文章编号:1000-5404(2007)22-2179-03

论著

表皮生长因子促进小鼠未成熟卵母细胞体外成熟的实验研究

王炼炼,丘 彦,幸贵邦 (重庆医科大学附属第一医院辅助生殖中心,重庆 400016)

提 要:目的 了解表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)对小鼠未成熟卵母细胞体外成熟、受精及胚胎发育的影响。**方法** 将生殖泡(germinal vesicle,GV)期卵母细胞分别在EGF浓度为0(对照)、0.5、1、2.5、5、10 ng/ml的培养液中进行体外培养,观察生殖泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)和第一极体(the first polar body,PB1)排出的情况。将达到MⅡ期的卵母细胞进行体外受精,观察原核和胚胎发育情况。**结果** EGF浓度为1、2.5、5、10 ng/ml组GVBD发生率高于对照组;EGF浓度2.5、5、10 ng/ml组PB1排出率高于对照组,其中EGF浓度5 ng/ml组的GVBD、PB1发生率最高($P<0.01$)。卵母细胞在1、2.5、5、10 ng/ml EGF培养浓度下的退化率低于对照组($P<0.05$,$P<0.01$)。卵母细胞的体外受精率、2-细胞和4-细胞胚胎的发生率在EGF浓度为5 ng/ml时明显高于对照组($P<0.01$)。**结论** EGF可促进GV期卵母细胞的成熟,对其受精能力和胚胎发展也有促进作用,也可能有抑制卵母细胞凋亡的作用,而EGF以上作用与剂量有关。

关键词: 表皮生长因子;卵母细胞;体外成熟
中图法分类号: R-33;R321.1;R329.2 **文献标识码:** A

Epidermal growth factor improves *in vitro* maturation of immature mouse oocytes

WANG Lian-lian, QIU Yan, XING Gui-bang (Center of Assisted Reproduction, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the significance of EGF in the *in vitro* maturation, fertilization, and pre-implantation development of the immature oocytes. **Methods** The immature oocytes were isolated from the ovaries of the rats. The germinal vesicle (GV) oocytes were cultured in the EGF solutions at concentrations of 0(control), 0.5, 1, 2.5, 5 and 10 ng/ml Ham's F10 culture media. The status of germinal vesicle breakdown(GVBD) and the extrusion of the first polar body (PB1) were observed. The achieved MⅡ oocytes were then inseminated *in vitro*; and the pronuclei (PN) and the pre-implantaon development were observed. The grade Ⅰ-Ⅱ4-cell embryos were selected and implanted into the fallopian tube of the rats with the 1 day pseudogestation. Follow-up observations were made till the delivery. **Results** After GV oocytes were treated with EGF solutions at concentration of 1, 2.5, 5 and 10 ng/ml for 12, 16, 20, and 24 h, the GVBD in the GV cumulus-oocyte complexs(COC) have better outcomes than that of the control group($P<0.05$, $P<0.01$). For 20, 24, and 36 h in the 2.5, 5 and 10 ng/ml EGF groups, the elimination ratio of PB1 was higher than that of the control group($P<0.05$, $P<0.01$), particularly in the 5 ng/ml EGF ($P<0.01$). The degenerating rates of the COC group cultured in the 1, 2.5, 5 and 10 ng/ml EGF were lower than that of the control group($P<0.05$, $P<0.01$). The fertilization rates of the oocytes and the incidence rate of 2-cells and 4-cells in the 5 ng/ml EGF were higher than those of the control group ($P<0.01$). **Conclusion** EGF promotes not only the maturation of COC in the GV phase, but also the fertilization and pre-implantation development in a dose-dependent fashion. enhancing effect of EGF was closely related to the dosage of EGF.

Key words: epidermal growth factor; oocyte; *in vitro* maturation

未成熟卵母细胞体外成熟(*in vitro* maturation, IVM)指获取未成熟卵母细胞进行体外培养,将培养成熟后的卵母细胞进行体外受精和胚胎移植,最终获得妊娠。此项技术为不孕患者提供了一条新的治疗途径,临床应用前景十分广阔。虽然IVM技术在不断的研究发展,胚胎植入后的妊娠率也有所改善,但未成熟卵母细胞IVM后的成熟率、体外受精率和胚胎移植后的妊娠率仍不乐观。培养条件直接影响甚至调节卵母细胞的减数分裂,因而选择合理的适合未成熟卵母细胞成熟所必需的体外培养条件在IVM技术中至关重

作者简介:王炼炼(1976-),女,重庆市人,硕士,医师,主要从事妇科内分泌、辅助生殖技术方面的研究。电话:(023)89012397
通讯作者:丘 彦,电话:(023)89012397
收稿日期:2006-12-15;修回日期:2007-02-11

要。表皮生长因子(epidermal grouth factor, EGF)是一种相对分子质量为 6×10^3 的多肽,是各种哺乳类动物细胞体外发育的有丝分裂原。有学者在实验中观察到EGF可增加体外培养的卵丘-卵母细胞复合物(cumulus-oocyte complexs, COC)减数分裂的进程率,增加第一极体的形成率,明显促进颗粒细胞的扩展,加速胚泡的形成以及分裂球的裂变[1]。本研究以小鼠生殖泡(germinal vesicle,GV)期未成熟卵母细胞为研究对象,将COC在不同浓度EGF的培养系统中进行体外培养,观察未成熟卵母细胞减数分裂的恢复、核成熟、受精率,以及胚胎的质量,探索窦卵泡体外培养最佳的EGF浓度。

1 材料与方法

1.1 研究对象

清洁级NIH种雌性小鼠25只,8~15周龄,体质量25~30 g,用于获取未成熟卵母细胞;清洁级NIH雄性种鼠10只,14~18周龄,体质量35~40 g,用于获取精子。清洁级NIH小鼠均来源于重庆医科大学实验动物中心。

1.2 研究方法

1.2.1 未成熟卵母细胞的收集、培养、体外受精 脱颈处死25只雌性小鼠,摘取卵巢,用配制好的Ham's F10培养液(美国HyClone公司,原装,批号:APC20858)洗涤卵巢3次,在解剖显微镜下刺破半透明的卵泡以获得COC。

用配制好的Ham's F10培养液洗涤3次后,将COC移至已预平衡6~8 h的培养液中(以Ham's F10培养液为基础培养液,加入10% BSA,0.5 U/ml FSH以及EGF(1 μg干粉,美国Pepro Tech公司产品),每滴放入3~5枚COC,置于37 ℃,在5% CO_2,95%空气和相对饱和湿度的培养箱中培养。脱颈处死NIH雄性种鼠后,分离两侧附睾周围组织,剪下附睾尾,在解剖显微镜下(×20)将其剪成0.5~1 mm长的小段,洗涤3次后放入预平衡后的Ham's F10培养液中将精液挤出。置于37 ℃,5% CO_2,95%空气和相对饱和湿度的培养箱中培养40 min。取出后将初步孵育的、分散好的精子悬浮液吸出约20 μl,调整精子密度为(5~10)×10^5/ml。在培养箱中与第2次减数分裂中期(metaphase Ⅱ,MⅡ)的卵母细胞进行受精。

1.2.2 分组 对照组:不加EGF的Ham's F10培养液;实验组:分别加入含0.5、1、2.5、5、10 ng/ml EGF的Ham's F10培养液。

1.2.3 观察指标 采用德国Zeiss Axiovert 200显微镜进行观察。分别在培养后的12、16、20、24 h在倒置显微镜下观察未成熟卵母细胞体外培养过程中生殖泡破裂(germinal vesicle breakdown,GVBD)的情况;分别在培养后的20、24、36 h观察第一极体(the first polar body,PB1)的排出;分别在培养后36 h观察卵母细胞的退化情况;体外受精后6~10 h观察原核的形成;体外受精后16~26 h,在倒置显微镜下(×200)观察胚胎透明带是否完整,卵裂球轮廓是否清晰,大小是否均匀,有无变性,以此对胚胎状况和质量作出判断和评估[2],以选择各期胚胎,并计数。

1.3 统计学处理

采用SPSS 11.0统计软件进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 EGF对GVBD发生的影响

体外培养12、16、20 h和24 h,EGF浓度为1、2.5、5、10 ng/ml组GVBD发生率均高于对照组($P<0.05$, $P<0.01$);5 ng/ml组在体外培养的12 h和24 h观察到GVBD发生率高于1、2.5、10 ng/ml各浓度组($P>0.05$),高于0.5 ng/ml组,但无显著性差异($P<0.01$)。见表1。

表1 EGF各浓度组发生GVBD的百分率[例数(%)]

EGF浓度(ng/ml)	培养细胞数(个)	时相点 12 h	16 h	20 h	24 h
0(对照)	40	3(7.50)	5(12.50)	10(25.00)	18(45.00)
0.5	42	4(9.52)[c]	4(9.52)[c]	13(30.95)[c]	21(50.00)[c]
1	39	7(17.94)[a]	9(23.07)	16(41.02)[a]	26(66.66)[a]
2.5	45	9(20.00)[a]	14(31.11)	19(42.22)[a]	33(73.33)[b]
5	40	11(27.50)[b]	15(37.50)[b]	19(47.50)[b]	32(80.00)[b]
10	35	8(22.85)[b]	15(42.85)[b]	18(51.42)[b]	27(77.14)[b]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组比较; c: $P<0.01$, 与5 ng/ml比较

2.2 EGF对PB1发生的影响

EGF浓度为2.5、5、10 ng/ml组的PB1高于对照组($P<0.05$, $P<0.01$)。5 ng/ml组在体外培养的24、36 h时PB1排出率高于1、2.5、10 ng/ml组,但无显著性差异($P>0.05$),明显高于0.5 ng/ml组($P<0.05$)。COC在1、2.5、5、10 ng/ml EGF浓度培养下的退化率低于对照组($P<0.05$, $P<0.01$)。见表2。

表2 各浓度组发生PB1及COC退化的百分率(%)

EGF浓度(ng/ml)	培养细胞数(个)	时相点 20 h	24 h	36 h	退化率(%)
0(对照)	40	3(7.50)	7(17.50)	12(30.00)	25(62.50)
0.5	42	2(4.76)	8(19.04)[c]	14(33.33)[c]	24(57.14)
1	39	5(12.82)	9(23.07)	18(46.15)	16(41.03)[a]
2.5	45	9(20.00)[a]	15(33.33)[a]	23(51.11)[a]	18(40.00)[a]
5	40	10(25.00)[b]	14(35.00)[a]	26(65.00)[b]	12(30.00)[b]
10	35	10(28.57)[b]	11(31.42)[a]	21(60.00)[b]	10(31.42)[b]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组比较; c: $P<0.05$, 与5 ng/ml比较

2.3 EGF对COC卵母细胞受精率、胚胎发育的影响

2.5、5、10 ng/ml组受精率高于对照组;2.5 ng/ml的2-细胞胚胎发生率高于对照组($P<0.05$),5 ng/ml浓度的2-细胞胚胎发生率明显高于对照组($P<0.01$);2.5、5、10 ng/ml浓度的4-细胞胚胎发生率明显高于对照组($P<0.01$)。见表3。

表3 各浓度EGF对COC受精率和胚胎发育的比较

EGF浓度(ng/ml)	MⅡ细胞数(个)	受精率(2NP)(%)	2-细胞胚胎发生率(%)	4-细胞胚胎发生率(%)
0(对照)	12	3(25.00)	2(16.67)	1(8.33)
0.5	14	4(28.57)	3(21.43)	2(14.29)
1	18	7(38.89)	5(27.78)	3(16.60)
2.5	23	10(43.48)[a]	8(34.78)[a]	6(26.09)[b]
5	26	14(53.85)[b]	10(38.46)[b]	8(30.77)[b]
10	21	10(47.62)[b]	6(28.57)	5(23.81)[b]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组比较

3　讨论

早在 20 世纪 60 年代，就有学者提出，哺乳动物的未成熟卵母细胞离开卵泡内环境，在体外可以自发的恢复减数分裂，然而所获得的卵母细胞的成熟质量、受精率以及胚胎发育不令人满意。近年来，大量研究致力于最佳体外培养系统的探寻，以期得到细胞核、细胞质同步性成熟、受精率高、发展潜力好的卵母细胞。

EGF 是重要的卵巢局部生长因子之一，在卵泡生长各个时期的卵泡液中可以检测到。Westergaard 等[3]在妊娠妇女卵泡液中观察到随着卵泡的增大，卵泡液中的 EGF 含量逐渐下降：直径为 1 ~ 2 mm 卵泡的卵泡液中 EGF 的浓度为 25.3 ~ 30 ng/ml，而直径为 5 ~ 6 mm 卵泡的卵泡液中 EGF 的含量下降至 7.1 ~ 9.4 ng/ml。而有研究者测得人类卵泡生长的不同时期卵泡液中的 EGF 浓度无显著性差异[4]。本研究采用含 0、0.5、1、2.5、5、10 ng/ml EGF 浓度的培养液分别对未成熟卵进行体外培养，探讨卵母细胞体外成熟、发育是否与浓度有关，了解 GV 期卵母细胞体外培养的最适浓度。

本实验结果显示，浓度分别为 1、2.5、5、10 ng/ml 的 EGF 不同时间段 GVBD 的发生率均显著高于对照组，尤以含 EGF 为 5 ng/ml 浓度的培养液最终获得的 GVBD 发生率最高，而 EGF 含量为 0.5 ng/ml 的培养液因其浓度较小，所获得的 GVBD 发生率与对照组没有明显的差异。结果表明 EGF 促进未成熟卵母细胞体外 GVBD 的发生，并且与 EGF 的浓度有关，其最佳浓度为 5 ng/ml。

EGF 促进体外培养的未成熟卵母细胞完成减数分裂的作用，可能是直接作用于卵母细胞本身，Goud 等[5]采用含 2 ng/ml 浓度的 EGF 对没有颗粒细胞附着的裸卵（denuded oocyte，DO）进行体外培养，发现有 64.3% 的未成熟卵达到了 M Ⅱ 期（与未添加 EGF 的 33.9% 对照）。该实验提示 EGF 直接作用于卵母细胞本身的机制可能是：卵母细胞上存在着 EGF 受体，卵泡中期和排卵前期 EGF 受体的上调更加强了 EGF 的效应；小鼠卵母细胞透明带允许相对分子质量为 150×10^3 以内的分子通过，人类可能与其相似。因此相对分子质量为 6×10^3 的 EGF 很容易通过透明带与 EGF 受体结合，激活酪氨酸激酶直接发挥其作用。

Goud 等[5]进一步研究表明，COC 和 DO 在 EGF 培养下达到 M Ⅱ 期的卵母细胞分别为 81.8% 和 64.3%，可见 EGF 对于 COC 发挥的作用优于 DO 的体外培养，提示 EGF 也可能以卵丘颗粒细胞为中介促进卵母细胞减数分裂的完成。分析其机制可能是：卵丘颗粒细胞上存在有 EGF 受体，EGF 和其家族成员之一的转化生长因子 α 结合 EGF 受体发挥作用[6]；颗粒细胞增加了卵母细胞的表面积与体积比，使更多的 EGF 进入卵母细胞；EGF 的活性可能借助颗粒细胞诱导的旁分泌信号调节卵母细胞的成熟[4]。

本实验结果表明，浓度为 2.5、5、10 ng/ml 的 EGF 受精率明显高于对照组，表明体外适合的 EGF 浓度能促进卵母细胞细胞质的成熟。体外适合的 EGF 浓度不但能促进卵母细胞细胞质的成熟，还能促进受精后胚胎的发展。浓度为 5 ng/ml 的 EGF 培养液最适宜小鼠体外胚胎的发育。另外实验表明浓度为 1、2.5、5、10 ng/ml 的 EGF 培养液中的 COC 退化率小于对照组，因此，推测 EGF 在某种程度上抑制了卵母细胞成熟过程中的凋亡。

总之，EGF 是卵母细胞发育过程中最为重要的调节因子之一，适合浓度的 EGF 不但可以促进未成熟卵母细胞减数分裂的恢复和完成，使细胞核和细胞质同步性成熟，还能促进胚胎的发育、减少体外卵母细胞的退化率。分子生物学的发展为我们进一步研究 EGF 在人类生殖过程中的作用机制提供了广阔的前景，将有利于辅助生殖技术的发展。

参考文献：

[1] Sakaguchi M, Dominko T, Yamauchi N, *et al*. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors *in vitro*[J]. Reproduction, 2002, 123(1): 135 - 142.

[2] 庄广伦. 现代辅助生育技术[M]. 北京：人民卫生出版社，2005：233 - 241.

[3] Westergaard L G, Yding-Andersen C, Byskov A G. Epidermal growth factor in small antral ovarian follicles of pregnant women[J]. J Endocrinol, 1990, 127(2): 363 - 367.

[4] Coticchio G, Rossi G, Borini A, *et al*. Mouse oocyte meiotic resumption and polar body extrusion *in vitro* are differentially influenced by FSH, epidermal growth factor and meiosis-activating sterol[J]. Hum Reprod, 2004, 19(12): 2913 - 2918.

[5] Goud P T, Goud A P, Qian H L, *et al*. *In-vitro* maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium[J]. Hum Reprod, 1998, 13(6): 1638 - 1644.

[6] Lee G S, Kim H S, Hyun S H, *et al*. Effect of epidermal growth factor in preimplantation development of porcine cloned embryos[J]. Mol Reprod Dev, 2005, 71(1): 45 - 51.

（编辑　王　红）