

TGF α 、EGF 对绵羊卵母细胞成熟的影响

周平 刘东军* 闫真 马玉珍 旭日干

(内蒙古大学哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021)

摘要 采用地衣红染色和免疫荧光的方法, 观察了培养在基础培养液加 BSA、血清、BSA+EGF 和 BSA+TGF α 四组成熟培养液中绵羊卵母细胞的核成熟状态和 α -微管蛋白分布, 以及成熟培养后皮质颗粒(CG)的分布情况。结果表明培养 22 h 的上述各组卵母细胞的核成熟率分别为 63.5%、75.2%、73.1%、69.8%, 处于第一次减数分裂末期的比率分别为 27.0%、16.3%、15.9%、16.9%, EGF、TGF α 和血清的添加明显提高了核的成熟率($P < 0.05$), 显著减少了处于第一减数分裂末期的比例($P < 0.05$); α -微管蛋白的正常率(66.6%、66.6%、73.6%)也显著高于 BSA 组(43.3%) ($P < 0.05$); CG 发生迁移较好的卵母细胞比率分别为 33.9%、58.8%、54.7%、47.9%, 与 BSA 组相比, EGF 和血清的添加明显促进了 CG 向皮质区的迁移($P < 0.05$)。实验表明 TGF α 和 EGF 均促进了绵羊卵母细胞成熟过程中从第一减数分裂末期向第二减数分裂中期的转变, 并且能够替代血清中的某些成分促进和改善体外成熟卵母细胞核成熟的质量, EGF 比 TGF α 更能促进绵羊卵母细胞胞质的成熟。

关键词 绵羊卵母细胞; α -微管蛋白; 皮质颗粒; TGF α ; EGF

表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、转化生长因子 α (transforming growth factor α , TGF α)、双调蛋白(amphiregulin)、痘苗病毒生长因子(vaccinia virus growth factor) 和 Schwannoma 衍生长因子(Schwannoma-derived growth factor)这几种生长因子都能够与 EGFR 的细胞外区域结合^[1], 激活自身酪氨酸激酶的活性, 从而引起一系列的细胞内事件。研究表明, EGF 诱导了大鼠卵丘卵母细胞复合体的成熟, 通过刺激颗粒细胞的增殖和 DNA 的合成, 抑制了颗粒细胞的分化, 并且能够增加颗粒细胞内的 pH 值, 明显引起了早期的核酸转录信号, 从而促进了蛋白质合成, 改善了细胞内的代谢和细胞骨架的组装^[2-4]。已有的研究发现 EGF 明显促进了卵母细胞胞质的成熟, 从而提高了胚胎的进一步发育能力^[5-9]。核和胞质成熟的卵母细胞才能够支持正常的受精和胚胎的进一步发育^[10,11]。成熟卵母细胞中染色体分布和纺锤体的形态对受精后合子的发育有着重要的影响, 无序的纺锤体组装可引起卵母细胞中染色体分布的异常, 从而阻止了第一极体和第二极体的排出, 可能还会导致合子中非整倍体的发生^[12]。已有的研究表明卵母细胞成熟过程中, 皮质颗粒(cortical granule, CG)的迁移和重新分布是对卵母细胞胞质成熟评价的重要依据^[12,13]。在成熟卵母细胞中 CG 是皮

质区特有的膜接合细胞器, 哺乳动物的 CG 中包含着复杂的蛋白质成分, 诸如蛋白酶、肝素结合胎盘蛋白、组织型纤维溶酶原激活因子, 在受精过程中就释放出来^[14]。在小鼠卵母细胞的成熟过程中, 随着生发泡的破裂, 皮质颗粒发生了明显的变化, 在第一减数分裂中期纺锤体附近形成无皮质颗粒区域, 第二减数分裂中期, 在纺锤体附近会形成更大的无皮质颗粒区域^[15,16]。本实验中观察到绵羊卵母细胞在体外成熟过程中皮质颗粒也经历了类似的变化。

因此本实验将核成熟状态、 α -微管蛋白以及 CG 在成熟培养后卵母细胞中的分布情况联合起来研究 TGF α 、EGF 对绵羊卵母细胞成熟的影响。本研究采用成分相对明确的基础成熟培养液 TCM199, 加入 BSA 替代血清成分, 在此基础上分别加入不同浓度的 TGF α 和 EGF, 检测其对绵羊卵母细胞核与胞质成熟的影响, 同时以血清组为对照, 采用免疫荧光分析的方法系统地观察了不同成熟时间 α -微管蛋白在染色体周围的分布, 同时检测成熟培养后 CG 在卵母细胞中的分布情况。

收稿日期: 2007-04-26 接受日期: 2007-05-17

国家自然科学基金资助项目(No.30260076)

* 通讯作者。Tel: 0471-4995071, E-mail: nmliudongjun@sina.com

1 材料与方法

1.1 卵母细胞的成熟培养

屠宰场收集废弃的绵羊卵巢置于采卵液(PBS+2 mg/ml BSA+5 IU/ml 肝素)中, 采用切割法收集卵母细胞, 挑选卵丘完整的卵丘卵母细胞复合体, 形态基本一致的卵母细胞随机放入以下 4 种成熟培养液中, TCM199+10 mmol/L Hepes+0.12 IU/ml LH+0.001 μ g/ml E2+0.02 IU/ml FSH 为基础培养液[TCM199 为 GiBco 公司产品(earle's 盐); E2、FSH、LH 为 Sigma 公司产品], 基础培养液 +OES(发情绵羊血清, 自制)、基础培养液 +6 mg/ml BSA、基础培养液 +6 mg/ml BSA+40 ng/ml EGF、基础培养液 +6 mg/ml BSA+8 ng/ml TGF α , 20 个/80 μ l, 置于 38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中进行成熟培养。实验中其他无机盐成分均采用日本和光纯药株式会社产品。

1.2 α -微管蛋白的免疫荧光标记

将基础培养液 + 血清、基础培养液 +BSA 及其分别添加 8 ng/ml TGF α 和 40 ng/ml EGF 的四组绵羊卵母细胞分别在培养 4、8、12、18 和 22 h 后收集, 经 0.5% 透明质酸酶消化彻底去除颗粒细胞, 用 pH 值 2.5 的 PBS 去除透明带, 放入 4% 多聚甲醛中室温固定 20 min。将固定后的卵母细胞置于 0.25% Triton-X100 (Sigma) 中渗透 30 min 后, 置于封闭液 (PBS+2% BSA+10% 山羊血清 + 2% 脱脂奶粉 +0.15 mol/L 甘氨酸) 中 37 $^{\circ}$ C 1 h, 然后加入 1:50 稀释的 FITC 标记的鼠抗人 α -微管蛋白抗体(Abcam), 37 $^{\circ}$ C 条件下 1 h, 温育结束, 经充分洗涤后加入 5 μ g/ml PI (Sigma), 置于暗盒中进行核标记 10 min, 最后在激光共聚焦显微镜下观察。

1.3 核成熟率的观察

将分别培养在添加血清和 BSA 及其分别添加 8 ng/ml TGF α 和 40 ng/ml EGF 四组的绵羊卵母细胞成熟培养 22 h 后, 去除颗粒细胞压片, 经固定液(无水乙醇:冰醋酸, 3:1)固定 24 h 后, 0.5% 地衣红染色, 脱色液脱色, 封片, 然后置于光学显微镜下观察并照相。

1.4 皮质颗粒的染色

如前所述固定成熟培养 22 h 后的卵母细胞, 0.2% Triton-X100(Sigma) 中渗透 10 min 后, 置于封闭液 (PBS+2% BSA +0.15 mol/L 甘氨酸) 中 37 $^{\circ}$ C 30 min, 经洗涤后转入含 100 μ g/ml 荧光素标记的扁豆凝集素(FITC-LCA, Sigma) 的 PBS 中, 37 $^{\circ}$ C 30 min, 经充分洗涤后加入 5 μ g/ml PI, 置于暗盒中进行核标记 10 min, 最后在激光共聚焦显微镜下观察

1.5 数据分析

用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析。CG 分布情况的统计采用 χ^2 检验, 其余数据采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 卵母细胞核成熟观察结果

核成熟的标准见图 1, 图 1A、图 1B 为成熟卵母细胞, 而图 1C 处于第一减数分裂后期和图 1D 染色体数明显较多处于第一减数分裂中期以及处于生发泡期的卵母细胞均统计为未成熟一类。从表 1 可以看出添加 TGF α 、EGF 和血清组与 BSA 组在核成熟率方面有明显差异($P<0.05$)。BSA 组处于第一次减数分裂末期的卵母细胞明显多于其余各组($P<0.05$)。上述结果表明 TGF α 和 EGF 均促进了绵羊卵母细胞从第一减数末期向第二减数分裂中期的转变, 并且可替代血清促进核的成熟。

2.2 卵母细胞不同成熟时间段 α -微管蛋白的分布

在添加 TGF α 、EGF 和 BSA 以及血清四组间, 分时段收集成熟培养的卵母细胞, 采用免疫荧光方法观察 α -微管蛋白的分布, 结果见图 2, α -微管蛋白在染色体周围的分布随着培养时间的延长是逐渐增多的, 培养在 M199+血清、M199+BSA+TGF α 和 M199+BSA+EGF 中 α -微管蛋白聚集到染色体周围的时间和纺锤体的形成明显早于 BSA 组。BSA 组在 18 h, 所培养的卵母细胞染色体 50%(21/40) 左右还处于第一次减数分裂中期, 部分细胞进入了后期和第二减数分裂中期即 MII 期, 而其余各组 70%(25/30、27/35、30/45) 以上的卵母细胞已进入后期或明显呈

表 1 EGF、TGF α 对卵母细胞的核成熟的影响

组别	卵子总数	中期	末期	成熟率(%)	末期比率(%)
M199+OES	141	106	23	75.2 \pm 1.6 ^a	16.3 \pm 3.6 ^a
M199+BSA	115	73	31	63.5 \pm 0.7 ^b	27.0 \pm 1.5 ^b
M199+BSA+EGF	119	87	19	73.1 \pm 1.8 ^a	15.9 \pm 3.1 ^a
M199+BSA +TGF α	106	74	18	69.8 \pm 2.1 ^a	16.9 \pm 3.9 ^a

试验重复了 3 次, 同一列中不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

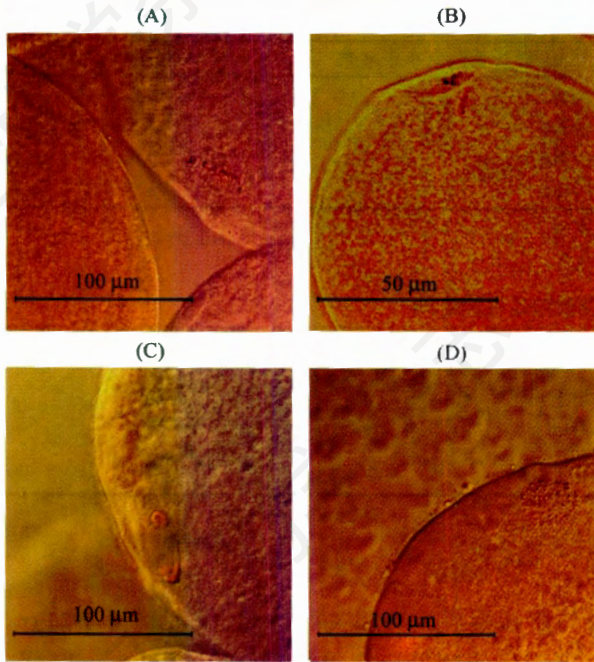


图 1 22 h 核染色体状态

A: 第二次减数分裂中期相的染色体; B: 极体与中期相染色体; C: 第一减数分裂末期; D: 第一减数分裂中期的染色体。

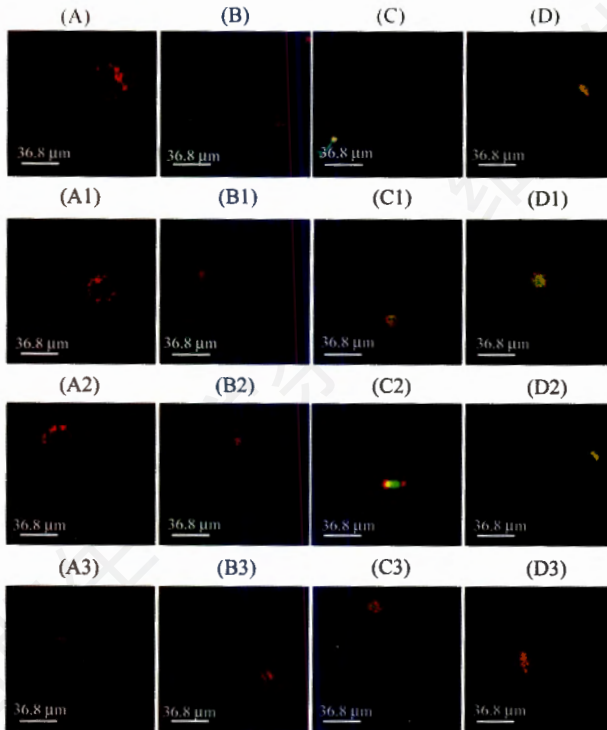


图 2 经过不同培养时间后 α -微管蛋白在染色体周围的分布 红色代表染色体区域, 绿色代表 α -微管蛋白的分布。A~A3: 分别培养在 TCM199+FCS、TCM199+BSA、TCM199+EGF、TCM199+TGF α 中, 培养 4 h 收集的卵母细胞, 均处于生发泡期。B~B3: 培养 8 h, 染色体发生凝聚。C~C3: 培养 12 h, C、C2: 第一减数分裂末期, C1、C3: 第一减数分裂中期, α -微管蛋白蛋白向染色体上聚集; D~D3: 培养 18 h, D、D2、D3 均达到第二减数分裂中期。

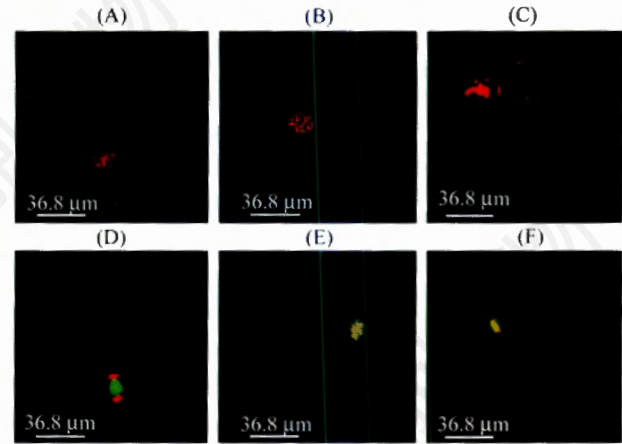


图 3 培养 22 h α -微管蛋白在染色体周围的分布情况

红色代表染色体区域, 绿色代表 α -微管蛋白的分布。A: 染色体周围几乎没有分布; B: α -微管蛋白有少量的分布; C: 染色体周围没有 α -微管蛋白的分布, 并且有部分染色体分散分布于胞质中; D: α -微管蛋白在纺锤体上的分布; E: 形成中的 MII 期染色体; F: α -微管蛋白在第二减数分裂中期染色体上的分布。

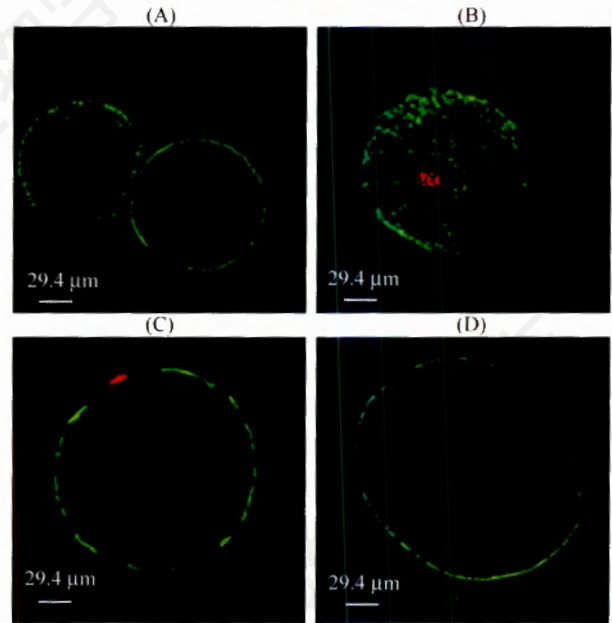


图 4 成熟 22 h 后, 绵羊卵母细胞中 CG 的分布

A: 在胞质和核周围都有 CG 的存在; B: 在核周围消失, 但在胞质中还大量存在 CG; C: CG 在皮质区的分布; D: 核附近形成无 CG 区域。

现出 MII 期纺锤体形态。

2.3 α -微管蛋白 22 h 在卵母细胞核中的分布

参照 Miyara 等^[12]对 α -微管蛋白的分类, 实验结果见图 3, 图 3A、图 3B、图 3C 为 α -微管蛋白分布异常, 图 3D、图 3E、图 3F 为 α -微管蛋白分布正常。统计结果见表 2, BSA 组 α -微管蛋白分布正常比例明显低于分别添加血清、EGF 和 TGF α 组, 说

表2 EGF、TGF α 对卵母细胞中 α -微管蛋白分布影响

组别	卵子总数	α -微管蛋白分布正常数	正常率(%)
M199+OES	63	42	66.6 \pm 6.4 ^a
M199+BSA	60	26	43.3 \pm 8.8 ^b
M199+BSA +EGF	72	48	66.6 \pm 6.8 ^a
M199+BSA +TGF α	76	56	73.6 \pm 5.5 ^a

实验进行了2次重复,同一列中不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

表3 EGF、TGF α 对皮质颗粒迁移的影响

组别	卵子总数	皮质颗粒迁移至皮质区	皮质颗粒迁移至皮质区比率(%)
M199+OES	85	50	58.8 ^a
M199+BSA	62	21	33.9 ^b
M199+BSA +EGF	75	41	54.7 ^a
M199+BSA +TGF α	73	35	47.9 ^{ab}

实验进行了2次重复,同一列中不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

明EGF和TGF α 均可以促进 α -微管蛋白的正常表达和改善在绵羊卵母细胞中的分布,并且可以替代血清中的某些成分改善卵母细胞体外培养的质量。

2.4 不同成熟培养条件对CG迁移的影响

如图4所示,A、B以及没有观察到皮质颗粒存在的均统计为皮质颗粒迁移不完全的一类,而C、D中CG均已完全迁移到皮质区,并且在核附近形成明显的无皮质颗粒区域,这种形态的卵母细胞被列为CG迁移较好的一类。各组统计结果见表3。添加TGF α 、EGF和BSA以及加血清组中,CG已完全迁移到皮质区和在核附近形成无皮质颗粒的区域的比例分别为47.9%、54.7%、33.9%、58.8%,血清组和添加EGF组CG迁移较好的比例明显高于仅添加BSA处理组($P<0.05$),而与添加TGF α 组间无明显差异($P>0.05$),添加TGF α 组与BSA组在统计学上无明显差异($P>0.05$),加入TGF α 后,CG迁移至皮质区的比例也有一定提高,而添加血清和EGF均明显促进了绵羊卵母细胞质中CG向皮质区的迁移。

3 讨论

体外受精(*in vitro fertilization*, IVF)胚胎的发育能力很大程度上与卵母细胞MII期的质量相关,一般认为卵母细胞的质量主要与以下两个因素相关:核和胞质的发育潜能,核发育潜能主要与卵母细胞的染色体和纺锤体组装形态相关^[17,18]。胞质的成熟过程意味着卵母细胞从没有发育潜能的状态转变成能够支持完成受精和早期胚胎的发育的过程,而胞质成熟仍没有很好的量化指标,主要变化之一认为是与CG的迁移和重新分布有关^[12,15,19]。本实验主要检测了部

分与核和胞质成熟相关的指标,从而评价TGF α 与EGF对绵羊卵母细胞成熟的影响。Sakaguchi等^[20]发现血清中的某些成分能够抵消生长因子对牛卵母细胞成熟的加速作用。因此本实验在M199+BSA中加入TGF α 和EGF,BSA中主要的成份是牛血清白蛋白V组分,这样可以减少血清中复杂成分对加入因子的影响。从核染色体状态与 α -微管蛋白在染色体周围的聚集及其分布可以看出,在22h各组间在核染色体的形态上存在着不同,BSA组处于末期的比率明显高于其他各组,同时与分时段观察 α -微管蛋白的分布相比较,这种结果可能与 α -微管蛋白在染色体周围聚集的速度和微管的形成相关,从而影响了染色体的分布状态和分离时间。已有的研究表明EGF可以通过PKC途径促进卵母细胞的成熟,从而增加了卵母细胞受精后的发育能力^[20]。 α -微管蛋白与纺锤体的形成相关,无序的纺锤体可造成染色体分散,从而可能造成胚胎发育过程中染色体异常的发生。培养液中加入EGF和TGF α 后,从核成熟和22h α -微管蛋白的分布观察,两种因子均对 α -微管蛋白的表达和在染色体周围的聚集有明显的促进作用,因此EGF和TGF α 能促进染色体和 α -微管蛋白分布的正常,从而改善了卵母细胞核成熟的质量。

研究认为胞质成熟的明显特征是CG的正常迁移,而质量好的中期核相与CG的定位密切相关,纺锤体和中期核相异常的卵母细胞中没有观察到CG的迁移,而CG在所有正常的MII期卵母细胞中均发生了迁移,同时微管的组织状态也与CG的迁移相关^[21,22],本实验中也观察到了类似的结果。过去的大部分研究均采用LCA特异与CG结合的方法来显示其

分布, 本实验中也采用了 LCA 来标记 CG 的分布情况。不同卵泡直径来源的卵母细胞, CG 的分布存在着一定的差异^[23], 可能会对结果产生一定的影响。实验中将 MII 期卵母细胞中染色体形态、 α -微管蛋白以及 CG 的分布联合起来, 目的是更加客观地检测 TGF α 、EGF 对绵羊卵母细胞成熟的影响。加入 EGF 和 TGF α 的培养液, 促进了卵母细胞中 α -微管蛋白和 CG 的正常分布, 说明这两种生长因子对绵羊卵母细胞胞质的成熟均有促进作用。统计结果表明, 在促进 CG 迁移方面 EGF 的作用强于 TGF α , 间接反映了 EGF 更加有利于绵羊卵母细胞胞质的成熟。这些研究结果预示着 EGF 和 TGF α 改善了卵母细胞的成熟质量, 能够提高卵母细胞受精后进一步的发育潜能。然而 TGF α 和 EGF 对卵母细胞起作用的确切机制还不是完全清楚, 它们通过相同的受体均促进了核的成熟转变和 α -微管蛋白的正常分布以及 CG 的迁移, 与血清中某些成分相似, 改善了卵母细胞成熟的质量, 但这些还需进一步通过体外受精实验以及进一步的研究来阐明它们在卵母细胞成熟过程中的具体

作用。

参考文献(References)

- [1] Kimura H *et al. Nature*, 1990, **348**: 257
- [2] May JV *et al. Endocrinology*, 1988, **123**: 168
- [3] Li M *et al. Endocrinology*, 1991, **129**: 656
- [4] Dekel N *et al. Endocrinology*, 1985, **116**: 406
- [5] Aberdeera LR *et al. Theriogenology*, 2000, **54**: 787
- [6] Guler A *et al. Theriogenology*, 2000, **54**: 209
- [7] Im KS *et al. Theriogenology*, 1995, **44**: 209
- [8] Grazul-Bilska AT *et al. Theriogenology*, 2003, **59**: 1449
- [9] Merriman JA *et al. Hum Reprod*, 1998, **13**: 690
- [10] Mermillod P *et al. J Reprod Fertil Suppl*, 1999, **54**: 449
- [11] Trounson A *et al. Reproduction*, 2001, **121**: 51
- [12] Miyara F *et al. Hum Reprod*, 2003, **18**: 1494
- [13] Damiani P *et al. Mol Reprod Dev*, 1996, **45**: 521
- [14] Liu M *et al. Reprod Biol Endocrinol*, 2003, **1**: 77
- [15] Ducibella T *et al. Biol Reprod*, 1993, **48**: 1251
- [16] Liu XY *et al. Hum Reprod*, 2005, **20**: 3402
- [17] Albertini DF *et al. Mutat Res*, 1992, **296**: 57
- [18] Mattson BA *et al. Mol Reprod Dev*, 1990, **25**: 374
- [19] Yoshida M *et al. Mol Reprod Dev*, 1993, **36**: 462
- [20] Sakaguchi M *et al. Theriogenology*, 2000, **54**: 1327
- [21] Kim NH *et al. J Reprod Fertil*, 1996, **107**: 79
- [22] Abbott AL *et al. Biol Reprod*, 2001, **65**: 1640
- [23] 李荣凤等. 畜牧兽医学报, 2000, **31**: 203

The Effects of TGF α and EGF on Ovine Oocytes Maturation

Ping Zhou, Dong-Jun Liu*, Zhen Yan, Yu-Zhen Ma, Shorgan Bou

(The Key Laboratory of Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Inner Mongolia university, Hohhot 010021, China)

Abstract The effects of TGF α and EGF on nuclear and cytoplasm maturation of ovine oocytes cultured in basal medium + BSA, serum, BSA+EGF and BSA+TGF α respectively were investigated by immunofluorescence and orcein staining. The results showed that the maturation rate of oocyte cultured in the four medium as above after 22 hours were 63.5%, 75.2%, 73.1%, 69.8% and the rates of oocytes stayed at telophase of meiosis I were 27.0%, 16.3%, 15.9%, 16.9%, respectively. Supplement of serum, EGF or TGF α significantly enhanced the maturation rates of the oocytes and reduced the rate of oocyte stayed at telophase of meiosis I ($P<0.05$); Significant higher rates of normal distribution of α -tubulin in oocytes cultured in serum, BSA+EGF and BSA+TGF α (66.6%, 66.6%, 73.6%) were compared to BSA group (43.3%) ($P<0.05$); The rates of oocyte with cortical granules in cortex were 33.9%, 58.8%, 54.7%, 47.9%, respectively, there was significant difference between oocytes cultured with serum, EGF and BSA ($P<0.05$). In conclusion, TGF α and EGF can promote the oocyte nuclear transition from telophase I to metaphase of meiosis II, and could substitute some substance in serum to improve the quality of oocyte matured *in vitro*, but EGF might be more functional than TGF α to promote the maturation of ovine ooplasm.

Key words ovine oocyte; α -tubulin; cortical granules; TGF α ; EGF

Received: April 26, 2007 Accepted: May 17, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30260076)

*Corresponding author. Tel: 86-471-4995071, E-mail: nmliudongjun@sina.com