

## 研究论文

# Gas6在猪卵母细胞及早期胚胎中表达模式与功能的初步研究

李志鹏 雷小灿 陆杏蓉 朱 鹏 崔奎青 石德顺\* 刘庆友\*

(广西大学亚热带农业生物资源保护利用国家重点实验室, 南宁 530004)

**摘要** 该研究通过免疫组化和QRT-PCR等方法系统分析了Gas6(growth arrest-special gene 6)基因在猪卵泡发生及早期胚胎发育过程中的表达规律, 并提出了一种改良猪卵母细胞体外成熟系统的方法。研究结果显示, Gas6基因表达于猪卵巢中的卵母细胞细胞核及其周围的卵丘细胞, 在卵母细胞体外成熟及早期胚胎发育过程中始终有表达, 且在囊胚中表达最高。Gas6 mRNA在卵母细胞成熟过程中始终存在, 但在孤雌激活后迅速消失, 直到发育到囊胚时再次出现。在猪卵母细胞体外培养系统中添加不同浓度的Gas6重组蛋白培养卵母细胞, 发现添加Gas6重组蛋白对卵母细胞的极体率无显著影响; 但是当添加浓度为100 ng/mL时, 培养的卵母细胞孤雌激活后分裂率、囊胚率及囊胚细胞数都显著增高。Gas6可能是通过改善卵母细胞细胞质的成熟质量提高卵母细胞的发育潜能, 从而获得了更多、更好的胚胎。

**关键词** Gas6; 猪; 卵泡发生; 早期胚胎

## Function and Expression Pattern Investigation of Gas6 on Porcine Oocytes and Early Embryos

Li Zhipeng, Lei Xiaocan, Lu Xingrong, Zhu Peng, Cui Kuiqing, Shi Deshun\*, Liu Qingyou\*

(State Key Laboratory of Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangxi University, Nanning 530004, China)

**Abstract** The expression pattern of Gas6 gene in porcine oocytes and early embryo was analyzed systematically using immunohistochemistry and QRT-PCR, and a new method was proposed to improve the quality of *in vitro* matured pig oocytes. The results showed that Gas6 gene was localized in ovarian oocyte nucleus and the surrounding cumulus cells simultaneously. It expressed all through the *in vitro* maturation of oocytes, and reached the highest relative expression peak in the blastocyst stage. Gas6 mRNA existed in the process of *in vitro* matured oocytes continuously, but disappeared after parthenogenetic activation, reappeared until the blastocyst stage. By adding recombinant Gas6 protein into the *in vitro* matured media of pig oocytes, we found that there was no significant change to the poly body discharge rate of the *in vitro* matured oocytes, but the cleavage rate, blastocyst rate and blastocyst cells number of oocytes after parthenogenetic activation was significantly increased when the adding

收稿日期: 2014-01-05 接受日期: 2014-03-24

国家自然科学基金(批准号: 31260552)和国家高技术研究发展计划(863计划)(批准号: 2011AA100607)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0771-3239202, E-mail: ardsshi@gxu.edu.cn; qyliu2002@126.com

Received: January 5, 2014 Accepted: March 24, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31260552) and the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Grant No.2011AA100607)

\*Corresponding authors. Tel: +86-771-3239202, E-mail: ardsshi@gxu.edu.cn; qyliu2002@126.com

网络出版时间: 2014-07-02 10:57

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0001.html>

concentration reached 100 ng/mL. We predicted that *Gas6* increased the development potential of oocytes by improving the quality of oocytes cytoplasm maturation, so as to obtain more and better embryos.

**Key words** *Gas6*; porcine; folliculogenesis; preimplantation embryo

高质量的卵母细胞被广泛应用于生殖生物学和转基因技术与克隆技术等生物技术的研究,而卵母细胞主要由体外培养而得<sup>[1-2]</sup>。但是,卵巢中的卵母细胞的发育是不同步的,这导致所获得的卵母细胞的发育能力大不相同,因此卵巢中很大一部分卵母细胞不能被充分地利用。近年来,尽管人们在体外培养卵母细胞的方法上获得了很大的突破,但是体外培养的低受精率、低分裂率、低囊胚率和囊胚细胞数较少等缺点依然存在<sup>[3]</sup>,而这些缺点与卵细胞成熟质量较差直接相关<sup>[4]</sup>。卵母细胞的生长和成熟是一个漫长的过程,也是其成功受精进而发育为胚胎所必需的过程。卵母细胞的成熟包括细胞核成熟和细胞质成熟,两者紧密相连,但却是两个复杂而不同的过程<sup>[5-6]</sup>。在这个过程中,卵母细胞合成、吸收并储存mRNA、蛋白质等早期胚胎发育所需的调控因子<sup>[7]</sup>。这个过程主要由RNA聚腺苷酸化、局限化、不同种类的修饰和蛋白质磷酸化等转录后调节方式控制<sup>[8]</sup>。因此,对卵母细胞的一些基因功能的分析将有助于研究卵母细胞细胞质及细胞核成熟、受精和早期胚胎发育的分子调控机制。

*Gas*基因(growth arrest-special gene)首先发现于经血清饥饿处理的细胞。*Gas6*基因(growth arrest-special gene 6)由Nagata等<sup>[9]</sup>最先从无血清培养的NIH3T3细胞中发现并克隆,该基因编码的*Gas6*蛋白是维生素K依赖蛋白,包括Axl、Met及Rse等几个分子在内的受体酪氨酸激酶家族的配体。Manfioletti等<sup>[10]</sup>推测,猪*Gas6*蛋白含有678个氨基酸,与小鼠的同源性为81%,与人抗凝血蛋白S的同源性为44%。*Gas6*系统具有广泛的生物学作用,与细胞的黏附、识别、存活、增殖和生长有关<sup>[11-13]</sup>。*Gas6*在雄性小鼠生殖脊和原始生殖细胞表达并且有利于原始生殖细胞的体外培养<sup>[14]</sup>,精子细胞的成熟和凋亡也需要通过*Gas6*系统进行调控<sup>[15]</sup>。研究发现,*Gas6*在GV期卵母细胞中表达量很高<sup>[16]</sup>,Fleming等<sup>[17]</sup>报道*Gas6*对8-细胞时期胚胎和囊胚发育也有影响。通过检测*Gas6*及其受体在卵母细胞成熟和早期胚胎发育过程中的表达发现,*Gas6*和Met在卵母细胞和卵泡细胞中有表达,而Rse和Axl只在卵泡细胞表达。Met在卵

母细胞成熟及早期胚胎形成过程中稳定表达,但是,Rse和Axl并不在卵母细胞成熟和原核形成过程中表达<sup>[18]</sup>。*Gas6*基因敲除可以导致小鼠胚胎红细胞前体细胞形成障碍<sup>[19]</sup>。

最近的研究发现,*Gas6*基因表达的降低可以抑制小鼠卵母细胞的胞质成熟和体外受精之后的原核形成,并且这种作用不依赖于MPF的活性<sup>[20]</sup>。*Gas6*通过诱导细胞外信号调节激酶(ERK1/2)的磷酸化作用调节斑马鱼胚胎血管内皮细胞的增殖、迁移和扩散<sup>[21]</sup>。在斑马鱼胚胎神经发育的早期如果*Gas6*的表达量不正常时会导致正常神经元因为吞噬作用的不正常结合而死亡<sup>[22]</sup>,这意味着*Gas6*基因可能会对早期胚胎的发育产生一定的影响。目前,对*Gas6*基因的研究主要集中在其对血栓形成和精子发生的影响<sup>[23]</sup>,很少有关于其与早期胚胎发育相关的研究。因此,本研究的目的在于探索*Gas6*基因在猪卵泡发育及卵母细胞成熟过程中和早期胚胎发育过程中的表达规律及作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用猪卵巢选自广西南宁市鲁班路屠宰场,从屠宰场取回的卵巢用酒精、生理盐水等消毒清洗后用注射器抽取法采集卵母细胞,挑选那些带有2层以上卵丘细胞、胞质均匀的卵丘细胞-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complexes, COCs),随机分配于各实验组中。

### 1.2 主要试剂

除特殊说明的之外,试验所用药品均购自Sigma Aldrich公司。试验所用*Gas6*一抗为购自Abcam公司的Anti-GAS6抗体(ab136249),该抗体为兔源*Gas6*多克隆抗体,免疫原为人*Gas6*部分肽段。猪和人*Gas6*的氨基酸序列同源性为94%,核苷酸序列同源性为93%,两者同源性较高,故认为该抗体适合于猪的检测。实验所用二抗均购自Proteintech公司,所用的*Gas6*重组蛋白购自R&D公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 免疫组织化学法 选取大小适宜的猪卵巢,

将其周边修整干净后平均分为两半,放入4%多聚甲醛中固定24 h以上。固定后的卵巢组织放入自动脱水机中进行脱水处理,随后放入石蜡中包埋。将含有组织的蜡块放入切片机中将其切成7  $\mu\text{m}$ 厚的薄片以制成石蜡切片,然后进行免疫组化染色,最后脱水烘干。用显微成像系统选取有代表性的原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡和成熟卵泡拍照观察。

**1.3.2 免疫荧光** 收集体外成熟时间为0(即刚从卵泡中抽出来的GV期的猪卵母细胞), 12, 24, 36, 42 h的猪卵母细胞,用PBS洗去培养液中的血清及蛋白等成分,然后放于4%多聚甲醛中固定1 h以上。然后用免疫荧光法进行荧光标记,用FITC标记的二抗标记阳性信号,用PI标记细胞核。压片后用激光共聚焦拍照观察。

**1.3.3 QRT-PCR** 收集体外成熟时间为0, 12, 24, 36, 42 h的猪卵母细胞和孤雌激活后的发育至2-细胞、4-细胞、8-细胞和囊胚时期的早期胚胎各5个,经PBS洗去血清和蛋白等成分后放于细胞裂解液中,用微量反转录cDNA试剂盒(TaKaRa公司)进行反转录反应。反转录体系为20  $\mu\text{L}$ : 8  $\mu\text{L}$ 细胞裂解液, 1  $\mu\text{L}$  DNase I, 1.3  $\mu\text{L}$  DNase I Buffer, 1  $\mu\text{L}$  EDTA, 1  $\mu\text{L}$  dNTP, 2  $\mu\text{L}$ 随机引物, 4  $\mu\text{L}$  5 $\times$ FS Buffer, 0.5  $\mu\text{L}$  RNase Inhibitor, 2  $\mu\text{L}$  DTT, 0.3  $\mu\text{L}$  FS逆转录酶。反应条件为: 25  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 42  $^{\circ}\text{C}$  90 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 终止。

根据GenBank上已知的猪*Gas6*基因序列,利用Oligo 6.0软件分别设计了1对*Gas6*定量引物及*18S*内参引物(表1)。引物由上海生工生物公司合成。然后以反转录产物为模板进行QRT-PCR反应。反应体系为20  $\mu\text{L}$ : 1  $\mu\text{L}$  RT-PCR产物, 10  $\mu\text{L}$  2 $\times$ Fast Start Universal SYBR Green Master(ROX), 0.6  $\mu\text{L}$  Primer F/R (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 8.4  $\mu\text{L}$  RNase Free H<sub>2</sub>O。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 40个循环。实验对每个样品进行4次重复,用*18S*作为内参,运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算目的基因的相对表达量。

**1.3.4 *Gas6*重组蛋白添加试验** 所用猪卵母细胞体外培养液基础液为M-199,胚胎培养液为PZM-3。在M-199中加入10%猪卵泡液,0.6 mmol/L半胱氨酸,0.91 mmol/L丙酮酸,10 ng/mL表皮生长因子,适量的青霉素、链霉素和1 mg/mL胰岛素作为卵母细胞体外培养液(PM)。在PM中加入10 IU/mL的人绒毛膜促性腺激素(hCG)和马绒毛膜促性腺激素(eCG)作为卵母细胞前22 h的培养液(PMh)。将从R&D公司购买的

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列(5'→3')	产物长度
Gene	Sequences (5'→3')	Production length
<i>Gas6</i>	F: CTA CTC CTG CCT GTG TGA CG R: GGA TGT CCT CAC AGG TGC TC	188 bp
<i>18S</i>	F: GAT GGG CGG CGG AAA ATT G R: TCC TCA ACA CCA CAT GAG CA	107 bp

*Gas6*重组蛋白用ddH<sub>2</sub>O溶解,用猪卵母细胞体外培养液PM和PMh分别稀释为100 ng/mL、200 ng/mL,用不添加重组蛋白的培养液作为对照组(0 ng/mL)。

收集带有2层以上卵丘细胞、胞质均匀的卵丘细胞-卵母细胞复合体(COCs),随机分配于各实验组中进行培养。第1 d用PMh培养液培养,22 h后换为PM培养液继续培养20 h。成熟后的卵母细胞用移液枪打掉颗粒细胞,连续统计7次培养的极体率。继续培养7次卵母细胞,并对成熟后的卵母细胞进行孤雌激活,然后放于Pzm-3培养液中连续培养7 d。在孤雌激活26 h后统计各组分裂率,于第7 d统计囊胚率。挑取囊胚放于Hoechst33342染液中染色,之后压片用荧光显微镜拍照观察,统计各组囊胚的细胞数。所有数据均用SPSS 17.0软件进行分析。

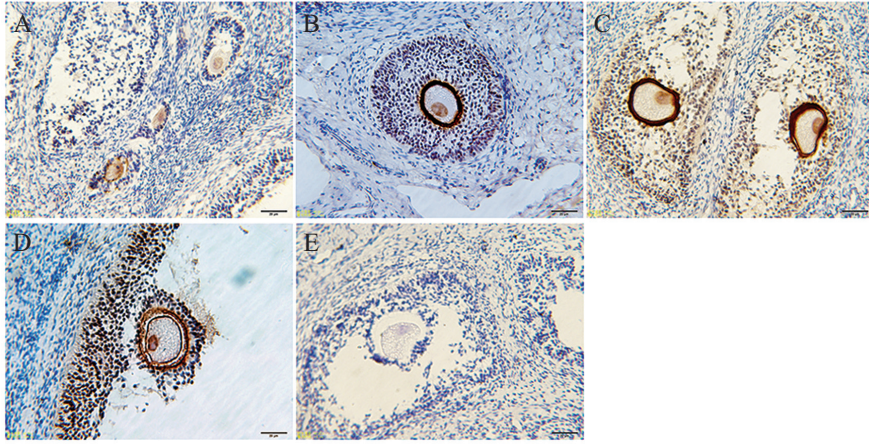
## 2 结果

### 2.1 *Gas6*基因在猪不同卵泡发育阶段中的蛋白表达检测

免疫组化的结果显示,在猪原始卵泡时期,*Gas6*只在卵母细胞观察到淡褐色免疫信号,而在其周围的卵丘细胞没有免疫信号(图1A)。随着卵泡发育到初级卵泡时期,可以观察到卵母细胞和其周围的卵丘细胞都有黄褐色免疫信号,表达量有所增加(图1B)。从初级卵泡到次级卵泡再到成熟卵泡,始终可以在卵丘细胞和卵母细胞看到阳性信号,并且随着卵泡发育免疫信号明显增强,由淡褐色变成深褐色,*Gas6*表达量增加(图1C和图1D),对照组没有观察到阳性信号。免疫组化的结果表明,*Gas6*在猪次级卵泡和成熟卵泡期表达较强,预测其主要参与了猪次级卵泡后的卵泡发育。

### 2.2 *Gas6*基因在猪卵母细胞体外成熟过程中的蛋白表达检测

为了探索*Gas6*基因在猪卵母细胞体外成熟过程中的表达情况,对体外培养的猪卵母细胞分阶段

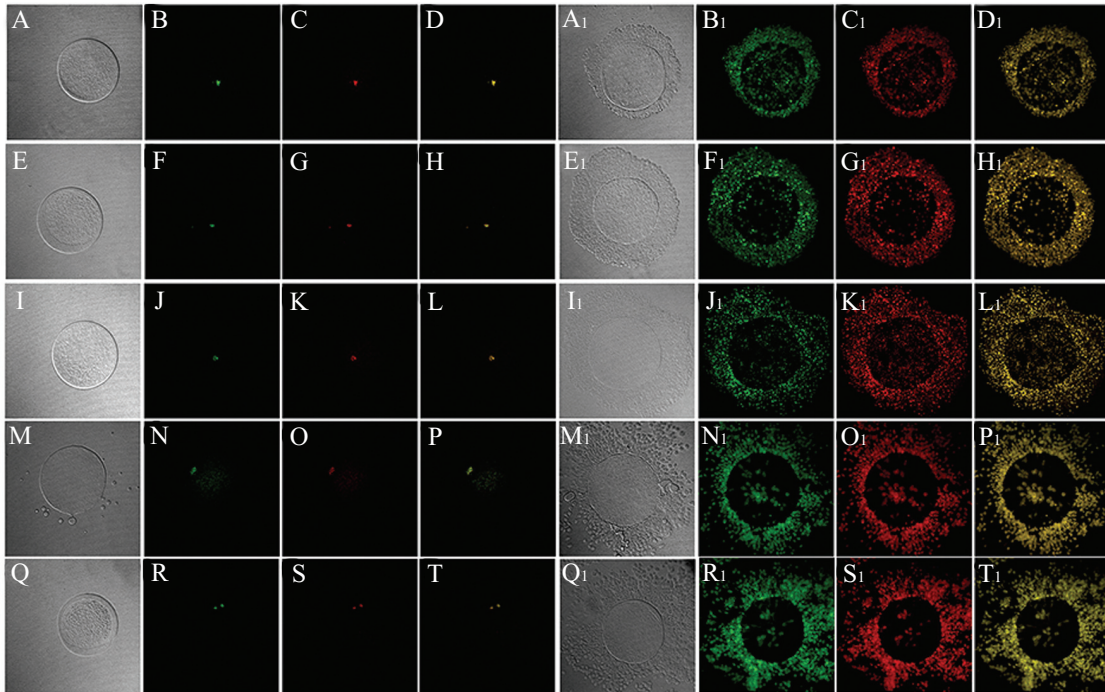


A: 原始卵泡; B: 初级卵泡; C: 次级卵泡; D: 成熟卵泡; E: 阴性对照。标尺=100 μm。

A: primordial follicles; B: primary follicle; C: secondary follicle; D: mature follicle; E: negative control. Scale bars=100 μm.

图1 免疫组化观察Gas6在猪卵泡发育过程中的表达

Fig.1 The expression pattern analysis of Gas6 in pig follicular development by immunohistochemistry



A~T: 分别为体外培养0 h(A~D)、12 h(E~H)、24 h(I~L)、36 h(M~P)和42 h(Q~T)的猪卵母细胞裸卵(用透明质酸酶去除颗粒细胞后的卵母细胞)。A、E、I、M、Q为常光照射下拍摄的图片; B、F、J、N、R为激光共聚焦在543 nm波长绿光拍摄的图片; C、G、K、O、S为激光共聚焦在488 nm波长红光拍摄的图片; D、H、L、P、T为将红光与绿光合成后的图片。A<sub>1</sub>~T<sub>1</sub>为同时期带有颗粒细胞的卵母细胞。

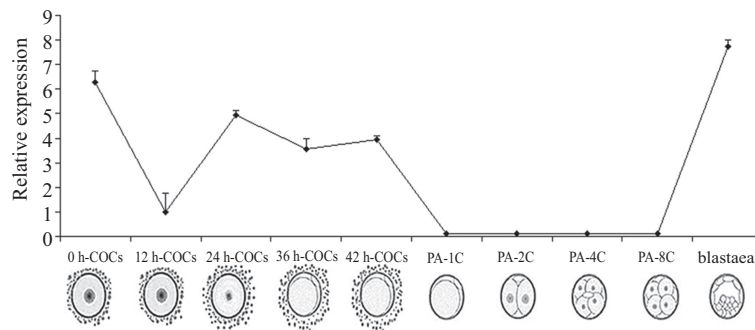
A~T: denuded pig oocytes (denude the granulosa cells with hyaluronidase) *in vitro* cultured for 0 h (A~D), 12 h (E~H), 24 h (I~L), 36 h (M~P), 42 h (Q~T). A, E, I, M, Q indicated picture shoot by nature light; B, F, J, N, R indicated picture shoot by green light of 543 nm wavelength; C, G, K, O, S indicated picture shoot by red light of 488 nm wavelength; D, H, L, P, T indicated picture overlapped green with red. A<sub>1</sub>~T<sub>1</sub>: cumulus-oocyte complexes of pig obtained at the same time with A~T.

图2 免疫组化观察Gas6在猪卵母细胞体外成熟过程中的表达情况

Fig.2 Gas6 expression in the process of *in vitro* maturation of pig oocytes by immunohistochemical method

进行了免疫组化实验, 包括体外成熟时间为0(即刚从卵泡中抽出来的GV期的猪卵母细胞), 12, 24, 36, 42 h的猪卵母细胞(图2)。如图2所示, 在猪卵母细胞成熟过程中始终可以观察到绿色荧光信号, 在裸

卵中可以看到在被PI标记的细胞核上有绿色荧光信号, 说明Gas6在卵母细胞核表达。在COCs中可以看到颗粒细胞被免疫荧光信号标记, 且绿色免疫荧光信号和红色标记的细胞核完全重合, 亦说明主要表



以18S为内参研究*Gas6*基因在卵母细胞成熟和早期胚胎发育过程中的相对表达量。0, 12, 24, 36, 42 h表示在体外培养0, 12, 24, 36, 42 h的猪卵母细胞, COCs表示卵丘-卵母细胞复合体, PA表示孤雌激活, 1C、2C、4C、8C和blastaea是孤雌激活后的1-细胞、2-细胞、4-细胞、8-细胞和囊胚。The relative expression level of *Gas6* gene in the process of oocytes *in vitro* maturation and early embryo development was studied by QRT-PCR with 18S-rRNA as reference gene. 0, 12, 24, 36 and 42 h means oocytes *in vitro* cultured for 0, 12, 24, 36 and 42 h. COCs indicates cumulus-oocyte complexes. PA means parthenogenetic activation. 1C, 2C, 4C, 8C and blastaea indicates 1-cell, 2-cell, 4-cell, 8-cell and blastaea after parthenogenetic activation.

图3 *Gas6*在猪卵子成熟及早期孤雌激活胚胎发育过程中的QRT-PCR检测

Fig.3 QRT-PCR of *Gas6* in the process of oocytes maturation and early parthenogenetic activated embryo development

表2 添加*Gas6*蛋白对猪早期胚胎的影响

Table 2 Effect of *Gas6* on early embryo development of pig

浓度(ng/mL) Concentration (ng/mL)	总数 Total	极体率(%) Polar body (%)	分裂率(%) Cleavage (%)	囊胚率(%) Blastocysts (%)	囊胚细胞数 Blastula cells
0	1507	826(54.79) <sup>a</sup>	552(66.84) <sup>a</sup>	213(37.33) <sup>a</sup>	45.984 6(±1.28) <sup>a</sup>
100	1379	832(60.31) <sup>a</sup>	626(75.24) <sup>b</sup>	301(48.05) <sup>b</sup>	54.630 8(±1.41) <sup>b</sup>
200	1441	789(54.72) <sup>a</sup>	557(70.59) <sup>ab</sup>	256(44.42) <sup>ab</sup>	49.200 0(±1.41) <sup>c</sup>

不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Different letters indicated significant difference at  $P < 0.05$ .

达于颗粒细胞核。观察结果显示, 在0, 12, 24 h阶段, COC中*Gas6*表达差异不显著, 在体外培养36 h和42 h时COC中*Gas6*表达显著增加。免疫荧光染色结果亦显示*Gas6*在猪卵母细胞体外成熟后期表达加强, 与免疫组化结果卵泡发育过程中的表达一致。

### 2.3 *Gas6*基因在猪卵子成熟及早期胚胎(PA)发育过程中的QRT-PCR检测

以18S为内参基因, 应用QRT-PCR技术对猪*Gas6*基因mRNA在卵母细胞体外成熟过程中及孤雌胚胎发育过程中的表达情况进行了研究(图3)。结果显示, 猪*Gas6*基因在卵子体外成熟中的卵丘-卵母细胞复合体(COCs)中前12 h呈现下调, 然后呈现增加后降低的表达模式, 这与免疫组化结果*Gas6*主要在卵泡发育后期表达增强相类似。在孤雌胚胎中, 只有囊胚期可以检测到*Gas6* mRNA的表达, 而1-细胞、2-细胞、4-细胞和8-细胞时期胚胎中均检测不到表达。囊胚期中的*Gas6*的相对表达量显著高于卵泡发育和早期胚胎发育的其他阶段, 甚至高于GV期卵

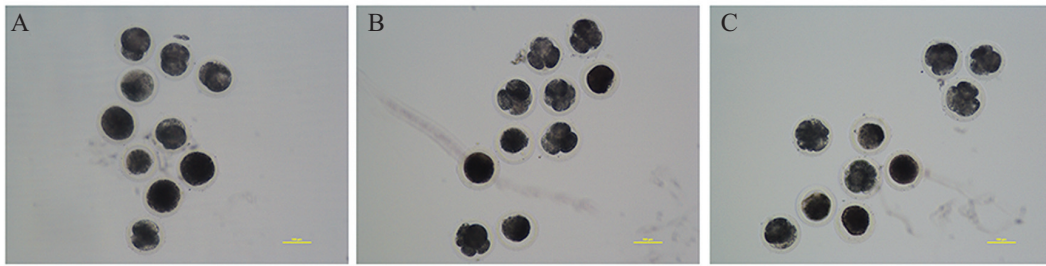
丘-卵母细胞复合体(COCs)中的表达。

### 2.4 添加*Gas6*重组蛋白对猪卵母细胞体外成熟培养质量的影响

在猪卵母细胞成熟液中添加不同浓度的*Gas6*重组蛋白进行培养(表2)。实验发现, 成熟液中添加*Gas6*后卵母细胞极体率没有显著变化, 但是添加浓度为100 ng/mL培养的卵母细胞孤雌激活后的分裂率(图4)和囊胚率(图5)显著增高, 囊胚细胞数显著增多( $P < 0.05$ )。实验表明, 猪卵母细胞体外培养系统中*Gas6*蛋白的增多不能使卵母细胞极体率增加, 但是可以提高孤雌激活胚胎的分裂率、囊胚率和囊胚质量。

## 3 讨论

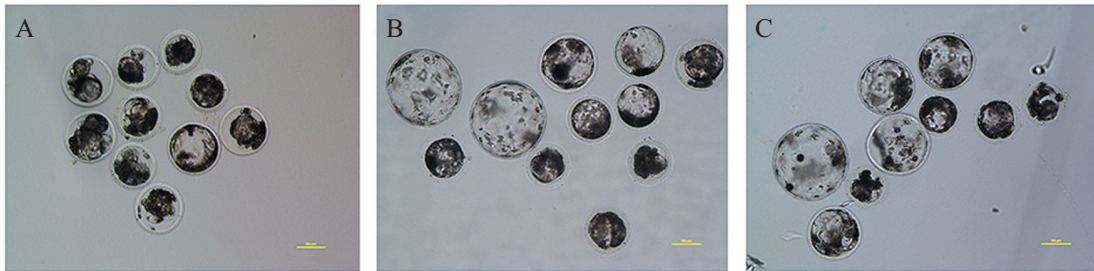
*Gas6*是人类发现的一种新的生长因子, 具有广泛的生物学作用。在生殖调控方面, 有研究报道, *Gas6*在雄性小鼠生殖脊和原始生殖细胞表达, 在雌性生殖脊和原始生殖细胞检测不到表达, 但是在发育中的卵巢中可以检测到表达<sup>[14]</sup>。本研究通过免疫



A: 在普通成熟液中培养42 h后的卵母细胞孤雌激活后26 h的胚胎在显微镜下的照片; B: 在成熟液中添加100 ng/mL Gas6重组蛋白培养42 h后的卵母细胞孤雌激活后26 h的胚胎在显微镜下的照片; C: 在成熟液中添加200 ng/mL Gas6重组蛋白培养42 h后的卵母细胞孤雌激活后26 h的胚胎在显微镜下的照片。标尺=100  $\mu\text{m}$ 。

A: the picture of embryos 26 h after parthenogenetic activation of oocytes cultured 42 h in common *in vitro* media by microscope. B: the picture of embryos 26 h after parthenogenetic activation of oocytes cultured 42 h *in vitro* media with 100 ng/mL Gas6 recombinant protein by microscope; C: the picture of embryos 26 h after parthenogenetic activation of oocytes cultured 42 h *in vitro* media with 200 ng/mL Gas6 recombinant protein by microscope. Scale bars=100  $\mu\text{m}$ .

图4 Gas6对卵母细胞分裂率的影响  
Fig.4 Effect of Gas6 on cleavage rate of oocyte



A: 在普通成熟液中培养42 h后的卵母细胞孤雌激活后的囊胚在显微镜下的照片; B: 在成熟液中添加100 ng/mL Gas6重组蛋白培养42 h后的卵母细胞孤雌激活后的囊胚在显微镜下的照片; C: 在成熟液中添加200 ng/mL Gas6重组蛋白培养42 h后的卵母细胞孤雌激活后的囊胚在显微镜下的照片。标尺=100  $\mu\text{m}$ 。

A: the picture of blastocyst after parthenogenetic activation of oocytes cultured 42 h in common *in vitro* media by microscope; B: the picture of blastocyst after parthenogenetic activation of oocytes cultured 42 h *in vitro* media with 100 ng/mL Gas6 recombinant protein by microscope; C: the picture of blastocyst after parthenogenetic activation of oocytes cultured 42 h *in vitro* media with 200 ng/mL Gas6 recombinant protein by microscope. Scale bars=100  $\mu\text{m}$ .

图5 Gas6对卵母细胞囊胚率的影响  
Fig.5 Effect of Gas6 on blastocyst rate of oocyte

组化染色法首次获得了Gas6基因在猪卵泡发育过程中的表达情况。结果表明, Gas6在原始卵泡的卵母细胞和初级卵泡次级卵泡与成熟卵泡的卵母细胞及其周围的卵丘细胞表达, 而卵巢组织细胞不表达, 进一步确定了Gas6在猪卵巢组织中的表达方位和表达模式。

多篇文献报道显示, Gas6基因参与调控早期胚胎发育。Fleming等<sup>[17]</sup>报道, Gas家族多个基因在小鼠早期胚胎表达, Gas6在8-细胞之前的胚胎表达很少, 到囊胚时期表达增多。Kim等<sup>[20]</sup>报道, Gas6的表达是小鼠卵母细胞成熟的重要因素。Gas6在GV和MII期小鼠卵母细胞表达较多, 但在体外受精(IVF)后胚胎中表达迅速消失, 直到8-细胞后又出现高表

达。本研究运用免疫荧光等方法探索Gas6在猪体外培养胚胎的表达规律, 结果显示, 在卵子成熟及早期胚胎发育过程中始终有Gas6蛋白的表达, 在COCs和GCs的表达明显高于裸卵中的表达, 在8-细胞之前的胚胎表达较低, 而囊胚期表达显著增高。QRT-PCR显示, 在2-细胞、4-细胞、8-细胞时期的早期胚胎无法检测到Gas6 mRNA, 但到了囊胚其mRNA表达水平迅速增高, 甚至高于GV期。这种表达规律与文献报道的Gas6在小鼠早期胚胎发育过程中的表达规律一致, 说明Gas6对猪卵子成熟及早期胚胎发育的影响与小鼠类似。

Jiang等<sup>[24]</sup>用原位杂交和RT-PCR等实验方法研究Gas6在小鼠体内胚胎发育中的表达规律, 研究发

现, *Gas6* mRNA始终存在于早期胚胎之中, 但是只有在早期胚胎的正常发育受到威胁和抑制时才有*Gas6*蛋白表达。本研究显示, 在卵子成熟及早期胚胎发育过程中都有*Gas6*蛋白的表达, 而在2-细胞、4-细胞、8-细胞时期的早期胚胎无法检测到*Gas6* mRNA。这种差异很可能是研究所用的材料导致的, Jiang等<sup>[24]</sup>用的是小鼠自然交配产生的体内胚胎, 而本研究用的是卵母细胞体外培养的孤雌激活胚胎。因此, 可以推断卵母细胞的正常生长发育在体外培养过程中依然受到了抑制, 其体外培养系统依然需要改进, 而*Gas6*蛋白可能有利于卵母细胞的体外成熟。在猪卵母细胞体外培养系统中添加*Gas6*重组蛋白试验表明, 添加100 ng/mL *Gas6*重组蛋白培养的卵母细胞孤雌激活后分裂率、囊胚率及囊胚细胞数都显著增高, 虽然并没有增加极体率, 但是符合Kim等<sup>[20]</sup>关于*Gas6*的表达不影响卵母细胞的细胞核成熟, 但是影响细胞质成熟的报道。因此, 在猪卵母细胞成熟过程中, *Gas6*蛋白的增多不影响细胞核的成熟, 但可能通过促进卵母细胞细胞质的成熟进而提高了成熟卵母细胞的质量, 进而提高了早期胚胎的发育潜能。同时, 实验也证明在猪卵母细胞体外培养系统中添加*Gas6*重组蛋白确实有利于获得质量更好的卵母细胞。Kim等<sup>[20]</sup>发现, 在斑马鱼胚胎显微注射*Gas6*重组蛋白可以显著促进斑马鱼胚胎血管内皮细胞的增殖, 且*Gas6*蛋白作用具有剂量依赖性。*Gas6*基因通过诱导细胞外信号调节激酶(ERK1/2)的磷酸化作用调节胚胎血管内皮细胞的增殖、迁移和扩散, 而*Gas6*基因的沉默可以抑制斑马鱼胚胎血管内皮细胞的增殖和细胞内微管结构的形成, 且这种作用与添加ERK1/2抑制剂的影响相似<sup>[21]</sup>。鉴于*Gas6*基因与抗凝血蛋白S的同源性为44%, *Gas6*基因敲除可以导致小鼠胚胎红细胞前体细胞形成障碍<sup>[9]</sup>, 推测*Gas6*基因可能通过诱导细胞外信号调节激酶(ERK1/2)的磷酸化作用调节早期胚胎血管内皮细胞生长因子等方式影响早期胚胎细胞骨架的形成, 从而影响了细胞质的成熟质量。

本研究进一步确定了*Gas6*在猪卵巢组织中的表达方位和表达模式, 分析了*Gas6*基因在猪卵母细胞成熟过程中及早期胚胎发育过程中的表达规律, 并提出了一种新的改良猪卵母细胞体外培养系统的方法, 为进一步研究*Gas6*基因在卵子成熟及早期胚胎发育过程中的调控机制提供了一定的依据。

## 参考文献 (References)

- 1 Niwa K. Effectiveness of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization techniques in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* 1993; 48: 49-59.
- 2 Rutledge JJ, Monson RL, Northey DL, Leibfried-Rutledge ML. Seasonality of cattle embryo production in a temperate region. *Theriogenology* 1999; 51(1): 330.
- 3 Nagai T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology* 2001; 55(6): 1291-301.
- 4 Sun QY, Lai L, Bonk A, Prather RS, Schatten H. Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: Effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition. *Mol Reprod Dev* 2001; 59(2): 192-8.
- 5 Sorensen RA, Wassarman PM. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol* 1976; 50(2): 531-6.
- 6 Szybek K. *In-vitro* maturation of oocytes from sexually immature mice. *J Endocrinol* 1972; 54(3): 527-8.
- 7 Eppig JJ, Wigglesworth K. Development of mouse and rat oocytes in chimeric reaggregated ovaries after interspecific exchange of somatic and germ cell components. *Biol Reprod* 2000; 63(4): 1014-23.
- 8 Gandolfi TA, Gandolfi F. The maternal legacy to the embryo: Cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology* 2001; 55(6): 1255-76.
- 9 Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Zong C, Hanafusa H, *et al.* Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1996; 271(47): 30022-7.
- 10 Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (*gas6*) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol* 1993; 13(8): 4976-85.
- 11 Goruppi S, Ruaro E, Schneider C. *Gas6*, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 1996; 12(3): 471-80.
- 12 Li R, Chen J, Hammonds G, Phillips H, Armanini M, Wood P, *et al.* Identification of *Gas6* as a growth factor for human Schwann cells. *J Neurosci* 1996; 16(6): 2012-9.
- 13 Nakano T, Higashino K, Kikuchi N, Kishino J, Nomura K, Fujita H, *et al.* Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for  $Ca^{2+}$ -mobilizing growth factors. *J Biol Chem* 1995; 270(11): 5702-5.
- 14 Matsubara N, Takahashi Y, Nishina Y, Mukoyama Y, Yanagisawa M, Watanabe T, *et al.* A receptor tyrosine kinase, Sky, and its ligand Gas 6 are expressed in gonads and support primordial germ cell growth or survival in culture. *Dev Biol* 1996; 180(2): 499-510.
- 15 Xiong W, Chen Y, Wang H, Wang H, Wu H, Lu Q, *et al.* *Gas6* and the Tyro 3 receptor tyrosine kinase subfamily regulate the phagocytic function of Sertoli cells. *Reproduction* 2008; 135(1): 77-87.
- 16 Yoon SJ, Chung HM, Cha KY, Kim NH, Lee KA. Identification of differential gene expression in germinal vesicle vs. metaphase

- II mouse oocytes by using annealing control primers. *Fertil Steril* 2005; 83 Suppl 1: 1293-6.
- 17 Fleming JV, Fontanier N, Harries DN, Rees WD. The growth arrest genes *gas5*, *gas6*, and *CHOP-10* (*gadd153*) are expressed in the mouse preimplantation embryo. *Mol Reprod Dev* 1997; 48(3): 310-6.
- 18 Kim K, Lee S, Lee K. Expression of *Gas6* receptors, *Tyro3*, *Axl*, and *Mertk*, in oocytes and embryos and effects of *Mertk* RNAi on the oocyte maturation. *Occur Reproduct* 2012; 16(3): 195-204.
- 19 Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Lambrechts D, Fish RJ, Tjwa M, Plaisance SEP, *et al.* Role of *Gas6* in erythropoiesis and anemia in mice. *J Clin Invest* 2008; 118(2): 583-96.
- 20 Kim KH, Kim EY, Kim Y, Kim E, Lee HS, Yoon SY, *et al.* *Gas6* downregulation impaired cytoplasmic maturation and pronuclear formation independent to the MPF activity. *PLoS One* 2011; 6(8): e23304.
- 21 Kim YS, Jung S, Jung DH, Choi S, Lee Y, Kim JS. *Gas6* stimulates angiogenesis of human retinal endothelial cells and of zebrafish embryos via ERK1/2 signaling. *PLoS One* 2014; 9(1): e83901.
- 22 林子琳. 斑马鱼*Gas6*和*Protein S*的基因表达与功能鉴定(硕士论文). 台湾海洋大学(Lin Zilin. Expression and characterization of *Gas6* and protein S from zebrafish. National Taiwan Ocean University) 2010, 38-41.
- 23 Lu Q, Gore M, Zhang Q, Camenisch T, Boast S, Casagrande F, *et al.* *Tyro-3* family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature* 1999; 398(6729): 723-8.
- 24 Jiang HY, Lee KH, Schneider C, O WS, Tang PL, Chow PH. The growth arrest specific gene (*gas6*) protein is expressed in abnormal embryos sired by male golden hamsters with accessory sex glands removed. *Anat Embryol (Berl)* 2001; 203(5): 343-55.

中国细胞生物学