

分类号:

密级: 否



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

AMH 对小鼠卵母细胞体外成熟及卵丘扩展的调控作用研究

REGULATION EFFECT OF AMH ON IN-VITRO
MATURATION OF OOCYTES AND CUMULUS EXPANSION
IN MOUSE

研究生: 李赞
CANDIDATE: LI ZAN

学号: 2015302110072
STUDENT NO.:

专业: 特种经济动物饲养
MAJOR: THE REARING OF SPECIAL-TYPE
ECONOMIC ANIMALS

导师: 梁爱心 副教授
SUPERVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR LIANG AIXIN

中国 武汉

WUHAN, CHINA

二〇一八年 六月

JUNE, 2018

华中农业大学硕士学位论文

AMH 对小鼠卵母细胞体外成熟及卵丘扩展的 调控作用研究

REGULATION EFFECT OF AMH ON IN-VITRO MATURATION OF OOCYTES AND CUMULUS EXPANSION IN MOUSE

研 究 生：李 赞

学 号：2015302110072

指 导 教 师：梁爱心 副教授

指 导 小 组：杨利国 教 授

张淑君 教 授

霍立军 教 授

熊家军 副教授

李 翔 副教授

滑国华 副教授

专业：特种经济动物饲养 研究方向：动物生殖生理与繁殖技术

获得学位名称：农学硕士 获得学位时间：2018年6月

华中农业大学动物科学技术学院

二〇一八年六月

资助项目

本论文由国家自然科学基金（31402078 和 31772604）
和中央高校基本科研业务费专项基金（2662016PY120）共
同资助。

**The thesis is supported by the National Natural
Science Foundation of China (31402078 and 31772604) and
the Fundamental Research Funds for the Central
Universities (2662016PY120).**

华中农业大学学位论文独创性声明及使用授权书

学位论文 是否保密	否	如需保密, 解密时间	年 月 日
独创性声明			
<p>本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知, 除了文中特别加以标注和致谢的地方外, 论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果, 也不包含为获得华中农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料, 指导教师对此进行了审定。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明, 并表示了谢意。</p>			
研究生签名: 李赞			
时间: 2018 年 6 月 15 日			
学位论文使用授权书			
<p>本人完全了解华中农业大学关于保存、使用学位论文的规定, 即学生必须按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本; 学校有权保留提交论文的印刷版和电子版, 并提供目录检索和阅览服务, 可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人同意华中农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容, 为存在馆际合作关系的兄弟高校用户提供文献传递和交换服务, 同时本人保留在其他媒体发表论文的权力。</p> <p>注: 保密学位论文(即涉及技术秘密、商业秘密或申请专利等潜在需要提交保密的论文)在解密后适用于本授权书。</p>			
学位论文作者签名: 李赞			
导师签名: 李赞			
签名日期: 2018 年 6 月 15 日			
签名日期: 2018 年 6 月 15 日			

目 录

摘要.....	i
Abstract.....	iii
缩略语表.....	v
1 前言.....	1
1.1 研究问题的由来.....	1
1.2 AMH 基因的研究进展.....	2
1.2.1 AMH 及 AMHR2 基因结构.....	2
1.2.2 AMH 基因的表达与定位.....	4
1.2.3 AMH 在卵巢中的调控作用.....	5
1.3 卵母细胞的体外成熟.....	7
1.3.1 卵母细胞质量的评定.....	7
1.3.2 卵母细胞体外成熟的影响因素.....	8
1.3.3 卵母细胞分泌因子.....	8
1.3.4 cAMP 与卵母细胞成熟的关系.....	9
1.3.5 MPF 与卵母细胞成熟的关系.....	9
1.4 卵丘扩展.....	10
1.4.1 卵丘颗粒细胞与卵母细胞的关系.....	10
1.4.2 卵丘扩展相关因子.....	10
1.4.3 卵丘扩展与卵母细胞的关系.....	11
1.5 实验的目的和意义.....	12
2 实验材料.....	13
2.1 实验动物.....	13
2.2 试剂与耗材.....	13
2.3 主要抗体.....	15
2.4 实验仪器.....	15

2.5 试剂的配制.....	16
3 实验方法.....	17
3.1 裸卵的收集与培养.....	17
3.2 卵丘卵母细胞复合体的收集与培养.....	17
3.3 实时荧光定量 PCR 检测基因的表达.....	18
3.3.1 RNA 的提取.....	18
3.3.2 RNA 浓度和纯度的检测.....	19
3.3.3 RNA 反转录为 cDNA.....	19
3.3.4 荧光定量 PCR.....	20
3.4 Western blot 检测蛋白水平的表达情况.....	22
3.4.1 裸卵蛋白的提取.....	22
3.4.2 卵丘卵母细胞复合体蛋白的提取.....	22
3.4.3 蛋白浓度检测及制样.....	22
3.4.4 蛋白免疫印迹.....	23
3.5 激素的检测.....	24
3.6 成熟促进因子及环磷酸腺苷的检测.....	25
3.7 小鼠卵丘扩展的评定及卵丘扩展指数.....	25
3.8 数据分析.....	26
4 结果与分析.....	27
4.1 AMH 和 AMHR2 在小鼠卵巢中的表达模式.....	27
4.1.1 不同日龄小鼠卵巢中 AMH 与 AMHR2 的表达.....	27
4.1.2 不同细胞 COC、CCs 及 DOs 中 AMH 与 AMHR2 基因的表达.....	27
4.1.3 不同时期卵母细胞中 AMHR2 的表达.....	28
4.2 AMH 对小鼠裸卵成熟的调控作用.....	30
4.2.1 AMH 对体外培养裸卵成熟率的影响.....	30
4.2.2 AMH 对体外培养裸卵中 AMHR2 表达的影响.....	31
4.2.3 AMH 对体外培养裸卵中卵母细胞分泌因子的调控.....	32
4.2.4 AMH 对体外培养裸卵中 cAMP 含量的影响.....	33

4.2.5 AMH 对体外培养裸卵中 MPF 含量的影响.....	34
4.3 AMH 对小鼠 COC 中卵母细胞成熟的调控作用.....	35
4.3.1 AMH 对 COC 体外成熟的影响.....	35
4.3.2 AMH 对 COC 中 BMP15、GDF9、AMHR2 及 FSHR 表达的调控.....	36
4.3.3 AMH 对 COC 中 cAMP 含量的影响.....	37
4.3.4 AMH 对 COC 中 MPF 含量的影响.....	38
4.4 AMH 对小鼠卵丘扩展的调控作用.....	39
4.4.1 AMH 对小鼠卵丘扩展指数的影响.....	39
4.4.2 AMH 对卵丘扩展相关因子表达的影响.....	40
4.5 AMH 对雌激素、孕酮及芳香化酶相关基因的调控作用.....	41
4.5.1 AMH 对雌激素、孕酮的影响.....	41
4.5.2 AMH 对芳香化酶相关基因表达的影响.....	42
5 讨论.....	43
5.1 AMH 在卵巢中的表达模式.....	43
5.2 AMH 参与调控卵母细胞的体外成熟.....	44
5.3 AMH 对卵丘扩展的调控作用.....	45
5.4 AMH 对 COC 中雌激素、孕酮分泌的影响.....	46
6 小结.....	47
6.1 全文结论.....	47
6.2 研究特色与创新.....	47
6.3 进一步研究进展.....	47
参考文献.....	48
致谢.....	62

摘要

抗苗勒氏管激素 (AMH) 是转化生长因子 β 超家族 (TGF- β) 成员之一, 由雌性动物的卵巢分泌, 并通过 2 型受体 (AMHR2) 发挥其生物学效应。AMH 主要通过抑制原始卵泡的募集、降低有腔卵泡对 FSH 的敏感性而参与调控卵泡生长发育, AMH 还可作为评估卵巢储备能力、预测超排反应的有效标志物。然而, 有关 AMH 基因功能的研究多集中于对类固醇激素的调控上, AMH 对卵母细胞体外成熟尤其是卵丘扩展的研究报道较少。因此, 本实验以昆明鼠的卵母细胞为研究对象, 采用体外培养、RT-PCR、Western Blot、ELISA 等方法, 分别研究 AMH 对裸卵和卵丘卵母细胞复合体体外成熟的影响, 分析 AMH 对卵丘扩展的调控作用, 为提高卵母细胞的利用率奠定基础。主要研究结果如下:

(1) AMH 及其受体在小鼠卵巢中的表达。通过检测不同日龄小鼠卵巢中 AMH 及 AMHR2 的表达, 发现 AMH 和 AMHR2 在 14 日龄时表达量最高; 还发现 AMH 仅在卵丘颗粒细胞中表达, 而 AMHR2 在卵丘颗粒细胞与卵母细胞中均有表达, 并且 AMHR2 的表达量随着卵母细胞的发育呈现逐渐下降的趋势, GV 期卵母细胞中 AMHR2 的表达显著高于 MI 期卵母细胞 ($P < 0.05$)。

(2) AMH 对体外培养裸卵成熟率的影响。在裸卵培养液中分别添加不同浓度的 rh-AMH (1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL), 体外培养 14 h 后, 发现裸卵的成熟率与 AMH 浓度呈剂量依赖关系, 其中 100 ng/mL 添加组成熟率最高, 且均显著高于对照组和低剂量添加组 ($P < 0.05$); 随着 AMH 浓度的升高, MPF 的含量逐渐增加, BMP15 的表达量逐渐升高; 此外, AMH 添加组能极显著降低胞质中 cAMP 含量 ($P < 0.01$)。可见, AMH 可能是通过上调 BMP15 表达、促进 MPF 分泌与降低 cAMP 的途径来促进裸卵的体外成熟。

(3) AMH 对卵丘卵母细胞复合体 (COC) 体外成熟的影响。将 100 ng/mL AMH 与 100 ng/mL FSH 单独或联合添加于卵丘卵母细胞复合体 (COC) 体外培养体系, 分析 AMH 对 COC 体外成熟的影响。结果发现, 与对照组相比, 添加 100 ng/mL AMH 对 COC 的体外成熟无显著性影响 ($P > 0.05$); 与 FSH 单独添加组相比, AMH 与 FSH 联合添加组中 COC 的成熟率显著降低 ($P < 0.05$), 提示 AMH 能抑制 FSH 对卵母细胞体外成熟的促进作用; 此外, 还发现 AMH 能显著抑制 FSH 促卵母细胞 MPF 分泌的作用。

(4) AMH 对体外卵丘扩展的调控作用。将 100 ng/mL AMH 与 100 ng/mL FSH 单独或联合添加于卵丘卵母细胞复合体 (COC) 体外培养体系, 分析 AMH 对卵丘颗粒细胞扩展的调控作用。结果显示, AMH 单独处理组对卵丘扩展没有影响, 而 FSH 添加组能显著促进卵丘颗粒细胞的扩展 ($P<0.05$); 与 FSH 单独处理组相比, AMH 与 FSH 联合处理组能显著降低卵丘扩展指数 ($P<0.05$), 提示 AMH 能抑制 FSH 对卵丘扩展的促进作用。采用 RT-PCR 法检测各处理中与卵丘扩展相关基因的表达, 发现 AMH 能显著上调卵丘颗粒细胞中 Ptgs2 mRNA 的表达 ($P<0.05$), 而 Has2、PTX3 和 Tnfaip6 基因的表达无显著性差异; FSH 处理组中 Has2、PTX3 和 Tnfaip6 的表达显著升高 ($P<0.05$), 而 AMH 能抑制 FSH 对 Has2、PTX3 和 Tnfaip6 基因表达的上调作用。

综上所述, 高浓度 AMH 能显著促进裸卵的体外成熟, 但对 COC 的成熟及卵丘扩展无影响, 且 AMH 能抑制 FSH 促 COC 体外成熟及促卵丘扩展的作用。

关键词: AMH; AMHR2; 表达; 体外成熟; 卵丘扩展

Abstract

Anti-Mullerian hormone (AMH) is a member of the transforming growth factor β (TGF- β) superfamily, secretes from the ovaries of female animals and exerts its biological effects through the type II receptor (AMHR2). AMH is involved in the regulation of follicular growth by inhibiting the recruitment of primordial follicles and reducing the sensitivity of antral follicles to FSH. AMH can also be used as an effective marker to evaluate ovarian reserve and predict superovulation. However, the research on the biological function of AMH is mainly focused on regulating steroid hormone in granulosa cells, little research on the in vitro maturation of oocytes, especially the expansion of cumulus. Therefore, the regulation action of AMH on in vitro maturation of DOs and COC as well as cumulus expansion were performed using methods of IVM, RT-PCR, Western Blot and ELISA. The results can lay a foundation for improving the utilization rate of female oocytes.

(1) Expression of AMH and its receptor in mouse ovary. Expression of AMH and AMHR2 was detected in different aged mice, results showed that AMH and AMHR2 had the highest expression at 14 days of age compared with other mice. AMH is only expressed in cumulus cells, while AMHR2 is expressed in both cumulus cells and oocytes. In addition, expression of AMHR2 decreased gradually with the development of oocyte, AMHR2 expression in GV oocytes was significantly higher than that in MI oocytes ($P < 0.05$).

(2) Effect of AMH on the in vitro maturation of Denuded oocyte (DOs). Different concentrations of rh-AMH (1 ng/mL, 10 ng/mL, and 100 ng/mL) were added to the culture medium of DOs, after 14 h in vitro culture, the maturation rate of DOs was found to be dose-dependent with the concentration of AMH. The high-dose (100 ng/mL) group got the highest maturation rate, and it was significantly higher than that of the control group and the low-dose group ($P < 0.05$). With the increase of AMH concentration, the MPF level gradually increased, and the expression of BMP15 gradually increased. Furthermore, the AMH-added group could significantly reduce the content of cAMP in the cytoplasm ($P < 0.01$). It can be seen that AMH may promotes the in vitro maturation of

DOs by promoting the expression of BMP15, increasing the content of MPF and decreasing the expression of cAMP.

(3) Effect of AMH on in vitro maturation of Cumulus oocyte complexes (COC). The effect of AMH on COC in vitro maturation was analyzed by adding 100 ng/mL AMH and 100 ng/mL FSH alone or in combination into the COC in vitro culture system. The results showed that compared with the control group, 100 ng/mL AMH treated group had no significant effect on the maturation of COC ($P > 0.05$); Compared with FSH alone treated group, the maturation rate of COC in the combination of AMH and FSH group was significantly decreased ($P < 0.05$), suggesting that AMH could inhibit the promoting effect of FSH on COC maturation in vitro. In addition, it was found that AMH could significantly inhibit the promoting effect of FSH on MPF in COC.

(4) The role of AMH in regulation of cumulus expansion. The regulation of AMH on cumulus expansion was analyzed by adding 100 ng/mL AMH and 100 ng/mL FSH alone or in combination with the COC in vitro culture system. The results showed that the AMH treated group had no effect on the expansion of the cumulus, while the FSH treated group significantly increased the expansion of the cumulus ($P < 0.05$). Compared with the FSH alone treated group, the combination of AMH and FSH group significantly decreased the cumulus expansion index ($P < 0.05$), suggesting that AMH can inhibit the promotion of FSH on cumulus expansion. RT-PCR was used to detect the expression of genes associated with cumulus expansion in each treatment. It was found that AMH could significantly increase the expression of Ptg2 mRNA in cumulus cells, whereas the expressions of Has2, PTX3 and Tnfaip6 genes were no significant difference ($P > 0.05$). But FSH can significant upregulate the expression of of Has2, PTX3 and Tnfaip6 ($P < 0.05$), and AMH could inhibit this action.

In conclusion, high concentration of AMH could increase the maturation rate of DOs, and AMH had no significant effect on COC maturation and cumulus expansion. However, AMH can inhibit the promotion of FSH on oocyte maturation and cumulus expansion in COC.

Key words: AMH; AMHR2; Expression; In Vitro Maturation; Cumulus expansion

缩略语表

缩略词	英文名称	中文名称
Abbreviation words	Full names in English	Full names in Chinese
AMH	Anti-Mullerian Hormone	抗苗勒氏管激素
AMHR2	Anti-Mullerian Hormone Receptor type 2	抗苗勒氏管激素受体
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
EGF	Epidermal Growth Factor	表皮生长因子
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
FSH	Follicle Stimulating Hormone	促卵泡激素
E2	Estradiol	雌二醇
P4	Progesterone	孕酮
IVM	In Vitro Maturation	体外成熟
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
RT-PCR	Real-time PCR	实时定量 PCR
PBS	Phosphate Buffer Saline	磷酸盐缓冲液
DOs	Denuded Oocytes	裸卵
COC	Cumulus Oocyte Complex	卵丘卵母细胞复合体
GV	Germinal Vesicle	生发泡
GVBD	Germinal Vesicle Breakdown	生发泡破裂
MI	Metaphase I	第一次减数分裂中期
MII	Metaphase II	第二次减数分裂中期
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate	环腺苷一磷酸
MPF	Maturation Promoting Factor	成熟促进因子
GDF9	Growth Differentiation Factor 9	生长分化因子 9
BMP15	Bone Morphogenetic Protein 15	骨形态发生蛋白 15
CYP19A1	Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1	细胞色素 P450 家族 19A1
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein	类固醇激素急性调节蛋白
3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase	3 β -羟基类固醇脱氢酶
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附测定

1 前言

1.1 研究问题的由来

在畜牧业生产中，繁殖性状是家畜的主要经济性状之一。雌性动物的生殖过程是一个十分复杂的过程，卵巢中卵泡的募集与发育、卵母细胞的成熟与排出以及胚胎的形成、着床与妊娠维持等活动是影响其繁殖性状的关键因素。为了提高动物繁殖力，体外受精-胚胎移植（*In vitro fertilization-embryo transfer*, IVF-ET）技术受到了广泛关注，而卵母细胞的质量是提高体外受精-胚胎移植成功率的关键。研究和开发提高卵母细胞体外成熟培养（*In vitro maturation*, IVM）技术，能充分挖掘优良母畜的繁殖潜力，对加快动物胚胎工程技术的发展，加速家畜良种扩繁具有重要意义。

AMH 是转化生长因子 β （*TGF- β* ）家族的一个 140 kDa 二聚体糖蛋白。在雌性动物中，AMH 是卵巢产生的重要调节因子，主要在性腺中表达（*Ingraham et al 2000*）。AMH 在原始卵泡的募集和以及在窦卵泡发育至成熟卵泡的选择过程中发挥重要作用，AMH 以负反馈的途径抑制原始卵泡募集到生长卵泡池中，AMH 还可以通过调节 FSH 在有腔卵泡中的敏感性的方式抑制优势卵泡的选择（*Durlinger et al 2001*, *Carlsson et al 2006*, *Pellatt et al 2011*）。AMH 是卵巢储备功能的评估指标之一，血清中 AMH 含量可以反映卵巢中可激活的有腔卵泡数以及有腔卵泡规模的大小（*Kevenaar et al 2006*, *Ficicioglu 2006*）。AMH 可以作为牛卵巢中卵泡库大小的一种内分泌标记物，可以帮助预测个体牛排卵反应（*Danielle et al 2010*, *Ireland et al 2011*），根据 AMH 浓度的高低可判断超排效果（*Rico et al 2009*），提示牛血液 AMH 含量可预测其生产可转移胚胎的数量。然而，有关 AMH 与卵母细胞的关系却存在一些相反的观点，1986 年 *Takahashi* 发现在大鼠中 AMH 能抑制卵母细胞减数分裂的发生，表明 AMH 可能是卵母细胞减数分裂的抑制剂（*Takahashi et al 1986*）。*Desforges* 和姜宙的研究报道也分别标明卵泡液中高浓度 AMH 抑制卵母细胞的成熟，阻碍卵子的发育能力（*Desforges et al 2010*, 姜宙等 2013）。与之相反地是，*Fanchin* 发现在女性卵泡液中，AMH 以自分泌或旁分泌的形式在卵丘细胞卵母细胞复合体（*Cumulus Oocyte Complex*, COC）中通过卵丘颗粒细胞（*Cumulus Cells*, CCs）对卵母细胞发育起促进作用，并能提高受精卵的发育潜能（*Fanchin et al 2007*）。*Zhang*

的研究表明, AMH 对 COC 的体外成熟率没有显著影响, 但可以提高囊胚率 (Zhang et al 2014)。

可见, AMH 在卵巢中发挥着重要作用, 然而有关其调控卵母细胞成熟率的研究较少, 且结果不一致, 极大地限制了 AMH 在雌性动物中的应用。此外, 尚未发现有关 AMH 对卵丘细胞扩展的研究报道。因此, 本研究分别以裸卵和卵丘卵母细胞复合体为研究对象, 具体研究 AMH 对小鼠卵母细胞体外成熟及卵丘扩展的调控作用及机制。

1.2 AMH 基因的研究进展

1.2.1 AMH 及 AMHR2 基因结构

AMH 是分子量为 140 KDa 的糖蛋白, 属于转化生长因子 β 超家族成员之一。人类 AMH 基因位于第 19 号染色体短臂上并由 2795 个碱基对组成, 含有 5 个外显子 (Lindhardt et al 2013)。人 AMH 的基因产物是 560 个氨基酸前体 (Pro-AMH), 由两个相同的分子量为 70kDa 的 Pro-AMH 亚基通过二硫键连接。Pro-AMH 蛋白水解导致 N-末端片段形成“前区” (115kDa AMHN) 以及 C-末端结构域形成“成熟区” (25kDa AMHC)。C-末端片段负责蛋白质和受体结合的生物活性, 而 N-末端结构域自身没有生物活性但能加强 C-末端的活性 (Dewailly et al 2014)。

TGF- β 家族成员通过两种相关的跨膜丝氨酸-苏氨酸激酶受体发挥作用, 称为 1 型受体和 2 型受体。在配体结合时, 2 型受体通过磷酸化活化 1 型受体, 进而激活下游 Smad 蛋白。基于下游信号途径, 可以鉴定两种主要信号传导途径: 一种是 TGF β /激活素样途径, 通过 Smad2/3 的信号传导; 另一种是 BMP 样信号通路, 通过 Smad1/5/8 信号传导 (Massague et al 2000)。作为 TGF- β 家族成员之一, AMH 也有两种类型的受体: AMHR1 型和 AMHR2 型, AMH 对 AMHR1 不具有亲和力, 但它能与 AMHR2 结合发挥作用。AMHR2 于 1994 年分别由荷兰研究组和法-美的一个团队通过使用不同的方法克隆出来。1995 年, 人类 AMHR2 被克隆出来, AMHR2 位于第 12 号染色体短臂 12q13, 长度为 8kbp, 有 11 个外显子 (Imbeaud et al 1995)。外显子 1 编码信号序列, 外显子 2 和 3 为胞外结构域, 外显子 4 的大部分为跨膜结构域, 外显子 5-11 为胞内结构域 (Josso et al 2003)。其中外显子 2 在兔中可发生可变剪接, 但在人类和大鼠中不发生 (Baarends et al 1994, Di et al 1994, Imbeaud et al 1995)。AMH

通过特异性 2 型受体 (AMHR2) 的信号传导激活 BMP 样途径 (Visser 2003)。在苗勒管退化的研究中, BMP 1 型受体 ALK2 (激活素受体样激酶 2)、ALK3 (又名骨形态形成蛋白受体 IA) 和 ALK6 (激活素受体样激酶 6) 被鉴定为 AMH 1 型受体。ALK 2 参与 AMH 诱导苗勒管退化, ALK 3 可能参与诱导苗勒管退化期间的 AMH 信号传导 (Visser et al 2001, Jamin et al 2002)。ALK6 在 AMH 信号传导中的作用尚不明确, 但体外实验研究表明 AMHR2 和 ALK6 之间存在依赖性相互作用, ALK6 也被认为是 AMHR1 型受体 (Gouedard et al 2000)。AMH 与 AMHR2 的结合可能触发 AMHR2 与一种或几种候选 1 型受体 ALK2, 3 型和 6 型之间的复合物的形成。活化的 1 型受体磷酸化 Smad 分子 1, 5 或 8, 然后与 Smad4 结合并进入细胞核以激活 BMP 特异性报道基因 *XVent2* 和 *Tlx2*, 其中 Smad6 抑制该传导途径的发生。已知的辅助信号传导途径包括 β -连环蛋白的核易位与 LEF-1 的结合, 以及 NF- κ B 核结合活性的诱导。在不存在 AMH 的情况下, NF- κ B 亚基 p65/RelA 和 p50/NF- κ B 通过抑制性蛋白质 I κ B α 保留在细胞质中。AMH 从这种抑制作用中释放亚基, 并使它们转移到细胞核中 (图 1-1)。

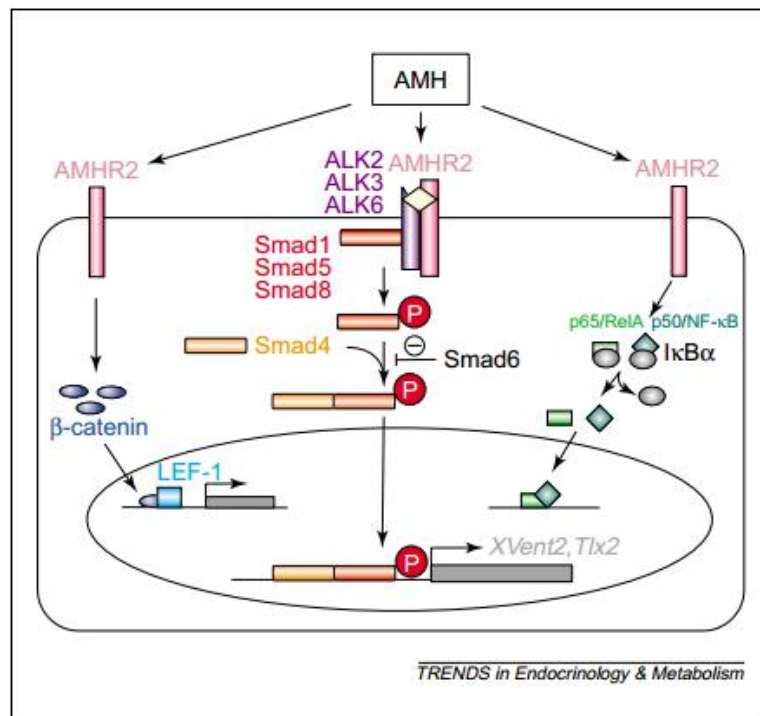


图 1-1 AMH 的信号传导通路 (Josso et al 2003)

Figure 1-1 Signaling pathways for AMH

1.2.2 AMH 基因的表达与定位

性腺未发育的胚胎由中肾管和苗勒管组成,AMH 长期以来参与雄性胚胎的性腺分化。在雄性中,睾丸支持细胞在妊娠第 7 周就开始分泌 AMH,并诱导苗勒管的退化。在睾酮的影响下,中肾管演变成附睾和精囊。从胎儿到青春期前,AMH 保持相对稳定的较高表达水平,直至青春期时,随着睾丸雄激素的大量合成 AMH 呈下降趋势。

在雌性动物中,由于缺乏 AMH,苗勒管分化为生殖系统,如子宫、输卵管和阴道上端 (Josso et al 1993, Lee et al 1993)。AMH 最初在卵巢中不表达,小鼠从出生后才可检测到卵巢 AMH,人类从妊娠第 36 周后才能检测到 (Rajpert et al 1999, Durlinger et al 2002a)。AMH 在原始卵泡中不表达,在直径小于 4 mm 的卵泡中表达最强,在卵泡直径 4-8mm 时 AMH 的表达逐渐下降,在直径大于 8 mm 的卵泡中 AMH 的表达几乎消失,且在闭锁卵泡中不表达。在卵巢中,一旦 FSH 依赖性生长卵泡出现,AMH 表达呈下降趋势。由 AMH 在卵泡各时期的表达情况可知,AMH 参与了卵泡形成的两次重要募集,即起始募集和周期募集 (Durlinger et al 2002a, Weenen et al 2004)。在女性中,AMH 的水平在青春期有缓和峰,随后在 23-25 岁之间达到最高水平。之后,AMH 水平稳定下降,直至绝经期 AMH 便检测不到 (Kelsey et al 2011)。在水牛中,AMH 的浓度与卵泡大小密切相关,当卵泡在 3-5 mm 时 AMH 的浓度是 204.65 ± 19.10 ng/mL,随着卵泡直径增大到 5-8 mm 时 AMH 的浓度为 59.13 ± 10.63 ng/mL,当卵泡 ≥ 8 mm 时 AMH 浓度呈急剧下降趋势,仅为 26.81 ± 8.53 ng/mL,且 AMH 及 AMHR2 在水牛小卵泡中的表达量 10 倍高于大卵泡,表明在水牛中 AMH 含量与卵泡大小存在负相关性。在水牛卵泡液中 AMH 浓度及 AMH mRNA 表达量与雌激素呈显著负相关,AMH 是卵泡活动的标志,表明 AMH 在水牛卵泡发生中起重要作用 (Liang et al 2016)。在山羊、绵羊以及牛的有腔卵泡液检测中发现,AMH 在小窦卵泡中浓度最高,分别为 450 ng/mL、400 ng/mL 和 290 ng/mL,当卵泡增加至排卵前大小时,AMH 浓度显著降低。Koizumi 等检测日本黑牛外周血中 AMH 浓度,发现其水平随年龄和胎次的增加而增加 (Koizumi et al 2016)。与反刍动物相比,在不同大小直径的猪卵泡液中 AMH 浓度没有观察到显著变化。此外,猪有腔卵泡的 AMH 浓度特别低,均未达到 1 ng/mL。反刍动物和猪之间 AMH 浓度

差异的原因尚不清楚,推测可能与单胎与多胎动物卵泡发育差异相关(Monnaux et al 2012)。

1.2.3 AMH 在卵巢中的调控作用

1.2.3.1 AMH 阻碍胎儿期卵巢的发育

在 AMH 过表达的转基因小鼠的研究中发现,AMH 在胎儿期间对卵巢的发育起阻碍作用(Behringer et al 1990)。雌性 AMH 过表达的转基因小鼠只具有阴道,没有子宫和输卵管,虽然它们在出生时有卵巢存在,但卵巢中几乎没有生殖细胞,并且在出生后 2 周内形成绳状结构。成年后,卵巢便发生退化,不具备繁殖能力。胎儿期间 AMH 浓度低的小鼠,卵巢发育正常。因此,小鼠胎儿期 AMH 的存在明显影响卵巢和雌性生殖细胞的发育(Durlinger et al 2002a)。

1.2.3.2 AMH 抑制原始卵泡的募集

在啮齿动物出生后卵巢内便形成了有限的原始卵泡池(Hirshfield 1991),这些原始卵泡被募集后通过初级和次级阶段发展为腔前卵泡。一旦进入有腔卵泡阶段,只有少数卵泡将达到排卵前期,而剩余的卵泡将变成闭锁卵泡(McGee and Hsueh 2000)。在雌性动物中,原始卵泡池的大小与雌性生殖寿命的持续时间呈正相关,卵泡池的过早耗尽预示着排卵的早期停止。

AMH 基因敲除(AMHKO)小鼠在 4 月龄时与野生型小鼠相比,卵巢内含有更多的生长卵泡和更少的原始卵泡。AMHKO 小鼠在 13 月龄时卵巢中几乎没有原始卵泡,而野生型小鼠卵巢仍然含有原始卵泡(Durlinger et al 1999)。这些结果表明 AMH 在原始卵泡募集中具有抑制作用(图 1-2)。Durlinger 在添加/不添加 AMH 的情况下体外培养 2 日龄小鼠卵巢,发现添加 AMH 的卵巢中生长卵泡比不添加 AMH 的卵巢少 40-50%(Durlinger et al 2002b)。类似地,在小鸡胚胎绒毛尿囊膜下接种小鼠新生的卵巢,小鸡性腺分泌高水平的 AMH,抑制原始卵泡募集,同样,在体外用 AMH 处理人卵巢皮质带 7 天,原始卵泡的生长被抑制(Carlsson et al 2006)。AMH 能抑制原始卵泡的募集,因此 AMH 在卵巢中卵泡发生的早期阶段起到抑制生长的作用,这种抑制作用可能是颗粒细胞衍生的 AMH 通过旁分泌方式对原始卵泡产生作用的结果(Van Houten et al 2010)。

1.2.3.3 AMH 抑制有腔卵泡对 FSH 的敏感性

AMH 除了在原始卵泡的募集中发挥作用, AMH 还在调整生长卵泡对 FSH 的敏感性中起作用。在血清 FSH 浓度较低的情况下, 4 个月大的 AMHKO 小鼠的卵巢比野生型同窝小鼠的卵巢中含有更多的生长卵泡 (Durlinger et al 1999), 表明 AMH 可能抑制 FSH 诱导的卵泡生长 (图 1-2)。体外培养小鼠腔前卵泡, 在培养基中单独添加 FSH 以及 AMH 与 FSH 联合添加, 结果表明 AMH 以时间依赖性地抑制 FSH 诱导的卵泡生长, 第 4 天和第 5 天时 AMH 与 FSH 联合添加组比单独添加 FSH 组的卵泡直径更小 (Durlinger et al 2001)。在啮齿动物和猪卵巢颗粒细胞的体外培养研究结果表明, 外源性 AMH 降低了芳香化酶的活性和 LH 受体的表达, 这与 AMH 对卵泡生长的抑制作用是一致的 (Clemente et al 1994)。另外, AMH 还能抑制 EGF 诱导的颗粒黄体细胞的增殖 (Kim et al 1992)。AMH 通过抑制颗粒细胞中芳香化酶细胞色素 P450 的表达, 抑制 FSH 对腔前卵泡和有腔卵泡生长, AMH 参与了生长卵泡到成熟卵泡的周期募集 (Grossman et al 2008)。

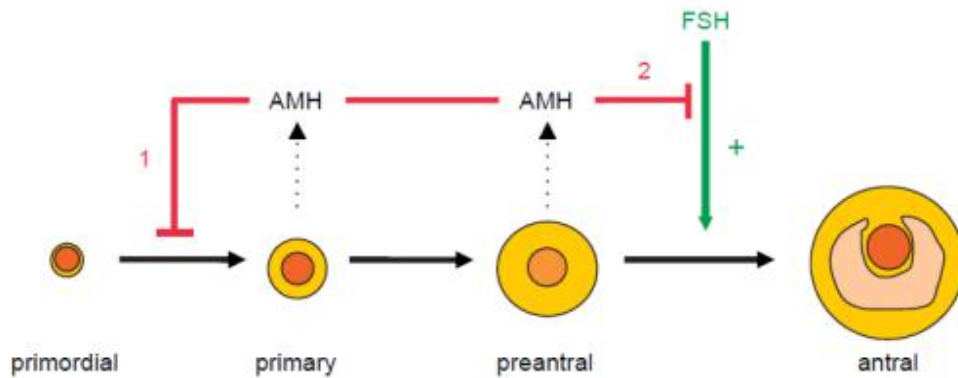


图 1-2 AMH 在卵巢内分泌模式 (Visser JA 2006)

Figure 1-2 Model of AMH action in the ovary (Visser JA 2006)

1.2.3.4 AMH 作为卵巢储备的标志物

卵巢储备功能主要包括卵巢内存留卵泡的数量和质量。生殖功能的下降反映了卵巢储备的减少, 这是由于原始卵泡池的数量和质量降低造成的, 卵巢内原始卵泡池耗尽, 存留的可募集卵泡数量减少, 卵母细胞质量下降, 导致更年期。

生长卵泡的数量与原始卵泡池的大小相关 (Scheffer et al 2003)。血清 AMH 浓度和有腔卵泡数之间存在强相关性, 血清 AMH 浓度随着雌性动物的年龄增加而降低。女性的血清 AMH 浓度在出生至青春期阶段比较低; 在青春期, 血清 AMH 浓

度不断增加, 大约在 20-25 岁时达到峰值; 此后, AMH 浓度逐渐降低, 直至绝经后检测不到 (De et al 2002)。AMH 在卵巢储备能力中具有潜在作用, 它通过双重作用来实现。首先, 它通过阻止几种刺激性生长因子如 KIT 配体和碱性成纤维细胞生长因子等的作用, 从而抑制卵泡的初始募集 (Durlinger et al 2002b)。其次, 进入青春期, AMH 降低有腔卵泡对 FSH 的敏感性, 从而降低卵泡周期募集的机会 (Kalich-Philosoph et al 2013)。一旦卵泡被选择为优势卵泡, AMH 含量迅速下降 (Jeppesen et al 2013)。

1.2.3.5 AMH 与卵母细胞的关系

在卵巢中, AMH 通过自分泌/旁分泌的方式调节卵巢内各种因子的表达, 形成了卵母细胞生长的微环境, 对卵母细胞成熟和质量发挥着重要的作用。Kim 等研究表明, 卵泡液 AMH 含量可以预测卵母细胞质量并可作为评估卵母细胞是否成熟的指标 (Kim et al 2014)。AMH 可能是卵母细胞减数分裂的抑制剂, 在大鼠卵母细胞体外培养研究中表明 AMH 能抑制其 GVBD 的发生 (Takahashi et al 1986)。Takahashi 以同样条件培养小鼠卵母细胞和卵丘卵母细胞复合体, 却发现不同剂量的 AMH 对小鼠卵母细胞 GVBD 率均无显著性影响。Ueno 的研究发现在不含有 AMH 的情况下体外培养大鼠卵母细胞, 有无添加 EGF 对大鼠卵母细胞的 GVBD 率均无影响; 而 AMH 与 EGF 联合培养却可以大大提高大鼠卵母细胞的 GVBD 率, 这表明 EGF 可能是 AMH 的拮抗剂, EGF 阻止了 AMH 对卵母细胞减数分裂的抑制作用 (Ueno et al 1988)。在猫的卵丘卵母细胞复合体体外培养研究中发现, 卵母细胞的成熟率随着 AMH 浓度的增加而显著降低 (Gilchrist et al 2006)。小鼠卵丘卵母细胞复合体在体外培养试验中表明其卵母细胞成熟率不受 AMH 的影响, 但当 rh-AMH 浓度为 100ng/mL 时可以显著提高小鼠卵母细胞的囊胚率 (Zhang et al 2014)。血清 AMH 水平与卵母细胞成熟数、受精率、获得胚胎数、高质量胚胎数及转移胚胎数之间均呈显著正相关 (Borges et al 2017)。

1.3 卵母细胞的体外成熟

1.3.1 卵母细胞质量的评定

哺乳动物卵母细胞质量的好坏将直接影响到卵母细胞的受精、早期胚胎存活、妊娠维持甚至胎儿的发育。卵母细胞的成熟包含核成熟和胞质成熟两个方面, 当核

和胞质达到同步成熟时卵母细胞才有可能发育成为优质胚胎。通常以第一极体排出作为卵母细胞核成熟的标志，胞质成熟包括特异性蛋白的合成、皮质颗粒细胞的释放、细胞内储藏的钙离子的释放以及线粒体的重定位等。目前临床上用来观察卵母细胞成熟度的常见方法是偏振光显微镜，成熟卵母细胞的形态为球形，排出第一极体，卵细胞质收缩，卵黄膜和透明带之间出现一个小的裂隙。卵母细胞中谷胱甘肽（Glutathione, GSH）是卵母细胞活性和发育能力的生化标志物，GSH 具有抵抗卵母细胞内氧化作用的伤害，可以作为卵母细胞胞质成熟的标志（Matos et al 2000）。卵母细胞的受精率、卵裂率和早期胚胎的存活是卵母细胞质量的直接评价标准。

1.3.2 卵母细胞体外成熟的影响因素

哺乳动物卵母细胞体外成熟培养技术是决定胚胎移植的关键，而卵母细胞体外成熟还存在很多影响因素。比如卵母细胞的种类、卵泡的大小、卵母细胞的状态、卵丘颗粒细胞的质量、体外培养卵母细胞的时间、卵母细胞培养液中各成分的组成以及卵母细胞的培养环境等因素。

1.3.3 卵母细胞分泌因子

卵母细胞在发育成熟的过程中并不是处于被动的状态，它可以通过分泌卵母细胞分泌因子生长分化因子-9（GDF9）和骨形成蛋白-15（BMP15）来调节周围细胞的功能（Erickson et al 2000, Moore et al 2005），卵母细胞分泌因子可以调节卵母细胞自身的成熟、卵母细胞质量以及排卵。GDF9 和 BMP15 是转化生长因子 β 超家族（TGF- β ）的两个成员（Chang et al 2002）。研究表明，GDF9 促进卵丘颗粒细胞增殖，抑制 LH/CG 受体在颗粒细胞中的表达，并刺激卵丘颗粒细胞扩展，提高透明质酸合成酶 2（Has2）和前列腺素合成酶 2（Ptgs2）表达（Elvin et al 1999 and 2000）。尽管 BMP15 在小鼠中的作用没有其他物种那么显著，但在小鼠中 BMP15 一旦缺失其生育能力便会受到负面影响，造成交配后受精卵母细胞数目的减少（Yan et al 2001）。BMP15 在啮齿动物以及家养物种中影响卵泡发育的功能，重组 BMP15 能促进大鼠卵丘颗粒细胞的增殖，但可能通过减少 FSH 受体的表达来抑制 FSH 的作用（Otsuka et al 2000 and 2001, Shimasaki et al 2003）。

1.3.4 cAMP 与卵母细胞成熟的关系

环腺苷酸 (cAMP) 是普遍存在于机体中的重要第二信使, 调节多种生理细胞反应, 在哺乳动物卵巢中是控制卵母细胞减数分裂的关键分子。早在 1978 年, Dekel 和 Beers 就将 cAMP 鉴定为卵母细胞“减数分裂抑制剂” (Dekel and Beers 1978)。研究显示 cAMP 依赖性蛋白激酶水平的降低能够促进卵母细胞的成熟 (Huchon et al 1981), 即磷酸化蛋白的磷酸化状态直接或间接地受 cAMP 依赖性蛋白激酶控制, 并维持卵母细胞的前期停滞 (Maller and Krebs 1977)。在牛卵母细胞中, 刺激 cAMP 产生或抑制 cAMP 类似物的降解导致 GVBD 的瞬时抑制 (Homa 1988, Bilodeau-Goeseels 2003)。一般而言, cAMP 发挥作用是通过 cAMP 依赖性蛋白激酶 A (PKA) 的激活介导的, 在小鼠和爪蟾卵母细胞中的研究表明 PKA 直接调节 MPF 催化亚基的激酶和磷酸酶 (Han and Conti 2006)。卵母细胞中 cAMP 含量的不断增长导致 PKA 激活, 继而阻止 MPF 活化的进程, 卵母细胞维持在 M 期。通常情况下, 卵母细胞内高水平的 cAMP 维持卵母细胞减数分裂停滞, 但在排卵时, 卵泡内高水平 cAMP 可诱导减数分裂恢复 (Dekel et al 1988)。cAMP 一旦发生水解, 卵内细胞 cAMP 水平下降, 导致 PKA 的失活, 卵母细胞迅速发育为 GVBD 期 (Norris et al 2009, Vaccari et al 2009)。cAMP 的峰值通常出现在 GVBD 之前, 在 GVBD 附近水平急剧下降 (Gilchrist et al 2016)。在 COC 体外培养中, FSH 的作用通过 cAMP 来实现, FSH 最初诱导卵丘颗粒细胞产生 cAMP, 并在 30min 后达到最高峰。此后, cAMP 浓度逐渐降低, 在 2h 后达到最低浓度, 卵丘卵母细胞复合体分泌减数分裂激活物, 诱导卵母细胞成熟 (Lin et al 2011)。

1.3.5 MPF 与卵母细胞成熟的关系

MPF (成熟促进因子) 最早在 1971 年由 Yoshio Masui 和 Clement Markert 在蛙卵中发现, 由于能诱导卵母细胞成熟而称之为成熟促进因子。MPF 是有丝分裂和减数分裂的通用细胞周期调节剂 (Nurse et al 1990), 它是由丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 p34cdc2 (Cdc2, 又可称为 CDK1) 和调节亚基 Cyclin B 组成的异二聚复合体 (Dunphy et al 1988, Draetta et al 1989)。MPF 在减数分裂成熟过程中发挥主导作用, 在未成熟卵母细胞中 MPF 活性被抑制到低水平, 并且 MPF 的激活诱导卵母细胞 GVBD 的发生 (Dessev et al 1991, Luscher et al 1991)。Cyclin B 的量是决定 MPF 活性的主

要因素，在 GV 期卵母细胞中表达量较低，形成的是没有活性的 Pre-MPF。随着卵母细胞的成熟 Cyclin B 的量逐渐呈上升趋势，与此同时，Cdc2 蛋白去磷酸化，形成成熟的 MPF，MPF 活化（Han et al 2005）。卵母细胞 GVBD 向 MI 的发育需重新依赖于 MPF 的激活，并在此时 MPF 水平达到峰值（Masui and Market 1998）。在自发成熟的大鼠卵母细胞中显示 MPF 活性在 GVBD 开始减数分裂之后立即升高，在 MI 达到最大水平，在 PBI 形成之前下降并且在进入第二次减数分裂（Ezoe et al 2015）。卵母细胞中 cAMP 水平与 MPF 水平呈负相关趋势，研究表明 cAMP 通过抑制 p34cdc2 去磷酸化的途径来抑制 MPF 活性（Goren and Dekel 1994）。抑制 MPF 激活同时，cAMP 抑制 CyclinB1 的合成，从而使 Pre-MPF 的活性降至最低，卵母细胞减数分裂被抑制（Josefsberg et al 2003）。

1.4 卵丘扩展

1.4.1 卵丘颗粒细胞与卵母细胞的关系

腔前卵泡中颗粒细胞可以分化成壁颗粒细胞和卵丘颗粒细胞，壁颗粒细胞位于卵泡腔周围，是卵泡内主要的体细胞成分；而卵丘颗粒细胞紧密围绕在卵母细胞周围，并与卵母细胞形成完整的卵丘卵母细胞复合体（Gilula et al 1978）。卵丘颗粒细胞通过专门的间隙连接与卵母细胞相互沟通，这些连接允许信号分子的代谢交换和转运，如传递氨基酸、谷胱甘肽、糖代谢产物等物质（Tanghe et al 2002）。卵丘颗粒细胞可以维持卵母细胞减数分裂的阻滞以及参与减数分裂的恢复，在卵母细胞成熟过程中起着促进的作用（Dekel and Beers 1980, Larsen et al 1986）。而卵母细胞能够分泌促有丝分裂因子促进壁颗粒和卵丘颗粒细胞 DNA 合成和细胞增殖（Gilchrist et al 2003），卵母细胞还能有效地调节卵丘颗粒细胞分化。卵母细胞通过壁颗粒细胞和卵丘颗粒细胞调节 FSH 诱导的孕酮和雌二醇合成并抑制 FSH 诱导的黄体生成素受体（LHR）mRNA 表达（Eppig et al 1997）。

1.4.2 卵丘扩展相关因子

卵丘扩展是卵泡发育最后阶段的另一个重要方面，对卵巢排卵的成功（Chen et al 1993）和随后的受精是至关重要的（Ball et al 1983）。在 LH 峰诱导作用下，胞外基质中合成大量透明质酸（HA）以及卵丘颗粒细胞细胞骨架的重排导致卵丘的膨胀

和具有粘弹性, 这一过程称为卵丘扩展 (Dekel et al 1979, Eppig 1979)。在 FSH 或表皮生长因子样肽 (EGF) (Vanderhyden et al 1990, Park et al 2004) 的刺激下, 卵丘颗粒细胞中 MAPK3/1 和 MAPK14 激酶信号传导途径的激活, 从而增加卵丘颗粒细胞中卵丘扩展相关因子 Has2、Ptgs2、PTX3 和 Tnfaip6 mRNA 表达 (Joyce et al 2001, Varani 2002, Ochsner et al 2003, Su et al 2003, Salustri et al 2004, Richards 2005)。Has2, 乙酰透明质酸合酶 2 是生成透明质酸所需的关键酶, 透明质酸是由卵丘颗粒细胞分泌的非硫酸化糖胺聚糖, 它是卵丘基质的基本成分 (Camaioni et al 1993; Chen et al 1993)。Ptgs2, 前列腺素合成酶 2 (也被称为 COX2, 环氧合酶 2) 由卵丘颗粒细胞以及壁颗粒细胞产生, 并且是卵丘扩展和排卵所需的 (Das 1997)。Tnfaip6, 肿瘤坏死因子诱导蛋白 6 (也称为 TSG6) 是一种分泌蛋白, 其结合透明质酸和 α - α 间质蛋白酶抑制剂 (ITI), 这是一种对基质形成重要的血清衍生蛋白质, 将 ITI 重链连接至透明质酸 (Fulop et al 2003, Mukhopadhyay et al 2004)。PTX3, 正五聚蛋白 3 也由卵丘颗粒细胞分泌, 并起到稳定 Tnfaip6 蛋白以维持扩展基质的作用 (Varani 2002, Salustri et al 2004)。

1.4.3 卵丘扩展与卵母细胞的关系

卵丘扩展可以促进卵母细胞核和胞质成熟, 对卵母细胞的发育能力起促进作用, 卵丘扩展程度与卵母细胞体外受精呈正相关关系。在细胞与细胞之间连接丢失时, 卵丘扩展会产生更多的因子通过多条信号通路进入卵母细胞, 从而提高卵母细胞的成熟及其发育能力 (岳顺利等 2005)。

1.5 实验的目的和意义

在哺乳动物中，卵母细胞的发育状态与成熟质量决定了早期胚胎能否正常发育。在卵丘卵母细胞复合体中，卵丘颗粒细胞是卵母细胞生长发育的微环境，且通过缝隙连接形式对卵母细胞发挥作用，而卵母细胞以旁分泌因子的形式来完成对卵丘颗粒细胞的调控。AMH 是卵巢产生的重要调节因子，主要通过抑制原始卵泡的募集、降低有腔卵泡对 FSH 的敏感性而参与调控卵泡生长发育，AMH 还可作为评估卵巢储备能力、预测超排反应的有效标志物。然而 AMH 在卵母细胞发育中发挥的调控作用尚不明晰。

本研究以昆明鼠卵母细胞为研究对象，从裸卵和卵丘卵母细胞复合体 2 个层面研究 AMH 对卵母细胞体外成熟的影响，探讨 AMH 对卵丘扩展的调控作用，旨在提高卵母细胞体外培养质量及卵母细胞利用率，促进体外胚胎发育，进而提高家畜的繁殖率。

2 实验材料

2.1 实验动物

SPF 级昆明雌鼠购自湖北省疾病预防控制中心。动物房保持 12 h/12 h 的明暗周期变化，早晨 8:00 至晚上 8:00 为光照时间，晚上 8:00 至次日早上 8:00 为熄灯时间。所有试验用小鼠均采用自由采食和饮水方式。动物房内设有空调及通风设备，严格控制温度与湿度。

2.2 试剂与耗材

表 2-1 主要试剂与耗材

Table 2-1 Main reagents and consumables

试剂与耗材	厂家
PMSG	宁波三生药业有限公司
FBS (胎牛血清)	美国 Gibco 公司
DMEM/F12	美国 Hyclone 公司
M16 Medium	美国 Sigma 公司
α -MEM	美国 Gibco 公司
青链霉素混合液	美国 Gibco 公司
重组小鼠 EGF	美国 PeProtech 公司
重组小鼠 FSH	美国 R & D Systems 公司
重组人 AMH/MIS	美国 R & D Systems 公司
石蜡油	美国 Sigma 公司
Trizol 试剂	美国 Invitrogen 公司
无水乙醇	上海国药集团化学试剂有限公司
氯仿	上海国药集团化学试剂有限公司
异丙醇	上海国药集团化学试剂有限公司
DEPC 水	武汉谷歌生物科技有限公司
DL1000 DNA Marker	日本 TaKaRa 公司
PCR 引物	武汉擎科创新生物科技有限公司

试剂与耗材	厂家
琼脂糖	武汉市普博欣生物技术有限责任公司
PMSF	武汉谷歌生物科技有限公司
RIPA 裂解液	武汉谷歌生物科技有限公司
磷酸化蛋白酶抑制剂 A、B 液	武汉谷歌生物科技有限公司
50×Cocktail 蛋白酶抑制剂	武汉谷歌生物科技有限公司
5×蛋白上样缓冲液	武汉谷歌生物科技有限公司
蛋白 Marker	美国 Thermo 公司
一抗、二抗洗脱液	武汉谷歌生物科技有限公司
Tris-base	上海国药集团化学试剂有限公司
NaCl	上海国药集团化学试剂有限公司
甘氨酸	上海国药集团化学试剂有限公司
甲醇	上海国药集团化学试剂有限公司
Tween-20	上海国药集团化学试剂有限公司
PVDF 纤维素膜	美国密理博公司
细胞培养板	美国 Corning 公司
1mL 注射器	上海金塔医用器材有限公司
1.5mL 离心管	赛默飞世尔科技(中国)有限公司
0.2mL PCR 管	赛默飞世尔科技(中国)有限公司

表 2-2 主要试剂盒

Table 2-2 The main kits

试剂盒	厂家（货号）
RNeasy Micro Kit	德国 QIAGEN（74004）
QuantiTect Rev. Transcription Kit (50)	德国 QIAGEN（205311）
QuantiNova SYBR Green PCR Kit (100)	德国 QIAGEN（208052）
SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒	武汉谷歌生物科技有限公司（G2003）
小鼠雌二醇（E2）ELISA 检测试剂盒	武汉华美生物工程有限公司 CUSABIO
小鼠孕酮（PROG）ELISA 检测试剂盒	武汉华美生物工程有限公司 CUSABIO
小鼠成熟促进因子（MPF）ELISA 检测试剂盒	上海酶联生物
小鼠环磷酸腺苷（cAMP）ELISA 检测试剂盒	上海酶联生物

2.3 主要抗体

表 2-3 主要抗体

Table 2-3 The Main Antibodies

抗体	编号	厂家
兔抗 AMH	ab84952	英国 Abcam
兔抗 AMHR2	ab107148	英国 Abcam
兔抗 BMP15	ab108413	英国 Abcam
兔抗 GDF9	ab93892	英国 Abcam
兔抗 GAPDH	AB-P-R 001	上海贤至生物科技有限公司
兔抗 β -actin	B1033	北京博奥龙免疫技术公司
Goat Anti-Rabbit IgG	BA1054	武汉博士德生物工程有限公司

2.4 实验仪器

表 2-4 主要仪器

Table 2-4 The main instruments

仪器	型号	厂家
微量移液器	1 μ L; 10 μ L; 200 μ L; 1mL	Eppendorf
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州安泰
CO ₂ 恒温培养箱	150i	美国 Thermo
倒置显微镜	IX51	OLYMPUS
低速离心机	5702R	Eppendorf
实时荧光定量 PCR 仪	ViiA7	ABI
电热恒温培养箱	ICV-450	日本 ASONE
电热恒温水浴锅	HW-SY11-K P2	北京长风仪器仪表有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG 9203A	上海精宏实验设备有限公司
全自动酶标仪	Multiskan MK3	Thermo scientific
Aquapro 超级纯水仪	AJY -0501	艾科浦
电子天平	BL1500	德国 Sartorius
PCR 仪	EDC-810	东胜创新生物科技有限公司
电泳仪	JY300	美国 Bio-Rad
微波炉	P70D20TJ-D3	Galanz 公司
微型高速离心机	C2500-R-230V	美国 Labnet
体视显微镜	SE45-ST1	日本 Nikon 公司
分光光度计	NanoDrop 2000	美国 Thermo

2.5 试剂的配制

(1) 裸卵捡卵液: 在 DMEM/F12 培养液中加入 10% FBS、1%青链霉素混合液, 混匀后分装至 50 mL 离心管, 4°C 保存备用。

(2) COC 捡卵液: 每 10 mL α -MEM 溶液中加入 2% FBS、20 mM 丙酮酸钠、1%青链霉素混合液, 分装后 4°C 保存备用。

(3) 裸卵体外成熟液: 为商业化的 M16 培养液。

(4) COC 体外成熟液: 在 α -MEM 溶液中加入 5% FBS、1%青链霉素混合液、20 ng/mL EGF、20 mM 丙酮酸钠、3 mg/mL BSA, 4°C 保存备用。

(5) 50×TAE 电泳缓冲液: 称取 600 mL 蒸馏水, 加入 242.0 g Tris-base、57.1 mL 冰乙酸、100 mL 0.5 mol/L EDTA, 调 pH 值至 8.0, 加蒸馏水定容为 1000 mL, 备用。

(6) 2%琼脂糖凝胶: 称取 2 g 琼脂糖, 加入 100 mL 1×TAE 电泳缓冲液, 在微波炉中加热融化。

(7) 蛋白印迹电泳液: 称取 3.02 g Tris-base、19 g Glycine、1 g SDS, 加双蒸水溶解并定容至 1000 mL, 调 PH 值至 8.3。

(8) 蛋白印迹转膜缓冲液(1×): 称取 5.8 g Tris-base、2.9 g Glycine、0.37 g SDS, 加双蒸水溶解, 并加入 200 mL 甲醇, 定容至 1000 mL。

(9) TBS 缓冲液(10×贮存液): 称取 12.1 g Tris-base、87.75 g NaCl、浓 HCl 调节 pH 到 7.4, 加水定容到 1000 mL。

(10) TBST 缓冲液: 量取 1000 mL 1×TBS 工作液加入 1 mL Tween -20, 现用现配。

(11) 5% BSA 溶液: 称取 0.5g BSA, 加入 10mL TBST 电泳缓冲液, 缓慢摇匀至溶解。

(12) 75%乙醇溶液: 量取 75 mL 无水乙醇, 加入 25 mL 蒸馏水, 混匀。

(13) PBS 缓冲溶液(10×贮存液): 称取 80 g NaCl、2 g KCl、14.4 g Na_2HPO_4 和 2.4 g KH_2PO_4 , 加入 1000 mL 蒸馏水溶解。

(14) 2×SDS 上样缓冲液: 取 1 mL 1M Tris (PH 6.8), 1 mL β -巯基乙醇, 0.002 g 溴酚蓝, 2 mL 甘油, 4 mL 10%SDS, 加 2 mL 超纯水溶解至 10 mL, -20°C 保存备用。

3 实验方法

3.1 裸卵的收集与培养

(1)微滴的制备与平衡:培养前 30 min 制好微滴(M16 培养液、1 ng/mL rh-AMH M16 培养液、10 ng/mL rh-AMH M16 培养液及 100 ng/mL rh-AMH M16 培养液各约 100 μ L),石蜡油覆盖微滴后,将其放入培养箱中进行酸碱度平衡。同时,于 1.5 mL 离心管中加入少许 M16 培养液,放入培养箱中进行平衡,以备清洗卵母细胞。

(2)裸卵的培养:各实验组取 5 只 3 周龄雌鼠,断颈快速处死,取出两侧卵巢,将卵巢置于 PBS 中清洗数次去除卵巢表面残余血迹和脂肪组织,然后将卵巢置于一一次性培养皿(35 mm)中央,用刀片剁碎卵巢,使卵母细胞从卵泡中释放出来;添加适量裸卵捡卵液悬浮卵巢组织碎块,在体视显微镜下用自制口吸管挑选处于 GV 期的卵母细胞;随后,将经过清洗的卵母细胞转入提前制好的微滴中培养。

3.2 卵丘卵母细胞复合体的收集与培养

(1)微滴的制备与平衡:培养前 30 min 将 30 μ L/滴培养液(α -MEM 细胞培养液、100 ng/mL rh-AMH α -MEM 细胞培养液、100 ng/mL rm-FSH α -MEM 细胞培养液及 100 ng/mL rh-AMH+100 ng/mL rm-FSH α -MEM 细胞培养液)置于小皿内,每个实验组制备 3 个微滴,石蜡油覆盖微滴后,将其放入培养箱中进行酸碱度平衡。同时,于 1.5 mL 离心管中加入少许 α -MEM 细胞培养液,放入培养箱中进行平衡,以备清洗 COC。

(2)COC 的收集与培养:各实验组取 5 只 3 周龄昆明雌鼠注射 PMSG 44 h 后,断颈处死取出含有大量有腔卵泡的卵巢,在体视显微镜下用 1 mL 注射器小心地将卵泡挑破,使 COC 流到捡卵液中,用口吸管挑选大小均一且颗粒细胞层较多的 COC,迅速清洗后转入微滴中培养。

3.3 实时荧光定量 PCR 检测基因的表达

3.3.1 RNA 的提取

1. 小鼠卵巢组织总 RNA 的提取

(1) 取 7 d、14 d、21 d 和 28 d 的昆明雌鼠，颈椎脱臼处死后，在无菌条件下迅速摘取卵巢并放入无菌 PBS 溶液中，去除卵巢表面残余血迹和脂肪组织后，将卵巢放入装有 1 mL Trizol 的 RNase-free EP 管中，使用磁珠振动匀浆。

(2) 用 RNase-free 枪头反复吹打卵巢至完全裂解，转移至 1.5 mL EP 管中。

(3) 每管加入 200 μ L 预冷的氯仿，轻轻颠倒数次混匀，室温静置 10 min。

(4) 标记、封口后，于 4 $^{\circ}$ C 离心机 12000 rpm 离心 15 min，样品分层，RNA 存在于上层水相中。

(5) 吸取上层水相（约 400 μ L）于新的 1.5 mL EP 管中，加入等量预冷的异丙醇，充分混匀后，室温静置 10 min。

(6) 标记、封口后，于 4 $^{\circ}$ C 离心机 12000 rpm 离心 10 min，此时可看到管底的白色 RNA 沉淀。

(7) 弃上清，向沉淀中加入 1 mL 75% 无水冰乙醇漂洗 2 次（注意：75% 无水乙醇用 DEPC 水配制，现用现配），于 4 $^{\circ}$ C 离心机 8000 rpm 离心 5 min，最后一遍用移液枪将上清洗净。

(8) 置于室温干燥 5-10 min，待沉淀呈半透明状，加入适量 DEPC 水溶解，离心管中收集到的为卵巢组织总 RNA。

(9) 将 RNA 保存在 -80 $^{\circ}$ C 备用。

2. 裸卵、COC 和卵丘颗粒细胞 RNA 的收集

裸卵、COC 和卵丘颗粒细胞的收集方法分别如下：（1）裸卵：将 GV 期裸卵（约 150 个）转入 350 μ L 含有 1% β -巯基乙醇的裂解液（Buffer RLT Plus）的 1.5 mL 离心管中，反复吹打数次使之混匀。（2）COC：将 COC 检出吹进含有新鲜捡卵液的 1.5 mL 离心管中，12000 rpm 离心 30s 后弃掉上清液，如此重复清洗 2-3 遍，最后将 350 μ L 含有 1% β -巯基乙醇的裂解液（Buffer RLT Plus）转移到该离心管中，用移液枪反复吹打混匀。（3）用口吸管将 COC 检出吹进含有透明质酸酶的新鲜捡卵液中，涡旋 3-5 min，将脱掉卵丘的卵母细胞检出；收集卵丘颗粒细胞，12000 rpm 离心 30 s 后弃掉上清液，如此重复清洗 2-3 遍，最后将 350 μ L 含有 1% β -巯基乙醇

的裂解液 (Buffer RLT Plus) 转移到该离心管中, 用移液枪反复吹打混匀。

之后, 参照 QIAGEN 试剂盒说明书提取 RNA, 步骤如下:

(1) 将收集的 RNA 样品溶液转入到 2 mL 的过滤柱 (gDNA Eliminator Spin Column) 中, 12000 rpm 离心 30 s 后收集滤液。

(2) 加入等体积预先配好的 70% 乙醇, 混匀后全部转移至 2 mL 的吸附柱 (RNase MinElute Spin Column) 中, 将吸附柱放入收集管中, 12000 rpm 离心 15 s, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

(3) 向上述吸附柱中加入 700 μ L 去蛋白液 RW1, 12000 rpm 离心 15 s, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

(4) 向上述吸附柱中加入 500 μ L Buffer RPE, 12000 rpm 离心 15 s, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

(5) 向上述吸附柱中加入 500 μ L 预先配制好的 80% 乙醇, 12000 rpm 离心 2 min, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

(6) 将上述吸附柱放入新的收集管中, 12000 rpm 离心 5 min, 弃掉收集管中的废液, 此时 RNA 在柱膜上。

(7) 将收集管更换为干净的 1.5 mL 离心管, 在吸附柱中加入 15 μ L 无 RNA 酶的水, 12000 rpm 离心 60 s。

(8) 将 RNA 保存在 -80 $^{\circ}$ C 备用。

3.3.2 RNA 浓度和纯度的检测

取 1 μ L 左右的 RNA, 采用 NanoDrop 2000 进行检测, RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值在 1.9-2.0 之间则表明 RNA 纯度较好, 可以满足实验需求。

3.3.3 RNA 反转录为 cDNA

(1) 将样品置于冰盒上, 在无 RNA 酶的 PCR 管中加入 10 μ L RNA、3 μ L gDNA Wipeout 以及 7 μ L RNase-free water, 轻轻混匀。

(2) 取出其中 6 μ L 进行 RNA 电泳跑胶。

(3) 将上述其他 14 μ L 样品置于 42 $^{\circ}$ C 孵育 2 min 后于冰上冷却。

(4) 在以上冷却后的 14 μ L 样品中加入 1 μ L RT Primer、4 μ L 5 \times Quantiscript RT Buffer、1 μ L Quantiscript Reverse Transcriptase, 总体系为 20 μ L, 轻轻混匀。

(5) 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中按照程序: 42 °C, 15 min; 95 °C, 3 min; 反应后置于-20 °C 保存。

3.3.4 荧光定量 PCR

(1) 定量引物的设计

通过 NCBI 查阅小鼠相关基因的序列, 与 AMH 相关的基因 (AMH 和 AMHR2)、与类固醇激素合成相关的引物序列 (CYP19A1、3 β -HSD 和 StAR)、卵母细胞特异性表达基因的引物序列 (GDF9 和 BMP15)、与卵丘扩展相关的基因 (PTX3、Ptgs2、Tnfaip6 和 Has2) 以及 FSHR、 β -actin 的 mRNA 序列, 应用 Primer 5.0 软件设计引物, 由武汉擎科创新生物科技有限公司, 其引物序列如下:

表 3-1 本研究所涉及基因的引物序列

Table 3-1 Primer sequences for genes used in this study

基因	引物序列 (5'-3')	扩增片段 (bp)
AMH	F:TACTCGGGACACCCGCTATT	110bp
	R:TCAGGGTGGCACCTTCTCT	
AMHR2	F:GCAGCACAAGTATCCCCAAAC	204bp
	R:GTCTCGGCATCCTTGCATCTC	
FSHR	F:AGGTACAGCTCTGCCATGCT	171bp
	R:GTACGAGGAGGGCCATAACA	
CYP19A1	F:CCCGAGCCTTTGGAGAACAA	161 bp
	R:TGAGGGTCAACACATCCACG	
3 β -HSD	F:TGGACAAAGTATTCCGACCAGA	250bp
	R:GGCACACTTGCTTGAACACAG	
StAR	F:GTGAAGGCTAAGGGATAA	125bp
	R:TGGAGCTGGTAAGACAAC	
GDF9	F:TGGAACACTTGCTCAAATCGG	106bp
	R:GACATGGCCTCCTTTACCACA	
BMP15	F:GAAAATGGTGAGGCTGGTAAAG	153bp
	R:AGATGAAGTTGATGGCGGTAAA	

PTX3	F:TTTGGAAGCGTGCATCCTGT	186bp
	R:GTTCTCCTTTCCACCCACCA	
Ptgs2	F:GTTTCATCCCTGACCCCAAG	193bp
	R:TCCATCCTTGAAAAGGCGCA	
Tnfaip6	F:GCTCAACAGGAGTGAGCGAT	166bp
	R:CTGACCGTACTTGAGCCGAA	
Has2	F:GACGACAGGCACCTTACCAA	116bp
	R:TGCTGGTTCAGCCATCTCAG	
β -actin	F:CACGATGGAGGGGCCGACTCATC	240bp
	R:TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT	

(2) 荧光定量 PCR 的反应体系 (10 μ L) 如下:

表 3-2 qRT-PCR 扩增反应体系

Table3-2 Reaction system for qRT-PCR

试剂	体积
SYBR Green PCR Master Mix	5 μ L
Forward primer	0.5 μ L
Reverse primer	0.5 μ L
cDNA	1 μ L
H ₂ O	3 μ L
Total Volume	10 μ L

按照上述体系混匀后加入 96 孔板 (注意避光), 上机检测。

(3) 扩增反应条件设定如下:

荧光定量 PCR 采用 Bio-Rad CFX96 real-time PCR detection system 进行, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 1 min, 40 cycles (95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s)。溶解曲线从 65 $^{\circ}$ C 开始到 95 $^{\circ}$ C, 0.5 $^{\circ}$ C/s 增量, 读取荧光值。利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因相对表达水平, β -actin 为内参基因。

3.4 Western blot 检测蛋白水平的表达情况

3.4.1 裸卵蛋白的提取

根据实验所需收集不同发育时期的裸卵（裸卵培养 0 h, 2 h, 8 h, 14 h 后对应 GV, GVBD, MI, MII 时期），每个样品约 200 个卵母细胞，体视显微镜下清洗卵母细胞后，将卵母细胞小心吹到含有 20 μ L 2 \times SDS 上样缓冲液中（尽量少带入培养液及其他液体），轻轻振荡，在室温裂解约 2 min 后于-20 $^{\circ}$ C 储存备用。

3.4.2 卵丘卵母细胞复合体蛋白的提取

COC 培养 16h 后，收集各激素处理组及对照组 COC，清洗后，将 COC 吹到 20 μ L RIPA 裂解液（含 0.2 μ L 1% cocktail 蛋白酶抑制剂，0.2 μ L 磷酸化蛋白酶抑制剂 A、B 液，0.4 μ L PMSF），冰上裂解 10-15 min 后将裂解液转移至 1.5 mL 离心管中，冰上继续裂解 5-10 min。以 12000 rpm 离心 10 min 后吸取上清液，分装保存于-20 $^{\circ}$ C。

3.4.3 蛋白浓度检测及制样

1. 蛋白浓度检测

本实验采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度测定。具体操作步骤如下：

（1）配制标准品：取 0.8 mL 蛋白标准配制液加入到蛋白标准（20 mg BSA）中，充分溶解后配制成 25 mg/mL 的蛋白标准溶液，取适量用 PBS 稀释至终浓度为 0.5 mg/mL 的标准品试剂。

（2）配制 BCA 工作液：根据样品数量，按体积比 50: 1 加入 BCA 的 A 和 B 工作液，充分混匀，BCA 工作液室温 24 h 内稳定。

（3）96 孔板标准品孔中分别加入 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μ L 标准品，再用 PBS 将其它孔补足到 20 μ L。

（4）样品孔中每孔加入 10 μ L 蛋白样品，再补加 PBS 至 20 μ L。

（5）每孔加入 200 μ L BCA 工作液，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。

（6）利用酶标仪，检测波长为 562 nm 时各孔 OD 值，根据结果绘制蛋白浓度标准曲线，通过标准曲线计算出检测样品的蛋白终浓度。

2. 制样

根据测得各蛋白样品浓度，加入去离子水使各样品的蛋白浓度相同，加入蛋白上样缓冲液吹打混匀，煮沸 5 min，冰上放置 1 min，封口，-20 °C 保存备用。

3.4.4 蛋白免疫印迹

(1) 检漏：用单蒸水将玻璃胶板洗净，注意边边角角的残胶处理完全，洗完后将其安装好。

(2) 制胶：根据目的蛋白大小，配制 10 % 的分离胶。在加入 10 % 过硫酸铵和 4 μ L TEMED 后，迅速用移液枪吹打混匀，小心将胶液注于玻璃板的空隙内，避免产生气泡。在胶上边缘加入无水乙醇用于平衡胶面，大约 40 min 后倒去胶上层无水乙醇，用吸水纸吸干。然后配制 5 % 浓缩胶。每板加 2 mL 左右，配好后迅速注胶，并马上插入点样孔排梳，插入时动作轻慢避免产生气泡，插完后用烧杯内的剩余胶液补齐液面。室温静置放置 1 h，待胶凝固后，将胶板放于电泳液中，轻轻地将排梳拔出。

(3) 点样：将已制好的蛋白样品煮沸 5 min，冰上放置 1 min；将蛋白样品吹打混匀后，小心加入各胶孔中，未加样孔用 buffer 补齐。

(4) 电泳：电泳过程分为两步：先调节电泳仪恒压 80 V，跑电泳 1 h 左右，目测样品跑到分离胶时，将电压调至 120 V，预染 Marker 显示，判断目的蛋白得到充分分离后，可结束电泳。

(5) 转膜（湿转法）：将玻璃板取出，用胶板缓慢撬开玻璃板。轻轻取出凝胶浸泡在转膜缓冲液中；剪下合适大小的 PVDF 膜，浸泡于甲醇中 1-2 min 进行激活，待 PVDF 膜两边保护纸完全浸透后，将膜放入转膜缓冲液中浸泡漂洗，同时充分浸泡两张转膜海绵垫和滤纸；按照黑色板-纤维垫-滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸-纤维垫-白色板顺序依次放好，且每铺一层用玻璃棒轻轻擀走多余的气泡，防止气泡影响转膜效果；夹紧板后放入转膜仪内，200 mA 恒流转膜 3 h。

(6) 封闭：转膜完成后用 TBS 将 PVDF 膜漂洗 10 min，然后用 5% 脱脂奶粉室温摇床封闭 2 h。

(7) 一抗孵育：按照相应抗体说明书的要求，用封闭液稀释一抗，4 °C 过夜孵育。

(8) 二抗：过夜孵育后取出 PVDF 膜，室温下用 TBST 漂洗 3 次，每次漂洗 10 min，用 TBST 稀释二抗，使 PVDF 膜浸泡于二抗孵育液中，室温摇床孵育 2 h。

(9) 洗膜：二抗孵育完成后用 TBST 充分洗涤 PVDF 膜 3 次，每次 10 min，再用 TBS 洗涤 3 次，每次 10 min。

(10) 化学发光与成像：用 ECL 显色试剂盒 (BIO-RED)，A 液与 B 液等比混合加入离心管中，用锡箔纸包裹避光，上下摇动混匀，显影时小心将漂洗好的 PVDF 膜正面朝上放置在干净的大皿中，均匀滴加适量的 ECL 显影液，置于 ImageQuant LAS 4000 mini 成像仪底盘，打开配套软件，调整焦距和曝光时间，成像得到蛋白免疫印迹化学显影图。

3.5 激素的检测

采用 ELISA 方法检测雌二醇与孕激素。首先，收集培养 16 h COC 微滴，1000 rpm 离心 15 min，收集上清液。上清分装后于 -20 °C 保存备用。参照 ELISA 试剂盒说明书检测上清中雌二醇和孕酮，具体步骤如下：

(1) 配制洗液工作液：浓洗涤液按 1: 20 倍用去离子水进行稀释。例如用量筒量取 285 mL 去离子水，倒入烧杯或其它洁净容器中，再量取 15 ml 浓洗涤液，均匀加入，搅拌混匀，在临用前配妥。浓洗涤液低温保存会有盐析出，稀释时可在水浴中加温助溶。

(2) 将各种试剂移至室温平衡至少 30 min，按前述方法配制试剂，备用。

(3) 将酶标板取出，设一个空白对照孔、不加任何液体；每个标准点依次各设两孔，每孔加入相应标准品 50 μ L；其余每个检测孔直接加待测标本 50 μ L。

(4) 手工洗板，弃去孔内液体。洗涤液注满各孔，静置 10 s 甩干，重复三次后拍干。

(5) 每孔加显色剂 A 液 50 μ L，显色剂 B 液 50 μ L，震荡混匀后，37°C 避光显色 15 min，每孔加终止液 50 μ L。

(6) 用酶标仪在 450 nm 波长依序测量各孔的光密度 (OD 值)，在反应终止后 10 min 内进行检测。

3.6 成熟促进因子及环磷酸腺苷的检测

将 COC 在不同处理的微滴中培养 16 h 后,把 COC 吹进含有透明质酸酶的 200 μ L 捡卵液,用移液枪反复吹打后,在涡旋仪中涡旋 3 min,使卵丘颗粒细胞与卵母细胞分离,瞬时离心后,用移液枪反复吹打将液体滴在小皿中,将 40 枚左右卵母细胞用口吸管检出吹进 20 μ L PH 为 7.2-7.4 的 PBS 中,将样品放置-80 $^{\circ}$ C 中,破坏卵母细胞。2500 rpm 离心 20 min 左右,收集上清。保存过程中如有沉淀形成,应再次离心。参照试剂盒说明书分别检测 cAMP 和 MPF,具体操作步骤如下:

(1) 标准品的加样: 设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μ L。

(2) 加样: 分别设空白孔(空白对照孔不加样品及酶标试剂,其余各步操作相同)、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ l,然后再加待测样品 10 μ l(样品最终稀释度为 5 倍)。加样将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀。

(3) 加酶: 每孔加入酶标试剂 100 μ l,空白孔除外。

(4) 温育: 用封板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 温育 60 min。

(5) 配液: 将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 20 倍稀释后备用。

(6) 洗涤: 小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,如此重复 5 次,拍干。

(7) 显色: 每孔先加入显色剂 A 50 μ l,再加入显色剂 B 50 μ l,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 min。

(8) 终止: 每孔加终止液 50 μ l,终止反应(此时蓝色立转黄色)。

(9) 测定: 以空白孔调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值),测定应在加终止液后 15 min 以内进行。

3.7 小鼠卵丘扩展的评定及卵丘扩展指数

小鼠卵丘扩展的评定及卵丘扩展指数(Cumulus Expansion Index, CEI)的计算参照 Fagbohun 和 Downs 的报道。卵丘扩展分为 5 个级别: 0 级,卵丘没有扩展,卵母细胞贴到培养皿底部; 1 级,只有最外层的 1-2 层卵丘颗粒细胞扩展; 2 级,外层的卵丘颗粒细胞呈放射状扩展,观察到整个 COC 较蓬松; 3 级,放射冠部分不扩展,

其余的均扩展；4 级，全部卵丘颗粒细胞扩展。卵丘扩展指数 CEI=[（0 级卵母细胞个数×0）+（1 级卵母细胞个数×1）+（2 级卵母细胞个数×2）+（3 级卵母细胞个数×3）+（4 级卵母细胞个数×4）]/卵母细胞总个数（Fagbohun and Downs 1990）。

3.8 数据分析

运用 SPSS 19.0 软件中的单因素方差分析（One-way ANOVA）对实验数据进行各处理组组间表达差异的显著性分析， $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 分别为差异显著或极显著判断标准，相对表达量的结果均使用平均值±标准差（Mean ± SD）表示，数据利用 Graphpad Prism 5 软件作图。实验数据来自至少 3 次独立重复实验。

4 结果与分析

4.1 AMH 和 AMHR2 在小鼠卵巢中的表达模式

4.1.1 不同日龄小鼠卵巢中 AMH 与 AMHR2 的表达

为明确 AMH 及其受体 AMHR2 在不同日龄阶段小鼠卵巢中的表达规律，分别收集 7 d、14 d、21 d、28 d 雌鼠卵巢，利用 Real-time PCR 方法检测 AMH 及 AMHR2 的相对表达量。结果显示，AMH 和 AMHR2 在不同日龄小鼠卵巢中均有表达且存在差异，其中，14 d 雌鼠卵巢中 AMH 和 AMHR2 mRNA 的表达量最高，均显著高于其它日龄鼠 ($P<0.05$)，初情期后 AMH 与 AMHR2 的表达趋于稳定。

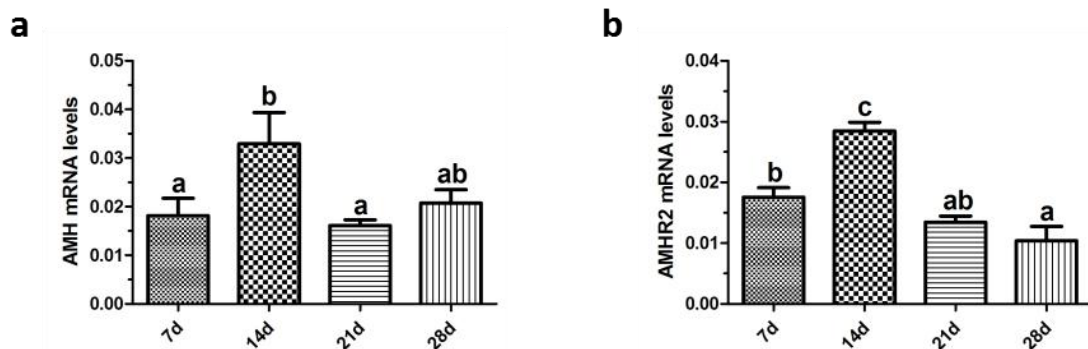


图 4-1-1 不同日龄小鼠卵巢中 AMH 及 AMHR2 的表达

a: 7 d、14 d、21 d 和 28 d 小鼠卵巢中 AMH mRNA 的表达水平；b: 7 d、14 d、21 d 和 28 d 小鼠卵巢中 AMHR2 mRNA 的表达水平；数据以平均值 \pm 标准差表示，不同的字母表示数据之间差异显著， $P<0.05$ 。

Figure 4-1-1 The expression of AMH and AMHR2 in different days of mouse ovary

a: AMH mRNA level in mouse ovary of 7 d、14 d、21 d and 28 d ; b: AMHR2 mRNA level in mouse ovary of 7 d、14 d、21 d and 28 d; The data represent mean \pm SD, different letters denote statistical difference at a $P<0.05$.

4.1.2 不同细胞 COC、CCs 及 DOs 中 AMH 与 AMHR2 基因的表达

收集 3 周龄雌鼠的卵丘卵母细胞复合体 (COC)、卵丘颗粒细胞 (CCs) 以及脱丘卵母细胞 (DOs)，利用 Real time PCR 方法检测 AMH 和 AMHR2 基因的表达。结果显示，在小鼠 COC 与 CCs 中均能检测到 AMH 与 AMHR2 基因的表达(图 4-1-2-a、b)，但在卵母细胞中仅检测到 AMHR2 基因的表达 (图 4-1-2-b)，未检测到

AMH 的表达 (图 4-1-2-a), 此结果提示 AMH 可能通过 AMHR2 对卵母细胞发挥作用。

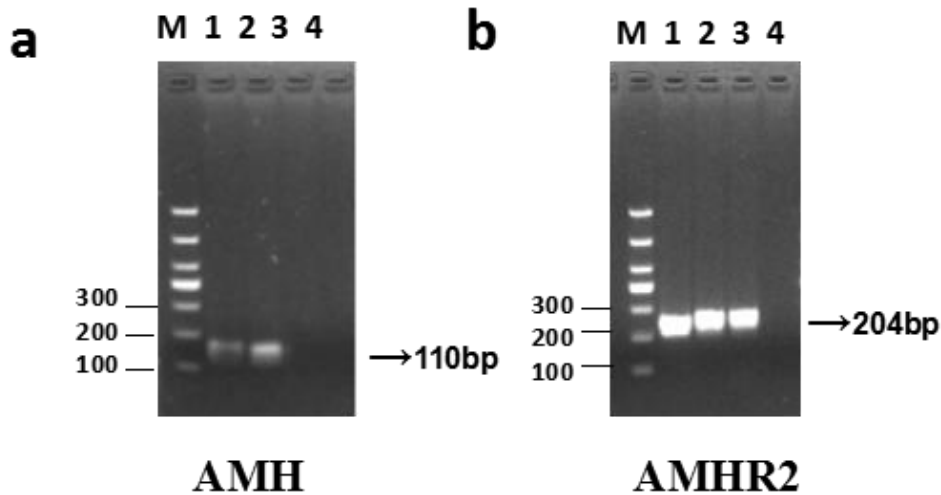


图 4-1-2 不同细胞中 AMH 及 AMHR2 基因的表达

M 代表 Marker DL1000, 泳道 1-4 分别以 COC、CCs、DOs 及 H₂O cDNA 为模板扩增 AMH(图 a) 及 AMHR2 (图 b)。

Figure 4-1-2 The Expression of AMH and AMHR2 Genes in Different Cells

eM represents Marker DL1000, lanes 1-4 represent application of AMH and AMHR 2 using COC、CCs、DOs and H₂O cDNA as templates, respectively.。

4.1.3 不同时期卵母细胞中 AMHR2 的表达

前期结果表明 AMHR2 在卵母细胞中有表达, 为进一步研究 AMHR2 在卵母细胞发育过程中的表达规律, 体外培养 DOs (脱丘卵母细胞) 0 h、2 h、8 h、14 h, 分别获得 GV 期、GVBD 期、MI 期和 MII 期的卵母细胞 (图 4-1-3-a)。收集各时期卵母细胞后提取总蛋白, Western Blot 结果显示, AMHR2 在 GV 期卵母细胞中的表达量最高, 且显著高于 MI 期 AMHR2 的表达 ($P < 0.05$) (图 4-1-3-b)。

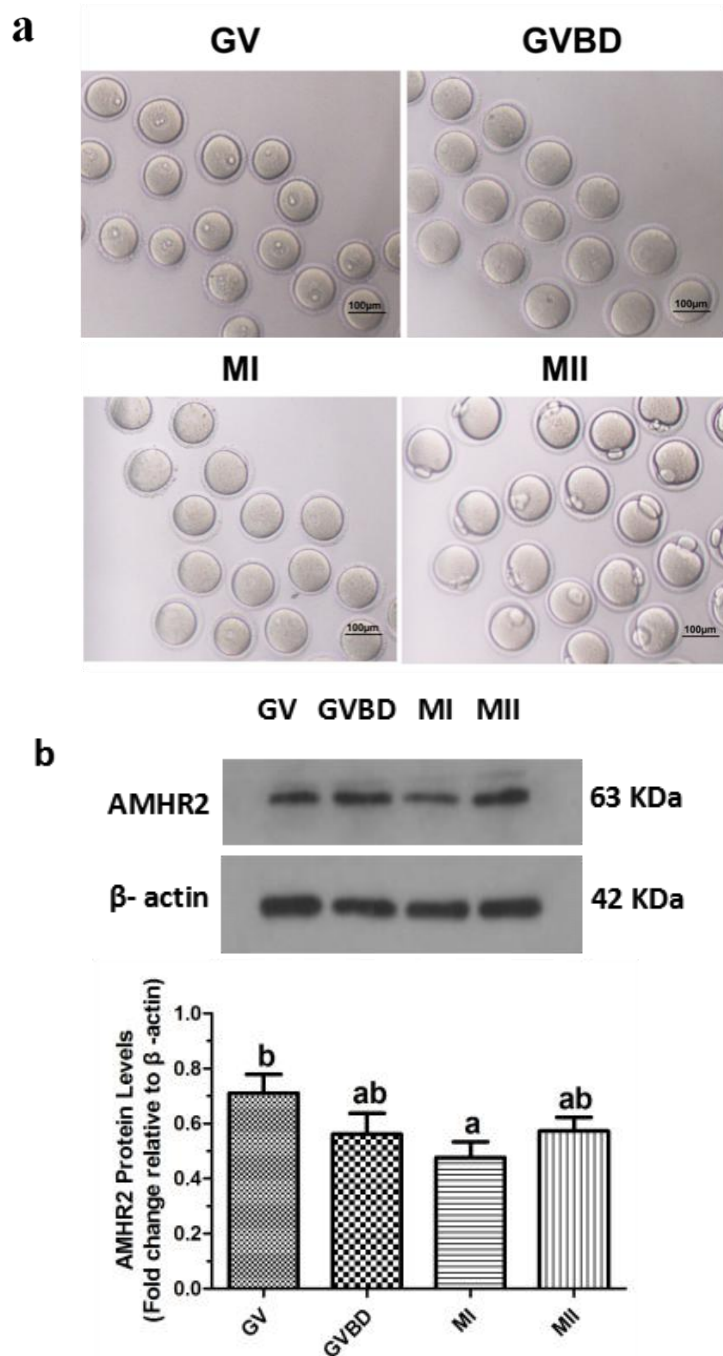


图 4-1-3 AMHR2 在不同时期卵母细胞中的表达

a: 各时期卵母细胞的形态; b: 在不同时期卵母细胞 AMHR2 的表达。GV: 生发泡期, GVBD: 生发泡破裂期, MI: 第一次减数分裂中期, MII: 第二次减数分裂中期。不同的字母表示数据之间差异显著, $P < 0.05$ 。

Figure 4-1-3 AMHR2 protein expression in different oocyte stages

a: The morphology of the oocyte in different stages; b: AMHR2 protein expression in different oocyte stages。GV: Germinal vesicle, GVBD: Germinal vesicle breakdown, MI: Metaphase I, MII: MetaphaseII. The data represent mean \pm SD, different letters denote statistical difference at a $P < 0.05$.

4.2 AMH 对小鼠裸卵成熟的调控作用

4.2.1 AMH 对体外培养裸卵成熟率的影响

分别添加不同浓度 (0, 1, 10, 100 ng/mL) rh-AMH 于裸卵培养液, 培养 14h 后, 以第一极体的排出率统计 MII 期卵母细胞的比率 (图 4-2-1)。由结果可知, 随着 AMH 浓度的增加卵母细胞成熟率逐渐升高, 表明裸卵的成熟率与 AMH 的浓度呈剂量依赖关系。其中, 100 ng/mL 添加组成熟率最高 (76.8%), 均显著高于低剂量添加组及对照组 ($P < 0.05$)

表 4-2-1 不同浓度 rh-AMH 处理对裸卵成熟率的影响

Table4-2-1 Effect of different doses of rh-AMH on Maturation rate of DOs

Group	No. of GV stage oocytes	Final stage oocyte maturation	
		Non- MII(%)	MI I(%)
1 ng/mL rh-AMH	855	38.7±3.2 ^b	61.3±3.0 ^a
10 ng/mL rh-AMH	726	30.5±5.7 ^{ab}	69.5±5.9 ^{ab}
100 ng/mL rh-AMH	837	23.2±7.3 ^a	76.8±7.4 ^b
Control	826	34.4±6.4 ^b	65.6±6.5 ^a

数据以平均值±标准差表示, 同一列, 不同的字母表示数据之间差异显著, $P < 0.05$ 。

Note: The data represent mean±SD, in a row, different letters denote statistical difference at a $P < 0.05$.

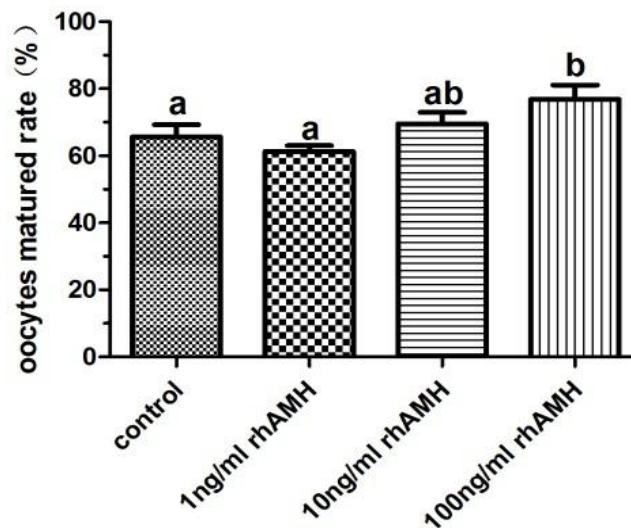


图 4-2-1 不同浓度 rh-AMH 对裸卵成熟率的影响

数据以平均值±标准差表示, 不同的字母表示数据之间差异显著, $P < 0.05$ 。

Figure4-2-1 Effects of different doses of rh-AMH on the maturation rate of DOs.

The data represent mean±SD, different letters denote statistical difference at a $P < 0.05$.

4.2.2 AMH 对体外培养裸卵中 AMHR2 表达的影响

分别添加不同浓度 (0, 1, 10, 100 ng/mL) rh-AMH 于裸卵培养液, 培养 14h 后, 收集裸卵, 提取裸卵蛋白。采用 Western blot 检测各处理组中 AMHR2 的蛋白表达。结果显示, 随着 rh-AMH 浓度的升高其受体的表达呈上升趋势, 100 ng/mL AMH 添加组中 AMHR2 的表达量最高, 且显著高于对照组及低剂量添加组 ($P < 0.05$) (图 4-2-2)。

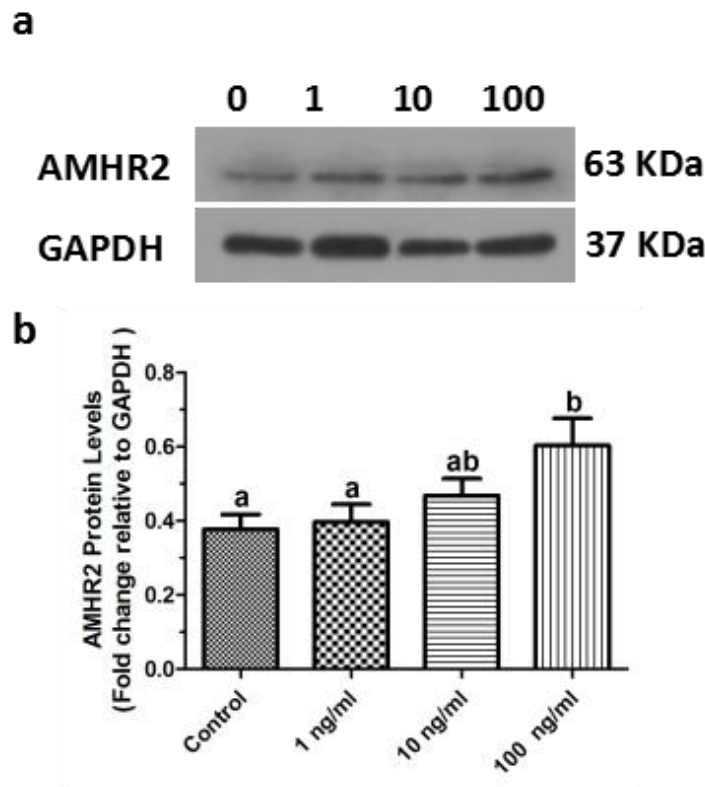


图 4-2-2 不同浓度 rh-AMH 处理下卵母细胞 AMHR2 的表达

a: AMHR2 蛋白在不同浓度 rh-AMH 处理下卵母细胞中的表达水平。b: AMHR2 蛋白在不同浓度 rh-AMH 处理下卵母细胞中相对表达水平统计分析 (AMHR2/GAPDH)。0 和 Control 表示 0 ng/mL rh-AMH, 1 表示 1 ng/mL rh-AMH, 10 表示 10 ng/mL rh-AMH, 100 表示 100 ng/mL rh-AMH。数据以平均值 \pm 标准差表示, 不同的字母表示数据之间差异显著, $P < 0.05$ 。

Figure4-2-2 AMHR2 protein expression in oocyte was treated with different concentrations of rh-AMH

a: AMHR2 protein expression was detected by Western blot in different concentrations of rh-AMH. b: The AMHR2 relative protein level (AMHR2/GAPDH) was analyzed by Western blot in different concentrations of rh-AMH. 0 and Control represents 0 ng/mL rh-AMH, 1 represents 1 ng/mL rh-AMH, 10 represents 10 ng/mL rh-AMH, 100 represents 100 ng/mL rh-AMH. The data represent mean \pm SD, different letters denote statistical difference at a $P < 0.05$.

4.2.3 AMH 对体外培养裸卵中卵母细胞分泌因子的调控

利用 Western blot 方法检测各处理组中裸卵的卵母细胞相关因子 BMP15 和 GDF9 的表达。结果显示，100 ng/mL rh-AMH 添加组与其它三组相比均能极显著提高 BMP15 的蛋白水平 ($P<0.01$)，而其它各组间 BMP15 的表达差异不显著 (图 4-2-3-a)。此外，10 ng/mL rh-AMH 处理组中 GDF9 的蛋白表达量最高，显著高于对照组及低剂量组 ($P<0.05$)，而 1 ng/mL rh-AMH 处理组的 GDF9 的表达量最低，显著低于 10 ng/mL 和 100 ng/mL AMH 处理组 ($P<0.05$) (图 4-2-3-b)。这些结果提示 AMH 可能通过增加 BMP15 和 GDF9 的表达而促进裸卵的核成熟。

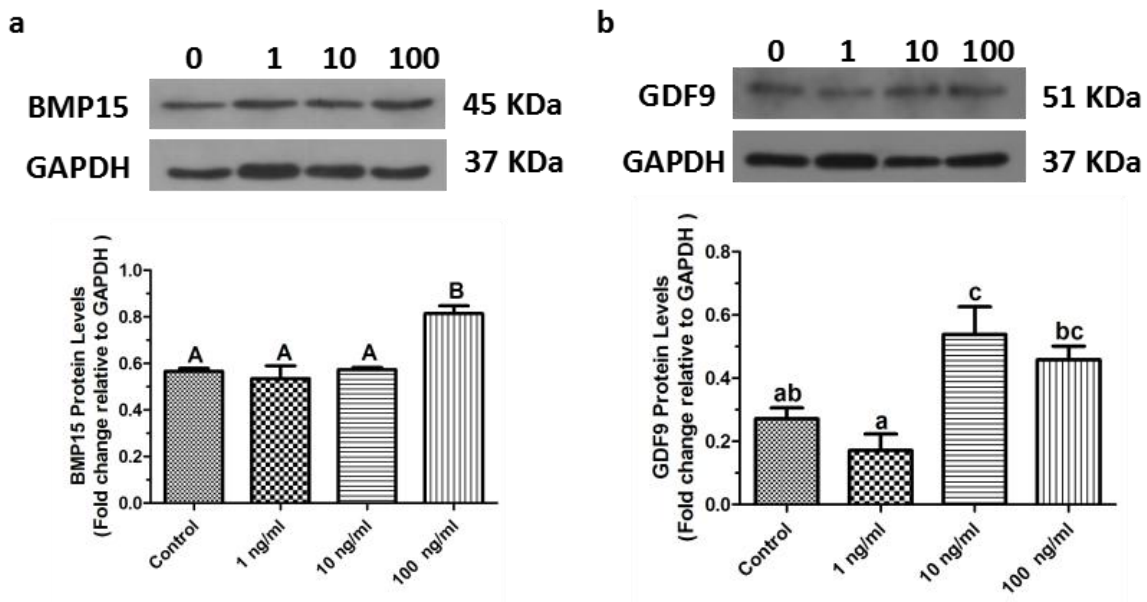


图 4-2-3 不同浓度 rh-AMH 处理对裸卵成熟相关基因表达的影响

BMP15 蛋白 (a) 与 GDF9 蛋白 (b) 在不同浓度 rh-AMH 处理下卵母细胞中的表达水平。数据以平均值 \pm 标准差表示，不同的小写字母表示数据之间差异显著， $P<0.05$ ；不同的大写字母表示数据之间差异极显著， $P<0.01$ 。

Figure4-2-3 Expression of oocyte maturation related genes in DOs treated with different concentrations of rh-AMH

BMP15 (a) and GDF9 (b) protein expression was detected by Western blot in different concentrations of rh-AMH. The data represent mean \pm SD, different lowercase letters denote statistical difference at a $P<0.05$; different capital letters denote statistical difference at a $P<0.01$.

4.2.4 AMH 对体外培养裸卵中 cAMP 含量的影响

将不同浓度 rh-AMH 处理裸卵后，收集卵母细胞裂解物，采用 ELISA 方法检测胞质内 cAMP 含量。结果显示，rh-AMH 处理后卵母细胞中 cAMP 含量极显著低于对照组 ($P < 0.01$)，不同浓度 rh-AMH 处理组间 cAMP 含量差异并不显著 ($P > 0.05$) (图 4-2-4-b)。此结果提示 AMH 能通过降低胞质中 cAMP 含量而促进裸卵的体外成熟。

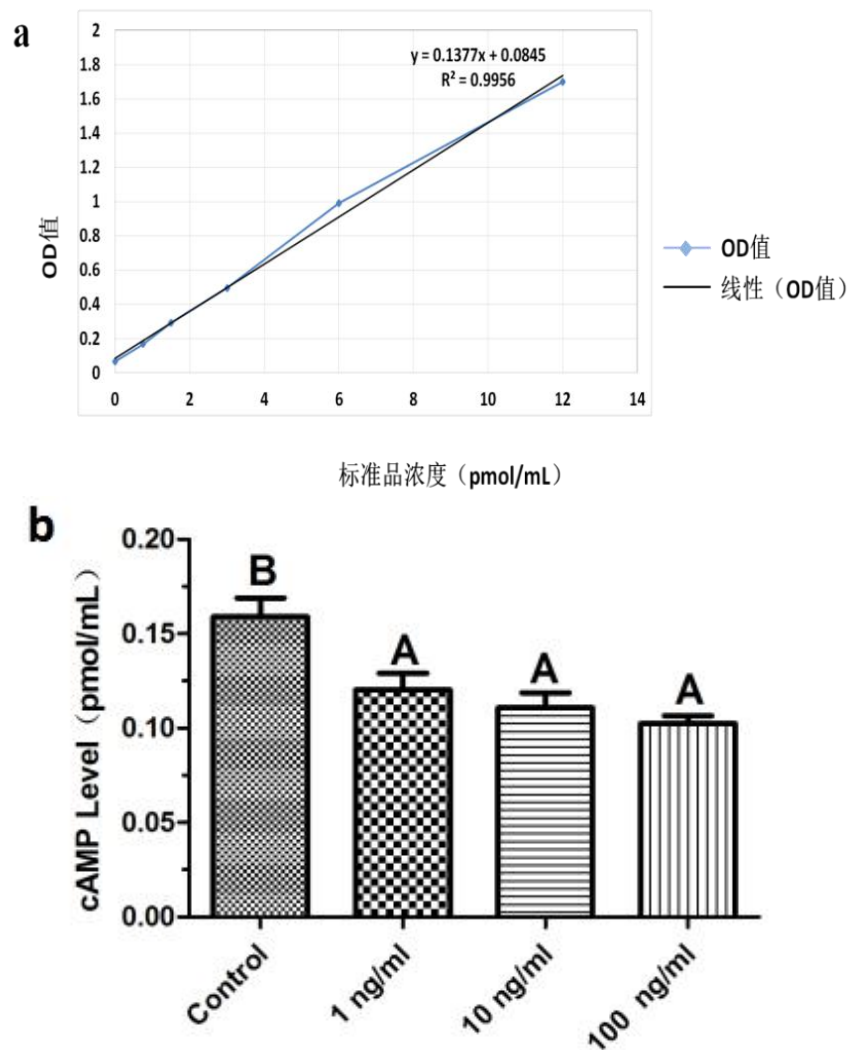


图 4-2-4 不同浓度 rh-AMH 处理下小鼠卵母细胞 cAMP 含量

a: 小鼠 cAMP 酶联免疫检测标准曲线; b: 不同浓度 rh-AMH 处理下小鼠卵母细胞中 cAMP 含量。数据以平均值 \pm 标准差表示，不同的大写字母表示数据之间差异极显著， $P < 0.01$ 。

Figure4-2-4 The cAMP level in mouse oocyte treated with different concentrations of rh-AMH
a: The standard curve of cAMP enzyme linked immunosorbent assay in mouse; b: The cAMP level in mouse oocyte was treated with different concentrations of rh-AMH. The data represent mean \pm SD, different capital letters denote statistical difference at a $P < 0.01$.

4.2.5 AMH 对体外培养裸卵中 MPF 含量的影响

将不同浓度 rh-AMH 处理裸卵后, 收集卵母细胞裂解物后, 采用 ELISA 方法检测胞质中 MPF 的含量。由图 4-2-5 可知, 随着 AMH 浓度的增加, MPF 含量呈上升趋势, 且 100 ng/mL rh-AMH 处理组中 MPF 含量显著高于对照组与低浓度处理组 ($P<0.05$)。

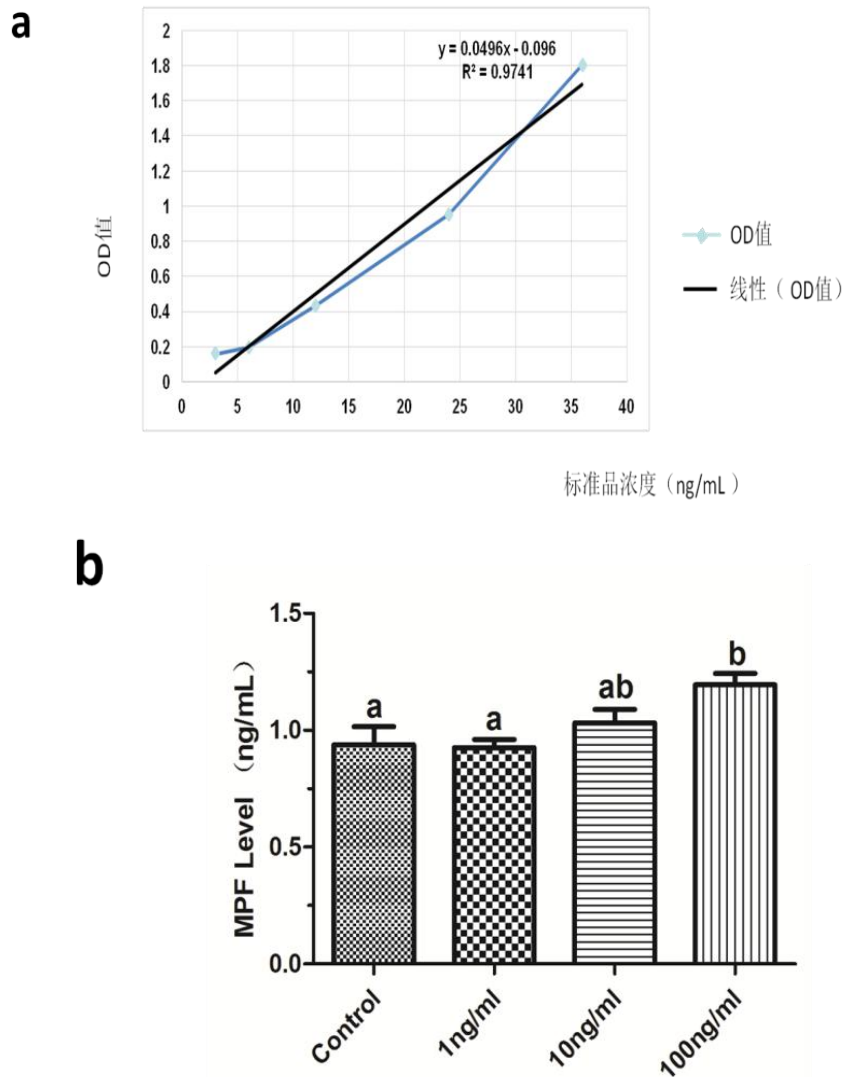


图 4-2-5 不同浓度 rh-AMH 处理下小鼠卵母细胞 MPF 含量

a: 小鼠 MPF 酶联免疫检测标准曲线; b: 不同浓度 rh-AMH 处理下小鼠卵母细胞 MPF 含量。数据以平均值 \pm 标准差表示, 不同的字母表示数据之间差异显著, $P<0.05$ 。

Figure4-2-5 The MPF level in mouse oocyte treated with different concentrations of rh-AMH
a:The standard curve of MPF enzyme linked immunosorbent assay in mouse; b:The MPF level in mouse oocyte was treated with different concentrations of rh-AMH. The data represent mean \pm SD, different lowercase letters denote statistical difference at a $P<0.05$.

4.3 AMH 对小鼠 COC 中卵母细胞成熟的调控作用

4.3.1 AMH 对 COC 体外成熟的影响

为进一步探讨 AMH 在小鼠卵母细胞成熟过程中的调控作用，体外添加 100 ng/mL AMH 到 COC 培养体系 16 h 后，脱丘收集并统计第一极体排出数（MII 期卵母细胞）。由表 4-3-1 可知，FSH 处理组能显著提高 COC 的体外成熟率（ $P < 0.05$ ），AMH 处理组中 COC 的成熟率与对照组相比差异不显著（ $P > 0.05$ ），然而，AMH 能显著抑制 FSH 对卵母细胞的促成熟作用（ $P < 0.05$ ），提示 AMH 可能降低了 COC 对 FSH 的敏感性。

表 4-3-1 AMH 对卵丘卵母细胞复合体成熟率的影响

Table4-3-1 Maturation rate of mouse COC after 16 hr culture

Groups	No. of GV stage COC	Final stage oocyte maturation	
		Non-MII(%)	MII (%)
AMH	266	19.6 ± 4.3 ^{ab}	80.4 ± 2.9 ^a
FSH	319	7.0 ± 2.7 ^c	93.0 ± 2.7 ^c
AMH+FSH	304	14.2 ± 3.8 ^b	85.8 ± 2.3 ^b
Control	289	20.3 ± 4.7 ^a	79.7 ± 4.7 ^a

数据以平均值±标准差表示，同一列，不同的字母表示数据之间差异显著， $P < 0.05$ 。

The data represent mean±SD, in a row, different letters denote statistical difference at a $P < 0.05$.

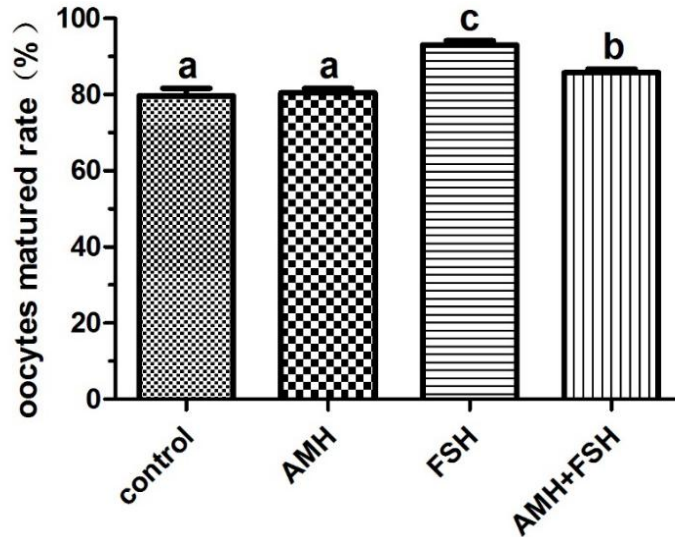


图 4-3-1 AMH 对 COC 体外成熟的影响

小鼠 COC 在对照组、100 ng/mL rh-AMH 组、100 ng/mL rm-FSH 组及 100 ng/mLrh-AMH+100 ng/mL rm-FSH 组中体外培养 16 h 后脱去卵丘颗粒细胞后统计卵母细胞成熟率。数据以平均值±标准差表示，不同的字母表示数据之间差异显著， $P<0.05$ 。

Figure 4-3-1 The rate of maturation of COC cultured in vitro by AMH

The mouse COC was cultured in control group, 100ng/mL rh-AMH group, 100 ng/mL rm-FSH group and 100 ng/mL rh-AMH + 100 ng/mL rm-FSH group after 16 h remove the Cumulus cells and statistical the oocytes maturation rate.The data represent mean±SD, different letters denote statistical difference at a $P<0.05$.

4.3.2 AMH 对 COC 中 BMP15、GDF9、AMHR2 及 FSHR 表达的调控

利用 RT-PCR 方法检测各处理组中卵母细胞分泌因子 BMP15 和 GDF9 以及 AMHR2 和 FSHR 的表达。由图 4-3-2 可知，COC 中 BMP15 和 GDF9 的表达在各处理组中差异均不显著 ($P>0.05$)；AMH 单独添加组、FSH 单独添加组以及 AMH/FSH 联合添加组中 AMHR2 的表达均显著高于对照组 ($P<0.05$)；FSH 处理组中 FSHR 的 mRNA 水平显著高于对照组与 AMH 处理组 ($P<0.05$)，提示 FSH 可能通过增加 FSHR 的表达来促进 COC 的成熟。

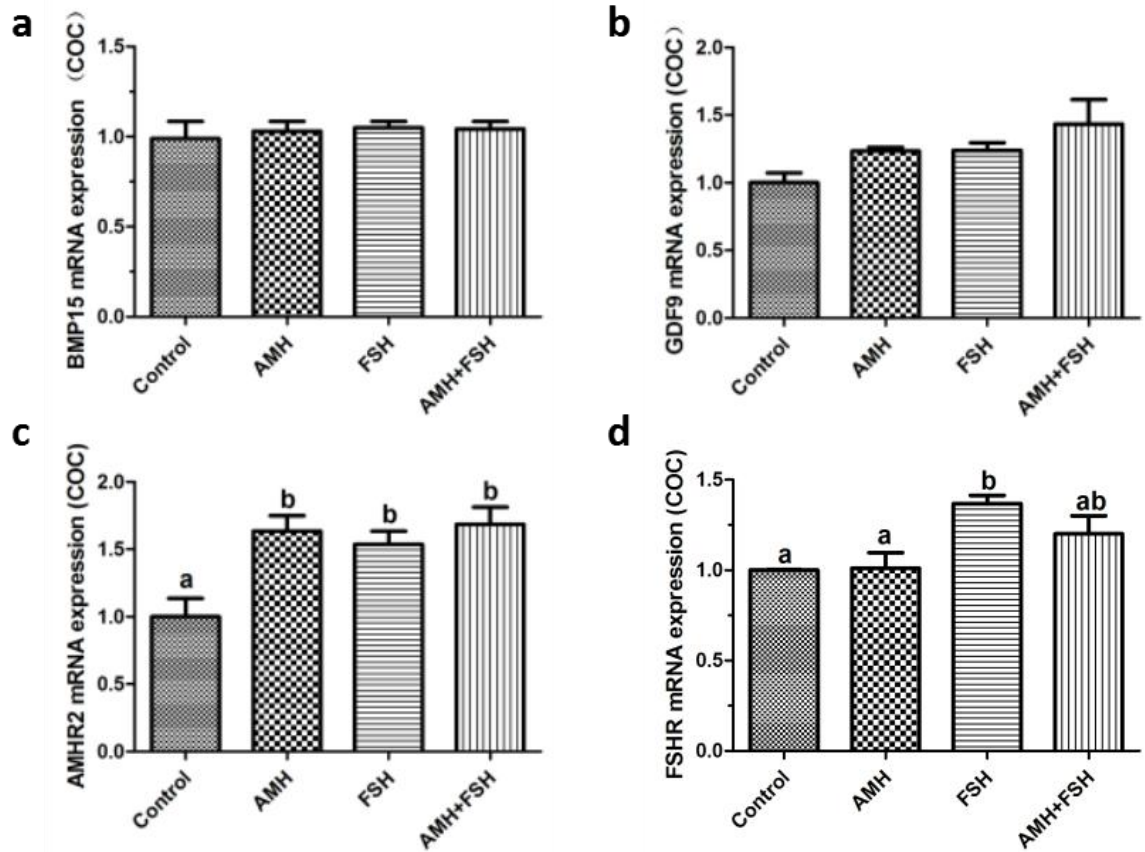


图 4-3-2 COC 中卵母细胞分泌因子、AMHR2 及 FSHR 的 mRNA 水平

小鼠 COC 在对照组、100 ng/mL rh-AMH 组、100 ng/mL rm-FSH 组及 100 ng/mL rh-AMH+100 ng/mL rm-FSH 组中体外培养 16 h 后，提取总 RNA，利用 RT-PCR 方法进行检测各基因 mRNA 水平。a: BMP15 mRNA 水平；b: GDF9 mRNA 水平；c: AMHR2 mRNA 水平；d: FSHR mRNA 水平。数据以平均值±标准差表示，不同的字母表示数据之间差异显著， $P<0.05$ 。

Figure 4-3-2 The mRNA levels of oocyte secreting factor, AMHR2 and FSHR in COC

The total RNA was extracted after COC was cultured in control group, 100 ng/mL rh-AMH group, 100 ng/mL rm-FSH group and 100 ng/mL rh-AMH + 100 ng/mL rm-FSH group for 16 h, and mRNA levels of each gene were detected by RT-PCR. a: BMP15 mRNA levels; b: GDF9 mRNA levels; c: AMHR2 mRNA levels; d: FSHR mRNA levels. The data represent mean±SD, different letters denote statistical difference at a $P<0.05$.

4.3.3 AMH 对 COC 中 cAMP 含量的影响

将不同处理的 COC 培养 16 h 后，脱去卵丘颗粒细胞，裂解卵母细胞后，利用 ELISA 检测胞质中 cAMP 的含量。由图 4-3-3 可知，与 AMH 或 FSH 单独处理组相比，AMH 与 FSH 联合添加组能显著降低卵母细胞中 cAMP 的含量 ($P<0.05$)；而 AMH 和 FSH 单独添加组中 cAMP 的含量与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$)。

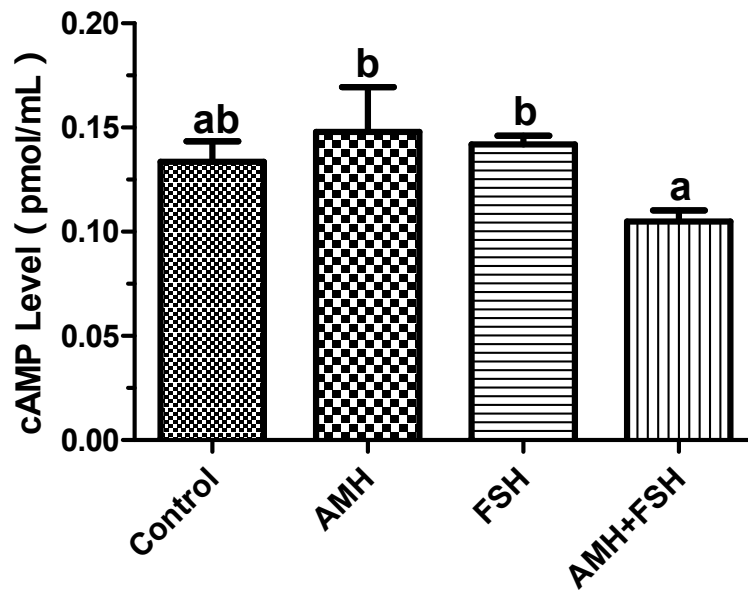


图 4-3-3 COC 在不同激素处理中的 cAMP 含量

标准曲线见图 4-2-4-a, 数据以平均值±标准差表示, 不同的字母表示数据之间差异显著, $P<0.05$ 。

Figure 4-3-3 The cAMP level in COC were treated with different hormones

The standard curve is shown in Figure 4-2-4-a, The data represent mean±SD, different letters denote statistical difference at a $P<0.05$.

4.3.4 AMH 对 COC 中 MPF 含量的影响

将不同激素处理的 COC 培养 16 h 后, 脱去卵丘颗粒细胞, 裂解卵母细胞后, 利用 ELISA 检测胞质中 MPF 含量。由图 4-3-4 可知, AMH 处理组中卵母细胞 MPF 含量与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$); 而 FSH 处理组能显著提高卵母细胞中 MPF 的含量 ($P<0.05$); 有趣的是, 与 FSH 单独处理组相比, AMH 与 FSH 联合添加组能显著降低 MPF 的含量 ($P<0.05$)。提示 AMH 可能降低了 FSH 刺激的 MPF 含量。

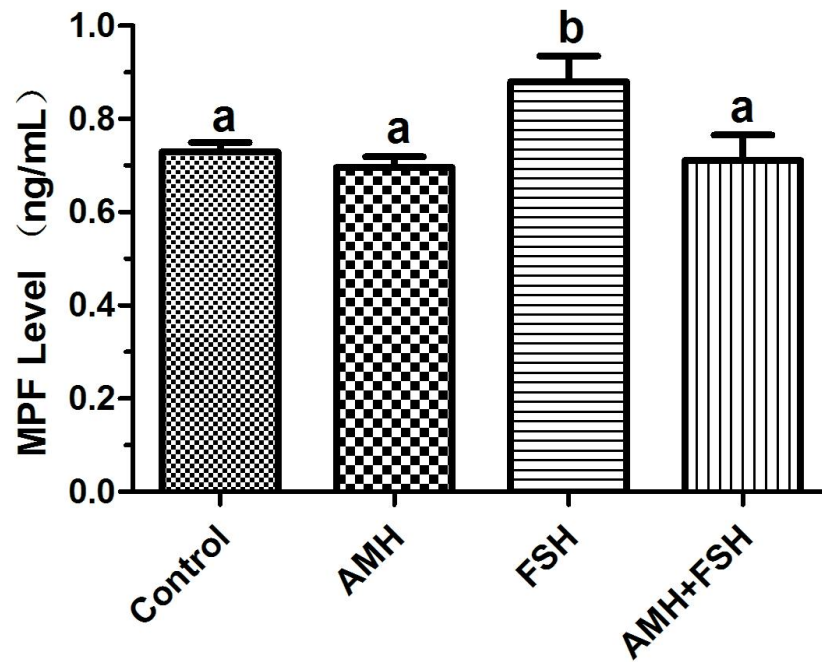


图 4-3-4 COC 在不同激素处理中的 MPF 含量

标准曲线见图 4-2-5-a, 数据以平均值±标准差表示, 不同的字母表示数据之间差异显著, $P<0.05$ 。

Figure 4-3-4 The MPF level in COC were treated with different hormones

The standard curve is shown in Figure 4-2-5-a, The data represent mean±SD, different letters denote statistical difference at a $P<0.05$.

4.4 AMH 对小鼠卵丘扩展的调控作用

4.4.1 AMH 对小鼠卵丘扩展指数的影响

将不同处理的 COC 培养 16 h 后, 根据卵丘扩展程度可分为 5 个级别 (图 4-4-1-A), 在倒置显微镜下拍下各组 COC 的卵丘扩展状态 (图 4-4-4-B)。由图 4-4-1-B 可观察到, FSH 处理组卵丘扩展程度基本达到 3-4 级扩展, 而 AMH 单独处理组与对照组卵丘扩展程度没有 FSH 处理组充分。根据 Fagbohun 和 Downs 报道的卵丘扩展指数的计算方法, 结果显示, AMH 单独处理组的卵丘扩展指数与对照组差异不显著 ($P>0.05$); FSH 单独处理组的卵丘扩展指数显著高于对照组和 AMH 处理组 ($P<0.05$); 有趣的是, 与 FSH 单独处理组相比, AMH 与 FSH 联合添加组能显著降低卵丘扩展指数 ($P<0.05$)。提示 AMH 可能降低了 FSH 对卵丘扩展的作用。

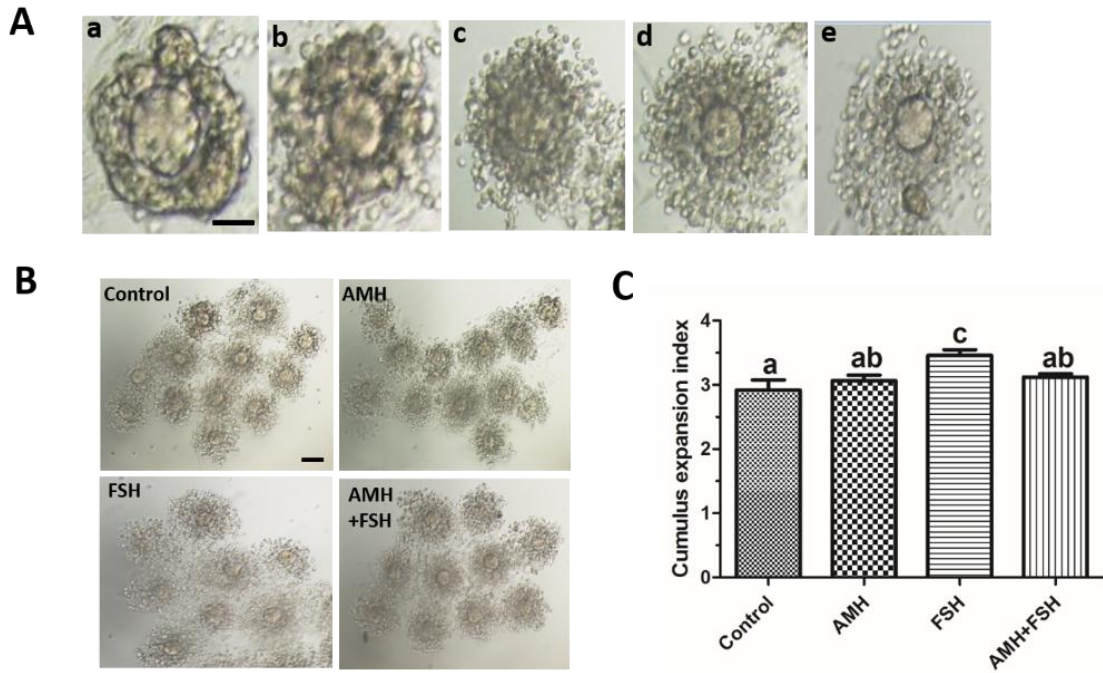


图 4-4-1 卵丘扩展级别和卵丘扩展指数

(A) 卵丘扩展级别。a: 0 级; b: 1 级; c: 2 级; d: 3 级; e: 4 级。(B) 不同激素处理下 COC 卵丘扩展状况。(C) 不同处理组的卵丘扩展指数。

Figure 4-4-1 Cumulus expansion levels and Cumulus expansion index

(A) Cumulus expansion levels. a: score 0; b: score 1; c: score 2; d: score 3; e: score 4. (B) Cumulus expansion of COC was treated by different hormones. (C) Cumulus expansion index.

4.4.2 AMH 对卵丘扩展相关因子表达的影响

利用 RT-PCR 方法检测各处理组中卵丘扩展相关因子 *Ptgs2*、*Has2*、*PTX3* 和 *Tnfaip6* 的表达。由图 4-4-2 可知, 与对照组相比, AMH 处理组中 *Ptgs2* 的表达显著升高 ($P < 0.05$), 而 *Has2*、*PTX3* 和 *Tnfaip6* 的表达无显著性差异 ($P > 0.05$); FSH 处理组中 *Has2*、*PTX3* 和 *Tnfaip6* 的表达均显著高于对照组和 AMH 处理组 ($P < 0.05$); 然而, 与 FSH 单独处理组相比, AMH 与 FSH 联合添加组能显著降低 *Has2*、*PTX3* 和 *Tnfaip6* 的表达 ($P < 0.05$)。

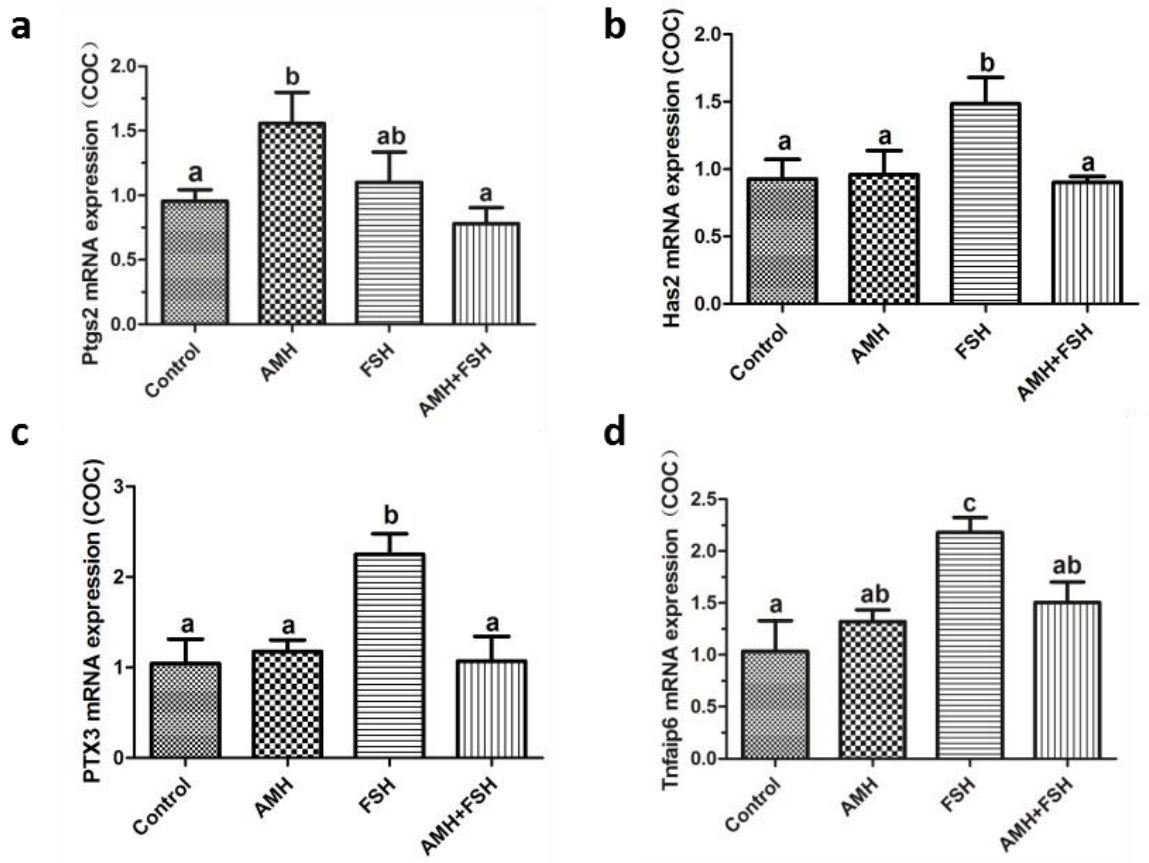


图 4-4-2 卵丘扩展相关因子 mRNA 水平

卵丘扩展相关因子 Ptgs2 (a)、Has2 (b)、PTX3 (c) 及 Tnfaip6 (d) mRNA 水平。数据以平均值±标准差表示，不同的字母表示数据之间差异显著， $P < 0.05$ 。

Figure 4-4-2 cumulus expansion related factor mRNA levels

Cumulus expansion related factor Ptgs2 (a)、Has2 (b)、PTX3 (c) and Tnfaip6 (d) mRNA levels. The data represent mean±SD, different letters denote statistical difference at a $P < 0.05$.

4.5 AMH 对雌激素、孕酮及芳香化酶相关基因的调控作用

4.5.1 AMH 对雌激素、孕酮的影响

将不同处理的 COC 培养 16 h 后，收集培养液，利用 ELISA 试剂盒检测雌激素和孕酮的水平。结果显示，AMH 处理组、FSH 处理组及 AMH 与 FSH 联合添加组中雌激素含量和对照组相比差异均不显著 ($P > 0.05$)；与对照组相比，FSH 处理组能显著提高孕酮含量 ($P < 0.05$)，而 AMH 处理对孕酮分布无显著性影响 ($P > 0.05$)，有趣的是，AMH 能显著抑制 FSH 对孕酮的促进作用 ($P < 0.05$) (图 4-5-1)。

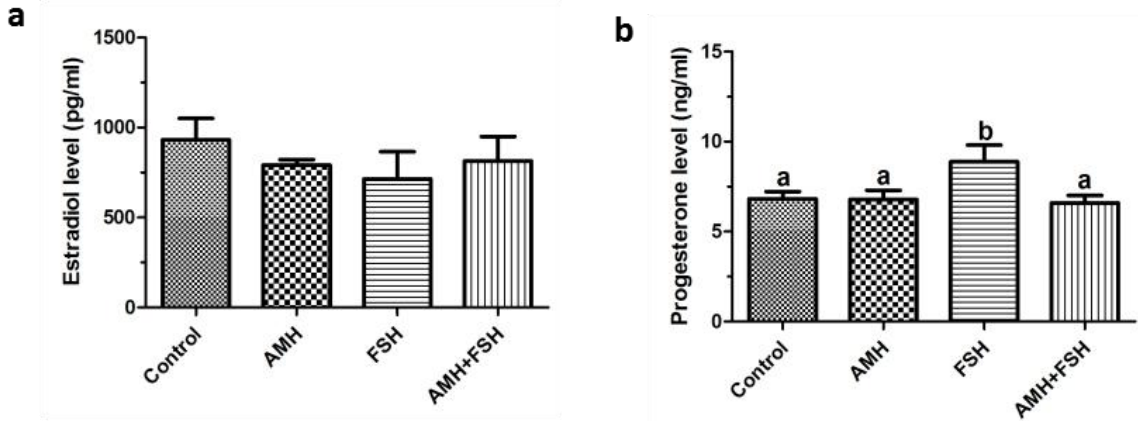


图 4-5-1 不同激素处理 COC 对雌激素 (a) 和孕酮 (b) 的影响

数据以平均值±标准差表示, 不同的字母表示数据之间差异显著, $P < 0.05$ 。

Figure 4-5-1 Effects of COC on Estrogen (a) and Progesterone (b) were treated with different hormones

The data represent mean±SD, different letters denote statistical difference at a $P < 0.05$.

4.5.2 AMH 对芳香化酶相关基因表达的影响

利用 RT-PCR 方法检测各处理组中芳香化酶相关基因 CYP19a1、 3β -HSD 和 STAR 的表达。由图 4-5-2 可知, COC 中 3β -HSD 和 STAR 的表达在各处理组中差异均不显著 ($P > 0.05$); 与对照组相比, FSH 处理组能显著提高 CYP19a1 的表达 ($P < 0.05$), 而 AMH 处理组中 CYP19a1 的表达无显著性变化 ($P > 0.05$)。

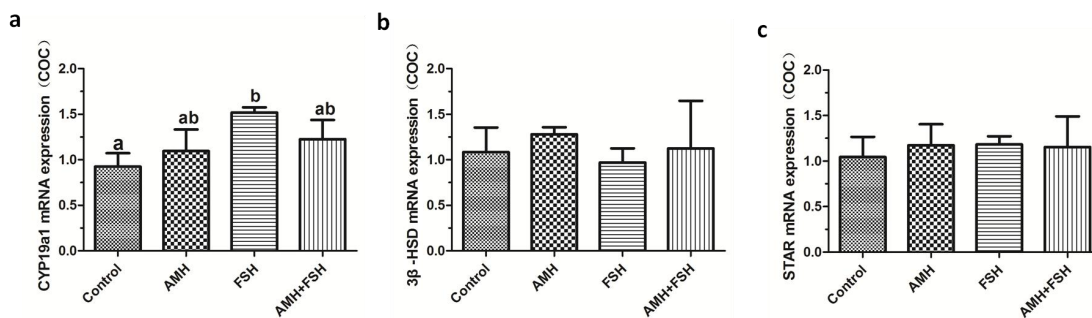


图 4-5-2 芳香化酶相关基因 mRNA 水平

不同激素处理后 COC 中 CYP19a1 (a)、 3β -HSD (b) 及 STAR (c) mRNA 水平。数据以平均值±标准差表示, 不同的字母表示数据之间差异显著, $P < 0.05$ 。

Figure 4-5-2 Aromatase related gene mRNA level

The levels of CYP19a1 (a), 3β -HSD (b) and STAR (c) mRNA in COC were treated with different hormones. The data represent mean±SD, different letters denote statistical difference at a $P < 0.05$.

5 讨论

AMH 是由雌性哺乳动物产生的一种卵巢内肽，在发育的卵巢卵泡中呈动态表达。在啮齿动物 (Durlinger et al 2002a)、家畜 (Rico et al 2011) 和女性 (Andersen et al 2010) 的腔前卵泡中可检测到 AMH 表达，在有腔卵泡中出现峰值，之后随着卵泡的逐渐增大其表达量呈下降趋势。作为转化生长因子 β (TGF β) 家族的成员，AMH 通过结合特定的 2 型跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体 AMHR2 发挥作用 (Baarends et al 1994)。很多研究发现，AMH 可抑制原始卵泡的募集和降低其对促卵泡刺激素 (FSH) 的敏感性。近期研究表明，AMH 仅在颗粒细胞中表达，在卵母细胞中尚未检测到，而 AMHR2 在颗粒细胞与卵母细胞中均有表达，提示 AMH 可能通过与 AMHR2 结合旁分泌调节卵母细胞的发育 (Fanchin et al 2007, Zhang et al 2014)。然而，AMH 对卵母细胞体外成熟及对卵丘颗粒细胞扩展的调控作用及机制尚不明晰。本研究以体外培养的裸卵及卵丘卵母细胞复合体为材料通过添加不同浓度 rh-AMH，探究 AMH 在卵母细胞成熟及卵丘扩展中的调控作用。

5.1 AMH 在卵巢中的表达模式

AMH 是卵泡发育的调节因子。研究表明，AMH 可以抑制原始卵泡的募集，抑制有腔卵泡对 FSH 的敏感性，防止卵泡过多过快地被消耗 (Durlinger et al 1999)。在小鼠卵巢中，AMH 在原始卵泡的颗粒细胞中不表达，从初级卵泡到次级卵泡的颗粒细胞中均有表达，且随着卵泡的增大 AMH 的表达量逐渐增高，但在卵泡继续发育为有腔卵泡，AMH 的表达量呈下降趋势，直至成熟卵泡中检测不到其表达 (Juengel et al 2002, Pask et al 2004)。单春华等人研究发现，小鼠在 4-6 日龄时，卵巢内主要是初级卵泡，在 6 日龄时颗粒细胞由单层增至 2 层，9-13 日龄时，卵巢内多为次级卵泡，卵母细胞周围的颗粒细胞增多，在 13 日龄时开始出现大小不等的腔前卵泡，在 17-21 日龄时，卵巢内出现有腔卵泡且在 21 日龄时明显增多 (单春华等 2006)。通过检测不同日龄小鼠中 AMH 的表达，我们发现，14 日龄小鼠卵巢中 AMH 和 AMHR2 mRNA 表达显著高于 7 日龄和 21 日龄小鼠，原因可能在于 14 日龄腔前卵泡数量多，而腔前卵泡是分泌 AMH 的主要来源。与该结果相一致的是 Salmon 等人发现在 6 日龄小鼠早期腔前卵泡的颗粒细胞中 AMH mRNA 水平低于 12 日龄小鼠晚期腔前卵泡中的 AMH mRNA 水平，从 22 日龄 eCG 引发的小鼠前排卵泡分离的颗

粒细胞中，AMH mRNA 水平低于 6 日龄和 12 日龄小鼠（Salmon et al 2004）。各日龄小鼠卵巢中 AMH 表达模式的差异表明 AMH 参与卵泡发育的调节。

Zhang 等人采用 PCR 和免疫荧光染色定位法发现 AMH 和 AMHR2 均在 GV 期和 MII 期 COC 卵丘颗粒细胞中表达，而仅有 AMHR2 在 GV 期和 MII 期卵母细胞中表达（Zhang et al 2014）。在本研究中，同样也发现 AMH 和 AMHR2 均可在卵丘卵母细胞复合体和卵丘颗粒细胞中表达，但仅有 AMHR2 在卵母细胞中有表达。此外，我们还利用 WesternBlot 检测了 AMHR2 在不同发育阶段卵母细胞中的表达，发现 GV 期卵母细胞中 AMHR2 表达显著高于 MI 期卵母细胞，随着卵母细胞的发育 AMHR2 的表达呈现逐渐下降趋势。此结果提示 AMH 一方面可能通过旁分泌作用于 AMHR2 而参与调控卵母细胞的体外成熟，另一方面可能通过自分泌作用于 AMHR2 而参与调控卵丘细胞的扩展。

5.2 AMH 参与调控卵母细胞的体外成熟

卵母细胞的成熟与雌性动物的繁殖力密切相关，卵母细胞体外成熟培养可以提供更多的优质胚胎，从而提高动物的繁殖率。卵母细胞的成熟过程受到很多内外因素的影响，如 FSH、EGF、FGF、LH、类固醇激素、黄体酮、cAMP、MPF 及卵母细胞分泌因子 GDF9、BMP15 等相互协调作用。在大鼠卵母细胞体外培养研究中发现 AMH 能抑制其 GVBD 期的发生，但在小鼠实验中并未发现显著性影响，提示 AMH 可能是大鼠卵母细胞减数分裂的抑制剂（Takahashi et al 1986）。Zhang 等人通过添加不同浓度 rh-AMH 体外培养小鼠 COC，结果表明 AMH 对小鼠卵母细胞的成熟率并无显著性变化（Zhang et al 2014），我们的研究与之相一致的是添加 AMH 后对 COC 卵母细胞成熟率也无显著性影响此外，我们还发现 AMH 可以抑制 FSH 对卵母细胞体外成熟的促进作用，推测 AMH 可能降低了 COC 对 FSH 的敏感性。在本研究中，我们还检测了 AMH 对脱卵丘颗粒细胞的裸卵（DOs）体外成熟的影响，发现高浓度 AMH（100 ng/mL）能显著提高裸卵的成熟率，且裸卵成熟率达到 76.8%。

Zhang 等人研究发现，AMH 浓度为 100 ng/mL 时，卵母细胞分泌因子 BMP15 和 GDF9 mRNA 表达量最高，且能显著提高小鼠卵母细胞的囊胚率。一旦 AMH 被干扰后 BMP15 和 GDF9 mRNA 表达量以及囊胚率显著降低（Zhang et al 2014）。我们在裸卵体外成熟的研究中同样也发现，100 ng/mL rh-AMH 时卵母细胞中 BMP15 显著高于其它组，而 GDF9 在 10 ng/mL rh-AMH 时达到最高水平。在 COC 体外培

养的结果, BMP15 的表达并不受外源性激素 FSH 和 AMH 的影响, 而 GDF9 仅在 AMH 与 FSH 联合添加时才有显著提高的趋势。由此推测, AMH 可能通过提高 BMP15 和 GDF9 的表达而促进裸卵的成熟, 然而这并不是唯一的途径。通过检测激素处理后卵母细胞中 cAMP 和 MPF 的水平, 发现 AMH 能显著抑制裸卵中 cAMP 的表达, 且高浓度 AMH 能显著提高 MPF 水平。卵母细胞内高水平 cAMP 含量能够抑制其 GVBD 的发生, 卵母细胞胞质的成熟受到阻碍, 而 MPF 则促进卵母细胞 GVBD 的进程, 提高卵母细胞的成熟。减数分裂开始时卵母细胞内 cAMP 水平下降, 此时 MPF 水平逐渐上升, 卵母细胞开始恢复减数分裂 (Josefsberg et al 2003)。卵母细胞中 cAMP 水平与 MPF 水平呈负相关趋势, cAMP 通过抑制 p34cdc2 去磷酸化及 CyclinB1 的合成的途径来抑制 MPF 活性 (Goren and Dekel 1994, Josefsberg et al 2003), 卵母细胞减数分裂被抑制。由此推测, AMH 主要通过降低卵母细胞胞质内 cAMP 表达、MPF 水平而促进裸卵的体外成熟。然而, 在卵丘卵母细胞复合体的体外培养中, 卵母细胞 cAMP 水平并不受 AMH 和 FSH 单独添加的影响, 但是当 AMH 与 FSH 联合添加培养时, cAMP 含量却显著下降其原因可能由于 AMH 和 FSH 发挥了协同作用。此外, 本研究还发现 FSH 能显著促进卵母细胞中 MPF 水平, 且 AMH 能抑制 FSH 在卵母细胞中 MPF 水平。值得关注的是, AMH 在裸卵和卵丘卵母细胞复合体中对 cAMP 含量和 MPF 水平的影响截然不同, 可能与卵丘颗粒细胞的存在有关, 但具体机制尚待进一步研究。

5.3 AMH 对卵丘扩展的调控作用

卵丘扩展是卵巢正常排卵和繁殖的先决条件。在动物体内, 卵丘扩展发生在排卵前卵泡 (Eppig et al 1979), 而在体外培养中, 卵丘扩展发生在卵母细胞减数分裂过程中 (Salustri et al 1989)。在体外培养实验中, 通常利用 FSH 避免卵丘颗粒细胞中缺乏黄体生成素 (LH) 受体而导致 LH 不能发挥其功能, 从而以 FSH 来促进 COC 的卵丘扩展 (Eppig et al 2015)。我们的研究发现在 COC 中单独添加 FSH 使卵丘颗粒细胞得以充分的扩展, 而 AMH 单独添加组的卵丘扩展程度与对照组差异不显著, 但 AMH 能显著降低 FSH 对卵丘扩展的促进作用。卵丘颗粒细胞的扩展是基于细胞外间隙糖胺聚糖大量合成透明质酸 (HA), 它起着卵丘扩展和调节卵母细胞成熟的结构成分的作用 (Eppig et al 1979, Salustri et al 1989, Chen et al 1990)。FSH 可以刺激 HA 的合成, 从而促进卵丘颗粒细胞的膨胀 (Eppig et al 1980, Chen et al 1992)。

COC 中 Has2 是生成 HA 所需的关键酶，我们的研究发现 FSH 能显著提高 COC 中 Has2 表达，与此同时，FSH 还可以促进卵丘扩展相关因子 PTX3 和 Tnfaip6 的表达。有研究表明 FSH 能激活卵丘颗粒细胞中 MAPK3 / 1 和 MAPK14 激酶信号通路，从而增加卵丘颗粒细胞中卵丘扩展相关因子 Has2、Ptgs2、PTX3 和 Tnfaip6 mRNA 表达，使卵丘细胞得以充分扩展（Su et al 2002, Ochsner et al 2003）。我们发现 AMH 能显著抑制 FSH 对卵丘扩展相关因子 Has2、PTX3 和 Tnfaip6 mRNA 表达的促进作用，但 AMH 对卵丘扩展并没有显著性影响。表明 AMH 能抑制 FSH 对卵丘扩展的促进作用，提示 AMH 可能通过降低 FSH 刺激的卵丘扩展相关因子表达的途径来抑制卵丘扩展。

5.4 AMH 对 COC 中雌激素、孕酮分泌的影响

在颗粒细胞体外培养实验中发现，AMH 对颗粒细胞分泌的雌激素及芳香化酶没有显著性影响，但 AMH 能抑制 FSH 诱导的雌激素含量和芳香化酶水平（Chang et al 2013）。我们在 COC 体外培养实验中发现，FSH 能上调芳香化酶基因 CYP19A1 的表达，但是并没有影响雌激素的分泌；而 AMH 对雌激素水平及芳香化酶相关基因的表达没有显著影响与之相反的是，我们猜测这可能与卵母细胞的存在有关，因为卵母细胞在发育成熟的过程中并不是处于被动的状态，它可以通过分泌卵母细胞分泌因子如 BMP15 和 GDF9 来调节卵丘细胞的功能（Erickson et al 2000, Moore et al 2005）。我们的研究还发现，FSH 能上调 COC 中孕酮的分泌量，而 AMH 能抑制此作用。卵母细胞在排卵前，卵泡中雌激素含量迅速降低，孕酮含量升高，而此时卵母细胞恢复减数分裂并发育到 MII 期，表明孕酮对卵母细胞的成熟可能有促进作用（Fair and Lonergan 2012），提示 AMH 可能通过抑制 FSH 刺激的孕酮含量的途径来抑制 COC 的成熟。

6 小结

6.1 全文结论

1. AMH 和 AMHR2 在 14 日龄小鼠卵巢中的表达量最高；AMHR2 在卵母细胞 GV、GVBD、MI 和 MII 中均有表达，且随着卵母细胞的发育其表达量有下降的趋势。

2. 高浓度 AMH 能显著提高裸卵成熟率，且主要通过上调 BMP15 表达、降低胞质内 cAMP 水平、提高 MPF 含量来实现。

3. AMH 对 COC 卵母细胞成熟率无显著性影响，但能显著抑制 FSH 对 COC 体外成熟的促进作用。

4. AMH 对卵丘扩展无显著性影响，但可显著抑制 FSH 促 COC 卵丘扩展及卵丘扩展相关因子的表达。

6.2 研究特色与创新

1. 分别从裸卵和 COC 两个层面探讨了 AMH 对卵母细胞成熟率的影响。
2. 首次探讨了 AMH 对 COC 卵丘扩展的影响。

6.3 进一步研究进展

1. 本研究虽初步证实了 AMH 能促进小鼠裸卵成熟，但未能通过体外受精进一步考察其对早期胚胎发育的影响。

2. 本研究发现 AMH 能抑制 FSH 促 COC 成熟和卵丘扩展的作用，但具体调控机制尚待阐明。

参考文献

1. 单春华,梁士儒,王博,安铁洙.性成熟前不同日龄小鼠卵泡的组织学观察.武汉: 中国畜牧兽医学会动物解剖学及组织胚胎学分会第十四次学术研讨会论文集, 2006
2. 姜宙,王晓燕,孙贤华,邹淑花.抗苗勒管激素及其 II 型受体与卵母细胞成熟的关系. 现代妇产科进展, 2013, 22:635-637
3. 岳顺利,周佳勃,严云勤.卵丘在卵母细胞成熟中的作用.中国细胞生物学学报, 2005, 27:403-406
4. Andersen CY, Schmidt KT, Kristensen SG, Rosendahl M, Byskov AG, Ernst E. Concentrations of AMH and inhibin-B in relation to follicular diameter in normal human small antral follicles. *Human Reproduction*, 2010, 25:1282
5. Baarends WM, van Helmond MJ, Post M, van der Schoot PJ, Hoogerbrugge JW, de Winter JP, Uilenbroek JT, Karels B, Wilming LG, Meijers JH. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the müllerian duct. *Development*, 1994, 120:189-97
6. Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biology of Reproduction*, 1983, 28:717
7. Behringer RR, Cate RL, Froelick GJ, Palmiter RD and Brinster RL. Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing Mullerian inhibiting substance. *Nature*, 1990, 345:167-170
8. Bilodeau-Goeseels S. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. *Theriogenology*, 2003, 60:1679
9. Borges E, Braga DPAF, Setti A, Figueira RDC, Jr AI. The predictive value of serum concentrations of anti-Mullerian hormone for oocyte quality, fertilization, and implantation. *Jbra Assisted Reproduction*, 2017, 21:176

10. Camaioni A, Hascall VC, Yanagishita M, Salustri A. Effects of exogenous hyaluronic acid and serum on matrix organization and stability in the mouse cumulus cell-oocyte complex. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268:20473-20481
11. Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen AP, Hovatta O. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Human Reproduction*, 2006, 21:2223
12. Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocrine Reviews*, 2002, 23:787
13. Chang HM, Klausen C, Leung PCK. Antimullerian hormone inhibits follicle-stimulating hormone-induced adenylyl cyclase activation, aromatase expression, and estradiol production in human granulosa-lutein cells. *Fertility & Sterility*, 2013, 100:585
14. Chen L, Mao SJ, Larsen WJ. Identification of a factor in fetal bovine serum that stabilizes the cumulus extracellular matrix. A role for a member of the inter-alpha-trypsin inhibitor family. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267:12380
15. Chen L, Russell PT, Larsen WJ. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Molecular Reproduction & Development*, 1993, 34:87
16. Chen L, Wert SE, Hendrix EM, Russell PT, Cannon M, Larsen WJ. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Molecular Reproduction & Development*, 1990, 26:236
17. Clemente ND, Goxe B, Remy JJ, Cate R. Inhibitory effect of AMH upon the expression of aromatase and LH receptors by cultured granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine*, 1994, 2:553-558
18. Das SK. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, 1997, 91:197-208
19. De VA, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Anti-mullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertility & Sterility*, 2002, 77:357

20. Dekel N, Beers WH. Development of the rat oocyte in vitro: inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus. *Developmental Biology*, 1980, 75:247-254
21. Dekel N, Beers WH. Rat oocyte maturation in vitro: relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75:4369-4373
22. Dekel N, Hillensjo T, Kraicer PF. Maturation effects of gonadotropins on the cumulus-oocyte complex of the rat. *Biology of Reproduction*, 1979, 20:191-197.
23. Dekel N. Regulation of oocyte maturation. The role of cAMP. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1988, 541:211
24. Desforges BV, Gallo CC, Pigny P, Lefebvre C, Dewailly D, Catteau-Jonard S. Increased anti-Mullerian hormone and decreased FSH levels in follicular fluid obtained in women with polycystic ovaries at the time of follicle puncture for in vitro fertilization. *Fertility & Sterility*, 2010, 94:198-204
25. Dessev G, Iovchevadessev C, Bischoff JR, Beach D, Goldman R. A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. *Journal of Cell Biology*, 1991, 112:523-533
26. Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. *Human Reproduction Update*, 2014, 20:370
27. Di CN, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard R. Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Mullerian hormone. *Molecular Endocrinology*, 1994, 8:1006-1020
28. Draetta G, Luca F, Westendorf J, Brizuela L, Ruderman J, Beach D. Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: Evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell*, 1989, 56:829-838
29. Dunphy WG, Brizuela L, Beach D, Newport J. The Xenopus cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell*, 1988, 54:423
30. Durlinger ALL, Gruijters MJ, Kramer P, et al. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, 2002b, 143:1076

31. Durlinger ALL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, 2001, 142:4891-4899
32. Durlinger ALL, Kramer P, Karels B, Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed, JA. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, 1999, 140:5789
33. Durlinger ALL, Visser JA, Themmen APN. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction*, 2002a, 124:601-609
34. Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Molecular Endocrinology*, 1999, 13:1035
35. Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97:10288-10293
36. Eppig JJ, Pendola FL, Wigglesworth K. Mouse oocytes suppress cAMP-induced expression of LH receptor mRNA by granulosa cells in vitro. *Molecular Reproduction & Development*, 2015, 49:327-332
37. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola F, Hirao Y. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 1997, 56:976-984
38. Eppig JJ. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature*, 1979, 281:483
39. Eppig JJ. Role of serum in FSH stimulated cumulus expansion by mouse oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Biology of Reproduction*, 1980, 22:629-633
40. Erickson GF, Shimasaki S. The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, 2000, 11:193-198
41. Ezo K, Yabuuchi A, Tani T, Mori C, Miki T, Takayama Y. Developmental competence of vitrified-warmed bovine oocytes at the germinal-vesicle stage is

- improved by cyclic adenosine monophosphate modulators during in vitro maturation. *Plos One*, 2015, 10:e0126801
42. Fagbohun CF, Downs SM. Maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex: stimulation by lectins. *Biology of Reproduction*, 1990, 42:413-423
43. Fair T, Lonergan P. The role of progesterone in oocyte acquisition of developmental competence. *Reproduction in Domestic Animals*, 2012, 47:142-147
44. Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, Taieb J. Anti-Mullerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2007, 92:1796
45. Ficicioglu C, Kutlu T, Baqlam E, Bakacak Z. Early follicular anti-Mullerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril*, 2006, 85: 592-596
46. Fulop C, Szanto S, Mukhopadhyay D, Bardos T, Kamath RV, Rugg MS. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. *Development*, 2003, 130:2253
47. Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng H, Wang X, De VM. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction*, 2016, 152:REP-15-0606
48. Gilchrist RB, Morrissey MP, Ritter LJ, Armstrong DT. Comparison of oocyte factors and transforming growth factor-beta in the regulation of DNA synthesis in bovine granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2003, 201,87-95
49. Gilchrist RB, Ritter LJ, Myllymaa S, Kaivooja N, Dragovic RA, Hickey TE. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *Journal of Cell Science*, 2006, 119:3811-21
50. Gilula NB, Epstein mL, Beers WH. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *Journal of Cell Biology*, 1978, 78:58
51. Goren S, Dekel N. Maintenance of meiotic arrest by a phosphorylated p34cdc2 is independent of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Biology of Reproduction*, 1994, 51:956-962

52. Gouedard L, Chen YG, Thevenet L, Racine C, Borie S, Lamarre I. Engagement of bone morphogenetic protein type IB receptor and Smad1 signaling by Anti-Mullerian hormone and its type II receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275:27973
53. Grossman MP, Nakajima ST, Fallat ME, Siow Y. Mullerian-inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture. *Fertility & Sterility*, 2008, 89:1364-1370
54. Han SJ, Chen R, Paronetto MP, Conti M. Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. *Current Biology* Cb, 2005, 15:1670-1676
55. Han SJ, Conti M. New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate. *Cell Cycle*, 2006, 5:227-231
56. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991, 124:43–101
57. Homa ST. Effects of cyclic AMP on the spontaneous meiotic maturation of cumulus-free bovine oocytes cultured in chemically defined medium.. *Journal of Experimental Zoology*, 1988, 248:222-231
58. Huchon D, Ozon R, Fischer EH, Demaille JG. The pure inhibitor of cAMP-dependent protein kinase initiates *Xenopus laevis*, meiotic maturation : A 4-step scheme for meiotic maturation. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 1981, 22:211-222
59. Imbeaud S, Faure E, Lamarre I, Mattei MG, Di CN, Tizard R. Insensitivity to anti-mullerian hormone due to a mutation in the human anti-mullerian hormone receptor. *Nature Genetics*, 1995, 4:382-388
60. Ingraham HA, Hirokawa Y, Roberts LM, Mellon SH, Mcgee E, Nachtigal MW. Autocrine and paracrine Mullerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction. *Recent Progress in Hormone Research*, 2000, 55:53
61. Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Mullerian hormone as

- a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in. *Reproduction Fertility & Development*, 2011, 23:1-14
62. Jamin SP, Arango NA, Mishina Y, Hanks MC, Behringer RR. Requirement of *Bmpr1a* for Mullerian duct regression during male sexual development. *Nature Genetics*, 2002, 32:408-410.
63. Jeppesen JV, Anderson RA, Kelsey TW, Christiansen SL, Kristensen SG, Jayaprakasan K. Which follicles make the most anti-Mullerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection. *Molecular Human Reproduction*, 2013, 19:519-527.
64. Josefsberg LB, Galiani D, Lazar S, Kaufman O, Seger R, Dekel N. MPF governs MAPK activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. *Biol. Reprod*, 2003, 68:1282-1290
65. Josso N, Cate RL, Picard JY, Vigier B, di Clemente N, Wilson C. Anti-mullerian hormone: the jost factor. *Recent Prog Horm Res*, 1993;48:1-59
66. Josso N, Clemente ND. Transduction pathway of anti-Mullerian hormone, a sex-specific member of the TGF- β family. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2003, 14:91-97
67. Joyce IM, Pendola FL, O'Brien M, Eppig JJ. Regulation of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 messenger ribonucleic acid expression in mouse granulosa cells during ovulation. *Endocrinology*, 2001, 142:3187
68. Juengel JL, Whale LJ, Wylde KA, Greenwood P, McNatty KP, Eckery DC. Expression of anti-Mullerian hormone mRNA during gonadal and follicular development in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Reproduction Fertility & Development*, 2002, 14:345
69. Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, Fishel-Bartal M, Ligumsky H, Paglin S. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Science Translational Medicine*, 2013, 5:185ra62
70. Kelsey TW, Wright P, Nelson SM, Anderson RA, Wallace WH. A validated model of serum anti-mullerian hormone from conception to menopause. *PLoS One*, 2011, 6:e22024

71. Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, van de Lang-Born BM, de Jong FH, Groome NP, Themmen AP, Visser JA. Serum AMH levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinol*, 2006, 147: 3228-3234
72. Kim JH, Lee JR, Chang HJ, Jee BC, Suh CS, Kim SH. Anti-Mullerian Hormone Levels in the Follicular Fluid of the Preovulatory Follicle: A predictor for oocyte fertilization and quality of embryo. *Journal of Korean Medical Science*, 2014, 29:1266-1270
73. Kim JH, Seibel MM, Maclaughlin DT, Donahoe PK, Ransil BJ, Hametz PA. The inhibitory effects of mullerian-inhibiting substance on epidermal growth factor induced proliferation and progesterone production of human granulosa-luteal cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1992, 75:911-917
74. Koizumi M, Nahar A, Yamabe R, Kadokawa H. Positive correlations of age and parity with plasma concentration of macrophage migration inhibitory factor in Japanese black cows. *Journal of Reproduction & Development*, 2016,62:257-263
75. Larsen WJ, Wert SE, Brunner GD. A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Developmental Biology*, 1986, 113:517-521
76. Lee MM, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev*, 1993, 14:152-164
77. Liang AX, Salzano A, D'Esposito M, Comin A, Montillo M, Yang LG, Campanile G, Gasparrini B. Anti-Mullerian hormone (AMH) concentration in follicular fluid and mRNA expression of AMH receptor type II and LH receptor in granulosa cells as predictive markers of good buffalo (*Bubalus bubalis*) donors. *Theriogenology*, 2016,86:963-970
78. Lin YH, Hwang JL, Seow KM, Huang LW, Hsieh BC, Chen HJ. Effect of incubation with different concentrations and durations of FSH for in-vitro maturation of murine oocytes. *Reproductive Biomedicine Online*, 2011, 23:111-117
79. Lindhardt JM, Hagen CP, Johannsen TH, Main KM, Picard JY, Jorgensen A. Anti-mullerian hormone and its clinical use in pediatrics with special emphasis on

- disorders of sex development. *International Journal of Endocrinology*, 2012, 2013:198698-198698
80. Luscher B, Brizuela L, Beach D, Eisenman RNA. Role for the p34cdc2 kinase and phosphatases in the regulation of phosphorylation and disassembly of lamin B2 during the cell cycle. *Embo Journal*, 1991, 10:865-875
81. Mahmoudi R, Subhani A, Pasbakhsh P, Abolhasani F, Amiri I, Salehnia M. The effects of cumulus cells on in vitro maturation of mouse germinal vesicle stage oocytes. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 2005
82. Maller JL, Krebs EG. Progesterone-stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. Induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 1977, 252:1712-1718
83. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo Journal*, 2000, 19:1745
84. Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *Biology of the Cell*, 1998, 90:461-466
85. Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*, 2000, 53:761
86. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*, 2000,21:200-214
87. Monniaux D, Drouilhet L, Rico C, Estienne A, Jarrier P, Touze JL. Regulation of anti-Mullerian hormone production in domestic animals. *Bioresource Technology*, 2012, 101:8762-8771
88. Monniaux D, Barbey S, Rico C, Fabre S, Gallard Y, Larroque H. Anti-Mullerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 2010, 22, 1083-1091
89. Moore RK, Shimasaki S. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 2005, 234:67-73

90. Mukhopadhyay D, Asari A, Rugg MS, Day AJ, Fulop C. Specificity of the tumor necrosis factor-induced protein 6-mediated heavy chain transfer from inter-alpha-trypsin inhibitor to hyaluronan: implications for the assembly of the cumulus extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry*, 2004,279:11119-11128
91. Munsterberg A, Lovellbadge R. Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation.*Development*, 1991, 113:613-624
92. Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*, 2009, 136:1869
93. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, 1990, 344:503-508
94. Ochsner SA, Day AJ, Rugg MS, Breyer RM, Gomer RH, Richards JS. Disrupted function of tumor necrosis factor-alpha-stimulated gene 6 blocks cumulus cell-oocyte complex expansion. *Endocrinology*, 2003, 144:4376-4384
95. Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276:11387-11392
96. Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone Morphogenetic Protein-15 identification of target cells and biological functions. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275:39523-39528.
97. Park JY, Su YQ, Ariga M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, 2004, 303:682
98. Pask AJ, Whitworth DJ, Mao CA, Wei KJ, Sankovic N, Graves JAM. Marsupial Anti-Mullerian Hormone Gene Structure, Regulatory Elements, and Expression.*Biology of Reproduction*, 2004, 70:160-167.
99. Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat M. Anti-Mullerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertility & Sterility*, 2011, 96:1246

100. Rajpert-De ME, Jorgensen N, Graem N, Muller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84: 3836–3844
101. Richards JS. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 2005, 234:75
102. Rico C, Fabre S, Médigue C, Di CN, Clement F, Bontoux M. Anti-Mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biology of reproduction*, 2009, 80:50-59
103. Rico C, Medigue C, Fabre S, Jarrier P, Bontoux M, Clement F. Regulation of anti-Mullerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. *Biology of Reproduction*, 2011, 84:560-571
104. Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM. Oocyte regulation of anti-Mullerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Developmental Biology*, 2004, 266:201
105. Salustri A, Garlanda C, Hirsch E. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. *Development*, 2004, 131:1577
106. Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264:13840-13847
107. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Looman CW, Blankenstein M, Fauser BC, Tejong FH. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Human Reproduction*, 2003, 18:700-706
108. Shimasaki S, Moore RK, Erickson GF, Otsuka F. The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. *Reprod Suppl*, 2003, 61:323-337

109. Su YQ, Denegre JM, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ. Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. *Developmental Biology*, 2003, 263:126-138.
110. Su YQ, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ. Mitogenactivated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology*, 2002, 143:2221
111. Takahashi M, Koide SS, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance as oocyte meiosis inhibitor. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 1986, 47:225-234
112. Tanghe S, Van SA, Nauwynck H. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction & Development*, 2002, 61:414-424
113. Ueno S, Manganaro TF, Donahoe PK. Human recombinant mullerian inhibiting substance inhibition of rat oocyte meiosis is reversed by epidermal growth factor in vitro. *Endocrinology*, 1988, 123:1652
114. Vaccari S, James L. Weeks II, Hsieh M, Menniti FS, Conti M. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of Reproduction*, 2009, 81:595
115. van Houten EL, Themmen AP, Visser JA. Anti-Mullerian hormone (AMH): regulator and marker of ovarian function. *Annales Dendocrinologie*, 2010, 71:191-197
116. Vanderhyden BC, Caron PJ, Buccione R, et al. Developmental pattern of the secretion of cumulus expansion-enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation.[J]. *Developmental Biology*, 1990, 140(2):307
117. Varani S. Knockout of Pentraxin 3, downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Molecular Endocrinology*, 2002, 16:1154-1167

118. Visser JA, Olaso R, Verhoef-Post M, Kramer P, Themmen AP, Ingraham HA. The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Mullerian inhibiting substance signaling. *Molecular endocrinology*, 2001, 15:936-45
119. Visser JA. AMH signaling: from receptor to target gene. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 2003, 211:65
120. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*, 2004;10:77-83
121. Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology*, 2001, 15:854-866
122. Zhang Y, Shao L, Xu Y, Cui Y, Liu J, Chian RC. Effect of Anti-Mullerian hormone in culture medium on quality of mouse oocytes matured in vitro. *Plos One*, 2014, 9:e99393

发表的主要论文

- 1.李赞,乔同,姜婷婷,牛凯峰,王贵强,秦则平,杨利国,梁爱心.AMH 在雌性动物繁殖领域中的研究与应用[J].中国奶牛,2018(04):24-27.
- 2.李俊,李梓芑,李赞,刘爽,梁爱心,杨利国.意大利地中海奶水牛泌乳规律及影响因素研究[J].中国奶牛,2016(11):13-16.

致谢

时光如白驹过隙，三年的硕士研究生学习生活转瞬即逝，这三年来我得到了很大的成长与进步，这都离不开所有人对我的帮助、指引、开导、关心与包容，在此我要向你们表达我最诚挚的谢意。

首先要感谢我的导师梁爱心副教授，本课题的顺利完成离不开梁老师的悉心指导，论文选题、试验设计、实验过程、论文定稿等环节中无不渗透着梁老师的心血。我初次进入实验室时，梁老师手把手的教我实验操作，给我讲解注意事项以及实验原理等相关知识，耐心讲授专业知识，在梁老师的帮助下极大的提高了我的独立思考并解决问题的能力。梁老师精益求精的工作作风，诲人不倦的高尚师德，平易近人的人格魅力深深地感染了我，这将在我今后的生活中受益匪浅。在此，再一次向梁老师致以最衷心的感谢！

感谢指导小组的杨利国教授、张淑君教授、霍立军教授、李翔副教授、熊家军副教授、滑国华副教授、何长久副教授和周扬副教授在本课题的试验设计、开题报告、中期检查以及实验过程中提出宝贵的建议和帮助。

感谢本课题组刘佳佳师姐、马凡华师姐、李俊师兄、邓廷贤师兄、刘深贺师兄、石昭意师姐、戴江河师兄、范海瑞师兄、王亚平师姐、王晨师姐、王力军师兄、于垚垚师兄、姜婷婷、张维、祖卓鑫、李梓芑、刘爽、孙旭阳、乔同师弟、杜超师弟、叶挺柱师弟、周子超师弟、牛凯峰师弟、魏鹏飞师弟、熊红玲师妹、华丽萍师妹、胡祥维师妹、张燊师弟、安志高师弟和陈超师弟等人在我的实验操作、试剂订购以及生活上等方面给与了诸多帮助，让我在一个温馨快乐的环境中完成我的学业。

感谢实验室小伙伴王丽师姐、任学青师姐、许苏童、张敏、陈矾、张慢、张嘉宇、彭兆宇、王湘阳、张玉侠师妹、阮健师弟、陈焱森师弟和南梁康师弟等人在我实验和生活上的支持与帮助，因为你们的陪伴生活变得多姿多彩。

最后感谢我的父母和家人，二十多年来给我提供良好的学习和生活环境，把你们最好的一切毫无保留的给了我。在我迷茫失落的时候支持我、引导我；在我开心收获的时候夸奖我，鼓励我。是你们无私的奉献和支持让我走到了今天，以后我会好好报答您们。

因为有了家人、老师、同学和朋友的陪伴、支持与帮助，我的整个研究生生涯过的充实而快乐，感谢所有人！