

抗氧化剂对家畜胚胎体外发育影响的研究进展

金 磊^{1,2}, 张子敬^{2,3}, 朱肖亭^{2,3}, 吕世杰^{2,3},
黄永震⁴, 王二耀^{2,3}, 徐照学^{2,3}, 施巧婷^{2,3*}

(1. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002; 2. 河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 郑州 450002;
3. 河南省畜禽繁育与营养调控重点实验室, 郑州 450002; 4. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 现在研究普遍认为活性氧自由基是导致胚胎体外发育阻滞的主要原因。本文主要综述了不同抗氧化剂对牛胚胎体外发育的影响, 并分析其作用机制。

关键词: 活性氧自由基; 胚胎体外发育; 抗氧化剂

中图分类号: S811.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-9111(2019)06-0055-04

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是线粒体氧化产生的一种副产物, 其化学性质较活泼, 容易发生氧化还原反应。一般我们所说的活性氧自由基主要是指超氧阴离子自由基(O_2^-)、羟自由基($\cdot OH$)、过氧化自由基($ROO\cdot$)、一氧化氮自由基(NO)等^[1]。ROS可由酶促反应产生, 如黄嘌呤氧化酶、醛氧化酶、NADPH氧化酶等氧化酶通过使 O_2 发生单电子还原, 形成 O_2^- ^[2]; 各种代谢途径也会产生ROS, 如线粒体呼吸链经氧化磷酸化释放出大量活性氧; 外界环境中各种因素也会导致胚胎产生大量的ROS, 如环境中存在粉尘颗粒、有机溶剂, 氧气浓度过大、培养液中含有重金属离子等。在胚胎发育过程中适量的活性氧作为信号转化分子可以加速凋亡细胞的水解以及消灭突变细胞等方面起着积极作用^[3]。体外环境中的胚胎细胞由于缺乏相应还原性酶的存在(如过氧化氢酶、超氧化物歧化酶等), 导致氧化还原平衡被打破、活性氧积累。过量的活性氧会引起脂质过氧化, 氧化还原反应受阻、基因突变、线粒体的DNA损伤、膜结构破坏和合成障碍等, 造成ATP耗竭和细胞能量供应链断裂的同时诱发ROS下游相关信号通路的异常变化, 最终造成细胞损伤, 从而导致胚胎发育阻滞^[4]。因此, 在胚胎的体外培养过程中往往在培养基中加入抗氧化剂来清除活性氧, 减少其产生的危害, 以提高胚胎发育率。

1 抗氧化剂的分类及功能

机体的正常生命活动都在不断产生自由基, 正

常情况下机体内相应抗氧化酶(超氧化物歧化酶, 过氧化氢酶等), 可以清除一部分自由基, 使氧化还原处于动态平衡状态。但在各种因素刺激下, 如高氧、环境应激等, 自由基的清除就会遭到破坏, 机体正常生长发育受到影响, 导致胚胎发育阻滞。目前, 用于清除自由基的抗氧化剂通常分为来自体内的酶类抗氧化剂和来自体外的非酶类抗氧化剂两类。前者主要有超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化物酶(POD)等; 后者主要有维生素C、维生素E、谷胱甘肽(GSH)、白藜芦醇、姜黄素、褪黑素、微量元素硒等。

2 酶类抗氧化剂

2.1 超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶

超氧化物歧化酶(superoxidedismutase, SOD)是存在于机体细胞内的一种抗氧化金属酶, 它通过催化超氧阴离子自由基使其转化成氧和过氧化氢, 过氧化氢在谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的催化下还原成水和氧气, 二者在机体的氧化和抗氧化平衡中起到重要作用, 并与许多疾病有着密切关系^[5-6]。SOD催化中心含有1个金属阳离子, 根据金属离子的不同, SOD家族分为Cu/Zn-SOD、Fe-SOD、Mn-SOD和Ni-SOD 4种^[7]。Cu/Zn-SOD和Mn-SOD在真核生物中均有存在, Fe-SOD主要存在于原核生物和植物的叶绿体中, 目前只在链霉菌属和蓝细菌中发现Ni-SOD存在。Nagasaka

收稿日期: 2018-08-10 修回日期: 2019-08-22

基金项目: 国家肉牛牦牛产业技术体系项目(CARS-37); 国家重点研发计划“中原舍饲农区优质肉牛高效安全养殖技术应用与示范”项目(2018YFD0501700); 科研发展专项资金项目“外泌体MiRNA对体外胚胎发育影响研究”(2019CY08)

作者简介: 金磊(1993—), 男, 河南永城人, 硕士, 主要从事动物遗传与育种研究。E-mail: 1083567715@qq.com

* 通讯作者: 施巧婷(1972—), 女, 广西邕宁人, 博士, 副研究员, 主要从事家畜繁殖学研究。E-mail: sqts@126.com

等^[8]研究表明, Cu/Zn - SOD 增多会减轻因氧化物增加引起的肝损伤。马瑛等^[9]研究表明, 在斑马鱼胚胎早期由于耗氧量低, SOD 含量也较低; 在胚胎中后期由于需氧量的增加, SOD 含量升高从而清除过量的活性氧, 防止 ROS 对遗传物质的毒害作用, 保障胚胎能够正常发育。

谷胱甘肽过氧化物酶可根据分子中是否含硒分为: 硒谷胱甘肽过氧化物酶 (Se - GSH - Px) 和谷胱甘肽转硫酶 (GST), 二者均可以清除体内产生的过氧化氢。在过氧化氢酶含量很少或 H_2O_2 量很少的组织中, 如脑、精液, GSH - Px 可代替过氧化氢酶清除组织中 H_2O_2 ^[10]。另有研究表明给小鼠腹腔注射谷胱甘肽活性酶抑制剂后可显著降低小鼠胚胎的妊娠率^[11]。

2.2 过氧化氢酶

过氧化氢酶可清除超氧化物歧化酶歧化超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot -}$) 产生的过氧化氢 (H_2O_2), 保护并提高了 SOD 酶活性; 还可清除从其他部位扩散的 H_2O_2 , 使其分解为水 (H_2O) 和氧气 (O_2), 从而使胚胎免于遭受 H_2O_2 的毒害。Julia 等^[12]的研究表明, 小鼠胚胎发育畸形率随着过氧化氢酶活性的降低而增加, 加入外源过氧化氢酶可以阻断该现象。然而有研究表明, 随着年龄的增长体内过氧化氢酶浓度逐渐降低, 妊娠率逐渐降低, 但胚胎质量与过氧化氢酶浓度无关^[13]。Yasushi 等^[14]研究证实, 在小鼠的体外胚胎培养中, 事先对精子进行过氧化氢酶预处理, 处理组其囊胚率及孵化囊胚率显著升高。

3 非酶类抗氧化剂

3.1 维生素 C 和维生素 E

维生素 C (vitamin C, V_C) 又叫 L - 抗坏血酸, 具有较强的抗氧化性, 它可提供电子使 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , 后者可以维持胶原酶的活性而起到抗坏血病的作用; 还可以使氧化型谷胱甘肽还原为还原型谷胱甘肽, 后者可清除活性氧自由基, 保护胚胎发育。据 Hu 等^[15]的报道, 在猪胚胎体外培养时, 当加入 V_C (20 mg/mL) 后胚胎内 ROS 水平显著下降, 且囊胚率及囊胚细胞数显著增加。说明 V_C 抑制了 ROS 对胚胎的毒性作用。然而 Hossein 等^[16]研究结果显示, 一次性单独添加 VC 并不会对猪胚胎的体外发育产生影响, 当分两次进行添加时囊胚率显著升高。这有可能是因为胚胎发育不同阶段产生 ROS 的量以及对 ROS 的敏感性不同。研究证实, 一定的 V_C 还可以提高牛、羊卵母细胞的体外成熟率和卵裂率^[17-18]。

维生素 E (vitamin E, V_E) 是一种脂溶性抗氧化

剂, 主要保护细胞免受自由基的损伤, 提高胚胎发育能力。已被证实添加 V_E 可以提高牛^[19]、老鼠^[20]、羊^[21]、猪^[22]等胚胎发育潜能。据报道 V_C 还参与了 V_E 的再生, 保证了 V_E 作为抗氧化剂可以被不断重复使用, 并通过和自由基反应防止 V_E 被氧化。然而据 Dalvit 等^[23]报道, 在牛的体外成熟培养液中同时添加 V_C 和 V_E 其囊胚率却显著低于单独添加组, 这和 Hossein 等^[16]在猪上的研究结果相同, 然而当将 V_C 和 V_E 分 2 次添加 (0 和 96 h), 其囊胚率与胚胎质量显著提高。

3.2 白藜芦醇

白藜芦醇是一种生物性很强的多酚类化合物, 具有细胞内抗氧化功能。近年来, 有关白藜芦醇对胚胎体外发育的促进作用得到越来越多的证实。Wang 等^[24]研究发现, 在牛卵母细胞体外成熟培养液中加入白藜芦醇提高了卵母细胞成熟率和体外受精囊胚率, 并且其细胞内 ROS 水平显著降低。据 Kwak 等^[25]的报道, 在猪卵母细胞体外培养中添加 2 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇预处理可提高胚胎囊胚率以及胚胎发育潜力, 并且抑制了 Caspase - 3 的表达, 降低了卵母细胞凋亡率, 然而当加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇, 胚胎卵裂率和成熟率明显降低。说明白藜芦醇的生物学作用具有剂量依赖性, 浓度过高便会产生不利影响。Mukherjee 等^[26]研究表明, 在山羊卵母细胞体外培养中添加白藜芦醇可提高 GSH 水平, 提高孤雌胚胎和克隆胚胎的发育潜力, 说明白藜芦醇可通过提高细胞内谷胱甘肽水平, 改善胚胎发育潜能。Daichi 等^[27]研究发现, 在猪卵母细胞成熟液中添加白藜芦醇, 可增强沉默信息调节因子 (SIRT1) 的表达, 使线粒体功能增强, 从而促进卵母细胞的发育。在牛卵母细胞体外培养中也得到相同结论^[28]。

3.3 谷胱甘肽

谷胱甘肽 (GSH) 是一种由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸组成的三肽, 是细胞内一种重要的抗氧化物质。GSH 能维持卵母细胞在减数分裂过程中纺锤体的形态并防止其被氧化, 对胚胎的后续发育起着重要作用。Timme-Laragy 等^[29]以斑马鱼为实验模型研究发现, 在胚胎发育过程中, GSH 与胚胎内氧化应激有关, 通过清除 ROS 来保护半胱氨酸免受氧化损伤, 并且 GSH 还与胚胎代谢系统和 DNA 的甲基化有关。Zuelke 等^[30]在仓鼠上的研究发现, M II 期卵母细胞中每枚卵母细胞约含 3.24 pmol/L 的 GSH, 而在囊胚阶段则仅有 0.29 pmol/L, 约占 M II 期 GSH 含量的 9%。说明胚胎发育的不同阶段 GSH 含量也呈现明显差异, 随着分裂分化的进行而逐渐降低。在猪胚胎体外培养中添加 GSH, 能够有

效促进 ICSI 胚胎的卵裂率和囊胚率,并且囊胚凋亡细胞数显著降低,提高了胚胎质量和发育潜力,同时也降低了胚胎内源 ROS,对胚胎起到很好地保护作用。在牛胚胎体外发育实验中也得到相同结果,但浓度过高则会产生不利影响^[31-32]。据孙尉峻^[33]研究报道,3 mmol/L 为外源 GSH 在牛胚胎体外培养中最适添加浓度,能显著提高囊胚发育率和早期囊胚总细胞数,并能够促进 2-4 细胞期胚胎内源性 GSH 的增长。而据李凤^[34]研究发现,外源 GSH 通过 γ -谷氨酰循环促进牛胚胎内 GSH 的合成和胚胎的体外发育,并且 GGT 酶和 GCL 酶在其中扮演了重要角色。

3.4 褪黑素

褪黑素(melatonin, MT)是一种具有抗氧化能力的胺类激素,褪黑素可以激活 MT1 和 MT2 这两种 G 蛋白偶联受体,这两种受体对卵母细胞的生长具有调节作用。王淑娟等^[35]在牛的胚胎体外培养中发现,添加褪黑素可显著提高卵母细胞成熟率和胚胎发育潜能,并且 MT1 受体的表达量随胚胎的发育而升高。Zhao 等^[36]研究也有相同结论。MT 作为一种有效的抗氧化剂可显著降低细胞内 ROS 水平,改善卵母细胞的体外成熟与胚胎的体外发育潜能。Gitto 等^[37]研究表明,与 V_A 、 V_E 和 N-乙酰半胱氨酸相比,MT 更有利于卵母细胞的成熟。有研究证实 MT 对小鼠^[38]、猪^[39]胚胎体外发育也具有显著促进作用。作为抗氧化剂,MT 可以显著减少体外培养细胞的凋亡,改善胚胎质量。有研究证实,MT 可抑制绵羊颗粒细胞在热应激情况下引起的增殖减少和凋亡率增加^[40]。Su 等^[41]研究表明,MT 可抑制促凋亡基因 *p53* 和 *Bax* 的表达,并促进抗氧化基因 *SOD1* 和 *Gpx4*,抗凋亡基因 *BCL2L1* 和多能性相关基因 *SOX2* 在胚胎中的表达。

4 小结

卵母细胞和胚胎发育过程中细胞内的氧化和还原平衡对其发育至关重要,在体外培养中这种平衡很容易被打破,所以需要加入相关抗氧化物质以减少 ROS 对胚胎造成氧化损伤。了解胚胎的抗氧化机制也有助于培养液的优化,从而提高卵母细胞体外成熟率和胚胎发育潜能,为胚胎体外生产奠定基础。

参考文献:

- [1] 王福海,黄成华. 活性氧自由基的研究进展[J]. 广州化工, 2013,41(16):10-12.
- [2] 王崔平. 活性氧自由基的检测及其清除研究[D]. 北京:首都师范大学,2007.
- [3] Allen R G, Balin A K. Oxidative influence on development and dif-

- ferentiation: an overview of a free radical theory of development [J]. Free Radical Biology & Medicine, 1989, 6(6): 631-661.
- [4] Scheibye-Knudsen M, Fang E F, Croteau D L, et al. Protecting the mitochondrial powerhouse [J]. Trends in Cell Biology, 2015, 25(3): 158-170.
- [5] McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein) [J]. Journal of Biological Chemistry, 1969, 244(22): 6049-55.
- [6] Wallace D C. Mitochondrial diseases in man and mouse [J]. Science, 1999, 283(5407): 1482-1488.
- [7] 董亮,何永志,王远亮,等. 超氧化物歧化酶(SOD)的应用研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(5): 53-58.
- [8] Nagasaka H, Inoue I, Inui A, et al. Relationship between oxidative stress and antioxidant systems in the liver of patients with wilson disease; Hepatic manifestation in wilson disease as a consequence of augmented oxidative stress [J]. Pediatric Research, 2006, 60(4): 472-477.
- [9] 马瑛. 斑马鱼早期胚胎神经形成过程中 SOD 表达特点研究[J]. 广西农业科学, 2010, 41(10): 1117-1120.
- [10] 马森. 谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽转硫酶研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(10): 53-56.
- [11] 许袖. 谷胱甘肽过氧化物酶 3 在小鼠围床期子宫中的表达、调节与功能[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011.
- [12] Abramov J P, Wells P G. Embryoprotective role of endogenous catalase in acatalasemic and human catalase-expressing mouse embryos exposed in culture to developmental and phenytoin-enhanced oxidative stress [J]. 2011, 33(3): 361-73.
- [13] Wdowiak A, Wdowiak A. Comparing antioxidant enzyme levels in follicular fluid in ICSI-treated patients [J]. Gynécologie Obstétrique & Fertilité, 2015, 43: 515-521.
- [14] Kuribayashi Y, Gagnon C. Effect of catalase and thioredoxin addition to sperm incubation medium before in vitro fertilization on sperm capacity to support embryo development [J]. Fertility & Sterility, 1996, 66(6): 1012.
- [15] Hu J, Cheng D, Gao X, et al. Vitamin C enhances the *in vitro* development of porcine pre-implantation embryos by reducing oxidative stress [J]. Reproduction in Domestic Animals, 2012, 47(6): 873-879.
- [16] Hossein M S, Hashem M A, Jeong Y W, et al. Temporal effects of α -tocopherol and l-ascorbic acid on in vitro fertilized porcine embryo development [J]. Animal Reproduction Science, 2007, 100(1/2): 107-117.
- [17] 王爱兵. 维生素 C 对牛早期胚胎发育影响及体细胞克隆牛影响因素研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [18] Hammami S, Moratà R, Romaguera R, et al. Developmental competence and embryo quality of small oocytes from pre-pubertal goats cultured in IVM medium supplemented with low level of hormones, insulin-transferrin-selenium and ascorbic acid [J]. Reproduction in Domestic Animals, 2013, 48(2): 339-344.
- [19] Olson S E, Seidel G E. Vitamin E improves development of bovine embryos produced in vitro [J]. Theriogenology, 1995, 43(1): 289.
- [20] Silva E, Greene A F, Strauss K, et al. Antioxidant supplementation during in vitro culture improves mitochondrial function and development of embryos from aged female mice [J]. Reprod. Fertil.

- Dev., 2015, 27(6):975.
- [21] Natarajan R, Shankar M B, Munuswamy D. Effect of α -tocopherol supplementation on in vitro maturation of sheep oocytes and in vitro development of preimplantation sheep embryos to the blastocyst stage[J]. 2010, 27(8):483-490.
- [22] Jeong Y W, Park S W, Hossein M S, et al. Antiapoptotic and embryotrophic effects of α -tocopherol and l-ascorbic acid on porcine embryos derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer[J]. Theriogenology, 2006, 66(9):2104-2112.
- [23] Dalvit G, Llanes S P, Descalzo A, et al. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte *in vitro* maturation[J]. Reproduction in Domestic Animals, 2005, 40(2):93-97.
- [24] Wang F, Tian X Z, Zhang L, et al. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization[J]. Fertility & Sterility, 2014, 101(2):577-586.
- [25] Kwak S S, Cheong S A, Jeon Y, et al. Effects of resveratrol on porcine oocytes in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization[J]. Theriogenology, 2012, 78(1):86-101.
- [26] Mukherjee A, Malik H, Saha A P, et al. Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression[J]. J. Assist. Reprod. Genet., 2014, 31(2):229-239.
- [27] Daichi S, Nobuhiko I, Hidetaka T, et al. Relationship between mitochondrial DNA copy number and SIRT1 expression in porcine oocytes[J]. PLoS One, 2014, 9(4):e94488.
- [28] Sugiyama M, Kawahara-Miki R, Kawana H, et al. Resveratrol-induced mitochondrial synthesis and autophagy in oocytes derived from early antral follicles of aged cows[J]. Journal of Reproduction & Development, 2015, 61(4):251-259.
- [29] Timme-Laragy A R, Goldstone J V, Imhoff B R, et al. Glutathione redox dynamics and expression of glutathione-related genes in the developing embryo[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2013, 65(6):89-101.
- [30] Zuelke K A, Jeffay S C, Zucker R M, et al. Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos[J]. Molecular Reproduction & Development, 2003, 64(1):106-112.
- [31] Xia L X, Kyung-Bon L, Hye L J, et al. Glutathione and cysteine enhance porcine preimplantation embryo development *in vitro* after intracytoplasmic sperm injection[J]. Theriogenology, 2014, 81(2):309-314.
- [32] Sun W J, Pang Y W, Liu Y, et al. Exogenous glutathione supplementation in culture medium improves the bovine embryo development after *in vitro* fertilization[J]. Theriogenology, 2015, 84(5):716-723.
- [33] 孙尉峻. 外源谷胱甘肽对牛体外受精胚胎发育的影响[D]. 北京:中国农业科学院, 2015.
- [34] 李凤. 外源谷胱甘肽通过 γ -谷氨酰循环促进牛早期胚胎内 GSH 的合成[D]. 北京:中国农业科学院, 2018.
- [35] 王淑娟, 刘文举, 庞训胜, 等. 褪黑素对牛卵母细胞体外成熟及孤雌胚胎发育的影响[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2):361-366.
- [36] Zhao X M, Hao H S, Du W H, et al. Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes[J]. Journal of Pineal Research, 2016, 60(2):132-141.
- [37] Gitto E, Tan D X, Reiter R J, et al. Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: Studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2001, 53(10):1393-1401.
- [38] Gao C, Han H B, Tian X Z, et al. Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos[J]. Journal of Pineal Research, 2012, 52(3):305-311.
- [39] Suzuki C, Yoshioka K. Effects of glutamine and hypotaurine on oxidative stress of porcine embryos cultured *in vitro*[J]. Reproduction Fertility & Development, 2005, 17(2):278-279.
- [40] Fu Y, He C, Ji P, et al. Effects of melatonin on the proliferation and apoptosis of sheep granulosa cells under thermal stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(11):21090-21104.
- [41] Su J, Wang Y, Xing X, et al. Melatonin significantly improves the developmental competence of bovine somatic cell nuclear transfer embryos[J]. Journal of Pineal Research, 2015, 59(4):455-468.

Advances in the Study of the Effects of Antioxidants on the Development of *in Vitro* Embryos

JIN Lei^{1,2}, ZHANG Zi-jing^{2,3}, ZHU Xiao-ting^{2,3}, LV Shi-jie^{2,3},

HUANG Yong-zhen⁴, WANG Er-yao^{2,3}, XU Zhao-xue^{2,3}, SHI Qiao-ting^{2,3*}

(1. College of Animal Husbandry and Medical Engineering, He'nan Agriculture University, Zhengzhou 450002;

2. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, He'nan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002;

3. He'nan Key Laboratory of Livestock and Poultry Breeding and nutrition Regulation, Zhengzhou 450002;

4. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: At present, it is generally believed that reactive oxygen species (ROS) are the main cause of *in vitro* embryo development block. In this paper, the effects of different antioxidants on the development of bovine *in vitro* embryos were reviewed and their mechanisms were analyzed.

Key words: reactive oxygen species (ROS); *in vitro* embryonic development; antioxidants