

# WY14643 对小鼠早期胚胎抗氧化损伤的影响

胡德宝, 张 也, 张日欣, 张宝修, 李钟淑, 方南洙\*

(延边大学农学院 动物遗传育种与繁殖实验室, 延吉 133002)

**摘 要:** 旨在研究 WY14643 对小鼠早期胚胎发育的影响, 探讨 WY14643 对早期胚胎抗氧化损伤的机理。通过  $H_2O_2$  诱导建立胚胎氧化损伤模型, 添加 WY14643 对胚胎进行体外培养, DCHFDA 测定胚胎内部  $H_2O_2$  含量, 分别用超氧化物歧化酶(SOD)和微量丙二醛试剂盒测定胚胎不同发育阶段 SOD 活性和丙二醛 MDA 含量, 并观察后续胚胎发育情况。结果表明: (1) 不同浓度 WY14643 处理 2 h 后,  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  WY14643 处理组 4-细胞率、囊胚率显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ ); (2) 经  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  WY14643 和  $H_2O_2$  联合处理后, 其胚胎发育率显著高于单独  $H_2O_2$  处理组和对照组 ( $P < 0.05$ ); (3) DCHFDA 荧光检测发现, WY14643 添加组胚胎内部  $H_2O_2$  水平显著低于其他各组 ( $P < 0.05$ ); (4) 经 SOD、MDA 检测, 发现添加 WY14643 胚胎内部各时期 SOD 水平显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ ), MDA 水平显著低于其他各组 ( $P < 0.05$ )。综上所述, 氧化应激对早期胚胎发育是不利的, WY14643 通过增加抗氧化酶 SOD 活性、降低脂质损伤等途径减少胚胎内部 ROS, 增加抗氧化能力, 促进胚胎在体外更好地发育。

**关键词:** WY14643; 氧化损伤; 早期胚胎; 发育能力

中图分类号: S814.8

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)04-0547-06

## Effects of WY14643 on Antioxidative Damage of Early Mouse Embryos

HU De-bao, ZHANG Ye, ZHANG Ri-xin, ZHANG Bao-xiu, LI Zhong-shu, FANG Nan-zhu\*

(Laboratory of Animal Genetic Breeding and Reproduction, Agricultural College of Yanbian University, Yanji 133002, China)

**Abstract:** The objective of this experiment was to study the effect of WY14643 on the development of early embryos and to explore the mechanisms of antioxidative damage capacity in early mouse embryos. The model of oxidative damage was established by  $H_2O_2$  and added WY14643 to the medium of *in vitro* culture.  $H_2O_2$  level in embryos were measured by DCHFDA. SOD activities and MDA contents were determined by using superoxide dismutase and malondialdehyde assay kit, respectively. The results showed that: (1) after different concentrations of WY14643 processing to 2 h, 4-cell rate and blastocyst rate in the group of  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  WY14643 treatment was significantly higher than other groups ( $P < 0.05$ ); (2) after  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  WY14643 with  $H_2O_2$  co-culture, the embryo development rate was significantly higher than only  $H_2O_2$  treatment group and control group ( $P < 0.05$ ). (3) through DCHFDA fluorescence detection, the  $H_2O_2$  level of WY14643 adding group was significantly lower than other groups ( $P < 0.05$ ). (4) from the SOD activities and MDA contents detection, we found that SOD level of adding WY14643 group was significantly higher than other groups within each period ( $P < 0.05$ ) as opposite to the MDA level were significantly lower than other groups ( $P < 0.05$ ). Those results indicated that WY14643 could improve the development of embryo by increasing activity of SOD enzymes to reduce lipid damage and then decrease the  $H_2O_2$  level of the embryos *in vitro* culture.

收稿日期: 2013-11-02

基金项目: 国家自然科学基金(31360546); 吉林省科技厅重点项目(20100228)

作者简介: 胡德宝(1987-), 男, 天津人, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: hdbky@163.com

\* 通信作者: 方南洙, 教授, E-mail: nzfang@ybu.edu.cn

**Key words:** WY14643; oxidative damage; early embryo; developmental competence

哺乳动物早期胚胎在体外培养的过程中会产生发育阻滞现象<sup>[1-2]</sup>。近年来,关于小鼠早期胚胎体外培养发育阻滞的原因和影响因素已有大量的报道,大多数品系小鼠早期胚胎体外培养过程中会存在 2-细胞期 G2 时相延长的特点,即 2-细胞阻滞(2-cell block)现象<sup>[3]</sup>。因为在这个时期,胚胎内部正进行着一系列的后续发育的准备过程,若胚胎在体外培养,由于缺少输卵管的内部保护机制,就非常容易引起氧化应激导致胚胎发育阻滞。活性氧(Reactive oxygen species, ROS)是细胞内部由于新陈代谢作用发生氧化还原反应生成很多自由基,生成的自由基包括超氧阴离子( $O_2^-$ )自由基、羟自由基( $HO^-$ )、一氧化氮( $NO^-$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )等,在各种哺乳动物的卵母细胞和早期胚胎发育的过程中各种代谢和培养环境中都有可能产生过量 ROS<sup>[4-5]</sup>导致氧化应激现象发生,引起细胞 DNA、脂质及蛋白质的损伤<sup>[6]</sup>,甚者将会产生细胞碎片<sup>[7]</sup>严重阻碍了早期胚胎的体外发育。

过氧化物酶体增植物激活受体(PPAR)是核受体家族中的配体激活受体和过氧化物酶体的增殖等功能有着紧密的联系,它包括  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  3 种形式亚型,PPARs 在大多数细胞中都有所表达,尤其是在肾和心肌细胞中表达,同时具有非常重要生物学作用,不同的亚基其生物学功能不同<sup>[8]</sup>。WY14643 是人工合成的过氧化物酶体增植物激活受体  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ) 特异性受体激活剂,国内外研究发现 WY14643 在体内能够起到降低血糖浓度、抗细胞衰老和抵抗氧化等作用<sup>[9-10]</sup>。WY14643 激活 PPAR $\alpha$  后,PPAR $\alpha$  通过和视黄素 X 受体结合后形成异二聚体物质,这个异二聚体物和位于抗氧化靶基因特异性启动子区域的 DNA 序列相结合,通过构象的变化而调控抗氧化酶的活性<sup>[11]</sup>。T. Okaya 等<sup>[12]</sup>在肺损伤模型中的研究发现,WY14643 能够有效地克服氧化应激反应,降低氧化损伤。另有研究报道,PPAR $\alpha$  特异性的激动剂还能够刺激上皮上的细胞产生许多自由基,通过活性氧第二信使的作用刺激各种抗氧化酶的活性升高<sup>[13]</sup>。

小鼠早期胚胎在体外发育的过程中会受到 ROS 的影响引起发育阻滞现象。迄今为止,WY14643 对体外发育的早期胚胎抗氧化机理研究甚少,本研究旨在通过 WY14643 对小鼠早期胚胎发育的影响以及胚

胎内部 ROS、SOD、MDA 等含量的测定,探索 WY14643 对小鼠早期胚胎的抗氧化机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

昆明白系小鼠,8~10 周龄,购自延边大学实验动物中心。

### 1.2 试剂及仪器

孕马血清促性腺激素(Pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(Human chorionic gonadotropin, hCG) 购自宁波激素有限公司;微量丙二醛测定试剂盒(MDA)、总超氧化物歧化酶(SOD) 购自南京建成生物工程研究所;其他相关药品非特殊说明均购自 Sigma 公司;倒置显微镜(Nikon TMS);二氧化碳培养箱(TC2323);荧光显微镜 NU-425-600E;紫外可见分光光度计(NEWLABO);酶标仪(BIO-TEK)。

### 1.3 试验方法

1.3.1 胚胎的收集、处理和培养 挑选健康的雌性小鼠,每只供试小鼠于第 1 天的 18:00 腹腔注射 10 IU 的 PMSG,时隔 48 h 腹腔内注射 10 IU 的 hCG,然后与公鼠合笼,公母比例为 1:1,合笼 12 h 后检查小鼠阴道栓。脱颈处死注射 hCG 22 h 后的见栓小鼠,打开腹腔取出输卵管放置 M2 中,在显微镜下挑破输卵管壶腹部,用透明质酸酶( $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )脱去合子周围的卵丘细胞,2 min 后用 M2 清洗 2~3 遍,然后将收集好的无卵丘细胞的合子期胚胎分别放入之前做好的不同浓度药物的 50  $\mu\text{L}$  的小滴中(每小滴 10 枚)清洗 2 遍,再转移到相应培养液中,在饱和湿度、5%  $\text{CO}_2$  气相条件、37 $^\circ\text{C}$  的培养箱中培养一定时间,之后将其换成 M16 培养液孵育。每 24 h 进行换液,每 12 h 观察胚胎发育情况。

1.3.2 胚胎内部 ROS 含量检测 取 20 枚胚胎,置于  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  PVA 小滴中洗涤 2 遍,然后避光置于  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  2',7',二氯荧光素二乙酸盐(DCHFDA)染色液微滴中,放入培养箱孵育 15 min。将孵育后的胚胎冲洗干净,在荧光显微镜下荧光显色。用 Image-proplus 6.0 对荧光图片量化分析,结果用平均相对荧光强度相对值表示。

1.3.3 总 SOD 和 MDA 的测定 用总超氧化物歧化酶检测试剂盒和微量丙二醛测定试剂盒在紫外可

见分光光度计(NEWLABO)和酶标仪(BIO-TEK)上进行测定。测定步骤按说明书操作。胚胎中二者的含量分别用( $U \cdot mgprot^{-1}$ )和( $nmol \cdot embryo^{-1}$ )表示。

#### 1.4 试验设计

1.4.1 合子期胚胎于 0、10、25、50  $\mu mol \cdot L^{-1}$   $H_2O_2$  中孵育 30 min, 筛选引起氧化应激的有效致死浓度。

1.4.2 合子期胚胎于 0.0、0.1、0.5、5.0  $\mu mol \cdot L^{-1}$  WY14643 中孵育 2 h, 观察胚胎发育情况, 探究其促进胚胎发育最适浓度。

1.4.3 最低致死浓度  $H_2O_2$  与最适浓度 WY14643 联合处理, 观察与对照组、最低致死浓度的  $H_2O_2$  组(A 组)、 $H_2O_2$  与最适浓度 WY14643 联合处理组(B 组)以及最适浓度 WY14643 组(C 组)之间发育率的差异情况。

1.4.4 DCHFDA 荧光检测 1.4.3 中对照组、A 组、B 组、C 组中  $H_2O_2$  水平, 观察 WY14643 对  $H_2O_2$  的作用。

1.4.5 测定对照组、A 组、B 组、C 组中超氧化物歧

化酶 SOD 活性、脂质过氧化损伤 MDA 水平, 进一步分析 WY14643 引起的抗氧化保护机制。

#### 1.5 统计分析

2-细胞早期胚胎发育率、4-细胞期胚胎发育率和囊胚率分别为 2-细胞期胚胎、4-细胞期胚胎和发育的囊胚数占合子数的百分比。数据应用 SPSS 17.0 进行差异显著性分析, 以  $P < 0.05$  为差异显著标准。每组试验重复数  $> 3$  次。

## 2 结果与分析

### 2.1 外源 $H_2O_2$ 对小鼠合子发育的影响

用不同浓度的  $H_2O_2$  处理胚胎 30 min 后, 随后放入新的 M16 中继续培养到 72 h, 其发育率显著不同。由表 1 可知, 50  $\mu mol \cdot L^{-1}$   $H_2O_2$  组胚胎无法发育到囊胚阶段; 25  $\mu mol \cdot L^{-1}$  与 0、10  $\mu mol \cdot L^{-1}$  组相比显著性降低了 4-细胞发育率和囊胚发育率 ( $P < 0.05$ ); 0、10  $\mu mol \cdot L^{-1}$  组之间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。至此筛选出了 25  $\mu mol \cdot L^{-1}$   $H_2O_2$  为引起氧化应激导致胚胎发育受阻的有效致死浓度。

表 1 外源性  $H_2O_2$  对小鼠合子发育的影响

Table 1 Effect of exogenous  $H_2O_2$  on development of mouse zygotes

浓度/ $(\mu mol \cdot L^{-1})$	合子数	卵裂率	4-细胞	囊胚
Concentration	Zygote number	Cleavage	4-cell	Blastocyst
0	142	84.66 ± 3.76 <sup>a</sup>	57.81 ± 3.44 <sup>b</sup>	27.62 ± 5.14 <sup>b</sup>
10	137	86.66 ± 5.26 <sup>a</sup>	53.10 ± 6.46 <sup>b</sup>	22.34 ± 8.30 <sup>b</sup>
25	145	76.48 ± 3.28 <sup>b</sup>	37.01 ± 5.74 <sup>a</sup>	16.82 ± 4.90 <sup>a</sup>
50	144	32.56 ± 3.34 <sup>c</sup>	6.23 ± 4.22 <sup>c</sup>	0

同行数据后所标字母相异表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 所标字母相同表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。下表同。  $n = 5$

Different letters in the same row means significant difference between the treatments ( $P < 0.05$ ), same letter in the same row means not significant difference between treatments ( $P > 0.05$ ). The same as below.  $n = 5$

### 2.2 WY14643 对小鼠合子发育的影响

不同浓度的 WY14643 对小鼠合子发育影响见表 2。从表 2 可知, 各组之间卵裂率无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); 0.1  $\mu mol \cdot L^{-1}$  WY14643 组 4-细胞率显著高于 0.0、1.0、5.0  $\mu mol \cdot L^{-1}$  组 ( $P < 0.05$ ), 其余各组之间差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 0.1  $\mu mol \cdot L^{-1}$  组囊胚率显著高于 0.0、1.0、5.0  $\mu mol \cdot L^{-1}$  组 ( $P < 0.05$ ), 1.0  $\mu mol \cdot L^{-1}$  组显著高于 0.0、5.0  $\mu mol \cdot L^{-1}$  组 ( $P < 0.05$ )。可以看出 0.1  $\mu mol \cdot L^{-1}$  的 WY14643 显著提高了胚胎发育率。

### 2.3 WY14643 对 $H_2O_2$ 刺激后的小鼠胚胎作用

由  $H_2O_2$  诱导氧化应激的小鼠胚胎, 再经过最

适浓度的 WY14643 处理 2 h 后, 其对胚胎发育的影响见表 3, 在  $H_2O_2$  中添加 WY14643 的 B 组中卵裂率、4-细胞率、囊胚率显著高于单独  $H_2O_2$  的 A 组 ( $P < 0.05$ ), 同时 B 组中各阶段发育率均高于对照组, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 单独最适浓度 WY14643 组(C 组)显著高于 A、B 组 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 胚胎内部 ROS 的检测

收集各处理不同发育阶段胚胎避光 DCHFDA 染色, 蓝色波长光 (535 nm) 激发, 荧光显微镜观察  $H_2O_2$  的荧光强度 (图 1), 荧光图片量化分析见表 4。单独  $H_2O_2$  作用的 A 组其  $H_2O_2$  水平显著高于其他各组, 而单独 WY14643 作用的 C 组能显著性

表 2 WY14643 对小鼠合子发育的影响

Table 2 Effect of WY14643 on development of mouse zygotes

浓度/( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	合子数	卵裂率	4-细胞	囊胚
Concentration	Zygote number	Cleavage	4-cell	Blastocyst
0.0	140	85.25 $\pm$ 2.32 <sup>a</sup>	56.75 $\pm$ 3.23 <sup>a</sup>	27.64 $\pm$ 3.29 <sup>a</sup>
0.1	141	90.91 $\pm$ 2.22 <sup>a</sup>	67.88 $\pm$ 4.86 <sup>b</sup>	41.19 $\pm$ 1.13 <sup>c</sup>
1.0	149	88.97 $\pm$ 4.18 <sup>a</sup>	59.22 $\pm$ 5.74 <sup>a</sup>	33.37 $\pm$ 3.90 <sup>b</sup>
5.0	138	87.24 $\pm$ 2.13 <sup>a</sup>	52.10 $\pm$ 8.73 <sup>a</sup>	22.47 $\pm$ 8.84 <sup>a</sup>

表 3 WY14643 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激后的小鼠胚胎作用

Table 3 Effect of WY14643 on development of mouse zygotes by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced

组别 Group	合子数 Zygote number	卵裂率 Cleavage	4-细胞 4-cell	囊胚 Blastocyst
对照 Control	128	85.23 $\pm$ 2.53 <sup>b</sup>	56.33 $\pm$ 3.27 <sup>b</sup>	27.35 $\pm$ 4.24 <sup>b</sup>
A	132	75.32 $\pm$ 4.21 <sup>a</sup>	38.23 $\pm$ 5.25 <sup>a</sup>	17.34 $\pm$ 3.26 <sup>a</sup>
B	127	86.53 $\pm$ 6.72 <sup>b</sup>	60.24 $\pm$ 2.32 <sup>b</sup>	32.38 $\pm$ 8.66 <sup>b</sup>
C	141	91.58 $\pm$ 3.22 <sup>b</sup>	69.58 $\pm$ 3.82 <sup>c</sup>	40.52 $\pm$ 2.26 <sup>c</sup>

对照组, M16 培养液; A. 25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组; B. 25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  WY14643 组; C. 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  WY1464 组。下同

Control, M16 medium; A. 25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group; B. 25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  WY14643 group; C. 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  WY14643 group. The same as below

降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水平 ( $P < 0.05$ ); 联合处理的 B 组也在一定程度上降低了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的水平, 并且显著低于 A 组 ( $P < 0.05$ )。初步说明 WY14643 能引起 ROS 水平的下降。

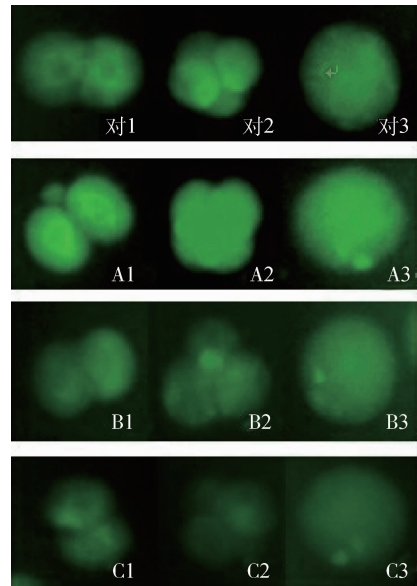
表 4 小鼠胚胎内部 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量

Table 4 Embryonic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in mouse

组别	2-细胞	4-细胞	囊胚
Group	2-cell	4-cell	Blastocyst
对照 Control	1.44 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	1.65 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	1.24 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>
A	1.69 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	1.94 $\pm$ 0.21 <sup>c</sup>	1.72 $\pm$ 0.35 <sup>c</sup>
B	1.40 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	1.56 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	1.13 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>
C	1.32 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	1.40 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	0.94 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>

2.5 不同处理后胚胎内部 SOD、MDA 的水平

SOD 活性和 MDA 含量是评价胚胎内部抗氧化水平的重要指标, 如图 2 所示, 在添加 WY14643 的 B 组和 C 组中胚胎发育各时期 SOD 的活性显著性高于对照组和 A 组 ( $P < 0.05$ ); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的 A 组 SOD 活性也略高于对照组但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。如图 3 所示, C 组 MDA 含量在胚胎发育的各时期都显著性低于其他各组 ( $P < 0.05$ ), 而 A 组 MDA 含量显著性高于对照组及其他各组 ( $P < 0.05$ ); 和对照组相比, B 组 MDA 含量略有下降, 但彼此差异不显著 ( $P > 0.05$ )。这 2 项重要的抗氧化指标的测定发现 WY14643 确实能够起到一定的抗氧化作用。



对 1~对 3. 对照组 2-细胞、4-细胞、囊胚的荧光染色; A1~A3. 25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 2-细胞、4-细胞、囊胚的荧光染色; B1~B3. 25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  WY14643 组 2-细胞、4-细胞、囊胚的荧光染色; C1~C3. 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  WY14643 组 2-细胞、4-细胞、囊胚的荧光染色

Control 1-3. Control group 2-cell, 4-cell, blastocyst fluorescent staining; A1-A3. 25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group 2-cell, 4-cell, blastocyst fluorescent staining; B1-B3. 25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group + 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  WY14643 group 2-cell, 4-cell, blastocyst fluorescent staining; C1-C3. 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  WY14643 group 2-cell, 4-cell, blastocyst fluorescent staining

图 1 胚胎 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 荧光染色图 10 $\times$ 10, 25

Fig. 1 Embryonic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fluorescence staining figure 10 $\times$ 10, 25

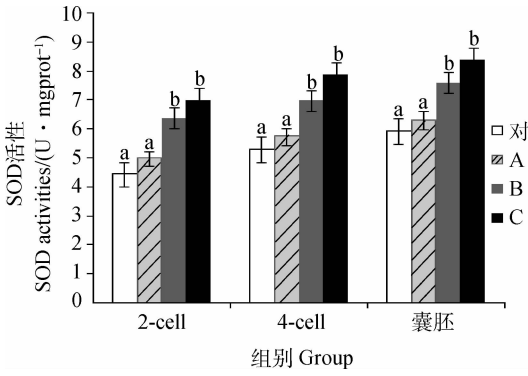


图2 胚胎内部 SOD 的活性  
Fig. 2 SOD activities of embryos

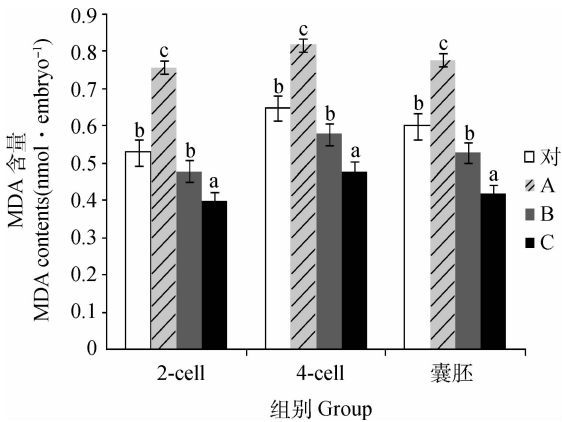


图3 胚胎内部 MDA 的活性  
Fig. 3 MDA content of embryos

### 3 讨论

ROS 是一种典型的活性氧物质,浓度过高能够引起细胞发生氧化损伤,导致胚胎内部出现代谢紊乱,产生氧化应激,使早期胚胎发育阻滞<sup>[14]</sup>。M. Legge 等<sup>[15]</sup>研究结果发现高浓度 ROS 能抑制正常细胞分裂,并且影响母型到合子型基因调控转换。在本试验中同样发现类似现象,经过一定浓度的外源性 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理合子期胚胎后,胚胎的发育能力明显下降。

WY14643 作为 PPAR $\alpha$  的一种特异性激动剂,PPAR $\alpha$  与氧化应激有着密切的关系,而且过氧化氢酶也被证实是 PPAR $\alpha$  的靶酶<sup>[16]</sup>,从而通过对抗氧化酶的调控来降低细胞内 ROS 水平,减少氧化应激反应。本试验中发现,经 25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  刺激氧化后,加入 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  WY14643,与对照组及单独加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组相比,WY14643 能显著性地提高胚胎的发育率,这可能是由于 WY14643 的加入有效地降低了 ROS 水平,促进了胚胎的发育有关。通过

DCHFDA 测定胚胎内部 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水平时发现,WY14643 添加组 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的水平显著低于其他各组,也证实了 WY14643 在胚胎发育的过程中能够减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量。SOD 是细胞内重要的清除和减少自由基的抗氧化酶,其活性反映了机体抗氧化损伤的能力<sup>[17]</sup>。为了进步了解 WY14643 在胚胎内部抗氧化机制,通过检测胚胎内部 SOD 的活性,发现 WY14643 组 SOD 活性显著高于其他组,这和 S. Jansen 等<sup>[18]</sup>在研究缺乏葡萄糖对小鼠胚胎的影响中,引起过氧化酶体增殖的结果相似。N. Marx 等<sup>[19]</sup>也发现,在人内皮细胞炎症反应后,由于 PPARs 被激活,发现 SOD 的酶活性表达上调。MDA 是脂质过氧化反应链终止阶段产生主要产物,具有很强的生物毒性,可引起细胞损伤,导致细胞结构和功能的改变。因此其含量可以间接反映自由基的产生情况和机体组织或细胞的脂质过氧化程度<sup>[20-21]</sup>。本试验中通过检测 MDA 的脂质过氧化损伤情况发现,在添加 WY14643 的处理组,其 MDA 水平显著性低于对照组和不添加组,这和王立奎等<sup>[22]</sup>研究的 WY14643 对缺氧复氧损伤原代大鼠肝细胞的保护作用及机制中发现的 WY14643 能够降低 MDA 含量的结果相一致。这说明 WY14643 在一定程度上通过激活 PPAR $\alpha$ ,提高了胚胎内部的抗氧化酶水平降低了 ROS 导致的脂质氧化损伤,促进了胚胎的发育。

过氧化物酶体是细胞内重要的生物氧化场所,包涵大量的抗氧化酶类,如 CAT、SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX),因此它对胚胎的抗氧化起着至关重要的作用,而 PPAR 和过氧化物酶体增殖<sup>[23]</sup>及细胞中一些抗氧化基因表达有着相当密切的关系<sup>[13,24]</sup>。WY14643 作为 PPAR $\alpha$  特异性激动剂,近年来其抗氧化作用越来越受到关注。而且国外临床研究发现<sup>[25]</sup>,WY14643 能够改善 2 型糖尿病患者的脂代谢导致的氧化损伤。然而 WY14643 在胚胎中的抗氧化信号转导途径以及分子作用机制和对后期胚胎发育的副作用还有待进一步研究。

### 4 结论

0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  WY14643 能够通过提高抗氧化酶 SOD 等活性,降低 ROS 水平,同时发现其能够降低脂质过氧化造成的 MDA 水平的下降,从而增加抗氧化能力,促进胚胎的发育。

## 参考文献:

- [1] BOWMAN P, MCLAREN A. Cleavage rate of mouse embryos *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1970, 24(1): 203-207.
- [2] TAKAHASHI Y, FIRST N L. *In vitro* development of bovine one-cell embryos; influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins[J]. *Theriogenology*, 1992, 37(5): 963-978.
- [3] FIAEH G, JOHNSON M H, BRAUDE P R, et al. The transition from maternal to embryonic control in the cell mouse embryo[J]. *EMBO J*, 1982, 1(6): 681-686.
- [4] DALVITG C, CETICA P D, PINTOS L N, et al. Reactive oxygen species in bovine embryo *in vitro* production[J]. *Biocell*, 2005, 29(2): 209-212.
- [5] NASR-ESFAHANI M H, AITKEN J R, JOHNSON M H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*[J]. *Development*, 1990, 109(2): 501-507.
- [6] APOSHIAN H V, ZAKHARYAN R A, AVRAM M D. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. *Ann Rev Plant Biol*, 2004, 55: 373-399.
- [7] YANG H W, HWANG K J, KWON H C, et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos[J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(4): 998-1002.
- [8] MARX N, PLUTZKY J. Peroxisome proliferator-activated receptors[J]. *Curr Atherosclerosis Rep*, 2002, 4(1): 59-64.
- [9] WILLSON T, BROWN P, STEMBACH D, et al. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery[J]. *J Med Chem*, 2000, 43(4): 527-550.
- [10] HILL M R, CLARKE S. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators on tumor necrosis factor expression in mice during endotoxemia[J]. *Infect Immun*, 1999, 67(7): 3488-3493.
- [11] BERGER J, MOLLER D E. The mechanisms of action of PPARs[J]. *Annu Rev Med*, 2002, 53(1): 409-435.
- [12] OKAYA T, LENTSCH A B. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  regulates postischemic liver injury[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 286(4): G606-G612.
- [13] INOUE I, GOTO S. The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) and PPAR $\gamma$  increase Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells[J]. *Metabolism*, 2001, 50(1): 3-11.
- [14] AL-GUBORY K H, FOWLER P A, GARREL C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(10): 1634-1650.
- [15] LEGGE M, SELLENS M H. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture[J]. *Hum Reprod*, 1991, 6(6): 867-871.
- [16] GIMUN G D, DOMANN F E, MOORE S A, et al. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter[J]. *Mol Endocr*, 2002, 16(12): 2793-2801.
- [17] ERTURK E, CEKIC B, GEZE S, et al. Comparison of the effect of propofol and N-acetyl cysteine in preventing ischaemia-reperfusion injury[J]. *Eur J Anaesthesiol (EJA)*, 2009, 26(4): 279-284.
- [18] JANSEN S, CASHMAN K. Glucose deprivation, oxidative stress and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (PPARA) cause peroxisome proliferation in preimplantation mouse embryos [J]. *Reproduction*, 2009, 138(3): 493-505.
- [19] MARX N, SUKHOVA G K, COLLINS T, et al. PPAR $\alpha$  activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells[J]. *Circulation*, 1999, 99(24): 3125-3131.
- [20] NOGUEIRA C R, BORGES F, LAMEU E, et al. Effects of supplementation of antioxidant vitamins and lipid peroxidation in critically ill patients[J]. *Nutr Hosp*, 2013, 28(5): 1666-1672.
- [21] BECANA M, DALTON D A, MORAN J F, et al. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules[J]. *Physiol Plant*, 2000, 109(4): 372-381.
- [22] 王立奎, 陈珂. WY1464 对缺氧复氧损伤原代大鼠肝细胞的保护作用及机制[J]. *山东医药*, 2010, 50: 19-21.
- [23] VANDE N, BOSCH H. Biochemistry of peroxisomes [J]. *Annu Rev Biochem*, 1992, 61(1): 157-197.
- [24] INOUE I, NOJI S, AWATA T, et al. Bezafibrate has an antioxidant effect: Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  is associated with Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>-superoxide dismutase in the liver[J]. *Life Sci*, 1998, 63(2): 135-144.
- [25] ANSQUER J C, FOUCHER C, RATTIER S, et al. Fenofibrate reduces progression to microalbuminuria over 3 years in a placebo-controlled study in type 2 diabetes; results from the diabetes atherosclerosis intervention study (DAIS) [J]. *Am J Kidney Dis*, 2005, 45(3): 485-493.