

彭中友, 孙俊铭, 李 燕, 等. GDF9 和 FST 调控猪卵母细胞成熟和胚胎早期发育[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(3): 583-589.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.03.019

## GDF9 和 FST 调控猪卵母细胞成熟和胚胎早期发育

彭中友<sup>1,2</sup>, 孙俊铭<sup>3</sup>, 李 燕<sup>1</sup>, 刘庆友<sup>3</sup>, 于建宁<sup>1</sup>, 施振旦<sup>1</sup>

(1. 江苏省农业科学院畜牧研究所/动物品种改良与繁育重点实验室, 江苏 南京 210014; 2. 贵州省畜牧兽医学校, 贵州 贵阳 550018; 3. 广西大学动物科学学院, 广西 南宁 530004)

**摘要:** 为探讨生长分化因子 9(Growth differentiation factor 9, GDF9) 和卵泡抑素(Follistatin, FST) 如何影响猪卵母细胞成熟及胚胎早期发育能力, 在猪卵母细胞体外成熟(IVM) 培养过程中添加不同浓度的 GDF9 和抗 GDF9 抗体, 或同时添加 GDF9 和 FST 或抗 FST 抗体, 测定猪卵母细胞的细胞核成熟率、卵裂率、囊胚率及囊胚总细胞数。结果显示, 添加 GDF9 显著提高孤雌胚囊胚率, 抗 GDF9 抗体则显著抑制卵裂率和囊胚率。添加 FST 显著降低孤雌胚囊胚率和囊胚总细胞数, 添加抗 FST 抗体显著提高了囊胚率。共同添加 GDF9 与抗 FST 抗体则使囊胚率达到最高。表明猪卵母细胞 IVM 期添加 GDF9 能一定程度上提高卵母细胞及胚胎的发育能力, 共同添加 GDF9 和抗 FST 抗体对胚胎发育的促进作用具有加性效应。

**关键词:** 猪; GDF9; 抗 GDF9 抗体; FST; 抗 FST 抗体; 囊胚率; 卵母细胞发育能力

**中图分类号:** S828 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)03-0583-07

## Growth differentiation factor 9 and follistatin regulating porcine oocyte maturation and early embryo development

PENG Zhong-you<sup>1,2</sup>, SUN Jun-ming<sup>3</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, LIU Qing-you<sup>3</sup>, YU Jian-ning<sup>1</sup>, SHI Zhen-dan<sup>1</sup>

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Laboratory of Animal Improvement and Reproduction, Nanjing 210014, China; 2. Guizhou Husbandry and Veterinary School, Guiyang 550018, China; 3. College of Animal Science, Guangxi University, Nanning 530004, China)

**Abstract:** To investigate the effects of growth differentiation factor 9 (GDF9) and follistatin (FST) on porcine oocyte maturation and early embryo developmental competence, different concentrations of exogenous GDF9, anti-GDF9 antibody, FST and anti-FST antibody were added into *in vitro* maturation medium, and the nuclear maturation, cleavage, blastocyst rate and blastocyst cell number were detected. GDF9 significantly improved blastocyst rate. Anti-GDF9 antibody significantly inhibited cleavage and blastocyst rates. FST addition reduced parthenogenic embryo blastocyst rate and the total cell number of blastocyst. Maturation medium containing anti-FST antibody significantly improved blastocyst rates. Maturation medium containing GDF9 and anti-FST antibody together drove parthenogenic embryo blastocyst rate to the highest level. The results suggested GDF9 addition

in maturation medium could improve oocyte maturation and early embryo developmental competence. GDF9 and anti-FST antibody in maturation medium could synergistically improve oocyte developmental competence.

**Key words:** porcine; growth differentiation factor 9 (GDF9); anti-GDF9 antibody; follistatin; anti-follistatin antibody; blastocyst rate; oocyte developmental competence

收稿日期: 2014-09-22

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[ CX(11)4074 ]; 国家科技支撑计划项目(2011BAD19B02-6)

作者简介: 彭中友(1986-), 男, 贵州大方人, 硕士, 研究方向为动物生物技术与繁殖内分泌。(Tel) 025-84390341; (E-mail) 912765429@qq.com

通讯作者: 施振旦, (E-mail) zdshi@mail.jaas.ac.cn

人工辅助生殖技术主要依赖卵子体外成熟(IVM)技术发展而来,IVM 技术能避免超数排卵中外源激素刺激造成的副作用,如卵巢过度刺激综合征<sup>[1-4]</sup>,但与体内成熟卵子比较,IVM 卵子发育潜力明显不如体内成熟卵子,IVM 卵子受精率和胚胎存活率都低于体内卵子<sup>[5]</sup>。由此国内外对动物卵母细胞 IVM 条件、体外受精条件和胚胎体外培养条件进行了大量的研究优化,并在牛和小鼠卵子 IVM 和胚胎早期发育方面取得较好进展<sup>[2,6-8]</sup>,但在猪的胚胎体外生产方面仍然面临 2 个主要问题,一是体外多精受精率高,二是体外受精卵子发育至囊胚比例低和体外胚胎发育质量低于体内发育胚胎质量<sup>[9-11]</sup>。

卵泡在发育过程中,卵子及其周围的颗粒细胞存在相互双向调控。卵母细胞通过旁分泌方式分泌系列生长因子如 BMP、GDF9 和活化素等作用于颗粒细胞促进其增殖<sup>[12]</sup>、分化<sup>[13]</sup>、代谢、凋亡<sup>[14]</sup>及卵丘扩展等<sup>[15]</sup>,其中 GDF9 在卵泡发生过程和早期胚胎中表达<sup>[16]</sup>,对卵巢和卵泡发育有重要调控作用<sup>[17-20]</sup>。卵泡液中 GDF9 含量与卵子核成熟和胚胎质量具有显著正相关性<sup>[21]</sup>。在卵母细胞 IVM 培养过程中添加 GDF9 能显著提高卵子成熟和早期胚胎的发育能力,这一作用在牛<sup>[6,8]</sup>与小鼠<sup>[2,7-8]</sup>上均得到证实,Gomez 等<sup>[22]</sup>将猪卵母细胞-卵丘细胞复合体(Cumulus-oocyte complexes, COCs)与能分泌 GDF9 的裸卵(DOs)共同培养发现 DOs 提高了孤雌激活后 COCs 中卵母细胞发育至囊胚的比例,但直接向猪卵母细胞 IVM 培养过程中添加 GDF9 是否能提高猪卵子成熟和早期胚胎的发育能力尚未见报道。

在卵丘细胞对卵子成熟的影响中,卵丘细胞分泌的 FST 特异性结合活化素(Activin, ACT)、BMP15 甚至 GDF9,降低这些转化生长因子的生物活性,抑制卵母细胞的发育与成熟<sup>[7,23]</sup>。如 Silva 等<sup>[24]</sup>在牛成熟培养液中添加 FST,剂量依赖性地抑制了胚胎发育。我们之前的研究表明,利用抗 FST 抗体处理体外培养的水牛卵母细胞,可以显著提高卵母细胞的成熟率及孤雌胚的发育<sup>[25]</sup>。Shi 等<sup>[26]</sup>研究发现 GDF9 能够抑制人颗粒黄体细胞 FST 的分泌。故推测 GDF9 可能是通过抑制 FST 的分泌而促进囊胚的发育,以及当 IVM 培养液中同时添加 GDF9 与抗 FST 抗体时,两种因子可能存在提高胚胎发育的

加性效应。

本研究以猪卵母细胞为模型,选用了 2 个单因子试验和 2 个二因子有重复交叉分组的试验设计方式,通过向猪卵母细胞成熟培养液中单独添加 GDF9,或者同时添加 GDF9 与 FST、GDF9 与抗 FST 抗体,以研究 GDF9 和 FST 对卵子成熟和胚胎发育的生物学作用,为最大程度提高猪的体外胚胎生产质量和效率提供理论和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 猪卵母细胞的采集和 IVM 培养

从屠宰场采集新鲜猪卵巢,置于 30~33℃ 灭菌生理盐水中,2 h 内送达实验室。用带有 18 号针头的 10 ml 注射器抽取卵巢表面直径为 2~6 mm 的卵泡,将抽取液放入 15 ml 离心管中。让 COCs 自然沉降 15 min,用含 2% FBS 的 TCM199 洗涤沉降物 2~3 次。实体显微镜下挑选胞质均匀且至少有 3 层完整颗粒细胞包围的 COCs,用成熟培养液洗涤 3 次,再用成熟培养液(TCM-199+10% 猪卵泡液+10 UI/ml eCG+10 UI/ml hCG+0.6 mmol/L 半胱氨酸)洗涤 3 次后进行成熟培养。液滴式培养,液滴大小为 150  $\mu$ l,每滴内培养 40~50 枚卵母细胞,培养条件为 39℃,5% CO<sub>2</sub> 的空气,饱和湿度。培养 22 h 后换成不含激素的成熟培养液继续培养 20~22 h。

GDF9 和抗 GDF9 抗体对猪卵母细胞成熟和胚胎早期发育的影响采用单因子试验:卵子 IVM 过程中,对照组使用基础培养液培养,试验组 3 份培养液中 GDF9 的添加浓度分别为 100 ng/ml、200 ng/ml 和 300 ng/ml,另 3 份培养液中抗 GDF9 抗体的浓度分别为 2.5  $\mu$ g/ml、5.0  $\mu$ g/ml 和 10.0  $\mu$ g/ml;GDF9(0 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml)与 FST(0  $\mu$ g/ml、0.1  $\mu$ g/ml、1.0  $\mu$ g/ml)或抗 FST 抗体(0  $\mu$ g/ml、50  $\mu$ g/ml、100  $\mu$ g/ml)的共同作用采用 2 因子交叉分组试验设计。抗 GDF9 抗体和抗 FST 抗体由江苏省农业科学院畜牧研究所动物品种改良与繁育重点实验室制备保存,其制备方法见之前发表文献[25]、[27];GDF9 和 FST 购自 R&D 公司,其余试剂均购自 Sigma 公司。

### 1.2 卵母细胞孤雌激活和早期胚胎培养

将培养 44~45 h 的卵丘-卵母细胞复合体移入 0.1% 透明质酸酶中消化,去除卵丘细胞,挑选排出第一极体且胞质均匀的卵母细胞。然后用电激活液

清洗融合槽 3~4 遍,将卵母细胞在电激活液中清洗 2~3 遍并静置 2~3 min,然后移入覆盖满电激活液的融合槽中,互相间有空隙的一字排开,再以 1.0 kV/cm 80  $\mu$ s 3DC 进行电激活。将激活处理过后的卵母细胞于培养液 PZM3(含有 5  $\mu$ g/ml 细胞松弛素 B 和 10  $\mu$ g/ml 放线菌酮)中化学激活 4 h,然后在 PZM-3 中清洗 2~3 遍,再置于 38.5  $^{\circ}$ C 含 5%  $\text{CO}_2$  和饱和湿度的二氧化碳培养箱进行连续培养。

### 1.3 成熟率、卵裂率、囊胚率的统计

培养 44 h 后的卵母细胞成熟以排出第一极体为标准,并结合成熟卵形态学进行评价。孤雌激活后 24 h 统计卵裂率,7 d 后统计囊胚率。成熟率=成熟卵子数/卵子总数,卵裂率=卵裂数/总卵数,囊胚率=囊胚数/卵裂数。

### 1.4 囊胚染色及囊胚细胞数统计

参照文献[13]方法用染料 Hoechst33342 对囊胚进行染色。收集孤雌激活后第 7 d 对照组和各处理组的囊胚,在洗液中洗 3 次,然后置于 20  $\mu$ g/ml Hoechst33342 的 CCM 液(Gibco,不含钙镁)中避光室温孵育 2 min,再在操作液中洗 3 次,将囊胚移到载玻片上甘油液滴内,盖上盖玻片并轻轻挤压使细胞平铺,封片后在荧光显微镜(购自 Nikon 公司)下观察,进行囊胚总细胞计数。

### 1.5 数据分析

所有试验至少重复 3 次以上,数据采用分析软件 SAS 9.0 进行 ANOVA 分析。

## 2 结果

### 2.1 GDF9 对猪卵母细胞成熟率、卵裂率和囊胚率的影响

成熟培养液中添加较低浓度(100 ng/ml 和 200 ng/ml) GDF9 对卵母细胞成熟率无显著影响,较高浓度(300 ng/ml) GDF9 则显著抑制卵母细胞的成熟(表 1);3 种浓度 GDF9 对卵裂率则都无影响。成熟液中添加较低浓度 GDF9 可以提高囊胚率,将其从对照组的 14.7% 显著提高到 200 ng/ml 处理组的 24.8%。当 GDF9 添加浓度继续提高到 300 ng/ml 时,囊胚率仅增加到 20.2%,与对照组差异不显著。

### 2.2 抗 GDF9 抗体对猪卵母细胞成熟率、卵裂率与囊胚率的影响

如表 2 所示,成熟培养液中添加抗 GDF9

抗体可以抑制卵母细胞的成熟率和孤雌激活胚的卵裂率和囊胚率,且抑制作用具有剂量依赖性。

表 1 不同浓度 GDF9 对体外卵子发育能力的影响

Table 1 The effects of different concentrations of GDF9 on *in vitro* oocyte developmental competence

| GDF9 浓度<br>(ng/ml) | 总卵数<br>(个) | 成熟率<br>(%)     | 卵裂率<br>(%)     | 囊胚率<br>(%)     |
|--------------------|------------|----------------|----------------|----------------|
| 0                  | 232        | 81.3 $\pm$ 1.8 | 71.6 $\pm$ 1.7 | 14.7 $\pm$ 1.7 |
| 100                | 247        | 82.3 $\pm$ 1.7 | 69.9 $\pm$ 2.5 | 21.4 $\pm$ 1.9 |
| 200                | 237        | 79.2 $\pm$ 1.3 | 72.8 $\pm$ 1.7 | 24.8 $\pm$ 2.2 |
| 300                | 255        | 74.6 $\pm$ 1.5 | 70.2 $\pm$ 6.0 | 20.2 $\pm$ 4.3 |

表 2 不同浓度抗 GDF9 抗体对体外卵子发育能力的影响

Table 2 The effects of different concentrations of anti-GDF9 antibody on *in vitro* oocyte developmental competence

| 抗 GDF9 抗体<br>浓度 ( $\mu$ g/ml) | 总卵数<br>(个) | 成熟率<br>(%)     | 卵裂率<br>(%)     | 囊胚率<br>(%)     |
|-------------------------------|------------|----------------|----------------|----------------|
| 0                             | 299        | 80.8 $\pm$ 1.5 | 72.2 $\pm$ 5.5 | 17.0 $\pm$ 4.2 |
| 2.5                           | 277        | 68.0 $\pm$ 2.7 | 61.8 $\pm$ 2.7 | 11.4 $\pm$ 3.1 |
| 5.0                           | 270        | 65.0 $\pm$ 1.8 | 60.7 $\pm$ 2.8 | 6.2 $\pm$ 2.0  |
| 10.0                          | 257        | 59.8 $\pm$ 1.8 | 53.8 $\pm$ 2.8 | 5.7 $\pm$ 1.7  |

### 2.3 共同添加 GDF9 和 FST 对卵子发育能力的影响

成熟培养液中添加不同浓度 FST 对卵子成熟率和孤雌胚卵裂率无显著影响,但随着 FST 剂量的增加囊胚率极显著降低,同时囊胚总细胞数显著降低。当向 0  $\mu$ g/ml FST 的培养液中分别添加浓度为 0 ng/ml、100 ng/ml 和 200 ng/ml GDF9,囊胚率依次为 42.8%、42.9%、51.2%,囊胚总细胞数分别为 52、47 和 44;当向 0.1  $\mu$ g/ml FST 的培养液中分别添加浓度为 0 ng/ml、100 ng/ml 和 200 ng/ml GDF9,囊胚率依次分别为 32.4%、45.5% 和 35.9%,囊胚总细胞数分别为 49、50 和 50;当向 1.0  $\mu$ g/ml FST 中分别添加 0 ng/ml、100 ng/ml 和 200 ng/ml GDF9 时,囊胚率分别为 24.3%、35.8% 和 41.2%,囊胚的细胞数依次分别为 43、43 和 46(表 3)。由此可见,FST 降低了 GDF9 对胚胎发育的促进作用。

表 3 共同添加 GDF9 和 FST 对卵子成熟和早期胚胎发育的影响

Table 3 The effects of adding GDF9 and FST together in maturation medium on oocyte maturation and early embryo development

| GDF9 (ng/ml) | FST (μg/ml) | 卵子数 (个) | 成熟率 (%)  | 卵裂率 (%)   | 囊胚率 (%)  | 囊胚总细胞数 (个) |
|--------------|-------------|---------|----------|-----------|----------|------------|
| 0            | 0           | 250     | 53.1±3.8 | 60.3±8.2  | 42.8±7.1 | 52.0±1.8   |
|              | 0.1         | 261     | 53.9±6.2 | 59.8±12.6 | 32.4±4.2 | 49.0±0.8   |
|              | 1.0         | 259     | 61.3±7.6 | 64.3±11.7 | 24.3±2.1 | 43.0±1.7   |
| 100          | 0           | 256     | 60.1±6.5 | 70.0±5.6  | 42.9±4.8 | 47.0±1.0   |
|              | 0.1         | 262     | 58.9±7.2 | 65.0±9.3  | 45.5±4.3 | 50.0±1.3   |
|              | 1.0         | 250     | 64.2±5.4 | 61.6±8.1  | 35.8±2.5 | 43.0±1.5   |
| 200          | 0           | 230     | 68.9±1.9 | 75.9±1.7  | 51.2±5.8 | 44.0±0.8   |
|              | 0.1         | 246     | 67.0±2.9 | 62.4±10.0 | 35.9±3.9 | 50.0±1.8   |
|              | 1.0         | 269     | 64.7±4.7 | 75.1±4.7  | 41.2±3.2 | 46.0±1.4   |

## 2.4 共同添加 GDF9 和抗 FST 抗体对卵子发育能力的影响

成熟培养液中单独添加抗 FST 抗体时,增加了囊胚率,呈剂量依赖性,当添加抗 FST 抗体浓度为 100 μg/ml 时,囊胚率为 59.9%,与对照组(42.5%)相比差异显著。当向含有抗 FST 抗体浓度为 50 μg/ml 的培养液中分别添加浓度为 0 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml 的 GDF9,囊胚率分别为 53.3%、66.5% 和 58.2%;当向抗 FST 抗体浓度为 100 μg/ml 的培养液中分别添加浓度为 0 ng/ml、100

ng/ml、200 ng/ml 的 GDF9,囊胚率分别为 59.9%、55.6%、52.8%;与对照组囊胚率(42.5%)相比,培养液中同时添加 50 μg/ml 抗 FST 抗体和 100 ng/ml GDF9 时囊胚率提高到 66.5% (表 4),表明共同添加抗 FST 抗体和 GDF9 对胚胎发育的促进作用具有明显的加性效应,且抗 FST 抗体和 GDF9 最适添加浓度分别为 50 μg/ml 和 100 ng/ml。从表 4 可以看出,各处理组的成熟率、卵裂率和囊胚总细胞数与对照组相比均无显著差异。

表 4 共同添加 GDF9 和抗 FST 抗体对卵子成熟和早期胚胎发育的影响

Table 4 The effects of adding GDF9 and anti-FST antibody together in maturation medium on oocyte maturation and early embryo development

| GDF9 (ng/ml) | 抗 FST 抗体 (μg/ml) | 卵子数 (个) | 成熟率 (%)  | 卵裂率 (%)  | 囊胚率 (%)  | 囊胚总细胞数 (个) |
|--------------|------------------|---------|----------|----------|----------|------------|
| 0            | 0                | 255     | 69.2±2.5 | 76.3±4.3 | 42.5±3.4 | 48±1.3     |
|              | 50               | 234     | 65.3±3.0 | 73.8±4.2 | 53.3±7.2 | 43±1.1     |
|              | 100              | 201     | 65.9±2.7 | 72.9±4.0 | 59.9±5.7 | 49±1.4     |
| 100          | 0                | 256     | 60.1±4.6 | 70.0±5.6 | 42.9±4.8 | 47±1.0     |
|              | 50               | 224     | 65.1±3.3 | 72.1±2.7 | 66.5±3.7 | 46±1.4     |
|              | 100              | 248     | 65.2±3.1 | 78.4±2.1 | 55.6±4.6 | 45±0.9     |
| 200          | 0                | 230     | 68.9±1.9 | 75.9±1.7 | 51.2±5.8 | 44±0.8     |
|              | 50               | 230     | 65.8±4.3 | 71.4±4.0 | 58.2±5.8 | 45±1.0     |
|              | 100              | 233     | 69.3±2.4 | 76.0±4.4 | 52.8±7.5 | 50±1.5     |

## 3 讨论

本研究通过向 IVM 培养过程中添加 GDF9 或者

抗 GDF9 抗体,从正反两方面证明了 IVM 培养液中添加 GDF9 具有促进猪早期胚胎发育的生物学作用。通过向培养液中同时添加 GDF9 和 FST 或者抗



FST 抗体进一步研究表明,FST 降低了 GDF9 对胚胎发育的促进作用;同时添加 GDF9 和抗 FST 抗体对胚胎发育的促进作用具有加性效应。

猪卵母细胞成熟培养液中添加不同浓度 GDF9 提高了囊胚率,当培养液中添加 GDF9 浓度为 200 ng/ml 时囊胚率显著提高,表明猪卵母细胞培养液中 GDF9 添加的最适浓度为 200 ng/ml,但另一方面,GDF9 对卵裂率和囊胚细胞数没有显著影响。Gomez 等<sup>[22]</sup>将猪 COCs 与能分泌 GDF9 的裸卵(DOs)共同培养也发现 DOs 提高了孤雌激活后 COCs 中卵母细胞发育至囊胚的比例,但对卵裂率和囊胚总细胞数同样没有显著影响。相同的工作在牛卵母细胞培养中也得到了证实<sup>[6]</sup>。在小鼠卵母细胞培养液中添加 GDF9 也同样促进了囊胚的发育<sup>[2]</sup>。这些研究结果都与我们的研究结果一致。我们试验还发现,当培养液中添加抗 GDF9 抗体时显著降低了囊胚率,而且具有剂量依赖性。Hussein 等<sup>[7]</sup>发现小鼠卵母细胞培养液中添加 smad2/3 特异抑制剂 SB-431542 阻断 GDF9 的下游通路后,显著降低了囊胚发育能力。研究结果表明,GDF9 缺陷型小鼠可以形成原始和初级卵泡,但之后卵泡发育受阻,导致完全不育<sup>[18,27-28]</sup>。这表明卵子分泌的内源 GDF9 对卵子进一步发育至成熟发挥着重要的作用,中和内源 GDF9 或基因沉默内源的 GDF9 表达都会影响卵子发育及最终成熟。

另外,添加 GDF9 浓度为 100 ng/ml 或 200 ng/ml 时对猪卵子成熟率没有影响,而添加高浓度(300 ng/ml)的 GDF9 能显著降低成熟率。Clelland 等<sup>[29]</sup>发现同样属于 OSFs 的 BMP15 具有抑制斑马鱼卵子成熟的生物学作用。若长期或重度免疫 GDF9,会使具有正常生殖机能的母羊卵泡发育停留在初级阶段,而不能发育至次级卵泡阶段以上而导致羊不育;若仅是轻度免疫 GDF9,则可以提高母羊的排卵数和产羔数<sup>[30]</sup>。因此推测过高或过低浓度的 GDF9 都会抑制卵泡发育。Elvin 等<sup>[31]</sup>研究发现 GDF9 能够抑制 LH 受体的表达,推测可能是高浓度 GDF9 抑制卵子成熟的原因之一。

进一步的研究发现,向 IVM 培养液中同时添加 GDF9 和 FST 或者抗 FST 抗体时,同时添加 GDF9 和 FST 的囊胚率和囊胚总细胞数显著低于同时添加 GDF9 和抗 FST 抗体。当向培养液中同时添加 GDF9 与 FST 时发现,同时添加各组囊胚率均与对

照相比无显著差异,这表明培养液中 GDF9 减弱了 FST 对卵子成熟和胚胎发育的抑制作用。当向培养液中同时添加 GDF9 和抗 FST 抗体时囊胚率最高达到 66.5%,高出对照组(42.5%)和单独添加 GDF9 组(42.9%、51.2%)或单独添加抗 FST 抗体组(53.3%、59.9%),这表明 IVM 培养中同时添加 GDF9 与抗 FST 抗体对卵子成熟和胚胎发育的促进作用具有加性效应。IVM 培养中卵子周围的卵丘细胞能合成和分泌一些调节因子,例如抑制素(INH)、活化素(ACT)和 FST<sup>[21]</sup>,在整个 IVM 过程中,这些分泌因子在培养液中不断积累并通过细胞微管影响卵丘细胞的功能和卵子成熟以及后续胚胎的发育。IVM 培养液中 COCs 分泌的 ACT、FST 和 INH 的浓度能够达到 100 ng/ml 以上<sup>[24,32]</sup>。培养液中的 ACT 能促进卵子成熟和胚胎的发育,而 FST 和 INH 亚基却阻碍卵子成熟和胚胎的发育<sup>[24,33-38]</sup>。FST 通过结合 ACT 阻碍其与受体 I 和 II 结合,从而降低 ACT 的生物学活性<sup>[39-40]</sup>。同时,FST 与 ACT 的亲中性比对 INH 的亲中性高出 50~100 倍<sup>[39]</sup>。研究结果表明,ACT 与 FST 的比例决定着卵子的成熟质量和胚胎的发育能力<sup>[24]</sup>。因此免疫 FST 能增加 ACT 含量,进而放大 ACT 下游信号<sup>[41-42]</sup>,从而促进卵子成熟和胚胎发育<sup>[25]</sup>。此外,FST 也能特异结合 BMP15,成熟培养液中同时添加 FST 和 BMP15 发现 FST 降低了 BMP15 对卵母细胞成熟和胚胎发育的促进作用<sup>[7]</sup>。这些结果表明 FST 可能通过结合 ACT 和 BMP15 抑制卵子成熟和随后胚胎的发育。Shi 等发现 GDF9 抑制人颗粒黄体细胞中 FST 的表达<sup>[26]</sup>。GDF9 和抗 FST 抗体促进卵子成熟和胚胎发育的加性效应可能是因为 GDF9 抑制了 CCs 中 FST 的表达和抗 FST 抗体有效中和了培养液中的 FST。

总之,研究结果证明了 GDF9 和 FST 分别对猪卵子 IVM 成熟及早期胚胎发育具有促进和抑制作用,培养液中共同添加 GDF9 和抗 FST 抗体对卵子成熟和胚胎发育的促进作用具有加性效应,这将有助于提高家畜体外胚胎的产量和质量。

#### 参考文献:

- [1] RAO G D, TAN S L. *In vitro* maturation of oocytes [J]. *Semin Reprod Med*, 2005, 23:242-247.
- [2] GILCHRIST R B, LANE M, THOMPSON J G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality [J]. *Hum Reprod Update*, 2008, 14(2):159-177.

- [3] SUIKKARI A M. *In-vitro* maturation; its role in fertility treatment [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2008, 20:242-248.
- [4] MATZUK M M, LI Q. How the oocyte influences follicular cell function and why[J]. *Oogenesis*, 2013, 1:75-92.
- [5] DIELEMAN S J, HENDRIKSEN P J, VIUFF D, et al. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos[J]. *Theriogenology*, 2002, 57(1):5-20.
- [6] DEY S R, DEB G K, HA A N, et al. COCulturing denuded oocytes during the *in vitro* maturation of bovine cumulus oocyte complexes exerts a synergistic effect on embryo development[J]. *Theriogenology*, 2012, 77(6):1064-1077.
- [7] HUSSEIN T S, THOMPSON J G, GILCHRIST R B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence[J]. *Dev Biol*, 2006, 296(2):514-521.
- [8] YEO C X, GILCHRIST R B, THOMPSON J G, et al. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice[J]. *Hum Reprod*, 2008, 23(1):67-73.
- [9] NAGAI T, FUNAHASHI H, YOSHIOKA K, et al. Up date of *in vitro* production of porcine embryos[J]. *Front Biosci*, 2006, 11:2565-2573.
- [10] NAGAI T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes[J]. *Theriogenology*, 2001, 55:1291-1301.
- [11] COOPER D K C, KEMP E, REEMTSMA K, et al. MRC. Xenotransplantation [M]. Berlin Heidelberg: Springer, 1991: 481-500.
- [12] GILCHRIST R, MORRISSEY M, RITTER L, et al. Comparison of oocyte factors and transforming growth factor-beta in the regulation of DNA synthesis in bovine granulosa cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, 201(1-2):87-95.
- [13] LI R, NORMAN R, ARMSTRONG D, et al. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells [J]. *Biol Reprod*, 2000, 63(3):839-845.
- [14] HUSSEIN T, FROILAND D, AMATO F, et al. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(22):5257-5268.
- [15] ZHANG X, HAN Y, SUI H, et al. Developmental and hormonal regulation of cumulus expansion and secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEf) in goat follicles [J]. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75(9):1387-1395.
- [16] PENNETIER S, UZBEKOVA S, PERREAU C, et al. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes *MATER*, *ZARI*, *GDF9*, *BMP15*, and *VASA* in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos[J]. *Biol Reprod*, 2004, 71(4):1359-1366.
- [17] DONG J, ALBERTINI D F, NISHIMORI K, et al. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis [J]. *Nature*, 1996, 383(6600):531-535.
- [18] VIITT U A, HAYASHI M, KLEIN C, et al. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles [J]. *Biol Reprod*, 2000, 62(2):370-377.
- [19] VIITT U A, MCGEE E A, HAYASHI M, et al. *In vivo* treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats[J]. *Endocrinology*, 2000, 141(10):3814-3820.
- [20] JUENGEL J L, HUDSON N L, HEATH D A, et al. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep [J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(6):1777-1789.
- [21] GODE F, GULEKLI B, DOGAN E, et al. Influence of follicular fluid GDF9 and BMP15 on embryo quality [J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(7):2274-2278.
- [22] GOMEZ M N, KANG J T, KOO O J, et al. Effect of oocyte-secreted factors on porcine *in vitro* maturation, cumulus expansion and developmental competence of parthenotes [J]. *Zygote*, 2012, 20(2):135-145.
- [23] KNIGHT P G, GLISTER C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary [J]. *Reproduction*, 2001, 121(4):503-512.
- [24] SILVA C C, KNIGHT P G. Modulatory actions of activin-A and follistatin on the developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes[J]. *Biol Reprod*, 1998, 58(2):558-565.
- [25] LI D R, QIN G S, WEI Y M, et al. Immunisation against inhibin enhances follicular development, oocyte maturation and superovulatory response in water buffaloes [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2011, 23(6):788-797.
- [26] SHI F T, CHEUNG A P, HUANG H F, et al. Growth differentiation factor 9 (GDF9) suppresses follistatin and follistatin-like 3 production in human granulosa-lutein cells[J]. *Plos One*, 2011 6(8):e22866.
- [27] 刘玉鹏, 彭中友, 郭日红, 等. 水牛生长分化因子 9 成熟肽基因克隆及重组蛋白和多克隆抗体的制备 [J]. *江苏农业学报*, 2013, 29(2):346-351.
- [28] ELVIN J A, CLARK A T, WANG P, et al. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary [J]. *Mol Endocrinol*, 1999, 13(6):1035-1048.
- [29] CLELLAND E S, TAN Q, BALOFISKY A, et al. Inhibition of premature oocyte maturation: a role for bone morphogenetic protein 15 in zebrafish ovarian follicles [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(11):5451-5458.
- [30] MCNATTY K P, MOORE L G, HUDSON N L, et al. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology [J]. *Reproduction*, 2004, 128(4):379-386.
- [31] ELVIN J A, YAN C, MATZUK M M. Growth differentiation fac-

- tor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(18):10288-10293.
- [32] SILVA C C, GROOME N P, KNIGHT P G. Demonstration of the suppressive effect of inhibin subunit on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes[J]. *J Reprod Fert*, 1999, 115: 381-388.
- [33] YOSHIOKA K, SUZUKI C, IWAMURA S. Activin A and follistatin regulate developmental competence of *in vitro*-produced bovine embryos[J]. *Biol Reprod*, 1998, 59 (5): 1017-1022.
- [34] IZADYAR F, DIJKSTRA G, VAN TOL H T, et al. Immunohistochemical localization and mRNA expression of activin, inhibin, follistatin, and activin receptor in bovine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation [J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 49 (2): 186-195.
- [35] IZADYAR F, HAGE W J, COLENBRANDER B, et al. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation[J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 49 (4): 444-453.
- [36] IZADYAR F, ZEINSTRA E, BEVERS M M. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes[J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 51 (3):339-345.
- [37] TRIGAL B, GOMEZ E, DIEZ C, et al. *In vitro* development of bovine embryos cultured with activin A [J]. *Theriogenology*, 2011, 75(3):584-588.
- [38] LIU Y P, MAO X B, WEI M Y, et al. Studies on enhancing embryo quantity and quality by immunization against inhibin in repeatedly superovulated Holstein heifers and he associated endocrine mechanisms[J]. *Anim Reprod Sci*, 2013, 142(1-2):10-18.
- [39] SCHNEYER A L, RZUCIDLO D A, SLUSS P M, et al. Characterization of unique binding kinetics of follistatin and activin or inhibin in serum[J]. *Endocrinology*, 1994, 135(2):667-674.
- [40] THOMPSON T B, LERCH T F, COOK R W, et al. The structure of the follistatin: activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding[J]. *Dev Cell*, 2005, 9(4):535-543.
- [41] CHAPMAN S C, BERNARD D J, JELEN J, et al. Properties of inhibin binding to betaglycan. InhBP/p120 and the activin type II receptors[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 196 (1-2):79-93.
- [42] WIATER E, LEWIS K A, DONALDSON C, et al. Endogenous betaglycan is essential for high-potency inhibin antagonism in gonadotropes[J]. *Mol Endocrinol*, 2009, 23 (7):1033-1042.

(责任编辑:袁 伟)