

# 超排处理对雌兔生殖器官中表皮生长因子表达的影响

高颖帆 伏晓玉 周娜 李伊健 王欣荣\*

甘肃农业大学动物科学技术学院 兰州 730070

**摘要:** 为探究外源促性腺激素对伊拉兔 (*Oryctolagus cuniculu*) 生殖器官中表皮生长因子 (EGF) 表达水平及其作用特点的影响, 本实验以伊拉兔为研究对象, 随机选取 30 只 (雄兔 6 只, 雌兔 24 只), 将雌兔随机分为超排处理组 ( $n = 12$ ), 即肌肉注射 70 U 孕马血清促性腺激素 (PMSG) 和 100 U 人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 和对照组 (不注射任何激素,  $n = 12$ )。并运用实时定量 PCR (qRT-PCR)、蛋白免疫印迹 (Western-blot) 及免疫组化方法, 研究经超排处理的伊拉兔卵巢、输卵管和子宫中表皮生长因子的表达与定位情况。结果显示, 在超排处理后的伊拉兔卵巢、输卵管和子宫中, 表皮生长因子 mRNA 与蛋白的表达量极显著高于对照组的卵巢、输卵管和子宫 ( $P < 0.01$ ), 其阳性信号分别定位于卵巢的初级卵母细胞、颗粒细胞、内膜细胞、间质细胞和血管内皮细胞, 输卵管的纤毛细胞、基细胞、黏膜上皮和肌层中, 以及子宫的上皮细胞和内膜细胞中。研究表明, 超排使用的外源促性腺激素可促进卵巢、输卵管和子宫中表皮生长因子表达量升高, 提示其可能参与伊拉兔的生殖过程并调节卵巢、输卵管和子宫的功能。

**关键词:** 伊拉兔; 超数排卵; 表皮生长因子; 生殖器官

**中图分类号:** S955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2023) 03-409-11

## Effect of Superovulation on Epidermal Growth Factor Expression in the Reproductive Organs of Female Rabbit

GAO Ying-Fan FU Xiao-Yu ZHOU Na LI Yi-Jian WANG Xin-Rong\*

College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

**Abstract: [Objectives]** The study aims to explore the effects of exogenous gonadotropin on epidermal growth factor (EGF) expression level and action characteristics in Hyla Rabbit's (*Oryctolagus cuniculu*) reproductive organs. **[Methods]** In this experiment, 30 Hyla Rabbits (6 male and 24 female) were randomly selected. Female rabbits were randomly divided into superovulation group (intramuscular injection of 70 U pregnant mare serum gonadotropin +100 U human chorionic gonadotropin,  $n = 12$ ) and control group (no injection of

**基金项目** 甘肃农业大学特色学科开放基金项目 (No. GAU-XKJS-2018-037);

\* 通讯作者, E-mail: wangxr@gsau.edu.cn;

**第一作者简介** 高颖帆, 女, 硕士研究生; 研究方向: 高原家畜繁殖生理; E-mail: 2925126120@qq.com。

收稿日期: 2022-08-02, 修回日期: 2023-01-14 DOI: 10.13859/j.cjz.202303010

any hormone,  $n = 12$ ). And Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), Western-blot and immunohistochemistry were used to study the expression and localization of epidermal growth factor (EGF) in ovaries, oviduct and uterus in superovulation group. SPSS 25.0 software was used for independent sample  $t$  test analysis of relevant data. Results were expressed as “mean  $\pm$  standard deviation”,  $P < 0.01$  means significant difference,  $P < 0.05$  means significant difference. **[Results]** The results showed that the relative expression level of epidermal growth factor mRNA in different tissues was significantly higher in the superovulation group than in the control group (uterus:  $t = 17.053$ ,  $P < 0.01$ ; oviduct:  $t = 3.009$ ,  $P < 0.01$ ; ovaries:  $t = 14.125$ ,  $P < 0.01$ ) (Fig.1). The relative expression of EGF protein was also significantly higher in different tissues of the superovulation group than the control group (uterus:  $t = 20.663$ ,  $P < 0.01$ ; oviduct:  $t = 19.537$ ,  $P < 0.01$ ; ovaries:  $t = 21.272$ ,  $P < 0.01$ ) (Fig.2). And the positive signals were located in primary oocytes, granulosa cells, endometrium cells, mesenchymal cells and vascular endothelial cells respectively (Fig. 3). Oviduct ciliated cells, basal cells, mucosal epithelium, muscularis and epithelial (Fig. 4), and endometrial cells of the uterus (Fig. 5). **[Conclusion]** Our study has shown that exogenous gonadotropin used for superovulation can promote the expression of epidermal growth factor expression in ovaries, fallopian tubes and uterus, suggesting that EGF may be involved in the reproductive process of Hyla Rabbit and regulate the functions of ovaries, fallopian tubes and uterus.

**Key words:** Hyla Rabbit, *Oryctolagus cuniculu*; Superovulation; Epidermal growth factor; Reproductive organs

超数排卵是通过注射外源促性腺激素诱导动物卵巢排出比自然发情状态下更多成熟卵子的技术, 简称“超排”(林峰等 2018)。较为完善的超排技术广泛应用于家畜胚胎工程研究中, 已成为胚胎移植成功的先决条件之一(胡小九 2001)。动物的繁殖性能受激素和多种生长因子的调节。生长因子在哺乳动物生殖器官中可通过内分泌、旁分泌及自分泌因子如类固醇激素、多肽类和生长因子的调控(张骏鸿等 2015)。

表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)是一种由 53 个氨基酸残基组成的肽链, 分子质量约 6 ku, 是调控卵泡生长发育的一种重要因子(王利娟等 2020)。有研究证实, 表皮生长因子在雌性哺乳动物生殖过程, 包括卵泡的发育、卵母细胞的成熟、早期胚胎发育、着床及子宫蜕膜化等过程中具有重要的调节作用(曹允考等 2004)。有研究证明, 在猪的卵母细胞和卵丘细胞上均有表皮生长因子 mRNA 的表达(Yoshida et al. 1998)。还有研究表明, 在人的卵巢内, 表皮生长因子在腔前卵

泡的颗粒细胞、各级卵泡的卵泡膜、闭锁卵泡和膜黄体细胞中表达量也较高, 提示表皮生长因子可能在卵泡发育过程中起着重要的调节作用(Reeka et al. 1998)。因此, 本实验通过对雌性健康伊拉兔(*Oryctolagus cuniculu*)注射孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)进行超排处理, 并运用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术、蛋白免疫印迹(Western-blot)和免疫组化技术, 测定伊拉兔生殖器官包括卵巢、输卵管和子宫中表皮生长因子的表达与分布情况, 旨在探讨外源促性腺激素处理对伊拉兔生殖器官中表皮生长因子表达水平的影响及其作用特点, 以期为伊拉兔超数排卵的内分泌调控机理提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

本实验以甘肃省靖远县某肉兔养殖场的

30 只体重 3~4 kg、体况正常的伊拉兔为研究对象, 包括成年健康雄兔 6 只和雌兔 24 只。将雌兔随机分为超排处理组 12 只和对照组 12 只。所有动物均按照相同饲养标准饲养。

## 1.2 超排处理及样品采集

每只超排处理雌兔于大腿内侧注射 70 U PMSG (宁波第二激素厂, 兽药 GMP 证字 11004 号, 1 000 U), 72 h 后注射 100 U hCG (宁波第二激素厂, 兽药 GMP 证字 11004 号, 1 000 U), 对照组注射相同剂量生理盐水, 随后每个笼内放入 1 只雌兔和 1 只雄兔, 共 6 笼 (1:1 合笼), 雄兔一天配种两只雌兔, 连续使用 2 d。待完成交配后, 再将其恢复单笼饲养。24 h 后, 对所有完成交配雌兔, 使用耳缘静脉注射空气法进行处死, 迅速解剖。每组选取 3 只发情状况较好的雌兔, 具体表现为, 超排处理组个体卵巢体积较大, 表面卵泡数与充血卵泡数量及排卵点数较多; 对照组为卵巢质地均匀, 有较多卵泡。将选取的雌兔左侧卵巢、输卵管和子宫组织固定于 4% 甲醛溶液, 用于组织蜡块的包埋及组化的制作, 将右侧卵巢、输卵管和子宫组织迅速装入冻存管置于液氮中冷却后转至 -80 °C 冰箱中保存备用。

## 1.3 qRT-PCR 检测

**1.3.1 总 RNA 的提取与 cDNA 合成** 采用 Trizol (美国 Omega 公司) 法直接提取伊拉兔组织内的总 RNA, 用 Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度及纯度, 选择完整性好的 RNA 将其浓度稀释为 400 mg/L, 并参照两步法用反转录试剂

盒 (美国 Thermo 公司) 合成第一链 cDNA, 然后置于 -20 °C 冰箱备用。

**1.3.2 EGF 基因相对表达量检测** 根据 Gene Bank 数据库中兔的 EGF mRNA 基因序列 (XM\_017347349.1) 在 NCBI Primer-BLAST 设计引物,  $\beta$ -actin 为内参基因, 引物均由 Servicebio (武汉) 公司合成 (表 1)。PCR 反应体系 (20  $\mu$ l): 2  $\times$  qPCR Mix 10.0  $\mu$ l, 上、下游引物各 0.4  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 8.2  $\mu$ l, 反转录产物 (cDNA) 1.0  $\mu$ l。反应条件: 预变性 95 °C 2 min; 变性 95 °C 15 s, 退火 59 °C 15 s, 延伸 65 °C 15 s, 40 个循环; 65~95 °C 制备熔解曲线。使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因的相对表达量。

## 1.4 Western blot 检测蛋白表达量

**1.4.1 蛋白样品的提取** 将组织块加入液氮充分研磨, 于蛋白裂解液和苯甲基磺酰氟中溶解于离心管中, 置于冰上反应, 待充分裂解后, 4 °C、12 000 r/min 离心 12 min, 取上清液, 参照 BCA 蛋白定量试剂盒 (赛维尔生物科技有限公司, G2026-1) 要求, 检测蛋白浓度。将蛋白溶液按照 4:1 的比例加入 5 倍的蛋白上样缓冲液, 沸水浴变性 15 min, 变性完成后放入 -20 °C 冰箱保存备用。

**1.4.2 Western-blot** 配置 12% 分离胶和 5% 浓缩胶, 加入样品和蛋白分子量标准进行十二烷基硫酸聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 待电泳完成后对目的蛋白凝胶条带进行切胶, 转膜、封闭后, 使内参 (鼠源

表 1 qRT-PCR 引物信息

Table 1 Information of primers used in qRT-PCR

基因 Genes	GenBank 登录号 GenBank accession No.	引物序列 (5' - 3') Primer sequences	退火温度 Annealing temperature, $T_m$ (°C)	产物大小 Amplicon length (bp)
<i>EGF</i>	XM_017347349.1	F: TAAAAGTAACCGGGAGAACCACT R: ATGTGCAGTTAAAGCTCACGAA	59	367
<i><math>\beta</math>-actin</i>	XM_001101683.1	F: GGACCTGACCGACTACCTCA R: CAGCTTCTCCTTGATGTCCC	59	100

$\beta$ -actin, Abmart 上海)(1:1 000)和一抗(鼠源 EGF 抗体, Abmart 上海)(1:500)与膜充分接触后置于 4 °C 过夜 10 h, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤膜, 二抗(羊抗兔 IgG/HRP, Abmart 上海)(1:3 000)在 37 °C 恒温摇床孵育 2 h 后洗膜。最后, 在暗室中加入超敏电化学发光液(electrochemiluminescence, ECL), 经显影、定影和曝光后观察胶片上的条带。

### 1.5 免疫组化染色

首先将超排处理组和对照组伊拉兔卵巢、输卵管和子宫在 4%多聚甲醛中固定, 经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、粘片和烤片后, 将切片脱蜡至水, 置于柠檬酸抗原修复缓冲液盒中抗原修复。用 PBS 缓冲液清洗卵巢、输卵管和子宫, 再将洗净的切片放入 3%过氧化氢溶液中孵育。将 3%牛血清蛋白(bovine albumin, BSA)滴加于切片上, 均匀覆盖组织, 室温封闭 30 min。滴加已稀释的一抗(鼠源 EGF 抗体, Abmart 上海), 超排处理组和对照组的阴性对照以 PBS 代替一抗进行染色, 切片置于湿盒内, 4 °C 孵育过夜。先加入 PBS 缓冲液洗剂, 再加入二抗(羊抗兔 IgG/HRP, Abmart 上海)标记覆盖组织, 室温孵育 1 h。用 PBS 缓冲液洗剂, 滴加现配制的二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色剂显色, 用自来水终止显色, 并用苏木素复染 3 min, 然后氨水反蓝, 用蒸馏水冲洗。置于溶液中脱水、透明, 用中性树脂封片。在显微镜下镜检, 蓝色为细胞核, 深棕黄色为强阳性表达, 浅棕黄色为阳性表达, 接近背景色或者白色无表达。

### 1.6 数据分析

采用倒置显微镜(Olympusdp-71, 日本)观察免疫组化切片阳性结果并采集图像, 结合图像分析软件 Image Pro Plus 6.0, 测量并分析每张切片阳性范围内 EGF 的积分光密度值。采用 SPSS 25.0 软件对相关数据进行独立样本  $t$  检验分析。最后用画图软件 Grand primer 8.0 对

数据作图, 结果以平均值  $\pm$  标准差(Mean  $\pm$  SD)表示,  $P < 0.01$  表示差异极显著,  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P \geq 0.05$  表示差异不显著。

## 2 结果

### 2.1 超排对伊拉兔生殖器官中表皮生长因子 mRNA 表达的影响

表皮生长因子 mRNA 在超排处理组不同组织中的相对表达量显著高于对照组(子宫:  $t = 17.053$ ,  $P < 0.01$ ; 输卵管:  $t = 3.009$ ,  $P < 0.01$ ; 卵巢:  $t = 14.125$ ,  $P < 0.01$ ) (图 1a); 在超排处理组子宫的相对表达量显著高于输卵管( $t = 5.630$ ,  $P < 0.05$ ) (图 1b), 卵巢的相对表达量显著高于输卵管( $t = 5.848$ ,  $P < 0.05$ ) (图 1b), 子宫和卵巢之间无显著差异( $t = 1.670$ ,  $P > 0.05$ ) (图 1b); 在对照组输卵管的相对表达量显著高于子宫( $t = 4.992$ ,  $P < 0.05$ ) (图 1b), 输卵管和卵巢之间无显著差异( $t = 1.854$ ,  $P > 0.05$ ) (图 1b), 子宫和卵巢之间无显著差异( $t = -3.730$ ,  $P > 0.05$ ) (图 1b)。

### 2.2 超排对伊拉兔生殖器官中表皮生长因子蛋白表达的影响

Western blot 检测伊拉兔生殖器官组织的表皮生长因子蛋白的表达(图 2a), 并以内参  $\beta$ -actin 对目的蛋白进行校正, 发现在卵巢、输卵管和子宫中, 表皮生长因子蛋白的相对表达量与 mRNA 的表达水平趋势基本一致。超排处理组与对照组相比, 表皮生长因子在子宫、输卵管和卵巢中均有表达, 且 EGF 蛋白在超排处理组不同组织中的相对表达量显著高于对照组(子宫:  $t = 20.663$ ,  $P < 0.01$ ; 输卵管:  $t = 19.537$ ,  $P < 0.01$ ; 卵巢:  $t = 21.272$ ,  $P < 0.01$ ) (图 2b); 在超排处理组子宫的相对表达量显著高于输卵管( $t = 6.667$ ,  $P < 0.01$ ) (图 2c), 卵巢的相对表达量显著高于输卵管( $t = 7.259$ ,  $P < 0.01$ ) (图 2c), 子宫和卵巢之间差异不显著( $t = 1.082$ ,  $P > 0.05$ ) (图 2c); 在对照组子宫和输卵管之间无显著差异( $t = 0.337$ ,  $P > 0.05$ ) (图 2c), 输卵管和卵巢之间无显著差

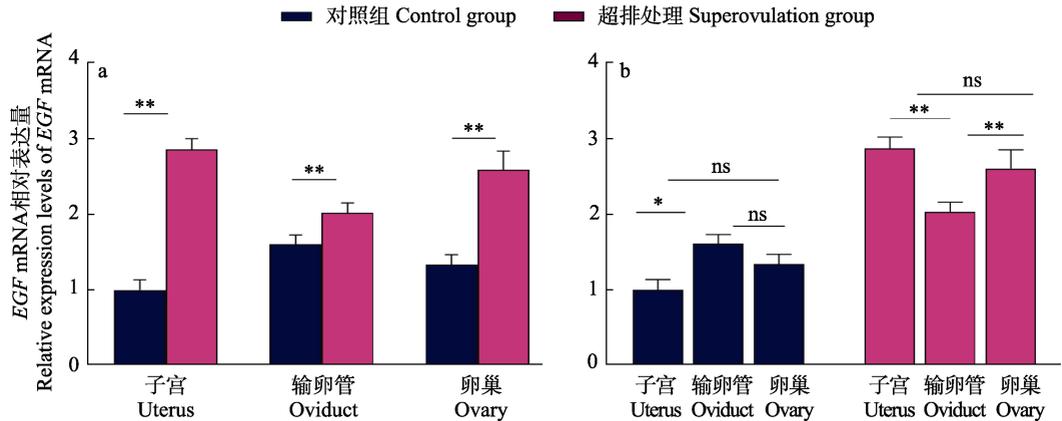


图 1 表皮生长因子 (EGF) mRNA 在伊拉兔子宫、输卵管、卵巢中的表达量

Fig. 1 Expression level of epidermal growth factor (EGF) mRNA in uterus, oviduct and ovary of Hyla Rabbit

ns. 无显著差异; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ . ns. No significant difference; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

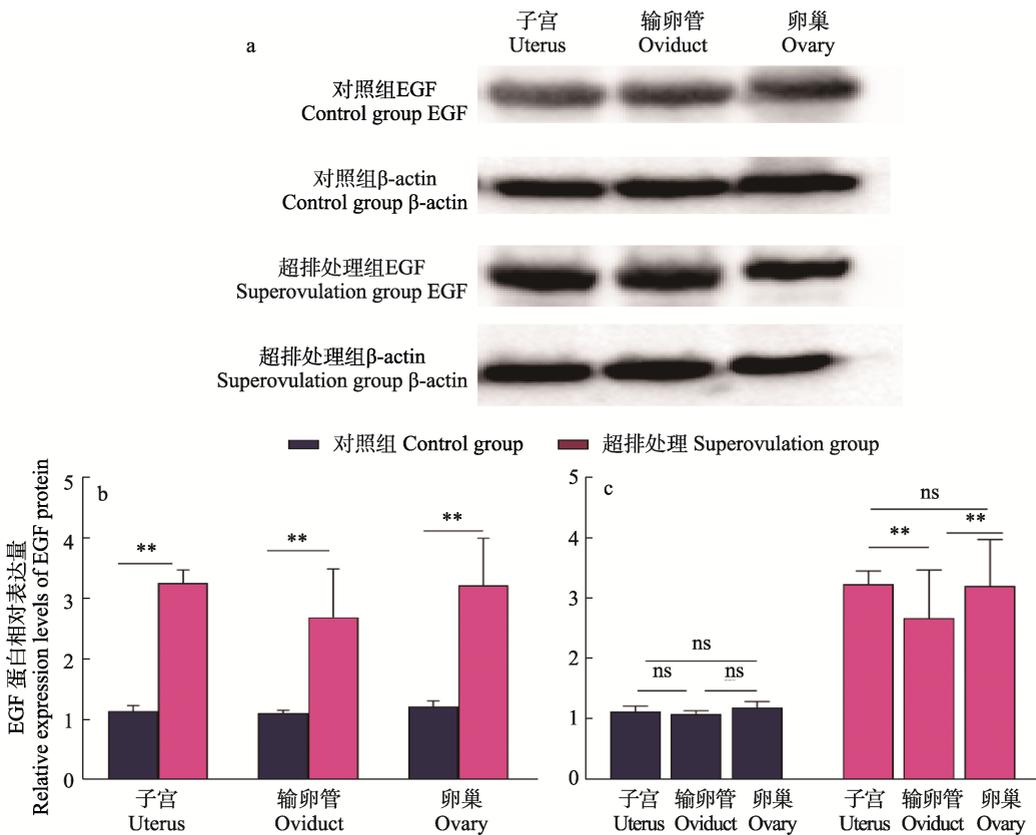


图 2 伊拉兔子宫、输卵管和卵巢中表皮生长因子 (EGF) 蛋白的检测 (a) 及相对表达量 (b, c)

Fig. 2 Detection (a) and relative expression of epidermal growth factor (EGF) protein in uterus, oviduct and ovary (b, c) of Hyla Rabbit

ns. 无显著差异; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ . ns. No significant difference; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

异 ( $t = -1.030, P > 0.05$ ) (图 2c), 子宫和卵巢之间无显著差异 ( $t = -0.660, P > 0.05$ ) (图 2c)。

**2.3 表皮生长因子在伊拉兔生殖器官中的定位**

通过免疫组化技术对伊拉兔生殖器官中表皮生长因子蛋白进行定位观察 (图 3), 发现表皮生长因子蛋白主要表达在对照组与超排处理组卵巢的初级卵母细胞、颗粒细胞、内膜细胞、间质细胞和血管中。在对照组中 (图 3a~c), 初级卵母细胞和内膜细胞中表达明显, 在颗粒

细胞、间质细胞及血管中弱阳性表达。与对照组相比较, 表皮生长因子蛋白在超排处理组的初级卵母细胞、内膜细胞、颗粒细胞和间质细胞中蛋白表达阳性信号均增强 (图 3d, e), 且在血管表达明显 (图 3f)。两组分别做了阴性对照, 对照组阴性对照 (图 3g, h) 和超排处理组阴性对照 (图 3i) 均无表达。

免疫组织化学结果显示 (图 4), 表皮生长因子蛋白在对照组和超排处理组输卵管中均有表达, 主要表达于输卵管的纤毛细胞、基细胞、

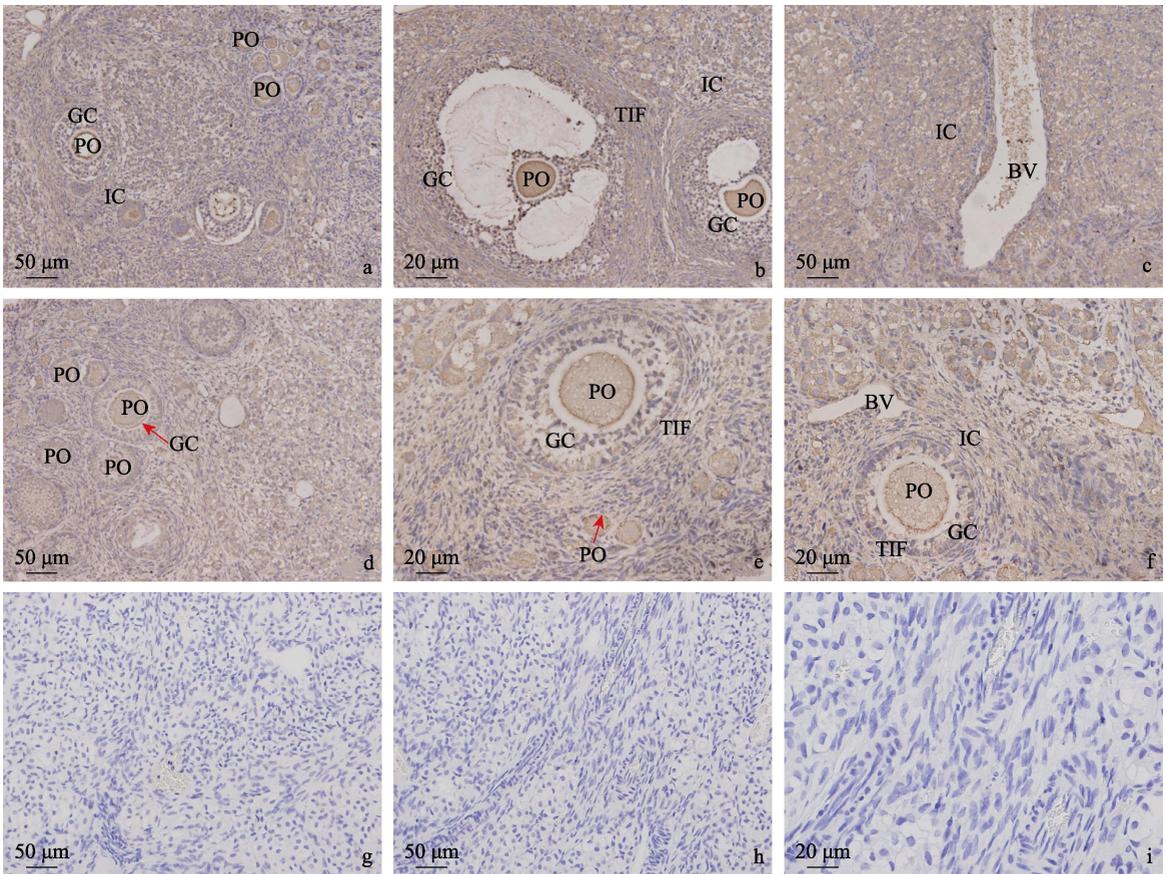


图 3 伊拉兔卵巢中表皮生长因子蛋白的定位

**Fig. 3 Localization of epidermal growth factor protein in the ovary of Hyla Rabbit**

a. 200 ×, b. 400 ×, c. 200 ×, 对照组卵巢; d. 200 ×, e. f. 400 ×, 超排处理组卵巢; g. 200 ×, h. i. 400 ×, 卵巢阴性对照. BV. 血管; IC. 间质细胞; GC. 颗粒细胞; PO. 初级卵母细胞; TIF. 内膜细胞  
a. 200 ×, b. 400 ×, c. 200 ×, ovary in control group; d. 200 ×, e. f. 400 ×, ovary in superovulation group; g. 200 ×, h. i. 400 ×, ovary in negative control. BV. Blood vessels; IC. Interstitial cells; GC. Granulosa cells; PO. Primary oocyte; TIF. Endometrial cells

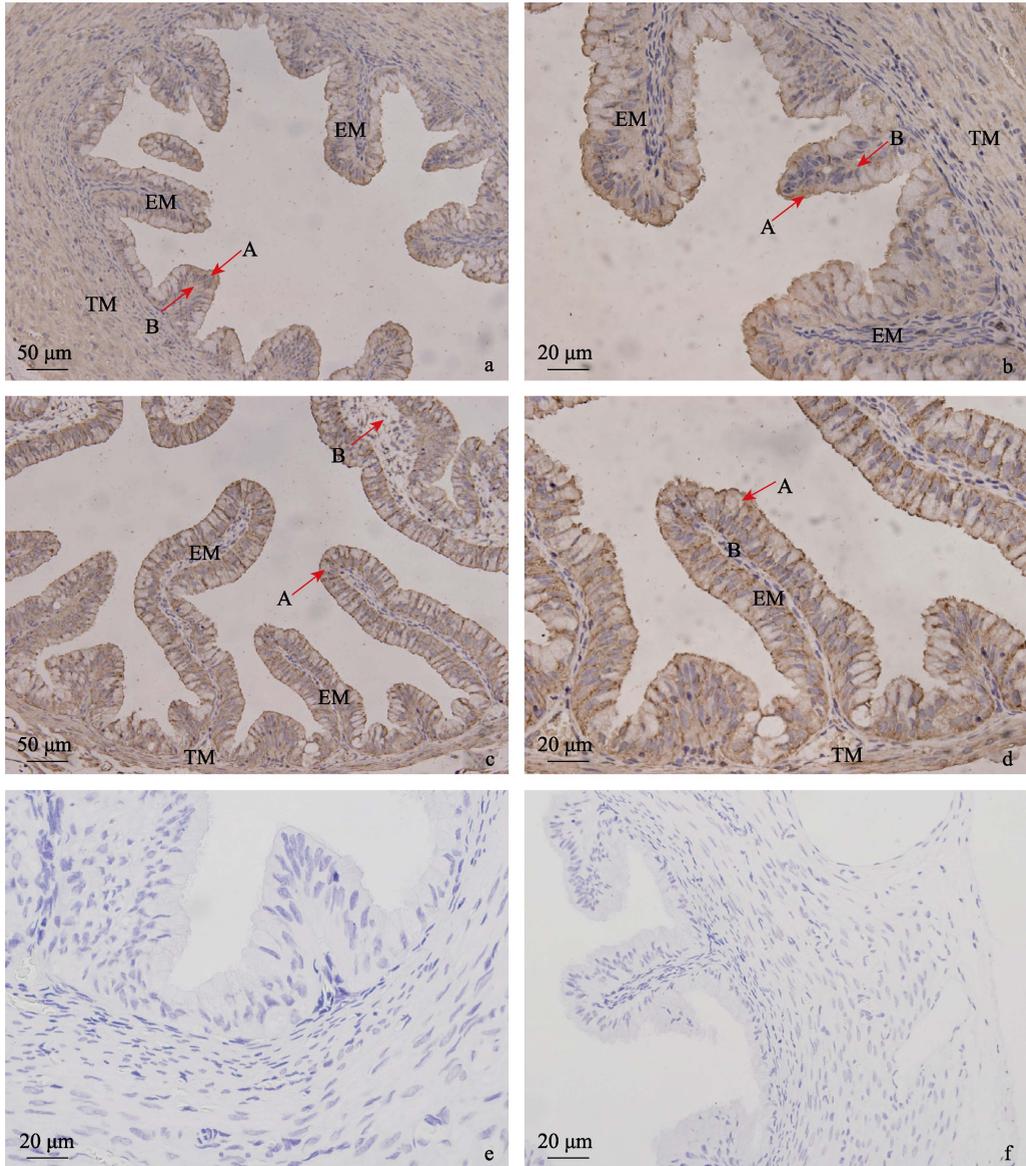


图 4 伊拉兔输卵管中表皮生长因子蛋白的定位

Fig. 4 Localization of epidermal growth factor protein in the oviduct of Hyla Rabbit

a. 200 ×, b. 400 ×, 对照组输卵管; c. 200 ×, d. 400 ×, 超排处理组输卵管; e、f. 400 ×, 输卵管阴性对照。A. 纤毛细胞; B. 基细胞; EM. 黏膜上皮; TM. 肌层  
 a. 200 ×, b. 400 ×, oviduct in control group; c. 200 ×, d. 400 ×, oviduct in superovulation group; e, f. 400 ×, oviduct in negative control. A. Ciliary cells; B. Basal cell; EM. Mucosal epithelium; TM. Muscle layer

黏膜上皮和肌层中。与对照组相比(图 4a, b), 表皮生长因子在超排处理组输卵管中表达阳性信号增强, 纤毛细胞、肌层、黏膜上皮中强阳性表达(图 4c, d), 基细胞表达明显。两组分

别做了阴性对照, 对照组阴性对照(图 4e)和超排处理组阴性对照(图 4f)均无表达。

免疫组化结果显示(图 5), 表皮生长因子蛋白主要表达在对照组和超排处理组的子宫内

膜上皮细胞和子宫内膜中。与对照组相比（图 5a, b），表皮生长因子在超排处理组子宫腺、子宫内膜强阳性表达（图 5c, d），在子宫内膜

上皮细胞和子宫上皮细胞中阳性表达。两组分别做了阴性对照，对照组阴性对照（图 5e）和超排处理组阴性对照（图 5f）均无表达。

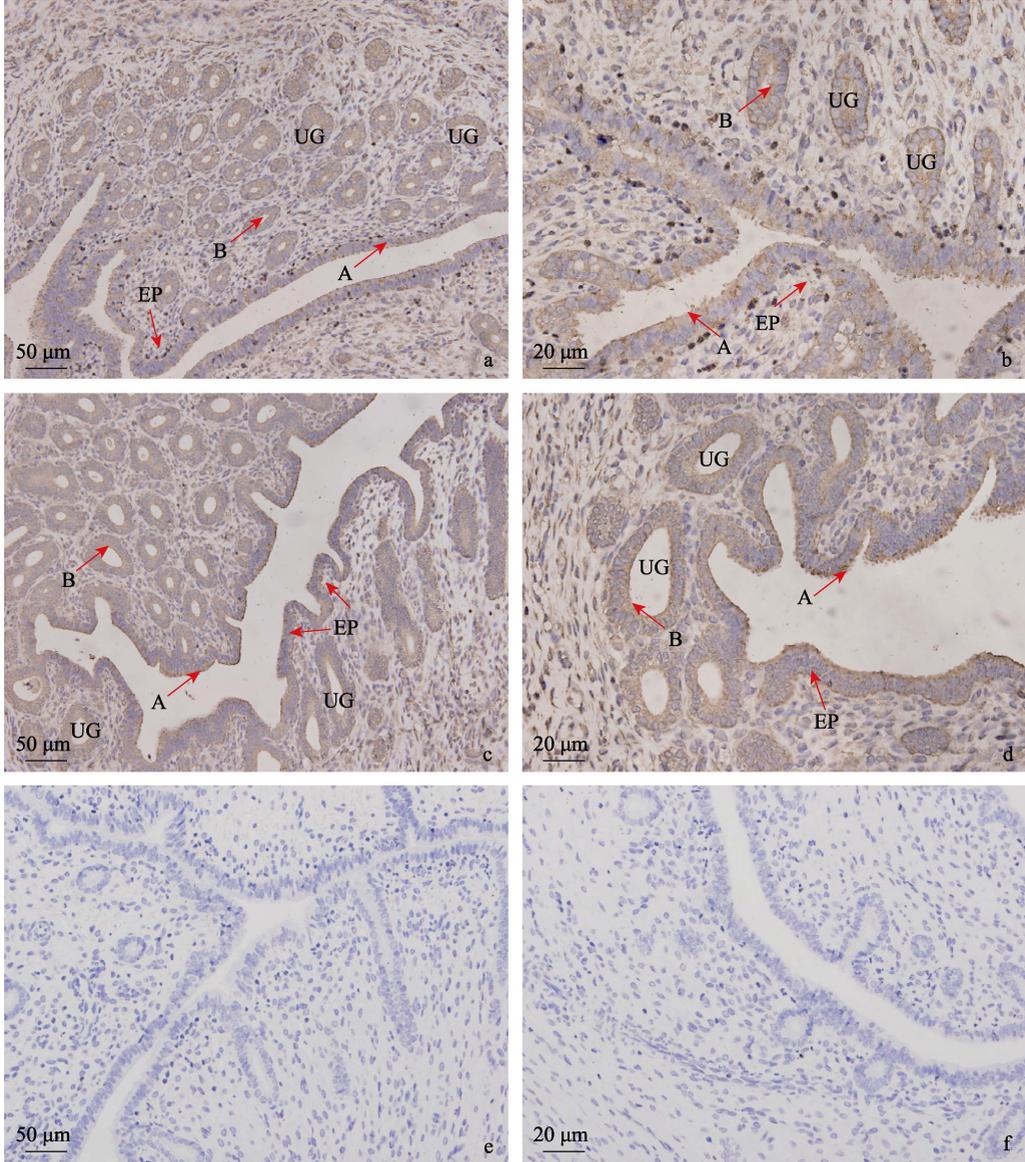


图 5 伊拉兔子宫中表皮生长因子蛋白的定位

Fig. 5 Localization of epidermal growth factor protein in the uterus of *Hyla* Rabbit

a. 200 ×, b. 400 ×, 对照组子宫; c. 200 ×, d. 400 ×, 超排处理组子宫; e. 200 ×, f. 400 ×, 子宫阴性对照。A. 子宫内膜上皮细胞; B. 子宫腺上皮细胞; EP. 子宫内膜; UG. 子宫腺

a. 200 ×, b. 400 ×, uterus in control group; c. 200 ×, d. 400 ×, uterus in superovulation group; e. 200 ×, f. 400 ×, uterus in negative control. A. Endometrial epithelial cells; B. Epithelial cells of the uterus; EP. Endometrium; UG. Uterine gland

### 3 讨论

卵巢的作用主要是卵泡发育、卵子发生以及分泌雌激素和孕酮，其在生殖系统中占重要的地位（王静瑜等 2020）。卵巢中有大量的卵泡，但是它们中的绝大多数都不能发育成熟，而是在各发育阶段中逐渐退化（曹允考等 2004）。在卵巢同一卵泡周期存在的卵泡闭锁现象，是与雌性动物体内的激素水平相关的（乔利敏等 2013）。在卵巢的生理活动中，促性腺激素和生长因子均起到关键的作用，但其作用的阶段和作用位点不同，对卵巢发挥的主要功能也不同（朱娜 2012）。PMSG 具有促卵泡素和促黄体素的双重活性，主要用于促进雌性动物卵泡发育、排卵和黄体形成。hCG 则具有诱导排卵前的卵泡生长发育并触发排卵的作用，通过注射 PMSG 和 hCG 可以补充体内激素的不足，使更多的卵泡发育成熟（林峰等 2018）。表皮生长因子是调控卵泡生长发育的一种重要因子，能促使原始卵泡中颗粒细胞的增殖分化和刺激类固醇激素的分泌，从而促进原始卵泡生长、诱导卵泡从初级卵泡向次级卵泡转化及卵母细胞直径的增大（张骏鸿等 2015）。有研究发现，在对人和猪（*Sus scrofa domestica*）卵巢的研究中，表皮生长因子 mRNA 的表达量随着有腔卵泡的增大而降低，猪卵泡中的表皮生长因子蛋白定位于有腔卵泡的颗粒细胞和膜细胞上（朱娜 2012）。还有研究发现，表皮生长因子对大鼠（*Rattus norvegicus*）、小鼠（*Mus musculus*）、猪等哺乳动物的卵母细胞减数分裂的重新启动具有促进作用（曹允考等 2000）。本研究显示，表皮生长因子 mRNA 与蛋白在超排处理后伊拉兔卵巢中的相对表达量要显著高于对照组，且表皮生长因子蛋白主要分布于初级卵母细胞、颗粒细胞、内膜细胞和间质细胞。有研究发现，在家猫（*Felis catus*）卵巢内，表皮生长因子在间质细胞、卵巢皮质细胞、卵泡膜细胞和黄体细胞中都有表达（Goritz et al. 1990）。在猪卵巢内，表皮生长因子在颗粒细胞

和卵丘细胞中都有表达，并且在排卵前卵泡的颗粒细胞中较多（Singh et al. 1995）。本研究结果显示，经 PMSG 和 hCG 的处理后，整个卵巢的表皮生长因子的表达量显著增高，说明外源促性腺激素可增加卵巢对表皮生长因子的响应能力，从而促进卵泡的发育。

输卵管的作用是卵子与精子结合和早期胚胎发育的主要场所，运送受精卵的管道，及为精子储存提供场所等（王静瑜等 2020）。表皮生长因子家族生长因子具有促进哺乳动物早期胚胎发育，影响胚泡着床等重要作用（张揆一 2004）。研究认为，在体内表皮生长因子可以维持输卵管上皮的完整性，对输卵管具有明显的作用，输卵管中表达的表皮生长因子可以以自分泌和旁分泌的形式影响生殖系统的生殖过程（曹允考等 2000）。本研究发现，经超排处理后，整个输卵管表皮生长因子的表达量也显著增高了。有研究表明，表皮生长因子具有促进哺乳动物卵母细胞受精和受精后发育的能力，可提高体外成熟卵子的精子穿透率（曹允考 2000）。有研究认为，在人的输卵管内，表皮生长因子主要定位在输卵管上皮细胞，表皮生长因子在增殖后期、分泌早期到中期的输卵管内表达量较高，而在增殖早期和分泌晚期表达量最低（Chegini et al. 1994）。本研究发现，表皮生长因子蛋白在输卵管纤毛细胞、基细胞、黏膜上皮、肌层中均存在表达，说明表皮生长因子可能通过自分泌和旁分泌的形式，调节卵母细胞的生长、成熟及受精后的早期胚胎发育。

子宫作为胎儿发育的场所，在胚胎附植和胎儿孕育中具有十分重要的作用（王静瑜等 2020）。有研究表明，妊娠期子宫腺可以分泌多种生物活性物质来调节子宫内膜细胞的生理状态（Chen et al. 2013）。在体外培养条件下，表皮生长因子对胚胎的发育具有明显的促进作用（Paria et al. 1990）。有研究表明，在胚胎着床过程中，生长因子的信号对调节胚胎与子宫内

膜之间的相互作用也有着重要的影响,表皮生长因子家族对胚胎的着床有着重要的作用,在添加表皮生长因子的培养系统中培养的小鼠胚胎的着床率明显升高 (Morita et al. 1994),说明表皮生长因子可以刺激子宫上皮细胞的生长及子宫内膜基质细胞、子宫内膜细胞中前列腺素 E 的产生和子宫内膜腺细胞的产生。本研究结果显示,经 PMSG 和 hCG 处理后,显著增加了子宫表皮生长因子的表达量,这将有利于子宫上皮细胞和黏膜上皮细胞的进一步增殖分化,也有利于为胚胎着床提供合适的微环境。有研究发现,在山羊 (*Capra aegagrus hircus*) 交配后 22 ~ 30 d 的子宫内膜上皮和腺细胞及经历蜕膜化的基质细胞中检测到表皮生长因子,大鼠怀孕 4 ~ 6 d 的子宫内膜上皮存在表皮生长因子 (Tristan et al. 1992, Flores et al. 1998)。本研究显示,在伊拉兔体内的表皮生长因子主要表达于子宫内膜的上皮细胞、子宫腺上皮细胞、子宫内膜和子宫腺。该结果也说明在哺乳动物雌性生殖过程,特别是从卵子成熟到胚胎着床过程中,表皮生长因子都扮演着重要的生理作用。

## 参 考 文 献

- Chegini N, Zhao Y, Mclean F W. 1994. Expression of messenger ribonucleic acid and presence of immunoreactive proteins for epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor alpha (TGF alpha) and EGF/TGF alpha receptors and 125I-EGF binding sites in human fallopian tube. *Biology of Reproduction*, 50(5): 1049–1058.
- Chen J C, Erikson D W, Piltonen T T, et al. 2013. Coculturing human endometrial epithelial cells and stromal fibroblasts alters cell-specific gene expression and cytokine production. *Fertility and Sterility*, 100(4): 1132–1143.
- Flores J M, Sanchez M A, Garcia P, et al. 1998. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and growth factor-betas in the caprine peri-implantation period. *Theriogenology*, 50(6): 931–944.
- Goritz F, Jewgenow K, Meyer H D. 1996. Epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in the ovary of the domestic cat (*Felis catus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 106(1): 117–124.
- Morita Y, Tsutsumi O, Taketani Y. 1994. *In vitro* treatment of embryos with epidermal growth factor improves viability and increases the implantation rate of blastocysts transferred to recipient mice. *American Journal of Obstetrics Gynecol*, 171(2): 406–409.
- Paria B C, Dey S K. 1990. Preimplantation embryo development *in vitro*: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the united states of America*, 87(12): 4756–4760.
- Reeka N, Berg F D, Brucker C. 1998. Presence of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human ovarian tissue and follicular fluid. *Human Reproduction Update*, 13(8): 2199–2205.
- Singh B, Rutledge J M, Armstrong D T. 1995. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Molecular Reproduction and Development*, 40(4): 391–339.
- Tristan J, Peter S, John C, et al. 1992. Expression of the genes for TGF alpha, EGF and EGF receptor during early pig development. *Developmental Cell*, 116(3): 663–669.
- Yoshida Y, Yoshida M, Bamba K. 1998. Detection of growth factor mRNA in porcine cumulus-oocyte complexes (COCs) during maturation *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development*, 44(2): 121–128.
- 曹允考. 2000. 表皮生长因子 mRNA 在猪雌性生殖器官中的表达. 香坊: 东北农业大学硕士学位论文, 3–22.
- 曹允考, 龚坤巍, 张贵学, 等. 2004. 猪输卵管和子宫中 EGF 表达的研究. *黑龙江畜牧兽医*, 47(7): 11–13.
- 曹允考, 严云勤, 龚坤巍, 等. 2000. 表皮生长因子在哺乳动物雌性生殖器官中的作用. *黑龙江畜牧兽医*, 43(8): 29–30.
- 胡小九. 2001. 家兔超数排卵研究进展. *当代畜牧*, 19(3): 43–44.
- 林峰, 李明, 高腾云, 等. 2018. 不同处理方法对家兔超数排卵效果研究 // 中国畜牧业学会. 第八届(2018)兔业发展大会论文集, 160–163.

- 乔利敏, 乔富强, 姚华, 等. 2013. 不同因素对家兔超数排卵效果的影响. 黑龙江畜牧兽医, 56(17): 158–160.
- 王静瑜, 王萌, 潘阳阳, 等. 2020. 牦牛 FAF1 基因的分子特征及其在不同阶段卵巢、输卵管、子宫中的表达. 生物技术通报, 36(7): 80–89.
- 王利娟, 陈超磊, 苏运泽, 等. 2020. 表皮生长因子对绵羊子宫内膜上皮原代细胞增殖的影响. 中国畜牧兽医, 47(1): 83–89.
- 张骏鸿, 刘晓坤, 魏强, 等. 2015. 小鼠卵巢 EGFR 表达检测及 EGF 提高小鼠超数排卵效果研究. 中国兽医学报, 35(10): 1702–1707.
- 张揆一. 2004. 子宫、输卵管、卵巢有啥功能. 家庭医学, 17(11): 8.
- 朱娜. 2012. 小鼠发情周期卵泡发育、生长因子与促进腺激素受体表达规律及超数排卵研究. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 10–40.

---

## 西藏林芝市发现北椋鸟

### Daurian Starling *Agropsar sturninus* Found in Linzhi, Tibet, China

2020年5月3日10时,在西藏自治区林芝市色季拉国家森林公园东久附近山上(94°48'50" E, 29°57'28" N, 海拔2 650 m)观察到1只北椋鸟(*Agropsar sturninus*)活动于高山松林边缘的蔷薇树上(图1)。该鸟上体烟灰色,下体灰白色,两翼及尾黑色,中覆羽白色形成延长的白色肩斑,大覆羽具白色端斑,这一点与紫背椋鸟(*A. philippensis*)的雌鸟不同,故而鉴别为北椋鸟雌鸟(赵欣如 2018)。

北椋鸟国内见于除新疆、西藏、青海外的各省、直辖市、自治区(郑光美 2017),后于2020年5月在青海省西宁市大通回族土族自治县被发现(中国观鸟记录中心 2020)。依据相关鸟类学文献(郑光美 2017, 赵欣如 2018, 丁平等 2019)和网络资料(中国观鸟记录中心 2020, eBird 2020),确定北椋鸟为西藏自治区鸟类分布新记录种。

(下转第 441 页)

---

**基金项目** 西藏自治区自然科学基金厅校联合基金项目(No. XZ2019ZRG-68), 生态环境部生物多样性调查、观测与评估项目;

**第一作者简介** 范丽卿, 女, 副教授; 研究方向: 动物生态学; E-mail: flqpig@163.com。

收稿日期: 2020-06-22, 修回日期: 2021-01-22 DOI: 10.13859/j.ejz.202303018