

DOI:10.3969/j.issn.1004-3845.2019.10.003

线粒体与卵子老化

刘晓婷, 黄睿*

(中山大学附属第六医院生殖医学研究中心, 广州 510655)

【摘要】 线粒体异常是卵子老化的重要原因。线粒体移植技术有望成为改善卵子质量和胚胎发育潜能及提高辅助生殖助孕成功率的新方法。本文就线粒体与卵子质量的关系、线粒体移植在辅助生殖领域的发展历史及其可能的作用机制等方面进行综述。

【关键词】 卵子老化; 线粒体移植; 卵子质量; 辅助生殖

【中图分类号】 R711.6 **【文献标识码】** A

Mitochondria and oocyte aging

LIU Xiao-ping, HUANG Rui*

Reproductive Medicine Research Center, the Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655

【Abstract】 Mitochondrial abnormality is the main cause of oocyte aging. Mitochondrial transfer technology is expected to be a novel treatment to improve the oocyte quality and the potential of embryo development, as well as increase the pregnancy rate of assisted reproductive technology. This paper reviews the relationship between mitochondria and the quality of oocyte, the development history of mitochondrial transfer treatment in the field of assisted reproduction and its possible mechanisms of improving the quality of oocyte.

【Key words】 Oocyte aging; Mitochondrial transfer; Oocyte quality; Assisted reproduction

(*J Reprod Med* 2019, 28(10):1120-1124)

自从辅助生殖技术的出现, 排卵障碍、内分泌异常、盆腔炎症性疾病等不孕患者的生育难题得到了很大程度的解决。但高龄妇女的助孕结局一直不尽人意, 近几十年的研究结果提示导致高龄女性生育能力下降的主要因素是卵子老化^[1]。线粒体是卵子内含量最多的细胞器, 能产生 ATP 和多种生物合成中间体, 为卵子的成熟、受精及胚胎发育过程提供能量, 同时参与细胞内多种生命活动过程, 如维持钙离子稳态、胞内信号传导、细胞凋亡、细胞代谢等。

在单个原始生殖细胞中线粒体数量 < 10 个, 在卵子发育成熟过程中, 其线粒体数量增至 1×10^6 个以上, 这提示线粒体数量和功能可作为衡量卵子质量的重要指标^[2]。与年轻女性相比, 高龄女性卵子中的线粒体 DNA(mtDNA) 突变率明显增高而拷贝数及线粒体膜电位明显降低^[3-4], 理论上改善线粒体功能和/或增加正常线粒体数量可以提高老化卵子

质量, 改善其发育潜能。自 1997 年将健康女性的卵细胞浆注入质量差的卵子中并获得活产的案例报道以来, 各种线粒体替代治疗和线粒体移植技术相继问世, 其中包括原核移植、纺锤体移植、极体移植、自体颗粒细胞线粒体移植、自体卵原前体细胞线粒体移植、自体脂肪干细胞线粒体移植、自体骨髓间充质干细胞线粒体移植等。然而由于安全隐患及伦理问题等因素, 这些技术的临床应用推广备受争议。同时, 我们对线粒体移植的作用机制了解甚少。本文将阐述线粒体与卵子质量之间的关系, 进而介绍线粒体移植在生殖医学领域的发展历史和分析其可

【收稿日期】 2019-07-31; **【修回日期】** 2019-08-13

【基金项目】 国家重点研发项目(2016YFC1000302)

【作者简介】 刘晓婷, 女, 广东韶关人, 硕士研究生, 生殖医学专业。(* 通讯作者, Email: drhuangr@sina.com)

能的作用机制。

一、线粒体与卵子质量

线粒体是半自主性细胞器,呈扁长形,由外膜、内膜、嵴和基质构成。人类线粒体遗传物质(mtDNA)长约 16.6 kb,呈双链环状,无组蛋白,其包含 37 个基因,编码 2 种线粒体 rRNA、22 种 tRNA 和 13 种氧化磷酸化酶复合体蛋白亚基。线粒体是卵子胞质中数量最多的细胞器,不仅为卵子成熟、受精及胚胎发育过程提供能量,同时调控钙离子稳态、细胞凋亡自噬等生命活动过程,其数量及功能异常将会对卵子受精和胚胎发育结局造成影响。

1. mtDNA 拷贝数与卵子质量:mtDNA 拷贝数在不同类型细胞中存在差异。与体细胞相比,成熟卵子 mtDNA 含量至少多一个数量级。在卵子发生、囊胚发育及着床后发育等阶段都有 mtDNA 复制活动^[5]。原始生殖细胞中含有约 200 个 mtDNA 拷贝数,随着卵子发生,线粒体数量和 mtDNA 拷贝数均逐渐增加,直至卵子成熟完成受精时 mtDNA 拷贝数达到峰值;在囊胚发育阶段,总体 mtDNA 拷贝数逐渐减少,但与内细胞团相比,滋养外胚层中的 mtDNA 拷贝数显著增加,而内细胞团则维持低水平的 mtDNA 复制。着床前期参与原肠胚形成的胚胎干细胞 mtDNA 开始复制,余未分化细胞内 mtDNA 数量随着细胞复制而减少,称为“mtDNA 稀释”;直至着床后期,mtDNA 稀释停止,因已积累了足够量的 mtDNA,未分化细胞发挥新的特定的细胞功能^[6]。

成熟卵子中需要有充足的 mtDNA 拷贝数,从而确保在胚胎着床后,每个子细胞有足够的 mtDNA 用于复制重启,为着床后的胚胎发育过程提供足够的能量。该 mtDNA 拷贝数下限值即为卵子发育能力的关键阈值,在人类该阈值为 100 000^[7]。小鼠实验表明,mtDNA 拷贝数减少导致胚胎囊胚形成率下降^[8];而成功体外受精卵的平均 mtDNA 拷贝数也显著高于未成功受精卵的 mtDNA 拷贝数^[3]。这说明卵子中的 mtDNA 拷贝数影响其发育潜能和受精能力,增加线粒体数量可能提高发育潜能、增强受精能力。因此,线粒体数量或 mtDNA 拷贝数可以作为衡量卵子质量优劣的标志之一。

2. mtDNA 突变与卵子质量:mtDNA 缺少组蛋白,邻近的电子传递链能产生大量的活性氧(ROS),且 mtDNA 的修复酶能力有限,使其容易发生突变,mtDNA 的突变率是核基因的 25 倍^[9]。突变 mtDNA

的聚集可以通过影响呼吸链功能干扰卵子的成熟。在卵子成熟过程中,微管和细胞分裂活动的必要能量由线粒体提供。一旦呼吸链功能受到损伤,ATP 产生减少,线粒体不能提供足够的能量,就会干扰纺锤体上微管蛋白聚合和解聚,影响减数分裂染色体的分离,影响卵子质量。

目前为止,研究人员已经找出超过 150 种不同的 mtDNA 突变方式。早在 1993 年,Kitagawa 等^[10]首次发现人类卵巢组织存在 mtDNA4977 bp 缺失,且随着年龄的增加,其缺失率也明显增加。之后 Keefe 等^[11]证实与年轻女性相比,高龄女性有更高的 mtDNA 4977 bp 缺失率,且认为这与其生育潜能低下有关。除此之外,Hsieh 等^[12]在人卵中检测到了另外 12 种 mtDNA 缺失,并认为 mtDNA 缺失可导致线粒体功能障碍和 ATP 生成受损,从而干扰卵子受精和进一步的胚胎发育。机体在有氧代谢过程中伴随着 ROS 的产生随着年龄的增加机体所累积的 ROS 会增加,高龄妇女卵子中高浓度的 ROS 以及受损的抗氧化防御机制使得 mtDNA 的突变率增高,进而引发受精率低、胚胎发育异常及反复流产等不良结局^[13]。

3. 氧化应激与卵子质量:线粒体在产生 ATP 的同时伴随着 ROS 的产生。正常情况下,机体内氧化水平和抗氧化水平处于一种动态平衡中。研究表明,适量的 ROS 参与卵泡发育、卵子成熟、排卵、黄体生成和卵泡闭锁等生理活动过程^[14]。机体内 ROS 与抗氧化剂之间的动态平衡对卵子正常生长发育有着重要的作用,机体的抗氧化能力随着年龄增长而减弱,随之面临的是 ROS 的积累。过多的 ROS 可破坏线粒体内膜的极性孔(mPT),导致钙离子和细胞色素 C 外流,造成线粒体膜电位消失,线粒体凋亡程序启动导致减数分裂周期停滞和细胞凋亡^[15],在胚胎中则表现为卵裂球溶解及细胞碎片增多。另外,高浓度 ROS 抑制钠钙交换体和钙离子信号分子钙调蛋白活性,导致内质网钙池储存钙离子减少而细胞质中钙离子增加,打破原有的钙离子稳态平衡^[16],最终致使卵子凋亡。研究报道,与形态正常的胚胎相比,出现细胞碎片的胚胎中 ATP 和 ROS 水平显著升高^[17];对小鼠 M II 期卵进行光致敏造成线粒体损伤后,后续的胚胎发育及胎鼠的出生率均受到影响^[18]。

线粒体在卵子成熟、受精及胚胎发育过程中有着至关重要的作用,线粒体数量不足和(或)功能障

碍都将影响妊娠结局。线粒体治疗的出现为这类问题的解决提供了新的方向。

二、线粒体治疗发展历史

1. 线粒体替代疗法:线粒体替代疗法(mitochondrial replacement therapy, MRT),即用健康的外源性线粒体补充或替代卵子或合子内异常的线粒体,可以改善卵子质量提高其发育潜能,但其产生的安全隐患和伦理问题引发争议。早在 1997 年, Cohen 等^[19]首次将健康女性的卵细胞浆注射到反复卵子质量差的患者卵子中并获得活产。次年, Van Blerkom 等^[20]将卵子中富含线粒体的胞质分离并注射入另一 M II 期卵中,发现受体卵子 ATP 含量增加且保持一定的活性。但引入外来的胞质会带来异质性的安全问题,同时胞质内含有的其他生物成分是否会对卵子造成伤害也是未知的。随着克隆技术的发展,除了卵胞质移植外,原核移植(pronuclei transfer, PNT)、生发泡移植(germinal vesicle transfer, GVT)、纺锤体移植(spindle transfer, ST)及极体移植(polar body transfer, PBT)等技术相继出现。2016 年,世界首例“三亲婴儿”于墨西哥诞生,该案例正是利用 ST 技术后进行辅助生殖技术助孕并最终产出子代。然而,外源性线粒体的引入可导致后代携带两种不同来源的线粒体,线粒体的异质性或许可通过表观遗传影响子代的性状,可能给予代带来即时或长期的健康隐患。同时,由于第三方遗传物质的引入所形成的“三亲婴儿”也势必会引起法律和伦理上的争议。

2. 线粒体移植技术:线粒体移植技术,即体外分离供体细胞的线粒体,将其通过显微注射注入 M II 期卵子。既避免了分离卵胞质和核移植等技术要求高的问题,也可利用自体细胞作为供体,最大程度减少了后续的伦理问题,现已成为该领域的研究热点。

Tzeng 等^[21]在 2001 年首次报道了自体颗粒细胞来源线粒体移植入卵子并成功妊娠的案例。孔令红等^[22]的研究表明自体颗粒细胞线粒体移植可明显改善胚胎发育质量,提高妊娠率。加拿大 OvaScience 公司分离患者卵巢里的卵原前体细胞(卵巢干细胞),从中分离提取线粒体注射入卵子中,并进行体外受精,诞生了世界上首个“干细胞婴儿”。2015 年, Oktay 等^[23]对 10 位反复助孕失败的患者进行卵原前体细胞线粒体移植,临床妊娠率达 40%。但 Labarta 等^[24]的一项卵原前体细胞线粒体移植随机

对照实验结果提示这项技术并不能改善妊娠结局,尽管该研究利用分子标记物对线粒体供体细胞进行了鉴定,但并不能完全明确其细胞性质,同时研究报道也没有明确其注射线粒体拷贝数的定量方法及具体注射剂量,因此并不能据此否定其对人类卵子质量的改善作用。2018 年梁晓燕团队报道了首例应用自体骨髓间充质干细胞来源的线粒体移植入卵子后,行辅助生殖技术助孕并成功活产男婴的案例^[25]。除了临床研究以外,动物实验发现肝细胞或自体脂肪组织来源的线粒体移植入卵子后均可以明显提高老龄小鼠卵子的发育潜能^[26-27]。

三、线粒体移植改善卵子质量的可能机制

卵子中线粒体过少或 mtDNA 突变会导致线粒体功能异常,影响卵子成熟、受精及胚胎发育,理论上增加线粒体数量或改善线粒体功能可以提高卵子质量,改善妊娠结局。已有文献表明,分离纯化的线粒体可以快速、直接进入哺乳动物细胞中并正常发挥自身功能^[28]。那么,线粒体移植后是如何改善卵子质量的?下面就几种可能的作用机制进行阐述。

ATP 的产生依赖于线粒体内膜上一条完整的氧化呼吸链复合体。氧化呼吸链的损伤将导致 ROS 水平上升,ATP 水平下降。Tarin 等^[29]提出卵子老化的“氧自由基——线粒体损伤学说”,认为随着年龄的增长,卵子内会堆积过多的 ROS 继而影响 ATP 的生成,能量生成受阻会干扰纺锤体微管蛋白的聚合解聚过程,染色体分离过程受到影响,从而导致非整倍体的发生。将体外分离的线粒体注射入卵子后,增加了 mtDNA 的拷贝数,增加 ATP 的生成^[29],使微管蛋白聚合和解聚过程的能量得以补充,减少卵子非整倍体的发生,从而提高卵子发育潜能。

线粒体具有高度的活动性,可以连续不断地进行融合与分裂。线粒体的融合与分裂平衡对维持线粒体正常形态、功能有重要作用。线粒体融合蛋白 Mfn2 对小鼠卵子成熟至关重要^[30],当敲除线粒体融合基因后可导致卵子成熟障碍,胚胎发育潜能及相应的胚胎质量下降。老化卵子中高浓度的 ROS 促进线粒体分裂,从而破坏线粒体的数量平衡。高龄女性卵子与年轻女性卵子相比,线粒体分裂活动更加旺盛,从而产生更多的线粒体碎片^[31]。过多的线粒体分裂活动可通过 ROS/NF- κ B 信号通路上调基质相互作用分子(STIM1)表达和钙池操纵性钙内流从而导致胞浆钙离子浓度增加^[32]。众所周

知,依赖于钙离子的释放和/或积累的信号通路在动物胚胎的各种发育进程中起着重要作用,可影响细胞的命运和形态。外源性线粒体进入卵子后,可能重新调节线粒体融合和分裂的稳态平衡,调节细胞内外钙离子浓度,使得细胞各项生理活动得以正常进行,从而改善老化卵子质量,提高其发育潜能。

另一方面,老化卵子中 ROS 的积累导致氧化损伤,导致线粒体功能障碍和细胞损伤^[33],其中过量的 ROS 累积会影响线粒体自噬。ROS 调控线粒体自噬的机制包括 ROS-PINK1/Parkin, ROS-HIF1-BNIP3/Nix, ROS-FOXO3-LC3/BNIP3 和 ROS-NRF2-P62 等通路^[34-37]。Niu 等^[38]的实验结果表明 PINK1 的下调诱导线粒体伸长和肿胀,降低线粒体 DNA 拷贝数,导致 ATP 缺乏,显著增加自噬和凋亡,显著影响囊胚的形成和质量。ROS 作为 PINK1/Parkin 通路的上游信号分子,老化卵子内高浓度的 ROS 是否下调了 PINK1 的表达使自噬功能受损最终导致卵子发育潜能变差,以及外源性线粒体是否通过重新调控线粒体自噬而改善卵子质量,这需要进一步的实验去探索。

四、展望

在近二十几年里,辅助生殖技术有了巨大的进步,但卵子老化及胚胎质量低下仍然是生殖医学领域的难题,越来越多的学者将目光聚焦在线粒体移植治疗上,但目前对线粒体移植治疗的临床应用所带来的伦理和安全问题存在争议。关于线粒体移植疗法的循证医学证据及基础研究相对较少,其有效性和安全性也需要更多的实验研究进一步验证。

【参 考 文 献】

- [1] Luke B, Brown MB, Wantman E, et al. Cumulative birth rates with linked assisted reproductive technology cycles [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366: 2483-2491.
- [2] Van Blerkom J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence [J]. *Mitochondrion*, 2011, 11: 797-813.
- [3] Santos TA, El Shourbagy S, St John JC. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome [J]. *Fertil Steril*, 2006, 85: 584-591.
- [4] Ravichandran K, McCaffrey C, Grifo J, et al. Mitochondrial DNA quantification as a tool for embryo viability assessment: retrospective analysis of data from single euploid blastocyst transfers [J]. *Hum Reprod*, 2017, 32: 1282-1292.
- [5] St John JC. Transmission, inheritance and replication of mitochondrial DNA in mammals; implications for reproductive processes and infertility [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 349: 795-808.
- [6] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 1981, 292: 154-156.
- [7] Reynier P, May-Panloup P, Chrétien MF, et al. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes [J]. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7: 425-429.
- [8] Ge H, Tollner TL, Hu Z, et al. The importance of mitochondrial metabolic activity and mitochondrial DNA replication during oocyte maturation in vitro on oocyte quality and subsequent embryo developmental competence [J]. *Mol Reprod Dev*, 2012, 79: 392-401.
- [9] Lynch M, Koskella B, Schaack S. Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture [J]. *Science*, 2006, 311: 1727-1730.
- [10] Kitagawa T, Sugauma N, Nawa A, et al. Rapid accumulation of deleted mitochondrial deoxyribonucleic acid in postmenopausal ovaries [J]. *Biol Reprod*, 1993, 49: 730-736.
- [11] Keefe DL, Niven-Fairchild T, Powell S, et al. Mitochondrial deoxyribonucleic acid deletions in oocytes and reproductive aging in women [J]. *Fertil Steril*, 1995, 64: 577-583.
- [12] Hsieh RH, Tsai NM, Au HK, et al. Multiple rearrangements of mitochondrial DNA in unfertilized human oocytes [J]. *Fertil Steril*, 2002, 77: 1012-1017.
- [13] Eichenlaub-Ritter U, Wiczorek M, Lüke S, et al. Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions [J]. *Mitochondrion*, 2011, 11: 783-796.
- [14] Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, et al. Reactive oxygen species level in follicular fluid—embryo quality marker in IVF? [J]. *Hum Reprod*, 2006, 21: 2403-2407.
- [15] Tiwari M, Prasad S, Shrivastav TG, et al. Calcium signaling during meiotic cell cycle regulation and apoptosis in mammalian oocytes [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232: 976-981.
- [16] Zhang CX, Cui W, Zhang M, et al. Role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) in modulating postovulatory aging of mouse and rat oocytes [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9: e93446.
- [17] Van Blerkom J, Davis P, Mathwig V, et al. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17: 393-406.
- [18] Thouas GA, Trounson AO, Jones GM. Developmental effects of sublethal mitochondrial injury in mouse oocytes [J]. *Biol Reprod*, 2006, 74: 969-977.
- [19] Cohen J, Scott R, Schimmel T, et al. Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs [J]. *Lancet*, 1997, 350: 186-187.
- [20] Van Blerkom J, Sinclair J, Davis P. Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial

- donation and the issue of heteroplasmy[J]. *Hum Reprod*, 1998,13:2857-2868.
- [21] Tzeng C, Hsieh R, Chang S, et al. Pregnancy derived from mitochondria transfer (MIT) into oocyte from patient's own cumulus granulosa cells (cGCs)[J]. *Fertil Steril*, 2001, 76: S67-S68.
- [22] 孔令红,刘忠,李红,等. 自体颗粒细胞线粒体移植对胚胎发育质量的影响[J]. *中华妇产科杂志*, 2004, 39:105-107.
- [23] Oktay K, Baltaci V, Sonmezer M, et al. Oogonial precursor cell-derived autologous mitochondria injection to improve outcomes in women with multiple IVF failures due to low oocyte quality: a clinical translation[J]. *Reprod Sci*, 2015, 22:1612-1617.
- [24] Labarta E, de Los Santos MJ, Herraiz S, et al. Autologous mitochondrial transfer as a complementary technique to intracytoplasmic sperm injection to improve embryo quality in patients undergoing in vitro fertilization-a randomized pilot study[J]. *Fertil Steril*, 2019, 111:86-96.
- [25] 方丛,黄睿,贾磊,等. 卵母细胞内注射自体骨髓线粒体获得男婴活产 1 例病例报道[J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2018, 38: 937-939.
- [26] Yi Y, Chen M, Ho JY, et al. Mitochondria transfer can enhance the murine embryo development[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2007, 24:445-449.
- [27] Wang ZB, Hao JX, Meng TG, et al. Transfer of autologous mitochondria from adipose tissue-derived stem cells rescues oocyte quality and infertility in aged mice[J]. *Aging (Albany NY)*, 2017, 9:2480-2488.
- [28] McCully JD, Levitsky S, Del Nido PJ, et al. Mitochondrial transplantation for therapeutic use [J]. *Clin Transl Med*, 2016, 5:16.
- [29] Tarin JJ. Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos[J]. *Mol Hum Reprod*, 1996, 2: 717-724.
- [30] Zhang JH, Zhang T, Gao SH, et al. Mitofusin-2 is required for mouse oocyte meiotic maturation[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:30970.
- [31] Zorov DB, Popkov VA, Zorova LD, et al. Mitochondrial aging: is there a mitochondrial clock? [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2017, 72:1171-1179.
- [32] Huang Q, Cao H, Zhan L, et al. Mitochondrial fission forms a positive feedback loop with cytosolic calcium signaling pathway to promote autophagy in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2017, 403:108-118.
- [33] Chakrabarti S, Jahandideh F, Wu J. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:608979. doi:10.1155/2014/608979.
- [34] Tracy K, Dibling BC, Spike BT, et al. BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27:6229-6242.
- [35] Zhao J, Brault J J, Schild A, et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells [J]. *Cell Metab*, 2007, 6:472-483.
- [36] Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution[J]. *Genes Cells*, 2011, 16:123-140.
- [37] Wei X, Qi Y, Zhang X, et al. Cadmium induces mitophagy through ROS-mediated PINK1/Parkin pathway[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2014, 24:504-511.
- [38] Niu YJ, Nie ZW, Shin KT, et al. PINK1 regulates mitochondrial morphology via promoting mitochondrial fission in porcine preimplantation embryos[J]. *FASEB J*, 2019, 33: 7882-7895.

[编辑:肖晓辉]