

# 表皮生长因子对牛输卵管上皮细胞生长、增殖和凋亡的影响

孙 伟<sup>1</sup> 李喜和<sup>1 2</sup> 郭继彤<sup>1</sup> 巴特尔<sup>1</sup> 杨利国<sup>3</sup>

(1. 内蒙古赛科星繁育生物技术股份有限公司, 内蒙古 呼和浩特 011517; 2. 内蒙古大学 蒙古高原动物遗传资源研究中心, 内蒙古 呼和浩特 010021; 3. 华中农业大学 动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 研究不同浓度的表皮生长因子对牛输卵管上皮细胞生长、增殖和凋亡的影响, 目的是建立高质量的牛体外胚胎共培养细胞系。牛输卵管上皮细胞体外培养技术结合血球计数法检测细胞增殖, 并利用流式细胞仪进行细胞周期和凋亡的检测, 通过 Lysis 软件对数据进行分析。结果表明, EGF 在 0~50 ng/mL 浓度范围内, 其促增殖、抑制凋亡作用随浓度的增加而增大, 呈剂量依赖性; 当浓度持续增高时, 其促增殖、抑制凋亡能力降低; 此外, S 期细胞数量明显增加, G<sub>2</sub>-M 期细胞数量有下降趋势。表皮生长因子在一定浓度范围内具有促进牛输卵管上皮细胞增殖和抑制其凋亡的作用, 并使其细胞周期发生变化。

**关键词:** 牛输卵管上皮细胞; 表皮生长因子(EGF); 细胞增殖; 细胞周期; 细胞凋亡

中图分类号: S858 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)增刊-0410-05

## Influence of Epidermal Growth Factor on Cell Proliferation Cycle and Apoptosis of Cultured Bovine Oviductal Epithelial Cells *in vitro*

SUN Wei<sup>1</sup>, LI Xi-he<sup>1 2</sup>, GUO Ji-tong<sup>1</sup>, BA Te-er<sup>1</sup>, YANG Li-guo<sup>3</sup>

(1. Inner Mongolia Saikexing Reproductive Biotechnology Co., Ltd, Huhhot 011517, China; 2. Institute for Animal Genetic Resources of Mongolia Plateau Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China; 3. Key Laboratory of Education Ministry of China in Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** To investigate the effect of epidermal growth factor (EGF) on proliferation, cell cycle and apoptosis of cultured bovine oviductal epithelial cells and provide foundation for further study of system of co-culturing bovine embryo *in vitro*. The cultured bovine oviductal epithelial cells were treated with different dose of EGF. The effects of bovine oviductal epithelial cells proliferation, cell cycle and apoptosis were measured by blood counting assay and analyzed by FCM (flow cytometry) and Lysis software. In the definite range of EGF (0~50 ng/mL), the effect on cells increased with raise of the EGF concentration showed dose-dependently. With the concentration improved, the abilities of promoting proliferation and inhibiting apoptosis had decreased. Besides, cell quantities increased obviously at S phase while declined slightly at G<sub>2</sub>-M phase. In the definite range of concentration, the epidermal growth factor could promote the proliferation and inhibiting apoptosis of the cultured bovine oviductal epithelial cells, moreover, the cell cycles had been altered after adding EGF.

**Key words:** Bovine oviductal epithelial cell; EGF; Cell proliferation; Cell cycle; Cell apoptosis

自从 Thibault<sup>[1]</sup> 于 1966 年提出, 早期牛胚胎发育到 8~16 细胞时存在一个“发育阻滞”现象, 就一直受到国内外学者的关注。发育阻滞现象存在于多种哺乳动物胚胎体外发育过程中, 而克服这一现象

的有效途径是建立体外共培养系统。国内外研究人员利用哺乳动物的多种细胞建立体外胚胎共培养体系均取得了一定效果<sup>[2]</sup>, 其中, 以输卵管上皮细胞作为共培养细胞效果比较显著。

收稿日期: 2012-08-25

基金项目: 湖北省科技厅“省基金依托基地项目”(2010CBBB01801); 国家现代农业产业(奶牛)技术体系岗位经费(CARS-37-04B)

作者简介: 孙 伟(1979-), 男, 内蒙古乌兰察布人, 助理研究员, 硕士, 主要从事动物生殖生物学与生物技术研究。

通讯作者: 杨利国(1963-), 男, 湖南邵阳人, 教授, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)是一种强有力的细胞分裂促进因子,大量研究表明,其能促进体内多种细胞的增殖和分化,包括启动DNA的合成、激活RNA及蛋白质的合成等<sup>[3-4]</sup>。因此,在牛输卵管上皮细胞培养过程中添加表皮生长因子可以提高共培养细胞的质量,从而可以显著提高胚胎的体外发育能力和胚胎质量。本研究通过在牛输卵管上皮细胞体外培养过程中添加不同浓度的EGF,探索EGF对输卵管上皮细胞体外增殖、周期和凋亡的影响,以期得到培养纯度高、时间长、活性强的优质上皮细胞,为牛体外胚胎共培养提供高质量的共培养细胞。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品和材料

黄牛输卵管采自武汉市洪山区武丰屠宰场,于37℃含双抗(100 U/mL青霉素,100 U/mL链霉素)的磷酸缓冲液(PBS)保温瓶中保存备用。DMEM培养液(GIBCO),EGF(Sigma),新生胎牛血清(FBS,GIBCO), $\beta$ -雌二醇(中科院动物所),胰蛋白酶(GIBCO),CO<sub>2</sub>培养箱(Japan Sanyo),倒置相差显微镜(Olympus),流式细胞仪测试(FAC Scalibur, Becton-Dickmson, USA),Lysis软件分析由武汉大学医学部测定。

### 1.2 方法

1.2.1 原代细胞分离培养与纯化 将无菌清洗处理好的输卵管,用镊子和剪子将输卵管切开,用手术刀片轻刮牛输卵管内剖面将粘性液体弃掉,然后利用手术刀片再继续刮切内表面,刮下的固型物于37℃利用V型胶原酶消化20~30 min,终止后将收集的细胞经100目不锈钢滤网过滤,为上皮细胞。1 000 r/min离心6 min,去上清,重悬单细胞,台盼蓝染色观察活细胞数量。以 $1 \times 10^6$ 个/mL接种于含10% FBS的DMEM完全培养液(10% FBS,100 U/mL青霉素,100 U/mL链霉素),置于5% CO<sub>2</sub> 38.5℃,饱和湿度的培养箱中静置培养。由于成纤维细胞贴壁速度快,待3~4 h后将培养基连同不贴壁的所有细胞移入另一培养瓶,静置培养3 d至贴壁,倒置相差显微镜隔天观察生长情况,每2 d换液,大约7 d后长成单层的上皮样细胞。

1.2.2 传代细胞培养 形成单层后,弃培养基,PBS液冲洗,加入0.25%胰蛋白酶37℃消化2 min,可重复消化2~3次,直至显微镜下观察细胞收缩变圆时终止消化。将细胞悬液经100目不锈钢滤网过滤,以 $1 \times 10^6$ 个/mL接种于培养瓶中。第1~2代在

含10% FBS的DMEM完全培养液中培养,第3代后在含15% FBS的DMEM完全培养液(15% FBS,100 U/mL青霉素,100 U/mL链霉素)中培养。

1.2.3 EGF对牛输卵管上皮细胞增殖、周期和凋亡的影响 取生长良好的对数生长期牛输卵管上皮细胞接种于24孔培养板,用含15% FBS的DMEM培养液将细胞浓度调整为 $1 \times 10^5$ 个/mL,每孔500  $\mu$ L,静置于5% CO<sub>2</sub>、38.5℃、饱和湿度的培养箱中培养至细胞贴壁(12~24 h)。弃上清,每孔加入无血清DMEM培养液500  $\mu$ L同步化24 h,换用含有不同浓度EGF的DMEM培养液(15% FBS),使EGF终浓度依次为0(对照组),25,50,75 ng/mL 4个浓度梯度,每个浓度组设3个重复,每孔500  $\mu$ L。倒置显微镜下观察细胞形态及生长情况,待第5 d血球计数法计数。

同时收集细胞悬液,1 000 r/min离心10 min,制成 $1 \times 10^6$ 个/mL悬液,取500  $\mu$ L经PBS冲洗,4℃预冷的70%乙醇固定2 h,1 500 rpm离心10 min,PBS冲洗,制成200  $\mu$ L细胞悬液,加入终浓度为1 mg/mL的RNaseA 37℃水浴消化30 min,于冰上2 min终止作用。加入1 mL 100  $\mu$ g/mL PI染色10 min,4℃避光保存,滤纸过滤经流式细胞仪上机测试,Lysis软件分析。

群体倍增值 $X = (\lg N_H - \lg N_1) / \lg 2$ ,其中 $N_H$ 为对数生长期末回收细胞数; $N_1$ 为接种细胞数。

群体倍增时间 $T = t/X$ ,其中 $t$ 为培养时间。

## 2 结果与分析

### 2.1 牛输卵管上皮细胞体外培养形态观察

倒置相差显微镜下观察,体外培养的原代牛输卵管上皮细胞呈单个贴壁细胞扩增为鹅卵石样小细胞片(图1),随着传代次数的增加,形成覆盖培养瓶底部的单层细胞片,呈鹅卵石样镶嵌排列,可传10代左右。传代培养3 d后较密集,随着传代次数的增加,形态呈多角形(图2)。

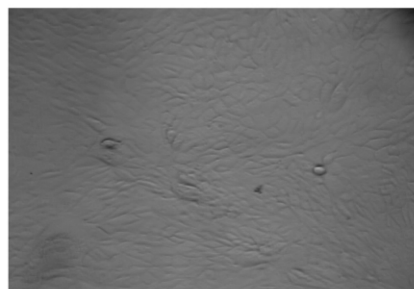


图1 牛输卵管上皮细胞原代第7天(100×)

Fig.1 The primary oviductal epithelial cell was cultured on 7 day (100×)

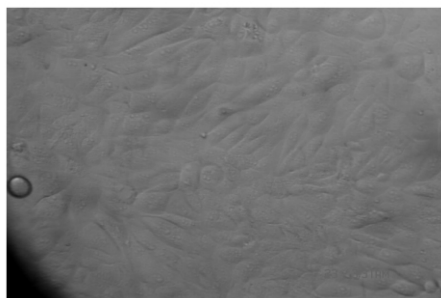


图2 牛输卵管上皮细胞第4代第7天(100×)

Fig.2 The fourth generation oviductal epithelial cell  
was cultured on 7 day (100×)

表1 不同浓度的EGF对牛输卵管上皮细胞增殖的影响

Tab.1 Effect of EGF at different concentrations on proliferation of bovine oviduct epithelial cells

浓度/(ng/mL) Concentration	接种细胞数 $I/( \times 10^5 )$ $N_1$	对数生长期末回收细 胞数/( $\times 10^5$ ) $N_H$	细胞群 体倍增值 $X$	细胞群体倍 增时间 $T$
0	1.20	11.20	3.23	37.15
25	1.20	12.50	3.39	35.40
50	1.20	15.40	3.69	32.52
75	1.20	12.00	3.33	36.04

### 2.3 EGF对牛输卵管上皮细胞周期和凋亡的影响

添加EGF后,牛输卵管上皮细胞的细胞周期发生了明显变化,S期细胞数量呈上升趋势,尤其以添加50 ng/mL EGF后,其S期细胞达到了36.70%,与对照组差异显著( $P < 0.05$ ),与试验2.2的结果一致,表明该浓度条件有较强的促增殖作用; $G_2$ -M期细胞数量略有下降;通过Lysis软件分析,EGF在

### 2.2 EGF对牛输卵管上皮细胞增殖的影响

25, 50, 75 ng/mL 3个浓度的EGF均能促进牛输卵管上皮细胞体外生长,而含50 ng/mL EGF的培养液中回收的细胞数量明显高于其他,并且细胞的群体倍增时间最短,为32.52 h,血细胞计数及公式计算的结果见表1。综上所述,EGF在0~50 ng/mL浓度范围内,其促增殖作用随浓度的增加而增大,呈剂量依赖性,当浓度持续增高时,其促增殖能力有所降低。

0~50 ng/mL浓度范围内,其抑凋亡作用随浓度的增加而增大,呈剂量依赖性,当浓度持续增高时,其抑凋亡能力有所降低,结果见流式细胞仪检测表2和流式图3。表明EGF不但促进细胞的增殖,同时抑制了凋亡的发生,50 ng/mL EGF是上皮细胞增殖和抑制凋亡的最适浓度。

表2 不同浓度的EGF对牛输卵管上皮细胞周期和凋亡的影响

Tab.2 Influences of EGF at different concentrations on cell cycle and apoptosis of bovine oviduct epithelial cells

浓度/(ng/mL) Concentration	$G_0/G_1$ 期/% $G_0/G_1$	$G_2-M$ 期/% $G_2-M$	DNA合成期/% S	$G_2/G_1$ 期/% $G_2/G_1$	凋亡/% Apoptosis
0	61.30	11.90	26.90	1.97	3.40
25	58.90	10.80	30.30	1.97	1.51
50	51.80	11.50	36.70	1.97	0.86
70	59.70	10.90	29.40	1.97	1.00

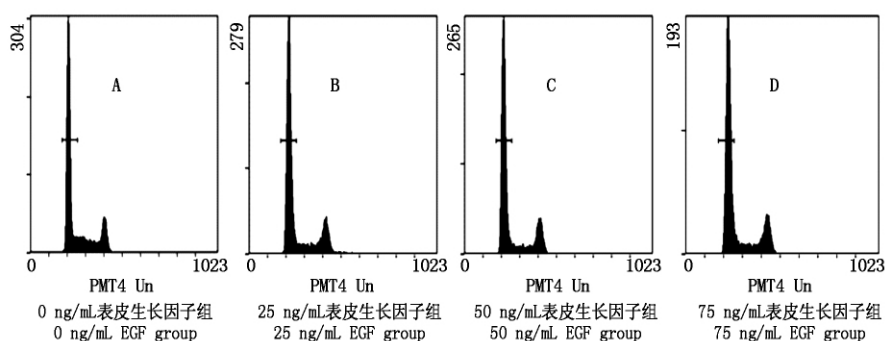


图3 不同浓度EGF对牛输卵管上皮细胞周期和凋亡影响的流式分析图谱

Fig.3 Flow cytometry image of Influences of EGF at different concentrations on  
cell cycle and apoptosis of bovine oviduct epithelial cells

### 3 讨论

输卵管上皮细胞作为一种共培养细胞,效果较为理想,其作用机制可能为以下2个方面<sup>[5-7]</sup>:一方面,共培养细胞可分泌一些对早期胚胎发育有利的物质,如生长因子、糖蛋白、氨基酸、丙酮酸等,可促进胚胎发育;另一方面,共培养细胞可以通过代谢途径,去除培养环境中对早期胚胎发育不利的物质,如重金属二价阳离子、葡萄糖、次黄嘌呤等。

EGF最初是由Cohen等<sup>[8]</sup>于1962年纯化鼠颌下腺神经生长因子的过程中发现的,是一个低分子量、对热稳定的多肽,是一条由53个氨基酸残基组成的单链,是一种强有力的细胞分裂因子,对细胞的生长和增殖有明显的调节作用。EGF通过与细胞膜上的EGF受体(EGFR)结合,把调节增殖的信息传递到细胞内部,并诱发一系列的生理反应。由于EGFR广泛存在于大多数上皮细胞和神经外胚层来源的细胞膜上,因此在体外培养条件下EGF不表现种属特异性及细胞特异性<sup>[9]</sup>,能对多种类型细胞的增殖起促进作用。EGF也是体外培养的上皮细胞有效的促有丝分裂剂<sup>[10-11]</sup>。此外,EGF在胚胎对子宫内膜黏附和穿入过程起重要作用,被列为“植入窗口”的标记分子之一<sup>[12]</sup>,通过与其受体结合后对诱导滋养层细胞的增殖与分化、促进着床前胚胎的发育、妊娠维持、胚胎的生长发育及肿瘤形成等方面起着重要作用<sup>[13]</sup>。

EGF促进输卵管上皮细胞增殖、抑制其凋亡呈剂量依赖关系,随着EGF浓度的增加,其促增殖、抑凋亡效应逐渐增大,但是当EGF浓度达到一定水平时,促增殖、抑凋亡效应反而下降。本试验研究结果表明,EGF在一定的浓度范围内(0~50 ng/mL)。随着其浓度的升高,其促增殖、抑凋亡效应逐渐增加,呈剂量依赖性。50 ng/mL浓度的EGF促增殖、抑凋亡效应最明显,当EGF浓度继续升高时,促细胞增殖、抑凋亡的能力有所降低,但仍高于对照组。考虑可能与EGFR的结合有关,生长因子通过与靶细胞上的受体作用而发挥效能,但EGFR数量有限,当可结合配体的受体被有效占据后,增加配体的浓度就不能起到促增殖、抑凋亡的作用<sup>[14]</sup>,亦或是高浓度的EGF抑制了培养基中其他成分的作用,从而对细胞产生毒性所致<sup>[15]</sup>。此外,试验过程受多种因素的影响,如培养条件、方法、细胞密度、pH、分化时期和细胞表面不同受体的表达等,仍有待于进一步研究。

血球计数法在显微镜下直接进行测定,它观察

在一定容积中的细胞个体数目。经过台盼蓝染色,使得死细胞不被计算在内,此方法简单快捷、准确,且无放射性。流式细胞仪是对细胞进行自动分析和分选的装置。它可以快速测量、准确地显示悬浮在液体中分散细胞的一系列重要的生物物理、生物化学方面的特征参量,并可以根据预选的参量范围把指定的细胞亚群从中分选出来,在检测细胞周期和细胞凋亡的研究中均有应用<sup>[16]</sup>。

流式细胞术检测细胞凋亡经典的方法是PI染色<sup>[17]</sup>,它是通过DNA含量的变化来检测细胞凋亡。PI是一种插入性的荧光染料,能够嵌入双链核酸(DNA和RNA)的碱基对中,经RNase的处理后,细胞中的RNA被消化掉,PI可对DNA进行特异的染色。并且,PI分子直接插入DNA的2个碱基对之间,每隔5个碱基插入一个荧光分子,这种结合十分紧密、稳定,不因染色过程而造成染料脱落丢失。因此,可作为DNA含量的定量分析,进行细胞周期研究和细胞的亚二倍体、二倍体、四倍体、六倍体的鉴定等。

EGF通过与具有酪氨酸激酶活性的受体结合后,激活酪氨酸激酶活性,作用于磷脂酶C(PLC),从而介导信号传导。关于EGF促有丝分裂的信号传导机制目前尚不明确,有研究报道<sup>[18-19]</sup>,磷脂酰肌醇-3-激酶(Phosphatidylinositol 3 kinase, PI3-K)在生长因子诱导的细胞增殖包括输卵管上皮细胞增殖中起着重要作用。丝氨酸蛋白激酶(AKT)的活性也与生长因子诱导的细胞生存与增殖有关。丝裂原激活蛋白激酶(Mitogen activated protein kinase, MAPK)是PI3-K下游区的效应基因。EGF以时间依赖方式增加蛋白质的酪氨酸磷酸化,激活PI3-K及其下游的靶基因AKT酶的活性,通过刺激PI3-K调节MAPK活性,导致DNA合成增加。PI3-K还可以调节EGF诱导的早期反应蛋白c-fos转录。EGF激活输卵管上皮细胞PI3-K途径,从而促成了c-fos的表达,刺激细胞由G<sub>1</sub>期向S期转变。输卵管上皮细胞是重要的共培养细胞,对PI3-K选择性的增加可能得到培养纯度高、时间长、活性强的上皮细胞,为进一步研究牛体外胚胎的共培养提供理想体系。

#### 参考文献:

- [1] 李 勇, 袁忠英, 杨春荣, 等. 体外生产胚胎技术[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23: 56-61.
- [2] 叶 荣, 陈学进, 杨利国, 等. 昆明小鼠早期胚胎体外发育阻滞原因分析[J]. 中国兽医学报, 2004, 24: 402-404.
- [3] Carpenter G. The regulation of cell proliferation advance

- in the biology and mechanism of action of epidermal growth factor [J]. *J Invest Dermatol* ,1987 ,71( 5) : 283 – 288.
- [4] Carpenter G. Epidermal growth factor [J]. *Annu Rev Biochem* ,1979 ,48( 1) : 193 – 216.
- [5] 叶新红 ,徐国江 ,严敬明. 输卵管上皮细胞共培养技术对受精卵体外发育的影响及临床应用价值 [J]. *生殖与避孕* ,2001 ,21: 183 – 187.
- [6] 谭秀文 ,谭景和. 胚胎体外共培养: 影响因素及作用机理 [J]. *生物工程学报* ,2003 ,19: 502 – 505.
- [7] Wetzels A M ,Bastiaans B A ,Hendriks J C ,*et al.* The effects of co-culture with human fibroblasts on human embryo development in vitro and implantation [J]. *Hum Reprod* ,1998 ,13: 1325 – 1330.
- [8] Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal [J]. *J Biol Chem* ,1962 ,237( 5) : 1555 – 1557.
- [9] Real F X ,Retting W J ,Chesa P G ,*et al.* Expression of epidermal growth factor receptor in human cultured cells and tissues: relationship to cell lineage and stage of differentiation. *Cancer Res* [J]. 1986 ,46( 9) : 4726 – 4731.
- [10] Goldberg J M ,Khalifa E A M ,Frieman C I ,*et al.* Improvement of in vitro fertilization and early embryo development in mice by co-culture with human fallopian tube epithelium [J]. *Am J Obstet Gynecol* ,1991 ,165 ( 12) : 1802 – 1805.
- [11] Sirisathien S ,Hernandez-Fonseca H J ,Brackett B G. Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor on bovine blastocyst development *in vitro* [J]. *Anim Reprod Sci* ,2003 ,77( 1) : 21 – 32.
- [12] 刘以训. 胚胎的宫内和异位植入 [J]. *中国科学 C 辑* ,2004 ,34( 2) : 105 – 112.
- [13] Goffin F ,Munaut C ,Malassine A ,*et al.* Evidence of aimed contribution of feto-maternal interactions to trophoblast differentiation along the invasive pathway [J]. *Tissue Antigens* ,2003 ,62( 2) : 104 – 116.
- [14] Liang R F. Effect of transforming growth factor- $\beta$  and epidermal growth factor on clonal rat pulp cells [J]. *Arch Oral Biol* ,1990 ,35( 1) : 7 – 11.
- [15] Yoneda T ,Pratt R. Mesenchymal cells from the human embryonic palate are highly responsive to epidermal growth factor [J]. *Science* ,1981 ,213( 7) : 563 – 565.
- [16] 耿慧霞 ,王 来 ,王 强. 流式细胞仪在生物学中的应用 [J]. *生物学杂志* ,2005 ,22( 4) : 44 – 51.
- [17] 林珏龙. 流式细胞仪对凋亡细胞作用的研究 [J]. *现代诊断与治疗* ,2002 ,13( 4) : 226 – 229.
- [18] Lenin M ,Nandini Ghosh-Choudhury ,Balachandar A ,*et al.* EGF stimulates mesangial cell mitogenesis via P13-kinase-mediated MAPK-dependent and AKT kinase-independent manner involvement of c-fos and P27<sup>kpl</sup> [J]. *Am J Physiol Renal Physiol* ,2005 ,289( 1) : 72 – 82.
- [19] Datta S R ,Brunet A ,Greenberg M E. Cellular survival a: a play in three Akts [J]. *Genes Dev* ,1999 ,13( 22) : 2905 – 2927.