

古丽米热·阿布都热依木, 吴阳升, 林嘉鹏, 等. 绵羊卵丘细胞直径与卵母细胞质量的相关性[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(12): 236–239.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2014.12.081

绵羊卵丘细胞直径与卵母细胞质量的相关性

古丽米热·阿布都热依木^{1,2}, 吴阳升², 林嘉鹏², 汪立芹², 张利^{2,3}, 蒋香菊^{2,3}, 杨楠^{1,2}, 唐淑红^{1,2}, 黄俊成²

(1. 新疆农业大学, 新疆乌鲁木齐 830000; 2. 新疆畜牧科学院动物生物技术研究中心, 新疆乌鲁木齐 830000;

3. 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832000)

摘要:利用 RT-PCR 方法, 检测不同直径绵羊卵泡卵丘细胞中 *FSHR*、*EGFR*、*GHR*、*bFGF*、*CYP19A*、*AMH* 基因的 mRNA 表达规律及卵母细胞孤雌激活后胚胎发育的影响, 结果表明, 大、中、小卵泡卵丘细胞中都有 *FSHR*、*EGFR*、*GHR*、*bFGF*、*CYP19A*、*AMH* 的 mRNA 表达, 不同直径卵泡卵丘细胞呈现递增趋势, 大卵泡卵丘细胞与中小卵泡的卵丘细胞相对表达量差异显著 ($P < 0.05$); *AMH* 在直径 > 5.0 mm 的卵泡卵丘细胞中有所下降。不同大小卵泡卵母细胞经体外培养, 结果表明, 各卵泡卵母细胞直径组间成熟率不显著, 随卵泡直径的增大卵裂率增加, 1.0 ~ 2.0 mm 组与 2.1 ~ 5.0 mm 组卵裂率都显著低于 > 5 mm 组 ($P < 0.05$), 相互间无差异 ($P > 0.05$); 囊胚率也呈现逐渐增加的趋势, 卵泡大于 5.0 mm 卵母细胞组极显著高于 1.0 ~ 2.0 mm 组 ($P < 0.01$), 2.1 ~ 5.0 mm 组 ($P < 0.05$)。证实卵丘细胞在绵羊卵母细胞成熟和受精及随后的胚胎发育过程中起重要作用, 卵泡直径对卵母细胞发育能力产生影响。

关键词:绵羊; 卵丘细胞; 卵母细胞; RT-PCR

中图分类号: S826.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2014)12–0236–04

准确判断卵母细胞的发育能力是提高各类辅助生殖成功的必要条件, 从形态学上观察卵母细胞的厚度及卵丘细胞包裹的紧密程度是评估卵母细胞质量的常用手段^[1–2], 这种标准并不能真正预测胚胎的健康, 需要从分子角度鉴定预测卵母细胞的功能。卵丘细胞是指在卵母细胞外周并与之进行代谢联系的颗粒细胞群, 对于卵母细胞成熟有极其重要的作用, 主要表现在卵丘细胞参与维持卵母细胞减数分裂阻滞、诱导卵母细胞减数分裂恢复并支持卵母细胞细胞质的成熟。卵丘细胞形态和卵丘细胞扩展影响卵母细胞成熟的同时, 卵母细胞对卵丘细胞的分化及发育也起着中心调节作用^[3]。Li 等研究证明卵母细胞对卵丘细胞表型和生存有重要的调节作用, 对卵丘细胞增殖、扩散、分化及细胞死亡、类固醇激素分泌有显著影响^[4–5]。最近, Ledda 等提出, 卵泡液和卵丘细胞可贮存及释放某些生长因子和某些特定蛋白质, 在卵母细胞成熟及胚胎发育过程中按一定顺序表达, 或通过选择性地扩散来调节胚胎生长发育^[6]。鉴于卵丘细胞与卵母细胞双向通信的作用, 可以推断卵母细胞的发育能力变化很可能影响卵丘细胞的表型或者基因的表达, 从而通过调节这些基因的表达来提高卵母细胞的发育能力。

本研究通过 RT-PCR 方法, 检测绵羊不同直径卵泡卵丘细胞 *FSHR*、*EGFR*、*GHR*、*bFGF*、*CYP19A*、*AMH* 基因的 mRNA

表达差异, 以推断这些基因对卵母细胞发育能力的影响, 对预测卵母细胞体外发育能力有着重要的意义。RT-PCR 方法克服了通过表观参数而选择卵母细胞的不可靠性, 是一个非侵入性辨别卵母细胞质量的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品及试剂 RNeasy Micro RNA 提取试剂盒、QIAEX II 琼脂糖凝胶回收试剂盒, 均购于 QIAGEN; 反转录试剂盒 RNA LA-PCR (AMV)、荧光实时定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Taq、Taq DNA 聚合酶、pMD19-T 载体, 均购于大连宝生物公司; 培养用胎牛血清 (FBS)、非必需氨基酸 (NEAA), 均购自 Gibco 公司; 牛血清白蛋白 (BSA), 购自 Bovogen 公司。

1.1.2 绵羊卵泡采集 绵羊卵巢来源于新疆维吾尔自治区乌鲁木齐当地屠宰场。将采集的卵巢放入 37 ℃、含有 0.9% 生理盐水的保温瓶中, 2 h 内运回实验室; 用生理盐水将成年绵羊卵巢洗涤 3 ~ 4 次, 置于烧杯内, 用注射器抽吸直径为 1.0 ~ 2.0 mm、2.1 ~ 5.0 mm 和 > 5.0 mm 的卵泡, 收集于盛有抽卵液的 90 mm 培养皿中。

1.2 方法

1.2.1 卵母细胞的体外成熟培养 将成年绵羊 GV 期卵丘卵母细胞复合体 (COCs) 按不同直径移入预先平衡好的成熟液中, 在 38.6 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下进行成熟培养, 以卵母细胞周围卵丘细胞扩展程度并排出第一极体作为卵母细胞成熟的标准。

1.2.2 卵丘细胞的分离 在体视镜下, 选取形态完好的 COCs 放入 0.1% 透明质酸酶中, 用玻璃管在成熟培养液中反复吹打机械分离卵丘细胞; 将含有卵丘细胞的成熟培养液, 收集在装有 1.5 mL PBS 的离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃

收稿日期: 2014–01–16

基金项目: 国家转基因重大专项 (编号: 2014ZX08008–003); 国家自然科学基金 (编号: U1203381); 新疆维吾尔自治区科技计划 (编号: 201111113); 新疆维吾尔自治区科技支疆项目 (编号: 201291147)。

作者简介: 古丽米热·阿布都热依木 (1985—), 女, 新疆乌鲁木齐人, 硕士, 从事动物分子生物学研究。E-mail: rere127@163.com。
通信作者: 黄俊成 (1968—), 男, 博士, 研究员, 从事家畜繁殖与胚胎生物技术研究。Tel: (0991) 4835903; E-mail: h_jc@sina.com。

上清,重复 1 次;将卵丘细胞转入裂解液中,储存在 -80°C 冰箱中,待 RT-PCR 检测分析。

1.2.3 卵母细胞孤雌激活 挑选有极体且细胞质均匀的卵母细胞,在含 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 离子霉素 (ionomycin) 的激活液中激活 4 min;经 2 mmol/L 6-DMAP 培养液洗 2 次,移入含 6-DMAP 的培养液内培养 2 h;培养液洗涤 3 次,移入含有 $600\sim 700\text{ }\mu\text{L}$ 体外培养液的四孔培养板中, CO_2 箱培养 48 h,统计卵裂率,统计 6~8 d 囊胚率。 CO_2 箱培养条件为 38.6°C 、 $5\%\text{ CO}_2$ 、 $5\%\text{ O}_2$ 、 $90\%\text{ N}_2$ 及饱和湿度。

表 1 实时定量引物序列

基因	引物序列	片段大小 (bp)
<i>FSHR</i>	F:5'-AGTGATAGAGGCAAATGTGT-3', R:5'-GGCAAGTGCTTAATACCTGT-3'	156
<i>EGFR</i>	F:5'-ACAACAGGAGTGATAAAGAGTGC-3', R:5'-CACACTCCTTGCCACGAC-3'	132
<i>bFGF</i>	F:5'-CGAGAAGAGCGACCCTCA-3', R:5'-TCTTTCATAGCAAGGTAACGG-3'	102
<i>GHR</i>	F:5'-ATCTTTGGAATACTTGGGCTA-3', R:5'-ATGGCTAAGATTGTATTACCC-3'	170
<i>CYP19A</i>	F:5'-ATTTCGCCACTGAGTTG-3', R:5'-TCCCTCATCATTGCCTCTTC-3'	175
<i>AMH</i>	F:5'-CTATGAGCAGGCCTTCTCG-3', F:5'-CCTCCAGGTGCAGGACCACC-3'	176
<i>18S</i>	F:5'-CGTTGAACCCCATTCGTG-3', R:5'-AGCGACGGGCGGTGTG-3'	129

1.2.5 定量 PCR 采用 SYBR Green I 荧光实时定量 PCR 法对各个样品中 mRNA 含量进行检测,每组 10^5 颗粒细胞,重复 3 次。反应体系为 $25\text{ }\mu\text{L}$: $2\times$ Master mix $12.5\text{ }\mu\text{L}$, primer (10 pmol/L) Mix $1\text{ }\mu\text{L}$, cDNA $2\text{ }\mu\text{L}$, RNase free 水 $9.5\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为: 95°C 预变性 10 min; 95°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s,55 个循环。

1.2.6 统计分析 根据 LightCycler 2.0 软件给出相对定量表达结果,定量数据以平均值 \pm 标准误差显示;使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同直径卵泡卵丘细胞 *GHR*、*bFGF*、*EGFR*、*CYP19A*、*FSHR* 和 *AMH* 基因表达规律

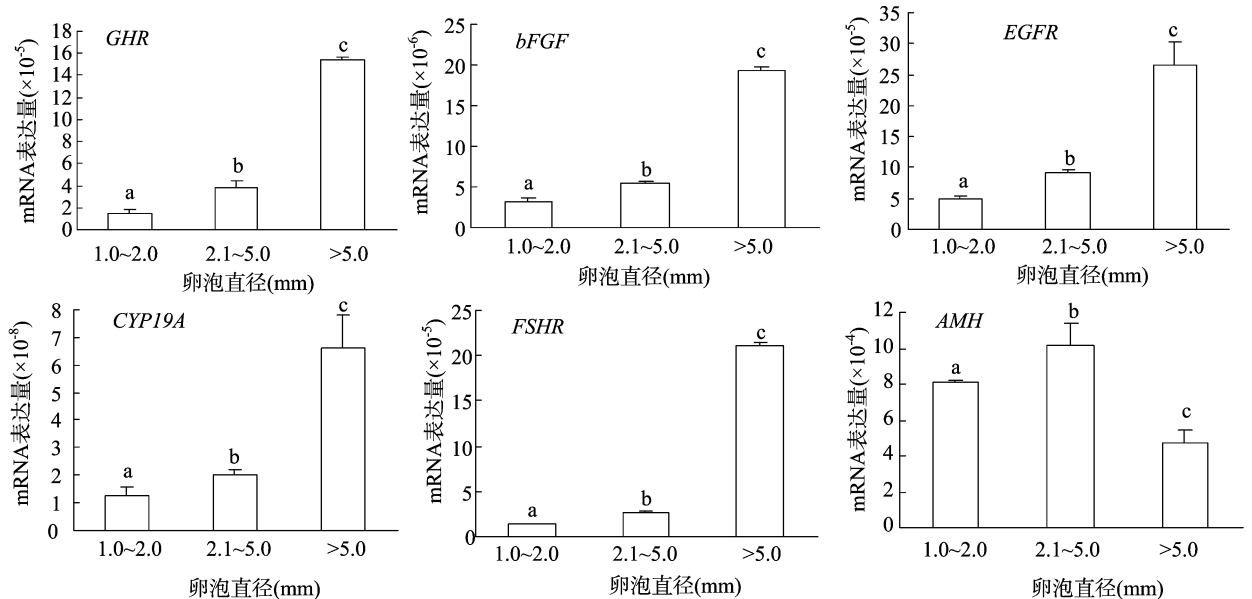


图1 不同直径卵泡卵丘细胞 *GHR*、*bFGF*、*EGFR*、*CYP19A*、*FSHR* 和 *AMH* 基因表达规律

1.2.4 RNA 提取与 cDNA 逆转录合成 根据 QIAGEN RNeasy Micro Kit 操作步骤提取总 RNA,溶解于 $14\text{ }\mu\text{L}$ RNase-free 水,按照大连宝生生物公司 (TaKaRa) 反转录试剂盒进行反转录;RNA $1\text{ }\mu\text{L}$,随机引物 (表 1) $1\text{ }\mu\text{L}$,加 RNase-free 水至 $15\text{ }\mu\text{L}$;置于 PCR 仪中 75°C 10 min, 4°C 暂停取出;立即冰浴 2 min,加入 Inhibitor $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 $5\times\text{ M-MLV buffer}$ $2\text{ }\mu\text{L}$ 、dNTP mixture (each 2.5 mmol/L) $7.5\text{ }\mu\text{L}$ 、M-MLV 酶 $1\text{ }\mu\text{L}$, 42°C 1 h、 70°C 10 min, -20°C 保存备用。

由图 1 可知,不同直径卵泡卵丘细胞培养 24 h, *GHR*、*FSHR*、*bFGF*、*EGFR*、*CYP19A* 基因表达量随着卵泡直径的增加逐渐递增,不同直径卵泡卵丘细胞之间的基因表达量差异显著 ($P < 0.05$);小卵泡卵丘细胞与大卵泡卵丘细胞差异极显著 ($P < 0.01$);*AMH* 在直径大于 5 mm 的卵泡卵丘细胞中基因表达量有所下降。

2.2 不同直径卵泡卵母细胞的体外培养效率

由表 2 可见,各卵泡卵母细胞直径组间成熟率差异不显著;随卵泡直径增大,卵裂率也有所增加, $1.0\sim 2.0\text{ mm}$ 组与 $2.1\sim 5.0\text{ mm}$ 组间无显著差异 ($P > 0.05$),都明显低于 $> 5.0\text{ mm}$ 组 ($P < 0.05$);随卵泡直径增大,囊胚率也逐渐增加,卵泡 $> 5\text{ mm}$ 卵母细胞组极显著高于 $1.0\sim 2.0\text{ mm}$ 组 ($P < 0.01$),显著高于 $2.1\sim 5.0\text{ mm}$ 组 ($P < 0.05$)。

表 2 不同直径卵泡卵母细胞的培养效率

卵泡直径 (mm)	卵数 (枚)	成熟率 (%)	卵裂率 (%)	囊胚率 (%)
1.0~2.0	181	78.7±2.70	82.5±4.02	31.2±3.48aA
2.1~5.0	212	84.2±0.70	82.8±0.97	43.3±2.06aAB
>5.0	67	83.6±1.18	91.8±4.47	48.8±2.88bB

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$);囊胚率=囊胚个数/成熟卵数。

3 结论与讨论

卵母细胞后期发育能力是在卵泡生长中获得的,卵丘细胞是最重要的卵泡体细胞,它们提供的缝隙连接跨膜通域促进卵丘细胞与卵母细胞相互通信、交换营养和旁分泌因子,进而调节卵母细胞的生长和成熟^[7-8]。Caixeta 等研究牛卵泡大小与卵母细胞发育能力间的关系及卵丘基因 *EGFR*、*FSHR*、*PTX3*、*IGFII* 的表达,结果表明,来自不同直径卵泡卵母细胞囊胚率差异显著,卵丘细胞基因 *EGFR*、*FSHR* 的表达在大小卵泡间差异显著^[9]。充足的生物机制证据显示,来自国内的动物物种如牛和猪,卵丘细胞在卵母细胞成熟和受精及随后的胚胎发育过程中起重要作用,卵泡直径确实对卵母细胞发育能力产生很大影响^[10-11]。

母畜中 *FSH* 基因对卵巢的作用,主要是通过卵泡颗粒细胞膜表面的促卵泡素受体 (*FSHR*) 结合来刺激颗粒细胞增殖分化和雌激素的生成,进而影响卵母细胞的发育与成熟^[12]。*FSHR* 在卵泡里仅存在于卵丘细胞。本试验结果表明, *FSHR* mRNA 在不同直径卵泡卵丘细胞中都有表达,表达量随卵泡直径的增大有逐渐增加的趋势;大卵泡卵丘细胞与中、小卵泡卵丘细胞 *FSHR* mRNA 的表达量差异极显著,中、小卵泡卵丘细胞间 *FSHR* mRNA 表达量差异显著。这与国外研究报道结果^[13] 基本一致,可能是由于不同大小直径的卵泡在发育过程中对 *FSH* 的依赖程度不同,小卵泡发育过程需要更多的 *FSH* 刺激,随卵泡的进一步发育,对激素的依赖程度逐渐降低。

表皮生长因子受体 (*EGFR*) 广泛存在于哺乳动物生殖系统中,参与卵巢功能的调节,与卵泡生长发育和成熟有关。*EGFR* 作为中介调节促黄体素、刺激释放双调蛋白、表皮调节素和细胞调节素等 EGF 样生长因子,并结合 EGF 诱导减数分裂,在绵羊中曾有卵母细胞成熟与卵丘细胞增殖的相关报道^[14]。有研究表明,利用免疫组织化学方法,可以实现 *EGFR* 与其配体 (*EGF*) 结合,刺激细胞的增殖与分化,加快卵丘细胞扩展,促进卵母细胞的成熟^[15]。试验表明,随绵羊卵泡的增加, *EGFR* mRNA 同样有逐渐增加的趋势,这在山羊中有过相同报道^[16];当卵泡直径 >5.0 mm 时, *EGFR* mRNA 表达量达到最大,这说明 EGF 在卵泡生长过程中主要可能是通过抑制颗粒细胞的凋亡和刺激卵泡腔的形成来实现;在颗粒细胞、卵丘细胞和卵母细胞中都有 *EGFR* 基因的表达,这说明 EGF 可以与卵丘细胞 *EGFR* 特异地结合,以此来调节卵母细胞的生长、发育和成熟。

碱性成纤维细胞生长因子 (*bFGF*) 广泛存在于垂体、脑、肾上腺、胎盘、肾、视网膜和胸腺^[17],最近研究发现,卵巢组织

中也有 *bFGF* 存在。大量数据表明, *bFGF* 对猪、牛、人、猫和啮齿类卵泡卵丘细胞起重要的作用,主要是促进卵丘细胞增殖,抑制其分化。Nilsson 等研究发现,新生小鼠卵巢的原始卵泡较少,初级卵泡增加,卵泡的增加可被 *bFGF* 受体的拮抗剂部分抑制^[18], *bFGF* 通过自分泌和旁分泌形式调节卵泡生长发育及促进排卵,卵母细胞产生的 *bFGF* 作用于周围的颗粒细胞,促进原始卵泡生长和向初级卵泡转化。本试验结果表明, *bFGF* mRNA 表达随卵泡直径增大有逐渐增加的趋势, >5.0 mm 的卵泡中呈高表达,高水平 *bFGF* 可能影响卵泡发育,对促进卵母细胞成熟及排卵有重要作用。 *bFGF* 在绵羊卵巢组织中报道较少,对不排卵性不孕具有广阔的应用前景,这方面研究有待进一步探索。

生长激素 (*GHR*) 及受体在卵泡发育、卵母细胞成熟、排卵等生殖过程中具有重要的作用。GH 作为卵母细胞介质,加速核和胞质的成熟,诱导颗粒细胞增殖,提高卵母细胞的卵裂率^[19]。本试验 *GHR* mRNA 表达与 *EGFR*、*FSHR*、*bFGF* 结果一致,随卵泡直径的增大, *GHR* 基因表达呈现递增的趋势,在卵泡直径 >5.0 mm 时,表达量达到最大值。这与 Izadyar 等的研究结果^[20] 基本一致,也进一步证实 *GHR* 表达可在功能上偶联,并可以在不损害卵母细胞情况下潜在地预测卵母细胞的发育能力。

抗苗勒氏管激素 (*AMH*) 是由睾丸支持细胞和卵巢颗粒细胞分泌,具有抑制雄性苗勒氏管发育、调节两性生殖细胞和性腺发育的重要作用,其基因表达及其调控对卵泡发育有重要的影响。Weenen 等研究表明,初级卵泡颗粒细胞中 *AMH* 为弱表达; *AMH* 在次级卵泡、窦前卵泡和 ≤4 mm 的小窦状卵泡中表达较高,其中,卵泡腔和卵母细胞周围的粒细胞中 *AMH* 表达水平最高;在 4~8 mm 大窦状卵泡中的表达逐渐下降,并在 *FSH* 依赖的卵泡阶段消失^[21],这一结论与本试验研究结果基本一致。

细胞色素芳香化酶 (*CYP19A*) 是目前已知的唯一一个不可逆的催化雄烷二酮和睾酮转化为雌酮和雌二醇的酶,是合成雌激素的关键酶和限速酶^[22-23]。目前,对 *CYP19A* 的研究主要集中在人、大鼠、小鼠上,存在于人和动物的胎盘、卵巢组织和睾丸的间质细胞,支持细胞和生精细胞都有芳香化酶的表达。研究表明, *CYP19A* mRNA 的表达与卵泡发育有关^[24]。Araki 等在小鼠上研究发现, *CYP19A* 在大卵泡中表达量极高,中卵泡及小卵泡卵丘细胞里未见表达^[25],与本试验结果不一致,这可能是由于物种差异。需说明的是, *CYP19A* 在绵羊卵巢组织中基因调控作用较少,值得进一步研究。

另外,不同直径卵泡卵母细胞有着不同的发育能力。本试验结果表明,卵泡卵母细胞直径为 1.0~2.0 mm 时,卵母细胞卵裂率低,这是由于小卵泡卵母细胞没有完全进入生长期;卵泡直径为 2.1~5.0 mm 时,卵母细胞卵裂率与小卵泡基本相同;随卵泡直径增加,囊胚率也逐渐增加,卵泡 >5.0 mm 的卵母细胞囊胚率极显著高于 1.0~2.0 mm 卵母细胞,显著高于 2.1~5.0 mm 卵母细胞。Machatkova 等研究表明,卵泡大小与卵母细胞的发育能力有直接关系,直径大的卵泡发育能力相对中、小卵泡发育能力较高^[26-27],这些差异也许是由于卵母细胞内 RNA 和蛋白质的储存量不同引起的。Anguit 等研究发现,在体外成熟之前,卵母细胞 RNA 的储存

量没有明显差异,在体外培养之后,直径大的卵泡卵母细胞 RNA 降低^[28],这可能是由于大卵母细胞动员储存 RNA 合成新的蛋白质能力较强,而小卵母细胞储存 RNA 和蛋白质较少,导致卵母细胞发育能力较低。

总之,本试验从转录水平检测所选基因在不同直径卵泡卵丘细胞中的表达,并且与卵母细胞体外成熟率相结合,这为从分子水平上解释卵丘细胞和卵母细胞的互作提供依据,是一个非侵入性辨别卵母细胞质量的新方法。

参考文献:

- [1] de Wit A A, Wurth Y A, Kruip T A. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus - oocyte complex[J]. Journal of Animal Science, 2000, 78 (5): 1277 - 1283.
- [2] Lonergan P, Rizos D, Gutierrez - Adan A, et al. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns [J]. Reproduction in Domestic Animals, 2003, 38 (4): 259 - 267.
- [3] Matzuk M M, Burns K H, Viveiros M M, et al. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation[J]. Science, 2002, 296 (5576): 2178 - 2180.
- [4] Li R, Norman R J, Armstrong D T, et al. Oocyte - secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells[J]. Biology of Reproduction, 2000, 63 (3): 839 - 845.
- [5] Hussein T S, Froiland D A, Amato F, et al. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins[J]. Journal of Cell Science, 2005, 118 (22): 5257 - 5268.
- [6] Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, et al. Cell coupling and maturation - promoting factor activity *in vitro* - matured prepubertal and adult sheep oocytes [J]. Biology of Reproduction, 2001, 65 (1): 247 - 252.
- [7] Grazul - Bilska A T, Reynolds L P, Redmer D A. Gap junctions in the ovaries[J]. Biology of Reproduction, 1997, 57 (5): 947 - 957.
- [8] Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, et al. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization[J]. Molecular Reproduction and Development, 2002, 61 (3): 414 - 424.
- [9] Caixeta E S, Ripamonte P, Franco M M, et al. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of Bos indicus: an approach to identify marker genes for developmental competence[J]. Reproduction Fertility and Development, 2009, 21 (5): 655 - 664.
- [10] Luciano A M, Lodde V, Beretta M S, et al. Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co - culture system with intact cumulus - oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3', 5' - monophosphate, and glutathione [J]. Molecular Reproduction and Development, 2005, 71 (3): 389 - 397.
- [11] Zhang L, Jiang S, Wozniak P J, et al. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*[J]. Molecular Reproduction and Development, 1995, 40 (3): 338 - 344.
- [12] 陈阿琴. 湖羊卵泡颗粒细胞相关差异表达基因的筛选和鉴定及抗氧化物对 GSTA1 表达的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [13] Cárdenas H, Pope W F. Androgen receptor and follicle - stimulating hormone receptor in the pig ovary during the follicular phase of the estrous cycle[J]. Molecular Reproduction and Development, 2002, 62 (1): 92 - 98.
- [14] Oyamada T, Iwayama H, Fukui Yutaka. Additional effect of epidermal growth factor during *in vitro* maturation for individual bovine oocytes using a chemically defined medium [J]. Zygote, 2004, 12 (2): 143 - 150.
- [15] 马红. 表皮生长因子受体在绵羊卵巢中的表达[J]. 黑龙江农业科学, 2008 (2): 78 - 79.
- [16] Gall L, Chene N, Dahirel M, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in the goat cumulus - oocyte complex[J]. Molecular Reproduction and Development, 2004, 67 (4): 439 - 445.
- [17] Gospodarowicz D, Schweigerer L. Fibroblast growth factor[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 1986, 46 (3): 187 - 204.
- [18] Nilsson E, Parrott J A, Skinner M K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2001, 175 (1/2): 123 - 130.
- [19] Bevers M M, Izadyar F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2002, 197 (1/2): 173 - 178.
- [20] Izadyar F, van Tol H T, Colenbrander B, et al. Stimulatory effect of growth hormone on *in vitro* maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF - I [J]. Molecular Reproduction and Development, 1997, 47 (2): 175 - 180.
- [21] Weenen C, Laven J S, Von Bergh A R, et al. Anti - Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment [J]. Molecular Human Reproduction, 2004, 10 (2): 77 - 83.
- [22] Séralini G, Moslemi S. Aromatase inhibitors: past, present and future [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2001, 178 (1/2): 117 - 131.
- [23] Conley A, Hinshelwood M. Mammalian aromatases[J]. Reproduction, 2001, 121 (5): 685 - 695.
- [24] Dubé C, Bergeron F, Vaillant M J, et al. The nuclear receptors SF1 and LHR1 are expressed in endometrial cancer cells and regulate steroidogenic gene transcription by cooperating with AP - 1 factors [J]. Cancer Letters, 2009, 275 (1): 127 - 138.
- [25] Araki H, Tsubota T, Maeda N, et al. Intraovarian immunolocalization of steroidogenic enzymes in a Hokkaido brown bear, Ursus arctos yesoensis during the mating season [J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 1996, 58 (8): 787 - 790.
- [26] Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, et al. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production [J]. Theriogenology, 2004, 61 (2/3): 329 - 335.
- [27] Kauffold J, Amer H A, Bergfeld U, et al. The *in vitro* developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter [J]. The Journal of Reproduction and Development, 2005, 51 (3): 325 - 332.
- [28] Anguita B, Paramio M T, Jiménez - Macedo A R, et al. Total RNA and protein content, Cyclin B1 expression and developmental competence of prepubertal goat oocytes [J]. Animal Reproduction Science, 2008, 103 (3/4): 290 - 303.