

董妍,管其标,张雪彤,等.白藜芦醇对猪卵母细胞体外老化的抑制作用[J].畜牧与兽医,2019,51(5):55-59.

Dong Y, Guan Q B, Zhang X T, et al. Effects of resveratrol (RES) inhibiting pig oocyte aging *in vitro* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 51(5): 55-59.

白藜芦醇对猪卵母细胞体外老化的抑制作用

董妍,管其标,张雪彤,钱雨鑫,郭昕怡,芮荣*

(南京农业大学动物医学院,江苏南京 210095)

摘要: 旨在研究白藜芦醇 (RES) 对猪卵母细胞体外老化的影响及机制。添加不同浓度 RES (0、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$) , 体外培养猪卵母细胞 44 h 后, 通过卵丘扩散和第一极体排出率筛选出最佳有效浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 。卵丘-卵母细胞复合体 (cumulus-oocyte complexes, COCs) 成熟培养 44 h 作为对照组, 连续培养 68 h 作为体外老化组, 置于含 2 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇成熟培养液中培养 68 h, 为白藜芦醇处理组。激光扫描共焦显微镜检测染色体和纺锤体, Western blot 检测凋亡相关蛋白 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 表达水平。结果表明: RES 处理组和对照组的猪卵母细胞染色体与纺锤体异常率均较老化组显著降低 ($P<0.01$)。用 2 $\mu\text{mol/L}$ RES 处理后, 猪卵母细胞 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达量均有下降, 显著低于老化组 ($P<0.001$); Bcl-2 蛋白表达量有所升高, 但差异不显著。试验表明, RES 可明显抑制猪卵母细胞的老化, 这一作用可能主要通过抑制线粒体凋亡途径来实现的。

关键词: 猪; 卵母细胞; 体外老化; 白藜芦醇

中图分类号: S814

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2019)05-0055-05

Effects of resveratrol (RES) inhibiting pig oocyte aging *in vitro*

DONG Yan, GUAN Qibiao, ZHANG Xuotong, QIAN Yuxin, GUO Xinyi, RUI Rong*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The purpose of the present study was to determine the effects of resveratrol (RES) on aging of pig oocytes *in vitro*. Pig oocytes were cultured for 44 h, and then different concentrations of RES (0, 1, 2 and 4 $\mu\text{mol/L}$) were separately added, and the oocytes treated with 2 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol during IVM were found to have significantly higher first polar body emission rates and better cumulus cell diffusion. Then, cumulus-oocyte complexes (COCs) were cultured for 44 h as a control group. In the aging group, the COCs were cultured for 68 h. As a resveratrol treatment group, the COCs were added to the culture solution containing resveratrol and were cultured for 68h. Finally, the chromosomes and spindles were examined by laser scanning confocal microscope, and Western Blotting was used to detect the relative expression levels of apoptosis-related proteins Caspase-3, Bcl-2 and Bax. The results showed that when the porcine oocytes cultured *in vitro* for 68 h, the abnormal rate of chromosome and spindle in the 2 $\mu\text{mol/L}$ RES group and the control group were significantly lower than those in the aging group ($P<0.01$), that the expressions of the Caspase-3 and Bax proteins in the 2 $\mu\text{mol/L}$ RES group were significantly lower than that in the aging group ($P<0.001$), and that the expression of the Bcl-2 protein was increased, but the difference was not significant. In conclusion, this experiment indicated that RES significantly inhibited the aging of oocytes, and this effect might be achieved mainly by inhibiting the mitochondrial apoptosis pathway.

Key words: pig; oocytes; aging *in vitro*; resveratrol

卵母细胞是雌性动物生殖细胞, 其质量决定了受精后胚胎的发育能力^[1-2]。卵母细胞未适时受精则会在体内衰老, 或体外培养后发生与时间相关的质量衰

退, 称之为卵母细胞老化^[3]。卵母细胞老化会造成受胎率下降, 流产率增高及妊娠缺陷^[4]。白藜芦醇 (RES) 是多酚类化合物, 主要来源于花生、葡萄 (红葡萄酒)、虎杖、桑椹等植物, 是植物为了应对机械性损伤、紫外线伤害和真菌感染而合成的一种抗毒素^[5]。已有 RES 抑制卵母细胞老化的报道, 但相关机制尚不明确。本试验旨在研究白藜芦醇对猪卵母细胞体外老化的作用及机理, 以期对相关研究与应用提供参考。

收稿日期: 2018-12-04; 修回日期: 2019-03-07

基金项目: 南京农业大学 SRT 计划 (1817A10); 国家自然科学基金 (31572589)

作者简介: 董妍 (1989-), 女, 硕士研究生

* 通信作者: 芮荣, 教授, 研究方向为动物生殖调控, E-mail:

rrui@njau.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 猪卵母细胞采集与成熟培养

在南京元润食品有限公司屠宰场采集猪卵巢，置于含 500 IU/mL 青、链霉素的 37 ℃ 无菌生理盐水中，2 h 内用保温瓶送达实验室；无菌条件下，用 37 ℃ 预热的 PBS 冲洗卵巢 2 次，抽吸法收集猪卵巢上直径为 3~6 mm 卵泡内的卵丘-卵母细胞复合体 (cumulus oocyte complexes, COCs)，实体显微镜下挑选包被 3 层及 3 层以上卵丘细胞的 COCs，随机分 4 组，分别添加 RES 0、1、2 和 4 $\mu\text{mol/L}$ ，将其移入 TCM-199 成熟培养液中，置于 38.5 ℃、5% CO_2 气相和饱和湿度的细胞培养箱中培养 44 h，筛选出白藜芦醇最佳有效浓度。再收集卵母细胞用作间接免疫荧光染色和凋亡相关蛋白表达分析。

1.2 体外老化和白藜芦醇处理猪卵母细胞

将白藜芦醇用二甲亚砜 (DMSO) 稀释为 10 mmol/L 的储备溶液，并在 -20℃ 保存。将白藜芦醇浓储备液加至 TCM199 培养液中，调节浓度至 2 $\mu\text{mol/L}$ 。COCs 培养至 44 h 作为试验对照组，培养至 68 h 作为体外老化组，置于含 2 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇成熟培养液中培养 68 h，作为白藜芦醇处理组。检测卵母细胞卵周隙变化。

1.3 间接免疫荧光染色与激光共聚焦显微镜观察

收集各组卵母细胞，在 4% 的多聚甲醛中室温固定 1 h，室温下用 1% 聚乙二醇辛基苯基醚 (TritonX-100) 通透 8 h，在 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 中于室温封闭 1 h；在 α -微管蛋白-异硫氰酸荧光素 (α -tubulin-FITC) 单克隆抗体 (1:200) 室温孵育 2 h，后用 10 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33342 室温下避光染核 10 min，洗涤液洗涤 3 次后甘油封片，用激光共聚焦显微镜 (Zeiss LSM700 META, Oberkochen, Germany)

观察，采用多通道或单通道观察封片后的细胞拍照并统计异常细胞比例。

1.4 Western blot 分析

每组收集 100 个卵母细胞，将卵母细胞放入裂解液中，确保所有细胞成功转移至含有裂解液的 1.5 mL 离心管中，然后 1 000 r/min 离心 2 min，然后放在 100 ℃ 水浴中煮 10 min，样品煮过后 1 000 r/min 离心 2 min，放置 -20 ℃ 避光保存。要避免反复冻融以防止样品中蛋白成分降解。本试验采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 法进行分离裂解液中的蛋白成分，通过制胶、灌胶、上样、电泳、转膜、抗体孵育和曝光显影及软件分析检测相关凋亡蛋白表达变化。

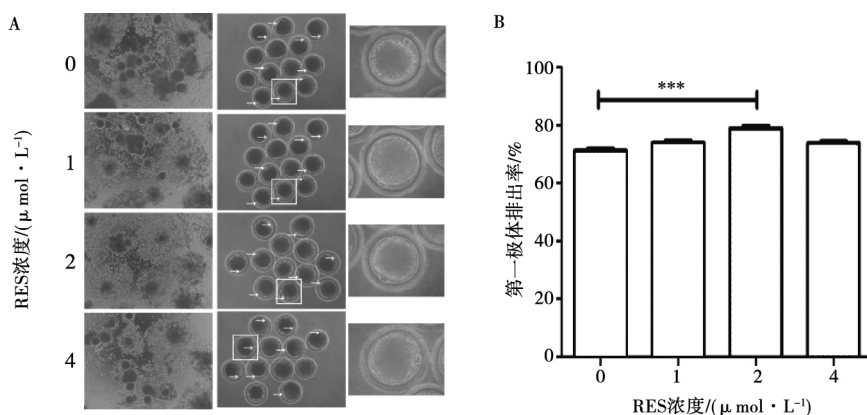
1.5 数据统计分析

每个组至少重复 3 次以上，数据采用 GraphPad Prism 5 分析，用方差分析 (Analysis of Variance, ANOVA) 对均数进行统计比较，结果以平均数 \pm 标准差表示， $P < 0.05$ 判为差异显著； $P < 0.01$ 判为差异极显著； $P < 0.001$ 判为差异极其显著。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 RES 对卵母细胞体外成熟的影响

在猪卵母细胞体外成熟培养液中分别添加 0、1、2 和 4 $\mu\text{mol/L}$ RES，培养 44 h 后，在显微镜下观察卵丘细胞的扩散情况，结果显示，浓度为 1 和 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 RES 组，卵丘扩散程度优于对照组和 4 $\mu\text{mol/L}$ RES 组 (图 1A)。在显微镜下观察卵母细胞第一极体 (pBI) 排出情况，通过进一步统计 pBI 排出率发现，2 $\mu\text{mol/L}$ 的 RES 组与对照组 pBI 排出率相比，差异极其显著 ($P < 0.001$)；1 $\mu\text{mol/L}$ 和 4 $\mu\text{mol/L}$ RES 组 pBI 排出率与对照组相比，差异不显著 (图 1B)。



注：与对照组相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。下同

图1 RES处理对猪卵母细胞卵丘扩散 (A, 100 \times) 和第一极体排出率 (B) 的影响

2.2 卵母细胞的卵周隙变化

在卵母细胞老化过程中, 卵周隙随着时间增加而增大, 且预示着发育能力降低^[6]。为进一步探讨白藜芦醇对老化卵母细胞的缓解作用, 显微镜下观察卵

周隙变化 (图 2A)。老化卵母细胞的卵周隙相比于对照组和 RES 处理组, 差异极其显著 ($P<0.001$), RES 处理组与对照组相比, 差异不显著 (图 2B)。

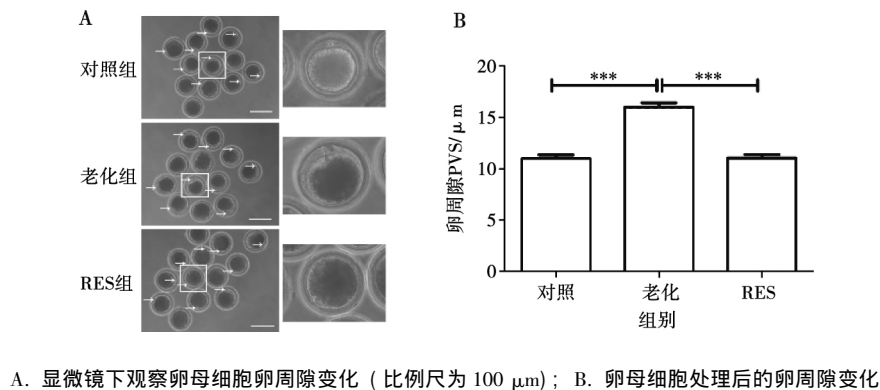


图 2 卵母细胞卵周隙变化

2.3 RES 处理对老化卵母细胞染色体和纺锤体的影响

为进一步探讨 RES 对猪卵母细胞老化是否有缓解作用, 通过免疫荧光染色结合激光共聚焦显微成像技术研究了卵母细胞染色体和纺锤体的变化, 结果如图 3A 所示, 老化组卵母细胞的染色体松散、纺锤体缺陷和排列紊乱。定量分析结果表明 (图 3B 和

3C), 老化组卵母细胞染色体异常率和纺锤体缺陷比例分别为 (44.38 ± 3.19)% 和 (42.60 ± 2.78)%, 均显著高于对照组 (12.59 ± 2.37)% (14.27 ± 2.80)%, ($P<0.001$)。RES 处理组染色体异常率和纺锤体缺陷比例分别为 (26.05 ± 3.77)% 和 (26.07 ± 1.85)%, 也明显高于对照组 ($P<0.05$), 但这一异常率显著低于老化组 ($P<0.01$)。

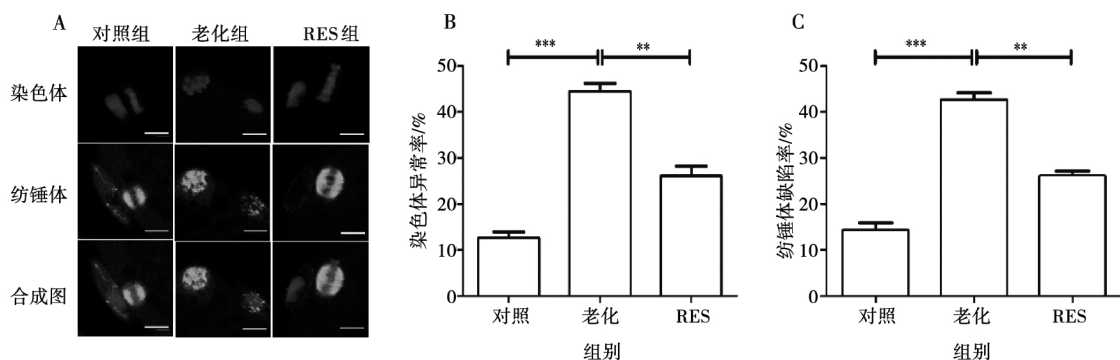


图 3 卵母细胞染色体和纺锤体变化

2.4 RES 对老化卵母细胞凋亡相关蛋白表达的影响

从图 4 中可以看出, 与对照组相比, 老化组 Caspase-3 和 Bax 表达量显著升高 ($P<0.001$), Bcl-2 表达量显著降低 ($P<0.001$)。RES 处理组 Caspase-3 表达量较对照组明显降低 ($P<0.01$), 且与老化组

相比, Caspase-3 表达量最低 ($P<0.001$), Bax 较对照组明显升高, 且差异极其显著 ($P<0.001$), 但这一表达量又显著低于老化组 ($P<0.001$), Bcl-2 表达量较对照组显著降低 ($P<0.001$), 仅略高于老化组 ($P>0.05$)。

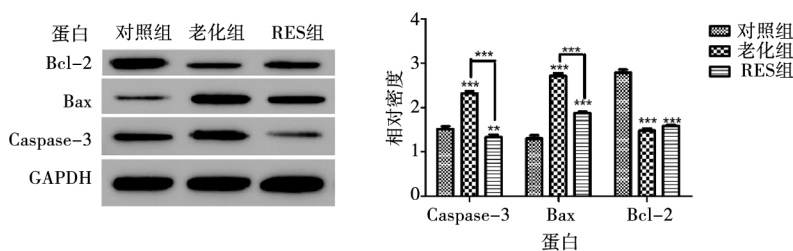


图4 RES对老化卵母细胞Caspase-3、Bax和Bcl-2表达的影响

3 讨论

RES是有益于人类健康的非黄酮类多酚化合物,它具有抗炎、抗氧化、抗癌、免疫调节、心脏保护、抗菌、抗凋亡^[7]、抗喘^[8]、调节血脂^[9]等一些其他生物活性。由于RES具有的各种生物活性,使得RES备受追捧。RES缓解卵母细胞老化已有一些报道,RES通过激活Sirt1活性提高线粒体功能、增加线粒体数量,减少老化对卵母细胞的影响^[10]。有研究表明,体外成熟培养液中添加2.0 μmol/L RES能增加细胞内谷胱甘肽以及降低活性氧含量,从而提高猪孤雌激活和体外受精胚胎的发育潜能;同时,RES能调节卵母细胞成熟相关基因的表达^[11]。本试验结果显示,在猪卵母细胞体外成熟培养44 h后,2.0 μmol/L RES可提高卵丘扩散率和增加卵母细胞体外成熟率。在继续培养到68 h后,卵周隙随着老化时间的增加而增大,而RES可缓解这一状况,同时,在老化卵母细胞中存在染色体松散、解聚和纺锤体缺陷,添加RES后,这一现象得到改善,染色体异常率和纺锤体缺陷比例显著降低。然而RES缓解卵母细胞老化的机制尚未明确,有待于今后试验中进一步研究。

细胞凋亡途径分为死亡受体介导的外源性凋亡途径和线粒体与内质网介导的内源性凋亡途径^[12]。Bcl-2家族与线粒体介导的内源性凋亡途径密切相关,其家族中抗凋亡蛋白(Bcl-2、Bcl-w、Bcl-xL等)和促凋亡蛋白(Bax、Bad、Bid等)之间的协同作用调控线粒体结构与功能的稳定性,在细胞凋亡中起关键作用^[13]。两种途径最后都活化Caspase-3,它被认为是细胞凋亡的主要诱导者,作为细胞凋亡过程的主要效应因子,Caspase-3能直接水解特异性底物,包括与DNA修复、复制,RNA剪切和细胞骨架相关的蛋白质^[14],且Caspase-3的活化是凋亡进入不可逆阶段的标志。细胞凋亡时,凋亡信号引起线粒体细胞色素C释放,细胞色素C和凋亡酶激活因子1(Apaf-1)、Caspase-9前体、ATP/dATP形成凋亡体,激活Caspase-3,引发Caspase级联反应,会导致核细胞骨

架重新组合,细胞骨架结构降解。而Bcl-2可抑制Caspase-3的激活,进而发挥抗凋亡作用。有研究表明^[15],活化的caspase-3促进了Ca²⁺的进一步释放,激活了更多的caspase-3,导致卵母细胞碎裂,加速老化。而卵母细胞老化会导致一系列形态结构变化,例如卵周隙增大、染色体松散分布、姐妹染色单体过早分离、纺锤体异常、皮质颗粒胞吐、透明带硬化、胞质破碎等^[16]。促凋亡相关蛋白Bax被证实参与了卵泡募集,Bax的缺失导致卵巢中卵母细胞数量增加^[17]。本试验中,老化组Bax和Caspase-3蛋白表达量增高,Bcl-2蛋白表达下降,RES作用于老化卵母细胞后,Bax和Caspase-3蛋白表达量降低,Bcl-2蛋白表达虽与老化组差异不明显,但有所提高。这个结果表明,RES可能通过下调Bax和Caspase-3,上调Bcl-2发挥其缓解卵母细胞老化作用。综上所述,RES在猪卵母细胞老化过程中,可缓解卵母细胞老化,抑制其凋亡,其潜在机制可能是抑制了线粒体凋亡途径的激活。

参考文献:

- [1] Wang Q, Sun Q Y. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors [J]. Reprod Fertil Dev, 2007, 19 (1): 1-12.
- [2] Zhang D, Keilty D, Zhang Z F, et al. Mitochondria in oocyte aging: current understanding [J]. Facts Views Vis Obgyn, 2017, 9 (1): 29-38.
- [3] Miao Y L, Kikuchi K, Sun Q Y, et al. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility [J]. Hum Reprod Update, 2009, 15 (5): 573-585.
- [4] Miao Y, Zhou C, Cui Z, et al. Postovulatory aging causes the deterioration of porcine oocytes via induction of oxidative stress [J]. FASEB J, 2018, 32 (3): 1328-1337.
- [5] Kong X X, Fu Y C, Xu J J, et al. Resveratrol, an effective regulator of ovarian development and oocyte apoptosis [J]. J Endocrin Invest, 2011, 34 (11): 374-381.
- [6] Miao Y, Ma S, Liu X, et al. Fate of the first polar bodies in mouse oocytes [J]. Mol Reprod Dev, 2004, 69 (1): 66-76.
- [7] Sanghoon Lee, Eun Jung Park, Joon Ho Moon, et al. Sequential treatment with resveratrol-trolox improves development of porcine

- embryos derived from parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer [J]. *Theriogenology*, 2015, 84: 145-154.
- [8] 何冰, 王经韵, 郑宇翔. 白藜芦醇抗喘活性及机制研究 [J]. *广东药学院学报*, 2012, 28 (4): 231-234.
- [9] Yu Y, Zhang N, Jiang H, et al. Resveratrol treatment improves plasma and blood glucose concentration and lipid metabolism in high-fat-fed C57BL/6J mice [J]. *Euro Food Res Tech*, 2016, 242 (11): 1-8.
- [10] Ma R J, Zhang Yu, Zhang L, et al. Sirt1 protects pig oocyte against *in vitro* aging [J]. *Anim Sci J*, 2015, 86: 826-832.
- [11] Kwak S, Cheong S, Jeon Y, et al. The effects of resveratrol on porcine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization [J]. *Theriogenology*, 2012, 78 (1): 86-101.
- [12] Fulda S. Alternative Cell Death Pathways and Cell Metabolism [J]. *Intern J Cell Biol*, 2013, (8): 463-467.
- [13] Zhao G, Zhu Y, Eno C O, et al. Activation of the proapoptotic bcl-2 protein bax by a small molecule induces tumor cell apoptosis [J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34 (7): 1198-1207.
- [14] Lord C E, Gunawardena A H. Programmed cell death in *C. elegans*, mammals and plants [J]. *Euro J Cell Biol*, 2012, 91 (8): 603-613.
- [15] Jiang Z, Lin FH, Jie Z, et al. The signaling pathways by which the Fas/FasL system accelerates oocyte aging [J]. *Aging*, 2016, 8 (2): 291-303.
- [16] 苗义良. 小鼠卵母细胞老化的分子调控及第一极体命运 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2004.
- [17] Greenfield C R, Pepling M E, Abus J K, et al. BAX regulates follicular endowment in mice [J]. *Reproduction*, 2007, 133 (5): 865-876.

倡导健康养殖新理念 解读疫病防控新技术

欢迎订阅 2019 年《畜牧与兽医》

《畜牧与兽医》渊源悠长, 1935 年创刊, 是全国最早公开发行的畜牧、兽医类国家级科技期刊。现由教育部主管、南京农业大学主办。始终遵循“为社会服务, 为畜牧生产服务”和“理论与实践相结合, 普及与提高并举”的办刊宗旨。本刊被美国化学文摘收录, 是全国中文核心期刊、江苏期刊方阵期刊、华东地区优秀期刊, 2004 年获教育部颁发的全国高校优秀期刊二等奖, 2015 年获中国高校技术类优秀期刊奖, 荣获历届全国畜牧兽医类优秀期刊一等奖, 在历次江苏省期刊质量评估和分级工作中均被评为一级期刊。

读者对象: 畜牧、兽医科技工作者和大专院校师生, 动物生产经营者和管理干部以及基层从业人员。

主要内容: 主要刊登畜牧、兽医两学科各领域的研究报告、文献综述与专论, 新的畜牧生产技术、疾病防治经验和兽医临床案例, 以及畜牧兽医资源的开发利用或其他新的信息。主要栏目有遗传繁育、动物营养、基础兽医、预防兽医、临床兽医和专题论述等。

征订办法: 本刊为月刊, 大 16 开, 定价: 28.00 元, 全年 12 期共 336.00 元。ISSN 0529-5130, CN 32-1192/S, 邮发代号: 28-42, 全国各地邮局均可订阅。邮局漏订者可直接汇款至本刊杂志社补订。

地 址: 江苏省南京市卫岗 1 号南京农业大学内 邮 编: 210095

电话 (传真): 025-84395701 (编辑部), 025-84396961 (广告部) E-mail: muyizz@njau.edu.cn

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告