

# 奶牛卵丘细胞无血清体外培养液的优化

王争光, 俞颂东\*, 许梓荣

(浙江大学动物分子营养学教育部重点实验室, 杭州 310029)

**摘要:** 采集奶牛卵巢表面卵泡中的卵丘-卵母细胞复合物, 通过胰蛋白酶消化获得卵丘细胞, 分别利用对照组 DMEM/F12 培养液和 4 个试验组 McCoy's5a 培养液对卵丘细胞进行原代及传代培养。试验 1 组用 McCoy's5a 基础培养液, 试验 2 组在 McCoy's5a 基础培养液中添加  $29 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的睾酮, 试验 3 组同时添加  $29 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的睾酮和  $15 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的绿茶多酚, 试验 4 组在第 3 组基础上添加转铁蛋白 ( $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、硒 ( $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和胰岛素 ( $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 构建成优化培养液 (Optimized McCoy's5a)。结果表明, 试验 4 组优化培养液所培养的卵丘细胞的形态和增殖规律符合正常细胞的一般规律, 染色体核型正常, 其细胞内 SOD、GSH 含量及冷冻解冻后的存活率均显著高于对照组, 优化培养液可以代替含血清的 DMEM/F12 培养液用于奶牛卵丘细胞的体外培养。

**关键词:** 卵丘细胞; McCoy's5a 培养液; 体外培养

中图分类号: S823.1; Q813.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)06-0934-05

## Optimization of Serum-free Media for Culturing *in vitro* of Cow Cumulus Cells

WANG Zheng-guang, YU Song-dong\*, XU Zi-rong

(Key Laboratory for Animal Molecular Nutrition of Ministry of Education, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** The cumulus cells were obtained by digesting cumulus-oocyte complexes with trypsin solution, and were cultured in DMEM/F12 media (control group) or McCoy's5a media (four treatment groups) during primary culturing and subculturing. The McCoy's5a were utilized for media in treatment 1. The media for treatment 2 were McCoy's5a media containing  $29 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  testosterone. Testosterone ( $29 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) and green tea polyphenols ( $15 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) were supplemented together into McCoy's5a media in treatment 3. In treatment 4, optimized McCoy's5a media were utilized for culturing cumulus cells. Optimized McCoy's5a media were supplemented with transferrin, selenium and insulin based on media in treatment 3. The results show that the cumulus cells cultured with optimized McCoy's5a media are normal in morphological characteristics, growth speed and karyotype. The contents of SOD and GSH and survival rate following thawing in cumulus cells cultured with optimized McCoy's5a media are significant higher than that in cumulus cells of control. The optimized McCoy's5a media with appropriate concentration of transferrin, selenium and insulin can instead of DMEM/F12 media containing serum to culture *in vitro* cumulus cells of cow.

**Key words:** cumulus cells; McCoy's5a medium; culture *in vitro*

研究证实将卵丘细胞作为胚胎的共培养细胞可克服早期胚胎体外发育阻滞, 提高其体外发育能力。

更为重要的是, 以卵丘细胞作为体细胞核移植时的供核细胞, 所构建的重构胚有较高的卵裂率和囊胚

收稿日期: 2008-05-14

基金项目: 中国博士后科学基金项目(20070421206); 浙江省教育厅科研项目(N20080202)

作者简介: 王争光(1979-), 男, 河南周口人, 博士, 讲师, 主要从事胚胎工程技术研究, E-mail: xueyanduan@163.com

\* 通讯作者: 俞颂东, E-mail: sdyu@zju.edu.cn

发育率<sup>[1-3]</sup>,其原因可能是卵丘细胞上存在着与卵母细胞紧密联系的胞质微绒毛桥,它有助于供体核与受体胞质间相关因子的交换<sup>[4]</sup>。因此,卵丘细胞在家畜胚胎体外生产技术特别是体细胞核移植技术中有着广泛的应用前景。

目前,传统的卵丘细胞体外培养液一般都加入血清,但无血清培养的试验结果比有血清培养更接近体内真实情况,避免血清培养时许多未知因素的干扰。此外,体外培养的卵丘细胞缺少母体的抗氧化体系,并且不可避免地受到光线和培养液中金属离子的影响,使得体外培养的卵丘细胞内 ROS 数量增加,以这样的卵丘细胞作为核供体细胞或胚胎共培养细胞,势必导致胚胎氧化应激损伤,从而影响胚胎的新陈代谢、信号传递、表观重编程调控、凋亡以及囊胚形成<sup>[5]</sup>。前期的研究已证实,在含血清的卵丘-卵母细胞复合物培养体系中加入绿茶多酚可显著降低细胞内活性氧含量<sup>[6]</sup>,但尚未证实无血清条件下,绿茶多酚对卵丘细胞体外培养的影响。本研究旨在以 McCoy's5a 培养液为基础优化奶牛卵丘细胞无血清培养体系,观察该培养体系对卵丘细胞形态学变化的影响,为奶牛体细胞核移植提供理想的供核细胞,为奶牛胚胎体外培养提供良好的共培养体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

所有试剂除特殊说明外,均购自 Sigma 公司。卵巢保存液和卵泡分离液为含 20 mmol · L<sup>-1</sup> Hepes、300 IU · mL<sup>-1</sup> 青霉素 (Gibco)、300 μg · mL<sup>-1</sup> 链霉素 (Gibco) 的 DPBS 液。卵丘细胞基础培养液为含青霉素 (100 IU · mL<sup>-1</sup>)、链霉素 (100 μg · mL<sup>-1</sup>)、L-谷氨酰胺 (3 mmol · L<sup>-1</sup>)、BSA (0.1%) 和 FSH (1 μg · mL<sup>-1</sup>) 的 McCoy's5a (Gibco) 培养液。

### 1.2 卵丘细胞的原代培养

屠宰场获取卵巢,用注射器抽吸卵巢表面直径为 2~6 mm 卵泡中的卵泡液,在实体镜下用玻璃吸管收集卵丘-卵母细胞复合物 (Cumulus-oocyte complexes, COCs)。用卵泡分离液清洗 COCs 2~3 遍后,加入适量 0.25% (w/v) 胰蛋白酶消化液室温消化。当大部分卵丘细胞脱离卵母细胞后,加入含血清的 DMEM/F12 培养液终止消化,用玻璃吸管

吸出卵母细胞,剩余液体装入 10 mL 离心管,500 × g,离心 5 min,弃去上清液。按照试验设计向离心管中加入相应培养液重悬沉淀,细胞计数,调整细胞密度为 1 × 10<sup>6</sup> /mL,分别接种于培养瓶中,于 38.5 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每日观察细胞的生长情况,每 2 d 换培养液 1 次。

### 1.3 试验设计

将采集的卵丘细胞分为 5 组,对照组用含血清的 DMEM/F12 培养液培养;试验 1 组用上述 McCoy's5a 基础培养液进行原代培养,试验 2 组卵丘细胞培养液中添加 29 ng · mL<sup>-1</sup> 的睾酮,试验 3 组卵丘细胞培养液中添加 29 ng · mL<sup>-1</sup> 的睾酮和 15 μmol · L<sup>-1</sup> 的绿茶多酚,试验 4 组卵丘细胞培养液在第 3 组基础上添加转铁蛋白 (5 μg · mL<sup>-1</sup>)、硒 (5 ng · mL<sup>-1</sup>) 和胰岛素 (10 μg · mL<sup>-1</sup>),构建成优化培养液 (Optimized McCoy's5a),这 3 种物质用 ITS 溶液 (100 ×) 添加。

### 1.4 卵丘细胞的传代培养

待细胞铺满培养瓶底后,吸出瓶内的培养液。用 Hanks 液清洗 2 遍后加入胰蛋白酶消化液,使消化液浸没细胞 2~3 min,当在显微镜下看到大部分细胞收缩脱壁后,加入相应培养液终止消化,收集消化液,离心后用相应培养液悬浮,置 38.5 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱培养。

### 1.5 SOD 和 GSH 含量测定

选择对照组和试验组传至第四代的卵丘细胞,参照试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 的操作说明,采用黄嘌呤氧化酶法,利用分光光度计检测细胞内过氧化物歧化酶 (Superoxide dismutases, SOD) 含量;采用分光光度计比色法检测细胞内谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 含量。

### 1.6 卵丘细胞的冷冻保存及解冻后存活率的检测

参照前期报道的方法<sup>[7]</sup>,并略加修改。复苏后存活率的检测采用 0.5% 的台盼蓝染色液,将 1 份细胞悬液与 2 份台盼蓝染色液混匀,2 min 后于倒置显微镜下观察计数。透亮而不着色的为活细胞,染成蓝色的为死细胞。

### 1.7 卵丘细胞的核型分析

按照徐小明等<sup>[8]</sup>的方法进行,有所改进。

### 1.8 数据处理

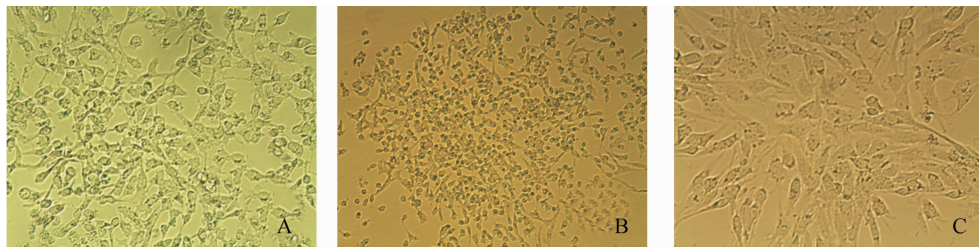
试验数据使用 SAS 软件 (6.13 版) 进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 卵丘细胞的生长特征

培养在对照组 DMEM/F12 培养液中的卵丘细胞,一般第 3~8 天细胞生长迅速,第 9 天细胞铺满培养瓶底,形状多为梭形、圆形或不规则三角形(图

1 A)。试验 1、2、3 组卵丘细胞生长速度与对照组无显著差异。试验 4 组卵丘细胞生长速度略快于对照组和其他试验组,第 3~7 天细胞处于指数生长期(图 1 B),第 8 天细胞铺满培养瓶底(图 1 C),形态与对照组卵丘细胞相似。



A. DMEM/F12 培养液培养第 9 天的卵丘细胞 ( $\times 100$ ); B. 优化 McCoy's5a 培养液培养第 4 天的卵丘细胞 ( $\times 50$ ); C. 优化 McCoy's5a 培养液培养第 8 天的卵丘细胞 ( $\times 200$ )

A. Cumulus cells cultured in DMEM/F12 media on 9 d ( $\times 100$ ); B. Cumulus cells cultured in optimized McCoy's5a media on 4 d ( $\times 50$ ); C. Cumulus cells cultured in optimized McCoy's5a media on 8 d ( $\times 200$ )

图 1 奶牛卵丘细胞的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of cow cumulus cells

### 2.2 不同培养液对卵丘细胞内 SOD 和 GSH 含量的影响

从表 1 可以看出,试验 1、2 组卵丘细胞内 SOD 和 GSH 含量与对照组无显著差异,而试验 3、4 组卵丘细胞内 SOD 和 GSH 含量均显著高于对照组和试验 1、2 组 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 不同培养液对卵丘细胞染色体核型的影响

由表 2 可知,4 个试验组卵丘细胞中具有正常染色体数目细胞的比例与对照组无显著差异,均为 90% 左右,说明二倍体细胞占优势,所培养的卵丘细胞符合体细胞核移植的供核细胞和早期胚胎体外培养的共培养细胞的基本染色体核型要求。

表 1 不同培养液对奶牛卵丘细胞内 SOD 和 GSH 含量的影响

Table 1 Effects of different media on content of SOD and GSH in cow cumulus cells

组别 Group	SOD/ ( $U \cdot mg^{-1}$ protein)	GSH/ ( $\mu g \cdot 10^{-6}$ )
对照组 Control	$30.1 \pm 1.5^a$	$0.47 \pm 0.02^a$
试验 1 组 Treatment 1	$28.4 \pm 2.0^a$	$0.51 \pm 0.01^a$
试验 2 组 Treatment 2	$31.7 \pm 1.1^a$	$0.45 \pm 0.01^a$
试验 3 组 Treatment 3	$42.5 \pm 1.7^b$	$0.69 \pm 0.02^b$
试验 4 组 Treatment 4	$43.0 \pm 2.3^b$	$0.71 \pm 0.01^b$

同一列中不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ),试验重复 4 次  
Different superscripts indicate significant differences between groups within column ( $P < 0.05$ ),  $n = 4$

表 2 不同培养液对卵丘细胞染色体核型的影响

Table 2 Effects of different media on karyotype of cow cumulus cells

组别 Group	分析的细胞总数目 No. of cells	有正常染色体的细胞数目 No. of cells with normal karyotype	正常比例/% (means $\pm$ SD)
对照组 Control	49	45	$91.8 \pm 3.4$
试验 1 组 Treatment 1	46	41	$89.2 \pm 1.7$
试验 2 组 Treatment 2	48	43	$90.0 \pm 4.5$
试验 3 组 Treatment 3	45	41	$91.1 \pm 3.9$
试验 4 组 Treatment 4	41	37	$90.3 \pm 5.2$

## 2.4 不同培养液对冷冻保存的卵丘细胞解冻后存活率的影响

由表 3 可知,培养在 McCoy's5a 基础培养液中的卵丘细胞(试验 1 组),冷冻解冻后的细胞存活率显著低于对照组( $P < 0.05$ ),而单独添加睾酮(试验 2 组)并没有提高解冻后细胞存活率。培养在同时

含睾酮和绿茶多酚的 McCoy's5a 培养液中的卵丘细胞(试验 3 组),其冷冻解冻后的细胞存活率与对照组无显著差异( $P > 0.05$ ),在第 3 组基础上进一步添加转铁蛋白、硒和胰岛素,卵丘细胞的存活率在 4 个试验组中达到最高( $P < 0.05$ )。

表 3 不同培养液对冷冻保存的卵丘细胞解冻后存活率的影响

Table 3 Effects of different media on survival rate of cow cumulus cells following thawing

	对照组	试验 1 组	试验 2 组	试验 3 组	试验 4 组
	Control	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4
细胞存活率/%					
Survival rate(means $\pm$ SD)	62.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	51.3 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	52.8 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	61.7 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	73.1 $\pm$ 3.4 <sup>c</sup>

同一行中不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),试验重复 4 次

Different superscripts indicate significant differences between groups within row ( $P < 0.05$ ),  $n=4$

## 3 讨 论

通过添加适量的睾酮、转铁蛋白、胰岛素、硒和绿茶多酚,本研究建立了一种不含血清的 McCoy's5a 优化培养液。研究结果证实,该优化培养液可代替含血清的 DMEM/F12 培养液用于卵丘细胞的体外培养。与对照组相比,McCoy's5a 优化培养液培养的卵丘细胞,其细胞内 SOD、GSH 含量及冷冻解冻后的存活率均显著高于对照组。

高庆华等<sup>[9]</sup>的研究证实,McCoy's5a 无血清培养时,卵丘细胞的增生不明显,即使长期培养(144 h),24 孔板的单孔密度很少超过  $10^6$  个,除高密度接种的抑制原因外,缺乏生长因子或生长因子活性低是重要的影响因素。以前的研究已表明,利用无血清培养液体外培养卵丘细胞时,需添加一定剂量的胰岛素和 IGF-I 才可以明显地促进卵丘细胞的增生<sup>[10]</sup>。本试验结果也证实在无血清的 McCoy's5a 培养液中加入适量的 FSH 和胰岛素可促进卵丘细胞的增殖。FSH 和胰岛素促进卵丘细胞的增殖可能与 2 种物质提高了卵丘细胞合成  $E_2$  的能力有关。Silva 等<sup>[11]</sup>的研究结果也证实,生理浓度的 FSH 单独或联合胰岛素均可刺激卵丘细胞分化和促进  $E_2$  的合成能力。但在无血清培养条件下,过高浓度的 FSH 反而会降低卵丘细胞  $E_2$  的合成能力,且高浓度的 FSH 还会产生异相作用,导致卵丘细胞黄体化<sup>[12]</sup>。绿茶多酚具有强的抗氧化活性,在其他细胞中已证实可提高细胞内抗氧化酶活力,因此,用优化

的 McCoy's5a 培养液培养的卵丘细胞内 SOD、GSH 含量的增加可能与绿茶多酚的抗氧化活性有关,但其确切的作用机理还需要进一步研究。

本研究利用优化的 McCoy's5a 培养液,对卵泡卵丘细胞进行了原代及传代培养,分析培养的卵丘细胞的形态、增殖规律等,均符合正常细胞的一般规律。所获得的卵丘细胞培养至 4 代时,绝大多数细胞染色体数目为 30 对,与实际奶牛染色体数相同,说明本试验所培养细胞的染色体核型是正常的,染色体没有发生倍型增加或丢失,试验采用的细胞培养方法和传代代数不会对细胞造成大的遗传性质改变,培养的细胞核型正常,可以作为体细胞核移植的供体细胞。更为重要的是,用 McCoy's5a 优化培养液培养的卵丘细胞内 SOD、GSH 含量显著高于对照组卵丘细胞,因此用于体细胞核移植的供核细胞和早期胚胎体外培养时的共培养细胞,有利于减少胚胎细胞内活性氧自由基的数量,从而改善胚胎体外发育。

## 参考文献:

- [1] ZHANG D F, WANG Y, CHEN Y, et al. Development *in vitro* in reconstitution of embryo from porcine somatic cell nuclear transfer [J]. *Dev Reprod Biol*, 2002, 11(1): 14-18.
- [2] BAGUISI A, BEHBOODI E, MELICAN D T, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(5): 456-461.
- [3] WAKAYAMA T, PENY A C, ZUCCOTTI M, et al.

- Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei [J]. *Nature*, 1998,394(6691):369-374.
- [4] DE PAZ P, SANCHEZ A J, DE LA FUENTE J, et al. Ultrastructural and cytochemical comparison between calf and cow oocytes [J]. *Theriogenology*, 2001,55(5):1107-1116.
- [5] WRENZYCKI C, HERRMANN D, LUCAS-HAHN A, et al. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2005,17(1):23-35.
- [6] WANG Z G, XU Z R, YU S D. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by treatment with green tea polyphenols during *in vitro* maturation of oocytes [J]. *Anim Reprod Sci*, 2007,100(1):22-31.
- [7] 王争光, 许梓荣, 俞颂东, 等. 不同培养体系对胎牛成纤维细胞体外培养的影响 [J]. 中国畜牧杂志, 2007, 43(1):14-16.
- [8] 徐小明, 窦忠英, 华进联, 等. 牛胎儿成纤维细胞的分离与体外培养 [J]. 中国畜牧杂志, 2004, 40(10):18-21.
- [9] 高庆华, 周 虚, 王春清, 等. 促卵泡激素和胰岛素对牛卵泡颗粒细胞长期培养的影响 [J]. 中国兽医学报, 2006, 26(4):442-447.
- [10] GUTIERREZ C G, CAMPBELL B K, WEBB R, et al. 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(3):608-616.
- [11] SILVA J M, PRICE C A. Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells *in vitro* [J]. *Biol Reprod*, 2000, 62(1):186-191.
- [12] SHORES E M, PICTON H M, HUNTER M G, et al. Differential regulation of pig theca cell steroidogenesis by LH, insulin-like growth factor I and granulosa cells in serum-free culture [J]. *J Reprod Fertil*, 2000,118(2):211-219.

## 动物疫情速递

### 安哥拉发生口蹄疫

2009年6月3日,安哥拉 Antonio Jose 博士向 OIE 通报了口蹄疫疫情。疫情始于2009年2月27日,于3月5日确诊。此次疫情是临床发病,病原是 SAT 2 型口蹄疫病毒,感染动物是牛,依靠临床和实验室检测作出诊断,Onderstepoort 兽医研究所(OIE 参考实验室)的抗体检测 ELISA 结果为阳性。疫区位于宽多库邦戈省 Rivungo 地区 Luiana 村,有易感牛 25 000 头,病例 250 例,死亡 30 头,扑杀 22 头。感染来源尚不清楚,可能来自接触野生动物或非法的动物移运。安哥拉采取的控制措施有国内限制移运、区域化和染疫场区消毒;同时未禁止免疫,未对动物进行治疗;即将采取紧急免疫措施。安哥拉上一次发生口蹄疫是 1974 年。

### 挪威发生 *Bonamia ostreae* 感染

2009年6月5日,挪威 Keren Bar-Yaacov 博士向 OIE 通报了 *Bonamia ostreae* 感染情况。疫情始于2009年6月4日,于6月5日确诊。此次疫情中感染动物未出现临床症状,依靠实验室手段检出,法国的海洋开发研究院(IFREMER,OIE 参考实验室)的 real-time PCR 结果为阳性。疫区位于东阿格德尔 Langestrand 沿海地区,水体为咸水,采取的是开放式生产系统。感染群体为野生平牡蛎(*Ostrea edulis*),发病率和死亡率均为 0.100 000 001 490 12%,有易感牡蛎 1 000 只,1 例病例,1 例死亡,未予扑杀或销毁。感染来源尚不清楚。至通报时,挪威尚未采取控制措施,禁止免疫,未对动物进行治疗;准备施行国内限制移运、区域化、在区封锁或缓冲区内外监测和清理尸体、副产品及废弃物。

(摘自 OIE 网站)