

• 综述 •

哺乳动物腔前卵泡体外培养的影响因素

唐桂毅, 刘妍, 张宗鹏*

天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

摘要: 哺乳动物卵巢有大量的腔前卵泡, 其中大部分卵泡不能进行排卵, 而卵泡发育和闭锁的调节是一个高度复杂的过程。随着对卵泡生长过程的深入研究, 国内外已经建立了多种体外培养方法, 而腔前卵泡体外培养已成为现今的研究热点, 并将其应用于雌性生殖毒理评价研究当中, 为新药评价研究提供了可靠的实验工具。对哺乳动物腔前卵泡的体外培养中的胚胎来源、分离方法、培养条件和添加成分等几个方面进行了阐述, 为进一步完善腔前卵泡培养体系提供实验依据。

关键词: 哺乳动物; 腔前卵泡; 体外培养; 生殖毒理; 新药评价

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2015)01-0085-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.01.017

Factors on *in vitro* culture of preantral follicles of mammal

TANG Gui-yi, LIU Yan, ZHANG Zong-peng

Center for Drug Evaluation and Research in Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China

Abstract: Preantral follicles are of great abundance in mammalian ovaries and the vast majority (> 99.9%) never become ovulatory; Regulation of follicular development and atresia is a complicated process. With further research about the process of follicle growth, many *in vitro* models have been established at home and abroad, while *in vitro* culture of preantral follicles that is applied to evaluating female reproductive toxicology and provides a reliable experimental tool for new drug evaluation has become a hot spot in the current study. This paper reviews the various factors *in vitro* culture of preantral follicles, such as embryos, separation methods, cultural conditions, and additives, which would further achieve the system to provide experimental basis for the culture.

Key words: mammal; preantral follicles; *in vitro* culture; reproductive toxicology; new drug evaluation

卵泡是哺乳动物卵巢内的基本功能单位, 为卵母细胞生长发育及成熟提供微环境。哺乳动物卵巢中储存着大量的腔前卵泡^[1], 包括原始卵泡、初级卵泡和次级卵泡, 但随着个体的发育, 99%以上的卵泡都会通过凋亡通路发生闭锁而逐渐退化, 同时还伴随着增生性改变^[2], 只有极少数的卵泡最终发育到成熟和排卵阶段。

目前在新药安全性评价方法中, 雌性生殖毒性评价方法主要采用整体动物试验, 存在不敏感、周期长且难以揭示毒作用位点和毒作用机制。为此, 近几年国内外已建立了多种体外雌性生殖毒性评价方法, 哺乳动物腔前卵泡体外培养方法也应运而生。该模型可以动态观察体外卵泡的形态分化和发育、激素生成、卵母细胞成熟及排卵等雌性生殖的主要

功能; 具有使用动物数量少、周期短、费用低和受试物用量少等优点。

哺乳动物的腔前卵泡体外培养正日益受到重视, 目前已应用于多种哺乳动物。虽然腔前卵泡的体外培养有了很大的发展, 但是由于多种因素的影响, 培养方法一直制约着相关研究工作的开展^[3]。为此, 笔者对腔前卵泡体外培养的影响因素作一综述, 希望为生殖毒理学研究和新药评价提供借鉴。

1 胚胎来源

由于哺乳动物种类不同, 卵巢的结构、腔前卵泡在体外的成熟时间、能力以及表现都有所差异^[4]。因此, 不同胚胎来源的卵泡细胞在体外成熟时, 要清楚其在体内所处的环境条件和特殊性。胚胎来源问题又分为动物年龄和卵巢及卵泡大小的选择。

收稿日期: 2014-11-18

作者简介: 唐桂毅 (1985—), 女, 硕士, 研究方向为新药的生殖毒理学评价。Tel: (022)84845264 E-mail: xiaoyi850903@163.com

*通信作者 张宗鹏, 男, 研究员。E-mail: zhangzp166@163.com

1.1 动物年龄

成年动物的卵巢会随着动物年龄的增加,纤维化程度增加、韧性加大,不断退化甚至闭锁,所分离的卵泡数量就减少;年龄越小,则相反。因此,应尽可能培养较早发育阶段的卵泡。

1.2 卵巢及卵泡大小的选择

对动物卵巢进行选择时,应将表面脂肪化、红体化、小的或者无黄体及未成熟卵巢弃去,留下发育良好的卵巢,用来分离腔前卵泡^[5]。一般认为体外培养的存活率、成熟率与卵泡直径的大小正相关^[6]。

2 分离方法

不同的分离方法,不但获得的腔前卵泡数量不同,而且对分离后的培养效果也有较大的影响^[5]。机械分离法获得的腔前卵泡虽少,但基底膜完整,有助于卵泡的成熟,比较适用于对卵泡需求数量少、卵泡质量要求高和卵泡直径大的实验。但在分离过程中组织块的大小、吹打次数、积压和过滤,也易引起卵泡破裂和颗粒细胞的脱落,从而造成卵泡质量下降。因此,在机械分离法中应尽可能减少机械损伤,提高卵泡的质量。

用酶消化法一般能得到较多的腔前卵泡,但对基底膜有损伤作用,故培养效果往往不佳。而采用酶消化-机械结合法分离腔前卵泡的培养一般较理想^[7],但应选择消化比较温和的酶,包括胶原蛋白酶、脱氧核糖核酸酶、胰蛋白酶等;还要注意酶浓度和作用时间,不同年龄及不同类型动物所需的酶浓度和作用时间不同,因此要灵活掌握,不能一概而论。而且在离心去酶过程中,要求去除干净,否则还会继续对卵泡基膜有破坏作用。

此外,分离时处理强度太大、时间过长、分离液温度及成分都会影响腔前卵泡的数量和质量。

3 培养条件

3.1 培养基的选择

卵巢内卵泡的发育需要正常的血供和合理的激素环境。离体的卵巢组织已没有血供,其营养主要由培养液提供,所以培养系统的选择对培养组织的活性尤为关键^[8]。

目前二维体系培养基多采用 α -MEM (或 DMEM)、TCM199、Ham's F-10、Waymouth's 和 Earle's, 其中 α -MEM 更有利于卵泡的生长。若是三维培养体系,可以将卵泡培养在胶原蛋白或海藻酸盐凝胶中,其中培养基质的选择尤为重要^[9]: 必须易于包埋、具有一定的机械性、营养物质和激素

能够进出卵泡、允许卵泡扩展、能够在培养终止时比较容易的收集卵泡,并且不损伤卵泡结构;但生物材料还需要通过纯化基质中的有机杂质,从而改善其纯度^[10]。因此,培养基的选择随着物种及实验目的的不同而有差异。

3.2 覆盖物的选择

因卵泡通常培养于微滴中,在培养过程中蒸发较快,且体外操作过程中液滴 pH 值也很容易改变。因此,在液滴表面加入覆盖物可以有效避免培养基的蒸发和 pH 值的改变。矿物油或石蜡油覆盖广泛应用于体外成熟和胚胎培养。然而,覆盖物的质量(含有的杂质)、添加浓度和体积都可能改变卵泡的生长环境,从而影响卵泡的发育和受精过程^[11]。

3.3 培养基的环境

培养基中通常加入 *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 调节 pH 值为 7.3~7.5 的中性环境,以避免培养基中 pH 值的酸化而影响卵泡的发育和成熟。

3.4 培养温度

哺乳动物卵泡体外培养的温度一般为 37~39 °C, 由于不同种属动物的体温不同,培养温度过高或过低均会影响卵泡细胞的成熟,因此要根据不同的动物选择适宜的培养温度^[12]。

3.5 气相

目前,卵泡细胞体外成熟培养常用的气相条件主要有两种^[4],即 5% CO₂、95% 空气和饱和湿度及 5% CO₂、5% O₂、90% N₂ 和饱和湿度。Wycherley 等^[13]研究表明,培养体系中氧含量是否适宜可能是制约卵泡体外培养的一个重要因素。因此卵泡周围培养基的氧气浓度必须维持在足够的浓度,才能改善氧和作用,从而促进卵泡的生长。但啮齿类及大动物的体质量存在差异性,因此卵泡对氧气的需要量也不相同。

4 添加成分

影响哺乳动物腔前卵泡生长和发育的因素很多,除了以上因素外,还受到多种添加成分的调控,主要包括血清、促性腺激素、类固醇激素、生长因子、维生素、细胞因子和 Kit 配体等。

4.1 血清

用同源还是异源血清目前仍存在争论。血清中含有多种营养物质,包括激素、生长因子、细胞因子、转铁蛋白等。血清可抑制或促进细胞的黏附,中和有毒物质的毒性,使细胞不受损害,促进卵泡

的正常生长和分化^[14]。目前,培养体系中一般均添加 5%~10%胎牛血清,也可以添加纯化 0.1%血清白蛋白或人工合成的血清替代品。但因血清成分比较复杂,其中某些成分可能抑制卵泡的生长,故关于是否向培养液添加血清尚存争议^[15]。

4.2 促性腺激素

促性腺激素包括卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH),两者都是垂体分泌的一种糖蛋白激素,长期以来被公认是调控卵泡发育生长的重要因子^[16]。

FSH在窦腔卵泡增殖、发育和成熟排卵过程中起主导作用,被形象地称为“拯救因子”^[17]。FSH受体的表达随着卵泡的发育不断增加,提示卵泡在发育的不同阶段对FSH的需求量也不一样,因此以动态方式、适当时间添加适宜浓度的FSH可能更有利于腔前卵泡的发育和卵母细胞的成熟^[18],而过高或过低浓度的FSH对卵泡的发育均没有促进作用。

LH对于膜细胞的增殖、卵泡内雌二醇的分泌、腔的形成以及核的成熟有重要意义。在卵巢中,LH受体主要在间隙细胞和膜细胞上表达,可以促进卵泡对FSH的反应,而FSH具有刺激颗粒细胞的增殖,激活芳香化酶的活性,诱导LH受体的表达,调节卵泡的生长或闭锁等作用^[19],因此LH受体的存在是诱发排卵和黄体形成所必需的。

4.3 类固醇激素

卵巢分泌的类固醇激素(雌激素、孕激素和雄激素)对腔前卵泡的发育有一定影响。虽然生理剂量的雌二醇不是卵泡早期发育所必需的,但并不能排除更低剂量的雌二醇有增加卵泡发育的可能性^[20]。Murra和Nilsson等^[21-22]发现雌激素对腔前卵泡的发育具有积极作用,在合适的浓度条件下,能影响初级卵泡甚至原始卵泡的发育。

孕激素通过减少卵母细胞的凋亡来抑制原始卵泡组装的能力,从而阻止原始卵泡的形成^[23]。雄激素是雌激素合成的底物,对卵泡的生长有直接促进作用,还能增加原始卵泡中胰岛素样生长因子(IGF)-I的表达。

4.4 生长因子

4.4.1 胰岛素样生长因子 在卵泡中,IGF主要是由颗粒细胞和卵泡细胞产生,分为IGF-I和IGF-II两种。IGF-I主要存在腔前卵泡和小囊状卵泡中,对卵泡的生长发育起重要作用^[24],能促进雌二醇的分泌,增加卵母细胞对FSH的敏感性,使LH受体含量增加,并协同LH合成孕酮,增强细胞的存活

率和卵子的成熟率,还能介导雄激素促进早期卵泡的生长发育;而IGF-II主要影响孕酮的产生^[25]。

4.4.2 表皮生长因子(EGF) EGF是由53个氨基酸组成的单链多肽,通过刺激不同阶段卵泡的卵母细胞生长和颗粒细胞增殖来促进卵泡的发育,且随着卵泡的发育表达增强,在排卵前达到高峰^[26]。EGF是一种卵母细胞成熟的诱导剂,能刺激颗粒细胞FSH受体的表达,同时能诱导孕酮的产生;也是一种强有力的细胞分裂促进因子,促进卵母细胞成熟。在体外培养中,EGF与促性腺激素可以相互影响来促进卵母细胞的发育^[27]。

4.4.3 转化生长因子(TGF) TGF有两种形式,即TGF- α 和TGF- β 。TGF- β 家族是一类具有较高同源性、富含半胱氨酸的糖蛋白,包括转化生长因子- β 、活化素(activin)A、抗苗勒氏管激素(AMH)、生长分化因子-9(GDF-9)、骨形成发生蛋白(BMP)等,这些因子对卵巢卵泡的生长发育均有作用,而TGF- α 的作用则相反。

(1) TGF- β 存在两种受体,即TGF- β -I和TGF- β -II,对卵泡主要是抑制增殖、促进分化作用,并能诱导卵泡的凋亡,但作用模式因种属、生理状态和体外培养条件不同而有所差异。

(2)活化素A是抑制素B亚单位的同质二聚体,是颗粒细胞的产物,可通过自分泌、旁分泌作用调节卵泡的生长。其受体存在于卵母细胞和颗粒细胞上,通过增加腔前卵泡颗粒细胞对胸腺嘧啶脱氧核苷酸的摄取,促进腔前卵泡的生长和腔的形成^[28]。

(3)AMH由睾丸未成熟的Sertoli细胞产生,是目前发现的惟一原始卵泡生长抑制因子,主要阻断原始卵泡生长的启动^[29],并且能够调节细胞的发育及分化。

(4)GDF-9可通过与丝氨酸-苏氨酸受体结合,促进颗粒细胞的增殖和分化、增加孕酮的产量,还能够促进卵母细胞的有丝分裂、维持卵泡超微结构的完整性^[30]。

(5)BMP有20个成员,其中BMP-2、3、4、6、7、15已被证实存在于哺乳动物卵巢中^[31]。其中BMP-4、BMP-7作用相似,均与腔前卵泡到有腔卵泡的转化过程有关;而BMP-6、BMP-15可促进颗粒细胞的增殖,并反向调节卵母细胞的生长。

4.5 维生素

在几十种维生素中,维生素C和维生素E对卵巢发育有重要作用。

4.5.1 维生素 C 又称抗坏血酸,是细胞外最重要的抗氧化剂之一。在卵巢组织中,维生素 C 主要聚集在颗粒细胞、卵泡膜细胞、黄体细胞和卵母细胞内,可以促进卵泡发育进程中胶原合成,维持卵泡基底膜的完整性^[32]。卵泡体外培养中添加维生素 C 可以降低卵泡细胞的凋亡,对抗自由基的破坏作用,加强 FSH 的作用,并且有利于颗粒细胞的体外生长^[33]。

4.5.2 维生素 E 自 1924 年被发现以来,已有大量实验表明维生素 E 与性功能有密切的关系^[34]。它通过垂体前叶分泌促性腺激素来增加卵巢的质量,促进卵泡的成熟,增大黄体,并抑制孕酮在体内的氧化,增强孕酮作用,从而提高动物的繁殖能力^[35]。

4.6 细胞因子

目前的研究发现细胞因子可多方面调节卵巢的功能。在正常的卵巢中可检测到肿瘤坏死因子、白介素-1 α 、-1 β 等多种细胞因子的表达^[36]。在卵泡发育的早期,卵巢分泌的肿瘤坏死因子能产生胰岛素抵抗作用,并通过凋亡途径显著抑制卵泡的发育、雌二醇的分泌及排卵率^[36];而白介素-1 α 、-1 β 可抑制 FSH 刺激颗粒细胞分化的功能^[37],并能调节甾体激素的分泌。

4.7 Kit 配体

Kit 配体也称为干细胞因子 (SCF),由颗粒细胞和卵母细胞产生,属于 II 型跨膜酪氨酸激酶受体,有两种膜结合形式,即 Kit 配体 1 和 Kit 配体 2,它们均可被降解为一种可溶性的 Kit 配体。Kit 配体主要参与原始卵泡生长的启动、卵泡膜细胞和卵泡腔的形成等^[38]。

4.8 碱性成纤维生长因子

碱性成纤维生长因子 (bFGF) 是一类直接促进原始卵泡募集的生长因子,主要存在于卵母细胞和颗粒细胞内,能促进原始卵泡的生长和向初级卵泡的转化^[39]。bFGF 是诱导原始卵泡发育的重要因子,能够调节颗粒细胞的有丝分裂、分化、凋亡及类固醇激素的合成。

5 结语

哺乳动物卵巢中有数量丰富的腔前卵泡,开发利用这一潜在的资源,对于提高遗传和经济价值哺乳动物的繁殖潜力、濒危物种的保存及女性不孕不育疾病的治疗具有十分重要的意义和广阔的发展前景。

目前,哺乳动物腔前卵泡体外培养在研究内容、手段和方法上已经取得了一些突破性进展,笔者团

队建立了大鼠腔前卵泡的体外培养方法^[40],但仍然有很多制约因素。为了充分利用腔前卵泡的资源、有效的研究各因素对卵泡生长发育的调控机制、阐明参与卵泡和卵母细胞生长过程及各细胞间信号传导的分子机制,需要进一步寻求高效、完善的腔前卵泡培养体系。腔前卵泡体外培养对生殖毒理学的研究,特别是在新药毒性作用机制评价上有良好的应用前景。相信经过不断改进、完善,腔前卵泡体外培养模型将成为研究生殖毒理学和新药评价的一种重要手段,但要完全实现这个目标依然任重道远。

参考文献

- [1] O'Brien M J, Pendola J K, Eppig J J. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence [J]. *Biol Reprod*, 2003, 68: 1682-1686.
- [2] Durlinger A L, Kramer P, Karels B, *et al.* Apoptotic and proliferative changes during induced atresia of pre-ovulatory follicles in the rat [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15: 2504-2511.
- [3] Lenie S, Cortvrindt R, Adriaenssens T, *et al.* A reproducible two step culture system for isolated primary mouse ovarian follicles as single functional units [J]. *Biol Reprod*, 2004, 71: 1730-1738.
- [4] 刘晓宁, 高 炬. 哺乳动物卵母细胞体外成熟的研究进展 [J]. 黑龙江动物繁殖, 2010, 18(6): 10-15.
- [5] 陈玉艳, 李 博. 哺乳动物腔前卵泡的分离 [J]. 吉林畜牧兽医, 007(3): 19-23.
- [6] Lenie S, Smits J. Functional AR signaling is evident in an *in vitro* mouse follicle culture bioassay that encompasses most stages of folliculogenesis [J]. *Biol Reprod*, 2009, 80: 685-695.
- [7] 靳双星, 李跃民, 张桂枝. 哺乳动物腔前卵泡分离和培养的研究进展 [J]. 草食家畜, 2004, (1): 19-23.
- [8] 刘爱敏, 章晓梅. 不同添加成分对卵巢组织体外成熟培养的影响 [J]. 明医学院学报, 2008, 29: 191-195.
- [9] 夏 仪. 大鼠腔前卵泡体外三维培养系统的建立及其在雌性生殖毒性研究中的应用 [D]. 上海: 第二军医大学, 2012.
- [10] Xu M, West E, Woodruff T K. Identification of a stage-specific permissive *in vitro* culture environment for follicle growth and oocyte development [J]. *Biol Reprod*, 2006, 75: 916-923.
- [11] Lee S, Cho M, Kim E, *et al.* se and/or haemoglobin added to a serum-free medium [J]. *J Vet Med Sci*, 2004; 66: 63-66.
- [12] Demeestere I, Delbaere A, Gervy C, *et al.* Effect of preantral follicle isolation technique on in-vitro follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(8): 2152-2159.

- [13] Wycherley G, Downey D, Kane M T, *et al.* A novel follicle culture system markedly increases follicle volume, cell number and oestradiol secretion [J]. *Reproduction*, 2004, 127(6): 669-77.
- [14] 彭 勇, 赖松家. 影响腔前卵泡体外发育的因素 [J]. 畜牧兽医师, 2005(5): 10-13.
- [15] 周 虚. 牛腔前卵泡在体外无血清培养中发育为有腔卵泡 [J]. 中国兽医学报, 2002, 22(5): 518-519.
- [16] Cecconi S. Growth and differentiation of small ovarian follicles in mammals: problems and future perspectives [J]. *J Reprod Dev*, 2002, 48: 431-445.
- [17] 李 娜, 朱 艳. 维系卵泡生长和功能的影响因素 [J]. 医学综述, 2008, 14(3): 382-384.
- [18] 梁 洋, 孙兴参, 胡小梅. FSH 对腔前卵泡生长发育的影响 [J]. 四川动物, 2007, 26(4): 782-785.
- [19] Adriaens I, Cortvrindt R, Smitz J. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence [J]. *Human Reproduction*, 2004, 19: 398-408.
- [20] 王海滨, 谢辉蓉, 夏国良. 哺乳动物卵泡早期发育调控的研究进展 [J]. 国外畜牧科技, 2002, 29(1): 37-43.
- [21] Murray A, Swales A K, Smith R W, *et al.* Follicular growth and oocyte competence *in vitro* cultured mouse follicle: effects of gonadotrophins and steroids [J]. *Sci Reprod Med*, 2008, 14(2): 75-83.
- [22] Nilsson E E, Skinner K M. Progesterone regulation of primordial follicle assembly in bovine fetal ovaries [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 313: 9-16.
- [23] Kezele P, Skinner M K. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(8): 3329-3337.
- [24] Thomas F H, Campbell B K, Telfer E E, *et al.* Effects of IGF-I bioavailability on bovine preantral follicular development *in vitro* [J]. *Reproduction*, 2007, 1(6): 1121-1128.
- [25] 马永臻, 柏建安. 卵泡生长发育的调节因素 [J]. 临沂医学专科学校学报, 2002, 24(2): 143-145.
- [26] Einspanier R, Schonfelder M, Muller K, *et al.* Expression of the vascular endothelial growth factor and its receptors and effects of VEGF during *in vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte (COC) [J]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 62(1): 29-36.
- [27] Kristina G, Tinrong W, Hyamalk R. Spatiotemporal expression of epidermal growth factor receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary [J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(11): 1593-1604.
- [28] Zhao J, Taverne M A, van der Weijden G C, *et al.* Effect of activin A on *in vitro* development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II [J]. *Biol Reprod*, 2001, 65(3): 967-977.
- [29] 宋文嘉, 夏 天, 赵丽颖. 卵巢储备力与卵巢局部调节因子 [J]. 广东医学, 2011, 32(9): 1197-1199.
- [30] Orisaka M, Jiang J Y, Orisaka S, *et al.* Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis [J]. *Endocrinology*, 2009, 150(6): 2740-2748.
- [31] Brankin V, Quinn R L, Webb R, *et al.* Evidence for a functional bone morphogenetic protein (BMP) system in the porcine ovary [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2005, 28(4): 367-79.
- [32] Rossetto I B, Lima V, Matos M H T, *et al.* Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2009, 37: 112-123.
- [33] Thomas F H, Leask R, Srsen V, *et al.* Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture [J]. *Reprod*, 2001, 122: 487-495.
- [34] Tao Y, Zhou B, Xia G, *et al.* Exposure to L-ascorbic acid or alpha-tocopherol facilitates the development of porcine denuded oocytes from metaphase I to metaphase II and prevents cumulus cells from fragmentation [J]. *Reprod Domest Anim*, 2004, 39(1): 52-57.
- [35] 李 娜, 朱 艳. 维系卵泡生长和功能的影响因素 [J]. 医学综述, 2008, 14(3): 382-384.
- [36] 张小雨. 卵泡发育与卵巢早衰研究进展. 中国保健营养 [J]. 2013, 4(下): 2188-2189.
- [37] Gonzalez F. Inflammation in polycystic ovary syndrome: underpinning of insulin resistance and ovarian dysfunction [J]. *Steroids*, 2012, 77: 300-305.
- [38] Thomas F H, Vanderhyden B C. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicle development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006, 4(1): 19.
- [39] 田允波, 曾书琴, 陈学进, 等. 哺乳动物原始卵泡生长启动的调控 [J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(4): 618-624.
- [40] 唐桂毅, 刘 妍, 杨佳梅, 等. 大鼠腔前卵泡体外培养方法的建立 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(6): 487-492.