

# Iloprost 对猪早期胚胎体外发育的影响

王 峰<sup>1</sup>, 刘仲凤<sup>1</sup>, 史春荣<sup>2</sup>, 张 朔<sup>1</sup>, 吕 明<sup>1</sup>, 孔庆然<sup>1</sup>, 刘 彪<sup>1</sup>, 刘忠华<sup>1\*</sup>

(1. 东北农业大学生命科学学院 胚胎工程实验室, 哈尔滨 150030;

2. 大庆市装备制造集团宏升实业总公司, 大庆 163411)

**摘要:** 本研究旨在探讨 PGI<sub>2</sub> 类似物 iloprost 对猪胚胎体外发育的影响。试验以 IVF 胚胎为研究对象, 分别在不同时期(0、24、48、72 h)将不同浓度(0、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) iloprost 加入到猪胚胎培养液中, 于 156 h 时记录囊胚发育率和囊胚细胞数, 筛选获得最佳添加方案, 检测胚胎脂肪代谢速度和代谢相关基因(*cox2*、*creb*、*ppar $\delta$* 、*pdk*、*cpt2*)的表达水平, 分析 iloprost 影响胚胎发育的机制。结果显示, 最佳的添加方案为, 在受精后 48 h 加入 2.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  iloprost, 胚胎囊胚发育率(28%)和囊胚细胞数(49.42)显著高于( $P < 0.05$ )对照组的囊胚发育率(16%)和囊胚细胞数(28.22); 添加 iloprost 后, 胚胎脂肪酸降解速度也显著加快( $P < 0.05$ ), 脂肪酸代谢相关基因 *cox2*、*creb*、*ppar $\delta$* 、*cpt2* 的表达量上升, 糖代谢相关基因 *pdk* 表达量无显著变化。结果表明, PGI<sub>2</sub> 类似物 iloprost 可以促进胚胎降解脂肪酸, 为胚胎发育提供能量, 提高了胚胎体外发育能力。

**关键词:** PGI<sub>2</sub>; 胚胎体外发育; 脂代谢; 猪

中图分类号: S828; S852.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)01-0050-07

## Effects of Iloprost on *in vitro* Development of Preimplantation Porcine Embryos

WANG Feng<sup>1</sup>, LIU Zhong-feng<sup>1</sup>, SHI Chun-rong<sup>2</sup>, ZHANG Shuo<sup>1</sup>, LV Ming<sup>1</sup>,  
KONG Qing-ran<sup>1</sup>, LIU Biao<sup>1</sup>, LIU Zhong-hua<sup>1\*</sup>

(1. Laboratory of Embryo Engineering, College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Hongsheng Industrial Corporation, Group of Equipment Manufacture in Daqing City, Daqing 163411, China)

**Abstract:** The aim of this study was to discuss the effect of PGI<sub>2</sub> analogue iloprost on *in vitro* development of porcine embryos. In this study, at different times(0, 24, 48, 72 h), iloprost with different concentrations(0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) was added into the porcine zygote medium 3(PZM-3) to observe the effect of iloprost on porcine IVF embryos and to screen the best additive dosage for embryo culture, blastocyst number and blastocyst cell number were counted at 156 h after fertilization. The speed of embryo fat metabolism and related genes (*cox2*, *creb*, *ppar $\delta$* , *pdk*, *cpt2*) expression level were tested for understanding the mechanism of iloprost promoting embryonic development. The results showed that addition of 2.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  iloprost at 48 hours after fertilization could significantly ( $P < 0.05$ ) improve the blastocyst rate (28% vs 16%,  $P < 0.05$ ) and blastocyst cell number (49.42 vs 28.22,  $P < 0.05$ ), significantly accelerate fatty acid degradation speed ( $P < 0.05$ ) and promote the expression of lipid metabolism related genes(*cox2*, *creb*, *ppar $\delta$* , *cpt2*). However there's no significant change in glucose metabolism related genes (*pdk*) expression level. These results demonstrates that iloprost can enhance the *in vitro* developmental capacity of porcine embryo by promoting fatty acid degradation.

收稿日期: 2011-03-02

基金项目: 哈尔滨市科技创新人才基金之海外留学人员基金(2010RFLXN014); 黑龙江省教育厅“新世纪”人才基金((1153-NCET-007)

作者简介: 王 峰(1985-), 男, 黑龙江肇东人, 硕士, 主要从事胚胎工程与发育生物学研究, Tel: 0451-55190747, E-mail: wangfeng86147545@163.com; 刘仲凤(1984-), 女, 山东济南人, 硕士生, 主要从事胚胎发育机理研究, E-mail: jinying2064@yahoo.com。二者并列为第一作者

\* 通讯作者: 刘忠华, E-mail: liu086@yahoo.com

\* 通讯作者: 刘忠华, E-mail: liu086@yahoo.com

**Key words:** PGI<sub>2</sub>; embryo *in vitro* development; lipid metabolism; swine

随着各物种克隆,转基因动物相继出生,目前克隆与转基因育种方法的应用逐渐被大家重视。猪是农业生产中重要的家畜,并且可以作为人器官移植的供体来源,因此,猪的转基因改良应用逐渐获得重视。但是目前克隆猪的成功率低,猪体外胚胎发育质量差是制约转基因猪生产效率的因素之一。着床前胚胎游离在输卵管和子宫内,不与母体直接接触,便于进行体外操作,是生产转基因动物的重要材料。但是由于目前体外胚胎还无法具备与体内输卵管子宫环境类似的培养体系,主要是缺乏输卵管子宫分泌的调控因子,所以目前体外胚胎的发育能力还远不及体内胚胎<sup>[1]</sup>。对比体内胚胎生长环境,寻找一种更加接近母体条件的体外胚胎培养体系是提高体外胚胎发育质量的有效方法,为相关研究领域提供高质量体外胚胎材料。

前列环素(Prostacyclin)是花生四烯酸的衍生物,激素类生长因子,属于前列腺素(Prostaglandin)家族的一员,按照前列腺素家族的命名方式命名为 PGI<sub>2</sub>。PGI<sub>2</sub> 首次发现于血管平滑肌<sup>[2]</sup>,可以抑制血小板凝集和血管平滑肌收缩,起到防止血栓形成和降低血压的作用,用于治疗心脑血管疾病<sup>[3]</sup>。PGI<sub>2</sub> 存在于输卵管液和子宫液中,由输卵管和子宫绒毛上皮细胞分泌<sup>[4]</sup>,对着床前胚胎发育、子宫内环境和子宫内膜与胚胎间的相互作用等方面起到调控作用。在小鼠体内,输卵管上皮细胞 PGI<sub>2</sub> 的表达峰处于每个生殖周期中 8 细胞-桑椹胚阶段,这说明 PGI<sub>2</sub> 很可能从 8 细胞-桑椹胚阶段开始调控胚胎发育。环氧酶也叫前列腺素 H 合成酶(PGHS),存在 2 种异构酶 COX1 和 COX2。COX1 普遍认为是细胞中的常规因子,主要执行一些保守蛋白的修饰、一些小分子的加工以及维持细胞内的稳定环境。COX2 可以修饰细胞中的特定细胞因子,而且对细胞各种功能的调节具有组织特异性,其活性被外界环境精准调控<sup>[5-6]</sup>。有关小鼠的研究发现 COX1 在整个早期胚胎发育中都有表达,COX2 只在 8 细胞胚胎阶段以后的输卵管上皮表达<sup>[7]</sup>。在小鼠着床期间 COX2 的表达上调,促进了 PGI<sub>2</sub> 的合成,而 COX1 的表达没有显著变化<sup>[8]</sup>。COX2 在体内受到细胞因子<sup>[9]</sup>、分裂和肿瘤促进因子<sup>[10]</sup>等的调控,影响炎症反应、细胞分化和血管发生等过程<sup>[11]</sup>。COX2 作为前列腺素合成过程的限速酶,是

前列腺素家族合成的重要调控因子,能准确控制前列腺素家族合成。PGI<sub>2</sub> 可以与细胞膜表面的 G 蛋白偶联 PGI<sub>2</sub> 受体结合,再通过蛋白激酶 A 使 cAMP 磷酸化<sup>[12]</sup>。由于 PGI<sub>2</sub> 是一种脂溶性小分子,可以直接穿透细胞膜,与核受体 PPAR 结合,调控基因表达<sup>[13]</sup>。Tadashi 等人在对小鼠心肌细胞代谢方式的研究中发现,在小鼠心肌细胞中,PGI<sub>2</sub> 可以通过直接结合 PPAR $\delta$  来调节脂酰肉碱转移酶(CPT)的活性,而不依赖于细胞表面的 PGI<sub>2</sub> 受体<sup>[14]</sup>。已有研究证明,在小鼠和牛的体外胚胎培养液中加入 PGI<sub>2</sub> 类似物 iloprost 对胚胎发育有促进作用。最近有研究显示,在猪成熟培养液中加入 iloprost 后,提高了猪卵母细胞的成熟质量<sup>[15]</sup>。但是,目前还没有 PGI<sub>2</sub> 与猪体外胚胎发育相关的报道。

本试验采用猪的体外受精胚胎作为研究对象,应用 PGI<sub>2</sub> 类似物 iloprost 探讨 PGI<sub>2</sub> 对于着床前胚胎的发育调控机理,寻找高效的胚胎体外培养条件,证明了 PGI<sub>2</sub> 可以调控植入前胚胎脂代谢途径,促进着床前胚胎发育。

## 1 材料与方法

### 1.1 卵母细胞成熟培养

在哈尔滨市周边屠宰场取得的卵巢储存于 35~38 °C 并在加有双抗(青霉素-链霉素)的生理盐水中运回实验室,再用 37 °C 加有双抗的生理盐水清洗。用带有 18 号针头的 10 mL 注射器抽出 3~8 mm 卵泡中的卵泡液(包含 COCs、颗粒细胞、卵泡液)装于 50 mL 的离心管中。39 °C 充分沉淀后,弃掉上层液体,再加入 PVA-TL-HEPES。重复 2 遍后将沉淀转移至平皿中,在实体镜下用吸管选取包裹 3 层以上卵丘细胞的卵丘卵母细胞复合体(COCs)。将选出的 COCs 经过成熟培养液洗滴洗涤后,按照 50 个 $\cdot$ 500 mL<sup>-1</sup>加入至 1 个培养孔中培养。

### 1.2 成熟卵母细胞的挑选

成熟培养 42~46 h 后,将成熟 COCs 转移至 0.5%透明质酸酶中震荡 3 min,选取排出第一极体的成熟 MII 期卵母细胞,按照 25 个 $\cdot$ 50  $\mu$ L<sup>-1</sup> mTBM 加入到事先准备好的受精滴中。

### 1.3 精子的采集和精液的保存

精液取自美系大白种公猪,将人工采集的精液

储存于 39 °C 的恒温器皿中运输回实验室,用 andro-hep(minitube, Germany) 精液稀释液按照 1 : 2 稀释精液。稀释后的精液储存于 17 °C, 每隔 12 h 混匀 1 次。

#### 1.4 卵母细胞体外受精(IVF)

取出 17 °C 保存精液 1 mL, 39 °C 孵育 20 min, 再用 39 °C 加有 0.1% BSA 的 DPBS 洗 2 遍后, 检测精子密度。取出适量精子加入到受精液中, 直到精子密度为 250 个 ·  $\mu\text{L}^{-1}$ , 再取出 50  $\mu\text{L}$  加入受精滴, 确保受精密度为 1 : 500。

#### 1.5 试验分组方法

首先根据 Song 等在牛上研究所得的最佳浓度<sup>[16]</sup>, 分别在培养 0、24、48、72 h 时加入 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  iloprost, 以添加等量 DMSO 为对照组, 检测最佳 iloprost 添加时间。在最佳添加时间条件下, 分别以 0、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度添加 iloprost, 检测最适添加浓度。在最适添加条件下(最佳添加时间和浓度), 分别观察 iloprost 对体外受精, 核移植, 孤雌激活胚胎的影响效果, 观察添加 iloprost 对胚胎脂滴含量的影响, 以及能量代谢相

关基因表达量的变化。

#### 1.6 iloprost 稀释分装冻存

准备密封的氮气浴, 将瓶装的 iloprost(Cayman L18215, Germany) 500  $\mu\text{g}$  在氮气浴环境下开封, 并静置直到溶解 iloprost 的甲酸乙酯完全挥发, 加入 138.7  $\mu\text{L}$  DMSO 溶解, 分装 5  $\mu\text{L} \cdot \text{管}^{-1}$ , 冻存于 -20 °C。

#### 1.7 受精胚胎体外培养

受精 5~6 h 后, 经猪合子培养液 3(PZM-3) 洗涤后, 转入 PZM-3 培养滴中培养, 每 30~40 枚胚胎放入 500  $\mu\text{L}$  培养液中。培养过程中, 按照 1 : 10 000 倍稀释 iloprost 冻存液, 加入胚胎培养液内。对照组加入等浓度 DMSO。

#### 1.8 油红 O 染色测定脂肪酸含量

5 g 油红 O 溶解于 50 mL 异丙醇中过滤, 配制油红 O 饱和液。取油红 O 饱和液 10 倍稀释后留做工作液, 将胚胎放入工作液中 15 min 后, 经过 70% 酒精反复清洗至胚胎脂滴周隙清晰为止, 压片在可见光下观察(图 1)。图片采用 NIH image J 软件分析特定 RGB 值像素点数。

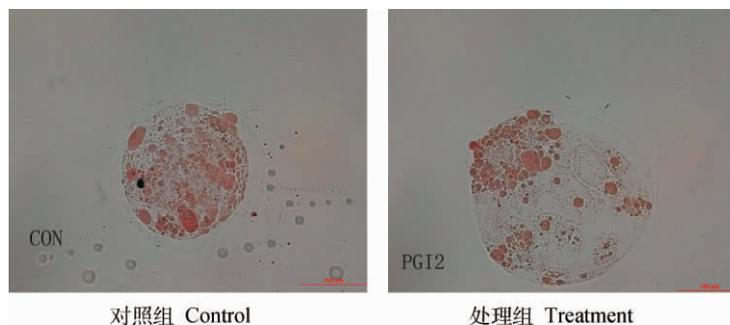


图 1 油红 O 染色照片(200×)

Fig. 1 Oil red O staining picture(200×)

#### 1.9 实时定量 RT-PCR 检测基因表达量

应用 Trizol (Invitrogen, USA) 提取总 RNA 后, 进行反转录 (TaKaRa 037A, Japan), 加入 real-time 检测试剂盒 (TaKaRa 041A, Japan), 引物由 Invitrogen 公司合成, 引物基本信息见表 1, 混和 25  $\mu\text{L}$  体系, 经 Bio-Rad real-time PCR 仪检测后, 数据通过 opticon monitor3 进行处理。

#### 1.10 数据处理

所有数据均以“平均值 ± 标准差 (mean ± SD)”表示, 所有胚胎发育数据经 SPSS 13.0 软件  $\chi^2$  检验 (Chi-square test), 油红 O 染色与基因表达试验数据经 one way ANOVA 模块进行显著性分析

( $P < 0.05$ , 存在显著差异)。

## 2 结果

### 2.1 不同时间加入 iloprost 对体外胚胎发育的影响

首先探讨 iloprost 在胚胎发育过程中作用的起始时间, 设计不同时间梯度进行处理, 观察 iloprost 对猪着床前胚胎发育的影响。采用小鼠和牛已有研究结果的最适浓度 1.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[15-18]</sup>。结果显示在受精 48 h 加入 iloprost 对着床前胚胎的促进作用最明显(表 2)。

表 1 Real-time RT-PCR 引物和退火温度

Table 1 Real-time RT-PCR primers and annealing temperature

mRNA	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物长度/bp Length	退火温度/°C Annealing temperature	基因编号 Gene ID
18SrRNA	AATCTCGGGTGGCTGAACGC CCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGAT	143	65	NR002170
<i>cox2</i>	AAGCGAGGACCAGCTTTCACCA CCACGGCAAAGCGGAGGTGTT	220	65	AF207824
<i>ppar<math>\delta</math></i>	CGCATGAAGCTGGAGTACGA TGGCACTTGTTCGCGTTCT	71	64	DQ437886
<i>creb</i>	GTGCCAAGGATTGAAGA TAGTACCCGGCTGAGTG	213	57	AY862387
<i>cpt2</i>	CGCTTCGGCAGATGGT CGCTGGGCTGGACAAT	209	57.6	AK350234
<i>pdk</i>	CTTGGCTGGTTTTGGTTACGGCTT AGTTCTTTGGTTCTTTGCTTGG	237	57	EU583382

表 2 不同时间加入 iloprost 对 IVF 胚胎发育的影响

Table 2 The effect of iloprost added at different times on embryo development

时间/h Time	重复次数 Repeat	总数 Embryo	囊胚率/% Blastocyst rate	囊胚细胞数 Blastocyst cells number
对照	3	145	12.3 ± 1.4 <sup>a</sup>	33.08 ± 1.94 <sup>a</sup>
0	3	145	11.5 ± 2.7 <sup>a</sup>	36.22 ± 3.49 <sup>a</sup>
24	3	145	10.7 ± 5.7 <sup>a</sup>	36.55 ± 7.34 <sup>a</sup>
48	3	145	19.5 ± 6.2 <sup>b</sup>	49.11 ± 5.11 <sup>b</sup>
72	3	145	11.9 ± 6.2 <sup>a</sup>	36.70 ± 9.17 <sup>a</sup>

不同字母表示存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。下同

The different superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ). The same as below

## 2.2 不同浓度 iloprost 处理对于体外胚胎发育的影响

采用试验 1 最佳加入 iloprost 的时期 48 h 加入不同浓度的 iloprost (0、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 探讨体外胚胎培养所需要 PGI<sub>2</sub> 的最适浓度。试验结果显示 1.0 和 2.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组的效果最好, 且二者间没有显著差异(表 3)。后续试验均采用受精后 48 h 2.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度条件进行。

## 2.3 iloprost 处理前后脂肪酸含量变化

本试验采用油红 O(苏丹红 5B)染色法(图 1)测定脂肪酸含量, 将 PGI<sub>2</sub> 处理组和对照组 IVF 胚胎分别进行油红 O 染色, 将获得图片经 image J 处理

后, 获得油红 O 染色的像素值, 比较不同组别胚胎剩余的脂滴含量。结果显示, iloprost 处理组胚胎的脂滴含量明显少于对照组(图 2)。试验结果说明 iloprost 促进了脂肪酸降解, 增加了脂肪代谢速度。

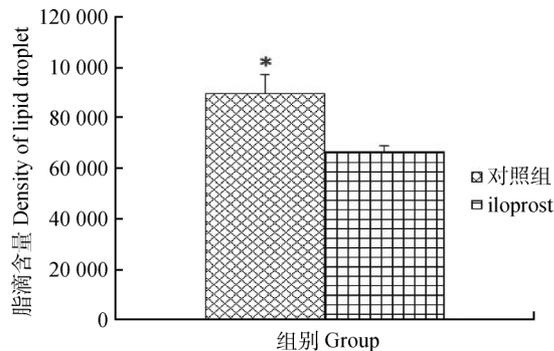
## 2.4 iloprost 对相关基因表达的影响

本试验选取前列腺素家族合成关键基因 *cox2* 作为前列腺素家族合成标志基因, 选取 *ppar $\delta$*  和 *creb* 作为 PGI<sub>2</sub> 信号途径激活标志基因, 选取 *pdk* 和 *cpt2* 作为能量代谢关键基因, 检测这些基因的表达量, 结果显示加入 iloprost 后, 胚胎 *cox2*、*ppar $\delta$* 、*creb*、*cpt2* 基因的表达量增加, *pdk* 基因的表达量与对照组无显著差异(图 3)。

表 3 不同 iloprost 处理浓度对于 IVF 胚胎发育的影响

Table 3 The effect of iloprost added with different concentrations on embryo development

浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration	重复次数 Repeat	总数 Embryo	囊胚率/% Blastocyst rate	囊胚细胞数 Blastocyst cells number
0	3	85	16 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	28.22 $\pm$ 5.39 <sup>a</sup>
0.2	3	85	23 $\pm$ 3.8 <sup>ab</sup>	38.33 $\pm$ 15.94 <sup>a</sup>
0.5	3	85	16 $\pm$ 5.8 <sup>a</sup>	36.66 $\pm$ 6.5 <sup>a</sup>
1.0	3	85	24 $\pm$ 4.8 <sup>ab</sup>	49.16 $\pm$ 8.75 <sup>b</sup>
2.0	3	85	28 $\pm$ 12.1 <sup>b</sup>	49.42 $\pm$ 12.56 <sup>b</sup>
5.0	3	85	16 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	33.26 $\pm$ 7 <sup>a</sup>
10.0	3	85	16 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	38.67 $\pm$ 7.23 <sup>a</sup>



\*. 代表显著差异 ( $P < 0.05$ )。下同

\*. Means significant difference ( $P < 0.05$ ). The same as below

图 2 加入 iloprost 后胚胎内脂滴含量变化

Fig. 2 The effect of the density of lipid droplets in embryos after adding iloprost

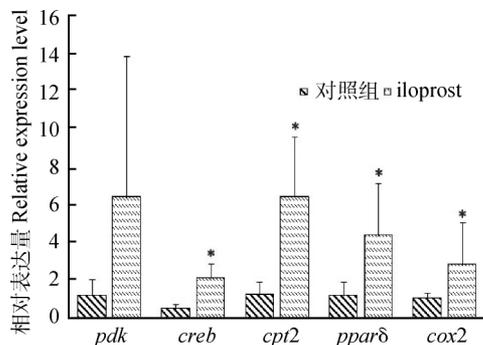


图 3 iloprost 对相关基因表达的影响

Fig. 3 The effect of iloprost on related genes expression

### 3 讨论

本试验在于探讨 PGI<sub>2</sub> 类似物 iloprost 对猪体外着床前胚胎发育的影响,为建立高效体外胚胎培

养体系奠定基础。试验结果表明,在猪体外胚胎培养液中加入 PGI<sub>2</sub> 类似物 iloprost 后,胚胎体外发育囊胚率显著上升,囊胚细胞数增多。前人研究成果和本试验发育数据充分表明了 PGI<sub>2</sub> 是调控着床前胚胎发育的重要旁分泌因子,在早期胚胎发育中起到调控胚胎脂肪酸代谢的作用。

有研究显示,在牛体外胚胎培养液内加入 PGI<sub>2</sub> 后,体外受精胚胎和核移植孵化率明显增加。Iloprost 的半衰期是 24 h, iloprost 加入培养液后在短期内就会降解。但试验结果表明,其降解后,胚胎依赖 PGI<sub>2</sub> 的信号途径直到囊胚期依然处于激活状态,这说明外源的 iloprost 促进了内源前列腺素合成。试验结果显示,COX2 的表达量增加,证明加入 PGI<sub>2</sub> 后,促进了 PGH<sub>2</sub> 合成,增加了胚胎合成前列腺素的量。推测外源 PGI<sub>2</sub> 促进内源前列腺素表达的机制是 PGI<sub>2</sub> 可以与 PPAR $\delta$  结合,使 PPAR $\delta$  活化,与视黄醇 X 受体(RXR)结合形成二聚体,这种二聚体可以直接与基因表达调控序列的 PPAR 结合区域(PPRE)结合,进而调控相关基因表达。PPRE 存在于多种代谢相关酶的调控序列,COX2 的调控序列中就包含有 PPRE 元件,可以与 PPAR 结合增加 COX2 的表达量。外源的 PGI<sub>2</sub> 和内源 PPAR $\delta$  相互作用,促进 PPAR $\delta$  表达量上升。而上升的 PPAR $\delta$  又促进 COX2 的表达。PPAR $\delta$  和 CREB 是目前已知 PGI<sub>2</sub> 调控表达的 2 种细胞信号蛋白。PPAR 可以直接和基因组中特定结合区域(PPRE)结合,调控下游基因表达。cAMP 应答蛋白(CREB)参与 cAMP-PKC 途径,调控胚胎内多种生长分化相关途径。本试验结果显示,加入 PGI<sub>2</sub> 后,PPAR $\delta$  和 CREB 的表达量上升,PGI<sub>2</sub> 可以激活

cAMP 应答通路。在小鼠体内最先发现的 PGI<sub>2</sub> 应答通路是通过 PGI<sub>2</sub> 表面受体(IP)刺激细胞应答的效应<sup>[19]</sup>。这种应答主要是通过 G 蛋白偶联的 IP 和 PGI<sub>2</sub> 结合后促使 G 蛋白活化,活化的 G 蛋白使 PKC 磷酸化,促进 ATP 环化为 cAMP 引起细胞内一系列反应<sup>[20]</sup>。但是在猪、牛等大型家畜体内还没有找到 PGI<sub>2</sub> 相关的表面受体。猪体内是否存在 PGI<sub>2</sub> 依赖的细胞膜表面受体还不能确定,但是对于小鼠体内 G 蛋白所引起的 ATP 磷酸化形成 cAMP,使 cAMP 量增加的现象,在先前研究的牛体内<sup>[16]</sup>以及本试验均显示相似的结果,加入 PGI<sub>2</sub> 后,cAMP 应答蛋白(CREB)的表达量上升。

着床前胚胎培养液中加入葡萄糖,而胚胎中含有大量脂肪酸。一般情况下,葡萄糖和脂肪酸代谢是细胞供能的 2 种主要方式。Higa 等在针对糖尿病大鼠模型研究中发现,在体外培养的大鼠胚胎中加入 PGI<sub>2</sub> 类似物后各种膜脂类的合成量都发生了显著变化,胚胎移入体内后,胚胎着床率明显增加<sup>[21]</sup>,这说明 PGI<sub>2</sub> 处理能调控能量代谢,提高糖尿病模型大鼠的胚胎发育质量。PGI<sub>2</sub> 增加了 PPAR $\delta$  的表达水平,PPAR $\delta$  可以调控细胞代谢,这种调控可能会涉及到 2 种代谢重要酶的表达量。本研究选取糖代谢的关键酶丙酮酸激酶(PDK)和脂代谢的关键酶肉碱脂酰转移酶 2(CPT2),它们是 2 种代谢途径的限速酶。PDK 是一种催化丙酮酸磷酸化为磷酸烯醇式丙酮酸的酶,是体内糖代谢的标志酶,调控糖代谢的水平。CPT2 与乙酰辅酶 A 共同作用将乙酰基转运至线粒体,是体内组织利用长链脂肪酸分解供能所必需的酶类。试验结果显示 PDK 的表达量与对照组相比差异不显著。而试验组 CPT2 的表达量显著高于对照组。结果表明在猪体外胚胎培养液中加入 PGI<sub>2</sub> 激活了 PPAR $\delta$  信号通路,进而促进了胚胎脂代谢水平,为胚胎发育提供了所需的能量,促进了囊胚发育比率,提高了胚胎发育质量。

经过对胚胎体外培养体系多年的研究,体外胚胎的发育率与发育质量都得到了明显的提升。但是相比体内胚胎,体外培养胚胎的质量还有待提高。对比体内胚胎生长环境,改善体外胚胎培养体系,使胚胎的体外发育质量提高,为胚胎工程研究提供理想材料。输卵管内存在多种胚胎发育相关的调控因子,筛选出更多胚胎发育相关的因子应用于体外胚胎培养体系,将会促进体外胚胎发育能力,使体外胚胎的生理水平更接近体内胚胎。本试验将前列腺素

类似物 iloprost 添加到猪体外胚胎培养体系,提高了猪体外胚胎的发育质量,改善大家畜体外胚胎培养体系,希望可以促进胚胎工程相关领域发展。

#### 4 结 论

目前克隆猪成功效率低下,猪体外胚胎发育质量低,制约了体外胚胎研究领域发展。本研究将 PGI<sub>2</sub> 类似物 iloprost 添加到猪胚胎培养液中,发现体外受精胚胎发育囊胚率提高、囊胚细胞数增多。iloprost 处理组体外受精囊胚脂肪酸含量显著低于对照组。检测 iloprost 加入后体外受精囊胚相关基因表达量的变化,发现脂代谢相关基因表达量较对照组上升。综上所述,iloprost 可以促进胚胎降解脂肪酸,提高胚胎体外发育能力,改善猪胚胎体外培养体系。

#### 参考文献:

- [1] HARDY K, SPANOS S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo[J]. *J Endocrinol*, 2002, 172: 221-236.
- [2] MONCADA S, GRYGLEWSKI R, BUNTING S, et al. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation[J]. *Nature*, 1976, 263: 663-665.
- [3] SMITH W L. Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells[J]. *Annu Rev Physiol*, 1986, 48: 251-262.
- [4] HUANG J C, ARBAB F, TUMBUSCH K J, et al. Human fallopian tubes express prostacyclin (PGI) synthase and cyclooxygenases and synthesize abundant PGI[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87: 4361-4368.
- [5] SIROIS J, SIMMONS D L, RICHARDS J S. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles. Induction *in vivo* and *in vitro*[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267: 11586-11592.
- [6] WANG H, WEN Y, MOONEY S, et al. Phospholipase A(2) and cyclooxygenase gene expression in human preimplantation embryos[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87: 2629-2634.
- [7] PAKRASI P L, JAIN A K. Evaluation of cyclooxyge-

- nase 2 derived endogenous prostacyclin in mouse pre-implantation embryo development *in vitro* [J]. *Life Sci*, 2007, 80:1503-1507.
- [ 8 ] LIM H, GUPTA R A, MA W G, et al. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta [J]. *Genes Dev*, 1999, 13:1561-1574.
- [ 9 ] SEIBERT K, ZHANG Y, LEAHY K, et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91:12013-12017.
- [10] SAMET J M, FASANO M B, FONTEH A N, et al. Selective induction of prostaglandin G/H synthase I by stem cell factor and dexamethasone in mast cells [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270:8044-8049.
- [11] SMITH W L, DEWITT D L, GARAVITO R M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology [J]. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69:145-182.
- [12] NASRALLAH R, LANDRY A, SCHOLEY J W, et al. Characterization of the PGI2/IP system in cultured rat mesangial cells [J]. *Pros Leuk Ess Fat Acids*, 2004, 70:455-464.
- [13] FORMAN B M, CHEN J, EVANS R M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94:4312-4317.
- [14] TADASHI K, HISAO H, YASUSHI F, et al. Carbacynin induces carnitine palmitoyltransferase-1 in cardiomyocytes via peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\delta$  independent of the IP receptor signaling pathway [J]. *J Mol Cel Cardiol*, 2007, 43:54-62.
- [15] KIM J S, CHAE J I, SONG B S, et al. Iloprost, a prostacyclin analogue, stimulates meiotic maturation and early embryonic development in pigs [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2010, 22:437-447.
- [16] SONG B S, KIM J S, KIM C H, et al. Prostacyclin stimulates embryonic development via regulation of the cAMP response element-binding protein-cyclooxygenase-2 signalling pathway in cattle [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2009, 21:400-407.
- [17] HUANG J C, WUN W S, GOLDSBY J S, et al. Stimulation of embryo hatching and implantation by prostacyclin and peroxisome proliferator-activated receptor delta activation: implication in IVF [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22:807-814.
- [18] HUANG J C, WUN W S, GOLDSBY J S, et al. Prostacyclin receptor signaling and early embryo development in the mouse [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22:2851-2856.
- [19] HUANG J C, GOLDSBY J S, ARBAB F, et al. Oviduct prostacyclin functions as a paracrine factor to augment the development of embryos [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19:2907-2912.
- [20] JIN X L, O'NEILL C. cAMP-responsive element-binding protein expression and regulation in the mouse preimplantation embryo [J]. *Reproduction*, 2007, 134:667-675.
- [21] HIGA R, GONZALEZ E, PUSTOVRH M C, et al. PPARdelta and its activator PGI2 are reduced in diabetic embryopathy: involvement of PPARdelta activation in lipid metabolic and signalling pathways in rat embryo early organogenesis [J]. *Mol Hum Reprod*, 2007, 13:103-110.

(编辑 郭云雁)