

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00888

葡萄糖在小鼠胚胎 2-细胞晚期诱导活性氧增多抑制胚胎体外发育

张雷^{1,2}, 李钟淑², 方南洙^{2*}

1. 铜仁学院生物化学系动物实验室, 铜仁 554300

2. 延边大学农学院动物遗传育种与繁殖实验室, 龙井 133400

[摘要] **目的:**测定葡萄糖培养早期胚胎体外发育各阶段的活性氧(ROS)水平,探讨葡萄糖对小鼠早期胚胎体外发育产生阻滞作用的机制。**方法:**通过在改良的CZB(m-CZB)培养液中添加不同浓度(分别为0、5、10、15、20、25、30 mmol/L)的葡萄糖培养小鼠早期胚胎,根据其体外发育的不同阶段,用分子探针氢化乙啶(hydroethidine, HE)和紫外分光光度法分别检测小鼠胚胎内、外ROS含量。**结果:**葡萄糖浓度达到15 mmol/L时囊胚发育率开始出现明显下降($P < 0.05$),相同浓度培养的小鼠胚胎在2-细胞晚期阶段胚胎内部超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)和培养液中过氧化氢(H_2O_2)含量均明显升高($P < 0.05$),而发育其他阶段胚胎内部的 $O_2^{\cdot-}$ 与对照组(0 mmol/L葡萄糖组)比较均无统计学差异($P > 0.05$)。**结论:**高浓度葡萄糖可能在2-细胞晚期阶段诱导ROS增多,致使小鼠早期胚胎体外发育受阻。

[关键词] 葡萄糖; 胚胎发育; 活性氧

[中图分类号] R 321-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)08-0888-04

Glucose-induced ROS inhibits mouse early embryo development at late 2-cell stage *in vitro*

ZHANG Lei^{1,2}, LI Zhong-shu², FANG Nan-zhu^{2*}

1. Laboratory of Animal, Department of Bio-chemistry, Tongren College, Tongren 554300, China

2. Laboratory of Animal Genetic and Breeding, Agriculture College of Yanbian University, Longjing 133400

[ABSTRACT] **Objective:** To measure the levels of reactive oxygen species (ROS) at each development stage of early embryos incubated with glucose *in vitro*, and to probe into the mechanism by which glucose blocks the development of mouse early embryos. **Methods:** Mouse early embryos were cultured with different concentrations of glucose (0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 mmol/L) added in modified CZB (m-CZB) medium. ROS levels inside and outside of embryos were examined by molecule probes of hydroethidine and spectrophotometry at different stages of embryos. **Results:** When glucose concentration reached 15 mmol/L, the blastocyst developmental rates decreased significantly compared with control (0 mmol/L glucose, $P < 0.05$); superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) levels inside embryos and hydrogen peroxide (H_2O_2) levels in the medium with 15 mmol/L glucose were significantly higher ($P < 0.05$) than those in medium with no glucose at late 2-cell stage. However, there was no significant difference in $O_2^{\cdot-}$ levels in the embryos exposed to 15 mmol/L glucose and no glucose at other growth stages ($P > 0.05$). **Conclusion:** High glucose may induce ROS production at late 2-cell stage and block the development of mouse embryos.

[KEY WORDS] glucose; embryo development; reactive oxygen species

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(8): 888-891]

葡萄糖(glucose)是体细胞体外培养所必需的能源物质,但其对仓鼠^[1]、小鼠^[2]、牛^[3]、绵羊^[4]和人^[5]的早期胚胎体外发育会造成不良影响。研究^[6-9]发现,当多数动物胚胎发育到桑椹胚阶段时,葡萄糖开始被利用,若不及时添加,会抑制囊胚的形成。由此可见,葡萄糖在胚胎发育的早期起抑制作用,后期则起促进作用。但葡萄糖抑制早期胚胎发育的机制目

前尚不十分清楚。对此学术界主要存在两大观点:(1)发生类似Crabtree效应^[4,10]。这种观点认为,葡萄糖的存在和磷酸盐激活作用使糖酵解增强,从而抑制了线粒体氧化代谢,能量的匮乏最终导致发育阻滞。该观点有一定的代表性,但葡萄糖/磷酸盐与2-细胞阻滞的关系究竟如何及其根本机制至今未得到阐明。(2)葡萄糖引起氧化应激^[3,11-12]。该观点认

[收稿日期] 2009-02-05 **[接受日期]** 2009-05-10

[基金项目] 国家自然科学基金(30270954), Supported by National Natural Science Foundation of China (30270954).

[作者简介] 张雷, 讲师. E-mail: zhangandlei@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0433-3264639, E-mail: nzfang@ybu.edu.cn

为过量的葡萄糖能够引起细胞氧化应激而对胚胎发育造成损伤,且已得到一些研究支持,但仍存争议,至今也未见有直接测定葡萄糖培养早期胚胎发育各阶段活性氧(ROS)的报道。本研究通过对葡萄糖培养的小鼠早期胚胎,在其发育的不同阶段,从胚胎内部和培养液两方面测定 ROS 的变化,为探讨葡萄糖能否造成胚胎氧化损伤提供直接依据,及为抗氧化治疗糖尿病胚胎病的构想和寻找促进胚胎体外发育的方法提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物 昆明小鼠由延边大学医学院实验动物学部提供。选取体质量 25~35 g、6~8 周龄雌鼠和体质量 35~45 g、8~12 周龄雄鼠作为实验动物。

1.2 主要试剂和培养液配制 D-PBS 为日本日水制药株式会社产品,NaOH 为沈阳市新化试剂厂产品,孕马血清促性腺激素(PMSG)为赤峰松山兽药厂产品,人绒毛膜促性腺激素(hCG)为浙江省宁波市激素制品有限公司产品,胎牛血清为北京鼎国生物技术有限责任公司产品,其余试剂均为美国 Sigma 公司产品。

CZB 基础培养液参照文献^[13]配制。谷氨酰胺具有抗氧化作用,配制时将其去除,制成改良的 CZB (m-CZB)培养液。按一定比例称取葡萄糖与 m-CZB 培养液混合制成浓度分别为 0、5、10、15、20、25、30 mmol/L 的葡萄糖 m-CZB 培养液。分子探针氢化乙啶(hydroethidine, HE)用二甲基亚砜(DMSO)溶解,调整浓度至 1×10^{-3} mol/L 后 -20°C 、避光保存;使用前用 m-CZB 培养液稀释成终浓度为 1×10^{-5} mol/L 的 HE 染色液,其保存时间不能超过 48 h。

1.3 小鼠超数排卵处理及受精卵采集 使用 PMSG-hCG 法对小鼠进行超数排卵处理。每天 17:00 时于雌鼠腹部皮下注射 5 IU PMSG,间隔 48 h 后再次腹部皮下注射 5 IU hCG,随后按 1:1 的比例立即与雄鼠合笼。自注射 hCG 24 h 后处死雌鼠,取出输卵管膨大部,置入含 5% 胎牛血清的 D-PBS 冲卵液中,在实体显微镜下刺破壶腹部,收集 1-细胞胚胎,之后用 300 mg/L 透明质酸酶消化去除受精卵周围的颗粒细胞,再把受精卵放在 m-CZB 培养液中洗涤 3~5 次,选择形态正常的受精卵用于体外培养。

1.4 胚胎培养 在 35 mm 培养皿中制作 20 μl 的培养滴,覆盖一层高压灭菌的矿物油。将培养皿置于 5% CO_2 、饱和湿度、 37°C 的 CO_2 培养箱中至少平衡 2 h。每滴中放入 5 枚胚胎。每隔 24 h 更换一次

培养液,并记录每天胚胎的发育情况。同样制作每滴含 10 个胚胎的 30 μl 培养滴,用于测定培养液中过氧化氢(H_2O_2)的浓度。

1.5 胚胎内部超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)的测定 HE 在胚胎内分别被 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 氧化为溴乙啶(ehidium bromide, EB),在激发光激发下产生红色荧光,HE 激发波长为 355 nm,发射波长为 460 nm。测定细胞内 EB 的荧光强度,即相对定量细胞内 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 水平。将待测定胚胎从 CO_2 培养箱中取出,置入 HE 染色液(终浓度为 1×10^{-5} mol/L)中,在 CO_2 培养箱内 37°C 保温 15 min。用 m-CZB 培养液冲洗胚胎以去除表面荧光后,立即在荧光显微镜(Leica DMIRB)下测定荧光强度,并用数码相机(SONY;DSC-P72)拍照。用 Image-Pro Plus 5.0 图像分析系统处理图片,得出荧光密度,从而比较不同时期胚胎内部 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的相对含量。

1.6 胚胎培养液中 H_2O_2 浓度的测定 通过量化辣根过氧化物酶(HRP)催化的酚红氧化测定 H_2O_2 的产生量。加入 20 μl 培养过胚胎的培养液于洁净的试管中,再用四重蒸馏水稀释到 1 ml,然后加入 0.75 ml 浓度为 0.8 mg/ml HRP、0.8 mg/ml 酚红 0.45 ml 和 D-PBS 0.8 ml。在室温下放置 5 min 后,加入 3 mol/L 的 NaOH 40 μl ,用紫外分光光度计在 610 nm 处测光密度,根据每次实验绘制的标准曲线推算出胚胎培养液中 H_2O_2 浓度。

1.7 统计学处理 实验数据以 SPSS 11.5 软件处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析(one way ANOVA),两两比较用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度葡萄糖对小鼠早期胚胎体外发育的影响 在不同培养液中,损伤动物早期胚胎发育的葡萄糖浓度不同^[14-16]。为了确定 m-CZB 培养液中阻滞昆明种小鼠早期胚胎发育的临界葡萄糖浓度,在 m-CZB 培养液中添加不同浓度的葡萄糖培养小鼠 1-细胞胚胎,结果如表 1 所示,随着葡萄糖浓度升高,胚胎囊胚发育率下降。当浓度升高到 15 mmol/L 时,其囊胚发育率(51.25%)与对照组(0 mmol/L 葡萄糖组,78.26%)比较差异有统计学意义($P < 0.05$),而低于 15 mmol/L 时与对照组比较则差异无统计学意义($P > 0.05$)。这说明 15 mmol/L 可能是葡萄糖引起胚胎发育阻滞的临界浓度。

2.2 体外不同发育阶段胚胎内部 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的测定 小鼠早期胚胎从 8-细胞阶段开始能够利用葡萄糖提供能量^[7-8]。对此,我们测定 8-细胞胚胎之前各发育阶

段的O₂⁻水平,结果如表2所示,无论是对照组还是15 mmol/L葡萄糖组,其胚胎2-细胞晚期阶段O₂⁻的水平均明显高于其他各阶段($P < 0.05$);处于2-细胞晚期阶段的15 mmol/L葡萄糖组O₂⁻的水平显著高于对照组($P < 0.05$),而其他阶段则差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 不同浓度葡萄糖对小鼠1-细胞胚胎体外发育的影响
Tab 1 Effect of different concentrations of glucose on development of 1-cell embryos cultured *in vitro*

Glucose concentration c _B /(mmol · L ⁻¹)	Number of trials	Number of 1-cell embryos	Percent of blastocysts ($\bar{x} \pm s, \%$)
0(Control)	23	115	78.26 ± 14.89
5	10	50	68.00 ± 21.50
10	10	50	62.00 ± 23.94
15	16	90	51.25 ± 24.19*
20	23	115	48.08 ± 29.80*
25	11	55	39.09 ± 14.46*
30	12	60	40.00 ± 19.07*

* $P < 0.05$ vs control group

表2 体外不同发育阶段胚胎内部O₂⁻的水平变化

Tab 2 Levels of O₂⁻ (values of EB emission) within embryos at different development stages *in vitro*
($\bar{x} \pm s$)

Glucose concentration c _B /(mmol · L ⁻¹)	Early 2-cell stage	Late 2-cell stage	Mid-4-cell stage
0(Control)	18.38 ±	55.38 ±	27.95 ±
	4.25(6)*	7.61(35)	1.47(6)*
15	22.02 ±	63.67 ±	27.06 ±
	3.08(12)*	11.81(39) [△]	4.41(5)*

* $P < 0.05$ vs late 2-cell stage; [△] $P < 0.05$ vs control group. Number of embryo is in the bracket

2.3 体外2-细胞晚期 m-CZB 培养液中 H₂O₂ 的测定 小鼠早期胚胎在体外培养时常发生2-细胞阻滞现象。我们对体外小鼠胚胎2-细胞晚期培养液进行H₂O₂含量的测定,结果如表3所示,15 mmol/L葡萄糖培养液中H₂O₂的含量显著高于对照组($P < 0.05$)。

表3 2-细胞晚期培养液中H₂O₂含量的测定
Tab 3 Levels of H₂O₂ in m-CZB medium containing glucose at late 2-cell stage

Glucose concentration c _B /(mmol · L ⁻¹)	Number of trials	Number of of late 2-cell embryos	Levels of H ₂ O ₂ [c _B /(μmol · L ⁻¹), $\bar{x} \pm s$]
0(Control)	10	100	2.35 ± 1.32
15	10	100	7.55 ± 2.08*

* $P < 0.05$ vs control group

3 讨论

3.1 葡萄糖对小鼠胚胎发育的影响 小鼠胚胎在早期卵裂时,主要利用丙酮酸或草酰乙酸提供能量;当发育到8-细胞阶段时,葡萄糖成为有效能源物质^[7-8]。在小鼠早期胚胎的体外培养中,在致密化之前添加葡萄糖是否对胚胎发育产生抑制作用,目前学术界尚存争议。但葡萄糖对小鼠早期胚胎发育的作用受制于胚胎的遗传背景和培养液成分两方面^[2,14,17],已为学术界所公认。如在传统培养液中,生理浓度的葡萄糖对纯系和远交系的小鼠早期胚胎发育会造成阻滞或部分阻滞,而对不同F1代早期胚胎却不会引起发育阻滞^[17]。在不同培养液中,相同浓度的葡萄糖培养同种胚胎却有不同效果。比如在M16培养液中,生理浓度的葡萄糖对远交系CF1小鼠受精卵发育具有抑制作用^[15],而在KSOM培养液中却有促进作用^[14]。最近,丁芳等^[16]的研究也表明,在CZB培养液中添加5 mmol/L葡萄糖不会抑制阻滞品系的ICR小鼠早期胚胎发育,当葡萄糖浓度提高到10 mmol/L时也仍未见到毒害作用。我们选用阻滞品系的昆明种小鼠的实验结果也表明,10 mmol/L葡萄糖浓度未见使胚胎发育受抑制,当葡萄糖浓度提高到15 mmol/L时才出现抑制作用。

3.2 体外不同发育阶段早期胚胎内外ROS的水平

大量体内外研究表明,胚胎在体外高糖环境下培养或母体糖尿病均会影响胚胎生长和导致发育障碍。然而,若在体外培养体系中加入某些抗氧化剂,即可抑制高糖所诱发的胚胎毒性^[3],表明高糖的胚胎毒性与ROS生成有关。我们的实验结果表明15 mmol/L葡萄糖导致小鼠胚胎ROS升高,与上述结果相一致。ROS是生物体内产生的O₂⁻、H₂O₂、HO·、NO·等活性含氧化合物的总称。它是一类性质十分活泼的化学基团,在机体的一系列病理、生理过程中起着中介介质的作用。当ROS过多,超过了细胞内的抗氧化能力时被称为氧化应激,氧化应激产生脂质过氧化、蛋白质和核酸被氧化修饰,导致细胞损伤。从胚胎发育到器官形成的重要时期里,胚胎组织中的抗氧化应激酶和还原物质远低于母体中的含量;而且胚胎内重要的还原物质——谷胱甘肽的浓度也随着卵裂的进行而下降,植入前的胚胎几乎不能合成谷胱甘肽^[18]。谷胱甘肽对调节细胞内ROS的浓度起着重要的作用。它既可以直接充当自由基的清道夫,同时又和NADPH一起作为谷胱甘肽过氧化物酶中和ROS的毒性。胚胎内部这些抗氧化物

质含量不足,导致其对氧化应激损伤的敏感性提高。

为了进一步明确葡萄糖在小鼠胚胎发育早期各阶段 ROS 的产生情况,我们进行了体外不同发育阶段胚胎内部 O_2^- 和体外 2-细胞晚期培养液中 H_2O_2 浓度的测定实验。结果显示,无论是对照组还是 15 mmol/L 葡萄糖组,2-细胞晚期的 O_2^- 含量均显著高于其他各阶段 ($P < 0.05$),这与 Nasr-Esfahani 等^[19]的报道相一致,即体外发育的胚胎(无论阻滞品系或是非阻滞品系)在 2-细胞中期到 4-细胞早期之间, H_2O_2 水平持续上升;但这一现象在 1-细胞到 2-细胞及 4-细胞到 8-细胞过渡期间并未出现。多数品系的小鼠早期胚胎体外培养时,第二细胞周期的 G_2 相时程将无限延长,即发生所谓“2-细胞阻滞”的发育阻断现象。研究^[20]发现,胚胎发育阻滞正好是母体-胚胎基因过渡期,即由卵母细胞贮存的遗传信息控制胚胎发育过渡到受精后胚胎基因的启动阶段。此时,细胞内部很多机制正在建立和转换中。对体内外胚胎发育状况的分析表明,输卵管分泌的某些因子对胚胎的发育十分重要。而离体培养使胚胎脱离了这一层保护,丧失了一些重要因子的来源,在这样的环境下任何不利因素都可能导致胚胎的发育阻滞。

本研究结果还显示,15 mmol/L 葡萄糖组在胚胎 2-细胞晚期产生的 ROS 要明显高于对照组 ($P < 0.05$),进而引起胚胎发育受阻,这与小鼠胚胎在体外发育停滞可能是因 ROS(如 H_2O_2 等)增多所致^[21]的观点一致。

总之,本实验结果表明,高糖抑制小鼠早期胚胎体外发育,很可能是胚胎 2-细胞晚期诱导 ROS 增多,并对其造成氧化应激损伤所致。

(志谢 本实验得到延边大学农学院动物科学系动物遗传育种与繁殖实验室金庆国老师及李兆华、唐桂娥、曹新燕等的帮助,在此一并表示感谢!)

[参考文献]

- [1] Ludwig T E, Lane M, Bavister B D. Differential effect of hexoses on hamster embryo development in culture[J]. Biol Reprod, 2001, 64: 1366-1374.
- [2] Hadi T, Hammer M A, Algire C, Richards T, Baltz J M. Similar effects of osmolarity, glucose, and phosphate on cleavage past the 2-cell stage in mouse embryos from outbred and F1 hybrid females[J]. Biol Reprod, 2005, 72: 179-187.
- [3] Iwata H, Akamatsu S, Minami N, Yamada M. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose [J]. Theriogenology, 1998, 50: 365-375.
- [4] Thompson J G, Simpson A C, Pugh P A, Tervit H R. Requirements for glucose during *in vitro* culture of sheep preimplantation embryos[J]. Mol Reprod Dev, 1992, 31: 253-257.
- [5] Conaghan J, Handyside A H, Winston R M, Leese H J. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos *in vitro* [J]. J Reprod Fertil, 1993, 99: 87-95.
- [6] Pantaleon M, Scott J, Kaye P L. Nutrient sensing by the early mouse embryo: hexosamine biosynthesis and glucose signaling during preimplantation development [J]. Biol Reprod, 2008, 78: 595-600.
- [7] Sakkas D, Urner F, Menezes Y, Leppens G. Effects of glucose and fructose on fertilization, cleavage, and viability of mouse embryos *in vitro* [J]. Biol Reprod, 1993, 49: 1288-1292.
- [8] Mognetti B, Leppens G, Sakkas D. The development of preimplantation mouse parthenogenones *in vitro* in absence of glucose: influence of the maternally inherited components [J]. Mol Reprod Dev, 1996, 43: 421-427.
- [9] Donnay I, Feugang J M, Bernard S, Marchandise J, Pampfer S, Moens A, et al. Impact of adding 5.5 mM glucose to SOF medium on the development, metabolism and quality of *in vitro* produced bovine embryos from the morula to the blastocyst stage [J]. Zygote, 2002, 10: 189-199.
- [10] Seshagiri P B, Bavister B D. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: evidence for the “Crabtree effect” [J]. Mol Reprod Dev, 1991, 30: 105-111.
- [11] Akazawa S. Diabetic embryopathy: studies using a rat embryo culture system and an animal model [J]. Congenit Anom (Kyoto), 2005, 45: 73-79.
- [12] Yang P, Zhao Z, Reece E A. Activation of oxidative stress signaling that is implicated in apoptosis with a mouse model of diabetic embryopathy [J]. Am J Obstet Gynecol, 2008, 198: 130. e1-7.
- [13] Chatot C L, Ziomek C A, Bavister B D, Lewis J L, Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro* [J]. J Reprod Fertil, 1989, 86: 679-688.
- [14] Biggers J D, McGinnis L K. Evidence that glucose is not always an inhibitor of mouse preimplantation development *in vitro* [J]. Hum Reprod, 2001, 16: 153-163.
- [15] Lawitts J A, Biggers J D. Overcoming the 2-cell block by modifying standard components in a mouse embryo culture medium [J]. Biol Reprod, 1991, 45: 245-251.
- [16] 丁芳,周红林,刘洋,马兰,苏莹,杜玲.葡萄糖对 ICR 小鼠胚胎体外发育的影响 [J]. 动物学研究, 2007, 28: 501-506.
- [17] Scott L, Whittingham D G. Influence of genetic background and media components on the development of mouse embryos *in vitro* [J]. Mol Reprod Dev, 1996, 43: 336-346.
- [18] Gardiner C S, Reed D J. Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo [J]. Arch Biochem Biophys, 1995, 318: 30-36.
- [19] Nasr-Esfahani M H, Aitken J R, Johnson M H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo* [J]. Development, 1990, 109: 501-507.
- [20] Flach G, Johnson M H, Braude P R, Taylor R A, Bolton V N. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryos [J]. EMBO, 1982, 1: 681-686.
- [21] Favetta L A, St John E J, King W A, Betts D H. High levels of p66shc and intracellular ROS in permanently arrested early embryos [J]. Free Radic Biol Med, 2007, 42: 1201-1210.