

曲小露,施振旦,李 辉. 一种优化的猪卵泡颗粒细胞分离方法及验证[J]. 江苏农业科学,2019,47(23):190-194.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.23.045

一种优化的猪卵泡颗粒细胞分离方法及验证

曲小露^{1,2}, 施振旦², 李 辉²

(1. 吉林农业大学动物科技学院, 吉林长春 130118;

2. 江苏省农业科学院畜牧研究所/动物品种改良与繁育重点实验室, 江苏南京 210014)

摘要:目前,进行体外研究的卵泡颗粒细胞主要通过抽取卵泡液的方式获得。而笔者前期研究发现,通过该方式获得的颗粒细胞贴壁率低且活力差。为解决该问题,在抽取方式的基础上采用 FICOLL-Paque 分离液对细胞进行进一步纯化,并通过 CCK-8、Western Blot、免疫荧光染色、QRT-PCR、ELISA 等方法分别对纯化细胞的形态、增殖能力、激素分泌相关受体(FSHR、LHCGR)和基因(*CYP19A1*、*CYP11A1*、*StAR*)的表达及激素分泌情况进行检测。结果发现,经纯化的细胞贴壁能力、细胞形态和增殖能力明显改善,且各激素分泌相关基因都有表达;E2 分泌量明显提高,而 P4 分泌明显降低。研究结果表明,经 FICOLL-Paque 分离液纯化后的猪卵泡颗粒细胞中黄体化的颗粒细胞被大部分清除,纯化后的细胞活力更好且更能体现出颗粒细胞的特性。

关键词:颗粒细胞;FICOLL-Paque;细胞增殖;孕酮;免疫荧光染色;FSH 受体

中图分类号: S828.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)23-0190-05

颗粒细胞存在于卵泡中,处于膜细胞与卵子之间,具有将膜细胞所合成的雄激素转化成维持卵子发育和发情所必需的雌激素的功能,同时组成了维持卵子发育的良好微环境^[1-3],并且可通过微绒毛为卵母细胞提供营养支持。因此,颗粒细胞功能不良将直接影响卵子的发育潜能,并必将抑制动物的繁殖性能。前人研究发现,颗粒细胞的凋亡可导致卵泡闭锁^[4],而其功能受损将抑制其雌激素的分泌^[5]。因此颗粒细胞是研究卵泡发育及内分泌的重要细胞模型。

目前,科研中用到的颗粒细胞普遍采用体外分离培养的方式获得^[6],而体外分离培养的细胞状态将直接影响后续试验及其结果的可靠性。因此,获得活力好的猪颗粒细胞对研究猪繁殖内分泌的调控机制具有重要意义。颗粒细胞的体外分离培养方法目前主要有剖切刮取和针头抽吸分离 2 种,而后的应用更为普遍,该方法操作简便,主要通过短时间沉淀,弃去大的细胞团块、组织块和卵丘卵母细胞复合体(cumulus oocyte complexes,简称 COC)后,经离心-清洗等步骤获得相对纯净的颗粒细胞。闫益波等研究发现,剖切法和抽吸法分离猪卵巢颗粒细胞的方式各有优劣,其中抽吸法能够更快速获得猪颗粒细胞^[7]。除上述方法外,也有研究者通过 FICOLL-Paque 分离液进行了人颗粒细胞的分离并进行相关试验检测,如 Chilvers 等在 2012 年用 PERCOLL 和 FICOLL-Paque 分离液分别进行了人颗粒细胞的分离,通过比较发现采用 FICOLL-Paque 分离液分离的颗粒细胞纯度好于 PERCOLL^[8]。目前,尚未有采用 FICOLL-Paque 分离液

对猪颗粒细胞进行分离纯化的相关报道。

在前期大量试验中发现,虽然抽吸法可以快速获得大量颗粒细胞,但是获得的细胞性能不稳定,主要表现在细胞贴壁数量少、活力差等方面。为解决该问题,本试验拟在抽吸法的基础上,进一步采用 FICOLL-Paque 分离液以密度梯度离心的方式对通过抽吸卵泡液获得的细胞进行纯化,旨在获得更加纯净、活力更好的猪卵泡颗粒细胞,为后续的试验开展提供更好的细胞模型。

1 材料与方法

本试验于 2018 年 5—7 月在江苏省农业科学院畜牧研究所动物品种改良与繁育重点实验室进行。

1.1 材料

猪卵巢取自江苏省南京市当地屠宰场 180 日龄左右的健康商品母猪。收集卵泡发育好的卵巢,置于 37℃ 盛有含 2% 青链霉素的生理盐水的保温杯中,于 2 h 内带回实验室。

FICOLL-Paque 分离液购自上海优宁维生物科技股份有限公司,细胞总 RNA 提取试剂盒购自北京天根生物科技有限公司,酶联免疫法测雌二醇、孕酮检测试剂盒购自北京北方生物技术有限公司,反转录相关试剂购自上海皓嘉科技发展有限公司,青链霉素、DNA 提取试剂盒、0.25% 无 EDTA 胰酶购自北京全式金生物科技有限公司,荧光定量 PCR 试剂、FITC 标记羊抗兔二抗购自上海翊圣生物科技有限公司,抗 FSHR 和抗 LHCGR 抗体购自爱必信(上海)生物科技有限公司,CCK-8、蛋白裂解液、BCA 法测蛋白、羊抗兔 HRP 标记二抗购自碧云天生物技术有限公司,DMEM/F12、PBS 购自南京维森特生物技术有限公司,胎牛血清购自 Gibco。阴性对照细胞 3D4/21 猪肺泡巨噬细胞由笔者所在实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 猪卵泡颗粒细胞的分离与培养 用 37℃ 无菌生理盐水冲洗卵巢 3~4 次后,用灭菌纱布拭干卵巢表面水分,选取

收稿日期:2018-08-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31402080);江苏省自然科学基金(编号:BK20151365)。

作者简介:曲小露(1993—),男,山东东营人,硕士研究生,主要从事动物繁殖方面研究。E-mail:qqquxxiaaooluu@163.com。

通信作者:李 辉,博士,副研究员,主要从事动物繁殖方面研究。
E-mail:lhlydk@126.com。

直径为 3~6 mm 的卵泡,用 10 mL 注射器配 10 号针头抽取卵泡液(注意避开血管)。

传统分离方法:将上述操作收集的卵泡液在 37 ℃ 条件下水浴静置 5 min,收集上清分装到 15 mL 离心管中,于 1 200 r/min 离心机中离心 2 min。弃掉上清,将收集到的细胞用 PBS 重悬清洗 2~3 次,用含 10% FBS,2% 青链霉素的 DMEM/F12 培养基重悬细胞,用台盼蓝染色计数后调整细胞密度至 1×10^6 个/mL,并置于温度为 37 ℃、CO₂ 浓度为 5% 的条件下培养。

FICOLL-Paque 分离方法:将收集的卵泡液装入 15 mL 离心管中,在 37 ℃ 条件下水浴静置 15 min,弃上清后,于 1 200 r/min 离心机中离心 2 min。弃掉上清,将沉淀重悬后转移至装有 FICOLL-Paque 分离液中的 15 mL 离心管中(轻轻沿管壁滴加至 FICOLL-Paque 分离液上层,注意不要打破液面)。轻轻转移至水平转子离心机中,在 4 000 r/min 下离心 30 min。待细胞分层后,将中层悬浮层细胞吸出转移至新的 15 mL 无菌离心管中,于 1 200 r/min 下离心 2 min,去除 FICOLL-Paque 分离液后,加入不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化 2 min,使细胞团分散成单个细胞。用含有 10% 胎牛血清的培养基终止消化,然后在 1 200 r/min 下离心 5 min,将收集的细胞用 PBS 清洗 2~3 次后,用含 10% FBS、2% 青链霉素

的 DMEM/F12 培养基重悬细胞,用台盼蓝染色计数后调整细胞密度至 1×10^6 个/mL,并置于温度为 37 ℃、CO₂ 浓度为 5% 的条件下培养。

1.2.2 细胞形态观察 细胞贴壁培养 24 h 后,去除 DMEM/F12 培养基,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗去未贴壁细胞后在倒置显微镜下观察 2 种分离方法所分离到的细胞状态差异并拍照记录。

1.2.3 细胞活力测定 将分离出的细胞按 10^4 个/孔的密度接种至 96 孔板中,分别在培养 24、48、72 h 后,按说明书向每孔中加入 10 μ L CCK-8,继续培养 2 h 后用酶标仪在 450 nm 波长下测吸光度,后根据吸光度作细胞增殖曲线。

1.2.4 QRT-PCR 检测激素分泌基因 *FSHR*、*LHR*、*CYP19A1*、*CYP11A1*、*StAR* 的表达 细胞培养 24 h 后弃去上清,用细胞总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA 后,进一步用反转录试剂盒制备 cDNA。根据所得 cDNA 进行 QRT-PCR。反应体系为 SYBR/ROX qPCR Master Mix(2 \times) 10 μ L,上下游引物各 0.4 μ L,cDNA 模板 1 μ L,灭菌双蒸水 8.2 μ L。反应的条件为预变性:50 ℃ 2 min,95 ℃ 10 min;变性:95 ℃ 15 s,退火、延伸:60 ℃ 1 min,循环数为 36 个。根据获得的 C_T 值,用 GraphPad 软件进行作图。所用引物序列见表 1。同时进行电泳检测。

表 1 试验所用的引物

基因	GenBank 登录号	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)	产物长度(bp)
<i>β-Actin</i>	XM_003357928.2	F:CTTCCTGGGCATGAGTCC;R:GGCGCGATGATCTTGATCTTC	60	201
<i>StAR</i>	AY368628.1	F:CATTACCATCTACTCCAGC;R:AACCCGTATCTTCTTGTCAG	60	109
<i>CYP11A1</i>	BX674071	F:AGACACTGAGACTCCACCCCA;R:GACGCCACTTGACCAATGT	60	120
<i>CYP19A1</i>	NM_214431.1	F:GCTGCTCATTGGCTTAC;R:TCCACCTATCCAGACCC	60	187
<i>FSHR</i>	NM_214386.3	F:GCCAGAACTAAACACAATG;R:TATAGACAAGTAACCGTCAGC	60	107
<i>LHCGR</i>	JN120797.1	F:TCAAGCCGAACCTTTATAGACG;R:ATGTGCTCAACTTCAATGTGG	60	101

1.2.5 免疫荧光染色法检测 FSH 受体的表达 细胞在培养 24 h 后,弃掉培养基,用 PBS 彻底清洗后,加入 4% 多聚甲醛,在 4 ℃ 冰箱中固定 30 min,用 PBS 清洗 3 遍(每次 10 min)后,加入 0.1% Triton-X-100 透化 20 min,PBS 清洗 3 遍(每次 10 min)后,用 5% 牛血清蛋白(BSA)室温封闭 1 h,用抗 FSHR 的抗体 4 ℃ 孵育过夜。一抗孵育结束后,用 PBS 清洗 3 遍(每次 10 min),室温孵育羊抗兔二抗 1 h,用 PBS 清洗 3 遍(每次 10 min)后,滴加 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)避光孵育 5 min,用 PBS 洗涤 4 次后,在荧光显微镜下观察染色结果并拍照记录。

1.2.6 Western blot 检测激素分泌相关基因 *FSHR*、*LHCGR* 和 *StAR* 的表达 采用上述 2 种方法分离的细胞在贴壁培养 24 h 后,弃掉培养基,用预冷的 PBS 冲洗细胞 2 次,彻底弃净液体。在冰上向细胞板上的细胞孔中加入配置好的裂解液工作液 120~150 μ L/孔使之与细胞充分结合,静置 5 min。用细胞刮刀将蛋白工作裂解液回收至 1.5 mL 离心管内,混匀后冰上静置 5~10 min,在 12 000 r/min 下低温离心 5 min,回收上清获得总蛋白,进一步用 BCA 法测定总蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)时统一上样量为 30 μ g。SDS-PAGE 结束后,通过湿法转印将蛋白转印至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。转膜结束后将 PVDF 膜取下浸入 5% 脱脂奶

粉中封闭 1 h,然后分别经过一抗室温孵育 2 h-彻底洗涤-二抗室温孵育 1 h-彻底洗涤后,将 Pro-light HRP 化学发光检测试剂均匀滴加到膜的蛋白面侧,用保鲜膜塑封后,放入 Image-Quant LAS 4000 化学发光成像系统中检测目的蛋白 FSHR、LHCGR 和 StAR 的表达情况,并拍照记录。

1.2.7 不同分离方法获得的细胞分泌 E2 和 P4 状况检测

1.2.7.1 雌二醇(E2)测定 将分离的细胞接种至 12 孔板中,预先培养细胞 24 h 后,含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,添加 0.1 μ mmol/L 雄烯二酮的培养液继续培养 24 h。培养结束后收培养液,在 12 000 r/min 下低温离心 5 min 除去细胞碎片,回收上清,并用 PBS 溶液 1:5 进行稀释,利用 E2 定量测定试剂盒(北京北方生物),采用酶联免疫竞争法检测细胞培养液中 E2 含量。与此同时收集细胞,提取总 DNA,通过将测定的细胞培养液中的 E2 含量除以总 DNA 的量进行均一化处理,以消除细胞数量差异带来的试验误差。

1.2.7.2 孕酮(P4)测定 将分离的细胞接种至 12 孔板中,预先培养细胞 24 h,更换新的培养液继续培养 24 h 后回收培养液,在 12 000 r/min 下低温离心 5 min 除去细胞碎片,回收上清,并用 PBS 溶液 1:5 进行稀释,利用 P4 定量测定试剂盒(北京北方生物技术研究有限公司)检测细胞培养液中 P4 含量。与此同时收集细胞,提取总 DNA,通过将测定的细胞培

养液中的 P4 含量除以总 DNA 的量进行均一化处理,以消除细胞数量差异带来的试验误差。

2 结果与分析

2.1 不同分离方法所获细胞形态分析

颗粒细胞分离培养是一种常规技术,目前采用的传统分离方法虽然可获得数量可观的细胞沉淀,但是其混有大量的细胞组织碎片和血细胞,导致细胞不纯。传统分离方法所获

得的细胞沉淀外观呈淡粉红色,表明有红细胞残留;而通过 FICOLL - Paque 法分离的颗粒细胞均悬浮于分离液之上,血细胞和组织碎片因密度较大而沉积在分离液的底部,获得的细胞无红细胞污染(图 1 - A)。吸取中间悬浮细胞层,采用胰酶消化成单个细胞并贴壁培养 24 h,观察发现,相对于传统分离方法,在接种相同数量细胞的情况下,通过 FICOLL - Paque 法获得的细胞贴壁率高且细胞形态饱满、立体感强(图 1 - B)。

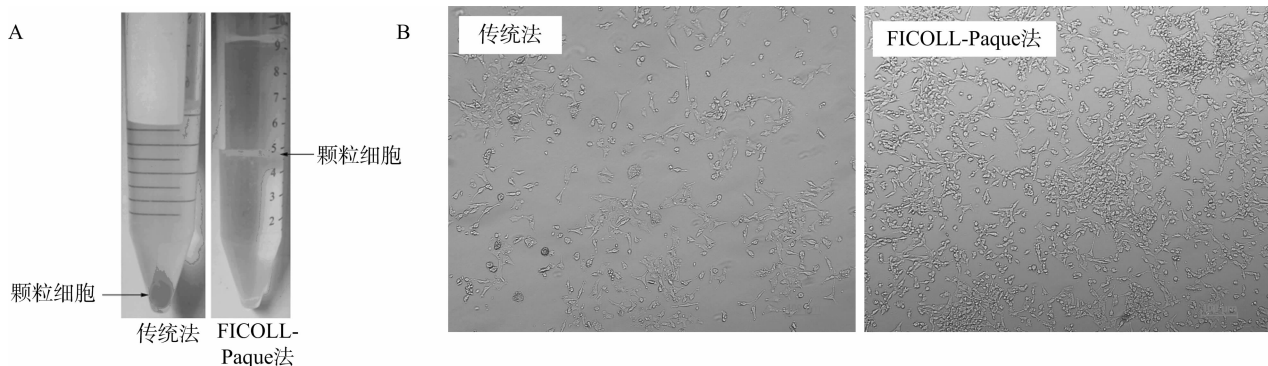


图1 传统分离方法与 FICOLL-Paque 法分离的猪卵泡颗粒细胞形态比较

2.2 细胞增殖检测

细胞增殖能力是反映细胞活力的直观标准。为检测通过 2 种分离方法获得的细胞增殖能力,采用 CCK - 8 方法进行了检测,测定各培养时间的培养液吸光度,以培养 24 h 时的吸光度为参照进行比较。结果(图 2)发现,通过传统分离方法获得的细胞增殖能力较弱,经过 72 h 的培养,细胞增殖较慢,而通过 FICOLL - Paque 法获得的细胞经 72 h 培养后,细胞增殖 3 倍。表明 FICOLL - Paque 法在分离活力较好的细胞时有明显优势。另外,相关研究认为,卵泡液中残留的血细胞等可能会影响细胞的增殖能力^[9-10]。为避免该问题,对分离的颗粒细胞进行进一步纯化是必需的。

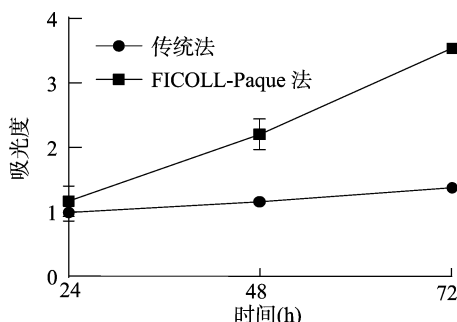


图2 传统分离方法与 FICOLL-Paque 法分离的猪卵泡颗粒细胞增殖情况比较

2.3 与激素分泌相关基因的表达检测

颗粒细胞是激素分泌的关键细胞。在卵泡期,膜细胞合成的雄激素主要在 FSH 作用下转变为雌激素,在此过程中 FSHR 和 CYP19A1 发挥重要作用。LH 峰后排卵,同时颗粒细胞开始黄体化,逐步减少雌激素分泌,转而分泌孕酮。在此期间,LHCGR 接受到 LH 的信号后,将合成孕酮的原料胆固醇在 StAR 的协助下从线粒体外膜转移至内膜,并在 CYP11A1 和 HSD - β 的作用下加工成孕酮。因此,为满足孕酮的分泌,颗粒细胞必须表达 LHCGR、StAR 和 CYP11A1 等基

因。此外,颗粒细胞又分为壁颗粒细胞和卵丘细胞。因卵丘细胞不表达 LHCGR,不能接受 LH 的信号^[11],所以,在体外试验中常做区分。在本研究中,为检测所分离的细胞的确是壁颗粒细胞,对 FSHR、LHCGR、StAR、CYP19A1、CYP11A1 基因进行了检测。从图 3 - A 可以看出,采用 FICOLL - Paque 方法和传统方法分离的细胞均表达了上述各基因(C_T 值均在 30 以下),而作为空白对照的猪肺泡巨噬细胞 3D4/21 中各基因扩增的 C_T 值均在 34 以上,可视为不表达。同时对采用传统方法和 FICOLL - Paque 方法分离的颗粒细胞中上述各基因的表达进行了电泳分析(图 3 - B)。为证明所分离的细胞在蛋白水平上表达了 FSHR,采取免疫荧光染色的方法对 FSHR 在细胞中的表达进行了检测,结果发现,2 种方法所分离的细胞均表达了 FSHR(图 3 - C)。另外进一步通过 Western blot 的方法检测与激素分泌相关的基因的表达情况。结果发现,相对于猪肺泡巨噬细胞 3D4/21, FICOLL - Paque 方法分离的颗粒细胞在蛋白水平全部表达(图 3 - D)。

2.5 雌激素和孕酮分泌的检测

颗粒细胞的最主要功能是激素的分泌。卵泡期颗粒细胞主要分泌雌激素,而黄体化的颗粒细胞停止雌激素分泌,转而分泌孕酮。因此,可通过检测细胞培养液中雌激素和孕酮的分泌水平来判定细胞的状态。本研究采用 ELISA 分析了 2 种分离方法所分离的颗粒细胞培养液中 24 h 内的激素累积量,并通过 DNA 的量进行均一化处理。结果发现,采用 FICOLL - Paque 法分离的细胞单位雌二醇分泌量高于传统方法;相反孕酮的分泌量明显低于传统方法(图 4)。从该结果可以看出,传统方法分离的颗粒细胞中含有部分已经黄体化的细胞,而经 FICOLL - Paque 方法纯化后,可明显清除该部分细胞。

3 讨论

颗粒细胞是研究卵巢类固醇激素生成和卵泡发育时最常用的一种细胞,在雌二醇、孕酮的生成和卵子的发育中起到重

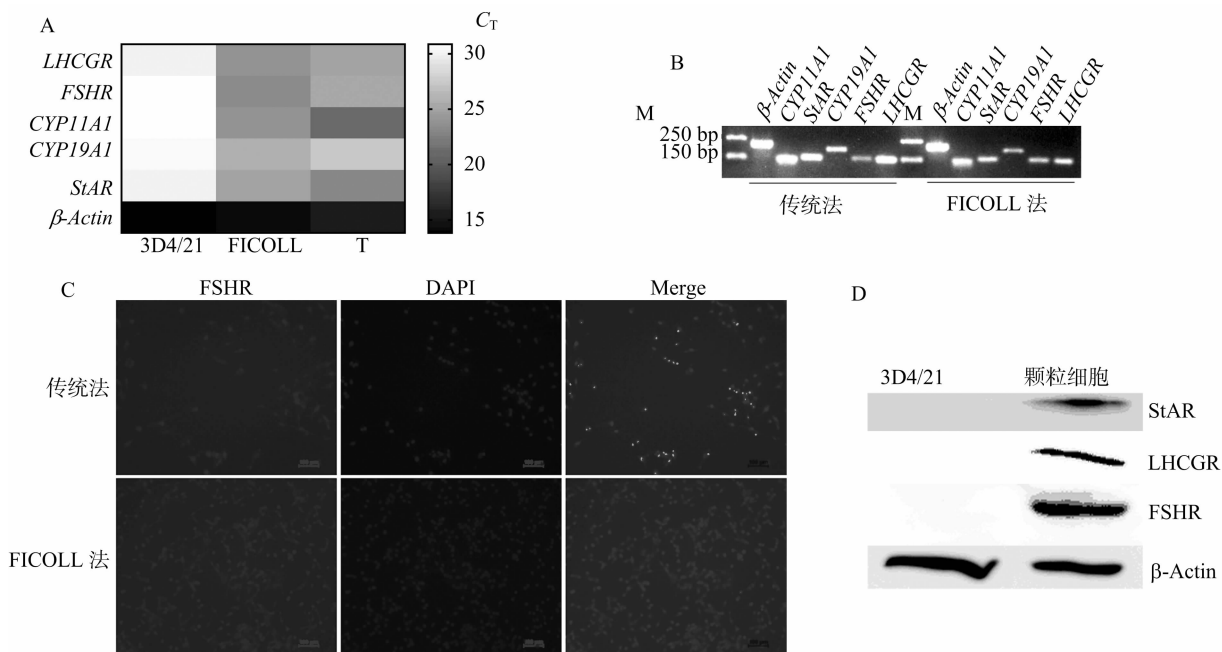


图3 分离的颗粒细胞中与激素分泌相关基因的表达检测
A—LHCGR、FSHR、CYP11A1、CYP19A1 和 StAR 在 FICOLL-Paque 方法 (FICOLL) 和传统方法 (T) 中的表达检测, 并用 3D4/21 细胞作为阴性对照; B—免疫荧光染色方法检测 FSHR 在 FICOLL-Paque 方法 (FICOLL) 和传统方法 (T) 中的表达; C—Western Blot 法检测 FICOLL-Paque 方法分离的颗粒细胞中 StAR、LHCGR 和 FSHR 的表达

图3 分离的颗粒细胞中与激素分泌相关基因的表达检测

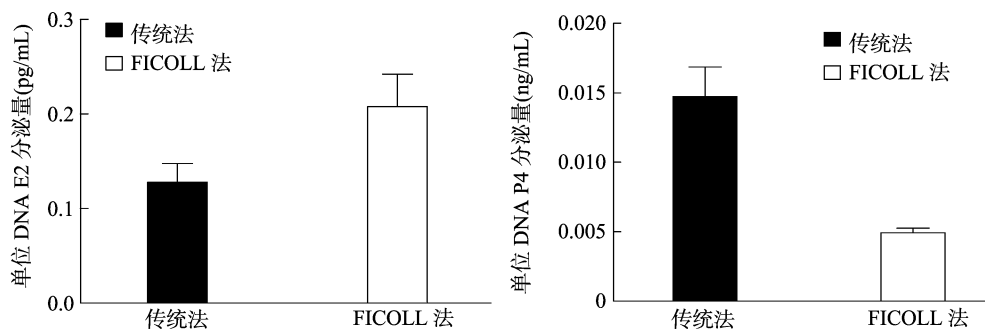


图4 雌二醇和孕酮在 2 种方法分离的颗粒细胞培养液中的累积量

要作用。随着卵泡的发育,颗粒细胞的形态和功能发生改变^[12]。邻近排卵期时,颗粒细胞会慢慢黄体化,大量分泌孕酮,停止或者少量分泌雌二醇^[13-14]。为了研究与颗粒细胞雌二醇分泌相关的调控机制,需用到雌二醇分泌高峰期的颗粒细胞,然而在前期的研究中发现,采用传统分离方法获得的细胞并不能满足试验的需求。因此需要优化分离方法,为颗粒细胞的体外研究提供更好的细胞模型。

本研究在传统分离方法的基础上,采用 FICOLL-Paque 分离液进一步纯化的方式分离猪卵泡颗粒细胞。FICOLL-Paque 分离液是高分子量蔗糖聚合物和泛影酸钠混合溶液,作为密度梯度介质可通过简单快速离心程序从血液中有效提取高纯度的活单核细胞,此前已有多篇成功分离单核巨噬细胞的报道^[15-17],有关学者尝试用其分离人颗粒细胞^[18-19],并取得了较好的效果。本研究率先将该方法应用于猪颗粒细胞的分离,结果发现,通过该方法分离的细胞不但贴壁率大大提高,而且细胞状态优于传统方法。另外,进一步采用 CCK-8 方法对细胞的活力进行检测发现,经 FICOLL-Paque 分离液

纯化过的细胞增殖能力明显强于普通方法所分离的细胞。虽然都表达了与激素分泌相关的基因,但是进一步的激素测定结果显示,经 FICOLL-Paque 分离液纯化过的细胞单位孕酮分泌量明显低于传统方法分离的细胞,但是雌激素的分泌量却相反。因此该结果从侧面证实有些猪卵巢颗粒细胞已经开始黄体化,而经 FICOLL-Paque 分离后可清除该部分细胞。相关报道认为,在抽吸的卵泡液中残留有一定数量的红细胞和白细胞^[9-10]。因此,除了细胞自身黄体化的原因外,卵泡液中的残留物也可能是影响所分离的颗粒细胞状态和活力的重要因素。

本研究发现,传统分离方法所获得的细胞多为单细胞,而其中贴壁好且活力好的细胞多为细胞团;相反经 FICOLL-Paque 方法分离的细胞中细胞团居多,这也是在实际操作中进行胰酶消化的原因。这种现象提示,卵泡中颗粒细胞功能的维持可能需要细胞间的互作和连接。黄明宇等认为,细胞间互作可以控制细胞存活、凋亡、迁移、增殖和分化等基本细胞功能^[20],而细胞间互作可通过细胞外基质 (extracellular

matrix,简称 ECM)以及旁分泌、自分泌和直接的细胞-细胞接触实现^[21]。直接的细胞间接触是由间隙连接、小蛋白质隧道组成^[22]。间隙连接通信是细胞培养中细胞通信的重要组成部分,它由连接蛋白、小质膜蛋白组成,它们形成蛋白质隧道,形成连接 2 个相邻细胞的间隙连接^[23]。前人研究发现,颗粒细胞在卵泡期的信号和物质共享需要胞间连接分子 CX43 的参与,而黄体化后 ECM 可发生重构,同时胞间连接也会削弱^[24-25]。本试验通过 FICOLL-Paque 方法分离的细胞多以细胞团的形式存在,该现象也恰好说明分离的细胞间互动强;而传统方法获得的细胞多以单细胞形式存在,说明通过这种方式分离的细胞,由于接近黄体化,而导致细胞间的互动差。然而目前产生此种现象的分子机制尚未明晰,还需今后进一步开展这方面的研究。

本研究在传统方法基础上,采用 FICOLL-Paque 分离液成功分离到了较纯的猪卵泡颗粒细胞,并通过试验进一步证明了通过该方法分离的细胞贴壁率、增殖能力要优于传统方法,为今后的试验提供了较好的细胞模型。

参考文献:

- [1] Dumesic D A, Meldrum D R, Katz - Jaffe M G, et al. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health[J]. Fertility and Sterility, 2015, 103(2): 303 - 316.
- [2] Liu X Q, Qiao P Y, Jiang A F, et al. Paracrine regulation of steroidogenesis in theca cells by granulosa cells derived from mouse preantral follicles[J]. BioMed Research International, 2015: 925691.
- [3] Matsuda F, Inoue N, Manabe N, et al. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells[J]. The Journal of Reproduction and Development, 2012, 58(1): 44 - 50.
- [4] Glamoclija V, Vilovic K, Saraga - Babic M, et al. Apoptosis and active caspase - 3 expression in human granulosa cells[J]. Fertility and Sterility, 2005, 83(2): 426 - 431.
- [5] Li H, Guo S S, Cai L P, et al. Lipopolysaccharide and heat stress impair the estradiol biosynthesis in granulosa cells via increase of HSP70 and inhibition of smad3 phosphorylation and nuclear translocation[J]. Cellular Signalling, 2017, 30: 130 - 141.
- [6] Garrett W M, Guthrie H D. Steroidogenic enzyme expression during preovulatory follicle maturation in pigs[J]. Biology of Reproduction, 1997, 56(6): 1424 - 1431.
- [7] 闫益波, 李文刚, 焦福林, 等. 猪卵巢颗粒细胞分离培养及细胞生物学特性研究[J]. 山西农业科学, 2016, 44(6): 825 - 828.
- [8] Chilvers R A, Bodenbun Y H, Denner L A, et al. Development of a novel protocol for isolation and purification of human granulosa cells[J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2012, 29(6): 547 - 556.
- [9] Quinn M, Mcgregor S B, Stanton J L, et al. Purification of granulosa cells from human ovarian follicular fluid using granulosa cell aggregates[J]. Reproduction Fertility and Development, 2006, 18(5): 501 - 508.
- [10] Loukides J A, Loy R A, Edeards R, et al. Human follicular fluids contain tissue macrophages[J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1990, 71(5): 1363 - 1367.
- [11] Richani D, Gilchrist R B. The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence[J]. Human Reproduction Update, 2018, 24(1): 1 - 14.
- [12] 高 萍, 钟玉宜, 张爱玲. 母猪卵巢颗粒细胞的分离培养及鉴定[J]. 广东农业科学, 2014, 41(4): 131 - 135.
- [13] Chaffin C L, Dissen G A, Stouffer R L. Hormonal regulation of steroidogenic enzyme expression in granulosa cells during the peri - ovulatory interval in monkeys[J]. Molecular Human Reproduction, 2000, 6(1): 11 - 18.
- [14] Jakimiuk A J, Weitsman S R, Navab A, et al. Luteinizing hormone receptor, steroidogenesis acute regulatory protein, and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids are overexpressed in thecal and granulosa cells from polycystic ovaries[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2001, 86(3): 1318 - 1323.
- [15] Zarei M H, Shirazi S F, Aghvami M, et al. Analysis of cytotoxic effects of nickel on human blood lymphocytes[J]. Toxicology Mechanisms and Methods, 2018, 28(2): 79 - 86.
- [16] Dias L D, Casali K R, Ghem C, et al. Mesenchymal stem cells from sternum: the type of heart disease, ischemic or valvular, does not influence the cell culture establishment and growth kinetics[J]. Journal of Translational Medicine, 2017, 15: 161.
- [17] Bargalló M E, Guardo A C, Maleno M J, et al. Utility of Systematic isolation of immune cell subsets from HIV - infected individuals for miRNA profiling[J]. Journal of Immunological Methods, 2017, 442: 12 - 19.
- [18] Matsubara H, Ikuta K, Ozaki Y, et al. Gonadotropins and cytokines affect luteal function through control of apoptosis in human luteinized granulosa cells[J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2000, 85(4): 1620 - 1626.
- [19] Eramaa M, Ritvos O. Transforming growth factor - β 1 and - β 2 induce inhibin and activin β B - subunit messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa - luteal cells[J]. Fertility and Sterility, 1996, 65(5): 954 - 960.
- [20] 黄明宇, 冒卫星, 张华丽. 应用于细胞间相互作用的微流控芯片技术研究进展[J]. 纳米技术与精密工程, 2016, 14(6): 446 - 452.
- [21] Hoshiba T, Chen G P, Endo C, et al. Decellularized extracellular matrix as an *in vitro* model to study the comprehensive roles of the ECM in stem cell differentiation[J]. Stem Cells International, 2016: 6397820.
- [22] Kumar N M, Gilula N B. The gap junction communication channel[J]. Cell, 1996, 84(3): 381 - 388.
- [23] Herzog D P, Dohle E, Bischoff I A. Cell communication in a coculture system consisting of outgrowth endothelial cells and primary osteoblasts[J]. BioMed Research International, 2014: 320123.
- [24] Wu Y T, Chang H M, Huang H F, et al. Bone morphogenetic protein 2 regulates cell - cell communication by down - regulating connexin43 expression in luteinized human granulosa cells[J]. Molecular Human Reproduction, 2017, 23(3): 155 - 165.
- [25] Chen Y C, Chang H M, Cheng J C, et al. Transforming growth factor - beta 1 up - regulates connexin43 expression in human granulosa cells[J]. Human Reproduction, 2015, 30(9): 2190 - 2201.