

分类号:
密 级:

单位代码: 10019
学 号: B11103119

中国农业大学

学位论文

白藜芦醇和褪黑素对卵母细胞成熟及胚胎发育
的作用机制

Mechanisms of Resveratrol and Melatonin on Oocyte Maturation
and Embryo Development

研 究 生: 汪 锋

指 导 教 师: 刘国世 教授

申请学位门类级别: 农学 博士

专 业 名 称: 动物遗传育种与繁殖

研 究 方 向: 配子与胚胎生物工程

所 在 学 院: 动物科技学院

2014 年 5 月

分类号:

密 级:

单位代码: 10019

学 号: B11103119

中国农业大学

博士学位论文

白藜芦醇和褪黑素对卵母细胞成熟及胚胎发育
的作用机制

Mechanisms of Resveratrol and Melatonin on Oocyte Maturation
and Embryo Development

研 究 生: 汪 锋

指 导 教 师: 刘国世 教授

申请学位门类级别: 农学 博士

专 业 名 称: 动物遗传育种与繁殖

研 究 方 向: 配子与胚胎生物工程

所 在 学 院: 动物科技学院

2014 年 5 月

China Agricultural University
Ph.D. Dissertation

**Mechanisms of Resveratrol and Melatonin on Oocyte Maturation
and Embryo Development**

Candidate: Wang Feng

Supervisor: Professor Guo-Shi Liu

College of Animal Science and Technology

China Agricultural University

Beijing, 100193

May, 2014

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中已经注明引用和致谢的内容外，论文中不包含本人和其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

学位论文作者签名：汪锋

时间：2014年6月4日

关于学位论文使用授权的说明

本人完全了解中国农业大学有关保留、使用学位论文的规定。本人同意中国农业大学有权保存及向国家有关部门和机构送交论文的纸质版和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人同意中国农业大学将本学位论文的全部或部分内容授权汇编录入《中国博士学位论文全文数据库》或《中国优秀硕士学位论文全文数据库》进行出版，并享受相关权益。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

学位论文作者签名：汪锋

时间：2014年6月4日

导师签名：刘国栋

时间：2014年6月4日

项目资助情况

本研究由

北京市自然科学基金（项目编号：6122019）

国家自然科学基金（项目编号：31172177）

新世纪优秀人才支持计划（项目编号：NETC-10-0782）

资助

This research was supported by Program for Beijing Natural Science Foundation (6122019), the National Natural Science Foundation of China (31372306), New Century Excellent Talents in University (NETC-10-0782).

中文摘要

卵母细胞体外成熟及胚胎发育是发育生物学研究的基础,改善胚胎体外生产效率对提高动物生产及促进辅助生殖技术的应用具有重要意义。本文研究了白藜芦醇和褪黑素与卵母细胞体外成熟及胚胎发育的作用机制。结果如下:

1.研究了不同浓度白藜芦醇(0.1, 1.0 或 10 μ M)对牛卵母细胞成熟的影响及作用机制。研究显示,牛体外成熟培养液中添加适宜浓度白藜芦醇能显著增加卵丘细胞孕激素分泌及减少雌二醇的分泌。1.0 μ M 白藜芦醇能显著促进卵丘扩展和极体形成,提高卵母细胞体外受精后囊胚率、孵化囊胚率和囊胚细胞数。白藜芦醇显著降低卵母细胞 ROS 水平,提高 GSH 水平。同时,本研究首次发现 Sirt1 在牛颗粒细胞、卵丘细胞、卵母细胞和囊胚中表达,且白藜芦醇能促进 Sirt1 的表达。本研究证明了白藜芦醇通过诱导孕激素分泌和抗氧化作用促进牛卵母细胞成熟及体外受精后胚胎发育,这种促进作用可能依赖于 Sirt1 途径。

2.研究了不同浓度褪黑素(10⁻¹¹, 10⁻⁹, 10⁻⁷, 10⁻⁵, 10⁻³ M)对牛胚胎发育的影响及其作用机制。研究表明,前期培养液中添加 10⁻⁷M 褪黑素,后期培养液中添加 10⁻⁹ M 褪黑素均能显著促进牛胚胎发育。qRT-PCR、免疫荧光和 western blot 检测表明,牛不同发育阶段胚胎上均存在 MT1 和 MT2 受体。进一步研究发现,褪黑素对牛胚胎发育的促进作用通过 MT1 受体介导。同时,褪黑素能显著影响牛胚胎发育过程中氧化、凋亡及发育相关重要基因(*SLC2A1*, *DNMT1A* 和 *DSC2*)的表达。本研究结果提供了褪黑素在体外条件下促进下牛胚胎发育的新机制。

3.研究了褪黑素对体外发育胚胎质量的影响。本实验研究了褪黑素处理对体外发育囊胚玻璃化冷冻后死亡率、孵化率及发育相关基因表达的影响。研究表明,褪黑素(10⁻⁷ M)组牛囊胚玻璃化冷冻并解冻培养 24 小时后囊胚孵化率显著高于对照组,而褪黑素组囊胚冷冻解冻后 48 至 72h,囊胚死亡率显著低于对照组。此外,褪黑素组囊胚冷冻解冻后 *DNMT3A*, *OCC*, *CDH1* 表达显著上调, *AQP3* 的表达显著下调。综上所述,褪黑素不仅加快牛胚胎体外发育的速度及提高囊胚发育率,而且还通过提高抗冷冻能力及调控发育相关基因的表达而提高囊胚质量。

4.研究了褪黑素对小鼠体外发育囊胚移植后附植效率的影响。研究显示,10⁻⁷M 褪黑素能显著提高小鼠体外发育囊胚移植后的妊娠率(95.0% vs. 67.8%),窝产仔数(4.1 只/窝 vs. 2.7 只/窝)和出生后代的存活率(96.84% vs. 81.24%)。分子研究显示,褪黑素显著上调了超氧化物歧化酶(SOD)和抗凋亡基因 *bcl-2* 的表达,下调了促凋亡基因 *p53* 和 *caspase-3* 的表达。说明褪黑素通过减少 ROS 产生及抑制细胞凋亡而提高了囊胚质量,高质量的囊胚移植后能产生更多且更健康的后代。

综上所述,白藜芦醇诱导牛卵母细胞孕激素分泌和降低胞内 ROS 水平、提高 GSH 水平,并可能通过 Sirt1 途径提高牛卵母细胞成熟及体外受精后发育效率;褪黑素通过降低胚胎发育过程中抗氧化抗凋亡基因(*GPX4*, *SOD1* 和 *BCL-2*)和发育相关重要基因(*SLC2A1*, *DNMT1A* 和 *DSC2*)的表达,下调促凋亡基因(*P53*, *Bax* 和 *Caspase-3*)表达,且通过 MT1 受体提高牛胚胎体外发育的效率和质量;通过上调 *DNMT3A*、*OCC*、*CDH1* 表达,下调 *AQP3* 表达,增强牛胚胎冷冻保存的抗冷冻能力;通过上调超氧化物歧化酶(SOD)和抗凋亡基因 *bcl-2* 表达,下调促凋亡基因 *p53* 和 *caspase-3* 表达,减少 ROS 产生及抑制细胞凋亡,显著提高小鼠囊胚移植后的附植和产仔成活效率。

关键词:白藜芦醇,褪黑素,卵母细胞成熟,早期胚胎发育,胚胎附植

Abstract

In vitro oocyte maturation and embryo development are the basis researches of development biology, improve the *in vitro* embryo production efficiency has great significance in improve animal production and to promote the application of assisted reproductive technology. In this study, we found the mechanisms of resveratrol and melatonin in *in vitro* oocyte maturation and embryo development. The results were as follows:

1. Experiment I analyzed the potential beneficial effects and mechanisms of action of resveratrol on the maturation of bovine oocytes that were incubated in different concentrations of resveratrol (0.1, 1.0 or 10 μ M) as germinal vesicle (GV) oocytes. Resveratrol significantly increased progesterone secretion and decreased estradiol-17 β secretion by cumulus cells. The elevated levels of progesterone activated the *Mos/MEK/p42* MAPK cascade in the oocytes. At a concentration of 1.0 μ M, resveratrol significantly improved cumulus expansion, polar body formation, the (hatched)blastocyst rate and the mean number of cells/blastocyst. Meanwhile, resveratrol significantly reduced the level of ROS, increased the level of GSH. For the first time, the expression of the sirtuin 1 gene was identified in granulosa cells, cumulus cells, oocytes and blastocysts. Further studies revealed that resveratrol promoted sirtuin 1 gene expression. In conclusion, resveratrol promoted bovine oocyte maturation and subsequent post-IVF embryonic development by inducing progesterone secretion and antioxidant effect, probably in a manner dependent on Sirtuin 1.
2. Experiment II addressed the mechanisms related to the beneficial effects of melatonin on mammalian embryonic development. To examine the potential beneficial effects of melatonin on bovine embryonic development, different concentrations of melatonin (10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} M) were incubated with fertilized embryos. Melatonin in the range of 10^{-11} to 10^{-5} M significantly promoted embryonic development both in early culture medium (CR1aa+3mg/ml BSA) and in later culture medium (CR1aa+6%FBS). The most effective concentrations applied in the current studies were 10^{-9} and 10^{-7} M. Using quantitative real-time PCR with immunofluorescence and western blot assays, the expression of melatonin receptor MT1 and MT2 genes were identified in bovine embryos. Further studies indicate that the beneficial effects of melatonin on bovine embryo development were mediated by the MT1 receptor. This is based on the facts that luzindole, a non-selective MT1 and MT2 antagonist, blocked the effect on melatonin-induced embryo development while 4-P-PDOT, a selective MT2 antagonist, had little effect. Mechanistic explorations uncovered that melatonin application during bovine embryonic development significantly up-regulated the expression of antioxidative (*Gpx4*, *SOD1* and *bcl-2*) and developmentally important genes (*SLC2A1*, *DNMT1A* and *DSC2*) while down-regulating expression of pro-apoptotic genes (*P53*, *BAX* and *Caspase-3*). The results obtained from the current studies provide new information regarding the mechanisms by which melatonin promotes bovine embryonic development under both *in vitro* and *in vivo* conditions.
3. Experiment III evaluated the potential effects of melatonin on the kinetics of embryo development and

quality of blastocyst during the process of *in vitro* bovine embryo culture. Bovine cumulus–oocyte complexes (COCs) were fertilized after *in vitro* maturation. The presumed zygotes were cultured in *in vitro* culture medium supplemented with or without 10^{-7} M melatonin. The cleavage rate, 8-cell rate and blastocyst rate were examined to identify the kinetics of embryo development. The hatched blastocyst rate, mortality rate after thawing and the relevant transcript abundance were measured to evaluate the quality of blastocyst. The results showed that melatonin significantly promoted the cleavage rate and 8-cell embryo yield of *in vitro* produced bovine embryo. In addition, significantly more blastocysts were observed by Day 7 of embryo culture at the presence of melatonin. These results indicated that melatonin accelerated the development of *in vitro* produced bovine embryos. Following vitrification at Day 7 of embryo culture, melatonin (10^{-7} M) significantly increased the hatched blastocyst rate from 24h to 72h and decreased the mortality rate from 48h to 72h after thawing. The presence of melatonin during the embryo culture resulted in a significant increase in the gene expressions of *DNMT3A*, *OCC*, *CDH1* and decrease in that of *AQP3* after thawing. In conclusion, melatonin not only promoted blastocyst yield and accelerated *in vitro* bovine embryo development, but also improved the quality of blastocysts which was indexed by an elevated cryotolerance and the up-regulated expressions of developmentally important genes.

4. Experiment IV verified that melatonin at its physiological concentration (10^{-7} M) significantly promoted the *in vitro* development of murine pronuclear embryos. This was indicated by the increased blastocyst rate, hatching blastocyst rate and blastocyst cell number with melatonin treatment. In addition, when these blastocysts were implanted into female recipient mice, the pregnancy rates (95.0% vs. control 67.8%), litter sizes (4.1 pups/litter vs. control 2.7pups/litter), and postnatal survival rates of offspring (96.84% vs. control 81.24%) were significantly improved compared to their non-melatonin treated counterparts. Mechanistic studies revealed that melatonin treatment upregulates gene expression of the antioxidant enzyme, superoxide dismutase (SOD), and the anti-apoptotic factor bcl-2 while downregulating the expression of pro-apoptotic genes p53 and caspase-3. Due to these changes, melatonin treatment reduces ROS production and cellular apoptosis during *in vitro* embryo development and improves the quality of blastocysts. The implantation of blastocysts with higher quality leads to more healthy offspring and increased pup survival.

Key words: Resveratrol; Melatonin; Oocyte maturation; Early embryo development; Embryo implantation.

目录

中文摘要..... I

ABSTRACT..... III

第一章 文献综述..... 1

 第一节 褪黑素在动物繁殖中的研究进展及其作用机制..... 1

 1. 引言..... 1

 2. 褪黑素受体及其信号通路..... 1

 3. 褪黑素在哺乳动物生殖中的研究进展..... 3

 4. 褪黑素对动物繁殖的调控机理..... 8

 第二节 白藜芦醇在动物繁殖中的作用及其机制..... 10

 1. 引言..... 10

 2. 白藜芦醇的抗氧化和自由基清除作用..... 11

 3. 白藜芦醇的雌激素/抗雌激素样作用..... 12

 4. 白藜芦醇在哺乳动物生殖中的作用..... 13

 5. 白藜芦醇的潜在作用机理..... 15

 第三节 研究思路与研究内容..... 17

第二章 研究论文..... 18

 实验一 白藜芦醇对牛卵母细胞成熟的影响及机制研究..... 18

 引言..... 18

 1. 材料与方法..... 19

 2. 结果..... 26

 3. 讨论..... 31

 4. 小结..... 33

 实验二 褪黑素及其 MT1 受体对牛胚胎发育的作用及机制研究..... 34

 引言..... 34

 1. 材料与方法..... 35

 2. 结果..... 36

 3. 讨论..... 42

 4. 小结..... 44

 实验三 褪黑素对牛体外发育囊胚抗玻璃化冷冻能力的研究..... 45

 引言..... 45

 1. 材料与方法..... 46

 2. 结果..... 48

 3. 讨论..... 51

 4. 小结..... 53

 实验四 褪黑素对小鼠体外发育囊胚移植后附植效率及后代成活率的研究..... 54

 引言..... 54

1. 材料与方法	55
2. 结果	57
3. 讨论	61
4. 小结	61
第三章 结 论.....	63
参考文献.....	64
致 谢.....	88
个人简介.....	89

第一章 文献综述

第一节 褪黑素在动物繁殖中的研究进展及其作用机制

1. 引言

褪黑素 (Melatonin, MT) 化学结构为 N-乙酰基-5-甲氧基色胺, 分子量为 232.27, 是首先在松果体中发现的一种胺类物质, 褪黑素合成前体是色氨酸。松果体细胞从血液中摄取色氨酸后, 在羟化酶和脱羧酶的作用下生成血清素。血清素在 N-乙酰基转移酶 (NAT) 作用下生成 N-乙酰血清素。然后在甲基化酶作用下生成褪黑素, 此过程需要羟基吲哚-O-甲基转移酶 (HIOMT) 参与。松果体中 NAT 水平和 MT 水平基本保持一致并受到光照的调控。尽管以前认为 NAT 是褪黑素合成的限速酶, 但最近的研究表明 HIOMT 才起到调节褪黑素周期性分泌的作用。因为通过肾上腺素受体激动剂提高 NAT 表达后, 褪黑素的合成没有显著变化, 而提高 HIOMT 活性后松果体褪黑素合成显著升高(Ceinos et al., 2004)。

在脊椎动物包括人类中, 褪黑素可以在松果体、视网膜、皮肤、胃肠道等器官合成, 但是周期性分泌的器官只有松果体和视网膜(Cassone et al., 1997)。褪黑素在身体的每个部位均可检测到, 人排卵前卵泡液中褪黑素显著高于外周血(Nakamura et al., 2003)。尽管推测认为卵泡液中高浓度褪黑素是从血液中富集而来, 但卵泡本身可能也能合成褪黑素, 因为在卵巢组织中存在褪黑素合成的两个限速酶 NAT 及 HIOMT(Itoh et al., 1999)。这表明, 卵泡中的褪黑素可能来源于自身合成和血液富集两部分。

褪黑素具有抗氧化活性, 褪黑素能通过多条途径降低氧化应激, 是一种高效的自由基清除剂。褪黑素不仅本身具有直接清除自由基的功能, 而且其代谢产物具有进一步清除自由基的能力, 此过程称作级联放大作用(Kilic, 2004)。此外, 褪黑素可以诱导一系列酶的产生, 这些酶可以将新陈代谢的产物转化为没有危害性的分子或者诱导其他内源性抗氧化酶的产生(Pablos et al., 1995)。Ozturk(2000)等报道, 小鼠用 10mg/kg 褪黑素处理 7 天后其超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性升高。Baydas(2002)等发现, 松果体切除的大鼠由于不能产生褪黑素而导致谷胱甘肽过氧化物酶活性降低。类似的, 褪黑素处理能提高 SOD, GPx 和谷胱甘肽还原酶水平(Rodriguez et al., 2004)。Mayo 等首次报道外源褪黑素处理能引起 Cu, Zn-SOD 和 Mn-SOD mRNA 水平的升高(Mayo et al., 2002)。他们发现, 褪黑素可以诱导新蛋白的合成, 然后调节抗氧化酶的表达 (如 CuZn-SOD, Mn-SOD 和 GPx)。正因为褪黑素具有强大的抗氧化性, 所以褪黑素能发挥许多生物学功能, 如抗癌、抗糖尿病及抗阿尔茨海默氏病等。

2. 褪黑素受体及其信号通路

褪黑素部分功能的发挥是通过与 G 蛋白偶联膜受体 MTNR1A 和 MTNR1B (也称 MT1 和 MT2, 它们以结合或单体存在) 结合, 抑制 cAMP 的合成而实现的(Reiter et al., 2009)。同时, 褪黑素也能与核受体 RZR/ROR α 结合, 进而引起 RZR 调控元件结合 p21 和 5-脂氧合酶等基因的启动子, 从而调控转录(Jung et al., 2006)。目前研究最清楚的是 MT 能激活百日咳毒素敏感性 G 蛋白抑制 cAMP 的合成。首先在青蛙的黑色素细胞中发现 MT 能下调 cAMP 含量(White et al., 1987),

在哺乳动物的脑垂体、视交叉上核、脑动脉中也有此现象(Morgan et al., 1994)。Reppert 等运用重组人褪黑素受体, 证明了褪黑素受体 MT1 和 MT2 的信号机制(Reppert et al., 1995)。最近的研究表明, MT 可以引起多种受体调控的细胞反应, MT1 和 MT2 有关的信号转导机制如下:

2.1 MT1 型褪黑素受体信号通路

MT1 型褪黑素受体既能与百日咳毒素敏感 G 蛋白(Gi)偶联, 也能与非敏感的 G 蛋白(Gq/11)偶联(Roka et al., 1999)。激活的 MT1 型受体能减少由毛喉素调控的 cAMP 合成(Dubocovich et al., 2010)。同时, 蛋白激酶 A 和环磷腺苷反应元件结合蛋白(CREB)的磷酸化也受到抑制(Witt-Enderby et al., 1998)。百日咳毒素敏感 G 蛋白 $\beta\gamma$ 亚族能通过 PGF2 增强磷酸化酶的活性, 引起磷酸肌醇或 ATP 的升高(Godson et al., 1997; Roka et al., 1999)。此外, 在非神经细胞内 MT1 型受体能激活 MEK1/2-ERK1/2 通路(Radio et al., 2006)。

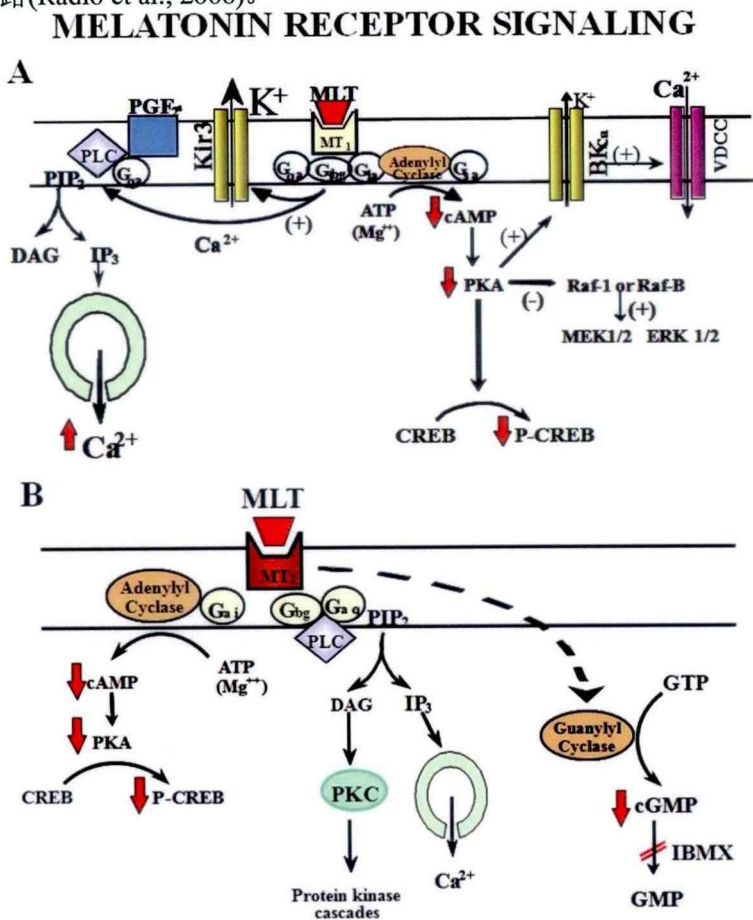


图 1 MT1 和 MT2 褪黑素受体信号通路。

A: 褪黑素和 MT1 受体结合后激活两条通路, 通过 Gq 偶联受体 α -亚单位抑制 cAMP 的合成及通过 $\beta\gamma$ 亚单位增强磷酸肌醇的分解。B: 褪黑素和 MT2 结合后的信号通路。MT2 通过 PKC 途径介导昼夜节律 (尚未证明), DAG, 甘油二酯; PKA 蛋白激酶 A; R, Gq-偶联受体 (如前列腺素 F2 α 受体 FP 和 嘌呤受体 P2Y) (Dubocovich, 2012)

Fig.1 MT1 and MT2 melatonin receptor signaling. A, melatonin (MLT) signals through activation of the MT1 receptor via two parallel pathways mediated by the α -subunit (i.e., inhibition of cAMP formation) and the $\beta\gamma$ -subunits (i.e., potentiation of phosphoinositide turnover stimulated by a Gq-coupled receptor (R)) of Gi. B, signaling pathways

coupled to MT2 melatonin receptor activation. Melatonin-mediated phase shifts of circadian rhythms through MT2 receptors are mediated by PKC activation (the mechanism leading to PKC activation remains putative, however). DAG, diacylglycerol; PKA, protein kinase A; R, Gq-coupled receptor (i.e., prostaglandin F_{2α} receptor FP and purinergic receptor P2Y) (Dubocovich, 2012)

MT1 型受体也能调节离子流动和离子通道。在绵羊垂体结节部细胞, 激活 MT1 型受体能通过百日咳毒素敏感 G 蛋白调节细胞内的 Ca^{2+} (Brydon et al., 1999)。与此相反, 在新生小鼠的垂体细胞内 MT 会通过百日咳毒素敏感 G 蛋白抑制 Ca^{2+} 的内流 (Slanar et al., 2000)。平滑肌内与 Gi/Go 偶联的 MT1 型受体, 能通过降低 cAMP 而诱导 Ca^{2+} 激活的钾离子通道的磷酸化调节血管收缩 (Masana et al., 2002)。在体外培养的大鼠子宫肌层细胞内, MT 能瞬时提高 BKCa 通道的活性, 这种效应可以通过百日咳毒素或抑制 PKA 而消除 (Steffens et al., 2003)。MT 也能激活内向整流钾通道 (Kir), Kir 通路的激活可能是 MT 引起的 K^+ 电导性升高的基础 (Jiang et al., 1995), 也是 MT 抑制视交叉上核神经元自发放电的原因。新生垂体细胞的超极化也可能通过激活 MT1 型受体来实现。综合相关的数据, 可以认为 MT1 型受体的激活能引起一系列组织依赖性的信号反应。

2.2 MT2 型褪黑素受体信号通路

Reppert 和 Petit 分别证明, 重组 MT2 型受体与 cAMP 合成减少有关 (Reppert et al., 1995)。激活 MT2 型受体, 也能抑制 cGMP 合成 (Dubocovich et al., 2010)。在视交叉上核, 褪黑素能通过激活 MT2 型受体提高 PKC 的活性, MT2 型受体特异拮抗剂 4P-PDOT 能抑制此过程。这一发现表明, MT2 型受体能调节磷脂酶 C (PLC) / 甘油二酯激酶 (DAGK) 信号通路 (McArthur et al., 1998)。而在视网膜上, MT2 型受体调节细胞内的 Ca^{2+} , 抑制神经递质的释放 (Dubocovich 1995)。视网膜、人子宫肌层都有 MT1 和 MT2 的存在 (Schlabritz-Loutsevitch et al., 2003)。在体外培养的未妊娠女性子宫肌层细胞中, 4P-PDOT 能解除 MT 对 cAMP 信号通路的抑制。而近期的实验证明, MT 对人类子宫肌层平滑肌细胞的作用, 与 MT2 型受体有关, 进一步的探究发现, PKC 参与了 MT2 型受体的调控通路 (Sharkey et al., 2009)。

3. 褪黑素在哺乳动物生殖中的研究进展

3.1 褪黑素与卵泡发育

卵泡发育是一个非常复杂的过程, 包括内分泌、旁分泌和自分泌机制。卵泡发生始于卵泡库中原始卵泡的生长。原始卵泡必须经过初级卵泡、次级卵泡及有腔卵泡的生长过程, 才能发生排卵及排出有受精能力的卵母细胞。卵泡是否能发育到次级或有腔卵泡依赖于体内 FSH 水平。有趣的是, 在生殖周期中只有少部分卵泡能充分发育并发生排卵, 而大部分卵泡则发生闭锁。闭锁的卵泡通常只有很少的卵泡液, 这可能是限制其进一步发育的原因。卵泡液主要包含水、电解质、血清蛋白及颗粒细胞所分泌的高浓度固醇类激素 (Hirshfield, 1990)。

人排卵前卵泡液中含有比外周血浓度高 3 倍的褪黑素 (Brzezinski et al., 1987), 且大卵泡褪黑素浓度显著高于小卵泡。褪黑素及其前体, 血清素和 N-乙酰血清素均被证明存在人卵巢中且在人卵巢匀浆中发现了褪黑素合成的两个限速酶, NAT 和 HIOMT (Itoh et al., 1999)。这意味着卵巢有可能

能合成褪黑素并分泌到卵泡液中。

有腔卵泡的特征是能够表达类固醇激素合成酶，促性腺激素受体和调节因子。当卵泡进一步成熟时，会出现从FSH到LH分泌的转变，这个过程决定了哪些卵泡可以继续生长。排卵卵泡的筛选机制和颗粒细胞LH受体的表达水平相关(Webb et al., 2002)。而褪黑素处理 (10 pM–100 nM)能显著提高人颗粒细胞LH受体表达水平(Woo et al., 2001)。

性腺类固醇激素在卵巢细胞的生长和分化过程中起着重要作用。卵泡膜细胞和颗粒细胞的相互作用是雌激素分泌所必需的(Drummond, 2006)。类固醇合成酶P450scc, P450c17和 P450 芳香化酶分别调节孕酮、雄烯二酮及雌二醇的合成。这些酶由颗粒细胞和卵泡膜细胞内的cAMP所激活，而cAMP的水平受FSH、LH及其受体的调节(Millier et al., 1994)。雌激素和促性腺激素还协同促进颗粒细胞生长和分化(Drummond, 2006)。孕酮对卵泡的生长和发育作用有限，但是它能够调节颗粒细胞的功能和排卵时卵泡的破裂过程(Graham et al., 1997)。据报道，孕酮受体敲除的小鼠不孕，因为其不能排卵(Lydon et al., 1995)。雄激素能促进早期卵泡发育(Murray et al., 1998)，但是也能通过诱导闭锁和凋亡抑制卵泡发育(Billig et al., 1993)。

在卵泡发育的不同阶段，褪黑素能影响类固醇激素的产生(WU et al., 2001)。Soares等人研究认为松果体切除后闭锁卵泡增多，雌激素水平升高而孕酮水平降低(Soares et al., 2003)。此外，人排卵前卵泡液中孕酮和褪黑素浓度正相关(Nakamura et al., 2003)。Adriaens(2006)等人用褪黑素 (100 mM)处理小鼠腔前卵泡12天后能显著提高孕酮及雄烯二酮的分泌。用100 ng/mL褪黑素处理猪腔前卵泡30h后能刺激孕酮及雄烯二酮的产生，但对雌二醇水平无显著影响(Tanavde et al., 2003)。

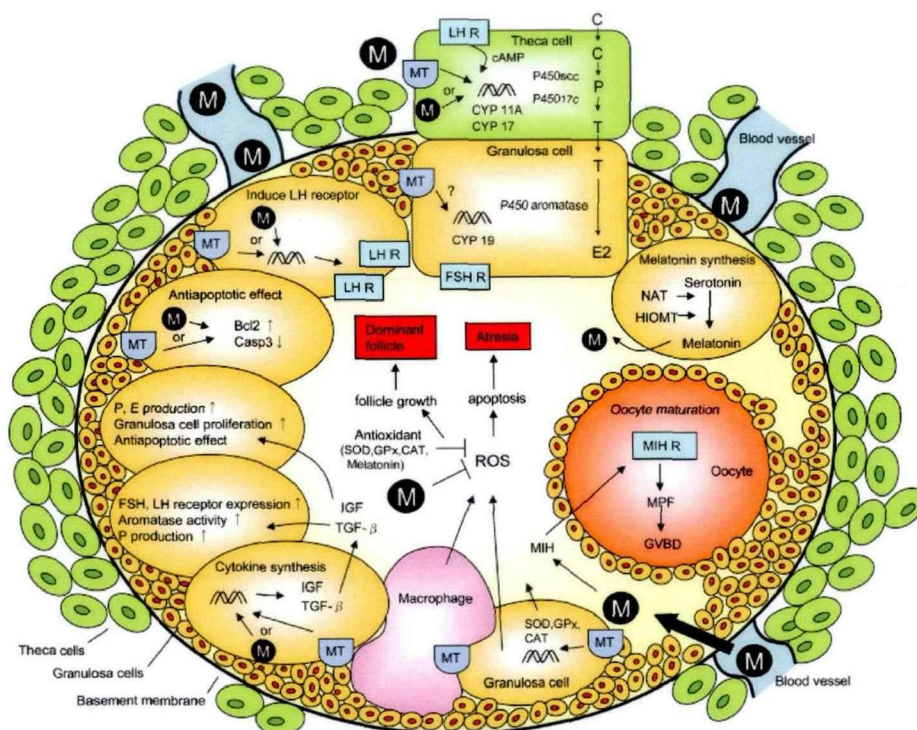


图2 褪黑素在卵泡中的作用示意图。

卵泡中的褪黑素可能由颗粒细胞自身合成和从血液中富集。褪黑素可以调控卵泡壁细胞和颗粒细胞固醇类合成酶的表达而影响类固醇激素的分泌。褪黑素同时可以调控LH mRNA的表达, *Bcl2* 和 *Casp3* 的生成, IGF和TGF-β的

活性和成熟诱导激素 (MIH) 的活性。褪黑素能调节颗粒细胞SOD, GPx和CAT的表达。过多的ROS会引起凋亡和卵泡闭锁, 而卵泡内的褪黑素可以直接或间接清除ROS而抑制卵泡闭锁, 从而使卵泡继续发育为优势卵泡。M=褪黑素; MT=褪黑素受体; LHR= LH受体; FSHR = FSH受体; C=胆固醇; NAT=N-乙酰转移酶; HIOMT=羟基吲哚-O-甲基转移酶; MIH=成熟诱导激素; MPF=成熟促进因子; GVBD=生发泡破裂; ROS=活性氧; SOD=超氧化物歧化酶; GPx=谷胱甘肽还原酶; CAT=过氧化氢酶; IGF=胰岛素样生长因子; TGF- β =转化生长因子 β 。

Fig.2 Schematic representation of the presumed roles of melatonin in ovarian antral follicle. Melatonin in the follicular fluid (FF) may be produced by granulosa cells (GC) but in addition, it is taken up from the blood through the basement membrane. Melatonin regulates sex steroid production by regulating steroidogenic enzyme activities or their gene expression in thecal cells and GCs. Melatonin also regulates LH mRNA expression, *Bcl2* and *Casp3* production, IGF and TGF- β activity, and gene expression and maturation-inducing hormone (MIH) activity. Macrophage and GCs produce ROS and melatonin modulates *SOD*, *GPx*, and *CAT* gene expression in GCs. Excessive ROS induces apoptosis and results in follicular atresia; however, increased levels of melatonin in FF scavenges ROS through its direct and indirect antioxidant actions and prevents atresia. The follicle may be rescued by melatonin and continues its growth to become a dominant follicle. M = melatonin; MT = melatonin receptors; LH R = LH receptor; FSH R = FSH receptor; C = cholesterol; NAT = N-acetyltransferase; HIOMT = hydroxyindole-O-methyltransferase; MIH = maturation-inducing hormone; MPF = maturation-promoting factor; GVBD = germinal vesicle breakdown; ROS = reactive oxygen species; SOD = superoxide dismutase; GPx = glutathione peroxidase; CAT = catalase; IGF = insulin-like growth factor; TGF- β = transforming growth factor β .

局部分泌的生长因子, 如胰岛素样生长因子 (IGFs)、转化生长因子 β (TGF- β)家族 (抑制素、激动素和骨形成蛋白 (BMPs) 等) 和促性腺素协同促进卵泡发育。卵泡发育过程中, 卵泡膜细胞和颗粒细胞能分泌IGFs(Poretsky et al., 1999)。IGFs是促进有丝分裂和抗凋亡的多肽, 它能促进分化及和特异性受体结合后发挥胰岛素样作用。IGF-I和IGF-II能诱导人颗粒细胞和颗粒-黄体细胞DNA合成及雌二醇和孕酮分泌(Poretsky et al., 1999)。IGF-I在卵泡中起抗凋亡作用, 而IGF结合蛋白能增强卵巢细胞凋亡(Chun et al., 1994)。人颗粒细胞用0.01–10mg/mL褪黑素处理能诱导IGF-I的产生(Schaeffer et al., 1997)。最近, Picinato (2008)等证明, 0.1 mM褪黑素能诱导IGF-I受体及激活两条细胞内信号通路: 1) PI3 K/AKT, 主要参与细胞新陈代谢; 2) MEK/ERKs, 主要参与细胞增值, 生长和分化。

卵泡闭锁是细胞凋亡过程, 其主要受促凋亡和抗凋亡因子调节。最近, 有研究表明褪黑素能通过上调*Bcl-2*及下调*Caspase-3*活性抑制线粒体凋亡通路。疟疾感染的小鼠注射10 mg/kg 褪黑素能通过抑制*Caspase-3*活性显著减少肝细胞凋亡(Guha et al., 2007)。老龄大鼠肝脏凋亡及线粒体细胞色素释放水平上升, *Bax*与*Bcl-2*的比例上调, *Caspase-3*活性升高。而饮用20 mg/L褪黑素4周后, 上述症状消失(Molpeceres et al., 2007)。

3.2 褪黑素与卵母细胞成熟

哺乳动物卵巢中存在褪黑素的两种膜受体及核受体。褪黑素在卵巢中的部分功能是通过膜受体介导的(Reiter et al., 2013)。这些受体存在于成熟卵泡中的颗粒细胞和卵泡膜细胞上, 也存在于黄体细胞上, 这表明褪黑素能直接调控卵巢的生理功能(Yonei et al., 2010)。

已证实褪黑素在卵巢水平可以通过cAMP调控卵泡固醇激素的释放,然后影响卵泡膜细胞和颗粒细胞固醇合成调节蛋白(StAR)的表达。在线粒体中,StAR蛋白负责将胆固醇从膜外转运到膜内,而膜内存在大量的固醇合成酶(Tamura et al., 2009)。

在卵泡发育的不同阶段,褪黑素可以影响特异性固醇合成酶基因的表达(CYP11A和CYP17),这些酶分别合成孕酮、雄烯二酮及雌激素(Adriaens et al., 2006)。在人类中,Woo(2001)等报道褪黑素可以通过提高颗粒细胞LH受体的表达水平来调节卵泡对LH的反应。此外,褪黑素还能通过提高胰岛素样生长因子(IGF-1)的产生促进卵泡发育,IGF-1能促进颗粒细胞的有丝分裂(Picinato et al., 2008)。

许多研究报道卵泡液中高浓度的褪黑素对抑制卵泡闭锁十分重要,褪黑素能保护排卵时卵母细胞免受自由基的危害,使得排卵前卵泡能充分发育(Tamura et al., 2009)。卵泡液中褪黑素浓度和卵泡大小有关,人卵泡越大,褪黑素浓度越高(Nakamura et al., 2003),但在猪上,卵泡越大,褪黑素浓度越低(Shi et al., 2009)。

在人类卵巢提取物中,Itoh等人发现了褪黑素合成的前体(N-乙酰血清素和血清素)及褪黑素合成的两个关键酶:NAT和HIOMT(Itoh et al., 1999)。颗粒细胞及卵母细胞中存在血清素表明褪黑素可能能够在这些部位合成,褪黑素能作为抗氧化剂直接清除自由基及促进颗粒细胞性固醇激素的合成(Amireault et al., 2005)。已证实褪黑素可能在牛(El-Raey et al., 2011)和人(Kim et al., 2013)的卵丘卵母细胞复合体中合成。

自由基及ROS是细胞新陈代谢的产物(Fujimoto et al., 2011),作为外源分子,在细胞中起第二信使的作用,能激活细胞级联信号通路,例如丝裂源活化蛋白激酶及转录因子(Pandey et al., 2010)。然而,ROS能快速和细胞内分子(蛋白、脂质和DNA)发生反应并改变它们的功能(Goud et al., 2008)。而这将导致一系列后果,如酶的失活,DNA断裂及细胞的最终死亡(Banerjee et al., 2012)(Khalil et al., 2013)。

哺乳动物的卵母细胞含有复杂的亚细胞结构,这些结构对温度及渗透压十分敏感。在冷冻保存过程中,卵母细胞瞬时经历的剧烈变化过程对其质量有很大影响(Tamura et al., 2009)。卵母细胞冷冻后也会产生ROS(Somfai et al., 2007)。ROS会影响对冷冻后卵母细胞存活十分关键的氧化还原平衡及细胞内的抗氧化系统。在这个平衡中当氧化水平较高时会显著降低细胞活力(de Leon et al., 2012)。

在生理状态及氧化条件下,褪黑素可以间接刺激抗氧化酶和抑制氧化酶,以及影响细胞内这些酶的mRNA水平(Rodriguez et al., 2004)。褪黑素的主要优势是其具有多重功能及分布广泛(J Reiter et al., 2013),这和其他已知的自由基清除剂有很大的不同(Leon et al., 2005)。

褪黑素可以促进许多物种的卵母细胞成熟,如牛、猪、水牛和羊(Rodriguez-Orsorio et al., 2007; Manjunatha et al., 2009; Tsiligianni et al., 2009; El-Raey et al., 2011)。成熟液中添加褪黑素可以减少ROS(Nakano et al., 2012)及促进卵母细胞成熟(Kang et al., 2009; Shi et al., 2009)。

牛卵母细胞体外成熟时添加10或50 ng/ml褪黑素能促进卵母细胞从MI到MII期的发育,提高核成熟率,促进胞质线粒体的均匀分布及卵丘扩展(El-Raey et al., 2011)。卵母细胞体外成熟过程的氧气浓度影响褪黑素的功能,高氧情况下褪黑素能显著促进牛卵母细胞成熟,这意味着褪黑素作用的发挥依赖于培养条件。

褪黑素也用于猪的卵母细胞成熟(Kang et al., 2009; Shi et al., 2009)。Rodriguez-Orsorio(2007)等

报道,成熟液中添加褪黑素能显著提高卵母细胞质量,这可能是由于褪黑素及其代谢产物发挥了自由基清除作用(Galano et al., 2013)。成熟液中添加褪黑素能提高核成熟、胞质成熟及降低ROS水平(Kang et al., 2009)。在水牛中,成熟液中添加褪黑素能通过降低氧化应激、脂质过氧化及DNA损伤而显著提高核成熟率(Manjunatha et al., 2009)。

3.3 褪黑素与胚胎发育

受精后血浆中高浓度的褪黑素能增加黄体细胞分泌孕酮,这对于确保妊娠是必需的(Tamura et al., 2008)。除了直接清除自由基,褪黑素还能调节抗氧化基因及抗氧化酶的表达,这对于成功妊娠也是必须的(Korkmaz et al., 2012)。

褪黑素在胚胎附植及胚胎发育中发挥着关键作用(Dair et al., 2008)。这些作用体现在在许多哺乳物种早期胚胎发育阶段能表达褪黑素受体(Shang et al., 2007)。褪黑素通过MT1和MT2膜受体抑制腺苷酸环化酶(Dubocovich 2007)。在体外培养的牛胚胎中,首次发现褪黑素MT1受体在胚胎发育的第七天表达(Sampaio et al., 2012)。

褪黑素对胚胎发育的促进作用部分归因于其能下调促凋亡基因(BAX和caspase-3)和上调抗凋亡基因(Bcl-2)的表达,同时提高细胞内的谷胱甘肽水平及降低ROS水平(Reiter et al., 2009; Gao et al., 2012)。这些作用使得囊胚凋亡水平降低,胚胎质量及随后的附植效率提高(Wang et al., 2013)。

家畜胚胎中存在大量脂滴,这对于其受精及早期胚胎发育过程中的能量代谢十分重要。但是,该生化过程中胚胎也易受到氧化应激的伤害(Sturmey et al., 2009)。和体内相比,胚胎在体外培养过程中暴露在相对较高的氧化应激条件下,其产生的活性氧也更多(Choi et al., 2008)。胚胎培养过程过多的活性氧会产生毒害作用,因为多余的ROS会和脂滴发生反应,损害关键的细胞结构,如损害细胞膜的完整性,引起蛋白结构及功能的改变及损害核酸结构(Tamura et al., 2012)。

卵母细胞抗氧化能力的降低及ROS的升高是引起胚胎发育阻滞和细胞凋亡的主要原因(Khalil et al., 2013)。细胞凋亡是胚胎在体外非最佳培养条件下的常见过程(Choi et al., 2008; Nánassy et al., 2008)。凋亡细胞数的升高引起胚胎在体外生产过程的逐渐死亡和解冻胚胎的生存力低下(Hao et al., 2003)。

胚胎培养液中添加褪黑素对小鼠(Ishizuka et al., 2000)、猪(Rodriguez-Osorio et al., 2007)、牛(Sampaio et al., 2012)和羊(Abecia et al., 2002)均有促进效果。从另一方面说,褪黑素对囊胚率的影响和添加褪黑素浓度(Manjunatha et al., 2009)及培养环境有很大关系(Kim et al., 2013, Papis et al., 2007)。

褪黑素能促进小鼠体外胚胎发育(Kang et al., 2009)。根据Ishizuka(2000)等的研究, 10^{-6} M褪黑素能降低氧化应激,促进受精及体外受精后的早期胚胎发育。培养液中添加褪黑素能显著促进小鼠原核胚体外发育后的囊胚率、孵化囊胚率及囊胚细胞数,因此,这些囊胚移植后附植及妊娠效率提高(Wang et al., 2013)。

褪黑素可以提高猪孤雌胚胎体外发育的囊胚率、囊胚细胞数及降低细胞凋亡。这是因为褪黑素具有抗氧化作用,能够减少ROS损伤(Nakano et al., 2012)及提高胚胎的发育能力(Choi et al., 2008)。当褪黑素浓度小于 10^{-9} M时不能够清除足够的ROS,而当褪黑素浓度大于 10^{-5} M,会引起

细胞损伤及降低囊胚率。因此,猪胚胎体外培养的最佳褪黑素浓度为 10^{-5} - 10^{-9} M。

在高氧(20%)条件下,培养液中添加褪黑素能通过减少氧化应激而提高牛体外受精胚胎发育(Papis et al., 2007)。在羊上,褪黑素能提高解冻胚胎的存活率,提高解冻培养24小时后胚胎的孵化率及降低发育阻滞胚胎的百分率(Abecia et al., 2002)。外源性褪黑素还对营养不良的母羊有促黄体化和提高体内生产胚胎活力的作用(Vázquez et al., 2010)。在山羊中,供体埋植褪黑素可以提高超数排卵后的繁殖力、胚胎质量和数量(Luther et al., 2005)。在体外,褪黑素也可以提高山羊卵裂率、囊胚率和囊胚细胞数(Berlinguer et al., 2009)。

4. 褪黑素对动物繁殖的调控机理

4.1 褪黑素对下丘脑-垂体-性腺轴的调控

季节性繁殖动物因日照长短的变化引起的内源褪黑素释放量的改变,能作用于下丘脑-垂体-性腺轴(Frungiari et al., 2005)。在无限增长的 GnRH 细胞中,内源褪黑素通过作用于 MT1 及 MT2 受体减少 GnRH mRNA 的表达,用褪黑素受体抑制剂 luzindole 可以抑制此作用。在新生大鼠脑垂体中,褪黑素通过百日咳毒素敏感性 G 蛋白受体抑制 GnRH 诱导的 LH 的释放, cAMP、cGMP 的聚集及增加胞内钙离子的释放。褪黑素调节垂体促性腺激素分泌的机制包括作用于 MT1 受体,但 MT2 不能排除在外。

褪黑素可能作用于下丘脑-垂体-性腺轴上的 MT1 和 MT2 受体调节卵巢和睾丸功能,褪黑素也可能直接作用于卵巢组织,在卵泡液中检测到了褪黑素。在多种卵巢组织中也检测到了 MT1 及 MT2 受体 mRNA 及 MT1 受体蛋白的表达。内源雌激素能够调节褪黑素受体的功能(Soares et al., 2003),而褪黑素能够促进多个物种包括人的颗粒细胞分泌孕酮。在人的黄体粒层细胞中,褪黑素能够增加 LH 受体及减少 GnRH 受体的表达(Woo et al., 2001)。在仓鼠的睾丸间质细胞中,褪黑素通过 MT1 受体抑制基础及绒毛膜促性腺激素诱导的 cAMP 及雌激素的产生(Frungiari et al., 2005)。

夜间分泌的褪黑素通过腺苷酸环化酶 G 蛋白偶联受体调节基因表达,由此与体内的生理节律相同步而调节季节性节律和昼夜节律。夜间松果体分泌的褪黑素作用于 MT1 受体,通过抑制 cAMP 依赖性信号通路来抑制垂体结节部生物钟基因 Per1 的表达(von Gall et al., 2002)。当早晨血液中的褪黑素浓度开始降低时,垂体结节部通过腺苷酸 A2b 受体的敏化解除转录抑制,Per1 基因开始表达(von Gall et al., 2002)。此外,在夜间,褪黑素同时通过作用于 MT1 受体抑制垂体结节部促乳素的释放。这可能是昼夜产生的褪黑激素向心脏中央起搏器及周围组织传递黑暗信号的一个普遍机制。

关于昼夜分泌的褪黑素和肾上腺素的关系在哺乳动物中得到阐述,人血液中皮质醇的峰值出现在早晨,因为夜间高水平褪黑素的存在,皮质醇一直处于低浓度水平。卷尾猴成年及胎儿肾上腺能表达 2-(125^I)吲哚褪黑素结合位点及 MT1 受体,但是不表达 MT2 mRNA(Torres-Farfan et al., 2004)。褪黑素能够抑制肾上腺细胞中促肾上腺皮质激素释放激素及降低促肾上腺皮质激素和丁酰-cAMP 诱导的皮质醇的产生。这种 MT1 介导的作用能够被抑制剂 luzindole 阻断。

在多种哺乳动物中,褪黑素通过感知光信号调节其繁殖。仓鼠的繁殖受到褪黑素介导的光信号的调控,但是,仓鼠不表达有功能作用的 MT2 褪黑素受体(Weaver et al., 1996)。通常认为繁殖是通过 MT1 褪黑素受体介导的,但这个假设缺乏直接证据。最近 Yasuo(2009)等报道了分别敲除

C3H 小鼠的 MT1、MT2 基因或同时敲除 MT1、MT2 会引起受光周期调控的 Diodinase 2 或 Diodinase 3 的表达发生变化。这些研究证明了 MT1 或 MT2 在调节下丘脑结节部感受光周期信号中所起的不同作用,同时证明了褪黑素通过 MT1 受体将光信号转化给下丘脑-垂体-性腺轴,从而调控繁殖作用(Yasuo et al., 2009)。

4.2 褪黑素对卵巢和子宫的调控

实验证明,褪黑素结合 MT1 和 MT2 后能激活 MAP 激酶,引起 p38 的积累(Jung et al., 2006)。p38 表达和磷酸化水平的升高引起 p53 表达和磷酸化的改变,进而影响 p53 的转录调节活性(Wagner et al., 2009)。褪黑素能调节 p53 和 p21 的表达,提高 p38 介导的 p53 磷酸化水平的升高(Kim et al., 2010),而 p38 MAPK 特异性抑制剂 PD98059 能阻断褪黑素对 p53 的调节作用。最近研究表明,对细胞上褪黑素受体选择性基因沉默或利用化学抑制剂 luzindole 处理均能阻断褪黑素对 p53 的调控作用,证明褪黑素在细胞水平能通过 MT1 和 MT2 调控 p38 的表达进而引起 p53 的积累和磷酸化水平的升高(Santoro et al., 2013)。

p53 基因是重要的抗癌基因,也是机体感受环境应激并进行调节的关键基因之一。p53 蛋白通过其 DNA 结合区 (DBD)与下游基因结合,从而调控下游基因的表达。2006 年 Hu 等发现 p53^{-/-}雌鼠胚胎着床、妊娠率和窝产仔数都显著降低,而雄性敲除鼠的生育率没有影响,进一步研究发现, p53 能调控 LIF 的表达进而影响到雌性动物的生殖。染色质免疫共沉淀结果显示, p53 蛋白能结合到 LIF 的内含子序列上,调节 LIF 的转录(Hu et al., 2007)。p53 对 LIF 的调控可能需要其它因子的协同作用,因为 p53 蛋白水平和活性在着床前子宫中并没有明显变化(Hu et al., 2007)。LIF 是雌二醇 (E₂) 敏感基因, E₂ 诱导子宫特别是妊娠第 4 天子宫高表达 LIF。因此, p53 可能与 E₂ 协同调控胚胎着床过程中 LIF 的表达,这一调控并不依赖 p53 表达水平的变化,而是通过 p53 和 ER 间的相互作用来进行(Levine et al., 2011)。也有实验证实, p53 结合到 DNA 序列上后,能与邻近的 ER 协同调节靶基因的表达(Menendez et al., 2010)。

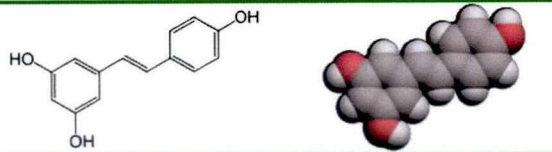
人排卵前大卵泡中 MT 含量高于小卵泡, MT 含量和孕酮 (P) 呈正相关(Jung et al., 2006)。人子宫上,存在具有功能的 MT1 和 MT2,妊娠和非妊娠状态下表达情况不同,其影响子宫的昼夜收缩节律和分娩。在大鼠上,切除松果体后胚胎附植点显著减少,雌二醇 (E₂) 上升, P 下降,补充外源褪黑素后恢复正常,显示褪黑素在胚胎附植过程中发挥重要作用(Dair et al., 2008)。女性月经周期中血清褪黑素含量黄体期较卵泡期高,颗粒细胞-黄体细胞上有褪黑素结合位点,褪黑素能直接激活黄体细胞分泌 P,同时,褪黑素(10 pM-100 nM)能显著提高黄体细胞 LH 受体的表达(Woo et al., 2001)。但也有一些实验表明褪黑素不影响或能抑制生长中的黄体细胞分泌 P。体外实验发现,短期的褪黑素处理(48h 内)能抑制 P 合成,而长时间则有促进作用(Tamura et al., 2009)。推测短期内褪黑素抑制 cAMP 而减少 P 合成,而一段时间后,褪黑素则促进 LH 受体表达,同时发挥保护黄体细胞作用,从而促进 P 的分泌。松果体切除大鼠,血清 P 下降、E₂ 升高, P 受体表达量降低, E₂ 受体不受影响,子宫内膜增厚,妊娠黄体数、附植点下降,而补充外源褪黑素后恢复正常。体外细胞实验证明,一定剂量的褪黑素对 E₂ 分泌有抑制作用,但能激活 E₂ 受体 ER α ,在非妊娠的大鼠子宫内褪黑素能提高孕酮受体 (PR) 表达量,降低雌激素受体 (ER) 表达量(Dair et al., 2008; Chuffa et al., 2011)。

第二节 白藜芦醇在动物繁殖中的作用及其机制

1. 引言

1.1 来源和结构

白藜芦醇（Resveratrol, RES），化学结构为 3,5,4'-三羟基-反式-二苯乙烯，分子量为 228.25，是植物为了应对机械性损伤、紫外线伤害和真菌感染而合成的一种抗毒素(Dercks et al., 1989)，其结构及基本性质如表 1 所示。这种天然的多酚类物质存在于超过 70 种植物中，在红葡萄酒和大部分食物中也能检测到其存在。据估计，新鲜的葡萄皮中含有约 50-100μg/g 白藜芦醇。在红葡萄酒中，白藜芦醇含量为 1.5-20mg/l(Siemann et al., 1992)。同样，在一些白葡萄酒和桃红葡萄酒也发现相当数量的白藜芦醇，而葡萄汁中含有约 4mg/l 的白藜芦醇。

表 1 白藜芦醇结构及基本性质	
	
别名	逆转醇, (E)-5-[2-(4-羟基苯基)-乙烯基]-1,3-苯二酚, 3,5,4-三羟基芪, 芪三酚
CAS 号	501-36-0
化学式	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
摩尔质量	228.25 g·mol ⁻¹
外观	白至淡黄色粉末
溶解性（水）	0.03 g/L
溶解性（DMSO）	16 g/L
溶解性（乙醇）	50 g/L
化学式	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
若非注明,所有数据均出自一般条件(25 °C, 100 kPa)	

通常情况下，白藜芦醇存在反式-（Z）和顺式-（E）两种同分异构体，而反式-白藜芦醇是发挥主要生物学功能的立体结构。在紫外线照射下，顺式-白藜芦醇可以转换为反式-白藜芦醇，此过程称为光异构化(Bernard et al., 2007)。反式白藜芦醇在高 PH 值及光照条件下均能稳定存在(Prokop et al., 2006)。

1.2 生物学功能

白藜芦醇具有很多生物学功能,研究表明,白藜芦醇具有很强的抗氧化能力(Raederstorff et al., 2013),能保护细胞免受活性氧等自由基的危害。白藜芦醇能增强端粒酶活性而保护细胞 DNA(Liu et al., 2013)末端，即端粒结构。在衰老的过程中端粒会逐渐缩短，细胞在衰老过程中随着时间的推移，暴露的 DNA 链逐渐受到损伤而抑制相应基因的表达。白藜芦醇也能保护细胞的能量工厂——线粒体(Liu et al., 2013)，同时白藜芦醇具有强烈的抗炎症作用(Olesen et al., 2013)及能影响特定的长寿基因的表达(Das et al., 2011; Liu et al., 2013)，这对于其抗衰老作用的发挥是至关重要的。

由于白藜芦醇具有很多生物学功能，所以白藜芦醇能作用于很多组织器官。例如，给小鼠饲

喂相当于人类 30mg/天的白藜芦醇后, 对其心脏、大脑和骨骼肌均能发挥保护作用(Barger et al., 2008)。研究表明, 白藜芦醇也能发挥神经保护作用, 其对记忆和认知能力有促进作用(Bai et al., 2013)。白藜芦醇也被证明是一种选择性雌激素受体调节剂, 在更年期的大鼠模型中, 白藜芦醇预防骨质丢失的程度与雌激素疗法相当, 同时, 白藜芦醇可以避免雌激素疗法对心血管和子宫产生的副作用(Zhao et al., 2013)。

虽然目前还未证实白藜芦醇能延长寿命, 但是, 白藜芦醇能够在细胞水平抑制年龄相关的变化, 如遗传表达变化及保护 DNA。正式因为这些作用, 白藜芦醇能够预防或延迟某些年龄相关的疾病, 如阿尔茨海默氏病、骨质疏松症、心血管疾病甚至癌症的发展。

2. 白藜芦醇的抗氧化和自由基清除作用

2.1 白藜芦醇对活性氧(ROS)产生的影响

研究表明, 活性氧(ROS)是引起氧化应激的主要原因。过量的 ROS 积聚诱导氧化反应, 进而对细胞大分子物质(脂类, 蛋白质和核酸)构成潜在危害。事实上, 由 ROS 诱导的 DNA 损伤会引起突变, 肿瘤发生和衰老。DNA 氧化损伤包括碱基修饰, 核糖损伤, DNA 链断裂和碱基缺失(Ahmad et al., 2005)。由于氧化剂、抗氧化剂和其他决定细胞内氧化还原状态的因素可以调控基因转录, 那么 ROS 也可以产生蛋白质损伤, 进而诱发其他类型的突变。

白藜芦醇具有抗氧化作用。白藜芦醇是一种自由基清除剂和高效的抗氧化剂。因为它能够促进各种抗氧化酶的活力。多酚类化合物作为抗氧化剂的能力取决于其酚羟基的氧化还原作用和其化学结构潜在的电子离域(Aggarwal et al., 2005)。Zini 首先证实了白藜芦醇通过三条途径发挥抗氧化作用(Zini et al., 1999): (1) 与还原型辅酶 Q 竞争性与 ROS 产生位点结合, 以降低氧化复合物的产生; (2) 清除线粒体内形成的 $O_2^{\cdot -}$ 自由基; (3) 抑制邻苯三酚诱导的脂质过氧化反应。事实上, 许多研究已经证明白藜芦醇能够清除 $O_2^{\cdot -}$ 自由基和羟基自由基(Leonard et al., 2003; Losa 2003)。

为了保护组织抵御 ROS 造成的伤害, 所有的细胞会启动防御过程, 包括产生超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽还原酶和谷胱甘肽过氧化物酶。白藜芦醇能够维持生物体系中胞内抗氧化物的有效浓度。例如, Losa 研究表明, 二苯乙烯能维持由 2-脱氧-D-核糖诱导氧化损伤的健康人体中分离的外周血单核细胞的谷胱甘肽水平。在先前的研究中, 白藜芦醇明显降低人类血液中蛋白质巯基的氧化(Olas et al., 2004)。同样, 白藜芦醇增加过氧化氢活化的人淋巴细胞中谷胱甘肽的水平。在另一项研究中, 白藜芦醇增加几种抗氧化酶的合成, 包括谷胱甘肽过氧化物酶, 谷胱甘肽 S-转移酶和谷胱甘肽还原酶(Yen et al., 2003)。

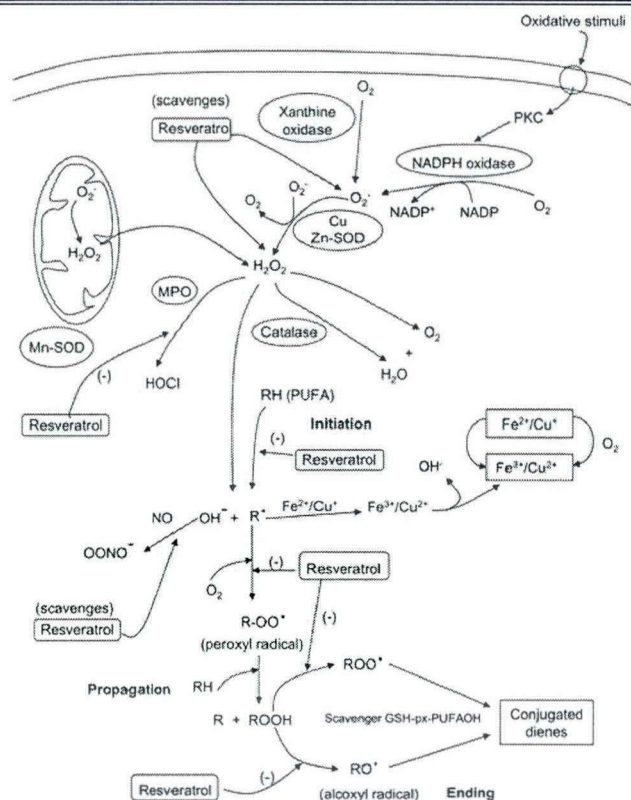


图 3 白藜芦醇的抗氧化作用

Fig. 3 Resveratrol antioxidant potential. (Alarcon de la Lastra, 2007)

2.2 白藜芦醇对活性氮(RNS)产生的影响

适宜浓度的 NO 能保护心血管及神经, 研究表明白藜芦醇能够调节缺血性心肌、大脑和肾脏血管内皮细胞 NO 的产生(Hattori et al., 2002)。然而, 过量的 NO 及其产生的 RNS 会引起血管的损害及诱发肿瘤。之前有报道研究了在氮化及氧化应激条件下白藜芦醇和氧化白藜芦醇对小胶质细胞的作用, 结果表明白藜芦醇能够通过抑制 iNOS 表达及 iNOS 酶活性减少 NO 产生(Lorenz et al., 2003)。

细菌脂多糖(LPS)能够显著诱导 iNOS 的产生, 然后引起 NO 的产生而起到杀菌效果。例如, RAW264.7 巨噬细胞用白藜芦醇前处理后能显著降低因 LPS 诱导的炎症反应及下调 iNOS 的表达(Wadsworth et al., 1999)。以上结果说明白藜芦醇是大鼠巨噬细胞病原菌反应潜在的抑制剂, 这意味着白藜芦醇可以用于治疗巨噬细胞高度响应相关的疾病(Leiro et al., 2002)。

3. 白藜芦醇的雌激素/抗雌激素样作用

白藜芦醇最具争议的是其雌激素/抗雌激素样特性。Gehm(1997)等报道, 在转染的 MCF-7 细胞中, 生理浓度的白藜芦醇表现出强烈的雌激素激动剂作用, 作者认为白藜芦醇之所以具有雌激素样作用是因为其结构和人工合成的雌激素(乙烯雌酚)类似。当白藜芦醇和雌二醇协同作用时, 白藜芦醇表现出超兴奋性, 这比雌二醇单独使用时所引的转录变化要强得多。但接下来的研究又得出了争议性的结论, 例如, Yang(2007)报道指出, 在上述同样细胞系中, 白藜芦醇表现出抗雌

激素样活性,因为它能抑制雌二醇诱导的孕酮受体的表达。此外,白藜芦醇能下调 TGF α 1 和 IGF-1 的基础水平,下调 TGF β 2 的 mRNA 水平。另一方面, Basly(2000)等研究比较了两种构型的白藜芦醇在 MCF-7 细胞中的雌激素样作用,结果发现两种构型白藜芦醇在中等浓度(10 和 25 μ M)时表现出雌激素超兴奋性作用,而低浓度(0.1 和 1 μ M)时表现出抗雌激素样作用。Gehm(1997)等在转染实验中发现 10 μ M 白藜芦醇能和大鼠子宫上的雌激素受体结合,而这是引起雌激素样活性必需的。但是,该报道在随后的研究中未被证实,尽管进行了各种来源的雌激素受体实验。例如,在 PR1 垂体细胞提取物中,白藜芦醇不能和雌激素受体结合(Stahl et al., 1998),但是,在不促进生长的情况下能促进催乳素的分泌。令人吃惊的是,白藜芦醇对催乳素的诱导作用能被纯的抗雌激素药物所阻断。进一步在 MC3T3-E1 成骨细胞中研究表明,白藜芦醇能够增加其碱性磷酸酶和脯氨酰羟化酶活性,这表现出其雌激素样及防止骨丢失作用。这两种作用均能被抗雌激素药物所拮抗,意味着白藜芦醇参与了雌激素通路。在 Yoon 等的另一项研究中,白藜芦醇不能和小鼠子宫雌激素受体结合。在转染了雌激素受体活性的成骨癌细胞中,白藜芦醇引起了雌激素样反应。而在 HepG2 肝细胞中,白藜芦醇以剂量依赖性方式和雌二醇发生拮抗作用(Yoon et al., 2000)。

白藜芦醇雌激素样作用体内模型实验也存在很多不确定性。目前至少有三个独立的研究组开展了不同剂量白藜芦醇对卵巢切除大鼠的研究。Ashby(1999)等对卵巢切除大鼠用 0.3 至 70 mg/kg/天白藜芦醇处理后,经过检测子宫重量等指标后未发现白藜芦醇有雌激素样作用。另一个实验是在大鼠断奶后在日粮中添加 1-1000 μ g/天的白藜芦醇,未发现对其子宫重量及 IGF-1 的 mRNA 水平的影响(Turner et al., 1999)。相反的是,当白藜芦醇浓度达到 1000 μ g/天时,会和雌二醇介导的胆固醇下调作用发生拮抗。唯一报道白藜芦醇具有雌激素样活性的是在易卒型自发性高血压大鼠中(Mizutani et al., 2000)。卵巢切除大鼠日粮中添加 5mg/kg/天白藜芦醇能减缓收缩压的升高。白藜芦醇还能增强内皮素依赖性血管舒张及保护卵巢切除引起的股骨力量的降低,这和雌二醇的作用方式类似。上述研究者进一步观察了正常型及易卒型大鼠血管平滑肌中血浆蛋白糖基化终产物(AGEs)的变化。AGEs 是血管疾病如动脉粥样硬化的潜在媒介。白藜芦醇能够以剂量依赖性抑制 AGEs 刺激的细胞增殖, DNA 的合成及脯氨酰羟化酶的活性(Mizutani et al., 2000)。重要的是,这些作用能够被纯的抗雌激素药物 ICI182780 所阻断。

最近, Bowers(2000)等指出白藜芦醇在瞬时转化细胞中同时具有激动剂和抑制剂作用。白藜芦醇能同时以差不多的亲和力与 ER- α 和 ER- β 结合,但是,这种亲和力比雌二醇要小 7000 倍。同时也发现白藜芦醇诱导的雌激素调节活性依赖于雌激素反应元件的序列和雌激素受体类型。白藜芦醇和 ER- β 结合后的转录活性要高于 ER- α 。此外,白藜芦醇对 ER- α 有抗雌激素样作用,而和 ER- β 则无此作用。10 μ M 或更高浓度白藜芦醇的雌激素样作用和抗雌激素样作用均很重要。

根据上述研究可以推测白藜芦醇具有调节雌激素受体的功能。考虑到在子宫和乳腺中缺乏雌激素活性或抗雌激素活性,而在骨及内皮细胞中有雌激素活性,也许这种选择性的雌激素受体调节作用能够得到令人满意的药理学作用。然而,白藜芦醇与雌激素受体结合的能力及对雌激素受体的超兴奋作用还需要进一步研究。

4. 白藜芦醇在哺乳动物生殖中的作用

众所周知,生育能力会随着年龄的增长而降低,而且在氧化应激的条件这个过程会加快。因

此, 白藜芦醇在保持生育能力, 保护未成熟卵母细胞中可能发挥作用, 并有可能延长生育年龄。

年龄会影响卵母细胞的数量(未成熟的卵子等待排卵)以及卵母细胞的质量。尽管通过辅助生殖技术, 如超数排卵和体外受精可以增加可受精卵母细胞数量, 但这对卵子的质量会产生较大影响。而卵子质量差往往会阻碍其受精及胚胎附植。

雌性动物或女性出生时就决定了其所有的卵母细胞数量。它们位于每个卵巢中, 这些未成熟的卵母细胞在出生后将保持静止。直到初情期(青春期)后在激素的级联信号诱导下才开始发生排卵或闭锁。在出生后至开始排卵时, 未成熟的卵母细胞很容易受到自由基的伤害。线粒体、端粒酶损伤和 DNA 的突变会影响卵母细胞质量及随后的胚胎附植, 因为它们会阻碍卵母细胞的生长和发育。如前所述, 白藜芦醇可以通过激活抗衰老基因, 保护线粒体功能和提高端粒酶活性来保护细胞免受氧化损伤(Liu et al., 2013)。多种动物模型的研究已证明了白藜芦醇对卵母细胞质量和数量两方面均存在有利影响。

有研究通过小鼠模型, 评估了白藜芦醇是否可以保护卵母细胞免受自由基的损害。鉴于合理的推测, 研究人员想知道随着时间的推移, 白藜芦醇是否能维持卵母细胞的质量, 从而延长生育年龄(Liu et al., 2013)。研究结果证明了白藜芦醇可以延长雌鼠的生育能力。和同龄对照组相比, 白藜芦醇处理组小鼠卵泡库中保持了较大的卵母细胞数量。此外, 白藜芦醇处理小鼠的卵巢端粒酶活性和基因表达和年轻小鼠类似, 表明白藜芦醇能够减缓卵巢衰老并保持卵母细胞的质量(Liu et al., 2013)。另一研究也得到了类似结果, 白藜芦醇处理组动物卵泡库能维持更多数量的卵母细胞(Kong et al., 2011)。因此, 白藜芦醇能够显著影响啮齿类动物卵母细胞质量和数量并延长生育年龄(Kong et al., 2011, Liu et al., 2013)。

多囊卵巢综合征(PCOS)是影响生育的常见疾病。最近发表的研究评估了白藜芦醇对女性因多囊卵巢综合征或肥胖而引起不孕的影响。氧化应激水平的升高是肥胖或PCOS的女性不孕的主要因素。这些妇女体内氧化的低密度脂蛋白(LDL)明显升高, 它在体内循环后损害各种细胞和组织。在卵巢中, 高含量氧化 LDL 会损害卵泡发育, 减少排卵。事实上, 在这些妇女中, 氧化低密度脂蛋白水平约提高了一倍, 研究发现氧化低密度脂蛋白与体外受精的成败呈负相关(Baek et al., 2013)。该研究继续评估了白藜芦醇是否可以保护氧化 LDL 对颗粒细胞的伤害。卵泡在有氧化的低密度脂蛋白的条件下不太可能存活。然而, 当颗粒细胞用白藜芦醇处理后, 氧化应激的标志物显著降低, 并且这些细胞能够更好地生长(Baek et al., 2013)。总之, 该研究证明了白藜芦醇在减少卵巢氧化应激中的潜在作用, 从而提高多囊卵巢综合征或肥胖的女性患着的生育能力(Baek et al., 2013)。

白藜芦醇对哺乳动物繁殖还存在其他促进作用。据报道, 白藜芦醇作为一种芳基羟受体拮抗剂, 能保护苯并芘引起的精子 DNA 损伤和细胞凋亡(Revel et al., 2001), 以及对人类精液 DNA 的损害(Garcez et al., 2010)。此外, 白藜芦醇能增加大鼠卵巢中孕激素的分泌和黄体化相关基因的表达(Morita et al., 2012)。白藜芦醇也能促进卵母细胞体外成熟和胚胎体外发育。研究表明, 培养液中添加白藜芦醇能显著提高体外生产的牛胚胎质量, 从而提高它们的抗冷冻保存能力(Abdel-Wahab et al., 2012)。体外成熟培养液中添加 2.0 μ M 白藜芦醇能增加细胞内谷胱甘肽(GSH)及降低活性氧含量, 从而提高猪孤雌激活和体外受精胚胎的发育潜能, 同时, 白藜芦醇能调节卵母细胞成熟相关基因的表达(Kwak et al., 2012)。此外, 添加白藜芦醇不仅能够提高猫卵母细胞玻璃化冷冻后的存活能力(Comizzoli et al., 2009), 而且还能以剂量依赖的方式提高小鼠胚胎的体外

发育(Liu et al., 2013)。

5. 白藜芦醇的潜在作用机理

白藜芦醇的作用机理尚不完全清楚, 一些研究表明白藜芦醇能激活沉默信息调节因子 1 (Sirtuin 1, SIRT1) 和 PGC-1 α 及改善线粒体的功能(Lagouge et al., 2006; Kaeberlein et al., 2005)。白藜芦醇直接激活 SIRT1 曾受到质疑(Pacholec et al., 2010), 然而, 新的研究再次证实了两者的关系(Denu 2012)。

白藜芦醇处理的细胞超氧化物歧化酶(SOD2)的活性提高 14 倍, 其能降低超氧化物转变成过氧化氢, 但过氧化氢未上升可能是由于其他细胞活动(Robb et al., 2008)。超氧化物 O²⁻是呼吸电子传递链的副产物。它不具有毒性, 但是它可以生物膜或其他细胞成分中夺取电子, 从而引起自由基连锁反应, 因此细胞保持一定量的超氧阴离子是必需的(Meydani et al., 1993)。MnSOD 降低超氧化物, 从而赋予在各种疾病中对线粒体功能障碍, 膜通透性改换和细胞凋亡的抵抗能力(Macmillan-Crow et al., 2001)。例如寿命的延长及对胰腺癌等癌症的抑制(Cullen et al., 2003), 以及抗再灌注损伤和辐照损伤能力(Sun et al., 2002)。Robb 等人提出白藜芦醇对 MnSOD 的上调是通过下述途径: RESV $\rightarrow$ SIRT1/NAD⁺ $\rightarrow$ FOXO3a $\rightarrow$ MnSOD。已证明白藜芦醇通过 SIRT1 引起 FOXO 转录因子向细胞核的迁移(Stefani et al., 2007), 这将刺激 FOXO3a 的转录活性及提高由沉默调节蛋白催化的 FOXO3a 的去乙酰化活性(Brunet et al., 2004)。已知 MnSOD 是 FOXO3a 的一个靶位点, 细胞中 FOXO3a 的过表达会引起 MnSOD 的强烈表达(Kops et al., 2002)。已有报道指出肿瘤细胞中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)不成比例的上调表达时(MnSOD 高表达, 但 CAT 或 GPX 只轻微变化), 会引起 H₂O₂在线粒体积累, 从而诱导癌细胞的凋亡(Khan et al., 2013)。

通过不同类型细胞和亚细胞体外培养实验证实了白藜芦醇的许多作用机制。这些机制包括对转录因子 NF- κ B 的调节(Leiro et al., 2005), 抑制细胞色素 P450 同工酶 CYP1A1(Chun et al., 1999), 改变雄激素的作用(Benitez et al., 2007), 表达和活化环氧和酶(COX)等。在体外, 白藜芦醇能抑制人胰腺癌细胞的增殖。在一些培养的肿瘤谱系中, 已证明白藜芦醇能诱导细胞凋亡, 这意味着它可以杀死癌细胞(Aziz et al., 2006)。白藜芦醇还能诱导 Fas/Fas 配体, 如 p53、细胞周期蛋白 A/B1 和细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK1/2 介导的细胞凋亡。此外, 白藜芦醇还具有抗氧化作用(Cao et al., 2005)。

据报道, 白藜芦醇能有效的抵抗神经细胞功能障碍和细胞死亡, 这在理论上, 可以有效地抵抗如亨廷顿氏病和阿尔茨海默氏病等疾病(Parker et al., 2005)。白藜芦醇还能直接抑制心肌成纤维细胞的活性, 并可能抑制心肌纤维化生长(Olson et al., 2006)。白藜芦醇是一种选择性雌激素受体调节剂和芳香化酶抑制剂(Bhat et al., 2001), 能显著增加睾酮的合成(Wang et al., 2006)。此外, 白藜芦醇通过 Nrf2 依赖性 γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶上调肺上皮细胞胞内谷胱甘肽水平, 从而保护他们免受香烟烟雾提取物诱导的氧化应激(Kode et al., 2008)。

最新研究表明, 白藜芦醇能够竞争性地抑制各种磷酸二酯酶活性, 其导致 cAMP 的上升, cAMP 作为第二信使活化 Epac1/CaMKK β /AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路。cAMP 浓度的升高增加了脂肪酸的氧化, 线粒体生物合成, 线粒体呼吸作用和糖异生作用(Park et al., 2012; Tennen et al.,

2012)。

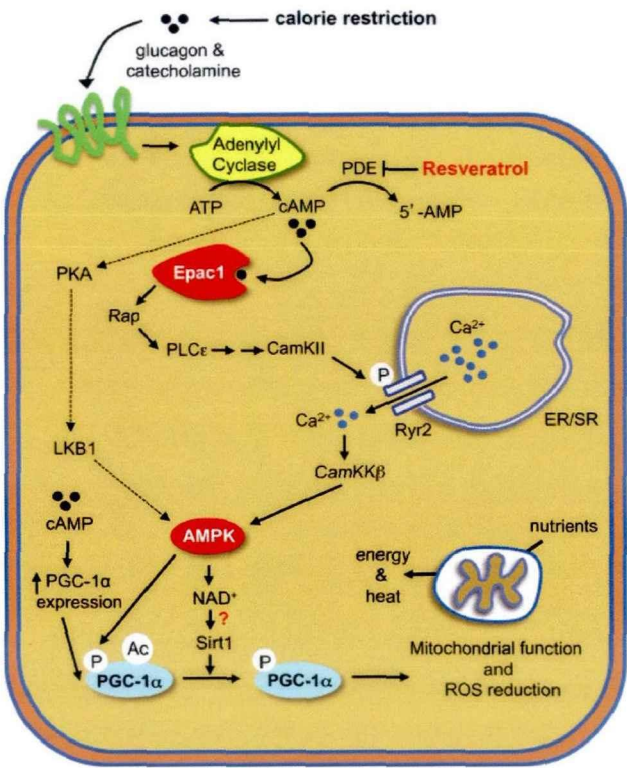


图 4 白藜芦醇作用通路。

白藜芦醇抑制磷酸二酯酶（PDE）活性，引起 cAMP 升高后激活 Epac1，然后激活 PLCε，引起 Ryr2 Ca²⁺ 通道 Ca²⁺的释放并最终激活 CamKKβ-AMPK 通路。限制能量（CR）通过胰高血糖素和儿茶酚胺提高了 cAMP 水平，然后激活 AC 及诱导 cAMP 进一步升高。AMPK 通过 PGC-1α、NAD⁺ 水平的增加和 Sirt1 的活性提高了线粒体生物合成及功能。虚线表示的是白藜芦醇的另一条可能的作用通路(Sung-Jun Park, 2012)。

Fig.4 Proposed Model of How Resveratrol Mimics CR.Resveratrol inhibits PDE activity and induces cAMP signaling via Epac1, which activates PLCε, resulting in Ca²⁺ release via the Ryr2 Ca²⁺ channel and, ultimately, the activation of the CamKKβ-AMPK pathway. CR increases cAMP levels by increasing glucagon and catecholamine levels, which activate AC activity and cAMP production. AMPK increases mitochondrial biogenesis and function by increasing PGC-1α expression, NAD⁺ levels, and Sirt1 activity. An additional pathway that may contribute to resveratrol action is indicated with dotted lines (Sung-Jun Park, 2012).

第三节 研究思路与研究内容

体外胚胎生产 (IVP) 在畜牧业生产和人类辅助生殖技术中发挥不可或缺的作用。据报道, 全球生产的牛胚胎中三分之一均采用体外方法生产, 而在欧洲每年大约有五十万人通过类似的方法治疗不孕不育(De Mouzon et al., 2012)。然而, 这些来自体外生产的胚胎质量要远低于体内胚胎, 体外生产的胚胎移植后妊娠率和产仔率远低于体内胚胎。

氧化应激尤其是 ROS 是胚胎体外生产效率低下的主要原因, ROS 能引起线粒体功能障碍, 三磷酸腺苷 (ATP) 的耗竭, 诱导细胞凋亡, 阻滞胚胎发育等(Takahashi et al., 2003; Yoneda et al., 2004; Favetta et al., 2007)。过多的 ROS 会损害细胞蛋白质, 脂质和 DNA(Henkel et al., 2003), 然后启动细胞凋亡并最终导致细胞死亡(Lysiak et al., 2007)。据报道, 卵母细胞体外成熟或胚胎体外培养过程 ROS 的积累会影响它们的发育潜力, 并导致细胞凋亡(Ahn et al., 2002; Somfai et al., 2007)。体外胚胎生产过程若存在过多的活性氧, 那么受精卵在二细胞阶段就会发生阻滞(Ishizuka et al., 2000)。因此, ROS 的产生和抗氧化系统之间的动态平衡对于体外生产胚胎的正常发育显得至关重要。

根据第一节及第二节所述, 白藜芦醇和褪黑素均是天然的抗氧化剂, 它们能够维持机体的氧化还原平衡, 降低氧化应激、减少细胞凋亡以及改善哺乳动物胚胎的体外生产(Takahashi, 2011)。因此, 本研究首先探索了白藜芦醇对牛卵母细胞体外成熟及褪黑素对牛胚胎体外发育的作用及其机制。其次, 在研究了褪黑素对牛胚胎体外发育效率影响的基础上, 进一步探索了褪黑素对体外生产胚胎质量的影响, 评价方法包括对体外发育囊胚进行玻璃化冷冻及检测 mRNA 的表达水平。最后, 利用小鼠模型研究了褪黑素对体外发育胚胎移植后妊娠率、产仔率和后代成活率的影响。

研究结果将明确利用抗氧化剂提高体外胚胎生产效率的可行性及潜在机理。为提高畜牧业生产及人类辅助生殖技术的应用提供理论依据。

第二章 研究论文

实验一 白藜芦醇对牛卵母细胞成熟的影响及机制研究

摘要: 本文研究了不同浓度白藜芦醇 (0.1, 1.0 或 10 μ M) 对牛 GV 期卵母细胞成熟的影响及作用机制。分析了白藜芦醇对卵丘细胞激素分泌、卵母细胞核成熟、卵丘扩展、细胞内谷胱甘肽和活性氧水平、胚胎卵裂、囊胚形成、卵母细胞和卵丘细胞成熟相关基因表达及 Sirt1 基因表达水平等参数的影响。研究显示, 添加适宜浓度白藜芦醇能显著增加卵丘细胞孕酮分泌, 同时减少雌二醇的分泌。孕酮水平的升高激活了卵母细胞中的 Mos/MEK/p42 MAPK 级联通路。成熟培养液中添加 1.0 μ M 白藜芦醇能显著提高卵丘扩展、极体形成、囊胚率、孵化囊胚率和囊胚细胞数; 同时, 白藜芦醇显著降低牛卵母细胞成熟后胞内 ROS 水平, 显著提高 GSH 水平。同时, 首次发现 Sirt1 在牛颗粒细胞、卵丘细胞、卵母细胞和囊胚中表达。进一步研究表明, 白藜芦醇能促进 Sirt1 基因的表达。本研究证明了白藜芦醇通过诱导孕酮分泌和抗氧化作用促进牛卵母细胞成熟及体外受精后胚胎发育, 这种促进作用可能依赖于 Sirt1 途径。

关键词: 牛, 白藜芦醇, 卵母细胞成熟, 抗氧化, SIRT1

引言

白藜芦醇 (3,5,4'-三羟基-反式-二苯乙烯) 是广泛存在于植物和食品中的一种天然的非黄酮类多酚物质, 花生(Wang et al., 2005), 桑椹(Stewart et al., 2003), 咖啡豆(Hurst et al., 2008)中, 虎杖的根部(Chen et al., 2013), 特别是葡萄(Jang et al., 1997)和红葡萄酒(Baur et al., 2006)中含量尤其丰富。白藜芦醇的生物学功能已经有许多研究。如白藜芦醇能显著延长酵母(酿酒酵母)的生命周期(Howitz et al., 2003)。通过小鼠和大鼠模型的研究已证明白藜芦醇能抗癌(Jang et al., 1997)、抗糖尿病(Palsamy et al., 2008)及保护心血管作用(Szmitko et al., 2005)。然而, 白藜芦醇发挥这些生物学功能的具体机制尚不清楚。已有研究表明, 白藜芦醇能通过激活去乙酰化酶 1 (SIRT1) (Alcaín et al., 2009)和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助活化因子 1 (PGC-1 α) 来改善线粒体功能。Robb(2008)等报道, 白藜芦醇通过 RESV (白藜芦醇) $\rightarrow$ SIRT1/NAD⁺ (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸) $\rightarrow$ FOXO3a $\rightarrow$ 超氧化物歧化酶 2 (SOD2) 通路使 SOD2 活性增加 14 倍。SOD2 能降低超氧化物含量, 从而提高在各种疾病中抵抗线粒体功能障碍, 膜通透性改变, 细胞凋亡和死亡的能力(Macmillan-Crow et al., 2001)。也有研究表明, 白藜芦醇能够增加肺上皮细胞内谷胱甘肽 (GSH) 水平, 从而保护它们免受香烟提取物诱导的氧化应激(Kode et al., 2008)。最新的研究(Park et al., 2012; Tennen et al., 2012)表明, 白藜芦醇能够竞争性地抑制各种磷酸二酯酶活性, 这将导致细胞内环磷酸腺苷 (cAMP) 浓度增加, cAMP 作为第二信使激活 Epac1/CaMKK β (钙/钙调蛋白依赖性激酶) /AMPK (AMP 激活的蛋白激酶) / SIRT1/PGC-1 α 途径。cAMP 水平的升高增加了脂肪酸的氧化, 线粒体生物合成, 线粒体呼吸作用和糖异生(Park et al., 2012; Tennen et al., 2012)。其他的研究还证明了白藜芦醇发挥生物活性的不同作用机制, 包括抑制细胞色素 P450 同工酶 1A1 (CYP1A1) (Chun et al., 1999), 调节核因子 kappa-B (NF- κ B) 的活性(Leiro et al., 2005)和调节雄激素活性(Benitez et al., 2007)。

与哺乳动物体内发育的胚胎相比,体外发育胚胎的发育能力要远远低于体内胚胎(Wang et al., 1999)。众所周知,在体外培养体系中,卵母细胞和胚胎容易受到氧化应激及其它不利因素的影响。因此,为了提高卵母细胞的成熟和早期胚胎的发育能力。各种抗氧化剂,如 β -巯基乙醇(β -ME),半胱氨酸(De Matos et al., 2000),半胱胺(Kobayashi et al., 2006),花青素(You et al., 2010)及褪黑素等(Gao et al., 2012; Wang et al., 2013)都已被添加到卵母细胞体外成熟和体外培养体系中。最近,白藜芦醇对哺乳动物繁殖的促进作用也引起越来越多的关注。据报道,白藜芦醇作为一种芳基炔受体拮抗剂,能保护苯并芘引起的精子DNA损伤和细胞凋亡(Revel et al., 2001),以及对人类精液DNA的损害(Garcez et al., 2010)。白藜芦醇能显著增加睾酮的合成,它是一种选择性雌激素受体调节剂(Bhat et al., 2001; Juan et al., 2005; Shin et al., 2008)和芳香酶抑制剂(Wang et al., 2006)。在雌性哺乳动物中,白藜芦醇能推迟卵巢卵泡库的释放,抑制初始卵泡的发育及凋亡,进而通过充足的卵泡储备来维持大鼠的发情周期及延缓更年期(Kong et al., 2011)。据报道,小鼠长期喂养白藜芦醇能显著改善其卵母细胞的数量和质量(Liu et al., 2013)。此外,白藜芦醇能增加大鼠卵巢中孕激素的分泌和黄体化相关基因的表达(Morita et al., 2012)。白藜芦醇也能促进卵母细胞体外成熟和胚胎体外发育。研究表明,培养液中添加白藜芦醇能显著提高体外生产的牛胚胎质量,从而提高它们的抗冷冻保存能力(Abdel-Wahab et al., 2012)。体外成熟培养液中添加 $2.0\mu\text{M}$ 白藜芦醇能增加细胞内谷胱甘肽(GSH)及降低活性氧(ROS)的含量,从而提高猪孤雌激活和体外受精胚胎的发育潜能,同时,白藜芦醇能调节卵母细胞成熟相关基因的表达(Kwak et al., 2012)。此外,添加白藜芦醇不仅能够提高猫卵母细胞玻璃化冷冻后的存活能力(Comizzoli et al., 2009),而且还能以剂量依赖的方式提高小鼠胚胎的体外发育(Liu et al., 2013)。

尽管许多研究已证明了白藜芦醇在哺乳动物生殖(Huang et al., 2011; Kwak et al., 2012)活动中的生物学功能。然而,白藜芦醇对牛卵母细胞成熟的作用尚缺乏研究。更重要的是,白藜芦醇促进卵母细胞成熟的具体机制仍不清楚。在本研究中,我们分析了白藜芦醇对牛卵母细胞体外成熟和受精后胚胎体外发育的影响。研究参数包括卵丘细胞激素分泌,卵母细胞核成熟,卵丘扩展,细胞内谷胱甘肽和活性氧水平,胚胎卵裂,囊胚形成,牛卵母细胞成熟(细胞分裂周期蛋白2同源, CDC2; 相关基因表达, 细胞周期蛋白-B2, CyCB2; C-MOS; 细胞外信号调节激酶, ERK2 和丝裂原活化的蛋白激酶, MAPK2)和卵丘细胞(穿透素3, PTX3; 过氧化氢酶, CAT; 谷胱甘肽过氧化物酶4, GPX4 和超氧化物歧化酶1, SOD1)相关基因的表达。为了确定白藜芦醇发挥作用的具体分子机制,我们还研究了颗粒细胞,卵丘细胞,卵母细胞和囊胚中SIRT1的表达。本研究证明了白藜芦醇是否依赖于SIRT1的方式,通过促进孕酮分泌和抗氧化作用,从而促进牛卵母细胞成熟和体外受精后胚胎的发育。

1. 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物材料

牛卵巢来自河北省廊坊市大厂回族自治县屠宰场,牛血清采自这个屠宰场屠宰的不同的牛。

1.1.2 溶液配制

实验所用胎牛血清(FBS)、M199 购自 Gibco 公司; L-谷氨酰胺、L-乳酸半钙, DMSO、青霉

素、链霉素、FSH、LH、17 β -E₂、透明质酸酶、无脂肪酸 BSA、Hoechst33342、Propidium Iodide、丙酮酸钠、肝素钠、咖啡因、必需氨基酸、非必需氨基酸、矿物油和其他无机盐类均购自 Sigma 公司(St. Louis, MO, USA)。

1.1.2.1 无钙镁 PBS 液 (DPBS)

取 0.20g KCl, 0.20g KH₂PO₄, 8.00g NaCl, 2.16g Na₂HPO₄·7H₂O, 溶于 900mL Milli-Q 超纯水中, 将 pH 值调至 7.2~7.4, 渗透压为 280mOsm/kg, 定容至 1L。0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 分装后储于 4℃ 备用。

1.1.2.2. 成熟培养液

M199 培养液 (GIBCO) 中加入 10%FBS, 10 μ g/mL FSH, 1 μ g/mL LH, 1 μ g/mL E₂, 100 μ g/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素。

1.1.2.3 DPBS-PVA (冲卵液)

先用 100mLMilli-Q 水加热融解 1g PVA, 冷却后再加入 9.55g DPBS 粉末, 添加 Milli-Q 水, 定容至 1L, 4℃ 保存。

1.1.2.4 透明质酸酶

取透明质酸酶 0.1g, 溶于 10mL DPBS 溶液中, 0.22 μ m 滤膜过滤灭菌, -20℃ 保存。

1.1.2.5 Hoechst33342

10mLDPBS 溶液中溶解 100mg Hoechst33342 粉剂, 浓度为 10mg/mL; 取此浓度溶液 5 μ L, 稀释到 10mL, 4℃ 备用。

1.1.2.6 CR1aa

CR1aa 培养液成分表		
成份	终浓度 (mM)	加入量 g/100mL
NaCl	114.7	0.67
KCl	3.1	0.023
NaHCO ₃	26.2	0.22
乳酸钠	20.4	0.002
酚红	1 μ L/mL	100 μ L

将上述成份加入 90mLMilli-Q 超纯水中, 充分溶解后, 加入 0.055g 半乳糖酸钙 (Hemicalcium L-lactate) (5mM), 调 pH 为 7.4, 定容至 100mL。测定渗透压应为 265-285mOsm/L。溶液配制好后, 用 0.22 μ m 滤膜过滤灭菌, 并用 1.5mL 无菌离心管分装, 每管 500 μ L, 4℃ 保存。使用当天, 在每 1mL 的 CR1aa 中加入 3mg 无脂肪酸的 BSA, 20 μ L 必需氨基酸 (50 $\times$ 储液), 10 μ L 非必需氨基酸 (100 $\times$ 储液) 和 10 μ L 的 L-Glutamine (100 $\times$ 储液), 用 0.22 μ m 滤膜过滤灭菌, 并用 1.5 mL 无菌离心管分装, 每管 500 μ L, 4℃ 保存。培养用液为含 6%FBS 的 CR1aa。

1.1.2.7 BO 储存液 (10 $\times$)

成分	mM	g/100ml
NaCl	112	6.5453
KCl	4.02	0.2997
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.83	0.1145
MgCl ₂ ·6H ₂ O*	0.52	0.1057
CaCl ₂ ·2H ₂ O*	2.25	0.3308
葡萄糖	13.9	2.5181

0.2% 酚红	10×	4.0 ml
双抗	10×	10.0 ml
Milli-Q 水		To 100ml

定容后使用 0.22 μ m 滤膜过滤灭菌，分装后于 4℃ 保存。

1.1.2.8 BO 洗精液

BO 液 (10 $\times$) 稀释 10 倍，加入 10mM 咖啡因和 20 μ g/mL 肝素。

1.1.3 仪器

超净工作台：北京古威超净设备公司；

CO₂ 培养箱：Model 3111/3131, Forma Scientific, Inc., 美国；

低速自动平衡微型离心机：LDZ4-0.8 型，北京医用离心机厂；

电热恒温水浴锅：HH-SY11-Ni 2C，北京市长风仪器仪表厂；

倒置显微镜和荧光显微镜：Nikon，日本；

激光共聚焦显微镜 Nikon EZ-C1，日本；

体式镜：SZ61，日本 Olympus 公司

超纯水仪：美国 MILLIPORE 公司；

数码相机：Nikon COOLPIX 4500，日本；

离心机：Eppendorf Centrifuge 5810R，德国；

- 80℃超低温冰箱：SANYO 公司，日本；

渗透压仪：P5520 VIESCOR2，Nikon，日本；

pH 计：INOLAB PH1；

电子天平：BP211D SartoriusAG。

1.1.4 耗材

细胞培养皿：35mm，60mm(NUNC，USA)；

细胞培养板：4 孔 (NUNC，USA)；

离心管：15mL，50mL (NUNC，USA)；

注射器：10mL，带 18G 针头。

1.2 实验方法

1.2.1 牛胚胎生产

1.2.1.1 卵巢的采集

将在河北廊坊市大厂回族自治县屠宰场屠宰的母牛卵巢立即取下，用生理盐水冲洗干净，存于 26~35℃、含有青霉素(100IU/mL)和链霉素(100IU/mL)生理盐水的保温瓶中，在 2~4h 内运回实验室。

1.2.1.2 卵丘卵母细胞复合体的采集和体外成熟

用配有 18 号钝针头的 10ml 注射器从 2~8mm 卵泡中抽吸卵丘卵母细胞复合体 (COCs)，采卵液为 DPBS+0.1%PVA，将成熟液在四孔培养皿中做成 700 μ L 的成熟滴，在培养箱中预热 2h 以上。挑选包裹有 3-5 层致密卵丘细胞的 COCs，在采卵液中洗 3 遍后再用成熟液洗两遍，然后放入四孔板成熟液中，每孔 80 个左右 COCs，在 5%CO₂、38.5℃、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养

22~24h。成熟液为 M199(Earle's)+10FBS+10 μ g/mL LH+10 μ g/mL FSH+1 μ g/mL 17 β -E₂+100 μ g/mL 青霉素+10 μ g/mL 链霉素。

1.2.1.3 体外受精

冻精的处理：直接离心法。取冻精细管 1 支，在室温下摇晃 10s 后放入 37℃ 水浴中解冻 1min 左右。用灭菌纸擦拭细管后，将精液推至含有 3ml 洗精液（BO 液）的 5ml 离心管中，1800r/min 离心 5min，弃上清液，再用 3ml 洗精液进行第二次离心洗涤，弃上清，用 1ml 洗精液悬浮精子，精子密度为 2-4 $\times 10^6$ 个/mL。

体外成熟的卵母细胞先在洗精液中洗 2 遍，然后用受精液洗 1 遍，放入 50 μ L 受精滴中，每滴 20~25 枚。每个受精滴中加入 50 μ L 精子，然后置于 38.5℃、5%CO₂ 和饱和湿度下受精 10h。

1.2.1.4 胚胎的体外培养与发育

将在受精液中与精子共孵育 10h 的卵母细胞用吸卵针去除卵丘细胞，然后将假定受精的卵母细胞于发育培养液 CR1aa+3mg/ml BSA 中洗涤 3 次，放入已预热平衡 2h 以上的 60 μ L CR1aa+3mg/ml BSA 培养滴中，每滴 20-25 枚，在 38.5℃、5%CO₂ 和饱和湿度下培养，48 小时后移入到 CR1aa+6%FBS 后期培养液中，每 48 小时半量换液。胚胎发育至第 8 天统计囊胚率，孵化囊胚率和囊胚细胞数。

1.2.2 囊胚细胞数鉴定

为了评估体外生产囊胚的质量，将囊胚用 DPBS-PVA 洗 3 遍，然后在含 4%多聚甲醛的 DPBS 中固定 10min。将固定好的囊胚转移到 PI 染液中，避光，室温孵育 10min，然后用含 0.1%PVA 的 DPBS 洗 2-3 遍，将囊胚置于干净的载玻片上，盖上盖玻片后在荧光正置显微镜下(Nikon Corp., Tokyo, Japan)观察细胞数。

1.2.3 RNA 提取及定量 PCR

1.2.3.1 RNA 提取

样品的收集：成熟前卵母细胞在含有 0.1%透明质酸酶的 PVA-DPBS 中脱去卵丘细胞，分别收集卵母细胞和卵丘细胞。成熟后卵母细胞在含 0.1%PVA 的 DPBS 中脱去卵丘细胞，分别收集卵母细胞和卵丘细胞。将上述卵丘细胞及卵母细胞用 DPBS 溶液洗涤两次，并储存于-80℃ 冰箱，用于 RNA 提取。

TRIZOL 法提取总 RNA

向收集的卵母细胞/卵丘细胞中加入 800 μ L Trizol，振荡 2~3min 使细胞充分裂解

↓

加入核酸助沉剂 Acryl Carrier,

↓

4℃, 12000g, 离心 5min, 取上清,

↓

将上清转入新的离心管中，加入 200 μ L 氯仿，振荡混匀 5~10min，室温放置 5~10min，

↓

4℃, 12000g, 离心 10min, 取氯仿上清,

↓

加入 500 μ L 异丙醇轻轻混匀，室温放置 2~3min，

↓
4℃, 12000g, 离心 10min, 弃上清, RNA 沉于管底,
↓
加入 1ml 75%乙醇悬浮沉淀, 轻轻摇洗沉淀,
↓
4℃, 8000g, 离心 5min, 尽量弃上清,
↓
超净台晾干 5~10min,
↓
加入 50μLDEPC 水溶解 RNA 样品,
↓
将每份 RNA 用 DEPC 水稀释 100 倍检测, 同时跑胶检测

1.2.3.2 RNA 反转录

构建如下反应体系:

组成	用量 (μl)
DNase I(冰)	2
Buffer DNase I +MgCl ₂	2
Ribolock RNase inhibitor (冰)	1
RNA 样品	15

20μl 体系, PCR 仪 37℃, 30min; 然后加入 2μl EDTA, 22μl 体系, PCR 仪 65℃, 10min;

二步法反转录:

(1)

组成	用量 (μl)
DEPC 处理水	8
Oligo(dT)18 Primer	2
RNA(由上得)	22

32μl 体系, PCR 仪 70℃, 5min;

(2)

组成	用量 (μl)
5×Reaction Buffer	10
25mM dNTP Mix	2
DEPC 处理水	3
Ribolock RNase inhibitor	1
反转录酶	2
RNA (由上得)	32

50μl 体系, PCR 仪 42℃, 60min; 72℃, 10min; 4℃, 将反转录后的 cDNA 一部分用于跑胶检测, 其余保存在-20℃。

1.2.3.3 荧光定量 PCR 反应

按照 TianGen 定量 RT-PCR 检测试剂盒, 20×SYBR solution 室温下平衡彻底混匀; 将 125μl 20×SYBR solution 加至 1.0ml 2.5×RealMasterMix 中构建如下反应体系:

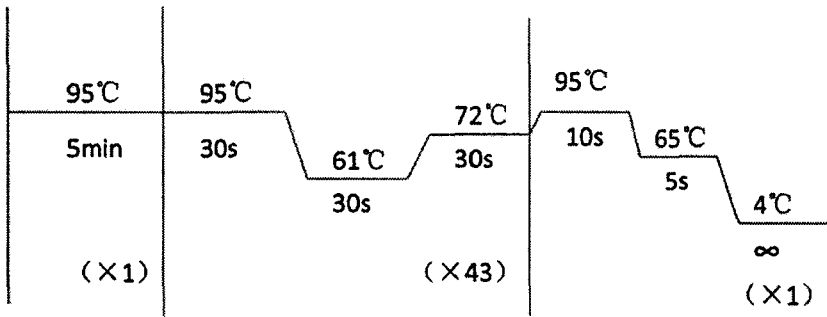
组成	用量
SYBR solution/RealMasterMix	9μl
Primer Up	0.5μl
Primer Low	0.5μl
cDNA 模板	0.5μl
ddH2O	补至 20μl

本实验研究基因所用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

Gene	Primer sequence(5'-3')	T _m (°C)	Size
<i>P450aro</i>	Forward: TTATCCTGGAGACCTTCCGACACT	60.0	131
	Reverse: GATCTGCCACTGGTTCACAAACAG		
<i>P450scc</i>	Forward: CCTCCGCTCAGCCCTGGTCA	60.0	189
	Reverse: CCCTTCTCCCTCCAGAAATGGT		
<i>PTX3</i>	Forward: CCAGCTGTACCTCAGCTATCGGT	60.0	117
	Reverse: TCCAGGTGCTGCACAGATG		
<i>CAT</i>	Forward: ACCAGATACTCCAAGGCGAAGGT	60.0	230
	Reverse: CAAAGCCACGAGGGTCACGA		
<i>GPx4</i>	Forward: GTGCTCGCTCCATGCACGA	60.0	224
	Reverse: CCTGGCTCCTGCCTCCCA		
<i>SOD1</i>	Forward: GCTGTACCAGTGCAGGTCCTCA	60.0	228
	Reverse: CATTTCCACCTCTGCCCAAGTC		
<i>c-mos</i>	Forward: CCTTGCACCAGGTCATCTACG	60.0	101
	Reverse: GCTGACCACGTCTAGGGAGTACT		
<i>ERK2</i>	Forward: GTATCATTACGGTGTCTGGTCCTGT	60.0	109
	Reverse: GTCTATGGTACACTGATTCGTGGC		
<i>MAPK1</i>	Forward: ACGCAACACCTCAGCAACG	60.0	162
	Reverse: GGCCAAGCCAAAGTCACAGA		
<i>CDC2</i>	Forward: GTTAATCTATGATCCTGCCAAACGA	60.0	113
	Reverse: CAGGGAAACTGTCAGAAAGCTACA		
<i>CyCB2</i>	Forward: CCACTCTTGTTTGTCCGTTCT	60.0	247
	Reverse: GCTACTTGTATGGCTCGGGTTG		
<i>SIRT1</i>	Forward: CGGTATTTATGCTCGCCTTGC	60.0	236
	Reverse: TCCTGCAACCTGCTCCAGTGT		
<i>GAPDH</i>	Forward: CCACGAGTAGTATAACAACACC	60.0	114
	Reverse: AGTCTCTCCACGATGCCAAAG		

反应步骤如下:



1.2.4免疫荧光染色(immunofluorescence)

染色方法

- A. 固定:** 将COCs、牛囊胚在4%多聚甲醛 (PFA) 室温下固定45分钟, 0.1% PBS-PVA洗3次, 每次10分钟;
- B: 渗透:** 用0.1% Triton渗透5分钟;
- C. 封闭:** 1% BSA溶液4℃封闭过夜;
- D. 一抗:** 含有1% BSA溶液稀释一抗 (1:200), 37℃孵育2小时, 然后用0.1% PBS-PVA洗3次, 每次20分钟;

E. 二抗：在1% BSA溶液稀释二抗（1:1000），室温避光孵育1小时，然后用0.1% PBS-PVA洗3次，每次20分钟；

F. DAPI染色压片后激光共聚焦镜下观察并统计及照相。

3. 抗体和其它试剂的来源以及用量

抗体和试剂	货号/公司	稀释度/浓度
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	111-035-003/Jackson ImmunoResearch Laboratories	1000×
SIRT1 (H-300)	SC-15404/SANTA CRUZ	200×

1.2.5 蛋白免疫印记（western blotting）

1. 细胞裂解

将含有 10 μ l 0.1% PBS-PVA 的样品吐入装有 10 μ l 蛋白裂解液的离心管中，-80 $^{\circ}$ C 保存样品。

2. SDS-PAGE 电泳

（1）制胶：采用 BIO-RAD 公司的 Mini-PROTEAN 3 CELL Electrophoresis Module 系统。

成份	12%分离胶（10ml）	5%浓缩胶（6ml）
H ₂ O	3.5 ml	3.66 ml
4X Tris	2.5 ml	1.5 ml
30%聚丙烯酰胺	4ml	0.78 ml
10%APS	33.3 μ l	30 μ l
TEMED	6.7 μ l	6 μ l

按照以上的配方混合分离胶溶液，倒入装备好的制胶板中，水封凝胶上面，使胶的边沿平整；待分离胶凝固后，倒掉上面的水，倒入浓缩胶，然后插入梳子，等待浓缩胶凝固。

（2）电泳缓冲液（10 $\times$ ）用水稀释为 1 $\times$

（3）电泳：采用 BIO-RAD 公司的 Mini-PROTEAN Tetra 垂直电泳槽，100V 恒压电泳 3h。

3. 转膜

（1）电转移缓冲液（10 $\times$ ）

以 700 水：200 甲醇：100 电转液（10 $\times$ ）比例，稀释为 1 $\times$

（2）膜：采用 Amersham 公司的 Hybond-P PVDF 膜。转膜之前预先用甲醇浸泡 15min，然后放到电转液中平衡几分钟。

（3）转膜装置：采用 BIO-RAD 公司的 Mini Trans-Blot 转印槽，配备凝胶支架转印夹、电极系统、冷却冰盒、纤维衬垫和滤纸。

（4）转膜条件：0.25mA 恒流电转 1.5h。

可以观察 Marker 是否转移到膜上来判断转膜成功与否。转膜过程中会产生大量的热，因此把转膜槽放在冰上以保持低温。

4. 封闭

（1）取 50 ml 10 $\times$ TBS 溶液，稀释到 500 ml，用 TBS-T 洗 PVDF 膜三次，每次 20 min。

（2）配制封闭液（5%的脱脂奶粉）：称取 5g 脱脂奶粉，用 TBS-T 稀释，定容至 100 ml。

（3）封闭：把膜放到足量的封闭液中，在摇床上慢慢摇动，室温 1~2h。

5. 抗体孵育

（1）把封闭好的膜放到 5%的脱脂奶粉稀释的一抗中孵育，室温 2h。

（2）TBS-T 洗膜，3 次，每次 20min。

(3) 把膜放到 5% 的脱脂奶粉稀释的二抗中孵育, 室温 2h。

(4) 洗同 (2)。

6. 曝光显影

(1) 把膜上的 TBS-T 尽量轻轻去掉, 在膜上均匀加入显影底物试剂。然后把膜转移到 X 射线摄影暗盒中, 膜上用保鲜膜覆盖, 发光液一面与 X 胶片接触。

(2) 在暗室中取出 X 射线胶片 (购自 Kodak 公司), 压到膜上, 关闭暗盒曝光数秒到数分钟 (根据实际情况确定曝光时间)。

(3) 暗室中取出胶片, 放入显影液中 1min, 水洗 30s, 定影液中 30s。

(4) 挑选曝光效果比较好的胶片, 扫描进行数据采集。

1.2.6 细胞内 ROS 和 GSH 含量的测定

取添加不同浓度白藜芦醇 (0.1, 1.0, 10 μ M) 组或对照组体外成熟 24 后的 MII 期卵母细胞, 用试剂盒分别检测细胞内 ROS 和 GSH 水平。卵母细胞成熟培养 24 小时后, 从成熟液中取出并在 PBS 中洗 3 遍, 然后放入含有 10 μ M H₂DCFDA (检测 ROS) 或 10 μ M CellTracker Blue CMF2HC (检测 GSH) 染色液中并置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中染色 20min。染色结束后将卵母细胞在 PBS 中洗 3 遍, 然后放入 10 μ L 的 PBS 液滴中, 在荧光显微镜下 (TE300; 尼康, 日本) 采集图像, 用 NIH Image J (v.1.40) 软件进行荧光强度分析。该试验重复 3 次。

1.2.7 成熟培养液中孕酮和雌二醇-17 β (E₂) 水平的测定

为了研究白藜芦醇对卵丘细胞孕酮和 E₂ 分泌的影响, 在体外成熟液中添加不同浓度白藜芦醇 (0.1, 1.0 或 10 μ M)。卵母细胞成熟 24 小时后收集成熟培养液。通过放射免疫分析法测定成熟培养液中孕酮和 E₂ 的浓度。具体方法参照孕酮 (ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA) 及雌二醇 (ICN Biomedicals, Inc. Costa Mesa, CA) 试剂盒说明书操作。

1.2.8 统计分析

每组数据至少重复 3 次, 数据统计采用 SPSS 18.0 统计软件, 所有数据结果用平均数 $\pm$ SEM 表示。单个均数间的比较采用单因素方差分析, 多个均数间的比较采用 Duncans 多重比较完成, $P < 0.05$ 视为两个数据差异显著。

2. 结果

2.1 白藜芦醇对卵丘细胞孕酮及雌二醇合成的的影响

与对照组 (22.48 $\pm$ 1.77ng/ml) 相比, 0.1 μ M 和 1.0 μ M 白藜芦醇添加组 (39.78 $\pm$ 4.90 和 40.96 $\pm$ 4.82 ng/ml) 孕酮浓度显著升高 ($P < 0.05$)。但添加 10 μ M 白藜芦醇没有显著影响 (27.71 $\pm$ 4.54ng/ml) (图 1A)。与此相反, 与对照组 (图 1B) 相比, 添加不同浓度白藜芦醇显著降低雌二醇的浓度。添加白藜芦醇组卵丘细胞中 P450aro 的表达显著低于对照组 ($P < 0.05$)。添加 1.0 μ M 白藜芦醇组卵丘细胞中 P450scc 的表达显著高于对照组, 但 0.1 和 10 μ M 白藜芦醇处理组显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 1C)。

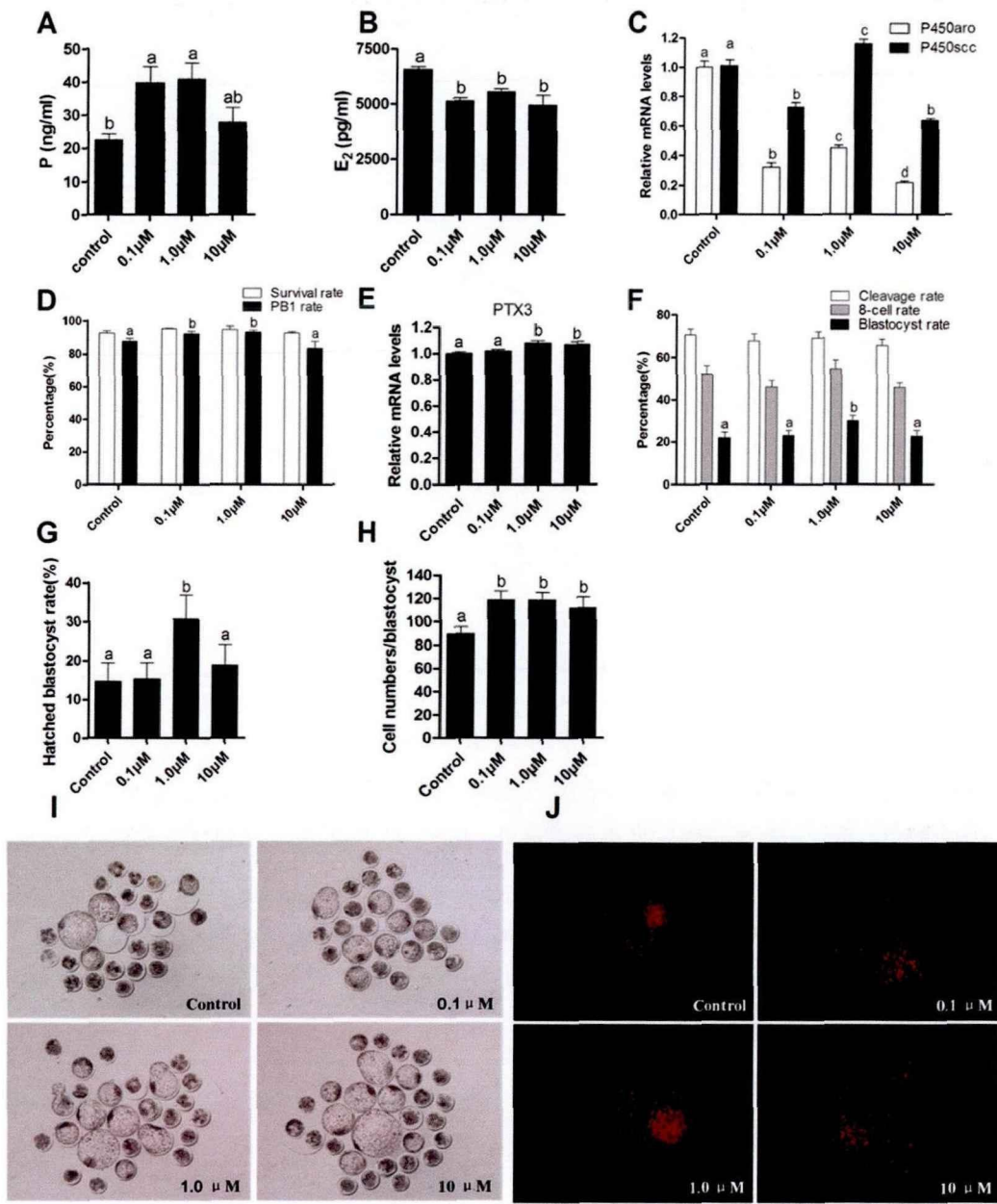


图 1 成熟液中添加白藜芦醇对卵母细胞固醇类激素分泌及受精后胚胎发育的影响。A: 不同浓度白藜芦醇添加组孕酮浓度。B: 不同浓度白藜芦醇添加组 17β-雌二醇浓度。C: 白藜芦醇对孕酮及雌激素合成酶表达的影响。D: 卵母细胞成活率及极体率。E: 卵丘扩展特异性基因 PTX3 表达。F: 卵裂率、8-细胞率和囊胚率。G: 孵化囊胚率。H: 平均囊胚细胞数。I: 添加不同浓度白藜芦醇胚胎发育明场照片。J: 添加不同浓度白藜芦醇囊胚 PI 染色。
*同列不同字母 (a-d) 代表差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 1 Effect of resveratrol on the secretion of steroid hormones and the development of fertilized bovine oocytes in maturation medium. Panel A: concentrations of progesterone (P) ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) in the groups treated with different concentrations of resveratrol. Panel B: concentrations of 17β-estradiol (E_2) ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in the groups treated with different concentrations of resveratrol. Panel C: the levels of expression of P and E_2 synthetic enzyme genes in the groups treated with different concentrations of resveratrol. Panel D: survival rate and polar body rate (PB1); Panel E: cumulus cell extension specific gene (*PTX3*) expression; Panel F: cleavage rate, 8-cell rate and blastocyst rate; Panel G: hatched

blastocyst rate; Panel H: mean number of cells/blastocyst. Panel I: epifluorescence photomicrographs of *in vitro* produced bovine blastocysts that developed in maturation medium supplemented with resveratrol at 0 (control), 0.1, 1.0 or 10.0 μM . Panel J: blastocysts were stained with PI to determine the mean number of cells/blastocyst of blastocysts that developed in maturation medium supplemented with resveratrol at 0 (control), 0.1, 1.0 or 10.0 μM . Different superscripted letters in the same column (a-d) indicate a significant difference ($P < 0.05$).

2.2 白藜芦醇对卵丘扩展, 卵母细胞存活率和极体率的影响

本实验共使用卵母细胞 1120 枚, 重复六次。与对照组相比 ($92.8 \pm 1.28\%$), 添加白藜芦醇组卵母细胞体外成熟后的存活率 (95.5 ± 0.29 , 94.9 ± 1.99 , $92.8 \pm 0.71\%$) (图 1D) 无显著差异 ($P > 0.05$)。但是, 0.1 和 1.0 μM 白藜芦醇添加组 (92.4 ± 1.40 和 $93.4 \pm 0.95\%$) 的极体率显著高于对照组 ($87.9 \pm 1.66\%$) (图 1D) ($P < 0.05$)。而添加 10 μM 白藜芦醇组极体率未显示提高 ($83.6 \pm 4.31\%$) (图 1D)。此外, 卵母细胞成熟后, 1.0 μM 和 10 μM 白藜芦醇添加组卵丘特异性扩展基因 (PTX3) 的表达显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 1E)。

2.3 白藜芦醇对牛卵母细胞体外成熟的影响

1080 枚牛卵母细胞 (6 次重复) 培养在含有不同浓度白藜芦醇 (0, 0.1, 1.0 和 10 μM) 的成熟液中, 体外受精后观察胚胎发育情况。和对照组 (卵裂率及 8-细胞率分别为 70.7 ± 2.92 和 $51.9 \pm 4.23\%$) 相比, 添加不同浓度白藜芦醇组卵裂率和 8-细胞率没有显著差异 ($P > 0.05$) (添加 0.1, 1.0 和 10 μM 白藜芦醇组卵裂率分别为 67.9 ± 3.34 , 69.2 ± 3.07 和 $65.6 \pm 3.17\%$, 8-细胞率分别为 46.1 ± 3.16 , 54.5 ± 4.12 和 $45.98 \pm 2.13\%$) (图 1F)。与此相反, 添加 1.0 μM 白藜芦醇组的囊胚率和孵化囊胚率 (分别为 30.0 ± 2.54 和 $30.7 \pm 6.05\%$) 显著高于对照组 ($P < 0.05$) (分别为 21.9 ± 2.65 和 $14.6 \pm 4.69\%$) (图 1F, 1I)。白藜芦醇添加组囊胚细胞数 (118.5 ± 7.67 , 118.7 ± 6.18 和 111.8 ± 9.13) 均显著高于对照组 (89.5 ± 5.96) ($P < 0.05$) (图 1H, 1J)。

2.4 白藜芦醇对牛卵母细胞成熟的抗氧化作用

添加 0.1, 1.0 和 10 μM 白藜芦醇组 ROS 水平分别为 0.58 ± 0.02 , 0.56 ± 0.02 和 0.72 ± 0.02 pixels/卵母细胞, 显著低于对照组 (1.00 ± 0.03 pixels/卵母细胞) ($P < 0.05$) (图 2A, 图 2C)。同时, 添加白藜芦醇组卵母细胞内谷胱甘肽 (GSH) 水平 (0.1, 1.0 和 10 μM 白藜芦醇组 GSH 水平分别为 1.52 ± 0.02 , 2.27 ± 0.06 和 1.52 ± 0.07 pixels/卵母细胞) 显著高于未处理组 (1.00 ± 0.03 pixels/卵母细胞) (图 2A, 2D)。此外, 白藜芦醇组抗氧化酶基因, 包括 SOD1, CAT 和 GPX4 表达水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 2B)。

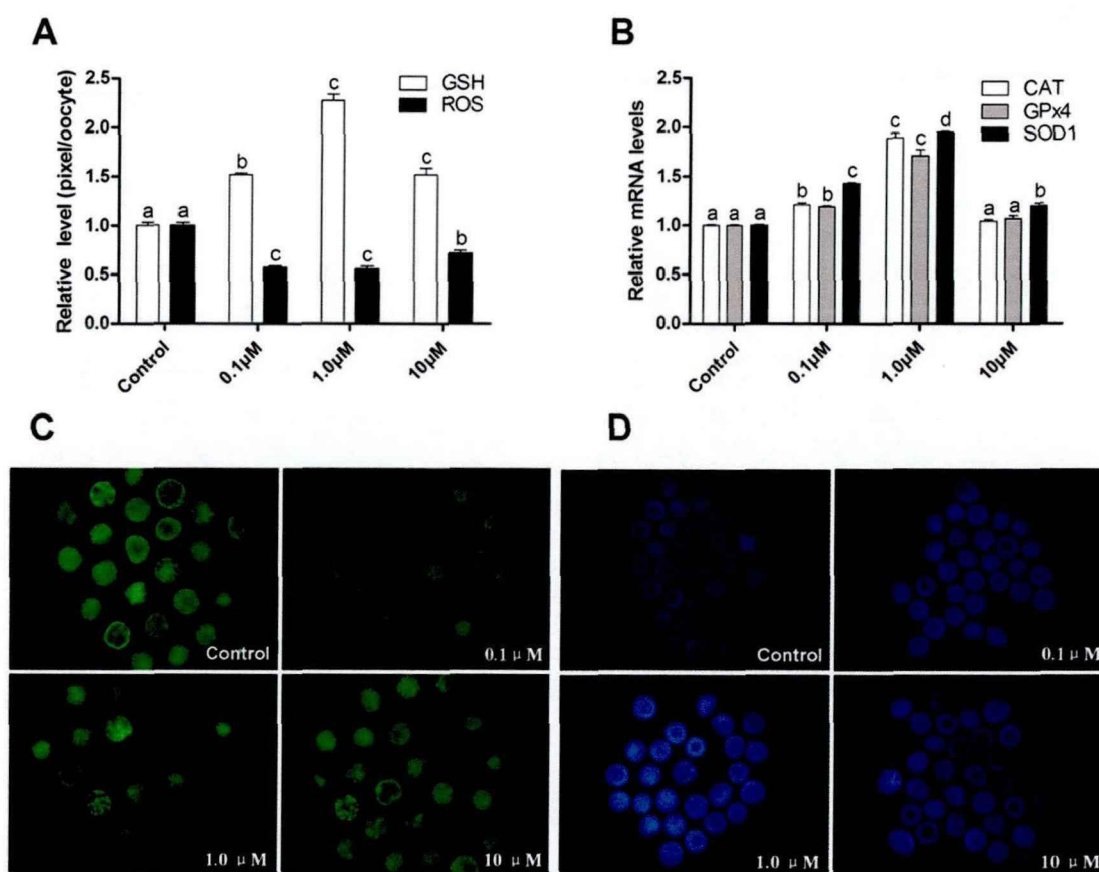


图 2 白藜芦醇对成熟后卵母细胞 GSH 及 ROS 含量及抗氧化酶 (CAT, GPx4 和 SOD1) 基因表达的影响。A: 白藜芦醇对卵母细胞胞内 GSH 和 ROS 水平的影响。B 白藜芦醇对卵母细胞抗氧化酶基因 (CAT, GPx4 和 SOD1) 表达的影响。C: 不同浓度白藜芦醇 (0, 0.1, 1.0 或 10.0 μ M) 处理后 MII 期牛卵母细胞 ROS 检测荧光照片。D: 不同浓度白藜芦醇 (0, 0.1, 1.0 或 10.0 μ M) 处理后 MII 期牛卵母细胞 GSH 检测荧光照片。

*同列不同字母 (a-d) 代表差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 2 Effects of resveratrol on intracellular GSH and ROS levels and the expression of the antioxidant enzymes genes CAT, GPx4 and SOD1 during bovine oocyte maturation. Panel A: effects of resveratrol on intracellular GSH and ROS levels; Panel B: effects of resveratrol on the expression of antioxidant enzyme genes (CAT, GPx4 and SOD1); Panel C: epifluorescence photomicrographs of *in vitro* matured bovine oocytes that were stained with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHFDA) to detect reactive oxygen species (ROS). Metaphase II oocytes that developed in maturation medium supplemented with resveratrol at 0 (control), 0.1, 1.0 or 10.0 μ M. Panel D: epifluorescence photomicrographs of *in vitro* matured bovine oocytes that were stained with CellTracker Blue to determine the level of intracellular glutathione (GSH). Metaphase II oocytes that developed in maturation medium supplemented with resveratrol at 0 (control), 0.1, 1.0 or 10.0 μ M. Different superscripted letters in the same column indicate a significant difference ($P < 0.05$).

2.5 白藜芦醇对卵母细胞 Mos/MEK/p42 MAPK 级联通路表达的影响

添加 1.0 μ M 白藜芦醇的卵母细胞 c-MOS 基因的表达水平显著高于对照组或其他组 ($P < 0.05$)。添加白藜芦醇组卵母细胞中 ERK-2 基因的表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$)。此外,

添加 1.0 μ M 白藜芦醇的卵母细胞 MAPK1 基因的表达水平显著高于对照组或其他组 ($P < 0.05$) (图 3A)。而添加白藜芦醇组卵母细胞 CDC2/CyCB2 基因表达水平显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 3B)。

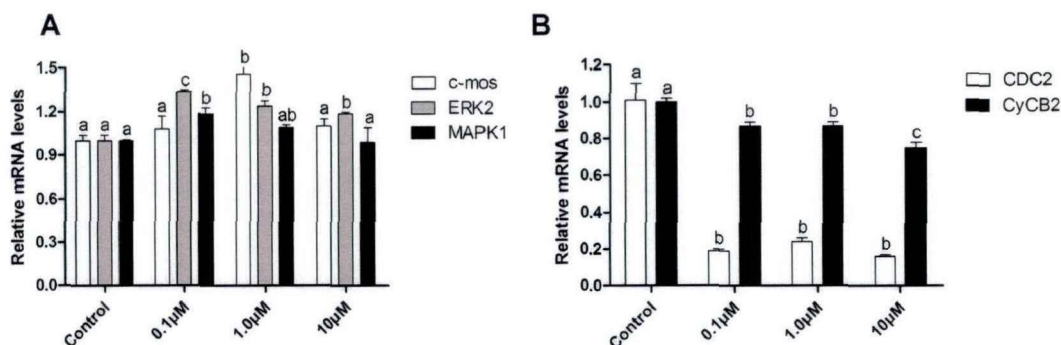


图 3 白藜芦醇对卵母细胞成熟相关基因表达的影响。A: 卵母细胞成熟相关基因表达的影响 (*c-mos*, *ERK2* 和 *MAPK1*)。B: 细胞周期相关基因 (*CDC2/CyCB2*) 表达的影响。*同列不同字母 (a-c) 代表差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 Effect of resveratrol on the expressions of genes related to oocyte maturation.

Panel A: oocyte maturation-related genes (*c-mos*, *ERK2* and *MAPK1*). Panel B: cell cycle-related genes *CDC2/CyCB2*. Different superscripted letters (a-c) in each column indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

2.6 白藜芦醇对牛颗粒细胞、卵丘细胞、卵母细胞及囊胚 SIRT1 表达的影响

本研究利用特异性抗体, 通过免疫荧光和免疫印迹分析确认了 SIRT1 存在牛颗粒细胞, 卵丘细胞, 卵母细胞和囊胚中 (图 4A, 4B)。采用实时定量 PCR 和 Western blotting 分析, 发现白藜芦醇处理的卵丘细胞中 SIRT1 基因表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 4C)。在卵母细胞中, 1.0 μ M 白藜芦醇处理的样品中 SIRT1 基因的表达水平显著高于对照组或其他浓度组 ($P < 0.05$) (图 4D)。此外, 白藜芦醇处理的卵丘细胞中 SIRT1 蛋白水平显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 4E), 然而, 在卵母细胞中 SIRT1 蛋白水平和对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$) (图 4F)。

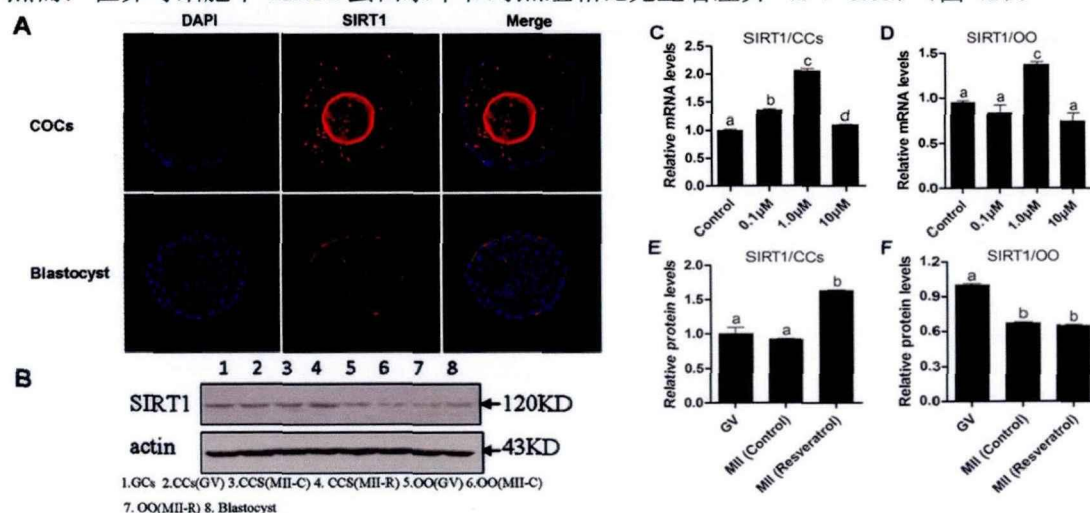


图 4 定量 PCR, 免疫荧光及 western blotting 法检测牛颗粒细胞、卵丘细胞、卵母细胞及囊胚上 SIRT1 的表达。A: 免疫荧光法检测牛卵丘卵母细胞复合体 (COCs) 上 SIRT1 的表达。B: western blotting 法检测 SIRT1 的表达: 1. 颗粒细胞 (GCs); 2. GV 期卵丘细胞 (CCs (GV)); 3. 对照组 MII 期卵丘细胞 (CCs (MII-C)); 4. 白藜芦醇处理组 MII 期

卵丘细胞 (CCs(MII-R); 5.GV 期卵母细胞(OO(GV)); 6.对照组 MII 期卵母细胞(OO(MII-C); 7.白藜芦醇处理组 MII 期卵母细胞(OO(MII-R); 8.囊胚。C: 不同浓度白藜芦醇处理对卵丘细胞 SIRT1 mRNA 水平的影响。D: 不同浓度白藜芦醇处理对卵母细胞 SIRT1 mRNA 水平的影响。E: GV 期与 MII 期卵丘细胞 (白藜芦醇处理/未处理) SIRT1 蛋白水平的比较。F: GV 期与 MII 期卵母细胞 (白藜芦醇处理/未处理) SIRT1 蛋白水平的比较。*同列不同字母 (a-d) 代表差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 4 Levels of expression of *SIRT1* in bovine granulosa cells, cumulus cells, oocytes and blastocysts determined using qRT-PCR, immunofluorescence and western blotting. Panel A: immunofluorescence images of *SIRT1* in bovine COCs and blastocysts. The cellular localization of *SIRT1* was identified using confocal analysis. Bovine COCs were incubated with the *SIRT1* antibody followed by an Alexa-488-conjugated donkey anti-goat IgG (red). Panel B: level of expression of the *SIRT1* gene evaluated using with western blotting in the following cells: 1. granulosa cells (GCs); 2. cumulus cells in the GV stage (CCs(GV)); 3. cumulus cells in the MII stage in the control group (CCs(MII-C); 4. cumulus cells in the MII stage in the resveratrol-treated group (CCs(MII-R); 5. oocytes in the GV stage (OO(GV)); 6. oocytes in the MII stage in the control group (OO(MII-C); 7. oocytes in the MII stage in the resveratrol-treated group (OO(MII-R); 8. blastocysts. Panel C: relative levels of *SIRT1* mRNA in cumulus cells (CCs) treated with or without different concentrations of resveratrol. Panel D: relative levels of *SIRT1* mRNA in oocytes (OO) treated with or without different concentrations of resveratrol. Panel E: relative protein levels of *SIRT1* in cumulus cells (CCs) in the GV or MII stage treated with or without 1.0 μ M resveratrol. Panel F: relative protein levels of *SIRT1* in oocytes (OO) in GV or MII stage treated with or without 1.0 μ M resveratrol. Different superscripted letters (a-d) in each column indicate statistically significant differences ($P < 0.05$)

3. 讨论

通过本研究发现,牛卵母细胞成熟液中添加适宜浓度白藜芦醇能够发挥如下作用:1)增加卵丘细胞孕酮的分泌及减少雌二醇的分泌;2)孕酮增强了 Mos/MEK/p42 MAPK 级联信号通路;3)促进成熟后牛卵母细胞卵丘扩展与极体排出;4)提高卵母细胞成熟和体外受精后的囊胚率,孵化囊胚率和平均囊胚细胞数;5)上调卵丘细胞抗氧化基因的表达及提高卵母细胞内 GSH 水平,降低 ROS 水平;6)首次发现白藜芦醇能够提高卵丘细胞 SIRT1 水平。

白藜芦醇能影响类固醇激素的分泌。Shin(2008)等研究指出,添加反式白藜芦醇可以提高小鼠睾丸激素水平。其他也有报道认为,白藜芦醇作为一种选择性雌激素受体调节剂(Bhat et al., 2001; Juan et al., 2005)及芳香酶抑制剂(Wang et al., 2006),能显著增加睾丸激素的产生。在雌性大鼠中,白藜芦醇能增加卵巢黄体化相关基因的表达及孕激素的分泌(Morita et al., 2012)。在本研究中,首次发现白藜芦醇显著上调孕酮合成酶基因的表达,随后增加卵丘细胞孕酮的分泌。与此相反,雌激素合成酶基因的表达以及卵丘细胞 E_2 的分泌显著下降。Lobo(1995)等已经证明,白藜芦醇的结构与人工合成的雌激素(乙烯雌酚)类似。Gehm(1997)等报道,白藜芦醇是一种植物雌激素,在不同的实验中表现出不同程度的雌激素受体激动剂活性。我们推测,当白藜芦醇添加到成熟培养液中,它可能表现出雌激素样活性并竞争性与雌激素受体结合。一旦卵丘细胞的雌激素受体饱和,会通过负反馈作用导致卵丘细胞中雌激素分泌的降低,这和我们在研究中观察到的现象相一致。

众所周知,孕酮通过抑制腺苷酸环化酶来激活 Mos/MEK1/p42 MAPK 级联信号通路,最终触发 M 期 Cdc2/cyclin B 的激活(Ferrell, 1999)。在本研究中,我们发现,白藜芦醇显著增加了孕酮的分泌,并上调了 C-mos/ERK2/MAPK2 表达及下调了 CDC2/CyCB2 的表达。这些结果表明,白藜芦醇可能通过卵丘细胞刺激孕酮的分泌从而促进牛卵母细胞成熟。孕酮通过胞质多聚腺苷酸化导致 Mos poly-A 尾巴的伸长,而这增加的多聚腺苷酸化增加了 Mos 翻译的速率,这是 Mos 蛋白积累所必需的(Gebauer et al., 1994)。Mos 蛋白足以启动卵母细胞的 GVBD(Yew et al., 1992)。这些结论与我们的发现相一致,白藜芦醇能显著提高卵母细胞成熟过程极体的排出。我们还观察到,白藜芦醇能促进卵丘细胞扩展,而卵丘细胞的充分扩展是卵母细胞成熟所必要的。此外,白藜芦醇对卵母细胞体外成熟和体外受精后胚胎发育的促进作用可能是由于提高了卵母细胞质量,这在许多研究中均得到类似结论;例如,给年轻老鼠长时间饲喂白藜芦醇能显著提高卵母细胞的数量和质量(Liu et al., 2013)。在成熟培养液中添加白藜芦醇能显著提高体外生产的牛胚胎质量,从而提高其冷冻保存时的抗冻能力(Abdel-Wahab et al., 2012);体外成熟过程中添加 2.0 μ M 白藜芦醇能显著改善猪孤雌激活和体外受精胚胎(Kwak et al., 2012)的发育潜力。此外,白藜芦醇以剂量依赖的方式(Liu et al., 2013)改善体外小鼠胚胎发育。我们发现,白藜芦醇略有增加体外成熟后牛卵母细胞的存活率表明卵母细胞的质量得到了改善。通过刺激孕酮分泌,提高卵母细胞质量,白藜芦醇显著提高卵母细胞体外成熟和受精后的囊胚率,孵化囊胚率和囊胚细胞数。然而,当白藜芦醇的浓度增加至 10 μ M,白藜芦醇对牛卵母细胞成熟的促进作用消失。类似的结果已有报道(Kim et al., 2004; Pocar et al., 2004),在牛卵母细胞体外成熟液中添加 20 和 40 μ M 的白藜芦醇显著降低卵母细胞达到 M II 期(Pocar et al., 2004)的百分比。据报道,添加 10 μ M 白藜芦醇(Kim et al., 2004)能促进体细胞的凋亡。这些结果意味着高浓度的白藜芦醇可能对牛卵母细胞成熟有负面影响。这种负面影响可能是由于白藜芦醇对各种磷酸二酯酶活性的竞争性抑制引起的,从而增加胞浆内 cAMP 的浓度,高浓度的 cAMP 抑制了卵母细胞成熟(Park et al., 2012)。

除了影响各种类固醇激素的分泌,白藜芦醇也是一种抗氧化剂。体外成熟培养液中添加 2.0 μ M 的白藜芦醇可以增加细胞内 GSH 水平,降低 ROS 水平,从而改善猪孤雌激活和体外受精胚胎(Park et al., 2012)的发育潜能。Juan(2005)等还发现,白藜芦醇作为一种抗氧化剂,可以提高大鼠精子的产生。白藜芦醇清除自由基的性能已在人精子体外研究中得到证明(Collodel et al., 2011)。在本研究中,我们发现,白藜芦醇能显著减少卵母细胞成熟后胞内 ROS 水平。这个结果与先前的研究得出的白藜芦醇是 ROS 的有效清除剂(Mahal et al., 2006)的结论相一致。此外,细胞内谷胱甘肽是主要的抗氧化剂之一,它在维持氧化还原平衡,消除过氧化物和外源物的解毒(Hayes et al., 2005)中起关键作用。本研究表明,白藜芦醇能增加 GSH 含量,这与文献报道(Yen et al., 2003, Li et al., 2006)相一致。分子研究表明,白藜芦醇处理显著上调卵丘细胞抗氧化基因(CAT, GPx4 and SOD1)的表达。总的来说,我们的结果表明,白藜芦醇通过调节氧化还原平衡发挥其对卵母细胞成熟和胚胎发育的促进作用。

白藜芦醇是 SIRT1 激活剂(Lagouge et al., 2006; Milne et al., 2007; Price et al., 2012)。SIRT1 是哺乳动物中酵母 Sir2 的同源物(沉默信息调节因子 2),NAD⁺依赖的第三类组蛋白去乙酰化酶。在哺乳动物细胞中,SIRT1 可以对多个目标蛋白发挥去乙酰化作用,包括 P53, FOXO1, FOXO3, PGC-1 α , 肝 X 受体, NBS1 和低氧诱导因子 2A(Michan et al., 2007)。SIRT1 的活化被认为是白藜芦醇发挥生物学作用的关键点(Milne et al., 2007)。Price(2012)等指出,在体外和体内条件下,

SIRT1 的活化对于白藜芦醇激活 AMPK 并改善线粒体功能是至关重要的。SIRT1 是能量平衡, 基因沉默, 新陈代谢, 基因组稳定性和细胞存活的主要调节子。在本研究中, 我们首次用免疫荧光和免疫印迹法证明了 SIRT1 存在于牛颗粒细胞、卵丘细胞、卵母细胞和囊胚。添加白藜芦醇能增加卵丘细胞 SIRT1 的 mRNA 及蛋白水平, 但仅增加卵母细胞中 SIRT1 的 mRNA 水平。类似的结果也有报道, 在硫酸葡聚糖钠诱导结肠炎的小鼠模型中, SIRT1 的下调表达和疾病的严重程度相关联。在此动物模型中, 白藜芦醇处理能显著逆转 SIRT1 的表达模式(Singh et al., 2009)。这些结果表明, 白藜芦醇对卵母细胞成熟和体外受精后胚胎发育的促进作用可能是由 SIRT1 的活化来介导。我们将在今后的研究中探索白藜芦醇促进卵母细胞成熟的具体途径。

4. 小结

本文首次报道了白藜芦醇对牛卵母细胞体外成熟的影响。白藜芦醇显著提高了卵丘扩展、卵母细胞成活率、极体率、(孵化)囊胚率和囊胚细胞数。分子机制研究表明: 首先, 白藜芦醇显著上调孕酮分泌及降低雌二醇分泌, 孕酮水平的升高进一步激活了 *Mos/MEK/p42 MAP* 通路; 其次, 白藜芦醇显著降低成熟后卵母细胞 ROS 水平, 显著提高 GSH 水平及抗氧化酶(*CAT*, *GPx4* and *SOD1*)表达水平; 最后, 首次在牛颗粒细胞, 卵丘细胞、卵母细胞及囊胚上检测到 SIRT1 表达, 进一步研究表明白藜芦醇对牛卵母细胞体外成熟的促进作用可能依赖于 SIRT1。

因此, 本文的研究得出了白藜芦醇对牛卵母细胞成熟及随后胚胎发育的新机制, 即白藜芦醇可能依赖于 SIRT1 刺激卵丘细胞孕酮分泌及发挥抗氧化作用而促进牛卵母细胞体外成熟。

实验二 褪黑素及其 MT1 受体对牛胚胎发育的作用及机制研究

摘要: 本文研究了褪黑素对牛胚胎发育的作用机制。为了研究褪黑素对牛胚胎发育的影响,将牛体外受精后胚胎培养在添加不同浓度褪黑素(10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} M)的培养液中。研究表明,无论是在前期培养液(CR1aa+3 mg/ml BSA)还是后期培养液(CR1aa+6% FBS)中添加 10^{-11} 至 10^{-5} M褪黑素都能显著促进胚胎发育。其最佳浓度分别为 10^{-7} 和 10^{-9} M。通过实时定量PCR、免疫荧光和western blot检测,发现在不同发育时期牛胚胎上均存在褪黑素MT1和MT2受体。进一步的研究表明,褪黑素对牛胚胎发育的促进作用是通过MT1受体介导的。因为非选择性MT1和MT2受体拮抗剂能抑制褪黑素对胚胎发育的促进作用,而选择性MT2受体拮抗剂4-P-PDOT则无此效果。分子检测发现褪黑素能上调牛胚胎发育过程中抗氧化抗凋亡基因(*GPX4*, *SOD1*和*BCL-2*)和发育相关重要基因(*SLC2A1*, *DNMT1A*和*DSC2*)的表达,同时下调促凋亡基因(*P53*, *Bax*和*Caspase-3*)的表达。本文的研究结果提供了褪黑素在体外条件下促进下牛胚胎发育的新机制。

关键词: 牛, 胚胎, 褪黑素, MT1, 体外培养

引言

体外胚胎生产在畜牧业生产和人类辅助生殖技术中发挥不可或缺的作用。据报道,全球生产的牛胚胎中三分之一均采用体外方法生产,而在欧洲每年大约有五十万人通过类似的方法治疗不孕不育(De Mouzon et al., 2012)。然而,这些来自体外生产的胚胎质量要远低于体内胚胎。在牛上,体外生产的胚胎在胚胎培养的第7天大约只有30-40%的囊胚率(Dalvit et al., 2005)。体外生产胚胎的效率较低可能基于以下原因,即相对于体内环境,体外发育的胚胎暴露于相对较高的氧气浓度下。随后导致活性氧(ROS)的升高(Luvoni et al., 1996)。ROS的产生已被认为是体外胚胎生产效率低下的一个主要原因。ROS会引起线粒体功能的改变,胚胎发育阻滞,ATP耗竭和细胞凋亡(Guerin et al., 2001)。

褪黑素(N-乙酰基-5-甲氧基色胺)是色氨酸的衍生物,主要产生于脊椎动物的松果体,其他组织包括卵巢,睾丸,骨髓,视网膜和晶状体等也能够合成褪黑素(Reiter et al., 2000, Siu et al., 2006)。褪黑素是一种高效的自由基清除剂和抗氧化剂(Reiter, 2000)。褪黑素及其代谢产物能直接清除活性氧,刺激抗氧化酶活性,提高谷胱甘肽(GSH)水平,抑制细胞和器官的促氧化酶活性(Galano et al., 2011; Galano et al., 2013; Hardeland 2013)。事实上,褪黑素是降低细胞氧化损伤最为有效的物质之一(Balao da Silva et al., 2011; Ortiz et al., 2011; Gao et al., 2012; Lowes et al., 2013; Wang et al., 2013)。除了直接清除自由基,褪黑素还可通过其特异性膜受体发挥功能。褪黑素受体包含褪黑素膜受体1(MT1)和褪黑素膜受体2(MT2),两者均是G蛋白偶联受体家族成员(Rivara et al., 2005)。在靶细胞中,MT1或MT2的活化会抑制腺苷酸环化酶活性(von Gall et al., 2002),从而引起一系列信号转导的变化。这些受体的激活会降低毛喉素诱导的cAMP的形成并随后激活蛋白激酶A(Vanecek, 1998)。在不同物种、组织和器官中,褪黑素通过与同一亚型受体(Tamura et al., 2009)结合后能激活不同的第二信使通路。

近年来,褪黑素对哺乳动物胚胎发育的促进作用已引起越来越多的关注。在培养液中添加褪黑素可以促进小鼠早期胚胎的发育(Ishizuka et al., 2000)。褪黑素通过提高囊胚率,孵化囊胚率和囊胚细胞数促进小鼠新鲜及冷冻的 2-细胞胚胎的体外发育(Gao et al., 2012)。此外,褪黑素可以促进小鼠原核胚胎的体外发育并提高这些胚胎移植后的附植效率(Wang et al., 2013)。褪黑素对胚胎发育促进作用的潜在机制可能依赖于它的抗氧化和抗凋亡能力。在其它物种,如猪上, 10^{-9} M 的褪黑素可以提高胚胎卵裂率和囊胚细胞数(Rodriguez-Ororio et al., 2007)。在绵羊上,褪黑素能提高体内外胚胎的质量和存活率(Abecia et al., 2002; Vázquez et al., 2010)。最近有报道表明, 10^{-6} M 褪黑素能提高植入前兔胚胎的发育和孵化囊胚率(Mehaisen et al., 2013)。褪黑素还能在高氧环境下促进牛胚胎体外发育及提高热应激牛卵母细胞体外受精后的囊胚率(Papis et al., 2007)。

在哺乳动物(包括人)的生殖器官上已确定存在褪黑素受体(Tamura et al., 2009)。人卵巢颗粒细胞膜上存在褪黑素结合位点(Yie et al., 1995),在人颗粒细胞/黄体细胞(Woo et al., 2001)及猪卵丘与颗粒细胞中确定存在褪黑素 MT1 和 MT2 受体(Kang et al., 2009)。在牛卵母细胞和囊胚上检测到 MT1 受体的表达,而 MT2 受体只在卵母细胞中表达(Sampaio et al., 2012)。目前对于褪黑素受体介导哺乳动物胚胎发育的研究很有限。更重要的是,褪黑素促进牛胚胎发育的分子机制仍不清楚。

综上所述,我们推测褪黑素对胚胎发育可能通过膜受体发挥作用。为了验证这种假设,我们首先采用荧光定量 PCR,免疫荧光和免疫印迹检测了不同发育时期牛胚胎 MT1 和 MT2 受体的表达。此外,通过非选择性 MT1/MT2 拮抗剂(luzindole)和特异性 MT2 受体拮抗剂(4P-PDOT)研究了 MT1 或 MT2 受体是否参与了牛胚胎发育。此外,我们还检测了抗氧化、抗凋亡及胚胎发育相关基因的表达,包括 *GPX4*, *SOD1*, *bcl-2*, *P53*, *BAX*, *Caspase-3*, 葡萄糖转运蛋白 1 和 3 (*SLC2A1* 和 *SLC2A3*), DNA 甲基转移酶 1A (*DNMT1A*), 干扰素 τ (*IFNT2*) 和桥粒胶蛋白 2 (*DSC2*)。

1. 材料与方法

1.1 实验材料

同实验一

1.2 实验方法

1.2.1 牛胚胎生产

同实验一

1.2.2 囊胚细胞数鉴定

为了评估体外生产囊胚的质量,将囊胚用 DPBS-PVA 洗 3 遍,然后在含 4%多聚甲醛的 DPBS 中固定 10min。将固定好的囊胚转移到 Hoechst 33342 染液中,避光,室温孵育 10min,然后用含 0.1% PVA 的 DPBS 洗 2-3 遍,将囊胚置于干净的载玻片上,盖上盖玻片后在荧光正置显微镜下(Nikon Corp., Tokyo, Japan)观察细胞数。

1.2.3 RNA 提取及定量 PCR

样品的收集：分别收集不同发育阶段（2-4 细胞、8-16 细胞、桑椹胚和囊胚）的胚胎。用 DPBS 溶液洗涤两次，并储存于-80℃ 冰箱，用于 RNA 提取。

TRizol 法提取总 RNA，RNA 反转录，定量 PCR 反应步骤同实验一。
本实验研究基因所用的引物序列

Table 1. Primers used in this study			
Genes	Primer sequence(5'-3')	Fragment Size	Sequence references and accession no.
MT1	Forward: GGAGGGTGAAACCTGACGAC	99	XM_002698656.1
	Reverse: CCCAGCAAATGGCAAAGAGG		
MT2	Forward: GGCTCCGTCTTCAACATCACC	145	NM_001206907.1
	Reverse: GCAGAAGGACCAGCAGGGTG		
GPx4	Forward: TGTGCTCGCTCCATGCACGA	224	NM_174770.3
	Reverse: CCTGGCTCCTGCCTCCCAA		
SOD1	Forward: GCTGTACCAGTGCAGGTCTCTCA	228	NM_174615.2
	Reverse: CATTTCCACCTCTGCCCAAGTC		
P53	Forward: CCTCCCAGAAGACCTACCT	221	X81704.1
	Reverse: CTCCGTCATGTGCTCCAAC		
bcl-2	Forward: GACTGACACTGAGTTTGCTACG	152	NM_001037100.3
	Reverse: GAGTCCTTCCACTTCGTCCTG		
caspase-3	Forward: CAGACAGTGGTGCTGAGGATGA	211	NM_001077840.1
	Reverse: GCTACCTTTCGGTTAACCCGA		
Bax	Forward: GGCTGGACATTGGACTTCCTTC	112	NM_173894.1
	Reverse: TGGTCACTGTCTGCCATGTGG		
SLC2A1	Forward: CAGGAGATGAAGGAGGAGAGC	258	M60448
	Reverse: CACAAATAGCGACACGACAGT		
SLC2A3	Forward: CCTGCTTTATTGTGGCTGAAC	165	NM_174603
	Reverse: CGAGGAACACAGTGAAGACGA		
DNMT1A	Forward: ACGAATGGTGGATTGCTGGT	197	AY173048
	Reverse: CACGTCTTCGTAGGTGGAGTC		
IFNT2	Forward: CTCCAGCAGTGCCTCAACCT	158	NM_001015511
	Reverse: CCTCCCATGTCAGAGTCTTTCTC		
DSC2	Forward: AGCAGGAAGTAGCAGTGGCA	241	M81190
	Reverse: CACAGTCCGCTGAGGTATG		
β-actin	Forward: TGACGTTGACATCCGTAAAGACC	117	NM_173979.3
	Reverse: GTGCTAGGAGCCAGGGCAG		

1.2.4免疫荧光染色(immunofluorescence)

抗体的来源及用量如下表所示，方法同实验一。

抗体和试剂	货号/公司	稀释度/浓度
Rabbit Anti-Goat IgG (H+L)	305-035-003/Jackson ImmunoResearch Lab.	1000×
MEL-1A-R (R-18)	sc-13186/SANTA CRUZ	200×
MEL-1B-R (T-18)	sc-13177/SANTA CRUZ	200×

1.2.5 蛋白免疫印记（western blotting）

方法同实验一

1.2.8 统计分析

每组数据至少重复3次，数据统计采用SPSS 18.0统计软件，所有数据结果用平均数±SEM表示。单个均数间的比较采用单因素方差分析，多个均数间的比较采用Duncans多重比较完成，*P* < 0.05视为两个数据差异显著。

2. 结果

2.1 前期培养液中添加不同浓度 MT 对早期胚胎体外发育的影响

1200 枚胚胎随机分成 6 组，前两天分别培养在含有不同浓度褪黑素的前期培养液中（CR1aa+

BSA), 其余 6 天培养在不含褪黑素的后期培养基中。结果表明, 褪黑素处理组卵裂率和对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$) (图 1A)。然而, 添加 10^{-7} M 褪黑素组 ($39.7 \pm 3.7\%$ 和 $22.1 \pm 2.5\%$) 胚胎发育至第 8 天时囊胚率和孵化囊胚率显著高于对照组 ($29.9 \pm 3.3\%$ 和 $13.0 \pm 3.1\%$) ($P < 0.05$) (图 1A)。褪黑素组和对照组囊胚细胞数没有显著差异 ($P > 0.05$) (图 1B)。相反的是, 添加 10^{-3} M 褪黑素组囊胚率, 孵化囊胚率和囊胚细胞数显著低于 10^{-7} M 褪黑素添加组 (图 1A, 1B)。

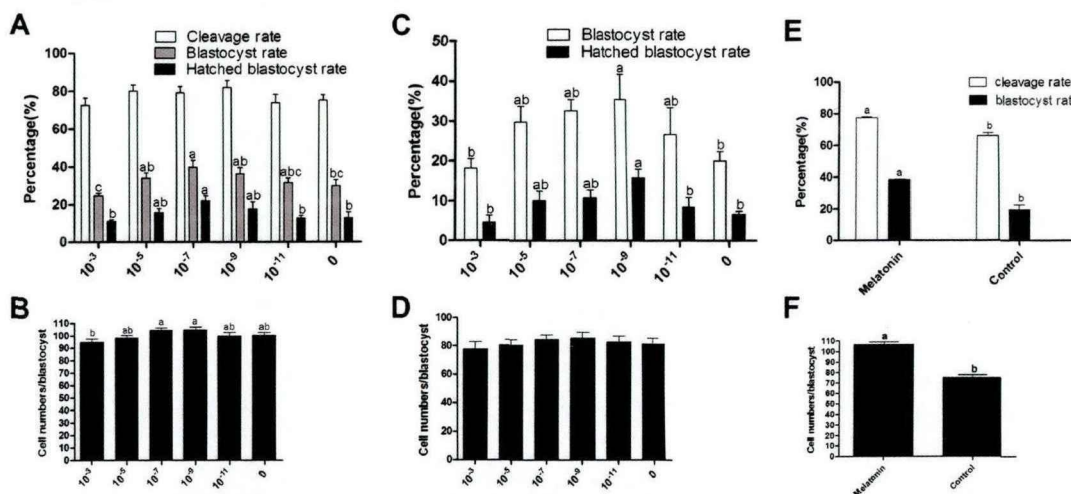


图 1 培养液中添加褪黑素对牛胚胎体外发育的影响。A: 卵裂率、囊胚率及孵化囊胚率 (只在前期培养液中添加褪黑素)。B: 囊胚细胞数 (只在前期培养液中添加褪黑素)。C: 卵裂率、囊胚率及孵化囊胚率 (只在后期培养液中添加褪黑素)。D: 囊胚细胞数 (只在后期培养液中添加褪黑素)。E: 卵裂率、囊胚率及孵化囊胚率 (分别在前期和后期培养液中添加最佳浓度褪黑素)。F: 囊胚细胞数 (分别在前期和后期培养液中添加最佳浓度褪黑素)。同列不同字母 (a-c) 表示有统计学差异 ($P < 0.05$)。

Fig.1 Effects of melatonin on bovine embryos produced *in vitro*. A: cleavage rate, blastocyst rate and hatched blastocyst rate (melatonin present only in early cultured medium); B: cell number/blastocyst (melatonin present only in early cultured medium); C: blastocyst rate and hatched blastocyst rate (melatonin present only in later cultured medium); D: cell number/ blastocyst melatonin present only in later cultured medium); E: cleavage rate, blastocyst rate (melatonin present both in early and later cultured medium); F: cell number/blastocyst (melatonin present both in early and later cultured medium). Different superscript letters (a-c) in each column identify statistical significant differences ($P < 0.05$).

2.2 后期培养液中添加不同浓度 MT 对早期胚胎体外发育的影响

共有 378 枚胚胎用于研究后期培养液中添加褪黑素对胚胎发育的影响。胚胎在不含褪黑素的前期培养液中培养两天后, 再分别培养在添加不同浓度褪黑素的后期培养液中。结果表明, 添加 10^{-9} M 褪黑素组第 8 天的囊胚率和孵化囊胚率 ($35.6 \pm 6.3\%$ 和 $15.9 \pm 2.2\%$) 显著高于对照组 ($20.1 \pm 2.3\%$ 和 $6.7 \pm 0.8\%$) ($P < 0.05$) (图 1C)。然而, 囊胚细胞数和对照组相比没有显著差异 ($P > 0.05$) (图 1D)。

2.3 全程发育培养液中添加最佳浓度 MT 对早期胚胎体外发育的影响

基于上述结果分别在前期培养液中添加 10^{-7} M 褪黑素, 在后期培养液中添加 10^{-9} M 褪黑素。共有 438 枚胚胎用于研究全程添加褪黑素对胚胎发育的影响。结果显示胚胎发育全程添加褪黑素

后卵裂率，囊胚率及囊胚细胞数均显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 1E, 1F)。

2.4 牛早期胚胎发育不同时期褪黑素受体鉴定

通过实时定量 RT-PCR 分析,确定不同发育阶段的牛胚胎上存在褪黑素 MT1 和 MT2 受体(图 2A)。进一步通过免疫荧光和蛋白质印迹分析也证实牛胚胎上存在 MT1 和 MT2 受体(图 2B, 2C)。

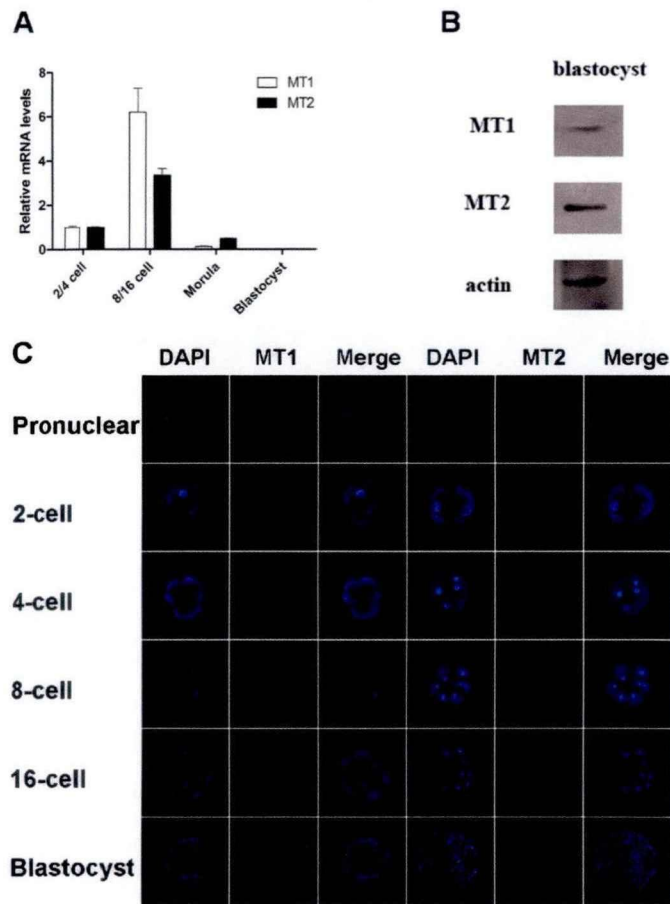


图 2 牛不同发育阶段胚胎褪黑素受体鉴定。A: 实时定量 PCR 法鉴定不同发育阶段牛胚胎 MT1 和 MT2 受体 mRNA 表达。B: western blotting 法检测囊胚 MT1 和 MT2 受体的蛋白表达。C: 免疫荧光法检测不同发育阶段牛胚胎 MT1 和 MT2 受体的表达。

Fig.2 Melatonin receptors detected in bovine embryos at different embryonic stages. A: mRNA of MT1 and MT2 in different embryo stages by qRT-PCR method. B: Proteins of MT1 and MT2 in blastocyst by western blotting method. C: Immunofluorescence images of MT1 and MT2 in different bovine embryo stages. The cellular localization of MT1/MT2 was identified by confocal analysis. Bovine embryos were incubated with the MT1/MT2 antibody followed by Alexa-488-conjugated donkey anti-goat IgG (red).

2.5 褪黑素受体抑制剂对牛早期胚胎体外发育的影响

共有 1575 枚胚胎 (7 次重复) 用于研究褪黑素对牛胚胎发育的促进作用是否依赖于受体。结果表明, 卵裂率和 8-细胞率在所有的处理组中均无显著差异 (图 3A)。然而, 添加褪黑素组 ($31.4 \pm 1.7\%$, $13.4 \pm 2.4\%$ 和 133.2 ± 5.6) 或 10^{-7}M 4-P-PDOT+MT 组 ($31.2 \pm 1.9\%$, $12.5 \pm 1.3\%$ 和

131.2±7.8) 的囊胚率 (图 3B)、孵化囊胚率 (图 3C) 及囊胚细胞数 (图 3D) 显著高于对照组 (23.1±2.4%, 8.0±1.3% 和 109.7±4.7) 及其他添加组 [luzindole (24.6±2.3%, 8.4±1.5% 和 100.5±5.0), 4-P-PDOT (21.3±2.6%, 6.6±0.9% 和 107.8±6.2) 及 MT+10⁻⁷M luzindole (21.8±2.5%, 7.8±1.4% 和 113.0±4.9)] ($P < 0.05$) (图 3, 图 4), MT+10⁻⁷M luzindole 与对照组无显著差异 ($P > 0.05$) 以上结果表明, 只有 MT1 受体参与牛胚胎发育, MT2 受体未参与。

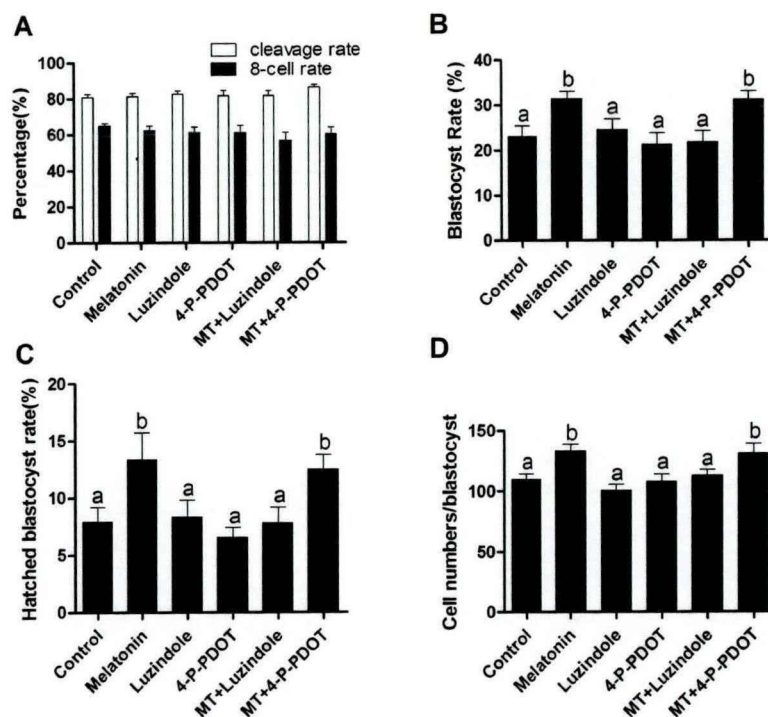


图 3 褪黑素受体抑制剂对牛胚胎发育的影响。A: 卵裂率及 8-细胞率。B: 囊胚率。C: 孵化囊胚率。D: 囊胚细胞数。每组培养胚胎总数为 228~283 枚, 同列不同字母 (a-b) 表示有统计学差异 ($P < 0.05$)。

Fig.3 Effects of melatonin receptor antagonist on *in vitro* development of bovine embryos. A: cleavage rate and 8-cell rate; B: blastocyst rate; C: Hatched blastocyst rate; D: cell numbers/blastocyst. The number of cultured embryos for each group varied from 228 to 283, respectively. Different superscript letters (a-b) in each column identify statistical significant differences ($P < 0.05$).

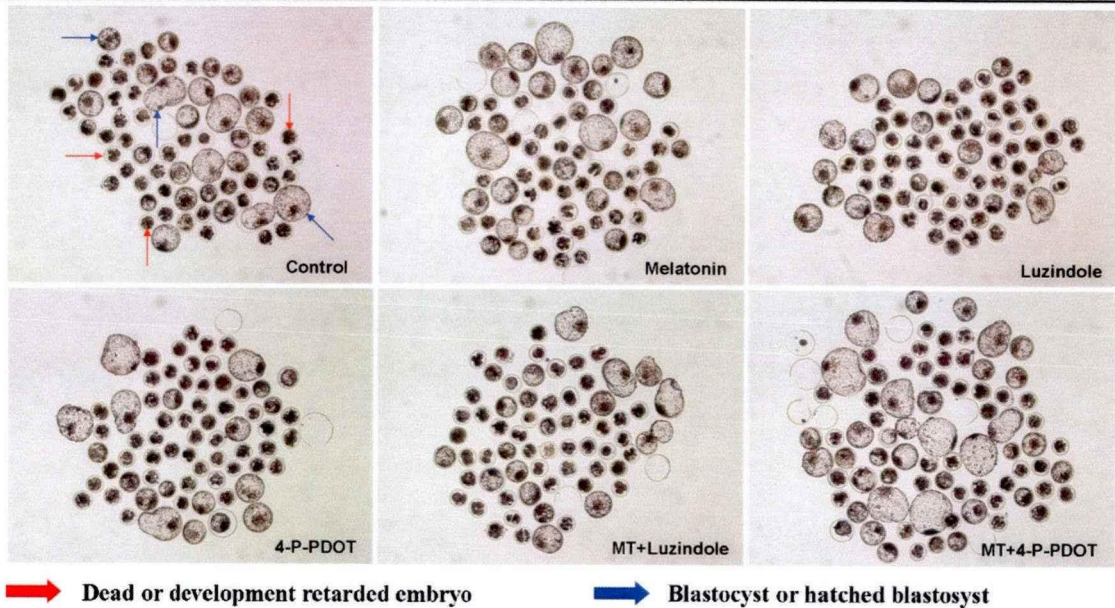


图 4 褪黑素受体抑制剂对牛胚胎体外发育影响的代表性明场照片。红色箭头表示死亡或者发育阻滞的胚胎，蓝色箭头代表囊胚或孵化囊胚。胚胎分别培养在添加 10^{-7} M 褪黑素， 10^{-7} M luzindole， 10^{-7} M 4-P-PDOT， 10^{-7} M luzindole + 10^{-7} M 褪黑素， 10^{-7} M 4P-PDOT + 10^{-7} M 褪黑素或不添加任何药物的培养液中。胚胎发育第 8 天在倒置镜下采集照片。添加 10^{-7} M 褪黑素或 10^{-7} M 4-P-PDOT + 10^{-7} M 褪黑素组囊胚率及孵化囊胚率要显著高于其他组。这意味着褪黑素对牛胚胎发育的促进作用通过 MT1 受体，因为非选择性 MT1 和 MT2 受体抑制剂 luzindole 能阻断褪黑素对牛胚胎发育的促进作用，而选择性 MT2 抑制剂 4-P-PDOT 则无此阻断效果。

Fig.4 Representative photos of the effects of melatonin receptor antagonist in culture medium on the development of bovine embryos. The red arrows represent dead or development retarded embryo and blue arrows represent blastocyst or hatched blastocyst. The embryos were produced in IVC medium supplemented with 10^{-7} M melatonin, 10^{-7} M luzindole, 10^{-7} M 4-P-PDOT, 10^{-7} M luzindole plus 10^{-7} M melatonin, 10^{-7} M 4P-PDOT plus 10^{-7} M melatonin or without drug, respectively. The embryos were photoed on day 8 under an inverted microscope. The blastocyst rate and the hatched blastocyst rate were significantly higher in the group supplemented with melatonin or 10^{-7} M 4-P-PDOT plus melatonin compared with rest of the groups including control, luzindole, 4-P-PDOT and melatonin plus 10^{-7} M luzindole, respectively. This indicates that the beneficial effects of melatonin on bovine embryo development are mediated via MT1 since luzindole, a non-selective MT1 and MT2 antagonist, blocks while 4-P-PDOT, a selective MT2 antagonist, has little effects on melatonin induced embryo development.

2.6 褪黑素对牛胚胎抗氧化抗凋亡基因表达的影响

荧光定量 PCR 结果表明，褪黑素处理组 *GPX4* 和 *SOD1* 基因表达 (mRNA) 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。同时，褪黑素处理显著下调促凋亡因子 *p53*, *BAX*, *caspase-3* 的表达 ($P < 0.05$)。相反，与对照组相比，除桑椹胚外，褪黑素处理组抗凋亡基因 *Bcl-2* 的表达量均显著上调 ($P < 0.05$) (图 5)。

2.7 褪黑素对牛胚胎发育相关基因表达的影响

褪黑素处理组参与细胞代谢的葡萄糖转运蛋白 1 (*SLC2A1*) 的相对表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而葡萄糖转运蛋白 3 (*SLC2A3*) 在褪黑素处理组及对照组间无显著差异 ($P > 0.05$)。褪黑素处理后与重编程相关的 DNA 甲基转移酶 1A (*DNMT1A*) 显著上调 ($P < 0.05$), 但胚胎母体间识别的干扰素 τ (*IFNT2*) 在褪黑素处理组及对照组间无显著差异 ($P > 0.05$)。最后, 褪黑素处理能显著上调 ($P < 0.05$) 桥粒胶蛋白 2 (*DSC2*) 的表达, 它是提供细胞连接和诱导囊胚腔形成的内在膜蛋白 (图 6)。

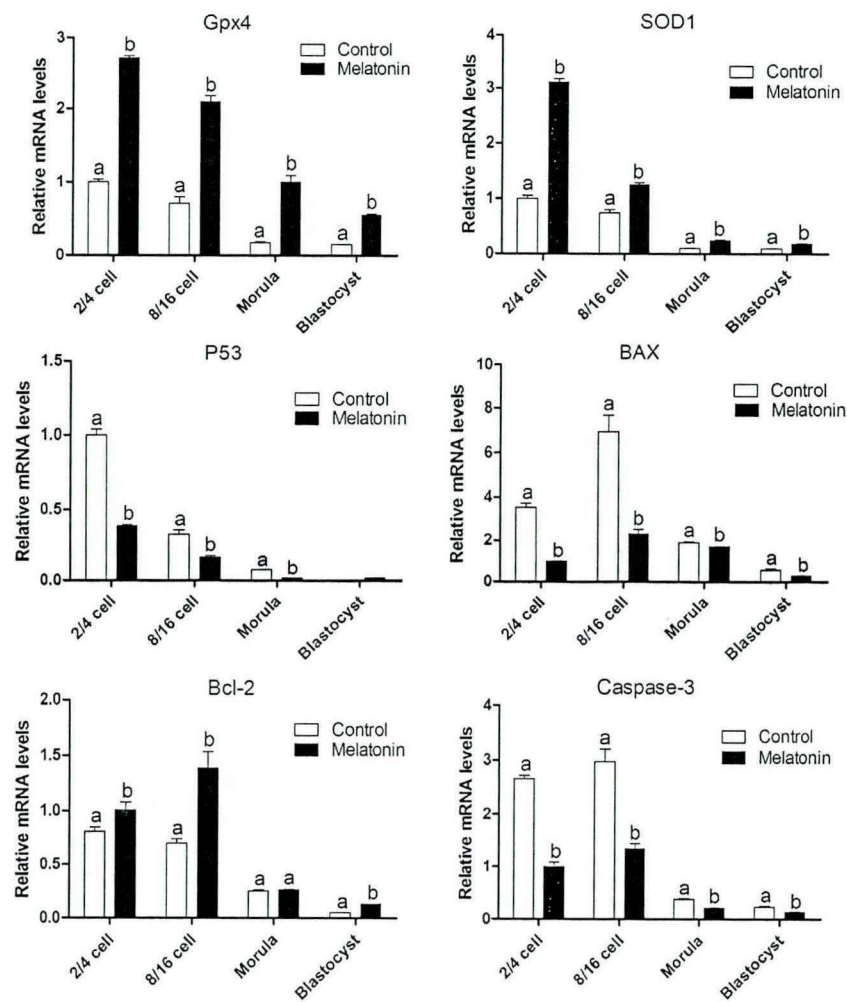


图 5 褪黑素对牛胚胎抗氧化酶(*Gpx4* 和 *SOD1*)、促凋亡基因(*P53*, *BAX* 和 *caspase-3*)和抗凋亡基因(*Bcl-2*)表达的影响。同列不同字母 (a-b) 表示有统计学差异 ($P < 0.05$)。

Fig.5 Effects of melatonin on the gene expression of anti-oxidative enzymes (*Gpx4* and *SOD1*), pro-apoptotic factors (*P53*, *BAX* and *caspase-3*) and anti-apoptotic factor (*Bcl-2*) during the development of bovine embryo. The letters of a and b identify statistically significant differences ($P < 0.05$).

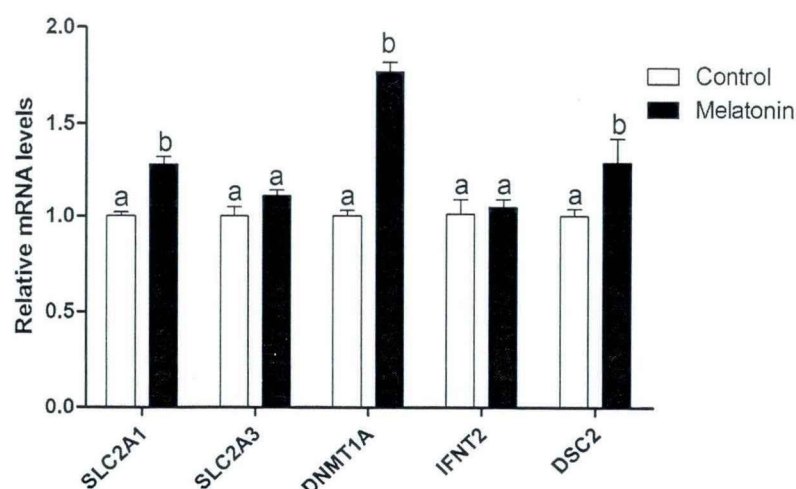


图 6 褪黑素对牛囊胚发育相关基因表达的影响 (*DNMT1A*, *SLC2A1*, *SLC2A3*, *IFNT2* 和 *DSC2*)。同列不同字母 (a-b) 表示有统计学差异 ($P < 0.05$)。

Fig.6 Effects of melatonin on the gene expression of developmentally important genes (*DNMT1A*, *SLC2A1*, *SLC2A3*, *IFNT2* and *DSC2*) in bovine blastocyst. The letters of a and b identify statistically significant differences ($P < 0.05$)

3. 讨论

养牛业是世界上最大的畜牧产业，它是许多国家国民生产总值的重要组成部分。为了提高养牛业的生产，每年在世界各地大约需要移植 265,000 枚体外生产胚胎(Thibier, 2006)。然而，胚胎体外生产效率仍然很低，而且与体内胚胎相比，体外生产胚胎质量很低(Lonergan et al., 2006)。Abeydeera(2002)和 Peterson(2003)等公布的数据显示，体内和体外生产的牛胚胎移植后妊娠率分别为 76%和 30%。两者产仔率差异更大，体内胚胎达 60%而体外胚胎只有 5%。研究认为胚胎体外生产时遭受的氧化应激特别是 ROS 是导致胚胎质量下降的主要原因(Guerin et al., 2001)。ROS 会引起线粒体损伤，胚胎发育阻滞，ATP 耗竭和细胞凋亡(Guerin et al., 2001)。因此，研究人员经常在培养液中添加抗氧化剂以改善体外发育胚胎的质量，如维生素 C(Hu et al., 2012)，白藜芦醇(Wang et al., 2013)及应用广泛的褪黑素(Lonergan et al., 2006; Gao et al., 2012; Wang et al., 2013)。褪黑素是一种高效的抗氧化剂(Galano et al., 2011; Galano et al., 2013)，已被广泛用于体外胚胎生产。据报道，适宜浓度褪黑素能提高附植前小鼠，绵羊(Vázquez et al., 2010)，猪(Rodriguez-Osorio et al., 2007)，水牛(Manjunatha et al., 2009)和兔(Mehaisen et al., 2013)胚胎的发育。

本研究表明，褪黑素通过清除 ROS 减少氧化损伤而促进牛胚胎发育。研究显示，培养液中添加褪黑素能显著提高囊胚细胞数。该结果与先前报道的褪黑素与猪孤雌胚胎(Shi et al., 2009)的研究一致。本研究结果再次证明了褪黑素能提高体外发育胚胎的质量。但是，当褪黑素浓度过高时 (10^{-3} M) 会抑制胚胎发育，这可能是由于高浓度褪黑素会抑制细胞分裂(Büyükcavcı et al., 2006)。

为了确定褪黑素促进体外胚胎发育的潜在作用机制，我们还研究了褪黑素与牛胚胎发育过程中抗氧化及凋亡相关基因表达的关系。结果表明，褪黑素能显著上调抗氧化酶 *GPX4* 和 *SOD1* 的表达。这与 Fischer (2013)等人的研究一致，其报道褪黑素能上调 *CAT*, *GPX* 和 *SOD* 等几个重要

抗氧化酶的表达,进而通过降低 8-羟基-2-脱氧鸟苷的形成来减少 DNA 损伤。Vandaele (2011)等研究发现, 10^{-7} M 褪黑素能显著降低体外培养小鼠胚胎的细胞凋亡。本研究也观察到类似结果,即褪黑素抑制促凋亡基因 *P53*, *BAX* 和 *caspase-3* 的表达,促进抗凋亡基因 *bcl-2* 的表达。

此外,本研究首次发现褪黑素能影响胚胎发育相关重要基因的表达,包括 *SLC2A1*, *DSC2* 和 *DNMT1A*。 *SLC2A1* 位于牛囊胚滋养外胚层细胞中(Wrenzycki et al., 2003),它主要参与细胞代谢及葡萄糖转运(Rieger et al., 1992)。有研究指出,体内生产胚胎 *SLC2A1* 的 mRNA 水平要显著高于体外生产胚胎(Wrenzycki et al., 2001)。而 *SLC2A1* 表达水平较高的体外生产胚胎通常具有更好的形态和质量(Lopes et al., 2007)。*DNMT1A* 参与的哺乳动物 DNA 胞嘧啶甲基化是维持适当的表观修饰和基因组的完整性不可或缺的(Jackson-Grusby et al., 2001)。*DNMT1A* 的缺失会导致各种紊乱,例如诱导细胞凋亡(Jackson-Grusby et al., 2001),胚胎发育及表型出现异常(Hastie 1997, Stancheva et al., 2000),并最终导致胚胎死亡(Li et al., 1993)。本研究显示,褪黑素处理组 *DNMT1A* 表达水平显著高于对照组。*IFNT2* 在胚胎和母体信号识别过程中发挥重要作用。有研究表明,体外生产的胚胎 *IFNT2* 表达水平上调,而高表达的 *IFNT2* 对应低质量的胚胎(Wrenzycki et al., 2001)。但与此相反的是,Yao(2009)等未能检测到经常规冷冻保存后的体外和体内胚胎之间 *IFNT2* 表达的差异。因此,目前所研究的单个囊胚 *IFNT2* 表达量与其质量的关联性分析是充满矛盾的(Hernandez-Ledezma et al., 1993)。在本研究中,我们也未发现褪黑素处理对 *IFNT2T* 表达的影响。*DSC2* 是维持细胞连接和调控囊胚腔形成的一种内在膜蛋白。据报道,体外培养的胚胎 *DSC2* 水平要低于体内生产胚胎(Knijn et al., 2002)。在本研究中,褪黑素处理组 *DSC2* 基因的表达要显著高于对照组。根据上述讨论可以推断,褪黑素能改善体外生产胚胎的质量。其机制包括褪黑素发挥抗氧化和抗凋亡作用,进而调节胚胎的代谢和表观修饰过程。

褪黑素除了直接发挥抗氧化作用外,其许多作用是通过 G 蛋白偶联受体 MT1 和 MT2 介导的(Tamura et al., 2009)。有充分的证据表明褪黑素能通过百日咳毒素敏感的 G 蛋白偶联受体抑制 cAMP 的合成,从而升高 cGMP(Rodriguez-Osorio et al., 2007)。目前已在许多动物(包括人)生殖器官中检测到褪黑素受体的存在(Woo et al., 2001)。褪黑素的结合位点不仅存在于人排卵前卵泡(Yie et al., 1995; Niles et al., 1999)的颗粒细胞中,而且还存在于猪卵丘细胞与颗粒细胞上(Kang et al., 2009)。Sampaio(2012)等报道,MT1 和 MT2 均存在于牛卵母细胞上,但是体外生产的牛囊胚中只有 MT1 存在。本文研究显示,体外生产的牛胚胎均表达 MT1 和 MT2。由于胚胎上存在褪黑素受体,那么褪黑素对胚胎发育的促进作用是否是通过这些受体介导的?进一步的研究确定了 MT1 参与了褪黑素对牛胚胎发育的促进作用,因为非选择性 MT1 及 MT2 抑制剂 luzindole 能阻断褪黑素的这种促进作用,而选择性 MT2 抑制剂 4-P-PDOT 则无此效果。该结果与前人报道一致,其认为在哺乳动物生殖活动的调节中 MT1 比 MT2 发挥更多生物学功能(Weaver et al., 1996)。

本研究首次报道了褪黑素对牛胚胎发育的促进作用是通过 MT1 受体。目前的研究提供了这样的证据,即可以应用外源性褪黑素提高试管婴儿及克隆牛的效率。本研究不仅可以解决当前牛胚胎体外生产效率低下的问题,而且也为褪黑素在大动物或人类医学上的使用提供技术和理论依据。然而,褪黑素通过 MT1 受体促进牛胚胎发育的具体机制还需要更深入的研究。

4. 小结

本研究解决了一个基本问题,即褪黑素对哺乳动物胚胎体外发育的作用机制。研究表明,培养液中添加 10^{-9} 至 10^{-7} M 褪黑素能显著促进牛胚胎体外发育。通过定量 PCR、免疫荧光及 western blot 技术,发现牛胚胎上存在 MT1 和 MT2 受体。同时,本文首次证明褪黑素通过 MT1 受体促进牛胚胎体外发育。此外,首次研究了褪黑素对胚胎发育相关重要基因表达的影响。

实验三 褪黑素对牛体外发育囊胚抗玻璃化冷冻能力的研究

摘要: 为了评估牛胚胎体外培养过程中褪黑素对胚胎发育和胚胎质量的潜在影响。牛卵丘卵母细胞复合体(COCs)体外成熟24h后进行体外受精。然后将胚胎培养在添加 10^{-7} M褪黑素的培养液中。通过观察卵裂率,8-细胞率和囊胚率研究褪黑素对胚胎发育的影响。通过玻璃化冷冻解冻后囊胚死亡率、孵化率及发育相关基因的表达研究褪黑素对胚胎质量的影响。研究结果显示,褪黑素能显著提高体外生产牛胚胎的卵裂率和8-细胞率。此外,胚胎培养的第7天,褪黑素组囊胚率显著高于对照组。以上结果表明褪黑素能促进牛胚胎体外发育。在胚胎发育的第7天将早期囊胚进行玻璃化冷冻,解冻培养24小时后,褪黑素(10^{-7} M)组囊胚孵化率显著高于对照组,而囊胚冷冻解冻后48-72h,褪黑素组囊胚死亡率均显著低于对照组。此外,褪黑素组囊胚冷冻解冻后*DNMT3A*, *OCC*, *CDH1*表达显著上调,*AQP3*的表达显著下调。综上所述,褪黑素不仅促进牛胚胎体外发育的速度及囊胚率,而且还通过提高抗冷冻能力及调控发育相关基因的表达而提高囊胚质量。

关键词: 牛, 褪黑素, 胚胎体外生产, 玻璃化冷冻

引言

越来越多的证据表明,作为人类早期胚胎发育的研究模型,牛植入前胚胎要优于小鼠胚胎(Wrenzycki et al., 2001)。然而,大量研究表明,体外生产的胚胎和体内胚胎有很大的差异。这些差异包括发育速度、形态特征(Van Soom et al., 1997; Boni et al., 1999)、细胞代谢(Khurana et al., 2000)、染色体整倍性(Viuff et al., 2001)、透明带完整性(Duby et al., 1997)、囊胚细胞数(Leibfried-Rutledge et al., 1987)、冷冻保存耐受性(Leibo et al., 1993)及基因转录水平(Niemann et al., 2000)等,这些差异最终体现在妊娠率的不同(Hasler, 2000)。虽然卵母细胞的内在质量决定了其最终能发育成囊胚的比例(即卵母细胞的发育能力),但是受精后胚胎的培养环境决定了囊胚的质量(Knijn et al., 2002; Rizos et al., 2002; Rizos et al., 2002)。研究表明,培养条件会影响胚胎发育的速度,如第一次卵裂(Lonergan et al., 1999),8-16细胞期基因组的激活以及最后囊胚的形成(Crosier et al., 2001)。例如,将在体外生产的牛受精卵移植入母羊的输卵管内发育,将大大增加这些胚胎的抗冷冻能力,甚至能和体内生产的胚胎相持平(Enright et al., 2000)。Rizos等人报道,受精后培养液中的血清含量将影响胚胎发育及所得囊胚的质量(Rizos et al., 2003)。因此,胚胎体外培养环境决定了胚胎的质量。

褪黑素(N-乙酰基-5-甲氧基色胺)是一种高效的自由基清除剂,抗氧化剂和抗凋亡剂(Reiter et al., 2009)。褪黑素在许多动物模型中被用于减少自由基损伤。如褪黑素已被广泛应用于癌症,免疫紊乱,阿尔茨海默氏病,糖尿病和病毒感染(Pappolla et al., 2000; Bonilla et al., 2004; Hussain et al., 2006; Tamura et al., 2009)。近年来,褪黑素也被广泛用于小鼠(Ishizuka et al., 2000),水牛(Manjunatha et al., 2009),牛(Papis et al., 2007)和猪(Rodriguez-Osorio et al., 2007; Kang et al., 2009)等体外胚胎发育的研究。在小鼠中,褪黑素能促进新鲜及玻璃化冷冻的2-细胞胚胎的发育,这些促进作用包括提高囊胚率,孵化囊胚率和囊胚细胞数(Gao et al., 2012)。褪黑素还能促进高氧条件下牛胚胎的体外发育和热应激牛卵母细胞的囊胚率(Papis et al., 2007)。在其它物种中, 10^{-9} M褪

褪黑素能促进猪孤雌和体外受精胚胎的卵裂率和囊胚细胞数(Rodriguez-Orsorio et al., 2007), 褪黑素还能显著改善绵羊体内外胚胎的质量以及存活率(Abecia et al., 2002)。近期有报道表明 10^{-6} M 褪黑素能显著提高附植前兔胚胎的发育和孵化囊胚率(Mehaisen et al., 2013)。以上研究结果主要集中于褪黑素对胚胎体外发育, 如卵裂率、囊胚率、孵化囊胚率和囊胚细胞数等形态学方面的影响(Shi et al., 2009; Gao et al., 2012)。因此, 有必要进一步确定和评估褪黑素对体外生产胚胎质量的影响。本课题组之前研究表明, 褪黑素能够通过提高体外发育小鼠胚胎的质量来提高这些囊胚移植后的附植效率(Wang et al., 2013)。

囊胚 mRNA 表达水平和抗冷冻能力经常被用作评估胚胎质量和发育能力的重要指标(Rizos et al., 2001; Rizos et al., 2003; Kuzmany et al., 2011)。但是, 据我们所知, 目前很少有关于褪黑素对牛囊胚质量包括囊胚发育, 抗冷冻能力和胚胎发育相关基因表达的研究。因此, 本文的研究将集中于褪黑素对牛胚胎发育的影响, 最重要的是, 研究其对体外生产胚胎解冻后质量的影响。

1. 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物材料

牛卵巢来自河北省廊坊市大厂回族自治县屠宰场, 牛血清采自这个屠宰场屠宰的不同的牛。

1.1.2 溶液配制

1.1.2.1 玻璃化冷冻及解冻溶液配制

预处理液 (EG20): 以 DPBS-PVA 为基础液, 加入体积分数为 20% 的乙二醇(EG, Sigma)溶液配制而成。

玻璃化溶液 (EFS35): 体积分数为 30% 的聚蔗糖 (Ficoll 70, sigma) 和 0.5mol/L 蔗糖于 DPBS-PVA 中混匀即为 FS 溶液, 然后用 EG 和 FS 液按体积比为 3.5: 6.5 的比例混合均匀, 即制成玻璃化溶液 EFS35。

解冻液: 含 1%PVA 的 DPBS 溶液。

1.1.2.2 其他溶液配制

同实验一

1.1.3 仪器

同实验一

1.1.4 耗材

同实验一

1.2 实验方法

1.2.1 牛囊胚生产

同实验一

1.2.2 玻璃化冷冻和解冻

装管方法: 在塑料细管中依次吸入约 7.5cm 的 PBS-PVA 溶液, 约 0.5cmEFS35 溶液, 约

0.5cmEFS35（放入胚胎），各段液体之间以空气柱（0.5cm）隔开。待胚胎导入 EFS35 节段后，再吸入一段 PBS-PVA 溶液，细管封口（图 1B，冷冻液与解冻液的比例约为 1-1.5/8.5-9.5）。

玻璃化冷冻：室温 25 ℃（±0.5）条件下，将胚胎移入预处理液（EG20）中 3min，再移入预先配置好的 EFS35 液的细管（图 1B）中平衡 30s，细管封口后直接投入液氮中冷冻。每支细管放入两枚囊胚（参考图 1A，1B）。

解冻：室温 25 ℃（±0.5）条件下，将细管从液氮中取出，浸入 25 ℃（± 0.5）水浴中平行晃动 10s。待细管内的溶液融化后，取出细管，拭干表面水珠，而后按照图 1C 所述方法在管内混合冷冻液和解冻液。。当胚胎在该混合液中停留约 30s 后，将胚胎推至干净的培养皿中，在显微镜下收集胚胎后用 PBS-PVA 洗涤三次，然后在 38.5℃、5%CO₂ 和饱和湿度的培养箱中继续培养 72 小时。

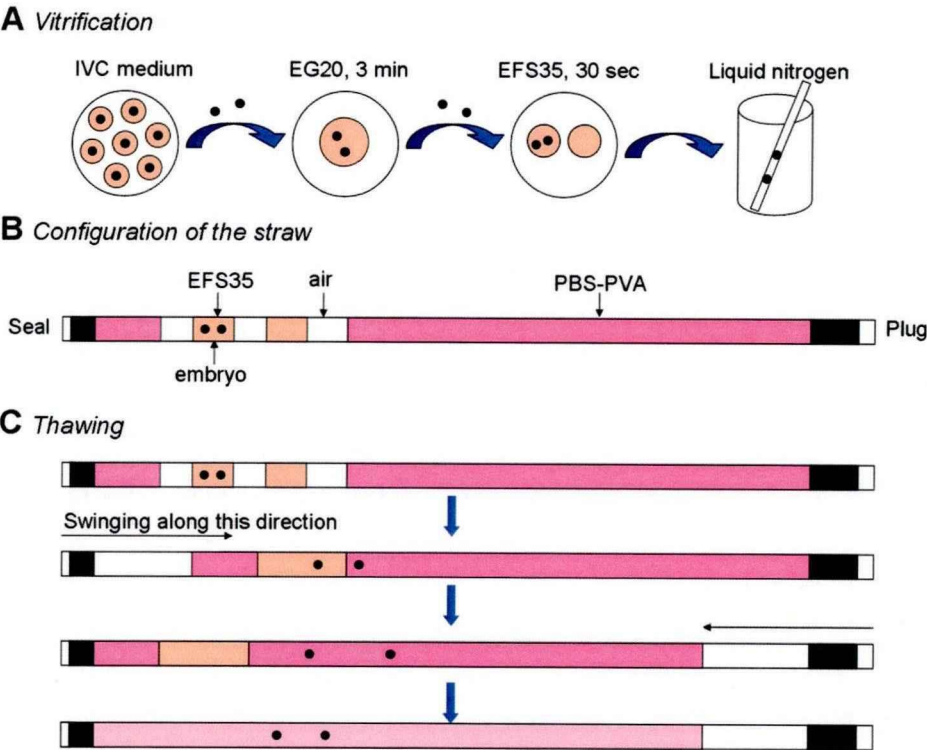


图 1 本研究用细管甩管法玻璃化冷冻与解冻方法。A：冷冻程序。B：细管装管方法。在塑料细管中依次吸入约 7.5cm 的 PBS-PVA 溶液，约 0.5cmEFS35 溶液，约 1cmEFS35（放入胚胎），各段液体之间以空气柱（0.5cm）隔开。待胚胎导入 EFS35 节段后，再吸入一段 PBS-PVA 溶液，细管封口。C：解冻时通过甩管法将 EFS35 和 PBS-PVA 溶液混匀。

Fig.1 Vitriification and thawing protocols in the present study. A. vitriification protocol; B: configuration of the straw. Approximately 7.5 cm of a dilution solution (PBS-PVA), a small volume of EFS35, and approximately 1 cm of EFS35 (take embryos) were aspirated into the straw one by one and each chamber was separated by small air bubbles. Then the embryos were pipetted into the section of EFS35 in the straw. Another volume of the dilution solution was aspirated and then the open end of the straw was sealed with PVA powder; C: solutions in the straw move from one end to another and the EFS35 was mixed with PBS-PVA solutions little by little.

1.2.3 解冻后囊胚质量评估：死亡率和孵化率

用细管法将发育至第 7 天的对照组及褪黑素组早期囊胚进行玻璃化冷冻，解冻后继续培养 72

小时，分别统计对照组及实验组解冻后 12h、24h、36h、48h、60h 及 72h 囊胚的孵化率及死亡率。

1.2.4 RNA 提取及定量 PCR

样品的收集：收集解冻培养 72h 后的囊胚用 DPBS 溶液洗涤两次，并储存于-80℃ 冰箱，用于 RNA 提取。

TRIzol 法提取总 RNA，RNA 反转录，定量 PCR 反应同实验一。

本实验研究基因所用的引物序列

Table 1 Primers used in this study			
Genes	Primer sequence(5'-3')	Fragment Size	Sequence references and accession no.
DNMT3A	Forward:CCGTAGTGTCCAAGACCAATC	186	BC114063
	Reverse:GCTGAGTCAAATCCTCGTAAC		
SLC2A3	Forward:CCTGCTTTATTGTGGCTGAAC	165	NM_174603
	Reverse:CGAGGAACACAGTGAAGACGA		
IFNT2	Forward: CTCCAGCAGTGCCTCAACCT	158	NM_001015511
	Reverse:CCTCCCATGTCAGAGTCTTTCTC		
OCC	Forward: GTGTTGCCTCCACTCTTGCCT	177	BC133617.1
	Reverse: GGAATCCCTTTGCCGCTCT		
TJP1	Forward: GTCCTCTTCCTGCTTGACCTC	100	AJ313183
	Reverse: CACCCACATCGGATTCTACG		
HSPA1A	Forward: CGATGGTGCTGACCAAGATG	103	NM_174550
	Reverse: CGCTGCGAGTCGTTGAAGT		
AQP3	Forward: TGGCTTCAACTCTGGCTACG	236	NM_001079794
	Reverse: GCGACAACTTCACATTCTCCTC		
CDH1	Forward: CGTATCGGATTTGGAGGGAC	192	AY508164
	Reverse: CGAGGAACAAGAGCAGGGTG		
β-actin	Forward: TGACGTTGACATCCGTAAAGACC	117	NM_173979.3
	Reverse: GTGCTAGGAGCCAGGGCAG		

1.2.5 统计分析

每组数据至少重复3次，数据统计采用SPSS 18.0统计软件，所有数据结果用平均数±SEM表示。单个均数间的比较采用单因素方差分析，多个均数间的比较采用Duncans多重比较完成， $P<0.05$ 视为两个数据差异显著。

2. 结果

2.1 褪黑素对牛胚胎体外发育的影响

共使用 235 枚胚胎研究了褪黑素 ($10^{-7}M$) 对胚胎发育的潜在影响。褪黑素处理组 ($87.78\pm1.02\%$) 卵裂率显著高于对照组 ($82.50\pm1.12\%$, $P<0.05$) (图 2A)。同样地，褪黑素处理组 ($84.45\pm0.93\%$) 8-细胞率也显著高于对照组 ($80.00\pm1.29\%$, $P<0.05$) (图 2B)。此外，胚胎发育第 7 天，褪黑素处理组 ($38.33\pm2.21\%$) 囊胚率显著高于对照组 ($26.67\pm1.05\%$, $P<0.05$) (图 2C)。

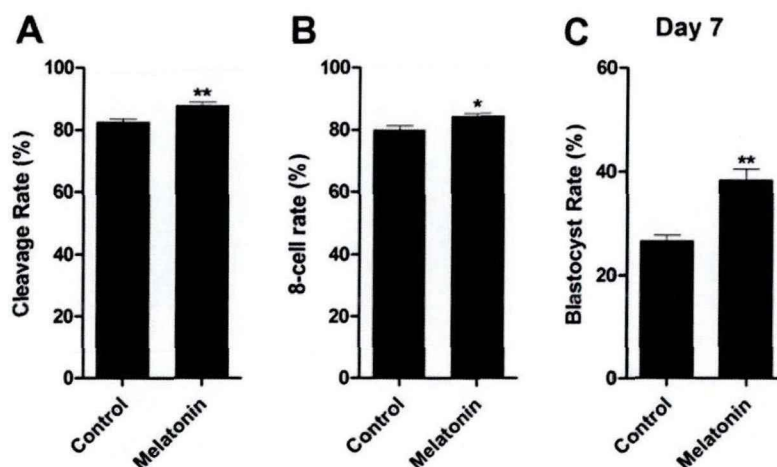


图2 褪黑素对牛体外成熟卵母细胞受精后胚胎发育的影响。A: 卵裂率。B: 8-细胞率。C: 受精后第7天的囊胚率。同列不同字母表示有统计学差异($P < 0.05$)。

Fig. 2 Effects of melatonin on the developments of *in vitro* maturation/fertilization bovine embryos. A: cleavage rate; B: 8-cell rate; C: blastocyst rate at Day 7 (*in vitro* fertilization=Day 0). Different superscripts in each column present statistical significant differences ($P < 0.05$).

2.2 褪黑素对牛体外发育囊胚抗玻璃化冷冻能力的影响

囊胚抵抗超低温保存的能力是反映胚胎质量的一个重要指标。在胚胎发育第7天时用细管法将褪黑素处理组及对照组的早期囊胚进行冷冻,解冻后继续培养72小时,分别统计解冻后12h、24h、36h、48h、60h及72h对照组及实验组囊胚的孵化率及死亡率。

本实验共进行4批,冷冻对照组囊胚65枚,实验组囊胚54枚,对照组囊胚解冻后12h、24h、36h、48h、60h及72h囊胚孵化率分别为 $0.00 \pm 0.00\%$ 、 $1.09 \pm 1.09\%$ 、 $8.50 \pm 3.29\%$ 、 $27.05 \pm 4.31\%$ 、 $32.24 \pm 4.59\%$ 及 $32.24 \pm 4.59\%$ (图3A,图4),死亡率分别为 $14.20 \pm 4.91\%$ 、 $17.46 \pm 1.96\%$ 、 $24.90 \pm 5.32\%$ 、 $29.25 \pm 3.58\%$ 、 $29.25 \pm 3.58\%$ 及 $29.25 \pm 3.58\%$ (图3B,图4);实验组囊胚解冻后12h、24h、36h、48h、60h及72h囊胚孵化率分别为 $3.33 \pm 3.33\%$ 、 $12.05 \pm 4.14\%$ 、 $24.32 \pm 5.00\%$ 、 $42.98 \pm 4.28\%$ 、 $51.36 \pm 5.79\%$ 及 $60.58 \pm 6.09\%$ (图3A,图4),死亡率分别为 $10.38 \pm 3.85\%$ 、 $10.38 \pm 3.85\%$ 、 $12.05 \pm 4.57\%$ 、 $13.44 \pm 3.41\%$ 、 $13.44 \pm 3.41\%$ 及 $13.44 \pm 3.41\%$ (图3B,图4)。由图3A可知,实验组囊胚冷冻解冻培养12h后囊胚孵化率与对照组无显著差异($P > 0.05$),但是培养24小时后实验组囊胚孵化率持续显著高于对照组($P < 0.05$),而且囊胚孵化率明显随着时间的延长而增加,但是对照组囊胚在冷冻解冻培养48h后囊胚孵化率无明显变化,而且对照组囊胚开始孵化的时间明显晚于实验组。由图3B可知,实验组囊胚冷冻解冻培养12h至36h时囊胚死亡率均低于对照组,但是没有显著性差异,但当囊胚培养到48h时,实验组囊胚死亡率开始显著低于对照组($P < 0.05$),且一直持续到72h,此外,实验组囊胚冷冻解冻后培养过程中囊胚死亡率无显著变化,但是对照组囊胚冷冻解冻后死亡率有逐渐上升的趋势。

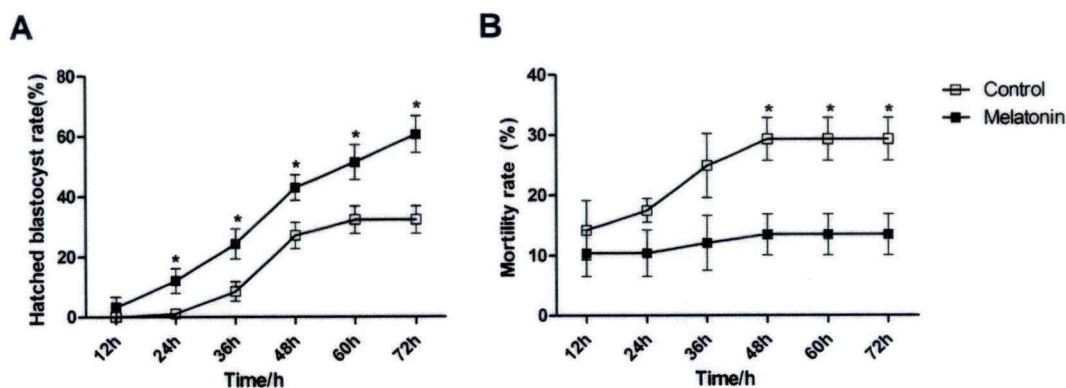


图3 褪黑素对玻璃化冷冻解冻后囊胚孵化率及死亡率的影响。A: 解冻后不同时间段囊胚孵化率变化。B: 解冻后不同时间段囊胚死亡率变化。同列不同字母表示有统计学差异($P < 0.05$)。

Fig.3 Effects of melatonin on blastocyst re-expansion and survival following vitrification and thawing. A: hatched blastocyst rate at different times after thawing. B: mortality rate at different times after thawing. Different superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$) between treatments at a given time point.

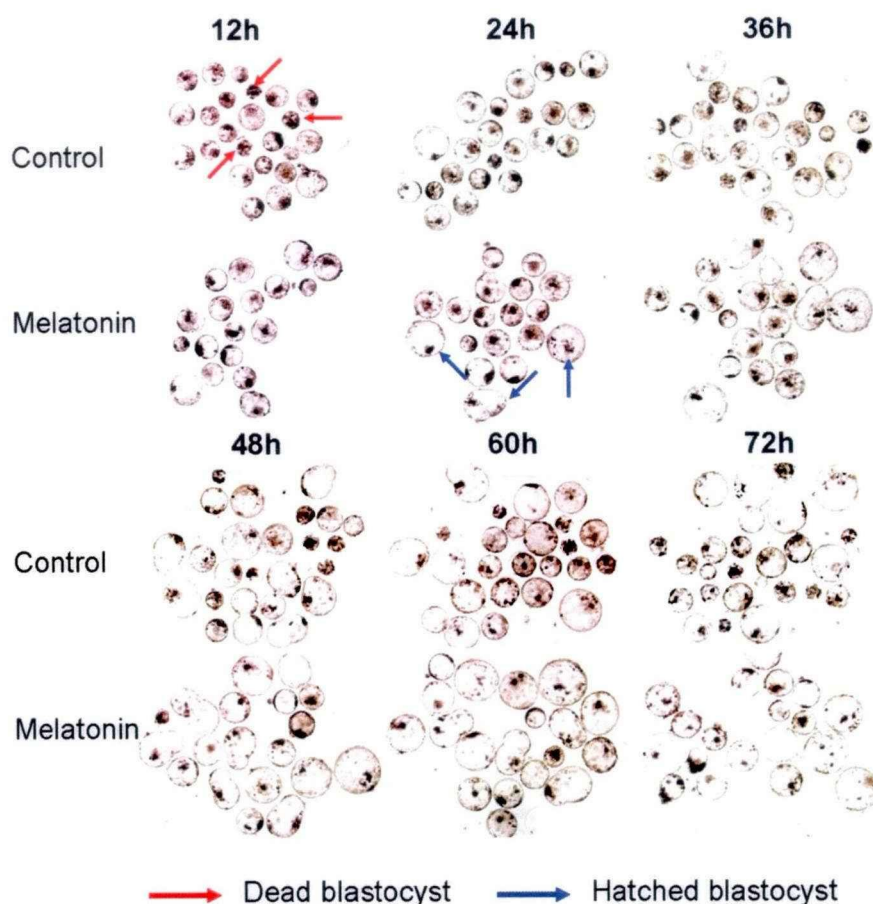


图4 褪黑素对牛囊胚玻璃化冷冻-解冻后胚胎发育的影响。红色箭头表示死亡的胚胎（未恢复扩展或发育阻滞的囊胚），蓝色箭头表示孵化囊胚。本研究在胚胎体外培养过程中使用 10^{-7} M褪黑素或无药物处理，当胚胎发育至第7天时进行细管法玻璃化冷冻，解冻后在 CO_2 培养箱继续培养72 h，结果发现 10^{-7} M褪黑素处理过的囊胚冷冻解冻后24h至72h囊胚孵化率显著提高，冷冻解冻后48h至72h囊胚死亡率显著降低。

Fig.4 Effects of melatonin on the development of bovine embryos after vitrification and thawing. The red arrows represent dead blastocyst (defined as without re-expansion or development retarded blastocyst) and blue arrows represent hatched blastocyst. Blastocysts were produced in IVC medium supplemented with or without 10^{-7} M melatonin, following vitrification and thawing at Day 7 of embryo culture, then cultured in IVC medium in a CO_2 incubator for 72 h. melatonin (10^{-7} M) significantly increased the hatched blastocyst rate from 24h to 72h and decreased the mortality rate from 48h to 72h after thawing.

2.3 褪黑素对牛体外发育囊胚玻璃化冷冻后 mRNA 转录水平的影响

本研究共收集褪黑素组囊胚 44 枚, 对照组囊胚 46 枚, 研究了褪黑素对胚胎发育相关基因表达的影响, 实验重复 3 次。根据定量 PCR 分析, 褪黑素处理组 DNA 甲基转移酶 3A (*DNMT3A*); 紧密连接蛋白 (*OCC*) 和钙粘蛋白 (*CDH1*) 均显著高于对照组 ($P < 0.01 \sim 0.05$), 与此相反, 褪黑素处理组水通道蛋白 3 (*AQP3*) 的表达显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 3)。葡萄糖转运蛋白 3 (*SLC2A3*), 干扰素 τ (*IFNT2*), 热休克蛋白 1A (*HSPA1A*) 和紧密连接蛋白 1 (*TJP1*) 的表达水平和对照组相比没有显著变化 ($P > 0.05$)。

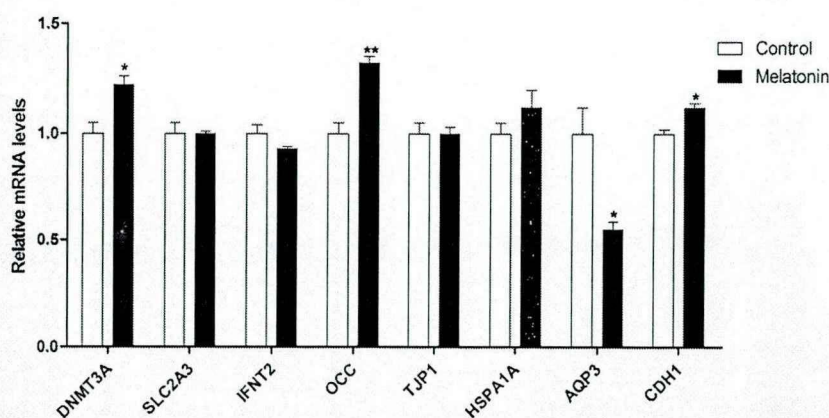


图5 褪黑素对发育相关基因表达的影响。牛囊胚解冻后检测了8个发育相关重要基因的表达 (*DNMT3A*, *SLC2A3*, *IFNT2*, *OCC*, *TJP1*, *HSPA1A*, *AQP3* 和 *CDH1*)。同列不同字母表示有统计学差异($P < 0.05$)。

Fig.5 Effects of melatonin on the gene expression of developmentally important genes. Eight developmentally important genes (*DNMT3A*, *SLC2A3*, *IFNT2*, *OCC*, *TJP1*, *HSPA1A*, *AQP3* and *CDH1*) were detected in bovine blastocyst after thawing. The letters of a and b represent statistically significant differences ($P < 0.05$)

3. 讨论

为了探明褪黑素对体外胚胎生产的影响, 本文研究了褪黑素对牛胚胎发育 (卵裂率, 8-细胞率和囊胚率)、抗冷冻能力及发育相关基因表达的影响。据报道, 胚胎的质量和活力主要受体外受精后的培养体系所影响(Galli et al., 2001; Rizos et al., 2002)。褪黑素作为一种高效的自由基清除剂和抗氧化剂, 被广泛用于体外胚胎生产。例如, 在培养液中添加褪黑素能显著提高小鼠早期胚胎发育效率(Ishizuka et al., 2000)。褪黑素已被证明能显著提高多个物种体外生产胚胎的囊胚率、孵化囊胚率及囊胚细胞数(Gao et al., 2012)。例如, 褪黑素能提高绵羊体外和体内条件下胚胎的质

量和存活率(Abecia et al., 2002; Vázquez et al., 2010), 提高猪胚胎的卵裂率和囊胚细胞数(Rodriguez-Ororio et al., 2007)。在高氧条件下, 褪黑素能促进牛胚胎体外生产的效率(Papis et al., 2007)。另外, 已有研究报道褪黑素能显著提高小鼠胚胎的附植效率(Wang et al., 2013)。本研究中, 我们发现褪黑素可以加快体外生产胚胎的发育速度。在胚胎发育的第七天, 添加褪黑素组囊胚率显著高于对照组。这些结果和前人研究类似(Yoshioka et al., 1997; Gutierrez-Adan et al., 2001), 他们认为, 体外培养体系会影响牛胚胎的发育速度。牛胚胎移植或胚胎冷冻通常在胚胎发育的第 7 天进行, 因为在这个时候, 发育正常的胚胎至少已经到早期囊胚阶段, 大多数发育正常的胚胎已到囊胚期, 部分已发育到扩张囊胚阶段(Galli et al., 2003)。如果胚胎发育到第 8 天甚至第 9 天才到囊胚, 那么这些胚胎通常质量较差, 无法进一步发育(Hasler et al., 1995)。

体外生产的牛胚胎和体内胚胎相比, 在许多重要方面均存在差异(Pomar et al., 2005)。如体外生产的胚胎常发育迟缓, 形态异常(Van Soom et al., 1997; Boni et al., 1999), 代谢迟缓(Khurana et al., 2000), 对温度敏感(Leibo et al., 1993), 细胞间通讯减少(Hasler, 2000), 并最终体现于妊娠率的降低(Hasler, 2000)。上述差异导致体外生产胚胎对冷冻保存更加敏感(Enright et al., 2000)。而胚胎承受冷冻解冻的能力是评价其质量的一个重要指标(Kaidi et al., 1998; Enright et al., 2000; Rizos et al., 2002)。不同培养体系对胚胎抗冷冻能力有很大影响(Rizos et al., 2003)。例如, 将体外生产的牛胚胎移植到羊输卵管发育后能显著提高它们抵抗冷冻解冻的能力。然而, 如果将这些胚胎培养在不含血清的培养液中, 例如人工合成的输卵管液, 它们则表现出较低的抗冷冻能力(Thompson, 1996)。本研究首次发现在体外培养液中添加褪黑素能提高囊胚的抗冷冻能力。褪黑素处理组囊胚冷冻解冻后 24h, 36h, 48h, 60h 和 72h 后的囊胚孵化率显著高于对照组。而有研究表明, 囊胚质量提高能显著提高胚胎移植后的妊娠率, 进而能生产更多的健康后代(Assou et al., 2010; Sandra et al., 2011)。

有研究表明体外培养条件也可以影响胚胎基因的表达(Doherty et al., 2000; Minami et al., 2001; Rizos et al., 2002)。mRNA 表达水平的差异或许可以解释体内外生产胚胎抗冷冻能力的差异(Enright et al., 2000; Rizos et al., 2002)。*DNMT3A* 发挥甲基化转移酶重新合成的作用, 在正常的发育和疾病中发挥着重要作用(Okano et al., 1999), 同时对于生殖细胞中大多数印记位点的甲基化是必不可少的(Kaneda et al., 2004)。*OCC* 是一个位于紧密连接处的完整的膜蛋白(Furuse et al., 1993)。它直接参与了囊胚形成时间的调控, 从而影响随后的胚胎发育(Sheth et al., 2000; Kim et al., 2004)。*CDHI* 主要参与细胞间连接。褪黑素处理能显著上调上述与胚胎发育紧密相关的三个重要基因的表达。因此, 褪黑素对胚胎质量的改善, 至少部分归因于褪黑素对这些基因的上调表达。*AQP3* 是跨膜通道蛋白, 其功能主要是在上皮组织中作为水分子通道允许水分子沿着渗透梯度方向迅速穿过细胞膜(Shiels et al., 1993)。有研究表明, *AQP3* 基因的表达既不受培养条件也不受由囊胚冷冻程序的影响(Kuzmany et al., 2011)。但在本研究中, 褪黑素显著下调 *AQP3* 的表达。据报道, *AQP3* 的表达下调能增加细胞抵抗凋亡的能力(Jablonski et al., 2007)。因此, 褪黑素对体外生产胚胎的抗细胞凋亡作用可能是通过下调 *AQP3* 实现的。*SLC2A3* 是非理想培养条件和低质量胚胎相关联的一个非常敏感的指标(Lopes et al., 2007)。研究表明, 与体内胚胎相比, 此基因在体外生产的胚胎中显著上调(Knijn et al., 2006)。然而, 在本研究中, 褪黑素不影响 *SLC2A3* 基因的表达。其他基因, 包括 *SLC2A3*, *IFNT2*, *HSPA1A* 和 *TJP1* 的相对表达量在对照组和褪黑素处理组之间不存在差异。结果表明这些基因似乎没有参与褪黑素对体外胚胎发育的促进作用。

总之,本研究结果表明,褪黑素可以显著提高体外生产胚胎的发育速度及囊胚质量,这体现在囊胚抗冷冻能力的提高,该过程的机制是复杂的,其中最重要的机制之一是褪黑素影响了胚胎发育相关的几个重要基因的表达,包括上调 *DNMT3A*, *OCC*, *CDH1* 和下调 *AQP3* 的表达。

4. 小结

本文首次证明了褪黑素不仅可以影响体外胚胎的发育效率(实验二)及发育速度,还能通过提高抗玻璃化冷冻能力及影响 mRNA 水平提高体外发育胚胎的质量。褪黑素显著提高体外发育牛囊胚玻璃化冷冻解冻后的孵化率及显著降低死亡率。此外,体外发育过程添加褪黑素能显著上调 *DNMT3A*, *OCC*, *CDH1* 及下调 *AQP3* mRNA 水平。

实验四 褪黑素对小鼠体外发育囊胚移植后附植效率及后代成活率的研究

摘要：原核胚在体外发育后经常存在各种缺陷，进而会影响它们随后移植到体内的附植过程，这是辅助生殖研究所面临的共同问题，仍需要进一步解决。在本研究中，我们观察到， 10^{-7} M 褪黑素能显著促进小鼠原核胚的体外发育。褪黑素处理显著提高了囊胚率，孵化囊胚率和囊胚细胞数。此外，当这些体外发育的囊胚移植给受体小鼠时，褪黑素处理组胚胎的妊娠率(95.0% vs. 67.8%)，窝产仔数(4.1 只/窝 vs. 2.7 只/窝)和出生后代的存活率(96.84% vs. 81.24%)显著高于对照组。进一步的分子机制研究表明褪黑素处理显著上调了超氧化物歧化酶(SOD)和抗凋亡因子 *bcl-2* 的表达，下调了促凋亡基因 *p53* 和 *caspase-3* 的表达。由于这些作用，褪黑素处理显著降低胚胎体外发育过程中活性氧的产生和细胞凋亡，进而提高了囊胚质量。而高质量的囊胚移植后能产生更多的健康后代，从而提高了后代的存活率。

关键词：褪黑素，小鼠，原核胚，胚胎移植，抗氧化，抗凋亡

引言

胚胎体外生产与移植是辅助生殖技术的基础，人类辅助生殖治疗，转基因及克隆动物的生产均需要这两大关键技术。遗憾的是，胚胎附植是制约辅助生殖技术能否成功的关键因素，这也是目前亟待解决的难点。有报道指出，哺乳动物大约只有 10-15% 的体外受精胚胎移植后能产生健康后代(De Mouzon et al., 1997)。目前普遍认为，大约有三分之一的胚胎附植失败要归因于体外受精胚胎存在着各种缺陷(Simón et al., 1998)。其中，胚胎体外发育过程中产生的活性氧(ROS)是导致胚胎发生缺陷的关键因素。众所周知，ROS 对许多生命活动均产生有害影响，如引起线粒体功能障碍，三磷酸腺苷(ATP)的耗竭，诱导细胞凋亡，阻滞胚胎发育等(Takahashi et al., 2003; Yoneda et al., 2004; Favetta et al., 2007)。过多的 ROS 会损害所有的细胞结构，包括蛋白质，脂质和 DNA(Henkel et al., 2003)，然后启动细胞凋亡并最终导致细胞死亡(Lysiak et al., 2007)。据报道，胚胎体外培养过程活性氧的积累会影响它们的发育潜力，并导致细胞凋亡(Ahn et al., 2002; Somfai et al., 2007)。体外胚胎发育过程若存在过多的活性氧，那么受精卵在二细胞阶段就会发生阻滞(Ishizuka et al., 2000)。因此，ROS 的产生和抗氧化系统之间的动态平衡对于体外培养胚胎的正常发育显得至关重要。

许多天然的抗氧化剂能够维持这种氧化还原平衡，抗氧化剂能够降低氧化应激、减少细胞凋亡以及改善哺乳动物胚胎的体外发育(Takahashi, 2011)。褪黑素(N-乙酰基-5-甲氧基色胺)是一种天然的化合物，存在于细菌，藻类，真菌，植物和动物等几乎所有的生物中(Mercolini et al., 2012; Tan et al., 2012; Zhao et al., 2013)。褪黑素同时具有亲水性和亲脂性，它很容易进入所有的亚细胞器，包括细胞膜，细胞质，细胞核和线粒体。除了参与各种生理活性外，褪黑素也是一种高效的自由基清除剂和抗氧化剂。褪黑素具有比传统的抗氧化剂，如维生素 C 和维生素 E 等具有更强的清除活性氧的能力(Mahal et al., 1999)。另外和维生素 C 及维生素 E 不同的是，褪黑素的代谢产物也参与活性氧的清除作用，这种现象被称为级联放大反应(Tan et al., 2007)。

除了直接清除活性氧，褪黑素也影响超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GPx）和过氧化氢酶（CAT）等抗氧化酶的活性(Okatani et al., 2000; Rodriguez et al., 2004; Fischer et al., 2013)。由于褪黑素具有多重抗氧化能力，因此能有效地降低氧化应激引起的线粒体和染色体 DNA 损伤并抑制细胞凋亡(Liu et al., 2000; Guerin et al., 2001; Fu et al., 2011; Banerjee et al., 2012; Song et al., 2012; Liu et al., 2013)。

据报道，褪黑素在许多动物包括小鼠，大鼠，羊，猪等卵母细胞成熟和胚胎发育中起重要作用(Abecia et al., 2002; Papis et al., 2007; Rodriguez-Osorio et al., 2007; Kang et al., 2009; Shi et al., 2009)。Ishizuka(2000)等研究发现， 10^{-4} ~ 10^{-6} M 褪黑素显著提高小鼠 IVF 的成功率，而 10^{-6} ~ 10^{-8} M 褪黑素能促进小鼠早期胚胎的体外发育。Tian 等人也观察到，当小鼠新鲜 2-细胞胚胎培养在含有 10^{-9} M 褪黑素的培养液中，其囊胚率，孵化囊胚率和囊胚细胞数均显著提高(Tian et al., 2010)。分子机制研究表明，褪黑素对体外胚胎发育的促进作用部分归因于它的抗氧化能力。伴随着细胞内谷胱甘肽水平的升高和活性氧产生的减少，囊胚凋亡百分率及平均凋亡细胞数也减少(Gao et al., 2012)。这在其它物种的研究中也得到了类似结果。例如，在猪卵母细胞体外成熟培养液中添加褪黑素，可以提高卵母细胞体外成熟的速度，显著增加孤雌后囊胚率和囊胚细胞数。同时，褪黑素处理后胚胎活性氧水平显著降低(Kang et al., 2009; Shi et al., 2009)。据报道， 10^{-6} M 褪黑素能促进羊卵母细胞成熟和体外受精后的卵裂率(Casao et al., 2010)。除了研究褪黑素对卵母细胞的影响， 10^{-10} M 褪黑素处理供体细胞能提高克隆胚的重构效率。另外， 10^{-9} M 至 10^{-12} M 褪黑素能显著提高克隆胚胎的发育，同时下调细胞凋亡相关基因（*Bax* 和 *P53*）的表达和减少细胞凋亡(Pang et al., 2013)。然而，目前很少有研究关于褪黑素对小鼠原核胚体外发育及囊胚移植后附植效率的影响。

本实验研究了褪黑素对小鼠原核胚体外发育及囊胚移植后附植效率及后代成活率的影响。为了进一步确定潜在的分子机制，我们还研究了褪黑素处理和小鼠原核胚发育过程中抗氧化和细胞凋亡相关基因表达之间的关系。

1. 材料与方法

1.1 化学试剂

孕马血清促性腺激素（PMSG）和人绒毛膜促性腺激素（hCG）购自中国上海宁波激素有限公司(Ningbo Hormone Products CO., LTD, China)。褪黑素及其他实验试剂均购自Sigma公司(St. Louis, MO, USA)。

M2 操作液及 M16 培养液的配制

M2 操作液及 M16 培养液配方		
组分	M2(g/500ml)	M16(g/500ml)
NaCl	2.767	2.767
KCl	0.178	0.178
KH ₂ PO ₄	0.081	0.081
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.147	0.147
乳酸钠	1.660	1.660
葡萄糖	0.500	0.500
NaHCO ₃	0.168	1.051
丙酮酸钠	0.011	0.011
谷氨酰胺	0.073	0.073

Hapes 液	2.502	--
青霉素 G	0.030	0.030
CaCl2.2H2O	0.125	0.125

将上述成份分别加入 500mL 灭菌 Milli-Q 超纯水中，充分溶解后，调 pH 为 7.4±0.3，定容至 500mL。测定渗透压应为 285±25mOsm/L。溶液配制好后，用 0.22μm 滤膜过滤灭菌，并用 10mL 无菌离心管分装，4℃保存。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物及胚胎采集

5-6周龄的昆明白系雌鼠（中国军事医学科学院实验动物中心），自由采食和饮水，控光（光照14h/d），室内温度为20~22℃。经过一周的适应性饲养后，隔日腹腔注射PMSG和hCG各10IU进行超数排卵，再与性成熟同系公鼠交配，次日早上检查阴道栓，有栓雌鼠在注射hCG后24h颈椎脱臼处死。用M2操作液冲洗输卵管，收集形态正常的原核胚胎于M2液中洗净后备用。操作在室温25℃，37℃恒温台上进行。

1.2.2 胚胎体外培养

为评定褪黑素对小鼠早期体外胚胎发育的影响，设置不含褪黑素的M16对照组（0mol/L）以及含10⁻³、10⁻⁵、10⁻⁷、10⁻⁹和10⁻¹¹ mol/L褪黑素的5个实验组。将各组培养液在60mm的培养皿(NUNCLON公司)中制成50μL的培养滴，立即覆盖石蜡油，培养前在37℃、5%CO₂、饱和湿度的Thermo311型培养箱中平衡2h以上。在实体显微镜下挑选原核较清晰且形态良好的胚胎，将原核胚随机分配到不同的实验组，每组15~20枚，入培前，胚胎用相应浓度的培养液洗3~5遍。然后在37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养，24h后统计卵裂率，96h后统计囊胚发育率、孵化囊胚率，Hoechst 33342染色统计囊胚细胞数。

1.2.3 TUNEL 法检测囊胚细胞凋亡

TUNEL检测步骤：将囊胚在PBS-0.1%PVA中洗3~5遍，然后在4%多聚甲醛中固定1h；固定后在0.1%Triton X-100中渗透1h；在TUNEL反应液中37℃反应1h；10μg/mL PI中染色10min，压片观察。统计凋亡囊胚的个数占总囊胚的比率及平均每个囊胚凋亡的细胞数。

1.2.4 囊胚移植

参考已发表的小鼠胚胎移植方法(Rose et al., 2012)，供体配种当天挑选自然发情的雌性小鼠，与输精管结扎后的公鼠交配，第二天早晨见栓后留备作受体。将受体小鼠用戊巴比妥钠麻醉，然后在两侧子宫角共移植 12 枚囊胚。移植结束后，将受体小鼠饲养于装有高压消毒锯木屑的笼子里。受体小鼠要小心照料，因为妊娠小鼠易遭受应激，有时会导致流产，甚至发生食崽行为。胚胎移植后约 17 天仔鼠出生。统计妊娠率，窝产仔数和仔鼠存活率。

1.2.5 RNA 提取及定量 PCR

样品的收集：分别收集褪黑素处理组及对照组 2-细胞胚胎和囊胚，用 DPBS 溶液洗涤两次，并储存于-80℃冰箱，用于 RNA 提取。

RNA 提取，RNA 反转录及定量 PCR 反应步骤同实验一。
本实验研究基因所用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

Gene	Primer sequence(5'-3')	$T_m(^{\circ}\text{C})$	Size
<i>p53</i>	Forward: TGAGGTTTCGTGTTTGTGCCTGC	60	165
	Reverse: CCATCAAGTGGTTTTTCTTTTGC		
<i>bcl-2</i>	Forward: ACCTGTGGTCCATCTGACCCCTC	60	163
	Reverse: CCAGTTCACCCCATCCCTGA		
<i>bax</i>	Forward: TGCTGACGTGGACACGGACT	60	112
	Reverse: AGCAAAGTAGAAGAGGGCAACCA		
<i>BAD</i>	Forward: CAGCCACCAACAGTCATCATGGA	60	134
	Reverse: CGAACGCGAGCGTCCTCGA		
<i>casepase-3</i>	Forward: CTGGAGAAATTCAAAGGACGGG	60	194
	Reverse: TGAGCATGGACACAATACACGG		
<i>GPx1</i>	Forward: CCAGGAGAATGGCAAGAATGAA	60	138
	Reverse: AGGAAGGTAAAGAGCGGGTGAG		
<i>SOD</i>	Forward: CACTCTCAGGAGAGCATTCCA	60	110
	Reverse: CCCAGCAITTCAGTCTTTG		
<i>GAPDH</i>	Forward: GGCATCTTGGGCTACACTGAG	60	211
	Reverse: GGTGGTCCAGGGTTTCTTACT		

1.2.6 数据处理

采用SPSS 18.0统计软件分别对实验数据进行单因素方差分析（ANOVA）， $P < 0.05$ 认为囊胚率、孵化囊胚率以及囊胚细胞数是有显著性差异的。结果用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示。

2. 结果

2.1 褪黑素处理对小鼠原核胚体外发育的影响

共采集 1387 枚原核胚用于研究褪黑素对小鼠原核胚体外发育的影响。结果表明，添加 10^{-7} M 褪黑素组原核胚的卵裂率为 $92.0 \pm 5.68\%$ ，显著高于对照组（ $89.3 \pm 4.17\%$ ）（ $P < 0.05$ ）。其他浓度褪黑素处理组卵裂率和对照组相比无显著差异（图 1）。 10^{-7} 或 10^{-9} M 褪黑素处理后的囊胚率分别为 $80.3 \pm 4.57\%$ 和 $74.8 \pm 2.63\%$ ，显著高于对照组（ $64.6 \pm 6.04\%$ ）（ $P < 0.05$ ）。相反， 10^{-3} M 褪黑素显著降低了囊胚率（ $P < 0.05$ ）。 10^{-5} ， 10^{-7} 和 10^{-9} M 褪黑素处理组孵化囊胚率分别为 $56.1 \pm 5.66\%$ 、 $60.6 \pm 3.75\%$ 和 $53.3 \pm 3.74\%$ ，显著高于对照组（ $44.0 \pm 5.24\%$ ）（ $P < 0.05$ ）。然而， 10^{-3} M 褪黑素则完全抑制囊胚的孵化（图 1）。 10^{-5} 和 10^{-7} M 褪黑素处理组的囊胚细胞数分别为 98.2 ± 5.14 和 97.4 ± 4.09 ，显著高于对照组 93.0 ± 4.14 （ $P < 0.05$ ）。而 10^{-9} 和 10^{-11} M 褪黑素处理组和对照组相比无显著差异。同样， 10^{-3} M 褪黑素显著降低囊胚细胞数（ $P < 0.05$ ）（图 1）。

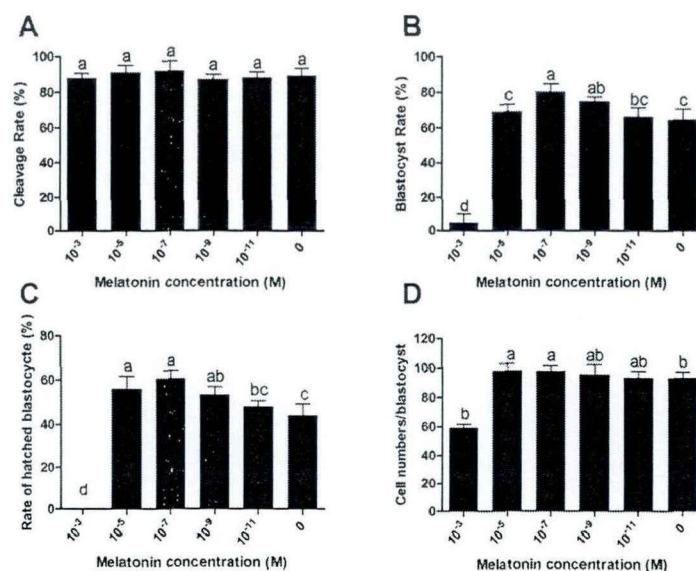


图 1 褪黑素对小鼠原核胚胎体外发育的影响。A: 卵裂率。B: 囊胚率。C: 孵化囊胚率。D: 囊胚细胞数。每组培养原核胚数为 209~244 枚, 同列不同字母 (a-d) 表示有统计学差异 ($P < 0.05$)。

Fig.1 Effect of melatonin on the *in vitro* development of murine pronuclear embryo. A: cleavage rate; B: blastocyst rate; C: rate of hatched blastocysts; D: cell numbers/blastocyst. The number of pronuclear embryos varied from 209 to 244 for different groups. Superscript letters (a-d) represent statistically significant differences ($P < 0.05$).

2.2 褪黑素对小鼠体外发育囊胚细胞凋亡的影响

本实验用 TUNEL 法检测了 194 枚小鼠囊胚的细胞凋亡情况。结果表明, 10^{-7} M 褪黑素处理组囊胚凋亡百分率显著低于对照组 (74.4% vs. 94.3%) 及其他浓度褪黑素处理组 (10^{-5} M 为 94.7%, 10^{-9} M 为 95.0%, 10^{-11} M 为 94.7%) ($P < 0.05$)。 10^{-7} M 褪黑素处理组 (1.6 ± 0.48) 囊胚平均凋亡细胞数也显著低于对照组及其他浓度褪黑素处理组 (对照组为 2.7 ± 0.44 , 10^{-5} M 为 2.2 ± 0.63 , 10^{-9} M 为 2.5 ± 0.5 , 10^{-11} M 为 2.9 ± 0.49) ($P < 0.05$) (图 2)。

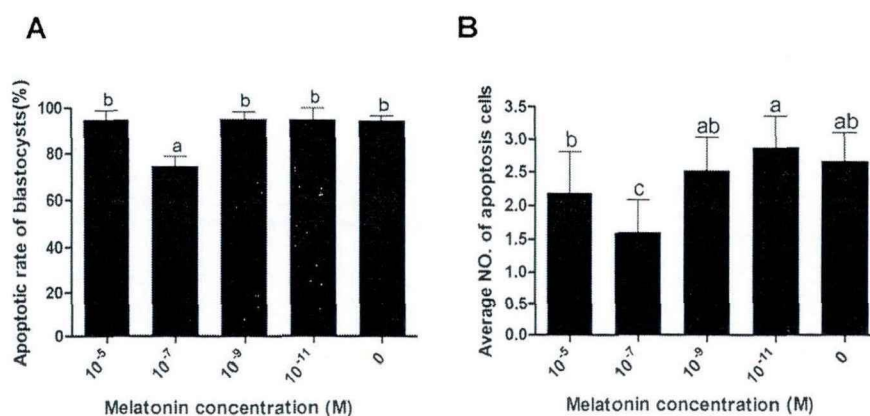


图 2 褪黑素对囊胚细胞凋亡的影响。A: 凋亡囊胚率。B: 囊胚平均凋亡细胞数。分子表示凋亡囊胚数, 分母表示每组囊胚总数。同列不同字母 (a-c) 表示有统计学差异 ($P < 0.05$)。

Fig.2 Effect of melatonin on apoptosis of blastocysts. A: apoptotic rate of blastocysts; B: average apoptotic cells/blastocyst. The numerators represent the numbers of the apoptotic blastocysts, and the denominators represent total blastocysts in each group. The letters of a-c at the tops of the bars represent statistically significant differences ($P < 0.05$).

2.3 褪黑素对体外发育囊胚移植后妊娠率、产仔率的影响

本实验共移植 10^{-7} M褪黑素组囊胚372枚，移植受体31只；移植对照组囊胚324枚，移植受体27只，平均每受体移植囊胚12枚。结果表明，褪黑素处理组囊胚移植后妊娠率为 $95.0 \pm 3.42\%$ ，显著高于对照组（ $67.8 \pm 5.03\%$ ）（ $P < 0.01$ ）。此外，褪黑素处理组囊胚移植后窝产仔数（ 4.1 ± 0.37 只/窝）显著高于对照组（ 2.7 ± 0.42 只/窝）（ $P < 0.05$ ）（图3A，3B）。褪黑素处理组窝产仔数最高为8只，而对照组最大窝产仔数为6只（图4）。

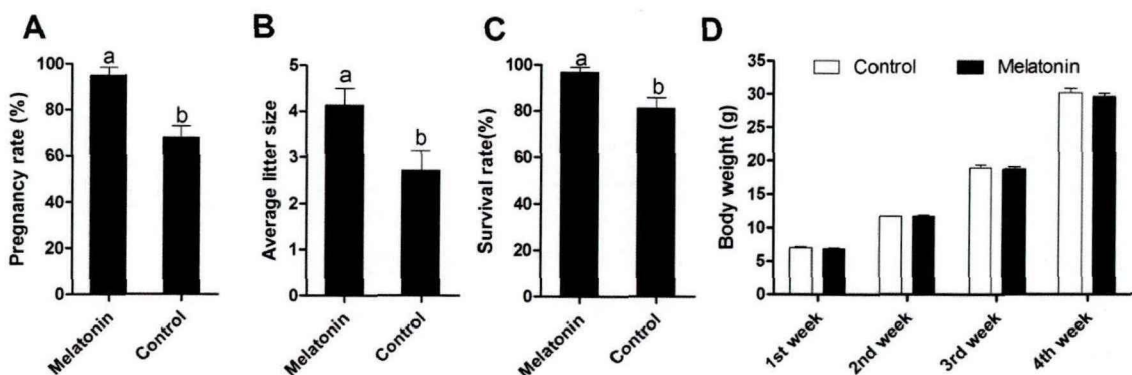


图 3 褪黑素对体外发育囊胚移植后妊娠率、产仔率、仔鼠体重及存活率的影响。A:妊娠率；B: 窝产仔数；褪黑素处理组移植囊胚 372 枚，受体 31 只；对照组移植囊胚 324 枚，受体 27 只，实验重复 6 次；C: 仔鼠成活率。D: 仔鼠体重变化。褪黑素处理组仔鼠 83 只，对照组 45 只，小鼠体重检测从一周龄至四周龄。同列不同字母(a-b)表示有统计学差异($P < 0.05$)。

Fig.3 Effect of melatonin on pregnancy rates, litter sizes, postnatal survival of offspring and body weight of the offspring obtained from blastocyst implantation. A: pregnancy rate; B: litter size. The number of recipients in melatonin-treated samples is 31 and 372 blastocysts were implanted. The number of recipients in controls is 27 and 324 blastocysts were implanted. These studies were conducted at six individual schedules. C: Effect of melatonin on postnatal survival of offspring obtained from blastocyst implantation. D: Effect of melatonin on body weight of the offspring obtained from blastocyst implantation. The numbers of offspring in melatonin-treated samples are 83, and for the controls are 45. Pups were weighed from the first week of age till to their four weeks of age. The letters a, b at the tops of the bars represent statistically significant differences ($P < 0.05$).

2.4 褪黑素对仔鼠体重及存活率的影响

我们检测了仔鼠出生后存活率和不同时期体重的变化，发现褪黑素处理组仔鼠出生后存活率显著高于对照组（ $96.8 \pm 2.15\%$ vs. $81.2 \pm 4.36\%$ ）（ $P < 0.05$ ）（图 3C）。但是，褪黑素组和对照组小鼠的体重无显著差异（ $P > 0.05$ ）（图 3D）。

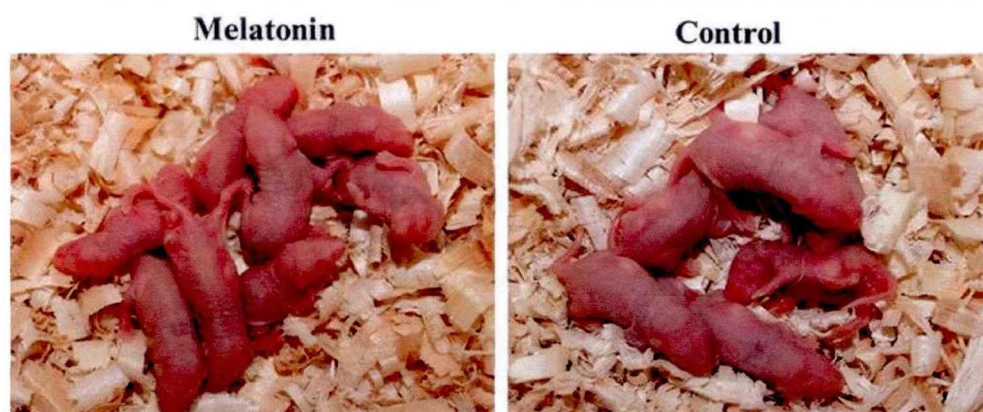


图 4 新生小鼠照片。褪黑素处理组最大窝产仔数为 8 只，对照组最大窝产仔数为 6 只。

Fig.4 Photos of the representative litters. A maximum litter size of melatonin-treated samples is 8 pups and a maximum litter size of controls is 6 pups.

2.5 褪黑素处理对小鼠原核胚发育过程基因表达的影响

定量 PCR 结果表明，在小鼠 2-细胞期， 10^{-7} M 褪黑素处理组超氧化物歧化酶的表达 (mRNA) 显著高于对照组 ($P < 0.05$)，但 *GPX1* 的表达和对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$) (图 5A)。在囊胚阶段， 10^{-7} M 褪黑素处理组促凋亡因子包括 *p53*、*casepase-3* 的表达显著低于对照组 ($P < 0.01$)。相反，褪黑素处理组抗凋亡基因 *Bcl-2* 的表达显著高于对照组 ($P < 0.01$)。 *Bax* 和 *BAD* 基因在褪黑素处理组和对照组之间无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 5B)。

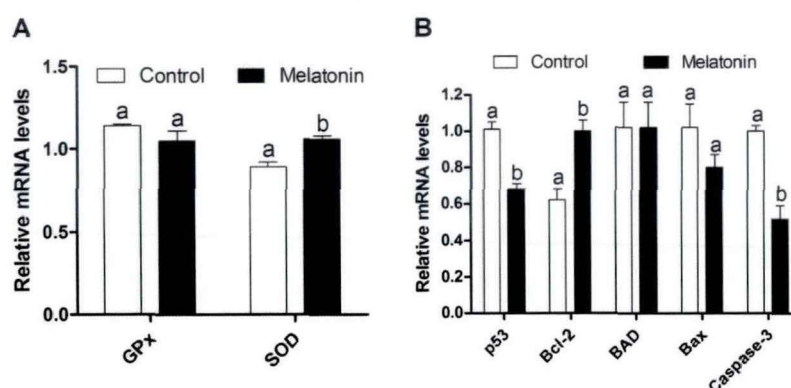


图 5 褪黑素处理对小鼠原核胚发育过程基因表达的影响。A：褪黑素对抗氧化酶表达的影响 (*SOD* 和 *GPx*)。B：褪黑素对凋亡相关基因 (*BAD*, *bax*, *casepase-3* 和 *bcl-2*) 表达变化的影响。同列不同字母 (a-b) 表示有统计学差异 ($P < 0.05$)。

Fig.5 Effects of melatonin on the gene expressions during the development of murine pronuclear embryo.

A: Effects of melatonin on the gene expression of anti-oxidative enzymes (*SOD* and *GPx*) during the development of murine pronuclear embryo. B: Effects of melatonin on the gene expression of pro-apoptotic factors (*BAD*, *bax* and *casepase-3*) and anti-apoptotic factor (*bcl-2*) during development of murine pronuclear embryo.

3. 讨论

褪黑素和哺乳动物生殖活动的关系其实早在几十年前就已有研究, 日前又引起了人们新的关注(Reiter et al., 2009)。最近许多报道表明褪黑素对体外培养的生殖细胞有保护作用并能促进胚胎的体外发育。据报道, 褪黑素不仅能促进新鲜的小鼠 2-细胞胚胎的发育(Papis et al., 2007), 而且能促进玻璃化冷冻 2-细胞胚胎的发育(Gao et al., 2012)。褪黑素能够显著提高胚胎体外发育的卵裂率和囊胚细胞数(Ishizuka et al., 2000; Rodriguez-Ororio et al., 2007; Tian et al., 2010)。本研究证实, 10^{-7} M 褪黑素显著促进小鼠原核胚体外发育的囊胚率和孵化囊胚率。同时, 本研究首次发现 10^{-7} M 褪黑素处理后的囊胚移植后妊娠率、产仔率及后代存活率均显著提高。提高妊娠率是许多科学家所面临的共同挑战, 因为很多因素危害囊胚附植后的发育。目前有许多研究尝试提高胚胎附植后的妊娠率。例如, 通过在胚胎培养液或移植液中添加粘多糖透明质酸(Gardner et al., 1999), 或者用血小板活化因子处理附植前胚胎可以提高妊娠率(Roudebush et al., 2004)。Rose(2012)等观察到, 不同品系小鼠胚胎相互移植后最高妊娠率达到 57.1% 至 83.3%。而在本研究中, 10^{-7} M 褪黑素处理后的囊胚移植后妊娠率达到 95.0%。妊娠率的提高可能是由于褪黑素处理显著提高了囊胚细胞数, 使得囊胚质量更高, 而高质量的囊胚更有利于附植和妊娠。同时, 高质量的胚胎将产生更多健康后代。正如本研究结果所示, 褪黑素处理后胚胎移植所产后代的成活率显著提高。

为了探明褪黑素处理对体外胚胎发育和胚胎附植的具体作用机制, 本文对褪黑素处理和胚胎发育过程中活性氧产生的关联性进行了分析。前人研究表明, 胚胎发育过程活性氧的产生是抑制胚胎发育的主要原因。活性氧或氧化应激会损害胚胎的透明带, 细胞骨架和线粒体(Ahn et al., 2002; Somfai et al., 2007)。ROS 的产生和抗氧化剂之间的平衡, 对牛卵母细胞成熟、受精和早期胚胎发育有很大影响(Cseh et al., 1997)。在培养液中添加抗氧化剂(超氧化物歧化酶, 二甲基硫脲等)能促进体外胚胎发育(Iwata et al., 2003)。Gupta(2010)等报道, 猪卵母细胞玻璃化冷冻后会引起 ROS 水平升高, 而在培养液中添加抗氧化剂 β -巯基乙醇(β -ME)能显著抑制这种上升。此结果与 Hosseini(2009)等报道一致, 其发现 β -ME 对玻璃化冷冻后的牛胚胎有促进作用。Fischer(2013)等发现, 褪黑素作为一种高效的抗氧化剂, 能上调一系列重要的抗氧化酶, 包括 CAT, GPX 和超氧化物歧化酶的表达, 防止 8-羟基-2'-脱氧鸟苷的形成而减少 DNA 损伤。 10^{-9} M 褪黑素处理显著减少 ROS 水平, 提高细胞内 GSH 水平而促进小鼠玻璃化冷冻 2-细胞胚胎的发育(Gao et al., 2012)。在本研究中, 我们也观察到, 10^{-7} M 褪黑素能上调体外胚胎发育过程中 SOD 的表达。

细胞凋亡是危害体外胚胎发育的另一个重要因素(Vandaele et al., 2011)。有几个因子, 包括 P53, BAX, BCL-2, TNF 和 caspase-3 参与了细胞凋亡过程(Alnemri et al., 1996; Marsden et al., 2002; Lalier et al., 2007; Cardaci et al., 2008)。本研究发现, 10^{-7} M 褪黑素处理显著降低了体外培养小鼠胚胎的细胞凋亡, 其具体机制是褪黑素下调了 P53, Bax 和 caspase-3 等促凋亡基因的表达, 同时上调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达。以上研究表明, 褪黑素通过抗氧化和抗凋亡作用提高了体外培养小鼠胚胎的质量, 进而提高了这些胚胎移植后的妊娠率, 窝产仔数及出生后代的存活率。

4. 小结

本文首次报道了褪黑素对小鼠原核胚体外发育及囊胚移植后附植效率及后代成活率的影响。研究发现, 褪黑素显著提高小鼠原核胚体外发育的囊胚率、孵化囊胚率和囊胚细胞数。尤其是,

首次发现褪黑素显著提高体外发育囊胚移植后的妊娠率、产仔率及仔鼠成活率。分子机理研究表明褪黑素通过抗氧化及抗凋亡作用促进了胚胎体外发育效率和囊胚质量，高质量的囊胚移植后能得到更多的健康后代。

第三章 结 论

■ 白藜芦醇通过诱导牛卵母细胞成熟过程中孕激素分泌和降低胞内 ROS 水平、显著提高 GSH 水平等抗氧化作用促进牛卵母细胞成熟及体外受精后胚胎发育；发现 Sirt1 在牛颗粒细胞、卵丘细胞、卵母细胞和囊胚中表达，白藜芦醇这种促进作用可能依赖于 Sirt1 途径。

■ 褪黑素显著影响牛胚胎发育过程中上调牛胚胎发育过程中抗氧化抗凋亡基因（*GPX4*, *SOD1* 和 *BCL-2*）和发育相关重要基因（*SLC2A1*, *DNMT1A* 和 *DSC2*）的表达，同时下调促凋亡基因（*P53*, *Bax* 和 *Caspase-3*）的表达，且褪黑素通过 MT1 受体促进牛胚胎发育。

■ 褪黑素不仅可以促进牛胚胎体外发育的效率，而且还通过上调 DNMT3A、OCC、CDH1 表达，下调 AQP3 的表达，进而玻璃化冷冻过程中的抗冷冻能力，提高囊胚质量。

■ 褪黑素通过上调了超氧化物歧化酶（SOD）和抗凋亡基因 bcl-2 的表达，下调了促凋亡基因 p53 和 caspase-3 的表达，减少 ROS 产生及抑制细胞凋亡，从而提高小鼠囊胚质量，高质量的囊胚移植后能产生更多且更健康的后代。

参考文献

1. Abdel-Wahab, A., G. Zullo, L. Boccia, M. De Blasi, V. Longobardi, G. Albero and B. Gasparrini (2012). "132 Resveratrol during in vitro culture improves cryotolerance of in vitro produced bovine embryos." *Reproduction, Fertility and Development* **25**(1): 213-214.
2. Abecia, J., F. Forcada and O. Zuniga (2002). "The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos in vitro." *Veterinary research communications* **26**(2): 151-158.
3. Abeydeera, L. (2002). "In vitro production of embryos in swine." *Theriogenology* **57**(1): 257-273.
4. Adriaens, I., P. Jacquet, R. Cortvrindt, K. Janssen and J. Smits (2006). "Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis." *Toxicology* **228**(2): 333-343.
5. Aggarwal, B. B. and S. Shishodia (2005). *Resveratrol in health and disease*, CRC Press.
6. Ahmad, A., F. A. Syed, S. Singh and S. Hadi (2005). "Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: mutagenicity in plasmid DNA." *Toxicology letters* **159**(1): 1-12.
7. Ahn, H. J., I. P. Sohn, H. C. Kwon, D. H. Jo, Y. D. Park and C. K. Min (2002). "Characteristics of the cell membrane fluidity, actin fibers, and mitochondrial dysfunctions of frozen-thawed two-cell mouse embryos." *Molecular reproduction and development* **61**(4): 466-476.
8. Alcaín, F. J. and J. M. Villalba (2009). "Sirtuin activators."
9. Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong and J. Yuan (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." *Cell* **87**(2): 171.
10. Ambruosi, B., G. Lacalandra, A. Iorga, T. De Santis, S. Mugnier, R. Matarrese, G. Goudet and M. Dell'Aquila (2009). "Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI." *Theriogenology* **71**(7): 1093-1104.
11. Amireault, P. and F. Dubé (2005). "Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos." *Biology of reproduction* **73**(2): 358-365.
12. Ashby, J., H. Tinwell, W. Pennie, A. Brooks, P. Lefevre, N. Beresford and J. Sumpter (1999). "Partial and weak oestrogenicity of the red wine constituent resveratrol: consideration of its superagonist activity in MCF - 7 cells and its suggested cardiovascular protective effects." *Journal of applied Toxicology* **19**(1): 39-45.
13. Assou, S., D. Haouzi, J. De Vos and S. Hamamah (2010). "Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes." *Molecular human reproduction* **16**(8): 531-538.
14. Aziz, M. H., M. Nihal, V. X. Fu, D. F. Jarrard and N. Ahmad (2006). "Resveratrol-caused apoptosis of human prostate carcinoma LNCaP cells is mediated via modulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway and Bcl-2 family proteins." *Molecular cancer therapeutics* **5**(5): 1335-1341.
15. Büyükcavcı, M., Ö. Özdemir, S. Buck, M. Stout, Y. Ravindranath and S. Savaşan (2006).

- "Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: relation with its pro-oxidant effect." *Fundamental & clinical pharmacology* **20**(1): 73-79.
16. Baek, S.-H., W.-C. Shin, H.-S. Ryu, D.-W. Lee, E. Moon, C.-S. Seo, E. Hwang, H.-S. Lee, M.-H. Ahn and Y. Jeon (2013). "Creation of resveratrol-enriched rice for the treatment of metabolic syndrome and related diseases." *PloS one* **8**(3): e57930.
17. Bai, T., D.-S. Dong and L. Pei (2013). "Resveratrol mitigates isoflurane-induced neuroapoptosis by inhibiting the activation of the Akt-regulated mitochondrial apoptotic signaling pathway." *International journal of molecular medicine* **32**(4): 819-826.
18. Balao da Silva, C. M., B. Macías-García, A. Miró-Morán, L. González-Fernández, A. Morillo-Rodriguez, C. Ortega-Ferrusola, J. M. Gallardo-Bolaños, G. Stilwell, J. A. Tapia and F. J. Peña (2011). "Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic - like changes in stallion spermatozoa." *Journal of pineal research* **51**(2): 172-179.
19. Banerjee, J., D. Maitra, M. P. Diamond and H. M. Abu-Soud (2012). "Melatonin prevents hypochlorous acid-induced alterations in microtubule and chromosomal structure in metaphase-II mouse oocytes." *Journal of pineal research* **53**(2): 122-128.
20. Barger, J. L., T. Kayo, J. M. Vann, E. B. Arias, J. Wang, T. A. Hacker, Y. Wang, D. Raederstorff, J. D. Morrow and C. Leeuwenburgh (2008). "A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice." *PloS one* **3**(6): e2264.
21. Basly, J.-P., F. Marre-Fournier, J.-C. Le Bail, G. Habrioux and A. J. Chulia (2000). "Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)-and (Z)-resveratrol." *Life sciences* **66**(9): 769-777.
22. Baur, J. A. and D. A. Sinclair (2006). "Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence." *Nature reviews Drug discovery* **5**(6): 493-506.
23. Baydas, G., M. F. Gursu, S. Yilmaz, S. Canpolat, A. Yasar, G. Cikim and H. Canatan (2002). "Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats." *Neuroscience letters* **323**(3): 195-198.
24. Benitez, D. A., E. Pozo-Guisado, A. Alvarez-Barrientos, P. M. Fernandez-Salguero and E. A. Castellón (2007). "Mechanisms Involved in Resveratrol-Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Prostate Cancer-Derived Cell Lines." *Journal of andrology* **28**(2): 282-293.
25. Berlinguer, F., G. G. Leoni, S. Succu, A. Spezzigu, M. Madeddu, V. Satta, D. Bebbere, I. Contreras-Solis, A. Gonzalez-Bulnes and S. Naitana (2009). "Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model." *Journal of pineal research* **46**(4): 383-391.
26. Bernard, E., P. Britz-McKibbin and N. Gernigon (2007). "Resveratrol photoisomerization: an integrative guided-inquiry experiment." *Journal of chemical education* **84**(7): 1159.
27. Bhat, K. P., D. Lantvit, K. Christov, R. G. Mehta, R. C. Moon and J. M. Pezzuto (2001). "Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models." *Cancer Research* **61**(20): 7456-7463.

28. Billig, H., I. Furuta and A. Hsueh (1993). "Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis." *Endocrinology* **133**(5): 2204-2212.
29. Boni, R., E. Tosti, S. Roviello and B. Dale (1999). "Intercellular communication in in vivo-and in vitro-produced bovine embryos." *Biology of reproduction* **61**(4): 1050-1055.
30. Bonilla, E., N. Valero, L. Chacín-Bonilla and S. Medina-Leendertz (2004). "Melatonin and viral infections." *Journal of pineal research* **36**(2): 73-79.
31. Bowers, J. L., V. V. Tyulmenkov, S. C. Jernigan and C. M. Klinge (2000). "Resveratrol Acts as a Mixed Agonist/Antagonist for Estrogen Receptors α and β 1." *Endocrinology* **141**(10): 3657-3667.
32. Brunet, A., L. B. Sweeney, J. F. Sturgill, K. F. Chua, P. L. Greer, Y. Lin, H. Tran, S. E. Ross, R. Mostoslavsky and H. Y. Cohen (2004). "Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase." *Science* **303**(5666): 2011-2015.
33. Brydon, L., L. Petit, P. de Coppet, P. Barrett, P. J. Morgan, A. D. Strosberg and R. Jockers (1999). "Polymorphism and signalling of melatonin receptors." *Reproduction Nutrition Development* **39**(3): 315-324.
34. Brzezinski, A., M. M. Seibel, H. J. Lynch, M.-H. Deng and R. J. Wurtman (1987). "Melatonin in Human Preovulatory Follicular Fluid*." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **64**(4): 865-867.
35. Cao, Y., Z.-D. Fu, F. Wang, H.-Y. Liu and R. Han (2005). "Anti-angiogenic activity of resveratrol, a natural compound from medicinal plants." *Journal of Asian natural products research* **7**(3): 205-213.
36. Cardaci, S., G. Filomeni, G. Rotilio and M. R. Ciriolo (2008). "Reactive oxygen species mediate p53 activation and apoptosis induced by sodium nitroprusside in SH-SY5Y cells." *Molecular pharmacology* **74**(5): 1234-1245.
37. Casao, A., J. Abecia, J. Cebrián Pérez, T. Muíño Blanco, M. Vázquez and F. Forcada (2010). "The effects of melatonin on in vitro oocyte competence and embryo development in sheep." *Spanish Journal of Agricultural Research* **8**(1): 35-41.
38. Cassone, V. M. and A. K. Natesan (1997). "Time and time again: the phylogeny of melatonin as a transducer of biological time." *Journal of biological rhythms* **12**(6): 489-497.
39. Ceinos, R., M. Chansard, F. Revel, C. Calgari, J. Miguez and V. Simonneaux (2004). "Analysis of adrenergic regulation of melatonin synthesis in Siberian hamster pineal emphasizes the role of HIOMT." *Neurosignals* **13**(6): 308-317.
40. Chen, H., T. Tuck, X. Ji, X. Zhou, G. Kelly, A. Cuerrier and J. Zhang (2013). "Quality Assessment of Japanese Knotweed (*Fallopia japonica*) Grown on Prince Edward Island as a Source of Resveratrol." *Journal of agricultural and food chemistry* **61**(26): 6383-6392.
41. Choi, J., S. M. Park, E. Lee, J. H. Kim, Y. I. Jeong, J. Y. Lee, S. W. Park, H. S. Kim, M. S. Hossein and Y. W. Jeong (2008). "Anti-apoptotic effect of melatonin on preimplantation development of porcine parthenogenetic embryos." *Molecular reproduction and development* **75**(7): 1127-1135.
42. Chuffa, L. G. A., F. R. Seiva, W. J. Fávaro, G. R. Teixeira, J. P. Amorim, L. O. Mendes, B. A.

- Fioruci, P. F. F. Pinheiro, A. A. H. Fernandes and J. A. Franci (2011). "Melatonin reduces LH, 17 beta-estradiol and induces differential regulation of sex steroid receptors in reproductive tissues during rat ovulation." *Reproductive Biology and Endocrinology* 9(1): 108.
43. Chun, S.-Y., H. Billig, J. Tilly, I. Furuta, A. Tsafiri and A. Hsueh (1994). "Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I." *Endocrinology* 135(5): 1845-1853.
44. Chun, Y. J., M. Y. Kim and F. P. Guengerich (1999). "Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor." *Biochemical and biophysical research communications* 262(1): 20-24.
45. Collodel, G., M. Federico, M. Geminiani, S. Martini, C. Bonechi, C. Rossi, N. Figura and E. Moretti (2011). "Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells." *Reproductive Toxicology* 31(2): 239-246.
46. Comizzoli, P., D. Wildt and B. Pukazhenthi (2009). "In vitro compaction of germinal vesicle chromatin is beneficial to survival of vitrified cat oocytes." *Reproduction in domestic animals* 44(s2): 269-274.
47. Crosier, A. E., P. W. Farin, M. J. Dykstra, J. E. Alexander and C. E. Farin (2001). "Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro." *Biology of reproduction* 64(5): 1375-1385.
48. Cseh, S., J. Corselli, S. Nehlsen-Cannarella, L. Bailey and A. Szalay (1997). "The effect of quick-freezing in ethylene glycol on morphological survival and in vitro development of mouse embryos frozen at different preimplantation stages." *Theriogenology* 48(1): 43-50.
49. Cullen, J. J., C. Weydert, M. M. Hinkhouse, J. Ritchie, F. E. Domann, D. Spitz and L. W. Oberley (2003). "The role of manganese superoxide dismutase in the growth of pancreatic adenocarcinoma." *Cancer research* 63(6): 1297-1303.
50. Dair, E. L., R. S. Simoes, M. J. Simões, L. R. G. Romeu, R. M. Oliveira-Filho, M. A. Haidar, E. C. Baracat and J. M. Soares Jr (2008). "Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats." *Fertility and sterility* 89(5): 1299-1305.
51. Dalvit, G., P. Cetica, L. Pintos and M. Beconi (2005). "Reactive oxygen species in bovine embryo in vitro production." *Biocell* 29(2): 209-212.
52. Das, D. K., S. Mukherjee and D. Ray (2011). "Erratum to: Resveratrol and red wine, healthy heart and longevity." *Heart failure reviews* 16(4): 425-435.
53. de Leon, P., V. Campos, C. Corcini, E. Santos, G. Rambo, T. Lucia Jr, J. Deschamps and T. Collares (2012). "Cryopreservation of immature equine oocytes, comparing a solid surface vitrification process with open pulled straws and the use of a synthetic ice blocker." *Theriogenology* 77(1): 21-27.
54. De Matos, D. and C. Furnus (2000). "The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine." *Theriogenology* 53(3): 761-771.
55. De Mouzon, J., V. Goossens, S. Bhattacharya, J. Castilla, A. Ferraretti, V. Korsak, M. Kupka, K.

- Nygren and A. N. Andersen (2012). "Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE." *Human Reproduction* **27**(4): 954-966.
56. De Mouzon, J., B. Rossin-Amar, A. Bachelot, C. Renon and A. Devecchi (1997). "FIVNAT. Influence of attempt rank in in vitro fertilization." *Contraception, fertilité, sexualité* (1992) **26**(7-8): 466-472.
57. Denu, J. M. (2012). "Fortifying the link between SIRT1, resveratrol, and mitochondrial function." *Cell metabolism* **15**(5): 566-567.
58. Dercks, W. and L. Creasy (1989). "The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction." *Physiological and molecular plant pathology* **34**(3): 189-202.
59. Doherty, A. S., M. R. Mann, K. D. Tremblay, M. S. Bartolomei and R. M. Schultz (2000). "Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo." *Biology of reproduction* **62**(6): 1526-1535.
60. Drummond, A. E. (2006). "The role of steroids in follicular growth." *Reprod Biol Endocrinol* **4**(16): 450.
61. Dubocovich, M. L. (1995). "Melatonin receptors: are there multiple subtypes?" *Trends in pharmacological sciences* **16**(2): 50-56.
62. Dubocovich, M. L. (2007). "Melatonin receptors: role on sleep and circadian rhythm regulation." *Sleep medicine* **8**: 34-42.
63. Dubocovich, M. L., P. Delagrange, D. N. Krause, D. Sugden, D. P. Cardinali and J. Olcese (2010). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors." *Pharmacological reviews* **62**(3): 343-380.
64. Duby, R., J. Hill, D. O'Callaghan, E. Overstrom and M. Boland (1997). "Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts." *Theriogenology* **47**(1).
65. El-Raey, M., M. Geshi, T. Somfai, M. Kaneda, M. Hirako, A. E. Abdel-Ghaffar, G. A. Sosa, M. E. El-Roos and T. Nagai (2011). "Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle." *Molecular reproduction and development* **78**(4): 250-262.
66. Enright, B., P. Lonergan, A. Dinnyes, T. Fair, F. Ward, X. Yang and M. Boland (2000). "Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality." *Theriogenology* **54**(5): 659-673.
67. Favetta, L. A., E. J. St John, W. A. King and D. H. Betts (2007). "High levels of p66 shc and intracellular ROS in permanently arrested early embryos." *Free Radical Biology and Medicine* **42**(8): 1201-1210.
68. Ferrell, J. E. (1999). "Xenopus oocyte maturation: new lessons from a good egg." *Bioessays* **21**(10): 833-842.
69. Fischer, T. W., K. Kleszczyński, L. H. Hardkop, N. Kruse and D. Zillikens (2013). "Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced

- depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin." *Journal of pineal research* **54**(3): 303-312.
70. Frungieri, M. B., A. Mayerhofer, K. Zitta, O. P. Pignataro, R. S. Calandra and S. I. Gonzalez-Calvar (2005). "Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system." *Endocrinology* **146**(3): 1541-1552.
71. Fu, Y., M. Tang, Y. Fan, H. Zou, X. Sun and X. Xu (2011). "Anti-apoptotic effects of melatonin in retinal pigment epithelial cells." *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* **17**: 1461-1468.
72. Fujimoto, V. Y., M. S. Bloom, H. G. Huddleston, W. B. Shelley, A. J. Ocque and R. W. Browne (2011). "Correlations of follicular fluid oxidative stress biomarkers and enzyme activities with embryo morphology parameters during in vitro fertilization." *Fertility and sterility* **96**(6): 1357-1361.
73. Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura and S. Tsukita (1993). "Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions." *The Journal of cell biology* **123**(6): 1777-1788.
74. Galano, A., D. X. Tan and R. J. Reiter (2011). "Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination." *Journal of pineal research* **51**(1): 1-16.
75. Galano, A., D. X. Tan and R. J. Reiter (2013). "On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK." *Journal of pineal research* **54**(3): 245-257.
76. Galli, C., G. Crotti, C. Notari, P. Turini, R. Duchi and G. Lazzari (2001). "Embryo production by ovum pick up from live donors." *Theriogenology* **55**(6): 1341-1357.
77. Galli, C., R. Duchi, G. Crotti, P. Turini, N. Ponderato, S. Colleoni, I. Lagutina and G. Lazzari (2003). "Bovine embryo technologies." *Theriogenology* **59**(2): 599-616.
78. Gao, C., H. B. Han, X. Z. Tian, D. X. Tan, L. Wang, G. B. Zhou, S. E. Zhu and G. S. Liu (2012). "Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos." *Journal of pineal research* **52**(3): 305-311.
79. Garcez, M. E., C. dos Santos Branco, L. V. Lara, F. F. Pasqualotto and M. Salvador (2010). "Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen." *Fertility and sterility* **94**(6): 2118-2121.
80. Gardner, D. K., H. Rodriegez-Martinez and M. Lane (1999). "Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer." *Human reproduction* **14**(10): 2575-2580.
81. Gebauer, F., W. Xu, G. M. Cooper and J. D. Richter (1994). "Translational control by cytoplasmic polyadenylation of c-mos mRNA is necessary for oocyte maturation in the mouse." *The EMBO journal* **13**(23): 5712.
82. Gehm, B. D., J. M. McAndrews, P.-Y. Chien and J. L. Jameson (1997). "Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**(25): 14138-14143.

83. Godson, C. and S. M. Reppert (1997). "The Mella Melatonin Receptor Is Coupled to Parallel Signal Transduction Pathways 1." *Endocrinology* **138**(1): 397-404.
84. Goud, A. P., P. T. Goud, M. P. Diamond, B. Gonik and H. M. Abu-Soud (2008). "Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid." *Free Radical Biology and Medicine* **44**(7): 1295-1304.
85. Graham, J. D. and C. L. Clarke (1997). "Physiological Action of Progesterone in Target Tissues 1." *Endocrine reviews* **18**(4): 502-519.
86. Guerin, P., S. El Mouatassim and Y. Menezo (2001). "Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings." *Human Reproduction Update* **7**(2): 175-189.
87. Guha, M., P. Maity, V. Choubey, K. Mitra, R. J. Reiter and U. Bandyopadhyay (2007). "Melatonin inhibits free radical - mediated mitochondrial-dependent hepatocyte apoptosis and liver damage induced during malarial infection." *Journal of pineal research* **43**(4): 372-381.
88. Gupta, M. K., S. J. Uhm and H. T. Lee (2010). "Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization." *Fertility and sterility* **93**(8): 2602-2607.
89. Gutierrez-Adan, A., P. Lonergan, D. Rizos, F. Ward, M. Boland, B. Pintado and J. De La Fuente (2001). "Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos." *Theriogenology* **55**(5): 1117-1126.
90. Hao, Y., L. Lai, J. Mao, G.-S. Im, A. Bonk and R. S. Prather (2003). "Apoptosis and in vitro development of preimplantation porcine embryos derived in vitro or by nuclear transfer." *Biology of reproduction* **69**(2): 501-507.
91. Hardeland, R. (2013). "Melatonin and the theories of aging: a critical appraisal of melatonin's role in antiaging mechanisms." *Journal of pineal research* **55**(4): 325-356.
92. Hasler, J., W. Henderson, P. Hurtgen, Z. Jin, A. McCauley, S. Mower, B. Neely, L. Shuey, J. Stokes and S. Trimmer (1995). "Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results." *Theriogenology* **43**(1): 141-152.
93. Hasler, J. F. (2000). "In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition." *Human Reproduction* **15**(suppl 5): 47-58.
94. Hastie, N. (1997). "Genomic imprinting Disomy and disease resolved?" *Nature* **389**(6653): 785-787.
95. Hattori, R., H. Otani, N. Maulik and D. K. Das (2002). "Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **282**(6): H1988-H1995.
96. Hayes, J. D., J. U. Flanagan and I. R. Jowsey (2005). "Glutathione transferases." *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**: 51-88.
97. Henkel, R., G. Maass, M. Hajimohammad, R. Menkveld, T. Stalf, J. Villegas, R. Sanchez, T. Kruger and W. B. Schill (2003). "Urogenital inflammation: changes of leucocytes and ROS."

- Andrologia **35**(5): 309-313.
98. Hernandez-Ledezma, J. J., N. Mathialagan, C. Villanueva, J. D. Sikes and R. M. Roberts (1993). "Expression of bovine trophoblast interferons by in vitro-derived blastocysts is correlated with their morphological quality and stage of development." *Molecular reproduction and development* **36**(1): 1-6.
99. Hirshfield, A. N. (1990). "Development of follicles in the mammalian ovary." *International review of cytology* **124**: 43-101.
100. Hosseini, S., M. Forouzanfar, M. Hajian, V. Asgari, P. Abedi, L. Hosseini, S. Ostadhosseini, F. Moulavi, M. S. Langrroodi and H. Sadeghi (2009). "Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important?" *Journal of assisted reproduction and genetics* **26**(6): 355-364.
101. Howitz, K. T., K. J. Bitterman, H. Y. Cohen, D. W. Lamming, S. Lavu, J. G. Wood, R. E. Zipkin, P. Chung, A. Kisielewski and L.-L. Zhang (2003). "Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan." *Nature* **425**(6954): 191-196.
102. Hu, J., D. Cheng, X. Gao, J. Bao, X. Ma and H. Wang (2012). "Vitamin C Enhances the In vitro Development of Porcine Pre-implantation Embryos by Reducing Oxidative Stress." *Reproduction in Domestic Animals* **47**(6): 873-879.
103. Hu, W., Z. Feng, A. K. Teresky and A. J. Levine (2007). "p53 regulates maternal reproduction through LIF." *Nature* **450**(7170): 721-724.
104. Huang, F. J., T. Y. Chin and W. H. Chan (2011). "Resveratrol protects against methylglyoxal-induced apoptosis and disruption of embryonic development in mouse blastocysts." *Environmental toxicology*.
105. Hurst, W. J., J. A. Glinski, K. B. Miller, J. Apgar, M. H. Davey and D. A. Stuart (2008). "Survey of the trans-resveratrol and trans-piceid content of cocoa-containing and chocolate products." *Journal of agricultural and food chemistry* **56**(18): 8374-8378.
106. Hussain, S. A., H. M. Khadim, B. H. Khalaf, S. H. Ismail, K. I. Hussein and A. S. Sahib (2006). "Effects of melatonin and zinc on glycemic control in type 2 diabetic patients poorly controlled with metformin." *Saudi medical journal* **27**(10): 1483-1488.
107. Ishizuka, B., Y. Kuribayashi, K. Murai, A. Amemiya and M. T. Itoh (2000). "The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice." *Journal of pineal research* **28**(1): 48-51.
108. Itoh, M. T., B. Ishizuka, Y. Kuribayashi, A. Amemiya and Y. Sumi (1999). "Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary." *Molecular human reproduction* **5**(5): 402-408.
109. Iwata, H., M. Ohota, S. Hashimoto and Y. Nagai (2003). "Free oxygen radicals are generated at the time of aspiration of oocytes from ovaries that have been stored for a long time." *Zygote* **11**(01): 1-5.
110. J Reiter, R., D.-X. Tan, S. Rosales-Corral and L. C Manchester (2013). "The universal nature,

- unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives." *Mini reviews in medicinal chemistry* **13**(3): 373-384.
111. Jablonski, E. M., M. Adrian Mattocks, E. Sokolov, L. G. Koniaris, F. M. Hughes Jr, N. Fausto, R. H. Pierce and I. H. McKillop (2007). "Decreased aquaporin expression leads to increased resistance to apoptosis in hepatocellular carcinoma." *Cancer letters* **250**(1): 36-46.
112. Jackson-Grusby, L., C. Beard, R. Possemato, M. Tudor, D. Fambrough, G. Csankovszki, J. Dausman, P. Lee, C. Wilson and E. Lander (2001). "Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation." *Nature genetics* **27**(1): 31-39.
113. Jang, M., L. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. Beecher, H. H. Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn and R. G. Mehta (1997). "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes." *Science* **275**(5297): 218-220.
114. Jiang, Z.-G., C. S. Nelson and C. N. Allen (1995). "Melatonin activates an outward current and inhibits LH in rat suprachiasmatic nucleus neurons." *Brain research* **687**(1): 125-132.
115. Juan, M. E., E. González-Pons, T. Munuera, J. Ballester, J. E. Rodríguez-Gil and J. M. Planas (2005). "trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats." *The Journal of nutrition* **135**(4): 757-760.
116. Jung, B. and N. Ahmad (2006). "Melatonin in cancer management: progress and promise." *Cancer Research* **66**(20): 9789-9793.
117. Kaeberlein, M., T. McDonagh, B. Heltweg, J. Hixon, E. A. Westman, S. D. Caldwell, A. Napper, R. Curtis, P. S. DiStefano and S. Fields (2005). "Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol." *Journal of Biological Chemistry* **280**(17): 17038-17045.
118. Kaidi, S., I. Donnay, A. Van Langendonckt, F. Dessy and A. Massip (1998). "Comparison of two co-culture systems to assess the survival of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification." *Animal reproduction science* **52**(1): 39-50.
119. Kaneda, M., M. Okano, K. Hata, T. Sado, N. Tsujimoto, E. Li and H. Sasaki (2004). "Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting." *Nature* **429**(6994): 900-903.
120. Kang, J. T., O. J. Koo, D. K. Kwon, H. J. Park, G. Jang, S. K. Kang and B. C. Lee (2009). "Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells." *Journal of pineal research* **46**(1): 22-28.
121. Khalil, W. A., W. F. Marei and M. Khalid (2013). "Protective effects of antioxidants on linoleic acid-treated bovine oocytes during maturation and subsequent embryo development." *Theriogenology* **80**(2): 161-168.
122. Khan, M. A., H.-c. Chen, X.-x. Wan, M. Tania, A.-h. Xu, F.-z. Chen and D.-z. Zhang (2013). "Regulatory effects of resveratrol on antioxidant enzymes: a mechanism of growth inhibition and apoptosis induction in cancer cells." *Molecules and cells* **35**(3): 219-225.
123. Khurana, N. K. and H. Niemann (2000). "Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo." *Biology of reproduction* **62**(4): 847-856.

124. Kilic, Ü. K. (2004). "Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage." *Pol. J. Pharmacol* **56**: 159-170.
125. Kim, C. H. and Y.-M. Yoo (2010). "Melatonin induces apoptotic cell death via p53 in LNCaP cells." *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology* **14**(6): 365-369.
126. Kim, J., M. C. Gye and M. K. Kim (2004). "Role of occludin, a tight junction protein, in blastocoel formation, and in the paracellular permeability and differentiation of trophectoderm in preimplantation mouse embryos." *Molecules and cells* **17**(2): 248-254.
127. Kim, M. K., E. A. Park, H. J. Kim, W. Y. Choi, J. H. Cho, W. S. Lee, K. Y. Cha, Y. S. Kim, D. R. Lee and T. K. Yoon (2013). "Does supplementation of in-vitro culture medium with melatonin improve IVF outcome in PCOS?" *Reproductive biomedicine online* **26**(1): 22-29.
128. Kim, Y., B. T. Choi, Y. T. Lee, D. I. Park, S.-H. Rhee, K.-Y. Park and Y. H. Choi (2004). "Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells." *Oncology reports* **11**(2): 441-446.
129. Knijn, H., C. Wrenzycki, P. Hendriksen, P. Vos, D. Herrmann, G. Van der Weijden, H. Niemann and S. Dieleman (2002). "Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo." *Reproduction* **124**(3): 365-375.
130. Knijn, H. M., C. Wrenzycki, P. J. Hendriksen, P. L. Vos, E. C. Zeinstra, G. C. van der Weijden, H. Niemann and S. J. Dieleman (2006). "In vitro and in vivo culture effects on mRNA expression of genes involved in metabolism and apoptosis in bovine embryos." *Reproduction, Fertility and Development* **17**(8): 775-784.
131. Kobayashi, M., E.-S. Lee and Y. Fukui (2006). "Cysteamine or β -mercaptoethanol added to a defined maturation medium improves blastocyst formation of porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection." *Theriogenology* **65**(6): 1191-1199.
132. Kode, A., S. Rajendrasozhan, S. Caito, S.-R. Yang, I. L. Megson and I. Rahman (2008). "Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **294**(3): L478-L488.
133. Kong, X., Y. Fu, J. Xu, X. Zhuang, Z. Chen and L. Luo (2011). "Resveratrol, an effective regulator of ovarian development and oocyte apoptosis." *Journal of endocrinological investigation* **34**(11): e374-381.
134. Kops, G. J., T. B. Dansen, P. E. Polderman, I. Saarloos, K. W. Wirtz, P. J. Coffey, T.-T. Huang, J. L. Bos, R. H. Medema and B. M. Burgering (2002). "Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress." *Nature* **419**(6904): 316-321.
135. Korkmaz, A., S. Rosales-Corral and R. J. Reiter (2012). "Gene regulation by melatonin linked to epigenetic phenomena." *Gene* **503**(1): 1-11.
136. Kuzmany, A., V. Havlicek, C. Wrenzycki, S. Wilkening, G. Brem and U. Besenfelder (2011). "Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured under different conditions." *Theriogenology* **75**(3): 482-494.

137. Kwak, S.-S., S.-A. Cheong, Y. Jeon, E. Lee, K.-C. Choi, E.-B. Jeung and S.-H. Hyun (2012). "The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization." *Theriogenology* **78**(1): 86-101.
138. Lagouge, M., C. Argmann, Z. Gerhart-Hines, H. Meziane, C. Lerin, F. Daussin, N. Messadeq, J. Milne, P. Lambert and P. Elliott (2006). "Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α ." *Cell* **127**(6): 1109-1122.
139. Lalier, L., P.-F. Cartron, P. Juin, S. Nedelkina, S. Manon, B. Bechinger and F. M. Vallette (2007). "Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis." *Apoptosis* **12**(5): 887-896.
140. Leibfried-Rutledge, M., E. Critser, W. Eyestone, D. Northey and N. First (1987). "Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo." *Biology of reproduction* **36**(2): 376-383.
141. Leibo, S. and N. Loskutoff (1993). "Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos." *Theriogenology* **39**(1): 81-94.
142. Leiro, J., E. Alvarez, D. Garcia and F. Orallo (2002). "Resveratrol modulates rat macrophage functions." *International immunopharmacology* **2**(6): 767-774.
143. Leiro, J., J. Arranz, N. Fraiz, M. Sanmartin, E. Quezada and F. Orallo (2005). "Effect of cis-resveratrol on genes involved in nuclear factor kappa B signaling." *International immunopharmacology* **5**(2): 393-406.
144. Leon, J., D. Acuña - Castroviejo, G. Escames, D. X. Tan and R. J. Reiter (2005). "Melatonin mitigates mitochondrial malfunction." *Journal of pineal research* **38**(1): 1-9.
145. Leonard, S. S., C. Xia, B.-H. Jiang, B. Stinefelt, H. Klandorf, G. K. Harris and X. Shi (2003). "Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses." *Biochemical and biophysical research communications* **309**(4): 1017-1026.
146. Levine, A. J., R. Tomasini, F. D. McKeon, T. W. Mak and G. Melino (2011). "The p53 family: guardians of maternal reproduction." *Nature reviews Molecular cell biology* **12**(4): 259-265.
147. Li, E., C. Beard and R. Jaenisch (1993). "Role for DNA methylation in genomic imprinting." *Nature* **366**(6453): 362-365.
148. Li, Y., Z. Cao and H. Zhu (2006). "Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress." *Pharmacological research* **53**(1): 6-15.
149. Liu, L., J. R. Trimarchi and D. L. Keefe (2000). "Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes." *Biology of reproduction* **62**(6): 1745-1753.
150. Liu, M., Y. Yin, X. Ye, M. Zeng, Q. Zhao, D. L. Keefe and L. Liu (2013). "Resveratrol protects against age-associated infertility in mice." *Human Reproduction* **28**(3): 707-717.
151. Liu, X., Y. Gong, K. Xiong, Y. Ye, Y. Xiong, Z. Zhuang, Y. Luo, Q. Jiang and F. He (2013). "Melatonin mediates protective effects on inflammatory response induced by interleukin-1 beta in human mesenchymal stem cells." *Journal of pineal research* **55**(1): 14-25.
152. Lobo, R. A. (1995). "Benefits and risks of estrogen replacement therapy." *American journal of obstetrics and gynecology* **173**(3): 982-989.

153. Lonergan, P., T. Fair, D. Corcoran and A. Evans (2006). "Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos." *Theriogenology* **65**(1): 137-152.
154. Lonergan, P., H. Khatir, F. Piumi, D. Rieger, P. Humblot and M. Boland (1999). "Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos." *Journal of reproduction and fertility* **117**(1): 159-167.
155. Lopes, A. S., C. Wrenzycki, N. Ramsing, D. Herrmann, H. Niemann, P. Løvendahl, T. Greve and H. Callesen (2007). "Respiration rates correlate with mRNA expression of G6PD and GLUT1 genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts." *Theriogenology* **68**(2): 223-236.
156. Lorenz, P., S. Roychowdhury, M. Engelmann, G. Wolf and T. F. Horn (2003). "Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells." *Nitric Oxide* **9**(2): 64-76.
157. Losa, G. (2003). "Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells." *European journal of clinical investigation* **33**(9): 818-823.
158. Lowes, D., N. Webster, H. Galley, B. McCormick, C. Torsney, L. Colvin, K. Mertens, J. Beattie, S. Scott and J. Willets (2013). "Proceedings of the Anaesthetic Research Society Meeting Merton College, Oxford, UK, April 11-12, 2013." *British Journal of Anaesthesia* **111**(2): 309P-320P.
159. Luther, J. S., D. A. Redmer, L. P. Reynolds, J. T. Choi, D. Pant, C. Navanukraw, D. R. Arnold, A. N. Scheaffer, P. Borowicz and J. D. Kirsch (2005). "Ovarian follicular development and oocyte quality in anestrus ewes treated with melatonin, a controlled internal drug release (CIDR) device and follicle stimulating hormone." *Theriogenology* **63**(8): 2136-2146.
160. Luvoni, G. C., L. Keskindepe and B. G. Brackett (1996). "Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media." *Molecular reproduction and development* **43**(4): 437-443.
161. Lydon, J. P., F. J. DeMayo, C. R. Funk, S. K. Mani, A. R. Hughes, C. Montgomery, G. Shyamala, O. M. Conneely and B. W. O'Malley (1995). "Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities." *Genes & development* **9**(18): 2266-2278.
162. Lysiak, J. J., S. Zheng, R. Woodson and T. T. Turner (2007). "Caspase-9-dependent pathway to murine germ cell apoptosis: mediation by oxidative stress, BAX, and caspase 2." *Cell and tissue research* **328**(2): 411-419.
163. Macmillan-Crow, L. A. and D. L. Cruthirds (2001). "Manganese superoxide dismutase in disease." *Free radical research* **34**(4): 325-336.
164. Mahal, H. and T. Mukherjee (2006). "Scavenging of reactive oxygen radicals by resveratrol: antioxidant effect." *Research on chemical intermediates* **32**(1): 59-71.
165. Mahal, H., H. Sharma and T. Mukherjee (1999). "Antioxidant properties of melatonin: a pulse radiolysis study." *Free Radical Biology and Medicine* **26**(5): 557-565.
166. Manjunatha, B., M. Devaraj, P. Gupta, J. Ravindra and S. Nandi (2009). "Effect of taurine and

- melatonin in the culture medium on buffalo in vitro embryo development." *Reproduction in domestic animals* **44**(1): 12-16.
167. Marsden, V. S., L. O'Connor, L. A. O'Reilly, J. Silke, D. Metcalf, P. G. Ekert, D. C. Huang, F. Cecconi, K. Kuida and K. J. Tomaselli (2002). "Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome." *Nature* **419**(6907): 634-637.
168. Masana, M. I., S. Doolen, C. Ersahin, W. M. Al-Ghoul, S. P. Duckles, M. L. Dubocovich and D. N. Krause (2002). "MT2 melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **302**(3): 1295-1302.
169. Mayo, J., R. Sainz, I. Antolin, F. Herrera, V. Martin and C. Rodriguez (2002). "Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **59**(10): 1706-1713.
170. McArthur, A. J. and S. S. Budden (1998). "Sleep dysfunction in Rett syndrome: a trial of exogenous melatonin treatment." *Developmental Medicine & Child Neurology* **40**(3): 186-192.
171. Mehaisen, G. M. K. and A. M. Saeed (2013). "In vitro development rate of preimplantation rabbit embryos cultured with different levels of melatonin." *Zygote*: 1-5.
172. Menendez, D., A. Inga and M. A. Resnick (2010). "Estrogen receptor acting in cis enhances WT and mutant p53 transactivation at canonical and noncanonical p53 target sequences." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(4): 1500-1505.
173. Mercolini, L., R. Mandrioli and M. A. Raggi (2012). "Content of melatonin and other antioxidants in grape-related foodstuffs: measurement using a MEPS-HPLC-F method." *Journal of pineal research* **53**(1): 21-28.
174. Meydani, M. and W. J. Evans (1993). "Free radicals, exercise, and aging." *Free radicals in aging*: 183-204.
175. Michan, S. and D. Sinclair (2007). "Sirtuins in mammals: insights into their biological function." *Biochem. J* **404**: 1-13.
176. Millier, S. G., P. F. Whitelaw and C. D. Smyth (1994). "Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited." *Molecular and cellular endocrinology* **100**(1): 51-54.
177. Milne, J. C., P. D. Lambert, S. Schenk, D. P. Carney, J. J. Smith, D. J. Gagne, L. Jin, O. Boss, R. B. Perni and C. B. Vu (2007). "Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes." *Nature* **450**(7170): 712-716.
178. Minami, N., K. Sasaki, A. Aizawa, M. Miyamoto and H. Imai (2001). "Analysis of gene expression in mouse 2-cell embryos using fluorescein differential display: comparison of culture environments." *Biology of reproduction* **64**(1): 30-35.
179. Mizutani, K., K. Ikeda, Y. Kawai and Y. Yamori (2000). "Resveratrol attenuates ovariectomy-induced hypertension and bone loss in stroke-prone spontaneously hypertensive rats." *Journal of nutritional science and vitaminology* **46**(2): 78-83.
180. Mizutani, K., K. Ikeda and Y. Yamori (2000). "Resveratrol inhibits AGEs-induced proliferation and

- collagen synthesis activity in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats." *Biochemical and biophysical research communications* **274**(1): 61-67.
181. Molpeceres, V., J. L. Mauriz, M. V. García-Mediavilla, P. González, J. P. Barrio and J. González-Gallego (2007). "Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis." *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **62**(7): 687-695.
182. Morgan, P. J., P. Barrett, H. E. Howell and R. Helliwell (1994). "Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance." *Neurochemistry international* **24**(2): 101-146.
183. Morita, Y., O. Wada-Hiraike, T. Yano, A. Shirane, M. Hirano, H. Hiraike, S. Koyama, H. Oishi, O. Yoshino and Y. Miyamoto (2012). "Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary." *Reprod Biol Endocrinol* **10**(1): 14-30.
184. Murray, A., R. Gosden, V. Allison and N. Spears (1998). "Effect of androgens on the development of mouse follicles growing in vitro." *Journal of reproduction and fertility* **113**(1): 27-33.
185. Nánássy, L., K. Lee, A. Jávör and Z. Macháty (2008). "Effects of activation methods and culture conditions on development of parthenogenetic porcine embryos." *Animal reproduction science* **104**(2): 264-274.
186. Nakamura, Y., H. Tamura, H. Takayama and H. Kato (2003). "Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production." *Fertility and sterility* **80**(4): 1012-1016.
187. Nakano, M., Y. Kato and Y. Tsunoda (2012). "Effect of melatonin treatment on the developmental potential of parthenogenetic and somatic cell nuclear-transferred porcine oocytes in vitro." *Zygote-The Biology of Gametes and Early Embryos* **20**(2): 199.
188. Niemann, H. and C. Wrenzycki (2000). "Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development." *Theriogenology* **53**(1): 21-34.
189. Niles, L., J. Wang, L. Shen, D. Lobb and E. Younglai (1999). "Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells." *Molecular and cellular endocrinology* **156**(1): 107-110.
190. Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber and E. Li (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." *Cell* **99**(3): 247-257.
191. Okatani, Y., A. Wakatsuki and C. Kaneda (2000). "Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain." *Journal of pineal research* **28**(2): 89-96.
192. Olas, B., B. Wachowicz, E. Bald and R. Głowacki (2004). "THE PROTECTIVE EFFECTS OF RESVERATROL AGAINST CHANGES." *Journal of physiology and pharmacology* **55**(2): 467-476.
193. Olesen, J., S. Ringholm, M. M. Nielsen, C. T. Brandt, J. T. Pedersen, J. F. Halling, L. J. Goodyear and H. Pilegaard (2013). "Role of PGC-1 α in exercise training-and resveratrol-induced prevention

- of age-associated inflammation." *Experimental gerontology* **48**(11): 1274-1284.
194. Olson, E. R., J. E. Naugle, X. Zhang, J. A. Bomser and J. Gary (2006). "Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**(1): H323-H330.
195. Ortiz, A., J. Espino, I. Bejarano, G. Lozano, F. Monllor, J. García, J. Pariente and A. Rodríguez (2011). "High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility." *Journal of pineal research* **50**(2): 132-139.
196. Ozturk, G., S. Coşkun, D. Erbaş and E. Hasanoglu (2000). "The effect of melatonin on liver superoxide dismutase activity, serum nitrate and thyroid hormone levels." *The Japanese journal of physiology* **50**(1): 149-153.
197. Pablos, M. I., M. T. Agapito, R. Gutierrez, J. M. Recio, R. J. Reiter, L. Barlow-Walden, D. Acuña-Castroviejo and A. Menendez-Pelaez (1995). "Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks." *Journal of pineal research* **19**(3): 111-115.
198. Pacholec, M., J. E. Bleasdale, B. Chrunk, D. Cunningham, D. Flynn, R. S. Garofalo, D. Griffith, M. Griffor, P. Loulakis and B. Pabst (2010). "SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1." *Journal of Biological Chemistry* **285**(11): 8340-8351.
199. Palsamy, P. and S. Subramanian (2008). "Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats." *Biomedicine & Pharmacotherapy* **62**(9): 598-605.
200. Pandey, A. N., A. Tripathi, K. V. PremKumar, T. G. Shrivastav and S. K. Chaube (2010). "Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes." *Journal of cellular biochemistry* **111**(3): 521-528.
201. Pang, Y. W., L. An, P. Wang, Y. Yu, Q. D. Yin, X. H. Wang, M. L. Yang, Z. H. Wu and J. H. Tian (2013). "Treatment of porcine donor cells and reconstructed embryos with the antioxidant melatonin enhances cloning efficiency." *Journal of pineal research* **54**(4): 389-397.
202. Papis, K., O. Poleszczuk, E. Wenta - Muchalska and J. A. Modlinski (2007). "Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration." *Journal of pineal research* **43**(4): 321-326.
203. Pappolla, M., Y.-J. Chyan, B. Poeggeler, B. Frangione, G. Wilson, J. Ghiso and R. Reiter (2000). "An assessment of the antioxidant and the antiamyloidogenic properties of melatonin: implications for Alzheimer's disease." *Journal of neural transmission* **107**(2): 203-231.
204. Park, S.-J., F. Ahmad, A. Philp, K. Baar, T. Williams, H. Luo, H. Ke, H. Rehmann, R. Taussig and A. L. Brown (2012). "Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases." *Cell* **148**(3): 421-433.
205. Parker, J. A., M. Arango, S. Abderrahmane, E. Lambert, C. Tourette, H. Catoire and C. Néri (2005). "Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons." *Nature genetics* **37**(4).

206. Peterson, A. and R.-F. Lee (2003). "Improving successful pregnancies after embryo transfer." *Theriogenology* **59**(2): 687-697.
207. Picinato, M., A. Hirata, J. Cipolla-Neto, R. Curi, C. Carvalho, G. Anhe and A. Carpinelli (2008). "Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets." *Journal of pineal research* **44**(1): 88-94.
208. Pocar, P., R. Augustin and B. Fischer (2004). "Constitutive expression of CYP11A1 in bovine cumulus oocyte-complexes in vitro: mechanisms and biological implications." *Endocrinology* **145**(4): 1594-1601.
209. Pomar, F., K. Teerds, A. Kidson, B. Colenbrander, T. Tharasanit, B. Aguilar and B. Roelen (2005). "Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study." *Theriogenology* **63**(8): 2254-2268.
210. Poretsky, L., N. A. Cataldo, Z. Rosenwaks and L. C. Giudice (1999). "The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease." *Endocrine reviews* **20**(4): 535-582.
211. Price, N. L., A. P. Gomes, A. J. Ling, F. V. Duarte, A. Martin-Montalvo, B. J. North, B. Agarwal, L. Ye, G. Ramadori and J. S. Teodoro (2012). "SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function." *Cell metabolism* **15**(5): 675-690.
212. Prokop, J., P. Abrman, A. L. Seligson and M. Sovak (2006). "Resveratrol and its glycon piceid are stable polyphenols." *Journal of medicinal food* **9**(1): 11-14.
213. Radio, N. M., J. S. Doctor and P. A. Witt-Enderby (2006). "Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade." *Journal of pineal research* **40**(4): 332-342.
214. Raederstorff, D., I. Kunz and J. Schwager (2013). "Resveratrol, from experimental data to nutritional evidence: the emergence of a new food ingredient." *Annals of the New York Academy of Sciences* **1290**(1): 136-141.
215. Reiter, R. J. (2000). "Melatonin: lowering the high price of free radicals." *Physiology* **15**(5): 246-250.
216. Reiter, R. J., S. A. Rosales-Corral, L. C. Manchester and D.-X. Tan (2013). "Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time." *International journal of molecular sciences* **14**(4): 7231-7272.
217. Reiter, R. J., D.-X. Tan, L. C. Manchester, S. D. Paredes, J. C. Mayo and R. M. Sainz (2009). "Melatonin and reproduction revisited." *Biology of reproduction* **81**(3): 445-456.
218. Reiter, R. J., D.-x. Tan, C. Osuna and E. Gitto (2000). "Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress." *Journal of biomedical science* **7**(6): 444-458.
219. Reppert, S. M., C. Godson, C. D. Mahle, D. R. Weaver, S. A. Slaugenhaupt and J. F. Gusella (1995). "Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**(19): 8734-8738.

220. Revel, A., H. Raanani, E. Younglai, J. Xu, R. Han, J.-F. Savouret and R. F. Casper (2001). "Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo (a) pyrene." *Reproductive Toxicology* **15**(5): 479-486.
221. Rieger, D., N. Loskutoff and K. Betteridge (1992). "Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro." *Reproduction, fertility and development* **4**(5): 547-557.
222. Rivara, S., S. Lorenzi, M. Mor, P. V. Plazzi, G. Spadoni, A. Bedini and G. Tarzia (2005). "Analysis of structure-activity relationships for MT2 selective antagonists by melatonin MT1 and MT2 receptor models." *Journal of medicinal chemistry* **48**(12): 4049-4060.
223. Rizos, D., A. Gutierrez-Adan, S. Perez-Garnelo, J. De La Fuente, M. Boland and P. Lonergan (2003). "Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression." *Biology of Reproduction* **68**(1): 236-243.
224. Rizos, D., P. Lonergan, M. Boland, R. Arroyo-Garcia, B. Pintado, J. De la Fuente and A. Gutierrez-Adan (2002). "Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality." *Biology of reproduction* **66**(3): 589-595.
225. Rizos, D., F. Ward, M. Boland and P. Lonergan (2001). "Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification." *Theriogenology* **56**(1): 1-16.
226. Rizos, D., F. Ward, P. Duffy, M. P. Boland and P. Lonergan (2002). "Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality." *Molecular reproduction and development* **61**(2): 234-248.
227. Robb, E. L., M. M. Page, B. E. Wiens and J. A. Stuart (2008). "Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD." *Biochemical and biophysical research communications* **367**(2): 406-412.
228. Rodriguez - Osorio, N., I. Kim, H. Wang, A. Kaya and E. Memili (2007). "Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos in vitro." *Journal of pineal research* **43**(3): 283-288.
229. Rodriguez, C., J. C. Mayo, R. M. Sainz, I. Antolin, F. Herrera, V. Martin and R. J. Reiter (2004). "Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin." *Journal of pineal research* **36**(1): 1-9.
230. Roka, F., L. Brydon, M. Waldhoer, A. D. Strosberg, M. Freissmuth, R. Jockers and C. Nanoff (1999). "Tight association of the human Mella-melatonin receptor and Gi: precoupling and constitutive activity." *Molecular pharmacology* **56**(5): 1014-1024.
231. Rose, C., H. Schwegler, J. Hanke and D. Yilmazer-Hanke (2012). "Pregnancy rates, prenatal and postnatal survival of offspring, and litter sizes after reciprocal embryo transfer in DBA/2JHd,

- C3H/HeNCrI and NMRI mice." *Theriogenology* **77**(9): 1883-1893.
232. Roudebush, W. E., J. B. Massey, H. I. Kort, C. W. Elsner, A. A. Toledo, D. Mitchell-Leef and D. B. Shapiro (2004). "Exposure of preimplantation embryos to platelet-activating factor increases birth rate." *Journal of assisted reproduction and genetics* **21**(8): 297-300.
233. Sampaio, R. V., S. Conceicao, M. S. Miranda, L. d. F. S. Sampaio and O. M. Ohashi (2012). "MT3 melatonin binding site, MT1 and MT2 melatonin receptors are present in oocyte, but only MT1 is present in bovine blastocyst produced in vitro." *Reproductive Biology and Endocrinology* **10**(1): 103.
234. Sandra, O., N. Mansouri-Attia and R. G. Lea (2011). "Novel aspects of endometrial function: a biological sensor of embryo quality and driver of pregnancy success." *Reproduction, Fertility and Development* **24**(1): 68-79.
235. Santoro, R., F. Mori, M. Marani, G. Grasso, M. A. Cambria, G. Blandino, P. Muti and S. Strano (2013). "Blockage of melatonin receptors impairs p53-mediated prevention of DNA damage accumulation." *Carcinogenesis* **34**(5): 1051-1061.
236. Schaeffer, H. and A. Sirotkin (1997). "Melatonin and serotonin regulate the release of insulin-like growth factor-I, oxytocin and progesterone by cultured human granulosa cells." *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* **105**(2): 109-112.
237. Schlambitz-Loutsevitch, N., N. Hellner, R. Middendorf, D. Muller and J. Olcese (2003). "The human myometrium as a target for melatonin." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **88**(2): 908-913.
238. Shang, E. H. and I. V. Zhdanova (2007). "The circadian system is a target and modulator of prenatal cocaine effects." *PloS one* **2**(7): e587.
239. Sharkey, J. T., R. Puttaramu, R. A. Word and J. Olcese (2009). "Melatonin synergizes with oxytocin to enhance contractility of human myometrial smooth muscle cells." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **94**(2): 421-427.
240. Sheth, B., J.-J. Fontaine, E. Ponza, A. McCallum, A. Page, S. Citi, D. Louvard, A. Zahraoui and T. P. Fleming (2000). "Differentiation of the epithelial apical junctional complex during mouse preimplantation development: a role for rab13 in the early maturation of the tight junction." *Mechanisms of development* **97**(1): 93-104.
241. Shi, J. M., X. Z. Tian, G. B. Zhou, L. Wang, C. Gao, S. E. Zhu, S. M. Zeng, J. H. Tian and G. S. Liu (2009). "Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes." *Journal of pineal research* **47**(4): 318-323.
242. Shiels, A. and C. S. Griffin (1993). "Aberrant expression of the gene for lens major intrinsic protein in the CAT mouse." *Current eye research* **12**(10): 913-921.
243. Shin, S., J. H. Jeon, D. Park, M.-J. Jang, J. H. Choi, B.-H. Choi, S. S. Joo, S.-S. Nahm, J.-C. Kim and Y.-B. Kim (2008). "trans-Resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo." *Archives of pharmacal research* **31**(1): 83-87.
244. Siemann, E. and L. Creasy (1992). "Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine."

- American Journal of Enology and Viticulture **43**(1): 49-52.
245. Simón, C., C. Moreno, J. Remohí and A. Pellicer (1998). "Cytokines and embryo implantation." *Journal of reproductive immunology* **39**(1): 117-131.
246. Singh, U. P., N. Singh, B. Singh, L. J. Hofseth, B. L. Price, M. Nagarkatti and P. Nagarkatti (2009). "Resveratrol (trans-3, 5, 4'-trihydroxystilbene) induces SIRT1 and down-regulates NF- κ B activation to abrogate DSS-induced colitis." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*: jpet. 109.160838.
247. Siu, A. W., M. Maldonado, M. Sanchez-Hidalgo, D. X. Tan and R. J. Reiter (2006). "Protective effects of melatonin in experimental free radical - related ocular diseases." *Journal of pineal research* **40**(2): 101-109.
248. Slanar, O., V. Pelisek and J. Vanecek (2000). "Melatonin inhibits pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide-induced increase of cyclic AMP accumulation and $[Ca^{2+}]$ in cultured cells of neonatal rat pituitary." *Neurochemistry international* **36**(3): 213-219.
249. Soares, J., M. Simoes, C. Oshima, O. Mora, G. De Lima and E. Baracat (2003). "Pinealectomy changes rat ovarian interstitial cell morphology and decreases progesterone receptor expression." *Gynecological endocrinology* **17**(2): 115-123.
250. Soares, J. M., M. I. Masana, Ç. Erşahin and M. L. Dubocovich (2003). "Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **306**(2): 694-702.
251. Somfai, T., M. Ozawa, J. Noguchi, H. Kaneko, N. W. Kuriani Karja, M. Farhudin, A. Dinnyés, T. Nagai and K. Kikuchi (2007). "Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage." *Cryobiology* **55**(2): 115-126.
252. Song, N., A. J. Kim, H. J. Kim, H. J. Jee, M. Kim, Y. H. Yoo and J. Yun (2012). "Melatonin suppresses doxorubicin-induced premature senescence of A549 lung cancer cells by ameliorating mitochondrial dysfunction." *Journal of pineal research* **53**(4): 335-343.
253. Stahl, S., T.-Y. Chun and W. G. Gray (1998). "Phytoestrogens act as estrogen agonists in an estrogen-responsive pituitary cell line." *Toxicology and applied pharmacology* **152**(1): 41-48.
254. Stancheva, I. and R. R. Meehan (2000). "Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in *Xenopus* embryos." *Genes & development* **14**(3): 313-327.
255. Stefani, M., M. A. Markus, R. C. Lin, M. Pinese, I. W. Dawes and B. J. Morris (2007). "The effect of resveratrol on a cell model of human aging." *Annals of the New York Academy of Sciences* **1114**(1): 407-418.
256. Steffens, F., X.-B. Zhou, U. Sausbier, C. Sailer, K. Motejlek, P. Ruth, J. Olcese, M. Korth and T. Wieland (2003). "Melatonin receptor signaling in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes as probed by large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel activity." *Molecular Endocrinology* **17**(10): 2103-2115.
257. Stewart, J. R., M. C. Artime and C. A. O'Brian (2003). "Resveratrol: a candidate nutritional

- substance for prostate cancer prevention." *The Journal of nutrition* **133**(7): 2440S-2443S.
258. Sturmey, R., A. Reis, H. Leese and T. McEvoy (2009). "Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development." *Reproduction in domestic animals* **44**(s3): 50-58.
259. Sun, J., D. Folk, T. J. Bradley and J. Tower (2002). "Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster*." *Genetics* **161**(2): 661-672.
260. Szmitko, P. E. and S. Verma (2005). "Red wine and your heart." *Circulation* **111**(2): e10-e11.
261. Takahashi, M. (2011). "Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos." *The Journal of reproduction and development* **58**(1): 1-9.
262. Takahashi, T., E. Takahashi, H. Igarashi, N. Tezuka and H. Kurachi (2003). "Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization." *Molecular reproduction and development* **66**(2): 143-152.
263. Tamura, H., Y. Nakamura, A. Korkmaz, L. C. Manchester, D.-X. Tan, N. Sugino and R. J. Reiter (2009). "Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications." *Fertility and sterility* **92**(1): 328-343.
264. Tamura, H., Y. Nakamura, M. P. Terron, L. J. Flores, L. C. Manchester, D.-X. Tan, N. Sugino and R. J. Reiter (2008). "Melatonin and pregnancy in the human." *Reproductive Toxicology* **25**(3): 291-303.
265. Tamura, H., A. Takasaki, I. Miwa, K. Taniguchi, R. Maekawa, H. Asada, T. Taketani, A. Matsuoka, Y. Yamagata and K. Shimamura (2008). "Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate." *Journal of pineal research* **44**(3): 280-287.
266. Tamura, H., A. Takasaki, T. Taketani, M. Tanabe, F. Kizuka, L. Lee, I. Tamura, R. Maekawa, H. Aasada and Y. Yamagata (2012). "The role of melatonin as an antioxidant in the follicle." *J Ovarian Res* **5**(5): 5.
267. Tan, D. X., R. Hardeland, L. C. Manchester, S. Rosales-Corral, A. Coto-Montes, J. A. Boga and R. J. Reiter (2012). "Emergence of naturally occurring melatonin isomers and their proposed nomenclature." *Journal of pineal research* **53**(2): 113-121.
268. Tan, D. X., L. C. Manchester, M. P. Terron, L. J. Flores and R. J. Reiter (2007). "One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?" *Journal of pineal research* **42**(1): 28-42.
269. Tanavde, V. and A. Maitra (2003). "In vitro modulation of steroidogenesis and gene expression by melatonin: a study with porcine antral follicles." *Endocrine research* **29**(4): 399-410.
270. Tennen, R. I., E. Michishita-Kioi and K. F. Chua (2012). "Finding a target for resveratrol." *Cell* **148**(3): 387-389.
271. Thibier, M. (2006). "Biosecurity and the various types of embryos transferred." *Reproduction in domestic animals* **41**(4): 260-267.

272. Thompson, J. G. (1996). "Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants." *Reproduction, fertility, and development* 9(3): 341-354.
273. Tian, X.-Z., Q. Wen, J.-M. Shi, S.-M. Zeng, J.-H. Tian, G.-B. Zhou, S.-E. Zhu and G.-S. Liu (2010). "Effects of melatonin on in vitro development of mouse two-cell embryos cultured in HTF medium." *Endocrine research* 35(1): 17-23.
274. Torres-Farfan, C., H. G. Richter, A. M. Germain, G. J. Valenzuela, C. Campino, P. Rojas-García, M. L. Forcelledo, F. Torrealba and M. Serón-Ferré (2004). "Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland." *The Journal of physiology* 554(3): 841-856.
275. Tsiligianni, T., I. Valasi, S. Cseh, E. Vainas, V. Faigl, F. Samartzi, T. Papanikolaou, E. Dovolou and G. S. Amiridis (2009). "Effects of melatonin treatment on follicular development and oocyte quality in Chios ewes-short communication." *Acta Veterinaria Hungarica* 57(2): 331-335.
276. Turner, R. T., G. L. Evans, M. Zhang, A. Maran and J. D. Sibonga (1999). "Is Resveratrol an Estrogen Agonist in Growing Rats? 1." *Endocrinology* 140(1): 50-54.
277. Vázquez, M., J. Abecia, F. Forcada and A. Casao (2010). "Effects of exogenous melatonin on in vivo embryo viability and oocyte competence of undernourished ewes after weaning during the seasonal anestrus." *Theriogenology* 74(4): 618-626.
278. Van Soom, A., M. L. Boerjan, P. Bols, G. Vanroose, A. Lein, M. Coryn and A. de Kruif (1997). "Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation." *Biology of reproduction* 57(5): 1041-1049.
279. Vandaele, L. and A. Van Soom (2011). "Intrinsic factors affecting apoptosis in bovine in vitro produced embryos." *Verh K Acad Geneesk Belg* 73(1-2): 79-104.
280. Vanecek, J. (1998). "Cellular mechanisms of melatonin action." *Physiological Reviews* 78(3): 687-721.
281. Viuff, D., P. J. Hendriksen, P. L. Vos, S. J. Dieleman, B. M. Bibby, T. Greve, P. Hyttel and P. D. Thomsen (2001). "Chromosomal abnormalities and developmental kinetics in in vivo-developed cattle embryos at days 2 to 5 after ovulation." *Biology of reproduction* 65(1): 204-208.
282. von Gall, C., M. L. Garabette, C. A. Kell, S. Frenzel, F. Dehghani, P.-M. Schumm-Draeger, D. R. Weaver, H.-W. Korf, M. H. Hastings and J. H. Stehle (2002). "Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin." *Nature neuroscience* 5(3): 234-238.
283. von Gall, C., J. H. Stehle and D. R. Weaver (2002). "Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction." *Cell and tissue research* 309(1): 151-162.
284. Wadsworth, T. L. and D. R. Koop (1999). "Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages." *Biochemical pharmacology* 57(8): 941-949.
285. Wagner, E. F. and Á. R. Nebreda (2009). "Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development." *Nature Reviews Cancer* 9(8): 537-549.

286. Wang, F., X. Tian, L. Zhang, C. He, P. Ji, Y. Li, D. Tan and G. Liu (2013). "Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization." *Fertility and sterility*.
287. Wang, F., X. Tian, L. Zhang, D. Tan, R. J. Reiter and G. Liu (2013). "Melatonin promotes the in vitro development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine." *Journal of pineal research* **55**(3): 267-274.
288. Wang, K.-H., Y.-H. Lai, J.-C. Chang, T.-F. Ko, S.-L. Shyu and R. Y.-Y. Chiou (2005). "Germination of peanut kernels to enhance resveratrol biosynthesis and prepare sprouts as a functional vegetable." *Journal of agricultural and food chemistry* **53**(2): 242-246.
289. Wang, W.-H., L. R. Abeydeera, Y.-M. Han, R. S. Prather and B. N. Day (1999). "Morphologic evaluation and actin filament distribution in porcine embryos produced in vitro and in vivo." *Biology of reproduction* **60**(4): 1020-1028.
290. Wang, Y., K. W. Lee, F. L. Chan, S. Chen and L. K. Leung (2006). "The red wine polyphenol resveratrol displays bilevel inhibition on aromatase in breast cancer cells." *Toxicological Sciences* **92**(1): 71-77.
291. Weaver, D. R., C. Liu and S. M. Reppert (1996). "Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters." *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.) **10**(11): 1478-1487.
292. Weaver, D. R. and S. M. Reppert (1996). "The Mella melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei." *Neuroreport* **8**(1): 109-112.
293. Webb, R., B. Nicholas, J. Gong, B. Campbell, C. Gutierrez, H. Garverick and D. Armstrong (2002). "Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle." *Reproduction* (Cambridge, England) Supplement **61**: 71-90.
294. White, B. H., R. D. Sekura and M. D. Rollag (1987). "Pertussis toxin blocks melatonin-induced pigment aggregation in *Xenopus* dermal melanophores." *Journal of Comparative Physiology B* **157**(2): 153-159.
295. Witt-Enderby, P. A., M. I. Masana and M. L. Dubocovich (1998). "Physiological Exposure to Melatonin Supersensitizes the Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate-Dependent Signal Transduction Cascade in Chinese Hamster Ovary Cells Expressing the Human mtl Melatonin Receptor 1." *Endocrinology* **139**(7): 3064-3071.
296. Woo, M. M., C.-J. Tai, S. K. Kang, P. S. Nathwani, S. F. Pang and P. C. Leung (2001). "Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **86**(10): 4789-4797.
297. Wrenzycki, C., D. Herrmann, L. Keskinetepe, A. Martins, S. Sirisathien, B. Brackett and H. Niemann (2001). "Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos." *Human Reproduction* **16**(5): 893-901.
298. Wrenzycki, C. and H. Niemann (2003). "Epigenetic reprogramming in early embryonic development: effects of in-vitro production and somatic nuclear transfer." *Reproductive*

- biomedicine online 7(6): 649-656.
299. WU, C. S., S. F. LEU, H. Y. YANG and B. M. HUANG (2001). "Melatonin Inhibits the Expression of Steroidogenic Acute Regulatory Protein and Steroidogenesis in MA-10 Cells." *Journal of andrology* 22(2): 245-254.
300. Yang, H., J. A. Baur, A. Chen, C. Miller and D. A. Sinclair (2007). "Design and synthesis of compounds that extend yeast replicative lifespan." *Aging Cell* 6(1): 35-43.
301. Yao, N., P. C. Wan, Z. D. Hao, F. F. Gao, L. Yang, M. S. Cui, Y. Wu, J. H. Liu, S. Liu and H. Chen (2009). "Expression of Interferon - tau mRNA in Bovine Embryos Derived from Different Procedures." *Reproduction in domestic animals* 44(1): 132-139.
302. Yasuo, S., T. Yoshimura, S. Ebihara and H.-W. Korf (2009). "Melatonin transmits photoperiodic signals through the MT1 melatonin receptor." *The Journal of Neuroscience* 29(9): 2885-2889.
303. Yen, G.-C., P.-D. Duh and C.-W. Lin (2003). "Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes." *Free radical research* 37(5): 509-514.
304. Yew, N., M. L. Mellini, C. K. Martinez and G. F. V. Woude (1992). "Meiotic initiation by the mos protein in *Xenopus*."
305. Yie, S.-M., L. Niles and E. Younglai (1995). "Melatonin receptors on human granulosa cell membranes." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 80(5): 1747-1749.
306. Yoneda, A., K. Suzuki, T. Mori, J. Ueda and T. Watanabe (2004). "Effects of delipidation and oxygen concentration on in vitro development of porcine embryos." *The Journal of reproduction and development* 50(3): 287.
307. Yonei, Y., A. Hattori, K. Tsutsui, M. Okawa and B. Ishizuka (2010). "Effects of melatonin: basic studies and clinical applications." *Anti Aging Med* 7: 85-91.
308. Yoon, K., L. Pellaroni, K. Ramamoorthy, K. Gaido and S. Safe (2000). "Ligand structure-dependent differences in activation of estrogen receptor α in human HepG2 liver and U2 osteogenic cancer cell lines." *Molecular and cellular endocrinology* 162(1): 211-220.
309. Yoshioka, K., A. M. Othman, T. Taniguchi, H. Yamanaka and K. Sekikawa (1997). "Differential patterns of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA." *Theriogenology* 48(6): 997-1006.
310. You, J., J. Kim, J. Lim and E. Lee (2010). "Anthocyanin stimulates in vitro development of cloned pig embryos by increasing the intracellular glutathione level and inhibiting reactive oxygen species." *Theriogenology* 74(5): 777-785.
311. Zhao, H., X. Li, N. Li, T. Liu, J. Liu, Z. Li, H. Xiao and J. Li (2013). "Long-term resveratrol treatment prevents ovariectomy-induced osteopenia in rats without hyperplastic effects on the uterus." *The British journal of nutrition*: 1-11.
312. Zhao, Y., D. X. Tan, Q. Lei, H. Chen, L. Wang, Q. t. Li, Y. Gao and J. Kong (2013). "Melatonin and its potential biological functions in the fruits of sweet cherry." *Journal of pineal research* 55(1): 79-88.

-
313. Zini, R., C. Morin, A. Bertelli, A. a. Bertelli and J. Tillement (1999). "Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain." *Drugs under experimental and clinical research* **25**(2-3): 87.

致 谢

光阴荏苒，时光飞逝，一转眼，三年的博士生涯即将画上最后的句点，而我在北京这座城市也整整度过了五年的时光。

脑海中涌现的还是考研成绩出来后，我只身一人来到中国农大的情景。那时，心情十分忐忑，因为还不知道自己能否被心仪的大学录取，每天唯一的事就是不停的敲各位老师的门，希望能得到一个肯定的答复。也许有些事就是一种缘分，其实，当初想来中国农大是因为对家禽很感兴趣，于是我毅然决定从生物技术专业转到动物学专业，这在很多人看来都很不理解。但是，我知道，我必须跟着自己的内心走。然而，命运总是充满着诸多变数，我去找了家禽方向的老师，结果被很不客气的请出了门外，正当我十分沮丧的时候，接到了现在的导师——刘国世老师的电话，于是我顺理成章的成为了中国农业大学繁殖组的一员。

中国农大繁殖组是一个大家庭，还记得刚来那时所有老师的学生都“挤”在一个面积不大的实验室，由于实验条件有限，大家都很珍惜时间，实验预约的黑板上永远都是已约的状态，整个实验室也十分忙碌，而正是这样的环境让我从师兄师姐那里学到很多的技术，第一次体外受精的成功、第一只胚胎移植小鼠的出生……这些，让我爱上了一个本不了解的专业，这也决定了我未来的科研方向。

所以，要说博士生涯最先感谢的是谁，那么，肯定是我的导师。如果说还想感谢谁，那么一定是整个繁殖组，因为，导师让我踏进了门槛，而繁殖组给了我成长。

感谢刘老师开拓了我的视野，人生有很多的第一次都发生在刘老师实验室，第一次坐飞机，第一次见到大海，第一次见到草原……

感谢刘老师丰富了我的阅历，威海、青岛、成都、内蒙古、天津、长春、哈尔滨……在各大养殖场做胚胎移植实验的经历一定会让我在未来对这些生活充满着怀念，以至于每每想起都会感到一阵阵喜悦。

感谢刘老师对我科研能力的培养，感谢刘老师对我生活上的关心，感谢刘老师教我做人的道理……我所有的成长离不开您的关怀。

感谢刘老师课题组的兄弟姐妹们，我一定会怀念和史建民师兄、王梁师兄、高超师兄及张璐师兄去威海做狐狸胚胎移植的时光，我一定会怀念2012年冬天的那个凌晨和田秀芝师姐及张鲁师弟踏着大雪去做实验的情景。我一定会怀念和徐静、卓志勇师弟、何长久师弟、张航师弟在青岛做实验的日子，我一定会怀念和付瑶师妹、秦文向师弟、姬鹏云师妹、李骥师弟、朱宽峰师弟、王静师妹、易金云师弟、宋怡乐师妹、宋玉坤师弟在一起学习及生活的每一天。有你们，真好。

感谢繁殖组朱士恩教授、曾申明教授、田见晖教授、秦应和教授、韩国才副教授、吴英杰副教授、安磊副教授、傅祥伟副教授及王书敏老师，你们三年来对我的学习及实验提出了诸多宝贵的意见和建议。

感谢父母二十多年来对我生活上的照顾和学业上的支持。感谢家人对我的关心和帮助。对亲人的谢意难以言表，我将永远铭记于心。

人生总是充满着相逢和离别，只要带着你们的祝福，我相信我一定能飞的更高、走的更远。让我们撑起新的风帆，再次扬帆远航！

汪 锋

2014年5月，北京

个人简介



姓 名	汪 锋	出生年月	1987. 09
籍 贯	安徽·黄山	政治面貌	中共党员
外语水平	CET-6	计算机等级	国家二级

教育背景:

2011.9~2014.7	中国农业大学动物遗传育种与繁殖专业	农学博士
2009.9~2011.7	中国农业大学 动物遗传育种与繁殖专业	全日制农业推广硕士
2005.9~2009.7	安徽农业大学 生物技术专业	理学学士

获奖情况及职务:

博士 (2011-2014 中国农业大学 动物科技学院)

2013 研究生国家奖学金.

2013 中国畜牧兽医学会优秀论文提名奖.

2012 博士科研成就奖.

硕士 (2009-2011 中国农业大学 动物科技学院)

2011 中国农业大学优秀研究生党员.

2011 中国畜牧兽医学会优秀论文提名奖.

2010 硕士科研成就奖、社会实践奖.

本科 (2005-2009 安徽农业大学 生命科学学院)

2009 校级成绩优秀毕业生、品学兼优毕业生.

2008 校三好学生、一等专业奖学金.

2007 国家励志奖学金、三等专业奖学金、社会实践二等奖.

2006 三等专业奖学金.

发表学术论文 (以第一作者发表SCI论文4篇, 累计影响因子22.512):

1. Wang F, Tian XZ, Zhang L, Liu GS, et al. Melatonin promotes the *in vitro* development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine. J Pineal Res 2013; **55**:267-274. (IF: 7.304)
2. Feng Wang, XiuZhi Tian, Liu GS, et al. Beneficial effects of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after IVF. Fertil Steril, 2014; **101**:577-586. (IF: 4.174)
3. Wang F, Tian XZ, Zhang L, Liu GS, et al. Beneficial effects of melatonin on *in vitro* bovine embryonic development are mediated by melatonin receptor 1. J Pineal Res, 2014; **56**:333-342. (IF: 7.304)
4. Wang F, Tian XZ, Liu GS. Melatonin improved the quality of *in vitro* produced (IVP) bovine embryos: implications for blastocyst development, cryotolerance, and relative transcript abundance. Plos One, 2014 2; 9(4):e93641. (IF: 3.73)
5. Wang F, Liu GS, et al. Melatonin promotes the *in vitro* development of pronuclear embryos and

increases the efficiency of blastocyst implantation in murine. The 11th World Conference on Animal Production WCAP2013-3-03-011 (Oral Presentation).

6. Lu Zhang, Menglong Chai, XiuZhi Tian, Feng Wang, Liu GS, et al. Effects of melatonin on superovulation and transgenic embryo transplantation in small-tailed han sheep (*Ovis aries*). *Neuroendocrinology Letters*, 2013, 34(4):101-108.

7. Wang F, et al. Beneficial effects of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after IVF, Aspir-0283. The 5th Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction (Brisbane, Australia, Oral Presentation)

8. Wang F, et al. Melatonin promotes the *in vitro* development of microinjected pronuclear mouse embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation through anti-oxidation and anti-apoptosis effect, Aspir-0285. The 5th Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction (Brisbane, Australia, Poster Presentation)

9. 汪锋, 田秀芝, 张鲁等. 褪黑素促进小鼠原核胚体外发育及囊胚移植效率. 中国畜牧兽医学会 2013 学术年会论文集. 2013 (口头报告).

10. 汪锋, 田秀芝, 刘国世等. 褪黑素对小鼠原核注射胚胎体外发育的影响. 中国畜牧兽医学会 2011 学术年会论文集. 2011:275. (口头报告).

11. 汪锋, 邓守龙, 韩红兵, 刘国世等. 转 TLR4、TLR2、VP1 抗病转基因绵羊研究. 中国畜牧兽医学会 2011 学术年会论文集. 2011:290.

12. 汪锋, 刘国世, 田秀芝, 李宁等. 以小鼠为模型验证抗口蹄疫病毒“睡美人”转座系统的转基因效率. 中国畜牧兽医学会动物繁殖学分会第十六届学术研讨会论文集. 2012:65.