

李运生, 童彬彬, 刘晓蕊, 等. 生长素对猪孤雌激活胚胎体外发育的影响及其受体基因的表达模式[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 811-816.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.04.016

生长素对猪孤雌激活胚胎体外发育的影响及其受体基因的表达模式

李运生^{1,2}, 童彬彬¹, 刘晓蕊¹, 凌英会^{1,2}, 方富贵^{1,2}, 张运海^{1,2}, 刘亚^{1,2}

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036; 2. 安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室, 安徽 合肥 230036)

摘要: 为探明生长素及其受体 GHSR-1a 在胚胎早期发育中的作用, 以猪孤雌激活胚胎为研究对象, 在其体外发育过程中添加不同浓度生长素, 观察胚胎发育速度和发育效率, 并用荧光定量 PCR 检测猪孤雌激活胚胎早期发育过程中生长素特异性受体基因 *GHSR-1a* 的表达。结果显示, 相对于对照组, 添加 10.0 mg/L 生长素可以显著提高 4-细胞胚胎、8-细胞胚胎、桑葚胚的发育率 ($P < 0.05$), 并能加快 4-细胞胚胎、8-细胞胚胎、桑葚胚的发育速度 ($P < 0.05$)。 *GHSR-1a* mRNA 在 2-细胞期到桑葚胚期保持较高表达水平, 囊胚期后显著下降 ($P < 0.05$); 免疫荧光染色表明 GHSR-1a 在猪孤雌激活胚胎各发育时期均有表达, 4-细胞期、8-细胞期和桑葚胚期的表达量显著高于囊胚期 ($P < 0.05$)。推测生长素通过提高 *GHSR-1a* 的表达来提高猪孤雌激活胚胎的发育速度和效率。

关键词: 生长素; GHSR-1a; 猪孤雌激活胚

中图分类号: S828 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)04-0811-06

In vitro development of porcine parthenogenetic embryos in response to ghrelin application and the expression of receptor gene *GHSR-1a*

LI Yun-sheng^{1,2}, TONG Bin-bin¹, LIU Xiao-rui¹, LING Ying-hui^{1,2}, FANG Fu-gui^{1,2}, ZHANG Yun-hai^{1,2}, LIU Ya^{1,2}

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Heifei 230036, China; 2. Anhui Provincial Laboratory for Local Livestock and Poultry Genetic Resource Conservation and Bio-breeding, Heifei 230036, China)

Abstract: The present study was designed to investigate the roles of exogenous ghrelin and its receptor GHSR-1a during early *in vitro* development of porcine parthenogenetic embryos. The developmental rates of 4-cell embryos, 8-cell embryos, and morula of porcine parthenogenetic embryos cultured in PZM3 supplemented with 10.0 mg/L ghrelin

were significantly higher than control group (ghrelin free) ($P < 0.05$), and the development of 4-cell embryos, 8-cell embryos, and morula were speeded up as well. The mRNA expression of *GHSR-1a* was identified at each stage of porcine parthenogenetic embryos (2-cell, 4-cell, 8-cell, morula and blastocyst). Indirect immuno-fluorescence revealed that the protein GHSR-1a levels were higher at 4-cell stage, 8-cell stage

收稿日期: 2015-01-31

基金项目: 高等学校博士科点专项科研基金博导类资助项目 (20123418110004); 安徽省生猪产业技术体系项目 (AH-CYTX-06-03); 安徽农业大学学科骨干培育项目 (2014XKPY-23)

作者简介: 李运生 (1980-), 男, 安徽凤台人, 博士研究生, 主要从事动物胚胎工程研究。 (E-mail) lys4224@163.com

通讯作者: 刘亚, (E-mail) liuya@ahau.edu.cn

and morula stage. It was suggested ghrelin improved the developmental rate and speed by increasing the receptor gene *GHSR-1a* expression.

Key words: ghrelin; *GHSR-1a*; porcine parthenogenetic embryo

生长素 (Ghrelin) 是一种生长激素促分泌素受体的天然配基,广泛表达于动物胃、消化道、肺、心脏、乳腺等多个器官^[1],调控食物摄取和促进生长激素分泌^[2]。生长素在生殖器官如子宫内膜、胎盘、睾丸、卵巢和胚胎中均有表达^[3-4],暗示其在生殖轴中起调控作用^[5]。胚胎发育是生殖发生的重要过程,也是生殖研究的重点内容。关于生长素对哺乳动物附植前胚胎发育的作用研究较少,且结果也不一致。在小鼠^[6-7]和牛^[8]胚胎发育过程中添加生长素可抑制囊胚的发育效率。但在水牛^[9]、绵羊^[10]和猪^[11]上,却发现生长素可以促进胚胎的体外发育能力。鉴于生长素在不同物种间的差异表现,有必要对其在胚胎发育过程中的作用机制进行探讨。

生长素主要通过与其特异性受体 *GHSR-1a* 结合发挥生物学效应。Kawamura^[5]发现附植前胚胎发育过程中生长素受体基因 *GHSR-1a* mRNA 仅在小鼠致密化、囊胚及孵化胚阶段转录。而 Du 等^[12]认为绵羊早期胚胎各发育时期均有 *GHSR-1a* 表达。目前在猪的胚胎上,*GHSR-1a* 的存在情况及其表达模式未有研究,生长素在物种间的差异作用是否与其受体的表达模式相关亦未有报道。

本试验拟在猪孤雌胚培养基中添加不同浓度的生长素,研究其在猪孤雌胚早期发育中的作用及对发育速度的影响,并检测猪孤雌激活胚胎不同发育时期 *GHSR-1a* 的转录及其表达水平,以期探明生长素及其受体 *GHSR-1a* 对哺乳动物附植前胚胎发育的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

猪卵巢采自安徽合肥肥东福润屠宰场,置入 38 ℃ 含青霉素及链霉素的生理盐水保温瓶中保存。

1.2 猪卵母细胞的获得及体外成熟

参照 Li^[13]的方法,生理盐水清洗卵巢后用 18 号针头抽取 2~6 mm 卵泡,体式显微镜下挑选卵丘包裹完整,2 层以上颗粒细胞层的卵丘卵母细胞复

合体 (Cumulus-oocyte complex, COCs),按照每 50 枚左右一孔的密度将 COCs 移入放有 400 μ l 成熟培养液的四孔板,38.5 ℃、5% CO₂、100% 湿度的环境中体外成熟 42~44 h。

1.3 猪孤雌胚的获得

用 0.1% 透明质酸酶脱除卵丘细胞,显微镜下选择透明带完整、卵周隙清晰、已排出第一极体的卵母细胞,并在预热的 f2 中洗涤 3 遍^[13]。放入融合槽中用 1.56 kV/cm、80 μ s、1 次直流电脉冲进行电激活。移出后用胚胎培养液 (Porcine zygote medium 3, PZM3)^[14]将卵母细胞洗涤 3 遍,转移到覆盖石蜡油的化学辅助激活液 (PCC, PZM3 + 10 μ g/ml 松胞素 B + 10 μ g/ml 环己酰亚胺)中作用 4 h,最后移入 PZM3 胚胎培养液中培养。培养条件为 38.5 ℃、5% CO₂、饱和湿度。

1.4 间接免疫荧光染色

参考周娜汝^[15]的方法,一抗孵育时在 DPBS + 1% BSA 中加入 *GHSR-1a* 抗体 (Abcam 公司生产, ab95250) (1:200 稀释),对照组用 PBS 代替。胚胎转移到玻片中压片并封片,置于激光共聚焦显微镜 (Olympus, FV1000) 下扫描拍摄。每组采用相同的曝光值采集图像并用 Image J 软件分析计算荧光强度。

1.5 胚胎细胞总 RNA 的提取及反转录

胚胎 RNA 提取选用 Qiagen 公司试剂盒 RNeasy Micro Kit, No. 74004,总 RNA 反转录采用 Qiagen 公司试剂盒 QuantiTect Reverse Transcription Kit, No. 205311。

1.6 引物设计与合成及荧光定量 PCR

GenBank 中查找 *GHSR* 序列 (NM_032075.3),设计引物为正向: 5'-AACGACTCGCTAGTG-GAGGA-3', 反向: 5'-GAAGCGTGACACTACCAG-CA-3'。引物均由生工生物工程有限公司合成。以 *GAPDH* 为内参基因,用实时荧光定量 PCR 检测 *GHSR-1a* 的相对表达量。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak) 法分析 *GHSR-1a* 的表达水平。

1.7 不同浓度生长素对猪孤雌胚早期发育的影响

在猪的孤雌激活体外培养液中添加不同浓度生

长素 [0 mg/L (对照)、0.1 mg/L、1.0 mg/L、10.0 mg/L、100.0 mg/L], 分别于培养 30 ~ 32 h、44 ~ 48 h、80 ~ 82 h、104 ~ 108 h、146 ~ 148 h 时统计其 2-细胞胚胎数、4-细胞胚胎数、8-细胞胚胎数、致密桑葚胚数及囊胚发育数, 计算其卵裂率、囊胚率、桑葚胚率。试验重复 5 次。另外, 在猪的孤雌激活体外培养液中添加不同浓度生长素 [0 mg/L (对照)、0.1 mg/L、1.0 mg/L、10.0 mg/L、100.0 mg/L], 分别于培养 24 h、40 h、72 h、102 h、132 h 时统计其 2-细胞胚胎数、4-细胞胚胎数、8-细胞胚胎数、桑葚胚数及囊胚发育数, 计算其卵裂率、囊胚率, 比较不同组间发育速度。试验重复 5 次。

1.8 猪附植前胚胎中 *GHSR-1a* mRNA 和 *GHSR-1a* 蛋白检测

分别在 2-细胞期、4-细胞期、8-细胞期、桑葚胚期、囊胚期收集胚胎^[15], 采用荧光定量 PCR 技术检测猪孤雌激活胚 *GHSR-1a* mRNA 在上述各阶段的表达水平, 试验重复 3 次。收集 2-细胞期、4-细胞期、8-细胞期、桑葚胚期与囊胚期的猪孤雌发育胚胎 (每组 20 枚), 采用间接荧光免疫法检测不同发育阶段胚胎中 *GHSR-1a* 蛋白水平。

1.9 统计分析

应用 SPSS 11.5 软件系统进行数据处理与统计

分析。

2 结果与分析

2.1 生长素浓度对猪孤雌胚胎早期发育的影响

如表 1 所示, 添加 10.0 mg/L 生长素组的猪孤雌胚胎 4-细胞发育率、8-细胞发育率和桑葚胚率均显著高于对照组和 0.1 mg/L 组 ($P < 0.05$); 添加 100.0 mg/L 生长素组的猪孤雌胚胎 4-细胞发育率、8-细胞发育率均显著高于添加 0.1 mg/L 组 ($P < 0.05$)。添加 0.1 mg/L 和 1.0 mg/L 生长素组在各时期胚胎发育效率均与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。

如图 1 所示, 胚胎发育 24 h 后, 添加生长素的试验组猪孤雌胚 2-细胞胚胎的发育速率与对照组无显著差异 ($P > 0.05$); 胚胎发育 40 h、72 h、102 h 时, 添加 10.0 mg/L 生长素组猪孤雌胚的 4-细胞胚胎、8-细胞胚胎及桑葚胚发育速率明显快于对照组 ($P < 0.05$), 其他组与对照组无显著差异 ($P > 0.05$); 胚胎发育 132 h 后, 添加生长素的试验组猪孤雌胚囊胚的发育速率与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 1 不同浓度生长素对猪孤雌胚胎早期发育能力的影响

Table 1 Effects of different concentrations of ghrelin on the *in vitro* developmental competence of porcine parthenogenetic embryos

生长素浓度 (mg/L)	培养 胚胎数	卵裂数 (卵裂率)	4-细胞胚胎数 (卵裂率)	8-细胞胚胎数 (卵裂率)	致密桑葚胚数 (桑葚胚率)	囊胚数 (囊胚率)
0	108	93 (86.26% ± 3.14% a)	80 (86.13% ± 4.08% ad)	78 (82.65% ± 3.85% ad)	72 (75.45% ± 5.13% ab)	63 (67.04% ± 3.40%)
0.1	108	95 (88.27% ± 2.34% a)	78 (79.81% ± 5.70% a)	74 (77.53% ± 1.48% a)	69 (71.99% ± 4.13% a)	63 (66.18% ± 1.86%)
1.0	108	95 (89.97% ± 2.08% a)	80 (81.35% ± 2.91% ad)	78 (80.86% ± 4.44% a)	75 (74.49% ± 7.74% ab)	59 (62.13% ± 3.20%)
10.0	108	97 (89.75% ± 2.37% a)	94 (97.64% ± 3.21% c)	94 (96.83% ± 2.88% c)	93 (92.92% ± 9.05% b)	72 (75.45% ± 4.32%)
100.0	108	97 (91.28% ± 2.91% a)	90 (91.17% ± 1.10% cd)	91 (91.98% ± 4.70% cd)	81 (80.86% ± 5.65% ab)	66 (69.96% ± 3.74%)

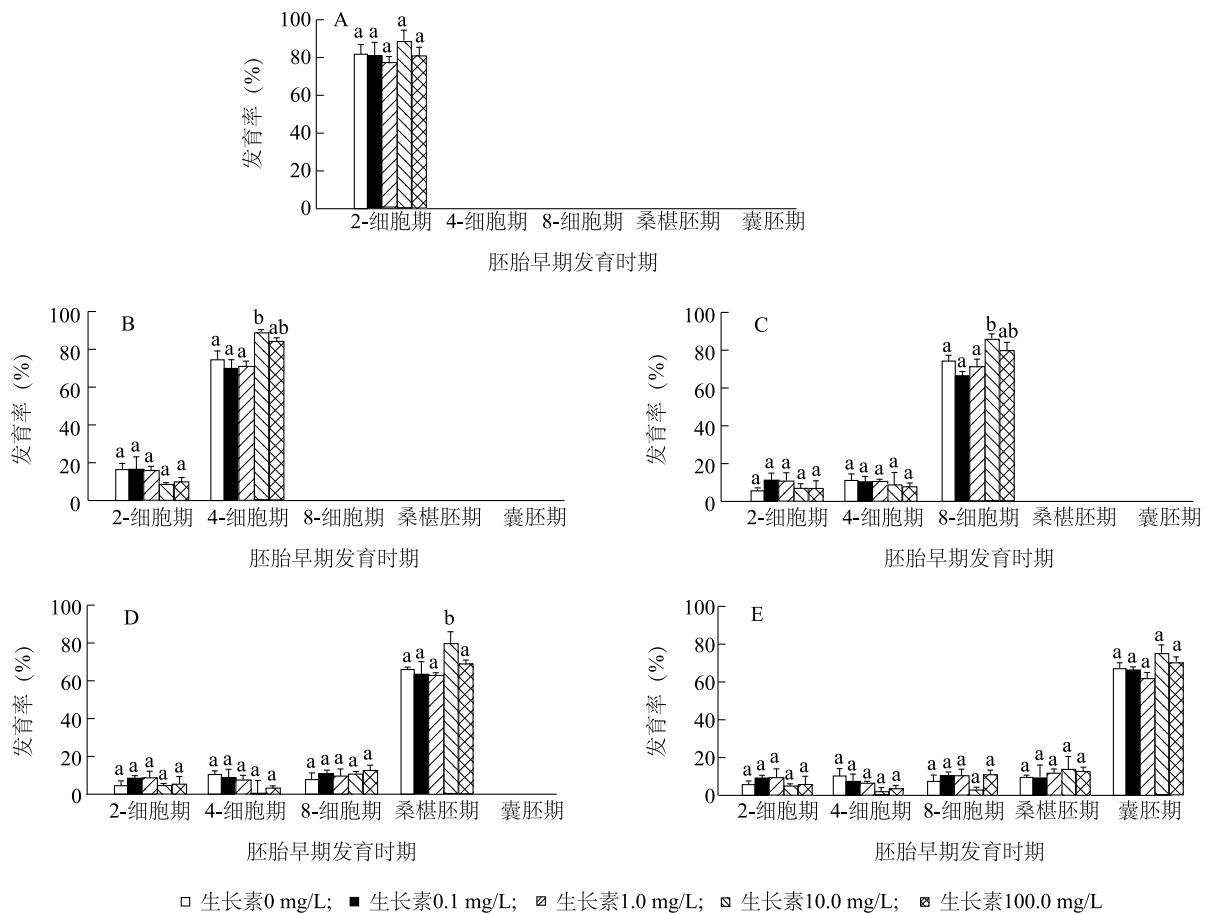
① 卵裂率 = 卵裂数 / 培养胚胎数; ② 囊胚率 = 囊胚数 / 卵裂数。同一竖栏内不同字母表示差异达显著水平 ($P < 0.05$)。

2.2 猪孤雌胚各发育时期 *GHSR-1a* 的表达

荧光定量 PCR 结果 (图 2) 显示, *GHSR-1a* mRNA 在猪孤雌胚早期发育的各个阶段均有表达, 其中在 2-细胞期、4-细胞期、8-细胞期及桑葚胚期表达量无显著差异, 囊胚期表达量显著下降 ($P < 0.05$)。

2.3 在猪孤雌胚早期发育过程中 *GHSR1a* 蛋白的表达量

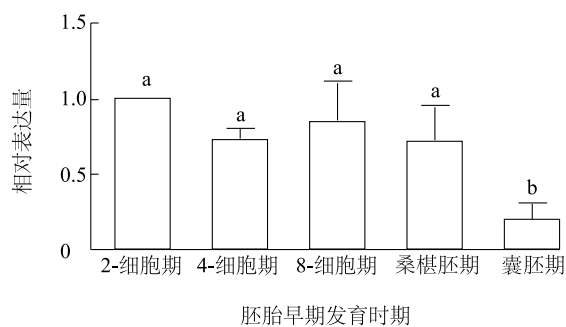
从图 3 和图 4 可以看出, *GHSR-1a* 蛋白在猪孤雌胚早期发育的各个时期均能检测到, 囊胚期的表达量显著低于 4-细胞期、8-细胞期和桑葚胚期 ($P < 0.05$)。



A: 胚胎培养 24 h; B: 胚胎培养 40 h; C: 胚胎培养 72 h; D: 胚胎培养 102 h; E: 胚胎培养 132 h。同一培养时间内立柱上方不同字母表示差异达显著水平 ($P < 0.05$)。

图 1 添加生长素后猪孤雌胚早期发育速率的变化

Fig. 1 The dose-dependent effects of ghrelin on the early development rate of porcine parthenogenetic embryos



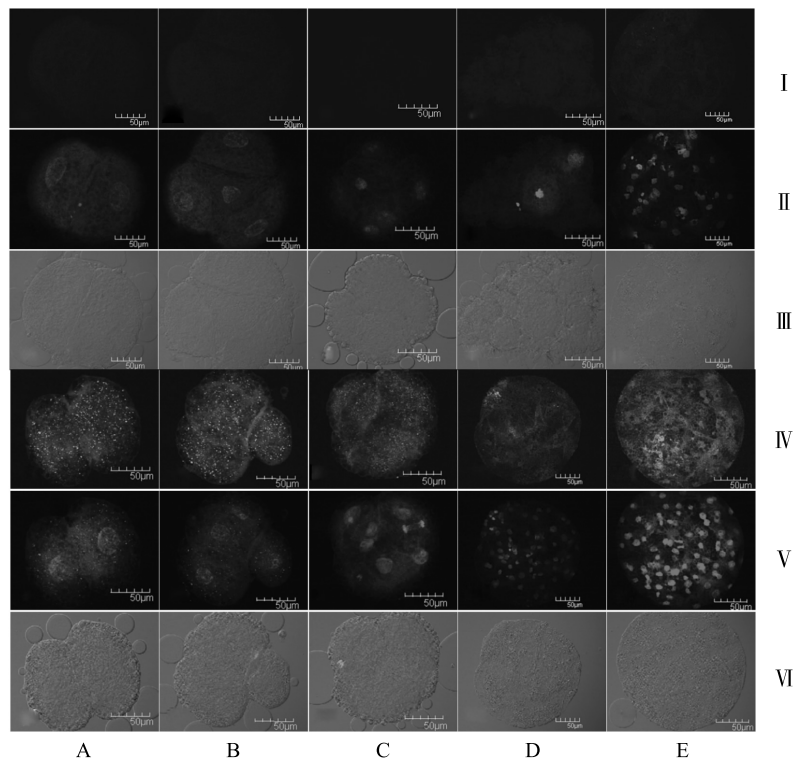
图中不同小写字母表示差异达显著水平 ($P < 0.05$)。

图 2 猪孤雌胚早期发育各时期 GHSR-1a mRNA 的相对表达量

Fig. 2 Relative mRNA expression of GHSR-1a at various developmental stages of porcine parthenogenetic embryos

3 讨论

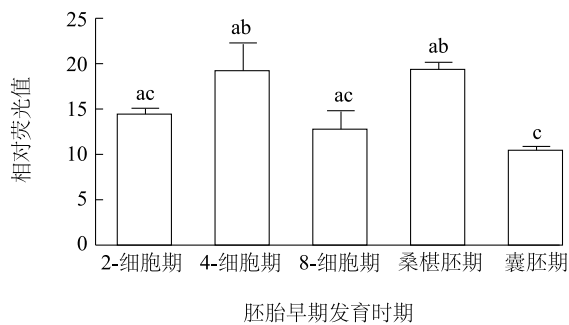
近年来,生长素对生殖器官的作用不断被证实,但其在胚胎发育过程中的功能还存在争议。2003 年,日本研究人员发现当向小鼠胚胎体外培养液中添加 100 nm/L 生长素时可抑制小鼠胚胎发育^[5]。习海涛^[7]发现在体外培养基中添加 0.1 mg/L 的生长素显著降低了小鼠自然受精胚和孤雌胚的桑椹胚及囊胚发育率,但进一步提高生长素的添加浓度后,桑椹胚率和囊胚率又有一定程度的回升;而对于体外受精胚,添加 1.0 mg/L 生长素显著降低了其囊胚发育率,提高生长素的浓度后,囊胚率并没有明显的回升趋势。另有报道在培养基中添加 50.0 mg/L 的生长素显著提高了水牛孤雌胚的



I: 无 GHSR1a 免疫组(对照组)绿色荧光通道; II: 对照组红色荧光通道; III: 对照组明场; IV: GHSR1a 免疫荧光染色; V: PI 核染; VI: 试验组明场。A: 2-细胞期; B: 4-细胞期; C: 8-细胞期; D: 桑椹胚期; E: 囊胚期。

图3 GHSR1a 蛋白在猪孤雌胚早期发育中的表达

Fig.3 GHSR1a expression at various developmental stages of porcine parthenogenetic embryos



图中不同小写字母表示差异达显著水平($P < 0.05$)。

图4 猪孤雌胚早期发育各时期 GHSR-1a 的表达量

Fig.4 GHSR-1a levels at various developmental stages of porcine parthenogenetic embryos

囊胚发育率^[9]。本研究结果显示,胚胎培养过程中添加 10.0 mg/L 生长素可以显著提高猪孤雌胚的4-细胞发育率、8-细胞发育率、桑椹胚率及囊胚发育率($P < 0.05$),但 100.0 mg/L 的添加浓度降低了猪孤雌胚的囊胚发育率,这与 Zhang 等人^[11]研究结果一

致。推测生长素对哺乳动物早期胚胎发育会产生一定促进作用,但在不同物种和不同来源的胚胎及生长素的添加浓度上表现不一。

向牛体外成熟的卵母细胞中添加 800 pg/ml 的生长素后发现,成熟 18 h 后 MII 期卵母细胞数显著高于对照组,但成熟 24 h 时卵母细胞数与对照无显著差异,成熟后体外受精时,成熟 18 h 的卵母细胞形成的囊胚率显著高于成熟 24 h 组^[8]。提示我们生长素可能在卵母细胞发育或胚胎发育过程中起作用。本研究结果表明,添加 10.0 mg/L 生长素组猪孤雌胚胎4-细胞胚胎、8-细胞胚胎及桑椹胚发育速率明显快于对照组($P < 0.05$),但2-细胞胚和囊胚在发育速度上与对照组无显著差异($P > 0.05$)。说明生长素有可能会促进胚胎的早期发育速度。从4-细胞期到桑椹胚期间其特异性受体 GHSR-1a 表现出的 mRNA 高表达模式与胚胎发育速度相一致,推测生长素通过 GHSR-1a 作用于胚胎发育。但生长素通过何种机制促进了胚胎发育的速度,还需要进

一步研究。

2008 年, Du 等^[12]检测了绵羊卵母细胞和不同发育时期的胚胎生长素及其受体基因 *GHSR-1a* mRNA 转录水平, 发现在附植前胚胎不同发育阶段均有表达, 其中 *GHSR-1a* mRNA 转录水平从 GV 期到 MII 期依次递减, 在 2-细胞期升高, 至囊胚期保持稳定。Kawamura 等^[5]研究结果表明小鼠体外受精胚自桑葚胚以后的附植前胚胎均检测到生长素及其受体 *GHSR-1a* 的表达, 表达从桑葚胚到囊胚呈增加趋势, 而此前各时期则没有生长素及 *GHSR-1a* 的表达。在本研究中, *GHSR-1a* mRNA 在猪孤雌胚胎早期发育的各个时期均可被检测到, 在 2-细胞期转录水平较高, 在 4-细胞期降低, 8-细胞期回升, 至囊胚期迅速下降。这可能是由于在 2-细胞期之前, 猪胚内还存在大量母源 mRNA, 而在 4~8-细胞期发生胚胎基因组激活, 原来的母源 mRNA 大部分降解, 导致 4-细胞期 *GHSR-1a* mRNA 降低, 而 8-细胞期时, 胚胎基因组已激活转录, 因此 *GHSR-1a* mRNA 回升。*GHSR-1a* 在这段时间的变化起何种作用, 还需要进一步研究。在本研究中发现 *GHSR-1a* mRNA 与蛋白在不同发育时期相对丰度的变化趋势并不完全一致, 这可能是由于从 mRNA 到蛋白还受诸如 mRNA 稳定性、翻译效率、蛋白寿命等多种因素影响所致。

参考文献:

- [1] GUALILLO O, LAGO F, GOMEZ-REINO J, et al. Ghrelin, a widespread hormone: insights into molecular and cellular regulation of its expression and mechanism of action [J]. *Febs Letters*, 2003, 552(2-3): 105-109.
- [2] HORVATH T L, DIANO S, SOTONYI P, et al. Minireview: Ghrelin and the regulation of energy balance—a hypothalamic perspective [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(10): 4163-4169.
- [3] GARCIA M C, LOPEZ M, ALVAREZ C V, et al. Role of ghrelin in reproduction [J]. *Reproduction*, 2007, 133(3): 531-540.
- [4] HARRISON J L, ADAM C L, BROWN Y A, et al. An immunohistochemical study of the localization and developmental expression of ghrelin and its functional receptor in the ovine placenta [J]. *Reprod Biol Endocrin*, 2007, 5:25.
- [5] KAWAMURA K, SATO N, FUKUDA J, et al. Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos *in vitro* [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(6): 2623-2633.
- [6] TENA-SEMPERE M. Ghrelin and reproduction: Ghrelin as novel regulator of the gonadotropic axis [J]. *Vitamins and Hormones*, 2008, 77:285-300.
- [7] 习海涛. Ghrelin 和 SCF 对小鼠附植前胚胎体外发育的影响 [D]. 合肥:安徽农业大学, 2009.
- [8] AMIRIDIS G S, DOVOLOU E, MESSINIS I, et al. Ghrelin accelerates *in vitro* maturation of bovine oocytes [J]. *Reprod Domest Anim*, 2014, 49:665-672.
- [9] 谢体三, 农 微, 张新民, 等. Ghrelin 对水牛体外受精和孤雌激活胚胎体外发育的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(11): 1478-1480.
- [10] WANG Z G, LIN P, YU S D. Effects of ghrelin on developmental competence and gene expression of *in vitro* fertilized ovine embryos [J]. *Theriogenology*, 2013, 79(4): 695-701.
- [11] ZHANG K, WEI H X, ZHANG Y H, et al. Effects of ghrelin on *in vitro* development of porcine *in vitro* fertilized and parthenogenetic embryos [J]. *Journal of reproduction and development*, 2007, 53(3): 647-653.
- [12] DU C, LI H, CAO G, et al. Expression of the orexigenic peptide ghrelin and the type 1a growth hormone secretagogue receptor in sheep oocytes and pre-implantation embryos produced *in vitro* [J]. *Reproduction In Domestic Animals*, 2010, 45(1): 92-98.
- [13] LI Y S, ZHANG C B, GAO Y, et al. Effect of epigallocatechin-3-gallate on the *in vitro* developmental potential of porcine oocytes and embryos obtained parthenogenetically and by somatic cell nuclear transfer [J]. *Italian Journal of Animal Science*, 2014, 13(1): 3116.
- [14] YOSHIOKA K, SUZUKI C, TANAKA A, et al. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium [J]. *Biology of Reproduction*, 2002, 66(1): 112-119.
- [15] 周娜汝. 猪体细胞克隆胚胎着床前发育期间 H3K27 乙酰化重编程规律研究 [D]. 合肥:安徽农业大学, 2013.

(责任编辑:孙 宁)