

p66Shc 在绵羊卵母细胞中的表达及其与胞质氧化还原稳态的关系

张通^{1, 2}, 栗瑞兰^{1, 2}, 范晓梅^{1, 3}, 刘春洁¹, 海日汗¹, 霍敏¹, 张家新¹

(¹ 内蒙古农业大学动物科学学院/内蒙古自治区动物遗传育种与繁殖重点实验室, 呼和浩特 010018; ² 山西大同大学医学院, 山西大同 037009;

³ 内蒙古医科大学基础医学院, 呼和浩特 010110)

摘要: 【目的】研究 p66Shc 在绵羊卵母细胞中的表达特征及其与卵母细胞胞质氧化还原稳态的关系, 为揭示 p66Shc 参与调控卵母细胞胞质氧化还原稳态分子机制提供理论依据。【方法】试验所用卵丘-卵母细胞复合体 (cumulus-oocyte complexes, COCs) 来源于屠宰场的绵羊卵巢。分别收集成熟前优质和劣质、常规成熟 24 h 及成熟 30 h 老化的卵母细胞, 采用实时荧光定量 PCR 对成熟前后不同质量绵羊卵母细胞中 p66Shc mRNA 的表达量进行分析, 利用细胞免疫荧光结合 MitoTracker Red 探针对 p66Shc 蛋白和线粒体进行共定位, 同时利用荧光探针 DCFH-DA 和卵母细胞自发荧光分别对成熟前后不同质量卵母细胞内 ROS 水平和氧化还原稳态进行检测。此外, 采用外源 H₂O₂ 诱导的氧化应激处理成熟前优质卵母细胞, 并对 p66Shc 蛋白的表达及定位进行了检测分析。【结果】实时荧光定量 PCR 结果显示, 成熟前劣质和成熟后老化卵母细胞中 p66Shc mRNA 表达量分别显著 ($P < 0.05$) 高于成熟前优质和常规 24 h 成熟的卵母细胞。然而优质卵母细胞成熟前后 p66Shc mRNA 表达量没有显著差异 ($P > 0.05$)。共定位结果表明, p66 蛋白主要分布在线粒体分布活跃的区域。细胞免疫荧光结果显示, 成熟前劣质和成熟后老化卵母细胞中 p66Shc 蛋白表达量也分别显著 ($P < 0.05$) 高于成熟前优质和常规 24 h 成熟的卵母细胞。与成熟前优质和常规 24 h 成熟的卵母细胞相比, 成熟前劣质和成熟后老化卵母细胞表现出线粒体分布紊乱和活性下降、ROS 水平升高以及氧化还原稳态的失衡。此外, 与未添加外源 H₂O₂ 的对照组相比, 外源 H₂O₂ 处理成熟前优质卵母细胞诱导的氧化应激显著 ($P < 0.05$) 上调 p66Shc 蛋白的表达并促使 p66Shc 由胞质向细胞核定位。【结论】p66Shc 基因在劣质和老化的绵羊卵母细胞中呈现高水平的表达, H₂O₂ 诱导的氧化应激显著上调 p66Shc 蛋白的表达并影响其亚细胞定位。总之, 绵羊卵母细胞中 p66Shc 表达上调影响了胞质的氧化还原稳态。

关键词: 绵羊卵母细胞; p66Shc; 线粒体; ROS; 氧化还原稳态

Expression of p66Shc and Its Relationship with Cytoplasmic Redox Homeostasis in Sheep Oocytes

ZHANG Tong^{1, 2}, LI RuiLan^{1, 2}, FAN XiaoMei^{1, 3}, LIU ChunJie¹, HAI RiHan¹, HUO Min¹, ZHANG JiaXin¹

(¹ Inner Mongolia Autonomous Region Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction/College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018; ² College of Medicine, Shanxi Datong University, Datong, 037009 Shanxi;

³ Basic Medical College, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110)

Abstract: 【Objective】The aim of this study was to investigate the expression characteristics of p66Shc and its relationship with cytoplasm redox homeostasis in different quality sheep oocytes before and after maturation, which could provide a theoretical basis for revealing the molecular mechanism of p66Shc involved in the regulation of cytoplasmic redox in oocytes. 【Method】The sheep cumulus-oocyte complexes (COCs) of ovaries used in this experiment were derived from the slaughterhouse. High quality and

收稿日期: 2018-; 接受日期: 2019-04-17

基金项目: 国家自然科学基金 (31460598)

联系方式: 张通, Tel: 13363420309; E-mail: imauzt@126.com. 通信作者张家新, E-mail: zjxcu@163.com

poor quality immature oocytes, conventional 24 h matured oocytes and aged oocytes (matured 30 h) were collected, respectively. The expression of p66Shc in different quality sheep oocytes before and after maturation was analyzed by quantitative real-time PCR. The p66Shc protein and mitochondria were co-located by using cellular immunofluorescence combined with MitoTracker Red probe. Simultaneously, the ROS level and the redox homeostasis of different quality oocytes were detected by fluorescence probe DCFH-DA and oocyte spontaneous fluorescence, respectively. In addition, exogenous H_2O_2 -induced oxidative stress was used to treat high quality immature oocytes, and the expression and localization of p66Shc protein were detected and analyzed. 【Result】 The real-time fluorescent quantitative results showed that the expression of p66Shc mRNA in poor quality immature oocytes and aged oocytes was significantly higher than those in high quality immature oocytes and conventional 24 h matured oocytes ($P<0.05$). However, there was no significant difference in the expression of p66Shc mRNA in high-quality oocytes before and after maturation ($P>0.05$). The co-localization results showed that the regional distribution of p66 protein was consistent with active mitochondrial distribution. The cellular immunofluorescence results showed that the expression of p66Shc protein in poor quality immature oocytes and aged oocytes was significantly higher than those in high quality immature oocytes and conventional 24 h matured oocytes ($P<0.05$). Compared with high quality immature oocytes and conventional 24 h matured oocytes, poor quality immature oocytes and aged oocytes showed disordered mitochondrial distribution, decreased activity, increased ROS levels, and imbalance redox homeostasis. In addition, compared with the control group without added exogenous H_2O_2 , exogenous H_2O_2 -induced oxidative stress by treating high-quality immature oocytes significantly ($P<0.05$) upregulated the expression of p66Shc protein and induced p66Shc from the cytoplasm to the nucleus. 【Conclusion】 The results indicated that the p66Shc gene exhibited high levels of expression in poor quality immature oocytes and aged oocyte, while H_2O_2 -induced oxidative stress significantly up-regulated the expression of p66Shc protein and affected its subcellular localization. In conclusion, the elevated expression of p66Shc perturbed cytoplasmic redox homeostasis in sheep oocytes.

Key words: sheep oocytes; p66Shc; mitochondria; ROS; redox homeostasis

0 引言

【研究意义】哺乳动物胚胎体外生产效率低,很大程度上与卵母细胞和胚胎暴露于不利的体外培养环境中造成的氧化应激有关^[1-2]。哺乳动物卵母细胞胞质氧化还原稳态失衡是影响卵母细胞体外成熟质量以及胚胎发育潜能的关键因素。近年的研究表明,原癌基因 SHC 编码的亚型 66KD 线粒体氧化应激蛋白(p66Shc)及其信号特性在调控细胞氧化应激、细胞凋亡和机体衰老过程中发挥了重要作用^[3-4]。因此,如果能从卵母细胞入手,研究 p66Shc 基因调控卵母细胞线粒体氧化还原代谢机制,从基因角度探究改善胚胎抗氧化应激能力的方法,从基因角度改善胚胎抗氧化应激能力,这对于优化家畜胚胎体外生产体系和提升人类辅助生殖技术水平具有重要的理论意义和现实意义。【前人研究进展】p66Shc 作为少数确定的哺乳动物氧化应激调控基因之一。在小鼠模型中发现,p66Shc 基因缺失突变体能增强细胞对活性氧类物质的抗性并延长机体寿命^[5],还能抵制年龄相关的疾病,如动脉粥样硬化^[6],内皮紊乱^[7],糖尿病依赖性肾小球病^[8]和乙醇诱导的肝病^[9]等。哺乳动物卵母细胞和胚胎体外发育迟缓、阻滞很大程度上是由氧化应激引起胞质氧化还原稳态失衡所导致。有报道表明哺乳动物

早期胚胎发育阻滞与线粒体氧化应激蛋白 p66Shc 的表达有关^[10-12]。REN 等^[13]表明,砷可以显著诱导小鼠 2-cell 早期胚胎的发育阻滞和线粒体氧化应激蛋白 p66Shc 的表达上调。通过显微注射 p66Shc 的 siRNA 到小鼠的受精卵原核,结果导致 p66Shc mRNA 和蛋白水平以及活性氧水平的显著下降,从而使砷诱导的 2-cell 阻滞减少,同时桑椹胚发育率得到提高。此外,BETTS 等^[14]在牛合子阶段同样利用 p66Shc RNA 干扰技术,数据表明 p66Shc 敲除的胚胎表现出细胞内 ROS 水平降低、DNA 损伤减少、锰过氧化物歧化酶(MnSOD)表达水平升高,胚胎发育至囊胚阶段的比例升高。上述结果表明 p66Shc 敲除能够显著增加胚胎的氧化应激抗性改善体外胚胎的发育能力。【本研究切入点】哺乳动物卵母细胞胞质氧化还原稳态的维持对于卵母细胞成熟质量以及发育能力的获得至关重要。p66Shc 作为细胞内氧化还原稳态调控的重要感受蛋白,开展探究 p66Shc 对绵羊卵母细胞胞质氧化还原稳态调控的分子机制具有重要意义。但迄今报道关于 p66Shc 在哺乳动物卵母细胞中的表达及其对氧化应激反应调控的文献较少。【拟解决的关键问题】本研究比较分析了成熟前后不同质量卵母细胞中 p66Shc mRNA 和蛋白的表达规律、线粒体分布与活性、ROS 水平以及氧化还原稳态,为进一步研究 p66Shc 调控

绵羊卵母细胞氧化还原机制以及 p66Shc 的功能提供重要的理论参考。

1 材料与方法

试验于 2017 年在内蒙古农业大学动物遗传育种与繁殖重点实验室完成。

1.1 试剂与药品

TCM-199 培养液, 含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 磷酸盐缓冲液 (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS), 青链霉素合剂 (Penicillin-Streptomycin, PS) 均为 Gibco 公司产品; 促卵泡生成素 (FSH)、促黄体生成素 (LH) 购自 Bioniche 公司; 雌二醇 (E_2)、胎牛血清 (FBS)、透明质酸酶 (Hya)、牛血清白蛋白 (BSA)、聚乙烯醇 (PVA)、半胱胺均购自 Sigma 公司; p66Shc 兔源一抗和 Alexa 488 标记的山羊抗兔的二抗均购自 Proteintech 公司, MitoTracker™ Red CMXRos 购自 Invitrogen 公司; 活性氧检测试剂盒购自 Beyotime 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 卵母细胞的采集与体外成熟 试验所用绵羊卵巢来源于呼和浩特屠宰场, 用添加有青链霉素的灭菌生理盐水清洗卵巢 3 次, 然后放入 37°C 水浴锅内保温。从卵巢表面抽取直径为 3—6 mm 的卵泡, 在体视显微镜下挑选卵母细胞。根据卵母细胞质均匀程度、卵丘细胞形态及其与卵母细胞结合的紧密程度分为优质和劣质卵母细胞, 优质 (high quality, HQ) 卵母细胞: 形状规则、胞质均匀、色泽一致、卵丘细胞层包裹紧密完整 (图 1-a); 劣质 (poor quality, PQ) 卵母细胞: 形状规则, 胞质不均、色泽不一, 卵丘细胞包裹不完整 (图 1-b)。选用优质卵母细胞用于体外成熟, 分为常规 24 h 成熟组 (图 1-c) 和成熟 30 h 老化组 (图 1-d)。成熟培养液为: TCM-199+10% (v:v) FBS+1% (v:v) PS + $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ FSH + $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LH + $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ E_2 + $100\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 半胱胺。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 分别收集成熟前优质卵母细胞、劣质卵母细胞、常规成熟 24 h 卵母细胞、老化组的卵母细胞, 每组样品收集卵母细胞数为 50 枚。按照 RNeasy Mini kit (Qiagen) 微量样品总 RNA 提取试剂盒提取卵母细胞的总 RNA, 用 Takara 反转录试剂盒合成 cDNA, 并将所得 cDNA 置于 -80°C 保存备用。根据 GenBank 查找绵羊的 p66Shc 序列和 β -actin 序列, 利用 Primer 5.0 设计引物, 引物序列见表 1, 由上海生工合成, 以反转录得到的 cDNA

作为模板, 以 SYBR 为荧光染料, 用 Takara 公司的 SYBR Premix Ex Taq II 进行荧光定量 PCR 扩增, 每组试验重复 3 次。以 β -actin 为内参, 根据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算 p66Shc 相对表达量。

1.2.3 线粒体染色和细胞免疫荧光 分别收集成熟前优质卵母细胞、劣质卵母细胞、常规成熟 24 h 卵母细胞、老化组的卵母细胞, 涡旋处理以去除卵丘细胞。裸卵在含有 0.01% PVA 的 PBS 缓冲液中洗涤 3 次, 转入 $500\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MitoTracker Red CMXRos (Cat# M7512, Invitrogen, USA) 孵育 30 min, 使用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 将固定的卵母细胞在 0.1% Triton X-100 的 PBS 中透化 20 min, 随后在 5% 山羊血清中室温封闭 1 h, 将卵母细胞在 p66Shc 兔源一抗 (Proteintech) (1:100) 中 4°C 孵育过夜。将洗涤后的卵母细胞转入二抗 (Alexa 488 标记的山羊抗兔) 孵育 30 min, 用 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DAPI 染色 15 min。将染色的卵母细胞转移到 35 mm 的共焦皿中, 并在 Olympus FluoView FV10i 共聚焦激光扫描显微镜系统 (Olympus, Tokyo, Japan) 下观察。检测 p66Shc (Ex: 495 nm; Em: 519 nm), MitoTracker Red (Ex: 578 nm; Em: 598 nm) 和 DAPI (Ex: 359 nm; Em: 461 nm)。每组试验重复 3 次, 使用 Image J 软件进行图像分析。

1.2.4 ROS 检测 分别收集成熟前优质卵母细胞、劣质卵母细胞、常规成熟 24 h 卵母细胞、老化组的卵母细胞各 30 枚, 涡旋处理以去除卵丘细胞, 转入含有 $200\ \mu\text{L}\ 10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ROS 水平检测工作液 (DCFH-DA) 的平皿中, 置于 39°C 培养箱中孵育 30 min, 将染色的卵母细胞转移到 35 mm 的共焦皿中, 并在 Olympus FluoView FV10i 共聚焦激光扫描显微镜系统 (Olympus, Tokyo, Japan) 下观察检测 FITC (Ex: 495 nm; Em: 519 nm)。每组试验重复 3 次, 使用 Image J 软件进行图像分析。

1.2.5 氧化还原稳态检测 分别收集成熟前优质卵母细胞、劣质卵母细胞、常规成熟 24 h 卵母细胞、老化组的卵母细胞各 30 枚, 涡旋处理以去除卵丘细胞, 将卵母细胞转移到 35 mm 的共焦皿中, 并在 Olympus FluoView FV10i 共聚焦激光扫描显微镜系统 (Olympus, Tokyo, Japan) 下观察。检测 FAD^{++} (Ex: 490 nm; Em: 540 nm) 和 NAD(P)H (Ex: 420 nm; Em: 460 nm)。每组试验重复 3 次, 使用 Image J 软件进行图像分析。

1.2.6 过氧化氢诱导处理 收集成熟前优质卵母细胞, 分为对照组 (30 min 和 1 h)、处理组 ($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{H}_2\text{O}_2$

处理 30 min 和 1 h)，每组样品 20 枚卵母细胞，首先比较对照组和处理组 ROS 水平和氧化还原稳态的变化，然后检测 H₂O₂ 诱导的氧化应激对 p66Shc 蛋白表达影响。将卵母细胞在 p66Shc 兔源一抗（Proteintech）（1: 100）中 4℃ 孵育过夜。将洗涤后的卵母细胞转入二抗（Alexa 488 标记的山羊抗兔）孵育 30 min，用 1 μg·mL⁻¹ DAPI 染色 15 min。将染色的卵母细胞转移到 35 mm 的共焦皿中，并在 Olympus FluoView FV10i 共聚焦激光扫描显微镜系统（Olympus, Tokyo, Japan）下观察。检测 p66Shc（Ex: 495 nm; Em: 519 nm）。每组试验重复 3 次，使用 Image J 软件进行图像分析。

1.3 统计分析

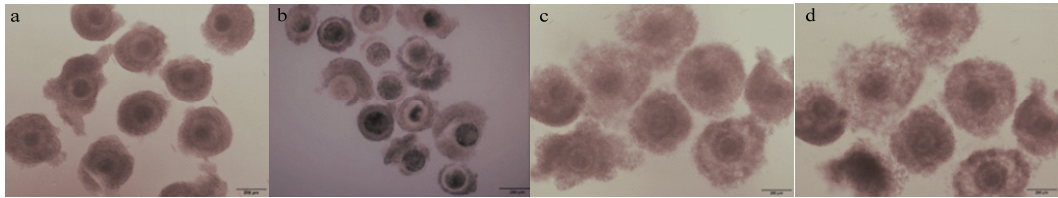
采用 SPSS 软件中的 ANAVO 进行单因素方差

分析和显著性检验。 $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 p66Shc 在成熟前后不同质量卵母细胞中的相对表达量

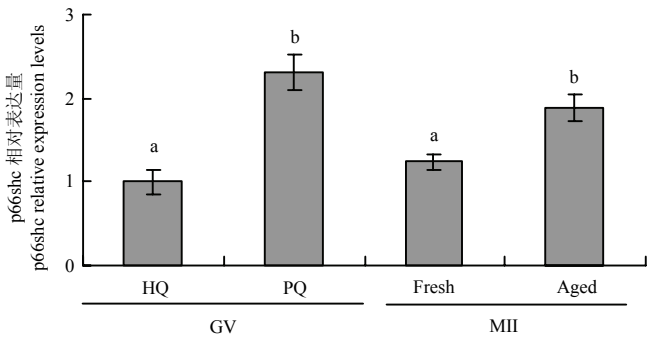
如图 2 所示, RT-qPCR 试验分析结果表明, p66Shc 在绵羊成熟前后不同质量卵母细胞中均有表达, 成熟前劣质卵母细胞 p66Shc mRNA 的相对表达量显著高于同时期优质的卵母细胞 ($P<0.05$)。成熟后老化的卵母细胞 p66Shc mRNA 的相对表达量显著高于常规成熟 24 h 的卵母细胞 ($P<0.05$)。然而优质卵母细胞成熟前后 p66Shc mRNA 表达量没有显著差异 ($P>0.05$)。



a: 成熟前优质卵母细胞; b: 成熟前劣质卵母细胞; c: 常规 24 h 成熟组; d: 成熟 30 h 老化组
a: high quality immature oocytes; b: poor quality immature oocytes; c: conventional 24 h matured oocytes; d: matured 30 h (aged oocytes)

图 1 成熟前后不同质量的绵羊卵母细胞

Fig. 1 Different quality sheep oocytes before and after maturation



不同字母表示差异显著 ($P<0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$)
The different superscripts mean significant difference ($P<0.05$), and the same superscripts mean no significant difference ($P>0.05$)

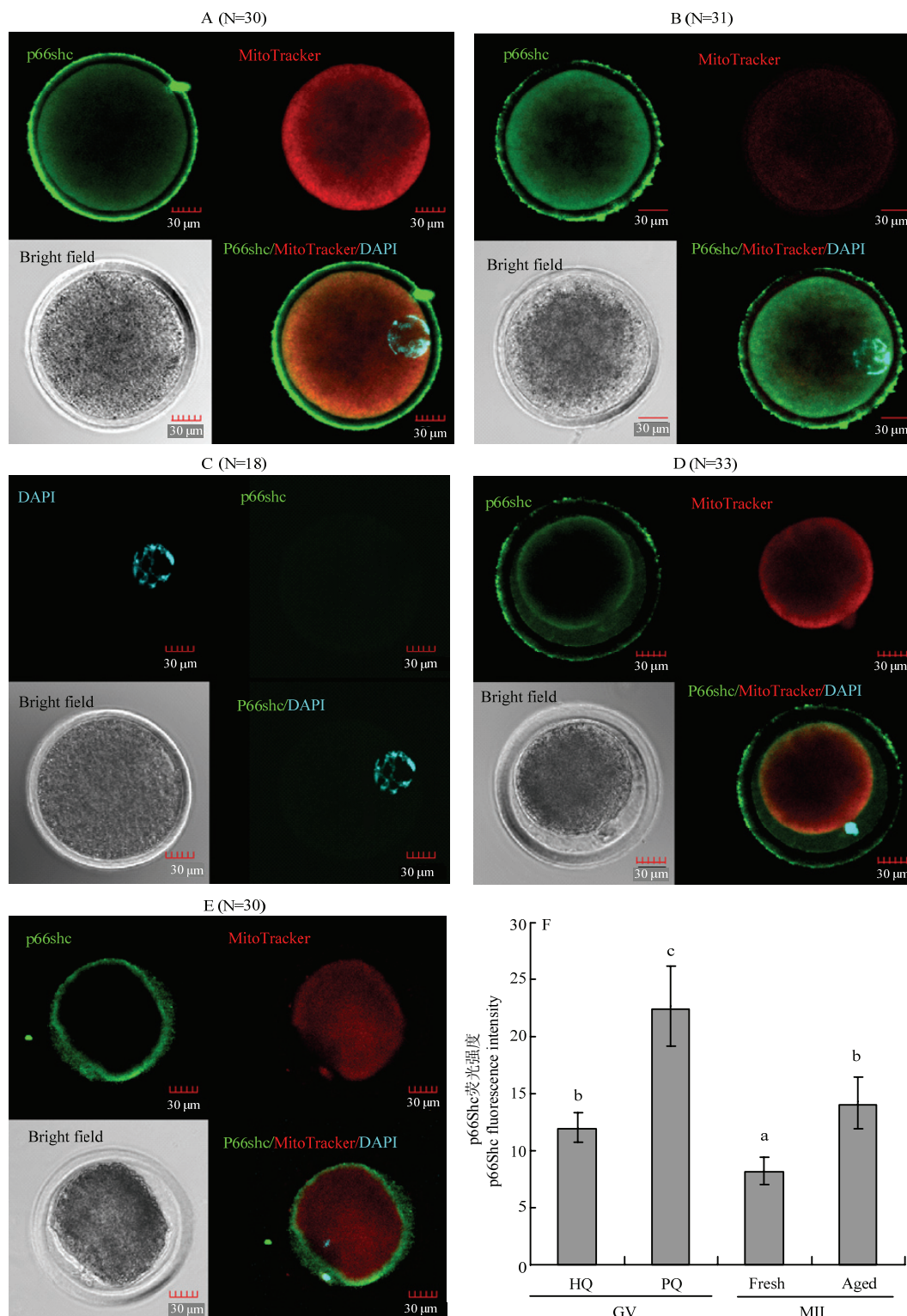
图 2 p66Shc 在成熟前后不同质量卵母细胞中的相对表达量

Fig. 2 The relative expression of p66Shc in different quality oocytes before and after maturation

2.2 p66Shc 蛋白与线粒体在成熟前后不同质量卵母细胞的共定位

采用细胞免疫荧光技术和 MitoTracker Red 线粒体探针针对 p66Shc 蛋白质和线粒体在绵羊成熟前后不

同质量卵母细胞进行共定位, 如图 3 所示, p66Shc 蛋白质在绵羊成熟前后不同质量卵母细胞中均有表达, 且主要呈现周边定位并且集中在线粒体分布活跃的区域。成熟前劣质卵母细胞 p66Shc 蛋白质表达量显著高



A: 成熟前优质卵母细胞; B: 成熟前劣质卵母细胞; C: 阴性对照 (成熟前); D: 常规 24 h 成熟卵母细胞; E: 成熟后老化的卵母细胞; F: p66Shc 蛋白荧光强度。绿色标记 p66Shc, 红色标记线粒体, 蓝色标记细胞核, 比例尺表示 30 μm 。不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)

A: High quality immature oocytes; B: Poor quality immature oocytes; C: Negative control (immature oocytes); D: Conventional 24 h matured oocytes; E: Aged oocytes; F: p66Shc protein fluorescence intensity. Green labeled p66Shc, red labeled mitochondrial, blue labeled nuclear, the scale bar represents 30 μm . The different superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), and the same superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$)

图 3 p66Shc 蛋白与线粒体在成熟前后不同质量卵母细胞的共定位

Fig. 3 Co-localization of p66Shc protein and mitochondria in different quality oocytes before and after maturation

表 1 p66Shc 和 β -actin 基因引物序列

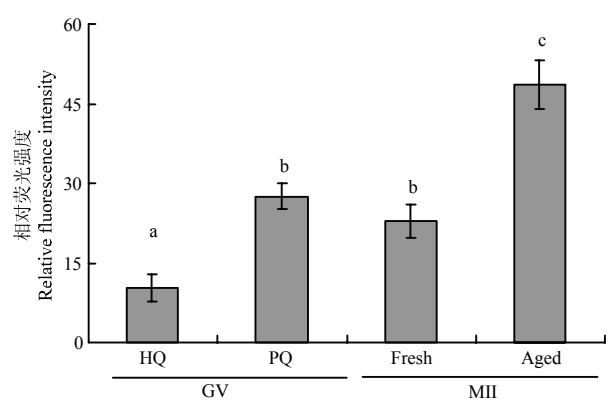
Table 1 The oligonucleotide primer for p66Shc and β -actin

基因	基因 ID	退火温度	引物序列 (5'-3')	产物长度
Gene	Gene ID	Annealing temperature (°C)	The sequence of primer	Product length (bp)
p66Shc	101113548	60	F: CGGGGTTTCCTACTTGGTT	169
			R: ACGGCTACAGGGCTTTCTC	
β -actin	443052	60	F: GTCATCACCATCGCAATGA	88
			R: CGTGAATGCCGACAGGATT	

于成熟前优质卵母细胞 ($P<0.05$)，成熟后老化的卵母细胞 p66Shc 蛋白质表达量显著高于常规 24 h 成熟的卵母细胞 ($P<0.05$)。然而优质卵母细胞成熟后 p66Shc 蛋白表达显著低于成熟前卵母细胞 ($P>0.05$)。成熟前卵母细胞线粒体在整个胞质中呈现明显的周边分布和中央弥散分布模式，成熟前优质卵母细胞线粒体活性显著高于成熟前劣质卵母细胞。优质卵母细胞常规成熟后线粒体聚集在皮质区域，然而老化卵母细胞的线粒体分布出现紊乱。

2.3 成熟前后不同质量卵母细胞的 ROS 水平

利用荧光探针 DCFH-DA 对成熟前后不同质量卵母细胞内 ROS 水平进行检测，结果如图 4 所示，成熟前劣质卵母细胞的 ROS 水平显著高于成熟前优质卵母细胞 ($P<0.05$)，成熟后老化的卵母细胞的 ROS 水平显著高于常规 24 h 成熟的卵母细胞 ($P<0.05$)，优质卵母细胞成熟后的 ROS 水平显著高于成熟前的卵母细胞 ($P<0.05$)。



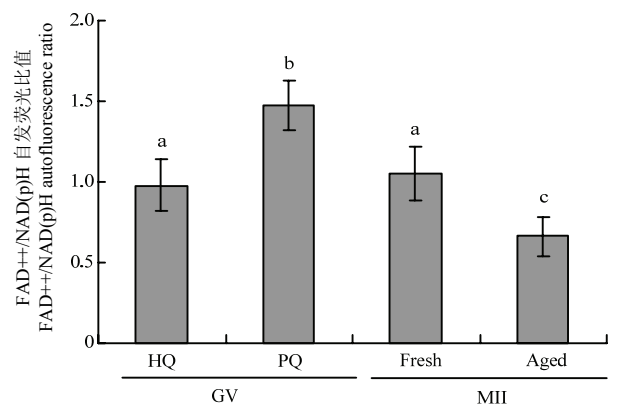
不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)，相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$)
The different superscripts mean significant difference ($P<0.05$), and the same superscripts mean no significant difference ($P>0.05$)

图 4 不成熟前后不同质量卵母细胞的 ROS 水平

Fig. 4 ROS levels of different quality oocytes before and after maturation

2.4 成熟前后不同质量绵羊卵母细胞的氧化还原稳态

通过检测成熟前后不同质量绵羊卵母细胞 $FAD^{++}/NAD(P)H$ 比率来评价胞质氧化还原稳态。结果如图 5 所示，成熟前劣质卵母细胞的 $FAD^{++}/NAD(P)H$ 比率显著高于成熟前优质卵母细胞 ($P<0.05$)，成熟后老化卵母细胞的 $FAD^{++}/NAD(P)H$ 比率显著低于常规 24 h 成熟的卵母细胞 ($P<0.05$)。优质卵母细胞成熟前后 $FAD^{++}/NAD(P)H$ 比率没有显著差异 ($P>0.05$)。



$FAD^{++}/NAD(P)H$ 荧光比值。不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)，相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$)
 $FAD^{++}/NAD(P)H$ fluorescence ratio. The different superscripts mean significant difference ($P<0.05$), and the same superscripts mean no significant difference ($P>0.05$)

图 5 成熟前后不同质量卵母细胞的氧化还原稳态

Fig. 5 Redox homeostasis of different quality oocytes before and after maturation

2.5 过氧化氢诱导的氧化应激上调 p66Shc 的表达

为了进一步研究 p66Shc 对氧化应激的反应，采用外源 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 处理成熟前优质绵羊卵母细胞，结果如图 6 所示， $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 处理 30 min 和 1 h 诱导的氧化应激 ROS 水平显著高于对照组 ($P<0.05$)，图 6-A)， $FAD^{++}/NAD(P)H$ 比率显著低

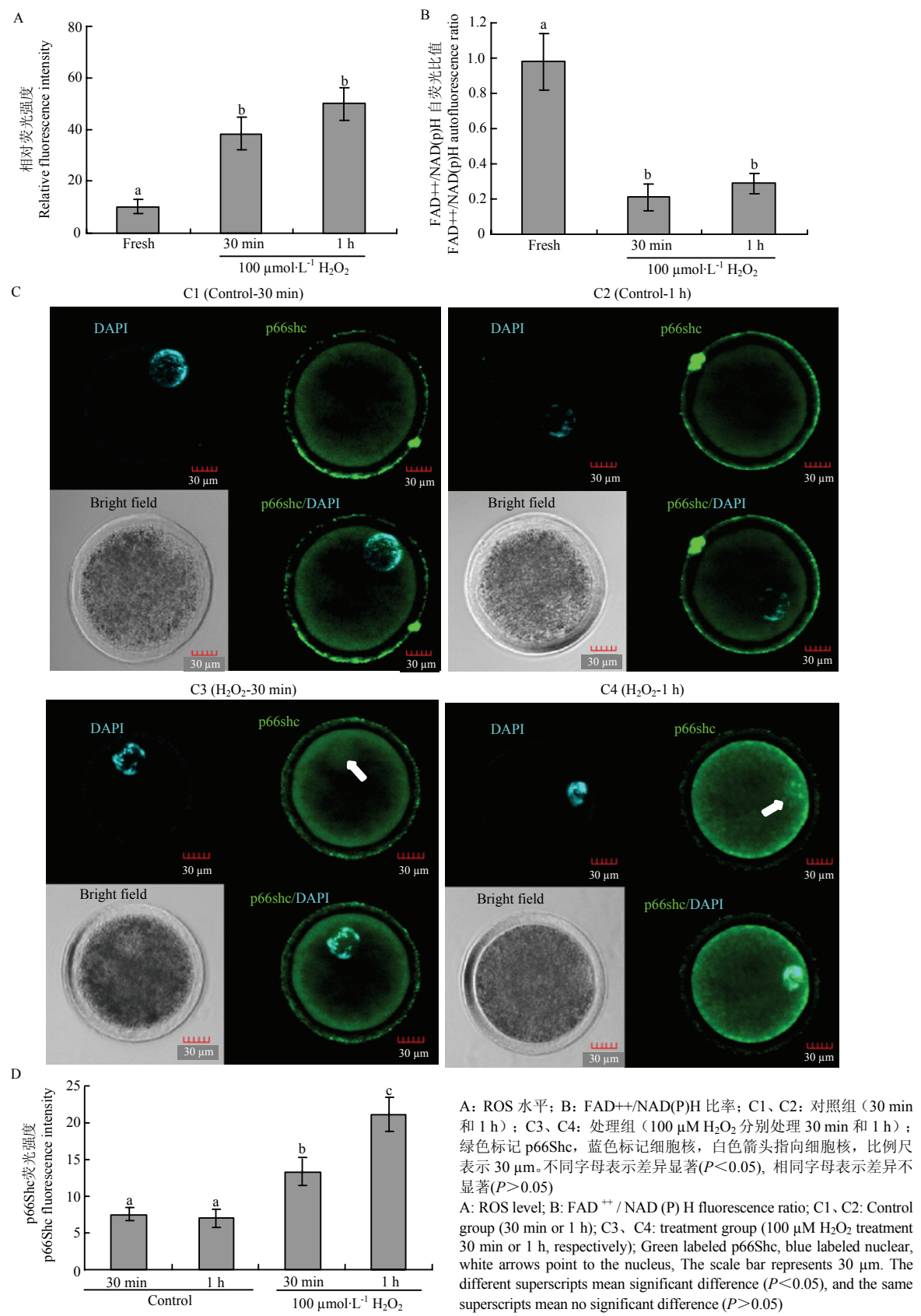


图 6 过氧化氢诱导的氧化应激上调 p66Shc 的表达

Fig. 6 Hydrogen peroxide induced oxidative stress upregulated the expression of p66Shc

于对照组($P<0.05$) (图 6-B)。通过细胞免疫荧光表明 H_2O_2 诱导的氧化应激显著上调 p66Shc 蛋白的表达($P<0.05$), 并且促使 p66Shc 由胞质向细胞核定位 (图 6-C、D)。

3 讨论

活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 主要包括超氧阴离子 (O_2^-)、过氧化氢 (H_2O_2)、羟基自由基 ($HO\cdot$) 等, 这些都是氧化损伤的有效诱导剂并且参与氧化应激反应的调节, 例如生殖细胞老化与凋亡、早期胚胎发育阻滞等^[15-17]。有报道研究表明, 体外胚胎生产过程中由于配子和胚胎暴露在外部环境下, 内源性和外源性高水平的 ROS 诱导的氧化应激反应可能导致基因表达和表观遗传修饰的改变以及细胞氧化还原稳态的紊乱, 进而导致卵母细胞成熟质量差、早期植入前胚胎的发育阻滞和凋亡^[18-19]。

p66Shc 作为少数确定的哺乳动物氧化应激调控基因之一, 在调控细胞氧化应激方面, 主要表现为参与破坏线粒体的代谢网络、引起细胞色素 c 的释放和 caspase 的级联活化^[20-22]。因而从基因角度说, p66Shc 介导的氧化应激被认为是细胞氧化损伤的关键基因。哺乳动物卵母细胞的氧化还原稳态是保证卵母细胞正常成熟和胚胎正常发育的关键性因素。在本研究中, 从 mRNA 和蛋白两个水平对绵羊成熟前后不同质量卵母细胞氧化应激蛋白 p66Shc mRNA 的表达量进行了比较分析。实时荧光定量 PCR 结果表明, p66Shc 基因在成熟前劣质和成熟后老化卵母细胞 p66Shc mRNA 的相对表达量都显著高于成熟前优质和常规 24 h 成熟的卵母细胞, 然而优质卵母细胞常规成熟前后没有显著差异 (图 2)。FAVETTA 等^[23]对氧化应激蛋白 p66Shc 在正常发育与早期发育阻滞的牛胚胎表达的研究中, 发现 p66Shc mRNA 在成熟前后的牛卵母细胞中表达没有显著差异, 这与本研究的结果相似。BAIN 等^[11]在牛胚胎中发现胚胎质量差与 p66Shc 氧化应激蛋白高表达有关, 因此推测 p66Shc 基因参与调控卵母细胞和早期胚胎氧化应激的能力。利用细胞免疫荧光结合 MitoTracker Red 探针对 p66Shc 和线粒体进行共定位, 结果表明成熟前劣质和成熟后老化卵母细胞 p66Shc 的蛋白表达显著高于成熟前优质和常规 24 h 成熟的卵母细胞, 这与 mRNA 表达模式一致 (图 3)。线粒体作为卵母细胞和胚胎能量代谢的核心, 在卵母细胞体外成熟和胚胎发育期间的各种生物过程中起重要作用, 越来越多的证据表明细胞质线粒

体的区域再分布以及活性大小能够作为哺乳动物卵母细胞发育能力的决定因素^[24-25]。本研究中, 比较分析了成熟前后不同质量绵羊卵母细胞线粒体的分布与活性, 成熟前优质卵母细胞线粒体呈现周边聚集和胞质的弥散分布模式 (图 3), 这可能与成熟过程中的卵母细胞与外界能量交换密切对线粒体需求较多有关, 成熟前劣质卵母细胞线粒体的活性显著低于优质卵母细胞 (图 3)。常规成熟 24 h 的卵母细胞线粒体更多地聚集到卵母细胞的皮质区域, 这可能与卵母细胞为受精做准备有关, 然而成熟 30 h 的卵母细胞线粒体分布模式紊乱 (图 3)。总之, 本研究的结果显示, p66Shc 表达水平的高低与线粒体的分布和活性反应了成熟前后卵母细胞的质量。

卵母细胞在正常生理条件下, ROS 的产生和清除系统处于动态平衡状态。由于种种原因, 导致细胞内 ROS 过度产生而 ROS 清除能力下降, 细胞就会出现氧化应激^[26]。p66Shc 对线粒体 ROS 代谢的调节依赖于线粒体呼吸链。研究发现 p66Shc 基因敲除小鼠的细胞内 ROS 的水平显著降低, 同时检测到反映细胞氧化应激状态的重要标志物—8-氧代脱氧鸟苷和硝基酪氨酸的下降^[27]。为了进一步探究成熟前后不同质量卵母细胞 p66Shc 与 ROS 水平和氧化还原稳态的关系, 笔者利用荧光探针 DCFH-DA 和卵母细胞自发荧光分别对成熟前后不同质量卵母细胞内 ROS 水平和氧化还原稳态进行检测, 结果表明成熟前劣质和成熟后老化卵母细胞 ROS 水平分别显著高于成熟前优质和常规 24 h 成熟的卵母细胞 (图 4), 因此, 卵母细胞质量差很大成程度上与 ROS 代谢失衡有关。TAKAHASHI 等^[28]同样发现质量差的小鼠卵母细胞 ROS 水平显著高于正常的卵母细胞。FAD⁺⁺/NADH 荧光强度比称之为氧化还原比, 常用来确定细胞氧化还原状态的相对变化来反映细胞代谢状态的变化^[29-30]。与成熟前优质和常规 24 h 成熟的卵母细胞相比, 成熟前劣质和成熟后老化卵母细胞表现出氧化还原稳态失衡的状态 (图 5)。因此, 卵母细胞质量下降与 ROS 水平升高及氧化还原稳态失衡有关。过氧化氢 (H_2O_2) 被广泛用作外源 ROS 的来源诱导氧化应激^[31-32], 采用外源 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 分别诱导成熟前优质卵母细胞 30 min 和 1 h, 结果表明 H_2O_2 处理引起 ROS 显著上升和氧化还原稳态的失衡, 并且 H_2O_2 诱导的氧化应激显著上调 p66Shc 蛋白表达并促使 p66Shc 由胞质向细胞核定位 (图 6)。因此, p66shc 在氧化应激条件下的表达上调, 可能触发了卵母细胞氧化应激“闸门”的开启。

但 p66shc 对卵母细胞氧化应激反应的具体调节机制还需进一步研究。

4 结论

p66Shc 在劣质和老化的绵羊卵母细胞中呈现高水平的表达特征, 而且 p66Shc 高表达影响了绵羊卵母细胞胞质氧化还原稳态。

References

- [1] WALE P L, GARDNER D K. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Human Reproduction Update*, 2016, 22:2-22.
- [2] KEEFE D, KUMAR M, KALMBACH K. Oocyte competency is the key to embryo potential. *Fertility & Sterility*, 2015, 103(2):317-322.
- [3] GALIMOV E R. The Role of p66shc in oxidative stress and apoptosis. *Acta Naturae*, 2010, 2(4):44-51.
- [4] BHAT S S, ANAND D, KHANDAY F A. P66Shc as a switch in bringing about contrasting responses in cell growth: implications on cell proliferation and apoptosis. *Molecular Cancer*, 2015, 14:76.
- [5] MIGLIACCIO E, GIORGIO M, MELE S, PELICCI G, REBOLDI P, PANDOLFI P P, LANFRANCONE L, PELICCI P G. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*, 1999, 402(6759):309-313.
- [6] FRANZECK F C, HOF D, SPESCHA R D, HASUN M, AKHMEDOV A, STEFFEL J, SHI Y, COSENTINO F, TANNER F C, VON ECKARDSTEIN A, MAIER W, LÜSCHER T F, WYSS C A, CAMICI G G. Expression of the aging gene p66Shc is increased in peripheral blood monocytes of patients with acute coronary syndrome but not with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2012, 220(1):282-286.
- [7] ZHOU S, CHEN H Z, WAN Y Z, ZHANG Q J, WEI Y S, HUANG S, LIU J J, LU Y B, ZHANG Z Q, YANG R F, ZHANG R, CAI H, LIU D P, LIANG C C. Repression of P66Shc expression by SIRT1 contributes to the prevention of hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *Circulation Research*, 2011, 109(6):639-648.
- [8] ALBIERO M, PONCINA N, TJWA M, CICILLOT S, MENEGAZZO L, CEOLOTTO G, VIGILI DE KREUTZENBERG S, MOURA R, GIORGIO M, PELICCI P, AVOGARO A, FADINI G P. Diabetes causes bone marrow autonomic neuropathy and impairs stem cell mobilization via dysregulated p66Shc and Sirt1. *Diabetes*, 2014, 63(4):1353-1365.
- [9] TIAN X, HU Y, LI M, XIA K, YIN J, CHEN J, LIU Z. Carnosic acid attenuates acute ethanol-induced liver injury via a SIRT1/p66Shc-mediated mitochondrial pathway. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology*, 2016, 94(4):416-425.
- [10] FAVETTA L A, MADAN P, MASTROMONACO G F, ST JOHN E J, KING W A, BETTS D H. The oxidative stress adaptor p66Shc is required for permanent embryo arrest in vitro. *BMC Developmental Biology*, 2007, 7:132.
- [11] BAIN N T, MADAN P, BETTS D H. Elevated p66Shc is associated with intracellular redox imbalance in developmentally compromised bovine embryos. *Molecular Reproduction & Development*, 2013, 80(1):22-34.
- [12] BETTS D H, MADAN P. Permanent embryo arrest: Molecular and cellular concepts. *Molecular Human Reproduction*, 2008, 14(8):445-453.
- [13] REN K, LI X, YAN J, HUANG G, ZHOU S, YANG B, MA X, LU C. Knockdown of p66Shc by siRNA injection rescues arsenite-induced developmental retardation in mouse preimplantation embryos. *Reproductive Toxicology*, 2014, 43:8-18.
- [14] BETTS D H, BAIN N T, MADAN P. The p66Shc Adaptor Protein Controls Oxidative Stress Response in Early Bovine Embryos. *PLoS One*, 2014, 9(1):e86978.
- [15] AGARWAL A, VIRK G, ONG C, DU PLESSIS S S. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World Journal of Mens Health*, 2014, 32(1):1-17.
- [16] PRASAD S, TIWARI M, PANDEY A N, SHRIVASTAV T G, CHAUBE S K. Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. *Journal of Biomedical Science*, 2016, 23:36.
- [17] 赵学明, 杜卫华, 王栋, 郝海生, 朱化彬. 不同冷冻方法对牛体外胚胎 ATP 含量与 ROS 水平的影响. *中国农业科学*, 2012, 45(1):170-177.
ZHAO X M, DU W H, WANG D, HAO H S, ZHU H B. Effect of controlled freezing and open-pulled straw (OPS) vitrification on ATP content and reactive oxygen species (ROS) level of bovine in vitro produced blastocysts. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(1):170-177. (in Chinese)
- [18] TIWARI M, PRASAD S, TRIPATHI A, PANDEY A N, ALI I, SINGH A K, SHRIVASTAV T G, CHAUBE S K. Apoptosis in mammalian oocytes: a review. *Apoptosis*, 2015, 20(8):1019-1025.
- [19] CAGNONE G, SIRARD M A. The embryonic stress response to *in vitro* culture: insight from genomic analysis. *Reproduction*, 2016, 152(6):R247-R261.
- [20] EDWARDS N A, WATSON A J, BETTS D H. p66Shc, a key regulator of metabolism and mitochondrial ROS production, is dysregulated by

- mouse embryo culture. *Molecular Human Reproduction*, 2016, 22(9): 634-647.
- [21] ORSINI F, MORONI M, CONTURSI C. Regulatory effects of the mitochondrial energetic status on mitochondrial p66Shc. *Biological Chemistry*, 2006, 387:1405-1410.
- [22] 顾闻, 陈川. 氧化应激下的 p66Shc 调控作用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014(9):870-873.
- GU W, CHEN C. Regulatory role of p66Shc in oxidative stress. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2014(9): 870-873. (in Chinese)
- [23] FAVETTA L A, ROBERT C, ST JOHN E J, BETTS D H, KING W A. p66shc, but not p53, is involved in early arrest of in vitro-produced bovine embryos. *Molecular Human Reproduction*, 2004, 10(6): 383-392.
- [24] BABAYEV E, SELI E. Oocyte mitochondrial function and reproduction. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 2015, 27(3):175-181.
- [25] 敬晓棋, 雷安民, 屈雷, 窦忠英. 牛-山羊异种体细胞克隆胚胎线粒体形态超微结构观察. *中国农业科学*, 2010, 43(12):2548-2554.
- JING X Q, LEI A M, QU L, DOU Z Y. The Mitochondrial ultrastructure of interspecies cloned embryos of bovine-goat. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43 (12): 2548-2554. (in Chinese)
- [26] 庞云渭. 褪黑素抑制牛卵母细胞及体外受精卵胚胎氧化损伤的作用机制[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- PANG Y W. Mechanism of melatonin inhibiting oxidative damage in bovine oocytes and *in vitro* fertilized embryos[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016. (in Chinese)
- [27] CAMICI G G, SCHIAVONI M, FRANCIA P, BACHSCHMID M, MARTIN-PADURA I, HERSBERGER M, TANNER F C, PELICCI P, VOLPE M, ANVERSA P, LÜSCHER T F, COSENTINO F. Genetic deletion of p66Shc adaptor protein prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(12):5217-5222.
- [28] TAKAHASHI T, IGARASHI H, AMITA M, HARA S, MATSUO K, KURACHI H. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: mini review. *Journal of Obstetrics & Gynaecology Research*, 2013, 39(10):1431-1439.
- [29] DUMOLLARD R, WARD Z, CARROLL J, DUCHEN M R. Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo. *Development*, 2007, 134: 455-465.
- [30] DAN D J, ALVAREZ L A, ZHANG X, SOLDATI T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biology*, 2015, 6:472-485.
- [31] BOGLIOLO L, MURRONE O, DI EMIDIO G, PICCININI M, ARIU F, LEDDA S, TATONE C. Raman spectroscopy-based approach to detect aging-related oxidative damage in the mouse oocyte. *Journal of Assisted Reproduction & Genetics*, 2013, 30: 877-882.
- [32] NIKDEL K, AMINAFSHAR M, MOHAMMADI-SANGCHESHMEH A, EMAMJOMEH-KASHAN N, SEYEDJAFARI E. H₂O₂-induced mild stress in relation with *in vitro* ovine oocyte developmental competence: implications for blastocyst apoptosis and related genes expression. *Cellular and Molecular Biology*, 2017, 63(5):43-49.

(责任编辑 林鉴非)