

LH/EGF 诱导 ICR 小鼠窦状卵泡卵母细胞体外成熟与排卵的研究

尹耀学, 苏友强*

(南京医科大学生殖医学国家重点实验室, 江苏 南京 211166)

[摘要] 目的: 利用医学研究常用 ICR 品系小鼠, 在建立窦状卵泡体外培养体系的基础上, 研究黄体生成素(luteinizing hormone, LH)与表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)诱导卵母细胞体外成熟及排卵的作用。方法: 体外剥离得到大的窦状卵泡用于培养并建立适宜于研究诱导卵母细胞成熟及排卵的窦状卵泡体外培养模型, 通过向培养液中添加 LH 和 EGF 诱导卵母细胞体外成熟与排卵。结果: 成功构建了 ICR 小鼠窦状卵泡体外培养模型, 发现 LH 或 EGF 单独处理均可诱导卵泡卵母细胞成熟和卵丘扩展, 而两者共同作用才能够诱导卵泡体外排卵。结论: LH/EGF 促进 ICR 小鼠窦状卵泡卵母细胞体外成熟与排卵。

[关键词] 窦状卵泡; 卵母细胞体外成熟; 排卵; ICR 小鼠; 女性生殖

[中图分类号] R329.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)09-1163-05

doi:10.7655/NYDXBNS20170918

LH/EGF induction of oocyte maturation and ovulation in cultured antral follicles of ICR mice

Yin Yaoxue, Su Youqiang*

(State Key Laboratory of Reproductive Medicine, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] Objective: To establish an antral follicle culture system suitable for investigating oocyte maturation and ovulation in ICR mice, a strain of mice that are frequently used in biomedical research in China, and to study the effect of luteinizing hormone(LH) and epidermal growth factor(EGF) on induction of oocyte maturation and ovulation in this follicle culture system. **Methods:** Large antral follicles were dissected and cultured *in vitro*, oocyte maturation and ovulation in these cultured follicles were then induced by supplementation of LH and EGF to the culture medium. **Results:** The antral follicle culture system suitable for investigating oocyte maturation and ovulation in ICR mice was successfully established. In this culture system, treatment with LH or EGF alone was able to induce oocyte maturation and cumulus expansion in follicle-enclosed cumulus-oocyte complexes, whereas supplementation with both LH and EGF was necessary for induction of ovulation. **Conclusion:** LH/EGF induces oocyte maturation and ovulation in cultured large antral follicles of ICR mice.

[Key words] antral follicle; oocyte maturation *in vitro*; ovulation; ICR mice; female reproduction

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(09):1163-1167]

女性生殖过程是一个漫长而复杂的过程, 它受到许多内外因素的影响。一些疾病如多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)和药物治疗导致女性生殖系统受损^[1]或者生殖过程被迫中断, 进而不能产生一枚质量合格的卵子。临床上, 对这些患者通常采用体外受精或生育力保存等辅助生殖措施来满足其生育需求。辅助生殖技术需要成熟的优质卵母细胞, 一般通过常用的超数促排卵途径获

得。然而目前通用的促排卵方案对机体具有过度刺激作用^[2], 特别是对有 PCOS 等疾病的敏感人群容易导致卵巢过度刺激综合征, 因此临床亟待寻找更为温和和优化的获取成熟卵母细胞的途径。卵母细胞体外成熟技术即为近几年新兴的获取成熟卵母细胞的方法, 但该技术还仅局限在使用卵丘卵母细胞复合体(cumulus oocytes complexes, COCs)进行体外成熟^[3-9]。目前, 如何通过患者窦状卵泡解决不孕和保存生育力正成为生殖医学研究的热点。卵泡体外培养作为新兴技术吸引了生殖医学界科学家和临床医师的广泛关注。

卵泡是女性生殖的最基本单位, 主要由阻滞在

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)

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

第 1 次减数前期的卵母细胞及其周围颗粒细胞组成。随着卵泡腔的出现,颗粒细胞分化为两种不同的细胞,即包绕着卵母细胞的卵丘细胞和沿卵泡壁排列的壁层颗粒细胞。在卵子发生过程中,颗粒细胞与卵母细胞间的信号交流对卵母细胞质量尤为关键^[10]。研究表明,颗粒细胞与卵母细胞之间存在调控环路——来自颗粒细胞的营养物质和信号分子调控卵母细胞功能和发育,而卵母细胞则通过分泌卵源性旁分泌因子调控这些营养物质和信号分子的产生。卵泡发育的每个阶段都需要该调控环路的参与,尤其是在黄体生成素(luteinizing hormone, LH)峰后至排卵的窦状卵泡阶段更为关键^[11]。

本研究首次将国内生物医学研究常用 ICR 品系小鼠作为模型,构建可用于研究窦状卵泡卵母细胞体外成熟与排卵的培养体系,并利用该模型初步探讨了 LH/表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)诱导卵泡卵母细胞体外成熟与排卵作用,以期为进一步深入研究卵母细胞成熟与排卵机制,优化成熟卵母细胞获得方案奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

21~23 日龄的 ICR 雌性小鼠(南京医科大学实验动物中心),所有批次使用动物均已通过南京医科大学动物伦理委员会一致同意。孕马血清促性腺激素(eCG,宁波第二激素厂);COCs 的 MEM 培养液与胎牛血清(FBS, Gibco 公司,美国);NaHCO₃、青霉素、链霉素、矿物油(Sigma 公司,美国);35 mm 培养皿(Corning 公司,美国);Milrinone (Calbiochem 公司,美国),EGF(BD 公司,美国);注射用高纯度尿促性素(宁波第二激素厂);其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 小鼠卵巢获取

购买 21~23 日龄 ICR 雌性初情前期小鼠,外观发育良好,生命体征正常,腹腔注射孕马血清促性腺激素(eCG,宁波第二激素厂)5 U/mL,促进卵泡发育。注射 eCG 约 46~48 h 后,采用脱颈椎方法处死小鼠,喷洒 75%酒精消毒腹部被毛,剖开腹腔,依解剖位置找到卵巢所在位置,使用尖头镊轻轻撕开卵巢被膜将卵巢取出,放入已准备好的装有培养液的培养皿中(MEM α +3 g/L BSA+5 mmol/L Milrinone+10% FBS)中备用。

1.2.2 大窦状卵泡的剥离

在卵泡中选择含大窦状卵泡较多的卵巢。使用 1 mL 注射器针头(直径为 0.45 mm)进行分离。选中目标窦状卵泡,一支注射器针头固定卵泡,使用另一支注射器针头针锋斜面将该卵泡周围组织切除干净。将分离得到的干净窦状卵泡暂存到培养皿相对干净角落备用,以此类推,继续剥离窦状卵泡以达到所需数目。待剥离完成,将所有窦状卵泡转移至干净培养液中备用培养。

1.2.3 培养液的配制

①培养液 MEM 分装 50 mL/瓶,在此基础上加入 BSA(3 g/L)、5 mmol/L Milrinone 和 10% FBS 制成卵泡体外培养基础工作液;②在基础培养液中加入 LH 5 U/mL;③在基础培养液中加入 EGF 50 ng/mL。

1.2.4 培养装置准备

①取液体闪烁杯(经灭菌烘干),注明处理水平(Ctrl、LH、EGF、LH 联合 EGF),配置好培养液(1 mL)后分别加入对应的液体闪烁杯中,置于 CO₂ 培养箱平衡 30 min;②等分所有窦状卵泡,使用 1 mL 移液枪将窦状卵泡分别转移至对应液体闪烁杯中,转移过程中使用尽量少的液体,以免带入的液体稀释药物浓度;③在液体闪烁杯盖子涂抹医用凡士林以隔绝杯中气体交换,同时,向杯中充入高浓度氧气(95% O₂、5% CO₂),迅速旋紧盖子,放入 37 °C 恒温培养箱中培养。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件对各数据进行分析处理,数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养模型的建立

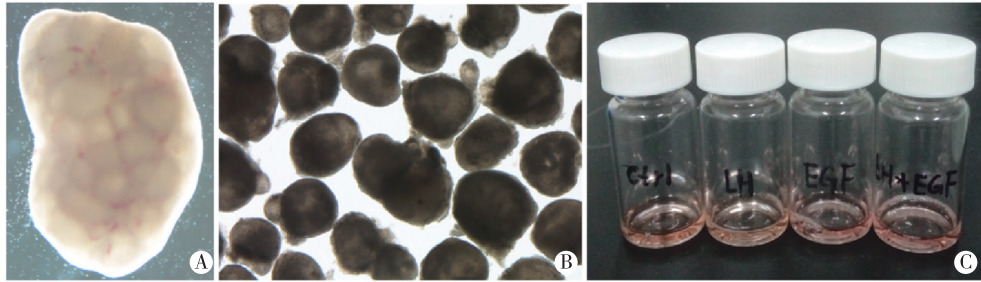
经过 eCG 处理后的小鼠卵巢在体视镜下可见卵巢发育良好,体积较大(图 1A);卵泡密集,卵泡壁薄并向卵巢表面隆起,卵泡腔大而透亮,折光性强(图 1B);液体闪烁杯内加入 1 mL 含不同处理水平培养液培养 8 h 或 12 h 之后,培养瓶内液体呈现粉红色,卵泡游离在培养液中,外观形态良好(图 1C)。初步说明该培养体系适合卵泡体外存活。

2.2 颗粒细胞维持卵母细胞减数分裂抑制

在基础培养液(MEM+BSA+Milrinone+10%FBS)中培养的卵泡仍然保持原有的外观形态,待戳开卵泡之后,COCs 形态疏松表现为不完整,卵丘细胞层数减少,并没有出现卵丘扩展现象(图 2A);卵母细胞

仍阻滞在 GV 期,将卵泡作为基本单位置于基础培养液中培养,卵母细胞维持在减数分裂抑制状态

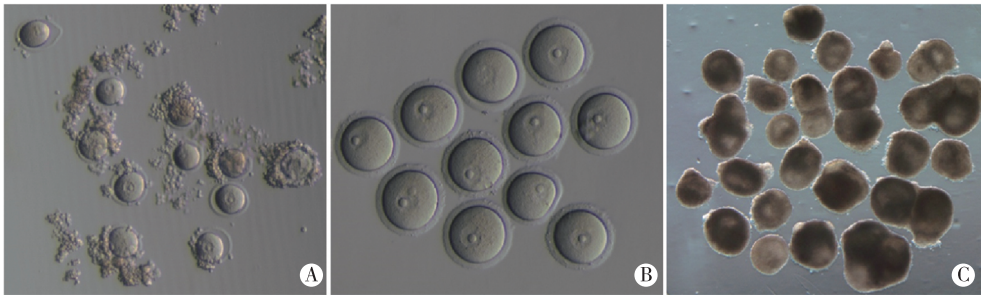
(图 2B),培养后的卵泡并没有出现排卵现象(图 2C)。由此可见,该卵泡体外培养系统可模拟体内状态。



A:体外剥离得到的卵巢(x10);B:体视镜下剥离得到的窦状卵泡(x40);C:卵泡体外培养系统。每个处理组观察 25 个卵泡(n=25)。

图 1 ICR 小鼠卵巢及卵泡的获得和体外培养系统

Figure 1 The culture system *in vitro*, acquirement of ovaries and follicles from ICR mice



A:未发生卵丘扩展的 COCs(x40);B:阻滞在 GV 期的卵母细胞(x100);C:未排卵的卵泡(x40)。每个处理组观察 25 个卵泡(n=25)。

图 2 体外卵泡培养的卵丘扩展、GVBD 及排卵情况

Figure 2 The cumulus expansion,germinal vesicle breakdown and ovulation in culture

2.3 LH 促进卵丘扩展和生发泡破裂 (germinal vesicle breakdown, GVBD)

在小鼠体内,LH 峰之后卵泡内发生一系列变化,比如卵丘扩展和卵母细胞恢复减数分裂以及排卵。使用含 5 U/mL 的 LH 培养卵泡,发现 12 h 后卵泡外观依然光滑透亮,COCs 出现卵丘扩展现象(图 3A),发生 GVBD(图 3B)。还探究了在不同时间 LH 对外体培养的卵泡内卵母细胞 GVBD 的促进作用,发现在体外 LH 作用 1 h 可以出现 GVBD 现象,4 h 大约将近半数卵母细胞发生 GVBD,8 h 时几乎 90% 卵母细胞发生 GVBD,而对对照组并没有随时间变化而变化(图 3D)。此外,在该体系中并没有出现体外排卵现象(图 3C)。

2.4 EGF 促进卵丘扩展和 GVBD

EGF 作为 TGF β 超家族成员,在小鼠体内是由颗粒细胞接受 LH 信号之后分泌,并作用于卵丘细胞表面受体,促进 COCs 的卵丘扩展和 GVBD,并参与排卵过程^[12-13]。在此实验中,直接使用含 50 ng/mL 的 EGF 培养液体外培养卵泡,使 EGF 直接作用到卵丘细胞表面受体。发现 COCs 发生卵丘扩展(图 4A)和 GVBD(图 4B),8 h 卵母细胞 GVBD 率高达

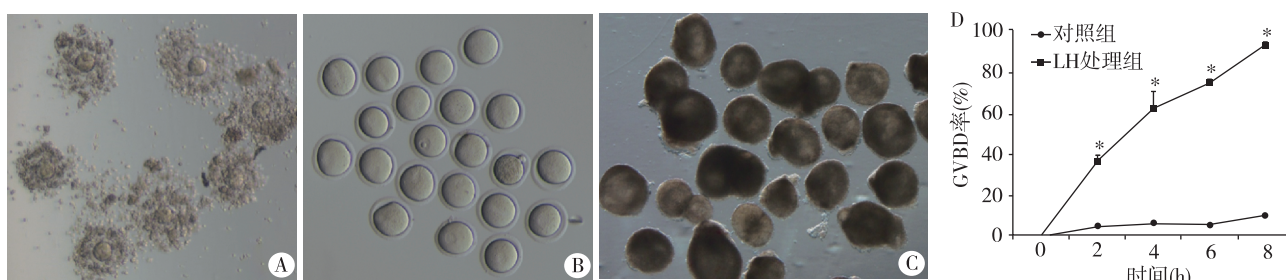
85%(图 4D),但仍然没有发现体外排卵现象(图 4C)。

2.5 LH 协同 EGF 共同促进体外卵丘扩展和卵母细胞 GVBD 并诱导排卵

基于 LH 和 EGF 单独作用都未能发生体外诱导排卵,本实验使用含有 5 U/mL LH 和 50 ng/mL EGF 培养液培养卵泡后,发现 COCs 发生卵丘扩展(图 5A)、卵母细胞发生 GVBD(图 5B),且其中 2 个卵泡发生体外排卵现象(图 5C)。该结果说明:LH 协同 EGF 共同作用不仅可以促进排卵前所必须的卵丘扩展和卵母细胞恢复减数分裂,还能促进体外排卵。

3 讨论

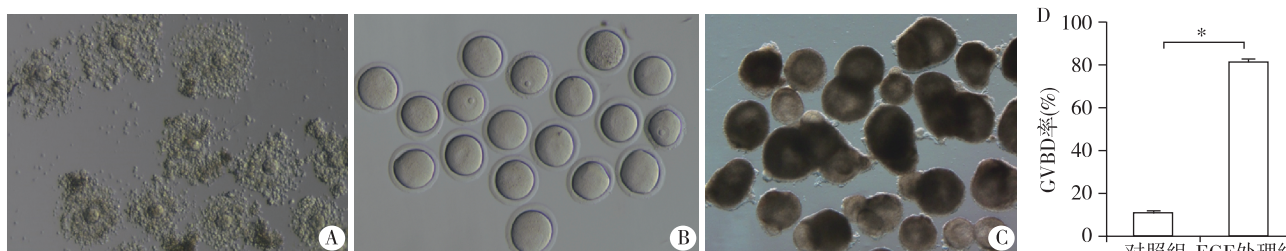
卵母细胞体外成熟技术是临床辅助生殖常用方法之一,该方法成功与否与患者妊娠结局密切相关。然而,目前临床常用的方法是 COCs 的体外培养系统。该方法是通过超声引导经阴道后穹窿穿刺取得 COCs 进而体外培养成熟。这人为的改变卵母细胞赖以生存的基本环境——卵泡微环境,因为直至排卵前,颗粒细胞-卵母细胞的调控环路都在调控卵泡微环境,进而影响卵母细胞发育潜能。针对系统存在不足,直接将卵泡作为基本单位进行体外培



A:发生卵丘扩展的 COCs($\times 40$);B:发生 GVBD 的卵母细胞($\times 100$);C:未排卵的卵泡($\times 40$);D:空白对照与 LH 处理组 GVBD 时间曲线,两组比较,* $P < 0.05$ 。每个处理组观察 25 个卵泡($n = 25$)。

图 3 LH 单独作用促进卵丘扩展、GVBD,但不能促进体外排卵

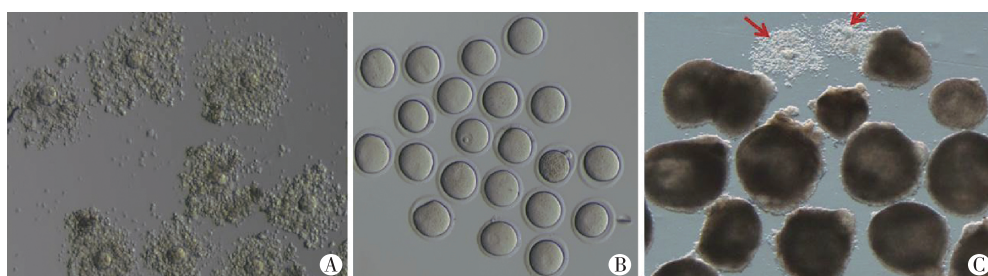
Figure 3 LH promotes cumulus expansion, gerimanl vesicle breakdown, but fails to promote ovulation



A:发生卵丘扩展的 COCs($\times 40$);B:发生 GVBD 的卵母细胞($\times 100$);C:未排卵的卵泡($\times 40$);D:空白对照与 EGF 处理组 8h GVBD 率,两组比较,* $P < 0.05$ 。每个处理组观察 25 个卵泡($n = 25$)。

图 4 EGF 单独作用促进卵丘扩展、GVBD,但不能促进体外排卵

Figure 4 EGF promotes cumulus expansion, gerimanl vesicle breakdown, but fails to promote ovulation



A:发生卵丘扩展的 COCs($\times 40$);B:发生 GVBD 的卵母细胞($\times 100$);C:红色箭头标示体外排卵的卵泡及排出的 COCs($\times 40$)。每个处理组观察 25 个卵泡($n = 25$)。

图 5 LH 协同 EGF 共同促进卵丘扩展、GVBD,并成功诱导体外排卵

Figure 5 LH and EGF promote cumulus expansion, gerimanl vesicle breakdown and ovulation

养至自发排卵,这样可以更高效地模拟卵母细胞体内发育正常成熟及排卵,改善原有系统在培养过程中可能对卵母细胞产生的不利影响。本研究建立的卵泡培养系统为深入研究卵母细胞体外成熟和排卵提供了良好模型,特别是 LH/EGF 促进卵丘扩展、卵母细胞 GVBD 以及诱导排卵。本研究借鉴国外类似方法^[14-15],但首次使用国内常用 ICR 品系雌性小鼠大的窦状卵泡建立培养模型,目的为研究排卵前 LH 后这一阶段的关键事件。其优点主要是取材容易且成本较低。

该培养系统提供的卵泡微环境维持卵母细胞减数分裂抑制,体现颗粒细胞-卵母细胞调控环路对卵丘卵母细胞发育潜能的影响。Zhang^[16-17]等在

2010 年发现颗粒细胞分泌的 C 型钠钛 NPPC 及其卵丘细胞上的受体 NPR2 参与维持卵母细胞减数分裂抑制,即:生长在卵泡内的卵母细胞维持减数分裂抑制。因此,卵泡成为研究 LH/EGF 促进卵丘扩展、卵母细胞 GVBD 和诱导体外排卵的最佳模型。

在正常人体内,月经周期中期的 LH 刺激引发一系列排卵相关事件:卵丘扩展、卵母细胞 GVBD 与排卵。LH 作用到壁层颗粒细胞 LH 受体,一方面,壁层颗粒细胞释放 EGF 样生长因子,作用到卵丘细胞使得后者释放透明质酸等细胞外基质,而后相互交联变得黏稠化,将卵丘细胞包裹,COCs 呈辐射状^[18-20],卵丘扩展为排卵和受精所必需。另一方面,颗粒细胞接受 LH 刺激后,减少释放 NPPC,通过 NPR2 作

用, 最终影响卵母细胞内 cAMP 导致卵母细胞恢复减数分裂而表现为 GVBD^[16-17]。本研究通过已经建立的 ICR 小鼠卵泡培养系统模型展开实验, 同时加入 LH 和 EGF, 两者协同作用实现卵丘扩展、卵母细胞 GVBD, 且成功诱导体外排卵。说明该模型能够模拟体内 LH 刺激引发的一系列排卵相关事件的发生。部分患者临床卵母细胞体外成熟失败的原因可能是缺少颗粒细胞-卵丘细胞调控环路的作用, 针对这种情况, 该模型利用窦状卵泡来作为基本单位进行培养, 能够最大程度模拟体内环境, 对解决该临床问题具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Schmidt KT, Rosendahl M, Ernst E, et al. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in 12 women with chemotherapy-induced premature ovarian failure: the Danish experience[J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(2):695-701
- [2] Dong G, Guo Y. Long-term effects of repeated superovulation on ovarian structure and function in rhesus monkeys[J]. *Fertil Steril*, 2014, 102(5):1452-1457
- [3] Newton H, Picton H, Gosden RG. *In vitro* growth of oocyte-granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue[J]. *J Reprod Fertil*, 1999, 115(1):141-150
- [4] Newton H, Illingworth P. *In-vitro* growth of murine pre-antral follicles after isolation from cryopreserved ovarian tissue[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(3):423-429
- [5] Xu M, Banc A, Woodruff TK, et al. Secondary follicle growth and oocyte maturation by culture in alginate hydrogel following cryopreservation of the ovary or individual follicles[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 103(2):378-386
- [6] Castro SV, de Carvalho AA, da Silva CM, et al. Freezing solution containing dimethylsulfoxide and fetal calf serum maintains survival and ultrastructure of goat preantral follicles after cryopreservation and *in vitro* culture of ovarian tissue[J]. *Cell Tissue Res*, 2011, 346(2):283-92
- [7] Dorphin B, Prades-Borio M, Anastacio A, et al. Secretion profiles from *in vitro* cultured follicles, isolated from fresh prepubertal and adult mouse ovaries or frozen-thawed prepubertal mouse ovaries[J]. *Zygote*, 2011, 11(1):1-12
- [8] Ting AY, Yeoman RR, Lawson MS, et al. *In vitro* development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification[J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(9):2461-2472
- [9] Smitz J, Dolmans MM, Donnez J, et al. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, *in vitro* follicle development and transplantation: implications for fertility preservation[J]. *Hum Reprod Update*, 2010, 16(4):395-414
- [10] 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
- [11] Wigglesworth K, Lee K, O'Brien M, et al. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells required for meiotic arrest of mammalian oocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(39):E3723-E3729
- [12] Yamashita Y, Shimada M. The release of EGF domain from EGF-like factors by a specific cleavage enzyme activates the EGFR-MAPK3/1 pathway in both granulosa cells and cumulus cells during the ovulation process[J]. *J Reprod Dev*, 2012, 58(5):510-514
- [13] 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
- [14] Skory RM, Xu Y, Shea LD, et al. Engineering the ovarian cycle using *in vitro* follicle culture[J]. *Hum Reprod*, 2015, 30(6):1386-1395
- [15] Xiao S, Zhang JY, Romero MM. *In vitro* follicle growth support human oocyte meiotic maturation[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:17323
- [16] Zhang M, Su YQ. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes *in vitro* [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(11):4377-4385
- [17] Zhang M, Su YQ, Sugiura K, et al. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes[J]. *Science*, 2010, 330(6002):366-369
- [18] Richards JS. Genetics of ovulation[J]. *Semin Reprod Med*, 2007, 25(4):235-242
- [19] Russell DL, Salustri A. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex[J]. *Semin Reprod Med*, 2006, 24(4):217-227
- [20] 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

[收稿日期] 2017-01-13