

牛卵泡可卡因-苯丙胺调节 转录肽 (CART) 受体的筛选

Screening of Cocaine-and Amphetamine-Regulated Transcript
Peptide (CART) Receptor of Cattle Follicle

李鹏飞 著

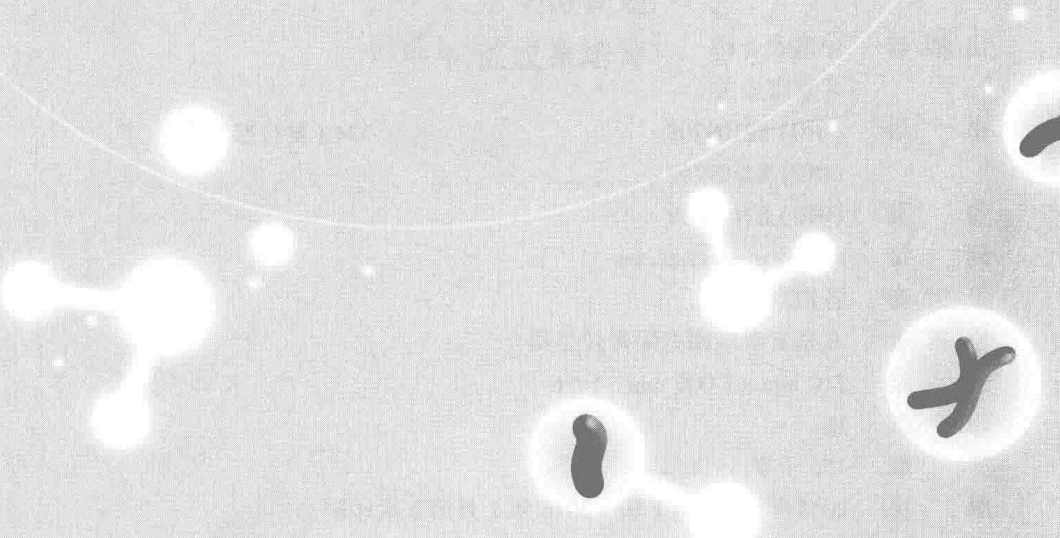
中国农业科学技术出版社

S852.1
46

牛卵泡可卡因-苯丙胺调节 转录肽 (CART) 受体的筛选

Screening of Cocaine-and Amphetamine-Regulated Transcript
Peptide (CART) Receptor of Cattle Follicle

李鹏飞 著



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

牛卵泡可卡因-苯丙胺调节转录肽 (CART) 受体的筛选 / 李鹏飞
著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2015. 10

ISBN 978-7-5116-2330-0

I. ①牛… II. ①李… III. ①牛-丘脑-肽-研究 IV. ①S852.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 252757 号

责任编辑 张孝安

责任校对 贾海霞

出版者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82109708 (编辑室) (010) 82106624 (发行部)

(010) 82109703 (读者服务部)

传 真 (010) 82106650

网 址 <http://www.castp.cn>

经 销 者 各地新华书店

印 刷 者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 710 mm × 1 000 mm 1/16

印 张 10

字 数 150 千字

版 次 2015 年 10 月第 1 版 2016 年 1 月第 2 次印刷

定 价 36.00 元

— 版权所有 · 翻印必究 —

国家自然科学基金项目 (No. 31172211); 农业部 “948” 项目 (No. 2010 - Z43); 国家自然科学基金项目 (No. 31402156); 山西省横向协作与委托项目 (2010HX54); 山西省回国留学人员科研资助项目 (2014 - 重点 5); 山西省科技攻关项目 (No. 20130311027 - 2); 山西省人事厅人才引进项目; 山西省青年基金 (No. 2014021028 - 2); 山西农业大学引进人才博士科研启动费 (2014ZZ04); 山西农业大学青年拔尖创新人才支持计划 (TYIT201403) 和科研管理费资助重大项目和标志性成果培育项目 (71060003) 部分研究成果。

内容简介

ABSTRACT

CART 是一种下丘脑分泌的神经肽，在动物体内具有广泛的生理作用，参与体内许多激素调控及疾病的病理过程。神经肽及其受体的研究已成为当今生理及神经科学研究中最活跃的领域之一。本书共 7 章。第一章和第二章为研究背景和意义，介绍牛卵泡发育过程和 CART 及其相互作用蛋白研究进展，并明确了研究内容、技术路线；其余章节为试验部分，通过牛卵泡转录组的高通量测序和 CART 相互作用蛋白研究，初步筛选 CART 候选受体；对 CART 及其候选受体的同源建模，ZDOCK 分子对接获得 4 个 CART 候选受体，并对 CART 及其候选受体进行荧光定量 PCR 验证。

本专著较为系统地介绍了作者多年来对 CART 的相关研究成果，思路新颖、资料丰富、内容连贯，反映了神经肽 CART 研究的新进展，可供畜牧兽医专业师生、医学院校师生及医学科研人员参考和查阅之用。

前言

PREFACE

探索和揭示神经肽的奥妙，是当代自然科学面临的重大挑战之一。自 20 世纪 60 年代后期神经肽概念的提出，在神经科学中导致了一场革命性的变化。进入 20 世纪 70 年代，由于成功地提纯和鉴定了某些神经肽，特别是相关实验技术如放射免疫测定技术的建立，使神经肽研究得以迅速发展。神经肽是神经元间重要的化学信使，它可发挥神经激素、递质和调质的作用；同时，神经肽在脑部和外部组织广泛分布，反映了神经肽生物学功能的多样性和复杂性，引起了各领域科研工作者的研究兴趣。

可卡因-苯丙胺调节转录肽 (CART) 是 20 世纪 80 年代发现的一种在动物体内广泛分布的下丘脑神经肽，参与人和动物多方面的生理功能：①调节动物食欲和进食量；②调节多种激素的释放；③参与疼痛感觉传导和疼痛反应产生；④在药物成瘾方面发挥作用。2004 年，首次在牛卵巢上发现 CART mRNA 表达，并证明 CART 对牛卵泡发育产生负调控作用。

《牛卵泡可卡因-苯丙胺调节转录肽 (CART) 受体的筛选》一书，在明确了 CART 与动物卵泡发育的关系及 CART 受体特征的基础上，对 CART 受体的筛选展开了研究，其中，也反映了本课题组 8 年多来从事神经肽 CART 研究工作的情况。本书共 7 章，具体内容如下。

第一章为牛卵泡发育及可卡因-苯丙胺调节转录肽研究进展，介绍牛卵泡发育过程和 CART 及其相互作用蛋白以及相关实验技术的研究进展；第二章为研究意义、内容和技术路线及创新点；第三章为牛卵泡转录组的高通量测序，通过结果初步筛选 CART 候选受体；第四章为 CART 相互作

用蛋白的研究,通过免疫共沉淀及质谱分析技术筛选 CART 候选受体;第五章为 CART 及其候选受体的同源建模,通过 SWISS - MODEL 和 MODELLER 同源建模技术获得 CART 及 38 个候选 G 蛋白偶联受体的分子坐标;第六章为 ZDOCK 分子对接,通过 CART 与候选受体的分子对接,筛选出 4 个 CART 候选受体;第七章为荧光定量 PCR 验证试验。本专著较为系统地介绍了作者多年来对 CART 的相关研究的进展与成果,思路新颖、资料丰富、内容连贯,反映了神经肽 CART 研究的新进展,可供畜牧兽医专业师生、医学院校师生及医学科研人员参考和查阅之用。

在本书编写过程中,得到中国农业科学技术出版社的大力支持;导师吕丽华教授审校了著作的全部内容;美国密歇根州立大学 Gerogre W Smith 教授和西弗吉尼亚大学姚舰波副教授、中国科学院电工研究所潘卫东教授、中国环境科学研究院关潇博士、山西农业大学动物科技学院刘文忠教授、河北农业大学动物科技学院张英杰教授、山东农业大学动物科技学院王建民教授、Oracle 公司软件工程师付晓峰老师在研究过程中给予了悉心的指导;课题组师弟师妹在资料收集、文稿打印等方面做了大量工作。在此,对关心、支持本书出版的同志表示衷心感谢。

由于作者学识水平所限,书中遗漏及错误之处在所难免,敬请广大同行和读者批评指正。

李鹏飞

2015 年 9 月

目 录

CONTENTS

第一章 牛卵泡发育及可卡因 - 苯丙胺调节转录肽研究进展	(1)
第一节 牛卵泡发育及其研究方法进展	(1)
第二节 CART 及其相互作用蛋白研究进展	(9)
第二章 研究意义、内容和技术路线	(22)
第一节 研究意义	(22)
第二节 研究内容	(23)
第三节 技术路线	(24)
第三章 牛卵巢卵泡高通量测序与 GO 分析	(26)
第一节 概述	(26)
第二节 材料与方法	(27)
第三节 结果与分析	(30)
第四节 讨论	(34)
小结	(35)
第四章 牛卵泡颗粒细胞 CART 蛋白质组学研究	(36)
第一节 牛卵泡颗粒细胞总蛋白的提取	(36)
第二节 免疫共沉淀及质谱分析 CART 相互作用蛋白	(39)
第三节 生物信息学分析	(48)
小结	(55)

第五章 G 蛋白偶联受体的筛选及同源建模	(57)
第一节 G 蛋白偶联受体的预测	(57)
第二节 CART 及 G 蛋白偶联受体的同源建模	(63)
小结	(78)
第六章 CART 与筛选蛋白的分子对接研究	(79)
小结	(91)
第七章 CART 及其候选受体基因在牛优势卵泡和从属卵泡 中的表达	(92)
第一节 牛发情周期第一卵泡波优势卵泡和从属卵泡的鉴定 ...	(92)
第二节 CART 及其候选受体在牛优势卵泡和从属卵泡的 表达量分析	(100)
小结	(108)
研究展望	(109)
附：本著作来源于以下已发表或待发表论文研究成果	(111)
参考文献	(115)



第一章

牛卵泡发育及可卡因 - 苯丙胺调节转录肽研究进展

第一节 牛卵泡发育及其研究方法进展

母畜出生前，卵巢上有许多原始卵泡，但只有少数卵泡能够发育成熟和排卵，绝大多数卵泡发生闭锁和退化。因此，卵泡的绝对数随着年龄的增长而减少。如初生母牛犊有 75 000 个卵泡，10 ~ 14 岁时 25 000 个，到 20 岁时只有 3 000 个。而且在一个发情周期内，单胎动物（牛、马或部分羊等）卵巢内一般情况下只有一个成熟卵泡释放卵子并受精，卵巢上大量参与发育的卵泡在其发生过程中闭锁而不能排卵。

牛发情周期内排卵卵泡的数量和质量与其繁殖性能直接相关。卵泡发育是一个连续而复杂的过程。按发育阶段不同，分为原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、三级卵泡和成熟卵泡。雌性哺乳动物卵母细胞生长的同时，周围的体细胞开始增生，逐渐由扁平状变为柱状，由单层变为复层，并分化成颗粒细胞和内膜细胞，这些体细胞的分化增生构成早期卵泡增大的主要原因。卵细胞本身在内分泌激素的调控下有序的生长、发育，相关基因在不同时空准确无误地表达。2007 年 George W Smith 课题组通过试验研究证实了可卡因 - 苯丙胺调节转录肽（Cocaine - and

amphetamine - regulated transcript peptide) 对牛卵泡发育有着显著的负调控作用, 能够引起牛卵泡闭锁, 因而是导致牛繁殖力下降的一个重要因素。本章就牛卵泡发育的研究概况及 CART 与卵泡发育关系的研究进展以及相关的实验技术进行综述。

1960 年, “双卵泡波” 提出, 此后, “优势” 卵泡概念、优势卵泡激素调控理论相继建立, 并随着放射免疫测定技术、超声波技术、体外细胞培养技术等的成熟和广泛应用, 已经明确在牛发情期内优势卵泡生长和闭锁过程通常经历 2 个或 3 个 “卵泡发育波”; 并发现在牛卵泡液中存在许多卵泡内生长因子, 通过体外实验研究表明这些生长因子可通过内分泌、自分泌和旁分泌作用, 修饰促性腺激素刺激卵泡生长和分化; 通过对颗粒细胞凋亡和体外实验研究发现, 颗粒细胞凋亡是引起卵泡闭锁的主要原因。然而, 卵泡生长和闭锁机理仍不明确。可以确定, 随着新技术、新方法的改进和应用, 对牛卵泡生长和闭锁机理的研究将会极大改善牛繁殖性能。

对牛排卵和卵泡发育相关的研究中, 人工调控发情周期的持续时间、排卵时间和排卵数量一直是研究热点。随着研究技术和手段的发展和应用, 卵巢有腔卵泡生长的特定模式相继建立。近年来, 许多研究人员致力于牛优势卵泡生长和闭锁规律研究, 尤其是促性腺激素与卵泡内生长因子相互作用结果、颗粒细胞凋亡与卵泡闭锁的关系。

一、牛发情周期内优势卵泡发育模式研究进展

(一) “双卵泡波” 和 “三卵泡波” 假设的提出

Rajakoski (1960) 报道: 在一个发情周期内, 直径 $\geq 5\text{mm}$ 的卵泡在生长过程中出现 2 个 “发育波”, 第一个发育波出现在发情周期第 3 ~ 4d, 第二个出现在发情周期第 12 ~ 14d, 二者导致排卵前卵泡形成; 第一个卵泡发育波中大卵泡从第 12d 到第 12 ~ 17d 逐渐衰退闭锁, 第二个发育波中大卵泡最后成熟、排卵。因此, Rajakoski 是第一个提出在

牛发情周期内卵泡生长和闭锁的“双波”概念。

Hodgen 等 (1977) 提出“优势”的概念解释了灵长类动物月经周期内, 当有排卵卵泡或黄体存在时卵泡生长衰退的原因。然而, 牛发情周期内“优势卵泡”的存在直到 1987 年才获得形态学、组织学、激素和生物化学研究的支持, 结果表明: 在发情周期的 3 个不同阶段, 雌激素活跃卵泡最终发育为最大卵泡; 根据这些研究结果, Ireland 和 Roche 得出结论: 在牛发情周期内, 优势卵泡出现 3 个阶段, 优势卵泡发育每个阶段都经历选择、优势、闭锁或排卵, 这与灵长类动物月经周期优势排卵卵泡的描述相同。

(二) 牛有腔卵泡分类方法的建立

Ireland 等通过对卵泡液中雌激素与孕酮或雄激素的比值首次对牛有腔卵泡 (直径 $\geq 6\text{mm}$) 进行分类, 分为雌激素活跃卵泡和雌激素不活跃卵泡。雌激素活跃卵泡 (雌激素浓度 $>$ 孕酮或雄激素浓度) 具有健康生长卵泡的生物学特性, 雌激素不活跃卵泡有闭锁卵泡或注定向闭锁卵泡发育的特性。

Ireland 等研究结果还表明: 在发情周期的卵泡期和黄体期, 雌激素活跃卵泡的生长与颗粒细胞 (CGs) 增殖、卵泡内雌激素浓度增加、CGs 和膜细胞 (TGs) 中促黄体素 (LH) 结合位点数量有关。相反, 雌激素不活跃卵泡 CGs 中促卵泡素 (FSH) 结合位点数量减少。在卵泡阶段, 排卵期前卵泡促性腺激素激增或黄体期 9 ~ 11d 的最大卵泡就是雌激素不活跃卵泡。与雌激素活跃卵泡相比, 雌激素不活跃卵泡其卵泡内雌激素浓度降低, CGs 和 TGs 中促性腺激素受体位点数量减少。总之, 雌激素活跃卵泡将 FSH 应答能力转向 LH 应答能力作为发育的基础, CGs 和 TGs 中促性腺激素受体数量减少与雌激素活跃卵泡产生雌激素能力丧失有关。

(三) 促性腺激素与卵泡发育的关系

Dobson (1977) 在牛排卵期前 3d 每隔 2h 通过 RIA 测定血清促性

腺激素浓度,发现在发情周期内牛血清 FSH 浓度有 2 个瞬时峰值,显著的 FSH 瞬时峰值与排卵期前 LH 峰值相伴随;在促性腺激素峰值出现 12~24h 后,当血清中 LH 浓度保持较低浓度或稳态时,另一个 FSH 波峰出现。Adams 等 (1992) 对显著的 FSH 波峰与卵泡波的关系加以阐述,在牛发情周期内有两个卵泡波,随着每个卵泡波出现,血清 FSH 浓度显著提高 50%~75%;通过对牛 FSH 浓度和卵泡波出现时间的研究,发现 FSH 波峰在排卵第 1d 和发情周期第 10d 出现;同时,还报道牛有 3 个卵泡波,在每个卵泡波前 1d 出现 FSH 波峰,即在发情周期第 1d、9d 和 15d。这些研究结果表明:在发情周期第一卵泡波和第二卵泡波之前,FSH 浓度存在显著的瞬时双倍增加,如图 1-1 所示。

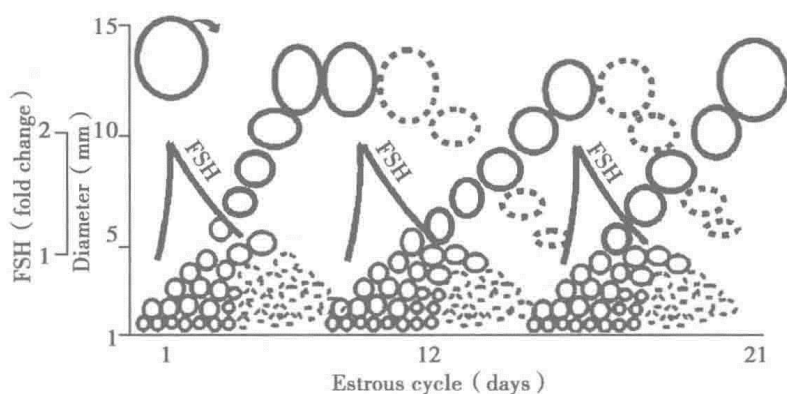


图 1-1 牛发情周期内每个卵泡波与 FSH 瞬时峰值关系的模型

(引自 James J Ireland et al., 2000)

Figure 1-1 A model depicting the relationship of transient peaks of FSH with each wave of follicular development during the estrous cycle of cattle

为了探究 FSH 在牛卵泡波形成中所起作用, Miller 等 (1979) 证明在牛卵泡期注射牛卵泡液,可延迟发情期到来。Good 等 (1995) 也证实牛卵泡液是一种来源丰富的抑制剂,对切除卵巢和未切除卵巢的牛,抑制 FSH 分泌而不改变 LH 分泌。总之以上研究结果充分证明在牛发情周期内 FSH 瞬时升高能刺激卵泡波内卵泡生长。

FSH 浓度瞬时升高引发卵泡波，同时很多研究也表明，在一个卵泡波内，FSH 浓度降低能够刺激优势卵泡发育以及选择优势卵泡。Adams 等（1993）证明在一个卵泡波内，当 FSH 浓度从波峰自然降低时，给牛注射 FSH 可延迟优势出现，后来得到 Mihm 等研究证实。这些研究结果表明：FSH 浓度从波峰下降过程中对选择过程终止和刺激优势出现起重要作用。

Rohe 等（1980）证明在牛发情期内 LH 脉冲分泌模式。牛颈静脉插管，在发情期第 3d、10d 或 11d、18d 或 19d，24h 内每隔 10min 采血，结果显示，在黄体期，LH 分泌模式由黄体期前期低振幅高频率脉冲改变为中期高振幅低频率；在发情期，LH 脉冲分泌模式转变为高频率（类似于黄体期前期）很高振幅的脉冲。Rohe 等的研究结果随后得到其他课题组研究证实。Cupp 等（1995）对这些研究内容加以充实：发情周期黄体期内，在孕酮浓度较高的不同时间 LH 分泌频率和振幅显著发生改变。然而，上述研究都没有对发情周期内优势卵泡生长和闭锁的动力学与 LH 脉冲分泌模式改变之间的关系进行研究。

Evans 等（1997）首次对牛发情周期内 LH 分泌脉冲动力学改变与卵泡波相互关系进行研究。他证明在第一个卵泡波优势卵泡生长期间，LH 分泌频率降低但振幅增加；与此相反，在第一个卵泡波优势卵泡丧失优势、第二个卵泡波生长卵泡出现后，LH 分泌频率保持不变，但振幅降低至发情周期第 3~4d 的水平。尽管 Cupp 等在研究过程中没有证明 LH 分泌频率和振幅的改变与卵泡波之间的关系，但研究结果与 Evans 等的结论相似，即发情周期卵泡波中 LH 脉冲分泌模式是不同的。

发情周期内 LH 脉冲分泌模式的改变调节优势卵泡生长和闭锁仍有待于研究。然而，可以肯定的是 LH 脉冲分泌模式的改变对优势卵泡生长和闭锁的调节有重要作用。优势卵泡的发育依赖于 FSH 和 LH 浓度的转变。因此，LH 脉冲分泌频率的降低，在发情周期一个卵泡波的后期，

不仅与每一个卵泡波内优势卵泡优势的丧失有关,而且可能是引起优势丧失的原因。

(四) 卵泡内因子与颗粒细胞凋亡对卵泡发育的影响

卵泡内因子尤其是生长因子如:抑制素、激活素、胰岛素样生长因子 I 和 II (IGF - I, IGF - II) 及其结合蛋白,对卵泡生长分化和功能调节有重要作用。除内分泌功能外,抑制素、激活素、IGF、卵泡抑素及 IGF 结合蛋白自分泌和旁分泌活性具有刺激或抑制颗粒细胞和膜细胞的功能。此外,各因子间在功能上存在颉颃作用,如抑制素与激活素、激活素与卵泡抑素、IGF 与 IGF 结合蛋白。由于这些因子及结合蛋白存在于牛卵泡液,各生长因子及其结合蛋白在卵泡内含量比例可能会发生变化,进而影响卵泡生长、分化及功能,但体外试验验证较为困难。因此,准确解释促性腺激素与卵泡内生长因子相互作用调节卵泡波内优势卵泡生长和闭锁的机制仍需进一步研究。

颗粒细胞的增殖分泌功能以及与内分泌激素相互影响,对维持卵泡正常生长、发育和成熟起着非常重要的作用。Pederson 等 (2003) 研究发现,闭锁卵泡总伴随着细胞严重凋亡,随着卵泡中颗粒细胞逐渐发生凋亡,卵泡随之发生闭锁。Bilodeau 等 (2002) 也证实严重闭锁卵泡中卵母细胞发育能力很低。Wongsrikeao 等 (2005) 认为颗粒细胞的包裹对卵母细胞生发泡破裂 (GVBD) 有关键作用,与颗粒细胞共培养有助于卵母细胞完全成熟,并有助于防止卵母细胞 DNA 片断化。目前对卵泡液中游离颗粒细胞研究较少,对颗粒细胞密度与卵泡闭锁及卵母细胞发育能力之间的关系尚无报道。Yang 和 Rajamahendran (2000) 研究发现,牛卵泡液中游离颗粒细胞凋亡比膜细胞更严重,Zeuner 等 (2003) 的试验也观察到类似的结果。Luciano 等 (2000) 认为,颗粒细胞凋亡后细胞连接遭到破坏,凋亡细胞进入卵泡液中,从而使卵泡液中凋亡的颗粒细胞密度增加。因此,卵泡液中游离颗粒细胞的密度有可能反映了卵泡闭锁程度及卵母细胞的发育能力,从而更加简便、快捷地挑选出高

质量卵母细胞。

Yao 等 (2004) 首次在牛卵巢上发现 CART mRNA 表达, 主要在卵泡颗粒细胞表达。Yasuhiro 等 (2004) 证明 CART 在牛卵泡颗粒细胞上有表达, Sen 等 (2007) 和吕丽华等 (2009) 通过研究进一步证明 CART 在一定 FSH 浓度下, 对颗粒细胞雌激素的分泌有抑制作用, 并对卵泡发育有着显著的负调控作用, 能够引起牛卵泡闭锁, 是导致牛繁殖力下降的一个重要因素。总之, 这些研究表明, 颗粒细胞凋亡或受到抑制, 最终会导致卵泡闭锁。

(五) 利用牛发情周期黄体的特征识别卵泡波

McNutt (1924) 和 Hammond (1927) 报道在牛发情周期内黄体的形态上有明显的变化, 尽管黄体的外观通常用来判断发情周期的阶段, 尤其是牛, 但在很多物种上判断的准确性仍未报道。Ireland 等 (1980) 通过对黄体表面总的变化特征的研究, 提出了准确判断母牛发情阶段的方法。

在 Ireland 等的研究中, 选择未知年龄海福特小母牛 180 头判断发情周期的阶段, 并将这些特征分成 4 个阶段, 描述见表 1-1 所示。通过与已知的发情周期天数对比, 确定了准确判断发情周期 4 个阶段的方法。

表 1-1 牛黄体发育的形态学特征

Table 1-1 Morphological features of bovine corpus luteum development

分类	发情周期阶段 (d)			
	I (1~4)	II (5~10)	III (11~17)	IV (18~20)
黄体的外观 (外部)	红, 近日排卵; 裂点未被上皮细胞覆盖	裂点被上皮细胞覆盖, 黄体顶点呈红或褐色	黄褐色或橙色	亮蓝色→白色
内部	红色, 偶尔充满血液, 细胞松弛, 有规则	仅顶点呈红或褐色, 其余黄体呈橙色	橙色	橙色→黄色
直径	0.5~1.5 cm	1.6~2 cm	1.6~2 cm	< 1 cm

(续表)

分类	发情周期阶段 (d)			
	I (1~4)	II (5~10)	III (11~17)	IV (18~20)
黄体表面脉管系统	不可见	通常外围固有	与阶段 II 相同, 但在后期黄体的顶点将被覆盖	不可见
卵泡直径 >10mm	不可见	出现	可能出现或不出现	出现

(引自 James J Ireland et al. , 1980)

第 I 至第 IV 阶段的时间长短相对于发情周期是未知的。因此, 评价这 4 个阶段相对于发情周期的时间长短, 母牛在每一阶段总数的百分数是随母牛发情周期的平均长度 (20d) 增加的。优势的非排卵卵泡存在的持续时间是从优势卵泡出现至消失的间隔时间, 对第一、第二卵泡波优势卵泡的持续时间是 7.4 ~ 13.1d、11.4 ~ 17d。每个卵泡波中直径 $\geq 5\text{mm}$ 的非优势卵泡的平均数量是 5.3 个、3.9 个和 4.7 个, 持续时间大约 6d, 最大直径通常 $\leq 8\text{mm}$ 。对于只有两个卵泡波的牛, 第一和第二卵泡波出现于发情周期的第 2 ~ 4d 和第 10 ~ 11d, 在第 6d 和第 19d 分别达最大直径约 13mm。排卵卵泡在排卵前 10d 左右能被检测到。

因此, 通过对牛发情周期内黄体外观形态变化, 推测出该黄体所处发情周期天数, 结合不同卵泡波所处的发情周期天数, 可以推测出卵泡波所处阶段。

二、卵泡发育研究方法的研究进展

Dufour 等 (1972) 和 Matton 等 (1981) 根据牛卵巢表面有腔卵泡大小不同提出的试验方案是选择多组处于发情周期不同天数的牛, 通过外科手术, 在每对卵巢最大卵泡或每个卵巢上两个最大卵泡的外周间质组织中注入墨汁点, 标记 3 ~ 5d 后, 通过卵巢切除术检查卵泡大小和发育情况。

以往研究牛发情周期内卵泡生长和闭锁的动力学主要通过屠宰牛或