women with super ovulation (B), serum concentration of P₄ shown in secretary phase in normally cyclic women and infertile women with super-ovulation (C).

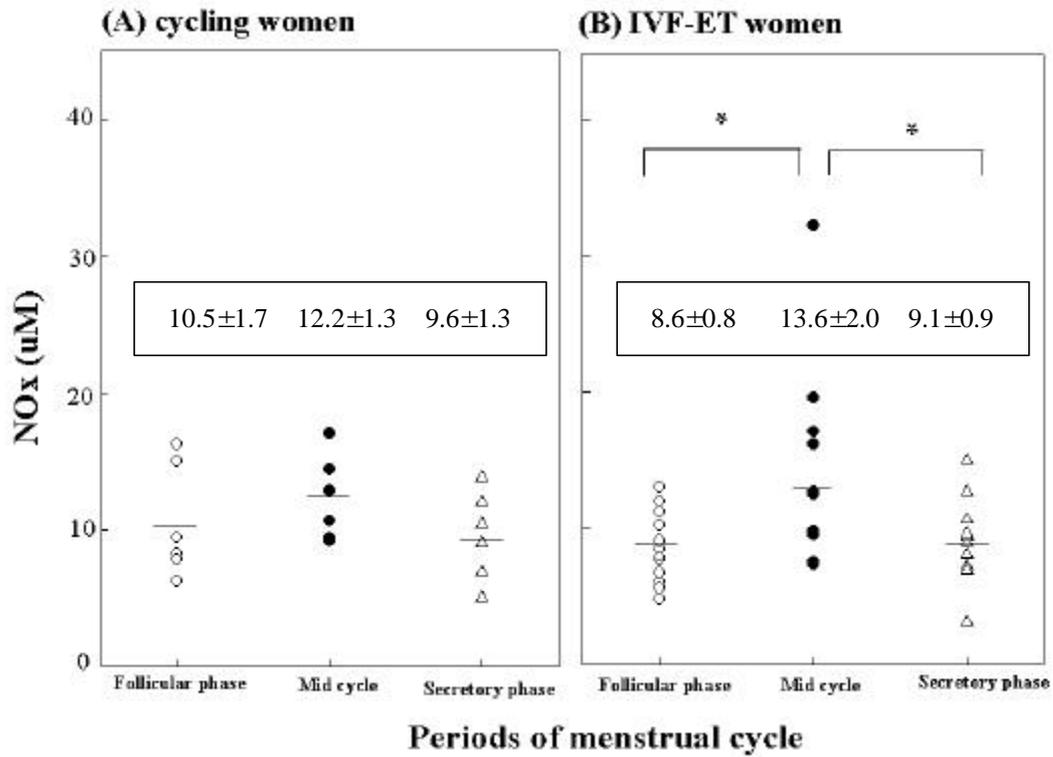


Fig. 16: Plasma concentration of NOx shown in relation to menstrual cycle in normally cyclic women (A) and infertile women with super-ovulation (B). *Significantly different as $p < 0.05$.

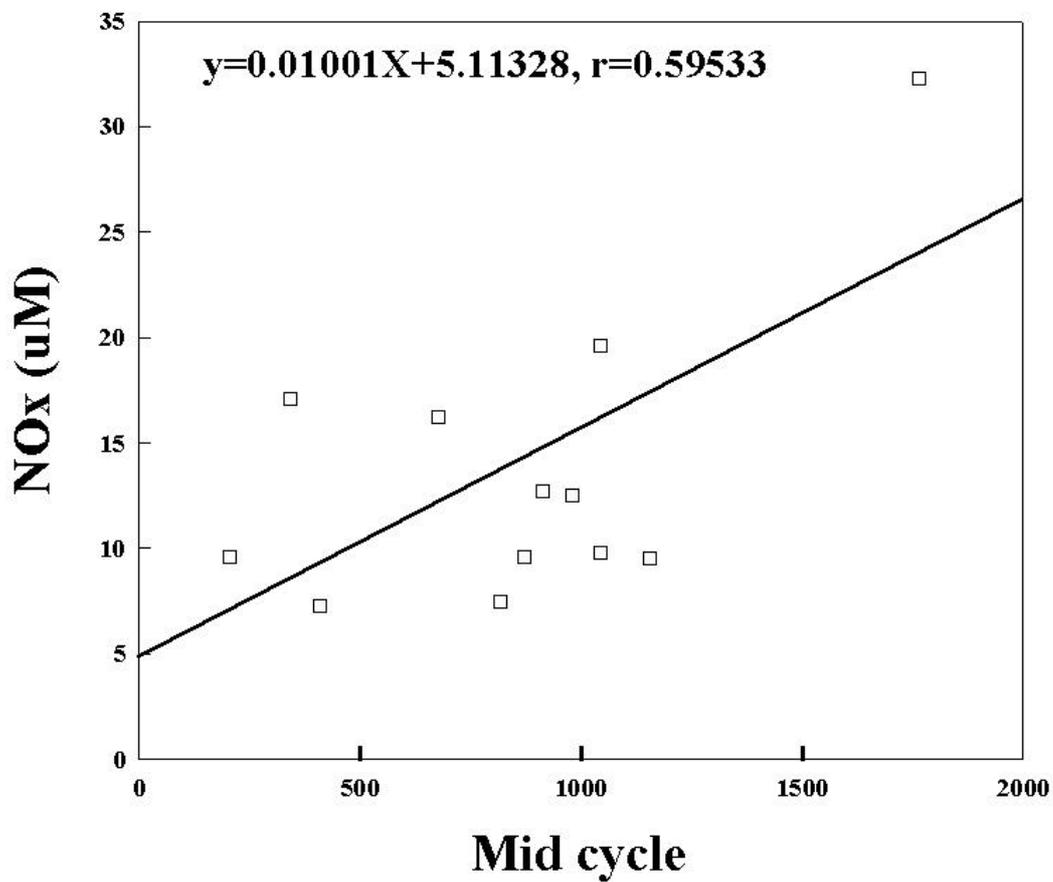


Fig. 17: Linear regression analysis showed that increases in plasma NOx levels positively correlated with increases in E2 levels at midcycle in IVF-ET women.

V、討論：

卵巢對於物種圖生存的意義是相當重要的，生育期的卵巢是一個始終在變化的動態器官，這裡面各種細胞成員在高度整合的運作下，主要的目的是為了產生可以受精的卵細胞（fertilizable ovum）和維持腺體功能以分泌性類固醇（sex steroids）〔33〕。而這些功能需要腦下垂體所分泌的促性腺激素 - 濾泡刺激素及黃體生成激素 - 之作用，在卵泡成長發育的過程中，它們不但各有所司而且拌演了同樣地重要的角色，濾泡刺激素對於早期顆粒細胞的成熟及黃體生成激素受體（LH/CG receptor）的誘發是不可或缺的；黃體生成激素則作用在膜細胞，促使雄性素（androgen）產生，進而在顆粒細胞中芳香化（aromatization）成為動情素〔33-35〕。

小白鼠動物實驗部份

本部份我們以 PMSG 和 hCG 來超排卵，據以觀察小白鼠濾泡成長（folliculogenesis）、排卵（ovulation）以及黃體化（luteinization）各個階段 eNOS 之表現；eNOS 是一種膜結合性蛋白質（membrane-bound protein），具有分子量 135kDa，可由血管內皮細胞合成。雖然 eNOS 的發現和命名是因為首先被發現在血管內皮細胞（vascular endothelium）內，但是 eNOS 也出現在種種不同物種不同類型的細胞，如：腎上腺、腎臟、肺臟、胰島、胎盤、卵巢和子宮等

等〔2, 29, 36-40〕。很多研究也指出一氧化氮會影響排卵 (ovulation) 以及類固醇形成 (steroid genesis) 等卵巢生理功能〔24-29〕。

內皮性一氧化氮合成 之細胞特定性分佈

本部份研究利用免疫組織化學染色，證實在小白鼠的卵巢膜細胞層和基質細胞以及卵細胞的表面，皆可見到褐色的 eNOS 表現，以 PMSG 刺激後則會隨時程演變而逐漸顯現在壁顆粒細胞 (mural granulosa cells)，以 hCG 取代 LH surge 觸發排卵後則逐漸顯現在黃體內，初期黃體 eNOS 的表現主要在血管內皮細胞上，接著顯現在黃體細胞，因而呈現明顯的細胞特定性分佈形態 (cell-specific distribution pattern) (Fig. 3-13)。這些發現與前人在大白鼠的研究報告相一致，包括：Van Voorhis 等學者報告 (1995 年) 在大白鼠卵巢以免疫組織化學染法發現 eNOS 表現主要在卵巢門 (hilum) 和基質的血管〔36〕；Zackrisson 等學者 (1996 年) 提出 eNOS 在大白鼠卵巢主要表現在卵巢基質、膜細胞層和黃體內，而且在這些組織的血管有強烈的免疫染色〔41〕；Jablonka-Shariff A 等學者 (1997 年) 則指出在大白鼠卵巢，當濾泡成長發育時，eNOS 的表現主要在膜細胞層，也表現在壁顆粒細胞，當排卵後也會表現在黃體內的細胞〔42〕。

內皮性一氧化氮合成 之時程變化

本實驗利用西方墨點法分析 eNOS 不同時程的相對含量，當以 PMSG 刺激卵泡成長後，可見 eNOS 表現逐漸增強，再以 hCG 觸發排卵後也持續增加，而在黃體形成後達到高原期，呈現出明顯的時程變化 (time-course changes) (Fig. 14)。一般而言，eNOS 是一種組成在生物體內會保持一定的濃度 (constitutively expressed)，但是 eNOS 的含量也會因各種不同的刺激而變化，諸如：剪力 (shear stress)、腫瘤壞死因子 - (tumor necrosis factor-) 和動情素等等 [40, 43-45]。我們的結果證實隨著濾泡成長、排卵以及黃體化等生殖生理程序的進展，eNOS 含量會有不同的改變，而呈現出明顯的時程變化。日本的學者 Nakamura 等 (1999 年) 研究大白鼠在注射 hCG 後 24 小時內，NOS 的活力和 NOS 陽性細胞的變化，指出主要增加的 isoform 是 eNOS，而且在五到九小時達到高峰，認為這一發現與排卵有關 [46]。然而我們的研究是每 24 小時的變化，與之相較並無相左之處，進而可以看出 eNOS 在黃體形成後達到高原期。

L-NAME 對超排卵的效應

L-NAME 是一氧化氮合成 之競爭性抑制劑 (competitive inhibitor)，本篇利用免疫組織化學染色法結果指出：L-NAME 對超排卵的效應而言，eNOS 的表現依然存在，小白鼠的卵巢膜細胞層和基

質細胞以及卵細胞的表面，皆可見到褐色的 eNOS 表現，但小白鼠卵泡發育和黃體數目皆減少 (Fig. 12, A); 而西方墨點法分析可見當以 PMSG + L-NAME 刺激卵泡成長後，eNOS 表現逐漸增強，再以 hCG + L-NAME 觸發排卵後也有增加；但與前組比較 eNOS 含量相對較少。這可能是抑制了卵泡發育、排卵減少和黃體數目的不足所致。

Jablonka-Shariff A 等學者 (1999 年) 在大白鼠的研究，施于超排卵和口服 NOS 抑制劑 L-NAME，報告指出排卵數顯著性降低而且卵細胞形態變異率也明顯增加；另外在卵巢的卵細胞或已排出的卵細胞 (ovarian or ovulated oocytes) 皆可見到強烈的 eNOS 免疫螢光染色 (immunofluorescent stain) (47)。因此卵巢一氧化氮的產量不但與排卵率有關，而且當排卵期一氧化氮缺乏時則會造成卵細胞成熟的嚴重缺陷。本部份研究，Jablonka-Shariff A 等是注射 hCG 前後三小時口服 NOS 抑制劑，而我們是同時給于超排卵和注射 NOS 抑制劑，因此可能一開始就抑制了卵泡發育，從而排卵減少和黃體數目產生不足。

促性腺激素與一氧化氮對卵巢的調節效應

腦下垂體分泌促性腺激素，目的是為了排出卵細胞和分泌性類固醇，而這些功能需要促性腺激素作用在細胞膜 (顆粒細胞和膜細胞) 上的促性腺激素受體 (gonadotropins receptors)，來活化細胞內的腺酸環化系統 (adenylate cyclase system)，以調控類固醇形成 (steroid

genesis) 和配子發生 (gametogenesis) [33]。直到目前為止，有許多各自的證據支持一氧化氮在卵巢生理的多重角色：

1、一氧化氮對排卵之效應

卵泡發育到破裂排卵，基本上有血管和蛋白質水解兩種變化 [48]，早在 1964 年 Szego 等學者就指出黃體生成激素高峰會引起卵巢充血和血管擴張 [49]，據 Powers 等學者 (1995 年) 報告這可能是透過 NO 來調控血液 - 卵泡障壁 (blood-follicle barrier) [50] 所致，而據 Yamauchi 等學者 (1997 年) 所提 NO 誘發卵泡破裂，部份是由於刺激前列腺素的產生 [51]，另外 Nakamura 等學者 [46] 所稱 eNOS 在注射 hCG 後九小時達到高峰，十二小時後排卵，這一發現與排卵時血管擴張有關。因為擴張的血管能提供更多而且重要的排卵相關因子，所以壁顆粒細胞也會呈現 eNOS 染色。

2、一氧化氮對黃體生成之效應

濾泡是卵巢的基本功能單位，卵細胞和顆粒細胞被基底膜 (basal lamina) 包圍而與周邊的膜細胞和基質分隔；基本上，基底膜內的顆粒細胞並無血管支配。排卵後，來自膜細胞層的微血管外皮細胞 (capillary pericytes) 首先侵入發展中的黃體，而黃體血管化最主要是靠血管旁細胞所合成分泌的血管內皮細胞生長因子 (vascular

endothelial growth factors, VEGF), 和同時由內皮細胞所合成釋放的 NO ; VEGF 是主要的血管形成因子 , 而 NO 是強力的血管擴張劑 , 共同促進血管新生和擴張 , 從而提供更多而且重要的黃體形成相關因子 [52-53] , 故初期黃體 eNOS 的表現主要在血管內皮細胞上。血管內皮細胞分泌 NO , 血管旁細胞 (包括有血管平滑肌細胞和微血管的外皮細胞) 分泌 VEGF , 共同構成一個旁分泌環 (paracrine loop) 來確保黃體構造和功能的協調 [53]。

3、一氧化氮對性類固醇形成之效應

早在 1994 年 Van Voorhis 等學者 (25) 利用試管嬰兒治療 , 採卵後所取得的卵泡細胞 (follicular cells) 行體外培養實驗後 , 提出一氧化氮會抑制雌激素的合成 ; 而 Olson 等學者 (1996 年) 則培養大白鼠黃體化細胞 , 也獲得相同結果 [54] ; 因此一氧化氮會抑制雌激素的類固醇形成 , 從而參與功能性的黃體退化。而這種作用機轉是 NO 直接抑制芳香化 (aromatase) 的活性以及減少了 aromatase mRNA 的轉譯 [55]。

黃體崩解時前列腺素也參與其中 , 前列腺素 F_2 (prostaglandin F_2 , PGF_2) 與前列腺素 E_2 (prostaglandin E_2 , PGE_2) , 各具有相反之效應 , 前者有分解黃體作用 (luteolytic action) , 而後者有促黃體作用 (luteotrophic action) [56]。據 Motta 等學者 (1997 年) 研究大白鼠

黃體退化的報告指出，在黃體晚期卵巢產生的一氧化氮增加，前列腺素 F_2 也會增加，則引起黃體素分泌減少黃體退化；反之以 L-NAME 抑制 NO 產生，則前列腺素 F_2 減少，黃體素增加〔57〕。他們在 1999 年更提出在黃體晚期，前列腺素 F_2 會正向調節 NOS 的活性 (up regulation)，兩者存在著正回饋的機轉 (positive feedback mechanism) 〔56〕，也就是一氧化氮會增加前列腺素 F_2 含量，前列腺素 F_2 再回饋增加一氧化氮含量。另外 Gobbetti 等學者 (1999 年) 研究兔子的黃體也提出相同的結果〔58〕。到了今年 (2000 年) Boiti 等學者研究兔子的黃體，報告指出較早期 (D_4) 黃體是前列腺素 E_2 會降低 NOS 活性，增加黃體素產生，較晚期 (D_9) 黃體則是前列腺素 F_2 會增加 NOS 活性，降低黃體素產生〔59〕。換言之：前列腺素 (前列腺素 E_2 與前列腺素 F_2) 對 NOS 活性和黃體素產生之作用，是依黃體成熟度 (age of corpora lutea) 而異；而這些作用是透過不同的訊息傳導系統 (PKA/PKC) 所致〔59〕。

4、一氧化氮對卵巢細胞凋亡之效應

細胞凋亡 (apoptosis) 是所有生物組織的正常功能，也說明了大多數卵巢濾泡閉鎖萎縮的由來。在卵巢促性腺激素、動情素、生長激素、生長因子 (IGF1, EGF/TGF- β , bFGF) 細胞激素 (interleukin-1

, IL-1) 和 NO 稱為存活因子 (survival factors) 共同作用確保濾泡的存活。反之, 雄性素、細胞激素 (interleukin-6) 和類 GnRH 胜 (GnRH-like peptide) 是凋亡因子 (apoptotic factors) [60]。Chun 等學者 (1995 年) 指出, 促性腺激素、IL-1 會藉著一氧化氮經由 cGMP 路徑來抑制卵泡凋亡。這也可以解釋 NOS 抑制劑 L-NAME 會降低排卵率的理由 [24, 26-27, 29, 47]。

一氧化氮也會與超氧化物自由基 (superoxide anion) 作用形成過氧亞硝酸 (Peroxynitrite), 其屬於活性氧類 (reactive oxygen species, ROS) 之一, 是一種強氧化劑具有很強的生物毒性。硝基酪氨酸 (nitrotyrosine) 則是過氧亞硝酸攻擊細胞蛋白質後之穩定產物, 通常代表著過氧亞硝酸的活性 [61-62]。Van Nassauw 等學者 (1999 年) 在鳥類卵巢的研究指出, 硝基酪氨酸主要存在於閉鎖萎縮的卵巢濾泡和排卵後的濾泡中, 因此過量的一氧化氮和活性氧類會引發濾泡閉鎖萎縮 [63]。

生育期婦女超排卵刺激部份

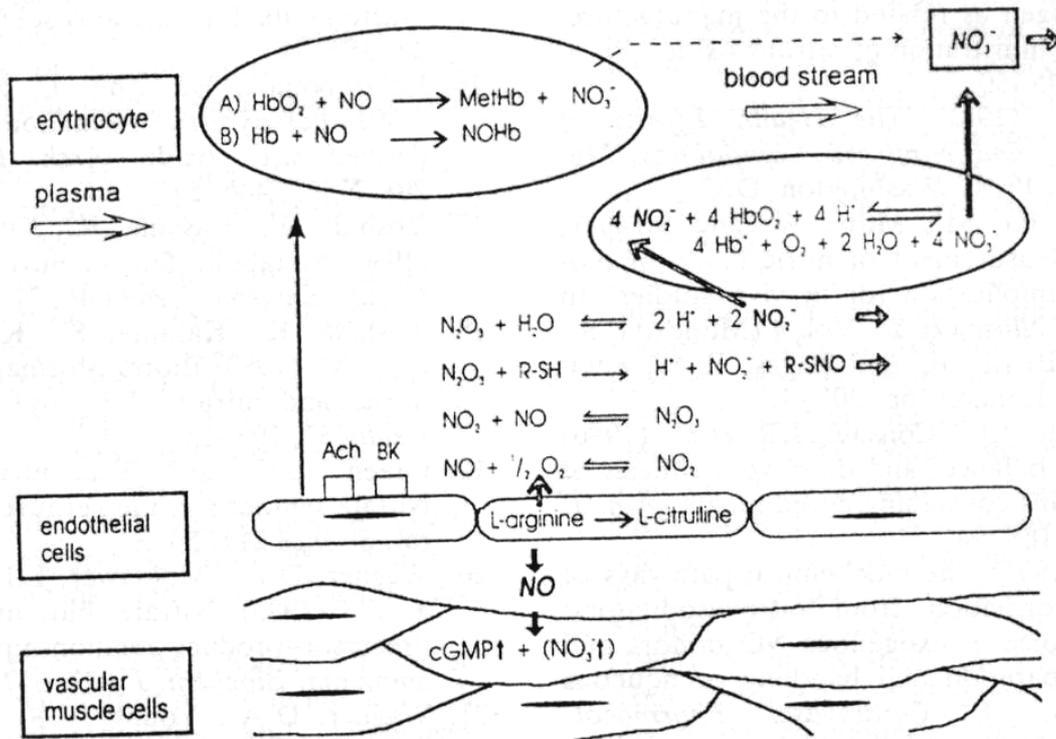
一氧化氮由 eNOS 合成後, 若從血管內皮細胞釋出至血管腔, 大部份很快地在血漿中被氧化為亞硝酸鹽 (nitrite), 隨後在紅血球內被氧化血紅素 (oxyhemoglobin) 轉化為硝酸鹽 (nitrate); 另外少部份的一氧化氮, 會直接進入紅血球內為氧化血紅素氧化為硝酸鹽

(nitrate), 因此, 亞硝酸鹽和硝酸鹽代表著血中一氧化氮之氧化代謝產物 (NO_x), 相對地也代表著體內一氧化氮的產生量 (附錄七) [64, 65]。

本部份研究顯示, 正常月經週期的婦女和進行控制性超排卵刺激之不孕症婦女, 其血中一氧化氮之氧化代謝產物的最高濃度是出現在中週期 (midcycle), 此時也有最高的血中動情素濃度, 此一發現可以支持動情素會調控一氧化氮的產生和釋出。這一結果與 Rosselli 等學者 (1994 年) 的報告相一致 [65]。在本研究又發現中分泌期 (midsecretory phase) 血中一氧化氮之氧化代謝產物的濃度, 在正常月經週期的婦女是相對最低, 而之於控制性超排卵刺激的不孕症婦女卻是相對較低。此一結果與 Rosselli 等學者的報告不同的是, 他們並無中分泌期的研究報告 [65], 然而基本上, 中分泌期是性類固醇分泌最旺盛之時, 也是黃體素產生最多之時, 因此, 黃體素對於一氧化氮的產生和釋出可能有與動情素相反的作用。

最近有些報告指出人類動脈血管內皮細胞有動情素接受器, 而動情素透過接受器可以加強血管內皮細胞 eNOS 的活性, 增加 NO 的產生 [19, 66-67]。因此排卵時, 卵巢與全身性血管之擴張, 有利於排卵和子宮內膜的生長。Sher 等學者 (2000 年) 利用威而剛 (Viagra) - 磷酸二脂 抑制劑 - 陰道塞劑, 來阻止 cGMP 的水解以加強 NO 擴

張血管的作用,有效改善子宮血流,增加子宮內膜厚度,因此增加IVF的懷孕率 [68]。



附錄七: Metabolism of NO in human blood.

NO released from endothelium into the vessel lumen is rapidly oxidized to nitrite (and S-nitrosothiol) in the plasma at the immediate site of its release. Nitrite is converted to nitrate via an autocatalytic reaction with oxyhemoglobin within the erythrocyte. Alternatively, a small proportion of NO may reach the erythrocytes directly, where it forms either nitrosylhemoglobin or oxidizes to nitrate (and methemoglobin), the fraction of each depending on the ratio of oxygenated and non-oxygenated hemoglobin within the erythrocyte. Thus, nitrate represents the final, but rather unspecific, end product, whereas nitrite (and S-nitrosothiol) are specific, but rather unstable, intermediates of NO metabolism in human blood [64, 65].

結論

1. 證實在小白鼠的卵巢膜細胞層和基質細胞以及卵細胞的表面，皆可見到褐色的 eNOS 表現，以 PMSG 刺激後則會隨時程演變而逐漸顯現在壁顆粒細胞，以 hCG 取代 LH surge 觸發排卵後則逐漸顯現在黃體內，呈現明顯的細胞特定性分佈形態。
2. 分析 eNOS 此一蛋白質不同時程的相對含量時，當以 PMSG 刺激卵泡成長後，可見 eNOS 表現逐漸增強，再以 hCG 觸發排卵後也持續增加，而在黃體形成後達到高原期，呈現出明顯的時程變化。
3. L-NAME 對超排卵的效應不但與排卵率有關，而且當排卵期一氧化氮缺乏時則會造成卵細胞成熟的嚴重缺陷。
4. eNOS 是組成性合成，但早期的顆粒細胞並無表現，至於促性腺激素藉由何種機轉誘發晚期顆粒細胞合成 eNOS？目前仍了解很少，尚不知情。
5. 小白鼠卵巢 eNOS 在在排卵前相當活躍，這一發現與排卵時卵巢血管擴張有關，擴張的血管能提供更多而且重要的排卵相關因子。
6. 人類血中動情素和 NO_x 含量也是在濾泡晚期達到高峰，應與全身性血管擴張有關，有利於排卵和子宮內膜的生長，這些報告與發現可以支持動情素會調控一氧化氮的產生和釋出，但中分泌期黃

體素對於一氧化氮的產生和釋出可能有相反的作用，而這一推論
未來須要更多的研究來加以證實。