

过氧化氢和谷胱甘肽对延边黄牛体细胞克隆胚胎氧化损伤的影响

杨月春^{1,2}, 王士勇¹, 李钟淑¹, 方南洙^{1*}

(1. 延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002; 2. 吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101)

摘要: 在延边黄牛体细胞克隆胚胎体外培养液中分别添加 H₂O₂ 和 GSH, 观察重组胚体外发育情况, 探究二者对延边黄牛体细胞克隆胚胎氧化损伤的影响。结果表明: 不同时间添加 H₂O₂ 时 0~24 h 组卵裂率显著高于其它组 ($P < 0.05$), 48~72 h 组 16 细胞以上发育率显著低于其它处理组 ($P < 0.05$)。不同时间不添加 H₂O₂ 时 48~72 h 组 16 细胞期以上发育率显著高于 0~24 h 组和 24~48 h 组 ($P < 0.05$), 24~48 h 组显著高于 0~24 h 组 ($P < 0.05$)。不同时间添加 GSH 时 0~24 h 组和 24~48 h 组卵裂率显著高于对照组, 48~72 h 组和 72~96 h 组 ($P < 0.05$), 对照组 16 细胞以上发育率显著低于 48~72 h 组和 72~96 h 组 ($P < 0.05$)。结论: H₂O₂ 对延边黄牛体细胞克隆胚胎发育前期的氧化损伤较大, 特别是在 48~72 h。培养前期添加 1 mmol/L 的 GSH 能够有效提高延边黄牛体细胞克隆胚胎体外发育效率, 缓解有害应激带来的氧化损伤。

关键词: 过氧化氢; 谷胱甘肽; 体细胞克隆; 氧化损伤

中图分类号: S823.8⁺1 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)06-1206-05

Effect of Hydrogen Peroxide and Glutathione on Oxidative Damage in Somatic Cell Cloning Embryos of Yanbian Cattle

YANG Yue-chun^{1,2}, WANG Shi-yong¹, LI Zhong-shu¹, FANG Nan-zhu^{1*}

(1. Agricultural College of Yanbian University, Yanji 133002, China; 2. College of Jilin Agricultural Science and Technology, Jilin 132101, China)

Abstract: After adding H₂O₂ and GSH into cultural medium *in vitro* of somatic cell cloning embryos, the oxidative damage of somatic cell cloning embryos of Yanbian cattle was studied. The results showed that when adding H₂O₂ in different time, the cleavage rate of the 0-24 h group was significantly higher than that of the other groups ($P < 0.05$), the developmental rate of over 16-cell of the 48-72 h group was significantly lower than that of the other groups ($P < 0.05$). Without H₂O₂ in different time, the developmental rate of over 16-cell of the 48-72 h group was significantly higher than that of the group of 0-24 h and 24-48 h ($P < 0.05$), that of the 24-48 h group was significantly higher than that of the 0-24 h group ($P < 0.05$). With GSH in different time, the cleavage rates of the 0-24 h group and the 24-48 h group were significantly higher than that of the control group, the 48-72 h group and the 72-96 h group ($P < 0.05$), respectively. The developmental rates of over 16-cell of the control group was significantly lower than that of the 48-72 h group and the 72-96 h group ($P < 0.05$). In conclusion: oxidative damage of H₂O₂ to somatic cell cloning early

收稿日期: 2012-10-24 修回日期: 2012-11-03

基金项目: 国家自然科学基金(30860184)和吉林农业科技学院青年教师科研基金(吉农院合字 2012105)资助

作者简介: 杨月春(1981—), 女, 讲师, 博士生, 主要从事动物繁殖与生物技术研究, E-mail: kettyyue@126.com; *

通讯作者: 方南洙, 教授, 博士生导师, E-mail: nzfang@ybu.edu.cn。

embryos of Yanbian cattle was serious, especially in the period of 48–72 h. When 1 mmol/L GSH was added in the early cultural medium in vitro, it could improve the development efficiency of Yanbian cattle somatic cell cloning embryos, and alleviate oxidative damage from the harmful stress.

Key words: hydrogen peroxide; glutathione; somatic cell cloning; oxidative damage

体细胞克隆技术操作繁琐、耗时长,光照、高氧张力、机械刺激等氧化应激因素会破坏体细胞克隆胚胎的氧化还原平衡,进而产生大量活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS),造成体细胞克隆胚胎的氧化损伤^[1],但是,目前对体细胞克隆胚胎氧化损伤的研究甚少。本试验研究在体细胞克隆胚胎体外培养液中分别添加过氧化氢(H_2O_2)和谷胱甘肽(Glutathione, GSH),观察二者对延边黄牛体细胞克隆胚胎氧化损伤的影响,为体细胞克隆胚胎的氧化损伤研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

除胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司、激素购自宁波市三生药业有限公司,其它试剂均购自Sigma-Aldrich公司。主要仪器有显微操作仪(Leica, DMIRB)、拉针仪(Narishige, PN-30)、实体显微镜(Nikon, BK1000)、倒置显微镜(Nikon, TMS)、细胞融合仪(宁波新芝, CRY-3)等。

1.2 方法

1.2.1 供核细胞的准备 取活体延边黄牛耳尖部皮肤在无菌条件下进行刮毛、切割等处理,组织块法原代培养(15% FBS + 85% DMEM) 3~5 d,将成纤维细胞与上皮细胞进行分离后传代培养。注核前用胰蛋白酶消化,制成悬液后静置片刻,吸取沉淀细胞供注核。

1.2.2 卵母细胞的准备 从延吉市屠宰场收集延边黄牛卵巢4~6 h内运至实验室。抽吸法抽取卵泡中的卵母细胞。在实体显微镜下挑选细胞质均匀、由完整或部分致密卵丘细胞包围的卵母细胞,体外成熟培养22~24 h。体外成熟液为90% TCM-199(SIGMA, M2520) + 10% FBS + 10 μ g/mL PMSG(宁波三生药业有限公司) + 10 μ g/mL hCG(宁波三生药业有限公司)。

1.2.3 显微操作 体外成熟的卵母细胞在3%透明脂酸酶的PBS液中震荡脱掉卵丘细胞,挤压法去除细胞质,完成去核后,恢复培养1 h,用注核针先吸取供核细胞,沿去核时在透明带留下的孔注入卵周隙中。

1.2.4 融合与激活 显微操作后培养2 h,用间隔1 s、场强100 V/cm,脉宽20 μ s的2次直流电脉冲诱导融合。1 h后观察,未融合的弃去。融合的用离子霉素(5 μ mol/L)预激活处理5 min,用6-DMAP(2 mmol/L)激活培养3~4 h。

1.2.5 体外培养 将激活后的重组胚按照试验分组放置在不同浓度处理组的培养液(基础培养液为CR1aa + 5% FBS + 0.3% BSA)中冲洗3遍,培养48 h后记录卵裂率,之后每隔24 h观察记录重组胚发育情况。

1.3 试验设计

试验1: 激活后的重组胚随机分成4组,分别为对照组(在整个体外培养阶段的培养液中不添加 H_2O_2)、0~24 h组(体外培养0~24 h培养液中添加60 μ mol/L的 H_2O_2)、24~48 h组(体外培养24~48 h培养液中添加60 μ mol/L的 H_2O_2)、48~72 h组(体外培养48~72 h培养液中添加60 μ mol/L的 H_2O_2),处理时间外更换为不添加 H_2O_2 的培养液。

试验2: 激活后的重组胚随机分成4组,分别为对照组(在整个体外培养阶段的培养液中不添加 H_2O_2)、0~24 h组(体外培养0~24 h培养液中不添加 H_2O_2 ,其余培养时间培养液中添加60 μ mol/L的 H_2O_2)、24~48 h组(体外培养24~48 h培养液中不添加 H_2O_2 ,其余培养时间培养液中添加60 μ mol/L的 H_2O_2)、48~72 h组(体外培养48~72 h培养液中不添加 H_2O_2 ,其余培养时间培养液中添加60 μ mol/L的 H_2O_2)。

试验3: 激活后的重组胚随机分成5组,分别为对照组(在整个体外培养阶段的培养液中不添加GSH)、0~24 h组(体外培养0~24 h培养液中添加1 mmol/L的GSH)、24~48 h组(体外培养24~48 h培养液中添加1 mmol/L的GSH)、48~72 h组(体外培养48~72 h培养液中添加1 mmol/L的

GSH) ,72 ~96 h 组(体外培养 72 ~96 h 培养液中添加 1 mmol/L 的 GSH) ,处理时间外更换为不添加 GSH 的培养液。

1.4 测定指标

体细胞克隆胚胎体外培养后每隔 24 h 在倒置显微镜下观察并记录重组胚卵裂数和发育数 ,体外培养 24 ~48 h 统计卵裂率(2 细胞发育数/供试卵数 ×100%) ,体外培养 96 ~120 h 统计 16 细胞以上发育率(≥ 16 细胞数/供试卵数 ×100%) ,因为在体外培养液中添加 H₂O₂ 对体细胞克隆胚胎产生氧化损伤 ,难以发育到囊胚阶段 ,所以未观察记录囊胚发育率。

1.5 统计分析

体细胞克隆胚胎卵裂率和 16 细胞以上发育率以 Mean ± SE 表示 ,数据采用 SPSS17.0 软件进行差异显著性分析和 LSD 多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同培养时间添加 H₂O₂ 对延边黄牛体细胞克隆胚胎氧化损伤的影响

以 CR1aa + 5% FBS + 0.3% BSA 为基础培养液 ,对照组在整个培养时期不添加 H₂O₂ ,处理组分别在 0 ~24 h、24 ~48 h、48 ~72 h 加入浓度为 60 μmol/L 的 H₂O₂ ,对延边黄牛体细胞克隆胚胎进行体外培养 ,观察卵裂率和 16 细胞以上发育率 ,结果见表 1。

表 1 不同培养时间添加 H₂O₂ 对延边黄牛体细胞克隆胚胎氧化损伤的影响

Tab.1 Effect of H₂O₂ on oxidative damage of somatic cell cloning embryos in different cultural time of Yanbian cattle

处理组 Treatment group	供试卵数(重复数) No . of provided	卵裂率/% Rate of cleavage	≥ 16 细胞发育率/% Rate of over 16 - cell
对照组 Control group	55(4)	56.4 ± 3.3 ^b	55.0 ± 3.4 ^a
0 ~24 h	55(4)	69.2 ± 5.7 ^a	49.8 ± 6.1 ^a
24 ~48 h	55(4)	58.1 ± 3.4 ^b	47.3 ± 8.3 ^a
48 ~72 h	54(4)	53.6 ± 2.9 ^b	28.0 ± 3.9 ^b

同列肩标字母不同表示差异显著(P < 0.05) 。

Values with different superscripts within a column are significantly different (P < 0.05) .

由表 1 可知 ,在体外培养 0 ~24 h 时添加 H₂O₂ 的处理组卵裂率显著高于其它处理组(P < 0.05) ,这时除 0 ~24 h 组在培养液中添加了 60 μmol/L 的 H₂O₂ 外 ,对照组和其余处理组培养液中均未添加 H₂O₂ ,因此对卵裂率未产生影响 ,48 ~72 h 组 16 细胞以上发育率显著低于其它处理组(P < 0.05) ,说明 H₂O₂ 在体细胞克隆早期胚胎后期培养中产生严重影响。

2.2 不同培养时间不添加 H₂O₂ 对延边黄牛体细胞克隆胚胎氧化损伤的影响

以 CR1aa + 5% FBS + 0.3% BSA 为基础培养液 ,对照组在整个培养时期不添加 H₂O₂ ,处理组分别在 0 ~4 h、24 ~48 h、48 ~72 h 不添加 H₂O₂ ,其余时间添加浓度为 60 μmol/L 的 H₂O₂ 对延边黄牛体细胞克隆胚胎进行体外培养 ,观察卵裂率和 16 细胞以上发育率 ,结果见表 2。

表 2 不同培养时间不添加 H₂O₂ 对延边黄牛体细胞克隆胚胎氧化损伤的影响

Tab.2 Effect of H₂O₂ free on oxidative damage of somatic cell cloning embryos in different cultural time of Yanbian cattle

处理组 Treatment group	供试卵数(重复数) No . of provided	卵裂率/% Rate of cleavage	≥ 16 细胞发育率/% Rate of over 16 - cell
对照组 Control group	55(4)	56.0 ± 4.9 ^a	58.7 ± 5.3 ^a
0 ~24 h	53(4)	54.6 ± 4.1 ^a	31.0 ± 2.7 ^d
24 ~48 h	54(4)	52.1 ± 6.6 ^a	39.1 ± 4.6 ^c
48 ~72 h	54(4)	55.7 ± 2.5 ^a	46.4 ± 4.1 ^b

同列肩标字母不同表示差异显著(P < 0.05) 。

Values with different superscripts within a column are significantly different (P < 0.05) .

由表2可知,在0~24 h、24~48 h、48~72 h不添加 H_2O_2 对延边黄牛重组胚卵裂率没有显著影响($P>0.05$),但是不同时期不添加 H_2O_2 对延边黄牛16细胞期以上重组胚发育率有显著影响,所有处理组显著低于对照组($P<0.05$),48~72 h组显著高于0~24 h组和24~48 h组($P<0.05$),24~48 h组显著高于0~24 h组($P<0.05$),说明 H_2O_2 对延边黄牛体细胞克隆胚胎发育前期影响较大,特别是在48~72 h。

2.3 不同培养时间添加 GSH 对延边黄牛体细胞克隆胚胎氧化损伤的影响

以 CR1aa + 5% FBS + 0.3% BSA 为基础培养液,对照组在整个培养时期不添加 GSH,处理组分别在0~24 h、24~48 h、48~72 h、72~96 h加入浓度为1 mmol/L的GSH,对延边黄牛体细胞克隆胚胎进行体外培养,观察卵裂率和16细胞以上发育率,结果见表3。

表3 不同培养时间添加 GSH 对延边黄牛体细胞克隆胚胎氧化损伤的影响

Tab.3 Effect of GSH on oxidative damage of somatic cell cloning embryos in different cultural time of Yanbian cattle

处理组 Treatment group	供试卵数(重复数) No. of provided	卵裂率/% Rate of cleavage	≥16细胞发育率/% Rate of over 16-cell
对照组 Control group	56(5)	68.2 ± 4.3 ^b	47.1 ± 3.9 ^b
0~24 h	55(5)	76.6 ± 3.3 ^a	52.5 ± 6.8 ^{ab}
24~48 h	54(5)	77.9 ± 3.2 ^a	55.0 ± 6.8 ^{ab}
48~72 h	57(5)	68.5 ± 6.1 ^b	56.5 ± 0.9 ^a
72~96 h	56(5)	64.7 ± 5.2 ^b	61.4 ± 9.6 ^a

同列肩标字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

Values with different superscripts within a column are significantly different ($P<0.05$).

由表3可知,不同时间添加GSH对延边黄牛体细胞克隆胚胎体外发育影响很大。0~24 h组和24~48 h组卵裂率显著高于对照组、48~72 h组和72~96 h组($P<0.05$),16细胞以上发育率与其它组差异不显著($P>0.05$),对照组16细胞以上发育率显著低于48~72 h组和72~96 h组($P<0.05$)。说明前期添加1 mmol/L的GSH能够有效提高延边黄牛体细胞克隆胚胎体外发育效率,缓解显微操作及胚胎重组过程中带来的氧化应激。

3 讨论

H_2O_2 是一类重要的活性氧物质,在正常生理条件下,细胞内部具有动态的氧化还原平衡,随着 H_2O_2 产生的同时细胞内部会产生相应量的抗氧化保护物质来抵消有可能发生的氧化损伤^[1],在生命科学领域, H_2O_2 常用于建立氧化损伤模型。作者在前期试验中发现在体细胞克隆胚胎体外发育过程中 H_2O_2 对其具有氧化损伤作用,不利其体外发育^[2]。在研究卵母细胞及早期胚胎以外的细胞氧化损伤时普遍采用相对较高的浓度^[3-4],而在研究卵母细胞及早期胚胎时普遍采用相对较低的浓度^[5-7]。Xiao等^[3]报道:在精子获能液中添加1 mmol/L H_2O_2 具有与冷冻效果相似的DNA损伤作用,用这样的精子使胚胎受精后在囊胚期之前表现出卵裂延迟,可能是由于受精后卵母细胞能逐渐修复精子的DNA损伤。本试验中发现在培养液中添加60 μ mol/L的 H_2O_2 ,延边黄牛体细胞克隆胚胎会比公认的生理条件下发育速度普遍加快的现象,这可能是由于在重组胚发育早期供核细胞并未受到强烈的氧化应激而能够迅速发挥指导其发育的作用,而受体卵母细胞受到的氧化应激较大,母源基因氧化损伤严重,因而 H_2O_2 对重组胚发育早期影响较大,在后期出现大量发育形态异常等氧化损伤现象^[2]。

GSH是一种抗氧化剂,在卵母细胞减数分裂中具有维持纺锤体形态的作用,保护纺锤体免受氧化损伤,具有清除胚胎内的过氧化氢和减少细胞毒性的作用^[8]。正常生理条件下,母体输卵管液或子宫液中含有的GSH可以保护胚胎免受氧自由基的损伤,但是,自开始发育直到囊胚阶段胚胎自身不再合成GSH^[9-10],因此在生命科学研究中常常在胚胎体外培养液中添加外源性GSH,使体外培养的胚胎免受氧自由基的损伤。本试验在延边黄牛体细胞克隆胚胎体外培养液中分阶段添加1 mmol/L的GSH

时,结果显示在 0~24 h 和 24~48 h 组具有影响卵裂率的效果,这是因为体细胞克隆胚胎发育到 2 细胞期往往会持续到 48 h,较正常生理状态和体外受精培养时卵裂迟缓。魏红芳等^[11]提出 GSH 在体外培养时对牛、山羊胚胎发育的保护和促进作用主要发生在 8~16 细胞期的发育中。本试验中,在 48~72 h 和 72~96 h 添加 1 mmol/L 的 GSH 时,16 细胞以上发育率显著高于对照组,与其它两个处理组差异不显著,研究结果与 Edwards 等^[9-11]的研究一致,这可能是因为延边黄牛体细胞克隆胚胎在体外培养前期主要依靠自身的抗氧化保护来抵抗氧化损伤,而在后期氧化还原平衡受到破坏,培养液中添加外源性 GSH 被吸收后逐渐起到了抗氧化保护作用。

参考文献:

- [1]Takahashi M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos[J]. *J Reprod Dev*, 2012, 58(1): 1-9.
- [2]杨月春,王士勇,李钟淑,等. 延边黄牛体细胞克隆胚胎氧化损伤的初步研究[J]. *江西农业大学学报*, 2009, 31(6): 1069-1073.
- [3]Xiao J, Liu Y, Li Z, et al. Effects of the insemination of hydrogen peroxide-treated epididymal mouse spermatozoa on cH2AX repair and embryo development[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38742.
- [4]Al-Gubory K H, Garrel C. Anti-oxidative signaling pathways regulate the level of reactive oxygen species at the endometrial-extra embryonic membranes interface during early pregnancy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(9): 1511-1518.
- [5]柳海星. GSH 和过氧化氢对小鼠早期胚胎体外发育的影响[J]. *延边大学农学学报*, 2010, 32(4): 281-284.
- [6]李月婷,刘影,王静娴,等. 过氧化氢对原代心肌细胞及 H9c2 细胞的损伤作用[J]. *贵阳医学院学报*, 2012, 37(3): 225-227.
- [7]邵志凌,魏虹. 白藜芦醇对过氧化氢损伤心肌细胞的保护作用及其机制研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2011, 20(36): 4615-4617.
- [8]Chatot C L, Tasca R J, Ziomek C A. Glutamine uptake and utilization by preimplantation mouse embryos in CZB medium[J]. *J Reprod Fertil*, 1990, 89(1): 335-346.
- [9]Edwards J L, King W A, Kawarsky S J, et al. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione[J]. *Theriogenology* 2001, 55(1): 209-223.
- [10]Gardner D K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture[J]. *Theriogenology*, 1998, 49(1): 83-102.
- [11]魏红芳,张长兴,咎林森,等. 谷胱甘肽(GSH)对牛卵母细胞体外受精胚胎发育的影响[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(33): 16398-16404.