

维生素 E 对人胚胎凋亡及体外发育的影响

周瑞年, 李瑞文*

基金项目: 四川省卫生厅科研项目 (090038)

作者单位: 610051 四川 成都, 成都市第九人民医院·成都市妇产科医院生殖与不孕研究所

作者简介: 周瑞年, 毕业于泸州医学院, 本科, 副主任医师, 研究方向为生殖内分泌与人类辅助生殖技术

* 通讯作者, E-mail: niu.wen0001@163.com

【摘要】 目的 探讨抗氧化物维生素 E (Vitamin E) 对人类体外培养胚胎凋亡及体外发育的影响, 并观察培养过程中胚胎凋亡的形态学变化。方法 以常规体外受精-胚胎移植 (in vitro fertilization and embryo transfer IVF-ET) 后废弃的胚胎为材料, 培养过程中添加抗氧化物质维生素 E, 观察其对胚胎体外发育的影响, 采用 TUNEL 方法对胚胎进行染色, 观察其凋亡情况; 用 Hoechst 33342 对胚泡进行荧光染色, 根据胚泡细胞总数及凋亡形态学变化对其凋亡进行检测。结果 当添加 100 μmol 维生素 E 时, 与对照组相比, 显著提高人类扩张期囊胚形成率和孵化率 ($P < 0.05$), 降低其凋亡率 ($P < 0.05$)。结论 维生素 E 能够降低人类囊胚的凋亡率, 提高其体外发育率。

【关键词】 维生素 E; 人胚胎; 凋亡; 体外发育

【中图分类号】R321 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1674-4020(2010)06-0034-04

doi: 10.3969/j.issn.1674-4020.2010.06.009

The effect of Vitamin E on the apoptosis and development of human embryos in vitro

ZHOU Rui-nian, LI Rui-wen*

Institute of Reproduction and Fertility, Chengdu the Ninth People's Hospital • Chengdu Obstetrics Hospital, Chengdu Sichuan 610051, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of antioxidant Vitamin E on human embryo apoptosis and development in vitro and to observe the morphology change of apoptosis embryo. **Methods** In the process of embryo culture in vitro, the embryos were stained with TUNEL, meanwhile the blastocysts were stained with Hoechst33342 fluorescence dye. According to total nuclei number of per blastocyst and the morphology changes, the situation of embryo apoptosis was examined. **Results** The rate of blastocyst expansion and the hatching rate were improved at the same time the apoptosis rate was decreased in vitro group in which 100 μmol Vitamin E was added to the culturing medium that the difference were significant ($P < 0.05$) between two groups. **Conclusion** The antioxidant Vitamin E can reduce apoptosis rate and improve the development rate of human blastocyst in vitro.

【Key Words】 Vitamin E; human embryo in vitro; apoptosis; development in vitro

在人类辅助生殖技术 (assisted reproductive techniques ART)中, 体外产生胚胎的发育潜力主要取决于配子质量和胚胎培养环境, 其中细胞及胚胎凋亡是造成发育率低的主要因素。体外胚胎的培养过程中, 凋亡可因不适的条件而造成^[1], 可被一系列的非生理学的刺激所激活和引发, 如温度, 有毒物质, 氧化应激, X-射线等^[2]。细胞接受外界的应激源, 产生一系列适应性反应, 包括信号转导途径, 基因表达的改变及其他细胞成分的化学修饰, 引起细胞增殖, 分化和凋亡。早期胚胎处于分裂期的细胞比较高, 导致其对细胞内外环境变化较敏感。接受某些应激源刺激后, 细胞凋亡增加。在人桑椹胚和囊胚的发育过程中, 一些细胞会经历程序性细胞死亡或凋亡的过程^[3]。此外, 在鼠类的第一个细胞周期^[4]和人类的第二细胞周期中^[5], 在排除不正常的或有缺陷的胚胎的过程中, 凋亡起主要作用。本实验用维生素 E (Vitamin E, VitE) 培养人胚胎, 根据胚胎的发育形态学特征及囊胚细胞的凋亡指数来研究其对胚胎凋亡的影响。以期为人类胚胎体外培养环境的进一步完善及提高 ART 妊娠率提供新思路。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究材料包括体外受精-胚胎移植 (in vitro fertilization and embryo transfer; IVF-ET) 和卵细胞浆内单精子注射 (intra-cytoplasmic sperm injection, ICSI) 的正常受精的废弃胚胎, 胚胎级别介于 II 级与 II 级之间, 共 232 个, 全部胚胎经患者充分知情后自愿捐献, 并经医院伦理委员会讨论批准。随机分为对照组 (106 个) 和 VitE 组 (126 个)。

1.2 方法

1.2.1 超排卵 常规长方案促排卵, 卵泡直径达到 18 mm 注射人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotrophin HCG), 36 小时后在 B 超引导下取卵。

1.2.2 精子的准备 根据精液密度与精子活力采用梯度离心或直接上游等方法进行处理; 睾丸组织经洗涤后粉碎离心取沉淀精子备用。

1.2.3 常规体外受精 将卵-冠-丘复合物用 HTF 清洗三遍, 置于 HTF 培养皿中预培养, 4 小时后放入受精液滴中, 每个液滴加入 2 000~20 000 条活

动精子, 放入 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。

1.2.4 胞浆内单精子注射 ICSI 时, 将精子加入 5 μL 10% 的 pvp 微滴中, 注射的卵母细胞置于 5 μL 含 10% HSA 的 M-HTF 微滴中, 上面覆盖石蜡油, 用固定针在九点钟的位置固定卵母细胞, 使极体位于 6 点或 12 点的位置, 以注射针吸取单个形态正常的活动精子, 于 3 点的位置将精子注入卵母细胞内, 后缓慢退出注射针, 释放固定的卵母细胞, 然后注射下一个, 方法同上。

1.2.5 胚胎培养 将胚胎置于四孔培养板中进行培养, 培养液为 Quinn's Blastocyst Medium + 20% HSA (对照组)、Quinn's Blastocyst Medium + 20% HSA + 100 μmol VitE (Signa) (Vitamin E 组)。每孔加入 500 μL 的培养液, 上面覆盖 200 μL 石蜡油, 在 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度的条件下培养。在第 5~7 d 检查囊胚发育率及孵化率。

1.2.6 荧光染色 在胚胎培养 5~7 d 时通过发育形态学进行评估, 用荧光染料 Hoechst33342 对胚泡进行染色, 参照 Gao F 等^[6]的方法进行细胞核计数。

1.2.7 凋亡检测 将要检测的胚胎, 用 PBS 清洗, 然后对其进行 TUNEL 染色, TUNEL 染色的基本步骤为: 固定→透化 (打孔)→标记 (染色)。荧光显微镜下观察, 拍照。

1.3 数据统计分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 13.0 统计软件进行显著性检验, 采用 *t* 检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 维生素 E 对人类胚胎凋亡的影响

在人类胚胎的体外培养过程中, 染色后的胚胎我们观察到了凋亡现象, 如图 1 所示。用 VitE 对胚胎进行培养, 其孵化囊胚凋亡细胞数和凋亡指数, 见表 1。与对照组相比, 其胚泡卵裂球凋亡细胞数和凋亡指数均显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 维生素 E 对人类胚胎体外发育的影响

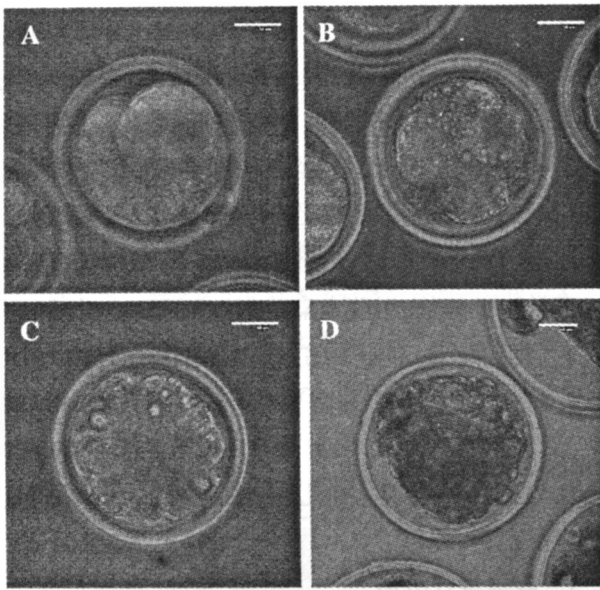
用 VitE 对胚胎进行培养, 其体外发育率如表 2 所示。与对照组相比, VitE 处理组显著提高扩张囊胚率和孵化率, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 维生素 E 对人类胚胎凋亡的影响

组别	胚泡细胞总数		凋亡指数 (%)
	总细胞数	凋亡细胞数	
对照组	79.18 ± 2.19	8.61 ± 1.11	10.91 ± 1.71
VitE处理组	85.89 ± 3.27	5.65 ± 0.77	6.57 ± 0.65

表 2 维生素 E 对人类胚胎体外发育的影响

组别	培养数	扩张囊胚数 (%)	孵化囊胚数 (%)
对照组	106	30(28.30 ± 0.02)	22(20.75 ± 0.02)
VitE处理组	126	43(34.12 ± 0.03)	37(29.36 ± 0.01)



A: 2 细胞期胚胎凋亡细胞; B: 4 细胞期胚胎凋亡细胞;
C: 桑葚期胚胎凋亡细胞; D: 囊胚期胚胎凋亡细胞

图 1 胚胎凋亡检测

3 讨论

体外培养胚胎的发育受多种因素的影响,除了卵母细胞质量和精子因素外,胚胎培养环境和操作环境亦是直接关系到胚胎早期发育的关键因素。哺乳动物胚胎在附植前能否存活不仅与胚胎自我调节能力有关,还要看我们提供的体外条件是否恰当。早期的孕体对应激的抵抗能力可由多种因素所调控,如细胞死亡程序的启动以及由应激诱导的基因或细胞周期调控子保护机制的启动等。氧自由基能够使细胞 DNA 链发生断裂或形成脂质过氧化,这些均能导致细胞周期的阻滞或细胞死亡。在许多物种中,细胞死亡首先在胚泡形成阶段观察到,主要是在内细胞团出现^[7]。在附植前发育过程中胚胎细胞

死亡的程度及对其的调控可能对孕体以后的发育是至关重要的。在人类和鼠类胚胎中,凋亡的细胞随机分布于整个胚胎中^[4,5],本实验利用 TUNEL 染色亦证明了这一点。且在培养液中添加 VitE 后利用 Hoechst33342 荧光染料对胚泡进行荧光染色,发现 VitE 具有抑制人类胚胎凋亡的作用。

人类胚胎在体外培养过程中,会产生活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS),过多的 ROS 会阻滞胚胎的发育^[8],使一些基因的表达方式发生改变^[9]。VitE 是一种抗氧化物质,是最有效的自由基清除剂,能提高胚胎的体外存活力^[10]。本实验用 VitE 对胚胎进行培养,与对照组相比, VitE 处理组显著提高扩张期囊胚形成率和孵化率,与其他报道一致。Tsuji 等^[11]在体外培养小鼠胚胎时加入 VitE,能够增加胚胎对葡萄糖的利用,提高囊胚发育率。Olson SE 等^[12]也报道了 VitE 可促进牛胚胎体外发育。

本实验探讨了 VitE 对人类胚胎凋亡及体外发育的影响。结果表明, VitE 处理能显著的降低人类胚胎的凋亡率,从而提高其体外发育率。然而,附植前胚胎阻滞和死亡的成因、角色、及基因调控等一系列问题还不清楚,有待于进一步阐明,本文对胚胎凋亡进行了检测,以期对胚胎质量评价及 ART 效率提高提供参考。

【参考文献】

[1] Som AV, Vanroose G, Laevens H, *et al*. Apoptosis in *in vitro* produced bovine embryos [J]. *Theriogenology*, 2000, 53: 367
[2] Wylie AH. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis in I. D. Bowen, R. A. Lockshin (Eds) [J]. *Cell Death in Biology and Pathology*, 1981, 9: 34

(下转第 39 页)

定^[3]。因此, Cys C有可能成为较理想的 GFR 检测的指标。

糖尿病肾损害是糖尿病严重的慢性微血管并发症。2型糖尿病患者确诊糖尿病时已有 7% 的患者合并糖尿病肾脏病^[4], 因此早期诊断具有重要意义, 而 Cys C可作为一个简便可靠的 GFR 的标志物诊断 2型糖尿病肾损害^[5]。有研究表明, GDM 和 2型糖尿病在免疫和遗传方面存在许多相似之处, 在一定意义上可认为是早期初发的 2型糖尿病, 或是由于妊娠所致潜在糖尿病易感因素的暂时暴露。尽管绝大多数妊娠期糖尿病患者没有明显症状, 但部分患者在确诊时可能已持续高血糖较长时间, 甚至发生了并发症。故早期诊断妊娠期糖尿病并对其肾脏功能做出正确评估, 有利于其预后的改善。

我们检测了 397例孕妇的血清胱抑素 C, 结果发现, GDM 组与 GIGT 组 Cys C 水平显著高于正常组, 而 BUN、Cr 在 GIGT 组和正常组间的差异无统计学意义。表明血清 Cys C 的检测, 较血清 BUN、Cr 检测更敏感, 可以为早期的肾脏损害提供客观的评估标准。如果对新诊断的糖尿病患者常规检测血清

Cys C, 早期发现糖尿病肾损害, 并对其进行积极的干预, 可以阻止其发展至临床期肾病。因此血清 Cys C 的检测对妊娠期糖尿病患者早期肾损害的诊断有着重要的参考价值和临床意义。

【参考文献】

- [1] Asch FM, Bieqanski SP, Panza JA, *et al*. Real-time 3-dimensional echocardiography evaluation of intracardiac masses [J]. *Echocardiography*, 2006, 23(3): 218.
- [2] 金惠铭主编. 病理生理学 [M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 257.
- [3] Aksun SA, Ozmen D, Ozmen B, *et al*. Beta2-microglobulin and CystatinC in type2 diabetes: assessment of diabetic nephropathy [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2004, 112(4): 195-200.
- [4] 王力宁. 糖尿病患者慢性肾脏病的早期筛查和防治 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2007, 16(6): 542-543.
- [5] E. M. El-Shafey H. A. El-Sorogy, A. A. Sabry. Is Serum Cystatin C an Accurate Endogenous Marker of Glomerular Filtration Rate for Detection of Early Renal Impairment in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus? [J]. *Renal Failure*, 2009, 31: 355-359.

(收稿日期: 2010-09-05 编辑: 李庆华)

(上接第 36 页)

- [3] Hardy K. Apoptosis in the human embryo [J]. *Rev Reprod*, 1999, 4: 125-134.
- [4] Hashimoto H, Matsuo Y, Yokoyama Y, *et al*. Induction of apoptosis in fish cells by hypertonic stress [J]. *Fisheries Sci*, 1998, 64: 820-825.
- [5] Hincik L, DerSmitsen PV, Heustepreute M, *et al*. Identification of caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease in rat blastocysts and their implication in the induction of chromatin degradation (but not nuclear fragmentation) by high glucose [J]. *Biol Reprod*, 2001, 64: 555-562.
- [6] Gao F, Shi HY, Daughy C, *et al*. Maspin plays an essential role in early embryonic development [J]. *Development*, 2004, 131(7): 1479-1489.
- [7] Hansen R, Oren M. From inductive signal to cellular effect [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1997, 7: 46-51.

- [8] Moss JL, Pontes E, Hansen PJ. Insulin-like growth factor-1 protects preimplantation embryos from anti-developmental actions of menadione [J]. *Arch Toxicol*, 2009, 83: 1001-1007.
- [9] Park SY, Kim EY, Jeon K, *et al*. Survivin acts as anti-apoptotic factor during the development of bovine pre-implantation embryos [J]. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74: 582-590.
- [10] Fazla, Ashkar, Esther S, *et al*. Thyroid hormone supplementation improves bovine embryo development in vitro [J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(2): 334-344.
- [11] Tsujii H, Muranaka M, Hamano K. Culture of in vitro mouse embryos with vitamin E improves development [J]. *J Reprod Dev*, 2002, 48: 25-29.
- [12] Olson SE, Seidel G. E. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients [J]. *Biol Reprod*, 2000, 62: 248-252.

(收稿日期: 2010-08-08 编辑: 魏巍)