

白藜芦醇对体外胚胎生产的作用机制

胡慧茹, 王健, 瞿静雯, 孙晓梅, 李拥军*

(扬州大学动物科学与技术学院/江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 江苏扬州 225009)

摘要 白藜芦醇是存在于 70 多种植物中的一种多酚物质, 常见于葡萄、桑椹等植物, 具有抗炎、抗老、抗癌的效能。近年来, 白藜芦醇对卵母细胞、冷冻精液、胚胎质量的影响备受关注。综述了白藜芦醇在体外胚胎生产中的应用情况, 为白藜芦醇更广泛地应用于胚胎工程试验提供参考。

关键词 白藜芦醇; 卵母细胞; 冷冻精液; 胚胎

中图分类号 R 285.5 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)06-0020-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.06.006



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Mechanism of Action of Resveratrol on *in vitro* Embryo Production

HU Hui-ru, WANG Jian, QU Jing-wen et al (College of Animal Science and Technology, Yangzhou University/Jiangsu Key Laboratory of Animal Genetics and Molecular Design, Yangzhou, Jiangsu 225009)

Abstract Resveratrol is a polyphenolic substance found in more than 70 kinds of plants. It is commonly found in grapes, mulberry and other plants. Its strong antioxidant activity has anti-inflammatory, anti-aging and anti-cancer effects. In recent years, the effects of resveratrol on oocytes, frozen semen, and embryo quality have attracted much attention. This article reviewed the application of resveratrol *in vitro* embryo production, and provided a reference for the wider application of resveratrol in embryo engineering experiments.

Key words Resveratrol; Oocyte; Frozen semen; Embryo

我国辅助生殖技术经过 30 多年的发展, 已经达到了世界先进水平, 为成千上万的家庭解决了不孕不育的难题。如超数排卵、胚胎移植、体外胚胎生产、冷冻保存等, 这些辅助生殖技术不仅在人体方面应用广泛, 而且对提高动物繁殖性能和诱导遗传改良也起到了十分积极的作用。然而, 与体内环境条件相比, 体外胚胎生产的效率仍相对较低。据报道, 细胞体外培养条件很难与体内生理环境达到精准一致, 且细胞内的抗氧化能力不能保护机体免于氧化损伤, 因此在体外培养过程中添加抗氧化剂, 可以有效保护卵母细胞、冷冻精液、胚胎免受氧化应激。

白藜芦醇作为天然多酚, 其结构式为 3,4',5-三羟基二苯乙烯, 最早是从白藜芦的根部提取得到的, 有顺式-(E)和反式-(Z)2 种同分异构体, 通常能够稳定存在并发挥主要生物活性的是反式结构。研究发现这种天然物质广泛存在于葡萄、桑椹、虎杖等 70 多种植物中, 且它们中大多数可食用。白藜芦醇是植物本身为应对外界伤害而合成的一种抗毒素, 后来有科学家证实它还有抗氧化、抗癌^[1]、抗炎^[2]和保护心血管^[3]等保健作用。近年来, 将白藜芦醇作为抗氧化剂用于体外胚胎生产的研究越来越多, 如在卵母细胞成熟方面, Zabihi 等^[4]发现 0.25 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇显著增加了绵羊卵母细胞的卵丘扩散, 添加在牛卵母细胞成熟液中时, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇同样改善了卵丘扩散以及第一极体的排出^[5], 在冷冻精液方面, Longobardi 等^[6]和 Gadani 等^[7]研究发现, 白藜芦醇虽然对精子活力无显著影响, 但 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 2 mmol/L 可分别提高公牛和公猪冷冻精液的

体外受精能力。在胚胎质量方面, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇可显著提高绵羊胚胎的发育能力, 主要表现在较高的囊胚率和囊胚细胞总数^[4], Kwak 等^[8]在猪的卵母细胞 IVM 期间补充 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇, 发现它可增加细胞内谷胱甘肽(GSH)水平, 降低活性氧(ROS)水平以及调节卵母细胞成熟期间的基因表达, 从而改善了孤雌激活和体外受精后猪胚胎的发育潜力。虽然一定浓度的白藜芦醇对不同物种的体外胚胎生产具有一定的积极作用, 但有研究显示过高浓度的白藜芦醇对卵母细胞的成熟及胚胎具有负面影响, 如 Zabihi 等^[4]研究发现 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇降低了 MII 卵母细胞率、卵裂率、桑椹胚和囊胚率。白藜芦醇对卵母细胞、冷冻精液、以及胚胎发育等均具有影响作用, 笔者探讨其在胚胎生产过程中的作用机理, 为此类抗氧化剂更广泛的应用于胚胎工程研究提供参考。

1 白藜芦醇的抗氧化作用

1.1 白藜芦醇对细胞内活性氧(ROS)水平的影响 活性氧(ROS)是体内正常代谢产生的一类氧单电子还原产物, 体外的理化因素(如化学药物、辐射、高压氧等)也可以诱导产生 ROS, 可以说生命活动与 ROS 的产生密切相关。但对于化学性质活泼且具有强氧化性的 ROS 而言, 体内含量一旦过高, 出现氧化与抗氧化的失衡便会引起机体出现氧化应激, 从而引发疾病或衰老。因此, 氧化应激亦是胚胎体外产生效率低下的重要原因, 而研究显示白藜芦醇的抗氧化作用主要是对抗细胞内的 ROS 水平。如 Mukherjee 等^[9]研究发现, 在 IVM 期间, 用 0.25 和 0.50 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇处理卵母细胞, 通过降低 ROS 水平, 为山羊卵母细胞提供有益的微环境, 进而调节基因表达和刺激胚胎发育。Kwak 等^[8]在猪的卵母细胞成熟及胚胎发育研究中发现了相似的结果, 即 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇通过降低细胞内 ROS 水平, 调节卵母细胞成熟期间的

基金项目 江苏现代农业产业技术体系建设项目(JATS[2018]304)。
作者简介 胡慧茹(1995—), 女, 河南焦作人, 硕士研究生, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。* 通信作者, 教授, 博士, 从事动物繁殖学和养羊生产学研究。
收稿日期 2019-09-20

基因表达,并提高猪胚胎的发育潜力。不同的是,Santos等^[10]研究发现添加白藜芦醇并未降低卵母细胞内 ROS 水平,这可能与不同物种的培养基成分差异有关。同时,这也印证了细胞内 ROS 水平不是受单一因素控制的,氧浓度、光、卵母细胞处理方式、细胞代谢反应和物理化学参数等均可以影响 ROS 水平^[11]。冷冻可以使细胞内 ROS 水平升高,造成细胞的氧化损伤。戴建军等^[12]发现在猪卵母细胞 IVM 培养基中添加 2 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇,可以提高卵母细胞的线粒体功能,降低氧化损伤,提高卵母细胞的抗冻能力。李世佳等^[13]发现向人精液冷冻保护液中添加 30 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇,可以降低精子内 ROS 水平,减少精子冷冻损伤,从而改善解冻后精子质量和功能。研究表明,玻璃化冷冻前用 2 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇预处理未成熟的卵母细胞,对随后胚胎的发育无影响,但将该试剂添加在玻璃化冷冻、升温后的 IVM 培养基中,改善了囊胚期的胚胎发育,这说明白藜芦醇虽不能阻止玻璃化造成的细胞损伤,但可以增强细胞亚致死的损伤恢复^[10]。

1.2 白藜芦醇对机体内谷胱甘肽 (GSH) 水平的影响 谷胱甘肽 (GSH) 是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的三肽,含有巯基。它几乎存在于身体的每一个细胞,具有清除自由基和抗氧化的作用。研究表明,在细胞体外培养过程中添加白藜芦醇,可以促进 GSH 的合成。如 Mukherjee 等^[9]发现在 IVM 培养基中添加白藜芦醇,能够促进山羊卵母细胞的细胞质成熟,且通过增加的细胞内 GSH 水平促进孤雌激活和手工克隆之后胚胎发育能力。同样的,在猪卵母细胞 IVM 培养基中添加 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇,能够增加细胞内 GSH 水平,降低 ROS 水平以及调节卵母细胞成熟期间的基因表达,改善孤雌激活和体外受精后胚胎的发育潜力^[8]。Li 等^[14]在研究热应激下猪卵母细胞及胚胎发育时发现,2.0 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇不仅可以改善核成熟,还可以通过增加谷胱甘肽 (GSH) 水平,提高热应激下胚胎孤雌激活后的囊胚率。

2 白藜芦醇对机体内固醇类激素分泌的影响

除抗氧化作用,白藜芦醇还能影响各类固醇类激素的分泌。早在 2008 年,研究发现白藜芦醇能够显著增加雄性小鼠睾丸激素的分泌^[15]。还有研究指出,白藜芦醇增加了雌性大鼠颗粒细胞中 P450arom 和黄体化相关基因 (如 LH-R 和 StAR) 的表达,这可能促进卵巢中的类固醇激素的生成和黄体化^[16]。孕酮与 Mos/MEK1/p42MAPK 级联信号通路密切相关,近年来,Wang 等^[5]研究显示,白藜芦醇显著上调 C-mos/ERK2/MAPK2 基因的表达,下调 CDC2/CyCB2 基因的表达,证实了白藜芦醇可以通过卵丘细胞诱导孕酮分泌、降低雌二醇分泌以及自身的抗氧化作用促进牛卵母细胞成熟和随后体外受精的胚胎发育。据报道,白藜芦醇还是一种植物雌激素,在不同的试验中发挥不同程度的雌激素受体激动剂活性^[17]。因此推测白藜芦醇在卵母细胞成熟液中发挥雌激素样活性,可以竞争性地与卵丘细胞上的雌激素受体相结合,达到饱和状态时,便会通过负反馈调节作用降低卵丘细胞中雌激素分泌^[5]。

3 白藜芦醇对线粒体功能和能量稳态的影响

线粒体是细胞能量代谢的重要场所。它可以直接利用氧,但也不断受到氧毒性的伤害,一旦损伤过度,细胞就会衰老死亡。而沉默信息调节因子 1 (Sirtuin1, SIRT1) 是 NAD⁺ 依赖的组蛋白去乙酰化酶 sirtuin 家族的成员^[18],对细胞稳态具有抗衰老作用,它的一个重要作用是上调线粒体的生物合成^[19]。白藜芦醇是 Sirtuin1 (SIRT1) 的激活剂,它可以通过抑制磷酸二酯酶来增强 SIRT1 的活性^[20]。研究表明,白藜芦醇补充在体外成熟 (IVM) 培养基中改善了牛和猪卵母细胞的受精效果和发育能力,最有可能通过上调线粒体生物合成和降解,使卵母细胞中 ATP 含量增加^[21-22]。而 Itami 等^[23]研究发现,白藜芦醇上调 SIRT1 的表达仅增强线粒体功能而对线粒体数量没有任何影响。SIRT1 的另一个重要作用是与控制细胞代谢的能量传感器 (腺苷一磷酸激活蛋白激酶 AMPK) 相互作用,影响卵母细胞的能量稳态,包括上调氧化磷酸化和脂肪磷酸化^[24]。研究表明,AMPK 的激活能够促进脂肪酸 β -氧化^[23],而且减数分裂过程中脂肪酸的消耗与卵母细胞的发育能力密切相关^[25]。因此,有学者认为,白藜芦醇显著增加卵母细胞内 ATP 含量是由于 SIRT1 因子激活 P-AMPK (磷酸化) 表达,促进脂肪酸 β -氧化,增强线粒体产生 ATP 的能力,从而大大提高了卵母细胞向囊胚阶段的发育能力^[26]。据报道,冷冻保存会降低胚胎内 ATP 含量和线粒体拷贝数,这表明冷冻保存可能会使胚胎中的线粒体受损,而受损线粒体的分解是维持细胞稳态所必需的。因此,有学者将 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇添加在慢速冷冻升温后的胚胎培养基中,发现它可以降低胚胎中 mt-cfDNA (游离线粒体之外的 DNA,即线粒体受损后裂解,mt-DNA (线粒体 DNA) 游离于线粒体之外) 的含量,增加培养基中 mt-cfDNA 的含量,说明白藜芦醇增强了受损线粒体的降解,并将 mt-DNA 分泌到培养基中,从而维持细胞稳态^[27]。

4 白藜芦醇对体外胚胎生产过程中细胞凋亡的影响

细胞凋亡在发育和分化中起关键作用,它是一种正常的细胞代谢程序,可以有效清除受损的细胞。然而对于体外培养卵母细胞或胚胎时由于环境应激等因素所产生的 ROS,亦可诱导细胞凋亡。大量研究表明,适当浓度的白藜芦醇通过调节与细胞凋亡有关基因的表达,可减少细胞凋亡。目前,最受关注的是 bcl-2 蛋白家族和胱天蛋白酶 (caspase) 家族,它包括功能相互对立的促凋亡 (Bax) 和抗凋亡 (Bcl-2) 基因,以及在凋亡过程中起关键作用的凋亡执行蛋白酶 caspase3。如 Kwak 等^[8]在研究猪卵母细胞成熟时发现,添加白藜芦醇对于 Bcl-2 的表达无显著影响,但明显降低了 Bax 和 Caspase-3 基因的表达,抑制了卵母细胞的凋亡。该结果在山羊^[9]和牛^[28]卵母细胞研究中分别得到了证实。然而,在人乳腺癌细胞培养中发现白藜芦醇还有剂量依赖效应,低浓度促进细胞分裂,抑制细胞凋亡,高浓度则发挥抗增殖促凋亡作用^[29]。如当白藜芦醇的添加量高至 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, Bax 表达量升高, Bcl-2 表达量下降,细胞呈现凋亡状态,其中 Bcl-2 表达量甚至是低于未添加白藜芦醇的空白组^[12]。

这与 Torres 等^[28] 和 Lee 等^[30] 的研究结果类似。此外,还有一些其他的基因在细胞凋亡中发挥作用,如 Kong 等^[31] 对大鼠的研究发现,白藜芦醇通过减少凋亡蛋白 FOXO3a、Bim 和 P27KIP1 的激活,抑制卵母细胞凋亡,增加卵母细胞数量,维持正常的发情周期,延缓大鼠衰老。

5 小结

白藜芦醇作为天然的抗氧化剂,在体外胚胎生产过程中的作用重大。添加适宜浓度的白藜芦醇可清除细胞内多余 ROS,提高 GSH 水平,降低氧化应激,维持机体氧化还原平衡;同时调节相关基因的表达,促进类固醇激素分泌,改善线粒体功能,维持细胞能量稳态,减少细胞凋亡,进而提高卵母细胞体外成熟效果、胚胎的体外发育潜力以及冷冻精液的受精能力。然而白藜芦醇在体外胚胎生产中的作用机制较为复杂,以及各物种间生理差异,添加浓度相差较大,因此要想明确白藜芦醇提高体外胚胎生产效率的潜在机理,还需深入研究。

参考文献

- BAUR J A, SINCLAIR D A. Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence[J]. Nature reviews drug discovery, 2006, 5(6): 493–506.
- GENTILLI M, MAZOIT J X, BOUAZIZ H, et al. Resveratrol decreases hyperalgesia induced by Carrageenan in the rat hind paw[J]. Life sciences, 2001, 68(11): 1317–1321.
- HYUN. The effects of resveratrol on oocyte maturation and preimplantation embryo development[J]. Journal of embryo transfer, 2012, 27: 71–80.
- ZABIHI A, SHABANKAREH H K, HAJARIAN H, et al. Resveratrol addition to in vitro maturation and in vitro culture media enhances developmental competence of sheep embryos[J]. Domestic animal endocrinology, 2019, 68: 25–31.
- WANG F, TIAN X Z, ZHANG L, et al. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization[J]. Fertility and sterility, 2014, 101(2): 577–586.
- LONGOBARDI V, ZULLO G, SAIZANO A, et al. Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves *in vitro* fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm[J]. Theriogenology, 2016, 88: 1–8.
- GADANI B, BUCCI D, SPINACI M, et al. Resveratrol and Epigallocatechin-3-gallate addition to thawed boar sperm improves in vitro fertilization[J]. Theriogenology, 2016, 90: 88–93.
- KWAK S S, CHEONG S A, 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.
- MUKHERJEE A, MALIK H, SAHA A P, et al. Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression[J]. Journal of assisted reproduction and genetics, 2014, 31(2): 229–239.
- SANTOS E C S, APPELTANT R, DANG-NGUYEN T Q, et al. The effect of resveratrol on the developmental competence of porcine oocytes vitrified at germinal vesicle stage[J]. Reproduction in domestic animals, 2018, 53(2): 304–312.
- KHAZAEI M, AGHAZ F. Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during *in vitro* maturation of oocytes[J]. International journal of fertility & sterility, 2017, 11(2): 63–70.
- 戴建军, 吴彩凤, 张树山, 等. 成熟液中添加白藜芦醇对猪卵母细胞体外发育和抗冻能力的影响[J]. 中国农学通报, 2018, 34(28): 137–142.
- 李世佳, 苏卫东, 邱丽君, 等. 白藜芦醇对精子冷冻损伤的保护作用[J]. 中华男科学杂志, 2018(6): 499–503.
- LI Y, WANG J, ZHANG Z Z, et al. Resveratrol compares with melatonin in improving in vitro porcine oocyte maturation under heat stress[J]. Journal of animal science and biotechnology, 2017, 8(1): 89–98.
- SHIN S, JEON J H, PARK D, et al. trans-Resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo[J]. Archives of pharmacological research, 2008, 31(1): 83–87.
- MORITA Y, WADA-HIRAIKE O, YANO T, et al. Resveratrol promotes expression of SIRT1 and STAR in rat ovarian granulosa cells: An implicative role of SIRT1 in the ovary[J]. Reproductive biology & endocrinology, 2012, 10(1): 1–10.
- GEHM B D, MCANDREWS J M, CHIEN P Y, et al. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(25): 14138–14143.
- GUARENTE L, PICARD F. Calorie restriction—the SIRT2 connection[J]. Cell, 2005, 120(4): 473–482.
- CIVITARESE A E, CARLING S, HEILBRONN L K, et al. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans[J]. PLoS Medicine, 2007, 4(3): 485–494.
- PARK S J, AHMAD F, PHILIP A, et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases[J]. Cell, 2012, 148(3): 421–433.
- TAKEO S, SATO D, KIMURA K, et al. Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes[J]. Journal of reproduction & development, 2014, 60(2): 92–99.
- SATO D, ITAMI N, TASAKI H, et al. Relationship between mitochondrial DNA Copy Number and SIRT1 Expression in Porcine Oocytes[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94488.
- ITAMI N, SHIRASUNA K, KUWAYAMA T, et al. Resveratrol improves the quality of pig oocytes derived from early antral follicles through sirtuin 1 activation[J]. Theriogenology, 2015, 83(8): 1360–1367.
- HARDIE D G. AMP-activated protein kinase—an energy sensor that regulates all aspects of cell function[J]. Genes Dev, 2011, 25(18): 1895–1908.
- TAKEO S, KAWAHARA-MIKI R, GOTO H, et al. Age-associated changes in gene expression and developmental competence of bovine oocytes, and a possible countermeasure against age-associated events[J]. Molecular reproduction and development, 2013, 80(7): 508–521.
- HARDIE D G. AMP-activated protein kinase: A key regulator of energy balance with many roles in human disease[J]. Journal of internal medicine, 2014, 276(6): 543–559.
- HAYASHI T, KANSAKU K, ABE T, et al. Effects of resveratrol treatment on mitochondria and subsequent embryonic development of bovine blastocysts cryopreserved by slow freezing[J]. Animal science journal, 2019, 90(7): 849–856.
- TORRES V, HAMDI M, MILLÁN DE LA BLANCA M G, et al. Resveratrol-cyclodextrin complex affects the expression of genes associated with lipid metabolism in bovine in vitro produced embryos[J]. Reproduction in domestic animals, 2018, 53(4): 850–858.
- KIM Y A, CHOI B, LEE Y, et al. Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells[J]. Oncology reports, 2004, 11(2): 441–446.
- LEE K, WANG C, CHAILLE J M, et al. Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced *in vitro*[J]. Journal of reproduction and development, 2010, 56(3): 330–335.
- KONG X X, FU Y C, XU J J, et al. An effective regulator of ovarian development and oocyte apoptosis[J]. Journal of endocrinological investigation, 2011, 34(11): 374–381.