

EGF 和不同血清对牛卵母细胞成熟及核移植胚胎体外发育的影响

王亚刚¹, 隋丽娜¹, 彭新荣¹, 赛务加甫^{1,2}, 郭志林¹, 李向臣¹, 王勇胜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 新疆石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832003)

[摘 要] 分离牛卵母细胞, 分别用添加表皮生长因子(EGF)和发情牛血清(发情当天血清(OCS(0 d)) and 发情第 7 天血清(OCS(7 d)))的培养液进行成熟培养后去核, 构建牛体细胞核移植胚并进行体外培养, 研究 EGF 和 OCS 对卵母细胞成熟及核移植胚胎体外发育的影响。结果表明 EGF 添加组和 OCS(0 d)添加组卵母细胞的成熟率及核移植胚的卵裂率和囊胚率分别为 74.5%, 84.6%, 25.9% 和 83.9%, 78.8%, 31.3%。在牛卵母细胞成熟液中添加 EGF、OCS(0 d)更有利于牛核移植胚胎的发育。

[关键词] 表皮生长因子; 发情牛血清; 胎牛血清; 核移植胚

[中图分类号] S823; Q813.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)10-0025-04

Effect of EGF and different serum on the maturation of bovine oocytes and the development of bovine somatic nuclear transfer embryos in vitro

WANAG Ya-gang¹, SUI Li-na¹, PENG Xin-rong¹, SAU Wu-jiafu^{1,2}, GUO Zhi-lin¹,
LI Xiang-chen¹, WANG Yong-sheng¹, ZHANG Yong¹

(1 Institution of Bio-Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China)

Abstract: Oocytes were isolated from bovine ovaries, enucleated after maturation in maturation medium with EGF or OCS (0 d and 7 d), respectively. Nuclear transfer embryos were constructed and cultured in vitro, and the influence of EGF and OCS on oocyte maturation was also studied. The results showed that the rates of maturation, cleavage and blastocysts on group adding EGF and group adding OCS(0 d) were 74.5%, 84.6%, 25.9% and 83.4%, 78.7%, 31.3%, respectively. The results indicate that the nuclear transfer embryos' development is better in the oocytes maturation medium with EGF or OSC(0d).

Key words: EGF; OCS; FBS; nuclear transfer embryos

哺乳动物的核移植技术是近年来生物工程研究的热点之一, 科研人员在此方面做了大量的工作。但目前核移植的效率仍然很低, 究其原因, 主要是卵母细胞体外成熟及培养系统不完善, 导致胞质未完全成熟所致。用于核移植的受体卵母细胞胞质的成熟情况直接影响着核移植胚的正常发育。因此, 在

核移植受体胞质研究上, 优化培养条件, 提高卵母细胞体外成熟效果对提高核移植效率有重大意义。

近年来, 一些学者在体外成熟液中加入表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)^[1-2]和发情牛的血清(Oestrous Cow Serum, OCS), 以期提高卵母细胞成熟率和胚胎的发育能力。但目前此方面的

收稿日期: 2006-09-04

基金项目: 国家“863”计划项目(2004AA213072)

作者简介: 王亚刚(1979-), 男, 陕西凤翔人, 在读硕士, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。

通讯作者: 张 涌(1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事胚胎工程与转基因动物研究。

研究多是用孤雌胚胎或体外受精胚胎来评价卵母细胞胞质成熟程度,而用核移植胚来评价卵母细胞成熟程度的研究尚未见报道。为此,本试验用分别添加 EGF 和 OCS 的卵母细胞成熟液培养牛卵母细胞,用获得的成熟卵母细胞构建牛体细胞核移植胚,从卵母细胞的成熟率、核移植胚的发育能力等方面研究 EGF 和 OCS 对卵母细胞胞质成熟的影响,以期核移植工作提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 牛卵巢 牛卵巢采自西安市屠宰场,将采集的牛卵巢置于装有 25 ~ 35 生理盐水 (9 g/L NaCl) 的保温瓶中,3 ~ 5 h 内运回实验室。

1.1.2 试剂及仪器 促黄体素 (LH) 购自宁波制药厂,促卵泡素 (FSH) 购自中国科学院动物所,胎牛血清 (FBS) 购自 Hyclone 公司。发情牛血清 (OCS) 为西北农林科技大学生物工程研究所采用常规方法自制,56 灭活 30 min 后使用,发情当天牛的血清记为 OCS(0 d),发情第 7 d 牛的血清记为 OCS(7 d)。其余试剂均购自 Sigma 公司。Nikon2000 显微操作仪为日本 Nikon 公司产品。

1.2 牛卵母细胞的采集和成熟培养

将牛卵巢用灭菌生理盐水洗涤 2 ~ 3 次,用 12# 针头抽取直径为 2 ~ 8 mm 卵泡的卵泡液,收集胞质均匀、卵丘细胞包裹完整的卵母细胞。将牛卵母细胞用平衡 2 h 以上的卵母细胞成熟培养液洗 2 次后,分别用添加 30 ng/mL EGF^[3] 及体积分数 10% FBS 和 OCS(0 d)、OCS(7 d) 的基础成熟培养液,于 38.5 、体积分数 5% CO₂ 和饱和湿度条件下成熟培养 22 h。基础成熟液的组成为:9.5 g/L M199 + 5 μg/mL FSH + 1.0 U/mL LH + 10 mmol/L Hepes + 1 mmol/L 丙酮酸钠 + 25 mmol/L 谷氨酰胺 + 1 μg/mL 17β-E₂。成熟液添加 OCS 时不添加 FBS。

1.3 牛卵母细胞的去核操作

牛卵母细胞体外成熟培养 22 h 后,置于 1 mg/mL 的透明质酸酶中消化,去除周围的卵丘细胞。选出有第一极体且形态良好的卵母细胞,在 Nikon 倒置显微镜下用固定管从极体对侧固定卵母细胞,用外径 15 ~ 20 μm 的斜口去核管吸出极体及附近一部分细胞质去核。随机抽取已去核的卵母细胞,于含有 5 μg/mL Hoechst 33342 的培养液内培

养 15 min,然后用 PBS 洗 2 次,在荧光显微镜下检查去核情况。

1.4 牛体细胞核移植胚的构建

将去核的牛卵母细胞置于注核微滴中,用石蜡油覆盖,再吸取供体细胞悬液加入注核微滴,置显微操作仪下注核。用外径 120 μm 固定管固定卵母细胞,再用外径 12 μm 的显微注射管反复抽吸供体细胞,使供体细胞膜破裂为核胞体,再轻轻将核胞体注射到去核的牛卵母细胞胞质中央。注核后将体细胞核移植胚移入胚胎培养液 (So Faa)^[4] 中培养 2 h。

1.5 牛体细胞核移植胚的激活和体外培养

体细胞核移植胚在 So Faa 中培养 2 h 后,在含 5 μmol/L 离子霉素的 SOFaa 中处理 5 min,然后在含 2 mmol/L 6-DMAP 的 SOFaa 中培养 4 h。激活后的核移植胚立即洗涤,并移入预先平衡好的含有颗粒细胞单层的 So Faa 微滴中,置 38.5 、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下培养 7 ~ 8 d,所用培养液同 1.2 节。期间每 2 d 换液 1 次,48 h 检查卵裂率,第 4 d 开始添加体积分数 10% FBS,第 7 ~ 8 天检查囊胚发育率。

1.7 数据统计分析

上述试验均重复 10 次,所得数据采用 SPSS 统计软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 EGF 对牛卵母细胞成熟及核移植胚发育的影响

由表 1 可知,与对照组相比,在成熟液中添加 EGF 显著地提高了卵母细胞的成熟率 ($P < 0.05$)、极显著提高了核移植胚的卵裂率和囊胚率 ($P < 0.01$)。表明成熟液中添加 EGF 有利于牛卵母细胞的核成熟和胞质成熟。

2.2 牛血清对牛卵母细胞成熟及核移植胚发育的影响

由表 2 可知,OCS(0 d) 添加组卵母细胞的成熟率极显著地高于 OCS(7 d) 添加组 ($P < 0.01$);OCS(0 d) 添加组的卵裂率高于 OCS(7 d) 添加组,但二者之间差异不显著 ($P > 0.05$);OCS(0 d) 添加组的囊胚率极显著高于 OCS(7 d) 添加组 ($P < 0.01$)。由表 2 还可知,成熟液中添加 OCS(0 d) 组卵母细胞的成熟率、核移植胚的卵裂率及囊胚率均极显著高于 FBS 添加组 ($P < 0.01$)。表明成熟液中添加 OCS(0 d) 更有利于卵母细胞的核成熟和胞质成熟。

表 1 EGF 对牛卵母细胞成熟及核移植胚发育的影响

Table 1 Effect of EGF on bovine oocytes maturation and NT embryos development

组别 Group	EGF 添加量/ (ng · mL ⁻¹)	对卵母细胞的影响		对核移植胚的影响		
		Effect on oocyte		Effect on NT embryo's development		
		卵母细胞数 No. of oocytes	卵母细胞成熟率/ % Maturation rate	核移植胚数 No. of NT embryos	卵裂率/ % Cleavage rate	囊胚率/ % Rate of blastocysts
试验组 Experiment group	30	235	74.5 (175/ 235) a	169	84.6 (143/ 169) A	25.9 (37/ 143) A
对照组 Control group	0	276	65.2 (180/ 276) b	174	60.9 (106/ 174) B	11.3 (12/ 106) B

注:同一列标注不同大写字母者表示差异极显著 ($P<0.01$),标注不同小写字母者表示差异显著 ($P<0.05$),下表同。
Note:Different capital letters in the same columns indicate greatly significant difference ($P<0.01$),and different small letters indicate significant difference ($P<0.05$). The same as follows.

表 2 不同血清对牛卵母细胞成熟率及体细胞核移植胚发育的影响

Table 2 Effect of serum on bovine oocytes maturation and NT embryos development

组别 Group	对卵母细胞的影响		对核移植胚的影响		
	Effect on oocyte		Effect on NT embryo		
	卵母细胞数 No. of oocytes	卵母细胞成熟率/ % Maturation rate	核移植胚数 No. of NT embryos	卵裂率/ % Cleavage rate	囊胚率/ % Rate of blastocysts
OCS(0 d)添加组 Control group	254	83.9(213/ 254) A	207	78.7(163/ 207) A	31.3 (51/ 163) A
OCS(7 d)添加组 1 Experiment group 1	219	60.3(132/ 219) B	129	69.8(90/ 129) AB	15.6 (14/ 90) B
FBS 添加组 2 Experiment group 2	442	67.0(296/ 442) B	282	60.6 (171/ 282) B	11.1 (19/ 171) B

3 讨 论

3.1 EGF 对卵母细胞成熟及核移植胚发育的影响

EGF 是由 53 个氨基酸组成的多肽,是动物机体内分泌的一种重要的生长因子。EGF 的受体存在于动物和人类卵丘复合体上,且随着卵泡的发育其表达增强,在排卵前达到高峰^[4]。EGF 与颗粒细胞上的受体结合后,通过酪氨酸蛋白激酶途径传递信号,在 COCs 体外成熟时促进蛋白质合成,进而促进卵母细胞核和胞质成熟及受精分裂^[5]。Guler 等^[6]发现,EGF 对绵羊卵子的体外成熟、卵裂及囊胚形成均有促进作用。李向臣等^[7]研究发现,EGF 能显著提高牛卵母细胞的成熟率和孤雌胚胎的发育率。Lonergan 等^[8]和 Lorenzo 等^[9]证明,EGF 不仅可以促进牛卵母细胞体外成熟,而且可以进一步提高体外成熟的卵母细胞形成囊胚的比例。本试验结果显示,EGF 可促进牛卵母细胞的核成熟(第一极体的排出)和胞质成熟(囊胚的形成)。

3.2 发情牛血清对牛卵母细胞成熟及核移植胚发育的影响

发情牛血清中含有一定浓度的激素和促成熟因子,能促进卵母细胞的成熟。与 OCS(0 d)相比,OCS(7 d)中孕酮的含量较高、而雌激素的含量较低^[10-11]。卵泡腔开始形成时,雌激素可协同 FSH 刺激颗粒细胞的有丝分裂和促进卵泡液的形成,并可促进蛋白质的合成。因此,一定浓度的雌激素可促

进颗粒细胞蛋白质的合成,进而影响卵母细胞的成熟^[12]。雌激素是促进胞质成熟的重要因子,其不仅能促进卵母细胞成熟分裂的复始,而且能显著提高卵母细胞的受精能力及早期胚胎的发育能力^[13]。有报道显示,体外成熟液中添加孕酮,能提高牛卵母细胞的受精率和卵裂率^[14]。本试验结果表明,OCS(0 d)组卵母细胞的成熟率极显著地高于 OCS(7 d)组,OCS(0 d)的卵裂率高于 OCS(7 d)组,这可能是因为雌激素和孕酮都能提高卵母细胞的卵裂率;OCS(0 d)组的囊胚率极显著高于 OCS(7 d)组,说明雌激素对卵母细胞的胞质成熟程度有重要影响。

3.3 不同血清对牛卵母细胞成熟及核移植胚发育的影响

在卵母细胞成熟中,血清的作用是为颗粒细胞提供营养,并防止透明带硬化。目前,在体外成熟中常用的血清有胎牛血清(FBS)、新生牛血清(NBS)和发情牛血清(OCS)。在使用胎牛血清和新生牛血清时,要求培养液有较高浓度的激素;而在使用发情牛血清时,培养液激素浓度要求较低或不需要激素。本试验结果表明,无论是卵母细胞的成熟率,还是核移植胚的卵裂率及囊胚率,OCS(0 d)添加组均极显著高于 FBS 添加组,说明 OCS(0 d)更有利于卵母细胞的核成熟和胞质成熟,其原因可能是 OCS(0 d)中含有促进卵母细胞成熟和胚胎发育的激素及细胞因子。

[参考文献]

- [1] Rieger D, Lucino A M, Modina S, et al. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes in vitro[J]. *Reprod Fertil*, 1998, 12(1): 123-130.
- [2] Lorenzo P, Illera M J, Illera J C, et al. Specific actions of growth factors (EGF and IGF-I) on the in vitro maturation of bovine oocytes[J]. *Rev Esp Fisiol*, 1993, 49(4): 265-270.
- [3] Ednspanier R, Schonfelder M, Miller K, et al. Expression of the vascular endothelial growth factor and its receptors and effects of VEGF during invitro maturation of bovine cumulus-oocyte complex (COC) [J]. *Mo Reprod Dev*, 2002, 62(1): 29-36.
- [4] Cho i Y H, Takagi M, Kamishita H, et al. Effects of follicular fluid on fertilization and embryonic development of bovine oocytes in vitro[J]. *Theriogenology*, 1998, 49: 1032-1112.
- [5] Purohit G N, Brady M S, Sharma S S. Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor 1 on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development in vitro [J]. *Anim Reprod Sci*, 2005, 87(3/4): 229-239.
- [6] Guler A, Poulin N, Mermillod P, et al. Effect of growth factors, EGF and IGF-I and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes[J]. *Theriogenology*, 2000, 54(2): 209-218.
- [7] 李向臣, 丛日华, 安志兴, 等. EGF 和 FBS 对牛孤雌胚胎发育的影响[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2004, 32(4): 51-54.
- [8] Lonergan P, Carolan C, Van L A, et al. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro[J]. *Biol Reprod*, 1996, 54: 1420.
- [9] Lorenzo P L, Illera M J, Illera J C, et al. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I [J]. *J Reprod Fertil*, 1994, 101(3): 697-701.
- [10] 卢惠霖, 卢光琇. 人类生殖与生殖工程[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2001.
- [11] 陈海燕, 傅 衍. 中国荷斯坦牛发情周期中孕酮、雌二醇含量的变化规律[J]. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2005, 23(3): 122-124.
- [12] 张 涌, 刘泽隆, 李裕强. 山羊卵泡卵母细胞体外成熟的研究[J]. *西北农业大学学报*, 1999, 27(1): 14-18.
- [13] 郭建来, 魏红芳. 影响牛卵母细胞体外成熟的因素[J]. *郑州牧业工程高等专科学校学报*, 2005, 25(3): 176-179.
- [14] Pinyopumm intr T, Bavister B D. Development of serum, timing of its inclusion and heat in activation[J]. *Theriogenology*, 2001, 41: 1241-1249.

欢迎订阅《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会主办的学术期刊,创刊于 1962 年,刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究简报、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息,适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中国科技核心期刊,被中国科学引文数据库 Chinese Science Citation Database 等多家重要数据库收录并荣获第三届国家期刊奖及中国科协精品科技期刊工程项目资助。2006 年《园艺学报》总被引频次 1987 次,影响因子 0.814,在全国 1652 种科技期刊中分别排名第 57 位和第 152 位。

2007 年《园艺学报》为双月刊,双月 25 日出版。每期定价 20.00 元,全年 120.00 元。

2008 年改为月刊,每月 25 日出版。每期定价 15.00 元,全年 180.00 元。

国内外公开发行,全国各地邮局办理订阅,国内邮发代号 82-471,国外发行由中国国际图书贸易总公司承办,代号 M448。漏订者可直接寄款至本编辑部订购。

编辑部地址:北京市海淀区中关村南大街 12 号 中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部
邮政编码:100081 电 话:(010)68919523