

冯美莹, 李桂焕, 徐振鹏, 等. 左旋肉碱对猪卵母细胞体外成熟、脂肪代谢和孤雌胚胎发育的影响[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(6): 8-12.

左旋肉碱对猪卵母细胞体外成熟、脂肪代谢和孤雌胚胎发育的影响

冯美莹, 李桂焕, 徐振鹏, 白银山, 王文聪, 李莉, 张守全, 卫恒习
(华南农业大学 动物科学学院/国家生猪种业工程技术研究中心/广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】探讨不同质量浓度的左旋肉碱对猪卵母细胞体外成熟、脂肪代谢和孤雌胚胎发育的影响.【方法】在成熟培养液中添加不同质量浓度左旋肉碱,观察其对猪卵母细胞体外成熟和孤雌胚胎发育的影响,并利用油红染色、三酰甘油定量试剂盒和定量 RT-PCR 技术检测其对卵母细胞脂肪代谢及其关键水解酶表达水平的影响.【结果和结论】在成熟液中添加 100 ng/mL 左旋肉碱能极显著促进猪卵母细胞的脂肪滴代谢 ($P < 0.001$),并显著提高猪卵母细胞体外成熟率和孤雌激活囊胚发育率 ($P < 0.05$);在胚胎培养液中添加 100 ng/mL 左旋肉碱能够显著提高猪孤雌胚胎卵裂率 ($P < 0.05$),其囊胚率和囊胚质量均有提高的趋势;通过定量 RT-PCR 进一步发现 100 ng/mL 左旋肉碱极显著降低猪卵母细胞中激素敏感脂肪酶基因 (*HSL*, $P < 0.01$) 和三酰甘油水解酶基因 (*ATGL*, $P < 0.001$) 的 mRNA 表达水平,表明左旋肉碱能够影响调控脂肪代谢关键酶基因的表达.试验结果表明,左旋肉碱具有促进猪卵母细胞体外成熟和孤雌激活胚胎发育能力的作用,其可能是通过调控脂肪代谢来实现的.

关键词:猪卵母细胞; 左旋肉碱; 孤雌激活; 脂肪代谢; 胚胎发育
中图分类号:S828 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2014)06-0008-05

Effects of *L*-carnitine on oocytes *in vitro* maturation, lipid metabolism and parthenogenetic embryos development in porcine

FENG Meiyong, LI Guihuan, XU Zhenpeng, BAI Yinshan, WANG Wencong,
LI Li, ZHANG Shouquan, WEI Hengxi

(College of Animal Science, South China Agricultural University/National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry/
Guangdong Provincial Key Lab of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】This study was conducted to explore the effect of different concentrations of *L*-carnitine on the maturation of porcine oocytes, the development of parthenogenetic (PA) embryos *in vitro* and the lipid metabolism in pig oocytes.【Method】Different concentrations of *L*-carnitine were added into mature medium to observe the influence on porcine oocytes maturation and parthenogenetic embryos development. Oil red staining, triacylglycerol kit and quantitative RT-PCR were used to detect the lipid metabolism and the key hydrolase expression level in oocytes.【Result and conclusion】The rates of oocytes maturation and the subsequent PA blastocysts increased significantly when supplemented with 100 ng/mL *L*-carnitine to the IVM medium ($P < 0.05$), and the oocytes lipid metabolism also increased sig-

收稿日期:2014-02-20 优先出版时间:2014-10-03
优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20141003.1118.007.html>
作者简介:冯美莹(1989—),女,硕士研究生, E-mail:jony.ya@163.com;通信作者:卫恒习(1980—),男,副研究员, E-mail: weihengxi@163.com
基金项目:国家科技支撑计划(2011BAD19B03);广东省现代农业产业技术体系生猪创新团队(粤农[2009]380号);东莞市科技计划项目(201208102049)

nificantly ($P < 0.001$). The addition of 100 ng/mL *L*-carnitine into embryo culture medium significantly increased the cleavage rates ($P < 0.05$) and contributed to the PA blastocyst rates and qualities. Further analyses of quantitative RT-PCR revealed that the mRNA expression levels of adipose triglyceride lipase gene (*ATGL*) and hormone-sensitive triglyceride lipase gene (*HSL*) both decreased significantly with 100 ng/mL *L*-carnitine treatment, which indicated that the *L*-carnitine could affect the lipid metabolism by regulating the key lipases gene expression. In conclusion, these results demonstrated that *L*-carnitine can improve porcine oocytes maturation and enhance the PA embryos developmental ability through lipid metabolism regulation.

Key words: porcine oocytes; *L*-carnitine; parthenogenetic activation; lipid metabolism; embryo development

随着哺乳动物体细胞核移植、转基因和胚胎干细胞等高新生物技术的发展,人们对卵母细胞质量的要求越来越高.当前猪卵母细胞体外成熟(*In vitro* maturation, IVM)体系仍不完善,导致猪卵母细胞的体外成熟质量不高、胚胎发育受阻,这制约了其在科学研究和畜牧生产中的应用^[1-3].研究发现,猪卵母细胞和早期胚胎中含有大量的脂肪滴,致使其对外界环境极为敏感,特别是低温条件会造成猪胚胎发育停止或死亡^[4].同时这也造成了胚胎冷冻保存的困难.

左旋肉碱是脂肪代谢过程中的一种关键的分子,能够促进脂肪代谢.在细胞内,左旋肉碱作为载体把脂肪酸从线粒体膜外转运到线粒体膜内,促使脂肪酸在线粒体内氧化分解并释放出能量^[1, 5-7].研究还发现左旋肉碱能够有效促进卵子的体外成熟和胚胎发育^[4-5, 8],但其在猪卵母细胞成熟和胚胎发育中的作用和机制尚不完全清楚.

本试验旨在研究不同质量浓度的左旋肉碱对猪卵母细胞的体外成熟、孤雌胚胎早期发育和囊胚质量的影响及其可能的作用途径,以期完善猪卵母细胞的体外培养体系,为提高猪卵母细胞和胚胎质量、促进猪胚胎冷冻保存技术的发展提供技术支持.

1 材料与方法

1.1 试验材料

DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)、非必需氨基酸(MEM NEAA)、丙酮酸钠和谷氨酰胺为GIBCO公司产品,葡萄糖为Hyclone公司产品,其他试剂均为Sigma公司产品.

试验中所用的溶液主要成分如下:成熟培养液中含有TCM 199(Tissue culture medium 199)、体积分数为10%的猪卵泡液、10 ng/mL的表皮生长因子、10 IU/mL人绒毛膜促性腺激素、10 IU/mL孕马血清

促性腺激素和0.1 mg/mL的*L*-半胱氨酸,每组再根据试验要求添加一定质量浓度的左旋肉碱;采卵液(Polyvinyl alcohol-Dulbecco's phosphate buffered saline, PVA-DPBS)中含有DPBS和1 g/L的聚乙烯醇(Polyvinylalcohol,PVA);电激活液中含有0.25 mol/L甘露醇,0.10 mmol/L CaCl₂,0.10 mmol/L MgCl₂,0.05 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)和0.1 g/L PVA;猪胚胎培养液(PZM-3,porcine zygote medium 3)中含有100.00 mmol/L NaCl、25.10 mmol/L NaHCO₃、10.00 mmol/L KCl、0.35 mmol/L KH₂PO₄、0.40 mmol/L MgSO₄·7H₂O、2.00 mmol/L 乳酸钙、2.00 mmol/L 丙酮酸钠、1.00 mmol/L *L*-谷氨酰胺、5.00 mmol/L 亚牛磺酸、体积分数为2%必需氨基酸(BME EAA)、体积分数为1%非必需氨基酸(MEM NEAA)和3 g/L 无脂肪酸牛血清白蛋白(BSA);油红染色液中含有0.15 g 油红 O、30 mL 异丙醇和20 mL H₂O.实时荧光定量RT-PCR检测所用的引物序列如表1所示.

表 1 实时荧光定量 PCR 引物
Tab. 1 The primers of real-time fluorescent quantitative PCR

引物	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
Hsl	TCCAAATCCCACGAGCCTTA GAGGAGACCGCACTGCTTGA	159
Atgl	ATGGAGCCCACGGACCTG CTGCCTGCTGCTCCTTTATCC	179
Actb	AGGGCAGTAGCATCGCTTTAGT AAGGGGATTGTGATGGCTGA	118

1.2 试验方法

1.2.1 不同质量浓度左旋肉碱对猪卵母细胞体外成熟及其孤雌胚胎体外发育的影响 在无菌条件下收集卵巢表面直径3~8 mm 卵泡中的卵母细胞,并在显微镜下挑选胞质均匀、颗粒细胞3层以上的卵丘-卵

母细胞复合体(Cumulus oocytes complexes, COCs). 然后,将采集的猪卵母细胞随机分成 4 组,分别在添加不同质量浓度(0、10、100、1 000 ng/mL)左旋肉碱的成熟液(每 100 μ L 培养液培养 20 ~ 30 枚卵子)成熟培养 42 ~ 46 h. 用透明质酸酶(1 mg/mL)脱去成熟培养后 COCs 的卵丘细胞,在体视显微镜下检查卵母细胞第一极体排出情况. 之后,分别给予 100 V/cm、60 μ s 的直流脉冲进行孤雌激活. 将电激后的卵母细胞转入 PZM-3 中培养,分别于培养第 2 天和第 7 天检查胚胎卵裂和囊胚发育情况,并利用 5 μ g/mL Hoechst 33342 对囊胚进行染色和细胞计数.

通过比较不同浓度左旋肉碱对猪卵母细胞体外成熟率(第一极体排出率)、卵裂率(卵裂数/激活卵数)、囊胚率(囊胚数/卵裂数)和囊胚细胞数的影响,从而确定左旋肉碱对猪卵母细胞体外成熟的影响,并筛选出其最佳添加质量浓度.

1.2.2 最佳成熟培养质量浓度左旋肉碱对卵母细胞脂肪代谢的影响 采用前期试验筛选的最佳左旋肉碱添加质量浓度,以添加 0 ng/mL 作为对照组,并对猪卵母细胞进行成熟培养. 然后分别收集成熟培养后的卵母细胞,对其进行脂肪含量检测和脂肪代谢关键酶类的表达检测,以期明确左旋肉碱对猪卵母细胞脂肪代谢的作用效果和作用途径.

首先,用油红染色检测猪卵母细胞内脂肪滴的含量. 在各组中随机选择部分具有第一极体的成熟卵母细胞,放入质量分数为 4% 多聚甲醛中固定 20 min 后,用 PVA-DPBS 洗 3 遍. 用油红染色 5 ~ 6 min 后,用含体积分数为 50% 乙醇的 DPBS 过夜洗涤. 第 2 天,将卵母细胞放到含适量 PVA-DPBS 的载玻片上,盖上盖玻片,在倒置显微镜下观察并拍照.

然后,用试剂盒检测卵母细胞的三酰甘油含量. 分别收集 300 个 0 和 100 ng/mL 左旋肉碱处理的成熟卵母细胞,置于 40 μ L 含体积分数为 1% Triton X-100 的 PBS 中,4 $^{\circ}$ C 裂解 40 min,随后按照 Dongou 的三酰甘油测定试剂盒(浙江东瓯诊断产品有限公司)说明书

书进行操作,利用酶标仪(BIO RAD-680)测定各样品吸光度,并计算三酰甘油含量,试验重复 3 次.

最后,用 mRNA 定量检测成熟卵母细胞中脂肪酶基因(*HSL*)和三酰甘油水解酶基因(*ATGL*)的表达. 分别收集 100 个 0 和 100 ng/mL 左旋肉碱处理的成熟卵母细胞,按照 Tiangen 公司的 RNAprep pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒分别抽提这 2 组卵母细胞的总 RNA,用 PrimeScript[®] 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行反转录,合成 cDNA 第 1 链(40 μ L/管). 取 1 μ L cDNA 为模板,以 β -actin 为内参,用实时荧光定量 RT-PCR 检测试验组与对照组间 *HSL* 和 *ATGL* 的 mRNA 表达水平,试验均重复 3 次.

1.2.3 胚胎培养液中添加不同质量浓度左旋肉碱对猪孤雌胚胎体外发育的影响 在猪卵母细胞成熟培养液中不添加左旋肉碱而在早期胚胎体外培养液中添加不同质量浓度(0、10、100、1 000 ng/mL)的左旋肉碱,通过 48 h 后胚胎卵裂率、7 d 后的囊胚率和囊胚细胞数进行效果评价,从而筛选出适合胚胎培养的最佳添加质量浓度.

1.2.4 统计分析 所有试验均重复 3 次以上,统计数据用平均值 $\pm$ 标准误差表示,应用 SPSS 17.0 对试验数据进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 作为统计差异显著的标准.

2 结果与分析

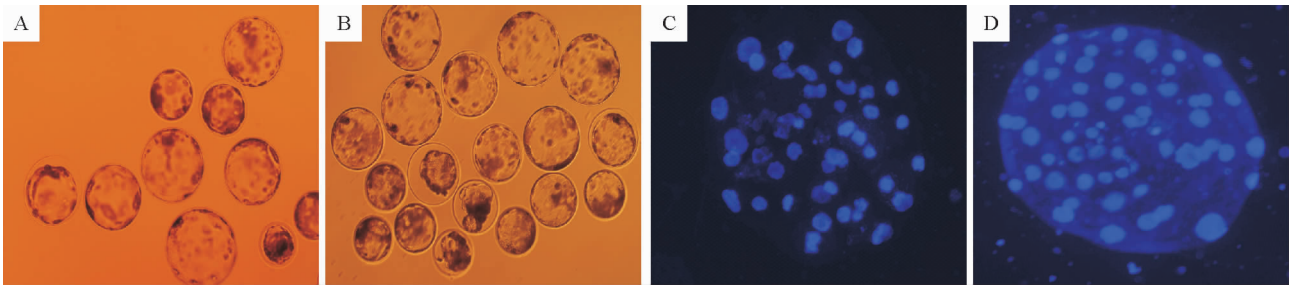
2.1 在成熟培养液中添加不同质量浓度的左旋肉碱对猪卵母细胞的影响

由表 2 可看出,与对照组及 1 000 ng/mL 组对比,添加 100 ng/mL 左旋肉碱可以显著提高卵母细胞的体外成熟率($P < 0.05$). 而在成熟液中添加左旋肉碱对卵裂率的影响不显著($P > 0.05$),但以添加 100 ng/mL 组的最高,并且其囊胚率和囊胚细胞数均较高(表 2,图 1). 由此可以认为添加一定质量浓度的左旋肉碱能够提高卵母细胞的成熟率,最佳的添加质量浓度为 100 ng/mL.

表 2 不同质量浓度左旋肉碱对猪卵母细胞体外成熟和孤雌激活胚胎发育的影响¹⁾
Tab. 2 Effects of different mass concentrations of L-carnitine on porcine oocytes maturation and PA embryos development in vitro

ρ (左旋肉碱)/ (ng $\cdot$ mL ⁻¹)	总卵数/ 枚	卵母细胞 成熟率/%	电激卵数/ 枚	卵裂率/%	囊胚率/%	囊胚细 胞数/枚
0(对照)	193	56.65 $\pm$ 1.68a	178	73.02 $\pm$ 4.78a	17.60 $\pm$ 4.44ab	33.67 $\pm$ 11.79a
10	199	63.13 $\pm$ 3.30ab	177	68.32 $\pm$ 3.97a	21.35 $\pm$ 6.22ab	43.67 $\pm$ 9.94a
100	200	69.76 $\pm$ 2.31b	188	77.37 $\pm$ 4.11a	29.15 $\pm$ 4.22b	40.33 $\pm$ 3.71a
1 000	204	56.60 $\pm$ 3.27a	189	66.05 $\pm$ 5.70a	13.06 $\pm$ 2.73a	27.67 $\pm$ 6.69a

1) 同列数据后,凡有一个相同小写字母者,表示差异不显著($P > 0.05$, Duncan's 法).



A: 添加 0 ng/mL 左旋肉碱的囊胚 (100 ×); B: 添加 100 ng/mL 左旋肉碱的囊胚 (100 ×); C: 添加 0 ng/mL 左旋肉碱的囊胚细胞数 (200 ×); D: 添加 100 ng/mL 左旋肉碱的囊胚细胞数 (200 ×).

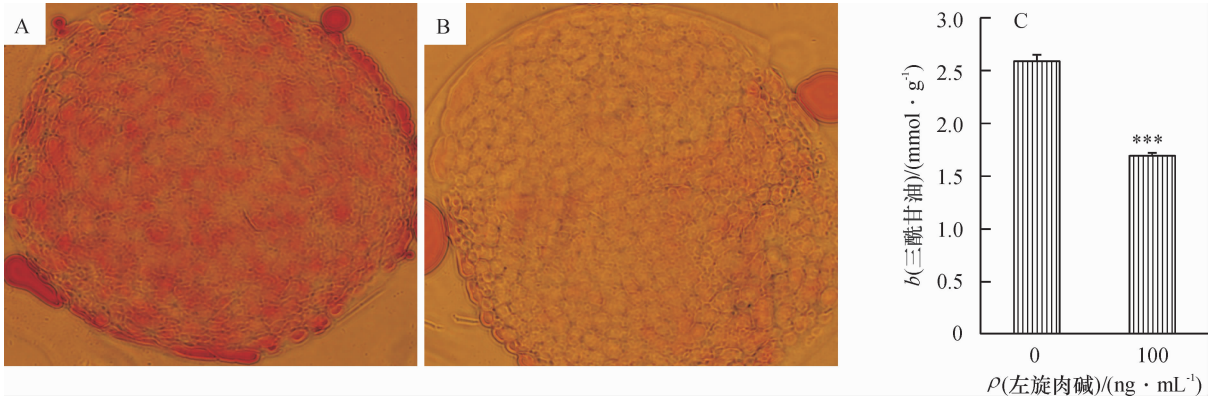
图1 成熟液中添加左旋肉碱对猪孤雌胚胎发育和囊胚质量的影响

Fig.1 The influence of blastocysts quality and developmental ability of PA embryos derived from IVM medium supplemented with *L*-carnitine

2.2 成熟后卵母细胞中脂肪含量和三酰甘油含量检测

如图2所示,通过比较油红染色后卵母细胞的颜色发现,添加 100 ng/mL 左旋肉碱试验组的卵母细胞着色明显较浅,表明其脂肪含量相对较低. 进一步对 0

和 100 ng/mL 组的成熟卵母细胞中三酰甘油含量进行检测,发现添加 100 ng/mL 左旋肉碱极显著降低了卵母细胞中三酰甘油的含量(图2),与油红 O 染色结果相一致,表明左旋肉碱能够促进三酰甘油分解,具有促进猪卵母细胞脂肪代谢的作用.



A: 添加 0 ng/mL 左旋肉碱的卵母细胞 (200 ×); B: 添加 100 ng/mL 左旋肉碱的卵母细胞 (200 ×); C: 卵母细胞中三酰甘油含量 (*** 表示在 0.001 水平上差异显著, Duncan's 法).

图2 成熟后的猪卵母细胞油红 O 染色和三酰甘油含量检测

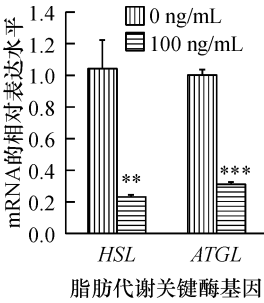
Fig.2 Fat staining by oil red O and triglycerides content detection of mature oocytes

2.3 左旋肉碱对猪卵母细胞中脂肪代谢关键酶 HSL 和 ATGL mRNA 表达水平的影响

实时荧光定量结果显示(图3),在成熟液中添加 100 ng/mL 的左旋肉碱后,其成熟卵母细胞中 HSL 和 ATGL 基因的 mRNA 表达水平均显著地低于对照组(0 ng/mL).

2.4 在胚胎培养液中添加不同质量浓度的左旋肉碱对猪卵母细胞的影响

如表3所示,在胚胎培养液中添加一定质量浓度的左旋肉碱具有显著提高猪孤雌胚胎卵裂率的作用($P < 0.05$),且以添加 100 ng/mL 组的卵裂率和囊胚率最高. 添加 10 ng/mL 左旋肉碱组的囊胚细胞数最多,但统计分析差异不显著($P > 0.05$).



“**”表示在 0.01 水平上差异显著,“***”表示在 0.001 水平上差异显著(Duncan's 法).

图3 左旋肉碱对猪卵母细胞 HSL 和 ATGL 基因 mRNA 表达水平的影响

Fig.3 Effects of *L*-carnitine supplementation on *HSL* and *ATGL* mRNA expression levels of porcine oocytes

表 3 胚胎培养液中不同质量浓度左旋肉碱对猪孤雌激活后胚胎发育能力的影响¹⁾

Tab. 3 Effects of different concentrations of *L*-carnitine in embryo culture medium on porcine PA embryo development

ρ (左旋肉碱)/ (ng · mL ⁻¹)	孤雌 胚数/枚	卵裂率/%	囊胚率/%	囊胚细胞数/枚
0	161	78.75 ± 1.88a	29.14 ± 8.70a	44.97 ± 3.19a
10	129	91.80 ± 2.16c	30.33 ± 4.44a	50.58 ± 2.18a
100	155	92.92 ± 1.23c	37.38 ± 5.66a	46.86 ± 0.69a
1 000	174	85.19 ± 0.44b	27.55 ± 6.37a	44.19 ± 2.10a

1) 同列数据后,凡有一个相同小写字母者,表示差异不显著($P>0.05$, Duncan's 法)。

3 讨论与结论

研究发现,左旋肉碱为卵母细胞和胚胎利用脂肪酸提供了必不可少的辅助因子,在卵母细胞体外成熟和早期胚胎发育中加入时可以提高胚胎的产出^[5]。同时,Lonergan 等^[9]认为胚胎的发育能力是判定卵母细胞质量的指标,Soom 等^[10]认为囊胚内细胞数多少表明了胚胎的发育能力强弱。本试验通过在成熟液(或胚胎培养液)中添加不同质量浓度的左旋肉碱,发现左旋肉碱能够显著提高猪卵母细胞的体外成熟率、脂肪代谢以及孤雌激活卵裂率,并有助于提高猪孤雌激活胚胎的囊胚发育率和囊胚质量。

目前文献报道关于左旋肉碱对猪卵母细胞成熟培养和胚胎发育的影响浓度各不相同。Wu 等^[8]发现,在成熟液中添加不同质量浓度(0、0.25、0.50、1.00 mg/mL)的左旋肉碱对于成熟率影响不显著,添加 0.50 mg/mL 左旋肉碱显著提高囊胚率和减少囊胚细胞死亡数;而在胚胎培养液中添加不同质量浓度(0、0.25、0.50、1.00、2.00 mg/mL)的左旋肉碱对于猪孤雌胚胎卵裂率和细胞数目无显著影响。Somfai 等^[4]研究发现,在成熟液中添加质量浓度 0.6~5.0 mg/mL 的左旋肉碱可以显著提高卵母细胞的成熟率和卵裂率,但对于其囊胚率无显著性影响。而本研究发现,在成熟液中添加 100 ng/mL 左旋肉碱能够显著地提高猪卵母细胞的成熟率,但对于其卵裂率和囊胚率却没有显著影响;在胚胎培养液中添加 10、100 和 1 000 ng/mL 的左旋肉碱能显著地提高猪孤雌胚胎卵裂,添加不同质量浓度左旋肉碱对于猪囊胚的发育没有显著性影响。产生这种差异的原因可能是基础培养体系的不同造成的。

此外,本研究发现,左旋肉碱可以显著降低成熟猪卵母细胞中三酰甘油的含量。已有大量的研究证明左旋肉碱能够提高线粒体活力,通过增加 β -氧化作用来提高卵母细胞和胚胎的发育^[4-5]。左旋肉碱主要是在肉碱脂酰转移酶 I 的作用下,其 3-羟

基与脂酰 CoA 的酰基结合生成脂酰肉碱,随后在移位酶的作用下从细胞质进入到线粒体内部。在线粒体内部,肉碱脂酰基转移酶 II 催化其分开,重新形成的脂酰 CoA 可不断进行 β -氧化,进而促进脂肪代谢^[11]。脂肪的主要成分是三酰甘油,ATGL 只水解三酰甘油,对甘油二酯不起作用,而 HSL 水解甘油二酯的活性是三酰甘油的 10 倍^[12-13],因而三酰甘油水解的起始受 ATGL 限速。其主要过程是 ATGL 特异性地将三酰甘油分解为甘油二酯,产物进而被 HSL 水解为甘油一酯,随后在甘油一酯酶的作用下形成甘油和脂肪酸^[14]。本研究发现,在成熟培养液中添加 100 ng/mL 左旋肉碱,在降低猪成熟卵母细胞中三酰甘油含量的同时也显著降低了 HSL 和 ATGL 基因的 mRNA 表达水平,表明左旋肉碱促进三酰甘油代谢的作用并非是通过 HSL 和 ATGL 基因 mRNA 表达水平的升高实现的。据李玉成^[15]报道,脂肪细胞 ATGL 基因 mRNA 表达水平的升高并不伴随着 ATGL 表达蛋白的升高。本研究通过油红染色发现,在成熟液中添加左旋肉碱可以促进猪卵母细胞的脂肪代谢,从而影响卵母细胞的质量和胚胎发育能力,但其具体作用机制仍需要进一步研究。

参考文献:

[1] 闫益波,吕善潮,叶绍辉. 猪卵母细胞体外成熟培养的主要影响因素[J]. 浙江畜牧兽医, 2007(6): 8-9.
[2] 刘晓辉,曹阳,郎洪彦,等. 培养液对猪卵母细胞体外成熟及孤雌胚胎早期体外发育的影响[J]. 安徽农业科学, 2011(20): 12229-12230.
[3] 徐小明,杨春荣,胡军和,等. 猪卵母细胞体外成熟及电激活后发育能力的研究[J]. 自然科学进展, 2006(3): 361-364.
[4] SOMFAI T, KANEDA M, AKAGI S, et al. Enhancement of lipid metabolism with *L*-carnitine during *in vitro* maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes[J]. Reprod Fertil Dev, 2011, 23(7): 912-920.

(下转第 18 页)