



分类号 S813

学 号 2010205002

南京农业大学

博士学位论文

小鼠卵巢氧化应激模型建立以及
卵巢保护性抗氧化剂的筛选

张家庆

指导教师 李 奎 教授

刘红林 教授

专业名称 动物遗传育种与繁殖

研究方向 哺乳动物发育遗传学

答辩日期 二〇一三年十二月



**ESTABLISHMENT OF MOUSE MODEL OF
OVARIAN OXIDATIVE STRESS AND THE
SCREENING OF OVARIAN PROTECTIVE
ANTIOXIDANTS**

BY Jiaqing Zhang

Supervisor: Prof. Kui Li, Prof. Honglin Liu

A thesis

Submitted to Nanjing Agricultural University

**In partial fulfillment of the
Requirement for Ph.D. Degree of Agronomy**

Completed in Oct 2013

Commencement in Dec 2013

原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者（需亲笔）签名：张家庆 2013年12月7日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权南京农业大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编学位论文。

保密☐，在_____年解密后适用本授权书。本学位论文属于不保密☐.

（请在以上方框内打“√”）

学位论文作者（需亲笔）签名：张家庆 2013年12月7日

导师（需亲笔）签名：刘红林 2013年12月7日

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	V
缩略语的中英文对照	IX
第一篇 文献综述	1
第一章 氧化应激研究综述	1
1 自由基的概念、产生与种类	1
1.1 自由基的概念	1
1.2 自由基的产生	1
1.3 自由基的种类	3
1.4 自由基的清除	3
1.5 氧化应激的产生与危害	4
2 氧化应激对雌性生殖机能的影响	5
2.1 氧化应激与卵泡发育	5
2.2 氧化应激与颗粒细胞凋亡	6
2.3 颗粒细胞凋亡与卵泡闭锁	7
2.4 氧化应激与胚胎发育	8
3 3-硝基丙酸	9
3.1 3-硝基丙酸的理化及生物学特性	9
3.2 3-硝基丙酸的吸收与代谢	9
3.3 3-硝基丙酸的作用机理	9
第二章 抗氧化剂研究综述	11
1 抗氧化剂的种类	11
2 抗氧化剂的生理作用与机理	11
2.1 维生素族抗氧化剂的作用与机理	11
2.2 多酚类抗氧化剂的作用与机理	13
2.3 醌类抗氧化剂的作用与机理	14
2.4 硫醇类抗氧化剂的作用与机理	14
第二篇 试验部分	17
第一章 小鼠卵巢氧化应激模型的建立	17

1 材料与方法	17
1.1 试剂	17
1.2 仪器设备	18
1.3 试验动物	18
1.4 氧化应激 (ROS) 的测定	18
1.5 基因表达	21
1.6 统计学分析	23
2 结果与分析	23
2.1 3-NPA 对小鼠体重和组织器官重量的影响	23
2.2 3-NPA 对不同组织中 ROS 水平的影响	25
2.3 3-NPA 对不同组织中抗氧化物酶活性的影响	29
2.4 3-NPA 对不同组织中抗氧化物酶 mRNA 水平的影响	30
3 讨论	31
第二章 氧化应激对卵泡和胚胎发育能力的影响	33
1 材料与方法	33
1.1 试剂	33
1.2 仪器设备	33
1.3 试验动物	34
1.4 石蜡切片	34
1.5 石蜡切片 HE 染色	36
1.6 石蜡切片 TUNEL 染色	36
1.7 体外受精及胚胎培养	37
1.8 颗粒细胞 RNA 的提取及定量 PCR	38
1.9 统计学分析	40
2 结果与分析	40
2.1 氧化应激对颗粒细胞凋亡及凋亡卵泡数量的影响	40
2.2 氧化应激对颗粒细胞凋亡基因表达变化的影响	42
2.3 氧化应激对卵泡发育的影响	42
2.4 氧化应激对卵泡闭锁的影响	44
2.5 氧化应激对排卵数量及早期胚胎发育能力的影响	46
3 讨论	47
第三章 小鼠卵巢保护性抗氧化剂的筛选	49
1 材料与方法	49

1.1 试剂	49
1.2 仪器设备	50
1.3 试验动物	50
1.4 组织中超氧化物阴离子比色法定量检测	50
1.5 组织中抗氧化酶活性的测定	51
1.6 统计学分析	51
2 结果与分析	52
2.1 抗氧化剂对小鼠体重和增重的影响	52
2.2 抗氧化剂对不同器官重量的影响	53
2.3 抗氧化剂对不同组织中 ROS 水平的影响	55
2.4 抗氧化剂对不同组织中 SOD 水平的影响	58
2.5 抗氧化剂对不同组织中 GPX 活性的影响	61
2.6 抗氧化剂对不同组织中 CAT 水平的影响	63
2.7 原花青素对颗粒细胞和卵巢内 ROS 水平的影响	66
2.8 原花青素对卵巢内 SOD 和 CAT 活性的影响	67
2.9 原花青素对卵泡颗粒细胞凋亡的影响	68
3.0 原花青素对卵泡颗粒细胞凋亡相关基因表达的影响	70
3 讨论	71
第四章 不同抗氧化剂体外抗氧化活性的比较研究	75
1 材料与方法	75
1.1 试验材料	75
1.2 试验方法	76
2 结果	80
2.1 小鼠卵巢颗粒细胞形态学观察	80
2.2 不同浓度 3-NPA 对小鼠卵巢颗粒细胞增值活性的影响	81
2.3 不同浓度 3-NPA 对颗粒细胞凋亡的影响	81
2.4 不同抗氧剂对 3-NPA 损伤颗粒细胞凋亡率的影响	83
2.5 不同抗氧剂对 3-NPA 损伤颗粒细胞存活率的影响	85
2.6 不同抗氧剂对 3-NPA 损伤颗粒细胞内 MDA 含量的影响	85
2.7 不同抗氧剂对 3-NPA 损伤颗粒细胞内 SOD 活性的影响	86
2.8 不同抗氧剂对 3-NPA 损伤颗粒细胞内基因表达的影响	87
3 讨论	88
第五章 小鼠卵巢氧化应激对繁殖性能的影响	91

1 材料与方法91

1.1 试验动物91

1.2 试剂与仪器92

1.3 试验方法92

2 结果与分析95

2.1 氧化应激对孕鼠体质量的影响95

2.2 氧化应激对小鼠繁殖能力的影响95

2.3 氧化应激对孕鼠内脏指数的影响96

2.4 氧化应激对胎鼠数量和重量的影响97

3 讨论99

参考文献101

全文结论115

创新之处117

需要进一步研究的内容119

附 录121

附录 1：主要溶液的配制121

附录 2：定量引物的扩增曲线、溶解曲线和标准曲线.....125

攻读博士期间发表的论文135

致 谢137

小鼠卵巢氧化应激模型建立以及 卵巢保护性抗氧化剂的筛选

摘 要

随着生活节奏的日益加快,社会竞争的日益激烈,无论是学习还是工作都处于紧张状态,过度的紧张和焦虑导致现代职业女性的心理压力越来越大,生殖系统疾病的发病率越来越多,卵巢氧化应激引起的人类生殖疾病也日益升高。卵巢氧化应激不仅影响着卵子的生成、卵泡的发育、卵子的成熟、卵泡的闭锁和排卵等,还能降低卵母细胞和胚胎的质量以及影响早期胚胎的发育能力,这些都会使受精率、胚胎质量、妊娠率显著降低。由于伦理和道德等原因,很难在人类对卵巢氧化应激的发生、发展和治疗进行深入细致的研究。因此建立成功可靠的动物卵巢氧化应激模型,用于揭示卵巢氧化应激机制以及开发研究新型抗卵巢氧化应激药物具有重要的实际意义。本研究应用氧化剂 3-NPA 成功建立了小鼠卵巢氧化应激模型,并对此模型进行了评估。利用建立的小鼠卵巢氧化应激模型,研究比较了 10 种不同抗氧化剂对卵巢氧化应激的保护作用,共筛选出了 4 种效果显著的卵巢保护性抗氧化剂,这对于研究卵巢氧化应激机制以及研究抗卵巢氧化应激药物的作用机制有着重要意义。

1、利用 3-NPA 建立小鼠卵巢氧化应激模型的研究

本试验通过观察 ICR 雌性小鼠体内注射不同浓度氧化剂 3-NPA (6.25, 12.5 和 25mg/kg)后,卵巢组织中 ROS 水平,抗氧化酶活性、各级卵泡数量、排卵数及早期胚胎发育等指标来判断卵巢氧化损伤的情况。结果表明,与对照组相比较,小鼠腹腔内注射 3-NPA (12.5mg/kg)连续 7 天,不仅能显著提高小鼠大卵泡闭锁比例,降低卵巢重量和大卵泡数量 ($P<0.05$),还能显著降低小鼠排卵数量和早期胚胎发育能力 ($P<0.05$)。除上述指标外,3-NPA (12.5mg/kg)还能显著降低颗粒细胞中 Bcl-2/ Bax 的比值,提高 (SOD2、CAT、GPX) mRNA 的表达和 ROS 的水平 ($P<0.05$)。结果表明,小鼠腹腔内注射 3-NPA (12.5mg/kg)连续 7 天,可诱导卵巢颗粒细胞凋亡,大卵泡闭锁和提高卵巢中 ROS 的水平。3-NPA 所诱导的小鼠卵巢氧化应激的损伤可作为卵巢氧化应激的动物模型。

2、卵巢氧化应激保护性抗氧化剂的筛选

本研究通过使用所建立的小鼠卵巢氧化应激模型,研究比较了不同抗氧化剂对体内卵巢氧化应激的抗氧化保护作用。通过对 10 种不同抗氧化剂:VC、VE、胡萝卜素、谷胱甘肽、没食子酸、姜黄素、原花青素、白藜芦醇、L-半胱氨酸和辅酶Q,抗氧化活性的检测,我们将组织中的ROS水平和抗氧化物酶 (SOD、CAT、GPX) 的活

性作为抗氧化功能的测定指标。结果表明, L-半胱氨酸、没食子酸、姜黄素、原花青素、白藜芦醇和胡萝卜素 6 种抗氧化剂能够显著降低卵巢组织内 ROS 的水平 ($P<0.05$); 其中姜黄素、原花青素、白藜芦醇和胡萝卜素 4 种抗氧化剂可显著提高卵巢的重量 ($P<0.05$)。GSH、VE、L-半胱氨酸、没食子酸、VC、辅酶Q、白藜芦醇、胡萝卜素 8 种抗氧化剂均可使卵巢组织中代偿升高的GPX活性显著下降 ($P<0.05$)。GSH、VE、L-半胱氨酸、姜黄素、VC、辅酶Q、白藜芦醇、胡萝卜素 8 种抗氧化剂均可使卵巢组织中代偿升高的T-SOD明显降低 ($P<0.05$)。GSH、VE、原花青素、辅酶Q、胡萝卜素 5 种抗氧化剂均能够降低卵巢中代偿升高的CAT活性 ($P<0.05$)。本研究表明, 卵巢氧化应激能够导致卵巢组织的过氧化损伤, 从而促进卵巢相关疾病的发生, 体内补充抗氧化剂能够显著降低卵巢过氧化损伤和提高卵巢组织的抗氧化功能。

3、不同抗氧化剂体外抗氧化活性的比较研究

本研究以体外培养的小鼠卵巢颗粒细胞为研究对象, 观察不同抗氧化剂: 原花青素 (PC)、维生素 C (VC) 和 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 对 3-NPA 致小鼠卵泡颗粒细胞损伤的保护作用。本研究共分为 5 组: 阴性对照组、3-NPA 模型组、PC 组 (50 μg 、100 μg 、200 $\mu\text{g/mL}$)、VC 组 (25 μg 、50 μg 、100 $\mu\text{g/mL}$) 和 NAC 组 (25 μg 、50 μg 、100 $\mu\text{g/mL}$)。采用体外培养的方法, 建立 3-NPA 致小鼠颗粒细胞氧化损伤模型。观察各组细胞的形态和结构; 采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法检测细胞存活率, 化学比色法检测细胞内超氧化物歧化酶 (SOD) 活性; TUNEL 法检测细胞凋亡率, RT-PCR 法分析了抗应激基因和凋亡相关基因的表达情况。结果表明, 高浓度的 PC、VC、NAC 均可减轻 3-NPA 诱导的颗粒细胞氧化损伤, 与 3-NPA 组相比较, PC、VC、NAC 组细胞存活率由 53.7% 分别上升到 85.3%、63.8% 和 60.5% ($P<0.05$); 细胞凋亡率由 38.2 % 分别降低到 13.4 %、23.6% 和 25.8% ($P<0.05$); PC、VC、NAC 组细胞内 SOD 活性明显降低 ($P<0.05$), PC 和 VC 组细胞内 MDA 含量显著降低 ($P<0.05$); PC、VC、NAC 组细胞内抗应激和凋亡相关基因的表达水平明显降低 ($P<0.05$)。结论: PC 和 VC 对 3-NPA 诱导的卵泡颗粒细胞的氧化损伤有显著的保护作用, 其机制可能与提高颗粒细胞的抗氧化能力以及降低凋亡率有关。

4、小鼠卵巢氧化应激对繁殖性能的影响

为了研究卵巢氧化应激对孕鼠胚胎发育的影响, 本研究利用以建立的小鼠卵巢氧化应激模型为研究对象, 在超数排卵处理后, 雌雄小鼠合笼, 于次日早晨检查阴道栓。孕鼠分别在孕龄 7.5d、12.5d 和 18d 颈椎脱臼处死, 处死前分别称重, 然后剖腹取出子宫, 分离出子宫内胚胎, 分别称重, 计数胚胎数量。结果表明, 和对照组 (生理盐水) 相比较, 3-NPA 诱导的卵巢氧化应激组显著地降低了孕鼠体重和增重; 提高了胚

胎的死亡率；降低了胎仔数量和胎鼠重量。结论：小鼠卵巢氧化应激能够显著地降低受孕率和繁殖性能。

本研究利用氧化剂 3-NPA 成功地建立了小鼠卵巢氧化应激模型，并且具有卵巢氧化应激的典型特征，如颗粒细胞凋亡，卵泡闭锁和卵巢中 ROS 的升高等，均能在此模型中显著地观察到。通过比较不同抗氧化剂对卵巢氧化应激的保护作用，发现多酚类抗氧化剂具有较强的抗氧化活性，对卵巢氧化损伤具有很好的保护作用。

关键词：卵巢；3-NPA；氧化应激；抗氧化剂

ESTABLISH OF MOUSE MODEL OF OVARIAN OXIDATIVE STRESS AND THE SCREENING OF OVARIAN PROTECTIVE ANTIOXIDANTS

ABSTRACT

With the quickening of the pace of life, the social competition is increasingly fierce. No matter work or learning is full of pressure, and excessive stress and anxiety lead to increasing psychological pressure for modern career women. The incidence of reproductive diseases is increasing, and the human reproductive diseases caused by ovarian oxidative stress are growing. Ovarian oxidative stress not only affects the generation of the egg, follicle development, oocyte maturation and follicle atresia but also reduces the quality of oocyte and embryo in early embryo development, which make the fertilization rate, embryo quality and pregnancy rate significantly reduced. Nevertheless, the relationship between oxidative stress and such disorders is not clear and cannot be adequately investigated in human for self-evident ethical reasons. So it is very important to establish the model of ovarian oxidative stress, which has important practical significance for revealing the ovarian oxidative stress mechanism and the development of new anti oxidative stress drugs. In this study, oxidant 3-NPA is used to establish an ovarian oxidative stress model and assessed this model. Using this ovarian oxidative stress model induced by 3-NPA, comparing the protective effect of different antioxidants on ovarian and screening four kinds of ovarian protective antioxidants. This has important significance for revealing the mechanism of ovarian oxidative stress and researching the action mechanism of anti-ovarian oxidative stress drugs. A mouse model of ovarian oxidative stress can be established by intraperitoneal injections of 3-NPA.

1. Establishment of a mouse model of ovarian oxidative stress

The aim of this study was to establish an animal model that could mimic the characteristics of ovarian degeneration induced by oxidative stress *in vivo* and investigate the effect of ovary oxidative stress on the follicle and oocyte development. Kunming female mice were dosed with 3-NPA (6.25, 12.5 and 25mg/kg) and saline (control) via intraperitoneal injection for 7 days. After dosing, ovaries were collected for histological evaluation of follicle numbers, granulosa cell apoptosis and atresia, and for measurement of weight, ROS levels, mRNA expression levels (Bcl-2, Bax, SOD2, CAT and GPX), and

antioxidant enzymes (T-SOD, CAT and GPX). All data were also measured in other organs. The results indicated that at the 7-day time point, 3-NPA (12.5 mg/kg) increased significantly the percentage of atretic large follicles, decreased the weight of ovaries, and reduced the number of large follicles compared with controls ($P<0.05$). Moreover, the number of ovulated oocytes and early embryonic development capacity were decreased significantly compared to controls ($P<0.05$). In addition, 3-NPA (12.5 mg/kg) also decreased significantly, the ratio of Bcl-2 to Bax, increased the mRNA expression of (SOD2, CAT and GPX) and ROS levels in granulosa cell ($P<0.05$). Collectively, these data indicate that 3-NPA induce granulosa cell apoptosis, large follicle atresia, and increase ROS levels in ovary. Therefore, it is suggested that we have established an in vivo model of ovarian oxidative stress that is useful for studying the mechanism of ovarian oxidative damage induced by free radicals and for the screening of novel antioxidants.

2. The screening of ovarian oxidative stress protective antioxidants

This experiment adopts the ovarian oxidative stress model by 3-NPA and compares the antioxidant protective effects of different antioxidants on ovarian oxidative stress. In this thesis, antioxidant activities of ten antioxidants such as Vitamin C, Vitamin E Carotene, Glutathione, Gallic acid, Curcumin, Proanthocyanidin, Resveratrol, L-cysteine and Coenzyme Q were measured. In the study of antioxidant activity in vitro, ROS level and activity of the antioxidant enzyme such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) activities in ovarian tissue were used as the measurement index of the antioxidant function. The results showed that the ten antioxidants exhibited different antioxidant abilities, L-cysteine, Gallic acid, Curcumin, Proanthocyanidins, Resveratrol and Carotene can significantly reduce ROS levels in ovarian tissue ($P<0.05$) and Curcumin, Resveratrol, Procyanidin and carotene can significantly increase the weight of the ovary ($P<0.05$) compare with model group. Eight antioxidants such as GSH, Vitamin E, L-cysteine, Gallic acid, Vitamin C, Coenzyme Q, Resveratrol and Carotene can make compensatory elevated glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in ovarian tissue significantly decreased ($P<0.05$). GSH, Vitamin E, L-cysteine, curcumin, Vitamin C, coenzyme Q, resveratrol and carotene eight kinds of antioxidants can make compensatory elevated T-SOD in ovarian tissue significantly lowered ($P<0.05$). GSH, Vitamin E, procyanidin, coenzyme Q and carotene five kinds of

antioxidants are able to make compensatory elevated CAT activity in ovarian tissue reduced significantly in ovarian tissue ($P < 0.05$). The results of the experiment showed that ovarian oxidative stress can lead to ovarian tissue oxidative damage, promote the development of ovary related disease. Antioxidant supplements can dramatically reduce ovarian oxidative damage and improve ovarian tissue antioxidant function. The study demonstrated that the mouse model of ovarian oxidative stress was successfully established, and the granulosa cell apoptosis, large follicle atresia, and increased ROS levels in ovary could be observed significantly in this model. By comparing the protective effect of different antioxidants on ovarian oxidative damage, and finding that phenol antioxidants have strong antioxidant activity and have a very good protection against ovarian oxidative damage.

3. Study on comparison of different antioxidants antioxidant activity in vitro

To explore the protective effect of different antioxidants PC、VC、NAC against the damage on mouse granulosa cells induced by 3-NPA. There were five groups in this experiment, namely negative control group, 3-NPA group, PC (50 μ g、100 μ g、200 μ g/mL)、VC (25 μ g、50 μ g、100 μ g/mL)、NAC (25 μ g、50 μ g、100 μ g/mL). The model of the damage on mouse granulosa cells induced by 3-NPA was made by culture in vitro. Morphological changes in granulosa cells were observed. The survival rate was detected by MTT method. The levels of SOD and MDA were measured by chemical colorimetry methods. The apoptosis rate of granulosa cells was detected by TUNEL method. Results : The oxidative damages in granulosa cells induced by 3-NPA in PC、VC、NAC groups were relieved as observed under microscope. Compared with 3-NPA, the survival rate in PC、VC、NAC groups increased from 53.7% to 85.3%、63.8% and 60.5% respectively ($P < 0.05$). The apoptosis rate in PC、VC、NAC groups decreased from 38.2% to 13.4%、23.6% and 25.8% respectively ($P < 0.05$). The SOD activity decreased significantly in PC、VC、NAC groups, the level of MDA in PC and NAC groups decreased significantly ($P < 0.05$). The levels of mRNA anti-stress genes and apoptosis-related genes decreased significantly in PC、VC、NAC groups ($P < 0.05$). Conclusion: PC and VC has significantly protective effects against oxidative damage induced by 3-NPA in mouse granulosa cells. The mechanism of protection may be related to anti-oxidation and apoptosis reduction.

3. Ovarian oxidative stress on reproductive performance

The aim of this study was to explore the influence of the ovarian oxidative stress on the embryonic development in female mouse. Female mice were dosed with 3-NPA (12.5

mg/kg) and saline (control) via intraperitoneal injection for 7 days. After super-ovulation treatment, the females were paired with a male (one to one) overnight and were examined for the presence of a vaginal plug in the following morning. The day on which a vaginal plug was observed as considered as Day 0.5 of gestation (0.5 d), the pregnant mice were killed on day 7.5、12.5 and 18 respectively . The embryos were isolated and collected. The number and weight of embryos were measured; the dead embryos were counted. Results: compared with control group, the 3-NPA treatment group decreased the growth of pregnant mice body weight and the number of embryo, resulted in the increased of the rate of the dead embryo. Conclusion: Ovarian oxidative stress can reduce the fertility and reproductive capability.

KEYWORDS: ovary; 3-NPA; oxidative stress; antioxidants

缩略语的中英文对照

英文缩写	英文全称	中文全称
CAT	Catalase	过氧化氢酶
d	Day	天
GSH	Reduced glutathione hormone	还原型谷胱甘肽
GSH-PX	Glutathione peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
hCG	Human chorionic gonadotropin	人绒毛膜促性腺激素
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide	过氧化氢
h	Hour	小时
IVF	In vitro fertilization	体外受精
min	Minute	分钟
OS	Oxidative stress	氧化应激
PMSG	Pregnant mare serum gonactotropin	孕马血清促性腺激素
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
ROS	Reactive oxygen species	活性氧自由基
RNS	Reactive nitrogen species	活性氮自由基
RT	Reverse transcription	逆转录
SOD	Superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
s	Second	秒
3-NPA	3-nitropropionic acid	3-硝基丙酸

第一篇 文献综述

第一章 氧化应激研究综述

1 自由基的概念、产生与种类

1.1 自由基的概念

早在 1900 年,摩西·冈伯格于密歇根大学就发现和证实了三苯甲基自由基,从此自由基的客观存在得到了全世界的肯定。1956 年,Harman 从分子生物学的角度就提出了自由基学说的理论,他认为机体的基础代谢水平和平均寿命的长短、线粒体的老化、免疫功能的降低以及某些老年性疾病的发生都与自由基有着密切的关系。目前大量研究也已证实,机体内自由基的含量随着年龄增长而呈现累积效应,但机体内的抗氧化物质和抗氧化防御体系的能力却随着年龄升高而逐渐下降。并且自由基代谢动态失衡的现象从生命早、中期就已经开始。所以,具有抗氧化活性的物质可以减轻自由基对机体的损伤,延缓机体衰老的进程^[1-3]。

自由基(radical),在化学上称之为“游离基”,是指化合物的分子在外界条件下(如:加热、燃烧、光照等),共价键发生均裂而形成的不成对电子的原子或原子团。由于原子在形成分子时,化学键中的电子需要成对存在,因此自由基就会到处去抢夺其它物质的电子,使得自己能够形成稳定的物质;在化学中,我们把这种现象称之为“氧化”。

自由基有三个主要特性,一是化学反应活性高,二是寿命短暂,三是具有磁矩。自由基化学性质非常活泼,非常容易失去电子或获得电子,因此具有极强的导致脂质过氧化反应的作用。大多数自由基反应活性强,寿命短暂,例如羟自由基通常仅只有 6-10 秒。

1.2 自由基的产生

自由基是生物体在有氧代谢过程中产生的中间产物,根据来源不同可分为内源性自由基和外源性自由基。1、内源性自由基 指机体在有氧环境条件下由体内生物氧化反应产生的自由基为“内源性自由基”,内源性自由基的主要来源:(1)体内生物氧化,如机体内一些生物大分子(血红蛋白、细胞色素 C、肌红蛋白、儿茶酚胺等)在生物氧化过程中会产生自由基。(2)酶促反应,如线粒体呼吸链经氧化磷酸化产生 ATP 的

过程，会从线粒体中释放出大量的活性氧自由基。2、外源性自由基 是指由机体外界环境来源的各种理化因素等诱导机体细胞或组织产生的自由基为“外源性自由基”，外源性自由基的主要来源：(1) 环境污染，如空气中的工业废气、臭氧、杀虫剂、麻醉气体、有机溶剂、粉尘颗粒等。(2) 电离辐射，如电磁辐射、离子辐射、紫外线辐射等。(3) 药物，如某些抗生素、抗癌药物、解热镇痛药、农药（杀虫剂、除草剂）等。(4) 其它因素，如重金属（铅、汞、砷等）、吸烟、饮酒、代谢紊乱、创伤、感染、缺血和炎症反应等

由此可见，我们的生活环境中到处充满了自由基，如做饭过程中产生的油烟，环境中的汽车尾气，空气中的粉尘颗粒，工作中的电脑辐射等这些都会增加我们的患病几率，危害我们的健康（图 1-1）。此外，经常吸烟和饮酒产生的自由基可直接损伤机体内的细胞膜，进而引起肺炎、肺癌、肺气肿、心脏病、高血压、糖尿病等一系列与吸烟饮酒相关的疾病。在正常的生理情况下，细胞内存在抗氧化体系和抗氧化物质能及时清除自由基，使自由基的生成与清除处于动态平衡之中，不会对机体产生危害的作用。但在病理情况下，由于机体细胞内活性氧生成过多或机体抗氧化系统衰弱，进而引起细胞或组织氧化损伤，导致功能丧失引发病变。

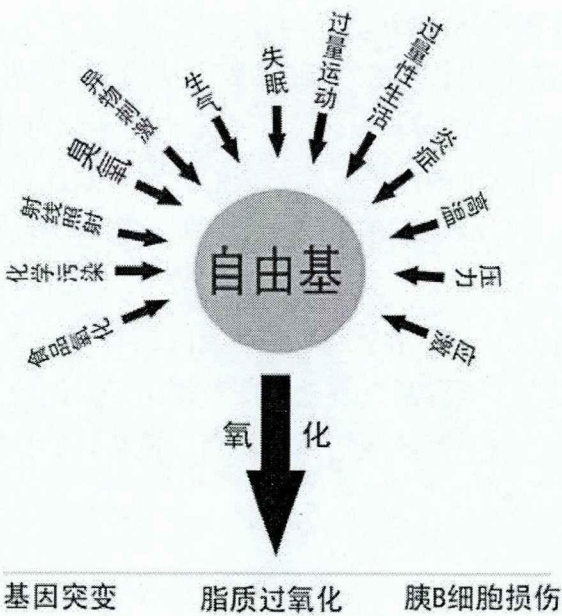


图 1-1 自由基的来源与危害

Fig 1-1 the source and harm of free radicals

1.3 自由基的种类

自由基按类型可以分为以下几种:

1. 超氧阴离子自由基, 如超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 和羟自由基 ($\cdot OH$), 超氧阴离子是机体内最主要的自由基, 体内的 O_2 通过得到电子的方式生成 $O_2^{\cdot-}$, 体内 SOD 能够及时把 $O_2^{\cdot-}$ 清除掉, 羟自由基 ($\cdot OH$) 的性质非常活泼, 能够与很多物质发生反应, 且反应迅速, 抗癌药和辐射等因素可诱导其生成。过氧化氢 (H_2O_2) 和单线态氧 (1O_2) 都不是自由基, H_2O_2 是一种活性氧, 1O_2 是激发态的分子氧, 它们都属于活性氧的范畴。

2. 脂类过氧化物自由基, 如脂类过氧化中生成的烷自由基 ($R\cdot$), 烷氧自由基 ($RO\cdot$) 和烷过氧自由基 ($ROO\cdot$) 等。此类物质的化学性质较活泼寿命较长, 体内 GSH-Px 能够有效的清除它们。

3. 其他, 如一氧化氮 (NO)、氯自由基 ($Cl\cdot$) 和甲自由基 ($CH_3\cdot$) 等。

研究表明, 对人体产生重大影响的活性氧自由基主要有以下 5 种: ①超氧阴离子自由基: 它是最早也是产生最多的自由基; ②过氧化氢: 它能够产生损害性极强的羟基自由基; ③羟基自由基: 它体内活性最强的自由基; 能引发体内脂质过氧化反应进而损伤细胞, 也会和磷脂、核酸、蛋白、糖类、氨基酸等生物体内的所有生物大分子发生反应, 进而引发细胞凋亡或死亡; ④单线态氧: 生物体内稳态的氧遭到紫外线辐射就会生成很多不稳定的单线态氧, 如果单线态氧与氯发生反应, 就会引起自由基物或脂质氧化; ⑤过氧化脂质: 它是很多自由基物过氧化反应后的产物, 且大部分在细胞膜中产生, 能够损害细胞膜的生物功能或引起细胞凋亡或死亡, 此外还能直接与蛋白质和核酸发生作用, 进而使得细胞和组织器官产生病变。

1.4 自由基的清除

人体的正常运动及新陈代谢每时每刻都在燃烧着能量(ATP), 而能量来源的线粒体在提供能量的同时也产生了大量自由基, 并且能量的传递过程也是由自由基来完成的。当自由基的活动处于动态平衡时, 它对机体是有益的。但在各种因素刺激下, 如服用药物、急性炎症、疾病、环境应激等, 自由基的产生与清除就会遭到破坏, 进而引发各种疾病。自由基即可产生于机体内部, 又可来源于机体外部, 因此清除自由基的途径也主要有两个:

1、利用机体内源的抗氧化体系, 它主要指机体内部的酶类抗氧化系统, 包括过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 以及过

氧化物酶（POD），这些抗氧化物酶在细胞内部协同对抗自由基，最终有效地消除细胞内过量的自由基。

2、利用机体外源的抗氧化剂，它们主要包括维生素 A、维生素 C、维生素 E、谷胱甘肽、胡萝卜素、多酚类抗氧化剂、微量元素硒（Se）、中草药等。它们可以提高机体的防御能力，增强机体抵抗力和免疫力，且能够与内源酶促体系共同清除自由基，抵抗氧化损伤。

因此，要想有效地降低自由基对人体的危害，不仅要依靠内源性防御体系，还要利用外源性自由基清除剂，使自由基在侵入机体之前就被阻断，从而使机体免遭氧化损害^[4]。

1.5 氧化应激的产生与危害

自然界中能够引起机体内产生氧化应激的因素有很多，可概括为内源性因素和外源性因素两类。内源性因素包括慢性或急性感染，如高血压、糖尿病、癌症、心脏病等。外源性因素主要包括环境污染、冷热应激、重金属、辐射等。此外，氧化应激的产生还与许多生活方式和饮食等因素有关，如喝酒、吸烟、剧烈运动、服用抗生素或抗癌药物、日晒（紫外线辐射）过多等；饮食中营养物质的缺乏也会导致氧化应激，如机体内缺乏维生素 E、C 和微量元素铜、硒等。这些都能够使机体细胞产生过量的活性氧自由基，从而使细胞内生物大分子（如脂类、蛋白和核酸等）氧化损伤，引起细胞凋亡或坏死，这是人类衰老和患病的主要根源。在正常生理情况下，机体细胞内存在的抗氧化体系能够及时清除多余的自由基，使自由基的生成与降解处于动态平衡之中，不会对机体产生有害影响。并且体内一定量的活性氧也具有一定的生理功能，如信号传导、激素分泌、细胞生长等。但在病理情况下，由于活性氧自由基生成过量或机体抗氧化能力不足，就可引发链式脂质过氧化反应损害细胞或组织，从而引起多种人类相关疾病，如心脏病、癌症、老年痴呆症、帕金森病和肿瘤^[5]。大量研究已表明，氧化应激能够引起多种卵巢相关疾病，如内分泌紊乱、卵泡闭锁、卵巢早衰等，这严重危害着人类和动物的生殖健康^[6-8]。在人类辅助生殖领域，氧化应激可引起体外胚胎老化、发育受阻、凋亡、碎片等危害作用^[7, 9]。在配子生成方面，氧化应激可使精子或卵子细胞氧化损伤，造成不孕不育等疾病，因为精子和卵子细胞膜中含有大量多不饱和脂肪酸，非常容易遭受 ROS 攻击，目前这已成为人类和动物生殖能力下降的主要原因之一（图 1-2）。

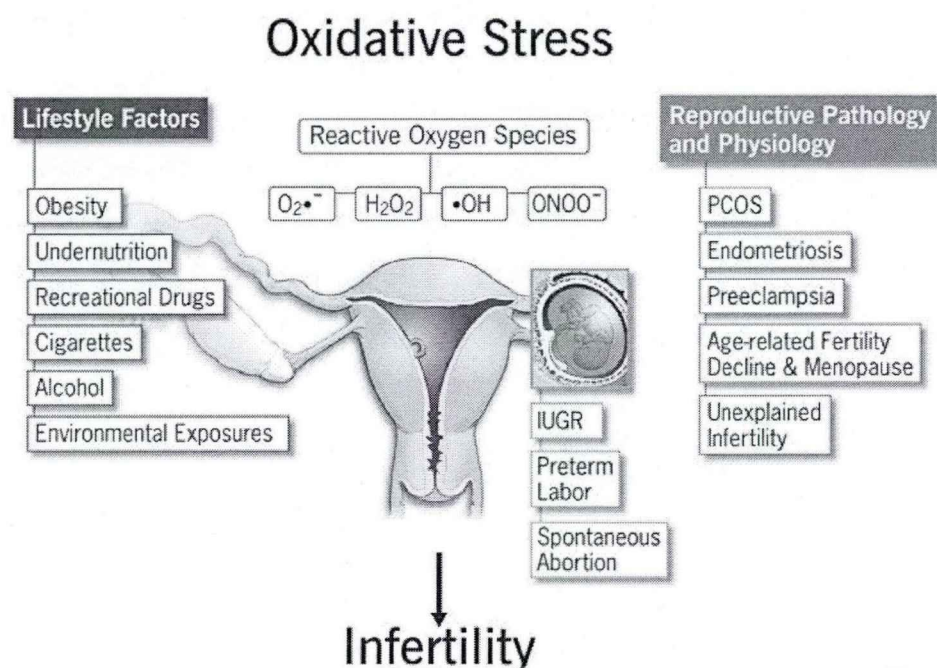
图 1-2 氧化应激对雌性生殖的影响^[10]

Fig 1-2 the effect of oxidative stress on female reproduction

2 氧化应激对雌性生殖机能的影响

氧化应激可发生在机体当中的每个组织器官，卵巢氧化应激可与很多卵巢疾病密切相关，如卵巢功能衰退、内分泌紊乱和多囊卵巢综合症等。卵巢氧化应激不仅影响着卵子发生、卵泡发育、卵泡成熟和卵泡破裂等，还能影响卵母细胞和胚胎质量以及早期胚胎发育，这些都会导致雌性生殖机能的下降。

2.1 氧化应激与卵泡发育

在正常情况下，卵泡内会产生一定量的 ROS，这在卵泡发育、破裂排卵过程中起到了非常重要的生理作用，也是健康卵巢颗粒细胞正常代谢活性的标志。卵泡内 ROS 过度升高，如感染、急性炎症、化疗、辐射、超数排卵等，将会导致氧化应激的产生，损害卵泡中卵母细胞和颗粒细胞中的生物大分子，可能导致卵泡发育障碍。研究表明，过量的 ROS 可以加速卵母细胞衰老，降低卵母细胞质量^[11, 12]。氧化应激还能够引起哺乳动物卵子的凋亡，并且这种现象可以被过氧化氢酶得到抑制^[13]。只有当卵泡内的 ROS 维持在一定量的水平，才能维持正常细胞功能，保证正常的发育。卵泡内的各种物质，如卵丘细胞、卵泡液等都可以保护卵母细胞免遭 ROS 的毒害作用^[14, 15]。很多研究已经证实，卵泡内含有内源性抗氧化物酶，如 SOD、CAT、GSH 等；非

酶类抗氧化物,如维生素 E、维生素 C、谷胱甘肽、尿酸等,它们共同对抗氧化损伤以降低卵泡中的 ROS 水平^[7, 11]。有研究报道,抗氧化物酶如 GSH-Px,在不孕女性卵泡液中水平的明显降低^[16],卵泡内高水平的 SOD 能够有效地降低 DNA 的氧化损伤^[15]。研究已证实,氧化应激能够改变原始卵泡,次级卵泡和有腔卵泡的数量,例如,母体妊娠期间营养不良可以降低出生后代卵泡数量,提高卵巢中氧化应激水平^[17];在重复超数排卵过程中,氧化应激可降低和卵泡卵母细胞的数量^[18]。卵泡内 ROS 和抗氧化体系之间的动态平衡对于维持卵母细胞和颗粒细胞的正常发育起着非常关键性的作用。

2.2 氧化应激与颗粒细胞凋亡

细胞凋亡是一个主动过程,在凋亡的过程中涉及一系列基因的激活、表达和调控等。细胞凋亡和细胞分化增殖都是生命活动的最基本现象,是维持机体内细胞数量动态平衡的基本措施。在早期胚胎发育过程中通过凋亡清除多余的和已经完成使命的细胞,确保了早期胚胎的正常发育;在成年时期通过凋亡清除病变和衰老的细胞,保证了身体健康。

细胞凋亡的途径主要有两个:(1)线粒体途径,主要由细胞应激或凋亡信号,如化疗药物、电离辐射、紫外线、重金属等诱导,引起细胞内线粒体通透性发生改变,从而导致细胞色素 C 释放及 AIF 释放,细胞色素 C 能够与 Apaf-1、ATP/dATP 形成凋亡小体 (apoptosome),导致 Caspases 9 激活,进而引发 Caspases 3 激活以及 Caspases 的级联反应,最终导致 DNA 的裂解。(2)死亡受体途径,主要由 Fas、TNFR1、CAR1 等途径,由它们相应的配体 FasL、TNF、Apo3L 等诱导,最终导致细胞的凋亡^[19, 20](图 1-3)。

凋亡是一个非常复杂的过程,受到细胞内外多种因素的影响。活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 能够引发凋亡的启动,最终导致细胞发生凋亡。卵泡内微环境对颗粒细胞增殖分化、凋亡起着极其重要的作用。ROS 作为卵泡内微环境中成员之一,在颗粒细胞增殖分化、凋亡中充当着重要角色。适宜浓度的 ROS 可以作为第二信使,在信号传导过程中发挥着重要的生理作用;氧化应激时过量的 ROS 能够导致细胞核 DNA 和线粒体 DNA 突变或裂解,细胞内一些重要的酶类失活,细胞膜脂质过氧化,蛋白变性等,这些变化均会引发细胞凋亡。

研究表明,在许多体系中已确定颗粒细胞凋亡与氧化应激密切相关^[21]。颗粒细胞在缺少 FSH 的条件下培养 4h 后,能够检测到 ROS 的产生并且发现了颗粒细胞的凋亡,说明了 ROS 的诱发了颗粒细胞的凋亡^[22]。8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 是氧化应激导

致 DNA 损伤的特异性产物, 在辅助生殖 IVF 时, 检测到 8-OHdG 水平与受精率呈现出负相关。毒理学研究也表明, 接触低剂量的过氧化氢将引起细胞凋亡而高剂量会使细胞发生坏死^[23]。此外, 许多氧化剂也能够导致细胞凋亡, 如有机过氧化物、脂质过氧化物、硫醇和醌类化合物等^[24, 25]。

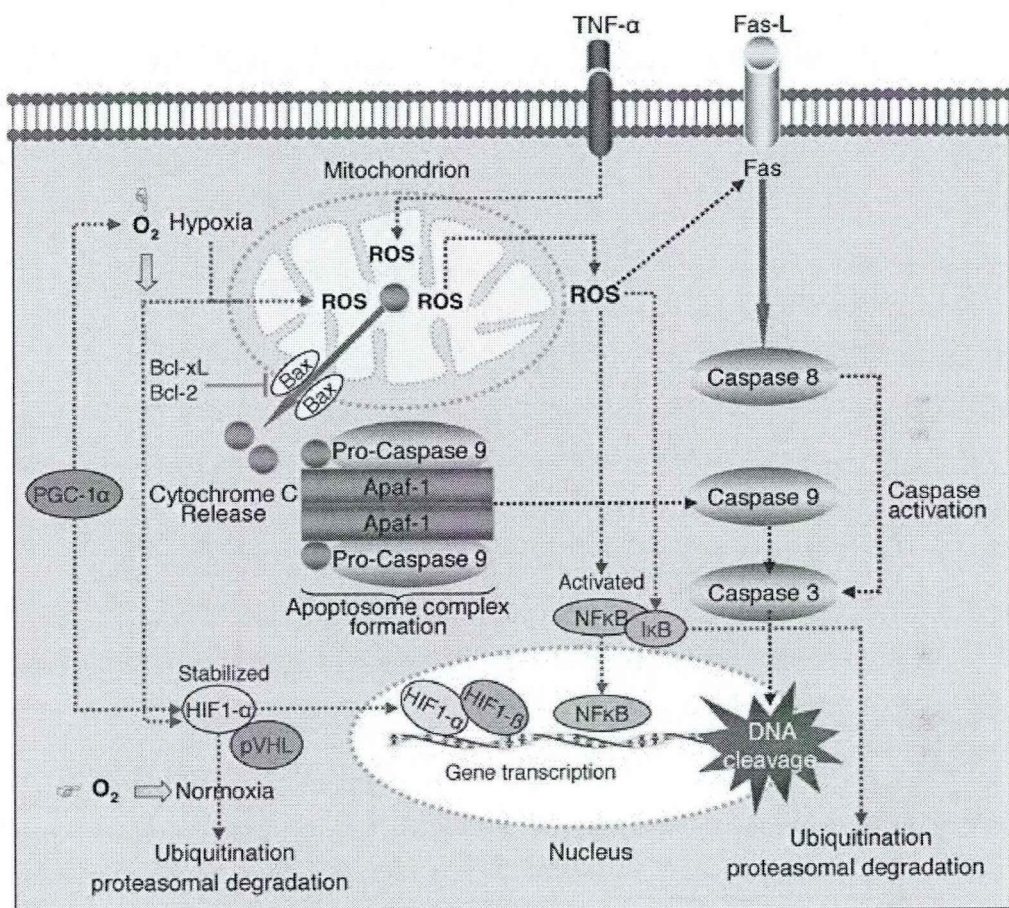


图 1-3 氧化应激介导的细胞凋亡的信号通路^[26]

Fig 1-3 Signalling pathways involved in ROS-mediated regulation of cell apoptosis

2.3 颗粒细胞凋亡与卵泡闭锁

卵泡内颗粒细胞的状态决定着卵泡发育的命运（发育成熟或退化闭锁），颗粒细胞增殖与分化卵泡则发育成熟，颗粒细胞凋亡卵泡则闭锁退化。哺乳动物卵泡闭锁是卵巢中一种普遍现象，只有少数卵泡能够发育到成熟排卵，而大部分卵泡将闭锁退化，其实质是由卵巢颗粒细胞凋亡造成的。在卵泡由原始卵泡向初级卵泡、次级卵泡逐渐发育成排卵前成熟卵泡时，卵泡闭锁同时发生。很多科学家在多种动物上先后开展了

卵巢颗粒细胞凋亡与卵泡闭锁的研究工作。1991 年 Tilly 发现鸡的颗粒细胞凋亡发生在卵泡闭锁的进程中^[27]。接着研究人员陆续在牛(Jolly et al.,1994)、绵羊(William,1995)、猪(Miki et al.,1998)等大动物中证实了卵泡闭锁进程中出现了卵巢颗粒细胞凋亡的现象。

颗粒细胞可为卵母细胞发育提供能量物质、激素、信号传导,还能保护卵子免遭氧化损伤。但在病理情况下,卵泡内颗粒细胞会产生大量的 ROS 可促使本身发生凋亡造成卵泡闭锁退化或使卵子失去保护作用从而降低了卵子质量。研究已证实,颗粒细胞的凋亡与排卵数和卵母细胞的质量呈现负相关。Lee 等报道,卵泡中颗粒细胞的凋亡可引起卵泡闭锁从而减少了排卵数量^[28]。Corn 等发现,卵丘颗粒细胞的凋亡能够降低卵母细胞的质量进而影响了胚胎发育的能力^[29]。颗粒细胞凋亡除了引起卵泡闭锁,减少排卵数和降低卵子质量以外,还能降低受精率和妊娠率等^[30]。

2.4 氧化应激与胚胎发育

胚胎发育的全过程都是在非常旺盛的有氧代谢中进行的,大量地消耗着氧气及其它营养物质。周围环境中 ROS 的水平和抗氧化物质之间的动态平衡对于卵子成熟、受精和胚胎发育具有重要的生理作用,但是过量的 ROS 对卵泡成熟、排卵、受精和早期胚胎发育将会产生有害的影响,可导致卵子减数分裂和胚胎发育阻止,进而引起凋亡或坏死。研究发现,卵泡中 ROS 水平的升高,显著提高卵母细胞中纺锤体缺失的比例,降低卵子的受精率和受孕率^[31]。

研究发现,与母体相比,胚胎中抗氧化酶(CAT、GSH 和 SOD)的活性较低,并且抗氧化能力较差。Gunter T 等报道,在大鼠胚胎中抗氧化物(CAT、GSH、SOD)的活性分别是成年大鼠的 20%、7%和 10%。活性氧自由基(ROS),如超氧自由基阴离子(superoxide radical; O_2^-)、过氧化氢(hydrogen peroxide; H_2O_2)、羟自由基(hydroxyl radical; $OH^\cdot$),已被大量研究证实能够损害卵子成熟和胚胎的发育能力。体外试验表明,过氧化氢能够导致小鼠受精卵细胞周期的停滞,引起受精卵凋亡或坏死。胚胎在新陈代谢中会产生一定量的 ROS,尤其是在体外培养时,胚胎自身以及周围培养环境会同时产生过量的 ROS,过度的 ROS 将会诱导氧化应激产生,对胚胎发育造成严重损害。在胚胎不同的发育时期,ROS 的产量也有所不同,ROS 对早期胚胎的影响比较显著,尤其是 2-细胞阶段,过量的 ROS 会导致发育阻滞,这在小鼠和仓鼠胚胎发育中已得到证实,大量的 ROS 可使细胞膜脂质变性,破坏 DNA 结构,引起 2-细胞阻滞,导致受精卵凋亡和发育受阻^[32-34]。Yang et al. 研究发现,胚胎内碎片的增多与胚胎内 ROS 的含量呈现明显的正相关。过度的 ROS 能够损害卵母细胞质量

和降低卵子的受精能力，颗粒细胞中过量的 ROS 将会导致氧化应激的发生进而会降低卵子质量、受精率胚胎质量和妊娠率等^[35]。因此，在体外培养环境中有效地降低卵子自身以及周围环境中 ROS 的产生对促进卵母细胞成熟和胚胎发育具有重要意义。

3 3-硝基丙酸

3.1 3-硝基丙酸的理化及生物学特性

3-硝基丙酸 (3-Nitropropionic acid, 3-NPA) 为白色结晶化合物，分子量为 119，熔点为 66.7~67.5℃，能够溶于水、丙酮、乙醇、乙酸乙酯、乙醚及热的三氯甲烷，它不溶于苯和石油醚。在自然条件下，它是由曲霉属和青霉属中的少数菌种产生的有毒代谢产物，变质或发霉的甘蔗中滋生的甘蔗节菱孢和蔗生节菱孢也具有产生 3-硝基丙酸的能力，此外在一些高等植物中也存在 3-硝基丙酸。研究报道，能够引起中毒的甘蔗样品中 3-硝基丙酸的含量大约为 1 700~2 083 mg/kg。

3.2 3-硝基丙酸的吸收与代谢

3.2.1 3-硝基丙酸的吸收

动物实验研究表明，3-硝基丙酸在胃肠道中被吸收的能力比较快，进行灌胃后在血液中浓度达到最高峰的时间大约为 12min 左右，进入血液以后它能很快地向体内各个组织中进行分布，并且能够迅速地通过血脑屏障作用，到达脑部区域，研究表明，大剂量灌胃给药后 5min 就能在脑部的不同区域检测到 3-硝基丙酸的存在。

3.2.2 3-硝基丙酸的排泄

在机体当中，肾脏为其主要的代谢排出途径，通常在 3 天之内可从尿液和粪便中排泄灌胃总量的 22.3%，其余则以代谢产物均匀地分布于体内其它各组织中。

3.2.3 3-硝基丙酸的毒性

动物实验表明，小鼠静脉内注射 3-硝基丙酸的 LD₅₀ 为 50 mg/kg，雄性小鼠经口腔灌胃，3-硝基丙酸的 LD₅₀ 约为 100 mg/kg，雌性小鼠的 LD₅₀ 大约为 68.1 mg/kg。

3.3 3-硝基丙酸的作用机理

3-硝基丙酸对生物体内一些重要的酶系统，如琥珀酸脱氢酶、过氧化氢酶、谷氨酰胺脱羧酶、单胺氧化酶等均有不同程度的抑制作用，进而阻断了呼吸链和三羧酸循环

的进行,导致细胞和组织器官缺氧,减少 ATP 的生成,最终使细胞和组织产生氧化损伤。此外,3-硝基丙酸还能激活细胞膜中的还原型辅酶 II (NADPH),NADPH 的激活能够导致分子氧被活化,从而引起大量活性氧自由基的生成。

3.3.1 诱导活性氧产生

琥珀酸脱氢酶 (Succinate dehydrogenase, 简称 SDH),是细胞内线粒体内膜的结合酶,是连接氧化磷酸化与电子传递的重要枢纽之一,可为真核细胞中的线粒体和多种原核细胞需氧和产能的呼吸链提供电子,其活性一般可作为评价三羧酸循环运行程度的指标。在化学结构上,3-硝基丙酸与琥珀酸非常相似,所以在机体内能够与琥珀酸脱氢酶结合,不可逆地抑制 SDH 的生物活性,从而阻止了呼吸链中复合体 II 和三羧酸循环的功能,这将会降低 ATP 的生成和诱导氧化应激的产生^[36-38]。研究表明,大鼠在注射 3-硝基丙酸后,在脑组织中能够发现活性氧自由基如过氧化物、羟自由基、超氧阴离子等显著升高,说明活性氧自由的生成是由于 3-硝基丙酸诱导产生的,并且添加不同种类的抗氧化剂能够有效地对抗这种氧化应激作用^[39,40]。3-硝基丙酸可诱导线粒体产生和释放 ROS,同时还能损伤线粒体和破坏其功能,线粒体释放和产生的 ROS 能够引起细胞氧化应激^[41,42]。

3.3.2 对细胞和组织的作用

3-硝基丙酸能抑制呼吸链复合体 II (SDH) 活性,这会提高细胞浆内细胞色素 C 的含量,同时还能致使细胞内 caspase 的含量提高,活性加强,而 caspase 家族 (caspase 8、9、10; 3、6 和 7) 和细胞色素 C 在细胞凋亡的过程中起到了非常重要作用。细胞色素 C 可激活 caspase 9 等信号途径从而引起细胞发生凋亡。大鼠和小鼠高剂量注射 3-硝基丙酸后,能够导致脑部局组织产生氧化损害,引起神经性症状,这与人类某些疾病 (亨廷顿舞蹈病、老年痴呆症、帕金森综合症) 的临床症状非常相似,所以 3-硝基丙酸是常用的建立人类疾病的动物模型的诱导药物。

第二章 抗氧化剂研究综述

活性氧是生物体内新陈代谢的正常产物，其生物活性具有不同的生理作用。少量的 ROS 对生物体具有重要的生理作用，如细胞信号传导、激素合成等，但当机体的抗氧化能力降低或体内 ROS 产生过量时就会使产生和清除之间的动态平衡受到破坏，造成氧化应激损伤，这与人类许多生殖疾病紧密相关。抗氧化剂（Antioxidants）是指能减轻或阻止氧化作用的分子。氧化是一个能够使电子从物质转移至氧化剂的化学反应，在这个过程中可产生自由基，从而引起链反应。当此反应发生于细胞中时，细胞容易遭受破坏或凋亡。抗氧化剂能捕获并中和自由基从而终止链反应对细胞产生保护作用。抗氧化剂通常是还原剂，例如维生素 C、硫醇、多酚类。抗氧化剂作为生物体内非酶类抗氧化系统的成份，可直接与活性氧发生反应，起到抑制或清除的作用；进而有效地提高了内源性酶类抗氧化物质的水平。因此，生物体补充外源性抗氧化剂能够有效地预防卵巢氧化应激相关疾病的发生。

1 抗氧化剂的种类

在自然界中，可以作用于对抗自由基的抗氧化剂范围非常广，种类极多。目前，已从单纯的合成抗氧化剂和食品氧化剂逐渐发展成为天然抗氧化剂与体内自由基清除剂。按照来源抗氧化剂可以分为内源性和外源性抗氧化剂。内源性抗氧化剂是指由机体自身合成和产生的抗氧化物质，如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等抗氧化物酶；维生素、褪黑素、肌肽等非酶类物质。外源性抗氧化剂是指由人工合成的化合物，如 BHA 和 BHT；或从植物中提取的抗氧化成份，如多酚类、生物碱类、皂苷类等；以及自然界中的微量元素，如锌、硒、铜等。

2 抗氧化剂的生理作用与机理

通过对内源性和外源性抗氧化剂的生物活性研究，其作用机理可以概括为以下几个方面：(1) 作为机体非酶系统的有效成份可直接清除体内的 ROS，或抑制体内 ROS 的产生。(2) 提高内源性抗氧化物质的水平，从而抑制或祛除机体内的 ROS。

2.1 维生素族抗氧化剂的作用与机理

β -胡萝卜素是一种重要的人体生理功能活性物质。1929 年，Moore 通过实验发现，

缺乏维生素 A 的大鼠补饲 β -胡萝卜素后能显著提高体内维生素 A 水平,从而证实了胡萝卜素能在体内转化为维生素 A,发挥维生素 A 的作用,所以又称其为维生素 A 原。细胞在有氧代谢中会产生大量高活性的 ROS,倘若机体不能及时清除这些活性物质,就会导致细胞氧化损伤。研究发现,细胞中缺乏维生素 A 能够促进 ROS 的生成,进而引发线粒体膜通透性发生改变和细胞色素 C 释放^[43]。 β -胡萝卜素能通过提供电子抑制 ROS 的生成,能够祛除单线态氧,降低光过敏作用,也是单线态氧的清除剂。体内实验研究表明,维生素 A 具有清除 ROS 和抗氧化的功能,能抑制阿霉素导致的小鼠心脏膜脂质的过氧化^[44]。大量研究表明,维生素 A 与 β -胡萝卜素的许多生物功能与人类健康有密切关系,它们可以增强人类和动物对疾病的抵抗能力^[45]。近年来研究证实,维生素 A 与 β -胡萝卜素具有抗氧化、解毒和保护心脏的作用,可以有效地抑制心脏病发病,因此已被广泛应用于心脏疾病的预防和治疗^[46]。

维生素 C (Vitamin C, Ascorbic Acid) 又叫 L-抗坏血酸,是一种水溶性维生素,在水果和蔬菜中含量丰富。在灵长类动物的生物进化过程中,由于发生突变造成机体内用于维生素 C 合成的一种必需的酶丢失,因此人类必须从饮食中获取维生素 C^[47]。而大部分动物能够通过自己体内合成所以不必通过饮食补充^[48]。VC 可以保护其它抗氧化剂,如维生素 A 和维生素 E,能够防止自由基对人体的伤害。VC 是一种强抗氧化剂,其本身被氧化,而使氧化型谷胱甘肽还原为还原型谷胱甘肽,从而发挥抗氧化作用。维生素 C 可以是氧化型,又可以是还原型存在于体内,所以可作为供氢体,又可作为受氢体,在体内氧化还原过程中发挥重要作用^[49]。Sahin 等^[50]研究表明,日粮中添加 VC 可显著降低热应激情况下肉鸡血清中 MDA 的含量,MDA 是脂质过氧化的产物可反应血清中的过氧化程度。维生素 C 不仅在抗热应激方面起到了作用的生理作用,在雌雄配子的生成过程以及胚胎发育过程中维生素 C 更是起到了举足轻重的作用。研究发现饮食中补充维生素 C,能够显著提高青年男子精子的活力和密度,降低精子畸形率,减少精子粘附性^[51]。维生素 C 还能保护精子内 DNA 免遭活性氧自由基的损伤,降低子代患遗传疾病的概率。在雌性动物中,卵巢内高浓度的维生素 C 可以有效地阻止活性氧自由基引起的卵泡凋亡。在卵母细胞和胚胎体外培养过程中,维生素 C 的作用效果更加显著,因为外界环境中含有大量氧气会产生更多自由基,这对胚胎发育极为不利。Tarín 等^[52]发现小鼠补充维生素 C 和 E 能够显著提高卵子孤雌激活后原核的形成率。Hosseini 等^[53]研究证实,在胚胎体外培养基中添加维生素 C 可降低猪体外受精胚胎凋亡的发生。由上述可知,只要机体内维生素 C 充足,维生素 C、谷胱甘肽、-SH 就能形成强有力的抗氧化组合,清除生物体内自由基,防止脂类过氧化反应以及某些化学物质的毒害作用,保护细胞的正常代谢。

维生素 E (Vitamin E) 又名生育酚,是指具有 α -生育酚生物活性的一类物质,

VE 与人类和动物的生殖活动密切相关。在人类, VE 对人体最重要的生理功能是促进生殖, 在雄性动物, 它能促进精子的生成, 提高精子密度、活力和射精量; 在雌性动物, 它能促进卵泡发育, 提高受孕率, 降低流产率, 提高产仔数和成活率等。研究报告 VE 是重要的脂溶性抗氧化剂, 它是体内最主要的生物自由基清除剂和抗氧化剂之一^[54, 55]。大量研究表明, VE 的抗氧化性能可有效地预防心血管、动脉粥样硬化和癌症等疾病的发生^[56-58]。在动物损伤模型中, VE 能够清除由酒精和铅诱导产生的自由基。除此之外, VE 还能阻止细胞中脂质氧化, 降低细胞中过氧化氢导致的 DNA 损伤^[59, 60]。

2.2 多酚类抗氧化剂的作用与机理

我国一些特有的食用和植物, 如茶叶、葡萄、迷迭香等, 含有大量的酚类物质, 这些物质的特点是, 有着很容易被自由基夺走的电子, 而它们在失去电子后就会成为一种对人没有伤害的稳定物质。

原花青素, 简称 OPC, 是一种有着特殊分子结构的生物类黄酮, 是目前国际上公认的清除人体内自由基最有效的天然抗氧化剂。它广泛地存在于水果、蔬菜和一些饮料当中, 与人类的健康生活紧密相关。近年来很多研究已证明, OPC 具有超强的抗氧化活性, 是一种非常好的自由基清除剂和脂质过氧化物的抑制剂^[61], 能有效地防治自由基引发的疾病, 如糖尿病、心血管疾病、关节炎等。Bagchi 等^[62]研究表明, 原花青素抗自由基的氧化能力是 VE 的 50 倍, VC 的 20 倍, 并吸收迅速完全, 口服 20 分钟即可达到最高血液浓度, 代谢半衰期达 7 小时之久。Ying Lu 等^[63]对苹果渣中原花青素的抗氧化及祛除自由基的能力, 结果显示, 原花青素清除超氧化物的能力是 VE 或 VC 的 10~30 倍。

白藜芦醇是一种生物性很强的天然多酚类物质, 它具有细胞内抗氧化活性的功能。它是存在于水果和蔬菜中的天然抗氧化剂, 如葡萄干、葡萄酒、葡萄汁等葡萄制品中都含有白藜芦醇, 尤其是红葡萄酒中含量最高。它主要通过清除或抑制自由基生成, 抑制脂质过氧化、调节体内抗氧化物相关酶活性等机制发挥抗氧化作用。研究发现, 白藜芦醇与其它黄酮类的多酚物质一样, 不仅具有非常强的抗氧化功能可阻止胆固醇在血管沉积预防心血管疾病, 还具有抗炎症、抗病毒、抗糖尿病、调节新陈代谢、保护神经系统等功能。研究发现, 当白藜芦醇达到 1.3 $\mu\text{g/mL}$ 时, 能明显抑制大鼠红细胞的自氧化溶血和由 H_2O_2 引起的氧化溶血, 对小鼠心、肝、脑、肾的体内外过氧化脂质的产生有明显的抑制作用。

姜黄素是从姜科、天南星科中的一些植物的根茎中提取的一种化学成分, 其中, 姜黄约含 3%~6%, 属于多酚类物质, 能够脱氢氧化, 能提供给自由基电子, 使链反

应终止。姜黄素的主要药理作用有抗氧化、抗衰老、抗炎、降脂、清除自由基、抗癌等。姜黄素作为一种强抗氧化剂,通过调节体内氧化-还原平衡,减少氧化应激造成的损伤,从而发挥其神经保护作用^[64, 65]。研究发现,姜黄素对 NIH 小鼠的心、肝、脾、肾和脑 5 个器官组织均具有显著的抑制脂质过氧化作用。姜黄素可提高机体内 SOD 和 GSH 的水平,对细胞起到防护作用。小鼠按 (250mg/kg) 的体重补充姜黄素 15d,发现谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs) 的活性在肝脏中提高了 1.8 倍。在尼古丁建立的肺损伤模型中,通过补充姜黄素可提高肺组织中 SOD 和 CAT 水平,减轻组织损伤^[66]。

没食子酸 (Gallic acid) 亦称五倍子酸或鞣酸,是一种有机酸,可见于五倍子、漆树、茶叶、葡萄等植物中。研究表明,没食子酸具有抗氧化、清除自由基、抗炎、抗病毒等多种生物学功能。研究证实,没食子酸对 Fenton 反应引发的活性氧自由基阴离子具有祛除作用,对 CYP3A 引起的氧化有显著的阻止作用,可降低细胞和组织中 ROS 的累积。腹腔内注射或口服没食子酸,能够明显抑制四氯化碳引发的大鼠肝损伤,其机制类似于 SOD 的活性作用,从而对细胞膜起到保护作用^[67]。动物实验表明,没食子酸可以抑制 γ 射线引起的小鼠不同组织中过氧化物的产生,对 DNA 和细胞膜具有保护作用。

2.3 醌类抗氧化剂的作用与机理

辅酶 Q (coenzyme Q) 简称 CoQ,即 ubiquinone,是生物体内广泛存在的脂溶性醌类化合物,辅酶 Q 广泛存在于真核细胞的线粒体中,它是线粒体呼吸链重要成分之一。辅酶 Q 具有抗氧化及清除自由基的作用,能够防治机体内生物大分子氧化损伤,并且还原型辅酶 Q 能够有效地防治生物膜、脂蛋白以及脂类过氧化^[68]。在人体呼吸链中质子移位及电子传递中起重要作用,可作为细胞代谢和细胞呼吸激活剂,还是重要的抗氧化剂和非特异性免疫增强剂,具有促进氧化磷酸化反应,保护生物膜结构完整性。辅酶 Q 还能激活人体细胞和细胞能量的营养,具有提高人体免疫力、增强抗氧化、延缓衰老和增强人体活力等功能。动物研究表明,大鼠连续补充 4 周辅酶 Q 能够使延长其运动时间,并能显著地降低运动导致的氧化损伤。小鼠补充辅酶 Q 能够显示出精力充沛、免疫功能和运动能力都能显著提高。

2.4 硫醇类抗氧化剂的作用与机理

谷胱甘肽、N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 和半胱氨酸等含有巯基化合物统称为硫醇 (R-SH)。在哺乳动物细胞中,尤其是肝脏,含有高浓度的还原型谷胱甘肽 (GSH) (10mmol/L)。在真核细胞中,大约 90% 的 GSH 存在于细胞质,约 10% 的 GSH 存

在于线粒体,虽然线粒体中 GSH 含量较少,但 GSH 对线粒体起着非常重要的作用,线粒体是细胞进行有氧呼吸代谢的场所,经氧化磷酸化途径,细胞在产生能量的同时也产生了大量的活性氧自由基,GSH 和其它酶类是对抗自由基的第一道防线。研究表明,人类很多疾病的发生与 GSH 活性降低或 GSH 氧化/还原循环受阻密切相关,并且 GSH 和其相关酶的活性可作为反映机体抗氧化功能的标志^[69, 70]。在体外培养过程中,卵母细胞中 GSH 的合成能力对卵子的质量及胚胎的发育能力具有非常重要的作用,GSH 在卵母细胞和胚胎中的含量可用来评估卵子及胚胎的质量^[71]。

半胱氨酸为含硫氨基酸之一,属非必需氨基酸,是一种生物体内常见的氨基酸,可由体内的蛋氨酸(甲硫氨酸,人体必需氨基酸)转化而来,可与胱氨酸互相转化,从半胱氨酸出发可生成谷胱甘肽。L-半胱氨酸对广泛的毒物如铅、镉、甲醛、乙醇、乙醛、氯仿、四氯化碳、过氧化脂等氧化剂具有有效的解毒作用,进而减少了自由基的生成,保证了机体健康。在卵母细胞的体外成熟、体外受精和胚胎培养中促进 GSH 的合成能够显著提高卵子的成熟及胚胎发育能力。在卵母细胞的体外成熟中添加半胱氨酸,可以促进卵子中 GSH 的合成,能够显著提高胞质成熟度、受精后雄原核形成率以及囊胚发育率^[72, 73]。L-半胱氨酸不仅能够促进猪受精后雄原核的形成,而且在猪精子的保存过程中,L-半胱氨酸还能降低 ROS 对猪精子质膜造成的过氧化损伤。因为在猪的精子质膜中含有大量不饱和脂肪酸,在低温保存过程中,精子的呼吸代谢可产生大量的 ROS,这很容易使得精子质膜发生过氧化反应,造成精子 DNA 的氧化损伤从而降低受精能力^[74]。

第二篇 试验部分

第一章 小鼠卵巢氧化应激模型的建立

在健康的机体内, ROS (reactive oxygen species)的产生和抗氧化剂的水平(antioxidants)保持着动态平衡,一旦这种动态平衡被体内外各种因素破坏时,将会产生大量的 ROS,导致氧化应激(oxidative stress)的发生^[75, 76]。氧化应激能够发生在机体内的每个组织器官,卵巢氧化应激与很多生殖疾病有着密切的关系^[6, 7, 77]。在人类辅助生殖领域中,卵巢氧化应激不仅影响着卵泡发育、卵泡闭锁、卵母细胞成熟、排卵、受精等,还影响着卵母细胞和胚胎质量以及胚胎的发育,这些都会导致受精率、胚胎发育率以及怀孕率的降低^[78-80]。因此,建立与人类相似病理变化的卵巢氧化应激模型对于研究发病机制及筛选新型抗氧化剂具有重要价值。目前国内实验室中应用最为普遍的实验小鼠为 ICR 小鼠,它不仅价格便宜而且繁殖力强。因此,在本研究中我们选择了 ICR 小鼠作为实验研究对象,通过观察小鼠体内注射不同浓度 3-NPA 后,卵巢中 ROS 水平,抗氧化酶活性、各级卵巢计数、排卵及胚胎发育等指标来判断卵巢氧化损伤的情况,建立了与人类生殖疾病相似的卵巢氧化应激模型。

1 材料与方法

1.1 试剂

DEPC、3-NPA: 购自 Sigma 公司

反转录试剂盒、SYBR Premix Taq™ 荧光定量酶: TaKaRa

Trizol: Invitrogen

细胞超氧化物阴离子比色法定量检测试剂盒、活体组织氧化应激活性氧(ROS)初级荧光测定试剂盒、组织超氧化物阴离子比色法定量检测试剂盒、细胞内氧化应激活性氧(ROS)红色荧光试剂盒: 上海杰美基因医药科技有限公司

苏木素-伊红(HE)、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、过氧化氢酶测试盒、谷胱甘肽—S 转移酶测试盒: 南京建成生物工程研究所

TaqDNA 聚合酶等普通 PCR 相关试剂(Takara 公司)

所有引物由上海英骏生物技术有限公司合成

1.2 仪器设备

实时荧光定量 PCR 仪: ABI7300, 美国 ABI 公司

UV-754 紫外分光光度计: 上海医用仪器厂

恒温水浴锅: 北京医疗设备厂

电子天平: Sartorius BP210S

超低温冰箱: Thermo

高速冷冻离心机: 德国 Eppendorf, 5810R 型

高压消毒锅: 上海申安医疗器械厂

电泳凝胶成像系统: Bio-Rad

电子天平: Sartorius BP210S

组织匀浆机: PRO200, 上海季诺科贸有限公司

PCR 仪: Takara

1.3 试验动物

4~5周龄清洁级ICR雌性小鼠40只, 平均体重为18~22 g, 购自南京市青龙山实验动物中心。小鼠分笼以后分别饲养在人工控温室(20~23 °C)和人工光照(14h光照, 10h黑暗)条件下, 标准颗粒饲料饲喂, 自由饮水和采食。母鼠先进行7d的标准化饲养, 以调节生理周期, 使其适应环境供实验使用。小鼠随机共分为4组: I. 对照组, 腹腔注射0.1mL的生理盐水; II. 3-NPA低剂量(6.25 mg/kg); III. 3-NPA中剂量组(12.5 mg/kg); IV. 3-NPA高剂量组(25 mg/kg), 分别腹腔内注射0.1mL 3-NPA(购自Sigma)配制: 按每只小鼠配制相应浓度的溶液, 用生理盐水配制, 然后用5N NaOH 调整pH值至7.4。对照组和试验组分别每日腹腔内注射2次(上午8:00, 晚上20:00), 连续注射7d。

1.4 氧化应激(ROS)的测定

1.4.1 细胞内氧化应激(ROS)红色荧光定性检测

(1) 卵巢颗粒细胞的准备: 将实验组和对照小鼠颈椎脱臼处死, 在无菌条件下取出两侧卵巢, 放入预热好的装有PBS溶液的培养皿(35×15 mm)内, 无菌环境中, 在体视显微镜下用1mL注射器针头刺破卵泡, 随即颗粒细胞释放到PBS中, 然后用枪头吹散颗粒细胞即可。

(2) 加入适量的GENMED清理液(Reagent A), 用200 μL枪头反复吹洗几次, 然

后离心，小心抽去上清液

- (3) 加入50-100 μL 含有GENMED染色液(Reagent B)和 GENMED稀释(Reagent C)的GENMED染色工作液，轻柔混匀
- (4) 放进37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水槽孵育20分钟，避免光照
- (5) 放入台式离心机离心5分钟，速度为300 g
- (6) 小心抽去上清液
- (7) 加入预冷的20 μL GENMED保存液(Reagent D)，轻柔混匀颗粒细胞，然后吸取5 μL 置于载玻片上，同时滴加(DAPI)和抗荧光淬灭剂
- (8) 激光共聚焦显微镜观察

本试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司，以上操作均按说明进行。

1.4.2 细胞内超氧化物阴离子比色法定量检测

一、样品准备

- (1) 准备好待测卵巢颗粒细胞
- (2) 小心加入50 μL GENMED清理液(Reagent A)用200 μL 枪头反复吹洗几次，然后离心，小心抽去上清液
- (3) 加入50 μL GENMED缓冲液(Reagent B)，混匀细胞颗粒群
- (4) 放进冰槽里待测

二、测定准备

- (1) 准备好待测样品，置于冰槽里备用
- (2) 设定好分光光度仪或酶标仪：580 nm波长，并置零

三、样品测读

实验开始前，将-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱里的试剂置于室温下融化，避免光照。然后进行下列操作。

- (1) 准备1个96孔板，做好标记：空白对照和待测样品
- (2) 移取50 μL GENMED缓冲液(Reagent B)到空白对照孔里
- (3) 移取50 μL 上述准备的待测样品到待测样品孔里
- (4) 分别加入10 μL GENMED染色液(Reagent C)
- (5) 轻轻摇动96孔板，使其混匀
- (6) 放进37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱里孵育30分钟
- (7) 即刻放进酶标仪里测读：获得吸光读数(OD)
- (8) 计算样本浓度

本试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司，以上操作均按说明进行。

1.4.3 组织中超氧化物阴离子比色法定量检测

一、样品准备

- (1) 手术取出动物组织，并称重以确定 50 毫克组织重量
- (2) 放进预冷的 15 毫升锥形离心管
- (3) 加入适量的 GENMED 清理液 (Reagent A) 清洗 1 次
- (4) 即刻用刀片切碎组织
- (5) 加入适量预冷的 GENMED 裂解液 (Reagent B)
- (6) 涡旋震荡 5 秒，充分混匀
- (7) 即刻放进预冷的 DOUNCE 匀浆器
- (8) 在冰槽里用匀浆棒匀化组织
- (9) 将所有组织匀浆物移入 1.5 毫升离心管
- (10) 移取 10 μ L 进行蛋白定量检测
- (11) 放进冰槽里待测

二、测定准备

- (1) 准备好待测样品，置于冰槽里备用
- (2) 设定好分光光度仪或酶标仪：580 nm 波长，并置零

三、样品测度

实验开始前，将-20℃冰箱里的试剂置于室温下融化，避免光照。然后进行下列操作。

- (1) 准备1个96孔板，做好标记：空白对照和待测样品
- (2) 移取适量的GENMED缓冲液 (Reagent C) 到空白对照孔里
- (3) 移取50 μ L上述准备的待测样品到待测样品孔里
- (4) 分别加入等量的GENMED染色液 (Reagent D)
- (5) 轻轻摇动96孔板，使其混匀
- (6) 放进37℃培养箱里孵育30分钟
- (7) 即刻放进酶标仪里测读：获得吸光读数 (OD)
- (8) 计算样本浓度

试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司，以上操作均按说明进行。

1.4.4 组织中抗氧化酶活性的测定

本研究采用化学比色法分别测定了组织中SOD、CAT和GSH-Px 三种抗氧化物酶

的活性。利用考马斯亮蓝法测定了不同组织中蛋白质的含量，试验具体操作步骤严格按照说明书流程进行，本实验所用试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.5 基因表达

1.5.1 组织提取及反转录

组织总 RNA 的提取 (Trizol 法)

1. 称取50-100 mg组织，加入1mL Trizol试剂，匀浆样品保持在15℃~25℃之间约5 min，以使核蛋白复合物完全解离。
2. 加入200 μ L的氯仿(Trizol量的1/5)，然后将EP管盖子盖好，用振荡器震荡约10-20 s至液体呈乳白色，然后室温静置5-10 min。
3. 在4℃，12000 rpm，离心15 min (离心后水相大约占总体积的60 %)，然后吸取上清液约200-300 μ L至另一新的EP管中。
4. 用1000 μ L 的枪头加入500 μ L预冷的异丙醇 (Trizol的1/2)，室温静置10 min；4℃，12000 rpm，离心10 min，然后弃上清。
5. 用75%乙醇1mL进行洗涤 ($\geq$ Trizol的量)，4℃，10000 rpm，离心10 min，然后倒掉乙醇。
6. 重复上述第5步操作
7. 将洗涤后的EP放入超净工作台，启动风扇进行吹干 (注意不要太干)，然后根据RNA团块大小确定加入的DEPC水的量。

组织RNA浓度的测定

总 RNA 的检测：用 10 μ L 的枪头吸取溶解于 DEPC 水的总 RNA 5 μ L 进行电泳检测，在 1.5%琼脂糖凝胶电泳中检测 RNA 的完整性 (如条带清晰，无拖尾现象并且 RNA 的 28S 与 18S 条带灰度比值约为 2.0)；用紫外分光光度计测定其浓度和纯度 (RNA 在 OD260 和 OD280 之间的比值应该在 1.8~2.0 之间)，然后将剩余的 RNA 加入 1/10 乙酸钠和 1mL 无水乙醇进行重新沉淀，然后放入-70℃保存备用。

RNA 的反转录

依次往 PCR 管中加入下列反应试剂：

- ① mRNA 模板：5-8 μ L
- ② Oligo dT：1 μ L
- ③ 0.1% DEPC 水：补充至 10 μ L

然后放入 PCR 仪内，90℃，5 min；完后立刻放入冰块中或-20℃冰箱冷却 10 min。
再往 PCR 管内依次加入下列试剂：

- ① M-MLV buffer (5×): 5 μL
- ② dNTP (10 mM each): 2.5 μL
- ③ RNase inhibitor (40 U/μL): 0.6 μL
- ④ M-MLV (200 U/μL): 1μL
- ⑤ 0.1% DEPC 水：补充至总体积 25μL

离心混匀后在 PCR 仪上 42℃，1 h；95℃，5 min，完后将所获得的 cDNA 产物放入于 20℃保存。

1.5.2 定量 PCR

定量 PCR 使用 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) 试剂盒进行，本实验以 GAPDH 基因作为内参基因，应用标准曲线方法对基因表达进行相对定量，反应体系及引物设计如下：

SYBR® Premix Ex TaqTM (2×)	10 μL
上游引物 (10μM)	4 μL
下游引物 (10μM)	0.4 μL
灭菌的超纯水	6.8 μL
cDNA 模板	2 μL
总反应体积	20 μL

以上操作均在冰盒上进行。

将以上反应体系内的混合物轻微离心混匀后，立刻置于荧光定量 PCR 仪上。
反应程序：95℃预变性 10 min，40 循环(95℃15 s，X℃退火温度 15s，72℃延伸 1 min)；在 80℃读板，测定荧光密度值；溶解曲线绘制：65~95℃，每隔 0.2℃读板一次。每个试验样本重复三次，根据 DNA Engine Opticon 输出的试验结果，以 GAPDH 作为内参标准，应用标准曲线的方法计算目标基因相对于内参基因 GAPDH 的表达量，引物设计如表 1-1。

表 1-1 实时荧光定量 PCR 反应引物序列和反应条件
Table 1-1 the Primer sequences for real-time RT-PCR

Gene	Accession Number	Primer sequences (5'-3')	Product size (bp)	Annealing Temperature (°C)
GAPDH	M32599	F:ACCACAGTCCATGCCATCAC R:TCCACCACCCTGTTGCTGTA	452	56
SOD2	NM_017051	F:ATGGTGGGGGACATATT R:GAACCTTGGACTCCCACAGA	166	57
Catalase	NM_009804.1	F:CCTCGTTCAGGATGTGGTTT R:TCTGGTGATATCGTGGGTGA	130	60
GP _x	NM_008160	F:GTCCACCGTGTATGCCTTCT R:TCTGCAGATCGTTCATCTCG	152	57

1.6 统计学分析

本研究中所有数据均以（平均值±标准误）表示，所获数据应用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差或卡方分析，组间差异性采用 LSD 法检验。判断标准以 $P<0.05$ ， $P<0.01$ 为有统计学意义，所有实验至少重复三次以上。

2 结果与分析

2.1 3-NPA 对小鼠体重和组织器官重的影响

为了研究不同剂量 3-NPA 对小鼠及组织器官重量的影响，本试验使用不同剂量的 3-NPA (6.25, 12.5, 25 mg/kg)进行腹腔内注射，连续 7 天，具体结果见(图 1-1, A-F).与对照组相比较 3-NPA (25 mg/kg) 注射组小鼠体重有所减轻，但两组之间差异不显著 ($P>0.05$)，3-NPA (6.25 , 12.5 mg/kg) 两组体重和对照组相比差异不显著 ($P>0.05$)，说明 3-NPA (6.25 , 12.5 mg/kg) 两组对体重没有显著影响比较适宜作为模型剂量。与对照组相比，3-NPA (12.5, 25 mg/kg)注射组卵巢指数显著降低($P<0.05$)，3-NPA (6.25 mg/kg) 卵巢指数差异不显著 ($P>0.05$)，说明 3-NPA (12.5, 25 mg/kg) 两组对卵巢的氧化应激影响比较明显，有可能降低了卵泡数量从而影响了卵巢重量。小鼠体增重，肝脏指数，肾和脾脏指数在各组之间差异不显著 ($P>0.05$)。

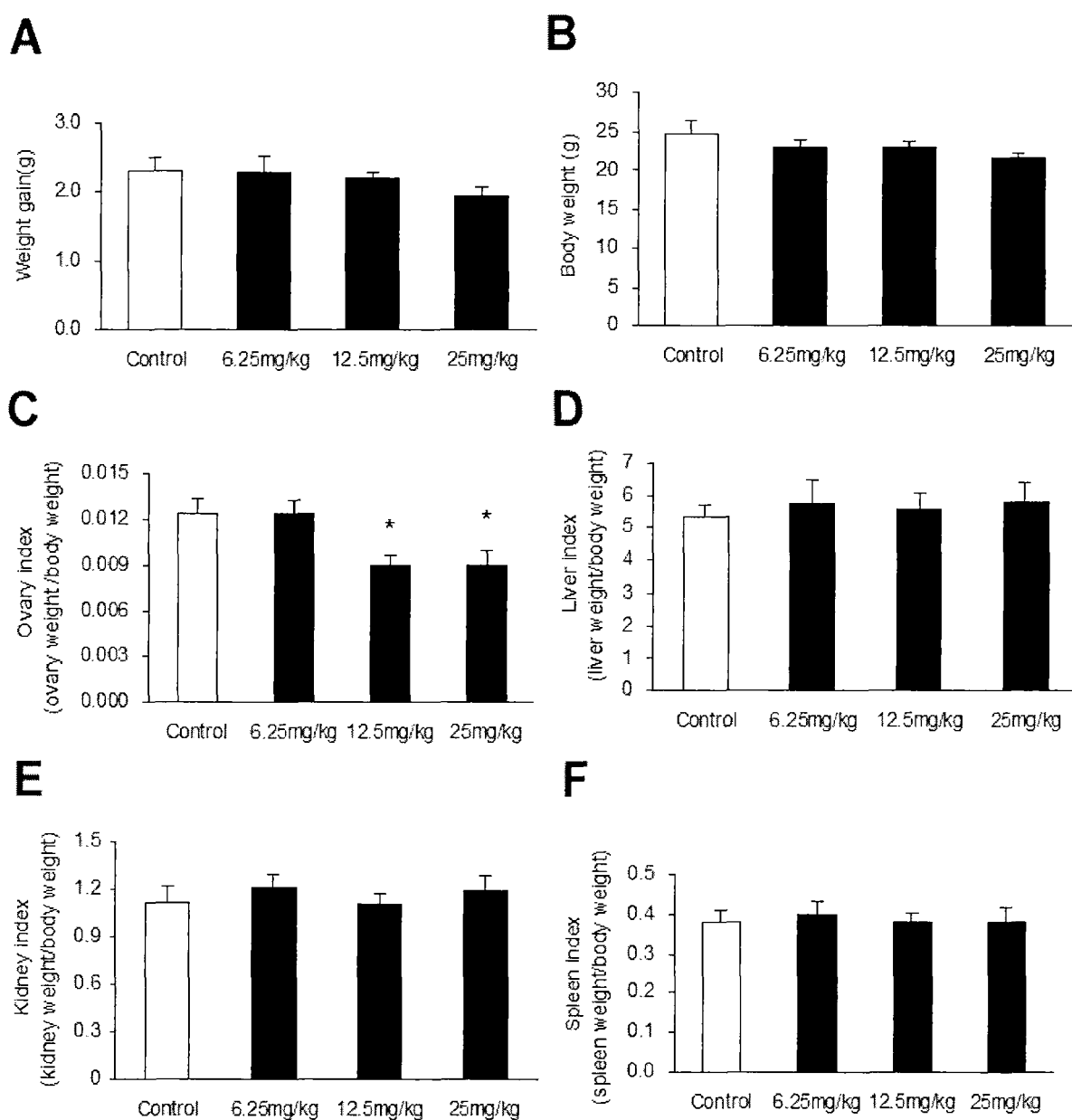


图 1-1 不同剂量的 3-NPA 对于体增重，体重和器官重量的影响

注：与对照组比较，* $P < 0.05$

Fig 1-1 the Effect of different doses 3-NPA on weight gain, body and organ weights.

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$.

2.2 3-NPA 对不同组织中 ROS 水平的影响

为了确定不同浓度 3-NPA 对不同组织中 ROS 的水平,我们分别测定了 3-NPA (6.25, 12.5, 25 mg/kg)对体内组织中 ROS 水平的影响(图 1-2, A-F)。结果显示,与对照组相比,3-NPA (12.5, 25 mg/kg)两种浓度能够显著地提高颗粒细胞和卵巢组织中 ROS 的水平($P < 0.05$); 3-NAP (6.25 mg/kg)浓度与对照组差异不显著($P > 0.05$),这说明 3-NPA (12.5, 25 mg/kg)两组都可以提高卵巢中 ROS 的水平,有可能导致卵巢的氧化应激。与对照组相比,3-NPA 不同浓度的注射未能提高脑,肾,肝和脾中 ROS 的水平($P > 0.05$),说明了 3-NPA 的氧化应激作用对于卵巢组织具有比较特异的影响。根据以上研究结果,我们初步证明了 3-NPA (12.5 mg/kg)浓度对于产生卵巢氧化应激是最为适宜的。要进一步确定 3-NPA 引起卵巢氧化应激时间点,我们分别检测了连续注射至第 3 d 和 7 d 颗粒细胞核卵母细胞中 ROS 的产生情况(图 1-3 和图 1-4)。结果显示,与对照组相比较,连续注射至第 3 d 颗粒细胞和卵母细胞没有发生明显变化,但连续注射至 7 d 颗粒细胞和卵母细胞中 ROS 的水平显著提高。

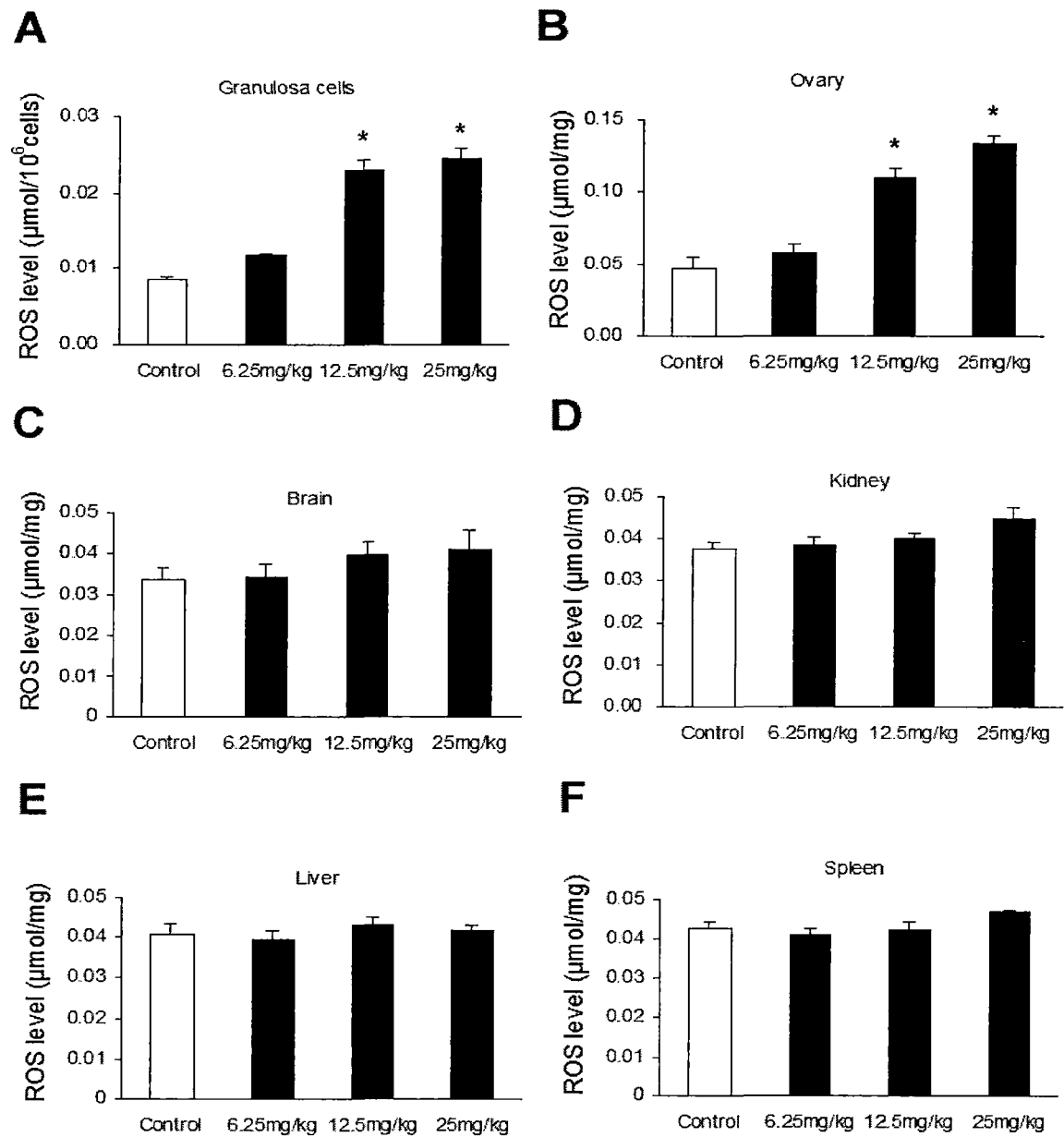


图 1-2 不同剂量的 3-NPA 对于组织中 ROS 水平的影响

注：与对照组比较，* $P < 0.05$

Fig 1-2 Effect of 3-NPA different doses on ROS levels in different tissues.

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$

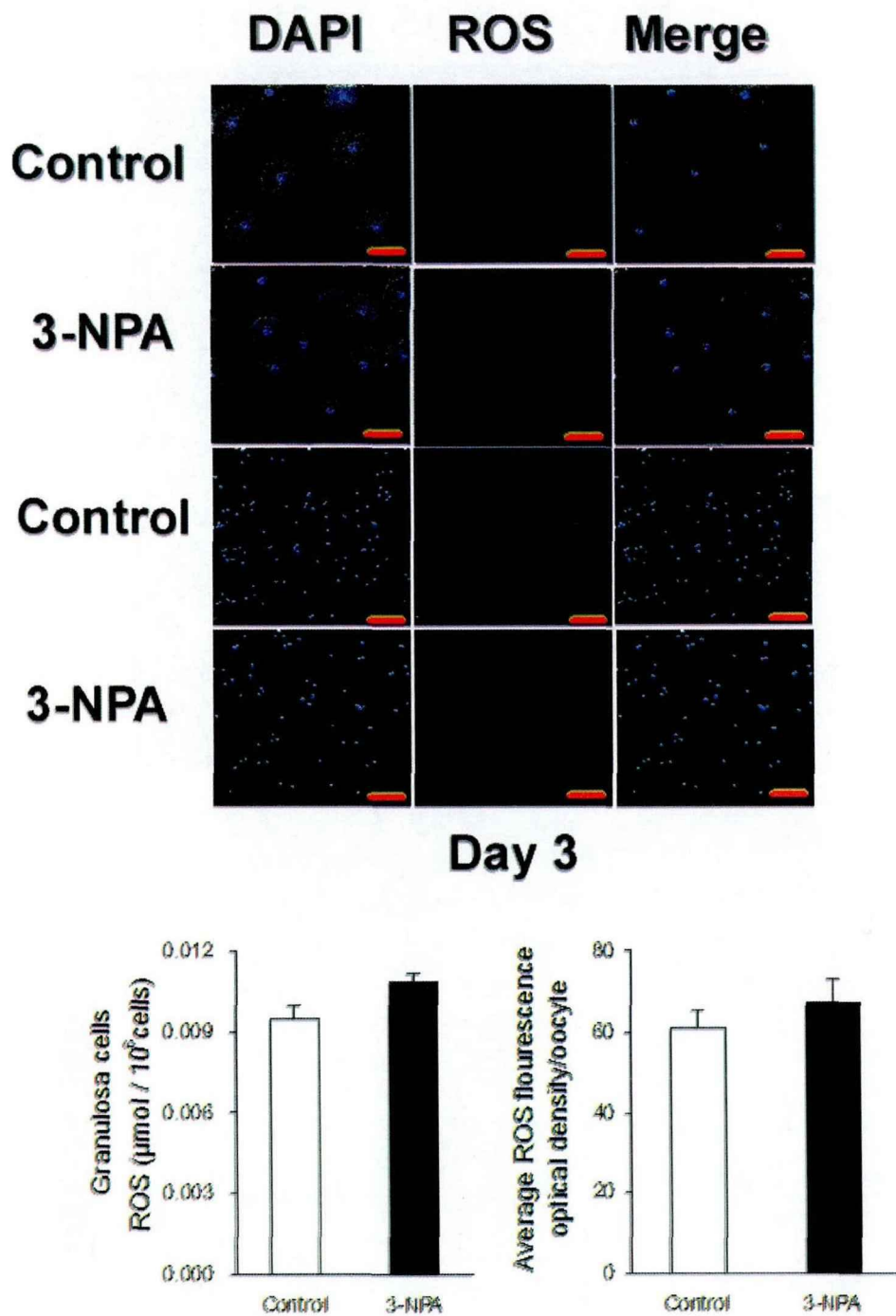


图 1-3 3-NPA (12.5 mg/kg)注射 3 天对颗粒细胞和卵母细胞中 ROS 水平的影响
(比例尺: 100 μm)

Fig 1-3 Effect of 3-NPA treatment for 3 days on ROS levels in granulosa cells and oocytes.
(Scale bars are 100 μm)

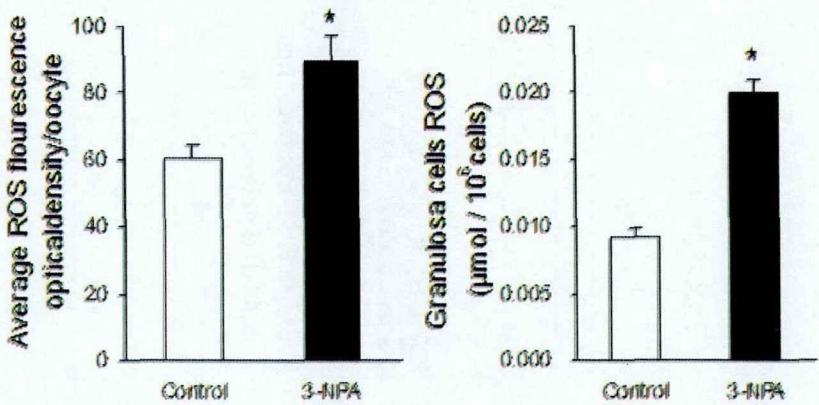
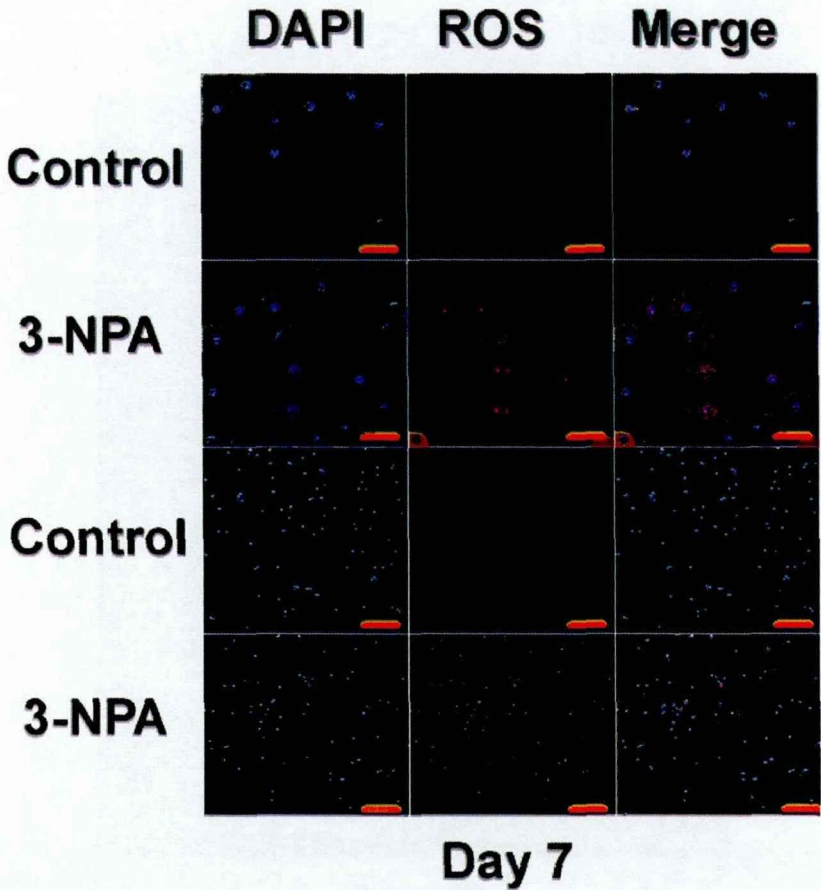


图 1-4 3-NPA (12.5 mg/kg)注射 7 天对颗粒细胞和卵母细胞中 ROS 水平的影响
(比例尺: 100 μm)

Fig 1- 4 Effect of 3-NPA treatment for 7 days on ROS levels in granulosa cells and oocytes.
(Scale bars are 100 μm)

2.3 3-NPA 对不同组织中抗氧化酶活性的影响

3-NPA (12.5 mg/kg) 连续注射 7 d, 能够显著提高颗粒细胞和卵母细胞中 ROS 水平, 很有可能体内抗氧化酶的活性也发生了相应的变化, 于是我们测定了体内不同组织中抗氧化酶的活性(图 1-5, A-C)。结果表明, 与对照组相比较 3-NPA (12.5 mg/kg) 显著地提高了卵巢组织中抗氧化酶 (SOD、GPX、CAT) 的活性, 这说明 3-NPA 能够有效地引起卵巢应激, 卵巢为了对抗氧化应激从而提高了组织中抗氧化酶的活性以降低氧化损伤。其余组织中抗氧化酶的活性没有发生显著地变化 ($P > 0.05$)。

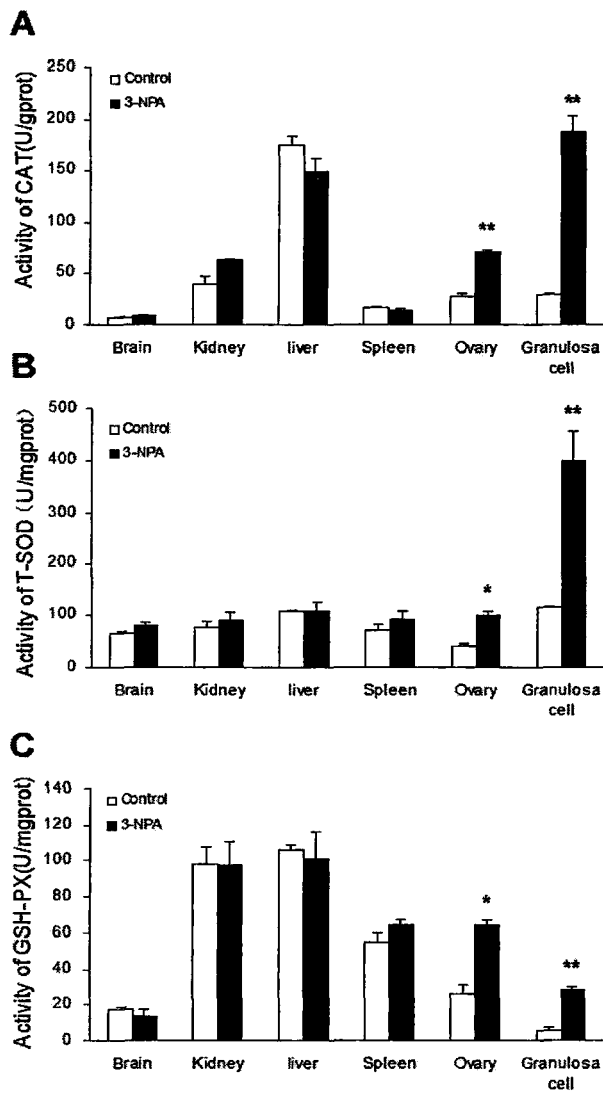


图 1-5 3-NPA 对不同组织中抗氧化酶活性的影响

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig 1-5 Effect of 3-NPA injection on antioxidant enzyme activity

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 3-NPA 对不同组织中抗氧化物酶 mRNA 水平的影响

研究表明,氧化应激能够引起体内抗应激基因((SOD₂、GPX、CAT))的表达,本试验采集了 3-NPA (12.5 mg/kg)连续处理 7d 后卵巢颗粒细胞,脑组织,肾组织,肝和脾组织进行了 qPCR 验证(图 1-6, A-E)。结果表明,抗应激基因 SOD₂和 GPX 在卵巢颗粒细胞中的表达量显著高于对照组($P < 0.05$),除了肾组织中 CAT 和脾组织中 GPX 的表达量比对照组较高以外,在其余各组织中 SOD₂, GPX 和 CAT 的表达量与对照组相比均无显著变化($P > 0.05$),说明了 SOD₂和 GPX 在颗粒细胞中的表达具有一定的保护性,其功能可能是保护卵巢免遭氧化应激损伤。

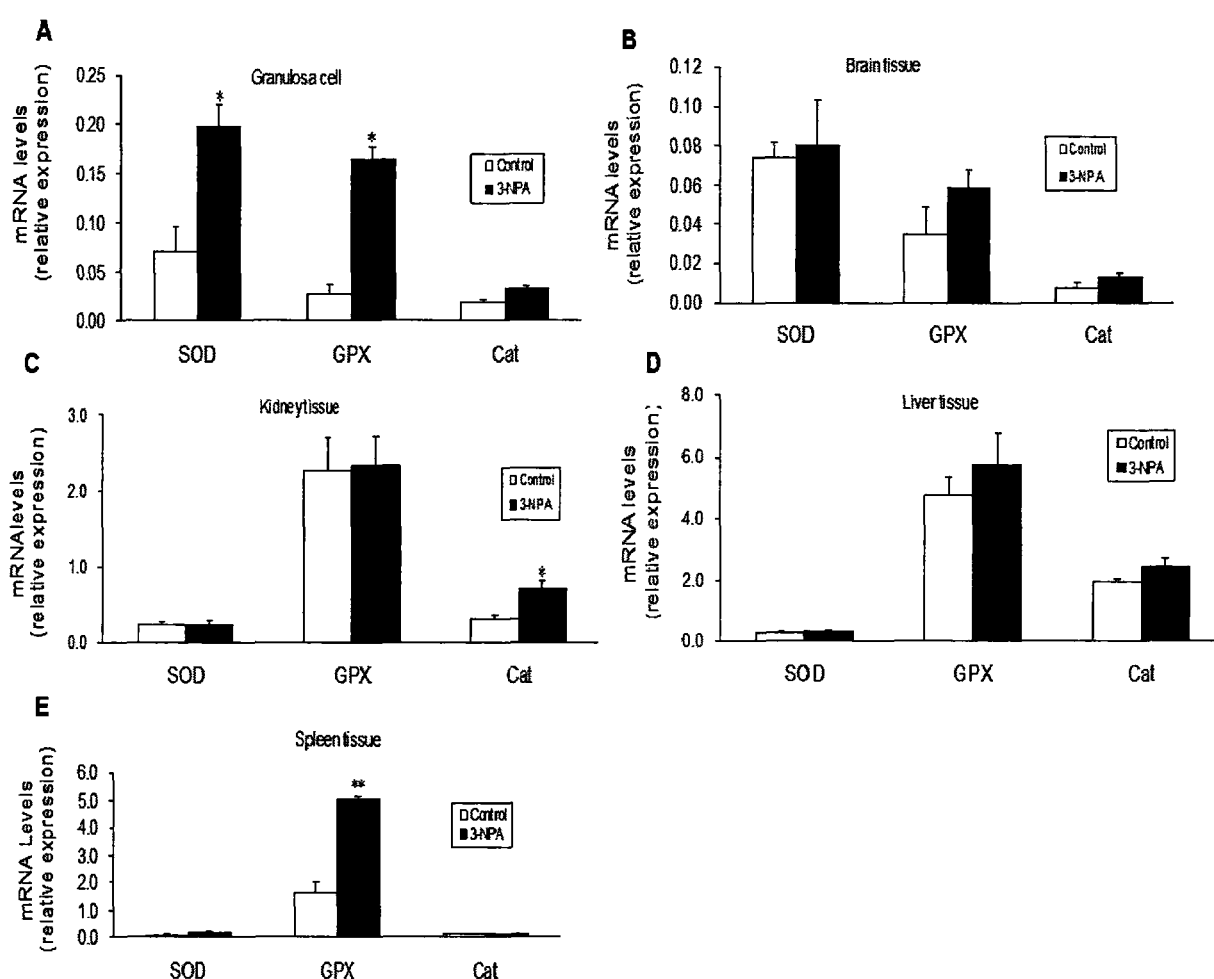


图 1-6 3-NPA 对不同组织中抗氧化物酶 mRNA 水平的表达

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig1-6 Expression of the antioxidant enzymes SOD2, GPX and CAT in different tissues.

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

到目前为止,已报道的氧化应激模型有很多,但卵巢特异性氧化应激模型的报道相对较少。有研究表明,体内注射甲氧滴滴涕能够抑制小鼠卵泡生长,引起卵泡闭锁,但甲氧滴滴涕作为一种有机氯杀虫剂,能够对肝脏、肾脏和心脏细胞产生毒害作用^[81]。小鼠长期服用重金属铅也能够引起卵巢氧化应激,但是长期应用的同时它也会导致全身性的氧化损伤^[82]。还有研究表明,长期性的吸烟可以引起卵泡内 ROS 升高且能降低卵泡数量,但长期吸烟能够引起肺部疾病^[83]。4-乙烯基环己烯(VCH),已被报道能够针对小鼠卵巢产生毒害作用,但它并不是通过氧化应激途径引起卵泡丢失的^[84]。

我们的研究表明,氧化剂 3-NPA 不仅能特异地提高卵母细胞和颗粒细胞中 ROS 的水平,引起颗粒细胞凋亡与卵泡闭锁,还能导致颗粒细胞及卵巢组织中抗氧化酶活性代偿性地升高。我们的结果表明,使用氧化剂 3-NPA 成功建立了一个小鼠卵巢氧化应激模型,该模型具有类似于正常氧化应激情况下引起的人类卵巢损伤病变^[85, 86]。

研究表明,不同品系的小鼠对 3-NPA 的耐受性有所不同,如 129SVEMS 和 FVB/n 小鼠对 3-NPA 具有较高的敏感性比 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠^[87]。具有亨廷顿病突变的小鼠与同窝的野生型小鼠相比需要更多剂量的 3-NPA。在对其它药物的耐受性方面,如喹啉酸和红藻氨酸, FVB/N 和 129/SvEMS 小鼠比 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠具有更高的敏感性^[88]。许多研究表明,高剂量的 3-NPA 可以诱导纹状体损伤,如在 Swiss Webster 成年小鼠, 3-NPA (120 mg/kg) 腹腔内注射 3 天,能够引起纹状体损伤,降低 SDH 活性^[89];在以 CD-1 为遗传背景的小鼠, 3-NPA (100 mg/kg) 腹腔内注射 4-5d,可以导致纹状体的损伤^[90]; CD1 小鼠, 3-NPA (60 mg/kg) 腹腔内注射 4d 时,就能够发现早期的纹状体损伤^[37]。也有研究表明, BALB/c ByJ 小鼠体内隔天注射高剂量的 3-NPA (500 mg/kg) 结果发现并没有引起纹状体损伤。很明显我们的研究具有重要的意义,因为我们的结果显示,低剂量的 3-NPA 能够对卵巢产生影响,能引起卵巢氧化应激。最后我们选取了 3-NPA (12.5 mg/kg/2 次/d),因为这个剂量足以能够引起卵巢氧化应激并且能够降低对其它组织的毒性作用。

在正常发育的卵泡内,卵泡内 ROS 的水平与抗氧化体系之间终保持着微妙的动态平衡,一旦这种动态平衡被体内外环境中各种因素破坏,氧化应激将会随之而产生。研究表明,氧化应激可以诱导颗粒细胞,卵母细胞和胚胎的发生凋亡^[12, 91]。体内外各种因素都可诱导细胞的凋亡,其中最重要的因素之一,即氧化应激^[92]。大量研究已证实,颗粒细胞的凋亡可以引起卵泡闭锁,降低卵母细胞数量和损害卵母细胞质量等^[30, 93, 94]。此外,正常生理条件下,非优势卵泡的退化也主要依靠由颗粒细胞所发动的闭锁过程^[95, 96]。许多动物研究试验表明,氧化应激可以改变原始卵泡,次级卵泡和有

腔卵泡的数量,如妊娠期间母体营养不良可以降低后代卵泡数量和提高卵巢内氧化应激水平^[17];在重复超数排卵过程中,氧化应激可降低卵母细胞和卵泡数量^[18]。此外,接触环境中的氧化应激产物,如离子辐射,重金属,工业和汽车废气等,这些都能够使体内产生氧化应激从而降低卵泡数量^[97-99]。我们研究同样表明,氧化剂 3-NPA 能够对卵巢产生氧化应激,引起大卵泡闭锁和降低大卵泡数量。

只有优质的卵母细胞才能产生优质胚胎,卵母细胞的质量在早期胚胎发育的过程中起着非常重要的作用。研究表明,卵母细胞和胚胎中产生过量的 ROS,不仅会导致氧化应激的产生,而且还会降低卵子质量,影响早期胚胎发育^[11, 12];在壁颗粒细胞和卵丘颗粒细胞中产生过量的 ROS 也会降低受精率和胚胎质量^[100]。此外,研究还表明 ROS 还参与了早期胚胎发育阻滞,如小鼠 2-细胞胚胎发育阻滞,这种现象与 ROS 的升高密切相关^[34]。在本研究中,我们也发现以 3-NPA(12.5 mg/kg)处理的小鼠显著提高了颗粒细胞和卵母细胞中的 ROS 水平。

卵泡内各种抗氧化成份,如各种成份,包括卵丘细胞、壁颗粒细胞和卵泡液等,均可在氧化应激过程中对卵母细胞起到一定程度的保护作用^[14, 101]。众所周知,内源性抗氧化酶如 GPX、SOD、CAT 以及非酶类抗氧化物质等都能够对抗 ROS 的作用,对卵母细胞和卵泡起到保护作用^[102, 103]。此外,外源性抗氧化物质如 VE、VC、褪黑素等都能够抑制或祛除过量的 ROS,提高胚胎的体外发育能力^[104-106]。在本试验中,我们也研究了 3-NPA 对卵巢内抗氧化物酶活性的变化情况。本研究结果显示,3-NPA 提高了抗氧化物酶的活性,这种提高很可能是卵巢动员内部的抗氧化机制以对抗 3-NPA 产生的氧化损害,从而对卵泡发育起到了保护作用。到目前为止,虽然还没有研究报道 3-NPA 对卵巢内部抗氧化物酶活性变化的情况,但在其它组织中研究已经表明,大鼠腹腔内注射 3-NPA (20 mg/kg) 连续 4 d,能够提高纹状体内的 SOD 活性;3-NPA (80 mg/kg) 的注射同样可提高大鼠肝脏中 SOD 和 GPX 的活性^[107, 108]。

综上所述,利用氧化剂 3-NPA 已初步成功地建立了一个卵巢氧化应激模型,此模型对于研究卵巢氧化应激机制和开发新型卵巢抗氧化剂具有重大意义。

第二章 氧化应激对卵泡和胚胎发育能力的影响

在正常情况下, 卵泡内会产生一定量的 ROS, 这在卵泡发育、破裂排卵过程中起到了非常重要的生理作用, 也是健康卵巢颗粒细胞正常代谢活性的标志。卵泡内 ROS 过度升高, 如感染、急性炎症、化疗、辐射、超数排卵等, 将会导致氧化应激的产生, 损害卵泡中卵母细胞和颗粒细胞中的生物大分子, 可能导致卵泡发育障碍。胚胎发育的全过程都是在非常旺盛的有氧代谢中进行的, 大量地消耗着氧气及其它营养物质。周围环境中 ROS 的水平和抗氧化物质之间的动态平衡对于卵子成熟、受精和胚胎发育具有重要的生理作用, 但是过量的 ROS 对卵泡成熟、排卵、受精和早期胚胎发育将会产生有害的影响, 可导致卵子减数分裂和胚胎发育阻止, 进而引起凋亡或坏死。卵巢氧化应激不仅影响着卵子的生成、卵泡的发育、卵子的成熟、卵泡的闭锁和排卵等, 还能降低卵母细胞和胚胎的质量以及影响早期胚胎的发育能力, 这些都会使受精率、胚胎质量、妊娠率显著降低。本研究应用 3-NPA 建立的小鼠卵巢氧化应激模型, 研究了氧化应激对小鼠卵泡发育能力, 卵泡凋亡, 卵泡闭锁以及卵母细胞早期胚胎发育能力的影响, 通过观察小鼠各级卵泡计数情况、超数排卵、卵裂率、囊胚细胞计数等指标来检测氧化应激对卵泡发育及胚胎发育能力的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

3-NPA、体外受精与胚胎培养等相关试剂: 购自 Sigma 公司

三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇、载玻片、石蜡、二甲苯: 购自南京农业大学试剂部
孕马血清促性腺激素(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(hCG): 宁波三生药业有限公司
反转录试剂盒、SYBR Premix Taq™ 荧光定量酶: TaKaRa

Trizol: Invitrogen

TUNEL 荧光试剂盒: Roche

1.2 仪器设备

恒温水浴锅: 北京医疗设备厂

电子天平: Sartorius BP210S

体式显微镜: XTL-2400

超低温冰箱: Thermo

CO₂ 培养箱: Shell/JB

虚拟切片扫描仪: Zeiss

高压消毒锅: 上海申安医疗器械厂

石蜡切片机: Thermo

石蜡包埋机: Thermo

激光共聚焦显微镜: Zeiss

电泳凝胶成像系统: Bio-Rad

电子天平: Sartorius BP210S

组织匀浆机: PRO200, 上海季诺科贸有限公司

1.3 试验动物

4~5周龄清洁级ICR雌性小鼠40只, 平均体重为18~22 g, 购自南京市青龙山实验动物中心。小鼠分笼以后分别饲养在人工控温室(20~23℃)和人工光照(14 h光照, 10 h黑暗)条件下, 标准颗粒饲料饲喂, 自由饮水和采食。母鼠先进行7d的标准化饲养, 以调节生理周期, 使其适应环境供实验使用。小鼠随机共分为4组: I. 对照组, 腹腔注射0.1mL的生理盐水; II. 3-NPA低剂量(6.25 mg/kg); III. 3-NPA中剂量组(12.5 mg/kg); IV. 3-NPA高剂量组(25 mg/kg), 分别腹腔内注射0.1mL. 3-NPA(购自Sigma)配制: 按每只小鼠配制相应浓度的溶液, 用生理盐水配制, 然后用5N NaOH 调整pH值至7.4。对照组和试验组分别每日腹腔内注射2次(上午8:00, 晚上20:00), 连续注射7d。

1.4 石蜡切片

1.4.1 取材及固定

在最后一次3-NPA腹腔内注射12 h后, 小鼠被颈部脱臼处死, 开腹后用镊子和剪刀小心地将卵巢周围脂肪去掉, 注意不要将卵巢撕破以影响后续的试验。将小鼠卵巢放入多聚甲醛溶液中固定12-24 h, 卵巢固定时, 多聚甲醛溶液一般为卵巢体积的10-15倍。

1.4.2 脱水

70%酒精	1h
85%酒精	1h
95%酒精	1h

- 100%酒精 (1) 30 min
- 100%酒精 (2) 1 h
- 100%酒精 (3) 30 min

注意：同浓度酒精应该准备两份以备脱水不完全

- 1 脱水在有盖子的瓶内进行
- 2 组织在更换高一级酒精时，可先用吸水纸吸干以免带入水分
- 3 纯酒精有水分可加入无水硫酸铜去除水分

1.4.3 透明

- 1/2 纯酒精 + 1/2 二甲苯混合液 30 min
- 二甲苯 (1) 30 min
- 二甲苯 (2) 40 min

1.4.4 透蜡

- 使用石蜡熔点为 70 °C，温箱温度调到 64 °C
- 1/2 二甲苯 + 1/2 石蜡混合液 30 min
- 纯 蜡 (1) 1 h
- 纯 蜡 (2) 1 h

1.4.4 包埋

用 L 型金属框包埋，方法：待石蜡稍微凝固时，用温镊子将卵巢组织夹取放入金属框的中央，待石蜡冷却变硬后即可取出蜡块。

1.4.5 修切蜡块

将卵巢组织蜡块修切成正方形，将卵巢组织以外的多余蜡块修去，但注意勿太靠近组织，修好以后蜡块上下两边要成平行的直线，这样可以避免切下的蜡条弯曲。

1.4.6 切片

将片刀安装在切片机上，将预定使用的刀口部位移至蜡块下方，刀的倾斜角度为 5 度左右。石蜡连续切片的厚度一般为 6 μm。

1.4.7 烤片

在 38 °C 水浴锅中展片，待切片完全浸水后用载玻片捞起，可用卫生纸将切片周围的水分吸干，放在 38 °C 电热板上烤 6-12 h，然后储藏于切片盒内。

1.5 石蜡切片 HE 染色

1.5.1 脱蜡

- (1) 二甲苯中脱蜡 5-10 min, 两次。
- (2) 梯度酒精下行入水: 无水乙醇、70 %乙醇、30 %乙醇各 2 min, 入蒸馏水 2 min。

1.5.2 染色封片

本试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 以下操作均按说明书进行。

- (1) 浸入试剂一核染液染缸内染色 5-8 min, 水洗 30-60 s
- (2) 浸入试剂二分化液 I 中约 6-8 s, 水洗约 30-60 s
- (3) 浸入试剂二分化液 II 中约 30 s, 水洗约 30-60 s
- (4) 置入试剂四浆染液中 2-5 min, 立即用试剂五增色液洗去多余染液, 一般蘸两次 2 s 左右即可。(千万不可用水冲洗)
- (5) 待玻璃片自然晾干后, 透明剂缸内蘸两下, 即可进行封片镜检。

石蜡切片使用 dot Slide-digital 虚拟显微镜进行扫描观察, 每 5 个切片进行扫描一次, 分别记录大、中、小卵泡数量, 为了阻止同一卵泡重复计数, 只有带核的卵母细胞被计数。小鼠卵泡分类方法和闭锁卵泡鉴定参照已发表的方法^[109-111], 小卵泡 (Pedersen and Peters Types 1-3b), 中卵泡 (Pedersen and Peters Types 4-5b), 大卵泡 (Pedersen and Peters Types 6-8)。

1.6 石蜡切片 TUNEL 染色

- (1) 石蜡切片在二甲苯中脱蜡3次, 每次5 min
- (2) 100 %乙醇 → 95%乙醇 → 85%乙醇 → 70%乙醇 → 蒸馏水 水洗, 每步操作各需5 min
- (3) 使用无DNA酶的蛋白酶K处理10min (蛋白酶 K:Tris =1:99, 最终浓度为300 μg左右)
- (4) PBS漂洗3次, 每次10 min
- (5) 通透: TritonX-100, 在冰上 (2-8℃) 促渗10 min
- (6) PBS漂洗3次, 每次10 min
- (7) 滴加25μL TUNEL反应混合物 (酶: Label =1: 9)
- (8) PBS漂洗3次, 每次10 min

- (9) 滴加DAPI (10 $\mu\text{g/mL}$) 5 μL , 保持5 min
- (10) PBS漂洗1次, 5 min
- (11) 滴加抗荧光淬灭剂5 μL , 湿盒内保存
- (12) 激光共聚焦显微镜观察

1.7 体外受精及胚胎培养

1.7.1 IVF 液滴和精子获能液滴的准备

卵母细胞IVF试验按照3只小鼠/皿计算做滴, 每滴30-40 μL , 培养液为含10 mg/mL BSA的HTF, 将做好的液滴覆盖上石蜡油在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内平衡过夜。

1.7.2 精子获能

颈椎脱臼处死小鼠, 从腹内取出睾丸, 一手用镊子夹住附睾, 另一手用1mL针头刺穿附睾, 待精子从针孔中流出后, 用灭菌宽径100 μL 枪头吸取5-10 μL 精子至平衡好的受精滴中, 精子密度约为 $1-5 \times 10^6$, 放在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育10 min, 取出置于体视镜下观察, 待精子扩散后, 继续放入培养箱孵育30 min后方可用。

1.7.3 MII 期卵母细胞的获取

在3-NPA (12.5 mg/kg) 腹腔内注射第5天时, 10 IU/只PMSG, 腹腔内注射, 48h后10 IU/只hCG, 腹腔内注射。在hCG注射后15-16 h后, 颈椎脱臼处死小鼠, 酒精棉球消毒后, 用剪刀和镊子开腹取出输卵管放入IVF液滴的矿物油中, 然后在体视显微镜下, 使用两个1mL注射器用针头将输卵管壶腹部裂开, 使卵丘卵母细胞复合体(COC)释放出来, 最后将COC放置到受精液滴中。

1.7.4 体外受精

使用高压灭菌过的宽口径枪头, 吸取10-15 μL 获能后的精子放入受精滴中, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中进行体外受精。放入的精子密度以 $1-5 \times 10^6$ 为最佳(以放入培养箱后10 min能够观察到COC被精子打散, 精子能够推动着COC运动为宜)。体外受精的整个过程最好在5 min以内完成。在体外受精2 h以后, 清洗掉受精卵周围多余的精子, 继续放入受精滴中培养4 h, 然后再体视显微镜下观察雌雄原核形成情况, 以形成雌雄原核和第二极体排除作为受精标志, 同时记录受精率。

1.7.5 体外培养

前一天晚上做好KSOM培养滴, 然后覆盖上石蜡油置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中

平衡过夜。在体外受精6 h的时候,将受精卵移入已平衡好的培养滴中清洗几次,然后30-50枚/滴移入到新的培养滴中进行体外培养,分别在受精后24h、96h统计卵裂率和囊胚率。体外培养期间胚胎不需换液,尽可能地减少体外观察,以保证培养效果。

1.8 颗粒细胞 RNA 的提取及定量 PCR

1.8.1 颗粒细胞总 RNA 的提取 (Trizol 法)

1. 大约 10^5 个细胞,加入1mL Trizol试剂,然后反复吹打几次混匀转入2mL 离心管中,室温静置5 min。
2. 加入 200 μ L的氯仿 (Trizol量的1/5), 然后将EP管盖子盖好,用振荡器震荡约10-20s至液体呈乳白色,然后室温静置5-10min。
3. 在4℃, 12000 rpm, 离心15 min (离心后水相大约占总体积的60%), 然后吸取上清液约200-300 μ L至另一新的EP管中。
4. 用1000 μ L 的枪头加入500 μ L预冷的异丙醇 (Trizol的1/2), 室温静置10 min; 4℃, 12000 rpm, 离心10 min, 然后弃上清。
5. 用75%乙醇1mL进行洗涤 ($\geq$ Trizol的量), 4℃, 10000 rpm, 离心10 min, 然后倒掉乙醇。
6. 重复上述第5步操作
7. 将洗涤后的EP放入超净工作台,启动风扇进行吹干 (注意不要太干), 然后根据RNA团块大小确定加入的DEPC水量。

1.8.2 颗粒细胞 RNA 浓度的测定

总 RNA 的检测: 用 10 μ L 的枪头吸取溶解于 DEPC 水的总 RNA 5 μ L 进行电泳检测, 在 1.5 %琼脂糖凝胶电泳中检测 RNA 的完整性 (如条带清晰, 无拖尾现象并且 RNA 的 28S 与 18S 条带灰度比值约为 2.0); 用紫外分光光度计测定其浓度和纯度 (RNA 在 OD260 和 OD280 之间的比值应该在 1.8~2.0 之间), 然后将剩余的 RNA 加入 1/10 乙酸钠和 1 μ L 无水乙醇进行重新沉淀, 然后放入-70℃保存备用。

1.8.3 RNA 的反转录

依次往 PCR 管中加入以下反应试剂:

- ① mRNA 模板: 5-8 μ L
- ② Oligo dT: 1 μ L
- ③ 0.1% DEPC 水: 补充至 10 μ L

然后放入 PCR 仪内, 90℃, 5 min; 完后立刻放入冰块中或-20℃冰箱冷却 10 min。再依次往 PCR 管中依次加入以下试剂:

- ① M-MLV buffer (5×): 5μL
- ② dNTP (10 mM each): 2.5μL
- ③ RNase inhibitor (40U/μL): 0.6μL
- ④ M-MLV (200U/μL): 1μL
- ⑤ 0.1% DEPC 水: 补充至总体积 25μL

轻微离心混匀后, 放置于 PCR 仪中 42℃, 1 h; 95℃, 5 min, 反应完后将所获得的 cDNA 产物放入于-20℃保存。

1.8.4 定量 PCR

定量 PCR 程序参照 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) 试剂盒说明进行, 本实验以 GAPDH 基因作为内参基因, 应用标准曲线方法对基因表达进行相对定量, 反应体系及引物设计如下:

SYBR® Premix Ex Taq™ (2×)	10 μL
上游引物 (10μM)	4 μL
下游引物 (10μM)	0.4 μL
灭菌的超纯水	6.8 μL
cDNA 模板	2 μL
总反应体积	20 μL

以上所有操作均在冰盒上进行。

将以上反应体系内的混合物轻微离心混匀后, 立刻置于荧光定量 PCR 仪上。反应程序: 95℃预变性 10 min, 40 循环(95℃15s, X℃退火温度 15s, 72℃延伸 1min); 在 80℃读板, 测定荧光密度值; 溶解曲线绘制: 65~95℃, 每隔 0.2℃读板一次。每个试验样本重复三次, 根据 DNA Engine Opticon 输出的试验结果, 以 GAPDH 作为内参标准, 应用标准曲线的方法计算目标基因相对于内参基因 GAPDH 的表达量。

表 2-1 实时荧光定量 PCR 反应引物序列和反应条件
Table 2-1 the Primer sequences for real-time RT-PCR

Gene	Accession Number	Primer sequences (5'-3')	Product size (bp)	Annealing Temperature (°C)
GAPDH	M32599	F:ACCACAGTCCATGCCATCAC R:TCCACCACCCTGTTGCTGTA	452	56
Bax	NM_007527.3	F:CCAGGATGCGTCCACCAAGA R:GGTGAGGACTCCAGCCACAA	394	57
Bcl-2	NM_009741.3	F:GTGGATGACTGAGTACCTGAACC R:AGCCAGGAGAAATCAAACAGAG	120	60
Caspase-3	NM_009810.2	F:ACAGCACCTGGTTACTATTC R: CAGTTCCTTTCGTGAGCAT	207	56
FasL	NM_001205243.1	F GGGTCTACTTACTACCTCAC R CCCTCTTACTTCTCCGTTA	192	57
BIM	NM_207681.2	F TATGGAGAAGGCATTGAC R TGTGGTGATGAACAGAGG	207	56

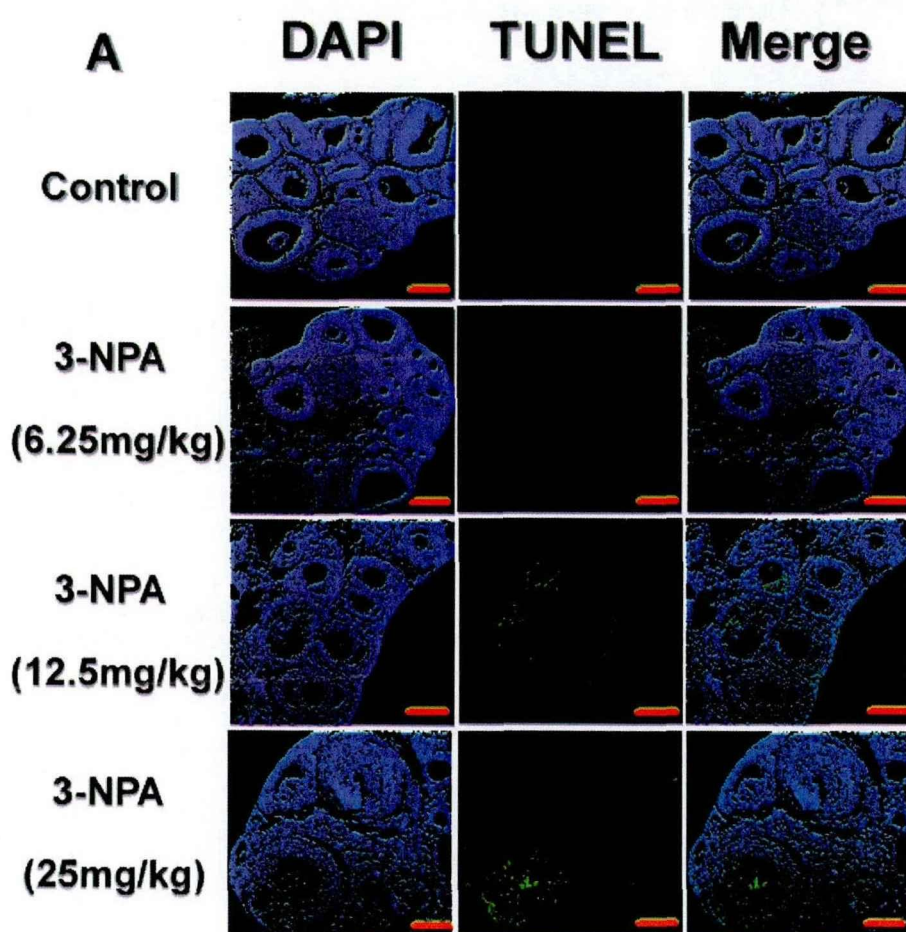
1.9 统计学分析

本研究中所有数据均以（平均值±标准误）表示，所获数据应用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差或卡方分析，组间差异性采用 LSD 法检验。判断标准以 $P<0.05$ ， $P<0.01$ 为有统计学意义，所有实验至少重复三次以上。

2 结果与分析

2.1 氧化应激对颗粒细胞凋亡及凋亡卵泡数量的影响

为了了解氧化应激对有腔卵泡中颗粒细胞凋亡变化的影响，我们将小鼠注射 3-NPA (6.25, 12.5 和 25 mg/kg) 连续处理 7d，然后对小鼠卵巢进制作石蜡切片，采用 TUNEL 染色方法观察了颗粒细胞凋亡的情况和凋亡卵泡数量的变化(图 2-1A 和图 2-1B)。与对照组和低浓度 3-NPA (6.25 mg/kg) 组相比较，卵巢氧化应激组 3-NPA(12.5 和 25 mg/kg)显著提高了颗粒细胞凋亡的数量及凋亡卵泡的比例 ($P<0.05$)，说明氧化应激对引起了颗粒细胞的凋亡，并且提高了凋亡卵泡的比例 ($P<0.05$)。



B

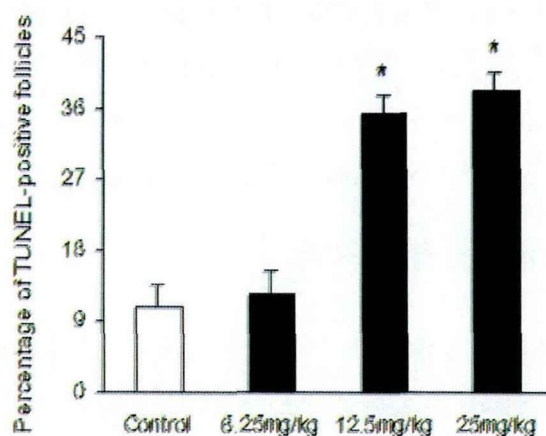


图 2-1 氧化应激对颗粒细胞凋亡及凋亡卵泡数量的影响。

注：与对照组比较，* $P < 0.05$

Fig 2-1 Effect of oxidative stress on granulosa cell apoptosis

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$

2.2 氧化应激对颗粒细胞凋亡基因表达变化的影响

为了了解氧化应激对有腔卵泡中颗粒细胞凋亡基因表达变化的影响,我们将小鼠注射 3-NPA (12.5 mg/kg) 连续处理 7d, 然后收集小鼠有腔卵泡中的颗粒细胞进行 RAN 的提取, 通过定量 PCR 方法分析了促凋亡基因 BAX 和抗凋亡基因 BCL-2 的表达变化 (图 2-2) 与生理盐水对照组相比较, 卵巢氧化应激组 3-NPA(12.5 mg/kg)颗粒细胞抗凋亡基因与促凋亡基因表达的比值显著低于对照组 ($P<0.05$), 说明氧化应激对引起了颗粒细胞的促凋亡基因的表达, 进而降低了 BCL-2 与 BAX 的比值。

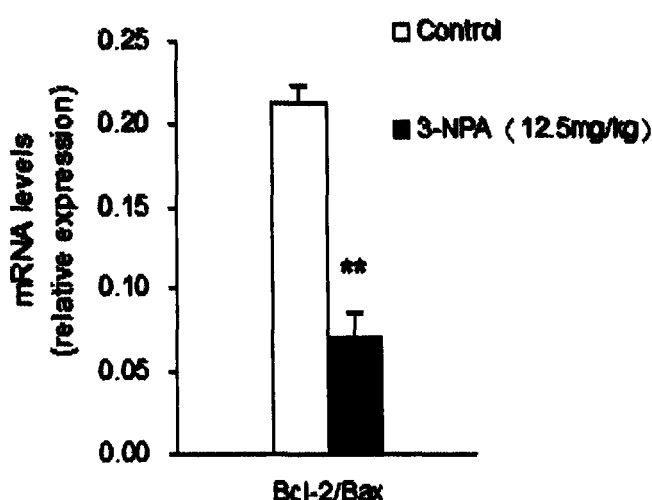


图 2-2 氧化应激对颗粒细胞中凋亡基因表达水平的影响

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

Fig 2-2 Effect of oxidative stress on the expression of apoptosis-related genes in granulosa

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$

2.3 氧化应激对卵泡发育的影响

为了了解氧化应激对不同类型卵泡发育能力的影响,我们将小鼠注射 3-NPA (6.25, 12.5 和 25 mg/kg) 连续处理 7d, 然后对小鼠卵巢制作石蜡切片, 采用 HE 染色方法观察了大卵泡 ($\geq 250\mu\text{m}$), 中卵泡 ($150-250\mu\text{m}$) 和小卵泡 ($50-150\mu\text{m}$) 数量及形态学的变化情况 (图 2-3, A-C) 和 (图 2-4, A1-C1)。与对照组和低浓度 3-NPA (6.25 mg/kg) 组相比较, 卵巢氧化应激组 3-NPA (12.5 和 25 mg/kg) 大卵泡的数量明显减少 ($P < 0.05$), 这说明氧化应激对大卵泡的发育产生了有害影响 ($P < 0.05$)。中卵泡和

小卵泡数量在各组之间差异不显著,说明氧化应激对中小卵泡的发育没有显著影响。

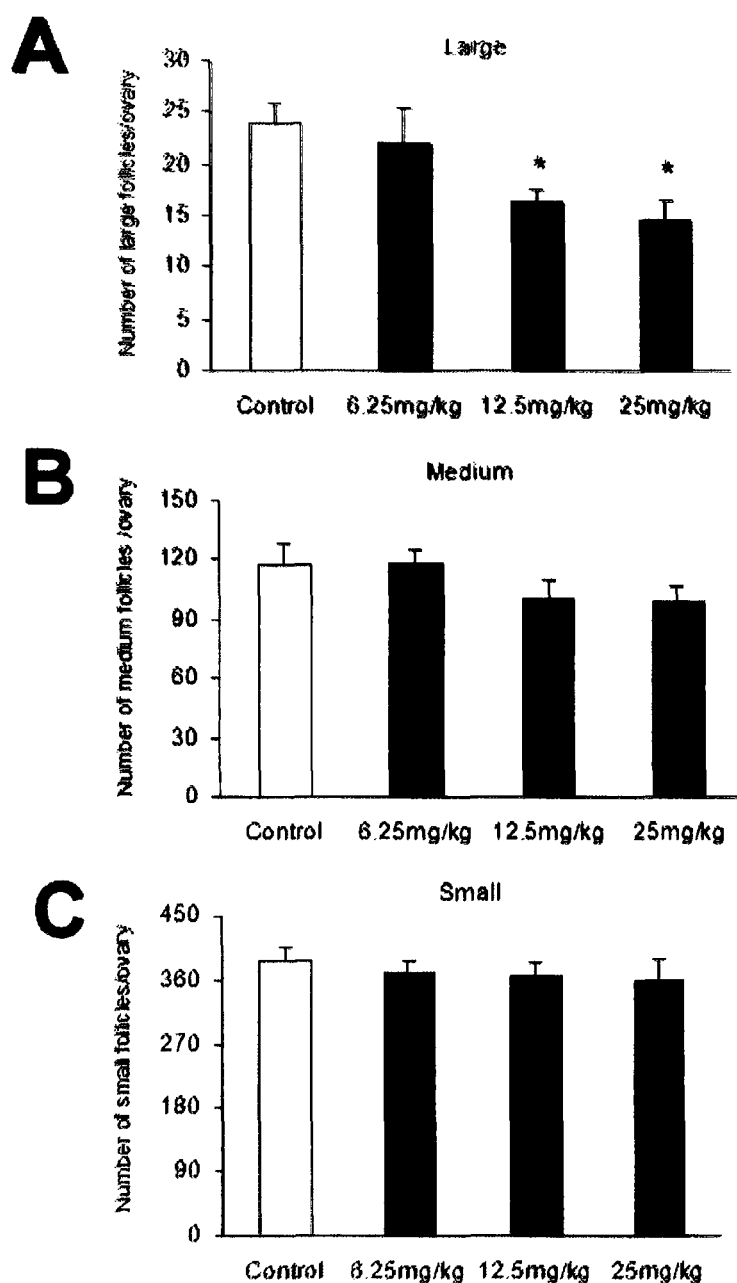


图 2-3 氧化应激对不同类卵泡数量的影响。

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, 卵泡直径: 大卵泡 $\geq 250 \mu\text{m}$; 中卵泡 (150–250) μm ; 小卵泡 (50–150) μm

Fig 2-3 Effect of oxidative stress on follicle numbers

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; Diameter of follicles: large, $\geq 250 \mu\text{m}$; medium, (150–250) μm ; small, (50–150) μm .

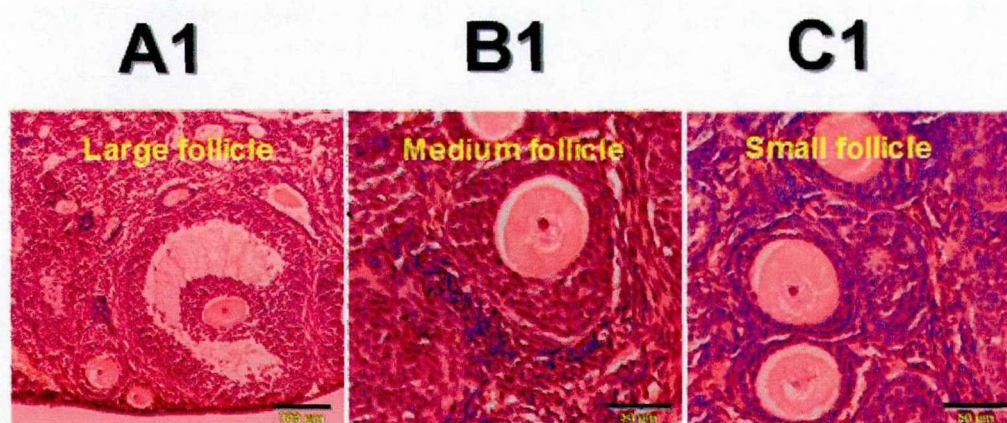


图 2-4 卵巢切片的 HE 染色及组织形态学观察.

卵泡直径: 大卵泡 $\geq 250 \mu\text{m}$; 中卵泡 (150-250) μm ; 小卵泡 (50-150) μm

Fig 4-4 Histological analysis of the ovary and Hematoxylin and eosin staining was performed on paraffin sections of mouse ovary.

Diameter of follicles: large, $\geq 250 \mu\text{m}$; medium, (150-250) μm ; small, (50-150) μm .

2.4 氧化应激对卵泡闭锁的影响

为了了解氧化应激对不同类型卵泡闭锁情况的影响, 我们将小鼠注射 3-NPA (6.25, 12.5 和 25 mg/kg) 连续处理 7 d, 然后对小鼠卵巢制作石蜡切片, 采用 HE 染色方法观察了大卵泡 ($\geq 250 \mu\text{m}$), 中卵泡 (150-250 μm) 和小卵泡 (50-150 μm) 闭锁数量的变化情况 (图 2-5 A-C) 和 (图 2-6)。与对照组和低浓度 3-NPA (6.25 mg/kg) 组相比较, 卵巢氧化应激组 3-NPA (12.5 和 25 mg/kg) 大卵泡闭锁比例明显增多 ($P < 0.05$), 这说明氧化应激引起了大卵泡的闭锁比例的提高 ($P < 0.05$)。中卵泡和小卵泡闭锁比例在各组之间差异不显著, 说明氧化应激主要影响了大卵泡的闭锁, 而对中小卵泡的闭锁没有产生显著影响。

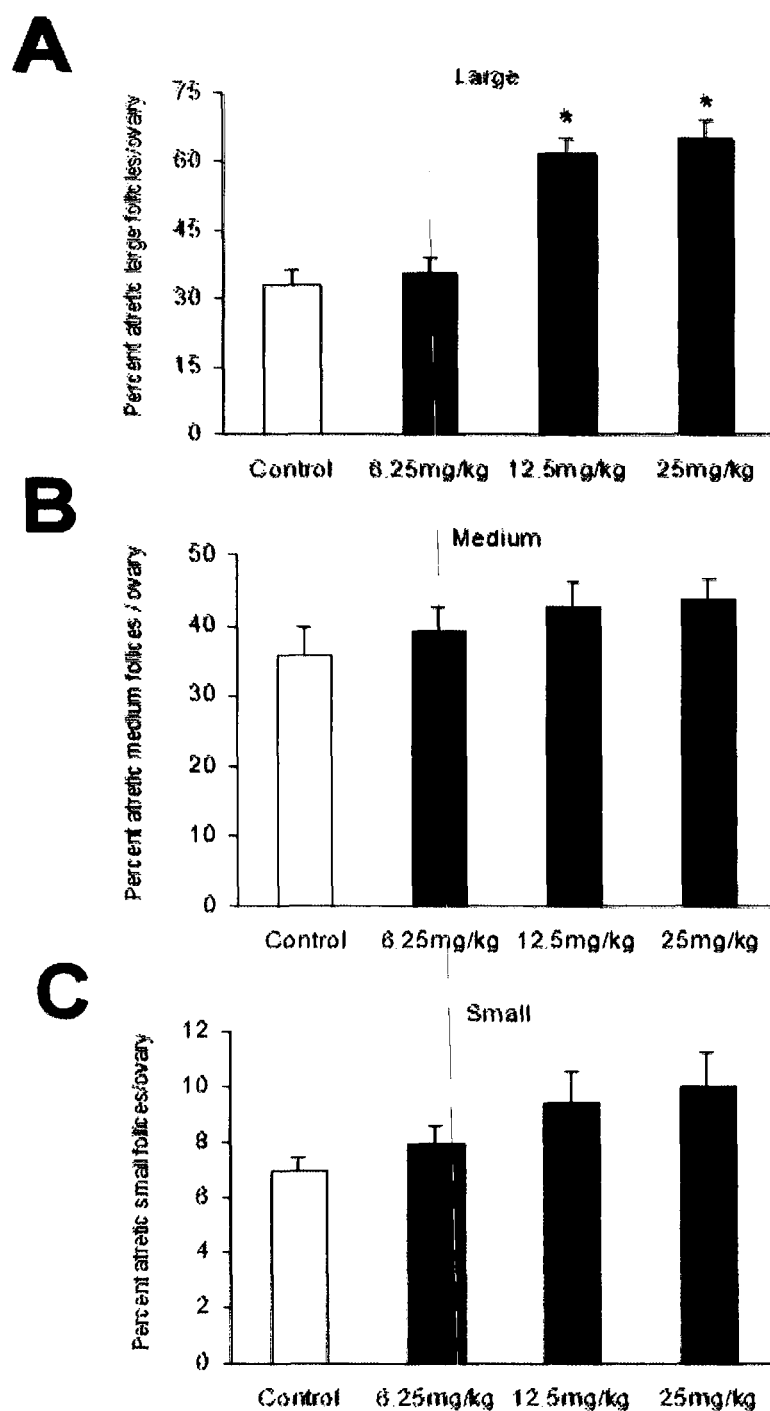


图 2-5 氧化应激对不同类型闭锁卵泡数量影响。

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；卵泡直径：大卵泡 $\geq 250 \mu\text{m}$ ；中卵泡（150-250） μm ；小卵泡（50-150） μm

Fig 2-5 Effect of oxidative stress on atretic follicle numbers

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; Diameter of follicles: large, $\geq 250 \mu\text{m}$; medium, (150-250) μm ; small, (50-150) μm .



图 2-6 闭锁卵泡的组织形态学分析。

注：卵泡直径：大卵泡 $\geq 250\text{ }\mu\text{m}$ ；中卵泡（150-250） μm ；小卵泡（50-150） μm 。

Fig 4-6 The morphological analysis of atretic follicles.

Diameter of follicles: large, $\geq 250\text{ }\mu\text{m}$; medium, (150-250) μm ; small, (50-150) μm .

2.5 氧化应激对排卵数及早期胚胎发育能力的影响

由于连续注射 3-NPA (12.5 mg/kg) 7d 能够引起颗粒细胞凋亡，卵泡闭锁及卵泡发育，我们检测了 3-NPA 对排卵数量和早期胚胎发育能力的影响（表 2-2），同时对囊胚的组织形态学进行了观察（图 2-7）。结果表明，3-NPA 组排卵数量，卵裂率和囊胚细胞数量与对照组相比显著降低（ $P<0.05$ ），说明氧化应激影响了排卵数量，阻滞了 2-细胞和囊胚细胞的发育能力；受精率，囊胚率与对照组相比差异不显著（ $P>0.05$ ）。

表 2-2 3-NPA 对超数排卵数量及胚胎发育的影响(n=5, $\bar{x}\pm s$)

Table 2-2 Effect of 3-NPA on ovulation number and early embryonic development (n=5, $\bar{x}\pm s$)

Group	Ovulation number	Fertilization (%)	Cleavage (%)	Blastocyst (%)	Blastocyst cell number
Control	26 $\pm$ 2.63	124 (95.4)	118 (95.2)	104 (83.9)	55.78 $\pm$ 4.94
3-NPA	14 $\pm$ 1.76*	66 (94.3)	53 (80.3*)	55 (83.3)	46.00 $\pm$ 2.13*

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，, Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$,

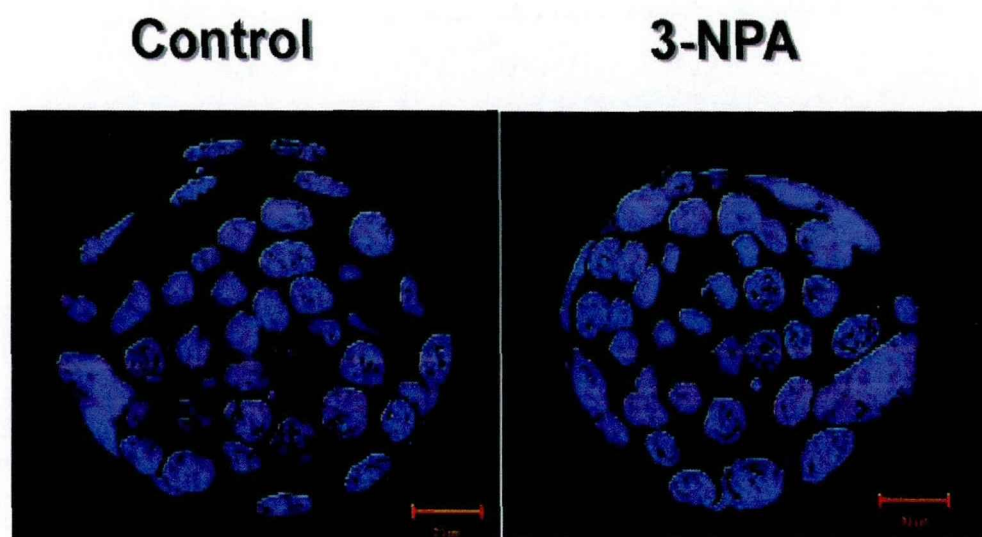


图 2-7 囊胚 DAPI 染色及形态学观察

Fig 2-7 Representative blastocyst photographs of DAPI staining.

3 讨论

氧化应激不仅能够对大卵泡的发育产生有害影响, 损害卵母细胞发育能力, 同时还能提高了闭锁大卵泡和凋亡卵泡的比例。我们的研究结果与许多文献中报道的相一致, 氧化应激不但对卵泡发育造成危害同时还能降低卵母细胞的发育能力。

在正常发育良好的卵泡内, ROS 与卵泡中抗氧化体系之间始终保持着微妙的动态平衡, 一旦这种动态平衡被体内外环境中各种因素破坏, 氧化应激将会随之而产生。研究已证明, 氧化应激可以诱导卵巢颗粒细胞, 卵母细胞和胚胎的发生凋亡^[12, 91]。体内外各种环境因素都可引起细胞的凋亡, 其中最重要的因素之一, 即氧化应激^[92]。大量研究已报道, 颗粒细胞的凋亡可以引发卵泡闭锁, 同时还损害卵泡发育能力, 减少卵母细胞数量和损害卵母细胞质量等^[30, 93, 94]。此外, 正常发育过程中非优势卵泡的闭锁退化也主要依靠由颗粒细胞所发动的闭锁过程^[95, 96]。我们的结果也表明, 在所获卵母细胞数量和颗粒细胞凋亡率之间存在着一个负相关。由此, 我们推论颗粒细胞凋亡能引起卵泡闭锁, 卵泡闭锁降低了卵子的数量。在我们试验中, 我们使用了低剂量的 3-NPA (6.25, 12.5 和 25 mg/kg) 去研究对卵母细胞和卵泡发育的影响。我们的结果表明, 3-NPA (12.5 和 25 mg/kg) 能够损害卵母细胞和卵泡的发育能力, 能引起大卵泡的闭锁。

大量动物研究表明,氧化应激可以改变原始卵泡,次级卵泡和有腔卵泡的数量,如妊娠期间母体营养不良可以降低后代卵泡数量和提高卵巢内氧化应激水平^[17];在重复超数排卵过程中,氧化应激可降低卵母细胞和卵泡数量^[18]。此外,接触环境中的氧化应激产物,如离子辐射,重金属,工业和汽车废气等,这些都能够使体内产生氧化应激从而降低卵泡数量^[97-99]。我们研究同样表明,氧化剂 3-NPA 能够对卵巢产生氧化应激,引起大卵泡闭锁和降低大卵泡数量。

体外试验表明,过氧化氢能够导致小鼠受精卵细胞周期的停滞,引起受精卵凋亡或坏死。胚胎在新陈代谢中会产生一定量的 ROS,尤其是在体外培养时,胚胎自身以及周围培养环境会同时产生过量的 ROS,过度的 ROS 将会诱导氧化应激产生,对胚胎发育造成严重损害。在胚胎不同的发育时期,ROS 的产量也有所不同,ROS 对早期胚胎的影响比较显著,尤其是 2-细胞阶段,过量的 ROS 会导致发育阻滞,这在小鼠和仓鼠胚胎发育中已得到证实,大量的 ROS 可使细胞膜脂质变性,破坏 DNA 结构,引起 2-细胞阻滞,导致受精卵凋亡和发育受阻^[32-34]。Yang et al. 研究发现,胚胎内碎片的增多与胚胎内 ROS 的含量呈现明显的正相关。过度的 ROS 能够损害卵母细胞质量和降低卵子的受精能力,颗粒细胞中过量的 ROS 将会导致氧化应激的发生进而会降低卵子质量、受精率胚胎质量和妊娠率等^[35]

卵泡液中的 ROS 主要来源于卵子和卵子周围的颗粒细胞,颗粒细胞代谢的活性决定着卵泡中 ROS 的含量,卵泡周围环境也能产生一定量的 ROS。当卵泡内的 ROS 处于一定水平时对卵子基因表达、成熟、类固醇合成等起着重要的生理作用。然而,当卵巢内 ROS 产生过多或抗氧化机能降低时,ROS 的积累就会导致卵巢功能衰退,包括 DNA、蛋白质和脂类的氧化损伤,最终导致减数分裂和细胞周期停滞^[35, 112]。

只有优质的卵母细胞才能产生优质胚胎,卵母细胞的质量在早期胚胎发育的过程中起着非常重要的作用。研究表明,卵母细胞和胚胎中产生过量的 ROS,不仅会导致氧化应激的产生,而且还会降低卵子质量,影响早期胚胎发育^[11, 12];在壁颗粒细胞和卵丘颗粒细胞中产生过量的 ROS 也会降低受精率和胚胎质量^[100]。此外,研究还表明 ROS 还参与了早期胚胎发育阻滞,如小鼠 2-细胞胚胎发育阻滞,这种现象与 ROS 的升高密切相关^[34]。在本研究中,我们也发现以 3-NPA(12.5 mg/kg)处理的小鼠显著提高了颗粒细胞和卵母细胞中的 ROS 水平,降低了卵母细胞核胚胎的发育能力。

第三章 小鼠卵巢保护性抗氧化剂的筛选

自由基代谢失衡是多种卵巢相关疾病如卵巢早衰、卵泡闭锁、子宫内膜异位、多囊卵巢综合症等发生发展的病理基础之一^[6, 113, 114]。抗氧化剂清除活性氧自由基的作用是机体保持生理健康的重要防护措施。众所周知,多种维生素和植物提取物中蕴含着丰富的抗氧化活性成分,有很多已广泛用于生物医药和医疗保健。因此,比较和筛选对卵巢氧化应激具有良好抗氧化功能的抗氧化剂,用来预防和减轻卵巢相关疾病的发生和发展具有重要意义。多酚类化合物如原花青素、白藜芦醇、姜黄素等具有良好的抗氧化功能。近年来对其研究主要集中于临床和药理学研究^[4, 115, 116],研究表明它们具有很强的清除活性氧自由基、抑制氧化损伤的功能。维生素族如 VA、VC、VE 等已广泛应用于生物医药领域,研究表明它们具有多方面的生物学功能,如提高机体免疫力和降低疾病发生^[117-119],清除自由基抗氧化功能更是其重要功能之一^[120]。本次研究的主要目的是以 3-NPA 诱导的小鼠卵巢氧化应激为模型,比较 10 种不同抗氧化剂对卵巢氧化应激的保护作用,为深入研究抗卵巢氧化损伤机制以及研发新型抗氧化应激药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

3-NPA: 购自 Sigma 公司

维生素 C、E、胡萝卜素、谷胱甘肽、没食子酸、姜黄素、原花青素 白藜芦醇: 购自南京泽朗医药科技集团有限公司。

L-半胱氨酸: 上海国药集团化学试剂有限公司

辅酶 Q: 华北制药集团制剂有限公司

细胞超氧化物阴离子比色法定量检测试剂盒、活体组织氧化应激活性氧(ROS)初级荧光测定试剂盒、组织超氧化物阴离子比色法定量检测试剂盒、细胞内氧化应激活性氧(ROS)红色荧光试剂盒: 上海杰美基因医药科技有限公司

超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、过氧化氢酶测试盒、谷胱甘肽—S 转移酶测试盒: 南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器设备

实时荧光定量 PCR 仪: ABI7300, 美国 ABI 公司

UV-754 紫外分光光度计: 上海医用仪器厂

恒温水浴锅: 北京医疗设备厂

电子天平: Sartorius BP210S

体式显微镜: XTL-2400

超低温冰箱: Thermo

高速冷冻离心机: 德国 Eppendorf, 5810R 型

CO₂ 培养箱: Shell/JB

高压消毒锅: 上海申安医疗器械厂

电子天平: Sartorius BP210S

组织匀浆机: PRO200, 上海季诺科贸有限公司

1.3 试验动物

4~5周龄清洁级ICR雌性小鼠120只, 平均体重为18~22 g, 购自南京市青龙山实验动物中心。小鼠分笼以后分别饲养在人工控温室(20~23 °C)和人工光照(14h光照, 10h黑暗)条件下, 标准颗粒饲料饲喂, 自由饮水和采食。母鼠先进行7天的标准化饲养, 以调节生理周期, 使其适应环境供实验使用。小鼠随机分为12组分别为: 对照组、模型组、维生素C组(300 mg/kg)、维生素E组(100 mg/kg)、胡萝卜素组(30 mg/kg)、谷胱甘肽组(300 mg/kg)、没食子酸组(100 mg/kg)、姜黄素组(200 mg/kg)、原花青素组(200 mg/kg)、白藜芦醇组(30 mg/kg)、L-半胱氨酸组(100 mg/kg)、辅酶Q组(50 mg/kg)。对照组和模型组给予同体积的生理盐水, 灌胃给药, 连续14d, 其余各组给予同等体积的抗氧化剂, 灌胃给药, 连续14d; 第7d后除空白对照组外, 其余各组均以同一剂量3-NP(12.5 mg/kg)腹腔内注射。3-NPA(购自Sigma)配制: 按每只小鼠配制相应浓度的溶液, 用生理盐水配制, 然后用5N NaOH 调整pH值至7.4。

1.4 组织中超氧化物阴离子比色法定量检测

一、样品准备

- (1) 手术取出动物组织, 并称重以确定 50 毫克组织重量
- (2) 放进预冷的 15 毫升锥形离心管
- (3) 加入适量的 GENMED 清理液(Reagent A)清洗 1 次

- (4) 即刻用刀片切碎组织
- (5) 加入适量预冷的 GENMED 裂解液 (Reagent B)
- (6) 涡旋震荡 5 秒, 充分混匀
- (7) 即刻放进预冷的 DOUNCE 匀浆器
- (8) 在冰槽里用匀浆棒匀化组织
- (9) 将所有组织匀浆物移入 1.5 毫升离心管
- (10) 移取 10 微升进行蛋白定量检测
- (11) 放进冰槽里待测

二、测定准备

- (1) 准备好待测样品, 置于冰槽里备用
- (2) 设定好分光光度仪或酶标仪: 580 nm 波长, 并置零

三、样品测度

实验开始前, 将 20 冰箱里的试剂置于室温下融化, 避免光照。然后进行下列操作。

- (1) 准备 1 个 96 孔板, 做好标记: 空白对照和待测样品
- (2) 移取适量的 GENMED 缓冲液 (Reagent C) 到空白对照孔里
- (3) 移取 50 微升上述准备的待测样品到待测样品孔里
- (4) 分别加入等量的 GENMED 染色液 (Reagent D)
- (5) 轻轻摇动 96 孔板, 使其混匀
- (6) 放进 37℃ 培养箱里孵育 30 分钟
- (7) 即刻放进酶标仪里测读: 获得吸光读数 (OD)
- (8) 计算样本浓度

试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司, 以上操作均按说明进行。

1.5 组织中抗氧化酶活性的测定

本研究采用化学比色法分别测定了组织中 SOD、CAT 和 GSH-Px 三种抗氧化物酶的活性。利用考马斯亮蓝法测定了不同组织中蛋白质的含量, 试验具体操作步骤严格按说明书流程进行, 本实验所用试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.6 统计学分析

本研究中所有数据均以 (平均值±标准误) 表示, 所获数据应用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差或卡方分析, 组间差异性采用 LSD 法检验。判断标准以 $P < 0.05$,

$P < 0.01$ 为有统计学意义, 所有实验至少重复三次以上。

2 结果与分析

2.1 抗氧化剂对小鼠体重和增重的影响

由(图3-1)可见, 试验各组在试验期内体重变化均没有显著差异($P > 0.05$), 但没食子酸组、姜黄素组、原花青素组和胡萝卜素组与模型组相比均有提高的趋势。没食子酸组、姜黄素组和胡萝卜素组在试验期内的增重显著高于同期的模型组($P < 0.05$) (图3-2), 其余抗氧剂组与模型组相比差异不显著($P > 0.05$).

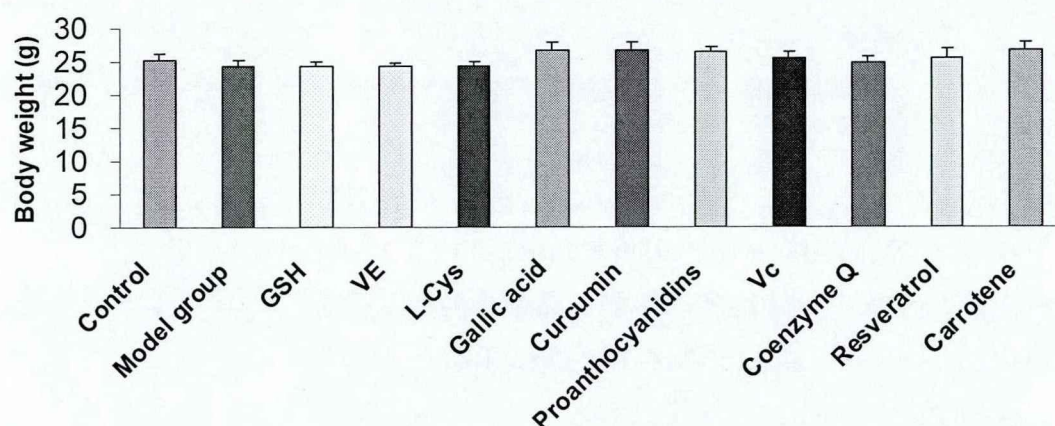


图 3-1 抗氧化剂对小鼠体重的影响

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig3-1 Effect of antioxidants on body weight

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

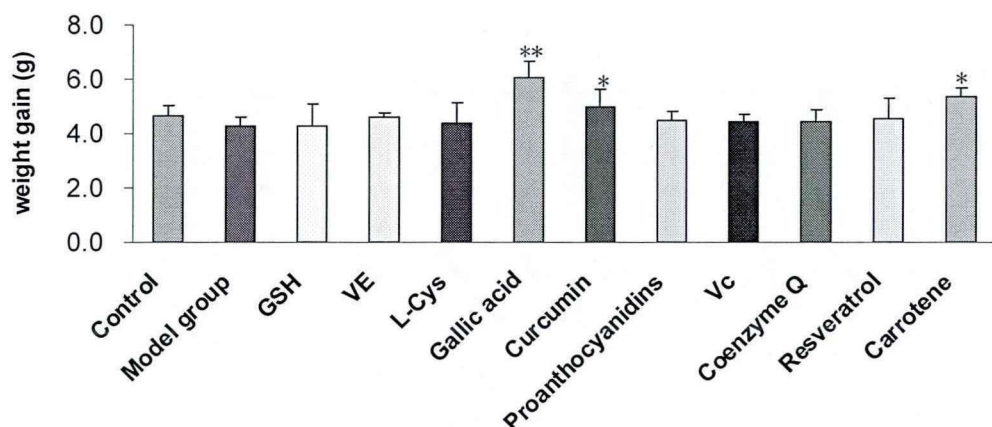


图 3-2 抗氧化剂对小鼠增重情况的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig 3-2 Effect of antioxidants on weight gain

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 抗氧化剂对不同器官重量的影响

抗氧化剂对卵巢、肝脏、脾脏和肾脏重量的变化，如（图3-3、3-4、3-5、3-6）所示。姜黄素组、原花青素组、白藜芦醇组和胡萝卜素组在试验期内的卵巢重量显著高于同期的模型组($P < 0.05$)，但其余抗氧化剂组卵巢重量和模型组相比差异不显著($P > 0.05$)。与模型组相比较，试验各组在试验期内肝脏、脾脏和肾脏体重变化均没有显著差异 ($P > 0.05$)。

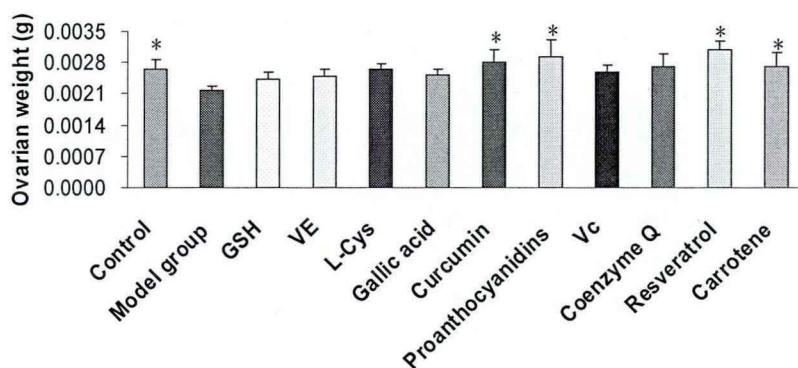


图 3-3 抗氧化剂对卵巢重量的影响

Fig 3-3 Effect of antioxidants on ovarian weight

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

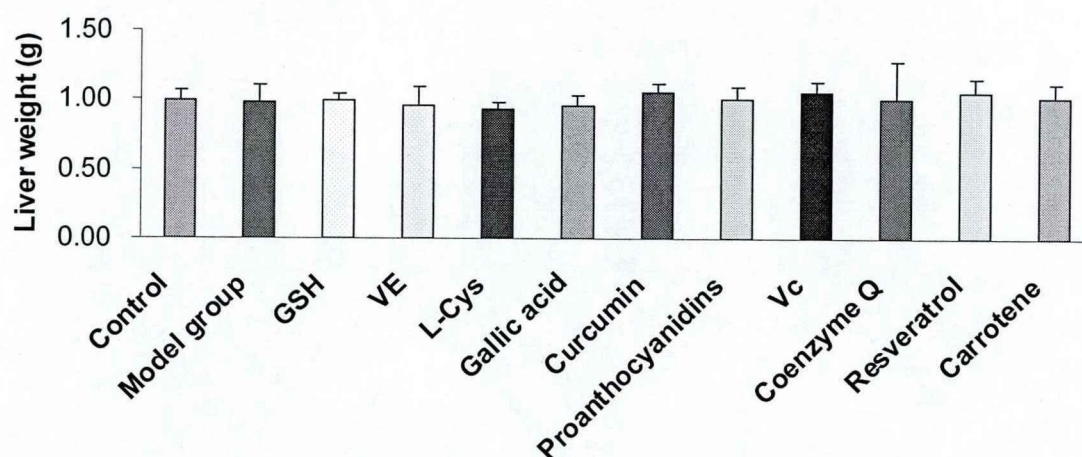


图 3-4 抗氧化剂对肝脏重量的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig3-4 Effect of antioxidants on liver weight

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

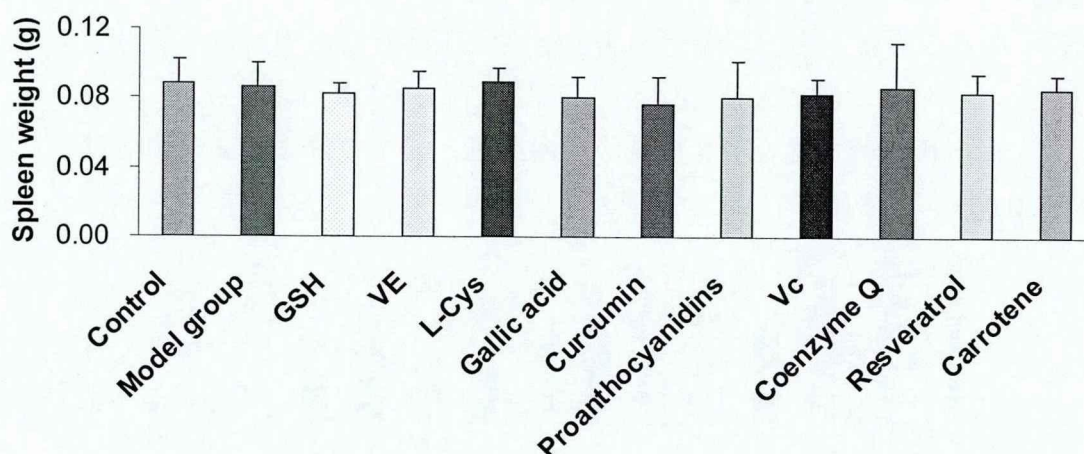


图 3-5 抗氧化剂对脾脏重量的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig4-5 Effect of antioxidants on spleen weight

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

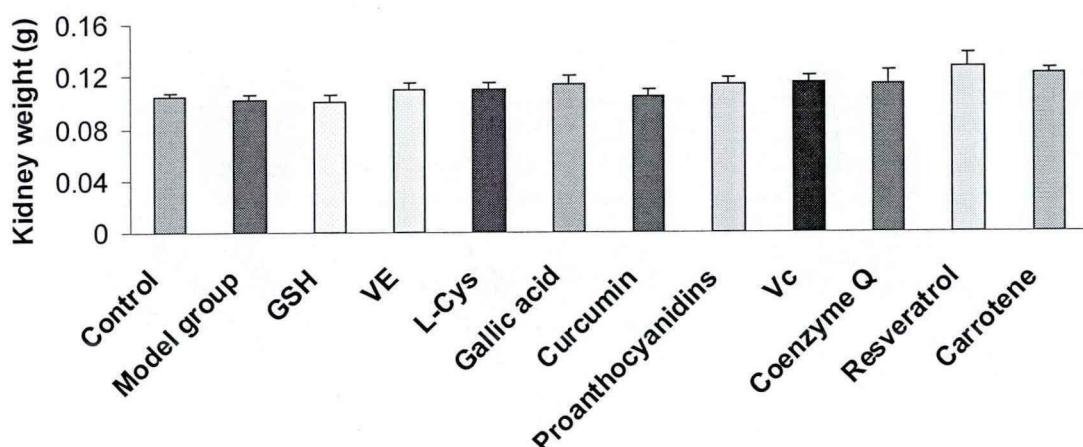


图 3-6 抗氧化剂对肾脏重量的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig 3-6 Effect of antioxidants on kidney weight

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 抗氧化剂对不同组织中 ROS 水平的影响

抗氧化剂对卵巢、大脑、肝脏、脾脏和肾脏组织中ROS水平的变化，如（图3-7、3-8、3-9、3-10、3-11）所示。与模型组相比较，L-半胱氨酸组、没食子酸组、姜黄素组、原花青素组、白藜芦醇组和胡萝卜素组卵巢内ROS的水平显著降低 ($P < 0.05$)，其余抗氧化剂组卵巢内ROS水平和模型组相比差异不显著($P > 0.05$)。与模型组相比较，试验各组脑组织内ROS水平均没有显著差异($P > 0.05$)。抗氧化剂组（GSH、VE、VC、L-半胱氨酸和胡萝卜素）肝脏组织中ROS的水平与模型组相比显著降低 ($P < 0.05$)，和模型组相比其余抗氧化剂组肝脏内ROS的水平差异不显著($P > 0.05$)。和模型组相比较，试验各组脾组织内ROS水平均没有显著差异($P > 0.05$)。抗氧化剂组（姜黄素、辅酶Q组、白藜芦醇和胡萝卜素）肾脏组织中ROS的水平与模型组相比明显降低($P < 0.05$)，其它抗氧化剂组与模型组相比差异不显著($P > 0.05$)。

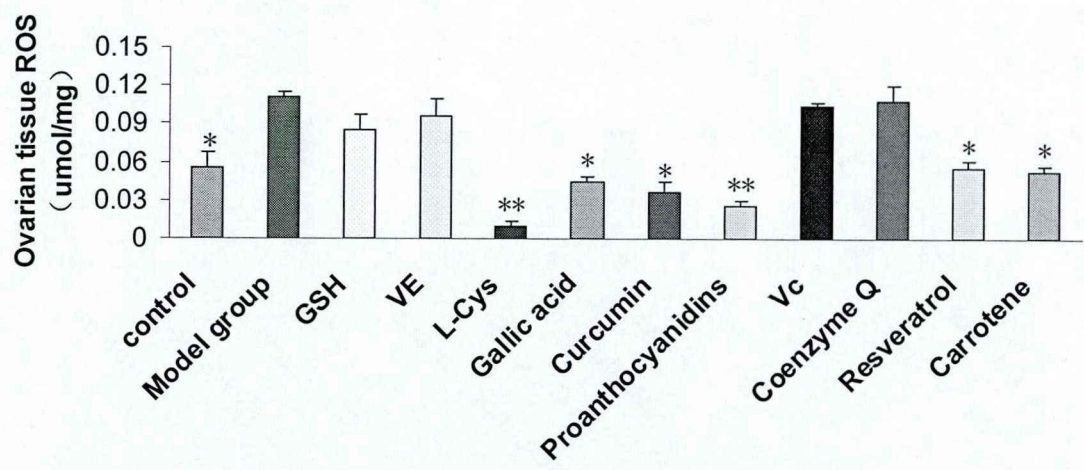


图 3-7 抗氧化剂对卵巢组织中 ROS 水平的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig 3-7 Effect of antioxidants on ROS in ovarian tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

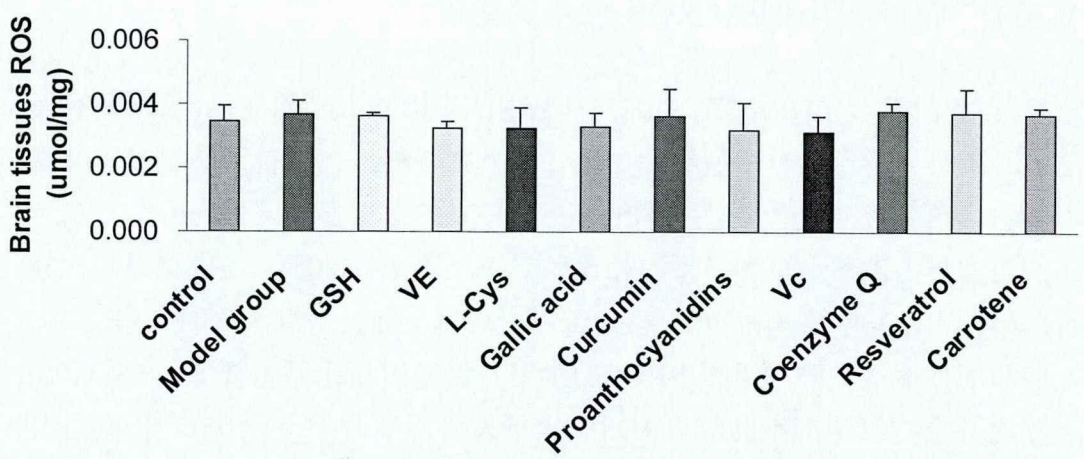


图 3-8 抗氧化剂对脑组织中 ROS 水平的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig 3-8 Effect of antioxidants on ROS in brain tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

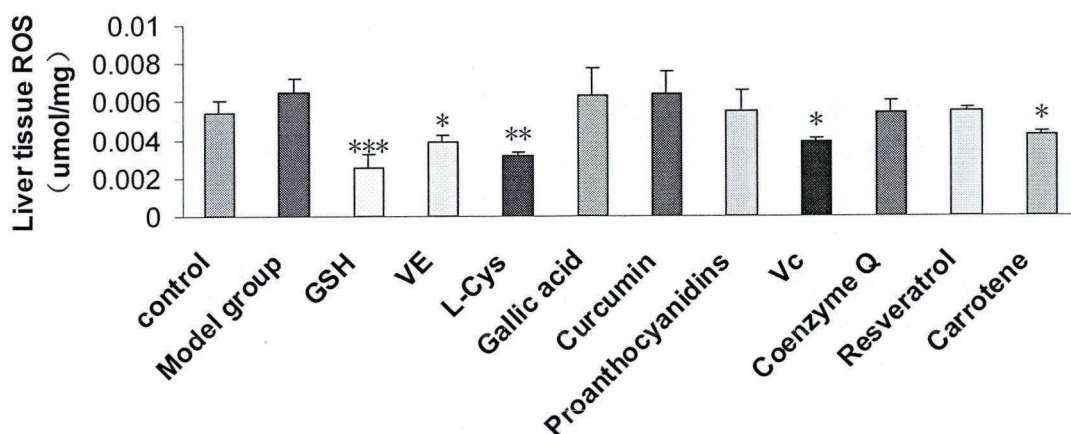


图 3-9 抗氧化剂对肝脏组织中 ROS 水平的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig 3-9 Effect of antioxidants on ROS in liver tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

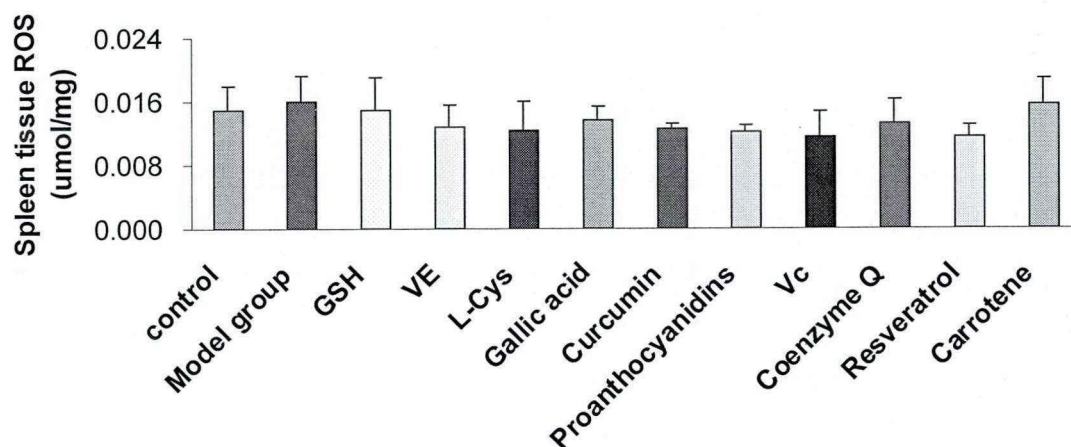


图 3-10 抗氧化剂对脾脏组织中 ROS 水平的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig 3-10 Effect of antioxidants on ROS in spleen tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

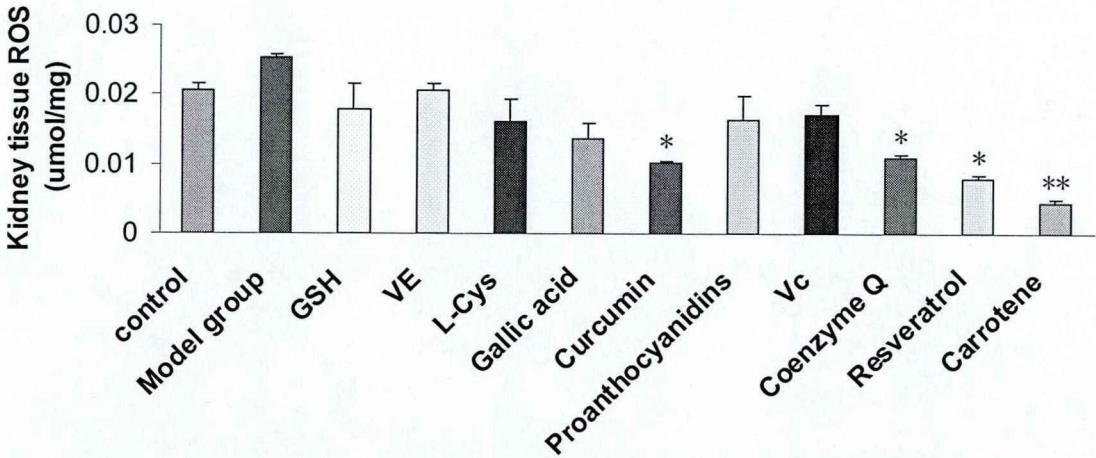


图 3-11 抗氧化剂对肾脏组织中 ROS 水平的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig 3-11 Effect of antioxidants on ROS in kidney tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 抗氧化剂对不同组织中 SOD 水平的影响

抗氧剂对卵巢、大脑、肝脏、脾脏和肾脏组织中SOD水平的变化，如（图3-12、3-13、3-14、3-15、3-16）所示。除了没食子酸组和原花青素组外，其余抗氧化剂组卵巢组织内T-SOD的水平均显著低于模型组（ $P < 0.05$ ）。与模型组相比较，试验各组大脑组织中T-SOD的水平均无显著差异（ $P > 0.05$ ）。抗氧剂组（GSH、没食子酸和姜黄素）肝脏组织中T-SOD的水平均显著低于模型组（ $P < 0.05$ ），其它抗氧剂组与模型组相比均无显著差异。与模型组相比较，除了没食子酸组脾脏中T-SOD的水平均显著降低外（ $P < 0.05$ ），其余抗氧化剂组脾组织内T-SOD水平均差异不显著。和模型组相比较，除了没食子酸和姜黄素组肾脏组织T-SOD显著降低外（ $P < 0.05$ ），其它各组之间均无明显差异。

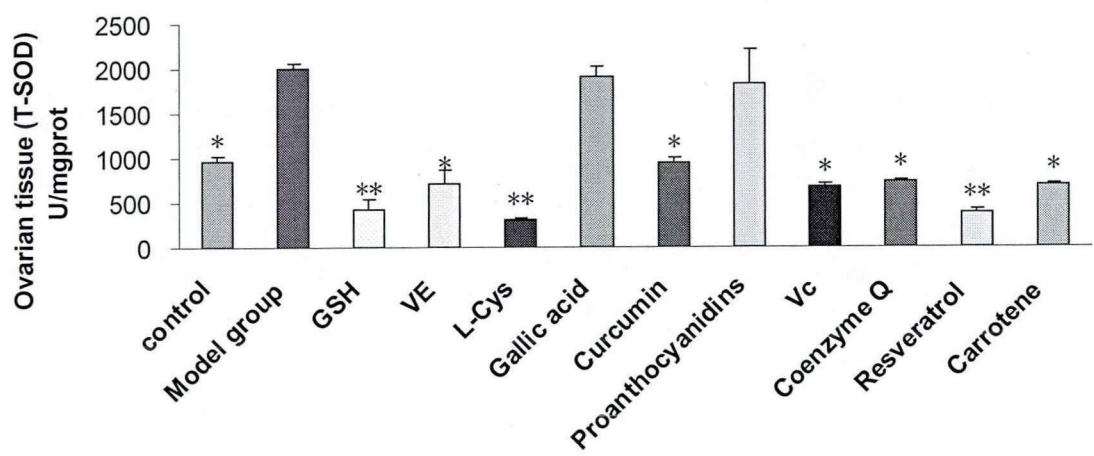


图 3-12 抗氧化剂对卵巢组织中 SOD 活性的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

Fig 3-12 Effect of antioxidants on SOD activity in ovarian tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

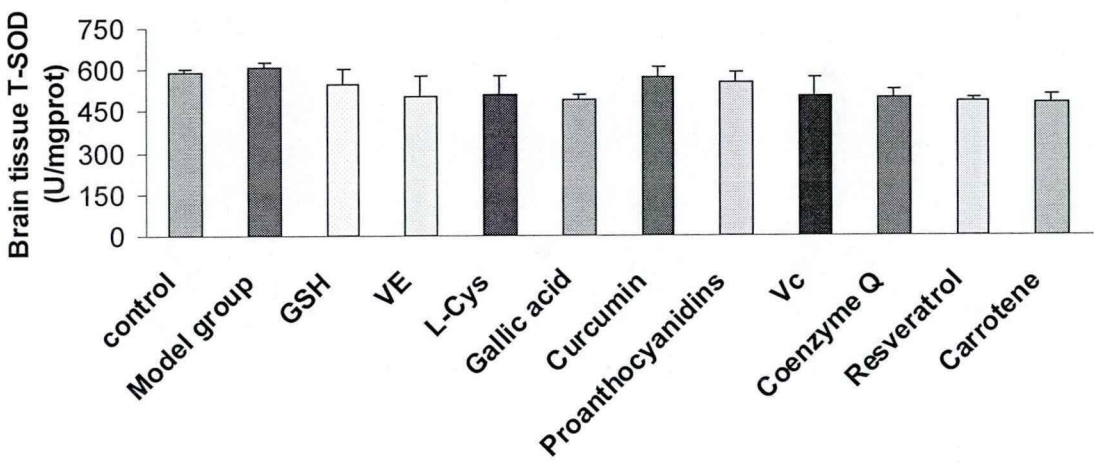


图 3-13 抗氧化剂对脑组织中 SOD 活性的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

Fig 3-13 Effect of antioxidants on SOD activity in brain tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

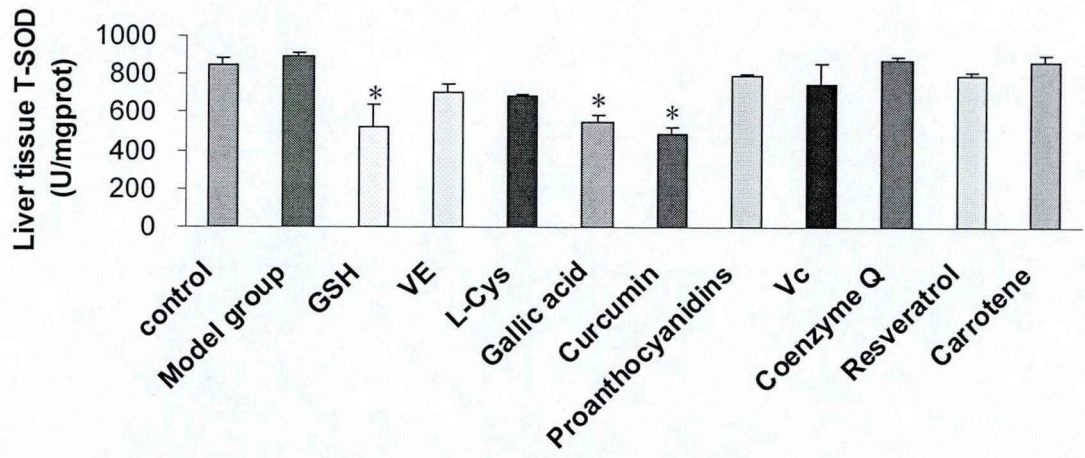


图 3-14 抗氧化剂对肝脏组织中 SOD 活性的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig4-14 Effect of antioxidants on SOD activity in liver tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

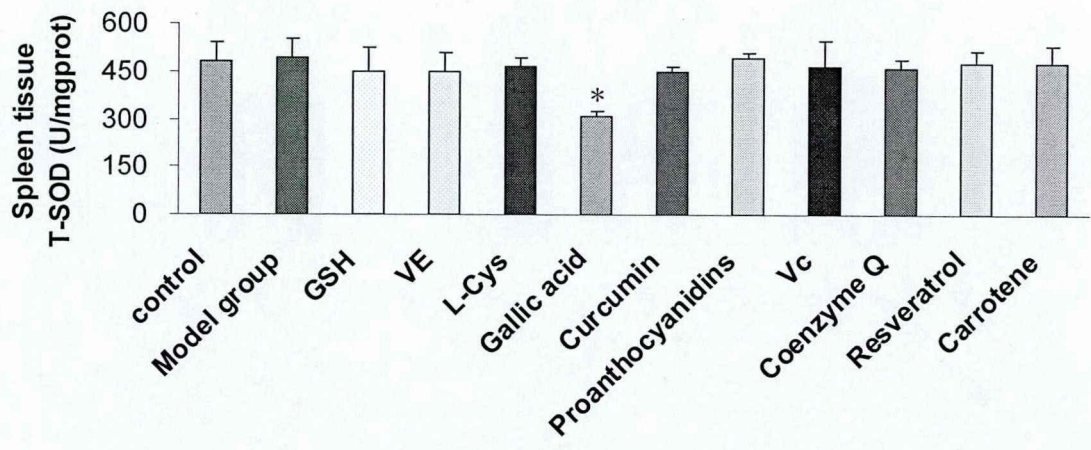


图 3-15 抗氧化剂对脾脏组织中 SOD 活性的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig 3-15 Effect of antioxidants on SOD activity in spleen tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

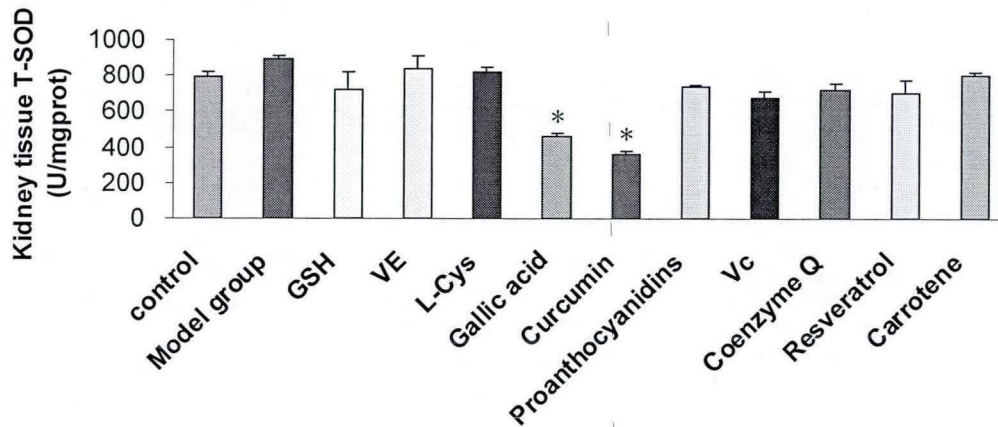


图 3-16 抗氧化剂对肾脏组织中 SOD 活性的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig 3-16 Effect of antioxidants on SOD activity in kidney tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 抗氧化剂对不同组织中 GPX 活性的影响

抗氧化剂对卵巢、大脑、肝脏、脾脏和肾脏组织中GPX水平的变化，如（图4-17、4-18、4-19、4-20、4-21）所示。与模型组相比较，除了姜黄素组和原花青素组外，其余抗氧化剂组卵巢内GPX水平均显著降低（ $P < 0.05$ ）。与模型组相比较，试验各组脑、肝脏、脾脏和肾脏组织内GPX水平均无显著差异。

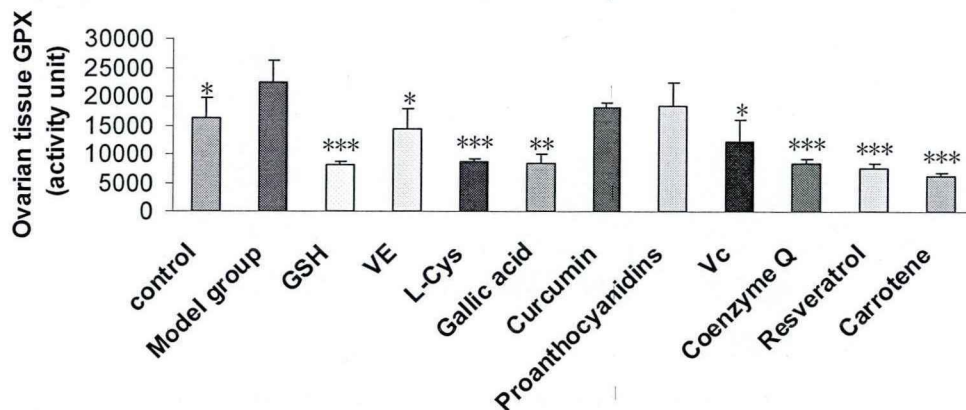


图 3-17 抗氧化剂对卵巢组织中 GPX 活性的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig4-17 Effect of antioxidants on GPX activity in ovarian tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

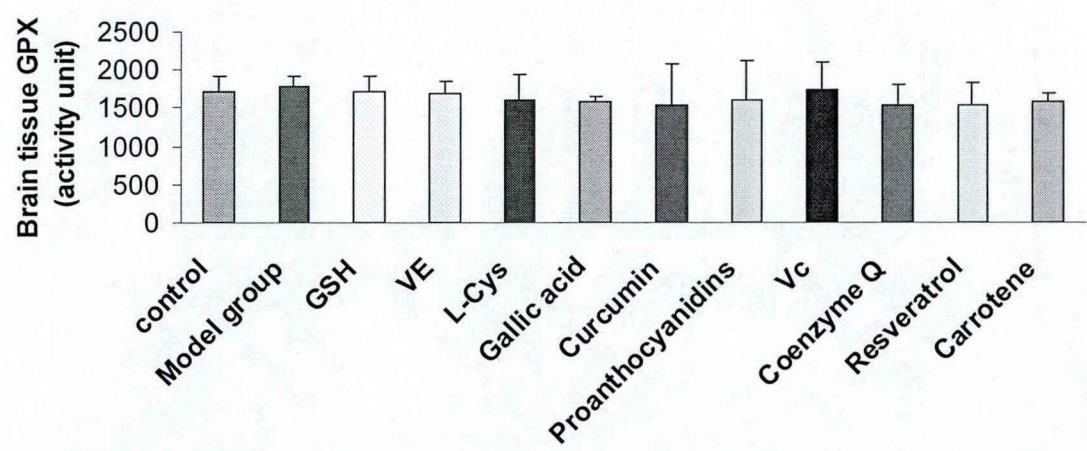


图 3-18 抗氧化剂对脑组织中 GPX 活性的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig 3-18 Effect of antioxidants on GPX activity in brain tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

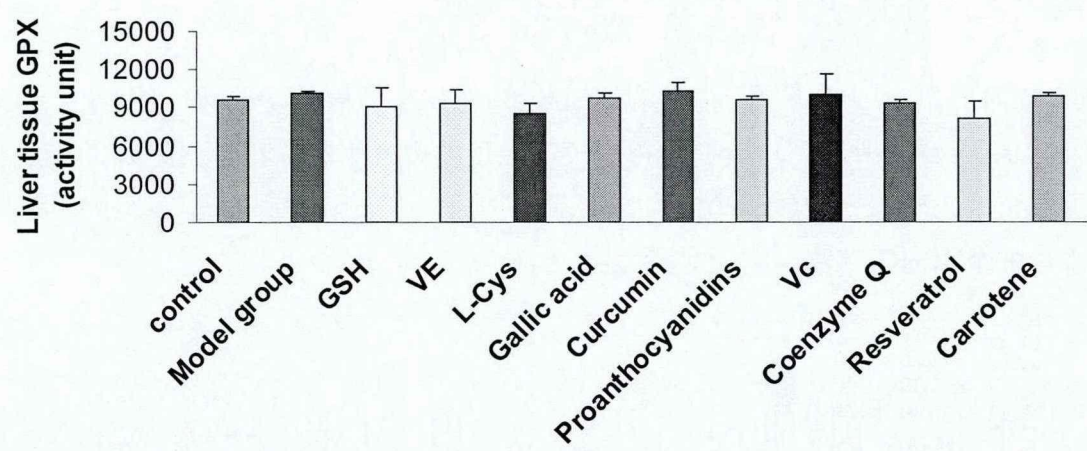


图 3-19 抗氧化剂对肝组织中 GPX 活性的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig 3-19 Effect of antioxidants on GPX activity in liver tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

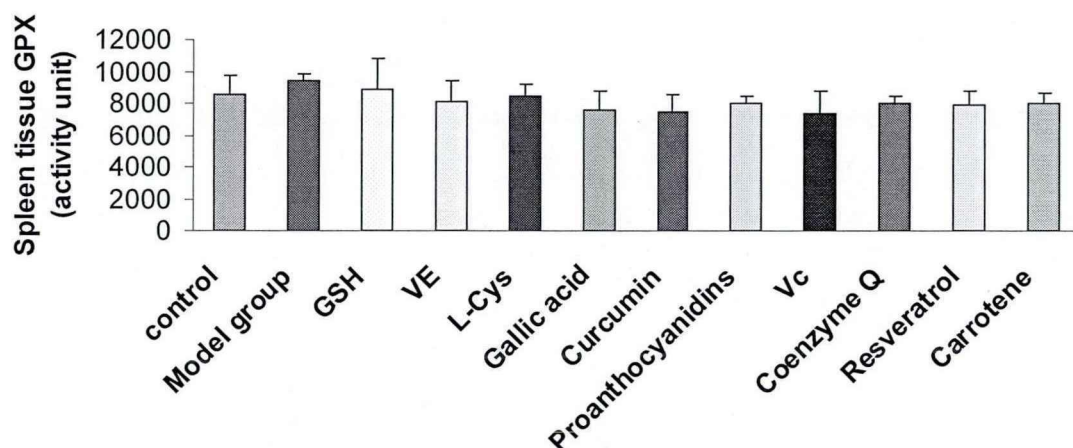


图 3-20 抗氧化剂对脾脏组织中 GPX 活性的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig 3-20 Effect of antioxidants on GPX activity in spleen tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

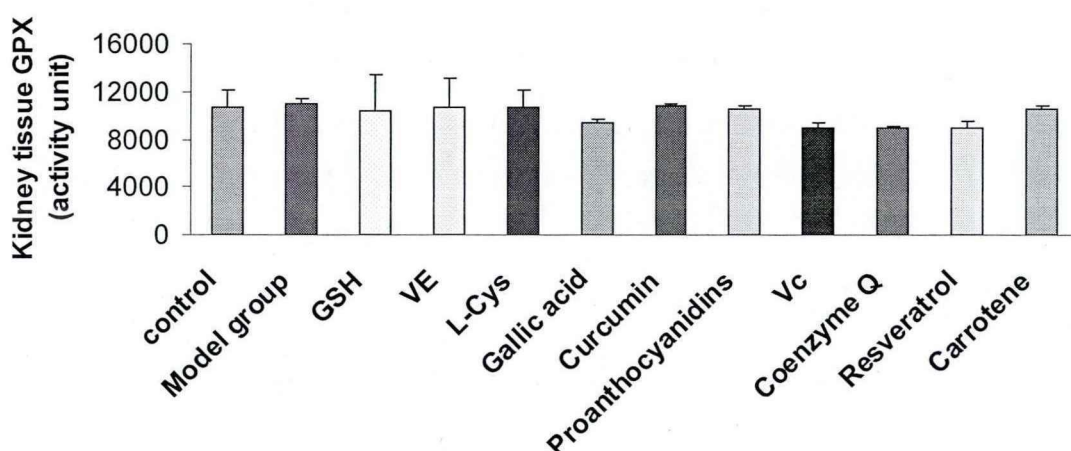


图 3-21 抗氧化剂对肾组织中 GPX 活性的影响

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig 3-21 Effect of antioxidants on GPX activity in kidney tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.6 抗氧化剂对不同组织中 CAT 水平的影响

抗氧化剂对卵巢、大脑、肝脏、脾脏和肾脏组织中CAT水平的变化，如（图3-22、3-23、

3-24、3-25、3-26) 所示。和模型组相比较, 抗氧化剂组 (GSH、VE、原花青素、辅酶 Q 和胡萝卜素) 卵巢组织内 CAT 水平均显著降低 ($P < 0.05$); 其余抗氧化剂组 (L-半光氨酸、没食子酸、姜黄素、VC、白藜芦醇) 与模型组相比, 卵巢组织内 CAT 水平均也有所降低, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。和模型组比较, 试验组 (大脑、肝脏、脾脏和肾脏) 各组织中 CAT 的水平均差异不显著 ($P > 0.05$)。

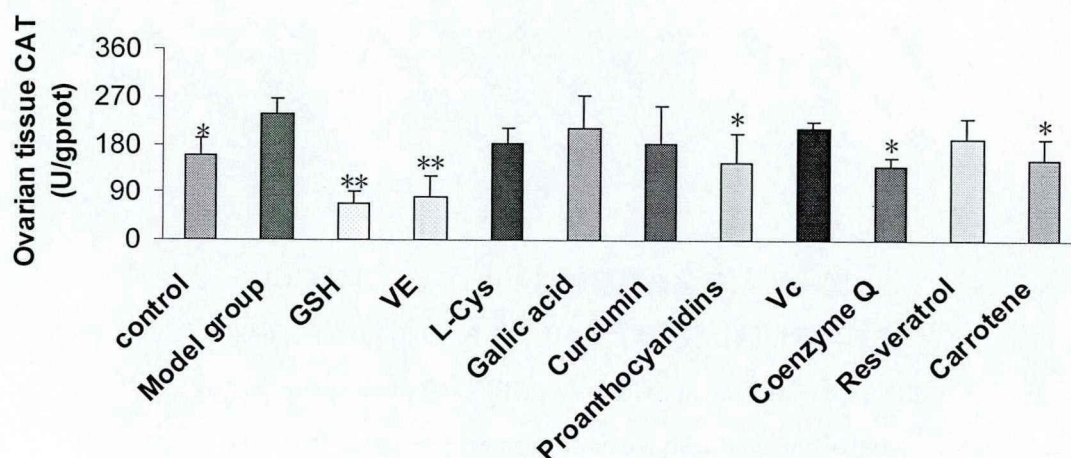


图 4-22 抗氧化剂对卵巢组织中 CAT 活性的影响。

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig4-22 Effect of antioxidants on CAT activity in ovarian tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

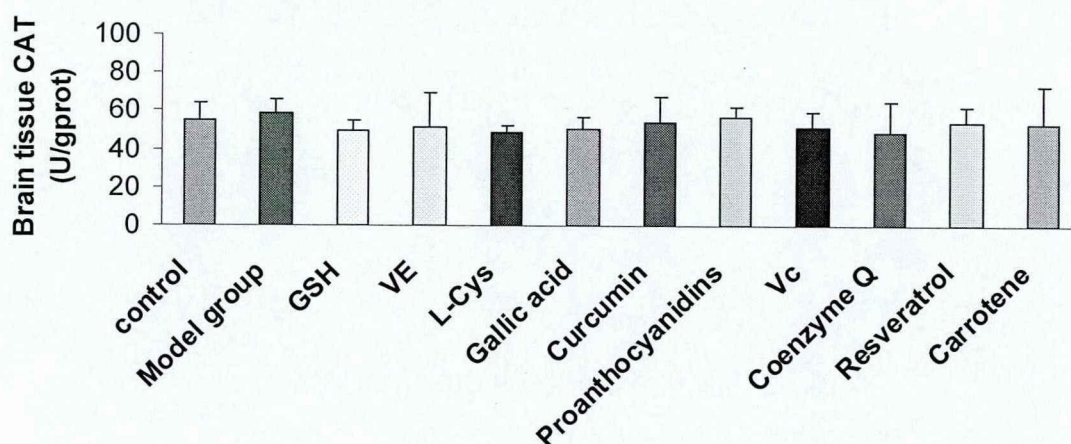


图 3-23 抗氧化剂对脑组织中 CAT 活性的影响。

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig 3-23 Effect of antioxidants on CAT activity in brain tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

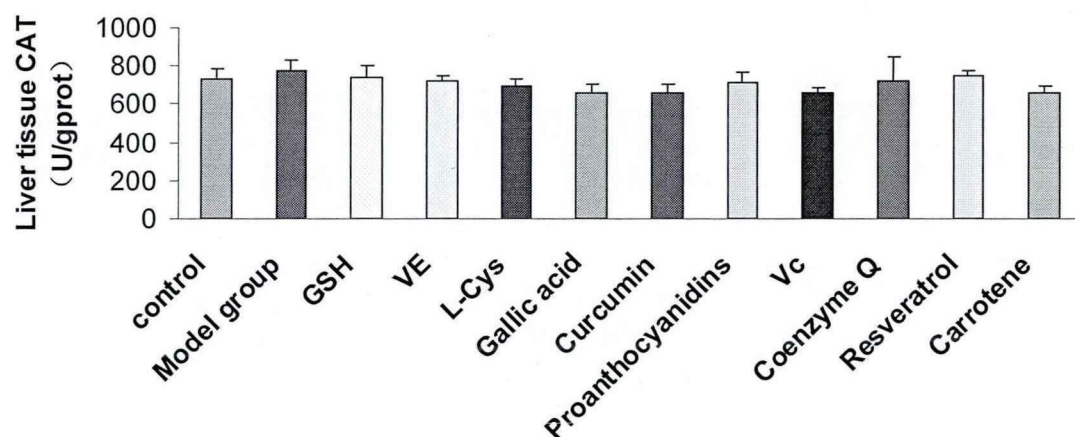


图 3-24 抗氧化剂对肝脏组织中 CAT 活性的影响。

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig 3-24 Effect of antioxidants on CAT activity in liver tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

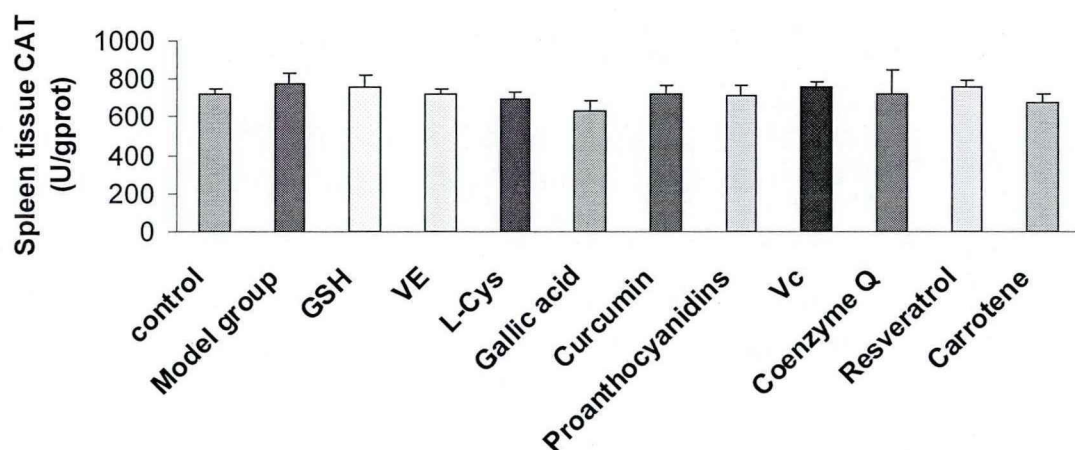


图 3-25 抗氧化剂对脾脏组织中 CAT 活性的影响。

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig 3-25 Effect of antioxidants on CAT activity in spleen tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

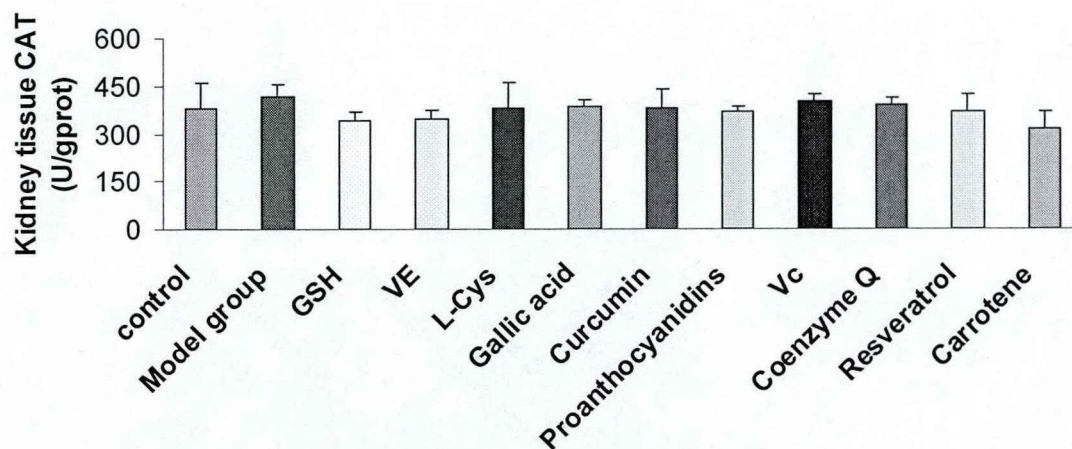


图 3-26 抗氧化剂对肾脏组织中 CAT 活性的影响。

注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig 3-26 Effect of antioxidants on CAT activity in kidney tissues

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.7 原花青素对颗粒细胞和卵巢内 ROS 水平的影响

要研究补充原花青素对卵泡颗粒细胞和卵巢组织内 ROS 水平的影响，我们使用了细胞内 ROS 红色荧光定性和定量方法以及组织内 ROS 水平定量方法分别检测了颗粒细胞和卵巢组织内的 ROS 水平。试验结果表明，与对照组相比较，在 3-NPA 单独处理组小鼠卵泡颗粒细胞和卵巢组织中 ROS 水平显著提高 ($P < 0.05$)。和 3-NPA 单独处理组相比较，小鼠卵泡颗粒细胞和卵巢组织中 ROS 水平在补充原花青素组显著降低($P < 0.05$)，见 (3-27 图 A-C)。

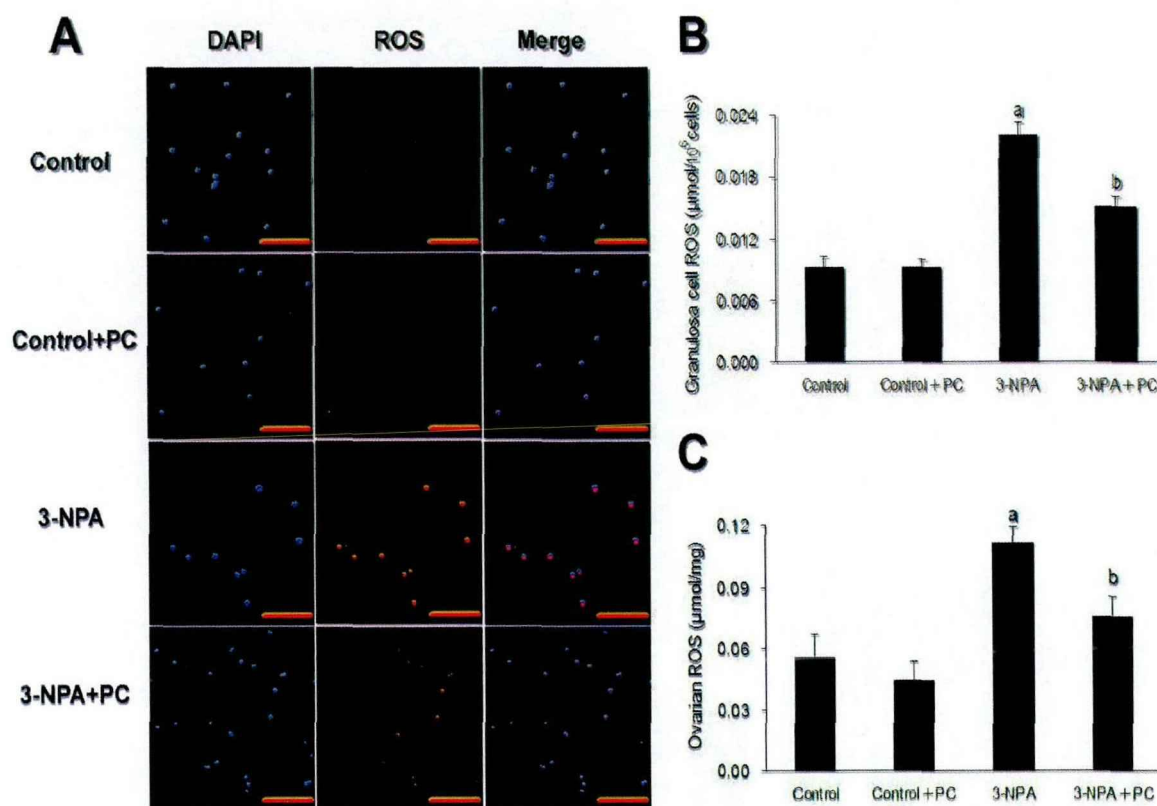


图 3-27 补充原花青素对颗粒细胞和卵巢内 ROS 水平的影响

与对照组比较：^a $P < 0.05$ ，与模型组比较：^b $P < 0.05$

Fig 3-27 Effect of PC on ROS levels in granulosa cells and ovarian tissue

^a $P < 0.05$ versus control group; ^b $P < 0.05$ versus 3-NPA-treated group.

2.8 原花青素对卵巢内 SOD 和 CAT 活性的影响

要研究补充原花青素对卵巢组织内 SOD 和 CAT 活性的影响，我们采用了黄嘌呤氧化酶法(羟胺法)测定 SOD 活力，紫外吸收法测定了 CAT 的活性。试验结果表明，与对照组相比较，在 3-NPA 单独处理组小鼠卵巢组织内 SOD 和 CAT 活性水平显著提高 ($P < 0.05$)。和 3-NPA 单独处理组相比较，小鼠卵巢组织中 SOD 和 CAT 水平在补充原花青素组显著降低($P < 0.05$)，见（图 3-28 A, B）

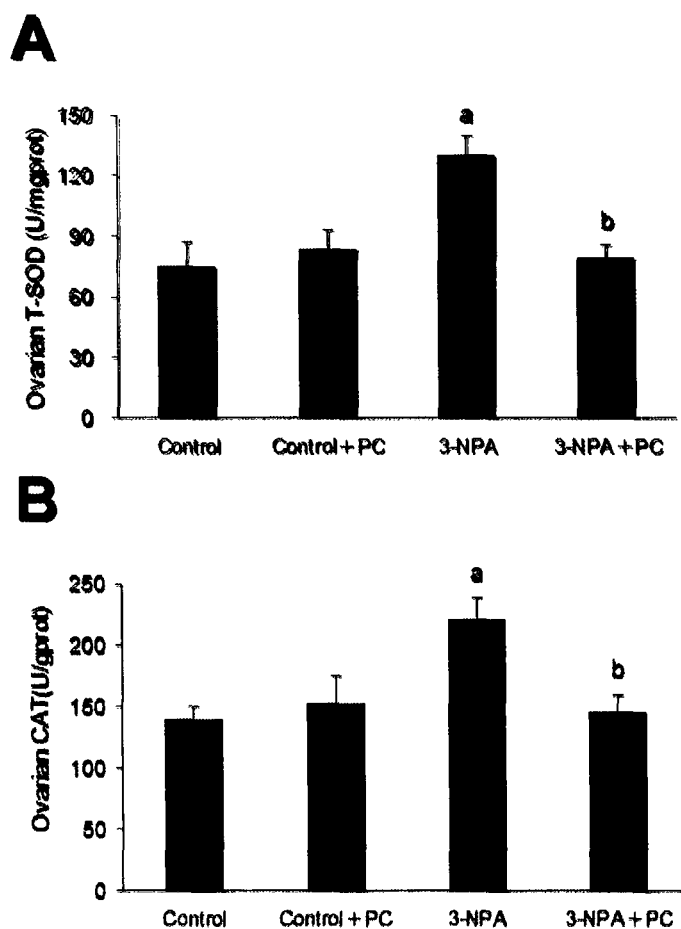


图 3-28 原花青素对卵巢内 SOD 和 CAT 活性的影响

与对照组比较: ^a $P < 0.05$, 与模型组比较: ^b $P < 0.05$

Fig 3-28 Effect of PC on ovarian superoxide dismutase and catalase activity

^a $P < 0.05$ versus control group; ^b $P < 0.05$ versus 3-NPA-treated group.

2.9 原花青素对卵泡颗粒细胞凋亡的影响

要研究补充原花青素对卵泡颗粒细胞凋亡的保护作用, 我们采用了 TUNEL 染色方法对小鼠卵巢切片进行了染色观察了颗粒细胞凋亡的数量。结果表明, 与对照组相比较, 3-NPA 单独注射组颗粒细胞的凋亡率显著升高 ($P < 0.05$), 并且闭锁卵泡的比例也显著高于对照组。与 3-NPA 单独处理组相比较, 补充原花青素组颗粒细胞凋亡的数量和卵泡闭锁的比例显著降低 ($P < 0.05$), 见 (图 3-29 A, B)。

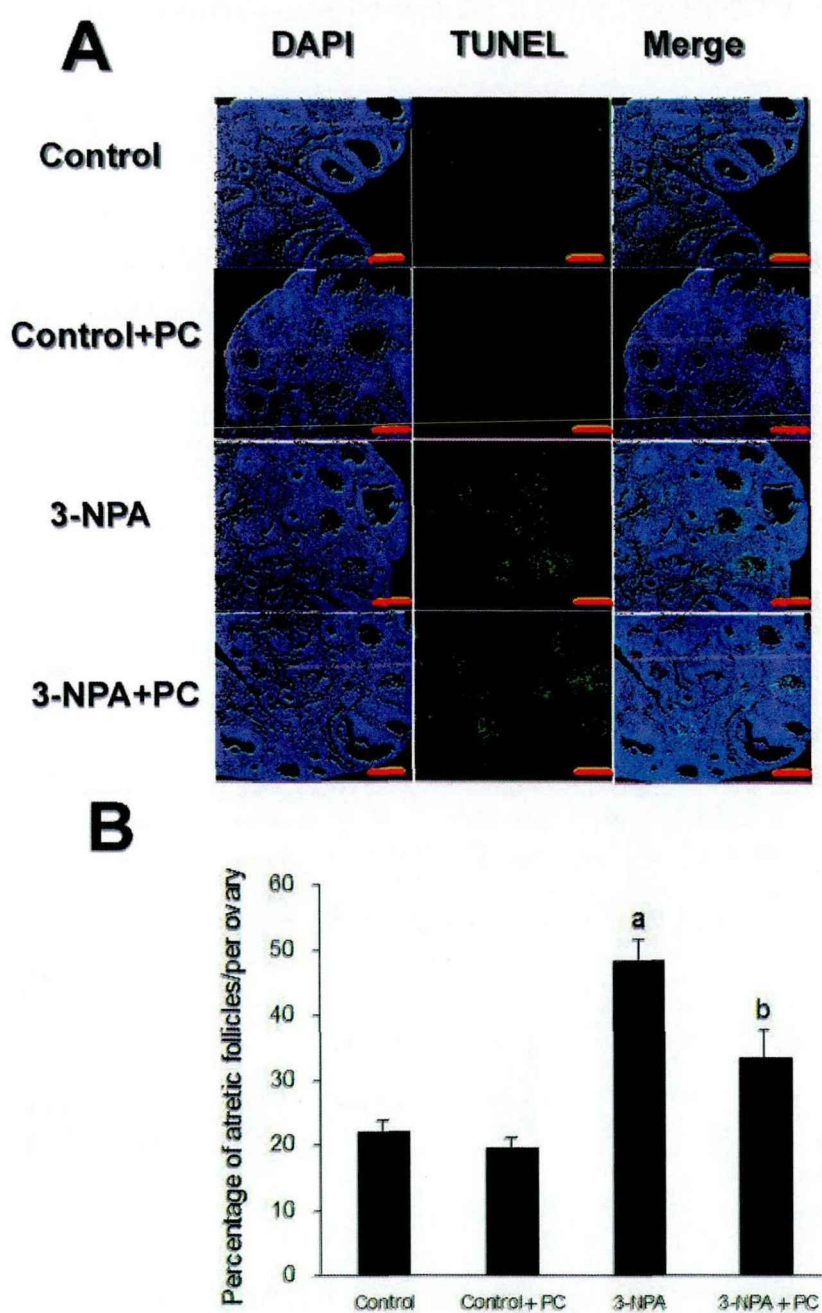


图 3-29 补充原花青素对颗粒细胞凋亡的影响

与对照组比较: ^a $P < 0.05$, 与模型组比较: ^b $P < 0.05$

Fig 3-29 Effect of PC on granulosa cell apoptosis in ovarian follicles

^a $P < 0.05$ versus control group; ^b $P < 0.05$ versus 3-NPA-treated group.

2.10 原花青素对卵泡颗粒细胞凋亡相关基因表达的影响

定量 PCR 方法检测了卵泡颗粒细胞内凋亡相关基因 (*Bcl-2*, *Bax*, *Bim*, *FasL*, and *caspase-3*) 的表达水平。试验结果表明, 与对照组相比较, 在 3-NPA 单独处理组 *Bcl-2*: *Bax* 的相对表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。和 3-NPA 单独处理组相比较, 在补充原花青素组 *Bcl-2*: *Bax* 的相对表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与对照组相比较, 凋亡相关基因 (*Bim*, *FasL*, *caspase-3*) mRNA 的表达水平在 3-NPA 单独处理组显著升高 ($P < 0.05$)。和 3-NPA 单独处理组相比较, 凋亡相关基因 (*Bim*, *FasL*, *caspase-3*) mRNA 的表达水平在补充原花青素组显著降低 ($P < 0.05$) , 见 (图 3-30)。

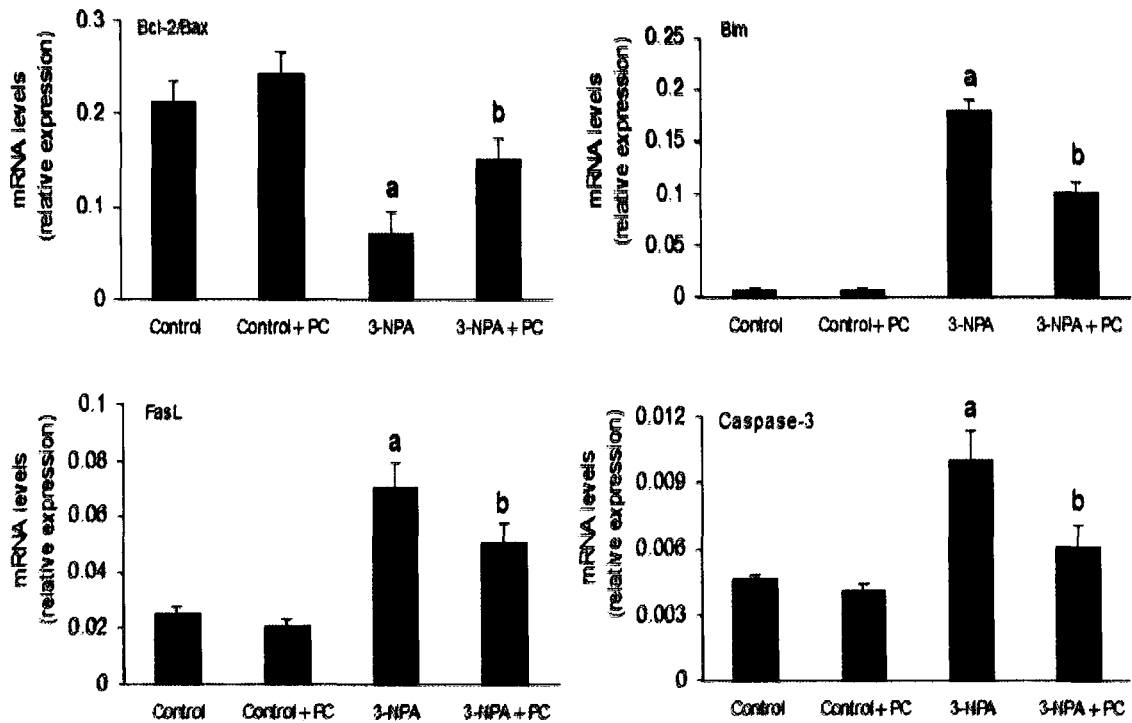


图 3-30 补充原花青素对颗粒细胞凋亡基因表达的影响

与对照组比较: ^a $P < 0.05$, 与模型组比较: ^b $P < 0.05$

Fig 3-30 Effect of PC on the expression of apoptosis-related genes in granulosa cells

^a $P < 0.05$ versus control group; ^b $P < 0.05$ versus 3-NPA-treated group.

3 讨论

本实验以3-NPA诱导的卵巢氧化应激模型为研究对象,分别给予上述动物模型10种不同的抗氧化剂处理14天,通过测定各组小鼠卵巢组织中ROS、SOD、GPX和CAT活性的变化。结果表明:L-半胱氨酸、没食子酸、姜黄素、原花青素、白藜芦醇和胡萝卜素6种抗氧化剂可显著降低卵巢组织内ROS的水平;其中姜黄素、原花青素、白藜芦醇和胡萝卜素4种抗氧化剂可以提高卵巢的重量,显示了4种抗氧化剂对卵巢氧化应激的保护作用。GSH、VE、L-半胱氨酸、没食子酸、VC、辅酶Q、白藜芦醇、胡萝卜素8种抗氧化剂均可使卵巢组织中代偿升高的GPX活性显著下降。GSH、VE、L-半胱氨酸、姜黄素、VC、辅酶Q、白藜芦醇、胡萝卜素8种抗氧化剂均可使卵巢组织中代偿升高的T-SOD明显降低。GSH、VE、原花青素、辅酶Q、胡萝卜素5种抗氧化剂均能够降低卵巢中代偿升高的CAT活性。

卵泡液中的ROS主要来源于卵子和卵子周围的颗粒细胞,颗粒细胞代谢的活性决定着卵泡中ROS的含量,卵泡周围环境也能产生一定量的ROS。当卵泡内的ROS处于一定水平时对卵子基因表达、成熟、类固醇合成等起着重要的生理作用。然而,当卵巢内ROS产生过多或抗氧化机能降低时,ROS的积累就会导致卵巢功能衰退,包括DNA、蛋白质和脂类的氧化损伤,最终导致减数分裂和细胞周期停滞^[35, 112]。动物研究表明成熟卵母细胞中还原型谷胱甘肽的水平会随着年龄增高而降低,通过口服抗氧化剂能够降低这种情况的发生,但对幼鼠生育能力没有显著效果。小鼠口服抗氧化剂能够拮抗因老化对卵母细胞质量和数量的影响,有效地清除卵泡中过量的ROS对于防止卵子氧化损伤,维持正常的细胞周期和早期胚胎发育非常重要。

研究表明,在人类卵巢细胞内VC的含量可达到毫摩尔水平,卵泡液中的VC含量为微摩尔水平,它们直接能够抑制或祛除与卵巢内的过量ROS,从而起到对卵巢的保护作用^[121, 122]。实验动物研究显示,卵泡液中的抗氧化酶主要为GSH、SOD、CAT等,其水平高于血清浓度^[123]。GSH在细胞中的浓度同样可以达到毫摩尔水平,它能够有效地清除细胞内的自由基^[124]。在成年大鼠和小鼠卵巢中GSH的浓度可达到3~4 nmol/mg组织或40~50 nmol/mg蛋白^[125, 126]。发情周期中的大鼠体内注射丁硫氨酸硫酸亚胺(GSH合成的抑制剂)能够使卵巢内GSH降低50%,GSH的降低显著地提高了有腔卵泡的闭锁比例^[125]。超氧化物歧化酶(SOD)在细胞内可以直接与超氧阴离子发生反应,使其转变成无毒的O₂和H₂O₂,SOD有三种类型分别为:SOD1(Cu/ZnSOD)它主要存在于细胞质,SOD2(MnSOD)它主要存在于线粒体,SOD3它主要存在于细胞外^[127]。过氧化氢酶(CAT),它主要包括GSH过氧化物酶类和一些

GSTs, 能够使一些有毒过氧化物转变为无毒的 H_2O 。很多研究表明, 机体在受到氧化应激损伤时, 机体细胞会促进 GSH 活性和抗应激基因表达增强, 这是细胞在氧化应激过程中形成的一种防御机制。Sanz 等研究报道, 随着鼠龄升高, 机体内过氧化产物含量明显增多并且抗氧化物酶 (SOD、GPX 和 CAT) 的活性也显著升高。Prakasam 等发现, 长期接触喷洒农药的工作人员, 体内红细胞及血浆中抗氧化物酶的活性显著升高^[128]。在本研究中, 我们也发现模型组中卵巢内抗氧化物酶的活性明显升高, 这很有可能是由于卵巢在氧化应激环境下形成的自我保护机制。

Tilly (1995) 等应用几种抗氧剂, 如维生素C、N-乙酰半胱氨酸 (NAC)、SOD 和过氧化氢酶等, 在体外研究了对颗粒细胞凋亡的影响, 结果表明ROS是颗粒细胞凋亡及卵泡闭锁的诱发因素之一, 抗氧化剂 NAC等可明显阻止颗粒细胞凋亡及卵泡闭锁^[92]。Ebisch (2007) 等报道, 女性补充叶酸、锌和硫醇可降低体内ROS水平进而提高卵母细胞质量, 说明抗氧化剂能够降低卵子中ROS水平, 提高卵子质量^[105]。在猪、牛、羊等哺乳动物卵母细胞的体外培养液中加入半胱氨酸能够提高卵母细胞内GSH的合成, 从而促进了卵母细胞的成熟和早期胚胎的发育能力^[129, 130]。在卵巢刺激的同时, 补充维生素C, 能够显著提高卵泡液中维生素C的含量, 进而提高高龄妇女卵子的获得数量和受孕率, 降低高龄妇女卵子非整倍体的发生^[122]。当小鼠饲喂抗氧剂 (VC和VE) 以后, 与对照组相比显著地提高了MII卵母细胞的数量, 降低了凋亡卵母细胞的数量^[104]。

多酚类抗氧化剂是人类饮食中最为丰富的抗氧剂, 如水果、蔬菜、葡萄酒、茶、巧克力和其它可口可乐产品等, 它们能够发挥强大的生物学功能, 如提高机体免疫力, 抵抗氧化应激和降低疾病发生等。研究表明, 多酚类抗氧剂可通过激活内源性防御体系, 如NF- κ B激活, 促进GSH合成, MAPK蛋白激活等, 发挥其抗氧化功能作用^[131]。动物的急性毒性实验中证明, 在高浓度香烟的毒害下, 使用了酚类自由基清除剂之后, 小白鼠的寿命比没有使用自由基清除剂的小白鼠的寿命明显延长, 最长的甚至可以延长将近一倍的寿命, 并且, 基因癌变率大大降低。体内外试验表明, 姜黄素可以提高多种抗氧化物活性, 如谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX), 超氧化物歧化酶 (SOD), 过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 等^[132], 并且能够激活内源性防御体系^[133]。Hung 等^[116] 研究发现, 白藜芦醇具有抗氧化清除细胞内自由基的功效, 还能促使GSH处于还原状态, 从而阻止了羟自由基的产生。Pandey等^[134] 研究表明, 白藜芦醇能够降低三丁基过氧化氢 (t-BHP) 导致的氧化应激, 提高细胞膜巯基含量和红细胞内GSH的水平。Bagchi.D 等^[135]利用化学发光和细胞色素C还原的方法检测了 VC、VE、胡萝卜素和原花青素的抗氧化能力, 结果表明, 原花青素的抗氧化作用要优于其

它抗氧化剂。Koga等^[136]发现,对禁食大鼠一次给予原花青素(25 mg/kg)可以显著提高血浆对氧化应激的抵抗力。

在本研究中,我们发现多酚类抗氧化剂的抗氧化作用显著优于临床上一些常用的抗氧化剂如VC、VA和VE等。我们的研究结果对开发和利用新型天然植物提取物多酚类抗氧化剂在临床上应用于预防和治疗卵巢氧化应激等疾病具有重要的指导意义。

第四章 不同抗氧化剂体外抗氧化活性的比较研究

颗粒细胞是雌性动物生殖过程中的重要功能细胞,与卵子的生长、发育、成熟密切相关,并且是孕激素和雌激素的主要来源细胞。很多研究表明,氧化应激是引起颗粒细胞凋亡的重要因素之一,颗粒细胞的凋亡可以导致卵泡的闭锁^[137]。很多学者认为,原始卵泡、初级卵泡的闭锁主要是由卵子凋亡所引起,有腔卵泡和成熟卵泡的闭锁很多是由卵泡中颗粒细胞凋亡引起。氧化应激与颗粒细胞的凋亡密切相关,过高的凋亡率会降低卵泡的发育能力,损害卵子质量^[91],氧化应激引起的颗粒细胞凋亡是卵泡发生闭锁的重要原因之一,并且此类凋亡可被多种抗氧化剂所阻止^[138]。

我们以前的研究表明,3-NPA诱导的体内卵巢氧化应激能够引起颗粒细胞ROS水平升高和凋亡率增加,并且能够显著地降低大卵泡数量和提高大卵泡闭锁率。是否3-NPA能够在外界环境条件下导致卵巢颗粒细胞氧化应激,能够对卵巢颗粒细胞产生氧化损害作用,这需要更进一步的深入研究。

为了进一步研究3-NPA在体外环境条件下能够引起小鼠卵巢颗粒细胞氧化损伤以及不同抗氧化剂体外抗氧化活性的作用,本研究通过在体外培养环境中添加3-NPA,观察3-NPA对小鼠卵巢颗粒细胞的氧化损伤作用,同时应用不同种类的抗氧化剂:维生素C、N-乙酰半胱氨酸、原花青素,研究比较不同抗氧化剂体外抗氧化活性的作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物

3周龄(16~18g)清洁级ICR雌性小鼠购于南京市青龙山实验动物中心,小鼠分笼以后分别饲养在人工控温室(20~23℃)和人工光照(14h光照,10h黑暗)条件下,标准颗粒饲料饲喂,自由饮水和采食。母鼠先进行7d的标准化饲养,以调节生理周期,使其适应环境供实验使用。

1.1.2 试剂

3-硝基丙酸(3-NPA)、VC、N-乙酰半胱氨酸(NAC)、DMSO购自Sigma公司;原花青素购自南京鼎国生物技术有限公司;SOD、MTT、丙二醛(MDA)购自南京建成生物研究所;孕马血清促性腺激素购自宁波第二激素厂;DMEM(F12)、胎牛血

清、胰酶、PBS 购自 GIBCO 公司；三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇：购自南京农业大学试剂部；反转录试剂盒、SYBR PremixTaq™ 荧光定量酶 TaKaRa 公司；Trizol 购自 Invitrogen 公司；TUNEL 荧光试剂购自 Roche 公司。

1.1.3 仪器设备

实时荧光定量 PCR 仪：ABI7300，美国 ABI 公司

UV-754 紫外分光光度计：上海医用仪器厂

恒温水浴锅：北京医疗设备厂

电子天平：Sartorius BP210S

超低温冰箱：Thermo

高速冷冻离心机：德国 Eppendorf，5810R 型

高压消毒锅：上海申安医疗器械厂

电泳凝胶成像系统：Bio-Rad

组织匀浆机：PRO200，上海季诺科贸有限公司

PCR 仪：Takara

1.2 试验方法

1.2.1 卵巢颗粒细胞的分离与培养

小鼠适应环境 7d 后，每只雌性小鼠腹腔内注射孕马血清促性腺激素（PMSG）10 IU，48h 后颈椎脱臼处死获取卵巢。具体步骤如下：

(1)小鼠在实验台上处死后，马上用 75%酒精进行体表消毒，在无菌条件下（燃烧酒精灯前）立刻取出两侧的卵巢放于预热好的盛有 F12 培养基的培养皿内（35 x15mm）内；

(2)将盛有卵巢的培养皿放在体视显微镜的热台上，在无菌条件下使用 1mL 注射器针头刺破卵巢表面成熟卵泡，使颗粒细胞释放到培养基当中。

(3)待所有卵巢处理完后，用针头将培养基中的卵巢碎片挑出，然后在超净台中使用 1mL 的枪头缓慢均匀地将颗粒细胞吹散，切记用力过猛，否则会将液体吹出容易造成污染。

(4)将 6-8 卵巢的颗粒细胞，按 2.5mL 的培养基移入 T25 培养瓶内，置于 37℃、5%CO₂ 相对湿度饱和的培养箱内培养。间隔 24h 进行观察检测是否污染，如无则继续进行培养，约 60%的细胞在培养 48h 后可贴壁生长，更换 F12 培养基继续培养。

(5)当 90%的细胞达到汇合时，轻轻地洗净培养基，使用预热的 PBS 清洗一次，加入

预热好的 0.25 % 的胰酶 1mL, 培养箱内消化 1-2 min 中, 用枪头轻轻吹洗几次培养瓶, 然后加入同体积的含有血清的培养基终止消化;

(6)细胞悬液 1000 rpm, 离心 5 分钟, 清洗 2-3 次, 彻底去除胰酶, 加入预热的培养基吹散颗粒细胞团块, 血细胞计数板计数, 调整颗粒细胞密度按 1×10^6 /孔的密度传入 6 孔板中, 48h 后颗粒细胞可贴壁, 待颗粒细胞汇合度达到 90 % 左右, 进行相关实验研究。

1.2.2 颗粒细胞形态学观察

Giemsa 染色

- ①12 孔板内细胞培养至 60%-70%, 弃去 F12 培养基。
- ②PBS 清洗 2 次, 甲醇固定 10min。
- ③吸去甲醇液体, Giemsa 工作液染色 45min (Giemsa: 稀释液 = 1:20)。
- ④水洗, 晾干, 显微镜下观察。

HE 染色

- ①12 孔板内细胞培养至 60%-70%, 弃去 F12 培养基。
- ②95%乙醇固定 20min, PBS 清洗 2 次, 每次 1min。
- ③核染液染色 1-3min, 自来水冲洗, 显微镜下观察, 若染色过深, 进行分色处理。
- ④浆染液染色 1min, 自来水冲洗, 显微镜下观察。

1.2.3 MTT 法检测卵巢颗粒细胞存活率

MTT 操作规程:

- ① 将分离得到的卵巢颗粒细胞经细胞计数后, 按每孔约 2×10^4 个接种于 96 孔板, 每孔 200 μ L, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 相对湿度饱和的培养箱内培养。
- ② 待颗粒细胞长至 60%~70%融合度时, 进行以下实验: 将终浓度为 0、2、4、8、16、32、64mM 3-NPA 的培养基加入各孔中 (每个浓度重复 6 孔), 对照孔每孔加入等体积的 F12 培养液, 继续培养 24h。
- ③ 弃去培养基, 每孔加入 150 μ L 的培养基和 50 μ L 1 x MTT 溶液, 37 $^{\circ}$ C 培养箱内孵育 4h, 使 MTT 还原为甲瓏。
- ④ 吸出上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO 使甲瓏溶解, 平板摇床摇匀或酶标仪内震荡 10-15min。
- ⑤ 酶标仪在 570 nm 波长处检测每孔的光密度, 试验重复 3 次。
- ⑥ 结果分析: 细胞存活率 = (加药细胞 OD/对照细胞 OD) $\times$ 100%。

1.2.4 颗粒细胞的 TUNEL 染色及凋亡率的测定

预先用 75% 的酒精将盖玻片浸泡 2-3 天，超净台内使用镊子轻轻夹起盖玻片置于酒精灯火焰上 1-2 秒，以达到祛除酒精和消毒目的，轻轻将盖玻片放置于 12 孔板内，将 2 个卵巢分离后得到的颗粒细胞悬液 150 μ L 加入到 12 孔板中的一个盖玻片之上，操作完毕后，立即将 12 孔板放入培养箱内培养，约 2-3 小时后，取出 12 孔板，每孔分别加入预热好的 1mL 的 F12 培养基，继续培养，待细胞汇合度达到 60-70% 时即可固定染色。

TUNEL 染色的具体步骤如下

- ① 吸出 12 孔板中的培养基，用预热的 PBS 清洗 2 次，每次 5min，尽量少洗，因为凋亡的细胞在洗的过程中，有可能脱落。
- ② 多聚甲醛固定 1h，预热的 PBS 清洗 2 次，每次 5min，37 $^{\circ}$ C 热台上烘干 5min。
- ③ 1% 的 TritonX-100 常温下穿透 15-20min，PBS 清洗 2 次，每次 5min，37 $^{\circ}$ C 热台上烘干 5min。
- ④ TUNEL 染色：TUNEL 染色液（酶：label = 1：9），每个载玻片上滴加 5 μ L，封口膜盖于染色液之上，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1h，PBS 清洗 3 次，每次 5min。
- ⑤ DAPI 染色：每个盖玻片上滴加 3 μ g/mL DAPI 工作液 50 μ L，染色 20min，PBS 清洗 3 次。
- ⑥ 将抗淬灭剂 5-10 μ L（抗淬灭剂：PBS = 1:200）滴加到载玻片上，然后将盖玻片转移到上边，置于激光共聚焦显微镜下观察。

颗粒细胞凋亡率的测定：激光共聚焦显微镜下观察，细胞核内出现绿色荧光凋亡小体为阳性细胞。40 倍物镜下计数 10 个不同视野中凋亡的颗粒细胞数。

1.2.5 MTT 法检测 VC、PC、NAC 对颗粒细胞存活率的影响

卵巢颗粒细胞经细胞计数后，按每孔约 2×10^4 个接种于 96 孔板，每孔 180 μ L，置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 相对湿度饱和的培养箱内培养，待颗粒细胞长至 60%~70 % 融合度时，进行以下实验：分别加入浓度为 0.5、1、2 mg/mL 的原花青素（PC）和 0.25、0.5、1 mg/mL 的 VC 和 N-乙酰半胱氨酸（NAC）20 μ L/孔，得到终浓度分别为（50 μ g、100 μ g、200 μ g/mL）的 PC 和（25 μ g、50 μ g、100 μ g/mL）的 VC 和 NAC，每组 6 个重复孔，同时设空白对照组和 3-NPA 组（24h 后加入药物），培养 24h 后，除对照组外，其余各组分别加入 200 μ L 16mM 浓度的 3-NPA 培养基，继续培养 24h 后，各孔均加入 50 μ L 1 x MTT 溶液，继续培养 4h，吸出上清液，每孔加入 150 μ L DMSO，平板摇床 10-15 min，酶标仪在 570 nm 波长处检测每孔的光密度，整

个实验重复 3 次。

1.2.6 颗粒细胞中 SOD 活性和 MDA 含量的测定

颗粒细胞接种于 6 孔板 共分为 5 组：阴性对照组、3-NPA 组、原花青素（PC）组（100 $\mu\text{g/mL}$ ）、维生素 C 组（100 $\mu\text{g/mL}$ ）、N-乙酰半胱氨酸组（100 $\mu\text{g/mL}$ ）。待细胞汇合度达到 60%左右,3 个抗氧剂组分别加入不同质量浓度的培养基培养 24h, 阴性对照组和 3-NPA 组则继续以 F12 培养基培养 24h, 然后除阴性对照组外, 每组均加入 2mL 16mM 浓度的 3-NPA 培养基, 培养 24h, 然后吸去各组颗粒细胞的培养液, PBS 洗涤颗粒细胞 2 次, 以细胞刮子刮下细胞, 1mL 冰生理盐水收集细胞, 冰浴中用超声破碎细胞, 体视显微镜下观察无颗粒细胞后, 分别按照试剂盒说明书操作, 测定颗粒细胞内 SOD 活性和 MDA 含量, 颗粒细胞的蛋白含量检测采用 BCA 方法进行测定。阴性对照整个过程中不做任何处理, 每组设 3 个平行孔, 整个实验重复 3 次。

1.2.7 颗粒细胞总 RNA 提取及定量 PCR

同第二章

表 1-1 实时荧光定量 PCR 反应引物序列和反应条件
Table 1-1 the Primer sequences for real-time RT-PCR

Gene	Accession Number	Primer sequences (5'-3')	Product size (bp)	Annealing Temperature (°C)
GAPDH	M32599	F:ACCACAGTCCATGCCATCAC R:TCCACCACCCTGTTGCTGTA	452	56
SOD2	NM_017051	F:ATGGTGGGGGACATATT R:GAACCTTGGACTCCCACAGA	166	57
Caspase	NM_009810.2	F: ACAGCACCTGGTTACTATTC R: CAGTTCTTTCGTGAGCAT	207	56
GP _x	NM_008160	F:GTCCACCGTGTATGCCTTCT R:TCTGCAGATCGTTCATCTCG	152	57
FoxO1	(NM_091739.3)	F CGTGCTTACAGCCTTCTA' R ACCTCCATCGTGACAAAA	181	58

2.8 统计分析

本研究中所有数据均以（平均值±标准误）表示, 所获数据应用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差或卡方分析, 组间差异性采用 LSD 法检验。判断标准以 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 为有统计学意义, 所有试验至少重复三次以上。

2 结果

2.1 小鼠卵巢颗粒细胞的形态学观察

小鼠卵巢颗粒细胞分离后的形态一般呈现圆形或椭圆形（见图 4-1 A）；小鼠卵巢颗粒细胞在体外培养 24h 后可呈现贴壁生长状态，形态由开始的圆形或椭圆形变为梭形或不规则的三角型（见图 4-1B）。小鼠卵巢颗粒细胞经 Giemsa 染色后，细胞核被染成紫红色，细胞质染成浅红色（见图 4-1C）。小鼠卵巢颗粒细胞经 HE 染色后，颗粒细胞核呈蓝色，胞浆呈红色（见图 4-1D）。

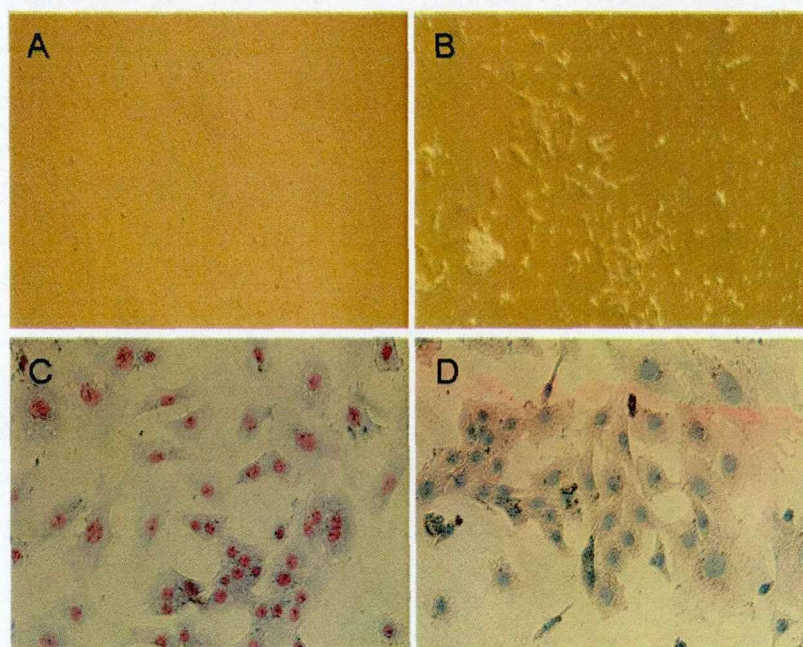


图 4-1 小鼠卵巢颗粒细胞形态学观察。A: 分离后的小鼠卵巢颗粒细胞（200 $\times$ ），B: 培养 24h 后的小鼠卵巢颗粒细胞（200 $\times$ ），C: 小鼠卵巢颗粒细胞的 Giemsa 染色（400 $\times$ ），D: 小鼠卵巢颗粒细胞的 HE 染色（400 $\times$ ）。

Fig 4-1 Morphology of cultured mouse ovarian granulosa cells from mouse ovaries. A: mouse ovarian granulosa cells after separation (200 $\times$), B: mouse ovarian granulosa cells cultured for 24h (200 $\times$), C: mouse ovarian granulosa cells stained with Giemsa (400 $\times$), D mouse ovarian granulosa cells stained with HE (400 $\times$).

2.2 不同浓度 3-NPA 对小鼠卵巢颗粒细胞增值活性的影响

MTT 法测定 0 – 64 mM 的 3-NPA 分别作用小鼠卵巢颗粒细胞 24h 后的细胞活性。在所测定的浓度范围内，3-NPA 对小鼠卵巢颗粒细胞活性具有明显的抑制作用，并且随着浓度的升高其抑制作用增强，呈现出明显的剂量效应关系。细胞抑制率达到 50% 时 3-NPA 的浓度约为 16-32 mM，具体变化如图 4-2 所示。

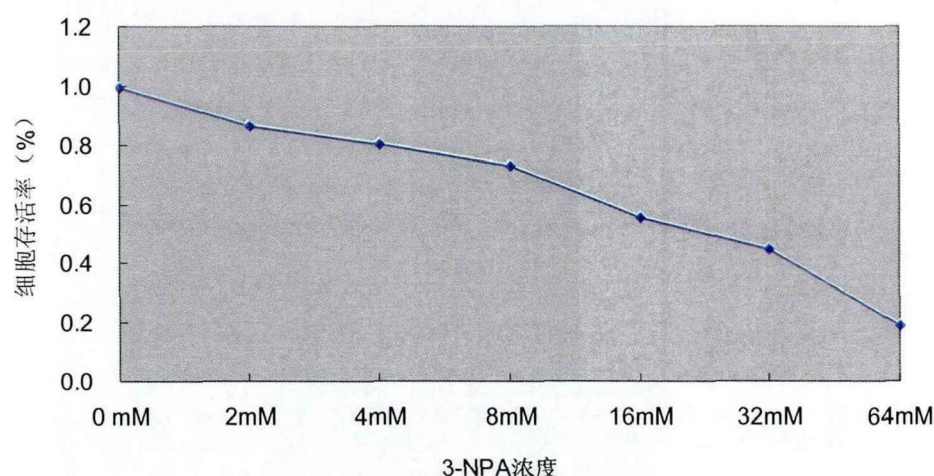
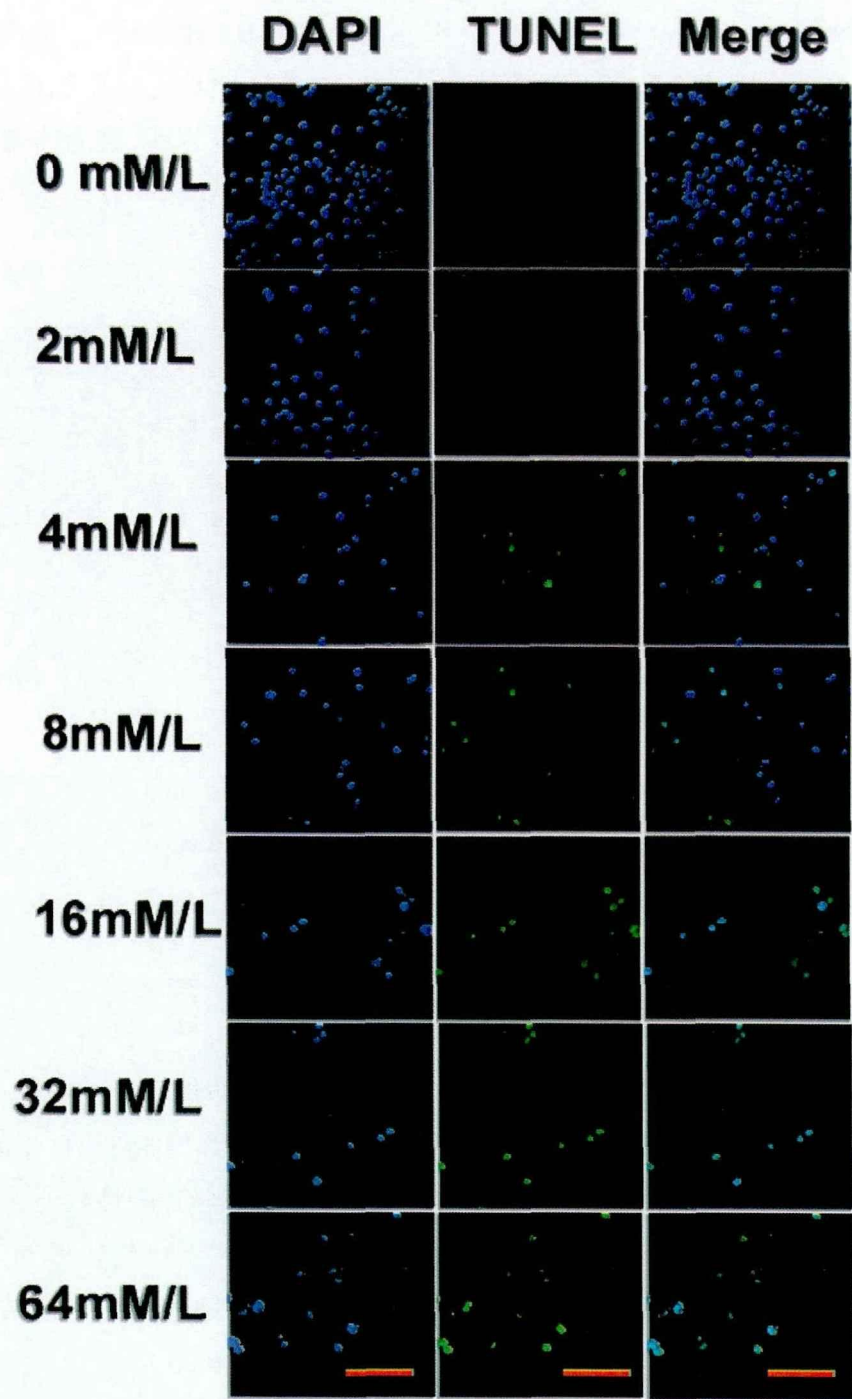


图 4-2 3-NPA 对卵巢颗粒细胞增殖抑制曲线

Fig 4-2 Inhibition curve of 3-NPA on ovarian granulosa cells proliferation

2.3 不同浓度 3-NPA 对颗粒细胞凋亡的影响

TUNEL 法测定了 0 - 64 mM 浓度梯度 3-NPA 对小鼠卵巢颗粒细胞作用 24h 的细胞凋亡率影响。在处理的浓度范围内，3-NPA 对小鼠卵巢颗粒细胞凋亡率的影响呈浓度梯度正相关关系，即细胞凋亡率随浓度增加而升高。TUNEL 阳性信号为亮绿色荧光，位于颗粒细胞核，性状呈现圆形或椭圆形，4 mM 浓度以上可见较多的亮绿色荧光信号（见图 4-3），0-2mM 则较少见到绿色荧光信号。颗粒细胞凋亡计数结果表明 16-64 mM 浓度较 0-8 mM 浓度组凋亡阳性细胞显著增多 ($P < 0.05$)。



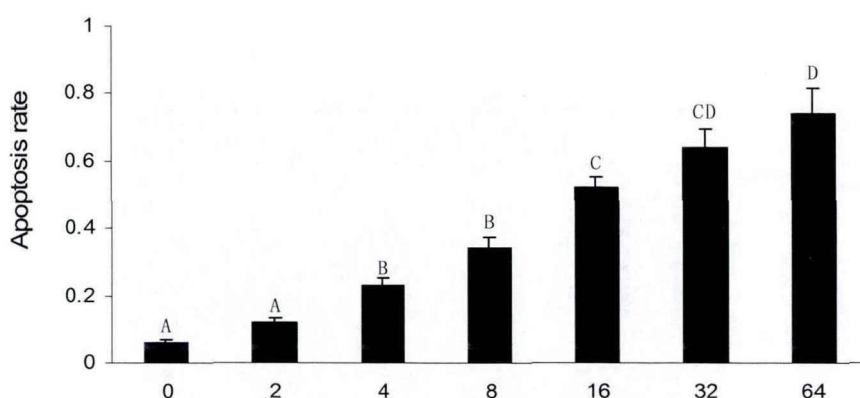


图 4-3 3-NPA 对小鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响

不同大写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

Fig 4-3 Effect of 3-NPA on percentage of apoptosis in ovarian granulosa cells

Different capitals indicate extremely difference ($P < 0.05$)

2.4 不同抗氧化剂对 3-NPA 损伤颗粒细胞凋亡率的影响

TUNEL 法测定了不同抗氧化剂 VC (100 $\mu\text{g/mL}$)、NAC (100 $\mu\text{g/mL}$)、PC (100 $\mu\text{g/mL}$) 与颗粒细胞共孵育后对颗粒细胞氧化损伤的保护作用。卵泡颗粒细胞经过 3-NPA 处理 24h, 3-NPA 组卵泡颗粒细胞的凋亡率显著升高, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。三种抗氧化剂与颗粒细胞共孵育后, 颗粒细胞凋亡率显著降低, 与 3-NPA 组相比, 差异均有显著统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4-4。

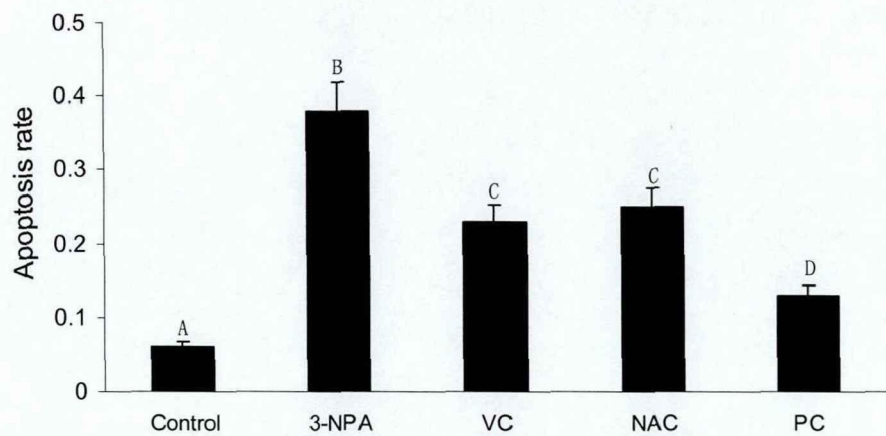
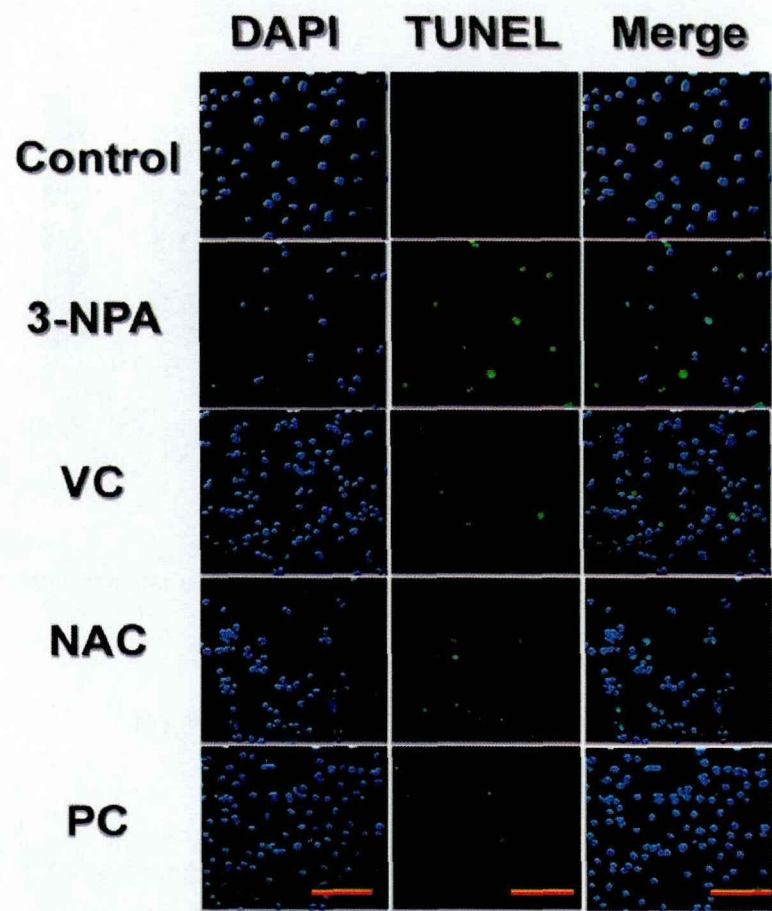


图 4-4 抗氧化剂对 3-NPA 损伤颗粒细胞凋亡率的影响

不同大写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

Fig 4-4 Effect of antioxidant on percentage of apoptosis in ovarian granulosa cells

Different capitals indicate extremely difference ($P < 0.05$)

2.5 不同抗氧化剂对 3-NPA 损伤颗粒细胞存活率的影响

MTT 法测定了不同浓度抗氧剂 VC(25、50、100 $\mu\text{g/mL}$)、NAC(25、50、100 $\mu\text{g/mL}$)、PC (50、100、200 $\mu\text{g/mL}$) 与颗粒细胞共孵育后对颗粒细胞氧化损伤的保护作用。卵泡颗粒细胞经过 3-NPA 处理 24h, 3-NPA 组卵泡颗粒细胞的存活率显著降低, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。三种不同浓度的抗氧剂与颗粒细胞共孵育后, VC-H (100 $\mu\text{g/mL}$)、PC L-H (50、100、200 $\mu\text{g/mL}$) 颗粒细胞存活率显著升高, 与 3-NPA 组相比, 差异均有显著统计学意义 ($P < 0.05$), VC L-M (25、50 $\mu\text{g/mL}$) 和 NAC L-H (25、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 颗粒细胞的存活率与 3-NPA 组相比较, 没有显著差异 ($P > 0.05$) 见图 4-5。

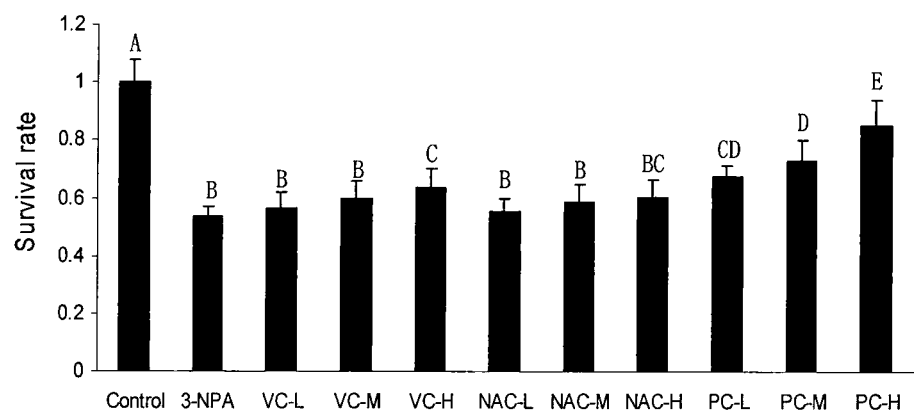


图 4-5 抗氧化剂对 3-NPA 损伤颗粒细胞存活率的影响

不同大写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

Fig 4-5 Effect of antioxidant on survival ratio in ovarian granulosa cells

Different capitals indicate extremely difference ($P < 0.05$)

2.6 不同抗氧化剂对 3-NPA 损伤颗粒细胞内 MDA 含量的影响

不同抗氧剂 VC (100 $\mu\text{g/mL}$)、NAC (100 $\mu\text{g/mL}$)、PC (100 $\mu\text{g/mL}$) 与颗粒细胞共孵育后, 采用硫代巴比妥酸法测定颗粒细胞中 MDA 的含量 (图 4-6)。卵泡颗粒细胞经过 3-NPA 处理 24h, 3-NPA 组卵泡颗粒细胞 MDA 含量显著升高, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。三种抗氧剂与颗粒细胞共孵育后, 颗粒细胞中 MDA 含量显著降低, 与 3-NPA 组相比, 差异均有显著统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4-6 。

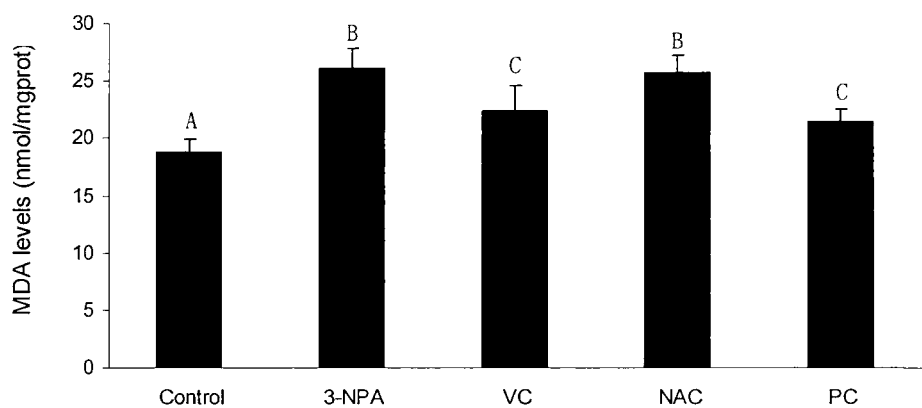


图 4-6 抗氧化剂对 3-NPA 损伤颗粒细胞内 MDA 水平的影响

不同大写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

Fig 4-6 Effect of antioxidant on MDA levels in ovarian granulosa cells

Different capitals indicate extremely difference ($P < 0.05$)

2.7 不同抗氧化剂对 3-NPA 损伤颗粒细胞内 SOD 活性的影响

不同抗氧化剂 VC (100 $\mu\text{g/mL}$)、NAC (100 $\mu\text{g/mL}$)、PC (100 $\mu\text{g/mL}$) 与颗粒细胞共孵育后，采用黄嘌呤氧化酶法测定颗粒细胞内超氧化物歧化酶 SOD 活性 (图 4-7)。卵泡颗粒细胞经过 3-NPA 处理 24h，3-NPA 组卵泡颗粒细胞 SOD 活性显著升高，与对照组相比，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。三种抗氧化剂与颗粒细胞共孵育后，颗粒细胞中 SOD 活性显著降低，与 3-NPA 组相比，差异均有显著统计学意义 ($P < 0.05$)，说明三种抗氧化剂均能降低代偿升高的 SOD 活性，见图 4-7。

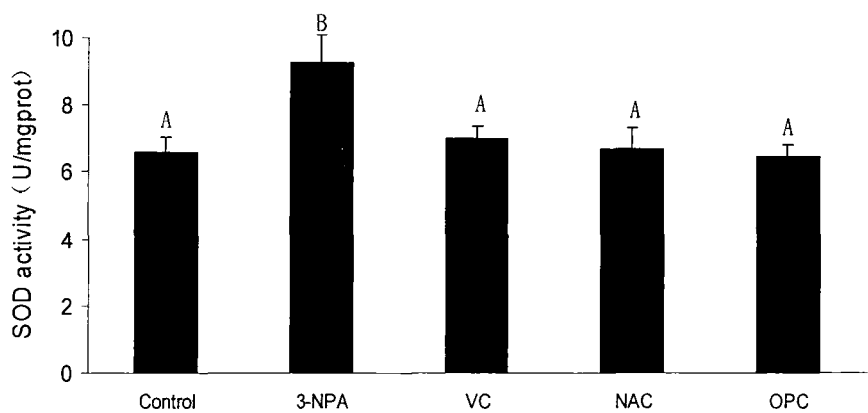


图 4-7 抗氧化剂对 3-NPA 损伤颗粒细胞内 SOD 活性的影响

不同大写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

Fig 4-7 Effect of antioxidant on SOD levels in ovarian granulosa cells

Different capitals indicate extremely difference ($P < 0.05$)

2.8 不同抗氧化剂对 3-NPA 损伤颗粒细胞内基因表达的影响

小鼠颗粒细胞与不同浓度抗氧化剂 VC-L、VC-H(25、100 $\mu\text{g/mL}$); NAC-L、NAC-H (25、100 $\mu\text{g/mL}$); PC-L、PC- H (50、200 $\mu\text{g/mL}$) 共孵育后分别检测了抗应激基因和凋亡基因在颗粒细胞中的表达情况。卵泡颗粒细胞经过 3-NPA 处理 24h, 3-NPA 组卵泡颗粒细胞中抗应激基因 (GPX、SOD、CAT) 的表达水平显著升高, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。VC-H、NAC-H、PC- H 三组颗粒细胞中抗应激基因 (GPX、SOD、CAT) 的表达水平显著降低, 与 3-NPA 组相比, 差异均有显著统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4-8 A 。

小鼠卵泡颗粒细胞经过 3-NPA 处理 24h, 3-NPA 组卵泡颗粒细胞中 Caspase-3 和 FoxO1 基因表达显著升高, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。VC-H、NAC-H、PC- H 三组颗粒细胞中 Caspase-3 和 FoxO1 基因表达显著降低, 与 3-NPA 组相比, 差异均有显著统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4-8 B 。

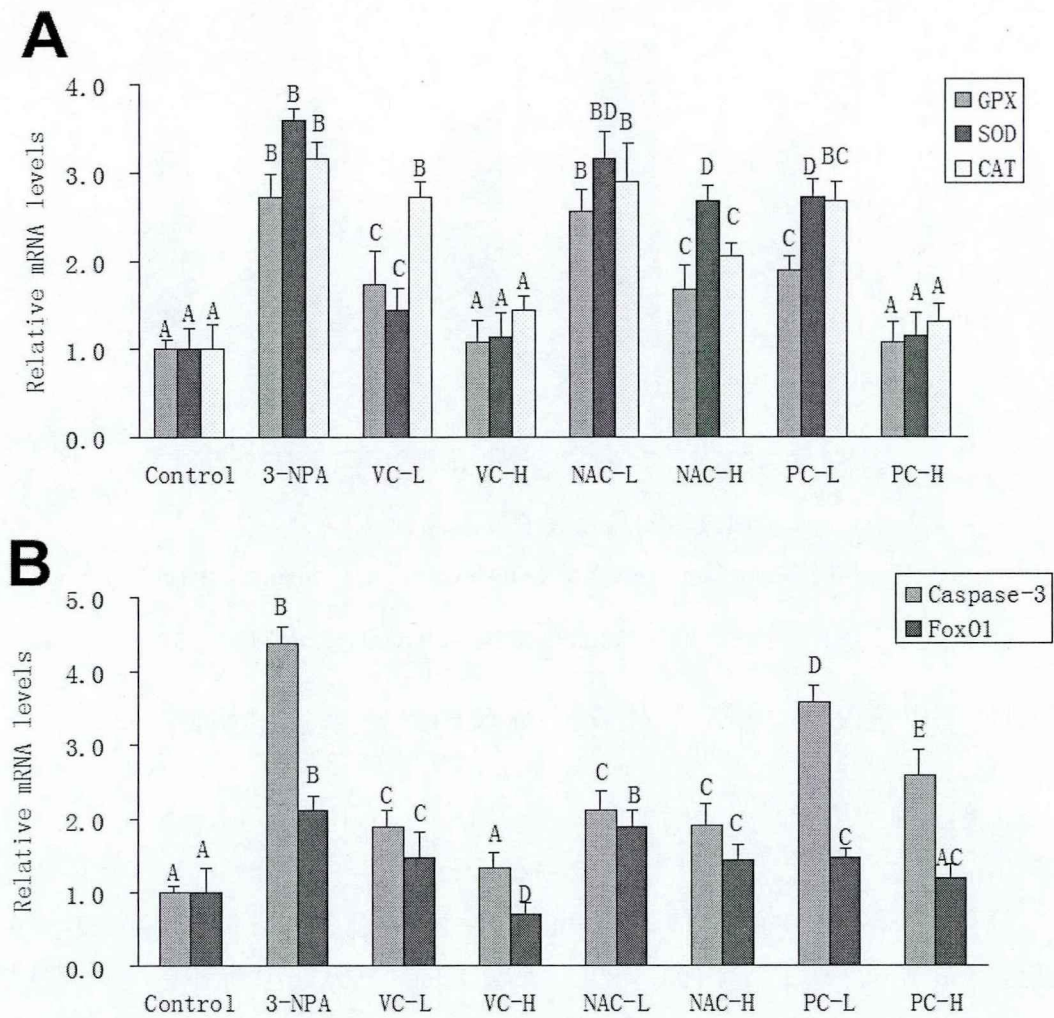


图 4-8 抗氧化剂对 3-NPA 损伤颗粒细胞基因表达水平的影响
不同大写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

Fig 4-8 Effect of antioxidant on mRNA expression levels in ovarian granulosa cells

Different capitals indicate extremely difference ($P < 0.05$)

3 讨论

研究表明, 在雌性动物正常卵泡周期性发育过程中, 不同时期卵泡闭锁的发生均与卵泡颗粒细胞的凋亡有着密切关系, 即卵泡闭锁的本质是颗粒细胞的凋亡。很多研究表明, 氧化应激是导致颗粒细胞凋亡的主要诱发因素之一, 并且这在鼠和猪的卵泡培养中已得到了证实^[22, 92, 137]。

线粒体是细胞内产生大量ROS来源的最重途径之一，并且对氧化应激极为敏感^[139]。3-NPA 其化学结构与琥珀酸类似，能够与线粒体复合酶II（琥珀酸脱氢酶）发生不可逆的结合，从而阻断了呼吸链和三羧酸循环，使线粒体膜电位发生变化，使能量的产生减少，最终产生大量ROS，导致细胞氧化损伤^[140, 141]。本研究结果显示3-NPA（8–64 mM/L）能够使小鼠卵泡颗粒细胞的凋亡率显著升高，由此我们可以推测出较高浓度的3-NPA很可能是通过改变颗粒细胞内线粒体膜电位的变化使其产生大量的ROS来发挥其诱导颗粒细胞发生凋亡的作用。

3-NPA致使线粒体复合体II的活性受到抑制，能够促使一些小蛋白，如细胞色素C等，使其从原本位于细胞内膜的位置返回到胞浆中。线粒体释放的细胞色素C会激活Caspase家族，此家族在细胞凋亡的过程中发挥着非常重要的作用，该家族可分为凋亡启动的上游，如Caspase 8、9、10，凋亡效应的下游，如Caspase 3、6、7^[142]。不同类型的哺乳动物细胞试验已表明，FoxO1能够通过激活凋亡相关的基因表达来诱导细胞凋亡^[143]。在本研究中Caspase -3和FoxO1 mRNA在3-NPA处理后表达水平显著升高，这表明3-NPA致颗粒细胞氧化损伤的作用很可能是通过FoxO1介导的途径来激活Caspase -3的表达，从而引起颗粒细胞凋亡的。

在正常情况下，有机体内活性氧ROS的生成与祛除处于动态平衡状态。当外界环境条件改变或机体遭遇各种疾病等因素时，机体内的这种动态平衡就会被扰乱，ROS会大量产生，为了有效地清除体内大量的ROS，机体就会动员体内各种防御机制包括酶类和非酶类抗氧化物质，从而降低ROS的水平，减少对机体的氧化损伤^[144, 145]。MDA和SOD是细胞受到氧化损伤最为代表性的指标。活性氧自由基能够与细胞膜上的多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应，并因此形成大量脂质过氧化物，如丙二醛（MDA），因此MDA的含量能够作为间接反应细胞内氧自由基含量和过氧化损伤程度的指标^[146, 147]。

超氧化物歧化酶SOD是一种非常重要的对抗氧化损伤的一种抗氧化物酶，它能使超氧阴离子转化为毒性较低的H₂O₂，过氧化氢酶可使其转变为无毒的H₂O。许多研究表明，3-NPA能够引起抗氧化物酶，如SOD、CAT，活性升高，酶的活性升高是为了消除过多的ROS，降低细胞氧化损伤的一种防御性反应^[148, 149]。我们的研究也表明，颗粒细胞中SOD的活性在3-NPA处理24h后明显升高，并且抗氧化剂的补充能够显著降低这种代偿性升高的活性。

本研究表明，在小鼠卵泡颗粒细胞的体外培养试验中，抗氧化剂VC、PC能够有效地降低氧化应激状态下小鼠卵泡颗粒细胞的凋亡率，提高颗粒细胞的存活率，并且高

浓度的VC和PC对抗细胞氧化损伤的作用更为显著。本研究为抗氧剂的临床应用提供了可靠详实的试验依据。

第五章 小鼠卵巢氧化应激对繁殖性能的影响

雌性哺乳动物的生殖能力取决于体内正常的卵巢功能,虽然在体内卵巢体积微小,但它是一个充满活力且功能强大的器官,它负责调节雌性动物的整个生殖活动,包括发情周期的调控、卵泡的募集、优势化、成熟、排卵等^[85, 150]。

在健康的机体内,活性氧自由基与抗氧化物的水平保持着一个动态平衡,当机体受到体内外环境的各种应激时,这种动态平衡就会受到破坏,造成体内ROS过多,导致机体内的不同组织受到氧化损害。氧化应激存在于机体的各个组织器官,卵巢氧化应激与多种生殖疾病有着密切的关系,如早期胚胎死亡、发育受阻、流产、死胎等。在人类辅助生殖领域,卵巢氧化应激可以影响卵泡的发育、卵子的成熟、受精率、胚胎质量、妊娠率^[31, 78, 151]。

卵泡内ROS含量过多,可以引起卵母细胞成熟障碍。研究表明,氧化应激可以导致卵母细胞凋亡,未受精卵母细胞2倍体发生率过高,染色体异常、胚胎胞质碎片和凋亡增加等。在女性输卵管积水的患者,输卵管内ROS水平与其囊胚形成率成负相关^[152]。ROS在哺乳动物生殖领域中的作用越来越受到关注,目前国内外很多研究主要集中于颗粒细胞凋亡、卵泡闭锁、卵母细胞氧化应激水平对于IVF的影响,但关于动物卵巢氧化应激模型的繁殖性能报道较少。

本研究以建立的小鼠卵巢氧化应激模型为基础,研究卵巢氧化应激对雌性小鼠体内生殖过程、胚胎发育、胚胎数量和胚胎重量的影响,为卵巢氧化应激引起雌性生殖能力下降的研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

3周龄(16~18g)清洁级ICR雌性小鼠购于南京市青龙山实验动物中心,小鼠分笼以后分别饲养在人工控温室(20~23℃)和人工光照(14h光照,10h黑暗)条件下,标准颗粒饲料饲喂,自由饮水和采食。母鼠先进行7d的标准化饲养,以调节生理周期,使其适应环境供实验使用。公鼠长期饲养于南京农业大学动物实验中心,每星期用4-6周龄母鼠进行合笼一次,见栓公鼠用于后续试验研究。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 主要试剂

孕马血清促性腺激素 (PMSG)、人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 购自浙江省宁波第二激素制药厂; 氢氧化钠、3-硝基丙酸 (3-NPA) 购自 Sigma 公司; 1mL 注射器、生理盐水 (500mL)、盖玻片、载玻片等购自南京农业大学试剂科。

1.2.2 主要仪器

恒温水浴锅: 北京医疗设备厂

电子天平: Sartorius BP210S

高速冷冻离心机: 德国 Eppendorf, 5810R 型

高压消毒锅: 上海申安医疗器械厂

SZ-51 型体视显微镜

OLYMPUS 单反数码相机

超净工作台

可调式微量移液器: Eppendorf

1.3 试验方法

1.3.1 小鼠发情鉴定

小鼠发情鉴定以阴道涂片法为主, 外阴观察法为辅的方法^[153-155]。小鼠发情的影响因素较多, 所以想准确的鉴定发情周期至少要进行 2 个周期以上才能确定。具体操作方法如下: 双手带上乳胶手套, 一手拿着镊子夹住小鼠尾巴, 将小鼠从笼子取出放在笼盖上, 以左手拇指和食指将其头背部皮肤固定, 其余手指固定其腰背部及尾巴, 右手持已吸好生理盐水的滴管在其阴道口处滴加一滴生理盐水, 左手稍放松腰背部, 此时生理盐水随即被吸入阴道内部, 稍候左手三指轻压腰部, 阴道黏液即随生理盐水流出现, 右手将其吸入滴管中, 然后滴到载玻片上, 空气中室温干燥, 待稍干后用甲醇固定 5min, 滴加姬姆萨染液进行染色 10-15min, 随后进行冲片、干燥, 镜检观察。

表 5-1 小鼠阴道涂片上皮细胞变化特点

Table 5-1 the various type of vaginal smear epithelial cells

阶 段	持续天数	小鼠阴道涂片细胞特点
发情前期	0.5~1.5	圆形有核上皮细胞占优势，少量白细胞，有时混有少量无核的角化上皮细胞，
发 情 期	1	几乎全为无核角化上皮细胞，细胞大而扁平，边缘不整齐
发情后期	1.2~2	大量的角化上皮细胞，常聚集成堆，出现许多白细胞及有核上皮细胞
发情间期	2~4	大量散在的白细胞，有时混有少量圆形有核上皮细胞

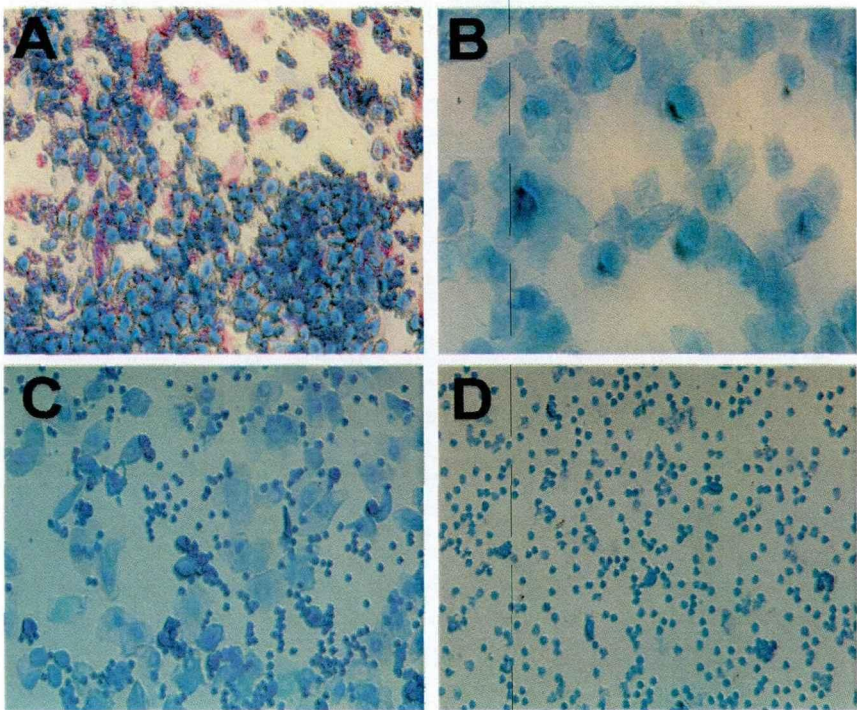
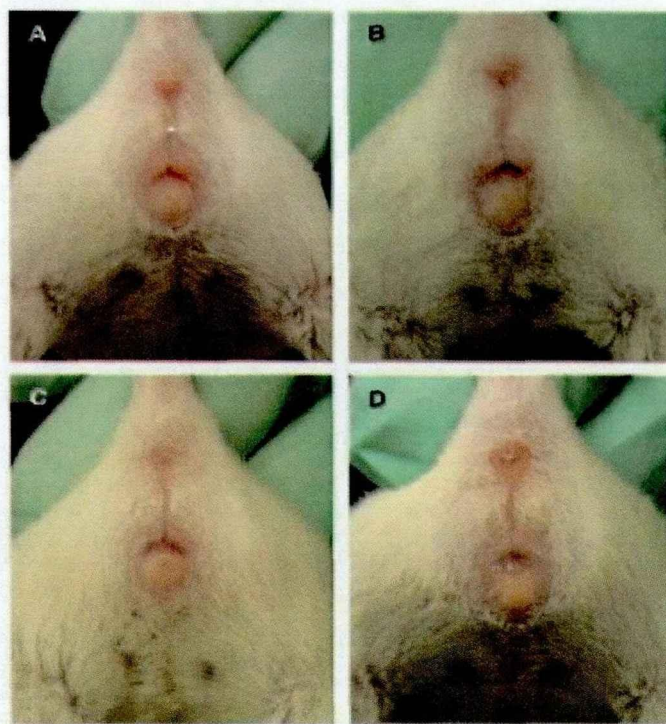


图 5-1 阴道涂片上皮细胞特点

A: 发情前期, B: 发情期, C: 发情后期, D: 间期

Fig 5-1 the various type of vaginal smear epithelial cells

(A) proestrus, (B) estrus, (C) metestrus, (D) diestrus

图 5-2 小鼠发情的外部观察法^[156]

A: 发情前期, B: 发情期, C: 发情后期, D: 间期

Fig 5-2 four stages of estrous in mouse

(A) proestrus (B) estrus, (C) metestrus, (D) diestrus

1.3.2 动物分组与药物注射

6周龄雌性小鼠60只, 随机分为对照组和实验组, 对照组小鼠每只腹腔内注射0.1mL的生理盐水, 实验组小鼠每只腹腔内注射0.1mL的3-NPA溶液(12.5 mg/kg)。对照组和试验组分别每日腹腔内注射2次(上午8:00, 晚上20:00), 连续注射7d。当药物和生理盐水注射到第5天时, 雌性小鼠于(晚上18:00)腹腔内注射PMSG 10U/只, 间隔48h, 腹腔注射hCG10U/只, 注射hCG后即与公鼠按1:1比例合笼。次日上午(8:00)检查阴道栓, 见栓着为妊娠0.5天。

1.3.3 胚胎发育情况的观察

孕鼠眼球摘除取血后, 颈椎脱臼处死, 从小鼠腹腔内取出肝、脾、肾、卵巢等内脏器官称重, 并计算各脏器系数(脏器指数=脏器重量/小鼠重量, 单位 mg/g), 每种

组织分成两份，一份于 4%的多聚甲醛固定，以备病理组织学观察，一份液氮冷冻保存用于 RNA 的提取。血液置于 4℃放置 30 min 后 4000 rpm 离心后取上清-80℃保存，以备激素及生化指标的测定。

对照组与实验组每组取 10 只在妊娠第 7.5 天时称重，然后颈椎脱臼处死，手术台上用剪刀沿腹中线剖开腹腔，取出子宫，从孕鼠子宫逐个取出胎鼠，体视显微镜下鉴别活胎和死胎，分别称重胚胎与子宫重量，同时记录活胚胎和死胚胎数量以及胚胎重量。其余 40 只小鼠分别在妊娠第 12.5 天和 18 天时颈椎脱臼处死，剖腹观察并记录各组的活胎数、死胎数和吸收胎数。

1.3.4 统计学分析

本研究中所有数据均以（平均值±标准误）表示，所获数据应用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差，组间差异采用 LSD 法检验。判断标准以 $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ 为有统计学意义，所有试验至少重复三次以上。

2 结果与分析

2.1 氧化应激对孕鼠体质量的影响

对照组和实验组在孕 0 d 和孕 7.5 d 体重和增重均无统计学意义 ($P > 0.05$) ,且随着孕鼠妊娠日龄的增加，两组孕鼠体重增加显著。对照组和实验组两组孕鼠在 12.5-18d 体重和增重变化出现显著差异，实验组孕鼠（3-NPA 诱导组）在妊娠第 12.5 d 时开始出现体重和增重明显下降，与对照相比体重和增重均差异显著 ($P < 0.05$)，两组孕鼠在妊娠第 18 d 时，对照组体重和增重均显著高于实验组 ($P < 0.05$)。

表 5-2 3-NPA 诱导的氧化应激对孕鼠体重的变化

Table 5-2 Effect of 3-NPA-induced oxidative stress on the body weight of pregnant mice

组 别	孕鼠 数量	孕 0 d	孕7.5 d		孕12.5 d		孕18 d	
		体重	体重	增重	体重	增重	体重	增重
对照组	17	25.63 ± 1.12	38.9 ± 1.53	13.28 ± 0.67	46.8 ± 1.45 ^a	21.18 ± 0.87 ^a	56.2 ± 3.16 ^a	30.58 ± 1.89 ^a
3-NPA	13	25.34 ± 1.14	37.6 ± 1.67	12.34 ± 0.76	43.2 ± 1.63 ^b	17.86 ± 0.59 ^b	51.4 ± 2.46 ^b	26.06 ± 1.45 ^b

注：同列数据肩注不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) , Note: Mean with the different small letters in the column were significantly different($P < 0.05$)。

2.2 氧化应激对小鼠繁殖能力的影响

实验组和对照组分别在注射 3-NPA 和生理盐水的第 5 d, 同时经 PMSG 处理, 48h 后注射 hCG, 然后与见栓小鼠进行 1:1 合笼, 实验结果如下表, 与对照组相比较, 实验组的见栓率和受孕率均显著降低 ($P < 0.05$)。和对照组相比较, 实验组在孕 7.5d、孕 12.5d 和孕 12.5d 胎仔鼠数量显著降低, 有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 5-3)。

表 5-3 3-NPA 诱导的氧化应激对小鼠繁殖能力的影响

Table 5-3 Effect of 3-NPA-induced oxidative stress on the fertility of mice

组 别	小 鼠 数 量	见 栓 数 (%)	受 孕 数 (%)	平均胎仔数		
				孕7.5 d	孕12.5d	孕18d
对照组	36	26 (72.2) ^a	20 (76.9) ^a	24.33±0.64 ^a	23.50±0.76 ^a	18.50±0.32 ^a
3-NPA	45	24 (53.3) ^b	16 (66.7) ^b	16.50±0.58 ^b	15.25±0.52 ^b	13.50±0.37 ^b

注: 同列数据肩注不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), Note: Mean with the different small letters in the column were significantly different ($P < 0.05$)

2.3 氧化应激对孕鼠内脏指数的影响

对照组和实验组在孕 7.5 d 时, 肝、脾、肾、卵巢各脏器指数在两组之间差异不显著 ($P > 0.05$), 与对照组相比较, 实验组(子宫+胚胎)的脏器指数显著降低 ($P < 0.05$)。对照组和实验组在孕 12.5 d 时, 肾和卵巢脏器指数在两组之间差异不显著 ($P > 0.05$), 与对照组相比较, 肝、子宫+胚胎的 2 个脏器指数在实验组中显著降低 ($P < 0.05$), 脾脏指数在实验组显著升高 ($P < 0.05$)。对照组和实验组在孕 18 d 时, 肝、肾和卵巢各内脏指数在各组之间差异不显著 ($P > 0.05$), 与对照组相比较, 脾脏指数在实验组显著升高 ($P < 0.05$), 和对照组相比较, 子宫+胚胎指数在试验组显著降低 ($P < 0.05$)。对照组在孕 7.5 d 至 12.5 d 时, 肝、脾、子宫+胚胎内脏指数呈现显著增高趋势 ($P < 0.05$), 肾和卵巢脏器指数呈现明显下降趋势 ($P < 0.05$); 在孕 12.5 d 至 18 d, 肝、脾、肾和卵巢脏器指数出现显著降低趋势 ($P < 0.05$), 子宫+胚胎脏器指数呈现显著升高趋势 ($P < 0.05$)。实验组组在孕 7.5 d 至 孕 12.5 d 时, 脾和子宫+胚胎指数出现显著升高趋势 ($P < 0.05$), 肝和肾内脏指数差异不显著 ($P > 0.05$), 卵巢指数呈现显著下降趋势 ($P < 0.05$); 在孕 12.5 d 至 18 d, 肝、脾和肾内脏指数呈现显著下降趋势 ($P < 0.05$)。

0.05)，卵巢指数也出现下降趋势，但差异不显著（ $P > 0.05$ ），子宫+胚胎指数呈明显升高趋势（ $P < 0.05$ ）（见表 5-4）。

表 5-4 3-NPA 诱导的氧化应激对孕鼠内脏指数的影响（mg/g）

Table 5-4 Effect of 3-NPA-induced oxidative stress on the organ index of pregnant mice (mg/g)

组别	孕鼠数量	内脏	孕 7.5 天	孕12.5 天	孕18 天
对照组	17	肝	64.05±1.72 ^{Aa}	70.08±2.02 ^{Ba}	56.30±2.31 ^{Ca}
		脾	5.02±0.22 ^{Aa}	8.18±0.38 ^{Ba}	3.66±0.21 ^{Ca}
		肾	11.04±0.27 ^{Aa}	9.75±0.32 ^{Ba}	7.84±0.25 ^{Ca}
		子宫+胚胎	24.22±2.53 ^{Aa}	170.30±16.31 ^{Ba}	367.89±18.23 ^{Ca}
		卵巢	0.94±0.06 ^{Aa}	0.74±0.02 ^{Ba}	0.67±0.01 ^{Ba}
3-NPA	13	肝	63.84±4.31 ^{Aa}	65.71±3.78 ^{Ab}	58.07±2.56 ^{Ba}
		脾	4.92±0.34 ^{Aa}	10.32±0.35 ^{Bb}	5.46±0.21 ^{Ab}
		肾	11.07±0.29 ^{Aa}	9.73±0.28 ^{Aa}	8.07±0.19 ^{Ba}
		子宫+胚胎	13.53±1.86 ^{Ab}	145.48±13.76 ^{Bb}	345.19±17.81 ^{Cb}
		卵巢	0.89±0.06 ^{Aa}	0.77±0.05 ^{Ba}	0.68±0.01 ^{Ba}

注：同行数据肩注不同大写字母表示差异显著（ $P < 0.05$ ），同列数据肩注不同小写字母表示差异显著（ $P < 0.05$ ），Note: Mean with the different capital letters in the same row were significantly different($P < 0.05$),Mean with the different small letters in the same column were significantly different ($P < 0.05$)

2.4 氧化应激对胎鼠重量的影响

与对照组相比较，胎仔鼠体重在孕 7.5d、12.5d 和 18d，体重显著下降，且存在显著性差异（ $P < 0.05$ ）（见表 5-5 和图 5-3）。

表 5-5 3-NPA 诱导的氧化应激对胎鼠数量和重量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5-5 Effect of 3-NPA-induced oxidative stress on the body weight and number of fetal mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	孕鼠数量	孕 7.5 天		孕12.5天		孕18天	
		胎仔数	胎鼠体重	胎仔数	胎鼠体重	胎仔数	胎鼠体重
对照	17	24.33±0.64 ^a	0.026±0.002 ^a	23.50±0.76 ^a	0.121±0.005 ^a	18.50±0.32 ^a	1.03±0.08 ^a
3-NPA	13	16.50±0.58 ^b	0.018±0.001 ^b	15.25±0.52 ^b	0.071±0.003 ^b	13.50±0.37 ^b	0.78±0.06 ^b

注：同列数据肩注不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) , Note: Mean with the different small letters in the same column were significantly different ($P < 0.05$)

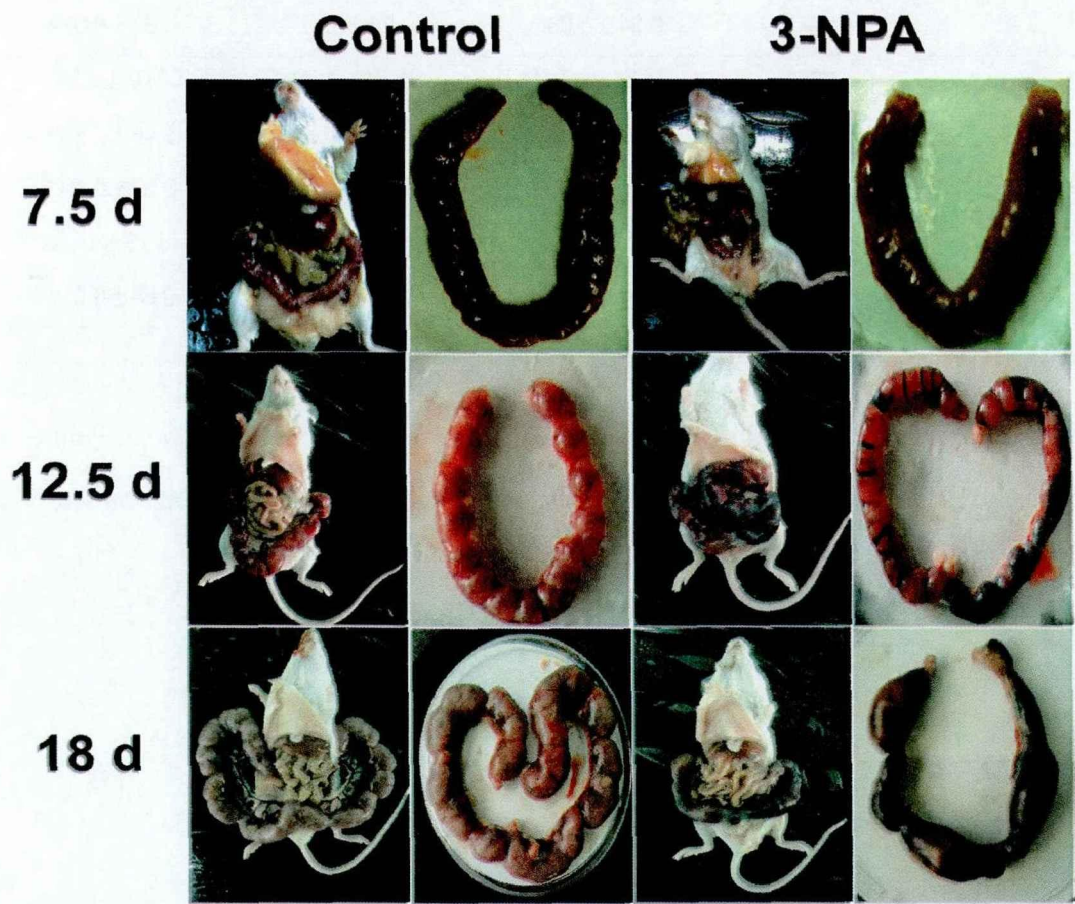


图 5-3 3-NPA 诱导的氧化应激对小鼠胚胎发育的影响

图-5-3 Effect of 3-NPA-induced oxidative stress on development of fetal mice

3 讨论

活性氧诱导的氧化应激与人类众多疾病有着密切的关系,如动脉粥样硬化、高血压、局部缺血再灌注、炎症、癌症、2-型糖尿病等^[157, 158]。目前,氧化应激也已成为人类妊娠相关疾病的重要致病因素^[159]。氧化应激在细胞凋亡调控上起着重要的作用,然而过高的ROS会引起病理性的组织损伤。大量研究显示ROS在辅助受孕和不孕的病理过程起着非常重要的作用,在子宫内膜异位、输卵管性、腹膜性及其它不明原因引起的不孕中起着同样的作用。

在妊娠的重要发育阶段,氧化应激可通过直接调控重要发育相关基因表达或间接氧化损伤重要功能细胞的脂类和蛋白等成分,从而对受孕和胚胎发育造成严重危害。Riesewijk^[160]和Sugino^[161]研究表明ROS不仅可以通过使胚胎着床前或着床期内重要功能基因的表达量下降而使着床失败,如人类claudin 4 基因,该基因在着床窗口时高度表达,还能通过提高PGF2 α 的表达水平引起子宫内膜脱落导致植入失败。此外,较高水平的NO与着床失败和受孕率降低也有着非常紧密的联系。本研究结果显示,卵巢氧化应激可以显著地降低小鼠的受孕率、怀胎数量和胎鼠重量,导致胚胎死亡率增加。我们的结果表明,实验组小鼠的受孕率显著低于对照组,我们推论引起这样的结果也可能是由于降低或提供胚胎植入前后子宫内膜基因表达造成的。

研究表明,ROS和抗氧化物存在于整个雌性生殖系统,包括于卵泡液、输卵管液、卵母细胞,胚胎及子宫内膜^[78, 162, 163]。众多的人类生殖系统的疾病,如子宫内膜异位、多囊卵巢综合征、输卵管堵塞及反复性流产等,都与高水平的ROS密切相关^[164]。在妊娠时,过高的ROS甚至可以引起黄体退化。Yang^[12]研究发现,高浓度的H₂O₂能够导致大量胚胎碎片Wang^[165]和Dong^[166]发现不孕妇女的腹水中具有高水平的ROS、NO和低水平的抗氧化物水平。

氧化应激与病理性妊娠有着紧密的联系,它可发生在妊娠的各个阶段,在怀孕早期胎盘部位容易发生氧化应激,但由于体内一些抗氧化物如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶及谷胱甘肽过氧化酶等活性的升高,能够及时清除过多的ROS,从而使得细胞免受妊娠所引起的氧化应激损伤,最终妊娠可以维持。Jauniaux^[167]通过测定孕早期胎盘血氧分压发现在正常妊娠母胎血液循环刚刚建立时,胎盘组织中发生了氧化应激。Raijmakers^[168]通过测定妊娠胎盘中活性氧产生酶-NADPH,发现正常妊娠的胎盘中具有较高水平的氧化应激。以上研究与所报道的孕期母体血液中存在高水平的MDA水平相一致。

环境中的污染物，如重金属、农药残留、烟草、粉尘颗粒等，这些都是体内过多ROS的来源且能够通过胎盘屏障进入胎儿血液中，最终对胎儿发育造成毒害作用^[169]。流行病学和试验数据表明，在妊娠期间接触环境中有害化学物质可导致早期胚胎的丢失、自发性流产、胚胎发育受阻和吸收、出生重及胎儿数量降低^[170, 171]。胎儿在子宫内接触外源性有害物质，可以导致氧化应激的产生并能够引起胎儿的毒性作用^[172]。本研究结果表明，卵巢氧化应激不仅可以降低孕鼠胎仔数量和不同发育时期胎儿的重量，而且还导致了胚胎死亡率的升高，我们推论这些结果很可能是由于氧化应激对卵母细胞造成的损害，从而导致胚胎的发育潜能降低造成死亡率升高、胎仔数和胎重量下降。

氧化应激对雌性生殖系统造成的危害已成为动物和人类生殖医学中的一个亟待解决的难题。妊娠失败导致的胎仔数降低给畜牧生产带来了巨大经济损失。环境质量、人类和动物健康三者之间紧密相连。因此，改善环境质量，降低污染，应用卵巢保护性抗氧化剂，三者有机结合起来才能为人类和动物生殖健康起到保护作用。

参考文献

- [1] Cadenas Enrique, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging [J]. Free radical biology & medicine, 2000, 29(3-4): 222.
- [2] Beckman Kenneth B, Ames Bruce N. The free radical theory of aging matures [J]. Physiological reviews, 1998, 78(2): 547-581.
- [3] Fang Yun-Zhong, Yang Sheng, Wu Guoyao. Free radicals, antioxidants, and nutrition [J]. Nutrition, 2002, 18(10): 872-879.
- [4] Bagchi D, Garg A, Krohn RL, etc. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins c and e, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro [J]. Research communications in molecular pathology and pharmacology, 1997, 95(2): 179.
- [5] Ames Bruce N, Shigenaga Mark K, Hagen Tory M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993, 90(17): 7915-7922.
- [6] Agarwal A., Saleh R. A., Bedaiwy M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction [J]. Fertil Steril, 2003, 79(4): 829-43.
- [7] Agarwal A., Gupta S., Sharma R.K. Role of oxidative stress in female reproduction [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2005, 3(28): 1-21.
- [8] Rizzo A., Roscino M., Binetti F., etc. Roles of reactive oxygen species in female reproduction [J]. Reprod Domest Anim, 2011.
- [9] Sikka Suresh C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function [J]. Current medicinal chemistry, 2001, 8(7): 851-862.
- [10] Agarwal Ashok, Aponte-Mellado Anamar, Premkumar Beena J, etc. The effects of oxidative stress on female reproduction: A review [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2012, 10(1): 49.
- [11] Goud A.P., Goud P.T., Diamond M.P., etc. Reactive oxygen species and oocyte aging: Role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2008, 44(7): 1295-1304.
- [12] Yang H.W., Hwang K.J., Kwon H.C., etc. Detection of reactive oxygen species (ros) and apoptosis in human fragmented embryos [J]. Human reproduction, 1998, 13(4): 998.
- [13] Liu Lin, Keefe David L. Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes [J]. Biology of Reproduction, 2000, 62(6): 1828-1834.
- [14] Fatehi A.N., Roelen B.A.J., Colenbrander B., etc. Presence of cumulus cells during in vitro

- p fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development [J].
- Zygote*
- , 2005, 13(02): 177-185.
- [15] Tatemoto Hideki, Muto Norio, Sunagawa Ikuko, etc. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: Role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid [J]. *Biology of Reproduction*, 2004, 71(4): 1150-1157.
- [16] Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, etc. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid [J]. *Clinica chimica acta*, 1995, 236(2): 173-180.
- [17] Bernal A. B., Vickers M. H., Hampton M. B., etc. Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(12): e15558.
- [18] Miyamoto K., Sato E. F., Kasahara E., etc. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(4): 674-81.
- [19] Circu M.L., Aw T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, 48(6): 749-762.
- [20] Simon H.U., Haj-Yehia A., Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ros) in apoptosis induction [J]. *Apoptosis*, 2000, 5(5): 415-418.
- [21] Chandra J., Samali A., Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 29(3-4): 323-333.
- [22] Tsai-Turton M., Luderer U. Opposing effects of glutathione depletion and follicle-stimulating hormone on reactive oxygen species and apoptosis in cultured preovulatory rat follicles [J]. *Endocrinology*, 2006, 147(3): 1224.
- [23] Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose - dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli [J]. *Cell proliferation*, 2008, 24(2): 203-214.
- [24] Sandstrom Paul A, Tebbey Paul W, Van Cleave S, etc. Lipid hydroperoxides induce apoptosis in t cells displaying a hiv-associated glutathione peroxidase deficiency [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(2): 798-801.
- [25] Dypbukt Jeanette M, Ankarcrona Maria, Burkitt Mark, etc. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting rinm5f cells. The role of intracellular polyamines [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(48): 30553-30560.
- [26] Al-Gubory K.H., Fowler P.A., Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2010, 42(10): 1634-1650.

- [27] Tilly Jonathan L, Kowalski Kim I, Johnson Alan L, etc. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression [J]. *Endocrinology*, 1991, 129(5): 2799-2801.
- [28] Lee K. S., Joo B. S., Na Y. J., etc. Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of ivf-et [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2001, 18(9): 490-8.
- [29] Corn Claudia Maria, Hauser-Kronberger Cornelia, Moser Marianne, etc. Predictive value of cumulus cell apoptosis with regard to blastocyst development of corresponding gametes [J]. *Fertility and sterility*, 2005, 84(3): 627-633.
- [30] Yuan YQ, Van Soom Ann, Leroy JLMR, etc. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence [J]. *Theriogenology*, 2005, 63(8): 2147-2163.
- [31] Chattopadhyay R, Ganesh A, Samanta J, etc. Effect of follicular fluid oxidative stress on meiotic spindle formation in infertile women with polycystic ovarian syndrome [J]. *Gynecologic and obstetric investigation*, 2009, 69(3): 197-202.
- [32] Zuelke Kurt A, Jones Dean P, Perreault Sally D. Glutathione oxidation is associated with altered microtubule function and disrupted fertilization in mature hamster oocytes [J]. *Biology of Reproduction*, 1997, 57(6): 1413-1419.
- [33] Kowaltowski Alicia J, Vercesi Anibal E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress [J]. *Free radical biology & medicine*, 1999, 26(3-4): 463.
- [34] Noda Y., Matsumoto H., Umaoka Y., etc. Involvement of superoxide radicals in the mouse two - cell block [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1991, 28(4): 356-360.
- [35] Tarin Juan J. Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos [J]. *Molecular Human Reproduction*, 1996, 2(10): 717-724.
- [36] Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, etc. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid [J]. *The Journal of neuroscience*, 1993, 13(10): 4181-4192.
- [37] Kim G.W., Copin J.C., Kawase M., etc. Excitotoxicity is required for induction of oxidative stress and apoptosis in mouse striatum by the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2000, 20(1): 119-129.
- [38] Ohgoh M., Shimizu H., Ogura H., etc. Astroglial trophic support and neuronal cell death: Influence of cellular energy level on type of cell death induced by mitochondrial toxin in cultured rat cortical neurons [J]. *J Neurochem*, 2000, 75(3): 925-33.
- [39] Brambrink A.M., Schneider A., Noga H., etc. Tolerance-inducing dose of 3-nitropropionic acid modulates bcl-2 and bax balance in the rat brain; a potential mechanism of chemical

- preconditioning [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2000, 20(10): 1425-1436.
- [40] Fontaine M. A., Geddes J. W., Banks A., etc. Effect of exogenous and endogenous antioxidants on 3-nitropropionic acid-induced in vivo oxidative stress and striatal lesions: Insights into huntington's disease [J]. *J Neurochem*, 2000, 75(4): 1709-15.
- [41] Wang J., Green PS, Simpkins JW. Estradiol protects against atp depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3 - nitropropionic acid in sk - n - sh human neuroblastoma cells [J]. *Journal of neurochemistry*, 2001, 77(3): 804-811.
- [42] Mandavilli B.S., Boldogh I., Van Houten B. 3-nitropropionic acid-induced hydrogen peroxide, mitochondrial DNA damage, and cell death are attenuated by bcl-2 overexpression in pc12 cells [J]. *Molecular brain research*, 2005, 133(2): 215-223.
- [43] Chiu Haw-Jyh, Fischman Donald A, Hammerling Ulrich. Vitamin a depletion causes oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and parp-1-dependent energy deprivation [J]. *The FASEB Journal*, 2008, 22(11): 3878-3887.
- [44] Chew Boon P. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health [J]. *Journal of Nutrition*, 1995, 125(6): 1804.
- [45] Hughes David A. Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-aged adults [J]. *Proceedings of the nutrition society*, 1999, 58(1): 79-84.
- [46] Palace Vince P, Khaper Neelam, Qin Qining, etc. Antioxidant potentials of vitamin a and carotenoids and their relevance to heart disease [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26(5): 746-761.
- [47] Smirnoff Nicholas. L-ascorbic acid biosynthesis [J]. *Vitamins & Hormones*, 2001, 61: 241-266.
- [48] Linster Carole L, Van Schaftingen Emile. Vitamin c [J]. *Febs Journal*, 2007, 274(1): 1-22.
- [49] Gardner Peter T, White Tamsin AC, McPhail Donald B, etc. The relative contributions of vitamin c, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices [J]. *Food Chemistry*, 2000, 68(4): 471-474.
- [50] Sahin K, Sahin N, Kucuk O. Effects of chromium, and ascorbic acid supplementation on growth, carcass traits, serum metabolites, and antioxidant status of broiler chickens reared at a high ambient temperature (32 c) [J]. *Nutrition Research*, 2003, 23(2): 225-238.
- [51] Dawson EB, Harris WA, Teter MC, etc. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers [J]. *Fertility and sterility*, 1992, 58(5): 1034.
- [52] Tarín JJ, Perez-Albala S, García-Pérez MA, etc. Effect of dietary supplementation with a mixture of vitamins c and e on fertilization of tertiary butyl hydroperoxide-treated oocytes and

- parthenogenetic activation in the mouse [J]. *Theriogenology*, 2002, 57(2): 869-881.
- [53] Hossein Mohammad Shamim, Hashem Md Abul, Jeong Yeon Woo, etc. Temporal effects of α -tocopherol and l-ascorbic acid on in vitro fertilized porcine embryo development [J]. *Animal Reproduction Science*, 2007, 100(1): 107-117.
- [54] Herrera E, Barbas C. Vitamin e: Action, metabolism and perspectives [J]. *Journal of physiology and biochemistry*, 2001, 57(1): 43-56.
- [55] Traber Maret G, Atkinson Jeffrey. Vitamin e, antioxidant and nothing more [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, 43(1): 4-15.
- [56] Stampfer Meir J, Hennekens Charles H, Manson JoAnn E, etc. Vitamin e consumption and the risk of coronary disease in women [J]. *New England Journal of Medicine*, 1993, 328(20): 1444-1449.
- [57] Rimm Eric B, Stampfer Meir J, Ascherio Alberto, etc. Vitamin e consumption and the risk of coronary heart disease in men [J]. *New England Journal of Medicine*, 1993, 328(20): 1450-1456.
- [58] Sigounas George, Anagnostou Athanasius, Steiner Manfred. D α -tocopherol induces apoptosis in erythroleukemia, prostate, and breast cancer cells [J]. 1997.
- [59] Jurczuk M, Brzóška MM, Moniuszko-Jakoniuk J. Hepatic and renal concentrations of vitamins e and c in lead-and ethanol-exposed rats. An assessment of their involvement in the mechanisms of peroxidative damage [J]. *Food and chemical toxicology*, 2007, 45(8): 1478-1486.
- [60] Brennan Lisa A, Morris Gerard M, Wasson Gillian R, etc. The effect of vitamin c or vitamin e supplementation on basal and h₂O₂-induced DNA damage in human lymphocytes [J]. *British Journal of Nutrition*, 2000, 84(02): 195-202.
- [61] Noda Yasuko, Anzai Kazunori, Mori Akitane, etc. Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized jes - fr30 esr spectrometer system [J]. *IUBMB life*, 1997, 42(1): 35-44.
- [62] Bagchi Debasis, Bagchi Manashi, Stohs Sidney J, etc. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006, 957(1): 260-270.
- [63] Lu Yinrong, Yeap Foo L. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace [J]. *Food Chemistry*, 2000, 68(1): 81-85.
- [64] Srivastava KC, Bordia A, Verma SK. Curcumin, a major component of food spice turmeric (*Curcuma longa*) inhibits aggregation and alters eicosanoid metabolism in human blood platelets [J]. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 1995, 52(4): 223-227.

- [65] Choi Hyunsung, Chun Yang-Sook, Kim Seung-Won, etc. Curcumin inhibits hypoxia-inducible factor-1 by degrading aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: A mechanism of tumor growth inhibition [J]. *Molecular pharmacology*, 2006, 70(5): 1664-1671.
- [66] Kalpana C, Sudheer AR, Rajasekharan KN, etc. Comparative effects of curcumin and its synthetic analogue on tissue lipid peroxidation and antioxidant status during nicotine-induced toxicity [J]. *Singapore medical journal*, 2007, 48(2): 124.
- [67] Kanai Shigeyuki, Okano Hideyuki. Mechanism of the protective effects of sumac gall extract and gallic acid on the progression of ccl4-induced acute liver injury in rats [J]. *The American journal of Chinese medicine*, 1998, 26(03n04): 333-341.
- [68] Kettawan Aikkarach, Kunthida Chitsopa, Takahashi Takayuki, etc. The quality control assessment of commercially available coenzyme q10-containing dietary and health supplements in japan [J]. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 2007, 41(2): 124.
- [69] Draï J, Bannier E, Chazot C, etc. Oxidants and antioxidants in long-term haemodialysis patients [J]. *Il Farmaco*, 2001, 56(5): 463-465.
- [70] Trevisan Maurizio, Browne Richard, Ram Malathi, etc. Correlates of markers of oxidative status in the general population [J]. *American journal of epidemiology*, 2001, 154(4): 348-356.
- [71] Miyamura M, Yoshida M, Hamano S, etc. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes [J]. *Theriogenology*, 1995, 43(1): 282-282.
- [72] Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, etc. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor [J]. *Theriogenology*, 2000, 54(5): 787-797.
- [73] de Matos Daniel G, Gasparrini Bianca, Pasqualini Sergio R, etc. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content [J]. *Theriogenology*, 2002, 57(5): 1443-1451.
- [74] Ahmadi Ali, Ng Soon - Chye. Fertilizing ability of DNA - damaged spermatozoa [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1999, 284(6): 696-704.
- [75] Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, etc. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing ivf: Relationship to outcome [J]. *Human reproduction*, 2003, 18(11): 2270-2274.
- [76] Agarwal Ashok, Gupta Sajal, Sikka Suresh. The role of free radicals and antioxidants in reproduction [J]. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 2006, 18(3): 325-332.
- [77] Gupta Sajal, Agarwal Ashok, Banerjee Jashoman, etc. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: A systematic review [J]. *Obstetrical &*

- gynecological survey, 2007, 62(5): 335.
- [78] Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings [J]. Human Reproduction Update, 2001, 7(2): 175-189.
 - [79] Pasqualotto Eleonora B, Agarwal Ashok, Sharma Rakesh K, etc. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures [J]. Fertility and sterility, 2004, 81(4): 973-976.
 - [80] Agarwal Ashok, Said Tamer M, Bedaiwy Mohamed A, etc. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting [J]. Fertility and sterility, 2006, 86(3): 503-512.
 - [81] Buczyńska ALINA, Szadkowska-Stańczyk IRENA. Identification of health hazards to rural population living near pesticide dump sites in poland [J]. Int J Occup Med Environ Health, 2005, 18(4): 331-339.
 - [82] Taupeau C., Poupon J., Nomé F., etc. Lead accumulation in the mouse ovary after treatment-induced follicular atresia [J]. Reproductive Toxicology, 2001, 15(4): 385-391.
 - [83] Stämpfli Martin R, Anderson Gary P. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer [J]. Nature Reviews Immunology, 2009, 9(5): 377-384.
 - [84] Hoyer Patricia B, Sipes I Glenn. Development of an animal model for ovotoxicity using 4 - vinylcyclohexene: A case study [J]. Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology, 2007, 80(2): 113-125.
 - [85] Behrman H. R., Kodaman P. H., Preston S. L., etc. Oxidative stress and the ovary [J]. Journal of the Society for Gynecologic Investigation, 2001, 8(1): S40-S42.
 - [86] Lima-Verde I. B., Bruno J. B., Matos M. H. T., etc. Implications of oxidative stress in the mammalian ovary and embryo [J]. Medicina Veterinaria-Recife, 2007, 1(1): 81-88.
 - [87] Gabrielson K.L., Hogue B.A., Bohr V.A., etc. Mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces cardiac and neurotoxicity differentially in mice [J]. The American journal of pathology, 2001, 159(4): 1507.
 - [88] Schauwecker PE, Steward O. Genetic determinants of susceptibility to excitotoxic cell death: Implications for gene targeting approaches [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94(8): 4103.
 - [89] Gould D. H., Gustine D. L. Basal ganglia degeneration, myelin alterations, and enzyme inhibition induced in mice by the plant toxin 3-nitropropanoic acid [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 1982, 8(5): 377-93.
 - [90] Beal M.F., Ferrante R.J., Henshaw R., etc. 3 - nitropropionic acid neurotoxicity is attenuated in

- p style="text-indent: 2em;">copper/zinc superoxide dismutase transgenic mice [J].
- Journal of neurochemistry*
- , 1995, 65(2): 919-922.
- [91] Jančar N., Kopitar A.N., Ihan A., etc. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development [J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2007, 24(2): 91-97.
 - [92] Tilly J. L., Tilly K. I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles [J]. *Endocrinology*, 1995, 136(1): 242-52.
 - [93] Lee K.S., Joo B.S., Na Y.J., etc. Clinical assisted reproduction: Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of ivf-et [J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2001, 18(9): 490-498.
 - [94] Corn C. M., Hauser-Kronberger C., Moser M., etc. Predictive value of cumulus cell apoptosis with regard to blastocyst development of corresponding gametes [J]. *Fertil Steril*, 2005, 84(3): 627-33.
 - [95] Tilly J.L. Molecular and genetic basis of normal and toxicant-induced apoptosis in female germ cells [J]. *Toxicology letters*, 1998, 102: 497-501.
 - [96] Flaws J.A., Hirshfield A.N., Hewitt J.A., etc. Effect of bcl-2 on the primordial follicle endowment in the mouse ovary [J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 64(4): 1153.
 - [97] Lee C.J., Park H.H., Do B.R., etc. Natural and radiation-induced degeneration of primordial and primary follicles in mouse ovary [J]. *Animal Reproduction Science*, 2000, 59(1-2): 109-117.
 - [98] Banu S.K., Samuel J.B., Arosh J.A., etc. Lactational exposure to hexavalent chromium delays puberty by impairing ovarian development, steroidogenesis and pituitary hormone synthesis in developing wistar rats [J]. *Toxicology and applied pharmacology*, 2008, 232(2): 180-189.
 - [99] Jurisicova A., Taniuchi A., Li H., etc. Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons diminishes murine ovarian reserve via induction of harakiri [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2007, 117(12): 3971.
 - [100] Seino T., Saito H., Kaneko T., etc. Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an in vitro fertilization-embryo transfer program [J]. *Fertil Steril*, 2002, 77(6): 1184-90.
 - [101] Tatemoto H., Sakurai N., Muto N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: Role of cumulus cells [J]. *Biology of Reproduction*, 2000, 63(3): 805-810.
 - [102] Suzuki T., Sugino N., Fukaya T., etc. Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries:

- Immunohistochemical localization and characterization [J]. *Fertil Steril*, 1999, 72(4): 720-6.
- [103] Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, etc. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation [J]. *IUBMB life*, 2001, 51(1): 57-64.
- [104] Tarín J.J., Pérez - Albalá S., Cano A. Oral antioxidants counteract the negative effects of female aging on oocyte quantity and quality in the mouse [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2002, 61(3): 385-397.
- [105] Ebisch IMW, Thomas CMG, Peters WHM, etc. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility [J]. *Human Reproduction Update*, 2007, 13(2): 163.
- [106] Tamura H., Takasaki A., Miwa I., etc. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate [J]. *Journal of pineal research*, 2008, 44(3): 280-287.
- [107] Fu Y.T., He F.S., Zhang S.L., etc. Lipid peroxidation in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid [J]. *Toxicon*, 1995, 33(3): 327-331.
- [108] Tunez I., Montilla P., Del Carmen Munoz M., etc. Protective effect of melatonin on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes in an animal model of huntington's disease [J]. *J Pineal Res*, 2004, 37(4): 252-6.
- [109] PEDERSEN TORBEN, Peters Hannah. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary [J]. *Journal of reproduction and fertility*, 1968, 17(3): 555-557.
- [110] Wang XN, Roy SHYAMAL K, Greenwald GS. In vitro DNA synthesis by isolated preantral to preovulatory follicles from the cyclic mouse [J]. *Biology of Reproduction*, 1991, 44(5): 857-863.
- [111] Borgeest C, Symonds D, Mayer LP, etc. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse [J]. *Toxicological sciences*, 2002, 68(2): 473-478.
- [112] Agarwal Ashok, Saleh Ramadan A, Bedaiwy Mohamed A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction [J]. *Fertility and sterility*, 2003, 79(4): 829-843.
- [113] Ruder E. H., Hartman T. J., Blumberg J., etc. Oxidative stress and antioxidants: Exposure and impact on female fertility [J]. *Hum Reprod Update*, 2008, 14(4): 345-57.
- [114] Ruder E. H., Hartman T. J., Goldman M. B. Impact of oxidative stress on female fertility [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2009, 21(3): 219-22.
- [115] Bagchi Debasis, Bagchi Manashi, Stohs Sidney J, etc. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention [J]. *Toxicology*,

- 2000, 148(2): 187-197.
- [116] Hung Li-Man, Chen Jan-Kan, Huang Shiang-Suo, etc. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes [J]. Cardiovascular research, 2000, 47(3): 549-555.
- [117] Allard Johane P, Aghdassi Elaheh, Chau Jenny, etc. Effects of vitamin e and c supplementation on oxidative stress and viral load in hiv-infected subjects [J]. Aids, 1998, 12(13): 1653-1659.
- [118] Chow Ching Kuang. Vitamin e and oxidative stress [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1991, 11(2): 215-232.
- [119] Coutoudis Anna, Pillay Kubendran, Spooner Elizabeth, etc. Randomized trial testing the effect of vitamin a supplementation on pregnancy outcomes and early mother-to-child hiv-1 transmission in durban, south africa [J]. Aids, 1999, 13(12): 1517-1524.
- [120] Alessio Helaine M, Goldfarb Allan H, Cao GUOHUA. Exercise-induced oxidative stress before and after vitamin c supplementation [J]. International journal of sport nutrition, 1997, 7(1): 1.
- [121] Luck Martin R, Jeyaseelan Indira, Scholes Rachel A. Ascorbic acid and fertility [J]. Biology of Reproduction, 1995, 52(2): 262-266.
- [122] Crha I, Hrubá D, Ventruba P, etc. Ascorbic acid and infertility treatment [J]. Central European journal of public health, 2003, 11(2): 63.
- [123] Carbone MC, Tatone C, Delle Monache S, etc. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: Characterization and age - dependent changes [J]. Molecular Human Reproduction, 2003, 9(11): 639-643.
- [124] Shan Xiaoqin, Aw Tak Yee, Jones Dean P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury [J]. Pharmacology & therapeutics, 1990, 47(1): 61-71.
- [125] Lopez Sarah G, Luderer Ulrike. Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2004, 36(11): 1366-1377.
- [126] Luderer Ulrike, Kavanagh Terrance J, White Collin C, etc. Gonadotropin regulation of glutathione synthesis in the rat ovary [J]. Reproductive Toxicology, 2001, 15(5): 495-504.
- [127] Ho Ye-Shih, Gargano Mary, Cao Jin, etc. Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase [J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(13): 7765-7769.
- [128] Prakasam A, Sethupathy S, Lalitha S. Plasma and rbc's antioxidant status in occupational male pesticide sprayers [J]. Clinica chimica acta, 2001, 310(2): 107-112.
- [129] Brad AM, Bormann CL, Swain JE, etc. Glutathione and adenosine triphosphate content of in vivo and in vitro matured porcine oocytes [J]. Molecular Reproduction and Development, 2003, 64(4): 492-498.

- [130] Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development [J]. *Theriogenology*, 2003, 59(3): 939-949.
- [131] Chen Chi, Yu Rong, Owuor Edward D, etc. Activation of antioxidant-response element (are), mitogen-activated protein kinases (mapks) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death [J]. *Archives of pharmacal research*, 2000, 23(6): 605-612.
- [132] Shen Shi-Qiang, Zhang Yuan, Xiang Jin-Jian, etc. Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2007, 13(13): 1953.
- [133] Nishinaka Toru, Ichijo Yusuke, Ito Maki, etc. Curcumin activates human glutathione*s*-transferase p1 expression through antioxidant response element [J]. *Toxicology letters*, 2007, 170(3): 238-247.
- [134] Pandey Kanti Bhooshan, Rizvi Syed Ibrahim. Protective effect of resveratrol on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to in vitro oxidative insult [J]. *Phytotherapy Research*, 2010, 24(S1): S11-S14.
- [135] Bagchi D, Garg A, Krohn RL, etc. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against tpa-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice [J]. *General pharmacology*, 1998, 30(5): 771.
- [136] Koga Takuro, Moro Keiko, Nakamori Kaoru, etc. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1999, 47(5): 1892-1897.
- [137] Murdoch WJ. Inhibition by oestradiol of oxidative stress-induced apoptosis in pig ovarian tissues [J]. *Journal of reproduction and fertility*, 1998, 114(1): 127.
- [138] Latchoumycandane C, Chitra KC, Mathur PP. The effect of methoxychlor on the epididymal antioxidant system of adult rats [J]. *Reproductive Toxicology*, 2002, 16(2): 161-172.
- [139] De Lamirande E., Gagnon C. Reactive oxygen species (ros) and reproduction [J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 1994, 366: 185.
- [140] Liot G, Bossy B., Lubitz S., etc. Complex ii inhibition by 3-np causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an nmda-and ros-dependent pathway [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2009, 16(6): 899-909.
- [141] Pang Z., Geddes J.W. Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: Acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis [J]. *The Journal of*

- neuroscience, 1997, 17(9): 3064-3073.
- [142] Shi Yigong. Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view [J]. Protein Science, 2004, 13(8): 1979-1987.
- [143] Urbich Carmen, Knau Andrea, Fichtlscherer Stephan, etc. Foxo-dependent expression of the proapoptotic protein bim: Pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells [J]. The FASEB Journal, 2005, 19(8): 974-976.
- [144] Wang X., Falcone T., Attaran M., etc. Vitamin c and vitamin e supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate [J]. Fertility and sterility, 2002, 78(6): 1272-1277.
- [145] Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species [J]. The Journal of physiology, 2003, 552(2): 335-344.
- [146] Kinnula VUOKKO L, Everitt JEFF I, Whorton A RICHARD, etc. Hydrogen peroxide production by alveolar type ii cells, alveolar macrophages, and endothelial cells [J]. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 1991, 261(2): L84-L91.
- [147] Yeligar Samantha M, Harris Frank L, Hart C Michael, etc. Ethanol induces oxidative stress in alveolar macrophages via upregulation of nadph oxidases [J]. The Journal of Immunology, 2012, 188(8): 3648-3657.
- [148] Binienda Zbigniew, Simmons Cathy, Hussain Saber, etc. Effect of acute exposure to 3-nitropropionic acid on activities of endogenous antioxidants in the rat brain [J]. Neuroscience Letters, 1998, 251(3): 173-176.
- [149] Binienda Zbigniew K, Ali Syed F. Neuroprotective role of l-carnitine in the 3-nitropropionic acid induced neurotoxicity [J]. Toxicology letters, 2001, 125(1): 67-73.
- [150] Johnson A.L., Bridgham J.T. Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary [J]. Reproduction, 2002, 124(1): 19.
- [151] Jauniaux Eric, Poston Lucilla, Burton Graham J. Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution [J]. Human Reproduction Update, 2006, 12(6): 747-755.
- [152] Bedaiwy Mohamed A, Goldberg Jeffrey M, Falcone Tommaso, etc. Relationship between oxidative stress and embryotoxicity of hydrosalpingeal fluid [J]. Human reproduction, 2002, 17(3): 601-604.
- [153] Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, etc. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging c57bl/6j mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology [J]. Biology of Reproduction, 1982, 27(2): 327-339.

- [154] Monies GS, Luque EH. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat [J]. *Cells Tissues Organs*, 1988, 133(3): 192-199.
- [155] CHAMPLIN ARTHUR K, DORR DARROLD L, GATES ALLEN H. Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina [J]. *Biology of Reproduction*, 1973, 8(4): 491-494.
- [156] Byers Shannon L, Wiles Michael V, Dunn Sadie L, etc. Mouse estrous cycle identification tool and images [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(4): e35538.
- [157] Dlasková Andrea, Hlavatá Lydie, Ježek Petr. Oxidative stress caused by blocking of mitochondrial complex $\text{I} + \text{IV}$ pumping as a link in aging/disease vicious cycle [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008, 40(9): 1792-1805.
- [158] Valko Marian, Leibfritz Dieter, Moncol Jan, etc. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, 39(1): 44-84.
- [159] Gupta Sajal, Agarwal Ashok, Banerjee Jashoman, etc. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: A systematic review [J]. *Obstetrical & gynecological survey*, 2007, 62(5): 335-347.
- [160] Riesewijk Anne, Martín Julio, van Os Roselinde, etc. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days $\text{LH} + 2$ versus $\text{LH} + 7$ by microarray technology [J]. *Molecular Human Reproduction*, 2003, 9(5): 253-264.
- [161] Sugino Norihiro, Nakata Masahiko, Kashida Shiro, etc. Decreased superoxide dismutase expression and increased concentrations of lipid peroxide and prostaglandin $\text{f}_2\alpha$ in the decidua of failed pregnancy [J]. *Molecular Human Reproduction*, 2000, 6(7): 642-647.
- [162] Jozwik Marcin, Wolczynski Slawomir, Jozwik Michal, etc. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans [J]. *Molecular Human Reproduction*, 1999, 5(5): 409-413.
- [163] Paszkowski T, Clarke RN, Hornstein MD. Smoking induces oxidative stress inside the graafian follicle [J]. *Human reproduction*, 2002, 17(4): 921-925.
- [164] Iborra Antoni, Palacio J, Martínez Paz. Oxidative stress and autoimmune response in the infertile woman [J]. 2005.
- [165] Wang Yongjin, Sharma Rakesh K, Falcone Tommaso, etc. Importance portance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility [J]. *Fertility and sterility*, 1997, 68(5): 826-830.
- [166] Dong MINYUE, Shi YIFU, Cheng Q, etc. Increased nitric oxide in peritoneal fluid from women

- with idiopathic infertility and endometriosis [J]. The Journal of reproductive medicine, 2001, 46(10): 887-891.
- [167] Jauniaux Eric, Watson Adrian L, Hempstock Joanne, etc. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress: A possible factor in human early pregnancy failure [J]. The American journal of pathology, 2000, 157(6): 2111-2122.
- [168] Rajmakers MTM, Peters WHM, Steegers EAP, etc. Nad (p) h oxidase associated superoxide production in human placenta from normotensive and pre-eclamptic women [J]. Placenta, 2004, 25: S85-S89.
- [169] Barr Dana B, Bishop Amanda, Needham Larry L. Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit [J]. Reproductive Toxicology, 2007, 23(3): 260-266.
- [170] Khattak Sohail, Guiti K, McMartin Kristen, etc. Pregnancy outcome following gestational exposure to organic solvents [J]. JAMA: the journal of the American Medical Association, 1999, 281(12): 1106-1109.
- [171] Buczyńska ALINA, Tarkowski STANISŁAW. Environmental exposure and birth outcomes [J]. Int J Occup Med Environ Health, 2005, 18: 225-232.
- [172] Wan Joanne, Winn Louise M. In utero-initiated cancer: The role of reactive oxygen species [J]. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 2006, 78(4): 326-332.

全文结论

- 1、ICR 雌性小鼠腹腔内注射 3-NPA (12.5mg/kg), 连续 7 天, 可引起卵巢氧化应激的发生, 应激效应可以引起颗粒细胞凋亡, 大卵泡闭锁和卵巢组织中 ROS 的升高。
- 2、通过给予卵巢氧化应激的小鼠补充不同生物活性的抗氧化剂后, 姜黄素、原花青素、白藜芦醇和胡萝卜素 4 种抗氧化剂可显著降低卵巢组织中 ROS 的水平, 提高卵巢的重量和降低代偿升高的抗氧化酶活性, 表明天然多酚类抗氧化剂 (姜黄素、原花青素、白藜芦醇) 和胡萝卜素对卵巢氧化应激的具有很好的保护作用。
- 3、在体外试验中, 抗氧化剂 VC 和原花青素能够有效地降低氧化应激状态下小鼠卵泡颗粒细胞的凋亡, 高浓度 VC 和原花青素的保护作用更为显著。
- 4、卵巢氧化应激可以引起小鼠受孕率下降, 增加孕鼠胚胎死亡率, 减少胎仔数量和降低胎鼠体重。

创新之处

- 1、应用 ICR 雌性小鼠成功建立了小鼠卵巢氧化应激模型，为进一步深入研究卵巢氧化损伤的机制以及开发新型抗氧化应激药物奠定了基础。
- 2、系统的研究了氧化应激对卵巢造成的氧化损伤和繁殖性能的影响，包括颗粒细胞凋亡、卵泡闭锁、卵泡数量、排卵数量、早期胚胎的发育能力、孕鼠不同日龄体质量以及胎仔鼠数量和重量等。
- 3、利用小鼠卵巢氧化应激模型，比较研究了 10 种不同抗氧化剂对卵巢的保护作用，筛选出了 4 种对卵巢氧化损伤具有特异保护作用的抗氧化剂。
- 4、通过一系列体内外实验，比较了不同抗氧化剂对颗粒细胞氧化损伤的保护作用，为抗氧化剂的临床应用提供了实验依据。

需要进一步研究的内容

通过本课题的研究发现，还有很多值得研究的内容主要包括以下几个方面：

- 1、通过芯片、测序等生物学技术筛选出不同组织中（子宫内膜、胎盘、早期胚胎和死亡胚胎）受氧化应激影响严重的重要发育功能基因，做进一步的分析与验证。
- 2、将筛选出的对小鼠卵巢氧化应激具有特异保护作用的抗氧化剂应用于大动物群体中，进一步研究抗氧化剂对于产仔数量和出生重量的影响；对于已处于氧化应激中的动物需要进一步研究对抗氧化剂的需要量。
- 3、对不同抗氧化剂进行优化组合，进一步研究抗氧化剂的联合应用对卵巢抗氧化应激的保护作用。
- 4、本研究为卵巢保护性抗氧化剂的临床应用提供了实验依据，但是如何客观、更加全面地评估不同抗氧化剂的抗氧化作用，还需要进一步进行重点研究。

附录

附录 1：主要溶液的配制

1.1 HTF、M2、CZB 和 mWM 溶液的配制方法

HTF、M2、CZB 和 mWM 溶液配方

成分	HTF (mg/100mL)	M2 (mg/100mL)	CZB (mg/100mL)	mWM (mg/100mL)
NaCl	593.8	553.4	477	640
KCl	35	35.6	36	35.6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4.9	29.3	29	29.4
KH ₂ PO ₄	5.4	16.2	16	16.2
60% Na-Lactate	340μL	320μL	443μL	—
NaHCO ₃	210	210.52	211	190
Na-Pyruvate	3.7	3.6	3	2.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	76	25	25	—
EDTA·Na ₂	—	—	4	—
Taurine	—	—	87.5	—
Glucose	50	100	—	100
Ca-lactate	—	—	—	46
Penicillin	7.5	6	7.5	7.5
Streptomycin	5	5	5	5
BSA	1000	400	300	300
Phenol red	0.1	0.1	0.1	0.1

注：

1. CaCl₂·2H₂O、MgSO₄·7H₂O 应单独配制成浓储液。
2. 除（1）和 BSA 外，其它所有试剂在称量后可直接融解。
3. 将（1）中溶液慢慢放入（2）中，将 pH 值调节至 7.3；然后用 0.22 μm 滤器进行过滤除菌；除菌后每管分装为 5 mL 进行密封后放入 4℃ 冰箱保存。
4. 溶液在使用前加入 BSA，进行充分溶解。
5. 如果在加入（1）的过程中产生一些浑浊或沉淀，则需要重新配制溶液；也可在使用前把（1）与 BSA 同时加入。

1.2 KSOM 溶液的配制方法

KSOM 和 KSOM-HEPES 溶液配方		
成分	KSOM (mg / 100 mL)	KSOM-HEPES (mg / 100 mL)
PVA	10	10
NaCl	555	555
KCl	18.6	18.6
CaCl ₂ ·2H ₂ O	24.99	24.99
KH ₂ PO ₄	4.76	4.76
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	5
Penicillin G	6	6
Phenol Red	0.2	0.2
Glucose	3.6	3.6
Na-Pyruvate	2.2	2.2
NaHCO ₃	126	126
HEPES	—	238
60%Na-Lactate	185μL	185μL
EDTA	0.38	0.38

注：

- 1. 首先将 PVA 在 80℃中进行充分溶解 1-2h。
- 2. 溶液使用前加入需要加入 50μL， 100mM 谷氨酰胺浓储液和 15mg BSA/5mL KSOM；如使用 KSOM-HEPES 溶液，在是使用前只需放入谷氨酰胺即可。
- 3. 使用 0.22 μm 滤器进行过滤除菌，然后进行分装并放入 4℃冰箱中待用。

1.3 PVP 溶液的配制方法

KSOM 短期使用溶液的配方

成分	mM	mg/100mL
Glucose	0.2	3.6
Na-Pyruvate	0.2	2.2
NaHCO ₃	15	126
60% Na-Lactate	10	185 μ L

注:

1. 使用前向溶液中加入 10 μ L 谷氨酰胺浓储液/mL。
2. 使用前向溶液中加入 10 μ L CaCl₂·2H₂O 浓储液/mL。
3. 使用前向溶液中加入 3 mg BSA/mL。
4. 使用 0.22 μ m 滤器进行过滤杀菌, 然后进行分装放入 4℃冰箱中待用。
5. 12%PVP 溶液配制: 向 10 mL KSOM 短期使用溶液中加入 1.2g PVP, 然后放在摇床上进行震荡混匀并过夜。用 0.22 μ m 滤器进行过滤杀菌, 最后分装放入 4℃冰箱中待用。

1.4 部分工作液的配制

1. 孕马血清 (PMSG) 溶液的配制: 将一支冻干粉 PMSG (1000 IU) 溶入 10mL 0.9 %的生理盐水中, 待完全溶解后分装于高压灭菌过得 EP 管中, 放入-20℃冰箱中保存。
2. 人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 溶液的配制: 将一支 hCG 针剂 (1000 IU) 溶入 10mL 0.9 %的生理盐水, 待完全溶解后分装于高压灭菌过得 EP 管中, 放入-20℃冰箱中保存。
3. 0.1%透明质酸溶液的配制: 将透明质酸酶 0.1 g, 溶入 10 mL HEPES-M2 溶液中, 滤器过滤后配制成 10 倍的浓储液, 然后进行分装, 放入-20℃冰箱中贮存。
工作液: 使用 HEPES- M2 溶液将浓储液稀释 10 倍。
4. 3.7%多聚甲醛溶液的配制: 将 3.7 g 多聚甲醛放入 100mL PBS 溶液中, 水浴锅中加热置 60℃左右进行充分溶解, 待完全充分溶解后放入 4℃冰箱中进行保存。
5. 0.5% Triton X-100 溶液的配制: 将 0.5 mL 的 Triton X-100 溶入到 100 mL 的 PBS 溶液中, 待完全充分溶解后放入 4℃冰箱中进行保存。
6. DAPI 溶液的配制: 将 1mg DAPI 溶于 1mL PBS 溶液中配成 1mg/mL 浓储溶液, 分装到锡纸包裹的 EP 管中, 放入到-20℃冰箱中保存。使用时使用 PBS 稀释至 3

μg/mL，放入 4℃短期保存。

7. 0.1% DEPC 水的配制：将 1mL 焦碳酸二乙酯（DEPC）加入到 999mL ddH₂O 水中，震荡混匀，置于 37℃环境中过夜，高压灭菌。

附录 2: 定量引物的扩增曲线、溶解曲线和标准曲线

1. GAPDH 的扩增曲线、溶解曲线和标准曲线

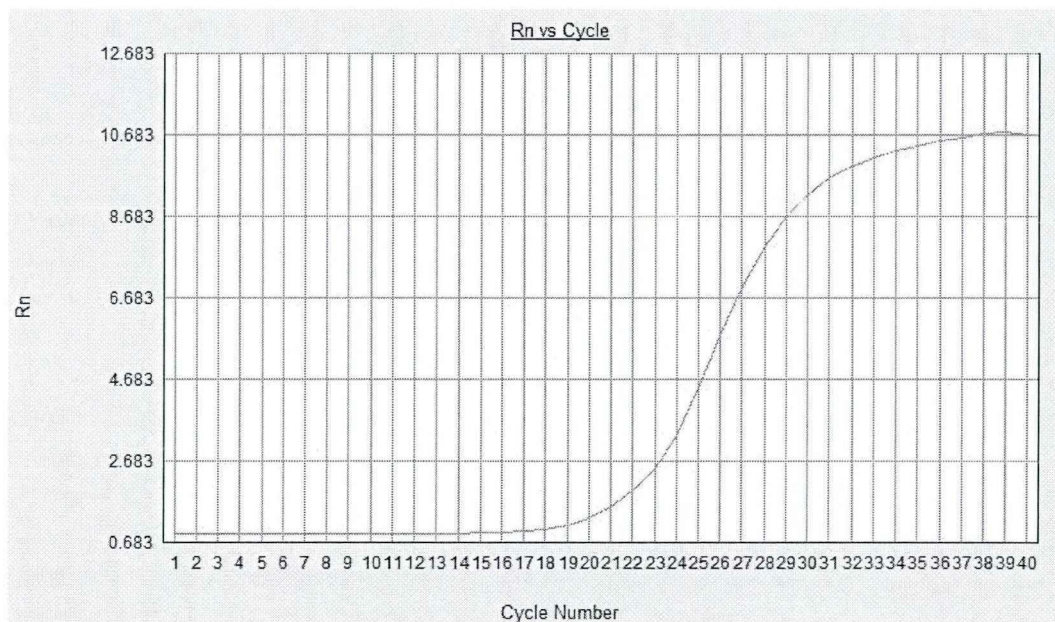


图 1-1 GAPDH 扩增曲线

Fig1-1 The amplification curves of GAPDH gene

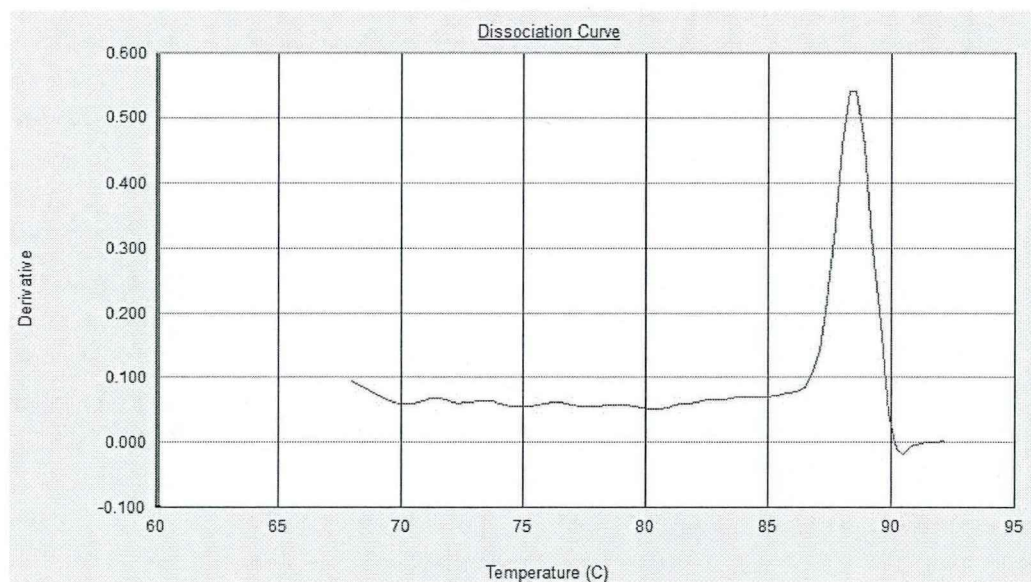


图 1-2 GAPDH 溶解曲线

Fig 1-2 The melting curves of GAPDH gene

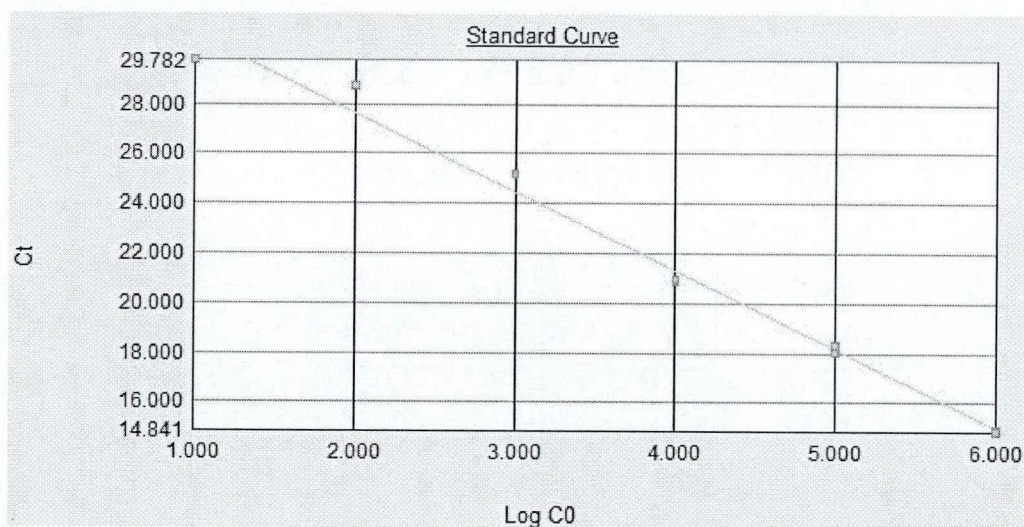


图 1-3 GAPDH 标准曲线

Fig1-3 The standard curves of GAPDH

GAPDH 标准曲线方程: $Y = -3.17 X + 33.97$, $R^2=0.987$

2. Bax 的扩增曲线、溶解曲线和标准曲线

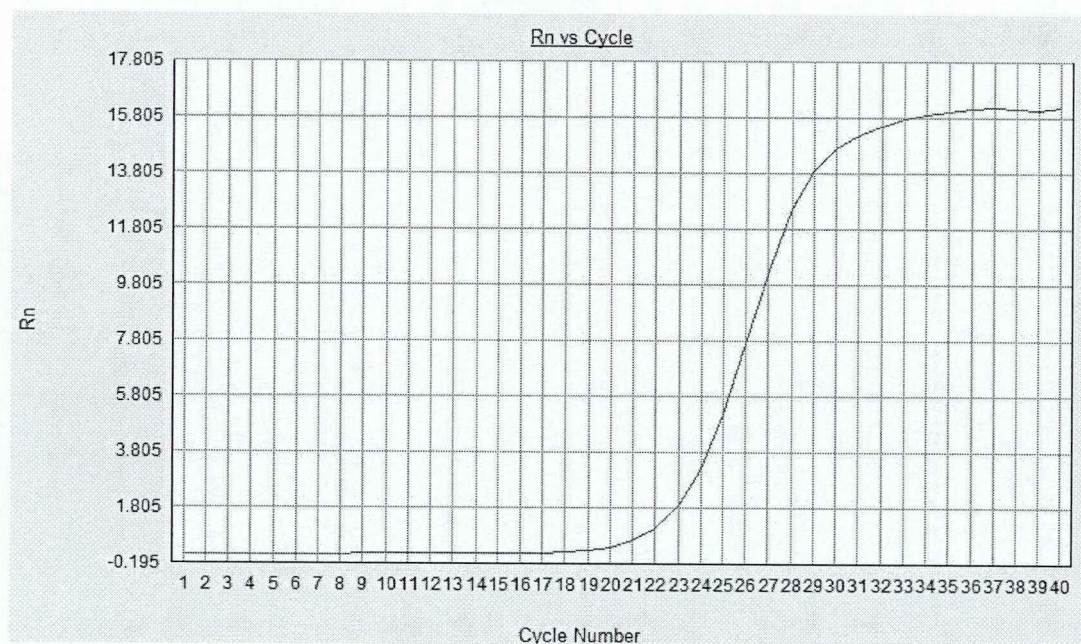


图 1-4 Bax 扩增曲线

Fig1-4 The amplification curves of Bax gene

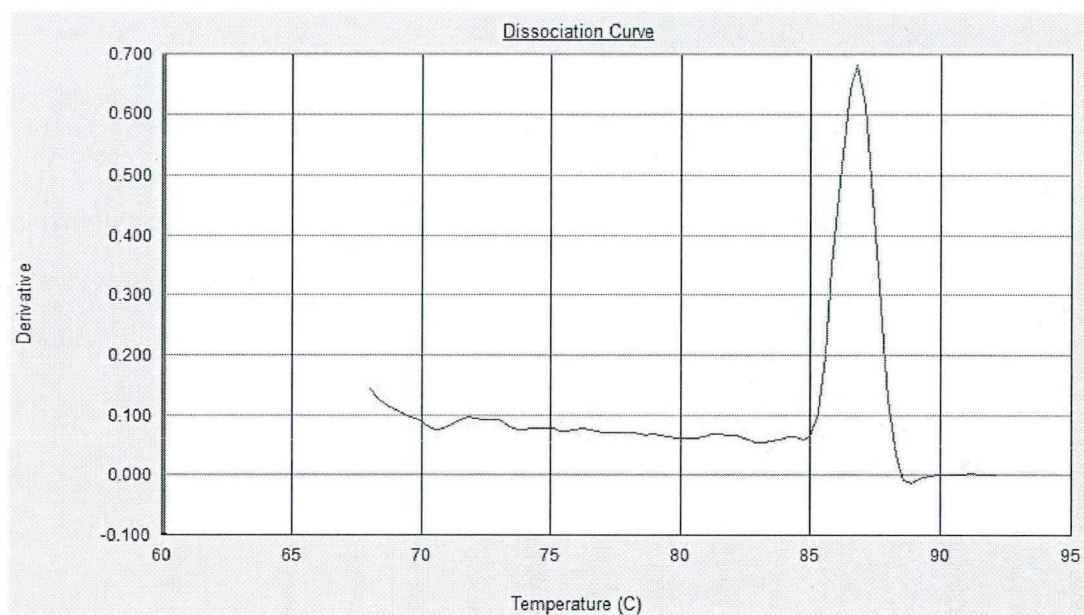


图 1-5 Bax 溶解曲线

Fig1-5 The melting curves of Bax

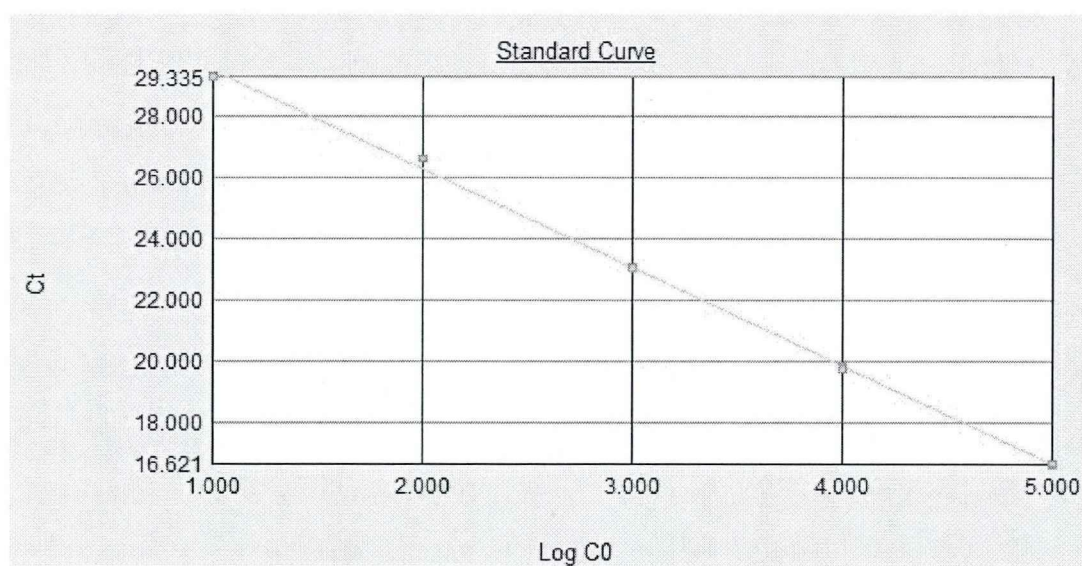


图 1-6 Bax 标准曲线

Fig 1-6 The standard curves of Bax

Bax 标准曲线方程: $Y = -3.23X + 32.77$, $R^2=0.998$

3. Bcl-2 的扩增曲线、溶解曲线和标准曲线

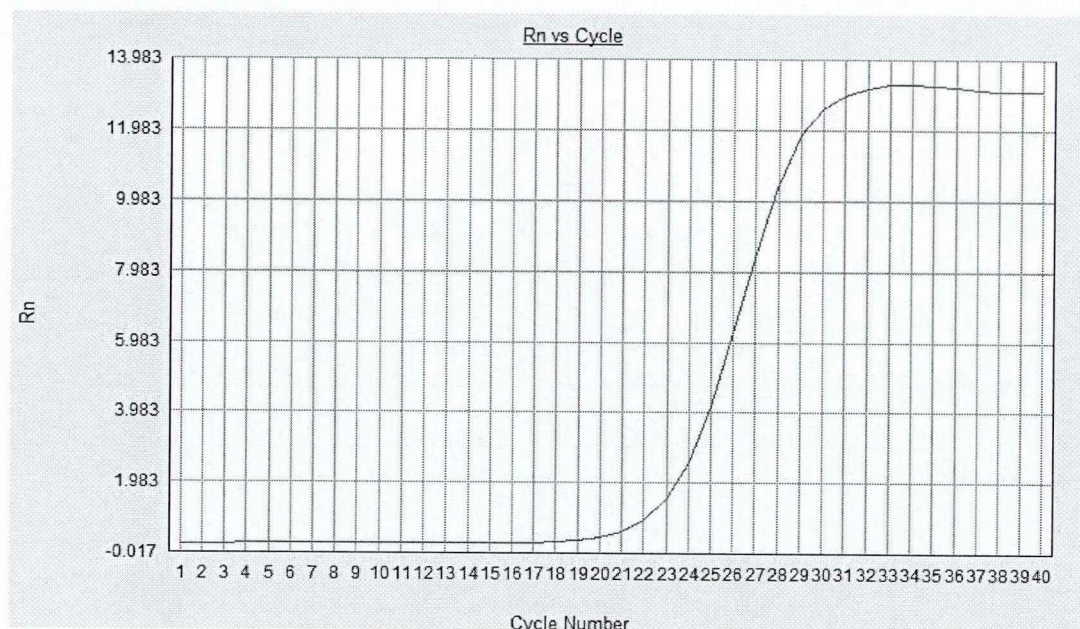


图 1-7 Bcl-2 扩增曲线

Fig1-7 The amplification curves of Bcl-2gene

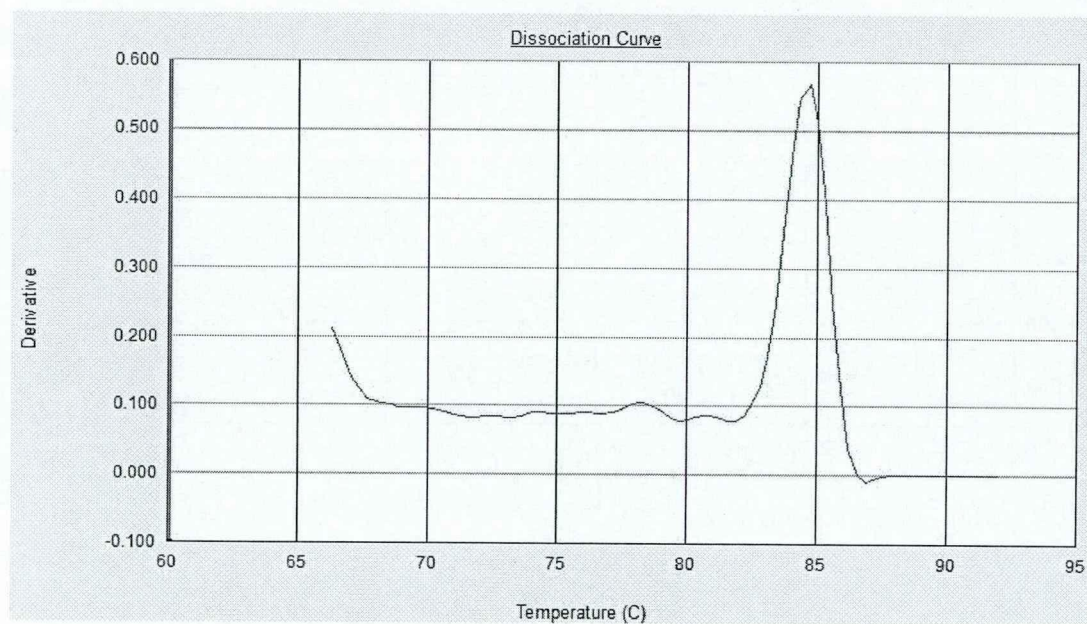


图 1-8 Bcl-2 溶解曲线

Fig1-8 The melting curves of Bcl-2 gene

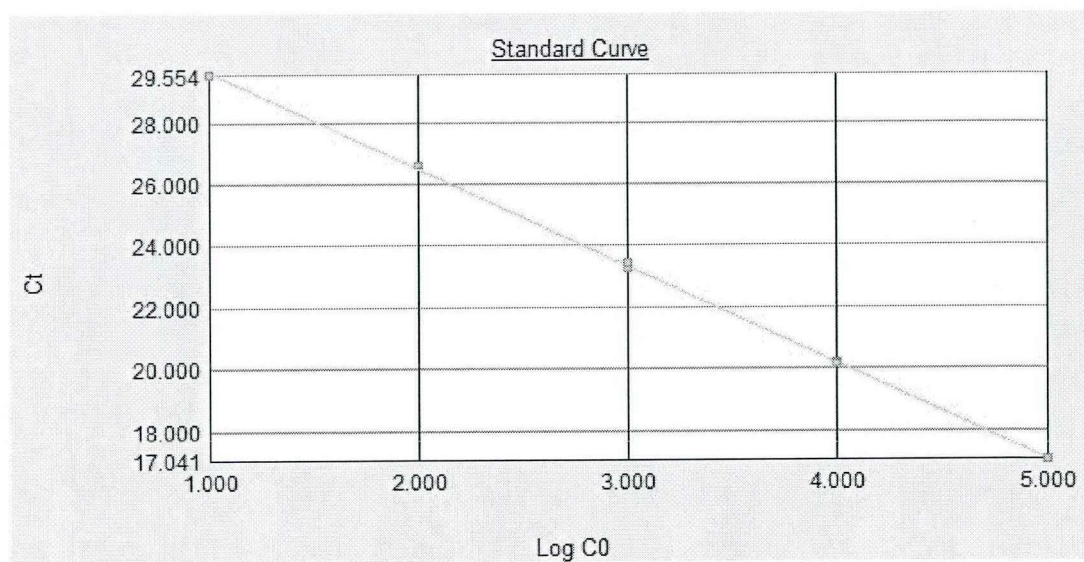


图 1-9 Bcl-2 标准曲线

Fig1-9 The standard curves of Bcl-2

Bcl-2 标准曲线方程: $Y = -3.16X + 32.78$, $R^2=0.999$

4. SOD2 的扩增曲线、溶解曲线和标准曲线

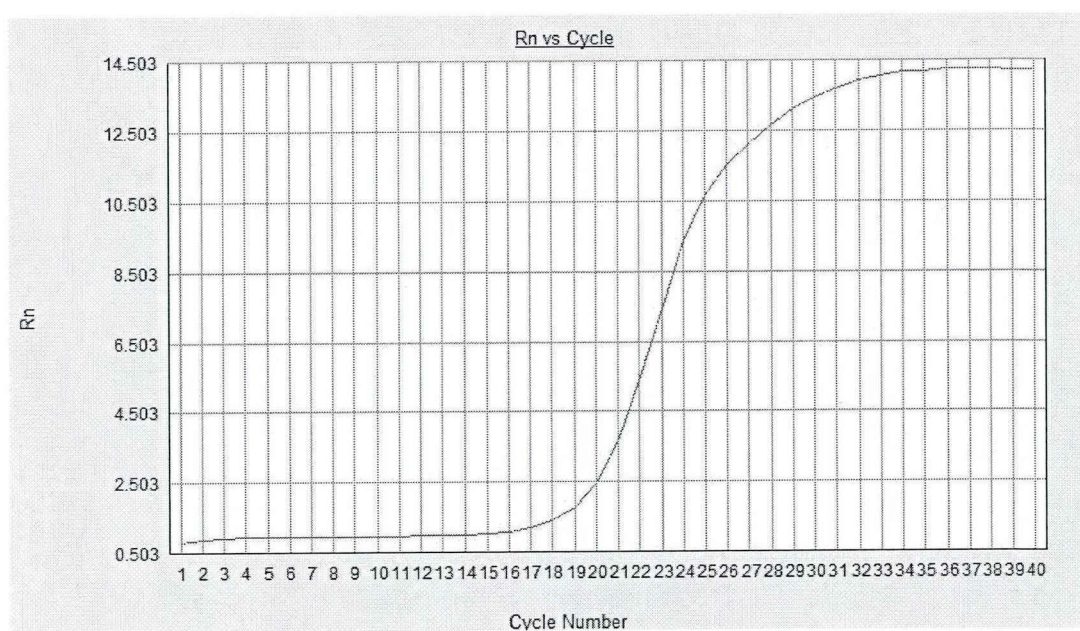


图 1-10 SOD2 扩增曲线

Fig 1-10 The amplification curves of SOD2gene

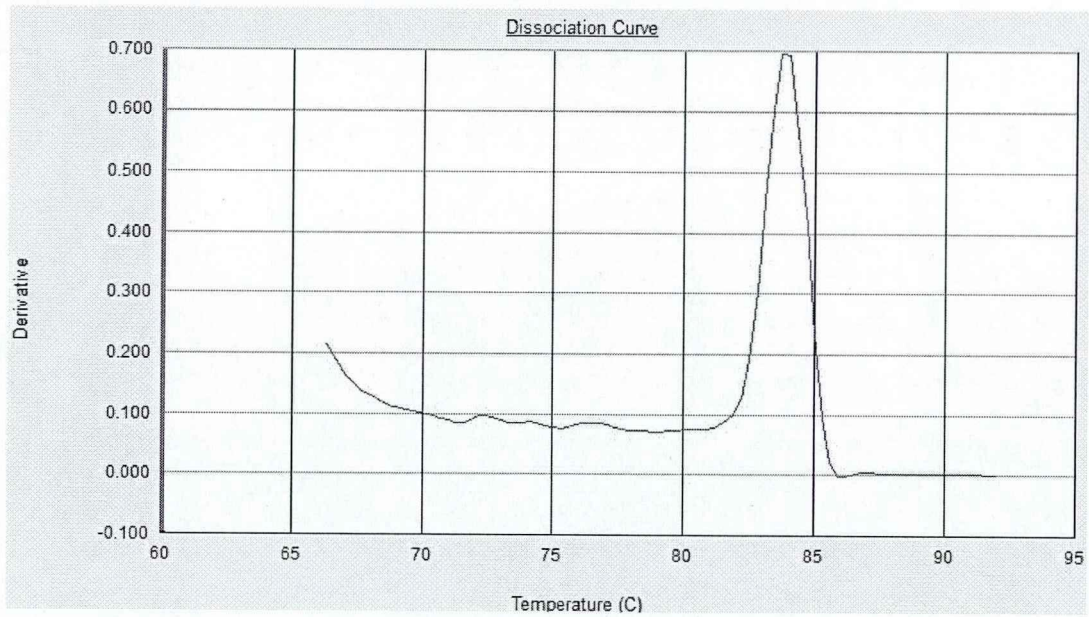


图 1-11 SOD2 溶解曲线

Fig1-11 The melting curves of SOD2gene

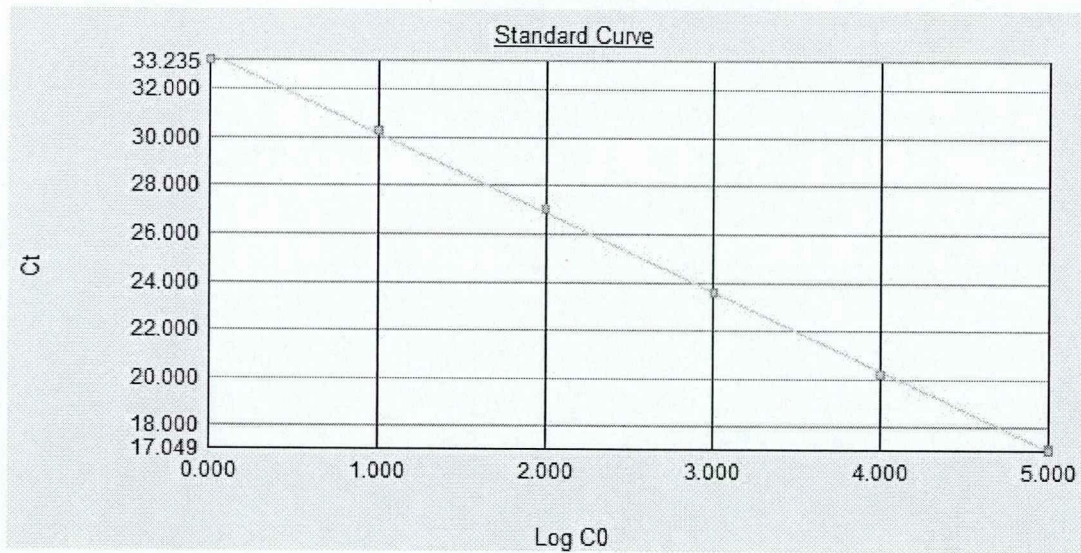


图 1-12 SOD2 标准曲线

Fig1-12 The standard curves of SOD2

SOD2 标准曲线方程: $Y = -3.27X + 33.43$, $R^2=0.999$

5. GPX 的扩增曲线、溶解曲线和标准曲线



图 1-13 GPX 扩增曲线

Fig1-13 The amplification curves of GPX gene

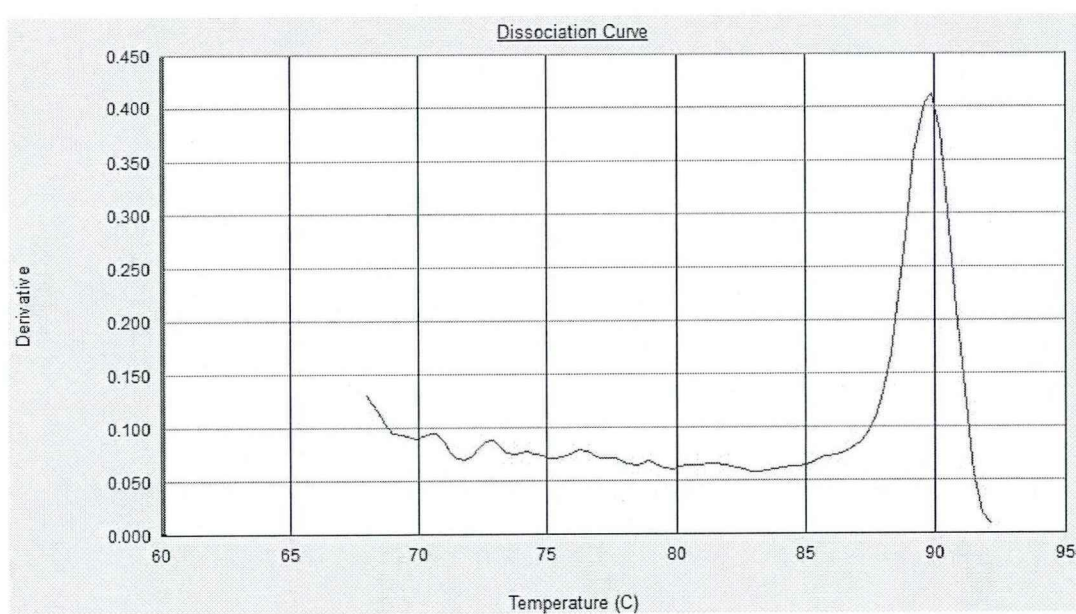


图 1-14 GPX 溶解曲线

Fig1-14 The melting curves of GPX gene

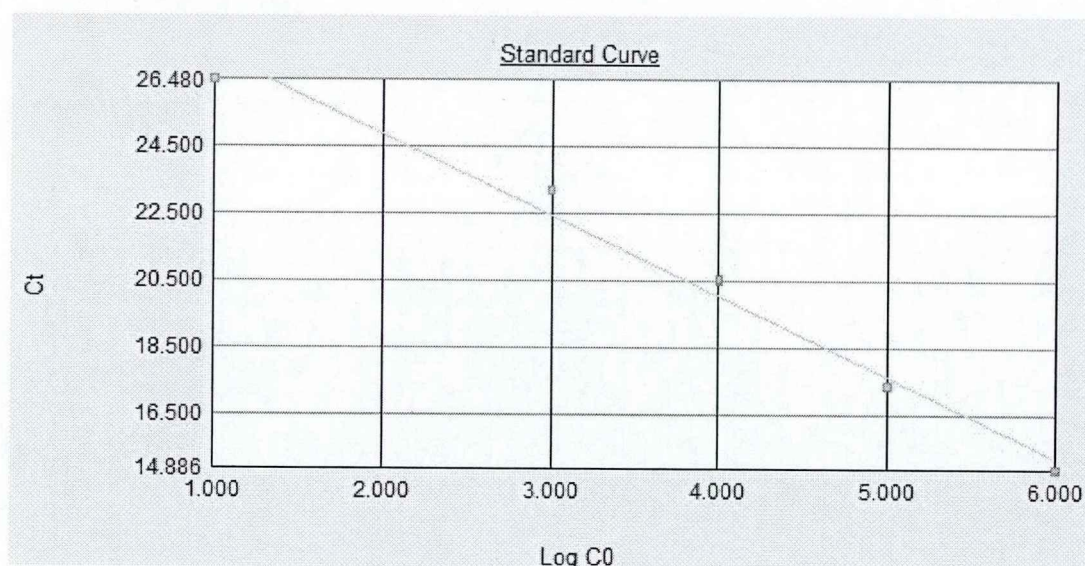


图 1-15 GPX 标准曲线

Fig1-15 The standard curves of GPX

GPX 标准曲线方程: $Y = -2.41 X + 29.67$, $R^2 = 0.988$

6. CAT 的扩增曲线、溶解曲线和标准曲线

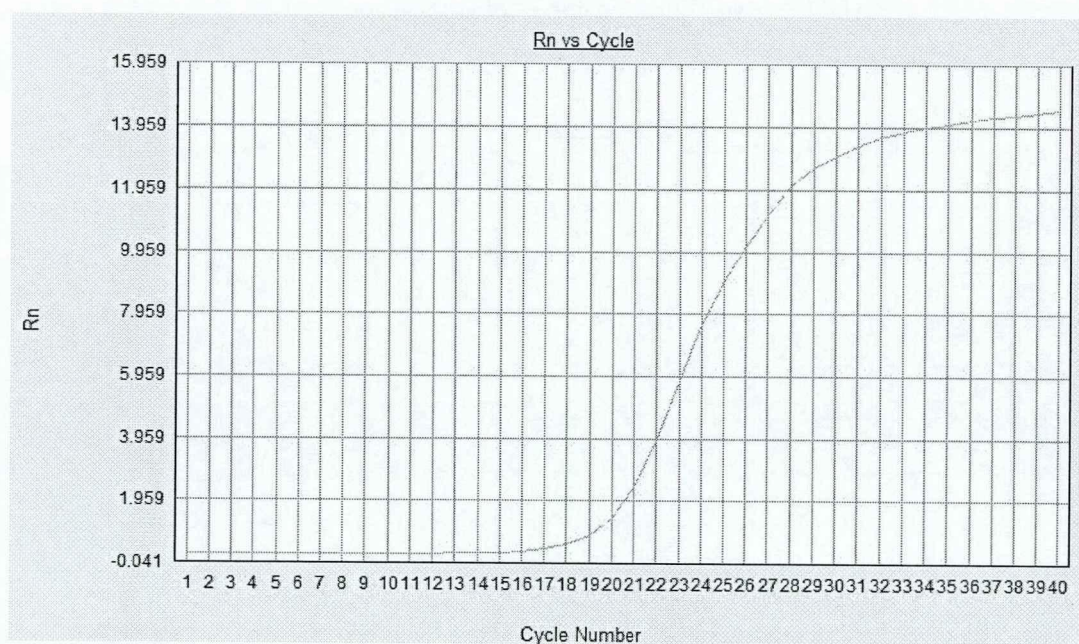


图 1-16 CAT 扩增曲线

Fig1-16 The amplification curves of CAT gene

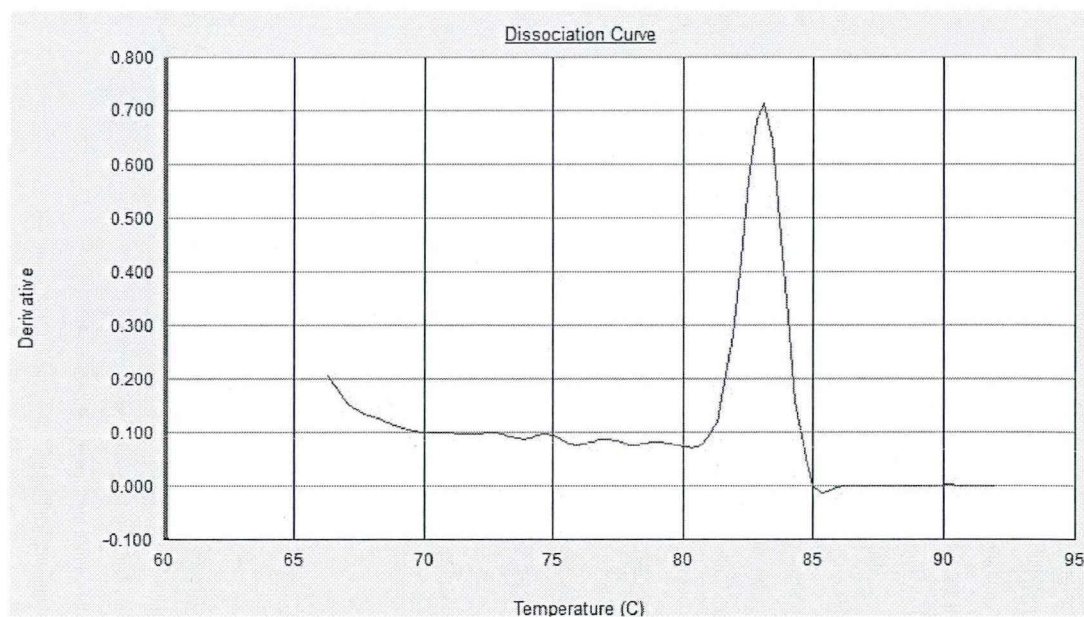


图 1-17 CAT 溶解曲线

Fig 1-17 The melting curves of CAT gene

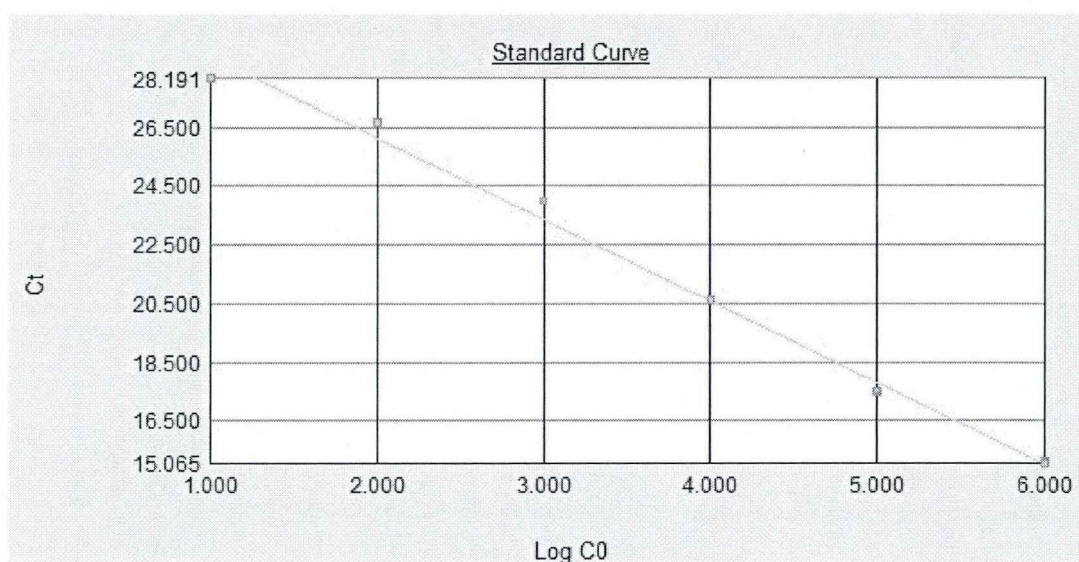


图 1-18 CAT 标准曲线

Fig1-18 The standard curves of CAT

CAT 标准曲线方程: $Y = -2.77X + 31.67$, $R^2 = 0.986$

攻读博士期间发表的论文

- 1、Protective effect of proanthocyanidin against oxidative ovarian damage induced by 3-nitropropionic acid in mice (The first author, Genetics and Molecular Research)
- 2、3-nitropropionic acid induces ovarian oxidative stress and impairs follicle in mouse (待发表)

致 谢

衷心感谢导师李奎教授、刘红林教授从课题的选题、实验设计、统计、直至论文的撰写,无不倾注了两位导师的心血。两位导师在繁重的科研和教学工作中抽出宝贵时间对实验予以指导和帮助,为实验的顺利完成提供了有力的保障,其渊博的知识严谨的治学态度、无私的敬业精神、不懈的探索精神和乐观的生活态度将是我一身学习的楷模。衷心感谢三年来两位恩师所给予我工作上的悉心教诲和生活上无微不至的关怀,将使我终生铭记和受益。在此,谨向两位恩师致以崇高的敬意和衷心的感谢。

特别樊俊华老师在学习与生活中给予我的指导、关怀与帮助。

感谢畜牧所冯书堂老师、敖红老师、杨述林老师、唐中林老师、牟玉莲老师、崔文涛老师;感谢南京农业大学谢庄教授、陈杰教授、石放雄教授、徐银学教授、黄瑞华教授、李齐发教授、孙少琛教授、周波副教授、李娟副教授、虞德兵老师、潘增祥老师、贾超老师、吴望军老师等各位老师的关心和帮助。

感谢南京农业大学的宋春雷、王旭光、王丽娟、马雪山、侯欣华、林飞、姜保春、董福禄、周晓龙、孙文星等师姐师兄及同窗好友在学习和实验上的指导和帮助。感谢韩静、杜长婉、赵芳、张军磊、卢有德、王欢、谢周瑞、付行、翟乐、秦岭、张宏晓、肖鹏、黄鲜菊、腾云、熊强、熊锴、付衍辉、刘泽群、曹蕊、杜学海、王艺等师弟师妹在实验上的协助,特别感谢申明、朱程程、Nazim Ally、于峰祥等对于实验的完成付出了辛勤的劳动。

感谢畜牧所鞠辉明博士后、任红艳博士后、马磊博士后、汤茂学、赵为民、辛磊磊、王超、梁如意、杨亚岚、彭兴、田俊、李林、刘小丹、黄雷、王庆庆、陶聪、徐盼等博士和硕士们在生活和学习等方面提供的帮助。

对三年来在我生活、学习上给予关怀和领导的领导、老师、同学、朋友再次表示衷心的感谢。

最后,我要特别感谢我的家人多年来给予我生活上的关心和精神上的鼓励。

张家庆

2013.10. 南京