

表皮生长因子和胰岛素样生长因子对水牛卵母细胞胞质成熟的影响

王晓丽, 崔奎青, 舒金辉, 冯贵雪, 石德顺*, 卞桂华, 韦精卫

(广西大学动物科学技术学院, 南宁 530005)

摘要: 以皮层颗粒(CG)单层分布于质膜下做为卵母细胞胞质成熟的标志, 利用 CG 荧光染色法, 研究了不同浓度表皮生长因子(EGF)和胰岛素样生长因子(IGF-1)及其组合对水牛卵母细胞胞质成熟的影响。结果发现:(1)添加不同浓度的 EGF(10、20、30、50 ng/mL)都可以提高胞质的成熟率, 但是组间差异不显著($P>0.05$); 皮质颗粒的分布随着 EGF 浓度的升高逐步由中间分布向皮层分布转变;(2)在成熟液中添加 IGF-1 30 ng/mL 时效果较好, 能显著提高卵母细胞胞质的成熟率; 皮质颗粒的分布随着 IGF-1 浓度的升高逐步由中间分布向皮层分布转变, 在添加 IGF-1 30 ng/mL 时, 在皮层分布最好, 随着 IGF-1 量的进一步增加, 皮质颗粒又向中间分布转变;(3)添加 20 ng/mL EGF+30 ng/mL IGF-1 组卵母细胞体外成熟率高于添加 30 ng/mL 的 IGF-1 组, 显著高于添加 20 ng/mL EGF 组和对照组($P<0.05$)。由此表明, EGF 和 IGF-1 对水牛卵母细胞体外成熟有协同作用。

关键词: 表皮生长因子; IGF-1; 卵母细胞; 胞质成熟; 水牛

中图分类号: S814.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)02-0228-05

Effects of Epidermal Growth Factor and Insulin Growth Factor-1 on the *in vitro* Cytoplasmic Maturation of Buffalo Oocytes

WANG Xiao-li, CUI Kui-qing, SHU Jin-hui, FENG Gui-xue, SHI De-shun*, BIAN Gui-hua, WEI Jing-wei

(College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: The cytoplasmic maturation of oocytes was evaluated according to the monolayer distribution of cortical granule (CG) beneath the plasmalemma following fluorescent staining. Effects of epidermal growth factor (EGF) and insulin growth factor-1 (IGF-1) on the cytoplasmic maturation of buffalo oocytes were examined in this study. Results showed that all EGF at the concentration tested (10, 20, 30, 50 ng/mL) could promote the maturity of buffalo oocyte cytoplasm, the distribution pattern of CG changed gradually from middle to cortex with the concentration of EGF increased. The maturity of buffalo oocyte cytoplasm was also improved significantly by adding 30 ng/mL IGF into the maturation medium ($P<0.05$), the distribution pattern of CG changed gradually from middle to cortex as the concentration of IGF-1 increased to 30 ng/mL, and then changed gradually from cortex to middle as the concentration of IGF-1 increased to either 50 ng/mL or 100 ng/mL. More oocytes matured significantly when they were cultured in the maturation medium containing 20 ng/mL EGF and 30 ng/mL IGF-1 in comparison with them cultured in either 30 ng/mL IGF-1 or 20 ng/mL EGF groups ($P<0.05$). These results indicate that EGF and IGF-1 have a cooperative effects on the *in vitro* maturation of buffalo oocytes.

Key words: EGF; IGF-1; oocytes; cytoplasmic maturation; buffalo

收稿日期: 2007-01-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30469090)

作者简介: 王晓丽(1976-), 女, 内蒙古赤峰人, 讲师, 博士, 主要从事动物生殖生理和细胞生物学研究, E-mail: lili-fly@126.com

* 通讯作者: 石德顺, 研究员, 主要从事胚胎生物技术研究, E-mail: ardsshi@gxu.edu.cn

体外培养的哺乳动物卵母细胞可自发完成核成熟,且易于观察和评定^[1]。而卵母细胞胞质的成熟,由于没有直观特征,其评定相对困难。目前将皮质颗粒(Cortical Granule,CG)呈单层分布于质膜下^[2]作为卵母细胞胞质成熟的标准被越来越多的研究者接受^[3-5]。水牛卵母细胞体外成熟率低一直是困扰研究者的问题,大量的研究工作都围绕这一问题展开。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^[6-7]。本研究借助 CG 荧光染色分别比较了不同浓度表皮生长因子(EGF)和胰岛素样生长因子(IGF)对水牛体外培养卵母细胞胞质成熟的影响,并探讨了它们对水牛卵母细胞胞质成熟的协同作用。

1 材料与方法

1.1 试剂及培养液配制

除 TCM-199 购自 Gibco 公司外,其他试剂均购自 Sigma 化学公司。卵母细胞清洗液(W)为 TCM 199 + 5.0 mmol/L NaHCO₃ + 5.0 mmol/L Hepes + 2% 发情牛血清(OCS);卵母细胞的成熟培养液(M)为 TCM199 + 26.2 mmol/L NaHCO₃ + 5.0 mmol/L Hepes + 5.0% OCS + 2.0% 卵泡液 + 0.1 μg/mL FSH。所有培养液均添加 60 μg/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素。培养液的消毒用膜孔为 0.20 μm 的微孔滤膜滤过进行。

1.2 卵巢和卵母细胞的采集

水牛卵巢来自南宁市附近屠宰场,用高压灭菌过的生理盐水清洗并放入装有 25~37℃ 生理盐水的保温瓶中,6 h 内运回实验室。去除卵巢表面附着组织,经无菌生理盐水清洗 3 次后再用 12 号针头注射器抽取卵巢表面直径为 2~6 mm 的卵泡,在体视显微镜下选择具有完整卵丘细胞层及均匀细胞质的卵母细胞进行体外成熟培养。

1.3 成熟培养

挑选的水牛卵母细胞用 W 清洗 2 次后,置于含有 1.5 mL M 的玻璃培养皿(10 mm × 30 mm)中,在 38.5℃、5% CO₂ 和最大饱和湿度的培养箱中成熟培养(*In vitro* maturation, IVM)24 h。成熟培养的具体处理根据试验设计添加不同浓度的生长因子。

1.4 皮质颗粒染色及观察

皮质颗粒的评定方法按照李荣凤和 Wang 等^[3,5]报道的进行。透明质酸酶去除卵丘细胞,链霉菌蛋白酶去掉透明带(可缺),洗液洗 2 次,3.7% 多聚甲醛液中室温下固定 30 min,阻断液洗 3 次,0.1% Triton X-100 的 PBS 液中室温下通透处理 5 min,阻断液洗 2 次,FITC-LCA 中避光条件下染色处理 30 min,洗 3 次(避光),封片激光共聚焦显微镜下观察。

1.5 试验设计

试验 1,根据 M 中 EGF 的添加浓度(0、10、20、30、50 ng/mL)分为 5 组,回收得到的水牛卵母细胞随机分配到各处理组中进行成熟培养 24 h,而后按照前述方法进行卵母细胞的皮质颗粒染色评定。

试验 2,根据 M 中 IGF-1 的添加浓度(0、10、30、50、100 ng/mL)分为 5 组,回收得到的水牛卵母细胞随机分配到各处理组中进行成熟培养 24 h,而后按照前述方法进行卵母细胞的皮质颗粒染色评定。

试验 3,根据 M 中的 EGF 和 IGF-1 的浓度组合 20 ng/mL EGF、30 ng/mL IGF-1、20 ng/mL EGF + 30 ng/mL IGF-1 以及对照组分为 4 组,回收得到的水牛卵母细胞随机分配到各处理组中进行成熟培养 24 h,而后按照前述方法进行卵母细胞的皮质颗粒染色评定。

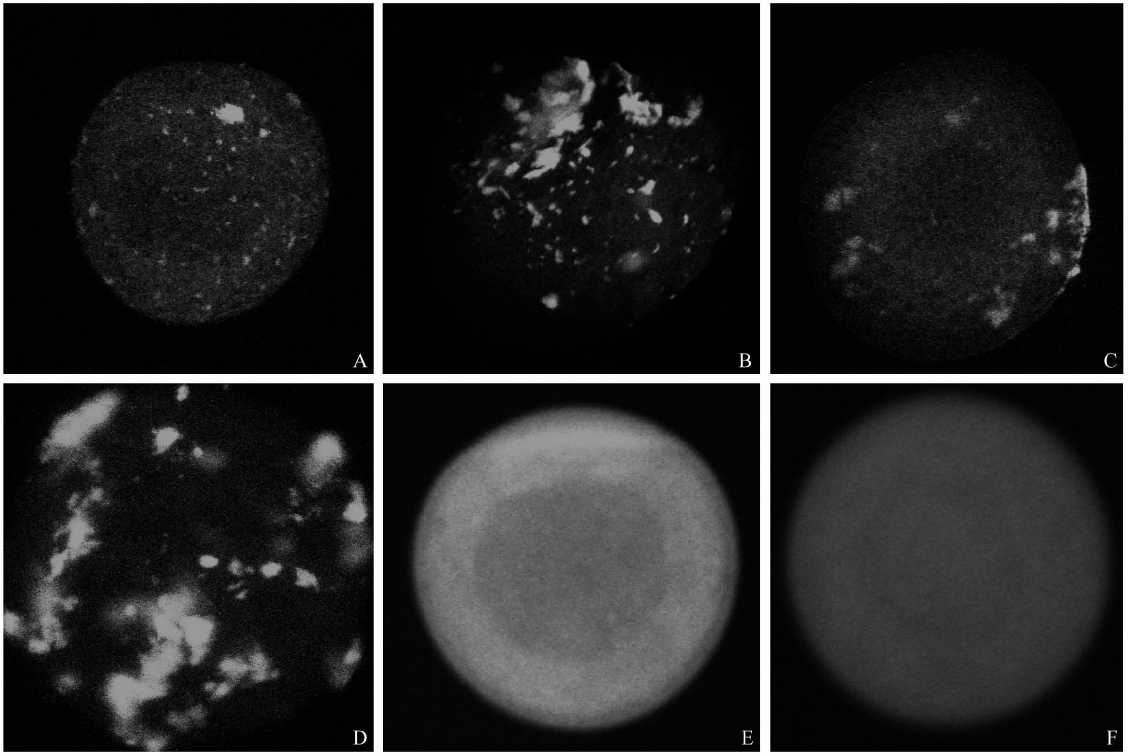
1.6 统计分析

数据采用卡方分析(χ^2)进行统计学的显著性检验。

2 结果与分析

2.1 水牛卵母细胞 CG 分布的观察

根据观察,可将 CG 的分布情况分为中间分布(图 A、B)、皮层分布(图 C~E)和完全缺乏 CG(图 F)3 大类。中间分布又分为部分聚合(CG 聚集成小簇)和完全聚合(CG 聚集成较大的簇)。皮层分布也分为完全聚合、部分聚合(CG 部分分散,部分仍聚集成小簇)和完全分散(CG 完全分散并呈单层分布于质膜下),前两类标志细胞质已接近成熟,而 CG 完全分散标志着细胞质已经成熟。完全缺乏 CG 或卵子本身形态异常则为卵子退化的特征。



A、B. 表示 CG 中间分布(A. 部分聚合,B. 完全聚合); C~E. 表示 CG 皮质分布(C. 部分聚合,D. 完全聚合,E. 完全分散); F. 表示无 CG
 A,B. Displaying CG in plasma (A. Part cluster, B. Cluster); C-E. Displaying CG in cortex (C. Part cluster, D. Cluster, E. Dispersion); F. Displaying no CG

图 1 FITC-LCA 染色后的水牛卵母细胞皮质颗粒分布情况 (×200)

Fig. 1 Cortical granule distribution of buffalo oocytes stained by FITC-LCA (×200)

2.2 EGF 对水牛卵母细胞胞质体外成熟的影响

如表 1 所示,在成熟培养液中分别加入浓度为 0、10、20、30、50 ng/mL 的 EGF,CG 皮质分布的水

牛卵母细胞比例显著提高,且其皮质分布比例随着 EGF 浓度的升高而逐渐提高,表明 EGF 对水牛卵母细胞胞质的成熟具有促进作用。

表 1 成熟培养液中加入不同浓度 EGF 对卵母细胞胞质成熟率的影响

Table 1 Effects of EGF on the cytoplasmic maturation of buffalo oocytes matured *in vitro*

EGF 浓度 (ng/mL) EGF conc.	卵母细 胞数/枚 Oocytes	无 CG No CG	CG 中间分布 CG in plasma			CG 皮质分布 CG in cortex				%
			部分聚合	完全聚合	合计	完全聚合	部分聚合	完全分散	合计	
			Part cluster	Cluster	Total	Cluster	Part cluster	Dispersion	Total	
0	106	23.6 ^a (25)	40.6 ^a (43)	20.8 ^a (22)	61.3 ^a (65)	7.5 ^a (8)	5.7 ^a (6)	1.9 ^a (2)	15.1 ^a (16)	
10	110	14.6 ^{ab} (16)	28.2 ^{ab} (31)	19.1 ^a (21)	47.3 ^{ab} (52)	14.5 ^a (16)	18.2 ^b (20)	5.5 ^a (6)	38.2 ^b (42)	
20	107	12.2 ^b (13)	25.2 ^b (27)	22.4 ^a (24)	47.7 ^{ab} (51)	10.3 ^a (11)	22.4 ^b (24)	7.5 ^{ab} (8)	40.2 ^b (43)	
30	114	8.8 ^b (10)	28.9 ^{ab} (33)	22.8 ^a (26)	51.8 ^{ab} (57)	11.4 ^a (13)	17.5 ^b (20)	12.3 ^b (14)	41.2 ^b (47)	
50	104	7.7 ^b (8)	26.9 ^{ab} (28)	15.4 ^a (16)	42.3 ^b (44)	13.5 ^a (14)	22.1 ^b (23)	14.4 ^b (15)	50.0 ^b (52)	

列内具不同上标的值差异显著(P<0.05),下同

Within columns, values with different superscripts are different (P<0.05). The same as below

2.3 IGF-1 对卵母细胞胞质体外成熟的影响

由表 2 可见,在成熟培养液中添加不同浓度的

IGF-1 时,水牛卵母细胞的 CG 皮质分布比例显著提高 (P<0.05)。当添加浓度在 30 ng/mL 时,CG

皮层分布的水牛卵母细胞比例达到 53.6%,显著高于对照组及其它试验组($P<0.05$)。随着 IGF-1 浓

度进一步升高,皮质颗粒又向中间分布转变。

表 2 成熟培养液中加入不同浓度 IGF-1 对卵母细胞胞质成熟率的影响

Table 2 Effects of IG-1 on the cytoplasmic maturation of buffalo oocytes matured *in vitro*

IGF 浓度 (ng/mL)	卵母细 胞数/枚	无 CG No CG	CG 中间分布 CG in plasma			CG 皮层分布 CG in cortex			
			部分聚合 Part cluster	完全聚合 Cluster	合计 Total	完全聚合 Cluster	部分聚合 Part cluster	完全分散 Dispersion	合计 Total
0	101	17.8 ^a (18)	45.5 ^a (46)	26.7 ^a (27)	72.3 ^a (73)	5.0 ^a (5)	3.0 ^a (3)	2.0 ^a (2)	9.9 ^a (10)
10	103	10.7 ^a b(11)	24.3 ^b (25)	17.5 ^{ab} (18)	41.8 ^b (43)	15.5 ^b (16)	11.7 ^b (12)	20.4 ^b (21)	47.6 ^b (49)
30	112	7.1 ^b (8)	24.1 ^b (27)	15.2 ^b (17)	39.3 ^b (44)	14.3 ^b (16)	8.9 ^{ab} (10)	21.4 ^c (34)	53.6 ^c (60)
50	106	11.3 ^{ab} (12)	24.5 ^b (26)	18.9 ^{ab} (20)	43.4 ^b (46)	16.0 ^b (17)	11.3 ^b (12)	17.9 ^b (19)	45.3 ^b (48)
100	110	13.6 ^{ab} (15)	28.2 ^b (31)	17.3 ^{ab} (19)	45.5 ^b (50)	13.6 ^{ab} (15)	11.8 ^b (13)	15.5 ^b (17)	40.9 ^b (45)

2.4 同时添加 EGF 和 IGF-1 对水牛卵母细胞胞质体外成熟的影响

如表 3 所示,在成熟培养液中添加 EGF、IGF-1 或同时添加 EGF 和 IGF-1 都可显著提高卵母细胞胞

质成熟率($P<0.05$),且同时添加 EGF 与 IGF-1 的 CG 皮层分布水牛卵母细胞比例显著高于单独添加 IGF-1 组和 IGF-1 组。由此表明,EGF 与 IGF-1 具协同作用,能显著提高水牛卵母细胞胞质体外成熟率。

表 3 成熟培养液中加入不同浓度 EGF 和 IGF-1 对卵母细胞胞质成熟率的影响

Table 3 Effects of EGF and IGF-1 on the cytoplasmic maturation of buffalo oocytes

组别 Groups	卵母细 胞数/枚	无 CG No CG	CG 中间分布 CG in plasma			CG 皮层分布 CG in cortex			
			部分聚合 Part cluster	完全聚合 Cluster	合计 Total	完全聚合 Cluster	部分聚合 Part cluster	完全分散 Dispersion	合计 Total
Control	111	18.0 ^a (20)	44.1 ^a (49)	27.0 ^a (30)	71.2 ^a (79)	4.5 ^a (5)	3.6 ^a (4)	2.7 ^a (3)	10.8 ^a (12)
EGF	108	10.2 ^b (11)	25.0 ^b (27)	18.5 ^{ab} (20)	43.5 ^b (47)	14.8 ^b (16)	5.6 ^a (6)	25.9 ^b (28)	46.3 ^b (50)
IGF	110	8.2 ^b (9)	22.7 ^b (25)	15.5 ^{ab} (17)	38.2 ^b (42)	16.4 ^b (18)	10.0 ^a (11)	27.3 ^b (30)	53.6 ^b (59)
EGF+ IGF	115	5.2 ^b (6)	25.2 ^b (29)	10.4 ^b (12)	35.7 ^b (41)	13.9 ^b (16)	7.0 ^a (8)	38.3 ^b (44)	59.1 ^b (68)

EGF 和 IGF 的浓度分别为 20 和 30 ng/mL

The concentration of EGF and IGF was 20 and 30 ng/mL, respectively

3 讨论

卵母细胞的成熟包括核成熟与胞质成熟。卵母细胞体外培养 20~24 h 后,大多数卵母细胞发生第一次减数分裂,排出第一极体,卵母细胞周围的卵丘细胞扩散,这些都是细胞核成熟的标志。一般都采用这种方法来粗判卵母细胞的成熟,但是单纯利用核成熟标准来鉴定卵母细胞成熟状态是不够的,因为部分核成熟的卵母细胞不能受精,无法形成有活力的胚胎^[8]。卵母细胞的核成熟与胞质成熟并非同步,核成熟不依赖于胞质成熟,可提前完成。胞质成熟不象核成熟那样可以从形态上把握,胞质在成熟过程中会发生皮质颗粒在质膜下单层分布等诸多变

化。卵母细胞胞质发育不成熟,可能是影响卵母细胞成熟质量、受精率、囊胚发育率和胚胎附植率的重要因素^[9]。

对于皮质颗粒在不同成熟时间的分布状态描述在不同的研究动物上有所不同。在猪^[5,10]上通常将皮质颗粒的分布描述为 3 级。I 级:皮质颗粒位于整个卵子的皮质层中,卵子发出均匀的荧光;II 级:皮质颗粒开始向细胞膜方向迁移。卵子质膜内侧有较强的光圈,皮质中还有皮质颗粒,但其发出的荧光较弱;III 级:皮质颗粒排布在质膜下,形成单层的光环。李荣凤等^[3]根据荧光显微镜下观察到的牛皮质颗粒的分布,将其分成中间分布和皮层分布,并根据皮质颗粒的聚集状态又分为部分聚合、完全聚合和

完全分散。本试验观察到的皮质颗粒的分布形式与李荣凤等观察到的基本相似。

EGF 是一种局部调节因子,广泛存在于人体的体液和组织中,具有多种生物学效应。Lonergan 等^[11]在卵母细胞成熟培养液中加入 EGF,发现无论浓度大小均可促进卵丘细胞扩展。艾继辉等^[12]发现 EGF 能提高裸卵的成熟率,促进卵丘卵母细胞复合体(COC)的胞质成熟,提高受精率。另外,Goud 等^[13]还发现对经 EGF 体外培养成熟的 COC、去卵丘裸卵(DO)行单精注射(ICSI),COC 的受精率、卵裂率明显高于 DO,提示 EGF 不仅促进卵母细胞成熟分裂,也促进其胞浆成熟,而卵母细胞的胞质成熟是体外受精和早期胚胎发育所必需的。笔者在成熟培养液中添加不同浓度的 EGF 发现都可以提高卵母细胞胞质的成熟率,与 Lonergan 等报道的结果一致。

IGF 是卵泡发育和生长所必需的生长因子。IGF-1 由颗粒细胞分泌,浓度随卵泡体积增大而升高。体外试验发现,IGF-1 单独或与促性腺激素协同作用能促进卵泡内卵子的发生及卵母细胞成熟^[14]。在含激素和血清的成熟培养液中加入 IGF-1 培养马卵母细胞,对核成熟的影响不明显,但卵母细胞皮质颗粒在成熟过程中迁移程度加强,卵母细胞的孤雌发育能力也显著增强,表明 IGF-1 促进了卵母细胞的胞质成熟^[15]。本研究发现,在成熟培养液中添加不同浓度的 IGF-1 时,卵母细胞胞质成熟率显著高于对照组。当添加量在 30 ng/mL 时,效果较好。在成熟培养液中添加 EGF、IGF-1 或同时添加 IGF-1 和 EGF 都可以显著提高卵母细胞胞质的成熟率,且同时添加 20 ng/mL EGF 与 30 ng/mL IGF-1 的水牛卵母细胞胞质成熟率显著高于单独添加 20 ng/mL IGF-1 组和 30 ng/mL IGF-1 组。由此表明,EGF 和 IGF-1 对水牛卵母细胞的胞质成熟具有促进作用,且两者的协同作用明显。

参考文献:

[1] SHEA B F, LATOUR J P A, BEDIRIAN K N, et al. Maturation *in vitro* and subsequent penetrability of bovine follicular oocyte [J]. *Anim Sci*, 1976, 43:809-875.

[2] GULYAS B J. Cortical granules of mammalian eggs [J]. *Int Rev Cytol*, 1980, 63:357-392.

[3] 李荣凤, 薛晓先, 刘哲, 等. 牛卵母细胞皮层颗粒荧光染色法质成熟鉴定 [J]. *畜牧兽医学报*, 2000, 31(3):203-210.

[4] HOSOE M, SHIOYA Y. Distribution of cortical

granules in classified bovine oocyte [J]. *Theriogenology*, 1996, 45(1):274.

[5] WANG W H, HOSOE M, LI R F, et al. Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation [J]. *Develop Growth Differ*, 1997, 39:607-615.

[6] IZADYAR F, HAGE W J, COLENBRANDER B, et al. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes due to improved cytoplasmic maturation [J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 49(4):444-453.

[7] KESKINTEPE 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.

[8] SIRARD M A, COENEN K, BILODEAU S. Effect of fresh or cultured follicular fraction on meiotic resumption in bovine oocytes [J]. *Theriogenology*, 1992, 37:39-57.

[9] SIRARD M A, RICHARD F, MAYES M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes a review [J]. *Theriogenology*, 1998, 19:483-497.

[10] 杨信志, 宋学雄, 岳奎忠, 等. 猪卵巢卵母细胞体外成熟及体外受精过程中皮质颗粒变化的研究 [J]. *解剖学报*, 2000, 31(4):355-358.

[11] LONERGAN P, CAROLAN C. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro* [J]. *Bio Reprod*, 1996, 54(6):1420-1429.

[12] 艾继辉, 罗丽兰, 刘建新. 表皮生长因子卵丘细胞对卵母细胞体外成熟的影响 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2003, 19(4):209-211.

[13] GOUD P T, GOUD A P, QIAN C, et al. *In vitro* maturation human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium [J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(6):1638-1644.

[14] 周汉林, 李琼, 夏万良. 哺乳动物卵母细胞、胚胎体外培养营养研究进展 [J]. *中国草食动物*, 2005, 23(1):51-54.

[15] LI X H, DAI Y F, ALLEN W R. Influence of insulin-like growth factor-I on cytoplasmic maturation of horse oocytes *in vitro* and organization of the first cell cycle following nuclear transfer and parthenogenesis [J]. *Biology of Reproduction*, 2004, 71(4):1391-1396.