

绵羊粒细胞集落刺激因子原核表达与提纯及用于颗粒细胞培养的效果

李闰婷^{1,2}, 陈龙欣², 张丽萌^{1,2}, 何海迎¹, 王泳¹, 杨若晨¹, 段春辉¹, 刘月琴¹, 王玉琴³, 张英杰¹

1 河北农业大学 动物科技学院, 河北 保定 071001

2 郑州师范学院 分子生物学实验室, 河南 郑州 450044

3 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471023

李闰婷, 陈龙欣, 张丽萌, 等. 绵羊粒细胞集落刺激因子原核表达与提纯及用于颗粒细胞培养的效果. 生物工程学报, 2020, 36(9): 1817-1827.

Li RT, Chen LX, Zhang LM, et al. Prokaryotic expression and purification of sheep granulocyte colony stimulating factor for granulosa cell culture. Chin J Biotech, 2020, 36(9): 1817-1827.

摘要: 文中旨在研究粒细胞集落刺激因子 (Granule cell stimulating factor, GCSF) 对绵羊颗粒细胞体外培养过程中细胞增殖和凋亡的影响, 明确 GCSF 对绵羊颗粒细胞生存的调节作用, 为今后该蛋白用于羊繁育方面的研究奠定基础。原核克隆表达纯化羊 GCSF 蛋白, 纯化的蛋白用 M-NSF60 细胞检测生物学活性, 将纯化的 GCSF 添加到颗粒细胞培养基中作为试验组, 以培养基中未添加 GCSF 的细胞为对照, 利用 Alamarblue 检测细胞增殖情况, 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡的变化。结果表明, 羊 GCSF 可以原核表达并纯化, 并且具有生物学活性。在 24 h 和 48 h 时, 在 0.06–600 ng/mL 的范围内随着加入 GCSF 的终浓度增加, 细胞活力升高。试验组颗粒细胞体外培养 24 h 后, 与阴性对照相比, 细胞周期的分布显著改变, S 期细胞比例显著减少 ($P < 0.05$), G2/M 期细胞比例显著增多 ($P < 0.05$)。试验组凋亡率和对照组相比, 48 h 检测时凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。综上所述, GCSF 在体外培养的绵羊颗粒细胞中, 可调控绵羊颗粒细胞周期, 促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡。

关键词: 粒细胞集落刺激因子, 羊, 颗粒细胞, 细胞活力, 细胞周期, 细胞凋亡

Received: December 25, 2019; **Accepted:** April 2, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFD0502100), National Modern Agricultural Industry Technology System Construction Project of China (Nos. CARS-38, CARS-39).

Corresponding author: Yingjie Zhang. Tel: +86-312-7528366; Fax: +86-312-7528886; E-mail: zhangyingjie66@126.com
国家重点研发计划 (No. 2018YFD0502100), 国家现代农业产业技术体系 (Nos. CARS-38, CARS-39) 资助。

Prokaryotic expression and purification of sheep granulocyte colony stimulating factor for granulosa cell culture

Runting Li^{1,2}, Longxin Chen², Limeng Zhang^{1,2}, Haiying He¹, Yong Wang¹, Ruochen Yang¹, Chunhui Duan¹, Yueqin Liu¹, Yuqin Wang³, and Yingjie Zhang¹

1 College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei, China

2 Molecular Biology Laboratory, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450044, Henan, China

3 College of Animal Science & Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

Abstract: In order to clarify the regulation of granule cell stimulating factor (GCSF) on granulosa cells, we studied the effect of GCSF on proliferation and apoptosis of *in vitro* cultured granulosa cells for research on GCSF used in sheep reproduction and breeding. Sheep GCSF protein was prokaryotic expressed and purified. Its bio-activity was measured with M-NSF60 cells. The purified GCSF was added in cell culture medium in experiment groups with non-added as control. Alarblue was used to measure cell proliferation, and flow cytometry was used to detect cell cycles and apoptosis. Sheep GCSF could be expressed and purified. Cell activity increased with GCSF concentration from 0.06 to 600 ng/mL at 24 h and 48 h. Cell cycles were significantly different between experiment and control groups at 24 h. Cell ratio of S was significantly reduced ($P < 0.05$) and G2/M phase significantly increased ($P < 0.05$). The apoptosis ratio of experiment group was significantly reduced ($P < 0.05$) at 48 h. In conclusion, GCSF could enhance cell proliferation, inhibit apoptosis, and regulate cell cycles on *in vitro* cultured sheep granulosa cells.

Keywords: GCSF, sheep, granulosa cells, cell proliferation, cell cycles, apoptosis

粒细胞集落刺激因子 (Granule cell stimulating factor, GCSF) 是集落刺激因子中糖蛋白生长因子中的一员, 能支持造血祖细胞的增殖^[1-3]。GCSF 可刺激特定骨髓前体细胞增殖以及分化成粒细胞, 延长中性粒细胞系各个阶段的祖细胞的存活时间, 刺激多能干细胞的增殖和分化, 诱导单核细胞和巨噬细胞的形成, 诱导成熟中性粒细胞产生更多的中性粒细胞并提高其存活率, 维持其表型, 但是该蛋白的半衰期较短^[1-6]。有资料显示 GCSF 的表达量差异可能与某些动物的抗病能力密切相关, 有研究通过体外注射 GCSF 提高牛和狗的免疫力、提高辅助生殖率及治疗乳房炎等的报道^[7-17], 但尚无该蛋白用于羊的繁育方面的研究。

卵泡的生长和发育, 受到来自颗粒细胞、卵泡膜细胞和卵母细胞自分泌或者旁分泌的基因、激素以及生长因子的作用和调控^[18]。有研究提示细胞集落刺激因子参与了卵泡发育和排卵的

理过程, 这种炎症性细胞因子可能以自分泌和旁分泌的方式参与到卵泡周期的调控当中, 在发育的卵泡周围存在着巨噬细胞, 这些细胞通过分泌内皮生长因子和其他细胞因子起到促进颗粒细胞增殖的作用^[18]。研究发现磷脂酰肌醇 3 激酶 (Phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (Protein kinase B, PKB/AKT) 和肝激酶 B1 (Liver kinase B1, LKB1)/AMP 活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 信号通路相关因子共同参与调控卵泡颗粒细胞增殖、卵泡直径变化、成熟和周期性排卵等过程^[19]。有报道显示 GCSF 在 PI3K/AKT 通路中起到重要作用^[20-21]。

本研究通过分子克隆的方法, 原核表达羊 GCSF 蛋白, 并将纯化的 GCSF 蛋白添加到体外培养的绵羊颗粒细胞中, 通过细胞活力试验、细胞周期试验和凋亡试验, 研究 GCSF 对颗粒细胞增殖和凋亡的影响, 为 GCSF 作为分子靶点用于提高绵羊免疫力的分子遗传育种研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

宿主菌大肠杆菌 *Escherichia coli* XL1-Blue、原核表达载体 pET28a 均由郑州师范学院分子生物学实验室提供。DMEM/F12 培养基为 Gibco 产品。*E. coli* BL21(DE3) 化学感受态细胞、TransGen 质粒提取试剂盒、Anti-His Mouse Monoclonal Antibody、HRP 标记的 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)、6× Protein Loading Buffer 及 DNA marker 购自北京全式金生物技术有限公司。DNA 胶回收试剂盒为 QIAgen 产品。Ni-NTA 凝胶购自南京金斯瑞生物科技有限公司。ECL 发光液试剂盒购自晶彩公司。Annexin-V FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术。胰酶替代物 (不含 EDTA) 和 AlamarBlue™ HS Cell Viability Reagent 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 购自 Life technologies。限制性内切酶购自 NEB 北京。其他试剂为国产分析纯试剂。

1.2 羊 GCSF 的克隆

根据羊 GCSF 的 C-末端的序列 (GenBank 登录号: L07939), 由 GENEWIZ 公司进行合成并连接到 pUC57 载体上。

pUC57-GCSF 与载体质粒 pET28a 分别进行 *Bam*H I 和 *Nco* I 双酶切后回收目的大小的 DNA 片段, 用 T4 DNA 连接酶将两个片段连接后 42 °C 热激 60 s 转化到感受态细胞 *E. coli* XL1-Blue 中, 涂布于含有 50 μg/mL 卡那霉素和 100 μg/mL 四环素的 2×YT 固体培养基平板上, 37 °C 培养过夜。次日挑取单克隆增菌培养后用 TransGen 质粒提取试剂盒提取质粒, 对重组质粒进行酶切鉴定、PCR 鉴定及序列测定 (GENEWIZ) 分析, 将转化获得的阳性重组质粒命名为 pET28a-GCSF。以热休克法 (42 °C 热激 60 s) 将重组质粒 pET28a-GCSF 转化宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 中, 重组菌命名为 BL21(DE3)/pET28a-GCSF。

1.3 羊 GCSF 的表达

取重组菌 BL21(DE3)/pET28a-GCSF 接种于 2 mL 的 LB 培养基 (含 50 μg/mL 卡那霉素) 中, 37 °C 培养至 OD_{600} 约为 0.6 时, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续剧烈振荡培养 5 h 后, 取 1 mL 菌液, 10 000×g 离心, 弃上清, 在沉淀中加入 70 μL PBS、20 μL 6×蛋白上样缓冲液和 10 μL 1 mmol/L DTT 后, 煮沸 5 min, 取 10 μL 用于 SDS-PAGE。同时, 设未诱导重组菌作为对照。确定重组羊 GCSF 能够表达后, 进行大量摇菌表达, 诱导表达方法同上。诱导表达结束后, 用 50 mL 离心管收集全部培养物, 8 000 r/min 离心 20 min 收集菌体沉淀。

1.4 羊 GCSF 的纯化与鉴定

上述菌体沉淀加入 20 mL 的 PBS 溶液 (按照 1:20 稀释), 充分重悬菌体沉淀。对重悬液中的菌体进行冰浴超声破碎 20 min, 超声破碎程序: 超声 5 s, 暂停 5 s。超声后 12 000 r/min 离心收集上清。上清中的重组蛋白用 Ni-NTA 凝胶装填的重力柱进行纯化, 详细的溶液配方与操作步骤参考 Ni-NTA 凝胶说明。主要包括 2 mL 的填料装填到 25 mL 的空柱中, 依次用 ddH₂O 和结合缓冲液各 10 mL 对柱子进行平衡; 超声破碎后的上清全部过柱; 之后用 20 mL 的结合缓冲液分两次洗涤柱子; 待结合缓冲液全部流出后, 用洗脱缓冲液洗脱柱子上结合的蛋白, 并收集流出液。将所有收集的流出液用 3 kDa 的超滤管进行超滤浓缩, 并用 PBS 替换其中的含有咪唑的溶液。浓缩后的样品用分子筛 Superdex75 10/300 GL 在 AKTA 蛋白纯化系统中进行精细纯化, 收集进样后 12 min 出峰的溶液, 最后再经 3 kDa 的超滤管进行超滤浓缩, 浓缩液即为纯化的 GCSF 蛋白质溶液。

纯化的 GCSF 蛋白溶液用 NanoDrop2000C 测量浓度后进行分装。取 2 μg 用于 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测。Western blotting 检测采用硝酸纤维素膜, 90 V 转膜 30 min, 5% 脱脂乳 (含有 0.05% 的 Tween20 的 PBST 配制) 室温封闭 2 h, 一

抗为 Anti-His Mouse Monoclonal Antibody, 室温孵育 1 h, 二抗为 HRP 标记的 Goat Anti-Mouse IgG (H+L), 室温孵育 1 h, ECL 发光液显色, 用多色荧光化学发光凝聚成像系统拍照保存结果。其余蛋白储存于 -80°C 备用。使用时用 DMEM/F12 培养基稀释至需要的浓度。

1.5 羊 GCSF 的活力验证

M-NSF60 细胞是一种用于检测 GCSF 活力的细胞。从液氮中取出的 M-NSF60 细胞迅速在 37°C 的水浴中融化, 立即转移到 37°C 预热的含 10% FBS、1% 双抗、2 nmol/L β -巯基乙醇、62 ng/mL hMCSF 的 RPMI1640 培养基中重悬浮细胞, 用白细胞计数板在显微镜下计数, 调整细胞密度为 2×10^4 个细胞/mL, 于 37°C 、5% CO_2 条件下培养 48 h 后离心收集细胞传代。进行 GCSF 生物学活性检测前, 离心收集细胞, 加入 RPMI1640 培养基 (含 10% FBS、1% 双抗、2 nmol/L β -巯基乙醇) 洗涤细胞 3 次后, 加入终浓度为 0、0.03、0.30、3.00、30.00、300 ng/mL GCSF 或 62 ng/mL hMCSF 的 RPMI1640 培养基 (含 10% FBS、1% 双抗、2 nmol/L β -巯基乙醇) 中用 96 孔细胞培养板培养 48 h 后, 每孔分别再加入 10 μL AlamarBlueTM HS 细胞活力试剂溶液在细胞培养箱内继续孵育 3 h, 用 EnVision[®] 多标记微孔板检测仪在 Ex/Em 分别为 560 nm/590 nm 进行吸光值检测。

1.6 羊颗粒细胞的体外培养

从唐县瑞丽肉食屠宰场收集 1 岁左右的小尾寒羊卵巢, 分别用医用酒精和生理盐水各冲洗表面 3 次后, 立即放入盛有约 37°C 的生理盐水 (含 1% 的双抗) 的保温瓶中, 3 h 内带回实验室。将采回的卵巢用医用酒精冲洗 3 次, 再用 37°C 预热的 DPBS (Gibco) 缓冲液清洗 3 次, 用已灭菌的小剪子剪掉卵巢外筋膜, 将卵巢放在盛有 37°C 预热的含 10% FBS (Gibco)、1.5% 双抗 (Gibco) 的 DMEM/F12 (Gibco) 培养基中, 洗涤 2 次。用灭菌的刀片将卵泡直径为 3–7 mm 的卵泡逐个割破, 用

灭菌的小镊子将卵泡液挤压出来, 然后将全部培养液吸至 15 mL 离心管中, 吹打后垂直静置 10 min, 使卵母细胞和其他小组织沉淀, 吸取上清液转移至新的无菌 15 mL 离心管, $100 \times g$ 离心 10 min, 弃掉上清。加入 DMEM/F12 培养基 (含 10% FBS、1% 双抗) 重悬细胞, 离心洗涤 ($100 \times g$, 10 min) 后弃掉上清, 重复 3 次。重悬浮细胞使之成为单细胞悬液, 用白细胞计数板在显微镜下计数, 调整细胞密度为 2×10^4 个细胞/mL, 于 37°C 、5% CO_2 条件下培养, 24 h 后更换培养液, 去除未贴壁的细胞。贴壁培养的细胞即为颗粒细胞, 加入 DMEM/F12 培养基 (含 10% FBS、1% 双抗) 继续培养。

1.7 细胞增殖检测

待颗粒细胞长满至培养瓶的 80% 时用胰蛋白酶消化, 并按 1×10^5 个细胞/mL 分别接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL , 分成 2 个处理组: 对照组 (不添加 GCSF 只添加 DMEM/F12 培养基) 和添加了不同浓度 GCSF 蛋白的 DMEM/F12 培养基稀释液的试验组 (600 ng/mL、60 ng/mL、6 ng/mL、0.6 ng/mL 和 0.06 ng/mL), 每组设 3 个重复孔, 连续培养 2 d, 每天定时加入 10 μL AlamarBlueTM HS 细胞活力试剂溶液后在细胞培养箱内继续孵育 3 h, 用 EnVision[®] 多标记微孔板检测仪在 Ex/Em 分别为 560 nm/590 nm 进行吸光值检测。

1.8 细胞周期检测

待颗粒细胞长满至培养瓶的 80% 时用胰酶替代物 (不含 EDTA) 消化, 并按 2×10^5 个细胞/mL 的密度接种 4 mL 于 60 mm 细胞培养皿中, 分成 2 个处理组: 对照组 (不添加 GCSF 只添加 DMEM/F12 培养基) 和添加了 60 ng/mL GCSF 蛋白的 DMEM/F12 稀释液的试验组, 每组设 3 个重复。颗粒细胞处理 24 h 后, 用胰酶替代物 (不含 EDTA) 消化处理细胞 3 min, $100 \times g$ 离心 3 min 收集细胞。PBS 重悬细胞 $100 \times g$ 离心 3 min 洗涤一次。细胞用 1 mL 的 PBS 重悬后, 加入 -20°C

预冷的无水乙醇 4 mL, 边加边混匀, 避免细胞结团。固定细胞过夜后, 离心收集细胞, 用含有 2% FBS 的 PBS 重悬细胞。加入终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PI 对细胞进行染色, 避光室温孵育 15 min。用流式细胞仪进行检测, 每次计数最少 2×10^4 个细胞, 结果用 NovoExpress 软件进行细胞周期拟合分析。

1.9 细胞凋亡检测

待颗粒细胞长满至培养瓶的 80% 时用胰酶替代物 (不含 EDTA) 消化, 并按 1×10^5 个细胞/mL 的密度接种 2 mL 于 6 孔板中, 分成 2 个处理组: 对照组 (不添加 GCSF 只添加 DMEM/F12 培养基) 和添加了 60 ng/mL GCSF 蛋白的 DMEM/F12 稀释液的试验组, 每组设 3 个重复孔, 继续培养 24 h 和 48 h 后, 用胰酶替代物 (不含 EDTA) 消化处理细胞 3 min, 加入含 10% FBS 的细胞培养液终止消化, 将细胞轻轻吹打下来转入无菌的 2 mL 离心管中, $100 \times g$ 离心 5 min。用含 2% FBS 的 PBS 洗涤细胞 2 次, $100 \times g$ 离心 5 min, 弃上清。加入 500 μL 结合缓冲液使细胞悬浮, 分别单独或同时加入 Annexin-V FITC 5 μL 和 PI 染液 5 μL , 轻轻吹打混匀, 室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 避光反应 15 min 后采用流式细胞仪进行检测。

1.10 统计分析

采用 GraphPad 6.0 软件进行统计分析。试验数

据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.01$ 表示差异极显著, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 羊 GCSF 的克隆、表达与纯化

扩增得到的 GCSF 基因片段分别经双酶切后, 回收目的片段, 连接到同样经过双酶切的 pET28a 载体上并转化到 *E. coli* XL1-blue 宿主菌株中后, 分别提取质粒进行 PCR、酶切和测序鉴定, 结果均与预期相符, 其中测序结果与之前用 L07939 的序列绘制的质粒图谱比对结果如图 1 所示, 测序得到的序列与预期序列完全一致。鉴定正确的质粒命名为 pET28a-GCSF。

经鉴定正确的 pET28a-GCSF 转化到 *E. coli* BL21(DE3) 中, 将重组菌命名为 BL21(DE3)/pET28a-GCSF。分别培养重组菌 OD_{600} 达到 0.6 后, 用 IPTG 诱导目的蛋白表达并纯化后进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测 (图 2)。

2.2 羊 GCSF 的生物学活性检测

羊 GCSF 的生物学活性如图 3 所示。在 0.03–300.00 ng/mL 的终浓度范围内, 随着加入 GCSF 蛋白浓度的增加, M-NSF60 细胞的荧光强度逐渐升高。添加了羊 GCSF 的试验组中的 M-NSF60 细胞的荧光强度与阳性对照组趋势一致。证明本研究纯化的蛋白有 GCSF 生物学活性。

pET28a-GCSF	TTCGGATCCTTATCAATGGTATGGTATGGTGGGGCTCAGCAAGGTAGCGCAGGCCACGGTATGCCAGCCCCAGAAACGCTGCAGCTGGGAAGCAACC	294
GCSF-T7_A03.ab1	525
pET28a-GCSF	AGGACTCCTCCTGCTCGGCCTGGAAGGCCGACGTGAAGGTGGCATGGTGGCCTGGGTGGGTGCACAGCAGGGGCCACCCCAAGTCTCCATCTGCA	394
GCSF-T7_A03.ab1	425
pET28a-GCSF	GCCAGATGTTGGTGGCAAAGTCGGTGACGTCCAGCTGCAGTGTGTCCAAGGTGGGAGCCAACTCTGGGAGATGCCCGCCAGGGCTCAGGAGGCCCTG	494
GCSF-T7_A03.ab1	325
pET28a-GCSF	GTAGAGAAAGAGGCCCGCTGCAGTTGGTCTAGGCAGCTCGTGCAGCTGCAGGGACTGGCTGGAGCAGCTGTAGGGGAGCCTGGGGATGCCAGAGAG	594
GCSF-T7_A03.ab1	225
pET28a-GCSF	TGCCCGAGCAGTACCAGCTCCTCCGGTGGCAGCTTGTGGTGGCAGCAGCCTCTCTGCAGCTGGCGCCATCAGCCTGGATTTTCTCACTTGTCT	694
GCSF-T7_A03.ab1	125
pET28a-GCSF	CTAAGCACTGAGCAGGAAGCTCTGGGGCAGGGAACGGGCAGGGCCAAAGGGGGTGGCCATGGTATATC	763
GCSF-T7_A03.ab1	56

图 1 GCSF 基因片段的测序比对结果

Fig. 1 Alignment of GCSF sequence. The residues that match the pET28a-GCSF were hidden as “.”.

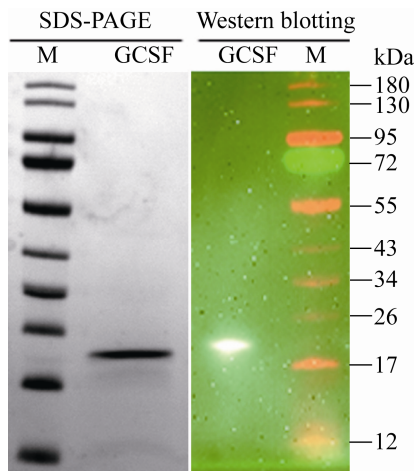


图2 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测纯化的 GCSF 蛋白

Fig. 2 SDS-PAGE and Western blotting analysis of purified GCSF protein.

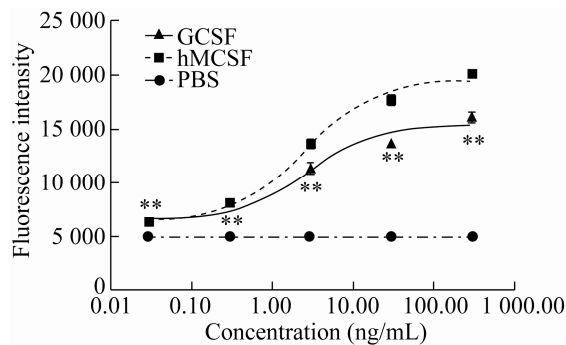


图3 GCSF 蛋白的生物学活性检测结果

Fig. 3 Bioassay of GCSF protein. The data were averaged across subjects and tested for significance by pair-samples *t*-test. The *P* value of GCSF group vs PBS group. **: $P < 0.01$.

2.3 GCSF 对绵羊颗粒细胞增殖的影响

本实验室前期研究显示,体外培养的绵羊卵巢颗粒细胞,第1天颗粒细胞处于贴壁生长期,细胞缓慢生长,培养第2-4天细胞处于分裂高峰期,细胞开始大量增殖进入对数生长期,第4-5天之后,细胞开始走向衰老退化^[17]。本研究中,颗粒细胞中添加了不同浓度的 GCSF 后,连续 2 d,每天定时加入 10 μ L AlamarBlue™ HS 细胞活力试剂溶液后在细胞培养箱内继续孵育 3 h,用 EnVision® 多标记微孔板检测仪在 Ex/Em 分别为 560 nm/590 nm

进行检测。结果如图 4 所示,在培养时间 24 h 和 48 h、GCSF 浓度 0.06–600.00 ng/mL 的范围内,随着加入的 GCSF 终浓度增加,荧光强度增大。其中在 24 h 添加 GCSF 浓度为 6.00 ng/mL 和 60.00 ng/mL 时与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$),浓度为 0.60 ng/mL 和 600.00 ng/mL 时与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$); 48 h 添加 GCSF 浓度为 60.00 ng/mL 和 600.00 ng/mL 时与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。细胞活力与荧光强度成正比。

2.4 GCSF 对绵羊颗粒细胞周期的影响

外源添加 GCSF 培养颗粒细胞 24 h 后,细胞周期拟合结果如图 5 所示,与对照组相比试验组 G1 期细胞比例由 (63.98 \pm 1.32)% 变为 (65.45 \pm 2.39)%,

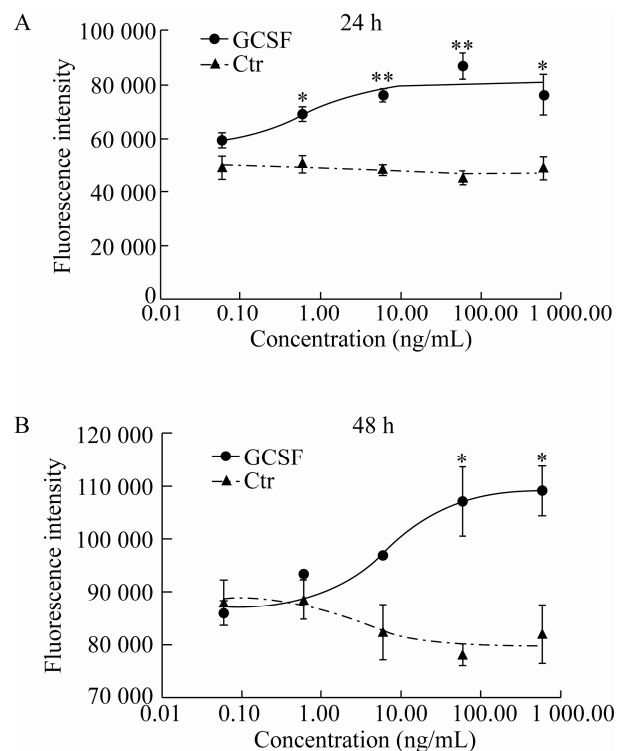


图4 GCSF 对绵羊颗粒细胞增殖的影响

Fig. 4 The effect of GCSF on proliferation of sheep granulosa cells. The data were averaged across subjects and tested for significance by pair-samples *t*-test. The *P* value of GCSF group vs Ctr group. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

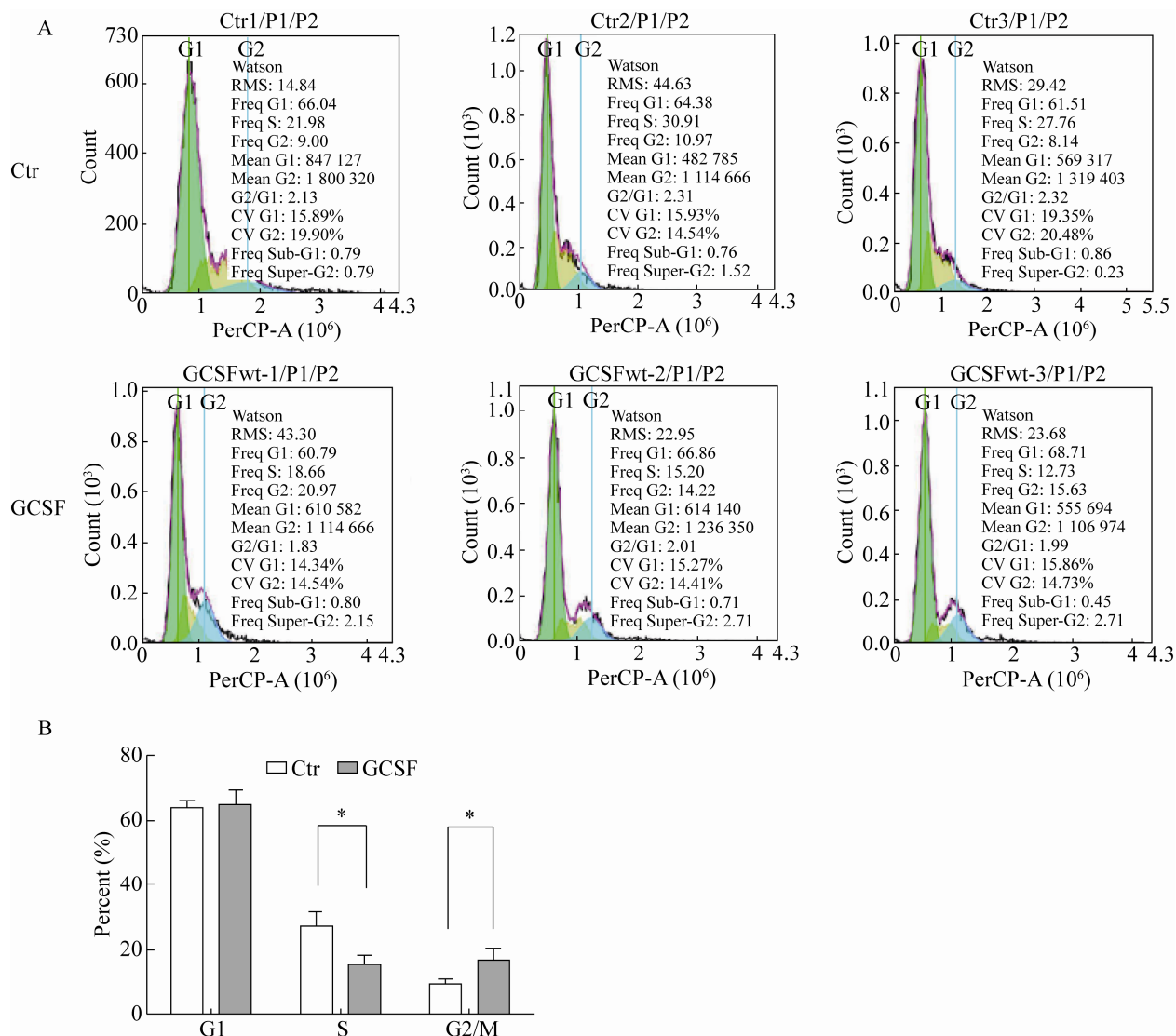


图5 细胞周期比较图

Fig. 5 Cell cycles analysis. (A) Cell cycle histogram of the flow cytometry. (B) The statistical analysis of GCSF group vs Ctr group was based on the values of each phase. Note: The data were averaged across subjects and tested for significance by pair-samples *t*-test. The *P* value of GCSF group vs Ctr group. * *P*<0.05.

略有增加，差异不显著；S期细胞比例由(26.88±2.62)%变为(15.53±1.72)%，显著减少(*P*<0.05)，G2/M期细胞比例由(9.37±0.84)%变为(16.94±2.06)%，显著增多(*P*<0.05)。

2.5 GCSF对绵羊颗粒细胞凋亡的影响

颗粒细胞经GCSF处理后，经过AnnexinV-FITC/PI染色如图6所示，检测结果将凋亡细胞

(早期凋亡和晚期凋亡)、正常活细胞和坏死细胞区分开。24 h时对照组(Ctr)和试验组(GCSF)的凋亡率分别是(7.02±0.35)%和(6.49±0.32)%。48 h时对照组和试验组的凋亡率分别是(10.25±0.51)%和(8.09±0.41)%。试验组凋亡率和对对照组相比，24 h检测时凋亡率差异不显著，48 h检测时凋亡率显著降低(*P*<0.05)。

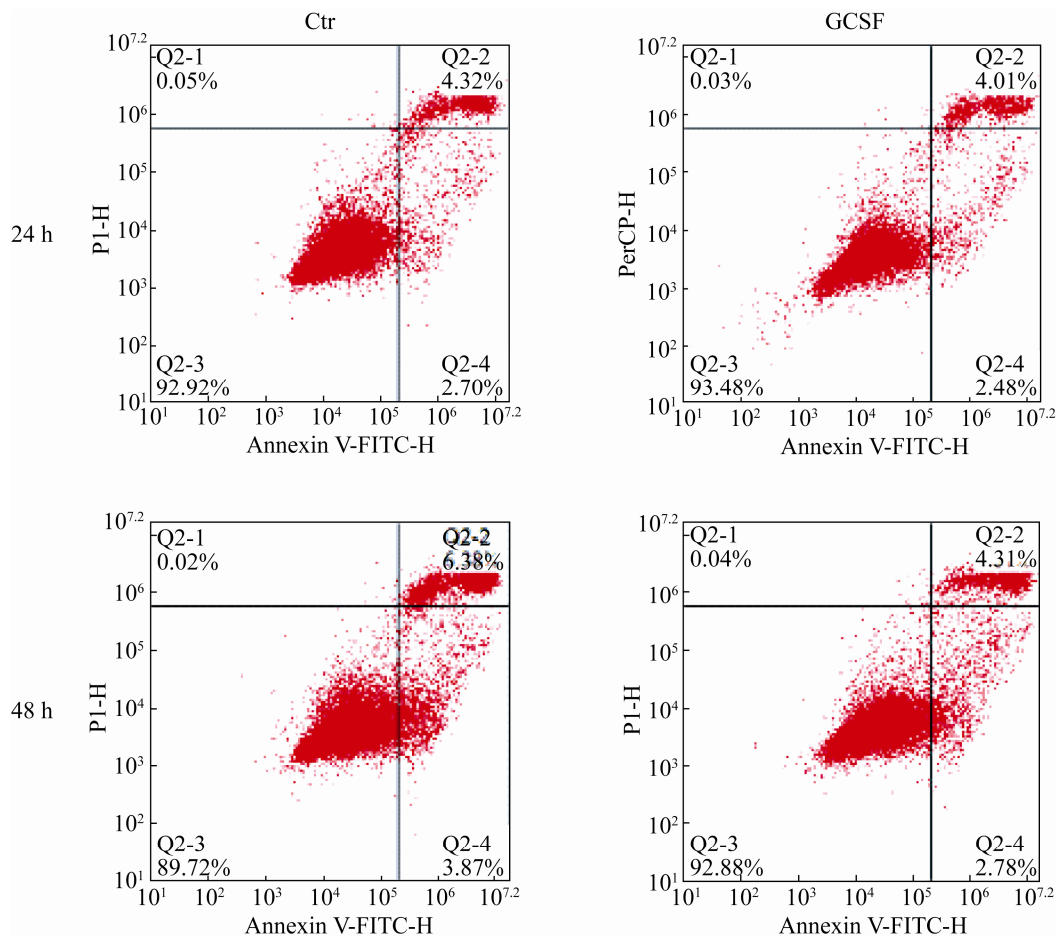


图6 GCSF处理后绵羊颗粒细胞凋亡图

Fig. 6 Treatment with GCSF on apoptosis in cultured sheep granulosa cells. Q2-4: early apoptotic cells; Q2-2: late stage apoptotic cells; Q2-3: normal living cell; Q2-1: dead cells.

3 讨论

GCSF可刺激粒细胞分化,延长中性粒细胞系各个阶段的祖细胞的存活时间,诱导成熟中性粒细胞增殖并提高其存活率,维持其表型,但是该蛋白的半衰期较短,体内研究中其他物种来源的GCSF半衰期一般在24 h以内^[1-6]。持续时间越长,添加到培养基中的GCSF的剩余浓度越小,相对应的生物学活性也会随之降低。本研究表达纯化的羊GCSF蛋白用于活力检测时,参考了以往的研究报道^[6],选择了在培养基中添加羊GCSF蛋白后的48 h这一时间点进行检测;在对颗粒细胞的影响的研究中,也选择了48 h以内的时间点进行检测。

GCSF对绵羊颗粒细胞增殖的影响中,24 h结果中GCSF组与对照组相比有两对是差异极显著的,而48 h结果中仅为差异显著,这也很可能是由于添加到培养基中的GCSF蛋白被代谢消耗后浓度降低造成的。GCSF作为一种生物大分子,需要与其受体GCSF-R (granulocyte colony stimulating factor receptor)结合,相互作用后将信号传导进入细胞。羊GCSF-R在羊颗粒细胞表面是否存在及存在量多少尚未得到验证,有待继续研究。本研究使用的颗粒细胞为同一羊的卵巢中统一条件下分离用于后期实验,可以排除细胞实验条件的差异。此外,细胞增殖、凋亡和周期检测的结果可以互相印证羊

GCSF 促进细胞增殖,抑制细胞凋亡活性。

有研究表明 GCSF 有助于由化疗引起的大鼠卵泡严重损失的恢复^[22-23]。卵泡从生长到成熟期包括募集、选择、优势化和闭锁几个重要环节,仅有少部分卵泡可以在发育过程之后成熟,大部分在卵泡发育的不同阶段逐渐闭锁退化^[24]。在哺乳动物卵泡发育的各个时期受到一些与之相关的分子及信号通路的调控^[24]。吴正中等发现使用 GH 组与未使用 GH 组卵相比,泡液 GH 与 IGF-1 含量及泡液 E2 浓度和卵巢颗粒细胞上 GHR mRNA、IGF-1R mRNA 和 STAR mRNA 的表达水平均显著正相关^[25]。本研究结果表明 GCSF 的添加促进颗粒细胞的增殖。作为集落刺激因子的糖蛋白生长因子中的一员,可能以与 GH 相同的方式发挥作用,需要进一步验证。

细胞进入分裂期后,会严格执行细胞周期各阶段的程序及分子事件。细胞分裂周期主要分为 3 个阶段,包括:G1 期,主要是细胞器的复制,细胞增大;接着,细胞进入 S 期,主要是 DNA 的复制;最后细胞进入 G2/M 期,细胞将各组分平均分配到各个子细胞中。通过流式细胞术可以很容易地检测细胞周期的不同阶段。如本研究图 3 所示,粒细胞经 GCSF 处理后,流式细胞仪结果显示,S 期细胞显著减少,G2/M 期细胞显著增加,处于分裂状态的细胞显著增加,在 GCSF 的动员下,粒细胞分裂速度加快,细胞周期的分布显著改变。

卵巢颗粒细胞的增殖和凋亡在卵泡闭锁中起重要的作用^[26]。在发育卵泡中,10%的粒细胞凋亡将注定卵泡闭锁^[23]。细胞凋亡是一种程序化的细胞自主死亡过程,在细胞凋亡的不同阶段具有不同的生物化学变化和细胞形态特征^[27]。细胞凋亡有死亡受体通路、线粒体通路和内质网通路 3 条信号转导通路。颗粒细胞的凋亡主要参与两个途径(线粒体途径和死亡受体途径),这两个途径都能交汇 Caspase 家族的信号分子。粒细胞凋亡是由 Caspase-3 酶的活性、促凋亡和抗凋亡蛋白决定

的^[21]。有研究显示,GCSF 可以在大鼠脑溢血模型中通过 PI3K/AKT 通路显著调高抗凋亡因子 B 细胞淋巴瘤-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2) 和血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达,抑制促凋亡因子 Caspase-3 的表达,从而影响细胞生长和凋亡^[20,28-29]。本研究的结果显示,外源添加的 GCSF 可能以相同的方式影响细胞周期的分布,促进了颗粒细胞的增殖,抑制了颗粒细胞的凋亡,进而可能影响卵泡的发育及排卵,其分子机制还有待于进一步研究验证。

REFERENCES

- [1] Begley CG, Lopez AF, Nicola NA, et al. Purified colony-stimulating factors enhance the survival of human neutrophils and eosinophils *in vitro*: A rapid and sensitive microassay for colony-stimulating factors. *Blood*, 1986, 68(1): 162-166.
- [2] Clark SC, Kamen R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science*, 1987, 236(4806): 1229-1237.
- [3] Avalos BR, Gasson JC, Hedvat C, et al. Human granulocyte colony-stimulating factor: Biologic activities and receptor characterization on hematopoietic cells and small cell lung cancer cell lines. *Blood*, 1990, 75(4): 851-857.
- [4] Ichinose Y, Hara N, Ohta M, et al. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor and lipopolysaccharide maintain the phenotype of and superoxide anion generation by neutrophils. *Infect Immun*, 1990, 58(6): 1647-1652.
- [5] Do BH, Kang HJ, Song JA, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (gcsf) fused with fc domain produced from *E. coli* is less effective than polyethylene glycol-conjugated gcsf. *Sci Rep*, 2017, 7: 6480.
- [6] Hatfield KJ, Melve GK, Bruserud Ø. Granulocyte colony-stimulating factor alters the systemic metabolomic profile in healthy donors. *Metabolomics*, 2017, 13: 2.
- [7] Nickerson SC. Effect of cytokines on bovine mammary gland immunity. *SAAS Bull Biochem Biotechnol*, 1991, 4: 60-67.

- [8] Cullor JS, Smith W, Fairley N, et al. Effects of human recombinant granulocyte colony stimulating factor (HR-GCSF) on the hemogram of lactating dairy cattle. *Vet Clin Pathol*, 1990, 19(1): 9–12.
- [9] Naumenko N, Pollari E, Kurronen A, et al. Gender-specific mechanism of synaptic impairment and its prevention by gcsf in a mouse model of als. *Front Cell Neurosci*, 2011, 5: 26.
- [10] Mishra VV, Choudhary S, Sharma U, et al. Effects of granulocyte colony-stimulating factor (GCSF) on persistent thin endometrium in frozen embryo transfer (FET) cycles. *J Obstet Gynecol India*, 2016, 66(S1): 407–411.
- [11] Hays PAMA, Nick K, Thea N, et al. Modified bovine g-csf polypeptides and their uses. China. CN102159230A, 2011-08-17 (in Chinese).
安娜·玛莉亚·A·海斯·蒲楠, 尼克·克努森, 席雅·诺曼, 等. 经修饰的牛 G-CSF 多肽和其用途. CN102159230A, 2011-08-17.
- [12] Zhang Y, Axiak-Bechtel S, Cowan CF, et al. Evaluation of immunomodulatory effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on polymorphonuclear cell from dogs with cancer *in vitro*. *Vet Comp Oncol*, 2017, 15(3): 968–979.
- [13] Putz EJ, Eder JM, Reinhardt TA, et al. Differential phenotype of immune cells in blood and milk following pegylated granulocyte colony-stimulating factor therapy during a chronic *Staphylococcus aureus* infection in lactating holsteins. *J Dairy Sci*, 2019, 102(10): 9268–9284.
- [14] Noel L, Donneau A F, Jouan C, et al. Absence of correlation between follicular fluid volume and follicular granulocyte colony-stimulating factor, a predictor of embryo implantation and successful delivery. *Gynecol Endocrinol*, 2020, 36(3): 268–272.
- [15] Kamath MS, Kirubakaran R, Sunkara SK. Granulocyte-colony stimulating factor administration for subfertile women undergoing assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*, 2020, 1: CD013226.
- [16] Cai L, Jeong YW, Jin YX, et al. Effects of human recombinant granulocyte-colony stimulating factor treatment during *in vitro* culture on porcine pre-implantation embryos. *PLoS ONE*, 2020, 15(3): e0230247.
- [17] Tournaye H, D'hooghe T, Verheyen G, et al. Clinical performance of a specific granulocyte colony stimulating factor ELISA to determine its concentration in follicular fluid as a predictor of implantation success during *in vitro* fertilization. *Gynecol Endocrinol*, 2020, 36(1): 44–48.
- [18] Xu S. The mechanism of M-CSF in follicular development and ovulation[D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2015 (in Chinese).
许嵩. M-csf 在卵泡发育和排卵中的作用机制[D]. 南京: 南京医科大学, 2015.
- [19] Zhang W, Xu S, Zhang ZF. Involvement of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in the function of follicular granulosa cells and its molecular mechanism. *J Med Res*, 2016, 45(1): 100–105 (in Chinese).
张薇, 许嵩, 张治芬. M-CSF 对卵泡颗粒细胞功能调节及其分子机制. *医学研究杂志*, 2016, 45(1): 100–105.
- [20] Liang SD, Ma LQ, Gao ZY, et al. Granulocyte colony-stimulating factor improves neurological function and angiogenesis in intracerebral hemorrhage rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(7): 2005–2014.
- [21] Li T, Ma AT, Zhang YJ, et al. Effects of silencing INH α gene by RNAi on cycle, apoptosis-related genes in sheep granulosa cells. *Chin J Anim Vet Sci*, 2017, 48(8): 1551–1556 (in Chinese).
李婷, 马爱团, 张英杰, 等. RNA 干扰 INH α 基因对绵羊颗粒细胞周期及凋亡相关基因表达的影响. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(8): 1551–1556.
- [22] Akdemir A, Zeybek B, Akman L, et al. Granulocyte-colony stimulating factor decreases the extent of ovarian damage caused by cisplatin in an experimental rat model. *J Gynecol Oncol*, 2014, 25(4): 328–333.
- [23] Sameni HR, Seiri M, Safari M, et al. Bone marrow stromal cells with the granulocyte colony-stimulating factor in the management of chemotherapy-induced ovarian failure in a rat model. *Iran J Med Sci*, 2019, 44(2): 135–145.
- [24] Cao JG, Chen M, Li W, et al. Research progresses on the molecular mechanisms underlying mammalian

- follicle development. *Spec Wild Econom Anim Plant Res*, 2018, 40(4): 114–118 (in Chinese).
曹俊国, 陈敏, 李文, 等. 哺乳动物卵泡发育调控分子机制研究进展. *特产研究*, 2018, 40(4): 114–118.
- [25] Wu ZZ, Li XM, Liu LY, et al. Study on the effect of growth hormone on oocyte maturation in patients with polycystic ovary syndrome. *J Reprod Med*, 2019, 28(11): 1346–1351 (in Chinese).
吴正中, 李雪梅, 刘兰云, 等. 生长激素改善多囊卵巢综合症患者卵母细胞成熟度的研究. *生殖医学杂志*, 2019, 28(11): 1346–1351.
- [26] Yao XL, Wang ZB, El-Samahy MA, et al. Roles of vitamin d and its receptor in the proliferation and apoptosis of luteinised granulosa cells in the goat. *Reprod Fertil Dev*, 2019, 32(3): 335–348.
- [27] Xu GQ, Fan JF, Yang SH, et al. The effects of FSH, LH on apoptosis and E₂, P secreting of Yak's granulosa cells cultured *in vitro*. *Chin J Anim Vet Sci*, 2015, 46(6): 932–939 (in Chinese).
徐庚全, 樊江峰, 杨世华, 等. FSH、LH 对体外培养的牦牛卵泡颗粒细胞凋亡及 E₂、P 分泌功能的影响. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(6): 932–939.
- [28] Guan XL, Hou LC, Yang H, et al. Effects of G-CSF on expression of bcl-2 and caspase-3 around hematoma on acute intracerebral hemorrhage (ICH) in rats. *J Apopl Nervous Dis*, 2015, 32(6): 511–513 (in Chinese).
关雪莲, 侯丽淳, 杨慧, 等. G-CSF 对大鼠脑出血周边组织 bcl-2、caspase-3 表达的影响. *中风与神经疾病杂志*, 2015, 32(6): 511–513.
- [29] Yao YL, Li YX, Rehemani A, et al. Cloning of Sp1 gene CDS region of Hu sheep and its effect on proliferation and apoptosis of granulosa cell. *Chin J Anim Vet Sci*, 2017, 48(11): 2098–2106 (in Chinese).
姚一龙, 李隐侠, 安外尔·热合曼, 等. 湖羊 Sp1 基因 CDS 区克隆及其对颗粒细胞增殖和凋亡的影响. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(11): 2098–2106.

(本文责编 郝丽芳)