

# 颗粒细胞 EGF 类因子信号通路在调控卵母细胞成熟和发育中的作用

杨鑫宇, 贾振伟

内蒙古民族大学动物科学技术学院, 通辽 028043

**摘要:** 动物体内卵泡排卵前促黄体素(luteinizing hormone, LH)诱导了卵丘颗粒细胞扩散, 并启动卵母细胞恢复减数分裂。普遍认为, 卵泡壁层颗粒细胞表达 LH 受体, 卵母细胞及其周围卵丘细胞不表达 LH 受体, LH 通过作用于卵泡壁层颗粒细胞产生信号分子, 这些信号分子作用于卵丘颗粒细胞介导了 LH 生物作用。然而, 一直以来, 关于排卵前介导 LH 作用而诱导卵母细胞成熟的机制一直存在争议。目前研究认为, LH 作用于卵泡壁层颗粒细胞后产生了 EGF 类因子, 并与颗粒细胞的受体结合, 促进了卵母细胞的成熟和发育。由于体外成熟的卵丘卵母细胞复合体来源于生长卵泡, 其卵丘颗粒细胞 EGF 类因子信号系统不完善, 目前的体外成熟培养体系难以模拟卵泡内的生理环境, 导致卵母细胞体外发育能力较差, 限制了这些卵母细胞的利用效率。本文综述了颗粒细胞 EGF 类因子信号系统、EGF 类因子在调控卵母细胞成熟中的作用及对卵母细胞发育能力的影响, 为优化卵母细胞体外成熟培养体系, 完善卵丘颗粒细胞的 EGF 类因子的信号系统, 进而提高卵母细胞体外成熟效率提供理论依据。

**关键词:** 颗粒细胞; EGF 类因子; 卵母细胞成熟; 卵母细胞发育能力

## The role of EGF-like factor signaling pathway in granulosa cells in regulation of oocyte maturation and development

Xinyu Yang, Zhenwei Jia

College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028043, China

**Abstract:** The surge of luteinizing hormone (LH) in preovulatory ovarian follicles triggers the resumption of meiosis in oocytes and induces the proliferation of surrounding cumulus granulosa cells. It is believed that LH receptors are expressed in the mural granulosa cells, but not the oocytes and the surrounding cumulus cells, suggesting that the LH signaling is mediated by factors produced by the granulosa cells. However, the mechanism underlying oocyte maturation induced by LH before ovulation has been controversial. Current studies suggest that LH binds on to its receptor on granulosa cells of the follicular wall to promote the production of EGF-like factors, which activate various signaling cascades and induce

收稿日期: 2018-10-07; 修回日期: 2019-01-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31760670)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31760670)]

作者简介: 杨鑫宇, 在读硕士, 专业方向: 配子与胚胎生物技术。E-mail: 2609447363@qq.com

通讯作者: 贾振伟, 博士, 副教授, 研究方向: 配子与胚胎生物技术。E-mail: zhenwei1999@sina.com

DOI: 10.16288/j.ycz.18-193

网络出版时间: 2019/1/17 12:17:31

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20190117.1217.002.html>

oocyte maturation and development. Since the *in vitro* maturation system is difficult to simulate the *in vivo* physiological environment, *in vitro* cultured follicles are likely to be deficient in the EGF-like factors, which could result in the poor developmental competency of *in vitro* cultured oocytes and restrict their efficient utilization. In this review, we summarize the EGF-like factor signaling system in granulosa cells and its regulation of oocyte maturation and development. It aims to optimize the *in vitro* maturation culture system of oocytes and increase the EGF-like factor signaling system in cumulus granulosa cells, thereby providing a framework for improving the efficiency on *in vitro* maturation of oocytes.

**Keywords:** granulosa cells; EGF-like factor; oocyte maturation; oocyte developmental competency

哺乳动物体内卵母细胞生长、成熟和排卵过程十分复杂,涉及多种激素和生长因子以内分泌或旁分泌的方式作用于卵泡颗粒细胞参与此过程的调控。动物卵泡颗粒细胞包括壁层颗粒细胞和卵丘颗粒细胞,普遍认为,排卵前促黄体素(luteinizing hormone, LH)作用于卵泡颗粒细胞后激活下游信号通路诱导了卵母细胞生长后期细胞质和细胞核成熟、排卵以及排卵后黄体细胞的形成。目前研究认为,卵母细胞不表达 LH 受体,卵丘颗粒细胞在卵母细胞分泌因子的抑制下也不表达 LH 受体,但卵泡壁层颗粒细胞表达 LH 受体,这说明 LH 作用于卵泡壁层颗粒细胞后将可能激活一些信号分子,将 LH 的生物作用传递至卵母细胞<sup>[1,2]</sup>。值得注意的是,目前研究已明确 LH 作用于卵泡壁层颗粒细胞后将产生表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)类因子,这些细胞因子介导了 LH 的作用,调控卵母细胞的成熟和发育<sup>[3]</sup>。

家畜卵母细胞体外成熟培养是一项重要的繁殖生物技术,在畜牧业生产和科学研究上广泛应用,是体外受精、性别控制、转基因动物生产及动物克隆等技术开展的前提和关键。由于体外成熟的卵丘颗粒细胞不表达 LH 受体,但表达促卵泡生成素(follicle-stimulating hormone, FSH)受体,因此,卵母细胞体外成熟期间通过添加 FSH 而激活卵丘颗粒细胞内调控卵母细胞恢复减数分裂的信号通路。但目前普遍认为,相对于体内成熟的卵母细胞,体外成熟的卵母细胞发育能力较差,影响了其利用效率。研究发现,卵母细胞在卵泡内生长后期,LH 将诱导 EGF 类因子的产生,并激活 EGF 类因子信号系统,促进卵母细胞成熟<sup>[4]</sup>。由于体外成熟的卵母细胞脱离了卵泡环境,而且这些卵母细胞来源于生长卵泡,

提示体外成熟的卵母细胞,卵丘颗粒细胞的 EGF 类生长因子信号系统可能不完善,不利于卵母细胞成熟,这可能是导致体外成熟的卵母细胞发育能力较差的一个重要因素。因此,本文综述了颗粒细胞 EGF 类因子信号系统、EGF 类因子在调控卵母细胞成熟中的作用及对卵母细胞发育能力的影响,为优化卵母细胞体外成熟培养体系,完善卵丘颗粒细胞的 EGF 类因子的信号系统,提高卵母细胞体外成熟效率提供理论参考。

## 1 颗粒细胞 EGF 类因子信号系统

### 1.1 EGF 类因子及其受体

哺乳动物表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)类因子,与 EGF 分子结构和生物学功能相似,因此被称为 EGF 类蛋白家族。目前研究认为,动物卵巢颗粒细胞表达的 EGF 类因子主要包括:特指双调蛋白(amphiregulin, AREG)、 $\beta$  细胞素(betacellulin, BTC)和表皮调节素(epiregulin, EREG)<sup>[5]</sup>。这些 EGF 类因子来源于非活性的跨膜前体糖蛋白,包括信号序列、跨膜结构域和胞外 EGF 结构域。EGF 类因子的前体蛋白在细胞膜外被蛋白酶水解而释放功能性的肽,通过与受体结合而发挥生物学功能。EGF 类因子的受体与 EGF 受体(epidermal growth factor-receptor, EGFR)相同,是一种分子量为 170 kDa 的细胞膜糖蛋白,属于酪氨酸激酶受体,由细胞外的配体结合区,疏水跨膜区和细胞内的酪氨酸激酶信号活化区 3 部分组成。

目前研究表明,体内卵泡发育和卵母细胞成熟期间,排卵前高水平的 LH 促进了壁层颗粒细胞表达 EGF 类因子,且通过旁分泌的方式作用于卵丘颗

粒细胞 EGFR, 使其表达 EGF 类因子。FSH 促进了壁层和卵丘颗粒细胞表达 EGFR, 而卵母细胞分泌因子促进了卵丘颗粒细胞表达 EGFR<sup>[4,6,7]</sup>(图 1)。而且, 研究认为, 颗粒细胞 EGF 类因子与 EGFR 胞外区结合后, 使其细胞内的部分发生特定酪氨酸残基磷酸化, 从而激活细胞内 ERK1/2、PI3K 以及 JAK/STAT 等下游信号通路, 其中 EGF 类因子与 EGFR 结合后通过 RAS/cRAF/MEK1 级联反应而激活 ERK1/2, 激活的 ERK1/2 与 CEBPB、c-myc 和 AP-1 等转录因子结合而促进基因表达, 因此, ERK1/2 被认为是调控卵母细胞减数分裂的恢复、卵丘颗粒细胞的扩散和排卵的关键信号分子<sup>[8~10]</sup>。

## 1.2 颗粒细胞 EGF 类因子信号系统功能的完善

近年来, 许多学者认为卵巢小有腔卵泡来源的卵丘卵母细胞复合体不能对 EGF 类生长因子发生反应, 随着卵泡发育, 卵丘颗粒细胞逐渐获得功能性 EGF 信号网络, 这与 EGF 类生长因子是介导卵母细胞成熟和排卵的中心调控因子的观点一致<sup>[11,12]</sup>。优势卵泡为了排卵, 排卵前卵丘颗粒细胞能够对 EGF 类生长因子发生反应, 而次要卵泡缺乏这种能力。为了了解生长阶段卵泡的颗粒细胞对 EGF 类生长因子反应能力较低的原因, 许多学者开展了相关研究。其中一种观点认为, 相对于大卵泡, 小卵泡的颗粒细胞 EGF 类生长因子受体基因 mRNA 表达量较低, 导致其对 EGF 类生长因子反应能力较低<sup>[13~15]</sup>。另外一种观点认为, 小卵泡的颗粒细胞 EGF 类生长因子受体基因 mRNA 表达量与大卵泡的颗粒细胞一致, 但

其翻译能力及翻译后蛋白磷酸化水平较低, 导致这些小有腔卵泡对 EGF 类生长因子反应和颗粒细胞扩散能力较低<sup>[12]</sup>。这些结果说明, 体内随着卵泡的生长, 卵丘颗粒细胞 EGF 类因子信号系统功能逐渐完善, 并获得支持卵母细胞成熟和发育的能力。同时提示, 小的有腔卵泡颗粒细胞 EGF 类因子信号系统功能不健全, 这可能是小卵泡来源卵丘卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complex, COCs)体外培养后, 导致卵母细胞发育能力较低的一个重要因素。

## 2 EGF 类因子在调控卵母细胞成熟的作用

### 2.1 EGF 类因子介导了 LH 信号

EGF 主要由卵泡内膜细胞和颗粒细胞产生。研究表明, 体外卵母细胞成熟期间, EGF 促进多种哺乳动物卵丘颗粒细胞扩散和卵母细胞成熟<sup>[16~18]</sup>。研究认为, EGF 通过卵丘颗粒细胞调控卵母细胞成熟, 因为成熟有腔卵泡来源的卵母细胞表达 EGF 受体数量很少, 而卵丘颗粒细胞拥有大量的 EGF 受体<sup>[19,20]</sup>。而且, 已有的研究证明, LH 促进了排卵前卵泡颗粒细胞 EGF 的表达, 这说明 EGF 通过介导 LH 信号, 并作用于颗粒细胞而调控卵母细胞成熟和发育<sup>[18]</sup>。

然而, Inoue 等<sup>[21]</sup>研究 LH 调控排卵前卵泡发育机制时发现, LH 峰值后 EGF 表达以及在卵泡液积累的量没有发生显著变化, 暗示 EGF 可能不是介导 LH 作用的关键因子。特别重要的是, 在多种哺乳动

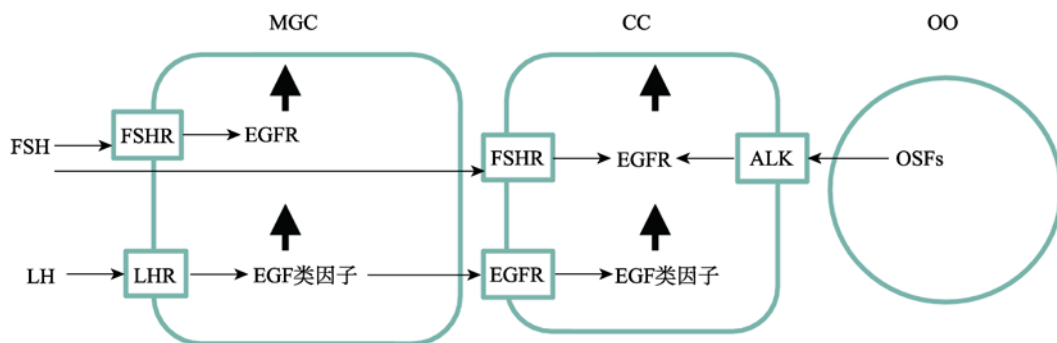


图1 EGF类因子及其受体在壁层和卵丘颗粒细胞上的表达

Fig. 1 The expression of EGF like factors and their receptor in C-type natriuretic peptide and natriuretic peptide receptor 2 expression in mural granulosa cells and cumulus cells

MGC: 壁层颗粒细胞; CC: 卵丘颗粒细胞; OO: 卵母细胞; FSH: 促卵泡素; FSHR: 促卵泡素受体; LH: 促黄体激素; LHR: 促黄体激素受体; EGFR: 表皮生长因子受体; OSFs: 卵母细胞分泌因子; ALK: 激活素受体样激酶; ↑: 表达增加。

物上的研究发现,排卵前 EGF 家族成员的 EGF 类生长因子(AREG, EREG 和 BTC)不表达,而 LH 峰启动后,这些 EGF 类生长因子表达量迅速增加<sup>[21-23]</sup>。研究已证明,在 LH 刺激下,EGF 类生长因子首先在卵泡壁层颗粒细胞上表达,然后分别以自分泌或旁分泌的方式作用于壁层颗粒细胞和卵丘颗粒细胞 EGFR,增强了前列腺素-过氧化物酶合成酶 2 (prostaglandin- peroxidase synthase 2, PTGS2)表达,且促进了卵丘颗粒细胞表达 EGF 类生长因子。壁颗粒细胞和卵丘颗粒细胞 PTGS2 表达增加后,促进了前列腺素 E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>)的合成,PGE<sub>2</sub> 作用于卵丘颗粒细胞上的受体,激活 p38MAPK 而进一步促进 EGF 类生长因子表达,这些 EGF 类生长因子与卵丘颗粒细胞 EGF 受体结合后,激活了 ERK1/2、PI3K 等信号通路,促进了调控卵母细胞恢复减数分裂和卵丘颗粒细胞扩散基因的表达,进而放大 LH 信号,使 LH 刺激信号从卵泡颗粒细胞外围向内传递至卵母细胞<sup>[24,25]</sup>。综上所述,EGF 类生长因子介导了排卵前 LH 信号,由于 EGF 类生长因子受体和 EGF 受体相同,因此 EGF 体外可能与其受体结合而模拟了 EGF 类生长因子的功能,而体内 EGF 可能不是 LH 信号的主要介导者。

## 2.2 EGF 类因子调控卵母细胞减数分裂

体内有腔卵泡生长期间,颗粒细胞为卵母细胞

提供 cAMP/cGMP 而使其减数分裂阻滞在生发泡阶段。目前,研究已明确,C 型钠肽(C-type natriuretic peptide, CNP)激活卵丘颗粒细胞上的受体(NPR2)产生 cGMP,进入卵母细胞通过抑制磷酸二酯酶(PDE3A)的活性,降低 cAMP 的水解,高水平的 cAMP 激活蛋白激酶 A 而抑制 MPF 的活性,进而将抑制减数分裂<sup>[26]</sup>。体内 LH 峰刺激后,降低了颗粒细胞 cGMP 的产生,使 cGMP 进入卵母细胞的量减少,激活了 PDE3A,使 cAMP 水平下降,卵母细胞恢复减数分裂。目前研究表明,LH 峰刺激后,AREG 和 EREG 等 EGF 类因子表达量增加,激活其受体后,抑制 CNP 表达量,导致 cGMP 生产水平下降,同时增强间隙连接蛋白磷酸化,进而关闭间隙连接,最终导致 cGMP 进入卵母细胞的量减少,解除其对卵母细胞减数分裂的阻滞<sup>[27]</sup>(图 2)。

此外,体外研究表明 EGF 信号网络的激活也参与了哺乳动物卵母细胞成熟的调控。例如,体外 cAMP 调控剂维持了卵母细胞减数分裂阻滞,而添加 EGF 诱导了其恢复减数分裂<sup>[28]</sup>。研究发现,FSH 体外由 EGF 类生长因子介导,诱导了卵母细胞恢复减数分裂和卵丘颗粒细胞扩散<sup>[29]</sup>。cAMP 是 FSH 信号通路的下游信号分子,高水平的 cAMP 也能够通过促进 EGF 类生长因子表达而诱导卵母细胞恢复减数分裂。另外,外源的 AREG、EREG 和 EGF 也能诱导多种哺乳动物卵母细胞恢复减数分裂和卵丘

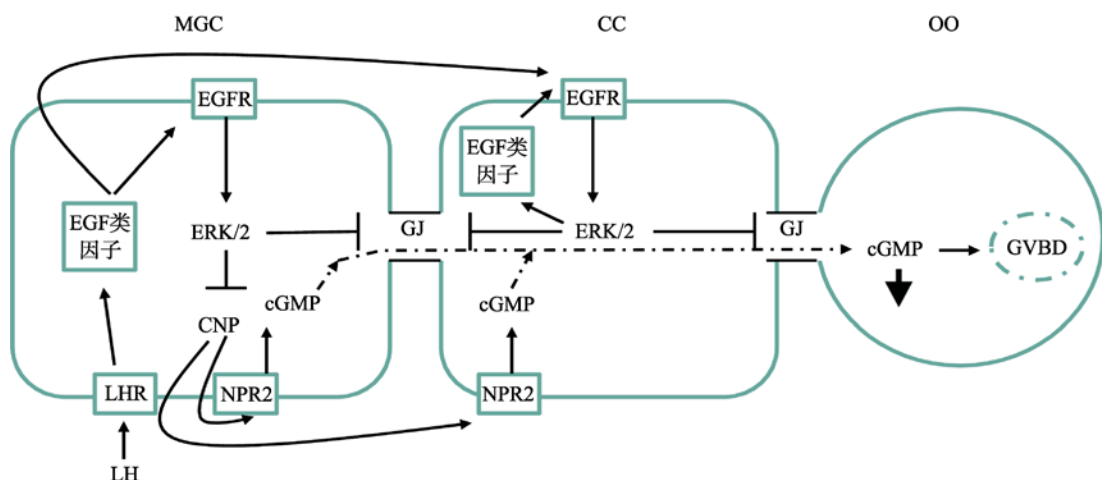


图 2 EGF 类因子对卵母细胞减数分裂恢复的调控作用

Fig. 2 The regulatory roles of EGF like factors in oocyte meiotic resumption

MGC: 壁层颗粒细胞; CC: 卵丘颗粒细胞; OO: 卵母细胞; LH: 促黄体激素; LHR: 促黄体激素受体; EGFR: 表皮生长因子受体; CNP: C 型钠肽; NPR2: 钠肽 2 型受体; ERK1/2: 细胞外调节蛋白激酶 1/2; ↓: cGMP 水平下降; GJ: 细胞间隙连接。GVBD: 生发泡破裂。



颗粒细胞扩散。特别注意的是,在小鼠(*Mus musculus*)上的研究发现,利用含有 AREG 的卵泡液培养卵母细胞诱导了卵母细胞成熟和卵丘颗粒细胞扩散,而免疫耗竭 AREG 后其作用消失<sup>[30]</sup>。在小鼠中,COC 体外培养期间,使用 EGF 类生长因子受体抑制剂,阻滞了 AREG 诱导的卵母细胞成熟,但培养前去除卵丘颗粒细胞后,并没有干扰卵母细胞成熟,揭示 EGF 类生长因子不是直接作用卵母细胞,而是通过作用卵丘颗粒细胞而影响卵母细胞成熟<sup>[31]</sup>。综上所述,排卵时 EGF 信号网络降低了卵丘颗粒细胞的 cGMP 进入卵母细胞,同时体内 LH 或体外 FSH 激活 EGF 信号网络,导致卵丘颗粒细胞发生一系列的生理变化而诱导卵母细胞成熟。

### 2.3 EGF 类因子对卵母细胞代谢的调控

COC 代谢是影响卵母细胞成熟和发育的一个重要因素。研究表明,相对于 FSH,EGF 类生长因子增强了牛(*Bos taurus*)卵丘颗粒细胞的糖酵解<sup>[32]</sup>。另有研究发现,相对于 FSH,EGF 类生长因子诱导了小鼠卵母细胞线粒体较高水平的膜电位,增强了卵母细胞氧化磷酸化,促进了 ATP 的产生,而且,AREG 和 EREG 提高了卵丘卵母细胞复合体氨基己糖通路代谢活性,进而促进透明质酸的合成,增强卵丘颗粒细胞扩散,同时促进了卵丘颗粒细胞的糖基化<sup>[33,34]</sup>。对牛、小鼠和猪(*Sus scrofa*)的研究表明,颗粒细胞增强糖基化与体外成熟的卵母细胞发育能力相关<sup>[35-37]</sup>,但 AREG 和 EREG 等 EGF 类生长因子诱导的颗粒细胞糖基化是否会影响卵母细胞发育能力,目前尚不确定,仍需进行深入研究。综上所述,EGF 类生长因子在调控卵丘颗粒细胞的糖酵解和卵母细胞氧化磷酸化方面发挥了重要作用,这可能是影响卵母细胞成熟和发育能力的关键因素。

## 3 EGF 类因子对卵母细胞发育能力的影响

### 3.1 EGF 类因子对卵母细胞发育能力的影响

由于 EGF 信号系统在诱导卵母细胞成熟和颗粒细胞扩散方面发挥了重要作用,因此,将 EGF 纳入体外成熟培养体系,有可能提高卵母细胞发育能力。

目前许多研究已证明,相对于体内成熟的 COC,体外成熟的 COC 颗粒细胞 EGF 类生长因子表达量较低。例如,Richani 等<sup>[38]</sup>研究发现,相对于小鼠体内成熟的 COC,FSH 诱导体外成熟的 COC,颗粒细胞 AREG 基因 mRNA 表达量及其蛋白的分泌较低。而且,基因芯片研究数据表明,相对于小鼠体内成熟的 COC,FSH 诱导体外成熟的 COC,颗粒细胞基因表达差异最显著的是 AREG,EREG 和 BTC 这 3 个 EGF 类生长因子<sup>[39]</sup>。体内 LH 峰刺激后 EGF 类因子主要由卵泡壁层颗粒细胞产生,是 COC 接受的诱导卵母细胞减数分裂的早期信号因子,导致卵丘颗粒细胞自动放大 EGF 信号网络。由于卵母细胞体外成熟培养期间,脱离了卵泡环境,COC 缺少来自于壁层颗粒细胞传递的 EGF 类因子的作用,不能激活 EGF 类因子受体,因此,颗粒细胞不能接受 ERK1/2-PGE<sub>2</sub>-p38MAPK 自动放大的信号。体外成熟的 COC 一般来自于小的生长卵泡,其卵丘颗粒细胞 EGF 信号系统尚处于发育阶段,体外培养期间,培养液内添加 FSH 可能部分克服 EGF 信号系统的缺陷。尽管如此,卵母细胞体外成熟培养期间,添加 EGF 类因子仍有利于卵母细胞成熟和发育。

鉴于体外成熟的 COC 颗粒细胞 EGF 信号系统缺陷,许多研究检验了体外成熟期间补充 EGF 类因子对卵母细胞发育能力的影响(表 1)。例如,在小鼠上的研究发现,卵母体外成熟期间,相对于 FSH 和 EGF,培养液添加 EREG 显著提高了卵母细胞成熟和受精后囊胚率,而且 EREG 和 AREG 结合使用显著提高了囊胚内细胞团细胞数,并增加了胎儿的数量<sup>[38]</sup>。Prochazka 等<sup>[10]</sup>研究报道,猪卵母细胞体外成熟期间,补充 EREG 或 AREG,相对于 FSH 和 LH,显著提高孤雌激活后的胚胎数量。这些结果揭示,生物活性的 EGF 类因子作为卵母细胞体外成熟的添加因子可能比 FSH 和 EGF 更适合,但具体的分子机制仍不清楚。这些研究说明,体内 FSH 和 EGF 不是诱导卵母细胞成熟的直接生理性因子,而体外成熟培养体系使用 EREG 和/或 AREG 可能模拟了体内卵母细胞成熟期间发生的生理事件,进而提高了卵母细胞发育能力。另外,Richani 等<sup>[38]</sup>发现,EREG 和 AREG 体内刺激了 EGF 类生长因子的表达,而

FSH 促进这些因子的表达能力有限。而且在卵母细胞体外培养期间,相对于 FSH, EREG 和 AREG 显著提高了 EGF 类生长因子的表达量,这些研究结果进一步证明 EGF 类因子是体内影响卵母细胞成熟的关键因子<sup>[40]</sup>。

一般认为 EGF 类因子对颗粒细胞基因表达、信号通路和细胞功能影响的能力低于促性腺激素,但其调控卵细胞发育的能力却高于促性腺激素的潜在机制是什么?目前研究认为,EGF 类因子的优势作用可能是影响了卵丘颗粒细胞和卵母细胞代谢。例如,用 AREG 处理牛 COC,相对于 FSH,能显著提高葡萄糖消耗量、乳酸的产量以及乳酸的产量/葡萄糖吸收量的比率<sup>[32]</sup>。对小鼠的研究发现,相对于 FSH 和 EGF,EGF 类因子增强了线粒体的活性,氨基己糖生物合成通路代谢活性,进而提高了透明质酸的产量和蛋白质  $\beta$ -O-连接糖基化的水平<sup>[33]</sup>。另外,EGF 类因子可能通过调控卵母细胞翻译而影响其发育能力。最近研究发现,EGF 或 AREG 作用于卵丘颗粒细胞产生的信号分子,可能介导了 FSH 调控卵母细胞中一些对胚胎发育起关键作用的基因 mRNA 的翻译<sup>[41]</sup>。但目前关于 EGF 类因子激活卵丘颗粒细胞何种信号通路而调控卵母细胞 mRNA 的翻译仍不确定,尚需进行深入研究。

### 3.2 EGF 类因子协同多种信号分子提高了卵母细胞发育能力

目前人们普遍认为,卵母细胞成熟期间,促性腺激素激活了 COC 多种信号通路,可能与 EGF 类因子信号通路协作影响卵母细胞减数分裂成熟和发育能力。这些受促性腺激素调控的众多信号通路,其中被卵母细胞分泌因子激活的信号通路能够延长卵丘颗粒细胞和卵母细胞间隙连接的通讯。GDF9 和 BMP15 是主要的卵母细胞分泌因子,能够增强 COC 对 EGF 类因子的敏感性而提高卵母细胞的发育能力(表 1)。例如,在牛上研究发现,AREG 与 BMP15 结合使用提高了体外成熟的卵细胞发育能力, BMP15 增强了颗粒细胞之间的间隙连接功能, AREG 增强了卵丘颗粒细胞的糖酵解, BMP15 维持了细胞间隙的通讯,进而使颗粒细胞产生的代谢物进入卵母细胞,提高其发育能力<sup>[32]</sup>。

另外,促性腺激素作用于 COC 后将产生大量的 cAMP, cAMP 水平的增加不仅能够延长卵丘颗粒细胞和卵母细胞间的通讯,也能增强对 COC 对 EGF 类因子的敏感性。例如,研究发现, cAMP 调控剂 (forskolin+IBMX) 前成熟处理 COC 后进行体外成熟, 体外成熟液中添加 AREG 和 EREG 显著提高了卵母

表 1 EGF 类因子对卵母细胞发育的影响

Table 1 Effects of EGF-like factors on oocyte developmental competency

EGF 类因子	功能	参考文献
AREG	促进了牛卵丘颗粒细胞的糖酵解	[32]
AREG 和 EREG	诱导了小鼠卵母细胞线粒体较高水平的膜电位,增强了卵母细胞氧化磷酸化,增强了 COCs 氨基己糖通路代谢活性,进而促进透明质酸的合成,同时促进了卵丘颗粒细胞的糖基化	[33,34]
EREG 和 AREG	EREG 显著提高了小鼠卵母细胞成熟和受精后囊胚率,而且 EREG 和 AREG 结合使用显著提高了囊胚内细胞团细胞数,并增加了胎儿的数量	[38]
EREG 和 AREG	显著提高了猪卵母细胞孤雌激活后的胚胎数量	[29]
AREG	作用于小鼠卵丘颗粒细胞产生的信号分子,介导了 FSH 调控卵母细胞中一些对胚胎发育起关键作用的基因 mRNA 的翻译	[41]
AREG	AREG 与 BMP15 结合使用提高了体外成熟的牛卵细胞发育能力	[32]
REG 和 EREG	cAMP 调控剂前成熟处理小鼠 COCs 后进行体外成熟,体外成熟液中添加 AREG 和 EREG 显著提高了卵母细胞的发育能力	[42]
AREG	双丁酰环腺苷酸与 GDF9 和 BMP15 蛋白前体结合使用,增强了 AREG 诱导的猪卵母细胞成熟和囊胚形成	[43]
AREG	CNP 和 GDF9 结合使用增强了 COCs 对 AREG 的反应能力,提高了腔前小鼠卵泡来源的卵母细胞发育能力	[44]

细胞的发育能力<sup>[42]</sup>。

此外,发育能力较低的猪卵母细胞,双丁酰环腺苷酸与 GDF9 和 BMP15 蛋白前体结合使用,增强了 AREG 诱导的卵母细胞成熟、囊胚形成以及颗粒细胞扩散相关基因(HAS2, TNFAIP6 和 PTGS2)的表达,而且,相对于促性腺激素,这些因子的结合使用促进了 EGF 类因子信号通路的下游因子 ERK1/2 的磷酸化<sup>[43]</sup>。另有研究发现,CNP 和 GDF9 结合使用增强了小鼠 COC 对 AREG 的反应能力,提高了腔前卵泡来源的卵母细胞发育能力,这些结果进一步说明 EGF 类因子信号系统在调控卵母细胞成熟和发育过程中的重要作用<sup>[44]</sup>。综上所述,体外成熟期间,EGF 类因子刺激卵母细胞恢复减数分裂,过早的使卵母细胞和卵丘颗粒细胞失去间隙连接功能,结合使用卵母细胞分泌因子和 cAMP 调控剂能够维持卵母细胞和颗粒细胞之间的间隙连接通讯功能,并能增强 EGF 信号系统功能,进而提高卵母细胞发育能力。

## 4 结语与展望

EGF 类因子信号网络是体内是排卵级联反应的关键参与者,卵母细胞从卵泡排出期间,EGF 类因子将 LH 信号从卵泡周边颗粒细胞传递至卵母细胞,调控了卵丘卵母细胞代谢,促进了卵母细胞成熟,而且,体外卵母细胞成熟期间,添加外源的 EGF 类因子能够提高卵母细胞发育能力,这说明其在优化卵母细胞体外成熟培养体系方面具有重要的利用价值。

目前研究认为 EGF 类因子增强了卵丘颗粒细胞糖酵解和卵母细胞氧化磷酸化功能,这可能是其提高卵母细胞发育能力的一个重要原因。而且,EGF 类因子也增强了卵丘颗粒细胞的糖基化,但其诱导颗粒细胞的糖基化是否会影响卵母细胞发育能力尚不确定,仍需深入研究。另外,EGF 类因子通过作用于卵丘颗粒细胞产生的信号分子,调控卵母细胞中一些对胚胎发育起关键作用的基因 mRNA 的翻译,这也可能是其提高卵母细胞发育能力的另一个原因,但 EGF 类因子激活卵丘颗粒细胞何种信号通路而调控卵母细胞 mRNA 的翻译亦不确定,尚需深入研究。

此外,卵母细胞成熟期间,EGF 类因子信号通

路可能和多种信号通路协作影响卵母细胞减数分裂成熟和发育能力。而且,体外成熟期间,EGF 类因子刺激卵母细胞恢复减数分裂,过早的使卵母细胞和卵丘颗粒细胞失去间隙连接功能,通过添加卵母细胞分泌因子和 cAMP 水平的调控剂 dbcAMP 或 CNP 维持了间隙连接功能,增强了 EGF 类因子在调控卵母细胞成熟和发育方面的作用。因此,为了模拟体内的环境,在完善卵丘颗粒细胞 EGF 类因子的信号系统的同时,使用间隙连接功能的增强剂,将可能建立理想的家畜卵母细胞体外成熟体系。

## 参考文献(References):

- [1] Eppig JJ, Pendola FL, Wigglesworth K. Mouse oocytes suppress cAMP-induced expression of LH receptor mRNA by granulosa cells *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 1998, 49(3): 327–332. [DOI]
- [2] Diaz FJ, Wigglesworth K, Eppig JJ. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt8): 1330–1340. [DOI]
- [3] Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, 2004, 303(5658): 682–684. [DOI]
- [4] Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Richards JS. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol Endocrinol*, 2006, 20(6): 1352–1365. [DOI]
- [5] Ashkenazi H, Cao X, Motola S, Popliker M, Conti M, Tsafiri A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology*, 2005, 146(1): 77–84. [DOI]
- [6] El-Hayek S, Demeestere I, Clarke HJ. Follicle-stimulating hormone regulates expression and activity of epidermal growth factor receptor in the murine ovarian follicle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(47): 16778–6783. [DOI]
- [7] Gupta S, Pandey S, Parmar MS, Somal A, Paul A, Panda BSK, Bhat IA, Baiju I, Bharti MK, Saikumar G, Sarkar M, Chandra V, Sharma GT. Impact of oocyte-secreted factors on its developmental competence in buffalo. *Zygote*, 2017, 25(3): 313–320. [DOI]
- [8] Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol*, 2005, 1: 2005.0010. doi:

- 10.1038/msb4100014. [DOI]
- [9] Fan HY, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science*, 2009, 324(5929): 938–941. [DOI]
- [10] Prochazka R, Blaha M. Regulation of mitogen-activated protein kinase 3/1 activity during meiosis resumption in mammals. *J Reprod Develop*, 2015, 61(6): 495–502. [DOI]
- [11] Diaz FJ, O'Brien MJ, Wigglesworth K, Eppig JJ. The preantral granulosa cell to cumulus cell transition in the mouse ovary: development of competence to undergo expansion. *Dev Biol*, 2006, 299(1): 91–104. [DOI]
- [12] Ritter LJ, Sugimura S, Gilchrist RB. Oocyte induction of EGF responsiveness in somatic cells is associated with the acquisition of porcine oocyte developmental competence. *Endocrinology*, 2015, 156(6): 2299–2312. [DOI]
- [13] Singh B, Rutledge JM, Armstrong DT. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Mol Reprod Dev*, 1995, 40(4): 391–399. [DOI]
- [14] Prochazka R, Kalab P, Nagyova E. Epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase activity regulates expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes *in vitro*. *Biol Reprod*, 2003, 68(3): 797–803. [DOI]
- [15] Caixeta ES, Ripamonte P, Franco MM, Junior JB, Dode MA. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reprod Fert Develop*, 2009, 21(5): 655–664. [DOI]
- [16] Boland NI, Gosden RG. Effects of epidermal growth factor on the growth and differentiation of cultured mouse ovarian follicles. *J Reprod Fertil*, 1994, 101(2): 369–374. [DOI]
- [17] Lorenzo P, Illera MJ, Sanchez J, Silvan G, Illera JC. The effect of EGF on cumulus expansion and bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 1992, 37(1): 250. [DOI]
- [18] Procházka R, Srsen V, Nagyová E, Miyano T, Flechon JE. Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte-cumulus cell complexes: nuclear maturation, expansion, and F-actin remodeling. *Mol Reprod Dev*, 2000, 56(1): 63–73. [DOI]
- [19] Garnett K, Wang J, Roy SK. Spatiotemporal expression of epidermal growth factor receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary: follicle stage-specific differential modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and progesterone. *Biol Reprod*, 2002, 67(5): 1593–1604. [DOI]
- [20] Almeida KC, Pereira AF, Alcântara Neto AS, Avelar SR, Bertolini LR, Bertolini M, Freitas VJ, Melo LM. Real-time qRT-PCR analysis of EGF receptor in cumulus-oocyte complexes recovered by laparoscopy in hormonally treated goats. *Zygote*, 2011, 19(2): 127–136. [DOI]
- [21] Inoue Y, Miyamoto S, Fukami T, Shiota K, Yotsumoto F, Kawarabayashi T. Amphiregulin is much more abundantly expressed than transforming growth factor- $\alpha$  and epidermal growth factor in human follicular fluid obtained from patients undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril*, 2009, 91(4): 1035–1041. [DOI]
- [22] Espey LL, Richards JS. Temporal and spatial patterns of ovarian gene transcription following an ovulatory dose of gonadotropin in the rat. *Biol Reprod*, 2002, 67(6): 1662–1670. [DOI]
- [23] Carletti MZ, Christenson LK. Rapid effects of LH on gene expression in the mural granulosa cells of mouse periovulatory follicles. *Reproduction*, 2009, 137(5): 843–855. [DOI]
- [24] Conti M, Hsieh M, Park JY, Su YQ. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol*, 2006, 20(4): 715–723. [DOI]
- [25] Panigone S, Hsieh M, Fu M, Persani L, Conti M. Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Mol Endocrinol*, 2008, 22(4): 924–936. [DOI]
- [26] Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science*, 2010, 330(6002): 366–369. [DOI]
- [27] Tsuji T, Kiyosu C, Akiyama K, Kunieda T. CNP/NPR2 signaling maintains oocyte meiotic arrest in early antral follicles and is suppressed by EGFR-mediated signaling in preovulatory follicles. *Mol Reprod Dev*, 2012, 79(11): 795–802. [DOI]
- [28] Downs SM, Daniel SA, Eppig JJ. Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *J Exp Zool*, 1988, 245(1): 86–96. [DOI]
- [29] Procházka R, Petlach M, Nagyová E, Nemcová L. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence *in vitro*: comparison with gonadotropins. *Reproduction*, 2011, 141(4): 425–435. [DOI]
- [30] Zamah AM, Hsieh M, Chen J, Vigne JL, Rosen MP, Cedars MI, Conti M. Human oocyte maturation is dependent on



- LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin. *Hum Reprod*, 2010, 25(10): 2569–2578. [DOI]
- [31] Downs SM, Chen J. EGF-like peptides mediate FSH-induced maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75(1): 105–114. [DOI]
- [32] Sugimura S, Ritter LJ, Sutton-McDowall ML, Mottershead DG, Thompson JG, Gilchrist RB. Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence: effects on gap junction-mediated metabolite supply. *Mol Hum Reprod*, 2014, 20(6): 499–513. [DOI]
- [33] Richani D, Sutton-McDowall ML, Frank LA, Gilchrist RB, Thompson JG. Effect of epidermal growth factor-like peptides on the metabolism of *in vitro*-matured mouse oocytes and cumulus cells. *Biol Reprod*, 2014, 90(3): 49. [DOI]
- [34] Richani D, Wang X, Zeng HT, Smitz J, Thompson JG, Gilchrist RB. Pre-maturation with cAMP modulators in conjunction with EGF-like peptides during *in vitro* maturation enhances mouse oocyte developmental competence. *Mol Reprod Dev*, 2014, 81(5): 422–435. [DOI]
- [35] Sutton-McDowall ML, Mitchell M, Cetica P, Dalvit G, Pantaleon M, Lane M, Gilchrist RB, Thompson JG. Glucosamine supplementation during *in vitro* maturation inhibits subsequent embryo development: possible role of the hexosamine pathway as a regulator of developmental competence. *Biol Reprod*, 2006, 74(5): 881–888. [DOI]
- [36] Pantaleon M, Tan HY, Kafer GR, Kaye PL. Toxic effects of hyperglycemia are mediated by the hexosamine signaling pathway and o-linked glycosylation in early mouse embryos. *Biol Reprod*, 2010, 82(4): 751–758. [DOI]
- [37] Frank LA, Sutton-McDowall ML, Brown HM, Russell DL, Gilchrist RB, Thompson JG. Hyperglycaemic conditions perturb mouse oocyte *in vitro* developmental competence via beta-O-linked glycosylation of heat shock protein 90. *Hum Reprod*, 2014, 29(6): 1292–1303. [DOI]
- [38] Richani D, Ritter LJ, Thompson JG, Gilchrist RB. Mode of oocyte maturation affects EGF-like peptide function and oocyte competence. *Mol Hum Reprod*, 2013, 19(8): 500–509. [DOI]
- [39] Kind KL, Banwell KM, Gebhardt KM, Macpherson A, Gauld A, Russell DL, Thompson JG. Microarray analysis of mRNA from cumulus cells following *in vivo* or *in vitro* maturation of mouse cumulus-oocyte complexes. *Reprod Fert Dev*, 2013, 25(2): 426–438. [DOI]
- [40] Blaha M, Nemcova L, Kepkova KV, Vodicka P, Prochazka R. Gene expression analysis of pig cumulus-oocyte complexes stimulated *in vitro* with follicle stimulating hormone or epidermal growth factor-like peptides. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015, 13: 113. [DOI]
- [41] Franciosi F, Manandhar S, Conti M. FSH Regulates mRNA translation in mouse oocytes and promotes developmental competence. *Endocrinology*, 2016, 157(2): 872–882. [DOI]
- [42] Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng HT, Wang X, Vos MD, Sugimura S, Smitz J, Richard FJ, Thompson JG. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction*, 2016, 152(2): R143–R157. [DOI]
- [43] Mottershead DG, Sugimura S, Al-Musawi SL, Li JJ, Richani D, White MA, Martin GA, Trotta AP, Ritter LJ, Shi J, Muelle TD, Harrison CA, Gilchrist RB. Cumulin, an Oocyte-secreted heterodimer of the transforming growth factor- $\beta$  family, is a potent activator of granulosa cells and improves oocyte quality. *J Biol Chem*, 2015, 290(39): 24007–24020. [DOI]
- [44] Romero S, Sánchez F, Lolicato F, van Ranst H, Smitz J. Immature oocytes from unprimed juvenile mice become a valuable source for embryo production when using C-type natriuretic peptide as essential component of culture medium. *Biol Reprod*, 2016, 95(3): 64, 1–10. [DOI]

(责任编辑: 史庆华)