

生长分化因子-9对牛卵丘细胞增殖的影响

欧阳效晴 张春强 栗瑞兰 张通 范晓梅 高丽霞 赵濛 张家新*

(动物遗传育种与繁殖自治区重点实验室, 内蒙古农业大学动物科学学院, 呼和浩特 010018)

摘要 研究生长分化因子-9(growth differentiation factor-9, GDF-9)对牛卵丘细胞增殖的影响。采用MTT法检测不同浓度GDF-9对卵丘细胞增殖的影响, 结果表明, GDF-9能促进卵丘细胞的增殖, 且GDF-9与卵丘细胞增殖效应存在浓度梯度关系; 在卵丘细胞增殖过程中, FSH在一定程度上与GDF-9发挥协同作用。在GDF-9和FSH的作用下, 去除卵母细胞的卵丘细胞复合物(oocytectomized cumulus cell complexes, OOX)也可以保持较好的发育形态。实时定量PCR结果表明, 随着GDF-9浓度的增加, 卵丘细胞扩展相关基因PTX3、HAS2及PTGS2的表达量也增加。总之, 以上的研究结果表明, GDF-9可以促进卵丘细胞的增殖, 对卵丘细胞功能的发挥起着重要的作用。

关键词 牛卵丘细胞; 扩展相关基因; 增殖; 生长分化因子-9

Effect of Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) on Bovine Cumulus Cells Proliferation

OuYang Xiaoqing, Zhang Chunqiang, Li Ruilan, Zhang Tong, Fan Xiaomei, Gao Lixia, Zhao Meng, Zhang Jiaxin*

(Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract This paper investigated the effect of growth differentiation factor-9 (GDF-9) on the proliferation of bovine cumulus cells. The effect of GDF-9 with different concentration on cumulus cells proliferation was studied by MTT assay. MTT results showed that GDF-9 could promote cumulus cell proliferation by a concentration-dependent manner, and FSH had a synergistic effect with GDF-9 on inducing cumulus cell proliferation. In addition, GDF-9 combined with FSH could promote oocytectomized cumulus complexes (OOX) development. The expression of cumulus cell expansion-related genes *PTX3*, *HAS2* and *PTGS2* were examined by Real-time quantitative PCR. The results showed that the expression of expansion-related gene were up-regulated by GDF-9. In conclusion, GDF-9 can promote cumulus cells proliferation and play an important role in regulating function of cumulus cells.

Key words bovine cumulus cells; expansion-related genes; proliferation; growth differentiation factor-9

转化生长因子(transforming growth factor, TGF)是细胞内信号蛋白的大家族之一, 在不同组织和不同物种中, TGF- β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族成员主要通过独特的转膜Ser/Thr激酶受体来实施生物学应答。目前已发现的TGF- β 超

家族生长因子有50多个, 这些生长因子的活性与C-端区有关, 而在C-端区结构域中一般都含7个或9个位置稳定的半胱氨酸(Cys), 其中, GDF-1、GDF-3、GDF-9发现得较晚^[1-2]。GDF-9(growth differentiation factor-9, GDF-9)在动物生殖方面的作用已越来越受

收稿日期: 2014-01-21 接受日期: 2014-03-24

国家科技支撑计划(批准号: 2011BAD19B01)、国家自然科学基金(批准号: 31060307)和公益性行业(农业)科研专项经费(批准号: 201003061)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-4309195, E-mail: zjxcu@163.com

Received: January 21, 2014 Accepted: March 24, 2014

This work was supported by the National Key Technology R&D Program (Grant No.2011BAD19B01), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31060307) and the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (Grant No.201003061)

*Corresponding author. Tel: +86-471-4309195, E-mail: zjxcu@163.com

网络出版时间: 2014-07-02 11:01 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0022.html>

到人们的重视, 这是因为: 第一, *GDF-9* mRNA仅在卵巢中高水平表达; 第二, *GDF-9*在TGF- β 家族中是独一无二的, 因为它有6个Cys, 而不是常规的TGF- β 家族所具有的7个或9个, 这表明*GDF-9*单体可能是非共价键连接而形成的二聚体。在对牛的研究中发现, 在*GDF-9*的协同下, FSH能大幅度提高在牛原始卵泡激活、存活和生长^[3], *GDF-9*反义核苷酸可以激活细胞蛋白凋亡酶和诱导腔前卵泡的凋亡, 但这一作用可被外源性的*GDF-9*减弱; *GDF-9*通过激活*GDF-9*脂酸激酶-3通路, 保护卵丘细胞免受凋亡, 这表明*GDF-9*可以抑制卵丘细胞的凋亡和闭锁, 促进腔前到腔卵泡的生长^[4]。同时, 对中国荷斯坦奶牛的研究结果表明, *GDF-9*基因的多态性对超数排卵的性能有影响^[5]。另外还有研究表明, FSH可以降低卵母细胞中*GDF-9*基因的表达, 但在卵丘细胞中却促进了*GDF-9*基因表达^[6]。目前, 关于*GDF-9*对体外培养的牛卵丘细胞的作用研究较少。因此, 本研究检测了不同浓度*GDF-9*对牛卵丘细胞增殖的影响以及FSH和*GDF-9*的协同作用。有研究表明, 乙酰透明质酸合酶2(hyaluronan synthase 2, HAS2)^[7-8]、穿透素3(pentraxin 3, PTX3)^[9]和前列腺素合成酶2(prostaglandin synthase 2, PTGS2)^[10-11]均已被证明在卵丘扩展功能上具有重要的作用, 因此我们检测了不同浓度*GDF-9*对牛卵丘细胞扩展相关基因(*HAS2*、*PTX3*和*PTGS2*)的相对表达丰度, 以探讨*GDF-9*对卵丘细胞增殖的影响。本研究为进一步阐明*GDF-9*对卵丘细胞功能的影响机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

DMEM/F12培养基, 无Ca²⁺、Mg²⁺磷酸盐缓冲液(DPBS)均购自于Gibco公司产品; 促卵泡生成素(FSH)购自加拿大YES生物技术研究有限公司; 胎牛血清为Hyclone公司产品; 青霉素、链霉素、重组*GDF-9*、四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、透明质酸酶、胰蛋白酶等购自美国Sigma公司; 反转录试剂盒PrimeScript RT Master Mix购自TaKaRa公司; 小提质粒试剂盒、定量PCR使用的SuperReal PreMix(SYBR Green)试剂盒和胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司; pGEM T-easy vector克隆载体购自Promega公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 牛卵丘细胞的分离及培养

卵巢采自呼和浩特市屠宰场, 保存在30~35 °C的生理盐水中, 4 h内运回实验室。将采回的卵巢用37 °C生理盐水清洗3次, 用12号针头抽取直径为2~8 mm卵泡中的卵泡液, 抽取的混合液注入到37 °C水浴锅中预热的50 mL尖底离心管中, 待卵丘卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complex, COC)自然沉降后除去上清, 在体视显微镜下挑选有3层以上卵丘细胞包裹、胞质均一的COC; 用震荡器震荡2 min后, 收集分散的卵丘细胞, 在1 200 r/min下离心5 min, 除去上清。然后用培养液离心洗涤2次, 除去上清后用培养液重悬浮, 培养液为: DMEM/F12培养基+100 U/mL青霉素+100 μ g/mL链霉素+10% FBS。

1.3 FSH和*GDF-9*对卵丘细胞体外增殖的影响

卵丘细胞增殖的检测采用Mosmann等^[12]所报道的MTT法。MTT法的原理是: 黄色的四甲基偶氮唑盐(MTT)能够被活细胞线粒体中的脱氢酶还原成蓝紫色的甲瓚结晶物, 根据细胞溶液的*D*值则可以反映出细胞存活率的变化情况。其主要方法如下: 收集对数期的卵丘细胞, 用台盼蓝染色检测细胞存活率达70%以上时, 调整细胞数至 5×10^3 , 接种到96孔板中, 每孔加入100 μ L培养基, 每孔接种细胞数为 1×10^4 , 在5% CO₂、37 °C孵育24 h后加入不同浓度的*GDF-9*, *GDF-9*浓度分别为0, 150, 300, 450, 600 ng/mL, 或者同时加入30 ng/mL FSH, 每组6复孔, 培养44 h后, 每孔加入20 μ L MTT溶液, 继续培养4 h。终止培养, 小心吸除孔内培养液。每孔加入150 μ L二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪*D*₄₉₀处测量各孔的吸光值。每组重复3次。

1.4 FSH和*GDF-9*对去除卵母细胞的卵丘细胞复合体(OOX)发育的影响

将卵丘卵母细胞复合体(COC)中的卵母细胞去除, 从而形成只有颗粒细胞和透明带的卵丘细胞复合体(OOX)。卵母细胞去除采用Peng等^[13]报道的方法, 方法如下: 先用固定吸管先将COC固定住, 并保持一定的负压, 然后用注射针将卵母细胞刺穿, 用固定针将卵母细胞中的胞质全部吸出, 从而形成卵丘细胞复合体(OOX)。然后根据不同的处理将OOX培养24 h, 观察每个处理中卵丘细胞的发育情况, 每个处理重复3次。实验处理分为四组, A: M199+10% FBS+COC; B: M199+10% FBS+100 ng/mL *GDF-9*+OOX; C:

表1 引物序列
Table 1 The sequence of primer

基因 Gene	参考序列 Reference sequence	退火温度(°C) Annealing temperature (°C)	引物序列(5'→3') The sequence of Primer (5'→3')	产物长度(bp) Product length (bp)
<i>HAS2</i>	NM_174079	58	F: GGA CTC ATT CCC GTA TCC GTT TG R: CTT CTT CCG CCT GCC ACA TT	198
<i>PTGS2</i>	NM_174445	56	F: TTT TCT GCT GAA GCC CTA T R: GAG GCA GTG TTG ATG ATT T	156
<i>PTX3</i>	NM_001076259	56	F: GCT ATC GGT CCA TAA TGC TTG R: TTT CTT TGA ATC CCA GGT GC	113
<i>GAPDH</i>	NM_001034034	56	F: TGA ACC ACG AGA AGT ATA ACA ACA CC R: TAA GTC CCT CCA CGA TGC CAA A	120

M199+10% FBS+10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FSH+OOX; D: M199+10% FBS+100 ng/mL GDF-9+10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FSH+OOX。

1.5 总RNA的提取及反转录(RT-PCR)

收集对数期的卵丘细胞,用台盼蓝染色检测细胞存活率达70%以上时,调整细胞数至 5×10^3 ,接种到6孔板中,加10%FBS-DMEM/F-12培养,每孔加入2 mL培养基,24 h后分别加入浓度为0, 150, 300, 450, 600 ng/mL的GDF-9作用48 h。根据Trizol Regent Kit说明书提取总RNA,并用RNase-free的DNase I处理,以去除DNA污染,最后用1.2%的琼脂糖凝胶电泳进行检测,以保证RNA样品质量可靠。按PrimeScript RT Master Mix使用说明书合成cDNA。

1.6 引物设计

根据GenBank中公布的牛cDNA序列,利用Primer 5.0设计特异性引物,由Invitrogen(上海)贸易有限公司合成。

1.7 PCR产物的克隆测序

所有基因的PCR扩增体系均采用20 μL 体系:采用提取的2 μL cDNA扩增模板,上下游引物(50 mmol/L)各1 μL , 10 μL 2 \times Premix EX Taq,加三蒸水至总体积为20 μL 。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法的要求,各个基因的扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,退火(温度见表1)30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 44个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳,回收目的DNA片段,具体操作按照胶回收试剂盒。回收后的PCR产物片段与pGEM T-easy克隆载体于16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接,转化DH5 α 感受态细胞,铺于含Amp/X-gal/IPTG的LB培养板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养14~16 h,蓝白斑筛选阳性克隆,将白色阳性克隆于含Amp的LB培养液中过夜培养,菌液PCR鉴定后送Invitrogen(上海)贸易有限公司测序。

1.8 实时荧光定量PCR

采用SYBR为荧光染料,用天根公司SuperReal PreMix(SYBR Green)进行荧光定量PCR扩增。反应体系20 μL , 2 \times SuperReal PreMix 10 μL ,上下游引物各0.5 μL ,模板1.5 μL ,无酶水7.5 μL 。反应条件采用三步法,具体如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;扩增:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,退火(温度见表1)30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,44个循环;熔解曲线:测量温度为55 $^{\circ}\text{C}$ ~95 $^{\circ}\text{C}$ 。在扩增完成后进行熔解曲线分析,以确定RT-PCR产物的专一性,重复3次。最后,以管家基因*GAPDH*为内参,根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各基因mRNA的相对表达量。

1.9 统计分析

数据用SAS 9.0软件中的One-Way ANOVA进行统计分析,并用*t*检验进行差异显著性测验, $P < 0.05$ 差异显著。

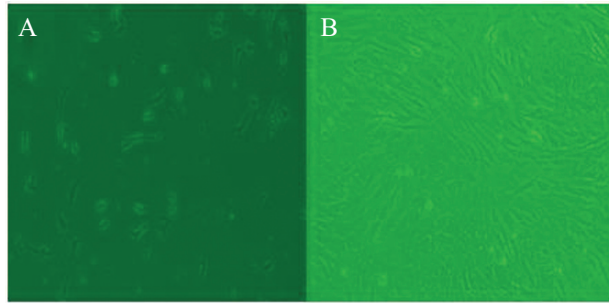
2 结果

2.1 牛卵丘细胞原代培养的形态学观察

倒置相差显微镜观察结果表明,刚接种时卵丘细胞呈球形,10 h后贴壁生长;培养24 h后,形态不规则,呈多角形或梭形(图1A)。培养6 d(144 h)时可铺满皿底,形成单层的卵丘细胞(图1B)。

2.2 FSH和GDF-9对卵丘细胞体外增殖的作用

由图2可知,在GDF-9浓度分别为0, 150, 300, 450, 600 ng/mL的情况下,无FSH时 D_{490} 分别为 0.358 ± 0.050 、 0.501 ± 0.070 、 0.761 ± 0.056 、 1.065 ± 0.113 和 1.550 ± 0.099 ,各浓度间差异显著($P < 0.05$);而有30 ng/mL FSH时, D_{490} 分别为 0.465 ± 0.041 、 0.674 ± 0.049 、 0.986 ± 0.067 、 1.332 ± 0.099 和 1.735 ± 0.016 ,各浓度间差异显著($P < 0.05$);在相同GDF-9浓度的情况下,添加FSH可以明显促进卵丘细胞的增殖作用($P < 0.05$)。从图2



A: 培养24 h; B: 培养144 h.
A: cultured for 24 h; B: cultured for 144 h.

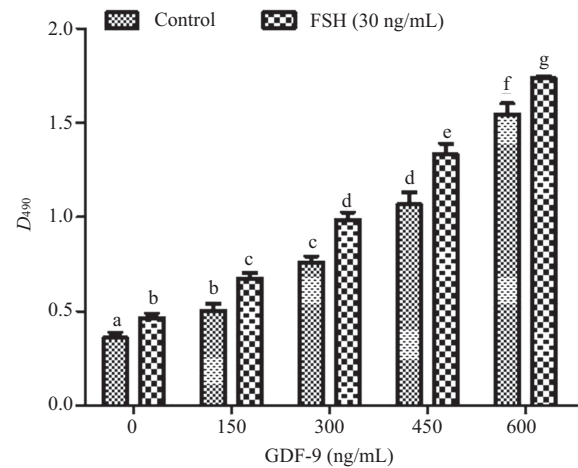
图1 牛卵丘细胞的形态(100×)

Fig.1 Morphology of bovine cumulus cells cultured *in vitro* (100×)

也可以看出, 不论有无FSH, 卵丘细胞的增殖随着GDF-9的浓度增加而逐渐增强, 即GDF-9与卵丘细胞增殖效应存在浓度梯度关系。

2.3 PCR扩增和克隆测序

将提取的总RNA按照上述条件进行RT-PCR扩增, 经1%琼脂糖凝胶电泳检测, *GAPDH*、*PTGS2*、*PTX3*和*HAS2*基因分别在120, 156, 113, 198 bp处有一条特异性条带(图3A), 与引物设计的预期扩增结果一致。然后对RT-PCR产物进行纯化、克隆、菌液PCR鉴定后(图3B), 送Invitrogen(上海)贸易有限公司测序。把所测序列分别与NM_001034034、NM_174445、NM_001076259和NM_174079进行比对, 同源性均为100%。



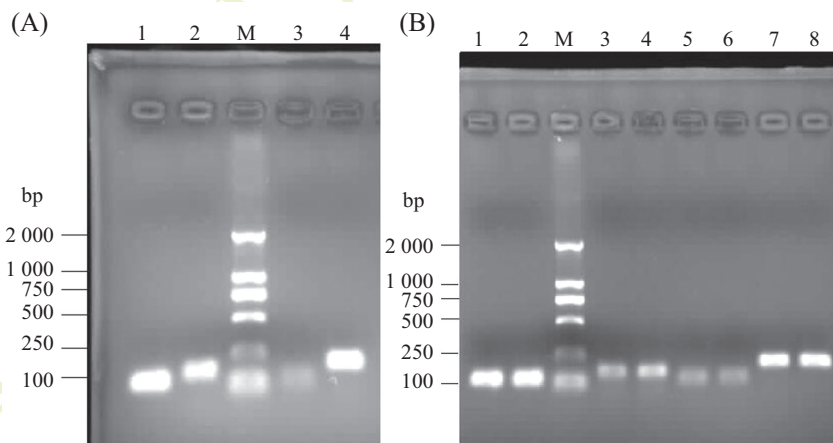
不同字母表示差异显著($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)。The different superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), and the same superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$).

图2 GDF-9和FSH对卵丘细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of GDF9 combined with FSH on cumulus cell proliferation

2.4 PCR产物特异性

实时荧光定量PCR产物特异性及扩增效率分析, 由扩增曲线和熔解曲线表明基因片段熔解曲线均出单峰, 无引物二聚体峰及非特异性扩增产物出现, 说明引物设计特异性好, 可用于后续试验。以*GAPDH*做标准曲线(4C)为例, 由扩增曲线(4A)和熔解曲线(4B)表明, 基因片段熔解曲线均出单峰, *GAPDH*基因的扩增效率(E)均在1.0左右, 相关系数



A: 牛扩展相关基因PCR扩增片段; M: DL2000 marker; 1: *GAPDH*基因; 2: *PTGS2*; 3: *PTX3*; 4: *HAS2*; B: 阳性克隆PCR扩增片段; M: DL2000 marker; 1, 2: *GAPDH*基因; 3, 4: *PTGS2*; 5, 6: *PTX3*; 7, 8: *HAS2*。

A: PCR products of expansion-related genes in bovine. M: DL2000 marker; 1: *GAPDH* gene; 2: *PTGS2* gene; 3: *PTX3* gene; 4: *HAS2* gene; B: PCR products of positive clones. M: DL2000 marker; 1,2: *GAPDH* gene; 3,4: *PTGS2* gene; 5,6: *PTX3* gene; 7,8: *HAS2* gene.

图3 牛扩展相关基因PCR扩增片段及阳性克隆

Fig.3 Bovine expansion-related genes fragment was amplified by PCR and positive clones

(R^2)大于0.990可用于 $\Delta\Delta Ct$ 相对定量PCR分析。

2.5 扩展相关基因表达量变化

试验结果表明, 由图5A可见, *PTGS*的表达量

以GDF-9浓度0为参照, 表达量为1。GDF-9浓度分布为150, 300, 450, 600 ng/mL时, *PTGS*的表达量分别为2、2.95、3.48和4.36, 各GDF-9浓度间的*PTGS*

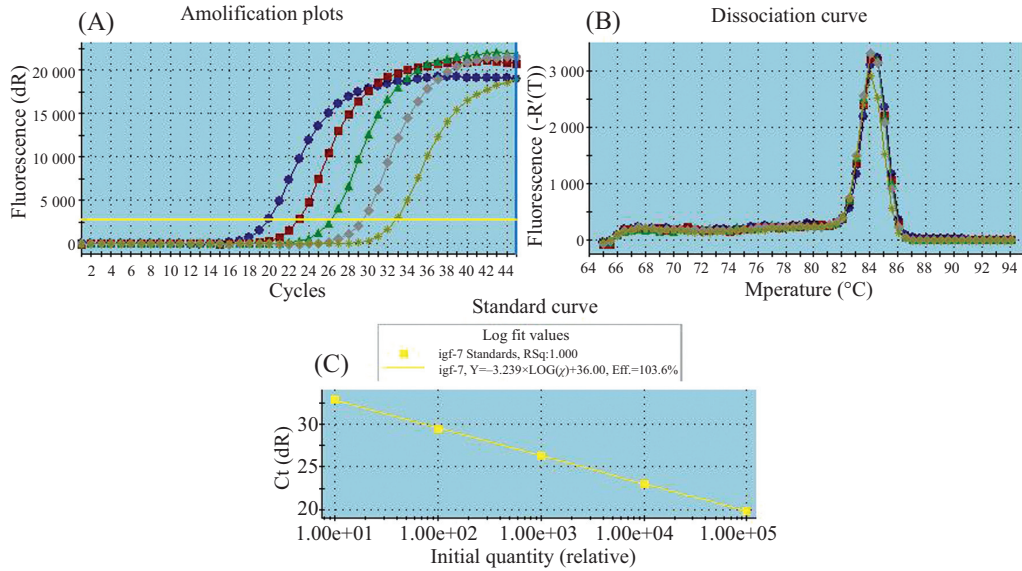
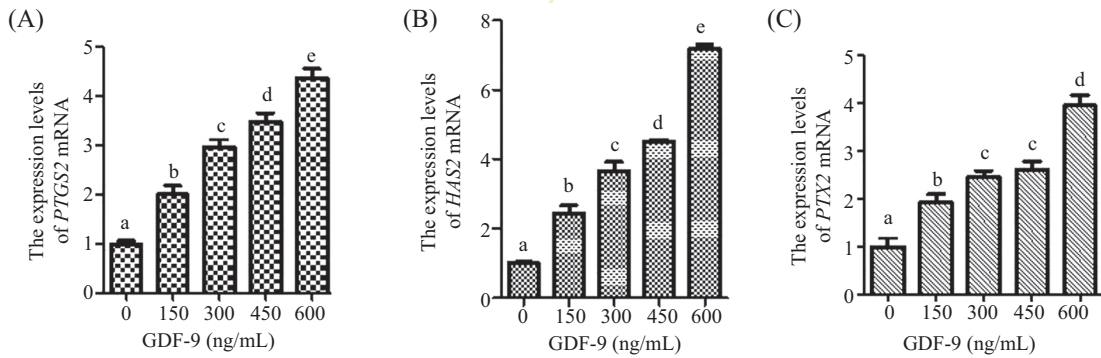


图4 *GAPDH*基因的RT-PCR扩增和溶解曲线及标准曲线

Fig.4 RT-PCR amplification, melting curve and the standard curve of *GAPDH* gene

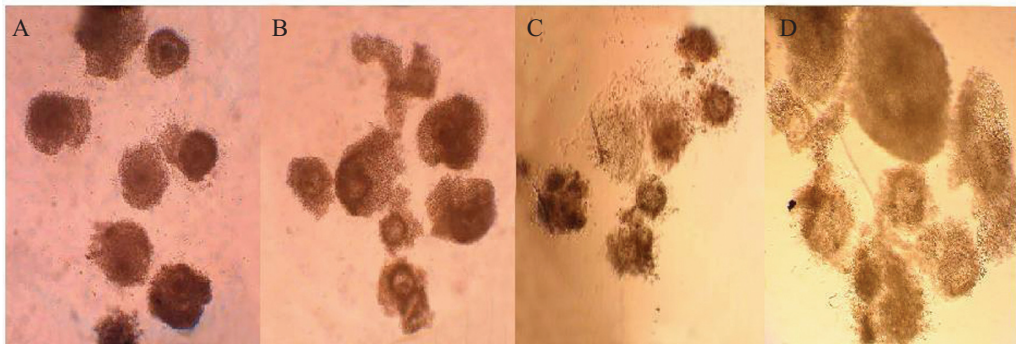


不同字母表示差异显著($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)。

The different superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), and the same superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$).

图5 GDF-9对卵丘细胞扩展相关基因表达的影响

Fig.5 Effect of GDF9 on expansion-related gene expression



A: COC; B: OOX+100 ng GDF-9; C: OOX+10 µg FSH; D: OOX+100 ng GDF-9+10 µg FSH.

图6 GDF-9和FSH对牛卵丘细胞复合体(OOX)发育的影响(40×)

Fig.6 Effect of GDF-9 combined with FSH on bovine cumulus cell complexes (40×)

的表达量均呈现出显著差异($P < 0.05$); 由图5B可见, *HAS2*的表达量以GDF-9浓度0为参照, 表达量为1。GDF-9浓度分别为150, 300, 450, 600 ng/mL时, *HAS2*的表达量分别为2.44、3.66、4.51和7.19, 各GDF-9浓度间的*HAS2*表达量均呈现出显著差异($P < 0.05$); 由图5C可见, *PTX3*的表达量以GDF-9浓度0为参照, 表达量为1, GDF-9浓度分别为150, 300, 450, 600 ng/mL时, *PTX3*的表达量分别为1.96、2.48、2.63和3.94, *PTX3*的表达量在300, 450 ng/mL GDF-9之间无显著差异($P > 0.05$), 其他各个浓度下的*PTX3*的表达量均呈现出显著差异($P < 0.05$)。

2.6 FSH和GDF-9对卵丘细胞复合体(OOX)发育的作用

如图6所示, 在外源的GDF-9作用下, 卵丘细胞复合体(OOX)的扩展情况与对照组(A)的卵母细胞卵丘细胞复合体的扩展情况相似(图6A和图6B)。在没有外源和内源的GDF-9的情况下, FSH虽然可以在一定程度上促进卵丘细胞增殖, 但卵丘细胞复合体(OOX)呈现松散的状态, 而且卵丘细胞也表现出退化的趋势(图6C), 但在外源GDF-9和FSH的共同作用下, 卵丘细胞复合体(OOX)扩展明显, 而且卵丘细胞复合体结构也比较紧凑(图6D)。

3 讨论

近来, 越来越多的研究表明, 卵母细胞是卵细胞功能的中央调节器, 从而在调节卵子发生、排卵率和繁殖力上起着至关重要的作用^[14-18]。目前, 大量的研究表明卵源性分泌因子可以用来调控卵丘细胞的功能^[19-23]。GDF-9是一种主要的卵源性分泌因子, 其主要的靶细胞是卵丘细胞。在动物体内, 卵丘细胞的增殖分泌功能与卵母细胞的生长和成熟紧密相关, 二者可形成功能上的整体。因此, 本实验以牛卵丘细胞为研究对象, 研究外源GDF-9对牛卵丘细胞增殖效应和扩展相关基因表达的影响, 为进一步深入研究GDF-9的作用机制奠定基础。

对卵丘细胞的增殖实验研究表明, GDF-9与卵丘细胞增殖效应存在浓度梯度关系, 随着GDF-9浓度的增大, 卵丘细胞增殖能力增强。有研究表明, GDF-9能使小鼠卵巢重量增加, 初级卵泡和小的腔前卵泡数分别增加30%和60%, 原始卵泡数相应减少29%, 而大腔前卵泡数量不变^[24]。GDF-9突变纯合的雌性小鼠能形成原始卵泡和初级卵泡, 但在初

级卵泡形成后卵泡发育停滞在单层颗粒细胞的初级阶段, 不再继续发育, 无卵泡膜细胞包绕^[25-27]。利用重组GDF-9蛋白的研究结果表明, 重组GDF-9可以作为卵丘细胞有丝分裂的刺激因子促进卵丘细胞增殖和DNA的合成, 并能增加培养的有腔卵泡的直径和蛋白质含量^[28]。本实验中, 对扩展相关基因表达的研究表明, 扩展相关基因的表达与GDF-9的关系也呈正相关性, 随着GDF-9浓度的增加, 扩展相关基因表达量也增加, 说明GDF-9对扩展相关基因表达量有促进的作用。在对鼠的研究中发现, 在重组GDF-9的作用下, GDF-9能促进卵丘细胞扩散相关基因的表达^[13], 并对卵丘细胞有促进增殖的作用^[29], 这与我们的结果相一致。而卵丘细胞扩展是扩展相关基因作用的结果。这说明GDF-9通过影响卵丘细胞的增殖, 进而影响了整个卵泡的发育。

在FSH的作用下, GDF-9对卵丘细胞的增殖效应更加明显, 在一定程度上说明FSH与GDF-9在对卵丘细胞增殖过程中存在协同关系; 卵丘细胞复合体(OOX)的体外培养实验表明, GDF-9不仅对卵丘细胞的扩展上起着重要的作用, 而且能够介导FSH对卵丘细胞起作用。有报道表明, 在小鼠OOX复合体(去除卵母细胞, 仅保留卵丘细胞和透明带)中添加重组GDF-9可以诱导卵丘细胞的扩散^[30]; 而从GDF-9基因缺失小鼠中获得的卵母细胞不能诱导OOX复合体中卵丘细胞的扩散^[31]。这些报道与我们的实验结果相一致。有研究表明, GDF-9通过调节FSH的活性从而影响FSH对大鼠卵丘细胞的作用^[28]。对仓鼠进行实验发现, 在GDF-9的协同下, FSH能大幅度增加原始卵泡发育的数量, 但该作用可被GDF-9的小干扰RNA(siRNA)完全抑制, 表明FSH通过GDF-9的作用调控原始卵泡形成^[32]。Orisaka等^[4]对大鼠的体外研究证实, GDF-9反义核苷酸降低了卵丘细胞中FSH受体的mRNA水平, 抑制了基础状态和FSH刺激下的窦前卵泡生长, 而该抑制作用可被外源性GDF-9拮抗, 加入GDF-9后卵泡的发育数增加, 这提示GDF-9缺陷可能导致卵丘细胞FSH受体异常, 使卵丘细胞对FSH反应降低, 影响了腔前期和早腔卵泡生存与生长, 因此, GDF-9和FSH的协同作用是卵泡获得充分发育所必需的。

本实验研究结果表明, 外源的GDF-9能促进牛卵丘细胞增殖, 并且表现出浓度梯度关系, 同时GDF-9与FSH对牛卵丘细胞增殖具有协同作用。但

是关于GDF-9具体怎样调控卵丘细胞的作用机制还需要进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Lee SJ. Identification of a novel member (GDF-1) of the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Endocrinol* 1990; 4(7): 1034-40.
- 2 Mcpherron AC, Lee SJ. GDF-3 and GDF-9: Two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J Biol Chem* 1993; 268(5): 3444-9.
- 3 Tang K, Yang WC, Li X, Wu CJ, Sang L, Yang LG, *et al.* GDF-9 and bFGF enhance the effect of FSH on the survival, activation, and growth of cattle primordial follicles. *Anim Reprod Sci* 2012; 131(3/4): 129-34.
- 4 Orisaka M, Orisaka S, Jiang JY, Craig Y, Kotsuji F, Tsang BK. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to earlyantral stage. *Mol Endocrinol* 2006; 20(10): 2456-68.
- 5 Tang KQ, Yang WC, Li SJ, Yang LG. Polymorphisms of the bovine growth differentiation factor 9 gene associated with superovulation performance in Chinese Holstein cows. *Genet Mol Res* 2013; 12(1): 390-9.
- 6 Barros CM, Satrapa RA, Castilho AC, Fontes PK, Razza EM, Ereno RL, *et al.* Effect of superstimulatory treatments on the expression of genes related to ovulatory capacity, oocyte competence and embryo development in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2012; 25(1): 17-25.
- 7 Chen L, Russell PT, Larsen WJ. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: Roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid with in the cumulus mass. *Mol Reprod Dev* 1993; 34(1): 87-93.
- 8 Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 1999; 13(6): 1035-48.
- 9 Varani S, Elvin JA, Yan C, Demayo J, Demayo FJ, Horton HF, *et al.* Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Mol Endocrinol* 2002; 16(6): 1154-67.
- 10 Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, *et al.* Multiple female reproductive failures in *Cyclooxygenase 2*-deficient mice. *Cell* 1997; 91(2): 197-208.
- 11 Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(18): 10288-93.
- 12 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1/2): 55-63.
- 13 Peng J, Li Q, Wigglesworth K, Rangarajan A, Kattamuri C, Peterson RT, *et al.* Growth differentiation factor 9: Bone morphogenetic protein15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(8): E776-85.
- 14 Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001; 122(6): 829-38.
- 15 Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 2004; 82/83: 431-46.
- 16 McNatty KP, Moore LG, Hudson NL, Lawrence SB, Reader K, Hanrahan JP, *et al.* The oocyte and its role in regulating ovulation rate: A new paradigm in reproductive biology. *Reproduction* 2004; 128(4): 379-86.
- 17 Gilchrist RB, Thompson JG. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology* 2007; 67(1): 6-15.
- 18 Thompson JG, Lane M, Gilchrist RB. Metabolism of the bovine cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 64: 179-90.
- 19 Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 2004; 25(1): 72-101.
- 20 Juengel JL, McNatty KP. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod* 2005; 11(2): 143-60.
- 21 McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, *et al.* Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. *Reproduction* 2005; 129(4): 473-80.
- 22 McNatty KP, Hudson NL, Whiting L, Reader KL, Stan L, Andrea W, *et al.* The effects of immunizing sheep with different BMP15 or GDF9 peptide sequences on ovarian follicular activity and ovulation rate. *Biol Reprod* 2007; 76(4): 552-60.
- 23 Gilchrist RB, Lant M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 2008; 14(2): 159-77.
- 24 Vitt UA, Mcgee EA, Hayashi M, Hsueh AJ. *In vivo* treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 2000; 141(10): 3814-20.
- 25 Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM, Albertini DF. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Dev Biol* 1998; 204(2): 373-84.
- 26 Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; 383(6600): 531-5.
- 27 Teixeira Filho FL, Baracat EC, Lee TH, Suh CS, Matsui M, Chang RJ, *et al.* Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(3): 1337-44.
- 28 Hsueh AJ, Mcgee EA, Hayashi M, Hsu SY. Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163(1/2): 95-100.
- 29 Spicer LJ, Aad PY, Allen D, Mazerboury S, Hsueh AJ. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. *Endocrinol* 2006; 189(2): 329-39.
- 30 Su YQ, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ. Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cell is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology* 2002; 143(6): 2221-32.
- 31 Vanderhyden BC, Macdonald EA, Nagyiva E, Dhawan A. Evaluation of members of the TGFbeta superfamily as candidates for the oocyte factor that control mouse cumulus expansion and steroidogenesis. *Reprod Suppl* 2003; 61: 55-70.
- 32 Wang C, Roy SK. Expression of growth differentiation factor 9 in the oocytes is essential for the development of primordial follicles in the hamster ovary. *Endocrinology* 2006; 147(4): 1725-34.