

# EGF 和 IGF-I 对绵羊卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

刘丑生<sup>1</sup>, 陆会宁<sup>2</sup>, 张利平<sup>2</sup>, 王志刚<sup>1</sup>, 赵俊金<sup>1</sup>, 孟飞<sup>1</sup>

(1. 全国畜牧兽医总站畜禽牧草种质资源保存利用中心, 北京 100094;

2. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 兰州 730070)

**摘要:** 本文研究了 EGF、IGF-I 以及 EGF 和 IGF-I 联合对绵羊卵母细胞体外成熟和卵裂的影响, 以确立绵羊卵母细胞体外成熟的最佳条件。结果表明: 50 ng/mL 的 EGF 的成熟率和卵裂率分别为 71.2% 和 45.5%, 显著高于对照组和 10、20、30、40 ng/mL 组 ( $P < 0.05$ ), 当 EGF 浓度达到 100 ng/mL 时, 成熟率和卵裂率最高, 分别为 72.9% 和 45.7%; 40 ng/mL IGF-I 的成熟率和卵裂率分别为 70.7% 和 58.5%, 显著高于对照组和 10、20、60、80、100 ng/mL 组 ( $P < 0.05$ ), 当 IGF-I 的浓度为 100 ng/mL 时, 成熟率和卵裂率最低, 分别为 38.8% 和 20.0%, 与对照组和其它各试验组差异显著 ( $P < 0.05$ ); 50 ng/mL EGF 和 40 ng/mL IGF-I 联合使用, 成熟率和卵裂率分别为 85.6% 和 61.0%, 同对照组和 50 ng/mL EGF 组、40 ng/mL IGF-I 组之间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

**关键词:** 绵羊; 卵母细胞; 体外成熟; 卵裂; 表皮生长因子; 胰岛素生长因子-I

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)05-0588-06

## Effects of EGF, IGF-I on *in vitro* Maturation and Cleavage of Ovine Oocytes

LIU Chou-sheng<sup>1</sup>, LU Hui-ning<sup>2</sup>, ZHANG Li-ping<sup>2</sup>,

WANG Zhi-gang<sup>1</sup>, ZHAO Jun-jin<sup>1</sup>, MENG Fei<sup>1</sup>

(1. *The Center of Preservation and Utilization of Germplasm Resources of Domestic Animals and Forage, National Animal Husbandry & Veterinary Service,*

*Beijing 100094, China; 2. College of Animal Science and Technology,*

*Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)*

**Abstract:** To establish an optimal conditions for *in vitro* maturation of ovine oocytes, we studied the effects of EGF, IGF-I and the union use of both of them on *in vitro* maturation and cleavage of ovine oocytes. The results showed that the maturation and cleavage rates derived from oocytes matured in medium supplemented with 50 ng/mL EGF alone were 71.2% and 45.5%, respectively, which was significantly higher than those in control and those with 10, 20, 30, 40 ng/mL EGF, and the highest maturation and cleavage rates present in medium with 100 ng/mL EGF, were 70.7% and 58.5%, respectively. While the oocytes were only treated with 40 ng/mL IGF-I, the maturation and cleavage rates were 70.7% and 58.5%, respectively, which was noticeably higher than that of the control and those with 10, 20, 60, 80, 100 ng/mL IGF-I, but the maturation and cleavage rates were only 38.8% and 20.0%, respectively when the concentration of IGF-I was 100 ng/mL, the difference is remarkable compared to the experimental groups and control group. When treated by the combination of 50 ng/mL EGF and 40 ng/mL IGF-I, the maturation and cleavage rates were 85.6% and 61.0%, respectively, which is significantly higher than the single

收稿日期: 2007-04-19

基金项目: 农业部畜禽牧草品种资源保护项目(农财发[2006]44号); 科技部成果转化项目(04EFN216P00381); 科技部《畜禽种质资源标准化整理、整合及共享试点》(2005DKA21100-03)资助

作者简介: 刘丑生, 甘肃人, 博士, 副研究员, 主要从事分子遗传与胚胎工程研究, 010-62814021-205, E-mail: liuchousheng@sina.com

use of 50 ng/mL EGF or 40 ng/mL IGF-I and the control group.

**Key words:** ovine;oocytes ;IVM ;cleavage;EGF;IGF-I

随着哺乳动物体外受精、转基因、核移植、外源基因导入等生物技术研究的不断深入,卵母细胞的体外成熟技术日益受到重视。但迄今为止,与体内成熟卵母细胞相比,体外成熟卵母细胞质量差,核、质成熟不同步等许多问题还未解决,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,制约着上述生物技术的发展<sup>[1-2]</sup>。因此,完善哺乳动物卵母细胞体外成熟培养体系,提高卵母细胞体外成熟的质量,愈来愈受到人们的关注和重视。随着研究的进一步深入,各种生物活性因子在卵母细胞体外成熟和早期胚胎发育过程中的作用,受到越来越多的重视。生物活性因子的影响可能是多途径、多环节、多因素间协同作用的结果,其来源、浓度和半衰期都影响着卵母细胞的体外成熟和胚胎的发育<sup>[3-4]</sup>。

本研究旨在优化绵羊卵母细胞体外成熟条件,比较了不同浓度 EGF、IGF-I 以及 EGF 和 IGF-I 协同对绵羊卵母细胞体外成熟和卵裂的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

卵巢采自北京大兴薛营屠宰场,精液是由全国畜牧兽医总站畜草中心保种基地提供的细管冻精。

### 1.2 主要试剂

BSA (Roche, 738328),  $17\beta\text{-E}_2$  (Sigma, E-8875), FSH(中科院动物所), LH(中科院动物所), Heparin (Sigma, H3149), Hepes (H-4034), Medium-199 (GIBCO, 31100-027), EGF (Sigma, E-9644), IGF-I (Sigma, I3769), Mineral Oil (Sigma, M-8410),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma, C-7902),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma, M-2393), NEAA (Sigma M-7145)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma, S-5011), EAA (Sigma, B-6766), NaCl (Sigma, S-5886)。

### 1.3 方法和设计

1.3.1 卵巢采集 卵巢采自北京市大兴区清真屠宰场。羊屠宰后立即采集羊卵巢,剪去多余脂肪组织,投入 30~35℃ 的卵巢保存液中保存,在 2~4 h 内运回实验室。卵巢保存液为:0.9% 灭菌生理盐水 + 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  青霉素 + 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素。

1.3.2 卵母细胞的采集 在无菌条件下,用灭菌生理盐水洗涤卵巢 3~5 次,切除多余的组织,放入盛有采卵液 (TCM-199 + 0.3% BSA (W/V) + 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  肝素钠) 的平皿中,一手用组织镊固定卵巢,另一只手用刀片轻轻划破卵巢表面的卵泡,并用采卵液冲洗卵泡。切割完毕后,静置平皿 15 min,收集下层液体检卵。在体视显微镜下观察卵丘-卵母细胞复合物 (Cumulus-oocyte complex), 并评定分级。

1.3.3 卵母细胞分级 把检出的卵母细胞用含 10% FCS 的 M-199 洗涤 3 遍,然后进行分级和计数。从形态学的角度将卵母细胞分为 4 级。

A 级:卵丘细胞致密,不扩散,细胞质均匀,形态规则,至少有 4 层卵丘细胞完全包裹的卵母细胞;B 级:含有 1~3 层卵丘细胞的卵母细胞;C 级:半裸卵,卵母细胞外只有部分卵丘细胞存在;D 级:包括裸卵、变形卵和退化的卵母细胞。

A、B 级卵母细胞用于体外成熟培养,一般成熟率较高,C 级也可用于体外培养,D 级不培养。

1.3.4 卵母细胞成熟培养 将选取的 A、B 级卵母细胞先用采卵液洗涤 2 次,再用成熟培养液 (TCM-199 + 10% FCS + 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FSH + 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LH + 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{E}_2$  + 60% 乳酸钠 1.375  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) 洗涤 3~5 次,移入四孔板中,每孔 600  $\mu\text{L}$  成熟培养液,成熟培养液至少在培养箱中平衡 2~4 h,每孔放入 50~60 个卵母细胞。将放入的卵母细胞均匀分散在培养液滴中,培养条件为 5%  $\text{CO}_2$ , 38.5℃、饱和湿度。

1.3.5 卵母细胞的成熟判断 主要通过观察卵母细胞形态来判断成熟情况,正常成熟的卵母细胞胞质均匀,没有空泡,其周围的卵丘细胞一般发生扩散,呈放射状排列。用 0.1% 的透明质酸酶消化,并用玻璃针拨动卵母细胞,以第一极体排出为成熟卵母细胞 (M II 期)。

1.3.6 体外受精 取绵羊冻精细管 2 支(解冻后活率达 0.3 以上),37℃ 解冻后,将解冻精液贴壁加入盛有 6 mL 由 mSOF 液配制的 90% 和 45% 的 Percoll 密度梯度液上层,然后进行密度梯度离心 (2 000 r/min, 20 min),再用精子洗涤液 (mSOF + 0.3% (w/v) BSA (Roche) + 2.5 mmol/L caffeine) 离心洗涤 (1 200 r/min, 5 min) 1 次,去上清液后,用

受精液 (mSOF + 0.3% (w/v) BSA (Roche) + 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Heparine + 2.5 mmol/L caffeine + 1 mmol/L 乳酸钙) 将精子密度稀释至  $(1\sim 2)\times 10^6/\text{mL}$  用于体外受精。

然后将体外成熟培养后的卵母细胞用 0.1% 透明质酸酶处理, 除去部分卵丘细胞, 然后用卵母细胞成熟培养液洗涤 2 次, 用受精液洗 2~3 次, 移入 50  $\mu\text{L}$  至少孵化 2 h 的受精液滴中, 每滴中放置 8~10 枚卵母细胞, 加入 20  $\mu\text{L}$  已备好的获能精子液, 置于  $\text{CO}_2$  培养箱, 精卵共培养 18~20 h, 培养条件与卵母细胞体外成熟培养相同<sup>[5]</sup>。

1.3.7 受精卵培养 将视为受精的卵母细胞用受精液洗涤 2~3 次, 用胚胎培养液 (mSOF + 10% FCS + 1% MEM) 洗涤 2 次, 移入已平衡 2 h 的胚胎培养液中继续培养, 培养条件与成熟培养相同。24 h 后观察第 2 极体排出情况, 将胚胎转入胚胎培养液 (mSOF + 10% FCS + 1% MEM + 2% BME) 中, 48 h 后观察卵裂情况。每 48 h 更换一半培养液。在胚胎培养液中氨基酸的添加顺序为: 在前 24 h 只加入 1% MEM, 在 24 h 之后再加 2% BME<sup>[6]</sup>。

### 1.3.8 试验设计

1.3.8.1 以成熟培养液为对照组, 在成熟培养液中分别添加 10、20、30、40、50、100 ng/mL EGF 为试验组, 将卵母细胞成熟培养和体外受精, 研究 EGF 对卵母细胞体外成熟和卵裂的影响。

1.3.8.2 以成熟培养液为对照组, 在成熟培养液中分别添加 10、20、30、40、50、100 ng/mL IGF-I 为试

验组, 将卵母细胞成熟培养和体外受精, 研究 IGF-I 对卵母细胞体外成熟和卵裂的影响。

1.3.8.3 以成熟培养液为对照组, 在成熟培养液中分别添加 50 ng/mL EGF、40 ng/mL IGF-I、同时添加 50 ng/mL EGF 和 40 ng/mL IGF-I 为试验组, 将卵母细胞成熟培养和体外受精, 研究 EGF 和 IGF-I 联合对卵母细胞体外成熟和卵裂的影响。

### 1.4 统计分析

同一试验组重复 3~5 次, 用  $t$  检验进行显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度的 EGF 对卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

随着 EGF 浓度的增加, 卵母细胞成熟率, 卵裂率在不断的增加。当 EGF 浓度由 10 ng/mL 增加到 40 ng/mL 时, 试验组和对照组间差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 当 EGF 浓度增加到 50 ng/mL, 成熟率和卵裂率分别为 71.2% 和 45.5%, 与对照组和其它试验组 (除 100 ng/mL EGF 组) 间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 当 EGF 浓度增加到 100 ng/mL, 成熟率和卵裂率分别为 72.9% 和 45.7%, 与对照组和其它试验组间 (除 50 ng/mL EGF 组) 差异显著 ( $P < 0.05$ ), 因此当浓度小于 50 ng/mL 时, 对卵母细胞的成熟率和卵裂率影响不大, 高于 50 ng/mL 时, 可以显著的提高卵母细胞的成熟率和卵裂率, 100 ng/mL 时其值达到最大 (表 1)。

表 1 不同浓度的 EGF 对绵羊卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

Table 1 Effects of different EGF concentrations on ovine oocyte *in vitro* maturation and cleavage

组别 Group	卵母细胞数/个 No. of oocytes	成熟卵母细胞数/个 No. of maturation oocytes	成熟率/% Maturation rate	卵裂率/% Cleavage rate
对照组	95	51	53.7 <sup>a</sup> (51/95)	25.4 <sup>a</sup> (13/51)
10 ng/mL EGF	95	54	56.8 <sup>a</sup> (54/95)	25.9 <sup>a</sup> (14/54)
20 ng/mL EGF	98	56	57.4 <sup>a</sup> (56/98)	26.7 <sup>a</sup> (15/56)
30 ng/mL EGF	90	52	57.8 <sup>a</sup> (52/90)	26.9 <sup>a</sup> (14/5)
40 ng/mL EGF	95	55	57.9 <sup>a</sup> (55/95)	27.2 <sup>a</sup> (15/55)
50 ng/mL EGF	92	66	71.2 <sup>b</sup> (66/92)	45.5 <sup>b</sup> (30/66)
100 ng/mL EGF	96	70	72.9 <sup>b</sup> (70/96)	45.7 <sup>b</sup> (32/70)

同一列中不同字母上标表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 相同字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。下同

The data in the same column with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ). The same as below

### 2.2 不同浓度的 IGF-I 对卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

IGF-I 浓度对卵母细胞成熟和卵裂表现为双重效应。当 IGF-I 的浓度在 0~40 ng/mL 时, 能提高

卵母细胞的成熟率和卵裂率,呈现浓度依赖性。同其它试验组和对照组相比,添加 40 ng/mL 的 IGF-I 显著的提高了卵母细胞成熟率和卵裂率,分别达到 70.7% 和 58.5%,与其它组间差异显著( $P < 0.05$ )。

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 时,成熟率和卵裂率为 38.8% 和 20.0%,显著低于对照组和其它各试验组( $P < 0.05$ )(表 2)。

表 2 不同浓度的 IGF-I 对卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

Table 2 Effect of IGF-I on ovine oocyte *in vitro* maturation and cleavage

组别 Group	卵母细胞数/个 No. of oocytes	成熟卵母细胞数/个 No. of maturation oocytes	成熟率/% Maturation rate	卵裂率/% Cleavage rate
对照组	90	49	54.4 <sup>a</sup> (49/90)	36.7 <sup>a</sup> (18/49)
10 ng/mL IGF-I	90	50	55.6 <sup>a</sup> (50/90)	38.0 <sup>a</sup> (18/50)
20 ng/mL IGF-I	92	52	56.5 <sup>a</sup> (52/92)	38.4 <sup>a</sup> (20/52)
40 ng/mL IGF-I	92	65	70.7 <sup>b</sup> (65/92)	58.5 <sup>b</sup> (38/65)
60 ng/mL IGF-I	90	50	55.6 <sup>a</sup> (50/90)	40.0 <sup>a</sup> (20/50)
80 ng/mL IGF-I	90	48	53.3 <sup>a</sup> (48/90)	39.6 <sup>a</sup> (19/48)
100 ng/mL IGF-I	90	35	38.8 <sup>c</sup> (35/90)	20.0 <sup>c</sup> (7/35)

### 2.3 EGF 和 IGF-I 联合对卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

50 ng/mL EGF 组、40 ng/mL IGF-I 组、50 ng/mL EGF 和 40 ng/mL IGF-I 二者联用的培养液组,同对照组相比,都能促进卵母细胞的成熟,差异

显著( $P < 0.05$ )。在试验组中,50 ng/mL EGF 和 40 ng/mL IGF-I 联用效果好,成熟率和卵裂率高,达到 85.6% 和 61.0%,同对照组和单独运用 50 ng/mL EGF、40 ng/mL IGF-I 组之间差异显著( $P < 0.05$ )(表 3)。

表 3 EGF 和 IGF 联合对卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

Table 3 Effect of union use of EGF and IGF on ovine *in vitro* oocyte maturation and cleavage

组别 Group	卵母细胞数/个 No. of oocytes	成熟卵母细胞数/个 No. of maturation oocytes	成熟率/% Maturation rate	卵裂率/% Cleavage rate
对照组 Control	90	49	54.4 <sup>a</sup> (49/90)	26.5 <sup>a</sup> (13/49)
50 ng/mL EGF	92	58	72.8 <sup>b</sup> (67/92)	41.8 <sup>b</sup> (28/67)
40 ng/mL IGF-I	95	58	71.6 <sup>b</sup> (68/95)	42.6 <sup>b</sup> (29/68)
50 ng/mL EGF+40 ng/mL IGF-I	90	59	85.6 <sup>c</sup> (77/90)	61.0 <sup>c</sup> (47/77)

## 3 讨论

### 3.1 不同浓度的 EGF 对卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

EGF 是最为常用的一种细胞因子,EGF 为单链多肽,是非胚胎产生的促进胚胎发育的因子。Lorenz 等<sup>[7]</sup>认为 EGF 作用于卵母细胞必须通过卵丘卵母细胞间的信息交流才能实现,可能是通过与卵丘胞膜上受体结合,经过  $Ca^{2+}$  浓度升高传递信号促进孕酮合成,而孕酮则可促进卵母细胞的减数分裂使其成熟。EGF 也可能使卵丘细胞内  $Ca^{2+}$  水平升高并直接进入卵母细胞而促进减数分裂启动。EGF

是颗粒细胞强有力的分裂素,可能是卵母细胞成熟分裂复始的一种信号因子,在卵母细胞的生长、成熟过程中起调节作用,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<sup>[8]</sup>。Coskun 等<sup>[9]</sup>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。Wang 等<sup>[10]</sup>认为这种作用是由卵丘细胞介导的,因为培养裸卵时,添加 EGF 没有效果。Park 等<sup>[11]</sup>的研究证明 EGF 浓度低于 30 ng/mL 时对卵母细胞体外成熟没有作用;Wang 等<sup>[10]</sup>的研究也说明 EGF 浓度在 10~20 ng/mL 并不能显著提高山羊卵母细胞的成熟率(79.3%、82.7%、85.5%,  $P$

>0.05)。本次试验结果显示,在成熟培养液中添加 10~40 ng/mL 的 EGF 对绵羊卵母细胞体外成熟没有显著的影响,100 ng/mL 的 EGF 可以显著提高绵羊卵母细胞的体外成熟率和卵裂率(72.9%、45.6%, $P<0.05$ )。这可能主要是由于培养基和血清等的作用而使 EGF 的作用在低浓度没有显现出来。

### 3.2 不同浓度的 IGF-I 对卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

IGF 是一种分子结构类似胰岛素的促生长多肽,包括 IGF-I 和 IGF-II,分别拥有 70 和 67 个氨基酸的单链多肽,3 个双硫键交叉连接而成。IGF-I 能增加葡萄糖和氨基酸的吸收,抑制蛋白质降解,刺激各种细胞的增殖和分化<sup>[12]</sup>。体外试验表明,IGF-I 可促进卵巢颗粒细胞增殖与分化及卵母细胞成熟。在大部分组织中,IGF 以自分泌或旁分泌的方式发挥作用。Xia 等<sup>[13]</sup>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 对绵羊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 40 ng/mL 的 IGF-I 显著地提高了成熟率和卵裂率(60.8%和 46.4%, $P<0.05$ )。当 IGF-I 的浓度为 100 ng/mL 时,成熟率和卵裂率降低,为 38.3%和 20.0%,显著低于对照组和其它各组( $P<0.05$ )。Sirotki 等<sup>[14]</sup>研究认为 IGF-I 增强了细胞内蛋白激酶 A (PKA)的水平,可能对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 等<sup>[13]</sup>检测了卵丘颗粒细胞中胸腺嘧啶脱氧核苷的含量,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。

### 3.3 EGF 和 IGF-I 联合对卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

EGF 和 IGF-I 联合运用对卵母细胞体外成熟和卵裂的作用在绵羊上未见报道,本研究发现 EGF 和 IGF-I 联合对卵母细胞的成熟有协同作用,同其它试验组和对照组相比能促进卵母细胞的成熟,成熟率最高,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<sup>[15-16]</sup>。本试验对绵羊卵母

细胞体外受精卵裂情况的研究,也是对卵母细胞胞质成熟好坏的一个初步判定。EGF 和 IGF-I 联用效果好,成熟率和卵裂率高,达到 85.6%和 61.0%,同对照组和单独运用 EGF、IGF-I 组之间差异显著( $P<0.05$ ),这从一个侧面说明 EGF 和 IGF-I 联用对绵羊卵母细胞胞质的成熟有促进作用,EGF 和 IGF-I 联用对卵母细胞受精后的卵裂也具有促进作用,其促进分裂的效果最好,分析可能是由于卵母细胞的胞质在 EGF 和 IGF-I 的培养基中成熟更充分,EGF 和 IGF-I 对于后期胚胎的发育作用如何,以及其分子机制有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] IZADYAR F, HAGEW J, COLENBRANDER B, et al. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation [J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 49 (4): 444-453.
- [2] GUTNISKY C, DALVIT G C, PINTOS L N, et al. Influence of hyaluronic acid synthesis and cumulus mucification on bovine oocyte *in vitro* maturation, fertilisation and embryo development [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2007, 19(3): 488-497.
- [3] YI Y J, PARK C S. Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, cycloheximide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine [J]. *Anim Reprod Sci*, 2005, 86(3-4): 297-304.
- [4] SONG K, LEE E. Modification of maturation condition improves oocyte maturation and *in vitro* development of somatic cell nuclear transfer pig embryos [J]. *J Vet Sci*, 2007, 8(1): 81-87.
- [5] 陈大元. 受精生物学-受精机制与生殖工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [6] 旭日干, 张锁链, 薛晓光, 等. 屠宰母牛卵巢卵母细胞的体外受精与早期发生 [J]. *内蒙古大学学报*, 1989, 20(3): 407-414.
- [7] 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]. *Reprod Fertil*, 1994, 101(3): 697-701.
- [8] WATSON A J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence [J]. *Anim Sci*, 2007, 85(13 Suppl): E1-3.
- [9] COSKUN S, LIN Y C. Effects of transforming growth factors and activin-A on *in vitro* porcine oo-

- cyte maturation[J]. *Molecular Reproduction Development*, 1994, 38(2):153-159.
- [10] 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.
- [11] PARK K W. Exposure of bovine oocyte to EGF during maturation allows them to develop to blastocysts in a chemically-defined medium [J]. *Theriogenology*, 1997, 48: 1 127-1 135.
- [12] 赵海波, 罗丽兰, 刘 义. 胰岛素样生长因子-1 对卵母细胞成熟度、受精力及卵裂力的影响[J]. *中华妇产科杂志*, 1997, 32: 586-588.
- [13] XIA P, TEKPETEY F R, ARMSTRONG D T. Effect of IGF -I on the pig oocyte maturation , fertilization , and early embryonic development *in vitro* and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity [J] . *Mol Reprod Dev*, 1994, 38 : 373-379.
- [14] SIROTKI N, MAKAREVICH A V. The involvement of the GH/IGF- I axis in the regulation of secretory activity by bovine oviduct epithelial cells[J]. *Anim Reprod Sci*, 1997, 48 (2-4):197-207.
- [15] 王敏康, 刘冀珑, 陈永福, 等. 哺乳动物早期胚胎体外发育阻滞的研究进展[J]. *遗传*, 2001, 23(4): 391-395.
- [16] 王海滨, 夏国良, 李美玲, 等. 哺乳动物卵母细胞培养体系的研究进展[J]. *农业生物技术学报*, 2000, 8(3):297-310.