

褪黑素对小鼠 2- 细胞期胚胎发育的影响

吴珊珊¹ 赵海波² 武 雁² 张建芳² 陈必良^{1△}

(1 第四军医大学西京医院妇产科 陕西 西安 710032 2 第四军医大学西京医院妇产科生殖医学中心 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究褪黑素对小鼠 2- 细胞期胚胎发育的影响。方法:在培养液中添加不同浓度褪黑素,在不同的作用时间点,观察并记录小鼠胚胎囊胚率、孵出率,研究其变化情况。结果:不同浓度褪黑素对小鼠 2- 细胞期胚胎存在双向作用,在 10^{-13} - 10^{-5} M 之间促进细胞囊胚形成和孵出,在 10^{-9} M 时促进效应达到最高,而在 10^{-3} M 时则呈现出一定的毒性作用。结论:褪黑素对小鼠胚胎发育影响与褪黑素浓度密切相关。

关键词 褪黑素 2- 细胞胚胎 体外胚胎发育 小鼠

中图分类号:Q 95-3 Q57 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)06-1072-03

Effect of melatonin on development of mice 2-cell embryos

WU Shan-shan¹, ZHAO Hai-bo², WU Yan², ZHANG Jian-fang², CHEN Bi-liang^{1△}

(1 The forth military medical university Xi-Jing hospital Gynecology and Obstetrics;

2 The forth military medical university Xi-Jing hospital Gynecology and Obstetrics Reproduction Medicine Center, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of melatonin on the development of mice 2-cell embryos. **Methods:** The effects of various concentrations of melatonin (10^{-13} - 10^{-3} M) on the development of mouse embryos were detected. The blastocyst rate and hatching rate of mouse embryos were recorded after treated by different concentrations of melatonin. **Results:** Melatonin could improve the development of mice 2-cell embryo in a bi-phasic manner. The rates of blastocyst formation and hatched blastocysts increased by melatonin at 10^{-13} - 10^{-5} M, and the maximum effects arrived at 10^{-9} M. However, the toxic effects appeared at 10^{-3} M. **Conclusions:** Melatonin affect the development of mice embryos depending the concentrations of melatonin.

Key words: Melatonin; Two-cell embryo; In vitro development; Mouse

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q57 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)06-1072-03

前言

褪黑素(N-乙酰-5-氧基色胺),是存在于从藻类到人类等众多生物中的一种激素,它在生物中的含量水平随每天的时间变化而变化^[1]。在人体中,主要由位于第三脑室后壁的松果体(Pineal Body 或 Pineal Gland)分泌^[2]。其次,视网膜、附件泪腺和胃肠道亦可分泌褪黑素。褪黑素在体内可调节多种生理过程,尤其是对睡眠和体温的控制^[3]。另有报道称,褪黑素及其代谢产物具有较强的内源性自由基清除活性^[4],可以减少体内的氧化应激引起的细胞损伤^[5]。

在生殖医学方面,有研究显示褪黑素可以直接影响体外羊^[6,7]、猪^[8]、牛^[9]、小鼠^[10,11]等胚胎细胞的发育。针对羊的实验中^[12],在培养液中加入 $1\mu\text{g/ml}$ 的褪黑素可以促进冻融囊胚发育能力,提高囊胚孵出率。类似的使用褪黑素处理体外培养的猪胚胎后,可以提高囊胚分裂率和胚胎数目,并可保护猪胚胎免受热应激伤害^[13]。褪黑素对处于高氧张力环境下(20%)的牛胚胎发育存在有益效应,可能与褪黑素的自由基清除能力有关。有报道认为,褪黑素这种抗氧化保护作用可能并不仅是直接作用于活性

氧的效应,而还可能与调节抗氧化防御系统有关^[14,15]。Ishizuka B 等发现高浓度的褪黑素(10^{-4} - 10^{-6} M)增加小鼠受精率,而低浓度的(10^{-6} 或 10^{-8})褪黑素可改善的胚胎在体外的早期发育情况^[16]。本次研究在获取小鼠 2- 细胞期胚胎后,使用不同浓度褪黑素作用体外小鼠 2- 细胞胚胎,记录并分析各组囊胚形成、孵出情况,以期了解褪黑素对小鼠 2- 细胞胚胎发育的作用效果,结果表明褪黑素可在一定程度促进小鼠囊胚形成和孵出。以上结果为体外胚胎发育培养环境的优化提供了有益的参考。

1 材料和方法

1.1 试剂

孕马血清促性腺激素(Pregnant Mare Serum Gonadotropin, PMSG)、绒毛膜促性腺激素(Human Chorionic Gonadotropin, HCG)购自宁波市激素制品有限公司。褪黑素(Melatonin, MT)和 M199 培养液购自 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA),石蜡油购自 AMRESCO 公司。培养皿购自 NEST 公司。

1.2 培养液配制

胚胎的微滴配制及分组:褪黑素使用 M199 溶解为 200mM 母液,4℃避光保存。使用时用 M199 培养液(含 10% FBS)将母液稀释为含 MT 浓度为 0 , 10^{-13} , 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3}mol/l 的液体,并标记编号。取 2 个培养皿,用巴氏滴管做 2 个微滴,每微滴 $50\mu\text{L}$,上面覆盖石蜡油,放入 5% CO_2 , 37℃饱和湿度的培养箱中,平衡过夜。

作者简介:吴珊珊(1983-),女,硕士研究生,主要研究方向:生殖医学 E-MAIL: xissy122@163.com

△通讯作者:陈必良(1962-),男,妇产科教授,硕士研究生导师, E-mail: gynobs@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2010-11-21 接受日期:2010-12-15)

1.3 小鼠来源

本实验选用昆明系小鼠(KM 小鼠) 购自第四军医大学实验动物中心。母鼠为 5~6 周龄,体重 25g 左右,公鼠 8 周龄以上,体重 35g 左右。动物培养于室温 20-22℃环境中,14h 灯光与 10h 黑暗交替循环,行自由采食和饮水。饲料成分 粗蛋白质 21.8% 粗脂肪 5.0%。饲料、垫料经高压消毒处理,饮用水是实验动物饮用纯水机制备的无菌水。

1.4 2- 细胞期胚胎培养

实验开始的第一天 18:00,选择阴门淡粉红色的雌性小鼠,腹腔注射 PMSG15 IU/ 只,间隔 48h,于第三天的 18:00 腹腔注射人绒毛膜促性腺激素(hCG)15 IU/ 只。注射 hCG 后按 1:1 的比例与成年雄鼠合笼,第四天早检查交配情况,并记录有阴栓雌鼠。

交配后 44h,颈脱臼法处死见栓雌鼠,打开腹腔,剪下输卵管迅速将其置于 PBS 平衡盐溶液中,倒置显微镜下用带 5 号针头注射器从输卵管壶腹部插入,刺破壶腹部使胚胎流出,收集形态正常的 2- 细胞期胚胎,用 PBS 液清洗后,随机将胚胎放入平衡好的微滴中。

1.5 褪黑激素对 2- 细胞期胚胎的处理

小鼠 2- 细胞胚胎在含有不同浓度褪黑素的 M199 培养液中培养 72h 后观察各组囊胚形成数目,并计算其占 2- 细胞胚胎总数百分率。培养 96h 后观察孵化囊胚数目,计算其占 2- 细胞胚胎总数百分率,并对孵化囊胚进行计数。

1.6 统计分析

囊胚形成率(72h)和孵出率(96h)间的差异用单因素方差分析进行检验。结果均使用 $\bar{x} \pm s$ 表示 $P < 0.05$ 认为有统计学显著差异。

2 结果

2.1 小鼠胚胎体外培养形态图

a)未经处理的小鼠 2- 细胞胚胎 b)小鼠扩张期囊胚。约受精后 4-4.5 天,随着子宫腔分泌液渗入的大量增加,囊腔不断扩大,外周滋养叶细胞进一步增多,中央的圆形细胞在分裂增殖的同时,向囊腔的一侧聚集并突向液腔,形成内细胞团,囊胚形成。c)囊胚孵出。约受精后 5 天左右卵透明带变薄,最终透明带出现缺口,胚胎滋养叶细胞包绕着囊腔,内细胞团从此处孵出。

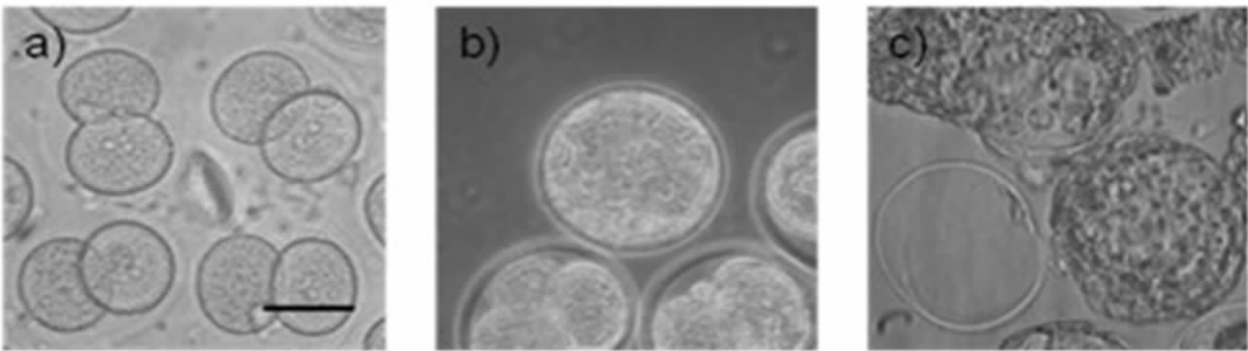


图 1 小鼠胚胎 2 细胞到囊胚孵出阶段显微镜($\times 100$)图片 a)2- 细胞期胚胎 b)囊胚期 c)孵化的囊胚 横线代表 20 μ m

Fig 1 Hatching stage of mouse 2-cell embryos under microscope ($\times 100$) a)two-cell embryos b) blastocysts c) hatched blastocysts; lateral line represent 20 μ m

2.2 褪黑素对小鼠 2- 细胞胚胎体外发育的影响

褪黑素作用后 统计 2- 细胞期胚胎囊胚形成率(72h)和孵出率(96h),由表 1 可见,MT 浓度在 $0-10^{-11}$ M 时,对 2- 细胞胚胎的囊胚率和孵出率呈促进作用,MT 浓度在 $10^{-7}-10^{-3}$ M 时,对 2- 细胞胚胎的囊胚率和孵出率呈抑制作用,MT 浓度在 10^{-9} M

时 2- 细胞胚胎的囊胚率和孵出率最高。由此可以说明 2- 细胞胚胎发育与 MT 浓度密切相关,较高浓度褪黑素处理下的小鼠 2 细胞期胚胎呈现较为明显的毒性作用,囊胚率和孵出率呈现大幅度的下降趋势,低浓度褪黑素对小鼠胚胎囊胚率和孵出率的促进具有显著的统计学意义。

表 1 小鼠 2- 细胞胚胎在不同浓度褪黑素处理 96h 后囊胚率和孵出率情况

Table1 Development of Mouse Embryos Cultured in Different Melatonin Concentrations

Concentration of melatonin (mol/l)	No.of two-cell embryos cultured	No.of blastocysts (% $\pm$ SEM)	No.of hatched blastocysts (% $\pm$ SEM)
0	107	54(50.02 $\pm$ 4.11)	27(25.44 $\pm$ 8.72)
10^{-13}	112	64(57.25 $\pm$ 3.26)*	51(45.23 $\pm$ 6.77)**
10^{-11}	108	72(66.27 $\pm$ 5.68)**	61(56.23 $\pm$ 7.15)**
10^{-9}	111	93(83.98 $\pm$ 3.29)**	76(68.31 $\pm$ 6.41)**
10^{-7}	122	82(67.54 $\pm$ 4.29)**	56(45.98 $\pm$ 6.14)**
10^{-5}	121	72(59.12 $\pm$ 3.11)*	42(34.52 $\pm$ 8.45)**
10^{-3}	126	18(14.11 $\pm$ 4.32)**	8(6.22 $\pm$ 3.14)**

Note:Compared with group * $p < 0.05$; Compared with group ** $p < 0.01$

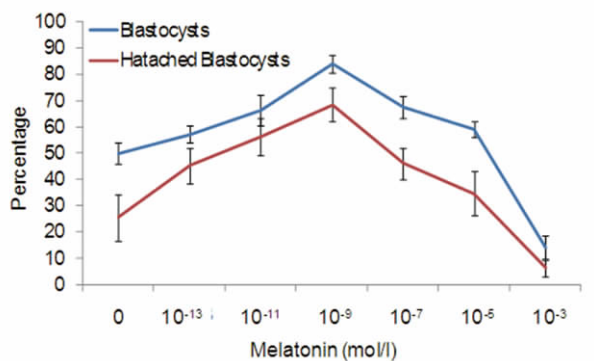


图2 小鼠2-细胞胚胎在不同浓度褪黑素处理后囊胚形成率(72h)和孵出率(96h)曲线图,横坐标分别代表0, 10^{-13} , 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} M的褪黑素。

Fig 2: After treatment with different concentrations of Melatonin, the blastocysts rate (72h) and hatched rate (96h) of mice 2-cell embryos were shown in curve chart. The x-axis presents the concentrations of melatonin, including 0, 10^{-13} , 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} M.

3 讨论

胚胎体外培养的关键,在于有适宜的培养环境。先前的研究表明褪黑素可以促进2-细胞期胚胎发育^[17]。本研究通过观察褪黑素对小鼠2-细胞期胚胎囊胚率和孵出率的影响,发现一定浓度褪黑素对2-细胞期胚胎的发育具有促进作用,在 10^{-9} M时体现为对胚胎最大的促进效果,高于或者低于该浓度促进作用减弱。然而高浓度的褪黑素(10^{-3} M)对胚胎的囊胚形成和孵出都存在比较显著的抑制效应,国内有报道认为, 10^{-3} M褪黑素可引起白血病NB4细胞周期阻滞在G1期,且凋亡细胞比例增加至28.13%^[18],同时这也与国外报道对HL-60细胞株的作用相同^[19]。因此高浓度褪黑素抑制2-细胞期胚胎的发育可能与细胞周期阻滞密切相关。

褪黑素促进小鼠胚胎发育的机制尚不明确,笔者认为对囊胚率和孵出率的影响可能由于褪黑素作为自由基清除剂而发挥一定的支持作用,自由基的存在刺激胚胎表达凋亡诱导基因Bax,并下调抗凋亡Bcl-xl,有报道指出在加有 10^{-10} M褪黑素的猪胚胎培养环境中,自由基水平显著下降,同时伴随有Bax mRNA表达显著下调,Bcl-xl mRNA表达水平上调1.7倍,从而使胚胎具备一定的抗凋亡能力,进而提高胚胎的存活率^[20]。

综上所述,本文首次探讨了不同浓度褪黑素对小鼠2-细胞期胚胎发育的影响, 10^{-13} - 10^{-5} M浓度间的褪黑素对胚胎发育均有显著的促进作用,高浓度的褪黑素 10^{-3} M对胚胎细胞有一定毒性作用,下一步可深入探讨褪黑素的作用机制。

参考文献 (References)

- [1] Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions[J]. *Endocr Rev*, 1991, 12(2): 151-80
- [2] Claustat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*, 2005, 9(1): 11-24
- [3] Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2004, 25 (3-4): 177-95
- [4] Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance [J]. *En-*

doctrine, 2005, 27(2): 119-30

- [5] Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, et al. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2001, 34(2): 237-56
- [6] Tsiligianni T, Valasi I, Cseh S, et al. Effects of melatonin treatment on follicular development and oocyte quality in Chios ewes - short communication[J]. *Acta Vet Hung*, 2009, 57(2): 331-5
- [7] Vazquez MI, Forcada F, Casao A, et al. Undernutrition and exogenous melatonin can affect the in vitro developmental competence of ovine oocytes on a seasonal basis [J]. *Reprod Domest Anim*, 2010, 45(4): 677-84
- [8] Shi JM, Tian XZ, Zhou GB, et al. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes[J]. *J Pineal Res*, 2009, 47(4): 318-23
- [9] Kang JT, Koo OJ, Kwon DK, et al. Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells [J]. *J Pineal Res*, 2009, 46(1): 22-8
- [10] Papis K, Poleszczuk O, Wenta ME, et al. Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration[J]. *J Pineal Res*, 2007, 43(4): 321-6
- [11] Voznesenskaya T, Makogon N, Bryzgina T, et al. Melatonin protects against experimental immune ovarian failure in mice[J]. *Reprod Biol*, 2007, 7(3): 207-20
- [12] Casao A, Vega S, Palacin I, et al. Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in Rasa Aragonesa rams [J]. *Reprod Domest Anim*, 2010, 45 (3): 425-32
- [13] Adriaens I, Jacquet P, Cortvrindt R, et al. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis[J]. *Toxicology*, 2006, 228(2-3): 333-43
- [14] Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger[J]. *Curr Top Med Chem*, 2002, 2(2): 181-97
- [15] Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, et al. Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration: implications for aging[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 959: 238-50
- [16] Ishizuka B, Kuribayashi Y, Murai K, et al. The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice[J]. *J Pineal Res*, 2000, 28(1): 48-51
- [17] Tian XZ, Wen Q, Shi JM, et al. Effects of melatonin on in vitro development of mouse two-cell embryos cultured in HTF medium[J]. *Endocr Res*, 35(1): 17-23
- [18] 曾庆曙, 刘沁华, 夏瑞祥, 等. 褪黑素对NB4细胞作用的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2008, 43(3): 305-08
- [19] Zeng Qing-shu, Liu Qin-hua, Xia Xiang-rui, et al. Study on the effects of melatonin on NB4 cells [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2008, 43(3): 305-308
- [20] Rubio S, Estevez F, Cabrera J, et al. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by melatonin in human myeloid HL-60 cells[J]. *J Pineal Res*, 2007, 42(2): 131-8
- [21] Choi J, Park SM, Lee E, et al. Anti-apoptotic effect of melatonin on preimplantation development of porcine parthenogenetic embryos[J]. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75(7): 1127-35