

# 褪黑素对控制性超排卵周期中体外成熟卵母细胞受精后所获胚胎发育的影响

朱琦<sup>1,2</sup>, 丁丁<sup>2</sup>, 王凯娟<sup>2</sup>, 霍然<sup>3</sup>, 张学森<sup>3</sup>, 刘婷婷<sup>4</sup>, 曹云霞<sup>2</sup>, 章志国<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探究不同浓度褪黑素(MT)对控制性超排卵(COH)周期中体外成熟卵母细胞受精后所获胚胎发育的影响。方法 收集COH周期的人未成熟卵母细胞行体外成熟(IVM)培养及单精子胞浆内注射(ICSI)受精,接着依次用含 $0$ 、 $10^{-11}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-7}$ 及 $10^{-5}$  mol/L MT的培养液进行分裂期和囊胚期胚胎体外培养,收集和冻存优质囊胚,最后通过array-CGH对复苏后优质囊胚进行非整倍体检测。结果  $10^{-9}$  mol/L组的囊胚率高于 $10^{-11}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-5}$ 及 $0$  mol/L组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.0001$ ,  $P < 0.01$ );  $10^{-9}$  mol/L组的优质囊胚率均高于其他组,但仅与 $10^{-5}$  mol/L和 $0$  mol/L组相比,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); MT组的非整倍体发生率(17.6%)低于非MT组(33.3%),但差异无统计学意义。结论 人类胚胎培养液中添加MT可以促进胚胎的体外发育,这种促进作用存在浓度相关性, $10^{-9}$  mol/L是最佳的作用浓度。

**关键词** 褪黑素; 胚胎体外培养; 胚胎发育; 非整倍体

**中图分类号** R 321; R 329

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2022)04-0616-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.020

与体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)相比,体外成熟(*in vitro* maturation, IVM)治疗妊娠率相对较低,主要是因为获得的优质胚胎数目较少。胚胎在体外培养过程中不可避免地处于一个相对高氧的环境,导致胚胎产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS),高水平的ROS会造成氧化应激进而引起细胞损伤、线粒体功能障碍、胚胎发育阻断和凋

亡<sup>[1]</sup>。因此,在培养液中添加抗氧化剂是抑制氧化损伤并促进胚胎体外发育的重要途径之一。褪黑素(melatonin, MT)作为一种强力的抗氧化剂,有动物研究<sup>[2]</sup>证明在培养液中添加合适浓度的MT可提高绵羊的囊胚形成率。然而,在人类胚胎培养液中添加MT进行胚胎体外培养却鲜有报道,因此,该研究旨在探讨人类胚胎培养液中添加MT能否改善胚胎的发育结局。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象及分组** 收集控制性超排卵(controlled ovarian hyperstimulation, COH)周期中,年龄在36岁以下患者的未成熟卵母细胞(germinal, GV或metaphase I, MI)行IVM培养,随后将体外成熟的卵母细胞(IVM-MII)随机分为MT组和非MT组,MT组的IVM-MII卵母细胞行单精子胞浆内注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)后,置于添加了不同浓度( $10^{-11}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-5}$  mol/L) MT的分裂期胚胎培养液培养3 d,随后将分裂期胚胎转入与分裂期培养液所含MT浓度一致的囊胚期培养液中继续培养2~3 d,而非MT组卵母细胞ICSI后直接置于不含MT的胚胎培养液中培养,观察各阶段胚胎发育情况。各组患者的年龄、基础卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、雌激素(estradiol, E2)、身体质量指数(body mass index, BMI)、不孕年限和获卵数等相比较差异均无统计学意义,见表1。该研究已获得安徽医科大学伦理委员会批准(编号:2015013)。

**1.2 药物与试剂** 重组人卵泡刺激素(Serino Barueri, SP, Brazil),促性腺激素释放激素拮抗剂(Merk Serono SA-Geneva, Switzerland),人绒毛膜促性腺激素(AESCA Pharma, Austria),褪黑素(Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA),胚胎培养液(Cook, Sydney, Australia),组织培养油(Vitrolife, Goteborg, Sweden),SurePlex DNA Amplification System试剂盒(New England Biolabs, USA)。

**1.3 控制性超排卵方案** 所有入组患者均采用

2022-03-17 接收

**基金项目:** 国家自然科学基金(编号:82071724);安徽高校自然科学基金项目(编号:KJ2020A0202);生殖医学国家重点实验室开放课题(编号:SKLMR-K202005)

**作者单位:** <sup>1</sup>安徽医科大学生物医学工程学院,合肥 230032

<sup>2</sup>安徽医科大学第一附属医院妇产科,合肥 230022

<sup>3</sup>南京医科大学生殖医学国家重点实验室,南京 211166

<sup>4</sup>安徽省胸科医院病案信息室,合肥 230022

**作者简介:** 朱琦,女,硕士研究生;

刘婷婷,女,病案信息技术师,责任作者, E-mail: liutingting090@163.com;

章志国,男,副教授,副研究员,硕士生导师,责任作者, E-mail: zzg\_100@163.com

表1 患者基本临床资料( $\bar{x} \pm s$ )

指标	0 mol/L	$10^{-11}$ mol/L	$10^{-9}$ mol/L	$10^{-7}$ mol/L	$10^{-5}$ mol/L	F 值	P 值
男方年龄(岁)	32.72 ± 4.27	31.83 ± 4.03	31.03 ± 3.98	31.63 ± 3.78	31.42 ± 3.83	0.663	>0.05
女方年龄(岁)	31.32 ± 2.78	30.32 ± 2.90	30.62 ± 3.82	30.78 ± 3.06	30.72 ± 2.97	1.116	>0.05
不孕年限(年)	3.024 ± 1.69	3.042 ± 1.89	3.036 ± 1.71	3.079 ± 1.59	3.063 ± 1.60	1.660	>0.05
获卵数(个)	18.58 ± 7.30	17.98 ± 6.48	17.92 ± 7.53	19.02 ± 6.92	19.20 ± 7.96	2.132	>0.05
FSH(mIU/ml)	7.042 ± 3.48	6.498 ± 2.06	6.989 ± 1.63	7.042 ± 2.06	6.948 ± 2.87	0.898	>0.05
LH(mIU/ml)	5.389 ± 2.30	4.962 ± 3.04	5.821 ± 4.97	4.982 ± 4.39	5.381 ± 3.54	0.650	>0.05
E2(pmol/L)	172.9 ± 109.63	174.0 ± 104.61	168.1 ± 97.80	176.8 ± 110.58	169.2 ± 104.62	0.403	>0.05
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	21.58 ± 2.80	21.59 ± 1.34	22.18 ± 2.58	22.36 ± 1.75	21.71 ± 3.21	1.248	>0.05

GnRH 拮抗剂方案(灵活方案)进行超促排卵,即从月经周期第2~3天给予重组人卵泡刺激素(gonadotropins, Gn, Gonal F)进行超排卵,4~5 d后根据卵泡大小及激素水平调整Gn用量,当优势卵泡达到12~14 mm时添加促性腺激素释放激素拮抗剂(gonadotropin-releasing hormone antagonist, GnRH-A, Cetrotide)至注射人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG, Pregnyl)日。当卵巢上2~3个卵泡直径 $\geq 18$  mm时,注射10 000 U HCG,在阴道超声指导下于36~38 h后完成取卵。

**1.4 IVM培养** 收集COH周期的GV/MI卵母细胞,挑选形态正常的卵母细胞入已准备好且平衡过夜的IVM液培养,24 h后挑选IVM-MII卵母细胞行ICSI,随后进行受精及胚胎体外发育培养。IVM详细过程参考已发表文献<sup>[3]</sup>。

**1.5 胚胎培养液的准备** 用无水乙醇将MT溶解并稀释至浓度为 $10^{-2}$  mol/L(母液),将母液分装进EP管,每管约10~20  $\mu$ l,置于-20  $^{\circ}$ C保存;每次实验前1 d,取一至多管母液复温后用胚胎培养液(卵裂期或囊胚期胚胎培养液)通过稀释倍数法将母液稀释至适当的MT浓度( $10^{-11}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-5}$  mol/L),充分混匀后分别将不同MT浓度的胚胎培养液在直径60 mm的培养皿中制备6~8滴液滴(30  $\mu$ l/滴),并覆盖2 ml组织培养油。最后将培养皿移至37  $^{\circ}$ C、6% CO<sub>2</sub>及饱和湿度条件下平衡18 h,备用。

**1.6 胚胎体外培养** IVM-MII卵母细胞行ICSI后,依次入分裂期及囊胚期培养液行5~6 d的胚胎体外培养,最后收集优质囊胚。ICSI授精、胚胎体外培养、发育观察及胚胎评估等详细过程参考已发表文献<sup>[4]</sup>。

**1.7 胚胎冷冻及复苏** 应用玻璃化法冷冻和复苏所获得的优质囊胚,并于-196  $^{\circ}$ C液氮中保存半年,随后解冻,复苏后的胚胎应用array CGH技术检测其非整倍体的发生情况。胚胎冻融的详细操作过程

参考已发表文献<sup>[5]</sup>。

**1.8 Array CGH检测** 应用SurePlex DNA Amplification System试剂盒对复苏后的胚胎进行全基因组扩增,然后通过array CGH方法(BlueGnome 24SureV3 packagekit)对扩增后的产物进行检测,最后通过PGXCloud系统PGS/gDNA分析软件2.0分析并出具报告。

**1.9 统计学处理** 采用SPSS 25.0统计学软件进行数据整理与分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,符合正态分布及方差齐性资料采用单因素方差分析比较组间差异;计数资料采用 $\chi^2$ 检验法或Fisher精确概率法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 MT对IVM-MII卵母细胞受精及受精后所获胚胎发育的影响** 该研究共收集721枚人GV/MI卵母细胞行IVM培养,获得IVM-MII卵母细胞589枚。如表2所示:589枚IVM-MII卵母细胞行ICSI受精和胚胎培养,共获得囊胚125枚,其中优质囊胚53枚,见图1。47枚发育自MT组,6枚发育自非MT组。 $10^{-9}$  mol/L组的囊胚率分别与 $10^{-11}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-5}$ 、0 mol/L组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.0001$ ,  $P < 0.01$ ); $10^{-9}$  mol/L组的优质囊胚率分别与 $10^{-5}$  mol/L和0 mol/L组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。以上结果表明胚胎培养液中添加 $10^{-9}$  mol/L MT能明显改善人卵母细胞ICSI后受精及受精后所获胚胎的体外发育结果,且 $10^{-9}$  mol/L是最佳的作用浓度。

**2.2 MT对源于GV/MI期的IVM-MII卵母细胞受精及受精后所获胚胎发育的影响** 共589枚IVM-MII卵母细胞,其中295枚源于GV期卵母细胞(GV-IVM-MII),294枚源自MI期卵母细胞(MI-IVM-MII)。

表2 添加不同浓度 MT 对胚胎体外发育的影响

指标	0 mol/L	10 <sup>-11</sup> mol/L	10 <sup>-9</sup> mol/L	10 <sup>-7</sup> mol/L	10 <sup>-5</sup> mol/L	χ <sup>2</sup> 值	P 值
IVM-MII (n)	109	126	117	125	112	-	-
受精率 (%)	88/109 (80.7)	111/126 (88.1)	111/117 (94.9) **###	110/125 (88.0)	94/112 (83.9)	11.537	<0.05
卵裂率 (%)	77/88 (87.5)	96/111 (86.5)	105/111 (94.6)	97/110 (88.2)	79/94 (84.0)	6.328	>0.05
囊胚率 (%)	19/77 (24.7)	26/96 (27.1) #	47/105 (44.8) **&§###	23/97 (23.7)	10/79 (12.7)	25.417	<0.000 1
优质囊胚率 (%)	6/77 (7.8)	11/96 (11.5)	21/105 (20.0) *##	10/97 (10.3)	5/79 (6.3)	10.553	<0.05

与 0 mol/L 组比较: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01; 与 10<sup>-11</sup> mol/L 组比较: & P < 0.05; 与 10<sup>-7</sup> mol/L 组比较: § P < 0.01; 与 10<sup>-5</sup> mol/L 组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.0001



图1 优质囊胚代表图 ×500

a: 4AA; b: 4AB; c: 4AB; d: 4AB

2.2.1 MT 对 GV-IVM-MII 卵母细胞受精及受精后所获胚胎发育的影响 如表 3 所示: 295 枚 GV-IVM-MII 卵母细胞行 ICSI 受精和胚胎体外培养, 共获得囊胚 71 枚, 其中优质囊胚 32 枚。10<sup>-9</sup> mol/L 组的囊胚率分别与 10<sup>-11</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-5</sup> mol/L 组相比, 差异统计学有统计学意义 (P < 0.05, P < 0.05, P < 0.01), 优质囊胚率方面, 10<sup>-9</sup> mol/L 组均高于其他组, 但差异无统计学意义。

2.2.2 MT 对 MI-IVM-MII 卵母细胞受精及受精后

所获胚胎发育的影响 如表 4 所示: 294 枚 MI-IVM-MII 卵母细胞行体外授精和胚胎体外培养, 共获得囊胚 54 枚, 其中优质囊胚 21 枚。受精率、卵裂率、囊胚率和优质囊胚率方面: 10<sup>-9</sup> mol/L 组的受精率和卵裂率均高于其他组, 但差异无统计学意义; 10<sup>-9</sup> mol/L 组的囊胚率分别与 10<sup>-7</sup>、10<sup>-5</sup> 和 0 mol/L 组相比, 差异有统计学意义 (P < 0.05, P < 0.01, P < 0.05); 10<sup>-9</sup> mol/L 组的优质囊胚率均高于其他组, 但差异无统计学意义。

表3 MT 对 GV-IVM-MII 卵母细胞受精及受精后所获胚胎发育的影响

指标	0 mol/L	10 <sup>-11</sup> mol/L	10 <sup>-9</sup> mol/L	10 <sup>-7</sup> mol/L	10 <sup>-5</sup> mol/L	χ <sup>2</sup> 值	P 值
IVM-MII (n)	55	63	60	60	57	-	-
受精率 (%)	47/55 (85.5)	57/63 (90.5)	59/60 (98.3)	54/60 (90.0)	50/57 (87.7)	6.446	>0.05
卵裂率 (%)	42/47 (89.4)	51/57 (89.5)	56/59 (94.9)	49/54 (90.7)	42/50 (84.0)	3.616	>0.05
囊胚率 (%)	12/42 (28.6)	14/51 (27.5)	26/56 (46.4) *##	13/49 (26.5)	6/42 (14.3)	12.698	<0.05
优质囊胚率 (%)	4/42 (9.5)	6/51 (11.8)	13/56 (23.2)	6/49 (12.2)	3/42 (7.1)	6.811	>0.05

与 10<sup>-11</sup> mol/L 组比较: \* P < 0.05; 与 10<sup>-7</sup> mol/L 组比较: # P < 0.05; 与 10<sup>-5</sup> mol/L 组比较: & P < 0.01

表4 MT 对 MI-IVM-MII 卵母细胞受精及受精后胚胎发育的影响

指标	0 mol/L	10 <sup>-11</sup> mol/L	10 <sup>-9</sup> mol/L	10 <sup>-7</sup> mol/L	10 <sup>-5</sup> mol/L	χ <sup>2</sup> 值	P 值
IVM-MII (n)	54	63	57	65	55	-	-
受精率 (%)	41/54 (75.9)	54/63 (85.7)	52/57 (91.2)	56/65 (86.2)	45/55 (81.8)	5.463	>0.05
卵裂率 (%)	35/41 (85.4)	45/54 (83.3)	49/52 (94.2)	48/56 (85.7)	37/45 (82.2)	3.934	>0.05
囊胚率 (%)	7/35 (20.0)	12/45 (26.7)	21/49 (42.9) *##	10/48 (20.8)	4/37 (10.8)	13.196	<0.05
优质囊胚率 (%)	2/35 (5.7)	5/45 (11.1)	8/49 (16.3)	4/48 (8.3)	2/37 (5.4)	4.030	>0.05

与 0 mol/L 组比较: \* P < 0.05; 与 10<sup>-7</sup> mol/L 组比较: # P < 0.05; 与 10<sup>-5</sup> mol/L 组比较: & P < 0.01

**2.3 Array CGH 检测结果** 该研究共获得并冻存优质囊胚 53 枚, 随后共复苏 40 枚优质囊胚用于 array CGH 检测, 其中非 MT 组 (0 mol/L) 6 枚胚胎接受检测, 而 MT 组共 34 枚 ( $10^{-11}$  mol/L:  $n=7$ ;  $10^{-9}$  mol/L:  $n=16$ ;  $10^{-7}$  mol/L:  $n=8$ ;  $10^{-5}$  mol/L:  $n=3$ )。非 MT 组有 2 枚胚胎被诊断为非整倍体 (整条染色体水平和片段水平的缺失), 其余 4 枚胚胎正常; MT 组中, 共 6 枚胚胎被诊断为非整倍体 (整条染色体水平和片段水平的缺失、重复和嵌合), 其余 28 枚胚胎正常。结果表明 MT 组的非整倍体发生率 (17.6%) 低于非 MT 组 (33.3%), 但两者之间差异无统计学意义。Array CGH 结果代表图如图 2 所示。

### 3 讨论

人类辅助生殖技术 (assisted reproduction technology, ART) 中的受精和胚胎培养方案与过去相比有了很大改进, 然而 ART 得到的胚胎只有少数可以足月发育, 主要原因是体外培养难以完全模拟胚胎体内生长的动态环境。研究<sup>[6]</sup>表明氧化应激对胚胎发育起着抑制作用。体内生长的胚胎会受到体内抗氧化物质如谷胱甘肽等的保护而免受氧化应激, 而在体外培养的胚胎不可避免地处于一个相对高氧的环境, 会因为抗氧化防御系统失衡而导致严重的氧化应激损伤, 使胚胎在发育过程中产生大量的 ROS<sup>[7]</sup>, 最终严重降低胚胎的体外发育潜能。MT 作为调节体内生理周期的内源性物质, 能够对抗氧化应激, 直接清除 ROS 等自由基, 具有很强的抗氧化作用<sup>[8]</sup>。因此该研究通过在胚胎培养液中添加不同浓度的 MT, 观察 MT 的处理对胚胎体外发育的影响。

动物研究<sup>[9]</sup>显示, 在胚胎培养液中添加 MT 能改善胚胎的体外发育结果, 同时也证实这种改善作

用存在浓度相关性。另有研究证明 MT 可降低卵母细胞中 ROS 水平, 并对小鼠<sup>[10]</sup>、牛<sup>[11]</sup>和猪<sup>[12]</sup>的体外胚胎培养起到促进作用。2020 年 Zou et al<sup>[6]</sup>发现在人 IVM 液中添加 MT 可以通过促进线粒体功能, 抑制氧化应激损伤进而改善人未成熟卵子的 IVM 结果, 并且证实  $10^{-5}$  mol/L 是最佳的作用浓度。基于以往的研究结论可以推测: 在人类胚胎的培养液中添加 MT 也可以改善胚胎的体外发育结果, 并且其作用效果也存在浓度相关性。因此, 本研究收集了 COH 周期的人未成熟卵母细胞进行 IVM 培养, 以获得 IVM-MII 卵母细胞并对其进行 ICSI 授精, 接着用含  $0$ 、 $10^{-11}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-5}$  mol/L MT 的培养液对受精卵进行体外培养, 随后对各组的受精及胚胎的早期发育状况进行系统地比较分析。结果显示: 若不考虑卵母细胞未成熟阶段,  $10^{-9}$  mol/L 组的囊胚率优于  $10^{-11}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-5}$ 、 $0$  mol/L 组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.0001$ ,  $P < 0.01$ ); 优质囊胚率也均高于其他组, 但仅与  $10^{-5}$  和  $0$  mol/L 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。以上研究结果表明:  $10^{-9}$  mol/L MT 的应用可以显著改善人类胚胎的体外发育结果, 提高优质囊胚的形成。随后, 研究组将未成熟卵母细胞按发育阶段进一步分为 GV 组和 MI 组, 发现 MI 组的成熟率高于 GV 亚组 (90.7% vs 83.2%,  $P < 0.01$ ), 而 GV 组的受精率高于 MI 组 (88.4% vs 74.9%,  $P < 0.0001$ ); 卵裂率、囊胚率和优质囊胚率方面, GV 组均高于 MI 亚组, 但差异无统计学意义。高明等<sup>[4]</sup>研究发现: GV 期卵母细胞的成熟率低于 MI 期; 受精率和卵裂率方面两者相当; 囊胚和优胚率方面, GV 期高于 MI 期, 但组间差异无统计学意义。Ouandaogo et al<sup>[13]</sup>研究显示 GV 期卵母细胞的受精率高于 MI 期卵母细胞。这些结果与本研究相一致, 均提示了 GV 期卵母细胞来源的胚胎发育潜能可能高于 MI 期。

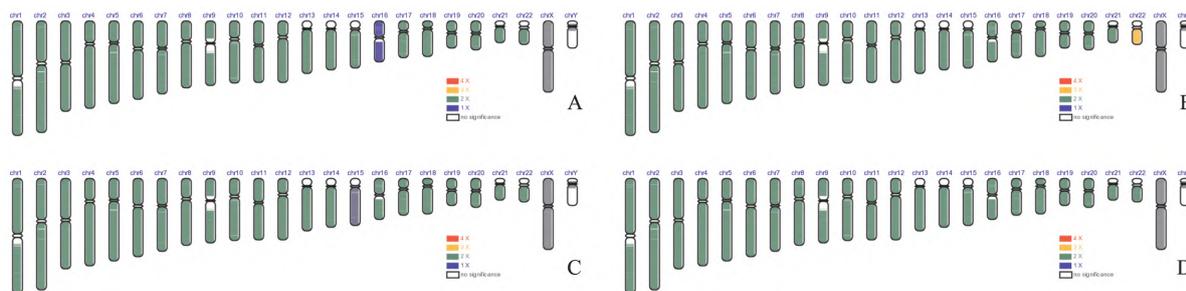


图2 优质囊胚 CGH 结果代表图

A: 整条染色体水平缺失; B: 整条染色体水平重复; C: 整条染色体 30% 以下嵌合; D: 整倍体平衡囊胚代表图

IVF 过程中,染色体异常是导致胚胎发育失败的关键因素,而非整倍体的发生率(3.1%~57%)是导致流产的主要危险因素,尽管胚胎表现为正常的形态<sup>[14-15]</sup>。本研究 array CGH 结果显示:MT 组优质囊胚中的非整倍体发生率(17.6% 6/34) 低于非 MT 组(33.3% 2/6),表明在胚胎培养基中补充  $10^{-9}$  mol/L MT 是有效的。

IVF/ICSI 作为 ART 的重要组成部分,越来越受到人们的关注,任何影响卵母细胞质量的因素都会影响其受精及后续胚胎的发育。本研究探究了不同浓度 MT 对 COH 周期中 IVM-MII 卵母细胞胚胎发育的影响。结果表明人类胚胎培养液中添加 MT 可以促进胚胎的体外发育,这种促进作用存在浓度相关性, $10^{-9}$  mol/L 是最佳的作用浓度。这一结论为改善胚胎体外发育结果提供了一种新的策略,具有重要的临床应用价值。

### 参考文献

- [1] Jo Y, Yoon S, Park B, et al. Particulate matter exposure during oocyte maturation: cell cycle arrest, ROS generation, and early apoptosis in mice[J]. *Front Cell Dev Biol* 2020 8:602097.
- [2] Barros V R P, Monte A P O, Santos J M S, et al. Melatonin improves development, mitochondrial function and promotes the meiotic resumption of sheep oocytes from *in vitro* grown secondary follicles[J]. *Theriogenology* 2020 144:67-73.
- [3] Sacha C R, Kaser D J, Farland L V, et al. The effect of short-term exposure of cumulus-oocyte complexes to *in vitro* maturation medium on yield of mature oocytes and usable embryos in stimulated cycles[J]. *J Assist Reprod Genet* 2018 35(5):841-9.
- [4] 高明,郝燕,陈大蔚,等.褪黑素对 ICSI 周期中人未成熟卵母细胞体外成熟结果的影响[J]. *安徽医科大学学报* 2014, 49(8):1044-7.
- [5] 穆耀琴,丁丁,魏兆莲,等.复苏周期中不同发育天数双囊胚移植临床结局分析[J]. *安徽医科大学学报* 2020, 55(10):1610-3.
- [6] Zou H, Chen B, Ding D, et al. Melatonin promotes the development of immature oocytes from the COH cycle into healthy offspring by protecting mitochondrial function[J]. *J Pineal Res* 2019 68(1):e12621.
- [7] Li C, Hao H, Zhao Y, et al. Melatonin improves the fertilization capacity of sex-sorted bull sperm by inhibiting apoptosis and increasing fertilization capacitation *via* MT1[J]. *Int J Mol Sci* 2019 20(16):3921.
- [8] Tamura H, Jozaki M, Tanabe M, et al. Importance of melatonin in assisted reproductive technology and ovarian aging[J]. *Int J Mol Sci* 2020 21(3):1135.
- [9] Tian X, Wang F, He C, et al. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach[J]. *J Pineal Res* 2014 57(3):239-47.
- [10] Zhao J, Fu B, Peng W, et al. Melatonin protect the development of preimplantation mouse embryos from sodium fluoride-induced oxidative injury[J]. *Environ Toxicol Pharmacol* 2017 54:133-41.
- [11] An Q, Peng W, Cheng Y, et al. Melatonin supplementation during *in vitro* maturation of oocyte enhances subsequent development of bovine cloned embryos[J]. *J Cell Physiol* 2019 234(10):17370-81.
- [12] Wang T, Gao Y Y, Chen L, et al. Melatonin prevents postovulatory oocyte aging and promotes subsequent embryonic development in the pig[J]. *Aging (Albany NY)* 2017 9(6):1552-64.
- [13] Ouandaogo Z G, Frydman N, Hesters L, et al. Differences in transcriptomic profiles of human cumulus cells isolated from oocytes at GV, MI and MII stages after *in vivo* and *in vitro* oocyte maturation[J]. *Hum Reprod* 2012 27(8):2438-47.
- [14] Mccooy R C. Mosaicism in preimplantation human embryos: when chromosomal abnormalities are the norm[J]. *Trends Genet* 2017, 33(7):448-63.
- [15] Liñón A, Lawrenz B, El Khatib I, et al. Clinical reassessment of human embryo ploidy status between cleavage and blastocyst stage by next generation sequencing[J]. *PLoS One* 2018, 13(8):e201652.

## Effect of melatonin on embryo development after fertilization of *in vitro* matured oocytes in controlled ovarian hyperstimulation cycles

Zhu Qi<sup>1,2</sup>, Ding Ding<sup>2</sup>, Wang Kaijuan<sup>2</sup>, Huo Ran<sup>3</sup>, Zhang Xuesen<sup>3</sup>, Liu Tingting<sup>4</sup>, Cao Yunxia<sup>2</sup>, Zhang Zhiguo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dept of Biomedical Engineering, Anhui Medical University, Hefei 230032;

<sup>2</sup>Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>3</sup>State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166;

<sup>4</sup>Medical Record Information Office of Anhui Thoracic Hospital, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To explore the effects of melatonin (MT) on the fertilization of *in vitro* matured oocytes in controlled ovarian hyperstimulation (COH) cycles and the development of subsequent embryos. **Methods** Immature human oocytes from COH cycles were collected for *in vitro* maturation (IVM) culture and intracytoplasmic

网络出版时间: 2022-04-01 09:58 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220330.1420.021.html>

# 基于系统药理学探讨莪术醇调控铁死亡和细胞自噬的作用机制

王佳慧, 何文星, 黄茹君, 何佳禧, 黎小清, 郑洋, 汪磊

**摘要** 目的 探讨莪术醇与铁死亡和细胞自噬的潜在关联。方法 利用 Pharm Mapper 数据库筛选出莪术醇作用靶点, 利用各种已知的相关数据库, 建立铁死亡、细胞自噬相关靶点数据库, 利用 String 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用网络, 对其中的关键靶点使用 DAVID 数据库进行富集分析。结果 获得莪术醇作用靶点 152 个, 铁死亡靶点 259 个, 细胞自噬靶点 796 个; 莪术醇主要通过 PTGS2、ALB、MAPK1、MAPK8、MAPK14 靶点调控铁死亡过程, 莪术醇主要通过 HSP90AA1、MAPK1、MAPK8、ALB、NOS3 靶点调控细胞自噬过程, 莪术醇主要通过 ALB、MAPK1、MAPK8 靶点调控铁死亡和细胞自噬过程。结论 莪术醇可能通过调控铁死亡和细胞自噬发挥药理作用。

**关键词** 莪术醇; 系统药理学; 铁死亡; 细胞自噬

2022-03-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81960751、81660705、81960761); 广西自然科学基金青年项目(编号: 2020GXNSFBA297094); 广西中青年骨干教师科研基础能力提升项目(编号: 2020KY59009、2022KY1667); 广西壮瑶药重点实验室(编号: GXZYZZ2019-4、GXZYZZ2020-07); 广西中医药大学一流学科(编号: 2019XK141); 广西中医药大学青年基金(编号: 2020QN006); 广西中医药大学赛恩斯新医药学院国家级创新创业项目(编号: 202113643009)

作者单位: 广西中医药大学赛恩斯新医药学院, 南宁 530222

作者简介: 王佳慧, 女, 助教;

汪磊, 男, 副教授, 责任作者, E-mail: sywanglei1984@sina.com

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)04-0621-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.021

莪术是姜科植物蓬莪术(*Curcuma phaeocaulis* Val) 广西莪术(*C. kwangsiensis* S. G. Lee et. C. F. Liang) 的干燥根茎, 具有行气破血、消积止痛之功, 对胁痛等有效果<sup>[1]</sup>。莪术醇是莪术的主要活性成分, 具有抑制肿瘤细胞增殖、抗炎等作用<sup>[2]</sup>。目前对莪术醇的研究主要集中在癌症以及慢性肝病领域。铁超载和脂质过氧化被认为是铁死亡的中心环节<sup>[3]</sup>。有研究<sup>[4]</sup>表明, 诱导肝星状细胞发生铁死亡, 可以有效阻止肝纤维化的发展。细胞自噬是通过溶酶体降解自身组分以维持稳态的过程。细胞自噬对肝纤维化的调控是双向的<sup>[5]</sup>。细胞自噬通过调节肝星状细胞的脂质代谢促进肝纤维化的发展; 另一方面, 细胞自噬通过调控肝细胞在肝脏炎症和肝脏代谢稳态等细胞功能抑制肝纤维化的发展<sup>[6]</sup>。铁死亡和细胞自噬在肝纤维化的发展中均发挥了重要作用, 为了探究莪术醇和铁死亡与细胞自噬之间的关系。该研究使用系统药理学的方法对莪术醇调控铁死亡和细胞自噬的分子机制进行探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 莪术醇化学成分靶点预测 本研究使用中药

sperm injection (ICSI) insemination, and then the cleavage embryo and blastocyst culture medium supplemented with 0,  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$  or  $10^{-5}$  mol/L MT were used in order to perform embryo culture *in vitro*, next the formed high-quality blastocysts were picked up and cryopreserved *via* vitrification, finally, array-CGH technology was used to detect aneuploidy of rewarmed high-quality blastocysts. **Results** The blastocyst rate of  $10^{-9}$  mol/L group was significantly higher than that of  $10^{-11}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$  and 0 mol/L groups ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.0001$ ,  $P < 0.01$ ), respectively; the high-quality blastocyst rate of  $10^{-9}$  mol/L group was higher than that of other groups, but there were only significant differences compared with  $10^{-5}$  mol/L and 0 mol/L groups ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); the incidence of aneuploidy in MT group (17.6%) was lower than that in non-MT group (33.3%), but no significant difference was found. **Conclusion** The addition of MT to human embryo culture medium can promote the *in vitro* development of embryo, which is related to concentration, and  $10^{-9}$  mol/L is the optimal concentration.

**Key words** melatonin; embryo culture *in vitro*; embryonic development; aneuploidy