

GDF-9 对牦牛 COCs 体外成熟培养及其相关基因 mRNA 表达的影响

王玉恒^{1,2,3} 徐业芬^{1,2*} 索朗斯珠^{1,2} 强巴央宗¹ 郭敏⁴
程玲华⁴ 牛家强^{1,2} 贡嘎^{1,2} 王刚^{1,2} 孔庆辉^{1,2}

- (1. 西藏农牧学院 动物科学学院,西藏 林芝 860000;
2. 西藏农牧学院 西藏高原动物疫病研究自治区高校重点实验室,西藏 林芝 860000;
3. 西藏自治区兽医生物药品制造厂,拉萨 850000;
4. 中国农业大学 动物科技学院,北京 100193)

摘要 为探明生长分化因子-9(Growth differentiation factor 9,GDF-9)对牦牛卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus-oocyte complexes,COCs)体外培养的卵母细胞成熟率及相关基因 mRNA 表达水平的影响;采取健康牦牛的卵巢,分离 COCs 进行体外成熟培养;在牦牛 COCs 成熟培养液中添加终浓度分别为 0、200、400、600 ng/mL 的 GDF-9,统计卵母细胞成熟率;采用 Real-time PCR 方法检测 GDF-9 处理的 COCs 中 Smad 信号通路下游分子 *Smad 4* 以及卵丘扩展相关基因(*HAS 2*、*PTX 3*、*PTGS 2*)的 mRNA 表达水平。结果表明:添加 0、200、400、600 ng/mL GDF-9 的 COCs 成熟率差异不显著($P>0.05$)。*Smad 4* 和卵丘扩展相关基因(*HAS 2*、*PTX 3*、*PTGS 2*)的 mRNA 表达量随着 GDF-9 浓度升高呈上升趋势,其中 600 ng/mL GDF-9 处理组的 *Smad 4* 和 *PTX 3* mRNA 表达量最高,与其他处理组差异显著($P<0.05$);600 ng/mL GDF-9 处理组的 *HAS 2*、*PTGS 2* mRNA 表达量与 400 ng/mL GDF-9 处理组差异不显著($P>0.05$),与其他实验组差异显著($P<0.05$)。研究发现,在牦牛 COCs 体外培养过程中,添加不同浓度的 GDF-9 对牦牛卵母细胞成熟率的影响差异不显著;GDF-9 显著提高其信号通路下游分子 *Smad 4* 基因以及卵丘细胞扩展相关基因(*HAS 2*、*PTX 3*、*PTGS 2*)的 mRNA 表达,说明 600 ng/mL GDF-9 对牦牛体外培养过程中卵丘扩展有作用,作用机制可能与激活 Smad 信号通路有关。

关键词 牦牛; 卵丘卵母细胞复合体; 体外成熟; 生长分化因子-9

中图分类号 S852.21

文章编号 1007-4333(2018)11-0088-09

文献标志码 A

Effect of GDF-9 on *in vitro* maturation culture and the expression of related genes in yak COCs

WANG Yuheng^{1,2,3}, XU Yefen^{1,2*}, Suolangsizhu^{1,2}, Changbayangzong¹, GUO Min⁴,
CHENG Linghua⁴, NIU Jiaqiang^{1,2}, GONG Ga^{1,2}, WANG Gang^{1,2}, KONG Qinhui^{1,2}

- (1. Department of Animal Science, Tibet Agricultural and Animal Husbandry College, Linzhi 860000, China;
2. Provincial Key Laboratory of Tibet Plateau Animal Epidemic Disease Research, Tibet Agricultural and Animal Husbandry College, Linzhi 860000, China;
3. Tibet Veterinary Biological Pharmaceutical Factory, Lhasa 850000, China;
4. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the effects of growth differentiation factor 9 (GDF-9) on culture and the related gene mRNA expression of yak cumulus-oocyte complexes (COCs) *in vitro*. The healthy yak ovaries were collected and COCs were isolated for maturation culture *in vitro*. GDF-9 with final concentrations of 0, 200, 400, and

收稿日期: 2018-02-18

基金项目: 西藏自治区科技厅厅校联合基金项目(XZ2017ZRG-25);国家自然科学基金项目(31460604);中西部高校综合实力提升计划(502000105);国家肉牛牦牛产业体系项目(CARS-37)

第一作者: 王玉恒, 硕士研究生, E-mail: 450014811@qq.com

通讯作者: 徐业芬, 教授, 主要从事高原动物生理学研究, E-mail: xzlxxyf@163.com

600 ng/mL was separately added to the maturation medium for yak COCs culture *in vitro*, and the oocyte maturation rate was separately counted. The mRNA expression levels of *Smad 4* and cumulus cell extension related genes (*HAS 2*, *PTX 3*, *PTGS 2*) in COCs were detected by Real-time PCR. The results showed that there was no significant difference in the maturation rates of COCs treated with 0, 200, 400 and 600 ng/mL GDF-9 ($P > 0.05$). The mRNA expression of *Smad 4* gene and extension related genes (*HAS 2*, *PTX 3*, *PTGS 2*) were increased with the increasing of GDF-9 concentration. The mRNA expression of *Smad 4* and *PTX 3* in group treated with 600 ng/mL GDF-9 was the highest, which was significantly different from other treatments ($P < 0.05$). Compared with group treated with 400 ng/mL GDF-9, the mRNA expression of *HAS 2* and *PTGS 2* in 600 ng/mL GDF-9 group had no significant difference ($P > 0.05$), which was significantly different from other experimental groups ($P < 0.05$). It was found that the maturation rates of yak COCs treated with GDF-9 showed no significant differences, but GDF-9 significantly increased the expression of *Smad 4* which was the downstream molecule gene of GDF-9 in the cell signaling pathway. GDF-9 also increased the mRNA expression of cumulus cell extension genes (*HAS 2*, *PTX 3*, *PTGS 2*). These results suggested that GDF-9 might play an important role in the extension of cumulus oocytes during culturing yak COCs *in vitro*, and the mechanism might be related to the activation of *Smad* signaling pathway, but its mechanisms remained to be further studied.

Keywords yak; cumulus-oocyte complexes; *in vitro* maturation; GDF-9

牦牛主要生活在我国青藏高原海拔 3 000 m 以上的高寒地区,有耐高寒、耐粗、耐劳、善走陡坡险路等优点,尤其对西藏的经济、文化、社会发展具有非常重要的意义^[1]。但由于牦牛繁殖力低、流产率较高等缺点,严重阻碍了其体外受精、体细胞克隆等技术开展,因此研究细胞因子在牦牛卵丘卵母细胞体外成熟过程中的作用,优化体外成熟培养体系,对推动牦牛高效繁殖技术的发展与应用具有重要意义。

卵母细胞体外成熟是哺乳动物繁殖基本技术之一,广泛应用于动物繁殖学科,该技术关乎哺乳动物体外受精、克隆、转基因等生物技术^[2]。研究发现大多数哺乳动物体外成熟卵母细胞的发育能力显著低于体内成熟的卵母细胞,因此探究优化体外成熟培养体系的方法一直是研究热点。很多细胞因子在卵泡发育及成熟过程中发挥不同作用,其中转化生长分化因子在哺乳动物卵泡发育过程中就具有重要生物学作用^[3, 4],且在不同发育时期具有发挥生物效应^[5, 6]。

生长分化因子-9 (GDF-9) 是转化生长因子- β (TGF- β) 超家族成员之一^[7]。1993 年通过对 TGF- β 家族的保守区域进行 PCR 扩增,首次发现 GDF-9^[8]。GDF-9 具有 TGF- β 家族成员的典型结构,但形成同质和异质二聚体的结合方式与家族其他成员不同^[5, 9]。GDF-9 是哺乳动物重要的卵巢调节因子, GDF-9 表达水平随着卵泡发育而不断变化^[10],但也存在种间差异:在小鼠、大鼠卵巢中, GDF-9 表达始于初级卵泡阶段;在牛、羊卵巢中, GDF-9 表达始于原始卵泡阶段^[11-12]。GDF-9 以旁分泌或自分泌的

方式作用于颗粒细胞^[13],对早期动物卵泡发育、卵泡细胞增殖、卵丘扩展具有重要作用^[14-15]。有研究表明当敲除 GDF-9 后导致小鼠卵泡停止发育^[16-17],而且发现小卵泡膜细胞对 GDF-9 缺失更加敏感^[18]。GDF-9 可以促进小鼠^[19]、反刍动物^[10, 20-21]和禽类^[22]颗粒细胞增殖,抑制 FSH 诱导的颗粒细胞分化。Yeo 等^[23]在成熟小鼠卵母细胞培养液中添加外源 GDF-9 后,发现显著提高了囊胚孵化数量以及胎儿的成活率; Hussein 等^[24]在水牛成熟培养液中添加外源 GDF-9 后,发现囊胚率显著提高; Lin 和 Lee 等^[25-26]在猪卵母细胞培养液中添加外源 GDF-9 后,发现也显著提高了囊胚率。GDF-9 信号通路属于 Smad 信号通路之一^[27-28],信号通路具体转导过程为: GDF-9 结合细胞膜 ALK-5 受体后激活 BMPR2 受体并形成复合物,而后磷酸化 Smad2/3 蛋白, Smad2/3 蛋白磷酸化后与 Smad4 蛋白结合形成聚合体,穿过核膜进入细胞核内调控基因表达,从而调控细胞功能^[4, 29]。乙酰透明质酸合酶 2 (*HAS 2*)^[30-31]、穿透素 3 (*PTX 3*)^[32] 和前列腺素合成酶 2 (*PTGS 2*)^[33-34] 作为卵丘扩展的相关基因,均已被证明在卵丘扩展功能上具有重要作用。

GDF-9 是参与调控卵泡功能的最重要的细胞因子之一,但是未见在牦牛卵母细胞成熟过程中的应用研究报道,因此,探索体外成熟过程中 GDF-9 对牦牛 COCs 体外培养的影响及其分子调控机制,可以更进一步了解成熟过程中牦牛卵母细胞的发育机制,以利于提高牦牛卵母细胞体外成熟培养的质量和早期胚胎的发育能力。本研究拟以西藏自治区

林芝母牦牛为研究对象,研究 GDF-9 蛋白对牦牛卵母细胞体外成熟培养过程中卵母细胞成熟的影响,以及对 GDF-9 信号通路下游分子 *Smad 4* 基因和 COCs 扩展相关基因 (*HAS 2*、*PTX 3*、*PTGS 2*) mRNA 表达的影响,为了解 GDF-9 对牦牛卵母细胞体外成熟过程中的调控机制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

牦牛卵巢采样于西藏自治区林芝市屠宰场,为 7~8 岁龄的西藏母牦牛。试剂为 Recombinant Mouse GDF-9 Protein (R&D, 739-G9-010)、TCM199 培养液 (Gibco, 11150059)、DPBS (Gibco, C14190500) 胎牛血清 (FBS, Hyclone, 040011A)、促卵泡素 (FSH, SIGMA, F4021)、促黄体生成素 (LH, SIGMA, L9773)、雌二醇 (E2, SIGMA, E2257)、EGF (SIGMA, E4127)、半胱氨酸 (SIGMA, C7352)、丙酮酸钠 (SIGMA, P4562)、青-链霉素 (Gibco, 12340030)、肝素钠 (SIGMA, H4784)。Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司,核酸助沉剂购于 Biotek 公司,mRNA 反转录试剂盒购于 Zomanbio 公司,SYBR 定量试剂购于 Takara 公司,其他无特殊说明试剂均为国产分析纯试剂。

试验在西藏农牧学院西藏高原动物疫病研究自治区高校重点实验室进行,试验时间为 2017 年 9—12 月。

1.2 牦牛卵巢的采集及卵母细胞体外分组成熟培养

将从屠宰场取得牦牛卵巢置于 32~35 °C 生理盐水中保温,2~3 h 带回实验室。用生理盐水冲洗 2~3 次后,用 20 mL 注射器抽取卵巢表面 3~10 mm 的卵泡,在体视显微镜下挑选胞质均匀,周围有 3 层或者 3 层以上卵丘细胞的 A 级和 B 级 COCs (图 1(a) 和 (b))。然后用卵母细胞洗液 (TCM199+1%青-链霉素+24 μg/mL 丙酮酸钠+25 μg/mL 肝素钠) 清洗 2 次,再用卵母细胞成熟液 (TCM199+10%FBS+10 μg/mL FSH+10 μg/mL LH+1 μg/mL E2+10 ng/mL EGF+0.1 mg/mL 半胱氨酸+24 μg/mL 丙酮酸钠) 洗涤 2 次。将收集到的 COCs 分成对照 I 组,试验 II 组、III 组和 IV 组,分别放入预先在 CO₂ 培养箱中平衡 2~4 h 的四孔板成熟培养液中 (500 μL 卵母细胞成熟液,放置 50 枚左右卵母细胞),同时 4 组成熟培养液中分别对应加入不同浓度 GDF-9 (0 ng/mL 组、200 ng/mL 组、400 ng/mL 组、600 ng/mL 组) 于 5% CO₂、38.5 °C 及饱和湿度条件下进行成熟培养,培养 24 h 后统计 COCs 成熟率,每个试验组内设 3 个重复。

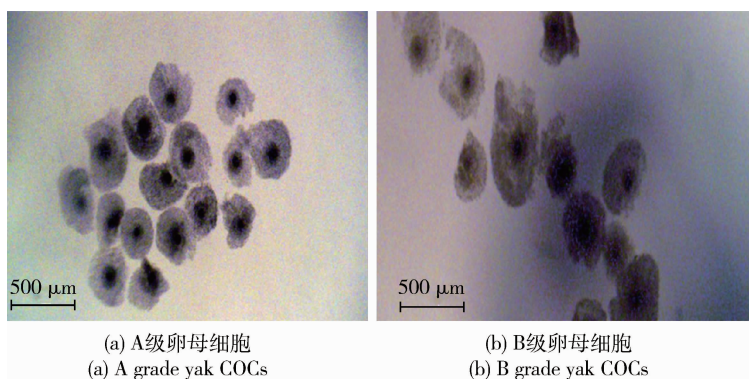


图 1 1 不同等级的牦牛 COCs

Fig. 1 Different grades of yak COCs

1.3 卵母细胞成熟率统计

将培养 24 h 的 COCs 放入 0.1% 透明质酸酶中,用吸卵针轻轻吹打获得裸卵。在体视显微镜下,根据第一极体排出情况鉴定卵母细胞是否成熟,并统计分析卵母细胞成熟率,每个试验组重复 3 次。

1.4 总 RNA 提取及反转录

将每个试验组的 COCs 用 PBS 清洗 3 次。提

取 RNA 参照 Trizol™ Reagent 试剂盒说明书进行,其中加入 10 μL 核酸助沉剂 (Biotek, RT2001)。用 Thermo 公司的 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测其 RNA 浓度和纯度 ($OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}} = 1.8\sim 2.0$),-80 °C 保存。

根据反转录试剂盒 Reverse Transcriptase kit (Zomanbio, ZR102) 说明进行 mRNA 反转录合成

cDNA,具体操作如下:反转录体系为 20 μL ,在冰上操作,在离心管中加入总 RNA 2 μL 、RT Enzyme Mix 3 μL 、RT Reaction Mix 7 μL 、RNase-Free ddH₂O 8 μL ;反应条件为 45 $^{\circ}\text{C}$ 50 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,cDNA -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 Real-time PCR 检测 mRNA 表达

从 GenBank 中检索牛基因的参考序列信息,用 Primer premier 5.0 软件设计基因引物(表 1),由上海赛百盛基因技术有限公司合成引物。用 SYBR 定量

试剂(TAKARA,A2280R)检测基因表达量。反应体系为 20.0 μL 、SYBR Premix Ex Taq II 10.0 μL ,上游和下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.8 μL ,cDNA 1.0 μL ,ddH₂O 7.4 μL 。扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,退火温度 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 s,共 40 个循环;溶解曲线测量温度为 55~95 $^{\circ}\text{C}$ 。每组 cDNA 样品重复 3 次,并通过溶解曲线分析并确定 RT-PCR 产物特异性。以管家基因 β actin 为内参,根据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 mRNA 表达量。

表 1 Real-time PCR 引物信息

Table 1 Information of primers used in Real-time PCR

基因 Gene	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature	PCR 产物/bp Product length	参考序列 NCBI reference sequence
β actin	F: CCAACTGGGACGACATGGA R: GTCTCGAACATGATCTGGGTCAT	60	148	NM_173979.3
Smad 4	F: TACCAGAACAAAGGAGTATCGTT R: CGGTAAGATATTAGCTGGAGTGAC	60	209	NM_001076209.1
HAS 2	F: ACACAGACAGGCTGAGGACAACTT R: AAGCAGCTGTGATTCCAAGGAGGA	60	133	NM_174079.2
PTGS 2	F: AAGCCTAGCACTTTCGGTGGAGAA R: TCCAGAGTGGGAAGAGCTTGCATT	60	168	NM_174445.2
PTX 3	F: CCTCAGCTATCGGTCCATAA R: ATTGAAGCCTGTGAGGTCTGC	58	296	NM_001076259.2

1.6 数据分析

采用 SPSS 19.0 软件包中 One-way ANOVA 对成熟率和基因 mRNA 表达量进行各处理组间差异显著性分析,显著平准设为 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,试验统计数据均为平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示。

2 结果与分析

2.1 GDF-9 对牦牛卵母细胞体外成熟的影响

以成熟培养液为基础培养液,分别添加 0、200、400、600 ng/mL GDF-9 培养 24 h 后,根据卵丘细胞扩散程度(图 2(a))和第一极体排出情况(图 2(b)),统计卵母细胞成熟率,结果见表 2。统计结果表明与对照组相比添加不同浓度的 GDF-9 差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 Smad 4 基因 mRNA 的表达分析

在 GDF-9 信号通路中,Smads 蛋白是将信号传导至细胞核的介导蛋白,首先受体激活型 Smad 蛋白 (Receptor Activated Smad, R-Smad) 被激活的受体磷酸化,然后与 Smad4 蛋白结合形成异源性聚合体,进入细胞核,从而调控目的基因的表达^[4, 27],故 Smad 4 在 GDF-9 信号传导过程中起着中枢性作用。因此利用 Real-time PCR 检测不同浓度 GDF-9 处理 COCs 后 Smad 4 mRNA 表达水平。由图 3 可知,Smad 4 基因 mRNA 在 COCs 中的表达量随着在成熟培养液中加入不同浓度 GDF-9 呈上升趋势,其中试验 IV 组的 Smad 4 基因表达量显著高于其他试验组 ($P < 0.05$); 试验 III 组的 Smad 4 基因 mRNA 表达量显著高于试验 II 组和对照组 ($P < 0.05$); 试验 II 组和对照组的 Smad 4 基因 mRNA 表达量差异不显著 ($P > 0.05$)。

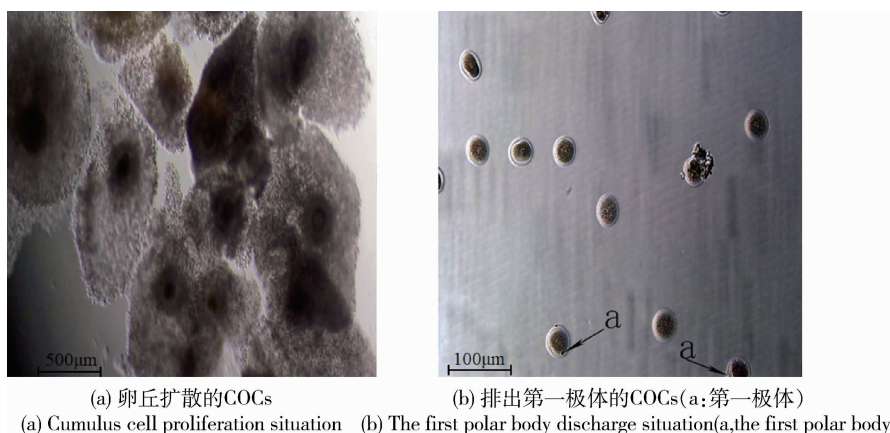


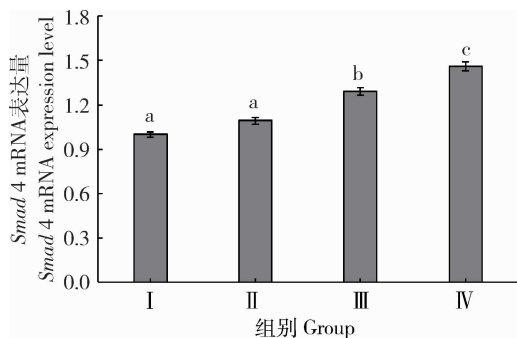
图2 卵丘扩散和第一极体排出的牦牛COCs

Fig. 2 First polar body discharge and cumulus diffusion of yak COCs

表2 成熟培养液中添加GDF-9对牦牛卵母细胞成熟率的影响

Table 2 Effects of GDF-9 in mature culture medium on the maturation rate of yak COCs

组别 Group	浓度/(ng/mL) Concentration	卵母细胞数 No. of oocytes	成熟数 No. of maturations	成熟率/% Maturation rate
I	0	108	86	79.62±2.14 a
II	200	102	82	80.39±1.72 a
III	400	109	88	80.73±1.86 a
IV	600	114	93	81.57±1.54 a

注:不同字母表示组间成熟率差异显著($P < 0.05$),相同字母表示组间成熟率差异不显著($P > 0.05$),下同。Note: Different letters mean significant differences among the groups ($P < 0.05$); Same letters mean no differences among the groups ($P > 0.05$). The same below.

I: 对照组; II: 200 ng/mL; III: 400 ng/mL; IV: 600 ng/mL。

下同。

I: Control; II: 200 ng/mL; III: 400 ng/mL; IV: 600 ng/mL. The same below.

图3 不同浓度GDF-9处理下牦牛COCs中Smad4基因表达量

Fig. 3 Expression of Smad4 mRNA in yak COCs treated with different concentrations of GDF-9

2.3 PTX 3、PTGS 2和HAS 2基因mRNA的表达分析

HAS 2^[28-29]、*PTX 3*^[30]和*PTGS 2*^[31-32]作为卵丘扩展的标记基因,均已被证明在卵丘扩展功能上具有重要作用,因此利用 Real-time PCR 检测不同浓度 GDF-9 处理 COCs 后扩展基因(*HAS 2*、*PTX 3*、*PTGS 2*)表达水平(图4、图5和图6)。由图4可知,试验IV组的*HAS 2*基因mRNA表达量显著高于试验II组和对照组($P < 0.05$),与试验III组差异不显著($P > 0.05$);试验III组、试验II组和对照组各组间的*HAS 2*基因mRNA表达量差异不显著($P > 0.05$)。由图5可知,试验IV组的*PTGS 2*基因mRNA表达量最高,显著高于其他试验组($P < 0.05$);试验III组、试验II组和对照组各组间的*PTGS 2*基因mRNA表达量差异不显著($P > 0.05$)。由图6可知,试验IV组的*PTX 3*基因mRNA表达量显著高于试验II组和对照组($P <$

0.05), 与试验 III 组差异不显著 ($P > 0.05$); 试验 III 组、试验 II 组和对照组各组间的 *PTX 3* 基因 mRNA 表达量差异不显著 ($P > 0.05$)。

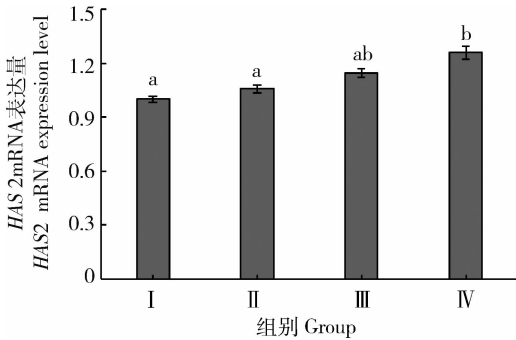


图 4 不同浓度 GDF-9 处理下牦牛 COCs 中 *HAS 2* 基因 mRNA 表达量

Fig. 4 Expression of *HAS 2* mRNA in yak COCs treated with different concentrations of GDF-9

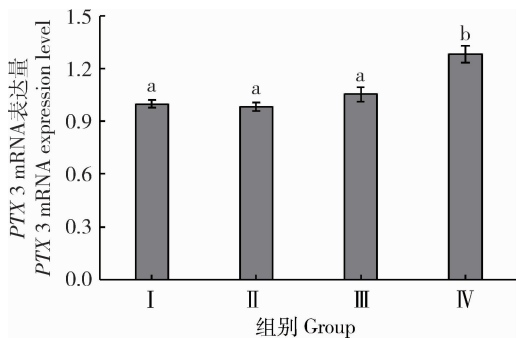


图 5 不同浓度 GDF-9 处理下牦牛 COCs 中 *PTX 3* 基因 mRNA 表达量

Fig. 5 Expression of *PTX 3* mRNA in yak COCs treated with different concentrations of GDF-9

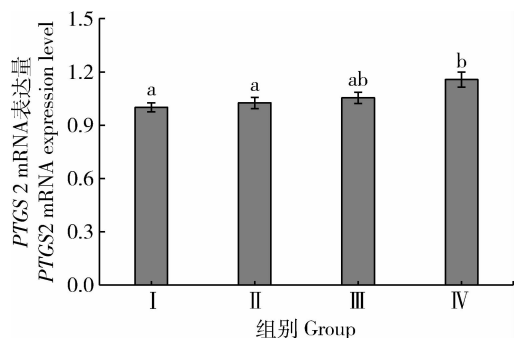


图 6 不同浓度 GDF-9 处理下牦牛 COCs 中 *PTGS 2* 基因 mRNA 表达量

Fig. 6 Expression of *PTGS 2* mRNA in yak COCs treated with different concentrations of GDF-9

3 讨论

3.1 GDF-9 对牦牛卵母细胞体外成熟的影响

转化生长因子在哺乳动物卵母细胞发育过程具有重要生物学作用^[5, 7], 且在不同发育时期具有良好的生物效应^[9, 35-36]。GDF-9 是 TGF- β 超家族成员之一, 在哺乳动物卵泡发育中有关键作用^[5], *GDF-9* 基因 mRNA 在哺乳动物卵巢的卵母细胞中表达^[15], 对卵泡和卵母细胞的生长、分化具有重要调控作用。GDF-9 对卵泡生长、分化作用主要表现在对颗粒细胞、卵泡膜细胞及卵丘卵母细胞的作用^[14]。在羊的研究中发现 GDF-9 在绵羊、山羊卵泡发育的各个阶段均有表达^[29]。研究发现 *GDF-9* 基因 mRNA 在牛卵母细胞、颗粒细胞^[12]、卵巢、子宫^[11]中均有表达, 且在卵巢中的表达量最高。近年来研究发现卵母细胞本身对卵泡发育的微环境也有重要作用, GDF-9 是重要的卵母细胞源性生长因子之一。在小鼠和牛上的研究发现, 添加外源 GDF-9 可显著提高囊胚率^[23-24]。本研究在牦牛 COCs 体外培养过程中加入外源 GDF-9 蛋白, 发现添加 GDF-9 的卵母细胞成熟率没有达到提高效果 ($P > 0.05$), 说明外源 GDF-9 可能不是直接作用于牦牛卵母细胞的成熟而是通过 GDF-9 信号通路作用于卵丘细胞产生效应。

3.2 GDF-9 对牦牛 COCs 中 *Smad 4* 基因 mRNA 的表达影响

在 TGF- β 信号通路中, Smads 蛋白是将信号传导至细胞核的介导蛋白。迄今已经发现 9 种哺乳动物的 Smads 蛋白, 包括 R-Smad、抑制型 Smad 蛋白^[37]、通用调节型 Smad 蛋白^[38], 其中 Smad4 是通用调节性 Smads 蛋白。在信号传导过程中, R-Smad 首先被激活的受体磷酸化, 然后与 Smad4 结合形成异源性聚合体, 进入细胞核, 从而调控目的基因的表达^[4, 27]。GDF-9 信号通路具有 TGF- β 信号通路的典型特征^[27-28], *Smad 4* 在 GDF-9 信号传导过程中起着中枢性作用, 本研究发现 *Smad 4* mRNA 表达水平至 400 ng/mL 组开始随着 GDF-9 浓度升高呈上升趋势, 其中 600 ng/mL GDF-9 处理组中 *Smad 4* mRNA 表达量最高, 说明 GDF-9 显著调控 COCs 中 *Smad 4* 基因 mRNA 表达水平, 推测其原因为 GDF-9 通过结合相应受体而激活信号通路, 从而导致 COCs 中 *Smad 4* 基因 mRNA 表达水平升高。

3.3 GDF-9 对牦牛 COCs 中卵丘扩展相关基因 mRNA 的表达影响

GDF-9 是卵丘扩展重要因子,在 FSH 调节下协同作用发挥卵丘扩展功能^[39-40]。Peng 和 Gui 等^[14,39]在小鼠 COCs 中发现外源 GDF-9 能促进卵丘扩展相关基因(*HAS 2*、*PTX 3*、*PTGS 2*)mRNA 表达,而且 Sugiura 等^[41]研究也发现 GDF-9 能与雌激素共同协作来促进小鼠卵丘细胞的扩散。LIN 等^[25]在猪 COCs 中发现外源的 GDF-9 可促进 *HAS 2*、*PTX 3*、*PTGS 2* 等卵丘扩展相关基因 mRNA 表达。Varnosfaderani 等^[42]在羊 COCs 中发现外源的 GDF-9 可促进卵丘扩展相关基因 *PTX 3* 和 *PTGS 2* mRNA 表达。本研究发现在添加 10 μg/mL FSH 下,COCs 中卵丘扩展相关基因(*HAS 2*、*PTX 3*、*PTGS 2*) mRNA 表达水平均随着 GDF-9 浓度升高呈上升趋势,其中 600 ng/mL GDF-9 处理组的 *PTX 3* mRNA 表达量最高;600 ng/mL GDF-9 处理组的 *HAS 2*、*PTGS 2* mRNA 表达量较高。结果说明 GDF-9 能显著影响卵丘扩展相关基因(*HAS 2*、*PTX 3*、*PTGS 2*)mRNA 表达,并呈剂量依赖性。

4 结 论

在牦牛卵丘卵母细胞体外培养过程中,添加 200、400、600 ng/mL 的 GDF-9 对牦牛卵母细胞成熟率没有显著提高效果,然而,GDF-9 可显著提高其信号通路下游分子 *Smad 4* 基因以及卵丘细胞扩展相关基因(*HAS 2*、*PTX 3*、*PTGS 2*)mRNA 表达,并呈现剂量依赖特点,提示 GDF-9 对牦牛体外培养过程中卵丘扩展有作用,其作用机制可能与激活 *Smad* 信号通路有关,有待于进一步研究。

参考文献 References

- [1] Zi X D, Lu H, Yin R H, Chen S W. Development of embryos after *in vitro* fertilization of bovine oocytes with sperm from either yaks (*Bos grunniens*) or cattle (*Bos taurus*) [J]. *Animal Reproduction Science*, 2008, 108(1-2):208-215
- [2] Reader K L, Stanton J L, Juengel J L. The role of oocyte organelles in determining developmental competence [J]. *Biology-Basel*, 2017, 6(3):1-22
- [3] Maric S, Bulic F, Belovari T, Krcmar S. Analysis of fibroblast growth factor influence on growth and developmental potential of rat fetuses *in vitro* culture model [J]. *Collegium Antropologicum*, 2007, 31(3): 911-918
- [4] Heldin C H, Miyazono K, Dijke P. TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins [J]. *Nature*, 1997, 390(6659): 465-471
- [5] Juengel J L, McNatty K P. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development [J]. *Human Reproduction Update*, 2005, 11(2): 143-160
- [6] Raty M, Ketoja E, Pitkanen T, Ahola V, Kananen K, Peippo J. *In vitro* maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes and embryo quality after verification [J]. *Cryobiology*, 2011, 63(3): 245-255
- [7] Ashry M, Lee K, Mondal M, Datta T K, Folger J K, Rajput S K, Zhang K, Hemeida N A, Smith G W. Expression of TGF-beta superfamily components and other markers of oocyte quality in oocytes selected by brilliant cresyl blue staining: Relevance to early embryonic development [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2015, 82(3): 251-264
- [8] Choi Y, Rajkovic A. Genetics of early mammalian folliculogenesis [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, 63(5):579-590
- [9] Liao W X, Moore R K, Otsuka F, Shimasaki S. Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9. Implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(6):3713-3719
- [10] Monti M, Redi C. Oogenesis specific genes (*Nobox*, *Oct 4*, *Bmp 15*, *Gdf 9*, *Oogenesin 1* and *Oogenesin 2*) are differentially expressed during natural and gonadotropin-induced mouse follicular development [J]. *Molecular Reproduction and Development* 2009, 76(10): 994-1003
- [11] Ghani M A, El-Sherry T M, Abdelhafeez H H. Effect of growth differentiation factor-9 (GDF-9) on the progression of buffalo follicles in vitrified-warmed ovarian tissues [J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2016, 51(5):795-803
- [12] 欧阳效晴,杨淑青,张春强,栗瑞兰,张通,张家新. 生长分化因子 9 在牛卵丘卵母细胞复合体体外成熟过程中的表达 [J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(10): 1569-1575
- [13] OuYang X J, Yang S Q, Zhang C Q, Li R L, Zhang T, Zhang J X. Expression of growth differentiation factor 9 in maturation of bovine cumulus oocyte complex [J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2013, 44(10): 1569-1575 (in Chinese)
- [14] McNatty K P, Juengel J L, Reader K L, Lun S, Myllymaa S, Lawrence S B, Western A, Meerasahib M F, Mottershead D G, Groome N P, Ritvos O, Laitinen M P. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function [J]. *Reproduction*, 2005, 129(4): 473-480
- [14] Peng J, Li Q, Wigglesworth K, Rangarajan A, Kattamuri C, Peterson R T, Eppig J J, Thompson T B, Matzuk M M.

- Growth differentiation factor 9: Bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(8):E776-785
- [15] Castro F C, Cruz M H, Leal C L. Role of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and their importance in mammalian female fertility—a review[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2016, 29(8):1065-1074
- [16] Dong J, Albertini D F, Nishimori K, Kumar T R, Lu N, Matzuk M M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis[J]. *Nature*, 1996, 383(6600): 531-535
- [17] 习欠云, 焦莉, 肖敏, 张永亮. GDF-9 下调转基因小鼠模型对繁殖与生长的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(7): 1157-1162
- Xi Q Y, Jiao L, Xiao M, Zhang Y L. Effects of GDF-9 down-regulated transgenic mouse model on reproduction and growth[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2015, 46(7): 1157-1162(in Chinese)
- [18] Spicer L J, Aad P Y, Allen D T, Mazerbourg S, Payne A H, Hsueh A J. Growth differentiation factor 9 (GDF-9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: Influence of follicle size on responses to GDF-9 [J]. *Biology of Reproduction*, 2008, 78(2):243-253
- [19] Vitt U A, Hayashi M, Klein C, Hsueh A J. 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]. *Biology of Reproduction*, 2000, 62(2):370-377
- [20] Spicer L J, Aad P Y, Allen D, Mazerbourg S, Hsueh A J. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells[J]. *Journal of Endocrinology*, 2006, 189(2):329-339
- [21] McNatty K P, Juengel J L, Reader K L, Lun S, Myllymaa S, Lawrence S B, Western A, Meerasahib M F, Mottershead D G, Groome N P, Ritvos O, Laitinen M P. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants [J]. *Reproduction*, 2005, 129(4): 481-487
- [22] Johnson P A, Dickens M J, Kent T R, Giles J R. Expression and function of growth differentiation factor-9 in an oviparous species, *Gallus domesticus* [J]. *Biology of Reproduction*, 2005, 72(5):1095-1100
- [23] Yeo C X, Gilchrist R B, Thompson J G, Lane M. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice[J]. *Human Reproduction*, 2008, 23(1): 67-73
- [24] Hussein T S, Sutton-McDowall M L, Gilchrist R B, Thompson J G. Temporal effects of exogenous oocyte-secreted factors on bovine oocyte developmental competence during IVM[J]. *Reproduction Fertility and Development*, 2011, 23(4):576-584
- [25] Lin Z L, Li Y H, Xu Y N, Wang Q L, Namgoong S, Cui X S, Kim N H. Effects of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 on the *in vitro* maturation of porcine oocytes [J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2014, 49(2): 219-227
- [26] Lee G S, Kim H S, Hwang W S, Hyun S H. Characterization of porcine growth differentiation factor-9 and its expression in oocyte maturation [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2008, 75(5):707-714
- [27] Itoh S, Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2007, 19(2): 176-184
- [28] Mottershead D G, Ritter L J, Gilchrist R B. Signaling pathways mediating specific synergistic interactions between GDF-9 and BMP15 [J]. *Molecular Human Reproduction*, 2012, 18(3):121-128
- [29] 郑爱燕, 吴曼, 尚利青, 丁家桐. 山羊 GDF-9 基因在卵丘卵母细胞复合体体外成熟过程中的表达 [J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(6): 671-677
- Zheng A Y, Wu M, Shang L Q, Ding J T. Expression of goat GDF-9 gene in maturation of cumulus oocyte complex during *in vitro* maturation[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2010, 41(6): 671-677(in Chinese)
- [30] Chen L, Russell P T, Larsen W J. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1993, 34(1):87-93
- [31] Elvin J A, Clark A T, Wang P, Wolfman N M, Matzuk M M. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary[J]. *Molecular Endocrinology*, 1999, 13(6): 1035-1048
- [32] Varani S, Elvin J A, Yan C, DeMayo J, DeMayo F J, Horton H F, Byrne M C, Matzuk M M. Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility [J]. *Molecular Endocrinology*, 2002, 16(6): 1154-1167
- [33] Lim H, Paria B C, Das S K, Dinchuk J E, Langenbach R, Trzaskos J M, Dey S K. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice[J]. *Cell*, 1997, 91(2): 197-208
- [34] Elvin J A, Yan C, Matzuk M M. Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(18):10288-10293
- [35] Chang H, Brown C W, Matzuk M M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily[J].

- Endocrine Reviews*, 2002, 23(6):787-823
- [36] Findlay J K, Drummond A E, Dyson M L, Baillie A J, Robertson D M, Ethier J F. Recruitment and development of the follicle; The roles of the transforming growth factor-beta superfamily [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2002, 191(1):35-43
- [37] Luukko K, Ylikorkala A, Makela T P. Developmentally regulated expression of *Smad 3*, *Smad 4*, *Smad 6*, and *Smad 7* involved in TGF-beta signaling[J]. *Mechanisms of Development*, 2001,101(1-2):209-212
- [38] Wong C, Rougier-Chapman E M, Frederick J P, Datto M B, Liberati N T, Li J M, Wang X F. Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1999,19(3):1821-1830
- [39] Gui L M, Joyce I M. RNA interference evidence that growth differentiation factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice[J]. *Biology of Reproduction*, 2005, 72(1):195-199
- [40] Tang K, Yang W C, Li X, Wu C J, Sang L, Yang L G. GDF-9 and bFGF enhance the effect of FSH on the survival, activation, and growth of cattle primordial follicles [J]. *Animal Reproduction Science*, 2012, 131(3-4):129-134
- [41] Sugiura K, Su Y Q, Li Q, Wigglesworth K, Matzuk M M, Eppig J J. Estrogen promotes the development of mouse cumulus cells in coordination with oocyte derived GDF-9 and BMP15[J]. *Molecular Endocrinology*, 2010, 24(12): 2303-2314
- [42] Varnosfaderani S R, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini S M, Khashouei E A, Abbasi H, Hosseinnia P, Nasr-Esfahani M H. Importance of the GDF-9 signaling pathway on cumulus cell expansion and oocyte competency in sheep [J]. *Theriogenology*, 2013, 80(5): 470-478

责任编辑:杨爱东