

山羊 *GDF9* 基因在卵丘卵母细胞复合体体外成熟过程中的表达

郑爱燕^{1,2}, 吴曼¹, 尚利青¹, 丁家桐^{1*}

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 苏州市立医院生殖与遗传中心, 苏州 225000)

摘要: 本研究采用实时荧光定量 PCR 技术, 从 mRNA 水平探讨了山羊卵丘卵母细胞复合体体外成熟 (IVM) 过程中 (0、6、12、18、24 和 27 h) *GDF9* 基因的相对表达变化, 分析其与卵丘细胞扩散之间的关系。结果表明, *GDF9* mRNA 在山羊卵丘卵母细胞复合体体外成熟过程中均有表达, 且在成熟培养初期表达量较低, 其表达峰值出现在 IVM 12 h, 与卵丘细胞开始扩散的时间一致, 之后又有所下降。由此推测, *GDF9* 基因在山羊卵丘扩散和卵母细胞体外成熟过程中起着重要的作用。

关键词: 山羊; *GDF9*; 卵丘卵母细胞复合体; 体外成熟; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S827; S813.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)06-0671-07

Expression of Growth Differentiation Factor 9 in Goat COCs during *in vitro* Maturation

ZHENG Ai-yan^{1,2}, WU Man¹, SHANG Li-qing¹, DING Jia-tong^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. The Center for Reproduction and Heredity, Suzhou Medicine Hospital, Suzhou 225000, China)

Abstract: To analyze the relationship between *GDF9* gene and expansion of cumulus-oocyte complex (COCs), the expression of *GDF9* in goat COCs during oocytes *in vitro* maturation (IVM) (0, 6, 12, 18, 24 and 27 h) was detected by fluorescent quantitative RT-PCR method. The result showed that *GDF9* mRNA were expressed at low levels in immature oocytes and increased to the highest level at 12 h of IVM, which coincides with the time of cumulus cell expansion, then declined slowly during IVM, with a slight increase at the end of IVM. The expression pattern of *GDF9* suggested that it might be important in cumulus expansion and oocyte maturation of goat.

Key words: goat; *GDF9*; COCs; *in vitro* maturation; real-time fluorescence quantitative PCR

生长分化因子 9 (growth differentiation factor 9, *GDF9*) 是由卵母细胞分泌的一种生长因子, 属于 TGF- β 超家族中的一员, 于 1993 年由 McPherron 等首次鉴定^[1], 由于其在卵母细胞中专一性表达而受到重视。利用原位杂交和免疫组化研究发现, *GDF9* mRNA 和蛋白在许多哺乳动物卵母细胞中都有表达^[2-5]。但是, 随后的研究表明 *GDF9* 在卵巢组织中的颗粒细胞^[6-8] 以及非卵巢组织, 包括下丘脑、垂体和睾丸中也有表达^[9-10]。 *GDF9* 参与调节卵

泡发生和卵母细胞成熟, 在卵泡发生的大部分阶段都有表达^[11-12], 在受精后以及植入前胚胎中也有表达^[13]。研究表明, 在卵母细胞缺失的条件下, *GDF9* 可以部分模拟卵母细胞的功能, 包括调节颗粒细胞黄体合成^[14], 抑制 LH 受体表达^[12], 促进颗粒细胞生长^[15], 以及调节卵丘扩散^[16]。

在腔前卵泡发生时, 随着卵母细胞的生长, *GDF9* 水平急剧升高, 然后在卵母细胞排卵前保持在较高水平^[11]。对小鼠窦前卵泡的研究表明, 在体

收稿日期: 2009-05-15

作者简介: 郑爱燕 (1983-), 女, 江苏苏州人, 硕士, 主要从事胚胎工程与生物技术研究, 现于苏州市立医院生殖与遗传中心工作, E-mail: 36663735@qq.com

* 通讯作者: 丁家桐, E-mail: jt ding@yzu.edu.cn

内发育过程中,*GDF9*的表达水平逐渐升高,且在成熟前的卵母细胞中最高;而在体外培养过程中,*GDF9*的表达水平整体呈下降趋势,仅在成熟前有所上升^[17]。但是,在猪的卵母细胞体外培养过程中,*GDF9*的表达水平始终呈下降趋势^[18]。

研究表明,*GDF9*在山羊初级、次级、有腔卵泡的颗粒细胞及卵母细胞中均有表达^[19],但是关于其在体外培养的卵母细胞及颗粒细胞中表达变化的研究尚未见报道。本试验以*GAPDH*为内参基因,采用实时荧光定量PCR技术,检测了山羊卵母细胞体外培养过程中*GDF9* mRNA的相对表达丰度,以探讨*GDF9*对卵母细胞体外成熟和卵丘细胞扩散的影响,为进一步研究山羊*GDF9*的生物学功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验对象 山羊卵巢采自当地山羊屠宰场,于采集后3 h内运回实验室。

1.1.2 试验试剂 RNA提取试剂Trizol购自美国Invitrogen公司;First Strand cDNA Synthesis Kit购自Fermentas(MBI)公司;Goldview购自SBS Genetech Co. Ltd;Biospin胶回收试剂盒购自杭州博日科技有限公司;大肠杆菌DH5 α 由本实验室保存;载体pMD19-T和SYBR Premix Ex Taq购自大连宝生物工程有限公司。TCM-199(Tissue Culture Medium 199)购自GIBCO(11150-059);丙酮酸钠(P5280)、E2(E2758)、青霉素钠(P7794)、硫酸链霉素(S9137)、石蜡油(M8410)购自Sigma;FSH(00867357)、LH(02267500)购自BIONICHE;FBS购自HYCLONE(SH3007101)。

1.2 试验方法

1.2.1 山羊卵母细胞的体外成熟 切割法获得卵母细胞,选择胞质均匀,且含有3层以上卵丘细胞的卵丘卵母细胞复合体(COCs)进行成熟培养,成熟培养液为:TCM199+10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LH+10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ FSH+1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ E₂+10% FBS+0.25 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 丙酮酸钠+100 IU $\cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素钠+100 IU $\cdot \text{mL}^{-1}$ 硫酸链霉素,培养条件是38.5 $^{\circ}\text{C}$,5% CO₂。

1.2.2 卵丘扩散判定 根据Prochazka等的方法判定卵丘的扩散程度^[7],分别在培养的0、6、12、18、24和27 h进行检测。记分法如下:0为没反应;1为最小可见反应(如,卵丘细胞外层变圆,发亮);2

为COC外层扩散;3为除了放射冠外所有的COC层均扩散;4为所有的COC层均扩散。卵丘扩散程度通过下列公式计算:(每个COC得分的总和)/(4 \times COCs个数) \times 100%。每个时间段进行评分的COCs为60个,重复3次。

1.2.3 总RNA提取和cDNA合成 在培养的0、6、12、18、24和27 h分别采集60个发育良好的COCs,根据Trizol Regent Kit(Invitrogen公司)说明书提取总RNA,并用RNase-free的DNase I(TaKaRa公司)处理,以去除DNA污染,最后用1.2%的琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白分析仪进行检测,以保证RNA样品质量可靠。cDNA第一链的合成按照Promega公司M-MLV Reverse Transcriptase使用说明进行。

1.2.4 引物设计 分别参考GenBank报道的山羊*GDF9*(AY681349)序列和*GAPDH*(AJ431207)序列,利用Primer5.0各设计1对引物。*GDF9*的上游序列为:5'-CCCCAGAATGAATGTGAGC-3',下游序列为:5'-GAGCCATACCGATGTCCAA-3';*GAPDH*的上游序列为:5'-ACACCCTCAAGAT-TGTCAGC-3',下游序列为:5'-ATAAGTCCCTC-CACGATGC-3'。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2.5 PCR产物的克隆测序 *GDF9*和*GAPDH*基因的PCR扩增体系均采用25 μL 体系:10 \times PCR Buffer 2.5 μL 、MgCl₂ 1.5 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 、dNTPs 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、引物各10 pmol、cDNA 2 μL 、Taq DNA聚合酶1.5 U,加双蒸水至25 μL 。根据2^{- $\Delta\Delta\text{CT}$} 法的要求,*GDF9*和*GAPDH*基因的扩增程序应一致,为:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

PCR产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳,EB染色后在紫外灯下将目的条带切下,然后根据Gel Extraction Kit说明书纯化回收目的产物。

回收后的PCR产物片段与pMD19-T Vector 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接,转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,铺于含Amp/X-gal/IPTG的LB培养板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h,蓝白斑筛选阳性克隆,将白色阳性克隆于含Amp的LB培养液中过夜培养,菌液PCR鉴定后送上海闪晶分子生物科技有限公司测序。

1.2.6 实时荧光定量PCR 采用SYBR Green I荧光染料法进行RT-PCR,反应体系为20 μL ,其中2 \times SYBR Premix Ex TaqTM 10 μL ,上下游引物

各 $0.4 \mu\text{L}$ ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $50 \times \text{ROX Reference Dye II}$ $0.4 \mu\text{L}$, cDNA $2 \mu\text{L}$, dH_2O $6.8 \mu\text{L}$ 。于美国 AB 公司 7500 实时定量 PCR 仪上进行,重复 3 次。根据 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法的要求,*GDF9* 和 *GAPDH* 基因的扩增条件程序应一致,为: 95°C 10 s; 95°C 5 s, 55°C 15 s, 72°C 20 s, 40 个循环。并在扩增完成后进行熔解曲线分析,以确定 RT-PCR 产物的专一性。最后,以管家基因 *GAPDH* 为内参,根据 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 *GDF9* mRNA 的相对表达量。

1.2.7 统计分析 试验均重复 3 次,数据用

SPSS 11.5 软件中的 One-Way ANOVA 进行统计分析,并用 Tukey 法进行差异显著性测验, $P < 0.05$ 差异显著。

2 结果

2.1 卵丘扩散得分

结果表明,山羊 COCs 在体外培养的不同时期出现了形态学上的变化(图 1),且在 IVM 12 h 时卵丘细胞出现显著扩散,然后扩散程度不断增加直至 IVM 27 h(表 1)。

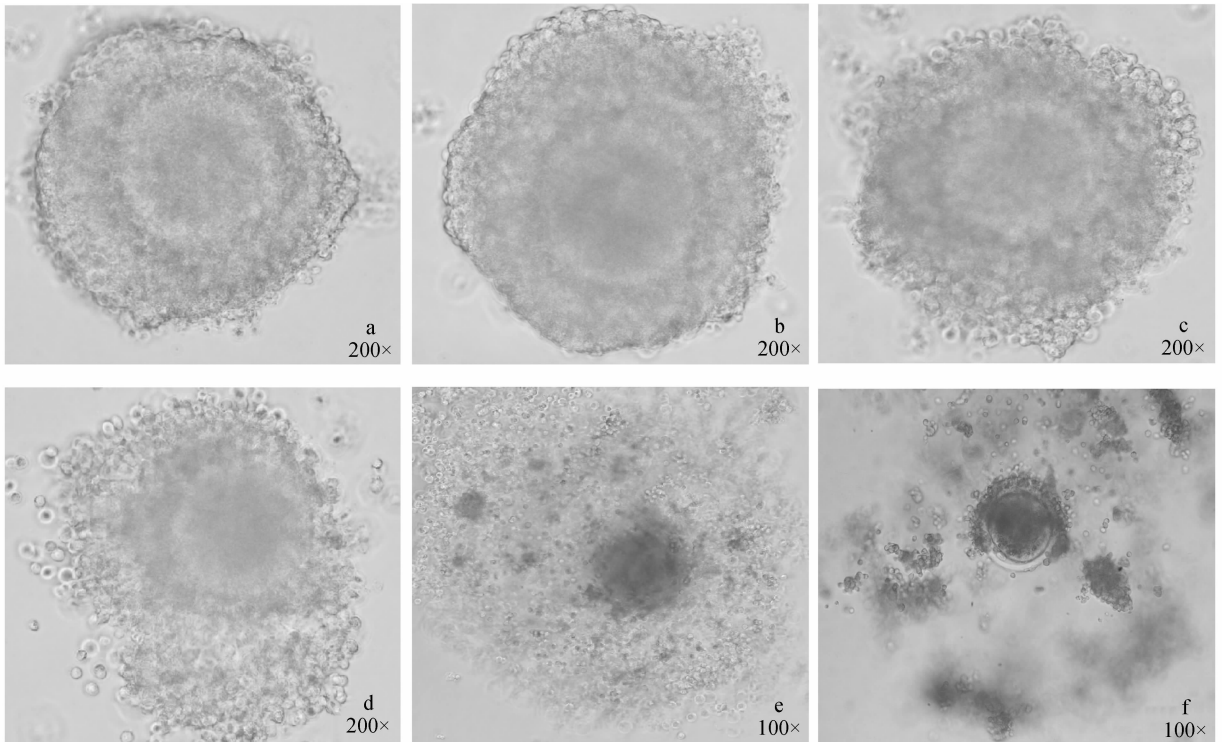
表 1 IVM 过程中卵丘细胞扩散情况

Table 1 Cumulus expansion during IVM cultivation

IVM 时间/h IVM time	0	6	12	18	24	27
卵丘扩散程度						
Degree of cumulus cell expansion (Mean \pm SD)	$0^\circ \pm 0$	$0^\circ \pm 0$	$26.04^b \pm 0.72$	$50.83^c \pm 0.96$	$69.58^d \pm 0.36$	$70.63^d \pm 0.63$

上标字母不同者为差异极显著 ($P < 0.01$), 上标字母相同者为差异不显著 ($P > 0.05$)

Numbers with different superscripts mean extremely significant difference ($P < 0.01$), numbers with the same superscript means no significant difference ($P > 0.05$)



a. 体外成熟 0 h; b. 体外成熟 6 h; c. 体外成熟 12 h; d. 体外成熟 18 h; e. 体外成熟 24 h; f. 体外成熟 27 h
a. IVM 0 h; b. IVM 6 h; c. IVM 12 h; d. IVM 18 h; e. IVM 24 h; f. IVM 27 h

图 1 体外培养不同时期的卵丘卵母细胞复合体形态

Fig. 1 Morphological changes of COCs under IVM cultivation

2.2 RNA 纯度的电泳检测

DNase I 处理的总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电

泳,显示清晰的 28S 和 18S 条带(图 2),核酸蛋白分析仪检测, $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$,提示 RNA 完整性和

质量较好。

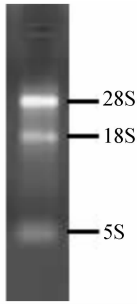
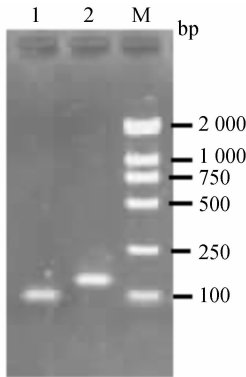


图2 山羊卵丘卵母细胞复合体总 RNA 电泳图

Fig. 2 Electropherogram of total RNA of goat COCs

2.3 *GDF9* 和 *GAPDH* 基因的 PCR 扩增和克隆测序

将提取的总 RNA 按照上述条件进行 RT-PCR 扩增,经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,*GDF9* 和 *GAPDH* 基因分别在 143 和 100 bp 处有 1 条特异性条带(图 3),与引物设计的预期扩增结果一致。然后对 RT-PCR 产物进行纯化、克隆、菌液 PCR 鉴定后(图 4),送上海闪晶分子生物科技有限公司测序。把所测序列分别与 AJ431207 和 AY681349 进行比对,同源性均为 100%。



M. DL2000 Marker; 1. *GAPDH* 基因; 2. *GDF9* 基因

M. DL2000 Marker; 1. *GAPDH* gene; 2. *GDF9* gene

图3 山羊 *GDF9* 和 *GAPDH* 基因 PCR 扩增片段

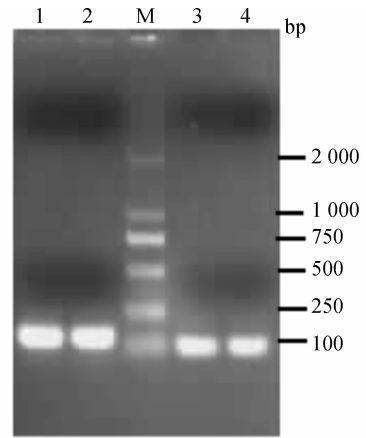
Fig. 3 PCR products of *GDF9* and *GAPDH* genes in goat

2.4 PCR 产物的特异性检测

实时荧光定量 PCR 的扩增曲线表明效果良好,经熔解曲线分析 *GDF9* 和 *GAPDH* 分别在 85 和 84.5 °C 出现单一产物峰(图 5),均与引物设计后预期产物 T_m 值相同。

2.5 *GDF9* 和 *GAPDH* 基因扩增效率一致性的判定

以质粒为模板,调整 *GDF9* 和 *GAPDH* 的质粒浓度一致,然后分别进行 10 倍梯度稀释,制作



M. DL2000 Marker; 1,2. *GDF9* 基因; 3,4. *GAPDH* 基因

M. DL2000 Marker; 1,2. *GDF9* gene; 3,4. *GAPDH* gene

图4 阳性克隆 PCR 扩增片段

Fig. 4 PCR products of positive clone

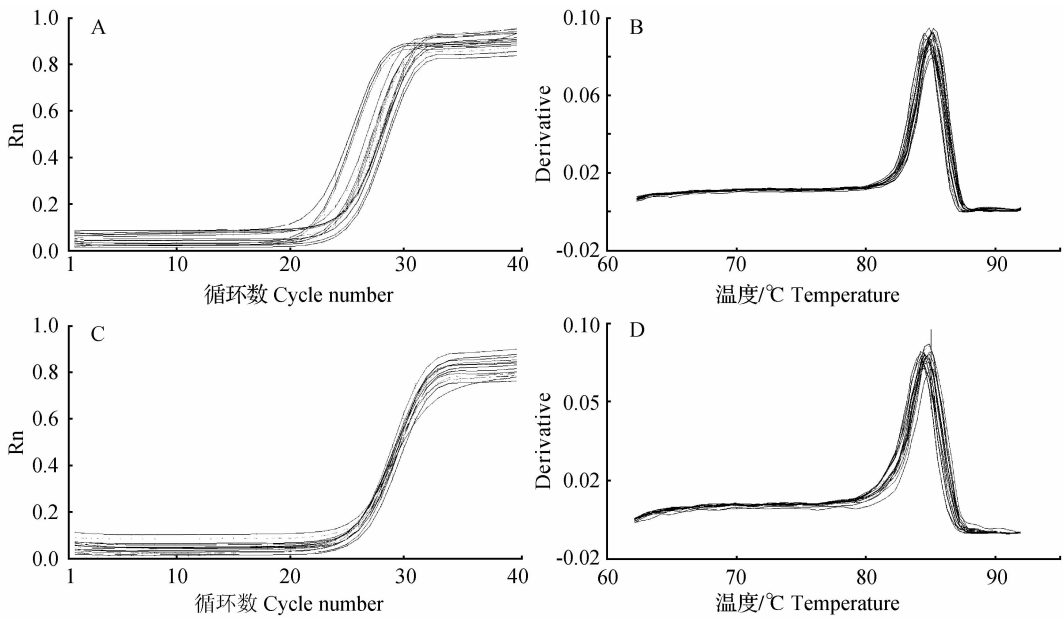
GDF9 和 *GAPDH* 的标准曲线(图 6),相关系数分别为 0.996 和 0.991,斜率分别为 -2.760 和 -2.662。由此可知其斜率之差 < 0.1 ,因此可以用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量分析。

2.6 *GDF9* 在卵母细胞体外成熟过程中的相对表达量变化

试验结果表明,*GDF9* mRNA 在山羊卵丘卵母细胞复合体体外培养的过程中均有表达,且呈现动态变化。以 IVM 0 h 为参照,表达量为 1,IVM 6、24 和 27 h 时 *GDF9* mRNA 的表达量分别为 0.96、1.08 与 1.43,与 IVM 0 h 之间差异不显著 ($P > 0.05$);而 IVM 12 和 18 h 时的相对表达量分别为 3.09 与 2.26,与其它时间段相比较均呈现出极显著差异 ($P < 0.01$),且 IVM 12 h 时 *GDF9* mRNA 的表达量显著高于 IVM 18 h ($P < 0.05$),呈现峰值(图 7)。

3 讨论

在卵泡发生过程中 *GDF9* 被认为是重要的卵母细胞成熟因子^[15]。既往的研究普遍认为 *GDF9* 是卵母细胞特异性表达的产物,但是随着研究的深入,越来越多的证据表明,*GDF9* 在卵丘细胞和颗粒细胞中也有表达。在人和灵长类,通过 Western blot、免疫组化和 RT-PCR 技术,*GDF9* 蛋白和 mRNA 被定位于颗粒细胞和卵丘细胞^[6,20-21]。Zhu 和 Prochazka 等分别在猪中证实 *GDF9* mRNA 在卵母细胞和颗粒细胞中均有表达^[7,22]。在山羊,Silva 等在原始、初级、次级和有腔卵泡的卵母细胞和颗粒细



A、B. *GDF9* 基因; C、D. *GAPDH* 基因

A, B. *GDF9* gene; C, D. *GAPDH* gene

图 5 *GDF9* 和 *GAPDH* 基因的扩增曲线和熔解曲线

Fig. 5 The amplification and dissociation curves of *GDF9* and *GAPDH* genes

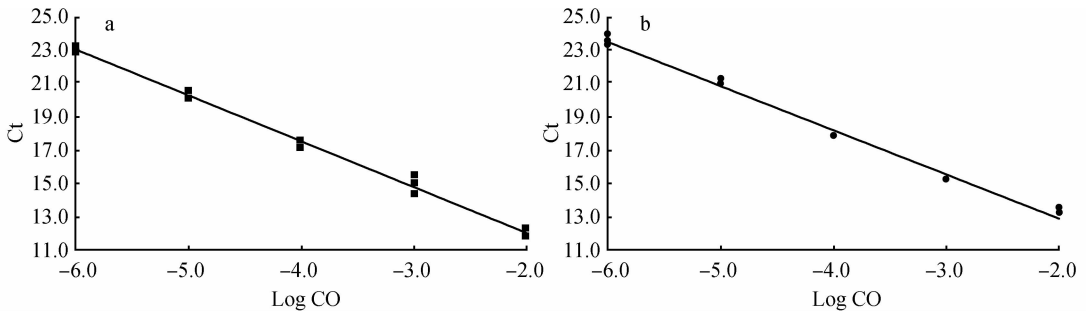


图 6 *GDF9* (a) 与 *GAPDH* (b) 基因的标准曲线

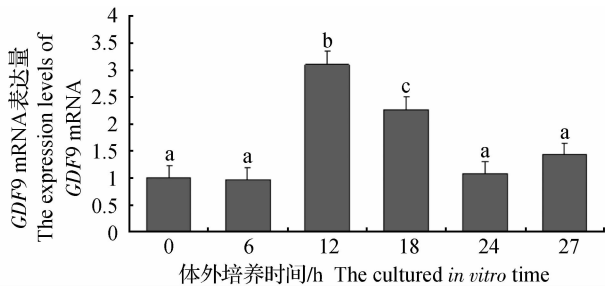
Fig. 6 The standard curves of *GDF9* (a) and *GAPDH* (b) genes

胞中也都鉴定到了 *GDF9* mRNA, 并由此推测山羊 *GDF9* 不仅作为卵母细胞旁分泌因子起作用, 而且还可能作为自分泌因子参与调节颗粒细胞的部分关键生物功能^[19]。因此, 本试验以卵丘卵母细胞复合体为研究对象, 研究 *GDF9* mRNA 相对表达丰度与卵丘扩散之间的关系, 并进一步探讨 *GDF9* 对卵母细胞体外成熟的影响。

结果表明, *GDF9* mRNA 在山羊卵母细胞体外培养全过程均有表达, 且在 IVM 12 h 时表达呈峰值, 与卵丘细胞开始扩散的时间一致, 初步证实山羊卵母细胞体外培养过程中 *GDF9* 可以诱导卵丘细胞扩散。该结论与 Prochazka 等^[7] 和 Li 等^[18] 的研

究结果不一致。Zhu 等在 Prochazka 的基础上进行了更深入的研究, 分别探讨了 IVM 不同时间, *GDF9* mRNA 在卵母细胞和卵丘细胞中的相对表达量, 结果在卵母细胞中 *GDF9* mRNA 的表达量呈下降趋势, 而在卵丘细胞中却存在着先升高后降低的趋势^[22], 可惜的是 Zhu 等没有进行卵丘扩散的评分。进一步研究证实, 在大鼠、奶牛和猪, 卵丘扩散可以在缺失卵母细胞的条件下直接由 FSH 诱导^[23-26]。也就是说上述物种的卵丘扩散中 *GDF9* 并不是必需的。

在小鼠, OOX 复合物(去除卵母细胞, 仅保留卵丘细胞和透明带的 COCs)中添加重组 *GDF9* 可以



标字母不同者为差异极显著($P < 0.01$), 标字母相同者为差异不显著($P > 0.05$)

The different superscripts mean extremely significant difference ($P < 0.01$), the same superscript means no significant difference ($P > 0.05$)

图7 *GDF9* 基因在山羊卵母细胞体外成熟过程中的相对表达丰度

Fig. 7 Relative abundance of *GDF9* gene in goat oocyte matured *in vitro*

诱导卵丘细胞的扩散^[12,27];而从 *GDF9* 基因缺失小鼠中获得的卵母细胞不能诱导 OOX 复合物中卵丘细胞的扩散^[28]。另外,利用 RNAi 技术发现,向卵母细胞中注射 *GDF9* 双链 RNA 后,可以显著降低卵丘扩散^[29],说明,*GDF9* 在卵丘扩散中起着至关重要的作用,与本试验结论一致。而卵丘扩散是卵母细胞体外成熟的标志性事件之一^[16],由此推测,*GDF9* 在山羊卵母细胞的体外成熟中起着重要作用。

4 结论

本研究利用实时荧光定量 PCR 技术,探讨了 *GDF9* 在山羊卵母细胞中的表达模式,初步证实山在羊卵母细胞体外培养过程中 *GDF9* 可以诱导卵丘细胞扩散,并由此推测 *GDF9* 在山羊卵母细胞体外成熟中起着重要作用。但究竟 *GDF9* 是通过何种途径作用于卵母细胞的,还有待进一步研究。

参考文献:

[1] McPHERRON A C, LEE S J. GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor- β superfamily containing a novel pattern of cysteines [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(5):3444-3449.

[2] HAYASHI M, MCGEE E A, MIN G, et al. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(3): 1236-1244.

[3] 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.

[4] LAITINEN M, VUOJOLAINEN K, JAATINEN R, et al. A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis [J]. *Mech Dev*, 1998, 78(1-2):135-140.

[5] AALTONEN J, LAITINEN M P, VUOJOLAINEN K, et al. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84(8):2744-2750.

[6] YAMAMOTO N, CHRISTENSON L K, MCAL-LISTER J M, et al. Growth differentiation factor-9 inhibits 3 β -adenosine monophosphate-stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(6):2849-2856.

[7] PROCHAZKA R, NEMCOVA L, NAGYOVA E, et al. Expression of growth differentiation factor 9 messenger RNA in porcine growing and preovulatory ovarian follicles [J]. *Biol Reprod*, 2004, 71 (4): 1290-1295.

[8] JOHNSON P A, DICKENS M J, KENT T R, et al. Expression and function of growth differentiation factor-9 in an oviparous species, *Gallus domesticus* [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72(5):1095-1100.

[9] FITZPATRICK S L, SINDONI D M, SHUGHRUE P J, et al. Expression of growth differentiation factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and non-ovarian rodent and human tissues [J]. *Endocrinology*, 1998, 139(5):2571-2578.

[10] ECKERT D C, WHALE L J, LAWRENCE S B, et al. Expression of mRNA encoding growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 during follicular formation and growth in a marsupial, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 192(1-2):115-126.

[11] MCGRATH S A, ESQUELA A F, LEE S J. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9 [J]. *Mol Endocrinol*, 1995, 9(1):131-136.

[12] 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.

[13] PENNETIER S, UZBKOVA S, PERREAU C, et

- al. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes *MATER*, *ZAR1*, *GDF9*, *BMP15*, and *VASA* in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos [J]. *Biol Reprod*, 2004, 71(4):1359-1366.
- [14] 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]. *PNAS*, 2000, 97(18):10288-10293.
- [15] GILCHRIST R B, RITTER L J, MYLLYMAA S, et al. Molecular basis of oocyte-paracrine signaling that promotes granulosa cell proliferation [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(18):3811-3821.
- [16] DRAGOVIC R A, RITTER L J, SCHULZ S J, et al. Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(6):2798-2806.
- [17] PENG Y H, ZHUANG G L, ZHOU C Q, et al. Growth differentiation factor-9 gene expression of mice oocytes *in vitro* and *in vivo* [J]. *Zoological Research*, 2006, 27(5): 456-460.
- [18] LI H K, KUO T Y, YANG H S, et al. Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during *in vitro* maturation of porcine oocytes and early embryos [J]. *Animal Reproduction Science*, 2008, 103(3-4): 312-322.
- [19] SILVA J R, VAN DEN HURK R, VAN TOL H T, et al. Expression of growth differentiation factor 9 (*GDF9*), bone morphogenetic protein 15 (*BMP15*), and *BMP* receptors in the ovaries of goats [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2005, 70(1):11-19.
- [20] SIDIS Y, FUJIWARA T, LEYKIN L, et al. Characterization of inhibin/activin subunit, activin receptor, follistatin messenger ribonucleic acid in human and mouse oocytes: evidence for activin's paracrine signaling from granulosa cells to oocytes [J]. *Biol Reprod*, 1998, 59(4): 807-812.
- [21] DUFFY D M. Growth differentiation factor-9 is expressed by the primate follicle throughout the periovulatory interval [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(2): 725-732.
- [22] ZHU G Y, GUO B R, PAN D K, et al. Expression of bone morphogenetic proteins and receptors in porcine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation [J]. *Animal Reproduction Science*, 2008, 104(3-4): 275-283.
- [23] VANDERHYDEN B C. Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factor(s) [J]. *J Reprod Fertil*, 1993, 98(1): 219-227.
- [24] PROCHAZKA R, NAGYOVA E, RIMKEVICOVA Z, et al. Lack of effect of oocytectomy on expansion of the porcine cumulus [J]. *J Reprod Fertil*, 1991, 93(2): 569-576.
- [25] SINGH B, ZHANG X, ARMSTRONG D T. Porcine oocytes release cumulus expansion-enabling activity even though porcine cumulus expansion *in vitro* is independent of the oocyte [J]. *Endocrinology*, 1993, 132: 1860-1862.
- [26] RALPH J H, TELFER E E, WILMUT I. Bovine cumulus cell expansion does not depend on the presence of an oocyte secreted factor [J]. *Mol Reprod Dev*, 1995, 42(2): 248-253.
- [27] SU Y Q, WIGGLESWORTH K, PENDOLA F L, et al. Mitogen activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(6): 2221-2232.
- [28] VANDERHYDEN B C, MACDONALD E A, NAGYOVA E, et al. Evaluation of members of the *TGF-β* superfamily as candidates for the oocyte factors that control mouse cumulus expansion and steroidogenesis [J]. *Reprod Suppl*, 2003, 61(1):55-70.
- [29] GUI L M, JOYCE I M. RNA interference evidence that growth differentiation factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72(1):195-199.