

EGF 和 FBS 对牛孤雌胚胎发育的影响^{*}

李向臣¹, 丛日华², 安志兴¹, 王超¹, 张涌¹

(1 西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100;

2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 在卵母细胞体外成熟液中分别添加 0, 10, 30, 50 ng/mL 表皮生长因子(EGF), 24 h 检查成熟率, 将成熟的卵母细胞置于 5 μ mol/L 离子霉素(Ionomycin)中激活 5 min 后, 在含有 6-DMAP 和 CCB 的培养液中培养 4 h, 最后移入 CR1 培养液中培养, 并在孤雌激活后第 0, 2, 4, 6 天添加体积分数 10% 的胎牛血清(FBS), 7~8 d 后检查囊胚率, 探讨牛成熟培养液中添加 EGF 及 FBS 对牛孤雌胚胎发育的影响。结果表明, 添加 30 ng/mL 的 EGF 能促进卵母细胞的成熟率和孤雌囊胚的发育率; 在第 4 天添加 FBS 更有利于胚胎的发育。

[关键词] 表皮生长因子; 胎牛血清; 孤雌激活; 胚胎; 牛

[中图分类号] S823.3+6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)04-0051-04

体外成熟卵母细胞的受精、卵裂及早期胚胎发育率很低, 这种现象可能是由于体外培养时胞质未完全成熟所致, 尤其是对用于核移植的卵母细胞而言, 胞质的成熟直接影响重构胚能否维持正常的分裂发育。近年来, 一些学者在体外成熟液中加入生长因子以期提高卵母细胞成熟率, 并证明表皮生长因子(EGF)能诱导猪^[1]、牛^[2]等动物体外培养卵母细胞的卵丘细胞扩散, 促进核成熟, 但 EGF 是否能促进胞质成熟还不是很清楚。本试验在成熟液中添加不同浓度的 EGF, 通过对孤雌胚胎发育的影响来确定 EGF 对胞质成熟是否具有促进作用。

血清是胚胎培养中常用的蛋白源物质, 但血清是一个复杂的系统, 含有一些尚未确定的物质, 因此其对胚胎的发育具有双重作用^[3]。多数学者认为^[4], 血清对胚胎最初发育不利, 而对后期胚胎的发育具促进作用。Robl 和 Davis^[4]的试验表明, 桑葚胚在含有血清的培养液中, 囊胚的发育率提高。本试验在孤雌胚胎培养的不同时期添加 FBS, 研究何时加入血清更有利于孤雌胚胎的发育, 以期核移植胚的培养提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 卵母细胞的体外成熟培养

将从屠宰场采集的卵巢置于 25~35℃ 的生理盐水中, 3~5 h 内运回实验室。用灭菌的生理盐水洗涤 2~3 次, 用 12# 针头抽取直径为 2~8 mm 卵

泡的卵泡液采集卵母细胞, 用 PBS 缓冲液稀释, 在体视显微镜下, 收集形态正常、结构完整的 A、B 级卵母细胞, 用平衡 2 h 以上的卵母细胞成熟液洗 2 次后用于成熟培养, 培养条件为: 38℃, 体积分数 5% CO₂ 和饱和湿度。卵母细胞成熟培养液组成为: M199 粉 9.5 g/L, Hepes 10 mmol/L, 丙酮酸钠 1 mmol/L, L-谷氨酰胺 2.5 mmol/L, 尿促性素(HMG) 0.075 U/mL (Serono), 17 β 雌二醇(17 β E₂) 1 μ g/mL, 体积分数 10% FBS (Gibico), 成熟培养 24 h 后置于含体积分数 0.1% 透明质酸酶的无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS 中, 用吸管反复吹打去掉卵母细胞周围的卵丘细胞, 在体视显微镜下观察第一极体的排出情况, 检查成熟率。

1.2 卵母细胞的孤雌激活

选择排出第一极体的卵母细胞, 在含 5 μ mol/L 离子霉素(Ionomycin)的 CR1 中激活 5 min, 然后在含 2 mmol/L 6-DMAP 和 5 μ mol/L 细胞松弛素 B (CB) 的 CR1 中培养 4 h, 用培养液洗 3 次后进行培养, 48 h 检查卵裂率, 7~8 d 检查囊胚发育率。

1.3 试验设计及统计分析

试验包括 2 项内容。试验 1 分析成熟过程中添加 EGF 对卵母细胞成熟及其后继发育的影响, 分别加入 10, 30, 50 ng/mL 的 EGF, 并设立对照组, 统计成熟率、卵裂率和囊胚发育率。试验 2 以孤雌激活当天计为第 0 天, 分别在胚胎发育的第 0, 2, 4 和 6 d 添加 FBS, 观察 FBS 对早期孤雌胚胎发育的作用。

^{*} [收稿日期] 2003-04-08

[基金项目] 国家“863”计划项目(2001AA213081)

[作者简介] 李向臣(1973-), 男, 内蒙古通辽人, 在读硕士, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。

所有试验重复 3 次以上,数据用 χ^2 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 EGF 对卵母细胞成熟及孤雌发育的影响

由表 1 知,添加不同浓度的 EGF 均能提高卵母细胞的成熟率,但以 30 ng/mL EGF 的效果最好,其与添加 10, 50 ng/mL EGF 时的卵母细胞成熟率

间存在显著差异($P < 0.05$),与对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。结果同时显示,添加 EGF 能够促进囊胚发育率,添加组与对照组相比存在显著差异,尽管添加 10, 30, 50 ng/mL EGF 之间无显著差异,但以添加 30 ng/mL 时的囊胚发育率最高,表明添加 30 ng/mL 的 EGF,无论是对卵母细胞成熟的促进,还是对孤雌胚囊胚发育率的提高,效果都是最佳的。

表 1 EGF 对牛卵母细胞成熟及孤雌胚发育的影响

Table 1 Effect of EGF on bovine oocytes maturation and parthenogenetic embryo development

EGF/ (ng · mL ⁻¹)	卵母细胞数 No. of oocytes	成熟率/% Matura- tion rate	激活卵数 No. of acti- vated oocytes	卵裂数 No. of cleavage	囊胚发育率/% Rate of blastoc- ysts
0	242	65.28 a (158/242)	158	118	8.47 a (10/118)
10	197	72.08 a (142/197)	142	113	18.58 b (21/113)
30	206	82.03 b (169/206)	169	147	24.49 b (36/147)
50	237	72.15 a (171/237)	171	144	18.75 b (27/144)

注:同一列中标注不同字母表示差异显著($P < 0.05$),下表同。

Note: Figures with different letters in the same column show significant difference, $P < 0.05$. The following tables are the same.

2.2 FBS 对牛孤雌胚发育的影响

不加血清的对照组与 0, 2, 4, 6 d 添加 FBS 组的孤雌胚发育结果见表 2。第 4 天与第 2 天和第 6 天添加组及对照组之间存在显著差异($P < 0.05$),与第 0 天存在极显著差异($P < 0.01$),对照组第 0 天

组和第 2 天组间无显著差异($P > 0.05$),第 0 天组与第 6 天组间差异显著($P < 0.05$)。添加 FBS 的时间以第 4 天开始效果最好,在孤雌激活后的第 0 天和第 2 天开始添加 FBS 对孤雌胚发育有不良影响。

表 2 FBS 对牛孤雌胚发育的影响

Table 2 Effect of FBS on bovine parthenogenetic embryo development

处理时间/d Time of treatment	激活卵数 No. of activated oocytes	卵裂数 No. of cleavage	囊胚发育率/% Rate of blastocysts
CK	246	202	18.32 a (36/202)
0	267	224	11.61 a (26/224)
2	217	178	19.10 a (34/178)
4	236	192	30.18 b (57/192)
6	185	167	22.75 b (38/167)

3 讨论

卵母细胞的成熟是一个复杂的动态过程,涉及许多代谢过程,通常以第一极体的排出作为判断卵母细胞成熟的标准,但这仅仅能证明核成熟。EGF 已经被证实^[5]能促进牛、鼠、猫、人卵母细胞的核成熟,该作用可能是通过颗粒细胞介导的,因为添加 EGF 培养牛的裸卵时并未发现生发泡的破裂(GVBD)。其可能的机制是:(1)卵丘细胞的存在增加了卵母细胞表面积与体积之比,促进了众多小分子物质如 EGF 进入卵母细胞^[6];(2)卵丘细胞微绒毛可穿过透明带与卵母细胞形成缝隙连接和桥粒,

有助于卵母细胞代谢过程中重要物质的转运^[6];(3)颗粒细胞可通过旁分泌信号直接作用于卵母细胞,表明卵母细胞和颗粒细胞共培养有助于卵子发育^[6];(4)Flod 认为^[7],EGF 提高牛囊胚发育率是因为 EGF 与滋养层细胞结合有关。这种结合可能激活滋养层细胞膜上的 Na^+/H^+ 交换^[8]。Park 等^[9]报道,添加 EGF 的浓度为 30 ng/mL 以下时,对成熟无促进作用,这与本试验结果相一致。Coskun 等^[10]使用 10 ng/mL 的 EGF,能显著提高牛成熟卵母细胞原核形成率、卵裂率以及 4~8 细胞发育率。本试验研究表明,30 ng/mL EGF 对卵母细胞成熟率和胚胎发育率有显著的提高作用;对孤雌胚的培养结

果发现, 10 ng/mL 的 EGF 对成熟卵母细胞的囊胚率与不加 EGF 组相比有显著差异, 说明 EGF 不但可以促进卵母细胞核成熟, 而且也可能促进牛卵母细胞的胞质成熟。

在培养液中添加各种血清或牛血清白蛋白, 这是适宜的也是必要的。但血清中含有很多未知成分, 所以加血清的培养液培养结果往往不稳定。Rizo 等^[11]在 SOF 培养液中加入胎牛血清后, 检测到 SOX, Bax, LIF, LR- β 表达水平显著增加, 而 Cx43 和 IFN- τ 相反却有下降的趋势。有研究^[12]表明, 血清中含有高浓度的肌醇, 不同批次的血清, 其促进胚胎发育的能力与其中肌醇浓度的高低呈正相关, 肌醇及其代谢中间物是细胞信号转导系统的重要成分, IP3 具有第二信使功能, 而肌醇的一些代谢直接具有促有丝分裂的效应^[13]。血清中还含有高浓度的

柠檬酸钠, 在血清中提取 BSA 时, 为防止凝血还要加入柠檬酸钠, 因此柠檬酸钠是 BSA 中除蛋白以外的浓度较高的重要物质, 被认为是 BSA 中促进胚胎发育的有效成分之一^[14]。柠檬酸钠可刺激脂肪酸的合成, 同时其又可以作为 Ca^{2+} 的螯合剂, 使细胞间紧密连接开放, 从而增加细胞间溶质穿梭运输, 因此柠檬酸钠可以保持细胞间连接的完整性, 从而对桑葚胚及囊胚的形成具有重要意义^[15]。培养液中不加血清及血清白蛋白, 牛胚胎发育会阻滞在 8~16 细胞。Pinyopumm intr^[3] 研究表明, 在胚胎发育早期血清对胚胎发育有抑制作用, 而在胚胎发育后期又具有促进作用。本试验研究发现, 在牛孤雌胚培养的第 3~4 天时加入 FBS, 能够显著提高囊胚发育率, 在牛孤雌胚培养的开始就添加血清, 对胚胎的发育不利。

[参考文献]

- [1] Wang W, Nwika K. Synergistic effects of EGF and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocytes in a serum-free medium [J]. Zygote, 1995, 3: 345-350.
- [2] Lorenzo PL, Illera MJ, Llobera JC, et al. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the addition of EGF and IGF-1 [J]. J Reprod Fert, 1994, 101: 697-701.
- [3] Pinyopumm intr T, Bavister BD. Development of bovine embryo in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and in activation [J]. Theriogenology, 1994, 41: 1241-1249.
- [4] Robl JM, Davis DL. Effects of serum on swine morulae and blastocysts *in vitro* [J]. J Anim Sci, 1981, 52: 1450-1456.
- [5] 周欢敏, 张涌. 生长因子对山羊无腔卵泡卵母细胞体外生长的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2001, 32(1): 23-27.
- [6] Goud PT, Goud AP, Qian C, et al. *In vitro* maturation of human germinal vesicle stage oocyte: role of cumulus cells and epididymal growth factor in the culture medium [J]. Hum Reprod, 1998, 13(6): 1638-1644.
- [7] Flood MR, Gage TL, Bunch TD. Effect of various growth-promoting factors on preimplantation bovine embryo development *in vitro* [J]. Theriogenology, 1993, 39(4): 823-833.
- [8] Corps AN, Brigstock DR, Littlewood CJ, et al. Receptors for epididymal growth factors and insulin-like growth factor-I on preimplantation trophectoderm of the pig [J]. Development, 1990, 110: 221-227.
- [9] Park KW, Iga K, Nwika K. Exposure of bovine oocytes to EGF during maturation allows them to develop to blastocysts in a chemically-defined medium [J]. Theriogenology, 1999, 48: 1127-1135.
- [10] Coskun S, Sanbuissho A, Lin YC, et al. Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing EGF [J]. Theriogenology, 1991, 36: 485-494.
- [11] Rizo D, Gutierrez-Aranda S, Perez-Garnelo J, et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression [J]. Bio Reprod, 2003, 68: 236-243.
- [12] Chiu TT. A correlation of the outcome of clinical *in vitro* fertilization with the inositol content and embryotrophic properties of human serum [J]. J Assist Reprod Genet, 1992, 9: 524-530.
- [13] Downes CP, Macphree CH. Myo-inositol metabolites as cellular signals [J]. J Biochem, 1990, 193: 1-18.
- [14] Kane D. A low molecular weight extract of bovine serum albumin simulate rabbit blastocyst cell division and expansion [J]. J Reprod Fert, 1985, 73: 147-150.
- [15] Gray CW. Purification of an embryo trophic factor from commercial bovine serum albumin and its identification as citrate [J]. J Reprod Fert, 1992, 94: 471-480.

The influence of EGF and FBS on parthenogenetic embryo proliferation of bovine

L I Xiāng-chen¹, CONG Ri-hua², AN Zhi-xing¹, WANG Chao¹, ZHANG Yong^{1*}

(1 Institution of Bio-Engineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: After the matured media was added 0, 10, 30 and 50 ng/mL Epidemal Growth Factor (EGF) respectively, oocytes were cultured for 24 hours and the rate of matured oocytes was counted. Then the matured oocytes were activated in 5 μ mol/mL ionomycin and were cultured in 6-DMA P and CCB for 4 hours, and were finally cultured in CR1. Simultaneously, just as the matured oocytes was activated, 10% Fetal Bovine Serum (FBS) was added to solution in the 0th, 2nd, 4th, 6th day and the rate of blastocytes was counted on 7th and 8th day. Results demonstrated that the media with 30 ng/mL EGF had benefited the rate of oocytes matured and proliferation rate of parthenogenetic embryos. This experiment discussed that EGF added to the matured culture medium for bovine oocytes and FBS added in different phages to the embryo culture media had an effect on bovine parthenogenetic embryo proliferation. Moreover, adding FBS on the 4th day showed better effect on parthenogenetic embryo development.

Key words: epidemal growth factor; fetal bovine serum; parthenogenetic activation; bovine

(上接第 50 页)

Research on application of GIS technology in fam land flatting project design

LU Cheng-shu, WU Ci-fang

(College of Resource and Environmental Science, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029, China)

Abstract: The paper introduced the application of Geographic Information System (GIS) in fam land flatting project design, especially in fam land elevation design and earthwork calculation, then Taking Langxi county of Anhui Province as a case study of ArcGIS desktop software. Finally, the problem and strategy of the application of GIS in land consolidation were discussed.

Key words: GIS; land consolidation; fam land flatting; earthwork calculation; fam land elevation design