

体外培养牛腔前卵泡颗粒细胞的超微结构研究

高志花¹, 周 虚^{2*}, 付永斌³, 王慧文¹, 李秀花¹

(1. 河北北方学院牧工系, 张家口 075131; 2. 中国人民解放军军需大学军事兽医系, 长春 130062;

3. 河北张家口市坝下农科所, 张家口 075131)

摘 要: 透射电镜下, 简易机械法分离得到的腔前卵泡有 1~3 层颗粒细胞, 相邻颗粒细胞间存在明显而广泛的间隙连接, 卵泡基膜完整, 外无卵泡膜。培养过程中超微结构的变化与体内发育腔前卵泡类似。培养 6d 时观察到颗粒细胞增殖现象, 培养 15 d 时, 个别卵泡的内膜细胞开始形成。超微结构研究结果表明, 本培养体系适于小腔前卵泡的体外培养。

关键词: 牛; 腔前卵泡; 体外培养; 颗粒细胞; 超微结构

中图分类号: S823.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)03-0216-05

腔前卵泡在体外培养时是由卵母细胞、颗粒细胞共同组成一个发育单位而生长发育的, 颗粒细胞间以及颗粒细胞与卵母细胞间通过间隙连接进行信息交流和物质交换。只有维持卵泡的完整性, 才能确保卵泡的双重功能, 既为体外卵母细胞提供生长和发育的微环境, 同时对促性腺激素刺激作出反应, 将生长和成熟的信息传递给卵母细胞。在卵母细胞和颗粒细胞间存在着复杂的旁分泌和自分泌调节系统, 如果卵母细胞和颗粒细胞间的对话被消弱, 卵泡发育就停止。Natalia^[1]和孙青原^[2]等认为, 颗粒细胞退化是卵泡退化的前奏, 腔前卵泡也是如此, 往往是颗粒细胞先行退化。由于颗粒细胞不能向卵母细胞输送营养及信息因子, 卵母细胞微绒毛退化, 从而引起卵母细胞闭锁。无论是体内还是体外, 颗粒细胞的存在对卵母细胞的发育都是不可缺少的。研究腔前卵泡体外发育过程中颗粒细胞的超微结构可为客观评定卵泡的发育状况提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 卵巢

牛卵巢采自长春市清真民族食品公司, 从刚屠宰的母牛腹腔中取出卵巢, 放入盛有 30~37℃, 含 200 IU/mL 青霉素和 200 μg/mL 链霉素的生理盐

水的保温瓶中 2 h 之内运回实验室。将卵巢去韧带、系膜等结缔组织, 并用 70% 的乙醇浸润 10~15 s 后, 转入无菌条件下, 再用 PBS 清洗 3 次, 采用皮肤移植刀切割、剪碎、过滤镜下直接检卵法即简易机械法^[3]分离直径约 100 μm 腔前卵泡。

1.2 牛腔前卵泡的培养和处理

培养液为含碳酸氢钠的 McCoy's 5a 培养液+ 20 mmol/L HEPES+ 100 IU/mL 青霉素+ 0.1g/L 链霉素+ 3 mmol/L L-谷氨酰胺+ 0.1% BSA+ 29 μg/L 睾酮+ 2.5 mg/L 转铁蛋白+ 4 μg/L 硒。腔前卵泡培养于 96 孔培养板, 每孔 1 个卵泡, 250 μL 培养液。培养条件为 5% CO₂、饱和湿度、37℃。每 3 d 换液 1 次。

1.3 透射电镜样品的制备

卵泡经 PBS (pH 7.4) 洗涤后, 在 2.5% 戊二醛中, 4℃ 下固定 2 h 以上。经 PBS 充分洗净, 1% 锇酸固定 2 h, 然后用梯度乙醇逐级脱水各 10 min, 用 100% 丙酮置换 10 min, 再放入 1:1 的丙酮与 Epon-812 中浸透 1 h; 纯 Epon-812 浸透 12 h。最后将样品用牙签挑到倒好包埋剂的包埋板上, 放入聚合器内聚合 (37℃、45℃、60℃ 各 24 h)。聚合的包埋块在实体显微镜下修成小梯形, 用 LKB-V 型超薄切片机切片。醋酸双氧铀和柠檬酸铅各染色 10 min, 样品在 JEL-1200 II 电镜下观察和拍照。

2 结 果

2.1 腔前卵泡颗粒细胞超微结构

用简易机械法分离得到的腔前卵泡, 其卵母细胞由 1~3 层颗粒细胞包围, 颗粒细胞外有由胶原纤

收稿日期: 2003-12-01

基金项目: 吉林省科技发展项目(20010537); 教育部留学回国人员启动基金项目

作者简介: 高志花(1967-), 女, 河北张家口人, 硕士, 从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: gaozhihua1995@sina.com

* 通讯作者: 周 虚, E-mail: xzhou65@vip.sina.com

维构成的基底膜, 为单层或多层层叠结构, 单层基底膜完整 连续地包绕颗粒细胞, 起伏不大(图 I-1), 多层基底膜则层叠起伏, 形成褶皱结构, 并有小的突起伸入颗粒细胞质膜内, 基底膜下胞质中有由内质网形成的同心圆排列的环状结构。颗粒细胞间有明显的间隙连接相联系, 胞质内细胞器清晰可见, 均匀分布, 较为稀疏, 线粒体多为圆形, 嵴不发达, 少数为椭圆形, 双层膜, 板状嵴, 嵴较为发达, 基质电子密度中等(图 I-2); 细胞内常有空泡小规模聚集或均匀散在分布, 近核处有时可见髓样结构(图 I-3); 粗面型内质网 RER 常与线粒体相伴, 内质网时而又与空泡相结合, 包绕空泡卷曲呈开口或闭合环状(图 I-4)。

2.2 体外培养 6 d 腔前卵泡颗粒细胞

基底膜变致密。颗粒细胞数量增多, 刚开始生长的颗粒细胞核较小, 胞质中尚无可见细胞器, 核及胞质内有小的空泡(图 I-1)。颗粒细胞间间隙连接变得更为清晰可见, 近核处有板层排列的环状片层分布, 一般为 4~8 层(图 I-2)。颗粒细胞胞质内细胞器略有增多, 分布均匀, 外包单层膜的囊泡在胞质中均匀分布, 但细胞器密集的区域分布较少(图 I-3)。偶见胞质中区有 RER 成群聚集, 高度盘绕呈网状结构(图 I-4)。

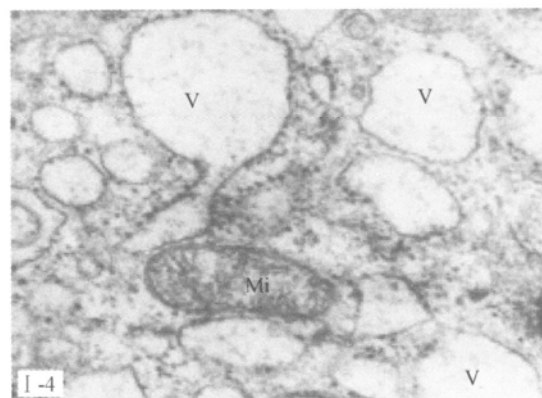
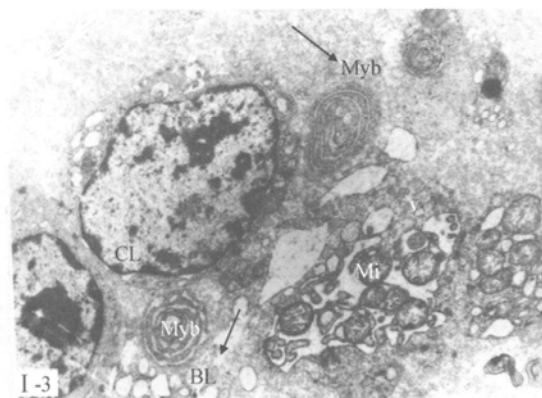
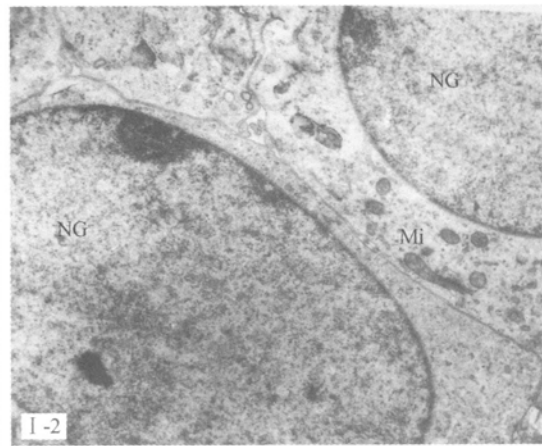
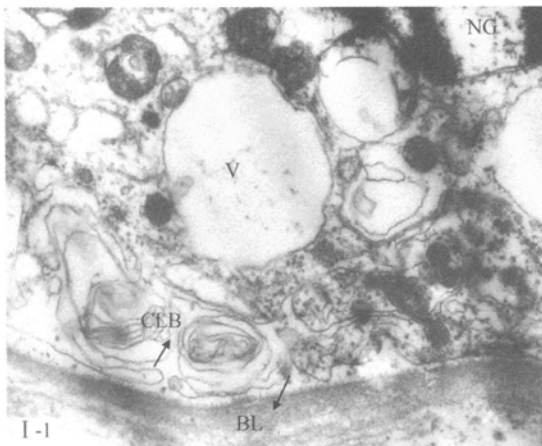
2.3 培养 15 d 腔前卵泡颗粒细胞

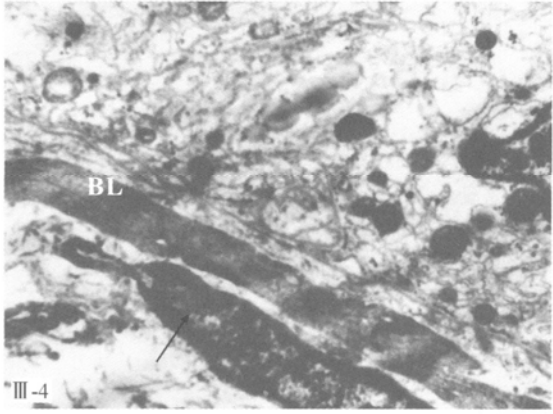
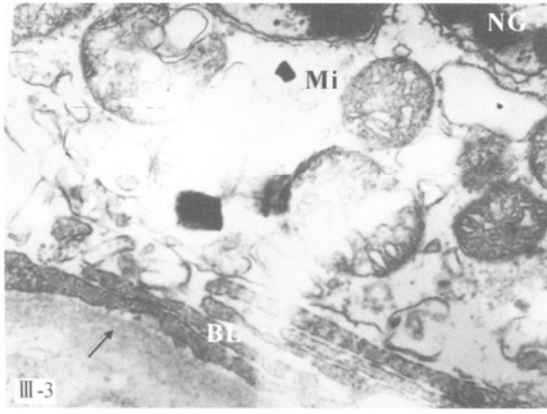
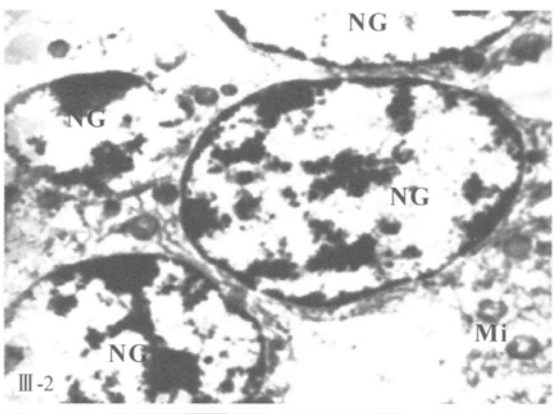
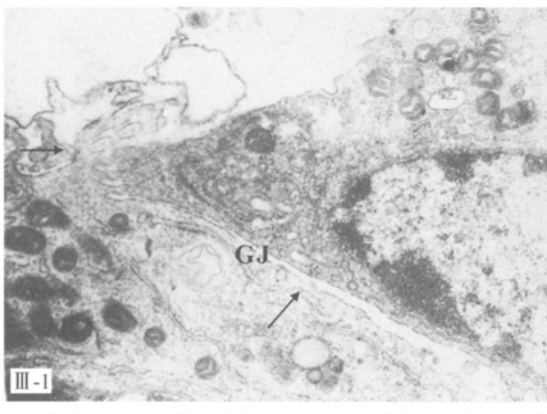
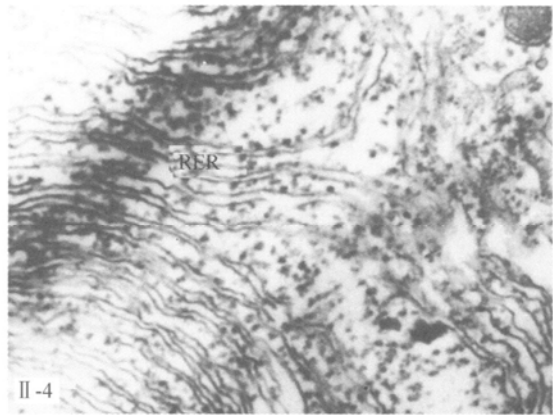
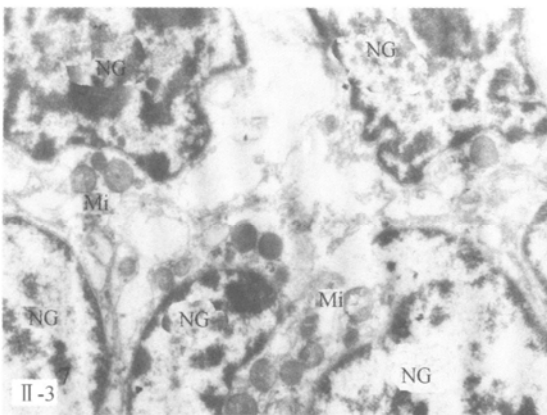
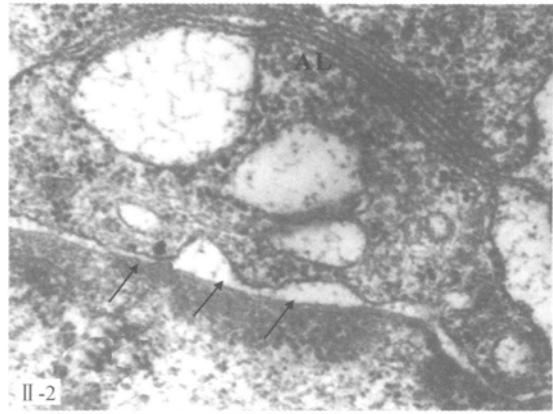
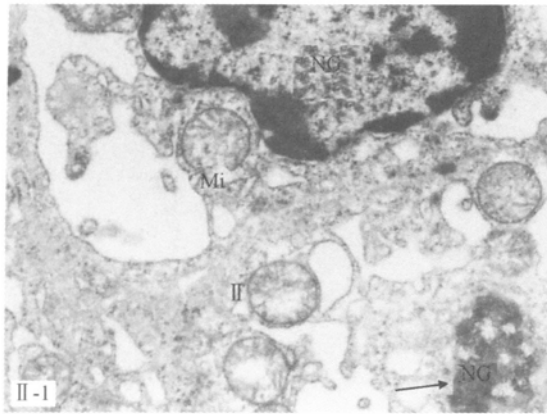
此期颗粒细胞体积及数量均有增加, 多为 2~4 层(图 IH1), 颗粒细胞间联系仍然很紧密, 相邻颗粒细胞间, 有的部位二者伸出突起指状镶嵌, 有的部位质膜间以间隙连接方式建立起通讯联系(图 IH2); 卵泡膜层发生了大的变化, 有些卵泡基底膜萎缩变薄, 表现为退化(图 IH3), 而另一些仍然保持致密状态, 还有个别卵泡开始有内膜细胞出现, 可见内膜细胞长形、条状的细胞核, 胞质较少, 细胞器尚未发育(图 IH4)。

3 讨论

3.1 卵泡基底膜的结构和功能以及卵泡膜层的变化与卵泡发育的关系

卵泡中卵泡颗粒层均有基底膜包围, 它起着影响颗粒细胞扩增和分化的作用^[4,5]。健康卵泡的基底膜可阻止毛细血管, 白细胞, 神经突起等进入颗粒细胞小室, 直到排卵时基底膜退化; 它还可能起着阻挡大分子蛋白, 如低密度脂蛋白(LDL)进入卵泡腔的作用。在体外培养时它起着保护卵泡形态, 维持卵泡与细胞外基质黏附的功能。基底膜的存在对卵泡进一步的体外培养有着至关重要的作用。





图版 I 培养前腔前卵泡颗粒细胞

图 I-1 卵泡基底膜(BL)与邻近颗粒细胞(NG)。示颗粒细胞内空泡(V)及基底膜下内质网(ER)形成的同心圆排列的环层结构(6 000×)

图 I-2 颗粒细胞间隙连接(GJ)明显,胞质内细胞器较少,但分布均匀,电子密度低(4 000×)

图 I-3 相邻颗粒细胞。示颗粒细胞(NG)近核处聚集的线粒体(Mi)、空泡(V)及髓样结构(Myb)(5 000×)

图 I-4 胞质中线粒体。示线粒体(Mi)与空泡相伴,空泡由 RER、SER 环状闭合而成(30 000×)

图版 II 培养 6d 腔前卵泡颗粒细胞

图 II-1 刚开始生长的颗粒细胞。核小,胞质内无可见细胞器(5 000×)

图 II-2 颗粒细胞间间隙连接(GJ),及颗粒细胞内板层式环层板(AL)(30 000×)

图 II-3 颗粒细胞紧密相邻,胞质内囊泡及其它细胞器均匀分布(5 000×)

图 II-4 大量内质网(RER)卷屈盘旋,形成网状结构内质网区(12 000×)

图版 III 培养 15 d 腔前卵泡颗粒细胞

图 III-1 多层颗粒细胞联系紧密,可见间隙连接(GJ),颗粒细胞中胞核大而胞质少(4 000×)

图 III-2 相邻颗粒细胞胞膜相接处形成间隙连接及颗粒细胞突起指状镶嵌(10 000×)

图 III-3 颗粒层外围基底膜(BL)萎缩(15 000×)

图 III-4 基底膜(BL)外有内膜细胞出现,膜细胞核为长条状,胞质少,细胞器未发育(5 000×)

Fig. I Granulosa cells in preantral follicles collected freshly

Fig. I-1 Follicular basal lamina (BL) and its neighbouring granulosa cell. Note the vesicles (V) and the concentric lamellar bodies (CLB) from endoplasmic reticulum (ER) beneath the BL (6 000×)

Fig. I-2 Gap junction (GJ) among the granulosa cells were evident. The organelles were fewer, but distributed evenly, and with low electron dense in the cytoplasm (4 000×)

Fig. I-3 The neighbouring granulosa cells. Showing aggregated mitochondria (Mi), the vesicles, and the myelin bodies (Myb) near nucleus of the granulosa cell (NG) (5 000×)

Fig. I-4 Mitochondria were accompanied by rough endoplasmic reticulum (RER) or SER, which fused to ring shaped and existed as vesicles (30 000×)

Fig. II Granulosa cells in preantral follicles at day 6 of culture

Fig. II-1 A granulosa cell newly began to grow. Its nucleus was very small, and no organelle was visible in the cytoplasm (5 000×)

Fig. II-2 Gap junction (GJ) between adjacent two granulosa cells, Showing Annuli Lamellae (AL) in one granulosa cell cytoplasm (30 000×)

Fig. II-3 Granulosa cells connected closely. The organelles distributed evenly in the cytoplasm (5 000×)

Fig. II-4 Numerous RER gathered in central cytoplasm region, for forming a web-like structure of RER zone (12 000×)

Fig. III Granulosa cells of preantral follicles at Day 15 of culture

Fig. III-1 Multiple layers of granulosa cells connected closely. The gap junctions (GJ) presented among granulosa cells that were with larger nucleus and fewer cytoplasm (4 000×)

Fig. III-2 Longer gap junction presented where the membranes of adjacent granulosa cells contacted. The granulosa cells process expanded and penetrated into each other to form a finger-like interlock (10 000×)

Fig. III-3 Follicular basal lamina (BL) in close contact with the basal granulosa cells wrinkled (15 000×)

Fig. III-4 Follicular interna theca occurred surrounding the basal lamina. The nucleus of the theca cell was long in shape and few organelle was observed in the cytoplasm (5 000×)

超微结构显示,采用简单机械分离方法得到的绝大多数为早期次级阶段的腔前卵泡,这些卵泡有一层完整的由胶原纤维构成的天然基底膜,此时没有卵泡内膜存在。体外培养 6 d 后,基底膜变致密,仍无卵泡膜出现;培养至 15 d 时,卵泡膜层发生了变化,有些卵泡基底膜萎缩,变得薄而脆弱,与颗粒

层的结合不再紧密,我们认为这是卵泡开始退化的标志之一;还有一些卵泡中观察到基底膜的外侧有长条状的内膜细胞核,及少量细胞质生成。卵泡内膜被认为是卵泡发育过程中由周围间质细胞形成的,推测培养的 15 d 是卵泡内膜细胞开始形成的时间,该期是体外培养卵泡出现明显分化的阶段,一部

分卵泡发生闭锁,在生长的卵泡中有一些则进入新的发育阶段。由此提议,鉴于卵泡所处的发育阶段有变化,卵泡进一步体外培养的营养需求可能会发生变化,因此在培养 15 d 后,培养体系中添加成分应做适当调整,以尽可能模拟卵泡体内生长的营养和激素环境。利用不同的培养体系分阶段培养不同发育进程的腔前卵泡有可能取得较好的培养效果,这已成为目前小腔前卵泡体外培养研究的趋势^[6]。

3.2 卵泡颗粒细胞的变化

超微结构研究显示,卵泡颗粒细胞在体外培养过程中不断增殖、分化,颗粒细胞层数增加,细胞器形态变化不大,但数量有所增加,细胞内基质电子密度降低,细胞间间隙连接越来越清晰,我们在培养 6 d 的腔前卵泡中观察到了颗粒细胞的增殖。培养 15 d 后颗粒细胞间联系仍然很紧密,相邻颗粒细胞间,有的部位二者伸出突起指状镶嵌,有的部位质膜间以间隙连接方式建立起通讯联系,完成细胞间的物质和信息交流。腔前卵泡阶段卵泡生长在很大程度上是颗粒细胞的生长和增殖,因为此时卵母细胞的生长极为缓慢。体外培养过程中腔前卵泡及其卵母细胞的直径变化,以及超微结构的观察都有力地证实了这一点。

参考文献:

- [1] Danilovich N A, Bartke A, Winters T A. Ovarian follicle apoptosis in bovine growth hormone transgenic mice[J]. *Biology of Reproduction*, 2000, 62: 103~107.
- [2] 孙青原,谭景和,杨增明. 山羊卵母细胞闭锁的超微结构研究[J]. *兽医大学学报*. 1993, 13(6): 129~132.
- [3] 高志花,周 虚,高庆华. 牛腔前卵泡的简易机械分离方法[J]. *中国草食动物*. 2003, 23(4): 1~5.
- [4] Richardson M C, Davies D W, Watson R H, et al. Cultured human granulosa cells as a model for corpus luteum function: relative roles of gonadotrophine and low density lipoprotein studied under defined culture condition[J]. *Human Reproduction*, 1992, 7: 12~18.
- [5] Figueiredo J R, Hulshof S C J, Van Den Hurk R, et al. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro* [J]. *Theriogenology*, 1994, 41: 1333~1346.
- [6] Eppig J J, O'Brren M. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles [J]. *Biol Reprod* 1996, 54: 197~297.

Ultrastructure Studies on the Granulosa Cell of Bovine Preantral Follicles Cultured *in vitro*

GAO Zhi-hua¹, ZHOU Xu^{2*}, FU Yong-bin³, WANG Hu-wen¹, Li Xiu-hua¹

(1. Department of Animal Husbandry and Engineering, Hebei North University, Zhangjiakou 075131, China; 2. Faculty of Animal Science and Technology, The Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China; 3. Baxia Agricultural Institute of Zhangjiakou, Zhangjiakou 075131, China)

Abstract: Bovine preantral follicles (about 100 μ m in diameter) were cultured *in vitro* in a serum-free system for 15 day. The transmission electron microscope analysis showed that the preantral follicles isolated mechanically were 1 to 3 layers of granulosa cells tightly enclosing the oocyte and intact basement membrane without theca cell. There are obvious and intensive gap junctions between the adjacent granulosa cells. The ultrastructural characteristics of the preantral follicles isolated freshly or cultured *in vitro* were mostly similar to those presented *in situ*. The proliferating of granulosa cells was observed on the sixth day of culture. The theca interna cell emerged in a few preantral follicles on the 15th day of culture. These results showed that the culture system is adapted for smaller preantral follicles' growing.

Key words: bovine; preantral follicles; cultured *in vitro*; granulosa cells; ultrastructure

* Corresponding author