

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.13.021

大鼠卵巢颗粒细胞体外培养及哈蟆油对其增殖功能的影响*

零小妹^{1,2}, 谭焱³, 季波², 杨晶晶^{1,2}, 吴新荣², 梁磊^{1,2Δ}

(1. 广东药科大学中药学院, 广州 510006; 2. 广州军区广州总医院药剂科, 广州 510010;
3. 广州军区广州总医院干部病房一科, 广州 510010)

[摘要] **目的** 采用 CCK-8 法研究哈蟆油对体外培养大鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响, 对比分析哈蟆油含药血清对颗粒细胞的增殖作用浓度和时间, 为进一步体外试验奠定基础。**方法** 选用 25 日龄未成年雌性 SD 大鼠, 腹腔注射孕马血清, 48 h 后脱颈处死, 收集卵巢颗粒细胞, 在 DMEM-F12 培养液中培养, 并通过 HE 染色和免疫荧光技术对颗粒细胞进行鉴定。25 只 SD 大鼠分为正常对照组、阳性药对照组、哈蟆油低、中、高剂量组, 灌胃给药 7 d 后采血并分离血清。将体积分数为 10%, 20%, 40%, 80% 各组不同浓度的含药血清加入体外培养的大鼠卵巢颗粒细胞体系中, 采用 CCK-8 法检测各组 24、48 h 和 72 h 细胞增殖情况。**结果** 哈蟆油显著提高了颗粒细胞的增殖能力, 有一定的量效和时效关系, 随着哈蟆油浓度的增加, 其促增殖能力逐渐增强, 在作用 48 h 后, 20% 浓度体积分数的哈蟆油含药血清组最为显著 ($P < 0.05$)。**结论** 体外建立大鼠卵巢颗粒细胞的培养方法, 有助于深入研究哈蟆油等中药对卵巢的作用和机制。

[关键词] 哈蟆油; 卵巢颗粒细胞; 增殖; 含药血清; CCK-8

[中图分类号] R711

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)13-1792-05

Culture in vitro of rat ovarian granulosa cells and effect of Ranae Oviductus on its proliferation*

Ling Xiaomei^{1,2}, Tan Yan³, Ji Bo², Yang Jingjing^{1,2}, Wu Xinrong², Liang Lei^{1,2Δ}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510006, China;
2. Department of Pharmacy, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou, Guangdong 510010, China; 3. First Department of Cadre Wards, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the effective methods of isolation, purification, culture in vitro and identification of SD rat ovarian granulosa cells, to research the effects of Oviductus Ranae on the proliferation of rat ovarian granulosa cells by CCK-8, and to contrastively analyze the best optimal action concentration and time of serum containing Oviductus Ranae on granulosa cells to lay the foundation for further in vitro experiment. **Methods** Nonage SD rats aged 25 d were selected and intraperitoneally injected by pregnant mare serum, then killed after 48 h. Ovarian granulosa cells were collected and cultured in the DMEM-F12 culture solution. The hematoxylin & eosin (HE) staining and immunofluorescence technique were used to identify the ovarian granulosa cells. Twenty-five SD rats were randomly divided into the normal control group, positive medicine control group, and low, middle and high doses Oviductus Ranae groups. Blood was collected and serum was separated after 7 d medication gavage. The volume percent of 10%, 20%, 40%, 80% serum in each group was added into the in vitro medium system of ovarian granulosa cells culture. Then the cell proliferation situation at 24, 48, 72 h in each group was measured by CCK-8. **Results** Oviductus Ranae significantly increased the proliferation ability of granulosa cells in a certain dose-dependent relation. With the increase of Oviductus Ranae concentration, its proliferation ability was gradually increased, after 48 h action, which in the Oviductus Ranae-containing serum group with the volume fraction of 20% was most significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Establishing in vitro cultural method of rat ovarian granulosa cells is conducive to further research the action and mechanism of Oviductus Ranae on ovary.

[Key words] Oviductus Ranae; ovarian granulosa cells; proliferation; drug-containing serum; CCK-8

女性进入围绝经期卵巢功能衰退可能导致多种疾病发生^[1]。目前的实验研究中, 体外培养卵巢颗粒细胞是研究卵巢功能极好的切入点, 但由于对颗粒细胞的分离纯化、培养方法报道各异^[2-3], 如采用机械分离法、胰酶或透明质酸酶消化法等, 但研究报道不多, 所用单一方法有其自身的优势, 但获得纯度高、量大的卵巢颗粒细胞并不确定。因此, 建立一种有效的分离纯化卵巢颗粒细胞的方法有助于深入研究围绝经期卵巢功能的变化。传统中药哈蟆油 (Oviductus Ranae, OR) 含有多种有效成分, 具有抗氧化、抗衰老等功效, 常用于治疗女性更年

期综合征等。本课题前期研究发现, 哈蟆油能明显提高雌性衰老模型小鼠体内雌激素水平、延长动情期、增加小鼠卵巢和子宫指数, 明显改善卵巢和子宫的病理改变, 降低卵巢、子宫中丙二醛含量, 提高其超氧化物歧化酶活力^[4]。关于哈蟆油体内研究, 已有诸多报道^[5-6], 但较少涉及其体外机制的研究。本研究旨在前期研究基础上, 通过优化的体外培养大鼠卵巢颗粒细胞分离、鉴定的有效方法, 探讨哈蟆油对卵巢颗粒细胞增殖的影响, 分析哈蟆油含药血清对卵巢颗粒细胞的增殖作用浓度和作用时间, 为进一步在体外研究哈蟆油调节卵巢功能的分子作用

* 基金项目: 广东省广州市珠江科技新星项目 (2013J2200030); 广东省广州市科技计划项目 (201509010012)。作者简介: 零小妹 (1991-), 在读硕士, 主要从事中药药理研究。Δ 通信作者, E-mail: libraliang78@126.com。

机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 雌性大鼠, 体质量 200~220 g, 用于细胞原代培养动物; 25 日龄 SPF 级 SD 雌性大鼠, 体质量 40~50 g; 均由广东省医学实验动物中心提供, 实验动物中心使用许可证号: SCXK(粤 2013-0002)。

1.2 仪器与试剂 兽用血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG, 1 000 IU/支) 购于杭州动物药品厂; 戊酸雌二醇 (estradiol valerate, EV) 购于拜耳医药保健有限公司广州分公司 (国药准字 J20130009, 批号: 188A2); 胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶、DMEM/F12 (1:1) 培养基、青-链霉素均购于美国 Gibco 公司; Anti-FSHR 兔多克隆抗体 (货号: ab103874) 购于 Abcam 公司; 一抗稀释液购于碧云天生物公司; 二抗 (FITC 标记羊抗兔) 购于谷歌生物有限公司; CCK-8 试剂盒购于日本同仁化学研究所; 3111 型二氧化碳恒温培养箱 (Thermo Fisher Scientific)、Multiskan Go 全波长酶标仪 (Thermo Fisher Scientific)、FRESCO 17 型冷冻微量离心机 (Thermo Fisher Scientific)、久保田常温低速离心机 (Kubota Corporation)、倒置显微镜 (日本 Olymups); BX51 正置显微镜 (日本 Olymups)。

1.3 药材 哈蟆油样品 (批号: 150701) 产地为吉林长白山, 购于广东大翔药业有限公司。

1.4 方法

1.4.1 研制哈蟆油药粉 称取 200 g 哈蟆油于 60 °C 恒温烘箱中干燥 24 h, 经粉碎后, 得到白色粉末过 120 目筛网, -20 °C 保存备用。

1.4.2 含药血清的制备 将哈蟆油药粉和戊酸雌二醇片用植物油研磨溶解成混悬液备用。哈蟆油按低中高 3 个剂量即 0.9、2.7、8.1 g·kg⁻¹·d⁻¹ (分别为临床等效剂量 1、3、9 倍), 阳性药对照组用 EV 0.54 mg·kg⁻¹·d⁻¹ (临床等效剂量 3 倍) 给大鼠灌胃, 连续给药 7 d, 正常对照组灌服等量植物油, 每组 5 只。末次给药后 1.5 h, 10% 水合氯醛麻醉, 分离腹主动脉采血, 静置 1 h, 3 500 r/min 离心 15 min, 吸取血清并将同组血清混均后, 于 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 56 °C 水浴灭活 30 min, 分装后, 于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.4.3 大鼠卵巢颗粒细胞的分离和原代培养 参照文献 [2, 7] 的方法并加以改进。取 25 日龄雌性 SD 大鼠, 腹腔注射血清促性腺激素 60 IU, 48 h 后脱颈处死。浸入 75% 乙醇中消毒 3 min, 在超净工作台里迅速剖取卵巢后, 放入预冷的无菌 PBS 中, 除去卵巢周围脂肪、组织及表面包膜, PBS 清洗 2 次后转移至预冷的 DMEM/F12 培养基中。用 1 mL 注射器针头刺破卵泡, 使颗粒细胞释放于培养基中, 40 μm 无菌细胞筛过滤, 收集颗粒细胞悬液。将剩余的组织块移入培养皿中, 加入约组织块 2 倍体积的 0.25% 胰蛋白酶 (含乙二胺四乙酸), 培养皿内吹打分散组织块, 于二氧化碳恒温培养箱中消化 30 min, 加入含有 10% 胎牛血清的培养液终止消化, 40 μm 无菌细胞筛过滤, 将两次收集的颗粒细胞悬液合并, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液收集细胞。加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基 (含 100 U/mL 青霉素和链霉素) 吹打混均成单细胞悬液。台盼蓝染色, 计数。调整细胞悬液浓度为 5.0×10⁵/mL, 接种于培养瓶中, 在二氧化碳恒温培养箱中培养 48 h, 收集贴壁颗粒细胞。

1.4.4 卵巢颗粒细胞生长及形态学观察 将原代培养获得的颗粒细胞稀释成 4×10⁴/mL, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μL, 分别于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24、48、72、96、

120 h, 每个时间点设 5 个复孔, 实验终止前 2 h 每孔按 CCK-8 试剂盒说明书操作, 于酶标仪 450 nm 处测定 OD 值, 绘制细胞生长曲线, 计算细胞增殖率: 细胞增殖率 (%) = 处理时间组 OD 值/24 h 对照组 OD 值×100%, 并观察颗粒细胞生长及形态学变化。

1.4.5 HE 染色法观察颗粒细胞形态 颗粒细胞悬液接种于已预先放置无菌细胞爬片的 24 孔培养板中, 每孔接种 5×10⁴ 个细胞, 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度条件下进行培养, 当细胞铺满爬片 70%~80% 时, PBS 洗涤爬片, 5 min×3 次; 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤爬片, 5 min×3 次; 苏木素染色 3 min, 取出爬片, 用流水冲去浮色 2 min; 盐酸乙醇中分色数秒, 流水小心冲洗; 醇溶性伊红染色 5 min, 流水冲去浮色; 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片后镜下观察细胞形态并拍照。

1.4.6 促卵泡生成素受体 (FSHR) 表达鉴定颗粒细胞 将稀释后的颗粒细胞悬液以 1×10⁵ 个接种于含无菌细胞爬片的 12 孔培养板中, 当细胞长满爬片 70%~80% 时, PBS 洗涤爬片 5 min×3 次; 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, PBS 1 000 μL 洗涤爬片 2 min×3 次; 加入 500 μL 0.5% TritonX-100 室温通透 20 min, PBS 1 000 μL 洗涤 3 min×3 次。每孔加入 400 μL 1% BSA 封闭 30 min, 弃去 1% BSA, 每孔加入 FSHR 一抗多克隆抗体 (按 1:120 比例稀释, 一抗稀释液配置, 浓度为 5 mg/L) 400 μL, 阴性对照组 (只加入 400 μL 一抗稀释液), 4 °C 过夜。次日, PBS 1 000 μL 洗涤 5 min×3 次, 加入 400 μL 相应的二抗 (按 1:200, PBS 稀释), 室温避光 1 h; PBS 1 000 μL 洗涤 2 min×3 次; 每孔加入 400 μL DAPI (5 mg/L, PBS 稀释), 室温避光染色 10 min; PBS 1 000 μL 洗涤 5 min×3 次; 用 30% 甘油封片 (PBS 稀释), 镜下观察拍片。

1.4.7 CCK-8 法检测颗粒细胞活性 (OD 值) 将颗粒细胞传代后, 用细胞计数板计数, 将细胞浓度调整为 1×10⁵/mL, 接种于 96 孔板内, 37 °C, 5% CO₂ 培养至 24 h 后细胞完全贴壁, 弃去旧培养液, 加入不同浓度的哈蟆油含药血清、戊酸雌二醇含药血清、正常大鼠血清, 各组血清均用含 5% 胎牛血清的新鲜细胞培养基溶解, 使血清体积分数分别为 10%、20%、40%、80%, 空白对照组加入等体积 5% 胎牛血清的细胞培养基, 每孔总体积 100 μL, 每组设 4 个复孔, 继续培养 24、48、72 h, 弃去培养液, 每孔加入体积分数为 10% 的 CCK-8 溶液 100 μL, 继续培养 2 h, 酶标仪 450 nm 处测 OD 值, 细胞存活率 (%) = 处理组 OD 值/对照组 OD 值×100%。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件包进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA); 多组间两两比较, 若方差齐则采用 LSD 检验; 若方差不齐, 用 Dunnett's T2 法进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 颗粒细胞生长曲线 初始培养至 24 h, 细胞增殖率增加不显著, 此时细胞处于贴壁生长适应期; 培养至 48 h, 随着培养时间的增加, 卵巢颗粒细胞明显增殖, 细胞增殖率开始显著增加, 此时细胞迅速进入对数生长期; 培养至 72 h, 细胞生长密度达到顶峰, 细胞增殖率达到最大值。随后由于细胞生长密度过高而受到抑制, 此时细胞生长进入平台期; 培养至 96 h 后细胞增殖率逐渐下降 (图 1)。

2.2 卵巢颗粒细胞形态学观察 颗粒细胞培养 24 h, 细胞开始贴壁生长, 呈椭圆形或多角形, 出现聚集生长的特征; 培养 48 h 后, 细胞明显增殖, 贴壁延伸, 生长旺盛。HE 染色后, 显

显微镜下可见颗粒细胞形态完整,边缘清晰,大小均一,呈多角形或梭形,核着深蓝色呈卵圆形或不规则形,胞质淡红色且含有许多颗粒(图 2)。

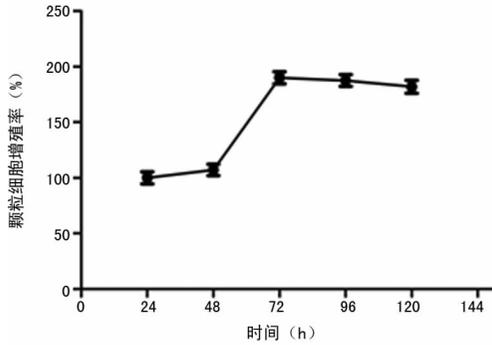


图 1 大鼠卵巢颗粒细胞生长曲线

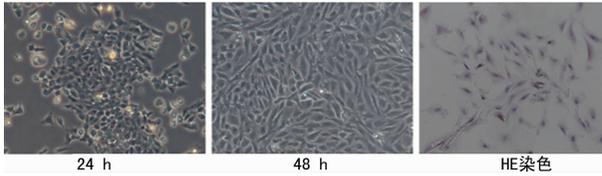


图 2 大鼠卵巢颗粒细胞原代培养 24、48 h 的形态观察及 HE 染色(×200)

2.3 FSHR 表达鉴定卵巢颗粒细胞 FSHR 特定表达于颗粒细胞的胞质上,该蛋白可作为分子标志物用于鉴定卵巢颗粒细胞^[7]。因此,FSHR 蛋白的表达水平可鉴别和检测原代颗粒细胞的纯度。如图 3 所示,颗粒细胞经免疫荧光染色后,几乎所有颗粒细胞胞质显现绿色荧光,说明细胞外 Anti-FSHR 抗体与颗粒细胞中 FSHR 结合于胞质显绿色,胞质未着色的细胞只显现核为蓝色。随机计数 10 个视野,计算胞质未着色的细胞占总细胞的百分比,发现 FSHR 阳性率达 90% 以上;阴性对照不加入 FSHR 抗体只孵育 PBS,胞质未着色,核呈蓝色。

2.4 不同浓度含药血清对颗粒细胞活性的影响 经方差齐性检验后方差齐,采用单因素方差分析,进一步结合 LSD 分析,各组不同浓度含药血清对颗粒细胞活性的影响因作用时间及浓度的不同具有不同差异性,见表 1。24 h 各组不同浓度含药血清细胞存活率的变化:正常对照组 [$F(4,10) = 2.945, P = 0.076$]、EV 阳性对照组 [$F(4,10) = 15.939, P < 0.001$]、OR 低剂量组 [$F(4,10) = 1.209, P = 0.366$]、OR 中剂量组 [$F(4,10) = 1.653, P = 0.236$]、OR 高剂量 [$F(4,10) = 4.899, P$

$= 0.019$];48 h 各组不同浓度含药血清细胞存活率的变化:正常对照组 [$F(4,10) = 20.819, P < 0.001$]、EV 阳性对照组 [$F(4,10) = 39.850, P < 0.001$]、OR 低剂量组 [$F(4,10) = 35.320, P < 0.001$]、OR 中剂量组 [$F(4,10) = 42.875, P < 0.001$]、OR 高剂量 [$F(4,10) = 25.906, P < 0.001$];72 h 各组不同浓度含药血清细胞存活率的变化:正常对照组 [$F(4,10) = 21.187, P < 0.001$]、EV 阳性对照组 [$F(4,10) = 43.264, P < 0.001$]、OR 低剂量组 [$F(4,10) = 90.740, P < 0.001$]、OR 中剂量组 [$F(4,10) = 121.950, P < 0.001$]、OR 高剂量 [$F(4,10) = 80.159, P < 0.001$]。经统计分析发现,24、48、72 h 各组不同浓度含药血清中,24 h 各组不同浓度体积分数的含药血清之间大部分没有统计学差异,48 h 各组 20% 含药血清的细胞存活率显著比同一组其他浓度高,72 h 各组不同浓度体积分数的含药血清之间具有统计学差异,但未呈现各组中某一相同浓度体积分数的含药血清的细胞存活率均较其他浓度高的特点。

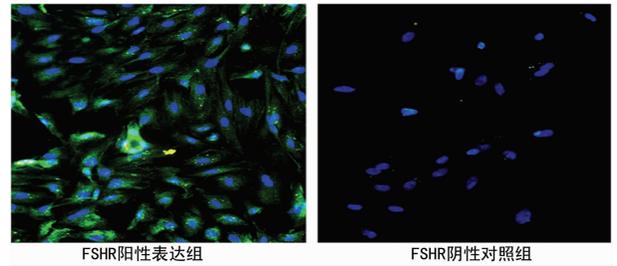


图 3 大鼠卵巢颗粒细胞 FSHR 免疫荧光染色(×200)

2.5 20% 含药血清作用不同时间对颗粒细胞活性的影响 结合表 2,进一步采用单因素方差分析 20% 浓度体积分数不同含药血清组作用不同时间点颗粒细胞活性的影响,正常对照组 [$F(2,6) = 22.727, P = 0.002$]、EV 阳性对照组 [$F(2,6) = 991.614, P < 0.001$]、OR 低剂量组 [$F(2,6) = 92.354, P < 0.001$]、OR 中剂量组 [$F(2,6) = 108.519, P < 0.001$]、OR 高剂量 [$F(2,6) = 32.135, P = 0.001$],与 24 h 比较,48 h 与 72 h 的细胞存活率显著升高,具有统计学差异;与 48 h 比较,正常对照组和 OR 低剂量组 48 h 与 72 h 的细胞存活率无统计学差异,而 EV 阳性对照组及 OR 中、高剂量组 72 h 的细胞存活率显著升高,具有统计学差异。综合以上结果,哈蟆油作用颗粒细胞的最佳反应条件为浓度体积分数为 20% 哈蟆油含药血清,作用时间为 48 h。

表 1 不同浓度含药血清对颗粒细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞存活率(%)		
	24 h	48 h	72 h
空白对照组	100.00±15.30	119.47±0.99	130.68±4.67
10%正常对照组	64.07±6.69	119.65±2.23 [#]	123.58±1.99 [#]
20%正常对照组	84.89±19.94	132.70±3.67 ^{**}	148.59±4.92 ^{**}
40%正常对照组	105.19±22.82	131.20±2.09 ^{**}	146.30±3.73 ^{**}
80%正常对照组	78.27±14.49	124.12±2.11 ^{**#}	143.43±4.42 ^{**}
10%EV 阳性对照组	69.26±12.77 [*]	125.17±1.49 ^{**#}	135.78±3.30 [#]
20%EV 阳性对照组	59.99±2.47 ^{**}	135.64±1.81 ^{**}	156.64±3.75 ^{**}
40%EV 阳性对照组	54.45±4.18 ^{**}	124.37±1.65 ^{**#}	158.07±4.72 ^{**}
80%EV 阳性对照组	100.62±6.08 [#]	126.97±1.98 ^{**#}	172.99±5.99 ^{**#}
10%OR 低剂量组	108.49±13.88	144.05±7.47 ^{**#}	159.75±4.17 ^{**#}
20%OR 低剂量组	109.62±5.45	166.34±8.26 ^{**}	175.01±5.00 ^{**}

续表 1 不同浓度含药血清对颗粒细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞存活率(%)		
	24 h	48 h	72 h
40%OR 低剂量组	117.78±6.23	165.64±2.41**	186.75±4.37***#
80%OR 低剂量组	107.87±0.66	152.76±5.20***	192.65±4.31***#
10%OR 中剂量组	96.67±8.63	140.10±3.32***#	151.08±6.50***#
20%OR 中剂量组	103.29±8.27	152.36±6.15**	181.12±4.71**
40%OR 中剂量组	78.74±19.01	153.38±5.10**	198.94±0.62***#
80%OR 中剂量组	90.93±10.23	155.36±1.78**	191.91±4.03***#
10%OR 高剂量组	59.06±11.89***#	124.62±2.76#	144.68±3.56***#
20%OR 高剂量组	93.49±20.60	141.20±4.91**	174.06±1.79**
40%OR 高剂量组	75.52±3.45*	134.25±3.33***#	166.36±0.27***#
80%OR 高剂量组	89.43±2.59	122.47±1.88#	177.53±6.21**

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与空白对照组比较; #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$, 与 20% 体积分数含药血清比较。

表 2 20%含药血清作用不同时间对颗粒细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞存活率(%)		
	24 h	48 h	72 h
正常对照组	84.89±19.94##	132.70±3.67**	148.59±4.92**
EV 阳性对照组	59.99±2.47##	135.64±1.81**	156.64±3.75***#
OR 低剂量组	109.62±5.45##	166.34±8.26**	175.01±5.00**
OR 中剂量组	103.29±8.27##	152.36±6.15**	181.12±4.71***#
OR 高剂量组	93.49±20.60##	141.20±4.91**	174.06±1.79***#

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与 24 h 比较; #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$, 与 48 h 比较。

3 讨 论

目前, 雌激素替代疗法已经广泛应用于围绝经期综合征, 但该方法存在诸多的副作用和不良反应。因此, 越来越多的学者把目光转移到中医药对围绝经期综合征的研究、预防及治疗上。围绝经期综合征与卵巢衰老密切相关。前期研究表明^[8], 以哈蟆油为主要成分的复方能延缓卵巢衰老, 缓解围绝经期不适症状。因此深入研究哈蟆油体外研究, 有助于探讨中药延缓卵巢衰老的机制, 为治疗围绝经期卵巢衰老提供确切的研究依据。卵巢颗粒细胞作为卵巢的功能细胞群, 其可通过多种方式如缝隙连接, 自分泌和旁分泌, 维持有利于卵母细胞生长和成熟的微环境。颗粒细胞的增殖、分化、凋亡直接影响着卵泡的发育、排卵、黄体形成以及甾体激素的分泌^[9-10]。因此, 颗粒细胞对于体外深入研究卵巢功能和卵巢衰老的作用机制非常重要。研究者^[11-14]已发现多种方法从卵巢中分离和纯化获得颗粒细胞。

本实验采用 25 日龄雌性 SD 大鼠进行卵巢颗粒细胞体外分离培养, 与成年大鼠相比, 未成年大鼠卵巢颗粒细胞还未接触过内源性促性腺激素的刺激, 因此, 采用孕马血清刺激雌性未成年大鼠, 使之处于动情前期, 获得大量相同发育阶段的颗粒细胞。进一步在前期的实验方法上^[15]优化原代颗粒细胞分离纯化的方法, 采用机械分离方法使颗粒细胞释放, 收集释放出来的卵母细胞和颗粒细胞, 经 40 μm 无菌细胞筛网(只允许颗粒细胞通过)分离颗粒细胞可去除其他杂质的细胞(如卵母细胞)及组织碎片, 在剩余的的组织块中加入胰蛋白酶, 控制消化时间, 避免胰蛋白酶消化的时间过长对颗粒细胞的损伤, 在经 40 μm 无菌细胞筛网分离过筛, 结合低速离心后, 合并两次收集的颗粒细胞。因此, 机械分离结合胰酶消化并通过细胞筛两次分离(即分离、消化、再分离)纯化颗粒细胞, 既能得到数量较多颗粒细胞, 减少对细胞的损伤, 又使杂质细胞减少及提高颗粒细胞存活率和纯度。原代卵巢颗粒细胞经体外预培养 24 h

后, 开始贴壁生长, 48~72 h 之间细胞大量增殖, 生长旺盛。显微镜下观察颗粒细胞形态学特征并用 HE 染色观察细胞结构。镜下观察可见, 颗粒细胞呈多角行或梭行, HE 染色发现核着蓝色, 胞质淡粉色, 细胞形态结构完整。除此之外, 与以往文献报道应用免疫组化染色^[2]对体外大鼠卵巢颗粒细胞鉴定方法的不同, 本实验采用免疫荧光技术, 利用分子标记物 FSHR 鉴别颗粒细胞, FSH 是卵巢分泌的一种重要内调节激素, 直接参与刺激卵泡发育、排卵、黄体生成及甾体激素的合成^[16]。但 FSH 必须与分布于卵巢颗粒细胞中的特异性 FSHR 相结合方能发挥其生理功能。FSHR 为 G 蛋白偶联受体家族的成员, 其主要分布于性腺、输卵管、子宫、卵细胞及移植前胚胎中表达。FSHR 的表达在卵巢对 FSH 起反应的过程中起关键作用^[17]。因此采用免疫荧光化学法检测 FSHR 表达, 发现仅胞质带有绿色荧光, 而对照组没有荧光显示为阴性, 该方法鉴定颗粒细胞简便快速、直观。

本实验在前期的实验基础上^[15], 采用 CCK-8 法比较了不同浓度的哈蟆油含药血清对体外培养大鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响, 采用中药血清药理学方法, 模拟哈蟆油在动物体内的真实作用, 观察其在机体内形成的代谢产物及其诱生的机体内源性物质对体外培养的卵巢颗粒细胞的作用, 避免了其理化性质对实验结果的干扰, 从而更能反映其促进颗粒细胞功能的整体药理效应。但由于血清中含有许多活性成分, 空白血清(即不含任何药物的正常血清)本身亦具有活性, 为了避免空白血清带来的实验误差, 实验过程中必须设立空白血清对照组。研究者认为^[18], 实验设计以不同剂量的药物给予动物, 则取等体积的血清作为不同剂量药物加入体外培养细胞系, 则空白血清对照组可只设 1 组(即加入等体积的空白血清作为对照); 以 1 种剂量的药物给予动物, 以不同浓度体积分数的含药血清加入量作为不同剂量组, 则空白血清对照组应设相应不同加入量的数个对照组。本实验以不同剂量的哈蟆油给予动物灌胃, 同时

设立阳性对照药物戊酸雌二醇,避免了 1 种剂量给予动物,以不同浓度体积分数的含药血清加入量作为不同剂量组,设置多组空白血清对照组,并且通过与阳性对照药物戊酸雌二醇含药血清对比分析,更加深入探讨哈蟆油含药血清对体外培养大鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响。实验结果证实,在一定的时间内,随着浓度增加,哈蟆油对颗粒细胞的促增殖作用越明显,其中作用 48 h,20% 浓度体积分数的哈蟆油含药血清对颗粒细胞的促增殖作用最明显。

哈蟆油促进卵巢颗粒细胞增殖,可能有以下两方面的原因,一方面可能是哈蟆油本身的抗氧化作用对细胞的保护;另一方面也可能是哈蟆油提高了性激素的浓度,而性激素对颗粒细胞的营养及调控作用,延长了卵泡寿命,减少卵泡的闭锁,从而增加卵泡颗粒细胞数目,使卵巢的功能得以总体改善,也进一步增加了内源性雌激素分泌,达到防治围绝经期综合征的目的。因此,哈蟆油如何通过保护卵巢颗粒细胞,延缓卵巢衰老,达到防治围绝经期综合征的目的,这仍需在未来的机制研究中进一步探讨。

参考文献

- [1] 于舒雁,刘会丽,苗明三. 更年期综合征的分子机制及中医药治疗更年期综合征的特点[J]. 中医学报,2012,27(3):338-340.
- [2] 岑妍慧,何国珍,杨美春,等. 大鼠卵巢颗粒细胞体外培养方法探讨[J]. 四川解剖学杂志,2012,20(4):19-21.
- [3] 刘英华,王静,王晓军,等. 大鼠卵巢颗粒细胞培养及分泌产物测定条件的研究[J]. 毒理学杂志,2008,22(5):384-386.
- [4] 梁磊,张绪慧,周毅,等. 哈蟆油胶囊对衰老模型小鼠生殖器官的保护作用[J]. 南方医科大学学报,2008,28(6):982-985.
- [5] 范青红,姚晖,郑红丽,等. 哈蟆油对雌性衰老大鼠子宫组织 p21 和 cyclinD1 基因表达研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2015,17(1):30-32.
- [6] 姚晖,康秀兰,彭荣芳,等. 哈蟆油对雌性衰老大鼠子宫组织 p16 和 cyclinD1 蛋白表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2013,33(8):1825-1828.
- [7] 肖娟,邹静,屠迪,等. Wistar 大鼠卵巢颗粒细胞的分离、培养与鉴定[J]. 中国老年保健医学杂志,2012,10(1):8-11.
- [8] Liang L,Zhang XH, Ji B, et al. Yifuning postpones ovari-

an aging through antioxidant mechanisms and suppression of the Rb/p53 signal transduction pathway[J]. Mol Med Rep,2016,14(1):888-896.

- [9] Sai T,Goto Y, Yoshioka R, et al. Bid and Bax are involved in granulosa cell apoptosis during follicular atresia in porcine ovaries[J]. J Reprod Dev,2011,57(3):421-427.
- [10] 叶摇娜,董晓英,李冬华. 卵巢早衰的颗粒细胞凋亡机制研究进展[J]. 首都医科大学学报,2014,35(3):1-5.
- [11] Cannon JD, Seekallu SV, Vandevort CA, et al. Association of luteinizing hormone receptor gene expression with cell cycle progression in granulosa cells[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab,2009,296(6):E1392-1399.
- [12] Chiu CH, Fei CY, Srinivasan R, et al. Inhibitory effects of epidermal growth factor on progesterone production of ovarian granulosa cells in Tsaiya duck (*Anas platyrhynchos* var. domestica) [J]. Br Poult Sci,2010,51(6):821-827.
- [13] Tian Y, Shen W, Lai Z, et al. Isolation and identification of ovarian theca-interstitial cells and granulosa cells of immature female mice[J]. Cell Biol Int,2015,39(5):584-590.
- [14] Miyoshi T, Otsuka F, Yamashita M, et al. Functional relationship between fibroblast growth factor-8 and bone morphogenetic proteins in regulating steroidogenesis by rat granulosa cells[J]. Mol Cell Endocrinol,2010,325(1/2):84-92.
- [15] 彭娟,邓虹珠,马丹丹,等. 哈蟆油对大鼠卵巢颗粒细胞增殖与分泌的影响[J]. 时珍国医国药,2013,24(3):532-535.
- [16] Wang XL, Wu Y, Tan LB, et al. Follicle-stimulating hormone regulates pro-apoptotic protein Bcl-2-interacting mediator of cell death-extra long(BimEL)-induced porcine granulosa cell apoptosis[J]. J Biol Chem,2012,287(13):10166-10177.
- [17] Fan QR, Hendrickson WA. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor[J]. Nature,2005,433(7023):269-277.
- [18] 黄臣虎,陆茵,高骁君,等. 中药血清药理学研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):266-271.

(收稿日期:2016-11-18 修回日期:2017-01-06)

(上接第 1791 页)

- [11] Khosravi Y, Dieye Y, Poh BH, et al. Culturable bacterial microbiota of the stomach of *Helicobacter pylori* positive and negative gastric disease patients[J]. Scientific World J,2014;610421.
- [12] Mattarelli P, Brandi G, Calabrese C, et al. Occurrence of bifidobacteriaceae in human hypochlorhydric stomach [J]. Microb Ecol Health Dis,2014,25(9):5.
- [13] Dicksved J, Lindberg M, Rosenquist M, et al. Molecular characterization of the stomach microbiota in patients with gastric cancer and in controls[J]. J Med Microbiol, 2009,58(4):509-516.
- [14] Muto M, Hitomi Y, Ohtsu A, et al. Acetaldehyde produc-

tion by non-pathogenic *Neisseria* in human oral microflora; implications for carcinogenesis in upper aerodigestive tract[J]. Int J Cancer,2000,88(3):342-350.

- [15] Väkeväinen S, Tillonen J, Blom M, et al. Acetaldehyde production and other ADH-related characteristics of aerobic bacteria isolated from hypochlorhydric human stomach[J]. Alcohol Clin Exp Res,2001,25(3):421-426.
- [16] 王洪波,李永芳,陈清波,等. 兰索拉唑联合莫沙必利治疗功能性消化不良的疗效观察[J]. 临床内科杂志,2015,32(8):558-559.

(收稿日期:2016-12-07 修回日期:2017-01-25)