

ICR 小鼠卵母细胞通过旁分泌机制促进排卵关键过程

杨光平,张心悦,时兰英,苏友强*

(南京医科大学生殖医学国家重点实验室,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:利用国内医学研究常用 ICR 品系小鼠,在构建用于研究卵母细胞-卵丘细胞交互作用培养模型的基础上,研究卵母细胞及其产生的旁分泌因子生长分化因子 9(GDF9)和骨形态发生蛋白 15(BMP15)对排卵过程中的关键事件——卵丘扩展的调控作用。方法:通过显微手术制备摘除卵母细胞后的卵丘细胞复合体(OOX),并通过与卵母细胞共培养或 GDF9 和 BMP15 处理研究卵母细胞及其特异释放的旁分泌因子对表皮生长因子(EGF)诱导卵丘扩展过程的调控。结果:成功构建了 ICR 小鼠 OOX 培养模型,发现卵母细胞及其释放的旁分泌因子 GDF9 和 BMP15 为 EGF 诱导卵丘扩展所必需。结论:ICR 小鼠卵母细胞通过旁分泌机制促进排卵关键过程。

[关键词] 卵丘细胞复合体;卵母细胞;排卵;ICR 小鼠;女性生殖

[中图分类号] R321.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)08-1055-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150802

Oocytes control of key ovulatory processes in ICR mice

Yang Guangping, Zhang Xinyue, Shi Lanying, Su Youqiang*

(State Key Laboratory of Reproductive Medicine, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a culture model for studying the interaction between oocytes and cumulus cells in the strain of ICR mice that are frequently used in biomedical research in China, and using this model to study the effect of oocytes and oocyte-derived paracrine factors growth differentiation factor 9(GDF9) and bone morphogenetic protein 15(BMP15) on cumulus expansion, which is one of the key ovulatory processes. **Methods:** Oocyte-tomized cumulus complexes(OOX) were constructed by microsurgical removal of the oocyte from the cumulus-oocyte complexes, and the effect of oocyte and paracrine factors on EGF-induced cumulus expansion was studied by co-culturing the OOX with oocytes and treating the OOX with recombinant GDF9 and BMP15. **Results:** The model of OOX culture was successfully established using ICR mice, and the oocyte and its paracrine factor GDF9 and BMP15 were found to be essential for EGF to induce cumulus expansion. **Conclusion:** Oocytes promote key ovulatory processes in ICR mice.

[Key words] oocyte-tomized cumulus complexes; oocytes; ovulation; ICR mice; female reproduction

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(08): 1055-1059]

女性生殖的最关键环节是产生一枚正常的成熟卵母细胞,因此女性是否正常排卵以及排出的卵母细胞的优劣就成为制约其妊娠成功的重要因素。众多研究表明,卵母细胞质量低下是导致女性不孕不育和新生儿出生缺陷的主要原因之一^[1-2];而排卵障碍或异常与女性不孕不育以及内分泌紊乱和代谢异常密切相关^[3]。因此研究决定卵母细胞质量的分子机制,揭示排卵过程的调控机制一直是生殖医学和

生殖生物学的研究热点。

卵母细胞质量受卵泡发育过程中多种复杂因素的影响,而卵母细胞与包裹在其周围的颗粒细胞之间的物质与信号的双向交流是影响卵母细胞质量的关键。研究表明,卵母细胞与颗粒细胞之间存在着一种基于“卵母细胞通过调控其周围颗粒细胞的发育和功能(如增殖和分化以及各种代谢活动等)来控制自身的发育和成熟”的调控环路。这种“卵母细胞-颗粒细胞调控环路”在卵泡发育的各个阶段都发挥着重要功能,尤其是在月经周期中期的促排卵激素(luteinizing hormone, LH)峰出现之后与排卵过程密切相关的关键阶段^[4-5]。深入研究卵母细胞-颗粒细

[基金项目] 国家重大科学研究计划项目(2014CB943200, 2013CB945500)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: youqiang.su@njmu.edu.cn

胞之间的交互作用,特别是卵母细胞所产生的旁分泌因子对卵母细胞周围颗粒细胞的调控作用,对于揭示影响卵母细胞质量的关键外源性因素以及探寻颗粒细胞内能够间接反映卵母细胞质量的客观分子靶标具有重要指导价值。

本实验以国内生物医学研究常用的 ICR 品系小鼠为模型,构建了一种可用于研究卵母细胞与其周围所包裹的颗粒细胞(卵丘细胞)之间交互作用的卵丘细胞复合体(oocytectomized cumulus complex, OOX)体外培养模型,并利用该模型,初步探讨了卵母细胞及其所产生的旁分泌因子生长分化因子9(growth differentiation factor 9, GDF9)和骨形态发生蛋白15(bone morphogenetic protein 15, BMP15)对排卵过程的关键事件——卵丘扩展的调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料

20~22日龄的雌性健康 ICR 小鼠由南京医科大学实验动物中心提供,动物使用经南京医科大学伦理委员会同意。颗粒细胞及卵细胞培养用 MEM α 液以及胎牛血清(FBS, Gibco 公司, 美国);青霉素、链霉素、无水碳酸氢钠以及覆盖培养液滴用矿物油(Sigma 公司, 美国);35 mm 培养皿(Corning 公司, 美国);米利农(Milrinone, Calbiochem 公司, 美国)。重组生长因子 GDF9、BMP15(美国贝勒医学院 Martin MM 实验室提供),表皮生长因子(EGF, BD 公司, 美国)。其他试剂为国产分析纯。显微注射用毛细玻璃管(北京正天易科贸公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complex, COC)的获取

取 20~22 日龄的雌性 ICR 初情前期小鼠,经腹腔注射孕马血清促性腺激素(PMSG, 宁波第二激素

厂)5 U/只,促进大的有腔卵泡发育。于 PMSG 注射 46~48 h 后经颈椎脱臼法处死小鼠,剖开腹腔取出卵巢并将其置于盛有 37℃ 培养液的培养皿中,再在体视显微镜下用注射器针头刺破大的有腔卵泡,待 COC 自然流出后,再用毛细捡卵管将 COC 收集到干净的培养皿(含有 MEM α +3 mg/mL BSA +5 μ mol/mL 米利农)中备用。

1.2.2 显微注射针的制备

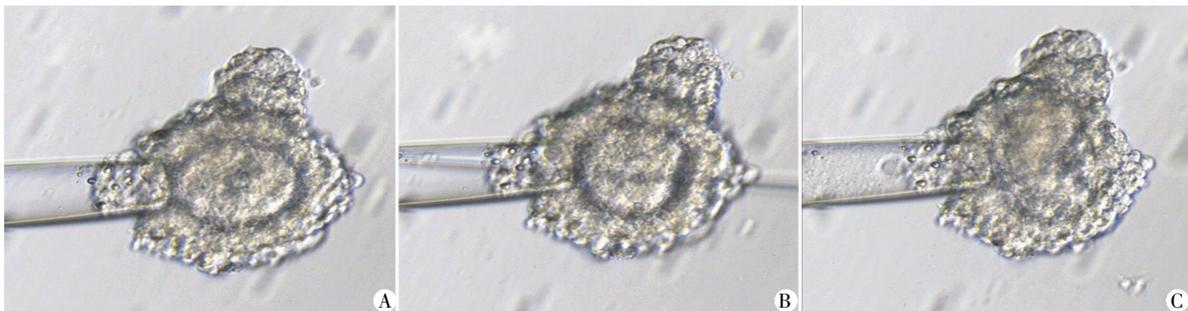
所有的显微操作注射针和吸持针均利用 P97 拉针仪控制以及 MF-900 煅针仪制作。注射针拉制程序设置为:热度值(H):570;拉力(P):80;速率(V):25;时间(T):50。吸持针拉制程序为:热度值(H):585;拉力(P):110;速率(V):25;时间(T):50。针拉制完后,再将注射针在煅针仪上烧 30° 弯曲;将吸持针在外径 40~50 μ m 处烧断,然后将断口烧圆润,使内径大约在 25 μ m 左右,最后将其同样烧至 30° 弯曲。

1.2.3 OOX 的制备

在显微操作平皿内制作一个体积为 10 μ L 的长条形培养液液滴,并用经培养液平衡过的胚胎培养用矿物油将其覆盖。挑选一定数量的完整 COC 放入操作滴中,将显微注射仪器调整好后,在倒置显微镜下用吸持针在合适的负压引力下将一个 COC 固定住,然后用注射针穿透 COC 并使注射针尖恰好穿入吸持针的腔内,最后,在将注射针轻轻从 COC 中拔出的同时,稍稍增大吸持针的负压牵引力,进而将卵母细胞胞质完全吸离 COC,制备完整的 OOX(图 1)。

1.2.4 OOX 模型的培养

在观察卵丘扩展实验中,无论是对照 COC 还是 OOX 模型,都在 MEM α + 5 μ mol/L Milrinone + 3 mg/mL BSA 培养液中培养 14 h,其中药物处理浓度为 EGF 10 ng/mL、重组生长因子 GDF9、BMP15 工作浓度为 60 ng/mL;而单纯观察模型建立则培养 20 h。



A:吸持针固定 COC;B:注射针刺穿 COC 并深入到吸持针内腔;C:注射针拔出后,在负压作用下 COC 中的卵细胞胞质被吸入吸持针内而被清除。

图 1 倒置显微镜下显微手术法摘除 COC 中的卵母细胞($\times 20$)

Figure 1 Microsurgical removal of oocyte from COC under inverted microscope($\times 20$)

2 结果

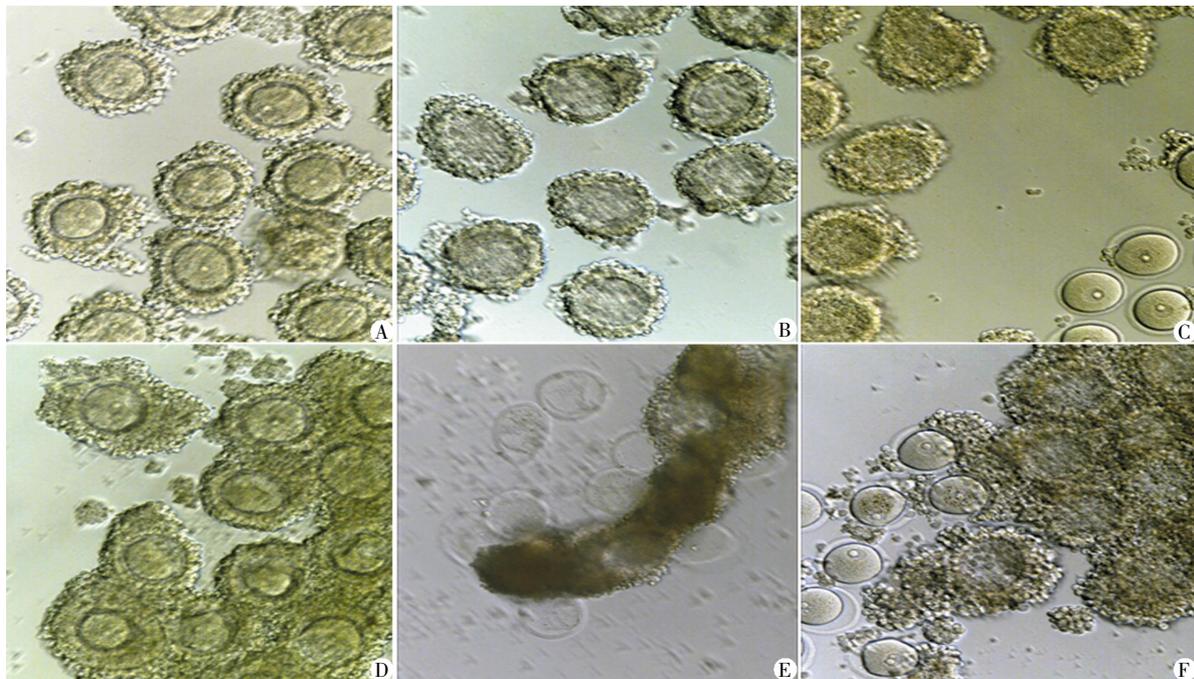
2.1 培养模型的建立

COC 在经显微手术法摘除卵母细胞后,其卵丘细胞仍然紧密连在透明带上并保持完整的三维结构(图 2B),与 COC 相比(图 2A)只是缺少了卵母细胞内的成分,因而是研究卵母细胞对卵丘颗粒细胞作用的完美模型;而 OOX 与生长发育完全的卵母细胞(fully-grown oocytes, FGO)共培养(OOX+FGO)则可以用来研究卵母细胞产生的旁分泌因子对卵丘细胞的调控作用(图 2C)。卵母细胞对卵丘细胞的作用在上述 3 种培养条件下培养 20 h 后就明显显示出来:与 COC(图 2D)组相比,OOX 组(图 2E)的卵丘细胞层三维结构塌陷并皱缩,并且透明带脱出;而 OOX

与 FGO 共培养,该现象却没有发生(图 2F),充分说明卵母细胞为维持其周围卵丘细胞的正常发育和功能所必需。

2.2 ICR 小鼠卵母细胞对卵丘扩展的促进作用

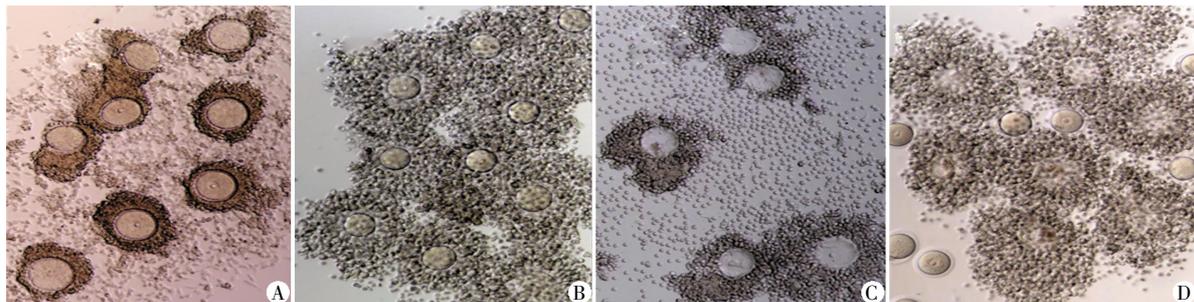
在没有 EGF 处理时,对照组中的 COC 不能发生卵丘扩展,卵丘层排列致密,最外层细胞贴壁(图 3A);而当 COC 接受 10 ng/mL EGF 处理 14 h 后,卵丘细胞发生完全扩展(图 3B)。然而在同样的 EGF 处理条件下,OOX 组却不能发生卵丘扩展,卵丘层仍然排列致密(图 3C),这充分说明卵母细胞为 EGF 诱导卵丘扩展所必需。而当 OOX 与 FGO 共培养时,卵丘细胞却能够发生完全扩展(图 3D),这说明卵母细胞对卵丘扩展的促进作用是通过其所释放的旁分泌因子而实现的。



A~C:培养前的 COC、OOX 和 OOX+FGO;D~F: 培养后的 COC、OOX 和 OOX+FGO。

图 2 COC、OOX 和 OOX+FGO 在培养 20 h 前后的形态变化(×20)

Figure 2 Morphological changes of COC, OOX and OOX+FGO before and after 20 h culture(×20)



A:未经 EGF 处理的 COC; B:经 EGF 处理的 COC;C:经 EGF 处理的 OOX;D:经 EGF 处理的 OOX+FGO。

图 3 卵母细胞对 EGF 诱导卵丘扩展的促进作用(×20)

Figure 3 Oocytes promote EGF-induced cumulus expansion(×20)

2.3 重组生长因子 GDF9 和 BMP15 对 ICR 小鼠卵丘扩展的作用

GDF9 和 BMP15 是卵母细胞特异释放的生长因子并在介导卵母细胞对颗粒细胞的调控作用中扮演重要角色。本实验研究了重组生长因子 GDF9 和 BMP15 对 ICR 小鼠卵丘扩展的作用。与前面实验结果相一致：没有 EGF 处理的对照组中的 COC 不能发生卵丘扩展(图 4A);而经 10 ng/mL EGF 处理 14 h 后,COC 卵丘细胞发生完全扩展(图 4B);EGF 处理下的 OOX 组不能发生卵丘扩展(图 4C),而当 OOX 与 FGO 共培养(图 4D)或接受 60 ng/mL 的 GDF9 处理时(图 4E),卵丘细胞却能够发生完全扩展;但是 60 ng/mL 的 BMP15 不能有效地促进 EGF 诱导的 OOX 的卵丘扩展(图 4F)。这些结果说明 GDF9 而非 BMP15 介导了 ICR 小鼠卵母细胞对卵丘扩展的促进作用。

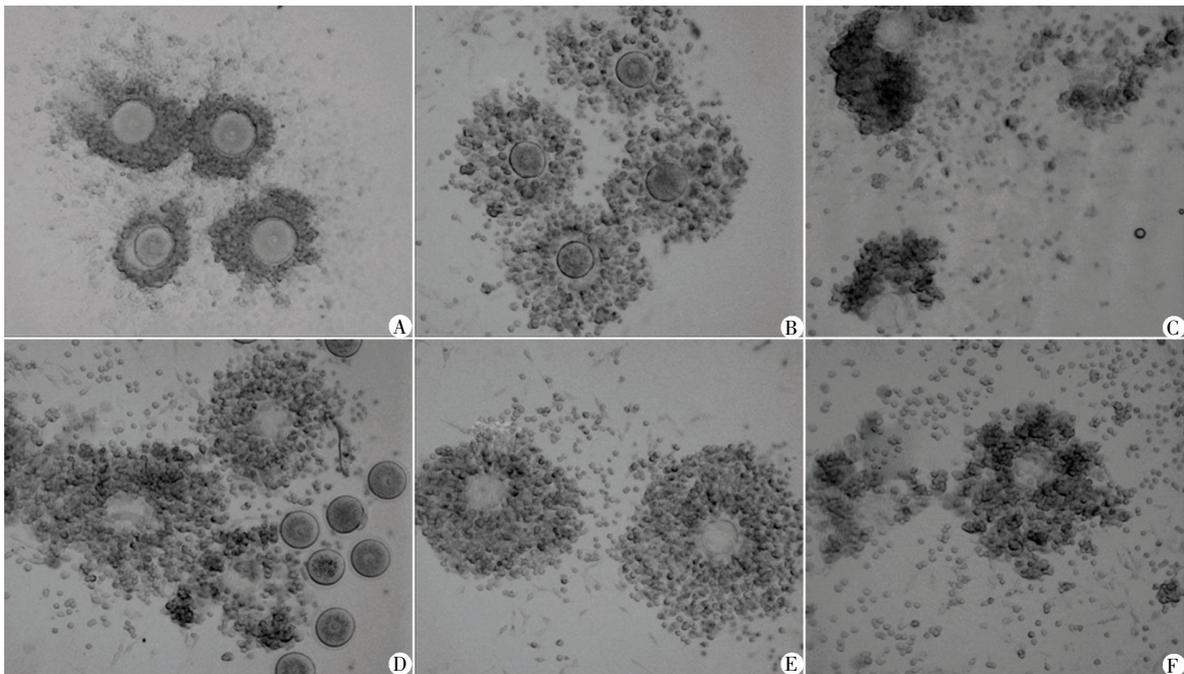
3 讨论

卵母细胞质量低下与女性不孕不育和新生儿出生缺陷密切相关。然而目前临床上尚缺乏一套客观有效的评估卵母细胞质量的标准;还局限在主要从卵母细胞外观形态入手进行主观性评估,因而还欠精确^[6]。而近期的“卵母细胞-颗粒细胞调控环路”学说的提出,从分析卵丘细胞发育和功能变化入手,探

寻一种无创、客观评估卵母细胞质量的新途径提供了崭新的思路^[7-9]。因此,深入研究卵母细胞-颗粒细胞之间的交互作用,揭示能够反映卵母细胞质量的颗粒细胞标志物就成为建立新型卵母细胞评估标准的关键。本文 OOX 模型的建立,为深入研究卵母细胞-颗粒细胞之间的交互作用,特别是卵母细胞对颗粒细胞的调控作用提供了一个理想的培养体系。这为后续结合临床样品,以小鼠 OOX 卵丘细胞作为一个标准的生物“效应器”来筛选反映人卵母细胞质量的客观分子靶标奠定了基础。值得一提的是,本文中的模型借鉴于国外已有方法^[4],但是本研究首次利用 ICR 品系小鼠建立 OOX 培养模型。优点在于该品系小鼠在国内供货渠道广且价格便宜,并且广泛应用于各种生物医学研究中。这就使该 OOX 培养模型的推广使用成为可能。

卵母细胞促进颗粒细胞的增殖和分化^[10-11],脱离卵母细胞后,体外培养颗粒细胞明显出现不健康状态。本实验中,对比拥有卵母细胞的 COC 以及与 FGO 共培养的 OOX,经显微手术摘除卵母细胞的 OOX 在培养 20 h 后,其完整的三维结构不再保持,出现塌陷和皱缩,并且同时有透明带脱出的现象。这说明该 OOX 模型能够完美地展现卵母细胞对颗粒细胞的影响。

在月经周期中期的 LH 作用之下,排卵卵泡内



A: 未经 EGF 处理的 COC; B: 经 EGF 处理的 COC; C: 经 EGF 处理的 OOX; D: 经 EGF 处理的 OOX+FGO; E: 经 EGF 和 GDF9 处理的 OOX; F: 经 EGF 和 BMP15 处理的 OOX。

图 4 卵母细胞及重组 GDF9 和 BMP15 对 EGF 诱导卵丘扩展的作用(×20)

Figure 4 Effect of oocytes and recombinant GDF9 and BMP15 on EGF-induced cumulus expansion(×20)

发生一系列排卵所必需的关键事件。其中,壁层颗粒细胞释放的 EGF 样生长因子 AREG、EREG 和 BTC 作用于卵丘细胞上的 EGF 受体,促使卵丘细胞释放透明质酸并形成黏稠的细胞外基质,进而将卵丘细胞交联在一起并将卵母细胞包裹在该基质内^[12-14]。卵丘细胞的这种变化被称为卵丘扩展,为排卵和卵子受精所必需^[15-17]。体外,EGF 也能够诱导完整的 COC 发生卵丘扩展^[18]。本实验同样通过加入外源性 EGF,对已建立的 ICR 小鼠 OOX 培养模型中的卵丘扩展现象进行了观察,发现卵母细胞的存在与否决定着 EGF 能否诱导卵丘细胞正常扩展,进一步证明该实验模型能够反映卵母细胞对颗粒细胞的调控作用。由于排卵障碍或异常与女性不孕不育以及内分泌紊乱和代谢异常密切相关,该 ICR 小鼠 OOX 培养模型的建立,为进一步深入研究排卵机制,揭示女性排卵障碍或异常的发病机制奠定了基础。

此外,在该培养体系中,外源性给予卵母细胞特异性生长因子 GDF9 而非 BMP15 能够有效地促进 EGF 诱导的 OOX 卵丘扩展,说明该 ICR 小鼠 OOX 培养模型也能够很好地用于研究卵源性重组生长因子对颗粒细胞的调控作用和机制,对进一步优化卵母细胞体外发育和成熟体系具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Keefe D, Kumar M, Kalmbach K. Oocyte competency is the key to embryo potential [J]. *Fertil Steril*, 2015, 103 (2): 317-322
- [2] Su YQ, Sugiura K, Sun F, et al. MARF1 regulates essential oogenic processes in mice [J]. *Science*, 2012, 335(6075): 1496-1499
- [3] Jayasena CN, Franks S. The management of patients with polycystic ovary syndrome [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(10): 624-636
- [4] Su YQ, Sugiura K, Eppig JJ. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism [J]. *Semin Reprod Med*, 2009, 27(1): 32-42
- [5] Wigglesworth K, Lee K, O'Brien M, et al. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(39): E3723-E3729
- [6] Wang Q, Sun QY. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2007, 19(1): 1-12
- [7] Li Q, McKenzie LJ, Matzuk MM, et al. Revisiting oocyte-somatic cell interactions: In search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence [J]. *Mol Hum Reprod*, 2008, 14(12): 673-678
- [8] Assou S, Haouzi D, de Vos J, et al. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes [J]. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16(8): 531-538
- [9] Fragouli E, Lalioti MD, Wells D, et al. The transcriptome of follicular cells: Biological insights and clinical implications for the treatment of infertility [J]. *Hum Reprod Update*, 2014, 20(1): 1-11
- [10] Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals [J]. *Reproduction*, 2001, 122 (6): 829-838
- [11] Emori C, Sugiura K. Role of oocyte-derived paracrine factors in follicular development [J]. *Anim Sci J*, 2014, 85 (6): 627-633
- [12] Park JY, Su YQ, Ariga M, et al. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle [J]. *Science*, 2004, 303(5658): 682-684
- [13] Zamah AM, Hsieh M, Chen J, et al. Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin [J]. *Hum Reprod*, 2010, 25 (10): 2569-2578
- [14] Conti M, Hsieh M, Zamah AM, et al. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 356(1-2): 65-73
- [15] Richards JS. Genetics of ovulation [J]. *Semin Reprod Med*, 2007, 25(4): 235-242
- [16] Russell DL, Salustri A. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex [J]. *Semin Reprod Med*, 2006, 24 (4): 217-227
- [17] Nagyova E. Regulation of cumulus expansion and hyaluronan synthesis in porcine oocyte-cumulus complexes during *in vitro* maturation [J]. *Endocr Regul*, 2012, 46 (4): 225-235
- [18] Wang Y, Liang N, Yao GD, et al. Knockdown of TrkA in cumulus oocyte complexes (COCs) inhibits EGF-induced cumulus expansion by down-regulation of IL-6 [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 382(2): 804-813

[收稿日期] 2015-01-27