

ความสามารถในการสร้างโปรเจสเทอโรนและอีสตราไดออล-17 ปีตาในหลอดทดลอง
ของเซลล์คอปัสตูเตียมของหนูขาวพันธุ์วีสตาร์และลิงแสม



นางสาว อัมพา เหลืองภิรมย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530

ISBN 974-568-522-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

013864

i 1029191x

IN VITRO PROGESTERONE AND ESTRADIOL-17 β SYNTHETIC ABILITY
OF THE ISOLATED LUTEAL CELLS IN WISTAR RATS
AND CYNOMOLGUS MONKEYS

Miss Ampa Luiengpirom

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy
Biological Science
Graduate School
Chulalongkorn University
1987
ISBN 974-568-522-4

Thesis Title In Vitro Progesterone and Estradiol-17 β Synthetic Ability of the Isolated Luteal Cells in Wistar Rats and Cynomolgus Monkeys

By Miss Ampa Luiengpirom

Department Biology

Thesis Advisor Professor Dr. M.R. Puttipongse Varavudhi, Ph.D.

Thesis Co-Advisor Associate Professor Dr. Prakong Tangpraprutkul, Ph.D.
Associate Professor Naiyana Chaiyabutr, M.S., D.V.M.



Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfilment of the Requirements for the Doctor of philosophy Degree.

Thavorn Vajrabhaya
..... Dean of Graduate School
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Kosin Amatayakul
..... Chairmain
(Associate Professor Kosin Amatayakul, MB., Ch.B., F.R.C.O.G)

Puttipongse Varavudhi
..... Member
(Professor M.R. Puttipongse Varavudhi, Ph.D.)

Prakong Tangpraprutkul
..... Member
(Associate Professor Prakong Tangpraprutkul, Ph.D.)

Pramuan Virutamasen
..... Member
(Associate Professor Pramuan Virutamasen, MD.)

Vithaya Yodyingyuad
..... Member
(Associate Professor Vithaya Yodyingyuad, Ph.D.)

Naiyana Chaiyabutr
..... Member
(Associate Professor Naiyana Chaiyabutr, M.S, D.V.M.)

อภิปา เหลืองภิรมย์ : ความสามารถในการสร้างโปรเจสโตโรนและอีส์ตราไดออก-17 ปีตา ในหลอดทดลองของ เซลล์คอฟฟัลลูเตียมของหนูขาวพันธุ์วีสตาร์และลิงแสม (IN VITRO PROGESTERONE AND ESTRADIOL-17 β SYNTHETIC ABILITY OF THE ISOLATED LUTEAL CELLS IN WISTAR RAIS AND CYNOMOLGUS MONKEYS) อ.ที่ปรึกษา : ศ.ดร. ม.ร.ว.พุดพิงค์ วรวิดิ, รศ.ดร.ประคอง ตั้งประพททธิกุล, รศ.นัยนา ชัยบุตร, 201 หน้า.

จุดมุ่งหมายในการศึกษาครั้งนี้เพื่อหาความสามารถในการสร้างฮอร์โมนโปรเจสโตโรน และอีส์ตราไดออก-17 ปีตาของเซลล์ลูเตียลของหนูขาวและลิงแสมในหลอดทดลองระหว่างการศึกษาระยะสั้น และระยะยาว เปรียบเทียบความสามารถในการตอบสนองของ เซลล์ลูเตียลต่อสารที่มีความสามารถควบคุมการทำงานของคอฟฟัลลูเตียม เช่น hCG, PRL และ/หรือ PGF_{2 α}

คอฟฟัลลูเตียมของหนูขาวที่นำมาศึกษาได้จากระยะวงสืบพันธุ์, ท้องเทียม, ตั้งครรภ์ และระยะให้นมลูก ส่วนคอฟฟัลลูเตียมของลิงแสมได้จากระยะลูเตียลของวงสืบพันธุ์ นำคอฟฟัลลูเตียมมาทำการแยกเซลล์ด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส 0.1% ตามวิธีของ Sala และคณะ (1979) และเลี้ยงเซลล์ภายในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และอากาศอื่น 95% ณ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ตามลำดับ

จากการศึกษาพบว่า เซลล์ลูเตียลของหนูขาวและลิงแสมสามารถมีชีวิตในหลอดทดลอง และสร้างฮอร์โมนโปรเจสโตโรนและอีส์ตราไดออก-17 ปีตา ภายใต้สภาวะปราศจากสิ่งกระตุ้นอย่างน้อย 7 วัน การให้ hCG สามารถกระตุ้นการสร้างฮอร์โมนโปรเจสโตโรนและอีส์ตราไดออก-17 ปีตาของเซลล์ลูเตียลของหนูขาวและลิงแสมอย่างมีนัยสำคัญ PRL มีฤทธิ์เพิ่มความสามารถในการสร้างฮอร์โมนโปรเจสโตโรนของเซลล์ลูเตียลของหนูขาวเท่านั้น แต่ไม่มีผลต่อการสร้างฮอร์โมนใด ๆ ของเซลล์ลูเตียลของลิงแสม และพบว่าอาจมีฤทธิ์เสริมเมื่อให้ร่วมกับฮอร์โมน hCG ส่วน PGF_{2 α} สามารถกระตุ้นการสร้างเฉพาะฮอร์โมนโปรเจสโตโรน ระยะยาวจากเซลล์ลูเตียล ระยะแรกของอายุการทำงาน แต่มีฤทธิ์เร่งการเสื่อมของการทำงานของเซลล์ลูเตียลที่ได้จากระยะท้าย ๆ ของอายุการทำงานของคอฟฟัลลูเตียม ทั้งจากหนูขาวและลิงแสม

จากผลการศึกษาอาจสรุปได้ว่า hCG และสารในเครืออนุพันธ์เดียวกันมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของคอฟฟัลลูเตียมของสัตว์ในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่มีรก ส่วน PRL มีความสามารถจำกัดกระตุ้นเฉพาะการสร้างฮอร์โมนโปรเจสโตโรนของคอฟฟัลลูเตียมของสัตว์แทะขนาดเล็ก และสัตว์ในกลุ่มใกล้เคียง นอกจากนี้ PGF_{2 α} น่าจะมีบทบาทสำคัญควบคุมการทำงานโดยตรงภายในคอฟฟัลลูเตียมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายกลุ่มด้วย



ภาควิชาชีววิทยา.....
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ.....
ปีการศึกษา2530.....

ลายมือชื่อนิสิตอภิปา เหลืองภิรมย์.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
.....

AMPA LUIENGPROM : IN VITRO PROGESTERONE AND ESTRADIOL -17 β SYNTHETIC ABILITY OF THE ISOLATED LUTEAL CELLS IN WISTAR RATS AND CYNOMOLGUS MONKEYS. THESIS ADVISOR : PROF. DR. M.R. PUTTIONGSE VARAVUDHI, Ph.D. ASSOC.PROF.DR. PRAKONG TANGPRAPRUTKUL, Ph.D., ASSOC.PROF. NAIYANA CHAIYABUTR, M.S., D.V.M. 201 pp.

The purpose of this study is to determine the functional capacity of rat's and cynomolgus monkey's isolated luteal cells on secretion of P and E₂ in short term and long term experiment and to compare responsiveness of these cells to potential corpus luteum regulating agents including hCG, PRL and PGF_{2 α} , either alone or in combination, during various physiological states. The study was conducted in the normal cycle of rats and monkeys; pseudopregnancy, pregnancy and lactating period of rats. The corpora lutea were treated with 0.1% of collagenase by method of Sala et al. (1979). The isolated luteal cells were incubated under 5% CO₂ and 95% humidified air at 37°C, for 3 hours 1, 3, 5, 7, 9 and 11 days, respectively.

The results indicate that isolated luteal cells of rat and monkey are capable to survive and secrete P and E₂ independent of hormone administration for at least 7 days. Administration of hCG during active luteal phase significantly enhanced the production of P and E₂ from isolated luteal cells of rats and monkeys. PRL was significantly capable to stimulate P secretion from rat luteal cells not the monkey and may acts synergistically with hCG. PGF_{2 α} , on the otherhand, was capable to stimulate long term P production from luteal cells of young CL of rats and monkeys but enhanced luteolysis in those from aged CL of both species.

It is concluded that hCG and related gonadotrophins may act as a universal luteotrophic agent in placental mammals while PRL has a limitation on stimulation of P production in small laboratory rodents and related primitive placental mammals. Finally, PGF_{2 α} may act as an intraluteal regulators in several mammalian species.

ภาควิชา Biology

สาขาวิชา Biological Science

ปีการศึกษา 1987

ลายมือชื่อนิสิต *Ampa Luengprom*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *P. H. / ...*



ACKNOWLEDGEMENT

I wish to acknowledge my deepest gratitude and appreciation to my advisor, Professor Dr. M.R. Puttipongse Varavudhi, for his expert guidance, valuable advice, suggestions, encouragement, understanding and intensive supervision throughout this study which has enabled me to complete this thesis.

I wish to express my sincere gratitude and appreciation to my Co-advisor, Associate Professor Dr. Prakong Tangpraputrtrakul for her guidance in radioimmunoassay, suggestions and comments.

I would like to thank Associate Professor Naiyana Chaiyabutr for her kindness in providing the technique of monkey's lutectomy and also extended to Associate Professor Dr. Vithaya Yodyingyud for his kindness in providing the laboratory animals and laboratory facilities throughout this study.

I am indebted to Associate Professor Dr. Hansa Asawarongchai who guided me in tissue culture technique, to the Graduate School, Chulalongkorn University for funding supports and to the Primate Research Laboratory for facility provision.

I would like to acknowledge the members of graduate thesis committee for valuable criticisms, suggestions and comments.

Finally, I wish to express my deepest thank to my parents for their love, encouragement and understanding and also extended to my friends in Primate Lab for their assistance in general works.



CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
CONTENTS	vii
LIST OF FIGURES	ix
LIST OF TABLES	xi
ABBREVIATION	xv
 CHAPTER	
I INTRODUCTION AND LITERATURE REVIEW	1
II MATERIALS AND METHODS	19
III RESULTS	42
1. Viability of isolated luteal cells in culture ...	42
2. P secretion of isolated rat luteal cells from various reproductive stages	43
3. Effects of hCG, PRL and $\text{PGF}_{2\alpha}$ and their combination on P and E_2 secretion from isolated rat luteal cells	49
4. Plasma P and E_2 levels in various reproductive stages of rats	75
5. Effect of partial ovariectomy on ovulation patterns and menstrual cycle in adult female monkeys	78
6. Plasma levels of P and E_2 during menstrual cycle in monkeys	78
7. Viability of isolated monkey luteal cells in culture	81
8. Ability of isolated monkey luteal cells in P and E_2 secretion in culture	81

CONTENTS
(continued)

CHAPTER	page
9. Effect of hCG, PRL and $\text{PGF}_{2\alpha}$ on P and E_2 secretion from monkey isolated luteal cells obtained during early mid, late and luteolytic phase	83
IV DISCUSSION	95
V REFERENCES	116
VI APPENDICES	162
VII BIOGRAPHY	201

LIST OF FIGURES

Figure	page
1. Menstrual records of cynomolgus monkey #101	23
2. Menstrual records of cynomolgus monkey #75	24
3. Menstrual records of cynomolgus monkey #24	24
4. Showing 5 areas of hemocytometer	28
5. The responsiveness of luteal cells to hCG, PRL and $PGF_{2\alpha}$ on P production A. Estrus and B. Lactating stage L_2	30
6. The responsiveness of luteal cells to hCG, PRL and $PGF_{2\alpha}$ on P production C. PSP stage L_2 and D. Pregnancy stage L_2	31
7. Surgical technique for partial lutectomy in monkey no. 101	40
8. Illustration of the rat luteal cells (A1, A2) and monkey luteal cells (B1, B2)	41
9. Viability of rat luteal cells from estrous cycle, pregnancy, PSP and lactating PSP during 11 day incubation	47
10. P secreting ability of rat luteal cells from estrous cycle, pregnancy, PSP and lactating PSP during 11 day incubation..	48
11. Short term effects of hCG, PRL and $PGF_{2\alpha}$ on <u>in vitro</u> P and E_2 production of rat luteal cells from estrous cycle during 3 hour incubation	54
12. Long term effect of hCG, PRL and $PGF_{2\alpha}$ on <u>in vitro</u> stimulation of P and E_2 secretion of rat luteal cells from estrous cycle during 11 day incubation.....	55
13. Responsiveness of luteal cells from cyclic rat to hCG, PRL and $PGF_{2\alpha}$ on P and E_2 secretion in 7 day incubation	56
14. Short term effects of hCG, PRL and $PGF_{2\alpha}$ on <u>in vitro</u> P and E_2 production of rat luteal cells from pregnancy, PSP and lactating PSP during 3 hour incubation	60

LIST OF FIGURES

(continued)

Figure	page
15. Long term effect of hCG, PRL and $\text{PGF}_{2\alpha}$ on <u>in vitro</u> stimulation of P and E_2 secretion of rat luteal cells from pregnancy during 11 day incubation	69
16. Long term effects of hCG, PRL and $\text{PGF}_{2\alpha}$ on <u>in vitro</u> stimulation of P and E_2 secretion of rat CL cells from PSP during 11 day incubation	70
17. Long term effects of hCG, PRL and $\text{PGF}_{2\alpha}$ on <u>in vitro</u> stimulation of P and E_2 secretion of rat luteal cells from lactating PSP during 11 day incubation	71
18. Responsiveness of rat luteal cells from pregnancy PSP and lactating PSP to hCG, PRL and $\text{PGF}_{2\alpha}$ on P and E_2 secretion in 7 day incubation	72
19. P and E_2 secreting ability of luteal cells obtained from different age of corpus luteum during 24 hour incubation	82
20. Long term effects of hCG, PRL and $\text{PGF}_{2\alpha}$ on <u>in vitro</u> stimulation of P and E_2 secretion of cynomolgus monkey (#101) luteal cells from early, mid and late luteal phase and luteolytic phase during 11 day incubation	88
21. Long term effects of hCG, PRL and $\text{PGF}_{2\alpha}$ on <u>in vitro</u> stimulation of P and E_2 secretion of cynomolgus monkey (#75) luteal cells from early, mid and late luteal phase during 11 day incubation	89
22. Long term effects of hCG, PRL and $\text{PGF}_{2\alpha}$ on <u>in vitro</u> stimulation of P and E_2 secretion of cynomolgus monkey (#24) luteal cells from mid, late luteal phases and luteolytic	

LIST OF FIGURES

(continued)

Figure	page
phase during 11 day of incubation	90
23. Responsiveness of cynomolgus monkey luteal cells to hCG, PRL and $\text{PGF}_{2\alpha}$ on P and E_2 secretion in 7 day incubation	91

LIST OF TABLES

Table	page
1. The validation of P and E ₂ assay	39
2. Percentages of cell viability and P secreting ability of luteal cells from dioestrous cycle during 11 day incubation..	44
3. Percentages of cell viability and P secreting ability of CL cells from PSP, pregnancy and lactating PSP stages during 11 day incubation	45
4. Comparision of the viability of rat luteal cells in culture on day 11 of incubation among treatment groups and the control group	46
5. Effects of hCG, o-PRL and PGF _{2α} on % increment of P and E ₂ of rat luteal cells during 3 hour incubation	61
6. Effects of hCG, o-PRL and PGF _{2α} on % increment of P and E ₂ of rat luteal cells during 7 hour incubation	73
7. Summarize effect of hCG, PRL and PGF _{2α} on stimulation of rat CL steroid production during 7 day incubation ...	74
8. Plasma progesterone (P) and estradiol-17β (E ₂) levels from various reproductive stages of rat	77
9. Ovulation pattern of cynomolgus monkeys assesed by laporascopy	79
10. Plasma levels of P and E ₂ of cynomolgus monkey on the day of lutectomy, 1 and 5 days after lutectomy	80
11. Viability of monkey luteal cells in culture on day 11 of incubation; comparison among treatment groups and the control group	92
12. Effects of hCG, o-PRL and PGF _{2α} on % increment of P and E ₂ of cynomolgus monkey luteal cells during 7 day incubation..	93

LIST OF TABLES

(continued)

Table	page
13. Summarize effect of hCG, PRL and $\text{PGF}_{2\alpha}$ on stimulation of cynomolgus monkey CL steroid production during 7 day incubation	94

LIST OF APPENDICES

Appendix	page
I. Chemicals	162
II. Instruments	165
III. Reagent preparations	167
IV. Sterilization techniques	168
V. Reagents for steroid hormones assay	169
VI. Composition of medium for luteal cell culture	172
VII. Other works in CL function <u>in vitro</u>	175
VIII. Table 14-32	182



ABBREVIATION

B	=	standard counts
B ₀	=	maximum binding counts
BS	=	buffer for steroid assay
CG	=	chorionic gonadotropin
CL	=	corpus luteum
C ₀	=	cornified cells
dbc-AMP	=	dibutyryl cyclic adenosine mono phosphate
Di-1	=	diestrus - day 1
Di-2	=	diestrus - day 2
DMEM	=	Dulbecco's modified Eagle medium
E	=	estrus
E ₂	=	estradiol-17 β
EMEM	=	Eagle's minimum essential medium
FCS	=	fetal calf serum
fmol	=	femtomoles
HAM-F10	=	nutrient mixture F-10
HBSS	=	Hank's balance salt solution
hCG	=	human chorionic gonadotropin
HEPES	=	N-2hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic
HDL	=	high density lipoprotein
iu	=	international unit
LDL	=	low density lipoprotein
LH	=	luteinizing hormone
MEM	=	minimum essential medium
μ g	=	microgram
NSB	=	non specific binding

ng = nanogram
O = nucleated cells
o-PRL = ovine prolactin
P = progesterone
PGF_{2α} = prostaglandin F_{2α}
pmol = picomoles
QC = quality control
RCA = recovery of assay
RCE = recovery of extraction
TC = total counts