

维生素 E 提高牛孤雌胚胎的体外发育研究

李瑞文, 李向臣, 安志兴, 张 涌*

(西北农林科技大学生物工程研究所, 杨凌 712100)

摘 要: 体外生产的牛孤雌胚胎用添加了 VE, VE+ VC 的 CR1aa 培养液, 置 38.5 °C 5% CO₂, 饱和湿度的培养箱中进行培养。通过荧光染料 Hoechst 33342 对胚泡进行荧光染色, 检测孵化囊胚的总细胞数。结果表明, 当培养基中添加 100 μmol/L VE 时, 与对照组相比, 扩张囊胚发育率和胚泡的细胞总数显著提高 ($P < 0.01$); 当 VE 与 VC 联用时, 发育到早期囊胚、扩张囊胚、孵化囊胚的数量和胚泡的总细胞数均低于单独使用 VE 的培养组。

关键词: Vitamin E; 牛; 孤雌胚; 体外发育

中图分类号: S823.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)11-1135-04

在体内或体外条件下, 暴露在由内源性(如细胞的正常新陈代谢)或外源性的(辐射、化学等因素)生理过程所产生的自由基中的细胞会发生氧化作用。在强氧化条件下或细胞的抗氧化保护机制受到损害时, 就会破坏细胞结构的完整性甚至死亡^[1,2]。早期的哺乳动物胚胎对活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)造成的破坏是非常敏感的^[3], 当在体外条件下培养时, 氧自由基的产量会升高^[4]。当在培养基中添加能产生更多氧自由基的物质时, 发育到囊胚的牛胚胎数量以剂量依赖的方式减少^[5]。即使是亚致死的破坏也对胚胎产生不利的影响, 导致了阻滞、正常新陈代谢途径的扰乱及生长发育的损害。

Vitamin E (α-生育酚及其衍生物)是动物细胞中最重要的和最有效的脂溶性抗氧化物质, 在体内保护细胞免受自由基损害^[6], 体外亦然, 而且被认为是哺乳动物细胞膜上主要的自由基清除剂, 能够明显降低自由基诱导的 DNA 损伤, 保护细胞不受氧化应激作用, 从而抑制凋亡, 延长细胞的寿命及生存状态。Vitamin C(抗坏血酸)是一种重要的水溶性抗氧化物质, 是细胞外液的主要抗氧化剂。在某种条件下, Vitamin C 能通过使生育酚与氧自由基相互作用的产物转为更多的生育酚的方式而与 Vitamin E 协同作用^[7], 提高 Vitamin E 的抗氧化能力。

本试验通过体外添加 VE, VE 与 VC 联合培养牛孤雌激活胚胎, 根据胚胎的发育形态学特征及囊胚中细胞数目来比较其对体外产生胚胎发育力的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂

卵巢来源于西安屠宰场, VE、VC、M199、Hepes、丙酮酸钠、L-谷氨酰胺、Hoechst33342 等均购自 Sigma 公司, 尿促性素(HMG)购自宁波制药厂, 胎牛血清购自 Hyclone 公司。

1.2 方法

1.2.1 卵母细胞收集 将从屠宰场采集的卵巢置于 25~ 35 °C 的生理盐水中, 3~ 5 h 内运回实验室。用生理盐水洗涤 3 次, 用无菌注射器和高压灭菌的 12# 针头抽取直径为 2~ 8 mm 卵泡的卵泡液采集卵母细胞, 收集胞质均匀、卵丘细胞包裹完整的卵母细胞备用。

1.2.2 牛卵母细胞的体外成熟和孤雌激活 将收集的卵母细胞用平衡 2h 以上的卵母细胞成熟培养液(M199 9.5 g/L+ Hepes10 mmol/L, + 丙酮酸钠 1 mmol/L+ L-谷氨酰胺 2.5 mmol/L+ 尿促性素(HMG) 0.075 U/mL + 17β雌二醇(17βE₂) 1 μg/mL+ 10% (v/v) FBS) 洗涤 3 次后, 置于 38.5 °C 5% (v/v) CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。成熟培养 24 h 后置于含 0.1% (v/v) 透明质酸酶的无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS 中, 用吸管反复吹打或在振荡仪上振荡 30~ 60 s, 以彻底去除卵丘细胞。在体视显微镜下挑选出胞质均匀、具有明显第一极体的卵母细胞用 CR1aa 洗 3 次, 放入含 5 μmol/L 离子霉素

收稿日期: 2004-09-28

基金项目: “863”国家高技术研究发展计划(2001AA213081)

作者简介: 李瑞文(1977), 男, 内蒙古集宁人, 硕士生, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。Tel: 029-87091851; E-mail: liruiwen0001@163.com

* 通讯作者: 张 涌, E-mail: zhangly@public.xa.sn.cn

(ionomycin)的CR1aa中,于培养箱中激活5 min,然后在含2 mmol/L 6-DMAP的CR1aa中培养4h,用培养液洗3次后进行培养,48h检查卵裂率,每隔2 d换液一次,第4天开始添加10% (v/v) FBS,7~8 d检查囊胚发育率。

1.2.3 胚胎培养 将激活后的胚胎放于4孔培养板(Nunc)中进行培养,培养液为CR1aa+0.3% BSA+0.05%酒精(对照组)或CR1aa+0.3% BSA+100 $\mu\text{mol/L}$ (VE组)或CR1aa+0.3% BSA+100 $\mu\text{mol/L}$ Vitamin E+100 $\mu\text{mol/L}$ Vitamin C(VE+VC组),每孔加入500 μL CR1aa培养液,上面覆盖200 μL 石蜡油,在38.5 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 ,饱和湿度的条件下培养7~8 d,将24 h后未卵裂的卵母细胞挑出弃去。

1.2.4 荧光染色 在移入培养液7 d后通过发育的形态学阶段对胚胎进行评估,用Hoechst33342

对胚泡进行染色,参照Pursell^[8]的方法进行细胞核计数。

1.2.5 试验设计数据统计分析 采用单因素完全随机试验设计,每个试验重复20次以上。试验数据以均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。采用SPSS统计软件进行单因素方差分析与显著性检验。

2 结果与分析

2.1 VE、VC对牛胚胎发育的影响

当培养液中添加100 $\mu\text{mol/L}$ VE时,与对照组相比早期囊胚、扩张囊胚和孵化囊胚发育率显著提高($P < 0.01$) (见表1);当100 $\mu\text{mol/L}$ VC与VE联用时,发育到早期囊胚、扩张囊胚和孵化囊胚的数量均高于对照组,但低于单独使用Vitamin E(100 $\mu\text{mol/L}$)处理组。

表1 VE、VC对牛胚胎发育的影响

Table 1 Effect of VE, VC on bovine embryo development

处理 Treatment	卵裂数 No. of cleavage	桑椹胚/% Morulae	早期囊胚/% Early blast.	扩张囊胚/% Expanded blastocysts	孵化囊胚/% Hatched blastocysts
Control	38.7 \pm 0.03	51.64 \pm 0.02	39.33 \pm 0.07 ^a	26.43 \pm 0.09 ^a	10.71 \pm 0.06 ^a
VE(100 $\mu\text{mol/L}$)	46.1 \pm 0.01	61.07 \pm 0.03	43.51 \pm 0.05 ^b	30.42 \pm 0.03 ^b	17.43 \pm 0.04 ^b
VE+ VC(100 $\mu\text{mol/L}$)	40.9 \pm 0.04	58.94 \pm 0.05	41.97 \pm 0.02 ^b	29.59 \pm 0.05 ^b	16.53 \pm 0.03 ^b

同一列中标注不同字母表示差异极显著($P < 0.01$),标注相同字母表示差异不显著($P > 0.05$),下表同

Figures with different letters in the same column show significant difference($P < 0.01$), same letters show no differences($P > 0.05$). The following tables are the same

2.2 荧光染色结果

胚泡经Hoechst33342染色后,染色结果见图1~5,计数结果见表1。由表1可见,当培养液中添加100 $\mu\text{mol/L}$ VE时,孵化囊胚细胞数与对照组相比显著增加($P < 0.05$) (见表2);当100 $\mu\text{mol/L}$ VC与VE联用时,孵化囊胚细胞数低于单独使用VE(100 $\mu\text{mol/L}$)处理组。

表2 VE、VC对每个胚泡细胞数的影响

Table 2 Effect of VE, VC on number of cells per blastocyst

处理 Treatment	孵化囊胚细胞数 No. cells per blastocyst
Control	77.2 \pm 0.04 ^a
VE(100 $\mu\text{mol/L}$)	86.3 \pm 0.06 ^b
VE+ VC(100 $\mu\text{mol/L}$)	84.5 \pm 0.03 ^b

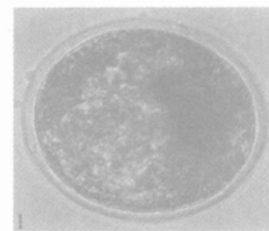


图1 早期囊胚

Fig. 1 Early blastocyst

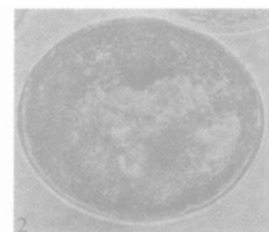


图2 扩张囊胚

Fig. 2 Expanded blastocyst

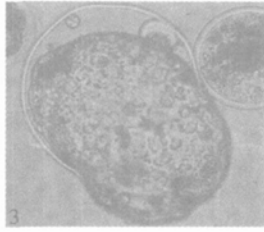


图 3 孵化囊胚

Fig. 3 Hatched blastocyst

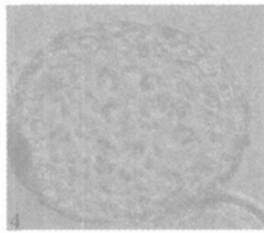


图 4 胚泡

Fig. 4 blastocyst

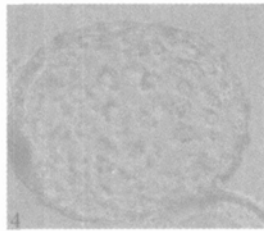


图 5 Hoechst 33342 染色

Fig. 5 Hoechst33342 staining

3 讨论

对于一系列与卵母细胞或胚胎相关的技术(如胞质内精子注射及细胞克隆、核移植)来说,孤雌生殖是非常基本而且重要的。孤雌胚与体内产生的胚胎相比质量上有很大的不同,体外产生的过程会深刻地影响形成囊胚的潜力、胚胎的总细胞数、内细胞团及凋亡的发生。而且,孤雌胚有一个较高的细胞凋亡率、较低的卵裂率及低的囊胚发育率^[9]。过量氧自由基的产生是造成这一结果的主要原因。为了提高孤雌胚的胚胎质量及囊胚发育率,降低凋亡率,国外学者做了大量研究,国内鲜见报道。在孤雌生殖过程中,孤雌胚胚泡的平均细胞数是决定胚胎后期发育的主要因素,单倍性孤雌胚胚泡出现的百分率是非常高的,这样的倍性是造成囊胚发育率低的主要原因。本试验通过在培养液中添加 100 $\mu\text{mol/L}$ VE, 或 100 $\mu\text{mol/L}$ VE+ 100 $\mu\text{mol/L}$ VC 对牛孤

雌胚进行培养,从胚胎发育的形态学特征来检测其囊胚发育率,通过 Hoechst 33342 荧光染色对胚泡的总细胞数进行评估。结果表明,与对照组相比,VE 添加组显著提高了牛囊胚的发育率和胚泡总细胞数($P < 0.01$),当 VE 与 VC 联用时,与单独添加 VE 组相比,胚胎的发育率和囊胚的总细胞数降低了,这与 Olson^[10]的研究结果相一致,但囊胚发育率与其相比显著提高。VC 作为一种促氧化作用而不是抗氧化作用^[11]。作者认为,VE 能显著提高牛孤雌胚囊胚发育率的原因可能是通过结合更多的活性氧自由基进而抑制其凋亡来实现的。

VE 的主要生物学功能是保护质膜上的多聚不饱和脂肪酸,这些膜脂质的过氧化物能够损坏质膜的结构,影响它的功能及通透性,最终导致不可逆转的细胞伤害或死亡。VE 和 VC(主要的水溶性抗氧化物质)之间存在着复杂的关系。在体外条件下,VC 能够使遭受了自由基攻击的 VE 获得再生而且通过直接与自由基反应来保护 VE 不受氧化作用^[12]。我们希望通过二者的联合使用,能够使胚胎的发育能力得到进一步的提高。事实上,当添加 VC 时,与单独添加 VE 组相比,胚胎的发育能力却降低了。本试验所用维生素浓度是以接近生理浓度水平为依据。人血浆中正常 VC 浓度为 30~150 $\mu\text{mol/L}$ ^[13],使用的 VE 浓度约为正常人血浆中浓度的 4~5 倍^[14],而且此浓度已被证明对体外产生的小鼠胚胎有保护作用^[15]。由于 VE 是脂溶性的,不溶于水,在培养过程中,其作用于细胞的真实浓度要小于设定的值。

总之,VE 能够提高牛孤雌胚的体外发育率和胚泡细胞总数,促进孤雌胚胎的体外发育力。

参考文献:

- [1] Krinsky N I. Dietary reference intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids [J]. National Academy Press, Washington, 2000, 1: 486.
- [2] Halliwell B, Gutteridge J M, Cross C E. Review article: free radicals, antioxidants and human disease: where are we now[J]? J Lab Clin Med, 1992, 119: 598~ 620.
- [3] Johnson M H, Nasr-Esfahani M H. Radical solutions and cultural problems: could oxygen radicals be responsible for the impaired development of mammalian *in vitro*[J]? Bioessays, 1994, 16: 31~ 38.
- [4] Goto Y, Noda Y, Mori T, et al. Increase generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*

- [J]. *Theriogenology*, 1993, 15: 69~ 75.
- [5] Fujitani Y, Kasai K, Ohtani S, et al. Effect of oxygen concentration and free radicals on *in vitro* development of *in vitro*-produced bovine embryos[J]. *J Anim Sci* 1997, 75: 483~ 489.
- [6] Sinha P, Kolleck I, Hans-Dieter V, et al. Vitamin E deficiency sensitizes alveolar type II cells for apoptosis [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 91~ 98.
- [7] Machlin L J, Gabriel E. Interactions of Vitamin E with Vitamin C, and Interactions: Vitamins, Minerals and Hazardous Elements[J]. *Ann N Y Acad Sci* 1980, 355: 98~ 107.
- [8] Gao F, Shi H Y, Daughy C, et al. Maspin plays an essential role in early embryonic development[J]. *Development*, 2004, 131(7): 1 479~ 1 489.
- [9] Hao Y H, Lai L X, Mao J D, et al. Apoptosis in parthenogenetic preimplantation porcine Embryos[J]. *Biol Reprod*, 2004, 70: 1 644~ 1 649.
- [10] Olson S E, Seidel Jr G E. Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with Vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients[J]. *Biology of Reproduction*, 2000, 62: 248~ 252.
- [11] Kline K, Lawson K A, Yu W P, et al. Vitamin E and breast cancer prevention: current status and future Potential[J]. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2003, 8(1): 90~ 102.
- [12] Lutsenko E A, Careamo J M, Gdde D W. Vitamin C Prevents DNA mutation induced by oxidative stress[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(19): 16 895~ 16 899.
- [13] Seis H, Stahl W, Sundquist A R. Antioxidant function of Vitamins[J]. *Ann NY Acad Sci*, 1992, 669: 7~ 20.
- [14] Bieri J G, Farrell P M. Vitamin E[A]. In: Munson P L, Glover J, Diczfalusy E, et al. *Advances in Vitamins and Hormones in Research and Applications* [M]. New York: Academic Press, 1976, 31~ 75.
- [15] Arechiga C G, Ealy A D, Hansen P J. Efficacy of Vitamin E and glutathione for thermoprotection of murine morulae[J]. *Theriogenology*, 1994, 41: 1 545~ 1 553.

Vitamin E Improves Development of Bovine Parthenogenetic Embryo *in vitro*

LI Ru-wen, LI Xiang-chen, AN Zhi-xing, ZHANG Yong*

(*Institution of Bio-Engineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China*)

Abstract: *In vitro*-produced bovine parthenogenetic embryos were cultured with Vitamin E, Vitamin E and Vitamin C in CR1aa culture medium at 38.5 °C, 5% CO₂ and high-humidity air. Meanwhile, fluorescence dye Hoechst 33342 was used to stain the blastocyst, so as to calculate the total nuclei number of per blastocyst. The result shows that when added 100 μmol/L Vitamin E to the culture medium, the development rate of expanded blastocyst and the total number of blastocyst raised distinctly compare to the control ($P < 0.01$). When added Vitamin E and Vitamin C to the medium, the number of early blastocyst, expanded blastocyst, hatched blastocyst and the total cell number of blastocyst were lower to the Vitamin E treatment.

Key words: Vitamin E; bovine; parthenogenetic embryo; development

* Corresponding author

《养殖技术顾问》

通俗易懂 实用具体 内容丰富 服务周到

邮发代号: 14-304, 月刊, 每期定价: 5.60 元, 全年定价: 67.20 元

地址: 哈尔滨市道外区红旗大街 518 号 邮编: 150050

电话: 0451-86823517; 57633298

E-mail: yzjsgw@126.com http://www.china-zygw.com