

IGF-I、TGF- α 、bFGF 对猪卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

刘珠果¹, 尚书江², 阎新龙¹, 吴晓洁¹, 邓继先¹

(¹军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071; ²军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

摘要: 研究了 IGF-I、bFGF、TGF- α 3 种细胞因子单独或者联合作用对猪卵母细胞体外成熟和孤雌激活后卵裂的影响, 以确立猪卵母细胞体外成熟的最佳条件。结果表明, 3 种细胞因子对卵母细胞的成熟和激活后卵裂呈现双重效应 (1) 20 ng·ml⁻¹ 的 IGF-I 的成熟率和卵裂率显著的高于对照组和 10、30、40、50、100 ng·ml⁻¹ 组 [(85.3 ± 2.11)%, (85.4 ± 2.81)%; (71.1 ± 1.91)%, (62.5 ± 0.98)%; (77.5 ± 2.5)%, (59.1 ± 3.93)%; (61.9 ± 1.72)%, (54.3 ± 3.48)%; (58.6 ± 4.26)%, (53.1 ± 1.23)%; (44.4 ± 5.10)%, (49.8 ± 3.55)%; (33.9 ± 3.48)%, (46.1 ± 3.59)%, $P < 0.05$], 当 IGF-I 的浓度达到 100 ng·ml⁻¹ 时, 成熟率 (33.9 ± 3.48)% 和卵裂率 (46.1 ± 3.59)% 降低, 与其它各组相比差异显著 ($P < 0.05$)。 (2) 20 ng·ml⁻¹ 的 bFGF 的成熟率 (85.0 ± 1.70)% 和卵裂率 (85.0 ± 2.82)% 最高, 和其它各组相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。 (3) 15 ng·ml⁻¹ 的 TGF- α 的成熟率 (86.9 ± 0.46)% 和卵裂率 (86.3 ± 2.01)% 最高, 和其它各组相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。 (4) 15 ng·ml⁻¹ TGF- α 和 20 ng·ml⁻¹ bFGF 联用组, 卵母细胞成熟率和分裂率显著高于 20 ng·ml⁻¹ bFGF 和 20 ng·ml⁻¹ IGF-I 联合组; 15 ng·ml⁻¹ TGF- α 和 20 ng·ml⁻¹ IGF-I 联合组; 与 20 ng·ml⁻¹ bFGF、20 ng·ml⁻¹ IGF-I 和 15 ng·ml⁻¹ TGF- α 三者联用组。 [(89.2 ± 1.44)% 和 (88.8 ± 0.17)%, (75.6 ± 0.98)% 和 (78.3 ± 1.65)%; (77.2 ± 2.54)% 和 (80.2 ± 2.26)%; (76.4 ± 1.28)% 和 (77.4 ± 3.73)%, $P < 0.05$]。

关键词: IGF-I; bFGF; TGF- α ; 猪; 卵母细胞; 体外成熟; 胚胎分裂

Effects of IGF-I, TGF- α , bFGF on Porcine Oocytes Maturation *in vitro* and Oocytes Cleavage

LIU Zhu-guo¹, SHANG Shu-jiang², YAN Xin-long¹, WU Xiao-jie¹, DENG Ji-xian¹

(¹Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071;

²Center of Laboratory Animal, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071)

Abstract: Effects of IGF-I, bFGF, TGF- α separation or combination on porcine oocytes maturation *in vitro* and cleavage after parthenogenetic activation were studied. The results showed that: (1) The maturation rate and the cleavage rate derived from oocytes matured in medium supplemented with 20 ng·ml⁻¹ IGF-I is significantly higher compared with control and 10, 30, 40, 50, 100 ng·ml⁻¹ groups [(85.3 ± 2.11)%, (85.4 ± 2.81)%; (71.1 ± 1.91)%, (62.5 ± 0.98)%; (77.5 ± 2.5)%, (59.1 ± 3.93)%; (61.9 ± 1.72)%, (54.3 ± 3.48)%; (58.6 ± 4.26)%, (53.1 ± 1.23)%; (44.4 ± 5.10)%, (49.8 ± 3.55)%; (33.9 ± 3.48)%, (46.1 ± 3.59)%, $P < 0.05$], however when IGF-I solution arrive to 100 ng·ml⁻¹, the maturation rate and the cleavage rate is greatly significant lower than other group ($P < 0.05$); (2) The maturation rate (85.0 ± 1.70)% and the cleavage rate (85.0 ± 2.82)% derived from oocytes matured in medium supplemented with 20 ng·ml⁻¹ bFGF is greatly significant higher than other group ($P < 0.05$); (3) The maturation rate (86.9 ± 0.46)% and the cleavage rate (86.3 ± 2.01)% derived from oocytes matured in medium supplemented with 15 ng·ml⁻¹ TGF- α is greatly significant higher than other group ($P < 0.05$); (4) The maturation rate and the cleavage rate derived from oocytes matured in medium supplemented with 15 ng·ml⁻¹ TGF- α and 20 ng·ml⁻¹ bFGF is significantly higher compared with 20 ng·ml⁻¹ bFGF and 20 ng·ml⁻¹ IGF-I group; 15 ng·ml⁻¹ TGF- α and 20 ng·ml⁻¹ IGF-I group, 20 ng·ml⁻¹ bFGF, 20 ng·ml⁻¹ IGF-I and 15 ng·ml⁻¹ TGF- α combination group. [(89.2 ± 1.44)% and

收稿日期: 2004-08-18

基金项目: “863” 重大专项资助 (2002AA206621)

作者简介: 刘珠果 (1978-), 男, 重庆人, 硕士, 主要从事胚胎生物技术与发育的基因调控的研究。Tel: 010-66948841; E-mail: liuzhuguo@126.com。邓继先为通讯作者, Tel: 010-66948838; E-mail: dengjx@lycos.com

(88.8±0.17)%、(75.6±0.98)% and (78.3±1.65)% ; (77.2±2.54)% and (80.2±2.26)% ; (76.4±1.28)% and (77.4±3.73)%, $P<0.05$].

Key words: IGF-I; bFGF; TGF- α ; Pig; Oocyte; *In vitro* maturation; Oocytes cleavage

卵母细胞的体外成熟 (IVM) 可以为采用体细胞核移植的方法生产大型转基因动物的研究提供大量的 M II 期卵母细胞。自意大利科学家 Mattioli 最先进行猪卵母细胞的体外培养研究至今, 许多研究者致力于这方面的工作, 猪卵母细胞的体外成熟技术取得了很大的进展, 如 NCSU 系列培养基的出现, 大腔卵泡液^[1], 不同激素组合的添加, 半胱氨酸^[2]和颗粒细胞等的运用, 但仍存在一些亟待解决的问题, 如与体内成熟的卵母细胞相比, 体外成熟的卵母细胞生产的体细胞克隆胚在体外的发育能力低, 囊胚数目少, 产仔率下降, 这些都说明了体外成熟的卵母细胞胞质成熟不充分。近几年的研究表明, IGF-I^[3]、bFGF^[4,5]、TGF- α ^[6]等细胞因子在卵母细胞成熟和胚胎发育过程中具有重要的作用, 除 Coskun 报道了 TGF- α 对猪卵母细胞体外成熟的作用外, 至今未见关于 bFGF、TGF- α 和三者连用在猪卵母细胞成熟和胚胎发育过程中作用的报道。本研究目的是探索 IGF-I、bFGF、TGF- α 3 种细胞因子单独或者联合作用对猪卵母细胞体外成熟和孤雌激活后胚胎分裂的影响, 优化培养条件, 为体细胞核移植技术生产转基因克隆猪提供大量优质的卵母细胞, 以提高体细胞克隆猪的成功率。

1 材料与方 法

1.1 药品及试剂

丙酮酸钠 (Hyclone 公司产品), bFGF (Gibco 公司产品), 其它药品均为 Sigma 公司产品。

1.2 猪卵巢及卵丘-卵母细胞复合体 (COCs) 的收集

猪卵巢采集于北京丰台友谊屠宰场。摘取刚屠宰的母猪卵巢, 立即置入添加双抗的 35℃ 灭菌生理盐水中 1.5 h 内送回实验室。卵巢组织用灭菌的生理盐水清洗 3 次, 除尽周围的脂肪和系膜, 用灭菌的医用纱布吸干后, 用 18 号针头的无菌注射器 (内有少量平衡后的 TL-HEPES-PVA) 抽取卵巢表面直径为 2~6 mm 的卵泡, 在体视显微镜下捡卵。试验采用卵丘颗粒细胞在 3 层或以上, 包裹致密, 卵母细胞胞质黑色均一的 COCs 用于成熟培养 (图 1)。

1.3 卵母细胞的体外成熟培养

捡出的 COCs 用 DPBS 和培养液分别洗涤 3 次, 最后移入含有成熟培养液滴的 35 mm 培养皿中。每个液滴 100 μ l, 覆盖石蜡油, 每滴放 COCs 20 枚。液滴

预先在 39℃、5% 的 CO₂ 与饱和湿度条件下的培养箱中平衡 2 h 以上。基础成熟培养液 NCSU-23 中添加有 0.22 mg·L⁻¹ 丙酮酸钠、10% (v/v) 的猪卵泡液 (PFF)、1% (v/v) 非必需氨基酸、10 IU·ml⁻¹ PMSG、10 IU·ml⁻¹ hCG、75 mg·L⁻¹ 青霉素、50 mg·L⁻¹ 硫酸链霉素。

1.4 卵母细胞成熟的判定

体外培养 44 h 的卵母细胞 (图 2), 经含 0.1% 透明质酸酶的 PBS 消化除去卵丘, 10 μ g·ml⁻¹ Hoechst 33342 染色, 荧光显微镜观察染色体和极体 (图 3), M-II 为成熟卵母细胞 (图 4)。

1.5 成熟卵母细胞的孤雌激活

将上述经 0.1% 透明质酸酶消化除去卵丘颗粒细胞的成熟卵母细胞, 用含 4% BSA 的 NCSU-23 培养液洗涤 3 次, 将其置于含 20 μ mol Ionomycin 的 NCSU-23 中作用 30 min, 再用上述培养液洗涤 3 次后置入含 5 mmol·L⁻¹ 6-DMAP 的 NCSU-23 中作用 3.5 h, 最后经上述培养液洗涤 3 次后, 转入同培养液中继续培养。本试验将培养 36 h 后分裂的卵母细胞 (图 5) 定为激活的卵母细胞。

1.6 激活卵母细胞的培养

卵母细胞经激活后转入 100 μ l 液滴中培养, 每个液滴放激活胚 20 枚, 培养条件为 39℃、5% CO₂、饱和湿度, 培养基为含 4% BSA 的 NCSU-23。入胚 36 h 检查激活卵母细胞的分裂率。

1.7 数据分析

为了降低季节、卵巢来源和试验批次造成的误差, 试验 1~4 表格中的数据均在同一季节、相同卵巢来源和试验条件所得, 试验重复 4 次。每个表格的数据用 SAS 软件检查数据的正态性和方差齐性满足条件后用 ANOVA 模块分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的 IGF-I 对猪卵母细胞体外成熟和孤雌激活后卵裂的影响

NCSU-23 基础培养液中添加不同浓度的 IGF-I, 试验组的卵丘扩散早, 成熟率和卵裂率高, 但细胞因子浓度对猪卵母细胞成熟和卵裂表现为双重效应。当 IGF-I 的浓度在 0~20 ng·ml⁻¹ 时, 能促进卵母细胞的成熟和孤雌激活后的卵裂, 呈现浓度依赖性。同其它试验组和对照组相比, 添加 20 ng·ml⁻¹ 的 IGF-I 显著的

提高了成熟率和卵裂率, 达 (85.3 \pm 2.11) % 和 (85.4 \pm 2.81) %, 差异显著 ($P < 0.05$)。当 IGF-I 的浓度继续增加, 成熟率和卵裂率显著下降, 当 IGF-I 的浓度为 100 ng·ml⁻¹ 时, 成熟率和卵裂率极低, 为 (33.9 \pm 3.48) % 和 (46.1 \pm 3.59) %, 低于对照组和其它各组, 差异显著 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.2 不同浓度的 bFGF 对猪卵母细胞体外成熟和孤雌激活后卵裂的影响

卵母细胞在不同浓度的 bFGF 的 NCSU-23 中培养, 其成熟率和卵裂率各不相同, 和 IGF-I 类似, bFGF 对猪卵母细胞的成熟和卵裂也表现为双重效应。低浓度和中等浓度的 bFGF 能促进猪卵母细胞的成熟和激

表 1 不同浓度的 IGF-I 对卵母细胞体外成熟和孤雌激活后卵裂的影响

Table 1 Effects of different solution of IGF-I on the porcine oocytes maturation *in vitro* and oocytes cleavage after parthenogenetic activation

组别	培养个数	44 h 成熟率	激活卵数	36 h 卵裂率
Group	Number of oocytes	Rate of maturation of 44 h (%)	Oocytes activated	Rate of cleavage of 36 h (%)
NCSU-23	90	71.1 \pm 1.91B	64	62.5 \pm 0.98 E
NCSU-23+10 ng·ml ⁻¹ IGF-I	90	77.5 \pm 2.5B	70	59.1 \pm 3.93 EB
NCSU-23+20 ng·ml ⁻¹ IGF-I	90	85.3 \pm 2.11A	77	85.4 \pm 2.81 A
NCSU-23+30 ng·ml ⁻¹ IGF-I	90	61.9 \pm 1.72C	56	54.3 \pm 3.48 BC
NCSU-23+40 ng·ml ⁻¹ IGF-I	90	58.6 \pm 4.26C	53	53.1 \pm 1.23BCD
NCSU-23+50 ng·ml ⁻¹ IGF-I	90	44.4 \pm 5.10D	40	49.8 \pm 3.55 CD
NCSU-23+100 ng·ml ⁻¹ IGF-I	90	33.9 \pm 3.48E	31	46.1 \pm 3.59 D

—列中不同大写字母为差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母为差异不显著 ($P > 0.05$), 重复次数 $n=5$ 。下同

Values in the same column with different capital letters meant significant difference ($P < 0.05$), with the same letters meant no statistical difference ($P > 0.05$), repeat number ($n=5$). The same as below

活后的卵裂, 在含 $20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ bFGF 的 NCSU-23 的培养液中, 卵母细胞的成熟率和卵裂率最高, 达 $(85.0 \pm 1.70)\%$ 和 $(85.0 \pm 2.82)\%$, 和其它各组相比, 差异

显著 ($P < 0.05$)。随着 bFGF 浓度的继续升高, 成熟率和卵裂率有所下降, 成熟率和对照组相比, 差异显著 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 不同浓度的 bFGF 对卵母细胞体外成熟和激活后卵裂的影响

Table 2 Effects of different solution of bFGF on the porcine oocytes maturation *in vitro* and oocytes cleavage after parthenogenetic activation

组别	培养个数	44 h 成熟率	激活卵数	36 h 卵裂率
Group	Number of oocytes	Rate of maturation of 44 h (%)	Oocytes activated	Rate of cleavage of 36 h (%)
NCSU-23	100	72.2±1.33 B	72	63.4±8.10 CD
NCSU-23+10 ng·ml ⁻¹ bFGF	100	79.4±4.18 B	79	72.3±2.52 B
NCSU-23+20 ng·ml ⁻¹ bFGF	100	85.0±1.70 A	85	85.0±2.82 A
NCSU-23+30 ng·ml ⁻¹ bFGF	100	66.7±3.35 C	67	53.8±3.96 D
NCSU-23+40 ng·ml ⁻¹ bFGF	100	63.6±3.76 C	64	54.6±1.73 D
NCSU-23+50 ng·ml ⁻¹ bFGF	100	61.9±1.72 C	62	62.8±1.50 C
NCSU-23+100 ng·ml ⁻¹ bFGF	100	58.9±1.68 C	58	55.5±3.30 D

2.3 不同浓度的 TGF- α 对卵母细胞体外成熟和激活后卵裂的影响

在预试验中发现 $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ bFGF 和 $20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ bFGF 对卵母细胞成熟率的影响不大, 但 $30 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ bFGF 反而使卵母细胞的成熟率降低, 因此笔者选择了 $5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ bFGF 浓度变化梯度进行试验, 结果发现在 6 种不同浓度的 TGF- α 的 NCSU-23 培养液中, 和其它

试验组相比, $15 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ bFGF 能显著提高卵母细胞的成熟率和卵裂率, 为 $(86.9 \pm 0.46)\%$ 和 $(86.3 \pm 2.01)\%$, 差异显著 ($P < 0.05$)。随着浓度的继续升高, 成熟率和卵裂率开始下降, 当浓度为 $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 时, 成熟率和卵裂率下降比较明显, 成熟率和对照相比, 差异显著 ($P < 0.05$, 表 3)。

表 3 不同浓度的 TGF- α 对卵母细胞体外成熟和激活后卵裂的影响

Table 3 Effects of different solution of TGF- α on the porcine oocytes maturation *in vitro* and oocytes cleavage after parthenogenetic activation

组别	培养个数	44 h 成熟率	激活卵数	36 h 卵裂率
Group	Number of oocytes	Rate of maturation of 44 h (%)	Oocytes activated	Rate of cleavage of 36 h (%)
mNCSU-23	100	73.3±3.35 B	73	60.8±0.12 C
mNCSU-23+5 ng·ml ⁻¹ TGF- α	100	75.8±2.23 A	76	58.3±3.13 BC
mNCSU-23+10 ng·ml ⁻¹ TGF- α	100	75.0±1.70 B	75	64.7±8.66 A
mNCSU-23+15 ng·ml ⁻¹ TGF- α	100	86.9±0.46 B	87	86.3±2.01 A
mNCSU-23+20 ng·ml ⁻¹ TGF- α	100	74.4±5.10 B	75	54.9±2.03 C
mNCSU-23+25 ng·ml ⁻¹ TGF- α	100	63.3±3.35 C	63	53.9±1.22 C
mNCSU-23+100 ng·ml ⁻¹ TGF- α	100	61.1±1.91 C	61	52.7±2.75 C

2.4 IGF、bFGF、TGF- α 3 种细胞因子联合运用对卵母细胞体外成熟和激活后卵裂的影响

将卵母细胞分别培养于单一细胞因子或者 3 种细胞因子两两联用和三者联用的培养液中, 和对照组相比, 都能促进卵母细胞的成熟, 差异显著 ($P < 0.05$)。在试验组中, bFGF 和 TGF- α 联用效果最好, 成熟率

和卵裂率最高, 均达 $(89.2 \pm 1.44)\%$ 和 $(88.8 \pm 0.17)\%$, 同对照组和含 IGF-I 组相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。3 种细胞因子单独运用组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。但 IGF 和 bFGF 组与 IGF-I 和 TGF- α 组以及三者联合运用组对卵母细胞的成熟作用低于三者单独运用组和 TGF- α 和 bFGF 联用组, 差异显著 ($P < 0.05$) (表 4)。

表 4 IGF、bFGF、TGF- α 3 种细胞因子联合运用对卵母细胞体外成熟和激活后卵裂的影响Table 4 Effects of different combination of IGF, bFGF, TGF- α on the porcine oocytes maturation *in vitro* and oocytes cleavage after parthenogenetic activation

组别	卵数	44 h 成熟率	激活卵数	36 h 卵裂率
Group	Number of oocytes	Rate of maturation of 44 h (%)	Oocytes activated	Rate of cleavage of 36 h (%)
NCSU-23	90	74.4 \pm 0.98 A	66	61.9 \pm 1.81 B
NCSU-23+15 ng·ml ⁻¹ TGF- α	90	85.6 \pm 0.98BC	79	87.2 \pm 2.31 A
NCSU-23+20 ng·ml ⁻¹ bFGF	90	87.2 \pm 2.54 C	77	86.0 \pm 1.91 A
NCSU-23+20 ng·ml ⁻¹ IGF-I	90	88.3 \pm 2.89 C	78	86.1 \pm 2.10 A
NCSU-23+15 ng·ml ⁻¹ TGF- α +20ng·ml ⁻¹ bFGF	90	89.2 \pm 1.44 C	80	88.8 \pm 0.17 A
NCSU-23+15 ng·ml ⁻¹ TGF- α +20 ng·ml ⁻¹ IGF-I	90	77.2 \pm 2.54 AB	70	80.2 \pm 2.26AC
NCSU-23+20 ng·ml ⁻¹ bFGF +20 ng·ml ⁻¹ IGF-I	90	75.6 \pm 0.98 A	68	78.3 \pm 1.65AC
NCSU-23+15 ng·ml ⁻¹ TGF- α +20 ng·ml ⁻¹ bFGF+20 ng·ml ⁻¹ IGF-I	90	76.4 \pm 1.28 A	69	77.4 \pm 3.73 C

3 讨论

胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor-I, IGF-I) 是一种作用于多种组织和多种器官的多效性细胞营养因子, 所属家族成员由两种低分子多肽 (IGF-I、IGF-II)、两类特异性受体 (IGF-I 受体、IGF-II 受体)、7 种结合蛋白 (IGF binding protein, IGFBPs) 及 IGF-I 结合蛋白酶组成。近年来的研究发现, EGF、IGF-I、IGF-II 等细胞因子对哺乳动物卵母细胞具有重要作用, EGF 在哺乳动物卵母细胞成熟中的作用已经被很多试验证明, 它可以部分替代激素、卵泡液和血清^[7]。Xia 研究发现 IGF-I 能促进卵子的卵裂, 卵子受精后用 IGF-I 处理, 增强了卵子的卵裂率, 本研究发现 IGF-I 对猪卵母细胞的成熟具有双向作用, 一定浓度的 IGF-I 对卵母细胞成熟具有促进作用, 高浓度的 IGF-I 对卵母细胞的成熟有抑制作用, 添加 20 ng·ml⁻¹ 的 IGF-I 显著的提高了成熟率和卵裂率, 达 (85.3 \pm 2.11) % 和 (85.4 \pm 2.81) %, 差异显著 ($P < 0.05$)。当 IGF-I 的浓度为 100 ng·ml⁻¹ 时, 成熟率和卵裂率降低, 为 (33.9 \pm 3.48) % 和 (46.1 \pm 3.59) %, 低于对照组和其它各组, 差异显著 ($P < 0.05$)。一定浓度的 IGF-I 促进猪卵母细胞成熟的机理, Sirotkin 研究认为 IGF-I 增强了细胞内蛋白激酶 A (PKA) 的水平, 可能对猪卵母细胞成熟有促进作用。此外, 当在成熟培养液中添加 IGF-I 的时候, Xia 检测了猪卵丘颗粒细胞中胸腺嘧啶脱氧核

昔的含量, 结果发现随着 IGF-I 的添加颗粒细胞中胸腺嘧啶脱氧核苷的含量增加了, 这是否与 IGF-I 促进卵母细胞的成熟相关, 还有待进一步探讨。笔者也对一定浓度 IGF-I 促进猪卵母细胞成熟的机理进行了初步探讨, 研究认为 IGF-I 促进卵母细胞成熟可能是通过 Akt 和 ERK 激酶起作用。

碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 对卵母细胞成熟的作用还未见报道, Watson 用巢式 RT-PCR 检测到了人卵丘颗粒细胞中 bFGF 的转录, 本研究发现 bFGF 对猪卵母细胞的成熟也具有重要作用, 一定浓度的 bFGF 能促进卵母细胞成熟, 卵母细胞在含有不同浓度 bFGF 的 NCSU-23 中培养, 其成熟率和卵裂率各不相同, 在含 20 ng·ml⁻¹bFGF 的 NCSU-23 培养液中, 卵母细胞的成熟率和卵裂率最高, 达 (85.0 \pm 1.70) % 和 (85.0 \pm 2.82) %, 和其它各组相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。bFGF 促进卵母细胞成熟的机理可能与颗粒细胞表达其受体有关, 通过配体受体的相互作用, 启动了一系列的级连信号通路, 促进了猪卵母细胞的成熟。

转移生长因子- α (TGF- α) 在哺乳动物卵母细胞的体外成熟过程中具有重要作用, 为了研究细胞因子对卵母细胞成熟的作用, 常采用无血清的培养体系, 对 TGF- α 在卵母细胞成熟的作用研究中, Coskun 研究认为 TGF- α 对卵丘-卵母细胞复合体的成熟具有促进作用, 研究还发现添加 TGF- α 对裸卵的成熟没有促

进作用, Coskun 研究认为在猪卵母细胞成熟过程中, 卵丘细胞表达了 TGF- α 的受体, 当培养基中加入 TGF- α 时, 就能与其受体结合, 通过细胞信号转导, 而发挥作用, 促进卵丘细胞扩散, 并通过卵丘细胞与卵母细胞之间的连接结构作用于卵母细胞, 促进卵母细胞的成熟^[8]。本研究发现 15 ng·ml⁻¹ TGF- α 能显著提高卵母细胞的成熟率和卵裂率, 为 (86.9±0.46)% 和 (86.3±2.01)%, 差异显著 ($P<0.05$)。随着浓度的升高, 其呈现的作用和 IGF-I 相似, 抑制了卵母细胞的成熟, 其抑制卵母细胞成熟的机理有待进一步研究。

IGF、bFGF、TGF- α 3 种细胞因子联合运用对卵母细胞体外成熟和激活后卵裂的作用也未见报道, 本研究发现 bFGF 和 TGF- α 对卵母细胞的成熟有协同作用, 同其它联用组和对照组相比能促进卵母细胞的成熟, 成熟率最高。但当三者联合运用时, 其促成熟效果反而降低, 而且 IGF-I 和 bFGF 及与 TGF- α 联用的效果都不如 bFGF 和 TGF- α 对卵母细胞的成熟效果好, 由此推测, IGF-I 和 bFGF、TGF- α 有部分拮抗作用, 其具体作用的分子机理有待以后的试验研究。卵母细胞的成熟包括细胞核成熟和细胞质成熟两方面, 而且胞质成熟对于胚胎的发育更为重要, 它是胚胎发育的物质基础。本试验主要研究了猪卵母细胞孤雌激活后卵裂的情况, 也是对卵母细胞胞质成熟好坏的一个初步判定。通过研究发现, 适当浓度的 3 种细胞因子 IGF-I、bFGF、TGF- α 不仅能促进卵母细胞的成熟, 而且能提高卵母细胞激活后的卵裂率。这从一个侧面说明 3 种细胞因子对于猪卵母细胞胞质的成熟有促进作用, 当 3 种细胞因子两两或者三者联用时对猪卵母细胞的成熟和激活后的卵裂也具有促进作用, 只有当 bFGF 和 TGF- α 联合运用时才显著促进了激活卵母细胞的分裂, 其促分裂的效果最好, 分析可能是由于卵母细胞的胞质在 bFGF 和 TGF- α 的培养基中成熟更充分。3 种细胞因子对于后期胚胎发育有何作用, 以及其分子机制有待进一步研究。

4 结 论

适当浓度的 IGF-I、bFGF、TGF- α 3 种细胞因子单独作用对猪卵母细胞体外成熟和孤雌激活后胚胎的分裂具有促进作用, 当 3 种细胞因子联合作用时,

bFGF 和 TGF- α 对卵母细胞的成熟和孤雌激活后胚胎的分裂效果最好, 而 IGF-I 和 bFGF、TGF- α 有部分拮抗作用, 3 种细胞因子对猪卵母细胞体外成熟和孤雌激活后胚胎分裂的具体作用机制有待以后的试验进行研究。

References

- [1] Sun Q Y, Lai L X, Bonk A, Prather R S, Schatten H. Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition. *Molecular Reproduction Development*, 2001, 59:192-198.
- [2] Yamauchi N, Nagai T. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine. *Biology of Reproduction*, 1999, 61:828-833.
- [3] Sabine K, Miodrag S, Gudrun B, Eckhard W, Fred S. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis, and expression of connexin 43 in bovine *in vitro* maturation cumulus-oocyte complexes. *Biology of Reproduction*, 2003, 68:1 584-1 589.
- [4] Bettina B, Miodrag S, Eckhard W, Heinrich M, Ralf E. Growth factors and components for extracellular proteolysis are differentially expressed during *in vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Biology of Reproduction*, 1998, 59: 801-806.
- [5] Yumiko Y, Motoharu M, Seizo H, Mitsutoshi Y. Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during *in vitro* maturation and after fertilization *in vitro*. *Journal Veterinary Medical Science*, 1998, 60(5): 549-554.
- [6] Reeka N, Berg F D, Brucker C. Presence of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human ovarian tissue and follicular fluid. *Human Reproduction*, 1998, 13(8): 2 199-2 205.
- [7] Abeydeera L R, Wang W H, Cantley T C, Rieke A, Murphy C N, Prather R S, Day B N. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology*, 2000, 54: 787-797.
- [8] Coskun S, Lin Y C. Effects of transforming growth factors and activin-A on *in vitro* porcine oocyte maturation. *Molecular Reproduction Development*, 1994, 38(2): 153-159.

(责任编辑 林鉴非)