

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.29.016

白藜芦醇对卵泡颗粒细胞线粒体的调节作用及人工辅助生殖效果的影响

陈 兰¹, 胡 沙², 李素萍^{1△}

(1. 湖北民族学院附属民大医院妇科, 湖北恩施 445000;

2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院, 武汉 430022)

[摘要] **目的** 探讨口服白藜芦醇对卵泡颗粒细胞线粒体功能及人工辅助生殖技术(ART)效果的影响。**方法** 研究入组受试对象 109 例, 其中, 对照组 59 例, 白藜芦醇组 50 例。分析其颗粒细胞氧化应激水平和线粒体功能, 检测胚胎发育和妊娠结局相关指标及不良反应。**结果** 白藜芦醇使颗粒细胞的还原型辅酶 II (NADPH) 氧化活性下降了 28.57% ($P < 0.05$), 同时也降低了丙二醛(MDA)水平 (0.653 ± 0.084) nmol/mL vs. (0.382 ± 0.052) nmol/mL, ($P < 0.05$)。白藜芦醇增加了线粒体 DNA(mtDNA) 拷贝数 (4.62 ± 0.24) $\times 10^5$ vs. (5.77 ± 0.38) $\times 10^5$, ($P < 0.05$) 和 ATP 生成 (2.516 ± 0.160) pmol vs. (4.484 ± 0.180) pmol, ($P < 0.05$)。白藜芦醇组较之对照组其卵成熟率 (87.75% vs. 94.15%, $P < 0.05$)、受精率 (86.69% vs. 91.49%, $P < 0.05$) 和优质胚胎率 (44.30% vs. 51.22%, $P < 0.05$) 均显著提高, 且尚未发现有明显的不良反应。**结论** 白藜芦醇可能对提高 ART 的成功率具有一定的辅助作用。

[关键词] 人工辅助生殖技术; 白藜芦醇; 颗粒细胞**[中图分类号]** R71**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)29-4080-03

Effect of resveratrol on the granulosa cell mitochondrial function and ART pregnancy outcome

Chen Lan¹, Hu Sha², Li Suping^{1△}

(1. Department of Gynaecology and Obstetrics, University Hospital of Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei 445000, China; 2. Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430022, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of resveratrol supplement to the granulosa cell mitochondrial function and assisted reproductive technology (ART) outcome. **Methods** The study would analyze the level of oxidative stress and mitochondrial function in granulosa cell from 109 cases with or without resveratrol supplement, including 50 cases in resveratrol group and 59 cases as control group. The embryo quality, IVF-ET outcome and adverse reactions would be observed. **Results** Resveratrol reduced the NADPH oxidation activity of granule cells by 28.57% ($P < 0.05$), and also decreased the MDA content (0.653 ± 0.084) nmol/mL vs. (0.382 ± 0.052) nmol/mL, ($P < 0.05$). Moreover, resveratrol supplement improved the mitochondrial DNA copy number (4.62 ± 0.24) $\times 10^5$ vs. (5.77 ± 0.38) $\times 10^5$, ($P < 0.05$) and ATP production (2.516 ± 0.160) pmol vs. (4.484 ± 0.180) pmol, ($P < 0.05$) in granulosa cell. Compared with the control group, the oocyte maturation rate (87.75% vs. 94.15%, $P < 0.05$), fertilization rate (86.69% vs. 91.49%, $P < 0.05$) and high quality embryo rate (44.30% vs. 51.22%, $P < 0.05$) in the resveratrol group were significantly increased. Meanwhile, the resveratrol supplement did not show any adverse effect. **Conclusion** Resveratrol might be a adjunctive therapy to the ART.

[Key words] assisted reproductive technology; resveratrol; granulosa cell

人工辅助生殖技术 (assisted reproductive technology, ART) 是目前治疗不孕不育的重要方法之一。目前, 全球 1.1%~2.0% 的新生儿依靠辅助生殖技术出生, 这一技术的发展还在不断的进展中^[1]。在 ART 的开展过程中, 颗粒细胞 (granulosa cells, GCs) 对胚胎着床率和妊娠率具有重要的作用。颗粒细胞是组成卵泡的主要细胞成分, 调节了卵母细胞的成熟及其胞核和胞质的正常分裂。而颗粒细胞线粒体的功能与卵母细胞的质量, 以及女性生育能力具有密切的关系^[2-3]。因此, 调节线粒体功能可能是改善卵母细胞活性和提高 ART 成功率的有效途径之一。白藜芦醇(resveratrol, Res) 是一种富含于桑葚、花生和葡萄等植物果实内的天然小分子多酚类物质, 具有抗氧化、调节线粒体功能的作用^[4]。有研究显示, Res 对于体外培养的卵泡及受精卵均有正向的调节作用^[5-6], 而口服 Res 对于颗粒细胞的作用及对 ART 成功率的影响尚鲜有报道。因此, 本研究将就口服 Res 对志愿者卵泡颗粒细胞线粒

体功能及 ART 的效果进行探讨, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究选择 2010 年 9 月至 2012 年 4 月来武汉协和医院辅助生殖中心接受 ART 的患者 120 名, 分为对照组和 Res 组各 60 名, 均采用常规体外受精-胚胎移植术 (IVF-ET)。所有入组对象均经过腹腔镜、子宫输卵管造影术、生殖内分泌检查、精液检查、遗传学检查及 B 超等相关检查, 证实不育原因主要为输卵管盆腔因素、子宫内膜异位症、多囊卵巢综合征, 符合 IVF-ET 术的适应证, 并排除泌尿生殖系统感染、性传播疾病、遗传疾病、子宫疾患等禁忌证, 排除男性少弱精症或无精症等对研究结果有影响的男方因素。患者均有意愿接受 IVF-ET 术, 并告知药物可能产生的不良反应, 签署知情同意书, 告知受试对象在该项研究中具有自主权。Res 组给予 Res 胶囊(GNC, 美国), 500 mg/d, 连续服用 6 周, 于取卵前停药。本研究入组受试对象 120 名, 研究结束时保留受试对象

109 名,其中,对照组 59 名,Res 组 50 名;对照组失访 1 例,Res 组不能耐受治疗 6 例,失访 4 例。两组间患者年龄、不孕时间、基础卵泡数目、激素基础水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组一般情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组 (n=59)	Res 组 (n=50)	P
年龄(岁)	33.20±4.22	32.60±4.91	0.494
不孕时间(年)	4.27±1.64	4.37±1.89	0.768
基础卵泡数(n)	16.10±5.31	15.30±6.36	0.473
雌二醇 (pmol/L)	163.50±89.7	167.60±88.3	0.811
FSH(IU/L)	7.93±4.43	8.21±3.62	0.722

1.2 方法

1.2.1 促排卵方案及颗粒细胞获取 所有入组对象均采用长方案控制性促排卵。(1)于黄体中期使用短效促性腺激素释放激素激动剂皮下注射(GnRH-a, triptorelin, 德国辉凌),剂量 0.05 mg/d。在此过程中,通过 B 超监测双侧卵泡数量及大小,使卵泡直径均小于 8 mm,如出现卵泡囊肿则 B 超引导下穿刺引流。(2)根据患者情况注射促性腺激素(Gn, 珠海丽珠),直至出现 1 个以上直径大于 18 mm 的卵泡,予以肌肉注射人绒毛膜促性腺激素(hCG, 珠海丽珠) 10 000 U。注射 hCG 后 36 h,在异丙酚麻醉下经阴道超声引导穿刺取卵。取卵后 1 h 使用透明质酸酶脱颗粒细胞,并将脱落颗粒细胞,2 500 r/min,离心 10 min,收集细胞团用于后续实验。卵泡行 IVF,并于 72 h 后移植卵裂期胚胎。移植 4 周后,行 B 超检查,以宫内见孕囊确定临床妊娠。

1.2.2 实验室检测 氧化应激水平由丙二醛(MDA)和还原型辅酶 II(NADPH)活性反映。提取颗粒细胞团的蛋白,利用 MDA 试剂盒(南京建成,中国)测定 MDA 水平,使用 NADPH 氧化活性试剂盒(Genmed Scientifics,美国)。线粒体的 ATP 生成采用 ATP 检测试剂盒(碧云天,中国)分析。线粒体 DNA(mtDNA)拷贝数比较采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)的方法,以 MT-ND1 基因反映 mtDNA 的拷贝数,以 HGB 基因作为内参。ND1 基因的引物如下。上游:5'-CCC TAA AAC CCG CCA CAT CT-3',下游:5'-GAG CGA TGG TGA GAG CTA AGG T-3';HGB 基因的引物为:上游:5'-GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG A-3',下游:5'-CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG-3。MT-ND1 扩增条件为:95 °C 10 min,95 °C 15 s 40 个循环,60 °C 1 min;HGB 的扩增条件为:95 °C 10 min,95 °C 15 s 40 个循环,56 °C 1 min。

1.2.3 胚胎发育和妊娠结局的评价指标 本研究利用卵成熟率、受精率及优质胚胎率和临床妊娠率对胚胎发育及妊娠结局进行评价。卵成熟率=M II 卵数/获卵总数×100%;受精率=2PN 数/M II 卵数×100%;优质胚胎率= I ~ II 级胚胎数/获卵总数×100%;临床妊娠率=临床妊娠数/移植周期数×100%。

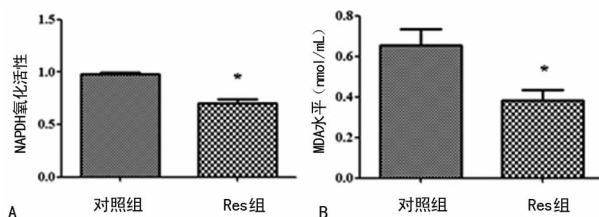
1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 进行统计分析处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验;计数资料以率表示,采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Res 对颗粒细胞氧化应激水平的影响 口服 Res 使卵泡颗粒细胞的 NADPH 氧化活性下降了 28.57%,并显著低于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外,Res 组颗粒细胞的 MDA 水平 (0.382 ± 0.052) $\mu\text{mol/mL}$ 显著的低于对照组

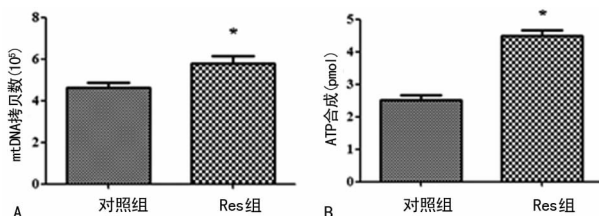
(0.653 ± 0.084) nmol/mL , ($P < 0.05$),见图 1。

2.2 Res 对颗粒细胞线粒体功能的影响 Res 显著的提高了卵泡颗粒细胞 mtDNA 的拷贝数,从对照组的 (4.62 ± 0.24) $\times 10^5$ 上升为 (5.77 ± 0.38) $\times 10^5$ ($P < 0.05$)。进一步研究发现,Res 组线粒体 ATP 的合成 (4.484 ± 0.180) pmol 显著高于对照组 (2.516 ± 0.160) pmol ,其能量代谢水平较高 ($P < 0.05$),见图 2。



A:Res 对颗粒细胞 NADPH 氧化活性的作用;B:Res 对颗粒细胞 MDA 水平的作用。* : $P < 0.05$,与对照组比较。

图 1 Res 对颗粒细胞氧化应激水平的影响



A:Res 对颗粒细胞 mtDNA 的作用;B:Res 对颗粒细胞 ATP 生成的作用。* : $P < 0.05$,与对照组比较。

图 2 Res 对颗粒细胞氧化应激水平的影响

2.3 口服 Res 对胚胎发育和妊娠结局的作用 对照组移植 59 周期,Res 组移植 50 周期,后者的卵成熟率由 87.75% 上升为 94.15%,受精率由 86.69% 上升为 91.49%,优质胚胎率由 44.30% 上升为 51.22%,3 项指标均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。Res 组的临床妊娠率为 48.0%,高于对照组的 44.1%,但二者间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2。

表 2 Res 对胚胎发育及妊娠结局的影响

项目	对照组 (n=59)	Res 组 (n=50)	P
平均获卵数(n)	11.90±3.93	12.30±5.61	>0.05
平均移植胚胎数(n)	2.08±0.51	2.17±0.62	>0.05
卵成熟率(%)	87.75	94.15*	<0.05
受精率(%)	86.69	91.49*	<0.05
优质胚胎率(%)	44.30	51.22*	<0.05
临床妊娠率(%)	44.10	48.00	>0.05

* : $P < 0.05$,与对照组比较。

2.4 药物不良反应评价 对照组和 Res 组在畸胎率、死胎率及流产率上差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。孕妇发生妊娠高血压疾病和妊娠期糖尿病的比率在二组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 3。

表 3 Res 的不良不良反应评价 [n(%)]

项目	对照组 (n=59)	Res 组 (n=50)	P
畸胎率	0(0)	0(0)	
死胎率	0(0)	0(0)	
流产率	5(8.47)	4(8.00)	0.605
妊娠高血压疾病发生率	3(5.08)	3(6.00)	0.579
妊娠期糖尿病发生率	4(6.78)	3(6.00)	0.592

3 讨 论

Res 作为一类天然小分子多酚类化合物,其抗氧化作用逐步受到民众的关注。近年来,较多的研究表明,Res 与女性健康密切相关。有研究显示,Res 具有类雌激素效应,可显著增加卵巢和子宫的湿质量,这一作用依赖于 Res 与雌激素 α 和 β 受体的结合^[7-8]。本研究发现,口服 Res(500 mg/d,6 周)可显著的降低卵泡颗粒细胞的氧化应激水平,增加颗粒细胞线粒体的合成和 ATP 生成。这一作用与前期的体外细胞实验相类似。早期研究显示,Res 可通过抑制脂氧合酶和环加氧酶的活性,减少颗粒细胞的凋亡^[9]。Sugiyama 等^[5]研究也指出 Res 通过增加颗粒细胞的线粒体生物合成和降解,从而对卵母细胞的生长发挥了积极的作用。而 Res 对颗粒细胞的抗氧化作用可能与抑制核因子 κ B(NF- κ B),抑制环加氧酶活性等作用有关^[10]。

另一方面,研究发现,Res 增高了 IVF-ET 后的卵成熟率、受精率及优质胚胎率;此外,Res 组增高了临床妊娠率,但与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。这与 Res 对颗粒细胞的积极作用有关。颗粒细胞对卵母细胞的成熟具有重要的作用^[11]。同时,Res 对于卵泡细胞亦有直接的保护作用。Res 可减缓卵泡闭锁的过程,增加卵泡的储备量,延长卵巢的功能期^[12]。Liu 等^[13]研究发现,给予老年小鼠 Res 后,改善了其卵巢的端粒酶活性、端粒长度和年龄相关基因的表达水平。此外,也有研究者认为,Res 对于多囊卵巢综合征及 IVF 术后的卵巢过度刺激综合征同样具有预防作用,但仍需进一步证实^[10]。

近期有报道指出,孕期使用 Res 可能对阻碍胎儿胰腺的发育,增加子代罹患糖尿病的风险^[14]。本研究于 ART 前期给予患者口服 Res,其不良反应尚未见报道。因此,笔者对口服 Res 的不良反应发生率进行了分析,结果发现,两组在畸胎率、死胎率、流产率及妊娠高血压疾病和妊娠期糖尿病的发生率上差异均无统计学意义($P>0.05$)。而前期的动物实验同样也没有发现 Res 具有致畸等不良反应^[15]。

参考文献

- [1] Kupka MS, D'Hooghe T, Ferraretti AP, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHRE dagger[J]. Hum Reprod, 2016, 31(2): 233-248.
- [2] Gannon AM, Stampfli MR, Foster WG. Cigarette smoke exposure elicits increased autophagy and dysregulation of mitochondrial dynamics in murine granulosa cells[J]. Biol Reprod, 2013, 88(3): 63.
- [3] Wang Q, Frolova AI, Purcell S, et al. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in cumulus cells of type I diabetic mice[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15901.

- [4] Gibellini L, Bianchini E, De Biasi S, et al. Natural compounds modulating mitochondrial functions [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015(2015): 527209.
- [5] Sugiyama M, Kawahara-Miki R, Kawana H, et al. Resveratrol-induced mitochondrial synthesis and autophagy in oocytes derived from early antral follicles of aged cows [J]. J Reprod Dev, 2015, 61(4): 251-259.
- [6] Takeo S, Sato D, Kimura K, et al. Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes[J]. J Reprod Dev, 2014, 60(2): 92-99.
- [7] Basini G, Tringali C, Baioni L, et al. Biological effects on granulosa cells of hydroxylated and methylated resveratrol analogues[J]. Mol Nutr Food Res, 2010, 54(Suppl 2): S236-243.
- [8] Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, et al. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta[J]. Endocrinology, 2000, 141(10): 3657-3667.
- [9] MacCarrone M, Lorenzon T, Guerrieri P, et al. Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity[J]. Eur J Biochem, 1999, 265(1): 27-34.
- [10] Ortega I, Duleba AJ. Ovarian actions of resveratrol[J]. Ann N Y Acad Sci, 2015, 1348(1): 86-96.
- [11] Jahromi BN, Mosallanezhad Z, Matloob N, et al. The potential role of granulosa cells in the maturation rate of immature human oocytes and embryo development: a co-culture study[J]. Clin Exp Reprod Med, 2015, 42(3): 111-117.
- [12] Chen ZG, Luo LL, Xu JJ, et al. Effects of plant polyphenols on ovarian follicular reserve in aging rats[J]. Biochem Cell Biol, 2010, 88(4): 737-745.
- [13] Liu M, Yin Y, Ye X, et al. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice[J]. Hum Reprod, 2013, 28(3): 707-717.
- [14] Roberts VH, Pound LD, Thorn SR, et al. Beneficial and cautionary outcomes of resveratrol supplementation in pregnant nonhuman primates[J]. FASEB J, 2014, 28(6): 2466-2477.
- [15] Williams LD, Burdock GA, Edwards JA, et al. Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals[J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(9): 2170-2182.

(收稿日期:2016-02-22 修回日期:2016-04-11)

(上接第 4079 页)

et al. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland[J]. J Clin Virol, 2010, 48(1): 49-54.

- [12] 梁金秋, 庞琳, 李洪杰, 等. 2011 年度 288 例儿童手足口病住院患者的病原学分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2013, 7(6): 825-829.
- [13] 卫海燕, 许玉玲, 黄学勇, 等. 肠道病毒分子分型研究进展

[J]. 中国病毒病杂志, 2012, 2(1): 72-76.

- [14] 邓东佳, 吴茜. 手足口病原学及其诊断研究进展[J]. 医学信息, 2014, 27(2): 474-475.
- [15] 周艳, 李维春, 徐元宏. 手足口病实验室诊断的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(8): 886-888.

(收稿日期:2016-02-21 修回日期:2016-04-09)