

小鼠卵巢颗粒细胞的体外培养

王妍,赵晓娥,杨培先,张仕强,苏利红,马保华

(西北农林科技大学 动物科技学院 农业部生殖内分泌与胚胎工程重点开放实验室,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 为了探讨小鼠卵巢颗粒细胞体外生长的特点及增殖的调控因素,分别添加 2 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素、50 ng/mL FSH 和 20 ng/mL EGF 的培养液培养小鼠卵巢颗粒细胞,每隔 24 h 对细胞进行计数,研究其对小鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响。此外,还对培养过程中出现的卵巢颗粒细胞集落进行了 AKP 染色和 C-kit 免疫组化染色鉴定。结果显示,在培养的第 4 天添加 EGF 组和 FSH 组与对照组相比均具有显著的促增殖作用 ($P < 0.05$),添加胰岛素组促增殖作用不显著 ($P > 0.05$);卵巢颗粒细胞集落经 AKP 染色和 C-kit 免疫组化染色均呈阳性。提示 EGF 和 FSH 对小鼠卵巢颗粒细胞具有促增殖效应,小鼠卵巢颗粒细胞具有干细胞的部分特性。

[关键词] 卵巢颗粒细胞;体外培养;细胞增殖;小鼠

[中图分类号] Q813.1⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)08-0011-04

Culture of mouse granulosa cells in vitro

WANG Yan, ZHAO Xiao-e, YANG Pei-xian, ZHANG Shi-qiang, Su Li-hong, MA Bao-hua

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Key laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology of Agricultural Ministry of China, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract : To investigate the growth characteristics and regulational factors contributed to proliferation of mouse granulosa cells in vitro, insulin (2 $\mu\text{g/mL}$), FSH (50 ng/mL) and EGF (20 ng/mL) were added into the basal medium, respectively. The cell number were counted every 24 hours, the effect of each factor on promoting mouse granulosa proliferation was researched. In addition, alkaline phosphatase (AKP) staining, and C-kit immunohistochemical staining were performed to identify the clones of granulosa cells appearing in culture. The results showed that the group added with EGF and FSH, but insulin ($P > 0.05$), had significant effect on promoting proliferation ($P < 0.05$) compared with the control group on the 4th day; the clones of granulosa cells were both positive for AKP and C-kit. Therefore, it was concluded that EGF and FSH could promote granulosa cells' proliferation and mouse granulosa cells had some properties of stem cells.

Key words : granulosa cells; culture in vitro; cell proliferation; mouse

卵巢颗粒细胞是动物生殖过程中非常重要的一类细胞。在动物体内,颗粒细胞的增殖分泌功能与卵母细胞的生长和成熟紧密相关,二者可形成功能上的整体。在体外条件下进行颗粒细胞增殖与分化的研究,可为妇女及雌性动物卵巢功能的检测、卵巢疾病引起的不孕症的治疗、避孕研究以及动物生殖

毒理研究提供新的手段。

Channing 等^[1]第一次证实,在含有血清的培养基中培养的卵巢颗粒细胞发生了结构和功能的变化。Pescador 等^[2]报道,猪的颗粒细胞在培养的最初 24 h 内附着在培养基质上,呈成纤维样;培养 72 h 时,细胞形状变为铺路石样。Meidan 等^[3]在体外

[收稿日期] 2006-07-17

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(99SM66)

[作者简介] 王妍(1979-),女,内蒙古海拉尔人,在读硕士,主要从事动物胚胎工程和生殖毒理研究。

[通讯作者] 马保华(1965-),男,副教授,博士,硕士生导师,主要从事动物胚胎生物技术与动物生殖毒理研究。

将牛的卵巢颗粒细胞和卵泡膜细胞诱导分化为大黄体样细胞和小黄体样细胞,并对其形态和功能进行了鉴定。Kishi 等^[4]研究了活化素和 FSH 对大鼠卵巢颗粒细胞分化的影响。但到目前为止,对小鼠卵巢颗粒细胞体外培养的研究很少。本试验对小鼠卵巢颗粒细胞体外培养的生物学特性以及增殖调控因素进行了初步研究,以期为进一步阐明卵巢颗粒细胞在体内的作用及增殖、分化调节机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试 剂 D/F₁₂ 培养基, GIBCO 公司产品; 孕马血清促性腺激素(PMSG), 宁波第二激素厂产品; 胎牛血清, 购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 无 Ca²⁺、Mg²⁺ 磷酸盐缓冲液 [PBS(-)] , 中杉金桥公司产品; C-kit 免疫组化试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司产品; 青霉素、链霉素、两性霉素-B、促卵泡激素(FSH)、胰岛素、重组人表皮生长因子(EGF)、透明质酸酶、胰蛋白酶、乙二胺四乙酸(EDTA)、坚固红和α-萘酚磷酸盐等均为 SIGMA 产品。

1.1.2 试验动物 健康、尚未性成熟的雌性昆明小白鼠, 购自第四军医大学, 质量 18~22 g。

1.2 小鼠卵巢颗粒细胞的分离及原代培养

每只小鼠腹腔注射 PMSG(8~10 U) 48 h 后, 颈椎脱臼处死, 无菌条件下迅速取出双侧卵巢, 用 PBS(-) 清洗 3 次, 在体视显微镜下去除其周围脂肪和被膜, 用 1 mL 注射器针头刺破卵泡使颗粒细胞和卵母细胞释放出来, 加入 1 g/L 透明质酸酶消化使颗粒细胞与卵母细胞分离, 用孔径为 0.074 mm 筛网过滤, 1 000 r/min 离心 5 min。弃上清, 用 PBS(-) 清洗 3 次, 加入基础培养液(D/F₁₂ 培养基 + 100 U/mL 青霉素 + 100 μg/mL 链霉素 + 0.5 μg/mL 两性霉素-B + 体积分数 10 % FBS) 重悬。

1.3 FSH、EGF 和胰岛素对卵巢颗粒细胞的影响

用台盼蓝染色检测细胞存活率达 70 % 以上时, 调整细胞数, 按照 1 × 10⁵ mL⁻¹ 接种, 分别添加 2 μg/mL 胰岛素、50 ng/mL FSH、20 ng/mL EGF, 于 37 °C、体积分数 5 % CO₂ 饱和湿度培养。每间隔 24 h 用胰蛋白酶对每组颗粒细胞进行消化计数。试验重复 3 次, 数据结果用“平均数 ± 标准差”表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。

1.4 小鼠卵巢颗粒细胞的鉴定

1.4.1 形态学观察 在倒置相差显微镜下观察颗粒细胞的生长行为和形态特征。

1.4.2 碱性磷酸酶(AKP) 染色 吸出培养液, PBS(-) 清洗 3 次, 体积分数 4 % 多聚甲醛室温固定 15 min, 再用 PBS(-) 清洗 3 次, 加入 AKP 染色液(1.2 mg/mL α-萘酚磷酸盐, 1 mg/mL 坚固红, 0.1 mol/L Tris 盐, 调至 pH 值为 8.4), 作用 15~30 min, PBS(-) 再清洗 3 次, 倒置相差显微镜下观察、照相。

1.4.3 C-kit 免疫组化染色 按照 SABC 试剂盒说明书进行。培养细胞用体积分数 4 % 多聚甲醛固定 30 min, 用体积分数 30 % H₂O₂ 和纯甲醇(体积比 1 : 50) 固定 30 min, 蒸馏水洗 3 次, 滴加体积比 1 : 300 稀释的 C-kit 兔抗小鼠一抗, 37 °C 作用 1 h, PBS(-) 洗 3 次, 每次 2 min; 滴加生物素化山羊抗兔二抗 IgG, 37 °C 孵育 20 min, PBS(-) 洗 3 次, 每次 2 min; 滴加 SABC, 37 °C 孵育 20 min, PBS(-) 洗 4 次, 每次 5 min; DAB 显色 30 min, 蒸馏水洗, 照相。

2 结果与分析

2.1 FSH、EGF 和胰岛素对颗粒细胞增殖的影响

由表 1 可见, 在细胞培养的第 4 天, 与对照组相比, 添加 EGF 或 FSH 对颗粒细胞具有显著的促增殖的作用 (P < 0.05), 而胰岛素促颗粒细胞增殖的作用不显著 (P > 0.05)。

表 1 FSH、EGF 和胰岛素对卵巢颗粒细胞增殖的影响

Table 1 Effect of FSH, EGF, Insulin on granulosa proliferation

处理 Treatment	细胞数量/(× 10 ⁴ · mL ⁻¹) Number of the cells					
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
对照组 Control	9.67 ± 0.58 a	12.00 ± 0.60 a	18.20 ± 2.11 a	20.03 ± 1.05 a	16.03 ± 1.55 a	12.33 ± 1.04 a
FSH	10.67 ± 0.5 a	12.17 ± 1.26 a	17.33 ± 0.58 a	25.60 ± 0.69 b	17.17 ± 0.76 a	14.67 ± 0.58 b
EGF	10.67 ± 1.15 a	17.03 ± 2.45 b	19.07 ± 1.30 a	30.27 ± 0.64 b	25.27 ± 0.64 b	15.00 ± 1.00 b
胰岛素 Insulin	10.67 ± 0.58 a	16.27 ± 0.64 b	17.07 ± 1.10 a	18.90 ± 0.66 a	15.10 ± 0.66 a	11.00 ± 1.00 a

注: 同一列数据后标不同小写字母者表示差异显著 (P < 0.05), 标相同字母者表示差异不显著 (P > 0.05)。

Note: Different small letters within a same row indicate significant difference (P < 0.05); and the same letters indicate insignificant difference (P > 0.05).

2.2 小鼠卵巢颗粒细胞原代培养的形态学观察

倒置相差显微镜观察结果表明,刚接种时颗粒细胞呈球形,10 h 后贴壁生长,培养 24 h 后,形态不规则,呈多角形或梭形(图 1-A)。培养 5 d 时可铺满

皿底,形成单层的颗粒细胞(图 1-B)。部分颗粒细胞还出现聚集生长的特征,形成胚胎干细胞样集落(图 1-C)。

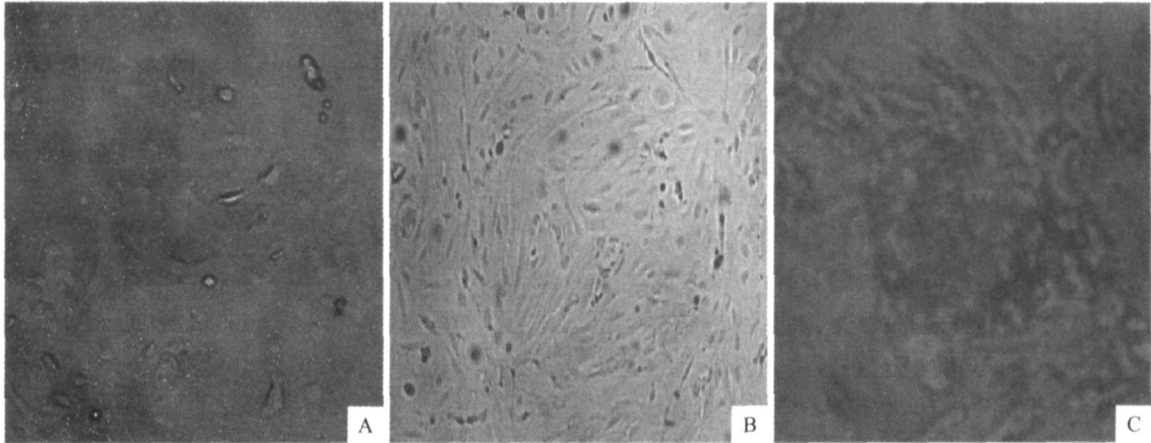


图 1 小鼠卵巢颗粒细胞原代培养的形态观察 (A、C. $\times 200$;B. $\times 100$)

Fig. 1 Investigation of granulosa cells' morph primarily cultured in vitro (A,C. $\times 200$;B. $\times 100$)

2.3 小鼠卵巢颗粒细胞 A KP 染色和 C-kit 免疫组化染色

由图 2,3 可见,与对照(图 2-A、图 3-A)不同,小

鼠卵巢颗粒细胞集落 A KP 染色(图 2-B)和 C-kit 免疫组化染色(图 3-B)均为阳性。

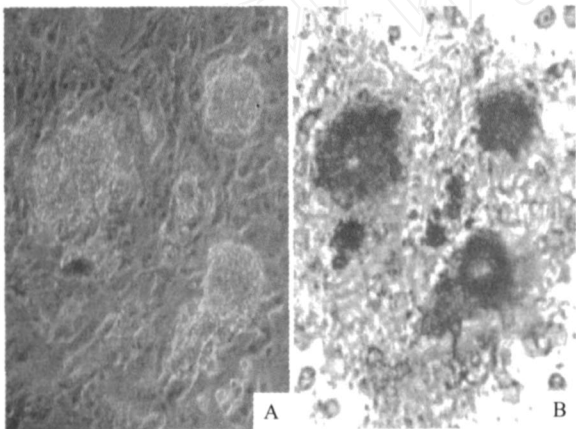


图 2 小鼠卵巢颗粒细胞集落 A KP 染色 ($\times 100$)

A. 对照;B. A KP 染色

Fig. 2 Mouse granulosa cells stained by A KP ($\times 100$)

A. Control ;B. A KP staining

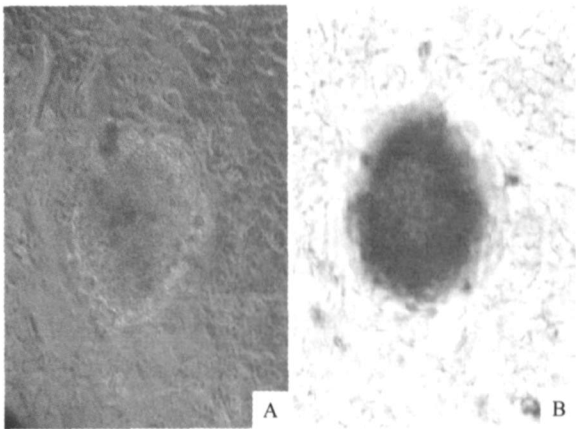


图 3 小鼠卵巢颗粒细胞集落 C-kit 染色 ($\times 100$)

A. 对照;B. C-kit 染色

Fig. 3 Mouse granulosa cells stained by C-kit ($\times 100$)

A. Control ;B. C-kit staining

3 讨 论

3.1 FSH、EGF 和胰岛素对小鼠卵巢颗粒细胞的影响

FSH 是卵巢颗粒细胞生长增殖与分化的决定因素,FSH 受体主要存在于小鼠的卵巢颗粒细胞上,因此,FSH 对其自身受体既有上调作用,又有

下调作用^[5]。高庆华等^[6]研究认为,在生理浓度范围内,FSH 浓度越高,对颗粒细胞增生作用的刺激越强。还有研究证实,牛卵巢颗粒细胞的体外培养对 FSH 有剂量依赖性^[7]。本试验结果表明,添加 50 ng/ mL FSH,在培养的第 4 天其对卵巢颗粒细胞表现出明显的促增殖作用 ($P < 0.05$)。

EGF 能刺激体内或体外培养的多种组织和细

胞的增殖或分化。据李芳等^[8]报道,EGF 的结合位点位于次级和三级卵泡的颗粒细胞上,卵丘颗粒细胞与 EGF 的结合能力较卵泡壁上的颗粒细胞强,而闭锁卵泡的颗粒细胞与 EGF 的结合能力弱或没有结合能力。本试验发现,EGF 组与对照组相比在培养的第 4 天也表现出明显的增殖效应 ($P < 0.05$),说明本试验培养的小鼠颗粒细胞中可能存在较大比例的卵丘颗粒细胞。

胰岛素可促进葡萄糖代谢及 RNA、蛋白质和磷脂的合成。胰岛素对细胞的作用是多方面的,其可能的机制之一是通过与胰岛素样生长因子-I(IGF-I)受体结合促进细胞代谢。众所周知,细胞的生长增殖与分化是完全向两个相反方向发生的,即相互颌颡。在大鼠^[9]和猪^[10]的报道中,添加胰岛素有增加颗粒细胞孕酮产量的作用。正常卵巢颗粒细胞不会增加孕酮产量,只有发生分化的卵巢颗粒细胞才会导致孕酮量的增加。高庆华等^[6]报道,胰岛素刺激颗粒细胞分化成黄体细胞并呈现出剂量依赖模式。本试验结果显示,2 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素对小鼠卵巢颗粒细胞没有显著的促增殖作用 ($P > 0.05$),这可能是胰岛素促进颗粒细胞分化所致。

3.2 卵巢颗粒细胞的干细胞特性

本研究首次发现,部分小鼠卵巢颗粒细胞具有聚集生长特性,能形成胚胎干细胞样集落,这与 Gutierrez 等^[11]体外培养的牛卵泡颗粒细胞的生长特性相似。为了进一步验证颗粒细胞集落是否具有干细胞表面特异性标记,作者特此选择了 AKP 染色和 G-kit 免疫组化染色对细胞进行了鉴定,结果显示两者均呈阳性,表明此类细胞可能具有干细胞特性。Tina 等^[12]在 1999 年提出牛卵巢颗粒干细胞的假说。张静等^[13]发现,在大鼠排卵前期卵泡颗粒细胞中有端粒酶的表达,这提示大鼠卵巢颗粒细胞中也可能存在干细胞群体。另外,卵巢颗粒细胞可用于核移植的现象本身也揭示颗粒细胞具有干细胞性质。因为分化程度低的细胞作为核供体更有利于重构胚的发育,利用哺乳动物体细胞作为核供体的成功率一般为 0.4%~0.9%,而用颗粒细胞作为核供体时的成功率可达 2.8%,不能排除这与部分颗粒细胞具有干细胞特性有关,但对于这方面的更深入

鉴定尚待进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Channing C P, Ledwitz R F. Methods for assessing hormone-mediated differentiation of ovarian cells in culture and in short-term incubations[J]. *Methods Enzymol*, 1975, 39:183-230.
- [2] Pescador N, Stocco D M, Murphy B D. Growth factor modulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinization in the pig ovary[J]. *Biol Reprod*, 1999, 60:1453-1461.
- [3] Meidan R, Gersh E, Blum O, et al. In vitro differentiation of bovine theca and granulosa cells into small and large luteal-like cells: morphological and functional characteristics [J]. *Biol Reprod*, 1990, 43:913-921.
- [4] Kishi H, Minegishi T, Tano M, et al. The effect of activin and FSH on the differentiation of rat granulosa cells[J]. *FEBS Letters*, 1998, 422:274-278.
- [5] 杨增明, 孙青原, 夏国良. 生殖生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2005:577-581.
- [6] 高庆华, 蒋超祥, 韩春梅. FSH 和胰岛素对牛卵泡颗粒细胞长期培养的影响[J]. *中国草食动物*, 2004, 24(4):16-18.
- [7] Kuran M, Broadbent P J, Hutchinson J S M. Follicle-stimulating hormone stimulated differentiation and progesterone production of bovine granulosa cells in culture[J]. *Animal Reproduction Science*, 1995, 39:237-249.
- [8] 李芳, 郑月慧, 郑莉萍. 生长因子对卵泡发育调节作用的研究进展[J]. *江西医学院学报*, 2005, 45(5):169-173.
- [9] Adashi E Y, Resnick C E, Hernandez E R, et al. Insulin-like growth factor-I as amplifier of follicle-stimulating hormone action: studies on mechanism(s) and site(s) of action in cultured rat granulosa cells[J]. *Endocrinology* 1988, 122:1583-1591.
- [10] Veldhuis J D, Rogers R J. Mechanisms subserving the steroidogenic synergism between follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I somatomedins alterations in cellular sterol metabolism in swine granulosa cells [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262:7658-7664.
- [11] Gutierrez C G, Campbell B K, Webb R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics [J]. *Biol Reprod*, 1997, 56:608-616.
- [12] Tina C L, Mathis J M, Latham S E. Evidence for ovarian granulosa stem cells: telomerase activity and localization of the telomerase ribonucleic acid component in bovine ovarian follicles [J]. *Biol Reprod*, 1999, 61:358-366.
- [13] 张静, 郑月慧, 郑莉萍. 排卵前期卵泡颗粒细胞端粒酶的表达及其影响因素[J]. *生理学报*, 2005, 57(6):714-718.