

# 抗氧化剂延缓卵母细胞老化

叶小芳 陈静波<sup>1</sup> 黄俊成<sup>1\*</sup>(石河子大学动物科技学院, 石河子 832000; <sup>1</sup>新疆畜牧科学院农业部草食家畜繁育生物技术重点开放实验室, 乌鲁木齐 830000)

**摘要** 哺乳动物由于其卵子老化发生卵子质量下降, 从而导致老化卵母细胞受精后发育而来的胚胎非整倍体率增高, 妊娠流产率增加, 对后代产生了严重影响。研究表明一定剂量的抗氧化剂可以延缓卵母细胞的老化, 提高卵母细胞的质量, 抵抗卵子老化造成的负面影响。

**关键词** 抗氧化剂; 卵母细胞; 老化; 发育

人们很早就发现, 许多哺乳动物的异常发育都与卵母细胞在输卵管内发生老化有着密切的联系, 人类以及其他高龄哺乳动物由于其卵子老化而造成流产或畸形胚的现象屡见不鲜, 这也成为困扰医学界的一大难题。目前, 体外成熟卵母细胞已在动物繁殖技术如体外受精、精子注射和核移植上有着广泛的应用, 制约这些技术在生产中进一步推广应用的一个主要原因就是效率低下, 造成生产成本过高, 而卵母细胞质量的好坏则是影响其效率的重要原因之一。控制卵母细胞老化将给这些技术带来很多好处, 既可取消对操作时间的限制, 而且卵母细胞的质量也能得到保证。如今寻求延缓卵母细胞老化的途径已经成为当前生殖生物学的研究热点。大量研究表明使用一定剂量的抗氧化剂可以延缓卵母细胞的老化, 提高卵母细胞的质量, 现就抗氧化剂对卵母细胞老化及后续早期胚胎发育影响的研究进展作一概述。

## 1 卵母细胞老化

胚胎的发育潜能取决于卵母细胞的发育潜能, 卵母细胞的质量对于体外胚胎生产、克隆等生物技术的有效应用至关重要。卵母细胞任何异常变化都会影响发育, 比如老化。哺乳动物成熟卵母细胞一般都停滞在第二次减数分裂中期(MII期), 直到有精子穿入或给予适当刺激时才能解除停滞并恢复减数分裂。若 MII 期卵母细胞不及时受精或激活, 就会发生老化。试验表明, 卵母细胞排出后在体内和体外不同程度的老化都影响其受精及孤雌激活的能力<sup>[1]</sup>, 延长培养时间的猪卵母细胞其活化率和碎裂率都增高<sup>[2,3]</sup>。哺乳动物老化卵母细胞受精后发育而来的胚胎非整倍体率增高, 妊娠流产率增加, 而且配子老化也可能通过一些细胞/分子途径影响发育。此外, 配

子老化有可能以疾病的形式对孕体产生远期效应<sup>[4]</sup>。控制卵母细胞的老化进程对于现代辅助生殖技术(assisted reproductive technique, ART)来说尤其重要, 体内或体外成熟的卵母细胞经常用于体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)、胞内单精子注射和核移植, 卵母细胞老化显著影响这些技术的效率, 因此, 控制卵母细胞老化非常有利于 ART。

## 2 氧自由基引起卵母细胞老化并且影响胚胎早期发育

自由基学说提出: 随着年龄的增长体内产生的自由基也逐渐增多。因自由基随老化渐增, 使过氧化脂质也增加, 同时体内清除自由基的功能却逐减, 以致自由基导致的损伤不断积累, 进一步加重老化。大多数在卵母细胞老化过程中发生的退行性变化以及对后代造成的短期或/和长期影响可以从氧自由基对卵母细胞的损伤方面来解释。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是正常有氧代谢的重要产物, 正常情况下 ROS 的产生和清除保持动态平衡, 当这种平衡被破坏而倾向于 ROS 过多时, 就产生了氧分压(oxidative stress, OS), OS 影响卵母细胞成熟、受精、胚胎发育和妊娠一系列的生理过程。研究表明 OS 导致的老化能引起受精能力下降, 并可能影响妊娠、正常生产甚至引起早产<sup>[5]</sup>。ROS 过度升高可通过直接影响细胞内钙离子储存结构, 干扰钙离子动态平衡<sup>[6]</sup>, 引起卵母细胞减数分裂停滞和降解, 继而发生凋亡。ROS 是决定胚胎发

收稿日期: 2008-11-05 接受日期: 2009-05-14

新疆维吾尔自治区科技攻关和重点项目(No.200841122)和中国博士后科学基金资助项目

\* 通讯作者。Tel: 0991-4835903, E-mail: h\_jc@163.com

育、引起形态改变如胞质浓缩和产生凋亡小体的重要因素。环境的氧浓度可能导致胚胎内 ROS 增加,进而导致胚胎胞质碎片化和凋亡<sup>[7]</sup>。

氧化损伤可以诱导体外培养小鼠卵母细胞减数分裂中产生非整倍体<sup>[8]</sup>,而抗氧化治疗可以抵消母体年龄对减数分裂和染色体分离的一些不良影响。

### 3 抗氧化剂对卵母细胞质量和早期胚胎发育的影响

目前,大家逐渐意识到保护卵母细胞和附植前胚胎免受氧化损伤的重要性,ROS和抗氧化剂对生殖功能的影响已经成为了大家研究的焦点<sup>[9,10]</sup>。为了优化体外胚胎生产,在体外培养过程中,必须要控制 ROS 的产生。目前主要是通过减少环境中的氧浓度,在培养基中添加抗氧化剂等途径来保护卵母细胞和胚胎不受到氧化损伤。

与氧化底物相比,抗氧化剂浓度较低,但能显著延缓或抑制底物的氧化<sup>[11]</sup>。抗氧化剂分防御性和清除性两种。防御性的抗氧化剂其作用是阻止新的 ROS 的形成,如金属螯合剂和金属结合蛋白;而清除性的抗氧化剂主要是清除已经形成的 ROS。按其性质可分为酶类和非酶类抗氧化剂。

#### 3.1 非酶类抗氧化剂

许多化学物质具有抗氧化功能,包括咖啡因、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、次牛磺酸、牛磺酸和半胱胺,维生素 A、C 和 E,丙酮酸钠、硫柳汞、二酰胺、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、 $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -mercaptoethanol,  $\beta$ -ME)、L-胱氨酸、己酮可碱、转铁蛋白、白蛋白、去氧腺苷等。

3.1.1 咖啡因 越来越多的证据表明咖啡因是一种非常重要的抗氧化分子。咖啡因可以延迟卵母细胞的老化过程,其机制可能是通过抑制 Myt1/Wee1 通路而抑制老化卵母细胞中的 Cdc2 (cell division cycle 2)磷酸化从而升高成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF)的活性。用咖啡因处理培养 72 h 的老化卵母细胞,其 MPF 水平降低,但 MPF 活性升高,孤雌激活率显著下降和碎片率下降<sup>[12]</sup>。咖啡因延长了猪卵母细胞处于生发泡期的减数分裂阻滞,能使培养 24 h 后的卵母细胞环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)水平显著升高。然而,经过咖啡因处理后的卵母细胞在人工激活后其囊胚率显著低于对照组<sup>[13]</sup>。咖啡因处理猪核移植胚胎,其

染色体浓缩率和囊胚率都增加了,这可能是由于在核移植过程中咖啡因引起的 MPF 活性增强的缘故<sup>[14]</sup>。

过量咖啡因能提高 MPF 和促有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)活性,导致核膜破裂,但是并不影响囊胚率,然而总的胚胎数显著增加<sup>[15]</sup>。咖啡因对体内成熟的卵母细胞质量没有影响,而对体外成熟的卵母细胞质量具有危害作用<sup>[16]</sup>。己酮可碱和去氧腺苷对卵母细胞的毒性大于咖啡因,尤其在浓度高和长时间的情况下毒性更大<sup>[17]</sup>。大剂量的咖啡因对正常细胞有不良的影响。

3.1.2 DTT DTT 与巯基乙醇作用相似,但刺激性气味要小得多,毒性也比巯基乙醇低得多。DTT 比巯基乙醇的浓度低 7 倍时,两者效果相近。DTT 对老化卵母细胞的作用机制还不是很清楚,可能是通过阻止自由基的氧化或通过一种氧化还原信号途径来调节细胞的碎裂和死亡。DTT 中的巯基与氧自由基结合,中断自由基链反应,从而阻止了自由基对细胞膜产生脂质过氧化,保护了细胞膜的完整性。服用不同浓度 DTT 都具有不同程度的抗脂质过氧化作用。去除卵丘细胞的老龄鼠的卵母细胞经过硫柳汞和 DTT 处理后,其孤雌激活率降低,并且排出第二极体,呈现出高水平的 MPF 和 MAPK 活性;与青年小鼠的卵母细胞相比,其胞质内的谷胱甘肽 S-转移酶活性和巯基化合物水平都较低<sup>[18]</sup>。培养液中添加 DTT 可以减轻老化引起的受精 24 h 细胞碎片的出现和囊胚率降低的现象<sup>[19]</sup>。将 10~12 周末促排的老龄鼠生发泡期的卵母细胞在添加或不添加二酰胺和 / 或 DTT 的培养液中进行体外培养,与只添加二酰胺组相比,二酰胺和 DTT 的添加降低了阻滞在第一次减数分裂的卵母细胞或具有有丝分裂末期染色体构型的卵母细胞比例<sup>[20]</sup>。

3.1.3  $\beta$ -ME 和半胱胺 在体外成熟(*in vitro* maturation, IVM)培养液中添加 $\beta$ -ME和半胱胺能提高卵母细胞胞内 GSH 含量及 IVF 后的发育能力<sup>[21-25]</sup>,提高卵母细胞成熟率及囊胚率<sup>[25-27]</sup>,促进雄原核的形成<sup>[28]</sup>。IVM 培养基里添加 $\beta$ -ME 提高了奶牛<sup>[29]</sup>、水牛<sup>[24]</sup>、绵羊<sup>[21]</sup>囊胚的质量,但没有提高囊胚率;由于 ROS 如超氧化阴离子和过氧化氢能促进精子获能<sup>[30,31]</sup>, $\beta$ -ME 可能会阻止精子获能,事实上,在 IVF 期间添加抗氧化剂降低了精子穿透率<sup>[32]</sup>。在 IVM 和体外胚胎培养(*in vitro* culture, IVC)的培养基中添加半胱氨酸有利于胚胎发育,而象过氧化氢酶(catalase, CAT)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)这样

的细胞内抗氧化剂却没有促进作用<sup>[33]</sup>。

**3.1.4 GSH** GSH也是一种有效的非酶类抗氧化剂之一<sup>[34]</sup>。卵母细胞体外培养基添加GSH能促进雄原核的形成和正常受精以及胚胎发育<sup>[27,35-39]</sup>。

**3.1.5 维生素 C (vitamin C, VC)、维生素 E (vitamin E, VE)** 在卵母细胞培养液里加入VC或VE可以显著增加GSH含量,促进卵母细胞的胞质成熟以及基因转染的供体细胞重够胚的发育,但它们之间没有协同作用<sup>[40]</sup>。VC可以减少H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对卵母细胞的损伤并且对卵母细胞无害,对体外MII期裸卵的微管结构和染色体排列有保护作用<sup>[41]</sup>。VC、VE都可以减轻老化对小鼠卵母细胞的副作用,使得MII期赤道板的染色体分布正常<sup>[42]</sup>;显著提高人卵泡液内维生素水平,提高大龄妇女可用卵母细胞数和妊娠率,降低卵母细胞非整倍体发生率<sup>[43]</sup>。

在抵抗ROS诱导的胚胎毒性时,VC比VE更有效<sup>[44]</sup>。最适浓度的VC、VE能支持减数分裂成熟,但浓度过高会产生副作用,当剂量超出安全的临界点时就会诱导生殖紊乱以及其他的一些机能障碍<sup>[45]</sup>。

**3.1.6 其他抗氧化剂** 叶酸能提高卵母细胞质量和促进卵母细胞成熟<sup>[46]</sup>。小鼠实验表明叶酸对于附植前胚胎是必需的,可能是因为在DNA合成和修复过程中脱氧胸腺嘧啶的合成时叶酸非常重要。在受精过程中添加叶酸也非常重要<sup>[47]</sup>。褪黑激素可以抵抗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对卵母细胞的副作用,提高受精率<sup>[48]</sup>。N-乙酰半胱氨酸阻止减数分裂纺锤体发生损伤,抵抗亚砷酸盐诱导的减数分裂异常和延迟的IVM<sup>[49]</sup>。环孢菌素可以阻止H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引起的卵母细胞发生Ca<sup>2+</sup>增加和胞质三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)水平下降<sup>[50]</sup>。一氧化氮(nitric oxide, NO)能延缓卵母细胞老化和促进青年鼠以及老龄鼠微管纺锤体装置的完整性。NO处理后的青年鼠和老龄鼠的卵母细胞卵质微管动力学(ooplasm microtubule dynamics, OMD)与透明带溶解时间都显著减少,老龄鼠皮质颗粒自发丢失减少。降低了卵母细胞纺锤体异常率<sup>[51]</sup>。鸟苷酸环化酶是MII期阻滞的一个关键调节因子<sup>[52]</sup>,在阻止卵母细胞老化过程中发挥重要作用。鸟苷酸环化酶处理后,未老化和老化的卵母细胞透明带溶解时间和OMD显著降低。此外,皮质颗粒胞吐显著减少。鸟苷酸环化酶能刺激大鼠和仓鼠卵母细胞减数分裂恢复<sup>[20,53-55]</sup>。

## 3.2 酶类抗氧化剂

一些抗氧化物酶如SOD、CAT或谷胱甘肽过氧

化物酶(glutathione peroxidase, GPX)可以保护卵母细胞和胚胎免受氧化损伤<sup>[56]</sup>。铜-锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD)、锰-超氧化物歧化酶(Mn-SOD)可以清除超氧化的自由基。CAT或GPX可以清除SOD反应的副产品——H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。GPX在细胞抗氧化方面发挥重要的功能。在谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)和谷氨酰半胱氨酸合成酶的基础上,细胞能维持GSH的浓度。诱导小鼠胚胎GSH耗竭后,2细胞胚胎和囊胚会在45 min内恢复GSH浓度<sup>[57]</sup>。由此表明GR对胚胎具有保护作用。

酶类抗氧化剂对卵母细胞和胚胎ROS的防御主要是依靠内源性的抗氧化物酶<sup>[58]</sup>,这些酶以mRNA的形式存在于卵母细胞中。整套母源转录物在胚胎发育期间呈下降趋势直到合子基因组活化。母源mRNA在卵母细胞成熟过程中的合成或累积的变化可能影响体外胚胎发育,这种影响一直持续到合子基因组活化,当转录下降到一个关键的临界点以下时,就会导致发育阻滞。

SOD催化超氧离子歧化成H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,对保护胚胎免受氧自由基损伤非常重要。添加SOD有助于克服2细胞发育阻滞。牛卵母细胞不同发育阶段都能检测到Mn-SOD、Cu/Zn-SOD、GCS、GPX和甲基甘氨酸氧化酶五种酶的转录物<sup>[59]</sup>。有趣的是,胞质内Cu/Zn-SOD转录物在IVM的卵母细胞表达水平显著高于其他基因,Mn-SOD的转录物在生发泡期的卵母细胞中表达,而在MII期卵母细胞不表达<sup>[60]</sup>。

老化引起ROS的增加似乎更多的归因于生物体内酶类抗氧化剂防御能力的下降,而不是非酶类抗氧化剂。然而,对于老化过程中非酶类抗氧化剂防御能力的下降仍然存在争议,抗氧化剂对卵母细胞的功效也有差异,这些差异可能是由于每个作者采取的研究方案不同造成的。

卵母细胞和胚胎受到了整个抗氧化系统的共同调节。ROS的来源随着品种、发育阶段和培养条件的不同也有差异。卵母细胞抵抗ROS的防御机制在各个阶段都不尽相同。卵母细胞不同发育阶段的抗氧化防御机制的综合性和完整性有利于提高卵母细胞的综合质量。因此,卵母细胞和胚胎以及环境中存在多重以及互补的抗氧化保护机制。

与体内条件比较,体外环境中高氧浓度和自由基清除剂的相对缺乏诱导产生高ROS水平。生长细胞或培养基中的一些物质如次黄嘌呤、儿茶酚胺、硫醇、黄素与氧反应产生氧自由基。在鼠卵母细胞体

外成熟培养液中添加抗氧化剂可以显著减少其染色体异常率。因此,在培养基中添加抗氧化剂可以降低 ROS 水平以及减少 DNA 损伤。培养基中金属离子的有害作用可以通过添加金属螯合剂来中和。添加 EDTA 和转铁蛋白可以克服发育阻滞的问题<sup>[61]</sup>。培养基内加入自由基清除剂和金属螯合剂如过氧化物歧化酶、转铁蛋白、EDTA、硫氧还原蛋白可以促进人类和啮齿类动物胚胎发育。

体外培养系统对于卵母细胞和胚胎发育来说条件还是有限,OS 是不可避免的,了解其环境中的抗氧化机制有助于改良体外胚胎生产的培养基。对卵母细胞和胚胎抗氧化防御机制的正确评价有助于发明一种方法来评估卵母细胞和胚胎的质量。

避免卵母细胞和胚胎培养过程中产生高水平的 ROS 是一个比较复杂的问题。简单地添加 ROS 清除剂是不够的,还有对抗氧化剂的选择及浓度等,这些因素都很难确定。由于转铁蛋白、青霉胺、次牛磺酸和牛磺酸对胚胎发育有促进作用,而且副作用不明显,因此经常被添加到培养基中。使用巯基化合物和维生素时必须小心,因为它们对胚胎会产生副作用。过剩的抗氧化剂可能对胚胎也有损伤作用。细胞中抗氧化剂与促氧化剂必须要保持平衡<sup>[62]</sup>,然而这对于体外培养的细胞来说比较困难。这些困难就解释了以前文献报道的互相矛盾的结果:一种物质在一种培养基里对胚胎发育有促进作用,但在不同的培养基里又不能发挥功能甚至是毒害作用。此外,一种物质(如 EDTA)对胚胎早期发育阶段有利,但是在合子基因组活化后又产生副作用。

#### 4 存在的问题

业已证明一定剂量的抗氧化剂可以延缓卵母细胞的老化,提高卵母细胞的质量。虽然抗氧化剂能够抵消老化对卵母细胞数量和质量的负面影响,体外抗氧化剂疗法可以保护和阻止配子的老化过程,但是必须意识到高剂量的抗氧化剂对生殖功能有潜在的副作用,甚至及会引起一些不良机体障碍<sup>[8]</sup>,而且也不能保证其对后代是否有影响,因此需要对附植前胚胎进行遗传缺陷的诊断。

大多数有关抗氧化剂对生殖老化的研究都强调卵母细胞发育能力以及染色体是否异常,并且主要集中在与老化特征相关的形态学变化,很少有关于分子生物学方面的报道。与形态学评价指标相比,卵母细胞质量相关的分子指标更具客观性,因此以后的研

究应该将形态学和分子生物学结合起来,这样才会更全面、更客观。

目前大多数研究都是通过通过在培养基里添加抗氧化剂来发挥抗氧化的作用。然而通过这种方式来维持胚胎中促氧化剂-抗氧化剂的平衡是一个非常复杂问题,因此对于卵母细胞和胚胎培养过程中 ROS 的限制需要更进一步的研究。

#### 参考文献(References)

- [1] Morita Y, Tilly JL. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass, *Dev Biol*, 1999, 213(1): 1-17
- [2] Nagai T. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes *in vitro* with ethanol, *Gamete Res*, 1987, 16(3): 243-249
- [3] Kikuchi K, Izaike Y, Noguchi J *et al.* Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged *in vitro*, *J Reprod Fertil*, 1995, 105(2): 325-330
- [4] Sakai N, Endo A. Effects of delayed mating on preimplantation embryos in spontaneously ovulated mice, *Gamete Res*, 1988, 19(4): 381-385
- [5] Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction, *Reprod Biol Endocrinol*, 2005, 3: 28
- [6] Takahashi T, Takahashi E, Igarashi H, *et al.* Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization, *Mol Reprod Dev*, 2003, 66(2): 143-152
- [7] Hu Y, Betzendahl I, Cortvridt R, *et al.* Effects of low O<sub>2</sub> and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture, *Hum Reprod*, 2001, 16(4): 737-748
- [8] Tarin JJ, Perez-Albala S, Cano A, *et al.* Oral antioxidants counteract the negative effects of female aging on oocyte quantity and quality in the mouse, *Mol Reprod Dev*, 2002, 61(3): 385-397
- [9] Marston JH, Chang MC. The fertilizable life of ova and their morphology following delayed insemination in mature and immature mice, *J Exp Zool*, 1964, 155: 237-251
- [10] Duranthon V, Renard JP. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept, *Theriogenology*, 2001, 55(6): 1277-1289
- [11] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed., Oxford: Clarendon Press, 1989, 22-85
- [12] Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, *et al.* Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes, *Biol Reprod*, 2000, 63(3): 715-722
- [13] Kren R, Ogushi S, Miyano T. Effect of caffeine on meiotic maturation of porcine oocytes, *Zygote*, 2004, 12(1): 31-38
- [14] Mao J, Wu GM, Prather RS, *et al.* Effect of methyl-beta-cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on *in vitro* fertilization and embryo development in the absence or presence of caffeine, *Theriogenology*, 2005, 64(9): 1913-1927
- [15] Lee JH, Campbell KH. Effects of enucleation and caffeine on maturation-promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activities in ovine oocytes used as recipient cytoplasts for nuclear transfer, *Biol Reprod*, 2006, 74(4): 691-698

- [16] Miao YL, Shi LH, Lei ZL, *et al.* Effects of caffeine on *in vivo* and *in vitro* oocyte maturation in mice, *Theriogenology*, 2007, 68(4): 640-645
- [17] Scott L, Smith S, Human sperm motility-enhancing agents have detrimental effects on mouse oocytes and embryos, *Fertil Steril*, 1995, 63(1): 166-175
- [18] Tarín JJ, Gómez-Piquer V, Pertusa JF, *et al.* Association of female aging with decreased parthenogenetic activation, raised MPF, and MAPKs activities and reduced levels of glutathione S-transferases activity and thiols in mouse oocytes, *Mol Reprod Dev*, 2004, 69(4): 402-410
- [19] Tarín JJ, Ten J, Vendrell FJ, *et al.* Dithiothreitol prevents age-associated decrease in oocyte/conceptus viability *in vitro*, *Hum Reprod*, 1998, 13(2): 381-386
- [20] Tarín JJ, Vendrell FJ, Ten J, *et al.* Antioxidant therapy counteracts the disturbing effects of diamide and maternal ageing on meiotic division and chromosomal segregation in mouse oocytes, *Mol Hum Reprod*, 1998, 4(3): 281-288
- [21] de Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, *et al.* Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content, *Theriogenology*, 2002, 57(5): 1443-1451
- [22] Mizushima S, Fukui Y. Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined maturation medium, *Theriogenology*, 2001, 55(7): 1431-1445
- [23] Comizzoli P, Marquant-Le Guienne B, Heyman Y, *et al.* Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G<sub>1</sub>-phase in bovine zygotes, *Biol Reprod*, 2000, 62(6): 1677-1684
- [24] Songsasen N, Apimeteetumrong M. Effects of  $\beta$ -mercaptoethanol on formation of pronuclei and developmental competence of swamp buffalo oocytes, *Anim Reprod Sci*, 2002, 71(3-4): 193-202
- [25] Rodríguez-González E, López-Bejar M, Izquierdo D, *et al.* Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation, *Reprod Nutr Dev*, 2003, 43(2): 179-187
- [26] Brad AM, Bormann CL, Swain JE, *et al.* Glutathione and adenosine triphosphate content of *in vivo* and *in vitro* matured porcine oocytes, *Mol Reprod Dev*, 2003, 64(4): 492-498
- [27] Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development, *Theriogenology*, 2003, 59(3-4): 939-949
- [28] Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, *et al.* Presence of  $\beta$ -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization, *Theriogenology*, 1998, 50(5): 747-756
- [29] Takahashi M, Nagai T, Okamura N, *et al.* Promoting effect of  $\beta$ -mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos, *Biol Reprod*, 2002, 66(3): 562-567
- [30] de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process, *Free Radic Biol Med*, 1993, 14(2): 157-166
- [31] Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Regulation of proteintyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives, *Free Radic Biol Med*, 1997, 22(4): 643-656
- [32] Blondin P, Coenen K, Sirard MA. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation, *J Androl*, 1997, 18(4): 454-460
- [33] Tremellen K, Miari G, Froiland D, *et al.* A randomised control trial examining the effect of an antioxidant (Menevit) on pregnancy outcome during IVF-ICSI treatment, *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 2007, 47(3): 216-221
- [34] Campos Petean C, Ferriani RA, dos Reis RM, *et al.* Lipid peroxidation and vitamin E in serum and follicular fluid of infertile women with peritoneal endometriosis submitted to controlled ovarian hyperstimulation: a pilot study, *Fertil Steril*, 2008, 90(6): 2080-2085
- [35] Jeong BS, Yang X. Cysteine, glutathione, and Percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*, *Mol Reprod Dev*, 2001, 59(3): 330-335
- [36] Sawai K, Funahashi H, Niwa K, Stage-specific requirement of cysteine during *in vitro* maturation of porcine oocytes for glutathione synthesis associated with male pronuclear formation, *Biol Reprod*, 1997, 57(1): 1-6
- [37] Kim IH, Van Langendonck A, Van Soom A, *et al.* Effect of exogenous glutathione on the *in vitro* fertilization of bovine oocytes, *Theriogenology*, 1999, 52(3): 537-547
- [38] Takahashi M, Nagai T, Hamano S, *et al.* Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos, *Biol Reprod*, 1993, 49(2): 228-232
- [39] Rodríguez-González E, López-Bejar M, Mertens MJ, *et al.* Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes, *Mol Reprod Dev*, 2003, 65(4): 446-453
- [40] Wongsrikeao P, Nagai T, Agung B, *et al.* Improvement of transgenic cloning efficiencies by culturing recipient oocytes and donor cells with antioxidant vitamins in cattle, *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(6): 694-702
- [41] Choi WJ, Banerjee J, Falcone T, *et al.* Oxidative stress and tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure, *Fertil Steril*, 2007, 88(4 Suppl): 1220-1231
- [42] Goud AP, Goud PT, Diamond MP, *et al.* Activation of the cGMP signaling pathway is essential in delaying oocyte aging in diabetes mellitus, *Biochemistry*, 2006, 45(38): 11366-11378
- [43] Crha I, Hrubá D, Ventruba P, *et al.* Ascorbic acid and infertility treatment, *Cent Eur J Public Health*, 2003, 11(2): 63-67
- [44] Tao Y, Zhou B, Xia G, *et al.* Exposure to L-ascorbic acid or  $\alpha$ -tocopherol facilitates the development of porcine denuded oocytes from metaphase I to metaphase II and prevents cumulus cells from fragmentation, *Reprod Domest Anim*, 2004, 39(1): 52-57
- [45] Tarín JJ, Pérez-Albalá S, García-Pérez MA, *et al.* Effect of dietary supplementation with a mixture of vitamins C and E on fertilization of tertiary butyl hydroperoxide-treated oocytes and parthenogenetic activation in the mouse, *Theriogenology*, 2002, 57(2): 869-881

- [46] Szymanski W, Kazdepka-Zieminska A. Effect of homocysteine concentration in follicular fluid on a degree of oocyte maturity, *Ginekol Pol*, 2003, 74(10): 1392-1396
- [47] O'Neill C. Endogenous folic acid is essential for normal development of preimplantation embryos, *Hum Reprod*, 1998, 13(5): 1312-1316
- [48] Tamura H, Takasaki A, Miwa I, *et al.* Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate, *J Pineal Res*, 2008, 44(3): 280-287
- [49] Navarro PA, Liu L, Ferriani RA, *et al.* Arsenite induces aberrations in meiosis that can be prevented by coadministration of N-acetylcysteine in mice, *Fertil Steril*, 2006, 85 Suppl 1: 1187-1194
- [50] Zhang X, Wu XQ, Lu S, *et al.* Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles, *Cell Res*, 2006, 16(10): 841-850
- [51] Goud AP, Goud PT, Diamond MP, *et al.* Nitric oxide delays oocyte aging, *Biochemistry*, 2005, 44(34): 11361-11368
- [52] Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, *et al.* Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP, *Pharmacol Rev*, 2000, 52(3): 375-414.
- [53] Hubbard CJ, Price J. The effects of follicle-stimulating hormone and cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate on cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-phosphodiesterase and resumption of meiosis in hamster cumulus-oocyte complexes, *Biol Reprod*, 1988, 39(4): 829-838
- [54] Gotoh Y, Nishida E. The MAP kinase cascade: its role in *Xenopus* oocytes, eggs and embryos, *Prog Cell Cycle Res*, 1995, 1: 287-297
- [55] Tornell J, Billig H, Hillensjo T. Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides, *Hum Reprod*, 1991, 6(3): 411-422
- [56] Li J, Foote RH, Simkin M. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase, *Biol Reprod*, 1993, 49(1): 33-37
- [57] Gardiner CS, Reed DJ. Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo, *Arch Biochem Biophys*, 1995, 318(1): 30-36
- [58] Harvey MB, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, *et al.* Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture, *Biol Reprod*, 1995, 53(3): 532-540
- [59] Lonergan P, Gutiérrez-Adán A, Rizos D, *et al.* Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected *in vitro* or *in vivo* before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge, *Mol Reprod Dev*, 2003, 66(3): 297-305
- [60] Goto T, Jones GM, Lolatgis N, *et al.* Identification and characterisation of known and novel transcripts expressed during the final stages of human oocyte maturation, *Mol Reprod Dev*, 2002, 62(1): 13-28
- [61] Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings, *Hum Reprod Update*, 2001, 7(2): 175-189
- [62] Aitken J, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk, *Bioessays*, 1994, 16(4): 259-267

## Antioxidants Delays Oocyte Aging

Xiao-Fang Ye, Jing-Bo Cheng<sup>1</sup>, Jun-Cheng Huang<sup>1\*</sup>

(College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China; <sup>1</sup> Key Laboratory of Reproduction & Breeding Biotechnology of Grass Feeding Livestock of Ministry of Agriculture, Xingjiang Academy of Animal Sciences, Urumqi 830000, China)

**Abstract** The poor quality of mammalian aged oocytes deteriorated which led to the ratios of heteroploid embryos and abortion ratio to increase and seriously affected the offspring. Research results showed that The appropriate dose of antioxidants could delay the aging process and improve the quality of the oocytes and relieve the negative influence caused by aging of oocytes.

**Key words** antioxidant; oocyte; aging; development

Received: November 5, 2008 Accepted: May 14, 2009

This work was supported by the Science and Technology Key Projects of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No.200841122) and the China Postdoctoral Science Foundation

\*Corresponding author. Tel: 86-991-4835903, E-mail: h\_jc@163.com