

EGF 对牛卵母细胞成熟及孤雌发育能力的影响

马 红

(黑龙江农业科学院畜牧研究所, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘要: 研究表明: 表皮生长因子(EGF)对牛卵母细胞的成熟和孤雌激活后发育有促进作用。与对照相比, 添加 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 EGF 就可以明显提高牛卵母细胞体外成熟率、激活后的卵裂率和囊胚率。但 EGF 水平的提高, 对提高卵母细胞成熟率的作用要高于提高后期胚胎发育的作用。 $40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 EGF 的卵母细胞成熟率明显高于 $30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时的成熟率, 但囊胚率未见明显提高。

关键词: 牛; 孤雌激活; 体外培养; 表皮生长因子

中图分类号: S823 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)03-0109-02

Effect of EGF on Oocyte Maturation in Vitro and Parthenogenetic Development Competence

MA Hong

(Animal Husbandry Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Epidemal growth factor (EGF) has been shown to have a positive effect during in vitro maturation (IVM) and parthenogenetic oocyte development. The presence of $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ EGF during IVM significantly increased the proportion of oocytes attaining metaphase II and rates of Cleavage and Blastocyst. However, EGF was more effective to improve oocyte maturation rate than to embryonic development. The oocyte maturation rate was significantly higher with $40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ EGF than $30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, but the rate of blastocyst had not been improved.

Key words: bovine; oocytes; culture; EGF

目前, 卵母细胞的体外成熟和体外培养技术, 已被广泛应用于科学研究、畜牧生产和医学生殖工程中。然而, 体外成熟卵母细胞的质量和发育潜能与体内成熟的卵母细胞相比仍有较大差距^[1]。如何提高卵母细胞的体外成熟质量仍有大量工作要做。卵母细胞的成熟调节是一个复杂的多因子调节过程, 卵母细胞的减数分裂恢复, 常需要促性腺激素、生长因子等诱导卵母细胞成熟, 表皮生长因子(EGF)在卵巢上主要由黄体 and 内膜细胞产生, 是一种卵泡卵母细胞成熟的诱导剂, 其作用与其剂量和作用时间有关^[2]。本研究通过在成熟液中添加不同浓度的 EGF, 探讨其对牛卵母细胞成熟以及胚胎早期发育的影响。

1 材料及方法

1.1 卵巢卵母细胞的采集

将采集的卵巢置于 30°C 含硫酸庆大霉素的灭菌生

理盐水的保温瓶, 3 h 内运回实验室。用预温的生理盐水清洗卵巢, 用 10 mL 注射器吸取卵巢表面 2~5 mm 大小的卵泡, 卵泡液收集于 60 mm 培养皿中, 待用。

1.2 卵丘-卵母细胞复合体的体外成熟培养

1.2.1 成熟液 TCM-199+ 10% FBS 成熟培养基作为对照组, 分别用 10 、 20 、 30 、 40 、 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ EGF 的成熟液培养 COCs, 统计其卵母细胞的成熟率。实验结果重复 3 次以上。

1.2.2 收集可用于成熟培养的卵丘-卵母细胞复合体 (Cumulus Oocyte Complexes, COCs) 将收集的 COCs (见图 1) 在分别用 5 种不同的成熟液清洗 3 遍, 然后置于含成熟培养液的 35 mm 培养皿中, 在 38.5°C 、5% CO_2 和饱和湿度的 CO_2 培养箱中培养。

1.3 成熟卵的检查

将成熟培养后 22 h 的 COCs 置于含 0.2% 透明质酸酶和 5% FBS 的 H-M 199 中, 用 100 μL 的微量移液器反复吹吸, 去掉成熟卵母细胞表面的卵丘细胞, 用含 5% FBS 的 H-M 199 洗涤 3 次, 以排出第一极体为成熟标准, 然后于显微镜下检查成熟率。

收稿日期: 2009-02-12

作者简介: 马红(1974-), 女, 黑龙江省人, 博士, 助理研究员, 从事动物繁殖育种研究。Tel: 13101583001; E-mail: mahong_ok@163.com。

1.4 卵母细胞的孤雌激活及发育培养

选择成熟卵母细胞,放入含 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 离子霉素的H-M199中激活5 min,然后在含 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-DMAP的H-SOF培养液中,于 $38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 和饱和湿度条件下培养4 h,用SOFaa培养液洗涤3次,然后移入以贴壁颗粒细胞为滋养层的含 $10\%\text{FBS}$ 的SOFaa培养液中共培养48 h,检查卵裂率,培养7 d后检查囊胚率。

2 结果与讨论

2.1 EGF对奶牛卵母细胞体外成熟的影响

比较了在成熟液中添加不同浓度(0、10、20、30、40、

$50\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)EGF对奶牛卵母细胞体外成熟的影响(见表1)。实验发现是否添加EGF对牛卵母细胞体外成熟影响很大,与对照相比,添加 $10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的EGF就可以明显提高牛卵母细胞体外成熟率和其后的囊胚率。随着EGF浓度的上升,卵母细胞的成熟率和受精后的囊胚率也随之上升。但EGF水平的提高,对卵母细胞成熟率的提高作用要高于对后期胚胎发育的作用。 $40\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的EGF的卵母细胞成熟率明显高于 $30\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时的成熟率,但囊胚率未见明显提高。

2.2 讨论

其中EGF在卵巢上主要由黄体和内膜细胞产生,

表1 EGF对牛卵母细胞体外成熟的影响

EGF/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	卵母细胞/枚	成熟卵母细胞/枚	成熟率/%	激活卵母细胞数/枚	卵裂/枚	卵裂率/%	囊胚/枚	囊胚率/%
0	304	107	35.3 a	89	49	55.2 a	9	10.1 a
10	286	181	63.3 b	166	127	76.5 b	38	22.9 b
20	295	203	68.8 b	184	142	77.2 b	41	22.3 b
30	305	239	78.4 c	178	137	77.0 b	49	27.5 c
40	314	252	80.3 c	210	167	79.5 c	56	26.9 c
50	320	263	82.2 c	202	159	78.7 c	56	27.7 c

注:同一列数字标注不同字母表示差异显著($P<0.05$);相同字母表示差异不显著($P>0.05$)。

是非胚胎产生的促进胚胎发育的因子,广泛分布于哺乳动物的多种组织,是一种卵泡卵母细胞成熟的诱导剂^[3]。EGF在卵母细胞的成熟过程中起调节作用,它对卵母细胞的成熟分裂启动、极体排出以及受精后的卵裂均具有促进作用^[4]。现已证实,EGF能诱导猪、奶牛卵丘膨胀和促进核成熟,但对裸卵的核则不起作用^[5]。Wang等^[6]也认为这种作用是由卵丘细胞所介导的,因为培养裸卵时,添加EGF没有效果。EGF的作用机理可能与其阻断卵母细胞与卵丘细胞的联系,从而中断cAMP的运输,导致成熟分裂复始或者直接作用于卵母细胞。G.N.Purohit^[7]等的研究证明浓度为 $10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的EGF对水牛卵母细胞体外成熟有促进作用。本实验也发现,少量的EGF即能提高牛卵母细胞体外成熟率。而且,在本实验添加EGF浓度范围内,卵母细胞的成熟率一直随EGF量的增长而提高。Coskun^[8]等报道,EGF能显著提高牛成熟卵母细胞原核的形成率、卵裂率及发育至4~8细胞的比率。在本实验中。随着EGF浓度的上升,体外培养卵母细胞激活后卵裂率及发育至囊胚的比率也随之上升,但对后期发育的促进效果没有对成熟率的提高明显。在 $30\sim 50\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度的EGF成熟的卵母细胞孤雌激活后囊胚率未见明显差异提高。由此看来,EGF可以显著的提高牛卵母细胞的成熟率和孤雌激活后的发育能

力,但对两者的促进能力并不完全一致。

参考文献:

[1] 张晓建,安志兴.不同添加成分对绵羊卵母细胞体外成熟的影响[J].动物医学进展,2008,29(6):28-31.

[2] 王建辰.家畜生殖内分泌学[M].北京:农业出版社,2003.

[3] Keskinete L, Brackett B G. In vitro developmental competence of in vitro matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media[J]. Biol Reprod, 1996, 55(2): 333-339.

[4] Lorenzo P L, Illera M J. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation on in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin like growth factor[J]. J Reprod Fertil, 1994, 101(3): 697-701.

[5] 李朝军,王斌,范必勤. EGF促进小鼠卵母细胞体外减数分裂启动机制的研究[J]. 实验生物学报, 1995, 28(2): 131-135.

[6] Wang W, Niwa K. Synergetic effects of EGF factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocytes in a serum-free medium[J]. Zygote, 1995(3): 345-350.

[7] Purohit G N, Brady M S, Sharma S S. Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development in vitro[J]. Animal Reproduction Science, 2005, 87: 229-239.

[8] Coskun S, Sanbuisso A, Lin Y C, et al. Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor (EGF)[J]. Theriogenology, 1991, 36: 485-494.