

## 表皮生长因子对胎鼠卵巢卵泡体外发育 和类固醇激素分泌的影响

王海滨 李美玲 夏国良 吕忠显 郭勇 谢辉蓉

(中国农业大学生物学院)

**摘要** 表皮生长因子(EGF)是参与卵巢功能调节的一个重要肽类因子。关于 EGF 对小鼠胚胎期卵巢卵泡发育和类固醇激素发生的作用至今未见报道。本研究以单个卵巢的总卵泡数、生长卵泡数和 5 个最大卵母细胞的平均直径为卵泡发育优劣的衡量指标,利用我们早期研究建立的无血清培养体系研究了 EGF 对胎鼠卵巢卵泡发育和类固醇激素分泌的作用。结果发现: EGF 处理组胎鼠卵巢总卵泡数、生长卵泡数和卵巢内 5 个最大卵母细胞平均直径从培养第 7 天起即显著高于 ITS 对照组直至培养结束; EGF 在培养后期显著促进胎鼠卵巢分泌睾酮,但对雌二醇的基础分泌无影响; EGF 处理组胎鼠卵巢在培养过程的后期引起贴壁的卵巢边缘脱离培养板底壁发生卷边现象,丧失卵母细胞皮质-髓质生长模式。结果提示: EGF 在胎鼠卵巢原始卵泡生长起始中起重要作用;同时 EGF 促进胎鼠卵巢小腔前卵泡/卵母细胞进一步生长、发育和体外存活; EGF 促卵泡发育作用与雌二醇的作用无关。

**关键词** 小鼠; 胚胎卵巢; 卵泡发育; 类固醇激素; 表皮生长因子

**分类号** Q 492.5; Q 492.6

## Effects of Epidermal Growth Factor on the Follicle Development and Steroidogenesis of Mouse Fetal Ovary in vitro

Wang Haibin Li Meiling Xia Guoliang Lu Zhongxian Guo Yong Xie Huirong  
(College of Biological Science, CAU)

**Abstract** Epidermal Growth Factor (EGF) is an important ovarian peptide, which involve the regulation of ovarian function. Very few informations were reported on the activity of EGF in regulating follicle development and steroidogenesis of fetal ovary. The present experiment was conducted to evaluate the function of EGF on the follicular development and steroidogenesis of mouse fetal ovary using a serum-free culture model established in our preliminary work. The average numbers of all oocytes and the growing oocyte per-ovary and the average diameter of the five largest growing oocytes were applied as the index of follicular development in the present experiment. The results revealed that: The growth and survives of fetal ovarian follicle in EGF group was significantly prior to that in ITS control group throughout the culture period. EGF enhanced the secretion of testosterone after 13 days culture, but had no effects on the secretion of estrodial. The cortex-medulla growth pattern of oocytes in some EGF-treated mouse fetal ovaries was lost because of the

收稿日期: 2000-06-26

国家自然科学基金资助项目(39770396)

夏国良,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

detaching of the *in-vitro* cultured ovarian cortex from the dish bottom. The results suggested that: EGF plays an important role in the initiation of mouse fetal ovarian primordial follicles. EGF promotes the growth and development of fetal ovarian follicle without the cooperation of estrodial *in vitro*.

**Key words** mouse; fetal ovary; follicular development; steroid; epidemal growth factor (EGF)

卵巢是一个复杂的生殖内分泌器官。下丘脑、垂体分泌的许多激素对卵巢功能均有重要的调节作用。同时卵巢内局部产生的一些肽类因子也可通过自分泌或旁分泌途径影响卵巢功能<sup>[1]</sup>。胚胎期小鼠下丘脑-垂体轴功能的出现先于卵巢获得对促性腺激素的反应性<sup>[2]</sup>。此时胎鼠虽然循环血液中存在高水平的促性腺激素<sup>[3]</sup>,但其卵巢活动如原始卵泡形成和生长起始等并不受促性腺激素的影响<sup>[4]</sup>。目前调节胚胎期卵巢内原始卵泡形成及其生长起始的生理机制仍未阐明。卵巢内局部产生的一些旁分泌和自分泌因素可能参与调节上述过程。EGF是参与卵巢功能调节的一个重要肽类因子。在卵巢局部EGF参与调节猪<sup>[5]</sup>、仓鼠<sup>[6]</sup>、小鼠<sup>[7]</sup>和牛<sup>[8]</sup>等的初级卵泡、次级卵泡颗粒细胞的增殖活动。关于EGF对小鼠胚胎期卵巢卵泡发育和类固醇激素分泌的作用至今未见报道。我们早期研究已经建立了一个适于胎鼠卵巢卵泡体外生长发育的无血清培养体系<sup>[9]</sup>。本试验利用该培养体系研究EGF对胎鼠卵巢卵泡发育和类固醇激素分泌的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂

HAM'S/F12 和低糖DMEM 培养基为HYCLONE 公司产品。人表皮生长因子(hEGF),胎牛血清(FBS), ITS(含胰岛素  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、转铁蛋白  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、亚硒盐  $30 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、胎球蛋白,牛血清白蛋白V 片段(BSA),谷氨酰胺,青霉素和链霉素等均购自SIGMA 公司。雌二醇、睾酮放射免疫分析试剂盒购自中国原子能科学研究院。24孔培养板为EVERGREEN 公司产品。

### 1.2 实验动物

6~7 周龄的性成熟雌性昆明白小鼠,体重 35 g 左右,购自中国科学院遗传所实验动物中心。在通风、每天光照(白炽灯补光)14 h、自由采食饮水的条件下饲喂。当日下午 17 时以雌雄 2:1 比例合笼,于次日上午 8 时观察到阴道栓的记为妊娠 0 d 母鼠。昆明白小鼠妊娠期为 20 d,出生当日为新生 1 d。

### 1.3 胎鼠卵巢的获取

母鼠妊娠 13 d 的当日上午 8 时,以颈椎脱臼法处死小鼠,取出胎鼠,置于 4℃ 无菌生理盐水,再在体视解剖镜下用 5 号针头依据雌雄性腺形态学差异分离得到完整的不含任何中肾组织的胎鼠卵巢。

### 1.4 卵巢培养

胎鼠卵巢用 24 孔培养板培养,每孔一个卵巢,含  $400 \mu\text{L}$  FBS 培养液。此培养液由 HAM'S/F12 和低糖 DMEM 以 1:1 比例混合而成(基础培养液),含 FBS 2%、谷氨酰胺

2 mmol·L<sup>-1</sup>、青霉素 100 IU·mL<sup>-1</sup>和链霉素 100 IU·mL<sup>-1</sup>。在 37 °C、CO<sub>2</sub>5%、空气 95%、饱和湿度的条件下贴壁培养 5 d。贴壁良好的胎鼠卵巢用基础培养液清洗 4 次后用 400 μL ITS 培养液(基础培养液添加 ITS、BSA 3 mg·mL<sup>-1</sup>、胎球蛋白 0.25 mg·mL<sup>-1</sup>、谷氨酰胺 2 mmol·L<sup>-1</sup>、青霉素 100 IU·mL<sup>-1</sup>和链霉素 100 IU·mL<sup>-1</sup>)和 EGF+ ITS 培养液(ITS 培养液添加 hEGF 10 ng·mL<sup>-1</sup>)继续培养 10 d, 并每 2 d 更换 1 次培养液。培养液收集后-20 °C 冻存备用。

### 1.5 卵母细胞记数和直径测量

5 d 贴壁培养后每 2 d 对显微镜下观察到的全部卵泡/卵母细胞和生长卵泡/卵母细胞(卵母细胞直径 > 25 μm)计数 1 次, 并同时利用目镜标尺测量卵巢中 5 个最大卵母细胞的直径。

### 1.6 培养液中雌二醇和睾酮含量的测定

将收集的培养液按不同处理每 4 孔合并成 1 个测量单元, 并将其浓缩至药盒要求体积, 分别测量培养液中雌二醇和睾酮的含量。

### 1.7 数据统计

试验结果采用 Student's-t 检验进行统计分析。结果以平均值 ± 标准误(SEM)方式来表示。P < 0.05 为差异显著。试验至少重复 3 次。

## 2 结果与结论

### 2.1 EGF 促进胎鼠卵巢卵泡体外起始生长、发育和存活

实验依据 Byskov 等<sup>[10]</sup>报道的以单个卵巢的总卵泡数、生长卵泡数和 5 个最大卵母细胞的平均直径为卵泡发育优劣的衡量指标。EGF 对胎鼠卵巢体外培养时卵泡生长发育的作用见图 1。

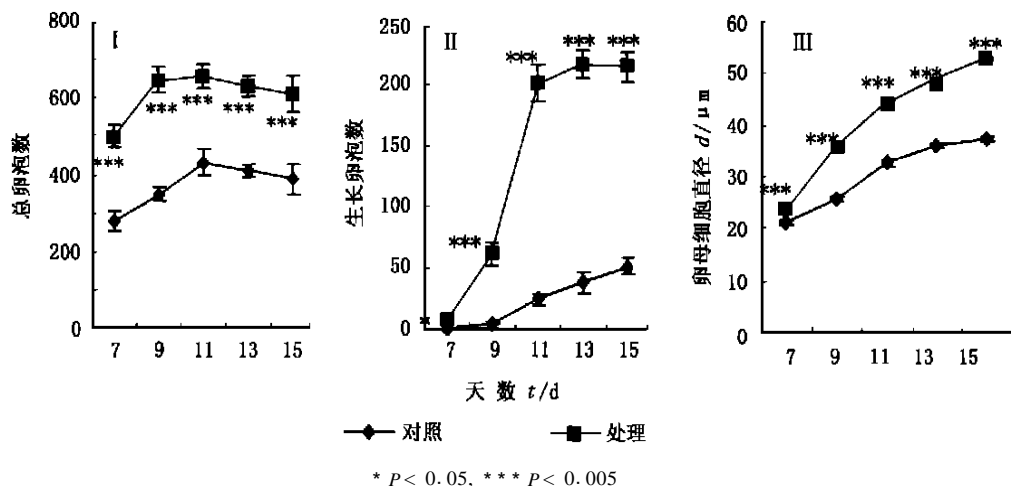


图 1 EGF 对小鼠胚胎卵巢卵泡体外发育的影响

胎鼠卵巢体外培养时 EGF 处理组总卵泡数、生长卵泡数和卵巢内 5 个最大卵母细胞的平均直径均显著高于 ITS 对照组(P < 0.05~0.005), 培养 11 d 时总卵泡数分别为 653 ± 33 和 431 ± 35; 生长卵泡数分别为 201 ± 16 和 24 ± 5; 卵巢内 5 个最大卵母细胞平均直径分别为 (44.5 ± 0.45) μm 和 (32.5 ± 0.6) μm。到培养 15 d 时 EGF 处理组卵巢内 5 个最大卵母细胞平

均直径已达( $52.6 \pm 0.4$ )  $\mu\text{m}$ 。可见 EGF 对胎鼠卵巢小腔前卵泡体外存活、起始生长及随后发育有显著的促进作用。

## 2.2 EGF 促进胎鼠卵巢结缔组织细胞增殖、游离

胎鼠卵巢体外培养后期 EGF 促进维系卵巢结构的结缔组织细胞迅速增殖,并向卵巢周围游离,造成完整的卵巢结构被破坏。随着体外培养的继续,越来越多卵巢在贴壁培养一段时间后发生卷边,丧失卵母细胞皮质-髓质生长模式,形成一个类似体内卵巢的组织块(图 2)。如培养第 9 天时约有 14% 的胎鼠卵巢发生卷边,到培养 15 d 时发生卷边的卵巢已达 68%。发生卷边的卵巢虽然仍含有大量卵母细胞,但在我们采用的培养体系中已无法继续观察其生长发育的动态进程。可见,利用我们早期研究建立的无血清培养体系添加 EGF 培养胎鼠卵巢不能维持其在体外长期单层贴壁培养。发生卷边的胎鼠卵巢重新形成一个类似卵巢的组织块,可能 EGF 有促进贴壁的胎鼠卵巢体外重新恢复立体结构的作用。

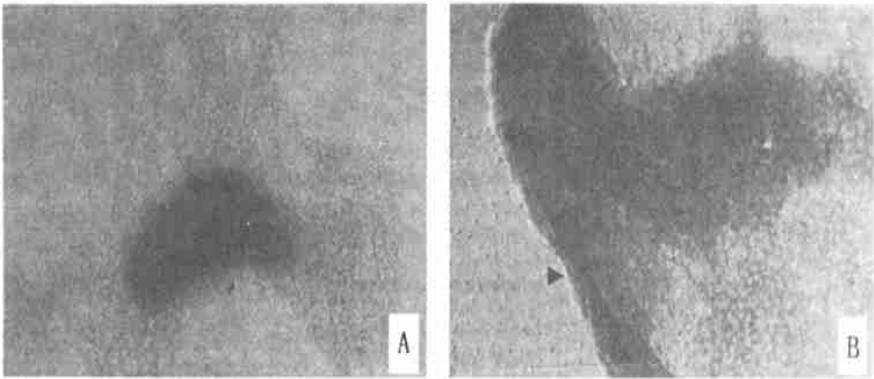


图 2 EGF 处理组小鼠胚胎卵巢体外培养过程中的形态学变化

A 表示体外培养 13 d 时保持卵母细胞皮质-髓质生长模式的卵巢 ( $\times 36$ );

B 表示培养 13 d 时部分发生卷边的胚胎卵巢,箭头所示为胚胎卵巢一侧皮质层已发生卷边 ( $\times 90$ )。

## 2.3 EGF 在培养后期促进胎鼠卵巢分泌睾酮

EGF 促进胎鼠卵巢结缔组织细胞增殖,最终导致卵巢发生卷边形成类似体内卵巢的组织块。由于发生卷边的胎鼠卵巢内仍含有大量卵泡,可能仍具有分泌类固醇激素功能。因此在本实验 EGF 处理组胎鼠卵巢体外继续培养至第 17 天,此时发生卷边的许多胎鼠卵巢因脱离培养板底壁而悬浮于培养液中已无法继续培养。实验发现 EGF 处理组胎鼠卵巢在培养早期睾酮分泌量较低,和 ITS 对照组无显著差异。从培养第 13 天起 EGF 处理组胎鼠卵巢睾酮分泌量开始显著增加( $P < 0.05$ ),直至培养结束(图 3)。EGF 处理组和 ITS 对照组胎

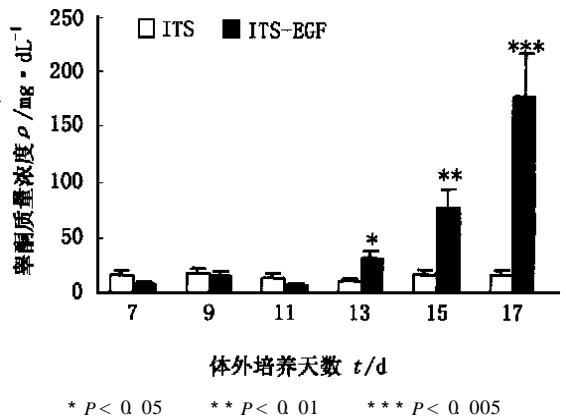


图 3 EGF 对小鼠胚胎卵巢分泌睾酮的影响

鼠卵巢在整个培养过程均检测不到雌二醇。

### 3 讨论

近年来卵巢内产生的一些肽类因子如干细胞因子受体(c-Kit)、抗缪勒氏管激素(AMH)被证实参与调节原始卵泡的生长起始过程<sup>[11-13]</sup>。EGF 是参与卵巢功能调节的一个重要肽类因子<sup>[11]</sup>。我们利用胎鼠卵巢体外无血清培养技术研究发现 EGF 促进胎鼠卵巢原始卵泡起始生长。据报道 EGF 可促进静息细胞表达增殖细胞核抗原(PCNA)<sup>[14]</sup>, 进而由 PCNA 引起细胞周期改变, 促进细胞增殖。EGF 可能通过促进胎鼠卵巢原始卵泡前体颗粒细胞表达 PCNA, 进而促进其变大并增殖, 导致原始卵泡进入生长相。最近在体内和体外实验也已证实 EGF 在新生大鼠卵巢原始卵泡生长起始过程中起重要作用<sup>[15]</sup>。原始卵泡起始生长后, EGF 对随后的腔前卵泡卵母细胞的体外生长发育也有显著的促进作用。EGF 是卵泡颗粒细胞的有丝分裂原, 可促进颗粒细胞大量增殖。卵母细胞的生长发育依赖于其外周包裹的颗粒细胞, 其生长率与相偶联的颗粒细胞的数量成正比。EGF 可能通过促进颗粒细胞增殖, 并有效地维持卵母细胞和颗粒细胞间的功能性偶联, 进而显著促进卵泡卵母细胞的生长发育。本研究中观察到 EGF 在促进卵泡生长发育的同时, 也造成培养的卵巢边缘发生脱离培养板底的现象, 原因可能是 EGF 可促进维系卵巢结构的结缔组织细胞迅速增殖, 并向卵巢周围游离, 造成完整的卵巢结构被破坏。另外由于结缔组织细胞在 EGF 的作用下持续处于分裂增殖相, 其分泌细胞外基质的活动相应被削弱, 胎鼠卵巢内许多利于其贴壁的细胞外基质成分含量降低, 导致胎鼠卵巢在培养过程中不断发生卷边现象。

卵泡在发育进程中分泌类固醇激素的活动与次级卵泡形成膜层细胞并增殖分化密切相关<sup>[16]</sup>。随着胎鼠卵巢内大量卵泡生长发育至次级卵泡阶段, 在 EGF 的作用下卵泡细胞分泌睾酮的水平在培养后期显著升高, 但 EGF 并不能增加胎鼠卵巢雌二醇的基础分泌。EGF 在促进胎鼠卵巢卵泡发育的同时, 对睾酮和雌二醇的分泌却显现不同的调节作用。许多研究已证实 EGF 可抑制 FSH 或 LH/hCG 诱导的 P450 芳香化酶活性和雌二醇的生成<sup>[17,17]</sup>。我们的研究结果进一步证实 EGF 促卵泡发育作用可能不需要雌激素的协同<sup>[7]</sup>, 而雄激素在卵泡发育过程中可能起一定作用<sup>[18-20]</sup>。

### 参 考 文 献

- 1 Vandenhurk R, Bevers M M, Beckers J F. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles *Theriogenology*, 1997, 47: 73~ 82
- 2 Huhtaniemi I T. Molecular aspects of the ontogeny of the pituitary-gonadotropin axis *Reprod Fertil Dev*, 1995, 7: 1025~ 1035
- 3 Halpin D M C, Jones A, Fink G, et al Postnatal ovarian follicle development in hypogonadal (*hpg*) and normal mice and associated changes in the hypothalamic-pituitary ovarian axis *J Reprod Fertil*, 1986, 77: 287~ 296
- 4 Mason A J, Hayflick J S, Zoeller R T, et al A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the *hpg* mouse *Science*, 1986, 234: 1366~ 1371
- 5 Morbeck D A, Flowers W L, Britt J H, et al Response of porcine granulosa cells isolated from primary

- and secondary follicles of FSH, 8-bromo-cAMP and EGF *in vitro* J Reprod Fertil, 1993, 99: 577~ 584
- 6 Roy S K. Epidermal growth factor and transforming growth factor- $\beta$  modulation of follicle stimulating hormone induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral and early antral follicles Biol Reprod, 1993, 48: 552~ 557
- 7 Boland N I, Gosden R G. Effect of epidermal growth factor on the growth and differentiation of cultured mouse ovarian follicles J Reprod Fertil, 1994, 101: 369~ 374
- 8 Wandji S A, Eppig J J, Fortune J E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles Theriogenology, 1996, 45: 817~ 832
- 9 李美玲, 夏国良, 王海滨, 等. 小鼠胚胎卵巢体外无血清培养体系的建立. 农业生物技术学报, 2000, 8(4): 353~ 356
- 10 Byskov A G, Xia G L, Claus Y A. The cortex-medulla oocyte growth pattern is organized during fetal life: an *in-vitro* study of the mouse ovary. Mol Human Reprod, 1997, 9: 795~ 800
- 11 Parrott J A, Skinner M K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis Endocrinology, 1999, 140: 4262~ 4271
- 12 Parrott J A, Skinner M K. Kit ligand actions on ovarian stromal cell: effects on theca cell recruitment and steroid production. Mol Reprod Dev, 2000, 55(1): 55~ 64
- 13 Durlinger A L, Kramer P, Karels B, et al. Control of primordial follicle recruitment by antimüllerian hormone in the mouse ovary. Endocrinology, 1999, 140: 5789~ 5796
- 14 Jaskulski D, Gatti C, Travali S, et al. Regulation of the proliferating cell nuclear antigen cyclin and thymidine kinase mRNA levels by growth factors J Biol Chem, 1988, 263: 10175~ 10179
- 15 柳海珍. 卵泡启动、生长和分化分子机理的初步探讨: [学位论文]. 北京: 中国科学院信息情报研究所, 1999
- 16 O'shaughnessy P J, Mannan M A. Development of cytochrome P-450 side chain cleavage mRNA levels in neonatal ovaries of normal and hypogonadal (*hpg*) mice Mol Cell Endocrinol, 1994, 104: 133~ 138
- 17 Haynes-Johnson D, Lai M T, Campen C, et al. Diverse effects of tyrosine kinase inhibitors on follicle-stimulating hormone-stimulated estradiol and progesterone production from rat granulosa cells in serum-containing medium and serum-free medium containing epidermal growth factor. Biol Reprod, 1999, 61: 147~ 153
- 18 Murray A A, Gosden R G, Allison V. Effect of androgens on the development of mouse growing follicles J Reprod Fertil, 1998, 113: 27~ 33
- 19 Vendola K, Zhou J, Wang J, et al. Androgens promote insulin-like growth factor-I receptor gene expression in the ovary. Hum Reprod, 1999, 14: 2328~ 2332
- 20 Vendola K, Zhou J, Wang J, et al. Androgens stimulate primordial follicles development in the primate ovary. Biol Reprod, 1999, 61: 353~ 357