

# 生长因子 EGF、bFGF 对猪孤雌胚体外发育的影响

刘吉<sup>1,2</sup>, 潘登科<sup>1</sup>, 张莉<sup>1</sup>, 牟玉莲<sup>1</sup>, 张勇<sup>1</sup>,  
杨述林<sup>1</sup>, 王子荣<sup>2</sup>, 冯书堂<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094;

2. 新疆农业大学动物科学学院, 乌鲁木齐 830052)

**摘要:** 在胚胎发育的不同阶段, 分别在培养基中添加 EGF 和 bFGF, 研究 EGF 和 bFGF 对猪孤雌胚体外发育的作用。结果表明: 在 1 细胞阶段添加 EGF 或 bFGF, 添加 EGF 能够显著提高孤雌胚的卵裂率 ( $P < 0.05$ ); 2~4 细胞阶段添加 EGF 和 bFGF, 添加 EGF 组和添加 bFGF 组的囊胚率都显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而添加 bFGF 组的囊胚率和囊胚细胞数都略高于对照组和添加 EGF 组。说明 EGF 和 bFGF 有利于猪孤雌胚的体外发育, 而且, bFGF 能够通过提高囊胚细胞数而提高猪孤雌胚的质量。

**关键词:** 生长因子; 猪; 体外发育

中图分类号: S828.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)01-0036-04

## Effects of EGF or bFGF on the Development of Porcine Parthenogenetic Embryos *in vitro*

LIU Ji<sup>1,2</sup>, PAN Deng-ke<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup>, MU Yu-lian<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>, YANG Shu-lin<sup>1</sup>,  
WANG Zi-rong<sup>2</sup>, FENG Shu-tang<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Department of Animal Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

**Abstract:** EGF and bFGF were added into the culture medium in the different stages. We studied the effects of epidermal growth factor or basic fibroblast growth factor on the development of porcine parthenogenetic embryos *in vitro*. The results as follows: The addition of EGF significantly enhanced the cleavage rate of porcine parthenogenetic embryos ( $P < 0.05$ ); The addition of EGF or bFGF significantly enhanced the rates of blastocysts formation of 2-4-cell porcine parthenogenetic embryos ( $P < 0.05$ ); Additionally, bFGF had more numbers of blastocysts and higher rates of blastocysts formation than the EGF's and the control. In conclusion, EGF and bFGF are propitious to the development of porcine parthenogenetic embryos *in vitro*. And bFGF increased the quality of blastocysts by increasing total cell numbers in porcine parthenogenetic embryos.

**Key words:** growth factor; porcine; *in vitro* culture

胚胎体外培养体系至关重要, 它直接影响胚胎体外发育及最终的妊娠结果<sup>[1]</sup>。猪的胚胎体外培养发育率不高, 体外受精胚和克隆胚的发育率仅 10%~40%。因此如何提高体外胚胎发育率, 创建一种理想的胚胎体外培养体系, 一直是该领域研究的重

点和热点。有关于培养基中添加生长因子对猪孤雌胚体外发育影响的研究报道还很少, 尤其是表皮生长因子(EGF)和碱性成纤维促进因子(bFGF)。有研究表明, 在无蛋白质的培养基中添加碱性成纤维促进因子(bFGF)对兔胚泡发育有促进作用, 而且认

收稿日期: 2006-01-16

基金项目: 科技部“863”项目(2003AA205103); 科技部“十五”国家攻关项目(2004BA717B-01)

作者简介: 刘吉(1977-), 男, 吉林扶余人, 硕士, 主要从事胚胎工程研究, E-mail: lljj361@163.com

\* 通讯作者: 冯书堂(1945-), 男, 研究员, 博士生导师, E-mail: Fst508@sina.com; Tel: 010-62815893

为添加 bFGF 能够克服阻滞,提高胚胎发育率<sup>[2]</sup>。但是,碱性成纤维促进因子(bFGF)对猪胚胎体外发育影响的报道目前还未见到。故本研究在猪孤雌胚胎发育的 1 细胞和 2~4 细胞阶段分别添加 EGF 和 bFGF,研究其对胚胎体外发育的影响,目的是为克隆猪以及用体细胞克隆技术生产转基因猪提供技术支持,提高克隆猪的成功率。

## 1 材料与方 法

所用药品除特别说明外均购自 Sigma 公司。

### 1.1 猪卵母细胞的采集

用带有 16G 或 18G 针头的 10 mL 无菌注射器(吸取少量的 TL-HEPES-PVA 或 PBS-PVA 洗卵液),抽取直径 3~6 mm 卵泡中的卵母细胞,1 h 内抽完。将抽取液缓慢注入置于 37 ℃ 恒温水浴锅的 50 mL 尖底离心管中,使卵母细胞自然沉降。沉降 15 min 左右可看到明显的界限,弃上清液,再加入在 37 ℃ 恒温水浴锅中预温的 TL-HEPES(加入 4% 的 BSA 或 PVA)洗卵液,静置 10 min 左右,再弃上清液,加入在 37 ℃ 恒温水浴锅中预温的 TL-HEPES-PVA 或 PBS-PVA,以此方法洗涤 2~3 次。然后将其转移到划线的 60 mm 培养皿中,在实体显微镜下迅速挑出胞质均匀的且有多层完整致密的卵丘细胞包围的卵母细胞,用 TL-HEPES-PVA 或 PBS-PVA 洗涤 2~3 次,再用成熟培养液洗涤 3 次后进行成熟培养。

### 1.2 卵丘-卵母细胞复合体的体外培养

体外成熟培养液为 NCSU23 (North Carolina State University 23),再补充加入 10 ng/mL 表皮生长因子(EGF),50 IU/mL 的 hCG,50 IU/mL 的 PMSG,10% 的猪卵泡液(PFF)和 10% 的胎牛血清(FCS)。液滴式培养,每 50 mL 液滴内培养 25 枚,培养条件为 38.5 ℃ 或 39 ℃,5%CO<sub>2</sub> 的空气,饱和湿度。培养 22 h 后换液,换成无 hCG 和 PMSG 的 NCSU-23 成熟培养液继续培养 22 h。

### 1.3 成熟卵母细胞的孤雌激活

将经成熟培养 44 h 的卵丘-卵母细胞复合体(COCs)转移到 0.1% 的透明质酸酶液滴中,用 100 μL 的移液器反复吹打至完全脱去卵丘细胞,在体视显微镜下挑选卵黄膜完整、卵周隙清楚、胞质均匀的、排出第一极体的成熟卵母细胞进行激活。

上述卵母细胞放入融合液中平衡 20 s 左右,然后按每批 40~50 枚转移事先铺好融合液的融合槽

(电极宽度为 500 μm,美国 BTX)内,卵与卵之间要保持均匀的距离。再施加一个 30 μs,1.2kV/cm 的直流电脉冲诱导激活。取出处理的卵母细胞,在事先平衡的培养液中洗涤 3 遍后,转入石蜡油覆盖并预先在 CO<sub>2</sub> 培养箱中平衡至少 2 h 的加有 7.5 μg/mL CB 的微滴培养液内培养 3~5 h,再取出用不加 CB 的同种培养液洗 3 遍后转移到胚胎培养液微滴中继续培养。

### 1.4 孤雌胚的体外培养

(1)以 NCSU23+0.4%BSA 为胚胎培养液,分别添加 EGF、bFGF 和 EGF+bFGF,添加量均为 10 ng/mL,观察其是否能提高体外胚胎的卵裂率和囊胚率;

(2)以 NCSU23+0.4%BSA 为胚胎培养液,在 2 细胞后,换成分别添加了 EGF 和 bFGF 的 NCSU23+0.4%BSA 的培养液继续培养,观察其对囊胚形成率和囊胚细胞数的影响;

以上试验至少重复 3 次,均以液滴式培养为主,液滴大小为 50 μL,每液滴中培养 20~25 枚卵,培养条件为 5%CO<sub>2</sub> 的空气、39 ℃、100%湿度,培养第 3 天观察卵裂率,继续培养到第 6~7 天观察囊胚率,以及进行荧光染色鉴定。

### 1.5 囊胚细胞计数

将囊胚在含 3.7% 多聚甲醛的 DPBS 中洗涤 3 遍后固定 10 min;然后将固定后的囊胚转移到含 10 μg/mL Hoechst33342(bisbenzimidazole)的 DPBS 中,避光孵育 10 min;染色结束后,将囊胚转移到载玻片上,再加 2 μL 甘油于囊胚液滴上,用 9:1 的凡士林/石蜡在其四角点四个柱,盖上盖玻片,在实体显微镜下小心按压盖玻片,使卵受压后稍微膨大但不至于破碎为宜,用指甲油封片。然后,在荧光显微镜下用紫外激发,观察细胞数<sup>[3]</sup>。

### 1.6 数据统计

用 SAS 统计软件中的 t-TEST 对数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 在胚胎培养液中添加 EGF 和 bFGF 对猪胚胎发育的影响

用添加 EGF 和 bFGF 的胚胎培养基培养孤雌胚,结果(表 1)表明,EGF 能显著提高孤雌胚的卵裂率,但是不能提高囊胚率。而 bFGF 单独添加或与 EGF 联合添加,卵裂率和囊胚率没有显著差异。

表 1 胚胎培养基 NCSU23 中添加 EGF 和 bFGF 对猪胚胎发育的影响

Table 1 Effect of EGF or bFGF during IVC on the development of porcine parthenogenetic embryos

	培养激活 卵数 No. of oocytes used	卵裂数(%±SE) No. of cleaved embryos (%±SE)	囊胚数 (%±SE) No. of blastocysts (%±SE)
对照组	80	55(68.00±2.00 <sup>b</sup> )	17(21.11±1.92 <sup>a</sup> )
EGF	68	50(73.45±1.83 <sup>a</sup> )	15(22.13±1.53 <sup>a</sup> )
bFGF	74	52(68.49±1.59 <sup>b</sup> )	15(19.61±2.44 <sup>a</sup> )
EGF+bFGF	74	53(71.50±4.76 <sup>ab</sup> )	18(24.22±2.60 <sup>a</sup> )

同一列内上标字母不同代表差异显著( $P<0.05$ )。下表同

Within the same column, values with different superscripts were significantly different( $P<0.05$ ). The same as below

## 2.2 42~44h 后在胚胎培养液中添加 EGF 和 bFGF 对猪孤雌胚发育的影响

在猪孤雌胚培养到 42~44 h 即 2~4 细胞阶段,向胚胎培养基 NCSU23 内分别添加 10 ng/mL 的 EGF 和 bFGF,用以观察不同生长因子对孤雌胚早期发育的影响,结果如表 2。EGF 和 bFGF 都能提高囊胚率,但却不能提高囊胚细胞数(如图 1~3)。bFGF 与 EGF 相比,虽差异不显著,但添加了 bFGF 后的囊胚率和囊胚细胞数都略高于 EGF 的。

表 2 在 44 h 后胚胎培养液中添加不同的生长因子对猪孤雌胚发育的影响

Table 2 Effect of EGF or bFGF during IVC on the development of porcine parthenogenetic embryos in 44 h

	培养激活 卵数 No. of oocytes used	囊胚数(%±SE) No. of blastocysts (%±SE)	囊胚细胞数 (±SE) No. of blastocysts cells(±SE)
对照组	156	30(19.01±1.72 <sup>b</sup> )	40.80±8.23 <sup>a</sup>
EGF	130	47(36.20±5.37 <sup>a</sup> )	31.40±9.96 <sup>a</sup>
bFGF	147	65(44.25±5.83 <sup>a</sup> )	43.25±9.74 <sup>a</sup>

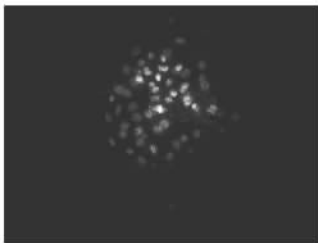


图 1 2~4 细胞阶段添加 bFGF 猪囊胚细胞数 Hoechst33342 染色 100×

Fig. 1 The numbers of blastocysts cells cultured in the medium supplemented with bFGF at 2-4-cells stage, stained with Hoechst 33342

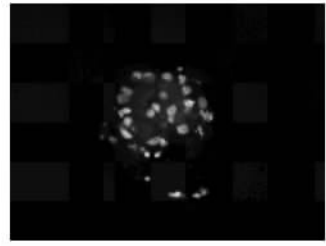


图 2 2~4 细胞阶段添加 EGF 猪囊胚细胞 Hoechst33342 染色 100×

Fig. 2 The numbers of blastocysts cells cultured in the medium supplemented with EGF at 2-4-cells stage stained with Hoechst 33342

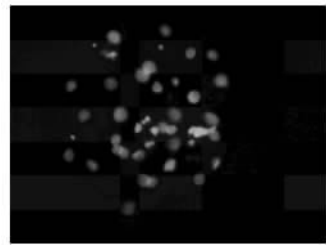


图 3 未添加生长因子的猪囊胚细胞数 Hoechst33342 染色 200×

Fig. 3 The numbers of blastocysts cells cultured in the medium no growth factors supplemented, stained with Hoechst 33342

## 3 讨论

胚胎在体内发育过程中,来源于母畜生殖道分泌的生长因子对附植前的胚胎发育起着重要的作用<sup>[4]</sup>。胚胎在体外培养过程中,向培养液内添加此类生长因子是否对胚胎的发育具有促进作用,研究人员已经做了大量的研究,已取得了一定的研究进展。本研究在猪孤雌胚的不同体外发育阶段向 NCSU-23 中添加了 EGF 和 bFGF,以研究其对胚胎体外发育的作用,结果是 EGF 能显著提高猪孤雌胚体外发育的卵裂率和囊胚率,bFGF 能够显著提高其囊胚率。

表皮生长因子(EGF)是一种含 53 个氨基酸的单链多肽物质,最初是由 Cohen<sup>[5]</sup>从小鼠颌下腺中分离出,之后在多种动物如兔、羊、猪等体内发现存在 EGF。母源性 EGF 能够以旁分泌的形式作用于胚胎中的 EGF<sub>r</sub>,刺激胚胎细胞分裂增殖,使早期胚胎卵裂率提高,囊胚发育率提高。

目前,关于 EGF 对猪胚胎体外发育作用已有研究报道<sup>[6~8]</sup>。韩国的 Lee 等<sup>[8]</sup>于 2005 年对猪着床

前胚胎 EGF 和 EGF 受体的表达情况做了详细的报道。利用 RT-PCR 检测猪 IVF 和 SCNT 胚胎 EGF 和 EGF<sub>r</sub>(受体)的表达,发现克隆胚胎和体外受精卵从成熟的卵母细胞到桑椹胚和囊胚均有 EGF mRNA 的表达,而且,EGF 的表达量在 2 细胞后有减少的趋势,因此可以推测 2 细胞后添加 EGF 有可能促进胚胎发育;同时发现 EGF<sub>r</sub> 仅在 2 细胞、桑椹胚和囊胚阶段表达,而在 4~8 细胞内未见表达。因此,可以说在桑椹胚前,2 细胞后添加 EGF 对胚胎发育的影响要到桑椹胚阶段才能起作用,或通过其他途径而起作用。Lee 等认为在体外培养的核移植胚 1 细胞阶段添加 10 ng/mL 的 EGF,能够促进胚胎的卵裂,但不能提高其囊胚率;在 2 细胞后添加 10 ng/mL 的 EGF,能增加囊胚细胞数,但不能提高囊胚发育率。这个结果与本研究的结果正好相反。本研究得出的结果是 EGF 提高了胚胎的囊胚率,而囊胚细胞数不但没提高反而降低。原因可能是本试验所用胚胎为猪的孤雌胚, Lee 等用的是体外受精卵和体细胞核移植胚,胚胎类型不同。本试验同时在激活后的 1 细胞期在培养液中添加了 EGF,结果为能够显著提高猪孤雌胚的卵裂率,而囊胚率略为下降。与 Lee 等的结果部分相同。这也证明了 EGF<sub>r</sub> 存在于成熟卵母细胞和 2 细胞内,并与添加的 EGF 结合发挥了作用。

碱性成纤维促进因子(bFGF)和酸性成纤维促进因子(aFGF)都是成纤维促进因子基因家族中的一员。其中,bFGF mRNA 被证明存在于小鼠附植前的囊胚内<sup>[9]</sup>,而对于绵羊附植前的胚胎,bFGF mRNA 从受精卵到囊胚逐渐减少<sup>[10]</sup>。附植前的兔胚胎能够分泌并能结合 bFGF,刺激体外胚胎的原肠胚的形成<sup>[11]</sup>。Anupma 等<sup>[12]</sup>认为尽管 aFGF 和 bFGF 属于同一蛋白家族,但是,它们可能对猪胚胎发育起着不同的作用。但在猪胚胎内未见有 bFGF 及其受体存在的报道。本试验中,2 细胞后添加 10 ng/mL 的 bFGF,能显著提高胚胎的囊胚率,囊胚细胞数也略有增加,而且好于添加 EGF 组。但在激活后 1 细胞期添加,对卵裂率和囊胚率均无效果。从本试验的结果来看,可能与 EGF 的相似,bFGF 受体可能存在于猪胚胎的 2~4 细胞期之后。具体原因有待通过分子手段如 RT-PCR 技术进一步研究证明。

总之,胚胎培养基 NCSU-23 添加 10 ng/mL EGF 或 10 ng/mL bFGF 对来自初情期前卵巢卵母

细胞的猪孤雌胚的发育具有促进作用。

#### 参考文献:

- [1] Cutting R, Pritchard J, Clarke H, *et al.* Establishing quality control in the new IVF laboratory[J]. *Hum Fertil (Camb)*, 2004, 7(2): 119~125.
- [2] Hrabe de Angelis M, Grundker C, Herrmann B G, *et al.* Promotion of gastrulation by maternal growth factor in cultured rabbit blastocysts [J]. *Cell Tissue Res*, 1995, 282(1):147~154.
- [3] 潘登科. 影响猪体细胞克隆胚胎发育能力因素研究[D]. 北京:中国农业大学,2005.
- [4] Kaye P L. Preimplantation growth factor physiology [J]. *Rev Reprod*, 1997, 2:373~386.
- [5] Cohn S. Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1960, 46(3):302~311.
- [6] Abeydeera L R, Wang W H, Cantley T C, *et al.* Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization [J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 51:395~401.
- [7] Wei Z, Park K W, Day B N, *et al.* Effect of epidermal growth factor on preimplantation development and its receptor expression in porcine embryos[J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60(4):457~462.
- [8] Lee G S, Kim H S, Hyun S H, *et al.* Effect of epidermal growth factor in preimplantation development of porcine cloned embryos [J]. *Mol Reprod Dev*, 2005, 71(1):45~51.
- [9] Campbell W J, Miller K A, Anderson T M, *et al.* Expression of fibroblast growth factor receptors by embryonal carcinoma cells and early mouse embryos[J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1992, 28:61~66.
- [10] Watson A J, Watson P H, Arcellana-Panlilio M, *et al.* A growth factor phenotype map for ovine preimplantation development [J]. *Biol Reprod*, 1994, 50: 725~733.
- [11] Deangelis M H, Grundker C, Herrmann B G, *et al.* Promotion of gastrulation by maternal growth factor in cultured rabbit blastocysts[J]. *Cell Tissue Res*, 1995, 282:147~154.
- [12] Gupta A, Bazer F W, Jaeger L A. Immunolocalization of acidic and basic fibroblast growth factors in porcine uterine and conceptus tissues[J]. *Biol Reprod*, 1997, 56(6): 1 527~1 536.