

基因与细胞治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000083

神经生长因子对培养的小鼠卵巢腔前颗粒细胞增殖的影响

于 洋¹, 赵晓成²

(1. 辽宁医学院基础医学院生理学教研室, 辽宁 121001;

2. 中国科学技术大学生命科学学院发育生物学研究室, 安徽 230026)

【摘要】目的:为了探讨神经生长因子(nerve growth factor, NGF)的促生殖作用及其机理, 观察小鼠卵巢腔前颗粒细胞(granulosa cell, GC)增殖情况, 同时建立便捷灵敏、毒性小、无污染的细胞增殖检测方法。**方法:**用 NGF 刺激培养的小鼠卵巢腔前 GC, CCK-8 实验分析, 溴脱氧尿嘧啶核苷(bromodeoxyuridine, BrdU)掺入标记, 免疫细胞化学染色法检测 GC 在体外培养中的增殖情况和 BrdU 标记指数(labeling index, LI); 流式细胞技术分析细胞周期各时相的变化。**结果:**NGF 明显促进 GC 增殖, 并且具有一定的量效关系。光镜下可见 BrdU 阳性标记的 GC, 其细胞核内可见棕褐色阳性颗粒, 提示处于细胞增殖期。NGF 组的 BrdU LI 为 40.62%, 明显高于对照组 23.57% ($P=0.000$)。NGF 使增殖期的细胞显著增多及增殖指数(proliferation index, PI)升高, G0/G1 期细胞相对比例减少($P=0.000$)。**结论:**本研究证实 NGF 能够促进 GC 增殖, CCK-8 分析和 BrdU 标记是高效、便捷的标记腔前 GC 增殖的方法, NGF 促进 GC 增殖与促进 GC DNA 的合成有关系。

【关键词】神经生长因子; 颗粒细胞; 增殖; 溴脱氧尿嘧啶核苷; CCK-8; 流式细胞技术

【中图分类号】R339.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-07-30

Effects of nerve growth factor on the proliferation of ovarian preantral granulosa cells in mice

Yu Yang¹, Zhao Xiaocheng²

(1. Teaching and Research Section of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Liaoning Medical University; 2. Teaching and Research Section of Developmental Biology, School of Life Sciences, University of Science and Technology of China)

【Abstract】Objective: To observe the proliferation of mouse ovarian preantral granulosa cells in order to discuss the reproduction and mechanism of nerve growth factor(NGF) and to establish speedy, sensitive and pollution free detection of cell proliferation with low toxicity. **Methods:** The mouse ovarian preantral granulosa cells were treated with NGF in vitro and cell proliferation and labeling index(LI) were measured by CCK-8 assay, bromodeoxyuridine(BrdU) labeling and immunocytochemistry staining. Changes in cell cycle were analyzed with flow cytometry. **Results:** Data showed that NGF significantly promoted the proliferation of granulosa cells in a dose-dependent manner. Granulosa cells BrdU positively labeled were visible under light microscope after NGF treatment. Brown positive grains were visible in the nuclei, which indicated that cells were in proliferation period. BrdU LI(%) in the treatment was 40.62%, which was significantly more than that of control(23.57%, $P=0.000$). Number of cells and the proliferation index were increased in proliferation period and the cell proportion was decreased in G0/G1 phase($P=0.000$) after NGF treatment. **Conclusions:** CCK-8 assay and BrdU labeling are effective, speedy and sensitive in detecting preantral granulosa cell proliferation. The promotion effect of NGF on granulosa cell proliferation might be associated with promotion of DNA synthesis.

【Key words】nerve growth factor; granulosa cell; cell proliferation; bromodeoxyuridine; CCK-8; flow cytometry

卵母细胞周围包绕着颗粒细胞(granulosa cell, GC), GC 即对卵母细胞起着营养的作用又促进卵母细胞的成熟, 因此 GC 在卵母细胞的发育成熟、信息

传递中有着至关重要的作用。以往的研究表明, 神经生长因子(nerve growth factor, NGF)存在于动物生殖系统中, 提示 NGF 在生殖细胞的分化、发育和生理功能的维持方面具有重要的作用^[1]。

CCK-8 其原理是, 活细胞线粒体脱氢酶经过还原作用生成的黄色甲臞产物, 具有高度水溶性, 不

作者介绍: 于 洋, Email: 4673322@163.com,

研究方向: 生殖生理学。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000083.html>

需要有机溶剂裂解细胞,可直接进行比色,细胞毒性低,步骤简便,准确性高。溴脱氧尿嘧啶核苷(bromodeoxyuridine, BrdU)的结构与胸腺嘧啶相似,在 DNA 合成过程中能掺入 S 期细胞的 DNA 中,掺入合成的强度可直接显示细胞增殖的能力,同时能避免以往应用氚标记的胸腺嘧啶核苷检测对细胞的放射性损害^[2]。

体外培养的卵巢 GC 缺乏有效的标记方法,同时为了进一步验证 NGF 的促卵泡发育作用并探索其机理,本文采用分离和培养原代小鼠卵巢腔前 GC,应用 CCK-8 分析, BrdU 体外标记检测细胞增殖,流式细胞技术分析细胞周期各时相的变化,以期探索 NGF 对 GC 增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康、出生 10 d 的雌性 ICR 小白鼠,购自中国科学技术大学生命科学学院实验动物中心[许可证号:SCXK(皖)2005-0008]。

1.2 主要试剂

NGF 购自 RD systems 公司; Anti-mouse antibody, Anti-rabbit antibody 购自 Promega 公司; DMEM-F12 培养液, Tryple, 胎牛血清, 双抗(Penstrep), 胶原酶(Collagenase) 购自 GIBCO 公司; 牛血清白蛋白购自 Biotech BASIC INC 公司; BrdU, BrdU in situ defection kit II 购自 BD Biosciences 公司; CCK-8 购自 Dojindo laboratories 公司; 细胞周期检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.3 腔前 GC(preantral granulosa cells, PreGC)的分离

小鼠断颈处死, 无菌操作取出双侧卵巢, 去除周围脂肪组织及卵巢被膜, 磷酸缓冲液洗净, 体视显微镜下用尖头镊子分离腔前卵泡, 用吸管吸取单个腔前卵泡, 2 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清液, 加入胰酶消化 15 min, 期间吹打数次, 然后终止消化, 1 500 r/min, 离心 5 min, 去上清, 加入完全培养基(DMEM/F12 培养基+10%胎牛血清+1%双抗), 制成 GC 悬液。台盼蓝染色, 检测细胞存活率为 90%, 调整细胞密度为 2×10^5 个/ml, 预接种到培养板中。

1.4 CCK-8 检测 GC 增殖

将细胞悬液接种到 96 孔培养板, 每孔 100 μ l, 设定 7 个不同 NGF 浓度组(0、50、100、150、200、250、300 ng/ml), 每组 6 个复孔。5%CO₂, 37℃孵箱培养 24 h, 细胞融合度达到 90%, 更换含 0.1%牛血清白蛋白的 DMEM/F12 培养基饥饿 24 h, 加入 NGF 使终浓度为 0、50、100、150、200、250、300 ng/ml, 继续培养 48 h。磷酸缓冲液清洗, 然后换成 100 μ l 饥饿培养基, 每孔再加入 10 μ l CCK-8 溶液孵育 12 h, 酶标仪检测 450

nm 波长的吸光度(absorbance, A)值, 计算平均值。

1.5 BrdU 体外标记 GC

将盖玻片(1.5 cm $\times$ 1.5 cm)在酒精灯上迅速过火后小心放入 24 孔培养板中, 然后将单细胞悬液滴到玻片上, 40 μ l/滴, 然后加培养基到 500 μ l, 设定对照组和 NGF 组(50 ng/ml), 每组 3 个复孔, 培养 24 h, 饥饿 24 h, NGF 组加入 NGF 使终浓度为 50 ng/ml 继续培养 30 h。然后取出爬片, 按照 BrdU In-Situ Detection Kit 中描述的体外培养细胞标记步骤操作, 封片后显微镜拍照, 随机计数 10 个高倍视野中细胞总数及 BrdU 阳性细胞数, 计算标记指数(labeling index, LI)。

1.6 流式细胞仪检测 GC 细胞周期各时相的变化

GC 接种后分为对照组和 NGF 组(50 ng/ml), 每组 3 个复孔, 培养 24 h, 饥饿 24 h, NGF 组加入 NGF 使终浓度为 50 ng/ml 继续培养 30 h, 按照细胞周期检测试剂盒说明书中的实验步骤进行, 上流式细胞仪检测。Multicycle AV Software 软件读取 G0/G1 期、S 期、G2/M 期的数据, 计算细胞增殖指数(proliferation index, PI), $PI = (S + G2/M) / (G0/G1 + S + G2/M) \times 100\%$ 。

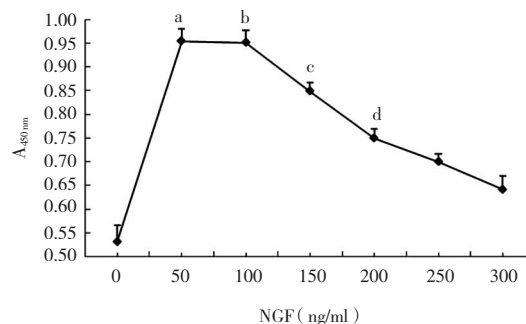
1.7 统计方法

使用 SPSS 16.0 统计分析软件进行统计学分析, 所有的检测数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析后, 组间两两比较行 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 NGF 对小鼠卵巢 PreGC 促增殖作用

不同浓度的 NGF 作用 PreGC 48 h 后, 采用 CCK-8 法检测 NGF 对细胞增殖的作用。结果显示, 在波长 450 nm 时, A 值随 NGF 浓度(0~100 ng/ml)增高而增加, 最理想反应发生在 NGF 浓度为 50 ng/ml, 同对照组(0 ng/ml)相比, 差异极显著($P=0.000$), 随着 NGF 浓度进一步增大(150~300 ng/ml), A 值呈现下降趋势(图 1)。

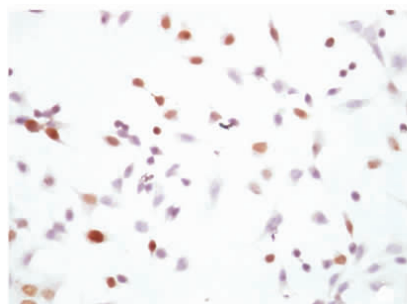


与 0 ng/ml 比较, a, $P=0.000$, b, $P=0.000$, c, $P=0.017$, d, $P=0.024$

图 1 不同浓度的 NGF 对小鼠卵巢 PreGC 促增殖作用 (CCK-8)
Fig.1 Proliferative effects of NGF with different concentrations on PreGC detected by CCK-8

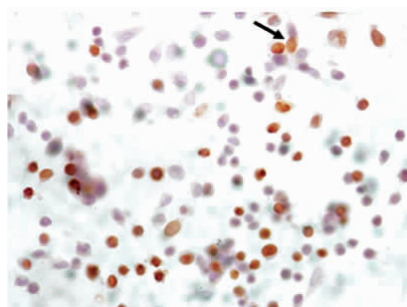
2.2 BrdU 的免疫细胞化学检测及 LI(%)

BrdU 免疫细胞化学染色显示,经 50 ng/ml NGF 处理 30 h 后,NGF 对小鼠卵巢 PreGC 显示促增殖作用(图 2)。随机计数 10 个高倍视野中细胞总数及 BrdU 阳性细胞数,计算 LI(%) ,NGF 组的 BrdU LI 为 40.62%,高于对照组 23.57%($P=0.000$)(图 3)。



只有少数细胞表达 BrdU

A. 对照组

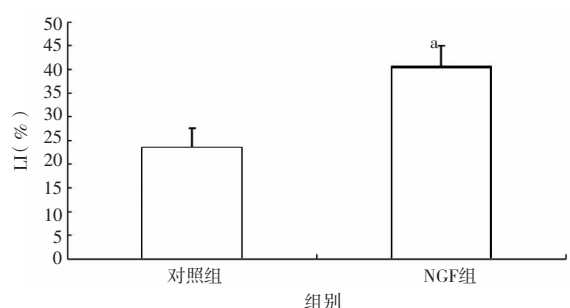


表达 BrdU 的细胞数增多,箭头表示细胞核内可见棕褐色阳性颗粒

B. NGF (50 ng/ml) 组 (40 ×)

图 2 NGF 刺激小鼠卵巢 PreGC 30 h 后 BrdU 免疫细胞化学染色结果

Fig.2 BrdU staining of PreGC treated by 50 ng/ml NGF for 30 h



a, 与对照组比较, $P=0.000$

图 3 NGF 对 BrdU 阳性 PreGC LI(%) 的影响

Fig.3 Effects of NGF on BrdU positive PreGC label index

2.3 NGF 对小鼠卵巢 PreGC 细胞周期的影响

采用流式细胞仪检测显示,NGF 组 PreGC 的 G0/G1 期比例较对照组明显降低,而 S 期比例及 PI(%) 则明显升高,具有统计学意义($P=0.000$)(表 1)。

表 1 NGF 对小鼠卵巢 PreGC 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effects of NGF on cell cycle of PreGC detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数 (n)	细胞周期分布 (%)			PI 值 (%)
		G0/G1 期	S 期	G2/M 期	
对照组	3	63.9 ± 3.5	20.6 ± 1.3	17.3 ± 1.8	37.2 ± 2.7
NGF 组 (50 ng/ml)	3	23.5 ± 3.2 ^a	62.8 ± 2.8 ^a	19.4 ± 3.8	77.8 ± 2.1 ^a
t 值		-90.790	-232.730		-173.963
P 值		0.000	0.000		0.000

注:a, 与对照组比较, $P < 0.01$

3 讨论

在促性腺激素的作用下,卵泡中的 GC 增殖、分化为程度不一的 GC,尤其是与卵母细胞之间形成大量缝隙连接的卵丘 GC,可以合成多种激素及生长因子,对支持卵母细胞的发育成熟、传递内分泌及其他环境信号有至关重要的作用,GC 通过缝隙连接调节卵母细胞的转录活性,并诱导卵母细胞主要蛋白的转录后修饰,从而调节卵母细胞的成熟分裂。同时,卵母细胞对 GC 的增殖、分化及功能也起着重要的调节作用,进而调控卵泡的发育,说明 GC 和卵母细胞之间的通讯是双向的。GC 的增殖和分化在原始卵泡形成启动以及以后的卵泡正常发育起着至关重要的作用,因此 GC 是否能够正常的增殖分化可作为卵泡发育成熟的标志^[3]。

国外越来越多的研究已经证实,卵巢中存在 NGF 及其受体 TrkA 和 p75 的表达。在猪的卵巢中,NGF 及其受体的 mRNA 在膜细胞有表达;且 NGF 与 TrkA 的蛋白在 GC 中有表达,从而说明它们对排卵过程起到一定作用^[4]。在山羊的 GC 和黄体细胞中的表达也表明,NGF 及其受体在卵泡发育与黄体功能上起着非常重要的作用^[5]。对金仓鼠的研究表明 NGF 及其受体在卵泡中有表达,从而证明 NGF 及其受体在卵泡发育、排卵等方面都有重要的作用^[6]。通过对 NGF 在小鼠和人的卵巢中表达的研究也表明,NGF 的过表达会导致卵巢中初级卵泡与次级卵泡数量的大幅增加,而裸露的卵母细胞数量相对减少,表明不正常的 NGF 及其受体水平的增加会造成卵巢囊状疾病^[7]。

CCK-8 是一种基于 WST-8 的检测细胞增殖和细胞毒性的方法。WST-8 是一种类似于 MTT 的化合物,在电子耦合试剂存在的情况下,可以被线粒

体内的脱氢酶还原生成黄色的甲臞,细胞增殖越快,则颜色越深;细胞毒性越大,则颜色越浅,对于同样的细胞,颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。与传统的 MTT 检测法比较,CCK-8 具有使用方便,不需要放射性同位素和有机溶剂,检测快速,灵敏度高,甚至可以测定较低的细胞密度,重复性优于 MTT,对细胞毒性小等各种优点^[8]。

本实验采用 CCK-8 试剂盒比较了不同浓度的 NGF 对体外培养的小鼠 GC 增殖的影响,选取 10 d 龄的小鼠,获取腔前 GC,避免分化的 GC 自身因素对 NGF 促增殖作用的影响,并且在加入 NGF 前用无血清培养基饥饿培养,减少其他因素干扰细胞增殖。实验结果证实在一定范围内随着浓度增高,NGF 对细胞的促增殖作用越明显。可以看出,50 ng/ml 和 100 ng/ml 的 NGF 都引起细胞增殖的最大效应,两者之间的促增殖作用没有差异,因此判定 NGF 的最理想反应发生在 NGF 浓度为 50 ng/ml。

BrdU 作为胸腺嘧啶的类似物,能取代胸腺嘧啶被增殖细胞利用。当细胞处于 DNA 合成期,即细胞处于增殖期,BrdU 被细胞特异性地摄入细胞核掺入到细胞新合成的 DNA 中,只要细胞不消亡,这种存留是永久的,用抗 BrdU 单克隆抗体经免疫细胞化学染色后,可特异性显示 BrdU 阳性标记细胞,即可直接观察其在细胞内的掺入情况^[9]。

本研究采用 BrdU 体外标记方法,选取 NGF 最理想反应浓度 50 ng/ml 作用 GC,然后进行免疫细胞化学检测,结果显示光镜下可见 BrdU 阳性标记的 GC,NGF 组的细胞体积增大,胞质丰富,其细胞核内可见棕褐色阳性颗粒,提示细胞处于增殖期。同时计算 BrdU 阳性 LI(%),数据显示 NGF 组的 BrdU 标记指数显著高于对照组,具有差异性,这更加直观的表明 NGF 能够促进 GC 的增殖。

卵泡的发育以 GC 的增殖为前提,而 GC 的增殖需要合成大量的 DNA,因此细胞的增殖情况可以用细胞周期的水平来反映。利用流式细胞仪检测 GC 周期各时相的变化,以间接反映细胞复制的水平。结果显示,NGF 作用于体外培养的小鼠腔前 GC 后,使

S 期的细胞显著增多及 PI 升高,而 G0/G1 期细胞相对比例减少,说明 NGF 能通过缩短 G0/G1 期,促进细胞由 G0 期向 S 期转化,推动细胞周期的进程,增加 S 期细胞比率,从而促进 GC 的增殖及 DNA 的合成。

综上所述,CCK-8 检测、BrdU 标记以及流式检测在研究 NGF 促 GC 增殖及影响因素等方面具有重要的应用价值,是高效、便捷的标记腔前 GC 增殖的方法,而且本实验结果证实了 NGF 促进 GC 增殖的作用与浓度相关,并在一定范围内随着 NGF 浓度的增加促增殖作用增强。

参 考 文 献

- [1] Dissen GA, Romero C, Hirshfield AN, et al. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(5): 2078–2086.
- [2] Kulldorff M, McShane LM, Schatzkin A, et al. Measuring cell proliferation in the rectal mucosa. comparing bromodeoxyuridine (BrdU) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) assays[J]. *J Clin Epidemiol*, 2000, 53(8): 875–883.
- [3] Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals[J]. *Reproduction*, 2001, 122(6): 829–838.
- [4] Jana B, Koszykowska M, Czarzasta J. Expression of nerve growth factor and its receptors, TrkA and p75, in porcine ovaries[J]. *J Reprod Dev*, 2011, 57(4): 468–474.
- [5] Ren L, Medan MS, Weng Q, et al. Immunolocalization of nerve growth factor (NGF) and its receptors (TrkA and p75LNGFR) in the reproductive organs of Shiba goats[J]. *J Reprod Dev*, 2005, 51(3): 399–404.
- [6] Shi Z, Jin W, Watanabe G, et al. Expression of nerve growth factor (NGF), and its receptors trkA and p75 in ovaries of the cyclic golden hamster (*Mesocricetus auratus*) and the regulation of their production by luteinizing hormone[J]. *J Reprod Dev*, 2004, 50(6): 605–611.
- [7] Dissen GA, Garcia-Rudaz C, Paredes A, et al. Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(6): 2906–2014.
- [8] 石淙, 万腊根. 细胞增殖的检测方法[J]. *实验与检验医学*, 2012(2): 153–155.
- [9] Crane AM, Bhattacharya SK. The use of bromodeoxyuridine incorporation assays to assess corneal stem cell proliferation[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1014: 65–70.

(责任编辑: 关蕴良)