

卵母细胞老化对绵羊胚胎早期发育及胞质谷胱甘肽含量的影响

叶小芳^{1,2} 陈静波² 吕雪峰² 陈世斌² 黄俊成^{2*}

(¹ 石河子大学动物科技学院, 石河子 832000; ² 新疆畜牧科学院, 乌鲁木齐 830000)

摘要 卵母细胞随着培养时间的延长逐渐发生老化, 老化严重影响卵母细胞的质量及发育潜能, 进而影响体外胚胎生产、克隆等生物技术的效率。本文系统地讨论了老化对绵羊孤雌胚、核移植胚和单精注射后的胚胎发育潜能以及胞质内 GSH 含量的影响。实验结果表明绵羊卵母细胞在成熟培养到 30 h 就已经发生老化, 并且老化降低了卵母细胞质量和后续胚胎发育能力, 但是不影响胞质内 GSH 含量。由此提示在实际操作中可以通过控制卵母细胞成熟的时间和适时的体外操作来改善卵母细胞的质量和促进胚胎发育。这些结果还可以指导操作, 降低核移植、单精注射等技术应用于基础研究时引起的操作误差, 提高辅助生殖技术的成功率。

关键词 老化; 绵羊卵母细胞; 发育; GSH

卵母细胞成熟过程涉及一系列复杂的关键事件, 这些事件主要是为卵母细胞受精和启动胚胎发育做准备。卵母细胞老化通过一些细胞/分子途径影响减数分裂过程的这些事件^[1]。排卵后短期阻滞在 MII 期的卵母细胞可以正常受精, 但有最佳受精时间的限制, 如果错过了这个最佳的受精时间, 卵母细胞仍停留在输卵管内(体内老化)或继续培养(体外老化)就会随着时间的延长导致质量下降, 这个过程就是卵母细胞老化。随着老化的发生, 卵母细胞也发生了一些功能性的变化, 如受精率下降^[2]、多精受精^[3]、染色体异常^[4]、结构变化以及透明带硬化^[5]、部分皮质颗粒胞吐^[4,5]、对激活刺激的敏感性增加^[2,6]、成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF)和丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)活性下降^[6,7]、表观遗传学变化^[8]、胚胎/胎儿发育异常甚至发育阻滞^[4,9]、流产率增加^[10]。此外, 卵母细胞老化可能以疾病的形式对孕体产生远期效应^[10]。老化引起的卵母细胞质量下降是导致这些功能性变化的主要原因^[11]。

谷胱甘肽(glutathione, GSH)在卵母细胞中的主要功能是通过巯基基团参与抗氧化作用和抵抗活性氧(reactive oxygen species, ROS)毒害作用来保护卵母细胞。贮存在卵母细胞中的 GSH 对于胚胎后续发育有重要作用^[12], GSH 的浓度高低对于卵母细胞的成熟和受精是非常重要的, 卵母细胞成熟期间 GSH 的积累能提高卵母细胞的胞质成熟质量, 保护卵母细胞在受精后的胚胎发育阶段免受氧化损伤^[13]。因此胞质内

GSH 水平高低是胚胎发育的一个很重要的影响因素。

卵母细胞质量不仅决定了受精后胚胎的发育潜能, 对于体外胚胎生产、克隆等生物技术以及现代辅助生殖技术(techniques of assisted reproduction, ART)的有效应用也至关重要, 因为这些技术都需要高质量的成熟卵母细胞。卵母细胞老化严重影响了这些技术的效率, 因此老化已成为当前生殖生物学的研究热点之一, 但目前还未见到有关老化对绵羊卵母细胞后续发育能力以及胞质内 GSH 水平影响的系统的报道。如果能明确绵羊卵母细胞的老化时间, 这样就可以确定最佳的取卵时间, 准确地选择授精时机, 提高绵羊的繁殖率。这些结果还可以指导操作, 有利于在核移植、单精注射等技术进行基础研究时降低操作引起的误差。本文系统地讨论了老化对绵羊孤雌胚、体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)胚以及单精注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)后的胚胎发育潜能的影响, 另外还研究了老化对胞质内 GSH 含量的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

本研究所用化学试剂除特别说明外, 均购自

收稿日期: 2010-03-02 接受日期: 2010-06-10

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

Sigma 公司; 培养用 TCM-199、DMEM、胎牛血清(FBS)、必需氨基酸(BME)、非必需氨基酸(NEAA)均购自Gibco公司; 牛血清白蛋白(BSA)购自Bovogen公司; GSH 和 GSSG 检测试剂盒(S0053)购自江苏碧云天生物技术公司。

1.2 卵母细胞收集和成熟

将从屠宰场采集的绵羊卵巢保存于37℃的灭菌生理盐水中, 2 h 内运至实验室, 用75%酒精消毒和生理盐水冲洗, 然后用带有12号针头的10 ml注射器抽取卵巢表面直径2~6 mm 卵泡中的卵泡液, 将抽出的卵泡液置于60 mm 培养皿中体式镜下挑选出卵丘细胞包裹三层以上、结构致密的卵母细胞-卵丘细胞复合体(cumulus oocyte complexes, COCs), 移入抽卵液中洗3次, 再将COCs用体外成熟(*in vitro* maturation, IVM)液洗三次, 然后按15~20个卵/滴移入50 μ l 的IVM液滴中, 在5% CO₂、38.6℃、饱和湿度条件下进行成熟培养。

抽卵液: Hepes-199+10% FBS+1 mg/ml PVA+6U/ml 肝素+100 U/ml 青链霉素

IVM: TCM199+10% FBS+0.05 U/ml FSH+1 μ g/ml 雌激素+10 ng/ml EGF+24.2 mg/ml 丙酮酸钠+0.1 mmol/L 半胱氨酸+100 U/ml 青链霉素

1.3 卵丘细胞的去除

卵母细胞培养成熟后, 将卵母细胞在含0.1%透明质酸酶的Hepes-199中用吸管反复吹打去除掉卵丘细胞, 在体视显微镜下观察第一极体(the first polar body, PB1)的排出情况, 将具有PB1且细胞质均匀的卵母细胞(DOs)继续进行后续实验。

1.4 卵母细胞的孤雌激活处理

将COCs分别在体外培养至24 hpm (hour post-onset of maturation, hpm)、30 hpm、36 hpm、48 hpm, 然后分别在相应的成熟时间将挑选出的DOs在含5 μ mol/L 离子霉素(ionomycin)的激活液中激活4 min, 经培养液洗三次, 移入含2 mmol/L 6-DMAP的培养液内培养3 h, 再用培养液洗三次后移入胚胎培养(*in vitro* culture, IVC)液中培养。48 h后统计卵裂率, 6~8 d统计囊胚率。根据孤雌发育率、自发激活(不经化学试剂激活就自发卵裂)率以及卵母细胞形态来确定老化时间。

IVC: SOF+4.5% (V:V)BME+1% (V:V)NEAA+2.77 mmol/L 肌醇+3 mg/ml BSA

1.5 SCNT

将培养至18 hpm的带有第一极体、形态完好的卵母细胞移入显微操作液滴中, 在配有显微操作臂

的200倍显微镜下用一内径为20 μ m的吊尖斜口去核针将第一极体及其下方的染色体一并吸除, 再将消化好的直径为1~20 μ m、表面光滑的供体细胞从原切口处移入去核卵母细胞的卵周隙中, 尽量使供体细胞紧贴卵质膜。然后将重构好的卵放入融合液中平衡2 min, 在融合槽内施以2次125 V/mm, 20 μ s/次的直流电脉冲进行融合并激活; 或在24 hpm进行电融合, 再将融合后的复合体立即激活或继续培养至30 hpm进行激活, 最后将激活后的复合体于IVC液中培养。在48 h统计卵裂率, 6~8 d统计囊胚率。挑选融合了的胚胎进行激活。激活方法和胚胎培养方法同前。

1.6 ICSI

分别在18 hpm、24 hpm和30 hpm将具有第一极体的DOs进行单精子注射, 然后立即激活和培养。在48 h统计卵裂率, 6~8 d统计囊胚率。

ICSI操作在Nikon倒置显微操作仪下进行, 具体程序参考Nagy等^[14], 简要地说, 显微操作时, 选择直线前进运动的精子, 以垂直于精子尾巴中段的方向猛然划过, 使精子尾部打折以确实质膜破裂, 然后将单个精子从尾部吸入注射针再连同微量的PVP操作液注入卵胞质。随后轻缓地撤出注射管, 并将卵母细胞从固定管释放。最后将注射后的卵母细胞进行激活和培养。激活方法和胚胎培养方法同前。

1.7 胞质内GSH含量测定

将培养至不同时间(18 hpm, 24 hpm, 30 hpm, 36 hpm)的卵母细胞去除卵丘细胞, PBS清洗3次, 转入200 μ l离心管中, -70℃保存, 等待测定。使用江苏碧云天公司生产的GSH和GSSG检测试剂盒, 按说明书操作。

1.8 数据统计与分析

所有试验重复3次, 卡方(χ^2)检验进行统计, 分析百分率之间差异的显著性。统计分析软件SPSS 11.5的ANOVA进行平均值之间的差异显著性分析, $P<0.05$ 判为差异显著。

2 结果

2.1 老化时间的确立及老化对孤雌激活胚胎发育的影响

由Table 1看出, 与24 hpm组相比, 18 hpm组的卵裂率和囊胚率差异不显著($P>0.05$), 30 hpm组与36 hpm组的卵裂率显著升高, 但囊胚率却显著降低($P<0.05$)。48 hpm组的囊胚率显著低于其他各组($P<0.05$)。当卵母细胞培养至36 h后就出现了自发

Table 1 Effects of maturation time on development of parthenogenetic ovine embryos

Time (h)	Oocytes	Spontaneous cleaved (%)	Cleaved (%)	Blastocysts (%)
24 hpm	124	0 (0) ^a	96 (77.42) ^a	46 (47.92) ^a
30 hpm	98	0 (0) ^a	86 (87.76) ^b	20 (21.05) ^b
36 hpm	80	6 (7.5) ^b	75 (93.75) ^b	11 (14.86) ^b
48 hpm	113	15 (13.27) ^b	83 (73.45) ^a	0 (0) ^c

Hpm means hour post-onset of maturation. a,b,c: values with different superscripts within the same column are significantly different ($P<0.05$).

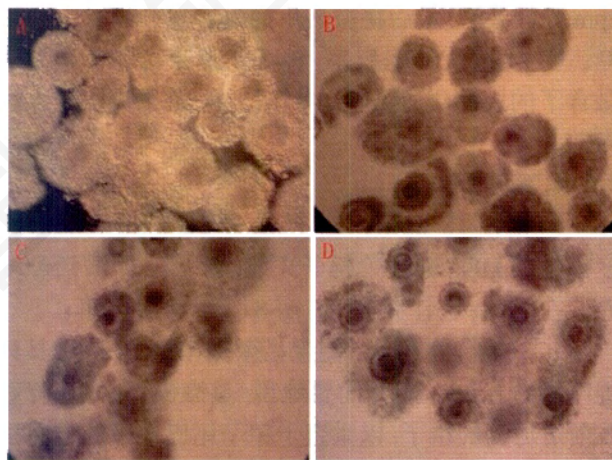


Fig.1 Oocytes morphology at different maturation time
A:24 hpm; B:30 hpm; C:36 hpm; D:48 hpm.

激活的现象(不用激活试剂就自行卵裂), 并且自发激活率显著高于 24 hpm 组和 30 hpm 组。

2.2 老化对 ICSI 胚胎发育的影响

由 Table 2 可以看出, 18 hpm 组的卵裂率和囊胚率与 24 hpm 组差异不显著($P>0.05$), 30 hpm 组的卵裂率与 24 hpm 组差异不显著, 但囊胚率显著低于 24 hpm 组。

2.3 老化对 SCNT 胚胎发育的影响

由 Table 3 可以知道, 18 hpm 的卵裂率和囊胚率与 24 hpm 组相比差异均不显著($P>0.05$); 虽然 30 hpm 组的卵裂率与 24 hpm 组差异不显著($P>0.05$), 但囊胚率却显著降低($P<0.05$)。

2.4 老化对胞质内 GSH 水平的影响

从 Fig.2 看出, 18 hpm 组、24 hpm 组、30 hpm 组和 36 hpm 组间的 GSH 水平差异不显著($P>0.05$)。48 hpm 组的 GSH 显著低于 24 hpm 组和 30 hpm ($P<0.05$)。

3 讨论

目前迅猛发展的胚胎工程技术以及 ART 都需大量体外成熟的卵母细胞, 卵母细胞成熟后老化显著影

Table 2 Effect of aging on early embryonic development after ICSI

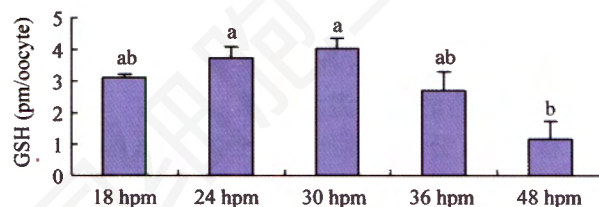
Groups	No. of oocytes	No. of cleaved (%)	No. of blastocysts (%)
18hpm	62	46 (74.19) ^a	13 (28.26) ^a
24hpm	67	47 (70.35) ^a	15 (31.91) ^a
30hpm	57	48 (84.21) ^a	4 (8.33) ^b

Hpm means hour postonset of maturation. a,b,c: values with different superscripts within the same column are significantly different ($P<0.05$).

Table 3 Effect of aging on SCNT reconstructed embryonic development

Groups	No. of oocytes	No. of cleaved (%)	No. of blastocysts (%)
18 hpm	90	65(72.22) ^a	11(16.92) ^a
24 hpm	81	57(70.08) ^a	12(21.05) ^a
30 hpm	72	49(68.06) ^a	2(4.08) ^b

Hpm means hour postonset of maturation. a,b,c: values with different superscripts within the same column are significantly different ($P<0.05$).

**Fig.2** Effect of aging on intracellular GSH level

Hpm means hour postonset of maturation. a,b,c: values with different superscripts within the same column are significantly different ($P<0.05$).

响这些技术的有效应用。因此, 控制卵母细胞的老化非常有利于这些技术的应用。在寻求控制卵母细胞老化的方法前, 最重要的就是要明确卵母细胞老化的时间。不同物种老化时间也存在差异^[15~17], 因此卵母细胞老化时间的确立对于选择成熟后卵母细胞最佳操作时间以及胚胎发育及其重要。目前, 已经有老化引起一些物种生殖力下降的相关报道, 但在绵羊中很少见到, 而且从未见过有关绵羊卵母细胞老化

时间确定的报道。老化可以引起卵母细胞发生许多特征性的变化, 如卵巢内卵母细胞数减少、孤雌激活率升高、MPF 及 PAK 活性降低、染色体异常染、妊娠率下降以及流产率增加等, 但是常把升高的激活率作为判断卵母细胞是否老化的一个标准^[6,18]。

实验发现 30 hpm 组与 36 hpm 组的卵裂率显著高于 24 hpm 组, 但囊胚率却显著降低($P<0.05$) (Table 1)。这说明 30 hpm 组和 36 hpm 组中卵裂的胚胎能发育到囊胚阶段的比例显著下降, 可能是由于 30 hpm 组和 36 hpm 组的卵母细胞质量下降导致胚胎质量差或异裂率升高, 从而使得发育到囊胚阶段的胚胎数减少。48 hpm 组的囊胚率显著低于其他各组($P<0.05$), 这说明 48 hpm 组的卵母细胞质量已经严重下降。另外还发现当卵母细胞培养至 36 h 后出现了自发激活的现象(不用激活试剂就自行卵裂), 并且自发激活率显著高于 24 hpm 组和 30 hpm 组。一般当卵母细胞过度老化时就会出现这种自发激活现象, 但其后续胚胎发育下降^[19], 由此说明当卵母细胞培养到 36 h 就老化过度了。通过对不同成熟时间的卵母细胞形态观察(Fig.1), 24 hpm 的卵丘细胞扩散较好, 胞质均匀, 折光度好; 成熟培养到 30 h 时, 卵丘细胞变得松散, 而且胞质折光性差; 成熟培养到 36 hpm 时, 卵母细胞胞质不均匀且发黑, 卵丘细胞即将脱落。当继续培养至 48 h 时, 卵丘细胞陆续脱落以及胞质变黑, 而且呈颗粒样暗区。因此卵母细胞随着培养时间的延长而质量下降可能是由于脱落的卵丘细胞扰乱了卵母细胞与卵丘细胞之间更好的交流并且其代谢物可能促进了卵母细胞的老化。结合老化对自发激活率、卵裂率、囊胚率、以及细胞形态观察可以得出两条结论: (1)卵母细胞培养到 30 h 就已经发生老化, 随着培养时间的延长, 到 36 h 后过度老化, 而且质量下降严重, 因此将绵羊卵母细胞老化时间定为 30 h。(2)卵母细胞老化显著降低了绵羊胚胎的孤雌发育能力。

ICSI 主要是用于挽救体外受精(*in vitro fertilization*, IVF)失败的卵母细胞, 但仅仅适用于在 IVF 后短期内未受精的卵母细胞。老化显著影响重新授精的效果, 对于进行 ICSI 来说应该越早越好。人经过 IVF 后受精率大约是 60~70%^[20], IVF 后未受精的老化卵母细胞还可以通过 ICSI 重新受精, 然而还存在一些困难, 与刚排卵卵母细胞相比, 不单是受精率下降, 移植后胚胎附植率以及发育潜能都下降了, 这主要是由于 ICSI 前老化引起的卵母细胞质量发生了变化^[21]。至今还未见到有关老化对绵羊卵母细胞经

ICSI 后形成的胚胎影响的报道。

老化卵母细胞的 PB1 位置发生改变。通常把 PB1 形态作为判断 ICSI 后胚胎质量的一个标准。具有完整而且形态好的 PB1 的卵母细胞受精率较高而且胚胎质量好; 相反, 老化卵母细胞的 PB1 通常发生移位和退化^[22]。有报道认为 PB1 在排卵前就开始发生退化, 在卵母细胞核成熟 6 h 后有 70% 发生了退化, 剩下的 30% 也即将退化。在老化过程中, 随着时间的延长 PB1 偏离纺锤体的角度逐渐变大。卵周隙随着老化的发生也逐渐变大, 更易使退化的 PB1 向旁边移位^[22]。由 Table 2 中的数据得知, 与 24 hpm 组相比, 30 hpm 组的卵裂率无显著变化, 但囊胚率却显著降低。由此说明老化降低了绵羊卵母细胞经 ICSI 的胚胎发育能力, 也就是降低了 ICSI 效率。引起发育能力下降的原因可能是随着卵母细胞的老化, 第一极体位置发生改变, 从而使以极体位置为标准的显微操作对卵母细胞造成一定的损伤, 进而降低后续胚胎发育的潜能。

影响核移植重构胚发育的因素很多, 其中受体卵母细胞的质量和发育能力最为重要^[23]。许多证据表明受体卵母细胞 MPF 活性高低对于克隆胚发育非常关键^[24], 而且卵母细胞成熟培养时间的长短影响受体胞质支持 NT 胚发育的能力^[25]。在延长培养过程中, 成熟卵母细胞的 MPF 活性逐渐下降, 受精率及受精后胚胎发育能力也随之下降^[6], 此外, NT 中受体卵母细胞质量也发生了下降^[26]。由于卵母细胞成熟后老化降低了 MPF 活性, 因此升高的 MPF 活性能改善卵母细胞的质量和促进受体胞质的发育。目前在小鼠^[27]、牛^[28]、猪^[23]和绵羊^[29,30]中已见采用体外延长培养的卵母细胞用作受体胞质进行 NT 的报道。本实验结果发现 30 hpm 组的卵裂率与 24 hpm 组差异不显著($P>0.05$), 但囊胚率却显著降低($P<0.05$) (Table 3)。其原因可能是老化卵母细胞对激活刺激比较敏感, 因此对卵裂率影响不大, 但实验发现 30 hpm 组的异裂率较高而且出现胚胎发育阻滞现象, 这可能就导致了囊胚率的降低。这与 Lee 等^[29]的实验结果不一致, Lee 等认为老化对绵羊 NT 重构胚的发育能力无显著影响, 这可能是由于具体的实验条件、实验方案不同造成的。结合老化对绵羊卵母细胞孤雌发育、ICSI 效果的影响, 我们发现老化对核移植重构胚比孤雌激活胚及 ICSI 后的胚胎的影响更大, 这也证实了王二耀等^[31]的实验结果。其原因是可能去核操作移除了对后续胚胎发育非常重要的一些蛋白及因子, 尤其是纺锤体相关蛋白, 包括核减数分裂装置

(nuclear-mitotic apparatus, NuMA)和HSET^[32]。本实验结果表明老化降低了NT重构胚的发育能力,这可能是由于随着卵母细胞的老化,受体胞质的MPF活性下降,从而引起重构胚发育能力的下降。因此,当用体外成熟的卵母细胞作为受体胞质进行NT时,必需严格控制卵母细胞的培养时间。

GSH 调控卵母细胞胞质成熟事件和核成熟事件^[33], 调节卵子发生、受精和胚胎发育过程^[34]。GSH 的浓度高低对于卵母细胞的成熟和受精是非常重要的, 卵母细胞成熟期间 GSH 的积累能改善卵母细胞的胞质成熟质量, 保护卵母细胞在受精后的胚胎发育阶段免受氧化损伤^[13]。细胞外的 GSH 能够通过除去培养液中过多的 ROS 来促进卵母细胞受精和受精后的胚胎发育^[35]。而细胞内 GSH 的合成是卵母细胞胞质成熟过程中的一个重要部分, 卵母细胞内 GSH 的浓度会随着排卵的临近而持续升高^[36], MII 期卵母细胞较 GV 期卵母细胞具有较高的 GSH 水平, 受精后, GSH 浓度显著下降^[13]。体外成熟卵母细胞内 GSH 含量反应了胞质成熟水平^[37], 低水平的 GSH 会降低体外成熟卵母细胞的发育能力^[38]。

以前的实验结果表明老化的卵母细胞 GSH 水平较低^[39], GSH 对于老化过程中发生的氧化损伤起着重要的保护作用, 它通过影响氧化还原状态来调节凋亡的发生^[40,41]。本实验首次研究了老化对绵羊卵母细胞胞质内 GSH 含量的影响(Fig.2), 结果显示 18 hpm 组、24 hpm 组、30 hpm 组和 36 hpm 组间的 GSH 水平差异不显著($P>0.05$)。由此表明老化对绵羊卵母细胞内 GSH 含量影响不大, 这与 Rausell 等^[39]的结果不一致。导致这个差异的原因还不清楚, 可能是由于在我们的实验中, 大多数卵巢都采自青年羊, 从而使这些卵母细胞发育到 MII 期需要更长的时间, 因此导致了培养到 30 h 时 GSH 水平不但未下降, 反而稍有上升。然而从 36 h 开始 GSH 水平呈逐渐下降状态, 卵母细胞培养至 48 h 时, 其 GSH 水平最低, 且显著低于 24 hpm 组和 30 hpm ($P<0.05$), 这说明 GSH 水平总体来说还是随着培养时间的延长而降低的。由此提示老化卵母细胞的氧分压较高, 较低的 GSH 水平不足以保护卵母细胞免受氧化损伤。

卵母细胞随着培养时间的延长逐渐发生老化, 老化严重影响卵母细胞的质量而且导致胚胎发育能力下降。鉴于体外成熟的卵母细胞在现代辅助生殖技术的有效应用中的重要性, 寻求延缓卵母细胞老化的方法具有一定的经济价值和社会意义, 因此可以通过控制卵母细胞的成熟时间和把握适时的体外操作时

间来改善卵母细胞的质量和促进胚胎发育。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, 为了优化体外胚胎生产, 在体外培养过程中, 可以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, 从而延缓卵母细胞的老化。本研究只是基于体外实验, 并且只研究了胚胎发育和 GSH 水平, 因此, 还需要进一步结合分子生物学、表观遗传学以及体内实验来深入研究老化在卵母细胞以及胚胎中的作用机制以及如何有效地控制卵母细胞的老化进程。

参考文献(References)

- 1 Jones KT. Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 143-58.
- 2 Goud P T, Goud A P, Laverge H, De Sutter P, Dhont M. Effect of post-ovulatory age and calcium in the injection medium on the male pronucleus formation and metaphase entry following injection of human spermatozoa into golden hamster oocytes. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 227-33.
- 3 Maalouf WE, Lee JH, Campbell KH. Effects of caffeine, cumulus cell removal and aging on polyspermy and embryo development on *in vitro* matured and fertilized ovine oocytes. *Theriogenology* 2009; 71: 1083-92.
- 4 Szollosi D. Morphological changes in mouse eggs due to aging in the fallopian tube. *Am J Anat* 1971; 130: 209-25.
- 5 Xu Z, Abbott A, Kopf GS, Schultz RM, Ducibella T. Spontaneous activation of ovulated mouse eggs: time-dependent effects on M-phase exit, cortical granule exocytosis, maternal messenger ribonucleic acid recruitment, and inositol 1,4,5-trisphosphate sensitivity. *Biol Reprod Fertil* 1997; 57: 743-50.
- 6 Kikuchi K, Izaike Y, Noguchi J, Furukawa T, Daen FP, Naito K, *et al.* Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged *in vitro*. *J Reprod*, 1995: 105: 325-30.
- 7 Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Izaike Y, Furukawa T, Daen FP, *et al.* Maturation/ M-phase promoting factor regulates aging of porcine oocytes matured *in vitro*. *Cloning Stem Cells* 2002; 4: 211-22.
- 8 Liang XW, Zhu JQ, Miao YL, Liu JH, Wei L, Lu SS, *et al.* Loss of methylation imprint of Snrpn in postovulatory aging mouse oocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 371: 16-21.
- 9 Tarin JJ, Perez-Albala S, Aguilar A, Minarro J, Hermenegildo C, Cano. A. Long-term effects of postovulatory aging of mouse oocytes on offspring: a two-generational study. *Biol Reprod* 1999; 61: 1347-55.
- 10 Sakai N, Endo A. Effects of delayed mating on preimplantation embryos in spontaneously ovulated mice. *Gamete Res* 1988; 19: 381-5.
- 11 Navot D, Bergh PA, Williams MA, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B, *et al.* Poor oocyte quality rather than implantation failure as

- a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet* 1991; 337: 1375-7.
- 12 Salmen JJ, Skufca F, Matt A. Role of glutathione in reproductive tract secretions on mouse preimplantation embryo development. *Biol Reprod* 2005; 73(2): 1308-14.
- 13 de Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 2000; 53: 761-1.
- 14 Nagy ZP, Liu J, Joris H, Bocken G, Desmet B, Van Ranst H, *et al.* The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development rates. *Hum Reprod* 1995; 10: 3171-7.
- 15 van Noord-Zaadstra BM, Looman CW, Alsbach H, Habbema JD, te Velde ER, Karbaat J. Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy. *Bmj* 1991; 302: 1361-5.
- 16 van Kooij RJ, Looman CW, Habbema JD, Dorland M, te Velde ER. Age-dependent decrease in embryo implantation rate after *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1996; 66: 769-75.
- 17 Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Shimada A, Kaneko H, Yamashita M, *et al.* Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biol Reprod* 2000; 63: 715-22.
- 18 Nagai T. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes *in vitro* with ethanol. *Gamete Res* 1987; 16: 243-49.
- 19 Hagen DR, Prather RS, First NL. Response of porcine oocytes to electrical and chemical activation during maturation *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1991; 28: 70-3.
- 20 Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, *et al.* Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1986; 46: 1118-23.
- 21 Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournaye H, Smits J, Camus M, *et al.* Analysis of 76 total fertilization failure cycles out of 2732 intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum Reprod* 1995; 10: 2630-6.
- 22 Miao Y, Ma S, Liu X, Miao D, Chang Z, Luo M, *et al.* Fate of the first polar bodies in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 2004; 69: 66-76.
- 23 Iwamoto M, Onishi A, Fuchimoto D, Somfai T, Suzuki S, Yazaki S, *et al.* Effects of caffeine treatment on aged porcine oocytes: parthenogenetic activation ability, chromosome condensation and development to the blastocyst stage after somatic cell nuclear transfer. *Zygote* 2005; 13: 335-45.
- 24 Campbell KH, Alberio R. Reprogramming the genome: role of the cell cycle. *Reprod Suppl* 2003; 61: 477-94.
- 25 Miyoshi K, Ruzicidlo SJ, Pratt SL, Stice SL. Utility of rapidly matured oocytes as recipients for production of cloned embryos from somatic cells in the pig. *Biol Reprod* 2002; 67: 540-5.
- 26 Cheong HT, Ikeda K, Martinez Diaz MA, Katagiri S, Takahashi Y. Development of reconstituted pig embryos by nuclear transfer of cultured cumulus cells. *Reprod Fertil Dev* 2000; 12: 15-20.
- 27 Taniguchi T, Taniguchi R, Kanagawa H. Influence of oocyte aging on developmental ability of reconstituted embryos produced from oocyte cytoplasm and single blastomeres of two-cell stage embryos. *J Vet Med Sci* 1996; 58: 635-40.
- 28 Tanaka H, Kanagawa H. Influence of combined activation treatments on the success of bovine nuclear transfer using young or aged oocytes. *Anim Reprod Sci* 1997; 49: 113-23.
- 29 Lee JH, Campbell KH. Caffeine treatment prevents age-related changes in ovine oocytes and increases cell numbers in blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* 2008; 10: 381-90.
- 30 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: 691-8.
- 31 王二耀, 代相鹏, 焦丽红, 周琪, 王柳. 卵母细胞老化对小鼠体细胞克隆胚发育的影响. *科技导报* 2007; 25: 28-33.
- 32 Simerly C, Dominko T, Navara C, Payne C, Capuano S, Gosman G, *et al.* Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. *Science* 2003; 300 (5617): 297.
- 33 Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perreault SD. Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. *Mol Reprod Dev* 2003; 64: 106-12.
- 34 Tarin JJ, Ten J, Vendrell FJ, Cano A. Dithiothreitol prevents age-associated decrease in oocyte/conceptus viability *in vitro*. *Hum Reprod* 1998; 13: 381-6.
- 35 Boquest AC, Abeydeera LR, Wang WH, Day BN. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos *in vitro*. *Theriogenology* 1999; 51: 1311-9.
- 36 Perreault SD, Barbee RR, Slott VL. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol* 1988; 125: 181-6.
- 37 Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day BN. Use of low-salt culture medium for *in vitro* maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after *in vitro* fertilization. *Biol Reprod* 1994; 51: 633-9.
- 38 Brad AM, Bormann CL, Swain JE, Durkin RE, Johnson AE, Clifford AL, *et al.* Glutathione and adenosine triphosphate content of *in vivo* and *in vitro* matured porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2003; 64: 492-8.
- 39 Rausell F, Pertusa JF, Gomez-Piquer V, Hermenegildo C, Garcia-Perez MA, Cano A, *et al.* Beneficial effects of dithiothreitol on relative levels of glutathione S-transferase activity and thiols in oocytes, and cell number, DNA fragmentation and allocation at the blastocyst stage in the mouse. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 860-9.
- 40 Boggs SE, McCormick TS, Lapetina EG. Glutathione levels determine apoptosis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 229-33.
- 41 Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75: 241-51.

The Effects of Aging on Intracellular GSH Level and Development Ability of Ovine Oocytes

Xiao-Fang Ye^{1,2}, Jing-Bo Chen², Xue-Feng Lü², Shi-Bin Chen², Jun-Cheng Huang^{2*}

(¹College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China;

²Xinjiang Academy of Animal Sciences, Urumqi 830000, China)

Abstract Oocytes were aging with the prolonged maturation period. Aging is detrimental to oocytes quality and subsequent development potentiality. Therefore, efficient application of the biotechnology was negatively affected by aging. This present study discussed the effects of aging on intracellular GSH level and development ability of ovine oocytes after parthenogenetic activation, SCNT and ICSI. The results has shown that: (1)ovine oocytes are aged when matured until 30hpm; (2)oocytes quality and subsequent development ability are declined by aging; (3) no significant effect on GSH level was observed by aging. In conclusion, oocyte quality can be modulated and development of embryos can be improved by controlling the maturation period or adjusting the timing of manipulation. The results provide the basis for improving treatments related delaying aging to produce more healthy embryos and preventing failures or abnormalities associated with ART using aged oocytes.

Key words aging; ovine oocytes; development; GSH

Received: March 2, 2010 Accepted: June 10, 2010

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

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-991-4835903, E-mail: h_jc@163.com