doi:10.11659/jjssx.11E021049

·基础研究·

Z-VAD-FMK 抑制凋亡通路对体外培养玻璃化冷冻未成熟卵母细胞的影响

卢美蓉[1],王 静[1],黄广翅[1],李桂花[1],刘秀盈[2],蔡杏琳[3] (1.海南现代妇女儿童医院妇产科,海南 海口 570100;2.海南现代妇女儿童医院检验科,海南 海口 570100;3.海南医学院第一附属医院产科,海南 海口 570102)

[摘 要] **目的** 探讨通过泛 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 抑制凋亡通路对体外培养玻璃化冷冻未成熟卵母细胞(VIOs)的 DNA 完整性和发育潜能的影响。**方法** 取 200 只雌性 ICR 小鼠未成熟卵丘—卵母细胞复合体(COCs)。实验Ⅰ:将未成熟 COCs 分为阴性对照组(FOs 组,$n=31$,新鲜 COCs)、阳性对照组(HPOs 组,$n=32$,过氧化氢暴露 COCs 约 3 h)、2 h VIOs 组($n=31$,玻璃化复苏 COCs 2 h)、18 h VIOs 组($n=32$,玻璃化复苏 COCs 18 h),探讨玻璃化冷冻对未成熟卵母细胞凋亡通路的影响。实验Ⅱ:将未成熟 COCs 分为 VIOs(−/−)组($n=36$,未加入 Z-VAD-FMK)、VIOs(+/−)组($n=37$,仅在玻璃化冷冻复苏培养基中添加 Z-VAD-FMK)和 VIOs(+/+)组($n=34$,在玻璃化冷冻复苏培养基和复苏后培养基中均添加 Z-VAD-FMK),复苏后孵育 18 h 进行染色,探讨 Z-VAD-FMK对凋亡标志物[未成熟卵母细胞 DNA 片段化(TUNEL 阳性卵母细胞百分比)、Caspase 活性]的影响。实验Ⅲ:将未成熟 COCs 分为 FOs 组($n=130$)、VIOs(−/−)组($n=129$)和 VIOs(+/+)组($n=128$),分组操作同上,分析 Z-VAD-FMK 对 VIOs 体外发育潜能的影响。**结果** 实验Ⅰ结果显示,HPOs 组、18 h VIOs 组未成熟卵母细胞 DNA 片段化比例高于 FOs 组($P<0.05$);18 h VIOs 组未成熟卵母细胞 DNA 片段化比例高于 2 h VIOs 组($P=0.023$),低于 HPOs 组($P=0.004$);HPOs 组、2 h VIOs 组和 18 h VIOs 组 Caspase 活性均高于 FOs 组($P=0.001$),但是 HPOs 组、2 h VIOs 组和 18 h VIOs 组 Caspase 活性比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。实验Ⅱ结果显示,与 VIOs(−/−)组相比,VIOs(+/−)组未成熟卵母细胞 DNA 片段化比例较低($P=0.007$);VIOs(+/+)组未成熟卵母细胞 DNA 片段化比例和 Caspase 活性低于 VIOs(+/−)组和 VIOs(−/−)组($P<0.001$),但 VIOs(+/−)组和 VIOs(−/−)组 Caspase 活性比较差异无统计学意义($P=0.588$)。实验Ⅲ结果显示,VIOs(+/+)组成熟率、受精率与 FOs 组和 VIOs(−/−)组比较差异无统计学意义($P>0.05$),但 VIOs(+/+)组和 VIOs(−/−)组闭锁率高于 FOs 组($P<0.001$);VIOs(−/−)组和 VIOs(+/+)组 5~8 细胞、9~16 细胞胚胎发育率均低于 FOs 组($P<0.001$);在胚胎发育后期,VIOs(−/−)组和 VIOs(+/+)组均无囊胚形成,与 FOs 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 玻璃化冷冻提高了 VIOs 的凋亡标志物水平,而 Z-VAD-FMK 能够抑制 DNA 损伤和 Caspase 活性,但其可能并不是胚胎发育的决定因素。

[关键词] 细胞凋亡;超低温保存;玻璃化冷冻;未成熟卵母细胞;DNA 完整性;发育潜能

[中图分类号] Q954.4 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-11-09

Effect of inhibiting apoptosis pathway by Z-VAD-FMK on vitrified immature oocytes in vitro

LU Mei-rong[1], WANG Jing[1], HUANG Guang-chi[1], LI Gui-hua[1], LIU Xiu-ying[2], CAI Xing-lin[3] (1. Department of Obstetrics and Gynecology, Hainan Modern Women and Children's Hospital, Haikou Hainan 570100, China; 2. Clinical Laboratory, Hainan Modern Women and Children's Hospital, Haikou Hainan 570100, China; 3. Department of Obstetrics, First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou Hainan 570102, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of inhibiting apoptosis pathway by pan-Caspase inhibitor Z-VAD-FMK on the DNA integrity and development potential of vitrified immature oocytes (VIOs) in vitro. **Methods** The cumulus-oocyte complexes (COCs) of 200 female ICR mice were obtained. Experiment Ⅰ: the immature COCs were divided into the negative control group (FOs group, $n=31$, fresh COCs), the positive control group (HPOs group, $n=32$, COCs exposed to hydrogen peroxide for 3 hours), the 2 h VIOs group ($n=31$, COCs with vitrification resuscitation for 2 hours) and the 18 h VIOs group ($n=32$, COCs with vitrification resuscitation for 18 hours), to investigate the effect of vitrification on apoptosis pathway of immature oocytes. Experiment Ⅱ: the immature COCs were divided into the VIOs (−/−) group ($n=36$, without Z-VAD-FMK), the VIOs (+/−) group ($n=37$, with Z-VAD-FMK in the vitrification-warming media) and the VIOs (+/+) group ($n=34$, with Z-VAD-FMK in the vitrification-warming media and postwarming incubation medium). Staining was conducted after resuscitation and incubation for 18 hours, to investigate the effect of Z-VAD-FMK on apoptosis markers [DNA fragmentation (percentage

[基金项目] 海南省卫生计生行业科研项目(19A200181)

[通信作者] 卢美蓉,E-mail:sav2126@163.com

of TUNEL positive oocytes) and Caspase activity of immature oocytes]. Experiment Ⅲ: the immature COCs were divided into the FOs group ($n=130$), the VIOs (−/−) group ($n=129$) and the VIOs (+/+) group ($n=128$), the grouping operations were the same as above, and the effect of Z-VAD-FMK on the development potential of VIOs in vitro was analyzed. **Results** The results of experiment Ⅰ showed that the DNA fragmentation ratio of immature oocytes in the HPOs group and the 18 h VIOs group were higher than those in the FOs group ($P<0.05$); the DNA fragmentation ratio of immature oocytes in the 18 h VIOs group was higher than that in the 2 h VIOs group ($P=0.023$), and lower than that in the HPOs group ($P=0.004$). The Caspase activities of the HPOs group, the 2 h VIOs group and the 18 h VIOs group were higher than that of the FOs group ($P=0.001$), but there was no statistically significant difference among the HPOs group, the 2 h VIOs group and the 18 h VIOs group ($P>0.05$). The results of experiment Ⅱ showed that compared with the VIOs (−/−) group, the DNA fragmentation ratio of immature oocytes in the VIOs (+/−) group was lower ($P=0.007$). The DNA fragmentation ratio of immature oocytes and Caspase activity in the VIOs (+/+) group were lower than those in the VIOs (+/−) group and the VIOs (−/−) group ($P<0.001$), but there was no statistically significant difference in Caspase activity between the VIOs (+/−) group and the VIOs (−/−) group ($P=0.588$). The results of experiment Ⅲ showed that the VIOs maturation and fertilization rates in the VIOs (+/+) group were not significantly different from those in the FOs group or the VIOs (+/+) group ($P>0.05$), but the closure rates in the VIOs (+/+) group and the VIOs (−/−) group were higher than those in the FOs group ($P<0.05$). The embryo development rates of 5 to 8 cells and 9 to 16 cells in the VIOs (−/−) group and the VIOs (+/+) group were lower than that in the FOs group ($P<0.001$). At the later stage of embryonic development, there was no blastocyst formation in the VIOs (−/−) group or VIOs (+/+) group, which had statistically significant differences compared with that in the FOs group ($P<0.05$). **Conclusion** Vitrification increase the apoptotic markers levels of VIOs, while Z-VAD-FMK can inhibit DNA damage and Caspase activity, but it may be not a determinant of embryonic development.

Keywords: apoptosis; cryopreservation; vitrification; immature oocytes; DNA integrity; development potential

卵母细胞超低温保存是保持生育能力的重要策略[1]。然而促性腺激素刺激卵母细胞成熟可能并不适合所有有保存生育能力需求的女性,如多囊卵巢综合征或激素依赖性癌症患者[2],对这类患者可在没有激素刺激的情况下从卵巢中采集未成熟的卵母细胞[3]。但玻璃化冷冻未成熟卵母细胞(vitrified immature oocytes,VIOs)经过多次冷冻后,会影响其减数分裂和复苏后正常发育能力的恢复,同时超低温保存可能会诱导细胞凋亡[4-5]。有研究发现,添加抗冻蛋白或抑制信号转导调控因子可有效提高 VIOs 的发育能力,并且在猪 VIOs 中被证明是适用、有效的方法[5-6]。半胱氨酸蛋白酶 Caspase 是细胞凋亡过程中参与蛋白水解和 DNA 断裂的效应酶,Z-VAD-FMK 是一种广谱细胞渗透性 Caspase 抑制剂,已成功用于逆转猪和牛胚胎及不同体细胞经冷冻诱导的凋亡变性[6-7]。本研究旨在探讨Z-VAD-FMK抑制凋亡通路对体外培养小鼠未成熟 VIOs 的 DNA 完整性和发育潜能的影响,以期为临床提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

200 只雌性 SPF 级 ICR 小鼠,5 ~ 6 周龄,购自上海亓上生物医学科技有限公司[生产许可证号:SCXK(沪)2021-0004]。将小鼠置于 22 ~ 28 ℃、光照/避光交替 12 h 环境下饲养,保证食物和水充足。本研究经海南医学院第一附属医院实验动物伦理委员会批准(LHK2019012)。除另有说明,本研究所有化学品和试剂均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 未成熟卵母细胞的获取

200 只雌性 ICR 小鼠腹腔注射 5 IU 孕马血清促性腺激素超排,48 h 后颈椎脱位处死。取卵巢,置于 1 mL改良小鼠输卵管液中,加入 20%(V/V)牛血清白蛋白,穿刺有腔卵泡,收集覆盖有致密卵丘细胞的未成熟卵丘—卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complexes,COCs)。

1.3 未成熟 COCs 的玻璃化冷冻和复苏[8]

玻璃化冷冻:将未成熟 COCs 悬浮于含有 7.5%(V/V)乙二醇、7.5% DMSO 的平衡溶液中培养 5 min,然后移至含 15%(V/V)乙二醇、15%(V/V)丙三醇、0.5 mmol/L蔗糖溶液和 20%(V/V)FBS 的 TCM-199 培养基中,置于冷冻薄膜聚丙烯带 45 ~ 60 s。将 5 ~ 6 个卵母细胞装入 CryoTop,并立即投入液氮中贮存。复苏:冷冻薄膜在 37 ℃含有 1 mmol/L 蔗糖解冻溶液及 20%(V/V)FBS 的 TCM-199 培养基中浸泡 1 min,提取玻璃化冷冻的卵母细胞,并移至含有 0.5 mmol/L 蔗糖溶液和 20%(V/V)FBS 的 TCM-199 培养基中培养 3 min,然后在不含蔗糖的 TCM-199 培养基中培养 5 min。

1.4 COCs 分组

实验Ⅰ用于探讨玻璃化冷冻是否诱导未成熟卵母细胞凋亡通路的激活:将未成熟 COCs 分为阴性对照组(FOs 组,$n=31$,新鲜 COCs)、阳性对照组(HPOs 组,$n=32$,100 μmol/L 过氧化氢溶液暴露 COCs 约 3 h 诱导细胞凋亡)、2 h VIOs 组($n=31$,玻璃化复苏 COCs 2 h)和18 h VIOs组($n=32$,玻璃化复苏 COCs 18 h)。由于在复苏后 COCs 可能开始缓慢闭锁,应在孵育后 2 h及 18 h(小鼠未成熟卵母细胞体外成熟的标准时长)对 VIOs 进行分析。实验Ⅱ用于探讨 Z-VAD-FMK 对凋亡标志物(未成熟卵母细胞 DNA 片段化、Caspase 活性)的影响:将 COCs 分为 VIOs(−/−)组($n=36$,正常玻璃化冷冻复苏培养基,未添加 Z-VAD-FMK)、VIOs(+/−)组($n=37$,添加20 μmol/L Z-VAD-FMK 至玻璃化冷冻复苏培养基中)和 VIOs(+/+)组($n=34$,添加 20 μmol/L Z-VAD-FMK 至玻璃化冷冻复苏培养基和复苏后培养基中),复苏后的 VIOs 孵育 18 h,随后进行凋亡标志物检测。泛 Caspase 抑制剂Z-VAD-FMK 购自美国 MedChemExpress 公司,其在所有玻璃化冷冻—复苏溶液和体外成熟培养液中的最终浓度为 20 μmol/L[尽量使 DMSO 浓度低于 0.1%(V/V),以避免细胞毒性]。实验Ⅲ主要分析 Z-VAD-FMK 对 VIOs 体外发育潜能的影响:将 COCs 分为 FOs 组($n=130$)、VIOs(−/−)组($n=129$)和 VIOs(+/+)组($n=128$),分组操作同上,评估 VIOs 的发育能力。

1.5 凋亡信号检测

采用 Cell MeterTM TUNEL 凋亡检测试剂盒(美国 AAT Bioquest 公司)和 CellEvent™ Caspase-3/7 Green 检测试剂(意大利 Thermo Fisher Scientific-Invitrogen 公司)于 38.5 ℃对卵母细胞进行染色,孵育 1 h,检测未成熟卵母细胞 DNA 片段化(TUNEL 阳性卵母细胞百分比)和 Caspase 活性;再用 Hoechst33342 或 DAPI(0.01 mg/mL)进行复染以确定细胞核;载玻片用抗褪色试剂(Fluoromount™ Aqueous Mounting 培养液)覆盖,在配备数码相机(AxioCamMRc5,德国 Zeiss)的荧光显微镜(Axiovert 100,德国 Zeiss)下观察,计算 TUNEL 阳性卵母细胞数量(细胞核区域显示亮红色荧光)以及 Caspase 活性(即绿色荧光),使用成像软件 ZEN 2.5 blue 版(德国 Carl Zeiss Microscopy)计算荧光强度。

1.6 体外胚胎培养[9]

卵母细胞于可控环境(39 ℃、5% CO_2)及 20 μL 未成熟卵培养液(TCM-199 培养基中添加 3 mg/mL 牛血清白蛋白、0.1 mg/mL 半胱氨酸、1.4 mg/mL 羟乙基哌嗪乙磺酸、0.25 mg/mL 丙酮酸钠、0.6 mg/mL 乳酸钠、0.15 mg/mL 左旋谷氨酰胺、0.055 mg/mL 庆大霉素、0.2 IU/mL 人促黄体激素和 0.5 IU/mL 人垂体促卵泡刺激激素)中培养 18 h;体外成熟培养液中培养 18 h 后,将卵母细胞从体外成熟培养皿中转移到 50 μL新鲜体外受精培养基中,培养皿上覆盖矿物油。体外受精采用成年雄性小鼠常规睾丸切除术后获得的新鲜附睾精子。实验前睾丸于 4 ℃中保存 24 h,从睾丸中解剖附睾,从输精管和附睾尾中获取精子,用体外受精培养液重悬,30 μm过滤器过滤精子悬液,通过 Bürker 血细胞计数盘测定精子的运动状态和浓度;将精子悬液添加到含卵母细胞的微滴中至 100 μL,最终运动精子浓度为 1×10^6/mL。每个试管受精液中含有来自同一实验组的 7~11 个卵母细胞。卵母细胞和精子在可控环境中(39 ℃、5% CO_2)共孵育。体外受精后,所有卵母细胞在体外培养(in vitro culture,IVC)培养基(Ham's F-10 中添加 5% FBS、0.11 mg/mL 丙酮酸钠、0.075 mg/mL 左旋谷氨酰胺、0.6 mg/mL 庆大霉素)中轻轻洗涤,使用剥离器微量吸液管去除精子和残余卵丘细胞后,将胚胎移至覆盖矿物油的 IVC 培养基中培养 120 h。IVC 期间,在高倍倒置显微镜下评估胚胎发育情况,每 24 h 1 次。

1.7 成熟率、受精率和胚胎发育率

体外受精 48 h 后,用配有 125 μm 尖头的剥离器微量移液管机械置换未分裂的卵母细胞,与精子结合后置于载玻片上,于 4 ℃、80% 乙醇中固定过夜。然后通过碘化丙啶染色(1 mg/mL,1∶100)评估染色质构型。生长中的胚胎培养至 120 h 或出现闭锁迹象时,用碘化丙啶染色,根据卵裂球核的数量确定其发育阶段。未受精卵母细胞的成熟期(中期Ⅱ)通过存在一组紧密排列的染色体(第一极体)和另一组分布良好的染色体来确定。体外成熟卵母细胞总数为未受精成熟阶段卵母细胞、受精卵母细胞(即未分裂但显示原核)和卵裂胚的总和;受精卵母细胞的数量为受精卵母细胞和卵裂胚的总和。通过记录卵裂胚(2~4 细胞、5~8 细胞、9~16 细胞)、桑葚胚和囊胚阶段评估胚胎发育情况,计算成熟率、受精率和胚胎发育率。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行数据处理。分类变量以率(%)表示,采用 χ^2 检验或 *Fisher* 精确检验。连续变

量以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 *Dwass-Steel-Critchlow-Fligner*。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

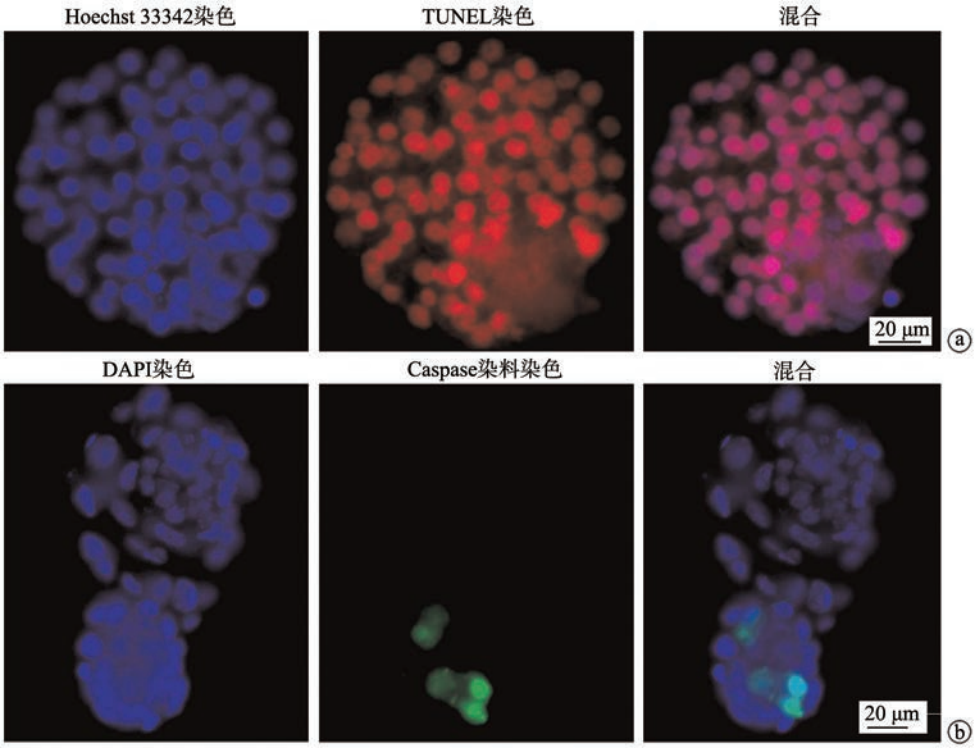
2.1 玻璃化冷冻对未成熟卵母细胞凋亡通路的影响(实验Ⅰ)

HPOs 组和 18 h VIOs 组未成熟卵母细胞 DNA 片段化比例高于 FOs 组($P<0.05$);18 h VIOs 组 DNA 片段化比例低于 HPOs 组($P=0.004$),高于 2 h VIOs 组($P=0.023$);2 h VIOs 组 DNA 片段化比例低于 HPOs 组($P<0.001$),但是与 FOs 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。HPOs 组、2 h VIOs 组和 18 h VIOs 组 Caspase 活性(绿色荧光强度)均高于 FOs 组($P=0.001$),但是 HPOs 组、2 h VIOs 组和 18 h VIOs 组 Caspase 活性比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1、图 1。

表 1 未成熟卵母细胞 DNA 片段化和 Caspase 活性

组别	n	DNA 片段化/个(%)	Caspase 活性
FOs 组	31	3(9.68)	199.6±178.3
HPOs 组	32	30(90.91)*	420.1±346.1*
2 h VIOs 组	31	9(29.03)#	321.7±212.3*
18 h VIOs 组	32	19(59.38)*#△	414.6±326.8*

*:与 FOs 组相比,$P<0.05$;#:与 HPOs 组相比,$P<0.05$;△:与 2 h VIOs组相比,$P<0.05$



a:TUNEL 染色和 Hoechst 33342 染色(亮蓝色荧光表示细胞核,胞核中的亮红色荧光表示未成熟卵母细胞 DNA 片段化);b:Caspase 活性检测(绿色荧光表示 Caspase 活性程度,蓝色荧光表示 DAPI 核染色)

图 1 未成熟卵母细胞染色图

2.2 Z-VAD-FMK 对凋亡标志物的影响(实验Ⅱ)

与 VIOs(−/−)组相比,VIOs(+/−)组未成熟卵母细胞 DNA 片段化比例较低($P=0.007$)。VIOs(+/+)组未成熟卵母细胞 DNA 片段化比例和 Caspase 活性低于 VIOs(+/−)组和 VIOs(−/−)组($P<0.001$),但 VIOs(+/−)组和 VIOs(−/−)组 Caspase 活性比较差异无统计学意义($P=0.588$),见表 2。

表 2 未成熟卵母细胞 DNA 片段化和 Caspase 活性

组别	n	未成熟卵母细胞 DNA 片段化/个(%)	Caspase 活性
VIOs(−/−)组	36	25(69.44)	434.5±248.3
VIOs(+/−)组	37	14(37.84)*	653.9±591.6
VIOs(+/+)组	34	3(8.82)*#	243.7±106.9*#

*:与 VIOs(−/−)组相比,$P<0.05$;#:与 VIOs(+/−)组相比,$P<0.05$

2.3 Z-VAD-FMK 对 VIOs 体外发育潜能的影响(实验Ⅲ)

与 FOs 组相比,VIOs(-/-)组成熟率较低($P=0.004$),而 VIOs(+/+)组成熟率与 VIOs(-/-)组、FOs 组比较,差异无统计学意义($P=0.384$、0.060)。各组受精率比较,差异均无统计学意义($P=0.082$)。VIOs(+/+)组和 VIOs(-/-)组闭锁率高于 FOs 组($P<0.001$),但 VIOs(+/+)组与 VIOs(-/-)组比较差异无统计学意义($P=0.550$),见表 3。此外,VIOs(-/-)组和 VIOs(+/+)组的 2~4 细胞胚胎发育率比较差异无统计学意义($P>0.05$),但 5~8 细胞、9~16 细胞胚胎发育率及桑葚胚发育率均低于 FOs 组($P<0.001$),各组 2~4 细胞胚胎发育率比较,差异无统计学意义($P>0.05$);在胚胎发育后期,VIOs(-/-)组和 VIOs(+/+)组均无囊胚形成,与 FOs 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

表 3 VIOs 成熟、受精和闭锁情况比较[个(%)]

组别	n	成熟	受精	闭锁
FOs 组	130	85(65.38)	68(52.31)	18(13.85)
VIOs(-/-)组	129	61(47.29)*	53(41.09)	50(38.76)*
VIOs(+/+)组	128	69(53.91)	57(44.53)	45(35.16)*

*:与 FOs 组相比,$P<0.05$

表 4 体外胚胎发育情况比较[个(%)]

组别	n	2~4 细胞	5~8 细胞	9~16 细胞	桑葚胚	囊胚
FOs 组	85	62(72.94)	53(62.35)	42(49.41)	30(35.29)	13(15.29)
VIOs(-/-)组	61	41(67.21)	12(19.67)*	4(6.56)*	1(1.64)*	0(0)*
VIOs(+/+)组	68	44(64.71)	20(29.41)*	6(8.82)*	1(1.47)*	0(0)*

*:与 FOs 组相比,$P<0.05$

3 讨论

为了克服 VIOs 的体外成熟和胚胎发育不良的问题,既往研究主要集中于改进玻璃化冷冻过程[4-6]。而本研究通过靶向凋亡途径证实了泛 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 可抑制未成熟卵母细胞玻璃化冷冻诱导的 DNA 损伤和 Caspase 的活性,从而使 VIOs 的成熟率接近于新鲜卵母细胞的成熟率。

活性氧类物质(reactive oxygen species,ROS)是正常细胞氧化过程的副产物。精子、卵母细胞和胚胎都会积累大量 ROS,从而导致线粒体损伤、三磷酸腺苷耗竭、细胞凋亡和发育障碍[10],从而影响冷冻卵母细胞和胚胎的发育能力。本研究通过过氧化氢溶液诱导超低温保存的未成熟卵母细胞凋亡,结果显示未成熟卵母细胞 DNA 片段化超过 90%。在卵母细胞凋亡过程中,Caspase 发挥着关键作用。Caspase 蛋白酶虽然可以裂解其他多种多肽成分,但是其本身通常也需要被其他酶(如级联中的其他 Caspase)裂解才能激活[11]。Caspase 活性增加导致一些细胞成分被破坏,从而激活典型的细胞凋亡途径。根据 Caspase 在级联反应中的功能,Caspase 可分为启动子(如 Caspase 8 和 Caspase 9)和效应子(如 Caspase 3、Caspase 6 和 Caspase 7)[12]。本研究实验Ⅰ结果显示,无论孵育时间长短,VIOs 组中 Caspase 活性均高于 FOs 组;2 h VIOs 组与 FOs 组的未成熟卵母细胞 DNA 片段化比例相似,而 18 h VIOs 组未成熟卵母细胞 DNA 片段化比例明显高于 FOs 组。因此,在复苏后不久,Caspase 的活性就可以被检测到,但有些酶可能需要更长的时间才能到达细胞核,并开始 DNA 片段化。关于细胞凋亡参与 VIOs 复苏后的闭锁机制在其他多个物种中也有报道[4-5]。我们推测,通过作用于凋亡级联反应成分可能有利于 VIOs 的生存和发育。本研究将 Z-VAD-FMK 用于 COCs 玻璃化冷冻复苏和/或玻璃化冷冻复苏及次日培养,结果显示,VIOs(+/+)组 Caspase 活性和未成熟卵母细胞 DNA 片段化比例低于 VIOs(+/-)组,说明仅在玻璃化冷冻复苏过程中添加 Z-VAD-FMK 不足以避免 DNA 损伤,而在孵育 18 h 过程中再次添加 Z-VAD-FMK 可以显著降低 Caspase 活性,减少 DNA 损伤。这可能是由于 Caspase 抑制剂通过与 Caspase 的催化位点结合并抑制其活性而发挥作用,只在玻璃化冷冻复苏过程中添加 Caspase 抑制剂暴露时间较短,延长 Z-VAD-FMK 的时间有利于抑制凋亡通路的激活。Niu 等[7]研究证实,体外培养玻璃化卵母细胞暴露于特定的 Caspase 抑制剂中可降低 Caspase 活性并提高发育能力,本研究结果与之一致。因此,Cryotop 玻璃化结合 IVM-IVF-IVC 方案对低温保存的卵母细胞体外胚胎培养可能是一个很好的方案。然而,本研究发现在胚胎发育中,VIOs(+/+)组和 VIOs(-/-)组受精率和闭锁率无统计学差异,发育后期进展较差,特别是桑葚胚和囊胚阶段,说明 Z-VAD-FMK 有利于体外成熟培养,可能是因为抑制剂的存在阻止了后期(即体外受精后)的闭锁[4,13-15]。另外,在培养过程中,不能进一步发育的胚胎细胞分裂停止并开始闭锁,而凋亡抑制剂的存在可能会抑制这一过程[16]。有研究发现,添加凋亡抑制剂至培养基可以提高胚胎发育率[17-18]。

此外,凋亡标志物的减少并不意味着发育能力的提高。由于目前没有一个阈值来区分健康和死亡细胞,荧光染色、免疫组化、PCR 等方法均不能对 Caspase 活性进行绝对定量,DNA 片段化的评估可能是对卵母细胞数量更好的评价方式。本研究结果显示,VIOs(+/+)组和 VIOs(-/-)组未成熟卵母细胞 DNA 片段化和 Caspase 活性有统计学差异,但胚胎发育率无统计学差异,尤其在胚胎发育后期 2 组均无囊胚形成。说明完成胚胎形成所需要的前提条件远不止 DNA 的完整性。此外,由于 VIOs 暴露于 Z-VAD-FMK 中可抑制 Caspase 8 的活性,从而导致 VIOs 发生坏死性凋亡[17-18]。因此,无凋亡标志物增加并不意味着卵母细胞健康,胚胎发育不良可能是由于非凋亡变性所致。

综上,未成熟卵母细胞的玻璃化冷冻作用可导致 DNA 片段化和 Caspase 活性增加,而在玻璃化冷冻复苏和次日培养加入泛 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 可有效逆转该过程。但是 Z-VAD-FMK 处理的 VIOs 体外成熟潜能和受精率与新鲜卵母细胞相似,因此 Z-VAD-FMK可能对胚胎发育的影响较小,但需进一步研究证实。本研究通过靶向 Caspase 凋亡通路,可能为抑制细胞凋亡、增强 VIOs 的超低温耐受性和提高玻璃化冷冻未成熟卵母细胞发育能力提供思路。

[参考文献]

[1] 李婷婷,周 怡,李思进,等. 卵母细胞成熟率对 ICSI 周期优质胚胎移植后妊娠结局的影响[J]. 生殖医学杂志,2021,30(2):145-149. doi:10.3969/j.issn.1004-3845.2021.02.002.

[2] 牛子儒,王 洋,陶立元,等. 不同年龄段不孕女性成熟卵母细胞冷冻复苏效果的影响因素分析[J]. 中国计划生育学杂志,2021,29(5):983-987. doi:10.3969/j.issn.1004-8189.2021.05.031.

[3] Cohen Y,Tannus S,Volodarsky-Perel A,et al. Added benefit of immature oocyte maturation for fertility preservation in women with malignancy[J]. Reprod Sci,2020,27(12):2257-2264. doi:10.1007/s43032-020-00245-z.

[4] Arayatham S,Tiptanavattana N,Tharasanit T. Effects of vitrification and a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1 inhibitor on the meiotic and developmental competence of feline oocytes[J]. J Reprod Dev,2017,63(5):511-517. doi:10.1262/jrd.2017-004.

[5] Lee HH,Lee HJ,Kim HJ,et al. Effects of antifreeze proteins on the vitrification of mouse oocytes:comparison of three different antifreeze proteins[J]. Hum Reprod,2015,30(9):2110-2119. doi:10.1093/humrep/dev170.

[6] Sadeghzadeh Oskouei B,Zargari S,Shahabi P,et al. Design and microfabrication of an on-chip oocyte naturation system for reduction of apoptosis[J]. Cell J,2021,23(1):32-39. doi:10.22074/cellj.2021.7056.

[7] Niu Y,Dai J,Wu C,et al. The application of apoptotic inhibitor in apoptotic pathways of MII stage porcine oocytes after vitrification[J]. Reprod Domest Anim,2016,51(6):953-959. doi:10.1111/rda.12772.

[8] 郭虹敏,李海艳,孙昕卉,等. 姜黄素对小鼠卵母细胞体外成熟及早期胚胎发育的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2021,37(4):330-336. doi:10.13423/j.cnkj.cjcmi.009177.

[9] Rizo G,Barrera AD,Jimenez LE,et al. Exogenous activation and inhibition of plasminogen/plasmin activity during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes:a biological and spectroscopic approach[J]. Mol Reprod Dev,2021,88(1):67-79. doi:10.1002/mrd.23441.

[10] Naillat F,Saadeh H,Nowacka-Woszuk J,et al. Oxygen concentration affects de novo DNA methylation and transcription in in vitro cultured oocytes[J]. Clin Epigenetics,2021,13(1):132. doi:10.1186/s13148-021-01116-3.

[11] Cheng X,Ferrell JE Jr. Apoptosis propagates through the cytoplasm as trigger waves[J]. Science,2018,361(6402):607-612. doi:10.1126/science.aah4065.

[12] Sowińska N,Müller K,Nizański W,et al. Mitochondrial characteristics in oocytes of the domestic cat(Felis catus)after in vitro maturation and vitrification[J]. Reprod Domest Anim,2017,52(5):806-813. doi:10.1111/rda.12982.

[13] Lee AWT,Ng JKW,Liao J,et al. Single-cell RNA sequencing identifies molecular targets associated with poor in vitro maturation performance of oocytes collected from ovarian stimulation[J]. Hum Reprod,2021,36(7):1907-1921. doi:10.1093/humrep/deab100.

[14] Doroudi R,Changizi Z,Nematollahi-Mahani SN. Effects of melatonin and human follicular fluid supplementation of in vitro maturation medium on mouse vitrified germinal vesicle oocytes:a laboratory study[J]. Int J Reprod Biomed,2021,19(10):889-898. doi:10.18502/ijrm.v19i10.9821.

[15] 易疆莺,滕文顶,王 芳,等. 抗氧化物原花青素对人未成熟卵母细胞体外成熟的影响[J]. 中国计划生育和妇产科,2021,10(13):82-86. doi:10.3969/j.issn.1674-4020.2021.10.20.

[16] Fransolet M,Noël L,Henry L,et al. Evaluation of Z-VAD-FMK as an anti-apoptotic drug to prevent granulosa cell apoptosis and follicular death after human ovarian tissue transplantation[J]. J Assist Reprod Genet,2019,36(2):349-359. doi:10.1007/s10815-018-1353-8.

[17] de Almeida Monteiro Melo Ferraz M,Fujihara M,Nagashima JB,et al. Follicular extracellular vesicles enhance meiotic resumption of domestic cat vitrified oocytes[J]. Sci Rep,2020,10(1):8619. doi:10.1038/s41598-020-65497-w.

[18] Nirmala GJ,Lopus M. Cell death mechanisms in eukaryotes[J]. Cell Biol Toxicol,2020,36(2):145-164. doi:10.1007/s10565-019-09496-2.

(编辑:龙小芬)