

doi: 10.13705/j.issn.1671-6825.2015.02.035

左卡尼汀对玻璃化冷冻小鼠卵母细胞体外受精结局的影响

苗卉[△] 李娜 苗聪秀

长治医学院附属和平医院生殖中心 长治 046000

[△]女,1981年10月生,硕士,讲师,研究方向:不孕症和妇科内分泌 E-mail: miaomiao811020@126.com

关键词 玻璃化冷冻;卵母细胞;左卡尼汀

中图分类号 Q813.7

摘要 目的:研究左卡尼汀对玻璃化冷冻小鼠卵母细胞的影响。方法:将卵母细胞分为新鲜组(存活卵数243个)、玻璃化冷冻组(解冻卵数282个)、左卡尼汀高、中、低剂量(2.0、1.0、0.5 g/L)组(解冻卵数分别为285、280和279个)。观察各组卵母细胞中GSH含量、ROS水平以及卵母细胞存活率、受精率、卵裂率、囊胚形成率。结果:5组卵母细胞GSH含量、ROS水平及卵母细胞存活率、受精率、卵裂率、囊胚形成率差异均有统计学意义($F = 881.290, 182.760$ 及 $\chi^2 = 113.361, 21.560, 16.660, 9.667$, P 均 < 0.05)。与新鲜卵母细胞比较,玻璃化冷冻卵母细胞中GSH含量降低,ROS水平升高,卵母细胞存活率、受精率、卵裂率均降低($P < 0.05$)。左卡尼汀呈剂量依赖性增加玻璃化冷冻卵母细胞中GSH含量,降低ROS水平($P < 0.05$);高剂量左卡尼汀可明显改善玻璃化冷冻卵母细胞的存活率($P < 0.05$)。结论:左卡尼汀可通过抗氧化作用改善玻璃化冷冻卵母细胞的结局。

Effects of L-carnitine on in vitro-fertilized outcomes of mouse oocytes underwent vitrification

MIAO Hui LI Na MIAO Congxiu

Center of Reproduction, the Affiliated Heping Hospital, Changzhi Medical College, Changzhi 046000

Key words vitrification; oocyte; L-carnitine

Abstract Aim: To study the effects of L-carnitine on the in vitro-fertilized outcomes of mouse oocytes underwent vitrification. Methods: Oocytes were divided into fresh group (243 survival oocytes), vitrification group (282 thawed oocytes), L-carnitine high, medium and low dose (2.0, 1.0, 0.5 g/L) groups (thawed oocytes number was 285, 280, 279, respectively). The GSH content, ROS level in oocytes and survival rate, fertilization rate, cleavage rate, blastocyst formation rate of oocytes in each group were observed. Results: There were significant differences in the GSH content, ROS level in the oocytes and the survival rate, fertilization rate, cleavage rate, and blastocyst formation rate among the 5 groups ($F = 881.290, 182.760$, and $\chi^2 = 113.361, 21.560, 16.660, 9.667$, $P < 0.05$). Compared with those of the fresh group, the GSH content was lower, ROS level was higher in the oocytes of vitrification group, and the survival rate, fertilization rate, and cleavage rate decreased ($P < 0.05$). L-carnitine could increase the GSH content, reduce ROS level in the oocytes un-

[7] 李大森,郭卫,曲华毅,等. 骶骨肿瘤术后伤口感染的相关因素分析[J]. 中国骨与关节外科 2013 6(3):239

[8] Chen KW, Yang HL, Lu J, et al. Risk factors for postoperative wound infections of sacral chordoma after surgical excision[J]. J Spinal Disord Tech 2011 24(4):230

[9] Omeis IA, Dhir M, Sciubba DM, et al. Postoperative surgical site infections in patients undergoing spinal tumor surgery: incidence and risk factors [J]. Spine (Phila Pa 1976) 2011 36(17):1410

[10] Sciubba DM, Nelson C, Gok B, et al. Evaluation of factors associated with postoperative infection following sacral tumor resection [J]. J Neurosurg Spine 2008 9(6):593

[11] Veeravagu A, Patil CG, Lad SP, et al. Risk Factors for postoperative spinal wound infections after spinal decompression and fusion surgeries [J]. Spine (Phila Pa 1976) 2009 34(17):1869

(2014-08-29 收稿 责任编辑李沛震)

derwent vitrification, and high dose L-carnitine could improve the survival rate($P < 0.05$). Conclusion: L-carnitine may improve the outcomes of oocytes which undergo vitrification through antioxidant effects.

卵母细胞冻存技术是辅助生殖领域的一种新技术,它对于雌性生育力的保存以及基因资源的管理具有重要的意义。自从Chen等^[1]于1986年首次报道冻融卵母细胞获得成功妊娠以来,卵母细胞冻存技术虽有发展但不甚理想。卵母细胞具有细胞质丰富、表面积/体积比值小等特点,导致其纺锤体、细胞骨架、线粒体在冷冻过程中易受损伤^[2]。玻璃化冷冻是将卵母细胞置于高浓度的渗透性冷冻保护剂中,保护剂在冷冻过程中由液态转为玻璃态,有效避免了细胞内冰晶形成,减少了冷冻引起的物理性损伤^[3]。但玻璃化冷冻仍无法避免卵母细胞受到氧化损伤^[4]。作者拟探讨左卡尼汀对小鼠卵母细胞氧化应激及玻璃化冷冻效果的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂来源 健康普通级雌性昆明小鼠,6~8周龄,体重21~24g;健康普通级雄性昆明小鼠,12~14周龄,体重28~32g;均由长治医学院实验动物中心提供。孕马血清促性腺激素(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、透明质酸酶、左卡尼汀均购自美国Sigma公司。基础冷冻保护液(BFPL)的配制:将杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS)与胎牛血清按体积比1:10混合。预平衡液:BFPL+乙二醇(1.5 mol/L)。玻璃化冷冻液(VS):BFPL+乙二醇(5.5 mol/L)+蔗糖(1.0 mol/L)。复苏液:遵循四步复苏法配制复苏液,即在BFPL中分别加入1.000、0.500、0.250和0.125 mol/L的蔗糖。还原型谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒、活性氧(ROS)检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

1.2 卵母细胞的收集及分组处理 雌性小鼠腹腔注射PMSG 500 U/kg 48 h后腹腔注射HCG 500 U/kg。于注射HCG 16 h后处死小鼠,摘取输卵管,于显微镜下撕开输卵管膨大部,收集卵丘卵母细胞复合体。将卵丘卵母细胞复合体移入含1 g/L透明质酸酶的DPBS中处理2~3 min,机械吹打直至保留3~5层卵丘细胞,再将卵母细胞移入DPBS中保存。将获得的卵母细胞随机分为5组。新鲜组:未经任何处理的新鲜卵母细胞。玻璃化冷冻组:经玻璃化冷冻的卵母细胞。左卡尼汀高、中、低剂量组:于冷冻前将卵母细胞放入含2.0、1.0、0.5 g/L左卡尼汀的DPBS中孵育2 h。

1.3 冷冻与复苏 先用BFPL冲洗卵母细胞3次,

再移入预平衡液中停留5 min,然后移入玻璃化冷冻液中,用开放式拉细麦管通过虹吸作用将卵母细胞吸入管中,投入液氮。复苏:依次将卵母细胞移入含1.000、0.500、0.250和0.125 mol/L蔗糖的复苏液中,各停留3 min,再用BFPL冲洗3次。

1.4 体外受精 复苏后1 h,选择存活、形态正常、无胞质碎裂和(或)透明带松解脱落的卵母细胞进行体外受精。于受精当日,选用性成熟的成年雄性小鼠,处死后,刺破附睾尾部获取精液,将精液悬浮液于37℃培养1.5 h获能后,以 $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 进行受精。6~9 h后显微镜下观察受精情况,将受精卵置于CO₂培养箱中培养。每间隔24 h观察受精卵发育情况,连续5 d。存活率=存活卵数/解冻卵数×100%;受精率=受精卵数/存活卵数×100%;卵裂率=卵裂数/受精卵数×100%;囊胚形成率=囊胚数/卵裂数×100%。

1.5 卵母细胞中GSH含量和ROS水平测定 卵母细胞复苏后,采用酶标仪测定卵母细胞中GSH含量和ROS水平,按照试剂盒说明书进行操作。每次取50枚卵母细胞,重复3次。

1.6 统计学处理 采用SPSS 13.0处理数据,5组卵母细胞GSH含量和ROS水平的比较采用单因素方差分析及LSD-t检验,5组间存活率、受精率、卵裂率和囊胚形成率的比较采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 5组卵母细胞存活率、受精率、卵裂率和囊胚形成率的比较 玻璃化冷冻组存活率、受精率、卵裂率以及囊胚形成率均较新鲜组显著降低。左卡尼汀呈剂量依赖性地改善玻璃化冷冻卵母细胞存活率、受精率、卵裂率和囊胚形成率。见表1。

表1 5组卵母细胞存活率、受精率、卵裂率和囊胚形成率的比较

组别	解冻卵数	存活卵数 (存活率/%)	受精卵数 (受精率/%)	卵裂数 (卵裂率/%)	囊胚数 (囊胚形成率/%)
新鲜组	-	243(100.00)	183(75.31)	153(83.61)	115(75.16)
玻璃化冷冻组	282	183(64.89)*	105(57.38)*	69(65.71)*	40(57.97)
左卡尼汀高剂量组	285	226(79.30)#	158(69.91)#	123(77.85)#	86(69.92)#
左卡尼汀中剂量组	280	206(73.57)	131(63.59)	96(73.28)	61(63.54)
左卡尼汀低剂量组	279	185(66.31)	109(58.92)	73(66.97)	44(60.27)
χ^2		113.361	21.560	16.660	9.667
P		<0.001	<0.001	0.002	0.046

*:与新鲜组比较 P均<0.05;#:与玻璃化冷冻组比较 P均<0.05。

2.2 复苏后5组卵母细胞中GSH含量和ROS水平的比较 与新鲜组比较,玻璃化冷冻组小鼠卵母细胞中GSH含量明显降低,ROS水平明显升高。与玻璃化冷冻组比较,左卡尼汀组卵母细胞中GSH含量升高,ROS水平降低,且表现出一定的剂量依赖性。见表2。

表2 复苏后5组卵母细胞中GSH含量和ROS水平的比较

组别	n	GSH含量/ μmol^*	ROS水平/ $\%^*$
新鲜组	50	8.69 \pm 0.30	39.40 \pm 3.48
玻璃化冷冻组	50	4.80 \pm 0.34	59.81 \pm 4.11
左卡尼汀高剂量组	50	6.73 \pm 0.45	41.83 \pm 3.77
左卡尼汀中剂量组	50	6.03 \pm 0.35	48.19 \pm 5.00
左卡尼汀低剂量组	50	5.16 \pm 0.38	50.77 \pm 4.52
F		881.290	182.760
P		<0.001	<0.001

* :5组间两两比较 P均<0.05。

3 讨论

左卡尼汀也叫左旋肉碱,是一种小分子、水溶性物质,作为载体,可通过脂酰肉碱的形式将长链脂肪酸由线粒体膜外运送至膜内,促进脂肪酸的 β 氧化并转化为能量;它也影响数种与蛋白和脂质代谢相关的关键酶的活性。左卡尼汀具有广泛的生理活性,临床上用于心血管疾病、泌尿系统疾病、神经系统疾病以及男性不育症的治疗。Wu等^[5]研究认为左卡尼汀可能有益于改善辅助生殖技术妊娠结局,尤其是多囊卵巢综合征和子宫内膜异位症患者。

在体外培养中,左卡尼汀可阻止卵丘细胞凋亡,改善猪卵母细胞减数分裂能力以及线粒体活性^[6]。在卵母细胞体外培养成熟过程中,添加左卡尼汀可增强猪卵母细胞发育潜能,并可通过加速核成熟以及抗氧化、抗凋亡等作用,改善孤雌胚胎的质量^[5]。黄映琴等^[7]通过临床试验发现,初次行体外受精-胚胎移植的患者在治疗过程中服用左卡尼汀口服液后,患者体内HCG注射日的雌激素水平、受精数、卵裂数、优质胚胎数、可移植胚胎数均明显高于未服用者,尤其以年龄<35岁者效果明显,说明左卡尼汀在体外受精-胚胎移植治疗中可提高部分患者的卵子质量,促进卵子成熟以及早期胚胎的形成与发育。在玻璃化冷冻过程中,卵母细胞在高浓度的冷冻保护剂中超高速降温,形成无结构的玻璃态,可避免冷冻过程中冰晶对细胞的损伤,保持细胞结构的完整^[8]。但是在本次研究中,玻璃化冷冻组卵母细胞的存活率、受精率、卵裂率均明显低于新鲜组,与

Wang等^[9]的报道一致,说明玻璃化冷冻还是影响了卵母细胞的存活能力。左卡尼汀高剂量组卵母细胞存活率、受精率、卵裂率以及囊胚形成率较玻璃化冷冻组明显升高,表明左卡尼汀能够改善卵母细胞玻璃化冷冻的效果。

在冷冻保存过程中,细胞暴露于机械、化学、温度等数种应激源,可导致其功能丧失甚至死亡。Gupta等^[4]观察到玻璃化冷冻可导致玻璃化-复苏卵母细胞中ROS活性增加,而ROS活性增加可引起线粒体损伤、ATP耗竭、钙振荡发生改变,从而导致受精率降低以及发育受阻^[10]。该研究结果显示,玻璃化冷冻-复苏的卵母细胞中GSH含量较新鲜卵母细胞明显降低,ROS水平较新鲜卵母细胞明显升高,与付敏等^[11]研究结果一致,提示卵母细胞处于氧化应激状态。0.5~2.0g/L的左卡尼汀可剂量依赖性地增加冷冻的卵母细胞中GSH含量,降低ROS水平,表明左卡尼汀可缓解细胞氧化应激状态,其作用机制可能在于直接清除活性氧^[12],清除线粒体膜上过量的长链脂肪酰基,维持线粒体膜通透性转换,抑制线粒体电子传递链系统释放电子,减少ROS生成^[13],增加细胞内抗氧化剂^[14]等。

总之,该研究结果提示左卡尼汀可通过抗氧化作用改善玻璃化冷冻卵母细胞的质量。

参考文献

- [1] Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation [J]. *Lancet*, 1986, 1(8486): 884
- [2] Lei T, Guo N, Liu JQ, et al. Vitrification of in vitro matured oocytes: effects on meiotic spindle configuration and mitochondrial function [J]. *Int J Clin Exp Pathol* 2014, 7(3): 1159
- [3] Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification [J]. *Nature*, 1985, 313(63): 573
- [4] Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization [J]. *Fertil Steril* 2010, 93(8): 2602
- [5] Wu GQ, Jia BY, Li JJ, et al. L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs [J]. *Theriogenology* 2011, 76(5): 785
- [6] Hashimoto S. Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology [J]. *J Reprod Dev* 2009, 55(1): 1
- [7] 黄映琴, 覃爱平, 孙惟佳, 等. 抗氧化剂左卡尼汀在IVF中的应用 [J]. *实用医学杂志* 2013, 29(2): 299
- [8] 林春莲. 人类卵母细胞玻璃化冷冻的研究进展 [J]. *中国医学创新* 2011, 8(4): 177

doi: 10.13705/j.issn.1671-6825.2015.02.036

糖尿病合并非酒精性脂肪肝的危险因素分析

李伟芳¹⁾ 王鹏²⁾# 李华¹⁾ 陈素芳¹⁾ 李天艺¹⁾

1) 郑州大学第一附属医院老年内分泌科 郑州 450052 2) 郑州大学公共卫生学院流行病学教研室 郑州 450001

#通信作者,女,1981年3月生,硕士,讲师,研究方向:流行病学 E-mail: wangpeng@zzu.edu.cn

关键词 2型糖尿病;非酒精性脂肪肝;危险因素

中图分类号 R587.1

摘要 目的:探讨2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝(NAFLD)的危险因素。方法:回顾性分析104例2型糖尿病合并NAFLD患者和157例未合并NAFLD糖尿病患者性别、年龄、糖尿病家族史、高血压病史、吸烟史、体重指数(BMI)、血尿酸、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、超敏C反应蛋白、血浆凝血酶原时间(PT)、糖化血红蛋白(HbA1C)、空腹血糖(FPG)的差异。非条件logistic回归模型进行2型糖尿病合并NAFLD的危险因素分析。结果:2组年龄、BMI、HbA1C、FPG、TG差异有统计学意义($\chi^2=7.266,66.897,8.911,9.348,30.161, P<0.05$); Logistic回归模型分析结果显示肥胖、高TG是2型糖尿病合并NAFLD的危险因素[OR(95% CI) = 4.503(2.930~6.919), 1.563(1.154~2.117)]。结论:肥胖和高TG是2型糖尿病合并NAFLD的危险因素。

Risk factor analysis of type 2 diabetes mellitus with non-alcoholic fatty liver disease

LI Weifang¹⁾, WANG Peng²⁾, LI Hua¹⁾, CHEN Sufang¹⁾, LI Tianyi¹⁾

1) Department of Geriatric Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052 2) Department of Epidemiology, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001

Key words type 2 diabetes mellitus; non-alcoholic fatty liver disease; risk factor

Abstract Aim: To investigate the risk factors of type 2 diabetes mellitus with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Methods: A total of 261 cases of type 2 mellitus diabetes were collected and allocated into 2 groups according to with or without NAFLD. The risk factors of type 2 mellitus diabetes with NAFLD were analyzed by using logistic regression analysis. Results: The analysis of univariate factor showed that age, BMI, HbA1C, FPG, TG had statistical significance between the 2 groups ($\chi^2 = 7.266, 66.897, 8.911, 9.348, 30.161, P < 0.05$). Logistic regression analysis demonstrated

[9] Wang L, Fu X, Zeng Y, et al. Epinephrine promotes development potential of vitrified mouse oocytes [J]. Pak J Biol Sci 2014, 17(2): 254

[10] Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, et al. Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage [J]. Cryobiology 2007, 55(2): 115

[11] 付敏, 钱卫平, 林冬霞, 等. 谷胱甘肽在小鼠卵母细胞玻璃化冷冻中的作用 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(28): 5422

[12] Gülçin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine [J]. Life Sci 2006, 78(8): 803

[13] 孙惟佳, 覃爱平, 靳玉甫, 等. 左卡尼汀对卵泡颗粒细胞抗氧化应激作用的影响 [J]. 中国现代医药杂志, 2012, 14(4): 22

[14] You J, Lee J, Hyun SH, et al. L-carnitine treatment during oocyte maturation improves in vitro development of cloned pig embryos by influencing intracellular glutathione synthesis and embryonic gene expression [J]. Theriogenology, 2012, 78(2): 235

(2014-07-25 收稿 责任编辑王曼)