

# 综述

## 生殖医学—辅助生殖技术

### 活性氧与女性生殖

广州第一军医大学南方医院生殖中心(510515) 付志红综述 邢福祺审校

**摘要** 活性氧(reactive oxygen species, ROS)是正常有氧代谢的产物,正常情况下,ROS的产生和清除保持动态平衡,但是当线粒体功能下降,ROS产生增加或细胞抗氧化机制受损时,可造成ROS的累积,导致细胞氧化应激损伤。在腹膜液、卵泡液和输卵管积水等重要的生殖微环境内都检测到ROS的存在,并发现腹腔液内ROS水平与不明原因不孕相关,多种生殖组织内存在不同的氧化/抗氧化系统,ROS可能参与卵母细胞老化、胚胎体外发育不良以及一些不孕原因的形成,在女性生殖中起重要作用。

**关键词** 女性不孕 卵母细胞 胚胎 氧化应激 活性氧

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是正常有氧代谢的重要产物,正常情况下ROS的产生和清除保持动态平衡,使ROS维持在细胞功能所必需的非常低的水平。但当线粒体功能下降,ROS产生增加或细胞抗氧化机制受损时,可造成ROS的累积,导致细胞氧化损伤,而氧化损伤进一步促进ROS的产生,形成一个恶性循环。另外,当线粒体抗氧化机制受损,如老化过程中出现低水平的ROS也能诱导体细胞的细胞周期停滞和老化。

ROS产生的氧化损伤主要包括细胞大分子如DNA、蛋白和脂质的氧化损伤。DNA的氧化损伤可导致核DNA和线粒体DNA突变或缺失,蛋白的氧化损伤导致重要酶失活,而细胞膜脂质过氧化导致膜流动性改变,进一步扩大氧化损伤效应。线粒体,特别是线粒体DNA是自由基攻击的重要目标。内源性ROS产生的持续性损伤可能是年龄相关的线粒体功能缺陷的原因。

ROS在男性不育中的作用已经得到证实<sup>[1]</sup>,25%~40%的不育男性精液中检测出高水平ROS。氧化损伤介导的精子膜损伤是很大一部分不育患者的精子功能缺陷的原因。近几年,在腹膜液、卵泡液和输卵管积水等重要的生殖微环境内都检测到ROS的存在<sup>[2,3]</sup>,并发现腹腔液内ROS水平与不明原因不孕相关,多种生殖组织内存在不同的氧化/抗氧化系统,ROS在女性生殖中的作用受到关注。

卵母细胞和早期胚胎可以调节ROS水平

动物实验显示ROS在诱导卵母细胞成熟中发挥重要作用。抗氧化剂可阻止卵母细胞减数分裂的恢复。体外受精(IVF)周期卵泡液内一定水平ROS

是IVF成功的标志,ROS的水平反映了健康卵泡的代谢活性<sup>[2]</sup>。但是ROS的过度升高对卵母细胞成熟和后续胚胎发育造成不良影响,ROS可通过直接影响细胞内钙离子储存结构,干扰钙离子动态平衡<sup>[4]</sup>,引起卵母细胞减数分裂停滞和降解,继而发生凋亡。过氧化氢处理后的卵母细胞受精率低,胚胎碎片含量高,囊胚形成率低<sup>[5]</sup>。

卵母细胞和早期胚胎代谢产生ROS,同时其也有多种抑制ROS升高的机制。一方面是外部保护,卵泡液和输卵管内均高度表达抗氧化酶以及非酶性抗氧化剂如维生素C、亚牛磺酸等,卵泡液内维生素C和尿酸水平比血中高10和30倍<sup>[6]</sup>。实验动物研究表明<sup>[7,8]</sup>,卵泡液内高度表达涉及清除ROS的抗氧化酶,包括过氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等,并高于血清浓度。Lapointe等<sup>[9]</sup>也在牛输卵管上皮检测到高水平的谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶mRNA,免疫印迹显示输卵管内存在这些抗氧化酶蛋白。另一方面,在卵母细胞和冠细胞内都存在过氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶以及过氧化氢酶活性,卵母细胞成熟后,冠细胞内抗氧化酶活性降低,而卵母细胞内抗氧化酶活性增高,提示卵母细胞和早期胚胎有调节ROS水平的能力<sup>[10]</sup>。在缺血、缺氧或老化过程中,卵泡生长受损,ROS产生增加和/或卵母细胞、早期胚胎抗氧化能力下降均可导致ROS水平升高,造成氧化应激损伤。

研究表明卵母细胞体外成熟中,降低卵母细胞和早期胚胎培养环境中ROS有助于卵母细胞和早期胚胎的发育。在牛、羊、猪等卵母细胞体外成熟培养基内加入半胱氨酸可以促进卵母细胞内谷胱甘肽合成,提高卵母细胞成熟以及后续胚胎的囊胚形成

率<sup>[11-13]</sup>。卵巢刺激期间,给予口服维生素 C,可以明显提高卵泡液内维生素 C 水平,提高年长妇女取卵数和妊娠率,降低年长妇女卵母细胞非整倍体发生率<sup>[6]</sup>。

## ROS 水平升高对女性生殖的影响

### 一、ROS 与卵母细胞成熟

ROS 与抗氧化剂之间的平衡对于卵母细胞成熟、受精和早期胚胎发育产生重要影响。大量的证据显示,卵泡微环境内氧化/抗氧化的平衡与卵母细胞成熟有关。Oyawoye 等<sup>[2]</sup>检测了进行 IVF 患者卵泡液内 ROS 的存在及其在妊娠结局中的作用,发现妊娠妇女卵泡液内有显著高水平的 ROS,另外,子宫内膜异位症(EMs)或男性因素不孕者妊娠组比未妊娠组有高水平 ROS。在这些研究的基础上,推测卵泡液 ROS,在引起氧化损伤阈值以下低浓度时,可能是预期 IVF 成功的标志。卵泡液一定水平 ROS 是健康卵泡颗粒细胞代谢活性的反映。

ROS 的过度升高,如在老化过程中,卵泡液内总抗氧化能力下降,可能导致卵母细胞成熟障碍。研究证实<sup>[14]</sup>氧化应激可以诱导哺乳动物卵母细胞凋亡,过氧化氢酶可以完全抑制这种效应。流行病学调查显示吸烟降低女性生育力,IVF-胚胎移植(ET)周期中吸烟患者卵母细胞质和量均受损<sup>[15]</sup>。吸烟引起血循环中 ROS 升高和卵泡内酶性或非酶性的抗氧化剂缺失,氧化/抗氧化平衡被打破,对卵母细胞和颗粒细胞均产生不良影响,吸烟患者的未受精卵 2 倍体发生率相对高,提示 ROS 的累积与卵母细胞的减数分裂的不成熟有关,而且吸烟的年轻母亲出生 21 三体婴儿危险性增加。提示吸烟女性卵泡内氧化/抗氧化剂失衡,造成卵泡生成受损。

年龄相关的生育力下降在妇女和其他大型哺乳动物非常普遍。研究发现<sup>[16]</sup>氧化损伤诱导的非整倍体增加是雌性小鼠年龄相关不孕的原因。氧化损伤可以诱导体外培养小鼠卵母细胞减数分裂中非整倍体发生,而抗氧化治疗可以拮抗母体年龄对减数分裂和染色体分离的不良影响。

### 二、ROS 与早期胚胎发育

数十年来,尽管技术提高很多,但是辅助生殖技术(ART)妊娠率还不尽人意。更好的理解体外胚胎生长很重要,但是对种植前胚胎生物、生化和代谢功能了解很少。IVF-ET 周期中,依靠培养条件和卵母细胞、精子质量,只有几个卵母细胞发育成好质量的胚胎,而其他的胚胎呈现形态异常包括细胞分裂不均或细胞碎片。碎片胚胎发育能力有限,很少着床。这种异常的胚胎发育可能由于不足够的培

养环境造成的。人类种植前胚胎的质量与培养基抗氧化能力明显下降相关。与体内条件比较,周围环境中高氧浓度和自由基清除剂的相对缺乏诱导产生高 ROS 水平。生长细胞内或培养基中的一些物质如次黄嘌呤、儿茶酚胺、硫醇、黄素与氧反应产生氧自由基。培养基内加入自由基清除剂和金属螯合剂如过氧化物歧化酶、铁传递蛋白、乙二胺四乙酸(EDTA)、硫氧还原蛋白可以促进人类和啮齿类动物胚胎发育。研究<sup>[17]</sup>发现胚胎碎片的增加与细胞内高 ROS 水平直接相关,特别是碎片部位,因此,推测 ROS 在胚胎碎片形成中起重要作用。

早期胚胎对氧化损伤非常敏感。体外研究<sup>[18]</sup>显示,过氧化氢体外诱导小鼠受精卵细胞周期停滞,凋亡,坏死。轻微的氧化损伤最初导致线粒体内膜去极化,线粒体基质和线粒体分布改变。处理 48h 后,受精卵皱缩,72h 后发育停滞,出现 DNA 碎片。提示在胚胎发育的早期,氧化损伤线粒体致线粒体功能不良可能导致细胞周期停滞和凋亡。人类碎片胚胎含有高水平的过氧化氢呈现凋亡征象。高过氧化氢水平也与一些种系小鼠胚胎的 2 细胞阻滞相关。

ROS 是决定胚胎发育、引起形态改变如胞质浓缩和凋亡小体的重要因素。因此,周围环境的氧浓度可能导致胚胎内 ROS 增加,进而导致胚胎胞质碎片和凋亡。在 IVF 中,通过降低环境氧浓度和培养基内加入自由基清除剂抑制 ROS 浓度可能促进胚胎的正常发育,提高妊娠率。有研究<sup>[19]</sup>检测了 day1 培养基内 ROS 水平与早期人类胚胎发育参数之间的关系。发现胞浆内单精子注射(ICSI)周期中,day1 ROS 水平与 day3 胚胎高细胞数负相关。并且,与 day3 胚胎碎片增加显著相关。从研究中推测 day1 培养基内 ROS 水平是早期胚胎生长的生化标志。在相同条件下培养的 ICSI 胚胎生长差异可能是其周围的 ROS 水平不同。这些自由基可能负面影响胚胎的细胞膜。当 ROS 超过一定水平,卵裂球细胞膜内的磷脂氧化导致膜流动性降低和诱导碎片。另外,受干扰的细胞膜功能可能导致囊胚形成的延迟。

### 三、ROS 参与女性不孕

研究报道 IVF 周期输卵管积水患者妊娠率和着床率低,IVF 前输卵管切除可以逆转输卵管积水的负面影响。输卵管积水对妊娠的负面影响可能与其胚胎毒性效应有关,Bedaiwy 等<sup>[20]</sup>对 11 例不孕妇女在腹腔镜下输卵管切除术时,穿刺输卵管积水,检测 ROS、TAC 和脂质过氧化。2 细胞鼠胚孵育在 25%、50%和 75%的输卵管积水液内,观察每一浓度

输卵管积水囊胚形成率。结果显示输卵管积水的胚胎毒性的浓度依赖效应,囊胚形成率与 ROS 水平负相关,推测输卵管积水中高 ROS 水平可能是其胚胎毒性的原因。另外,EMs 和特异不孕腹腔液内 ROS 水平高于对照组输卵管结扎腹腔液内 ROS 水平认为 ROS 可能参与不明原因不孕的形成。

氧化应激损伤可能源于 ROS 产生过量和/或抗氧化系统受损,总结文献认为氧化损伤可能参与影响生殖功能的一些病理过程。在女性生殖中,确定卵泡液及颗粒细胞 ROS 水平和总抗氧化能力与卵母细胞成熟和早期胚胎发育的关系以及腹腔液内 ROS 水平与各种女性不孕关系非常重要,ROS 可能在特异不孕中起作用。总之,少量的生理量的 ROS 可能在正常生殖功能中起重要作用,而高水平 ROS 介导影响人类生育的病理情况。治疗策略必须直接针对降低 ROS 水平,以保持能维持正常细胞功能所必需的很少量。

#### 参 考 文 献

- 1 Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*, 2003,79(4):829-843
- 2 Oyawoye O, Abdel-Gadir A, Garner A, et al. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod*, 2003,18(11):2270-2274
- 3 Mohamed A, Bedaiwy M, Jeffrey M, et al. Relationship between oxidative stress and embryotoxicity of hydrosalpingeal fluid. *Hum Reprod*, 2002,17(3): 601-604
- 4 Takahashi T, Takahashi E, Igarashi H, et al. Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. *Mol Reprod Dev*, 2003,66(2):143-152
- 5 Hu Y, Betzendahl I, Cortvindr R, et al. Effects of low O<sub>2</sub> and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from preantral follicles. *Hum Reprod*, 2001,16(4):737-748
- 6 Crha I, Hrubá D, Ventruba P, et al. Ascorbic acid and infertility treatment. *Cent Eur J Public Health*, 2003,11(2):63-67

- 7 Carbone MC, Tatone C, Monache SD, et al. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod*, 2003,9(11):639-643
- 8 Torok A, Belagyi J, Torok B, et al. Scavenger capacity of follicular fluid, decidua and culture medium with regard to assisted reproduction: an in vitro study using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Gynecol Obstet Invest*, 2003,55(3):178-182
- 9 Lapointe J, Bilodeau JF. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biol Reprod*, 2003,68(4):1157-1164
- 10 Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, et al. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life*, 2001,51(1):57-64
- 11 Brad AM, Bormann CL, Swain JE, et al. Glutathione and adenosine triphosphate content of in vivo and in vitro matured porcine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 2003,64(4):492-498
- 12 Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, 2003,59(3-4):939-949
- 13 Rodriguez-Gonzalez E, Lopez-Bejar M, Izquierdo D, et al. Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reprod Nutr Dev*, 2003,43(2):179-187
- 14 Liu L, Keefe DL. Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod*, 2000,62:1828-1834
- 15 Paszkowski T, Clarke RN, Hornstein MD. Smoking induces oxidative stress inside the graafian follicle. *Hum Reprod*, 2002,17(4):921-925
- 16 Tarin JJ, Perez-Albala S, Cano A. Oral antioxidants counteract the negative effects of female aging on oocyte quantity and quality in the mouse. *Mol Reprod Dev*, 2002,61(3):385-397
- 17 Yoneda A, Suzuki K, Mori T, et al. Effects of delipidation and oxygen concentration on in vitro development of porcine embryos. *J Reprod Dev*, 2004,50(3):287-295
- 18 Bedaiwy MA, Miller K, Falcone T, et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. In: 18th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, 30 Jun-3 Jul, 2002, Vienna, Austria. *Hum Reprod*, 2002,17:38
- 19 Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, et al. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, 2004,62(7):1186-1197
- 20 Bedaiwy MA, Goldberg JM, Falcone T, et al. Relationship between oxidative stress and embryotoxicity of hydrosalpingeal fluid. *Hum Reprod*, 2002,17(2):601-604

## 基质金属蛋白酶与胚泡植入

天津医科大学总医院妇产科(300052) 张慧娟综述 糜若然审校

**摘 要** 植入又称着床是指胚泡通过与子宫内膜的相互作用而埋入于子宫内膜的过程。胚泡植入是建立妊娠的第一步,成功与否直接影响妊娠的结局。基质金属蛋白酶(MMPs)是一组锌依赖性的蛋白水解酶,降解细胞外基质(ECM),与月经期内膜重塑、胚胎植入密切相关。

**关键词** 基质金属蛋白酶 基质金属蛋白酶抑制剂 胚泡植入

植入又称着床,是指胚泡通过与子宫内膜的相互作用而埋入于子宫内膜的过程。在植入过程中胚胎与子宫都处在生长发育的动态阶段,此时双方必须达到“同步”才能保证植入成功,即胚胎在宫腔一段特

定的时间内,必须发育至胚泡期,透明带脱落,来源于胚泡的滋养层细胞发育到具有“浸润性”的时期,而母体内雌孕激素必须达到一定水平,子宫内膜达到“接受期”,必须双方同时达到各自的发育阶段才能发生胚泡植入,这段关键时期称植入窗,又称着床窗。