

陈静波,张响英,金彩莲,等. 转化生长因子 β 对体外成熟猪卵子成熟率的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(22):176-178.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.048

转化生长因子 β 对体外成熟猪卵子成熟率的影响

陈静波,张响英,金彩莲,李腾腾,沈鸣扬,杨二军,尹最难

(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300)

摘要:在猪卵子的体外生产方面,关于卵子的体外成熟和体外受精技术目前还存在着不足,特别是猪的受精卵体外生产方面存在复杂的细胞质成熟、多精子侵入率较高以及前核形成受到抑制等问题。为改善猪卵子体外成熟体系,将转化生长因子 β (transforming growth factor- β ,简称 TGF β)添加到体外成熟的培养液中,研究 TGF β 对裸卵和卵丘卵母细胞复合体成熟率的影响。在没有添加 TGF β 的体外成熟培养液中,裸卵和卵丘卵母细胞复合体被成熟培养 24 h,结果没有卵子达到 M-II 时期,但是在添加 TGF β 的体外成熟培养液中,观察到有卵子达到 M-II 时期。另一方面,当卵丘卵母细胞复合体在体外成熟培养时,将 TGF β 添加到不同培养阶段(0~24 h 或 24~48 h)的培养液时,卵子的成熟率没有差别。对裸卵在体外成熟培养 24 h 时,当在前半期添加 TGF β 时(0~24 h),卵子的成熟率为 59%;当在后半期添加 TGF β 时(24~48 h),卵子的成熟率为 57%。同样在裸卵组中,当在全期添加 TGF β 时(0~48 h),卵子的成熟率为 27%;当无添加 TGF β 时,卵子的成熟率为 38%。前 2 组与后 2 组相比,卵子成熟率有显著差异。

关键词:转化生长因子 β ;体外成熟;体外受精;猪卵子;卵丘卵母细胞

中图分类号: S828.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)22-0176-03

哺乳动物卵子的成熟发生在胎儿时期并且停止于前 I 期的双线期,这个时期将一直持续到排卵前期^[1]。在这段休止期卵子是无法完成受精的。卵子具有受精能力是在完成减数分裂到达 M-II 时期,释放第一极体的时候。哺乳动物卵子的生长必须要有外围包裹着的卵丘细胞才能成熟。卵子在排卵之前都会保持 GV 期(germinal vesicle)卵母细胞状态,在促性腺激素的作用下引起生理上的反应完成排卵。卵子开始恢复细胞核的成熟,主要表现在卵母细胞发生生发泡破裂(germinal vesicle breakdown,简称 GVBD)、同源染色体的分离、第一极体的排出。在细胞质成熟过程中,胞浆内积累多种蛋白质和稳定的 mRNA,线粒体会发生有效重排^[2]。到排卵时,包裹着卵子的卵丘细胞已经完全膨胀,卵子已经达到了 M-II 时期。这是因为在促黄体生成素(luteinizing hormone,简称 LH)的作用下,使卵子恢复了减数分裂以及卵丘细胞的膨胀^[3]。然而发生这些变化的原因也可能是在排卵之前,其他分子参与控制这些机制作用而导致卵子发生变化。

最近研究表明,在某些动物的卵丘卵母细胞复合体和由卵泡包裹的卵子中,减数分裂的恢复是由表皮生长因子(epidermal growth factor,简称 EGF)、转化生长因子 α (transforming growth factor- α ,简称 TGF α)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β ,简称 TGF β)所引起的^[4-6]。TGF β 是一种多功能的细胞活化素并且具有多种形式。它们属于一个大的基因家族,在细胞生长方面扮演着许多角色,比如分化、迁移以及细胞外基质的形成、细胞表面分子表达的调

节。对不同的基因,TGF β 也有许多种类。据报道,1985 年已经克隆出来人类的 TGF β 的 cDNA 序列,现在称之为 TGF β -1^[7]。1987 年从牛骨头里分离出 1 种多肽物质,能合成胶原蛋白,与 TGF β -1 表现出 71% 的同源性,后来被命名为 TGF β -2。第 3 种 TGF β 被命名为 TGF β 3,与 TGF β -1 和 TGF β -2 相比,分别表现出 76% 和 80% 的同源性。在哺乳动物的细胞里 3 种 TGF β 都能得以表达。TGF β -1 是由 390 个氨基酸组成的。实际上所有的细胞都具有 TGF β -1 受体,它们能控制细胞的许多功能。据报道有 9 个膜蛋白和 TGF β 相结合。

调解卵子成熟的主要是卵丘细胞。据报道,卵丘细胞提供给卵子营养和其他物质,以及完成相互通信是通过缝隙连接完成的。卵丘细胞和卵子之间缝隙连接对于细胞间的相互作用,特别是对旁分泌和内分泌的调节是非常重要的。因此,本研究主要探讨 TGF β 对与体外成熟培养的卵子以及卵丘卵母细胞复合体成熟率的影响。

1 材料与方法

1.1 卵子的准备

猪的卵巢取自江苏省泰州市城郊屠宰场,放入 35~37℃ 的 0.85% 生理盐水中带回实验室。试验人员在显微镜下用嘴吸住特制吸管,将存在于 TALP 缓冲液(Tyrod's Albumin Lactate Pyruvate:红细胞裂解液,含 0.1% 的聚乙烯醇)的卵丘卵母细胞吸出。每 15 个卵子放进 100 μ L 不含牛血清的 NCSU23 培养液中。此培养液中含有 10% 的猪卵泡液、0.6 mmol/L 半胱氨酸、10 IU/mL 人体绒毛促性腺激素、10 IU/mL 孕马血清促性腺激素,培养液小滴被矿物油所覆盖,在 38.5℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24~48 h。

1.2 试验设计

在第 1 个试验中,将不同浓度的 TGF β -1(0、1、5、10 ng/mL)添加到成熟培养液中,评定卵丘卵母细胞的成

收稿日期:2016-05-31

基金项目:江苏农牧科技职业学院大学生创新创业训练项目品牌专业项目(编号:201612806053P)。

作者简介:陈静波(1976—),女,黑龙江哈尔滨人,硕士,助教,主要从事动物繁殖的研究。E-mail:2622548765@qq.com。

熟率。

在第 2 个试验中,将裸卵和卵丘卵母细胞保存在含有和不含有 $TGF\beta-1$ (1 ng/mL) 的培养液中 24、48 h 后,评定裸卵和卵丘卵母细胞的成熟率。

在第 3 个试验中,将裸卵或卵丘卵母细胞复合体培养在含有或者不含有 $TGF\beta-1$ (1 ng/mL) 的培养液中。将 $TGF\beta-1$ 添加到培养液中的时间段分别是体外培养 0 ~ 24 h、24 ~ 48 h、0 ~ 48 h。

1.3 卵子成熟的评估

试验最后,用吸管反复去除卵丘细胞,把裸卵放在载玻片的中心,盖上盖玻片。将载玻片放入 25% 的醋酸中浸泡 2 ~ 3 d,加 1% 的苔红素染色,浸泡在 45% 的醋酸中。用酰基甘油除去多余的染料,并放在倒位相位差显微镜下,放大 200 ~ 400 倍观察。

卵子被分为 GV 期 (germinal vesicle)、P - I 期 (prophase - I)、M - I 期 (metaphase - I)、T - I 期 (telophase - I) 和 M - II 期 (metaphase - II)。

1.4 统计分析

采用 SAS 软件对数据进行整理与分析,应用 ANOVA 作方差分析 ($\alpha=0.05$)。

2 结果与分析

在第 1 个试验中,当将卵丘卵母细胞复合体培养在添加不同浓度的 $TGF\beta-1$ 培养液时,卵丘卵母细胞复合体到达 M - II 时期的比例分别是 53% (42/79)、69% (61/88)、64% (57/89)、52% (31/60) (表 1)。

表 1 不同浓度的 $TGF\beta$ 对体外成熟卵子成熟率的影响				
$TGF\beta-1$ 浓度 (ng/mL)	卵子总数量 (个)	不同时期卵子数量 (个)		
		GV	P - I ~ T - I	M - II
0	79	0	37	42 (53%)
1	88	0	27	61 (69%)
5	89	0	32	57 (64%)
10	60	0	29	31 (52%)

注:括号内数据为占卵子总数量的比例,下表同。

为检测 $TGF\beta$ 和卵丘细胞对卵子体外成熟率的影响,将裸卵和卵丘卵母细胞复合体体外成熟培养 24 h,在裸卵和卵丘卵母细胞复合体中,一组在培养液中添加 $TGF\beta$,而另一组

不在培养液中添加 $TGF\beta$ 。结果表明,无论是裸卵还是卵丘卵母细胞复合体,在培养液中添加 $TGF\beta$ 的组中,卵丘卵母细胞复合体和裸卵的成熟率分别是 5%、4%,而没有添加 $TGF\beta$ 的培养液中,卵丘卵母细胞复合体和裸卵的成熟率均是 0 (表 2)。

表 2 体外成熟培养 24 h 后裸卵和卵丘卵母细胞中 $TGF\beta$ 对卵子成熟率的影响					
卵丘细胞 是否存在	$TGF\beta$ 是否含有	卵子总数量 (个)	不同时期卵子数量 (个)		
			GV	P - I ~ T - I	M - II
+	+	96	8 (8%)	83 (86%)	5 (5%)
	-	104	13 (12.5%)	91 (87.5%)	0 (0)
-	+	74	11 (15%)	60 (81%)	3 (4%)
	-	97	17 (18%)	80 (82%)	0 (0)

注:“+”表示在培养液中添加 $TGF\beta$;“-”表示在培养液中不添加 $TGF\beta$,下表同。

然而在体外成熟培养 48 h 后,在添加 $TGF\beta$ 、未添加 $TGF\beta$ 组中卵丘卵母细胞复合体达到 M - II 成熟阶段的比例分别是 70%、52%;裸卵组中的成熟率分别是 35%、26%,卵丘卵母细胞组的成熟率比裸卵组的成熟率有所提高 (表 3)。

表 3 体外成熟培养 48 h 后裸卵和卵丘卵母细胞中 $TGF\beta$ 对卵子成熟率的影响					
卵丘细胞 是否存在	$TGF\beta$ 是否含有	卵子总数量 (个)	不同时期卵子数量 (个)		
			GV	P - I ~ T - I	M - II
+	+	96	1 (1%)	28 (29%)	67 (70%) a
	-	106	11 (10%)	40 (38%)	55 (52%) ab
-	+	69	6 (9%)	39 (57%)	24 (35%) b
	-	62	6 (10%)	40 (65%)	16 (26%) b

注:同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著 ($P < 0.05$),下表同。

在第 3 个试验中,将卵子培养在含有或不含有 $TGF\beta$ (1 ng/mL) 的各个时间段培养液中。在卵丘卵母细胞组中,卵子的成熟率无显著差异。然而,当卵子处于裸卵状态时,与 $TGF\beta$ 暴露在培养液的时间是 0 ~ 24 h、24 ~ 48 h 时 (卵子成熟率为 27%),以及在这 2 个时间段中均未添加 $TGF\beta$ 的培养液 (卵子的成熟率 38%) 相比,当 $TGF\beta$ 暴露在培养液的时间分别是 0 ~ 24 h (卵子成熟率为 59%)、24 ~ 48 h (卵子成熟率为 57%) 时,后 2 组卵子成熟率有显著提高 (表 4)。

表 4 暴露在培养液中的各个阶段 $TGF\beta$ 对裸卵和卵丘卵母细胞复合体中成熟率的影响						
卵丘细胞是否存在	$TGF\beta$ 暴露在培养液中的阶段		卵子总数量 (个)	不同时期卵子数量 (个)		
	0 ~ 24 h	24 ~ 48 h		GV	P - I ~ T - I	M - II
+	+	+	58	5	18	35 (60%) a
	+	-	60	3	18	39 (65%) a
	-	+	63	3	15	45 (71%) a
	-	-	63	3	26	34 (54%) a
-	+	+	67	6	43	18 (27%) b
	+	-	63	1	25	37 (59%) a
	-	+	69	5	35	39 (57%) a
	-	-	79	6	43	30 (38%) b

3 结论与讨论

卵子为受精做准备,不仅要发生减数分裂而且细胞质也

要经历极重要的变化,包括卵子将获得支持精子染色质的去凝缩作用和随后的雄性前核形成的能力。尽管在体外卵子核的成熟能够自发地完成,但是体外成熟的卵子可能缺少使精

子去凝缩和雄性前核形成的能力。Yoshida 等认为卵丘细胞在细胞质成熟方面扮演了一个重要的角色^[4]。Zheng 等认为,当被卵丘细胞包裹的卵子在含有卵泡液和卵泡膜细胞的培养液中培养时,会加强细胞质的成熟^[5]。这些结果表明,卵泡细胞能通过旁分泌和自分泌来分泌一些能够调节细胞质成熟的因子。生长因子类似转化生长因子(TGF β),已经被证实能够刺激或加强卵子细胞核的成熟。最近的研究主要集中在解释 TGF β -1 的信号传播途径方面。据证明,Type-I 和 Type-II 受体依靠 TGF β -1 形成了 1 个异侧的复合体。TGF β -1 连接 Type-I 和 Type-II 受体的复合体触发了 Type-II 组的丝氨酸和苏氨酸蛋白激酶区域。这些蛋白激酶的活性是刺激磷脂酶 C(phospholipase C,简称 PLC)来打断细胞膜的纤维醇磷脂从而形成纤维醇三磷酸盐(inositol phosphate three,简称 IP₃)^[6]。钙的浓度对维持抑制哺乳动物的卵子减数分裂具有重要的作用。在小鼠的裸卵及仓鼠的裸卵和卵丘卵母细胞中,细胞外高浓度的钙会使抑制卵子减数分裂的作用消失。然而卵子减数分裂的发展进程依靠于细胞外部钙的浓度,最近研究表明主要集中在细胞内部钙的运用和减数分裂的恢复。表明这种关系非直接的证据是运用新霉素,一种假定的磷酸肌醇逆转率抑制剂,在猪和牛的卵子中它能阻止卵母细胞发生发泡破裂。这就意味着纤维醇三磷酸盐(IP₃)可能与引发减数分裂恢复有关。

本研究探讨 TGF β 对卵子和卵丘细胞成熟的作用效果。然而,将卵丘卵母细胞复合体添加到不同浓度的 TGF β -1 的培养液时,卵子的成熟率没有差别(表 1)。在其他研究中表明,TGF β 能刺激大鼠和小鼠的成熟。TGF β 能在结构和功能上调节 EGF,一种能在体外刺激猪卵母细胞成熟的激素。

TGF β 能因物种、培养条件以及被评估的类固醇不同而刺激或者抑制细胞的生长或者分化。TGF β 抑制细胞生长的能力应该与细胞的分化状态有关。体外培养 4 d 后,牛卵丘细胞在细胞周期功能上的分化、形态上的改变以及生成类固醇应答等方面的弱化,可能反映出牛卵丘细胞上 TGF β 受体缺乏或者其对 TGF β 敏感性的减弱。

结果表明,TGF β 不会影响体外成熟培养 24 h 的裸卵和卵丘卵母细胞复合体的成熟率(表 2)。然而,当体外培养 24 h 后,TGF β 对裸卵和卵丘卵母细胞复合体恢复减数分裂具有一种有效的刺激作用。相反,繆勒管抑制物质能关闭对于 TGF β 的同源性,抑制大鼠卵子的自然成熟。尽管 TGF β 单独对于大鼠的自发卵子成熟没有作用,但是它能在体外抑制 LH 引导的卵子成熟。

卵丘卵母细胞复合体是由卵丘细胞和卵子构成的,二者之间在形态和功能上的连接是通过异种间的缝隙连接完成的。据报道,卵丘细胞和卵子之间通过缝隙连接进行双向的信息交换。对于缝隙连接关于减数分裂成熟的关系有 2 种解释。第 1 种理论认为,缝隙连接作为一种媒介可以从卵丘细胞传送抑制物质给卵子。第 2 种理论认为,由于激素的作用会对卵丘细胞产生刺激,这种刺激又是通过缝隙连接传给卵子而刺激其成熟。由于 TGF β 不能直接支持裸卵或者卵丘卵母细胞复合体的自发成熟,这一结果似乎更接近于第 2 种理

论假设。

本研究结果表明,当将 TGF β 添加到培养液的不同阶段时,TGF β 能促进体外成熟培养时猪裸卵的成熟(表 4)。由于 TGF β 和卵丘细胞间的相互作用,TGF β 在猪卵子体外成熟培养时需要 24 h,免疫组织化学的研究表明,TGF β 存在于大鼠和牛的荚膜细胞、细胞间质细胞中以及大鼠排卵之前的卵泡中。

综上所述,TGF β 能刺激猪卵子细胞核的成熟。这些结果意味着对体外成熟的猪卵子,卵丘细胞是关键的,但是 TGF β 能促进裸卵的成熟。

本研究主要探讨 TGF β 和卵丘细胞对猪卵子体外成熟的影响。将卵母细胞放在不同浓度的 TGF β 培养液中体外成熟培养时,不同浓度的 TGF β 对卵子的成熟率没有差异。当体外成熟培养 24 h 后,在添加 TGF β 的培养液中,裸卵发展到 M-II 阶段。在添加 TGF β 组中,裸卵和卵丘卵母复合体中,体外成熟培养 48 h 后,卵子的成熟率分别为 35%、70%;在不添加 TGF β 组中,裸卵和卵丘卵母细胞复合体的成熟率分别是 26%、52%。当将 TGF β 添加到不同培养阶段的培养液中体外成熟培养时,卵丘卵母细胞复合体的成熟率在添加 TGF β 不同阶段时,成熟率达到了 54%~71%。在裸卵组中,当添加 TGF β 在 0~24 h 时,卵子的成熟率为 59%,当添加 TGF β 在 24~48 h 时,卵子的成熟率是 57%。在裸卵中,0~48 h 阶段均未添加 TGF β ,裸卵的成熟率为 38%,可见,添加 TGF β 组的裸卵的成熟率(57%和 59%)与 0~48 h 阶段均未添加 TGF β 的组(38%)相比,差异显著。总之,TGF β 能促进猪卵子细胞核的成熟,卵丘细胞对卵子成熟起到关键作用,同时 TGF β 能促进裸卵的成熟。

参考文献:

- [1]Knobil E, Neill J D. The Physiology of Reproduction [M]//Wassarman P M. The mammalian ovum. New York: Ravan Press, 69-102.
- [2]张莉. 猪卵母细胞体外成熟培养及孤雌发育研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2005.
- [3]Tsafiri A, Dekel N, Bar-Ami S. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation[J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1982, 64(2): 541-551.
- [4]Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi H, et al. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro* [J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1992, 95(2): 481-488.
- [5]Zheng Y S, Sirard M A. The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes[J]. Theriogenology, 1992, 37(4): 779-790.
- [6]Okragly A, Balwit J M, Haak-Frendscho M, et al. Transforming growth factor β -1 (TGF- β -1): a biological paradox[J]. Promega Notes Magazine, 1994(10): 1-7.
- [7]徐梦思, 黄涛, 马亮, 等. 猪 TGF β I 和 TGF β R I 基因多态性与产活仔数的关联分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 38-41.