

• 基础研究 •

## 腐胺通过线粒体相关内质网膜改善高龄卵母细胞质量

倪曼,程丽,郭爽,腊博雅,严正杰,崔毓桂,覃莲菊\*,刘嘉茵\*

南京医科大学第一附属医院生殖医学中心,生殖医学与子代健康全国重点实验室,江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的:评估体外成熟(*in vitro* maturation, IVM)培养液中添加腐胺是否可改善高龄小鼠卵母细胞质量,及腐胺对高龄小鼠卵母细胞中线粒体相关内质网膜(mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane, MAM)的影响。方法:取生发泡期(germinal vesicle, GV)小鼠卵母细胞进行体外成熟培养至减数分裂(meiosis, M) II期,分别使用8周龄小鼠卵母细胞作为年轻对照组,40周龄小鼠卵母细胞作为老龄对照组,IVM液中添加0.5 mmol/L腐胺的40周龄小鼠卵母细胞作为老龄实验组。通过检测M II期卵母细胞的第一极体排出率、二细胞率、囊胚率、皮质颗粒分布、纺锤体异常率和染色体异常率评估卵母细胞的质量。使用透射电镜观察M II期卵母细胞的MAM, qPCR检测MAM间Ca<sup>2+</sup>传递的关键分子含量, Ca<sup>2+</sup>探针测定线粒体、内质网和胞质的Ca<sup>2+</sup>水平,并通过检测线粒体膜电位、ATP含量和活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平评估线粒体功能。结果:腐胺提高了高龄小鼠卵母细胞的第一极体排出率( $P < 0.05$ )和囊胚率( $P < 0.05$ ),并显著降低皮质颗粒分布异常率( $P < 0.01$ )、纺锤体异常率( $P < 0.01$ )和染色体异常率( $P < 0.05$ )。腐胺可阻止高龄小鼠卵母细胞的MAM间距缩短变化( $P < 0.001$ ),降低其Ca<sup>2+</sup>传递的关键分子含量( $P < 0.05$ ),缓解由MAM间Ca<sup>2+</sup>快速传递引起的线粒体钙超载( $P < 0.001$ ),从而改善线粒体功能( $P < 0.05$ ),降低细胞内ROS水平( $P < 0.001$ )。结论:体外成熟培养液中添加腐胺可显著改善高龄小鼠卵母细胞质量,且腐胺可通过影响MAM间Ca<sup>2+</sup>传递缓解线粒体钙超载,改善线粒体功能。

**[关键词]** 腐胺;线粒体相关内质网膜;卵母细胞;高龄

**[中图分类号]** R321.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2024)07-891-10

**doi:** 10.7655/NYDXBNSN240332

## Putrescine improves the quality of aged oocytes through mitochondria - associated endoplasmic reticulum membrane

NI Man, CHENG Li, GUO Shuang, LA Boya, YAN Zhengjie, CUI Yugui, QIN Lianju\*, LIU Jiayin\*

State Key Laboratory of Reproductive Medicine and Offspring Health, Clinical Center of Reproductive Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** The aim of this study is to evaluate the impact of putrescine on oocyte quality in aged mice during *in vitro* maturation (IVM). Additionally, the effect of putrescine on mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) in aged mouse oocytes will be investigated. **Methods:** Germinal vesical (GV) stage mouse oocytes were cultured *in vitro* until they reached the Meiosis (M) II stage. The young control group consisted of 8-week-old mice, while the old control group consisted of 40-week-old mice. The old experimental group consisted of 40-week-old mouse oocytes supplemented with 0.5 mmol/L putrescine in the IVM solution. The oocyte quality was assessed by detecting the first polar body (PB1) extrusion rate, 2-cell rate, blastocyst formation rate, cortical granule distribution, spindle abnormality rate, and chromosome abnormality rate of oocytes at stage M II. Additionally, MAM in M II -stage oocyte was observed using transmission electron microscopy, the content of key molecules for Ca<sup>2+</sup> transfer was detected by qPCR, and the Ca<sup>2+</sup> levels in mitochondria, endoplasmic reticulum, and cytoplasm were determined using Ca<sup>2+</sup> probes. Mitochondrial function was assessed by measuring mitochondrial membrane potential, ATP content, and reactive oxygen species (ROS) levels. **Results:** Putrescine increased the rate of PB1 extrusion ( $P < 0.05$ ) and the blastocyst rate ( $P < 0.05$ ) in oocytes of aged mice and significantly reduced the rate of cortical granule distribution abnormalities ( $P < 0.01$ ), spindle abnormalities ( $P < 0.01$ ), and chromosomal abnormalities ( $P < 0.05$ ). The oocytes contained MAM structures. Putrescine prevented the shortening of MAM spacing ( $P < 0.001$ ) in oocytes of aged mice

**[基金项目]** 国家重点研发项目(2021YFC2700404, 2021YFC2700501)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: jyliu\_nj@126.com; ljqin@njmu.edu.cn

and reduced the levels of key molecules for  $\text{Ca}^{2+}$  transfer between MAM ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, putrescine improved mitochondrial function ( $P < 0.05$ ) and reduced intracellular ROS levels ( $P < 0.001$ ) by alleviating mitochondrial calcium overload ( $P < 0.001$ ) caused by rapid  $\text{Ca}^{2+}$  transfer between MAMs. **Conclusion:** The addition of putrescine to in vitro maturation cultures significantly improved the quality of oocytes of aged mice. Putrescine also alleviated mitochondrial calcium overload and improved mitochondrial function by modulating inter-MAM  $\text{Ca}^{2+}$  transfer.

[Key words] putrescine; mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane; oocyte; aging

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(07): 891-900]

随着年龄的增长, 女性生育能力逐渐减退, 表现为卵母细胞数量和质量的逐渐下降<sup>[1]</sup>。提供细胞能量的线粒体功能低下是卵母细胞衰老的一个重要机制, 而近年来的研究提出了内质网-线粒体轴的概念。内质网和线粒体密切接触的部位称为线粒体相关内质网膜 (mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane, MAM), 参与脂质合成和运输、钙 (Calcium ion,  $\text{Ca}^{2+}$ ) 稳态、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生、线粒体自噬和内质网应激等过程, 在细胞的生理和病理活动中起重要作用<sup>[2]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$  作为第二信使, 是 MAM 界面传递的重要信息物质<sup>[3]</sup>。MAM 间  $\text{Ca}^{2+}$  传输紊乱已被证实与衰老相关疾病如神经退行性病变<sup>[4]</sup>、糖尿病相关病变<sup>[5]</sup>、癌症等有关, 并造成肥胖小鼠卵母细胞质量下降<sup>[6]</sup>, 但其在衰老卵母细胞中的作用尚未见报道。

腐胺是能量代谢三羧酸循环中的一种多胺, 由鸟氨酸在鸟氨酸脱羧酶的作用下生成, 在抗氧化、抗凋亡和抗炎中发挥重要的作用<sup>[7]</sup>。研究发现, 高龄小鼠排卵期鸟氨酸脱羧酶活性降低, 腐胺生成减少。在卵母细胞体外成熟 (*in vitro* maturation, IVM) 培养液中或小鼠排卵期的饮用水中补充腐胺, 可以降低卵母细胞非整倍体率和胚胎丢失率, 提高高龄小鼠的生育能力<sup>[8]</sup>。推测腐胺可以通过上调丙酮酸脱氢酶激酶 4 表达和提高线粒体活性来延缓卵母细胞的衰老过程<sup>[9]</sup>。然而, 腐胺对 MAM 能否起到调控作用, 从而改善卵母细胞质量的研究尚未见报道。本研究使用自然衰老小鼠作为研究模型, 以卵母细胞中 MAM 为观察指标, 在 IVM 培养液中添加腐胺, 观察其对衰老卵母细胞的改善作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

孕马血清促性腺激素 (PMSG, 宁波第二激素厂); 腐胺 (putrescine, Put, Sigma 公司, 美国); IVM

液、TYH 液、HTF 液、KSOM 液、M2 培养液、透明质酸酶 (南京爱贝生物有限公司); 4% 多聚甲醛固定液 (上海碧云天公司); Triton X-100 (BioFroxx 公司, 德国); PBS 缓冲液 (上海塞维尔公司); DAPI-Fluoromount-G 抗荧光淬灭封片剂 (SouthernBiotech 公司, 美国); 聚乙烯醇 (上海碧云天公司); LCA-FITC (Invitrogen 公司, 美国); Anti- $\alpha$ -Tubulin 抗体 (Abcam 公司, 美国); 戊二醛固定液 (北京百瑞极公司); Fluo-4 AM (Invitrogen 公司, 美国); Rhod-2 AM、Mag-Fluo-4 AM (上海懋康生物公司); ROS 检测试剂盒、增强型线粒体膜电位检测试剂盒、增强型 ATP 检测试剂盒 (上海碧云天公司); Micro RNA Kit (QIAGEN 公司, 德国); ChamQ SYBR qPCR Master Mix (南京诺维赞公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物及分组

实验采用 C57/B6J 小鼠, 选择 8 周龄小鼠作为年轻组, 40 周龄小鼠作为老龄组。动物实验方案由南京医科大学动物伦理委员会批准 (实验伦理号: IACUC-2208018), 所有小鼠均购于南京医科大学实验动物基地生产部。小鼠在 22 °C 下保持 12 h/12 h 的暗-光循环, 自由进食饮水。

#### 1.2.2 生发泡 (geminal vesical, GV) 期卵母细胞获取和 IVM

以 10 U/只小鼠的标准注射 PMSG, 46~48 h 后取 GV 期卵丘-卵母细胞复合体 (cumulus-oocyte complex, COC)。其中, 8 周龄小鼠 COC 记为年轻组 (Young), 40 周龄小鼠 COC 记为高龄组 (Old), IVM 液中添加 0.5 mmol/L 腐胺的高龄组 COC 记为腐胺组 (Put)。其中 IVM 液中腐胺添加浓度的标准参考 Liu 等<sup>[10]</sup> 研究。在 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 14~16 h, 然后使用透明质酸酶脱去卵丘颗粒细胞, 在显微镜下观察卵母细胞第一极体排出情况。收集 M II 期卵母细胞用于后续实验。实验至少重复 3 次, 每次每组使用 20~30 个 COC。

### 1.2.3 体外胚胎培养

处死C57/B6J雄鼠,取附睾并划开输精管,使精子进入TYH液中获能60 min。将COC在HTF液中清洗3次后置于新的液滴中,加入已获能精子共培养4~6 h。在KSOM培养液中清洗卵母细胞并在新鲜的液滴中继续培养,在胚胎发育至二细胞期(受精后24~30 h)和囊胚期(受精后96~100 h)进行拍照观察。以上培养均在37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中完成,实验至少重复3次,每次每组使用20~30个COC。

### 1.2.4 卵母细胞免疫荧光

M II期卵母细胞脱颗粒后在1% HCl中脱除透明带,并清洗3次。随后在4% PFA中室温固定30 min, PBS清洗3次后移入0.5% Triton×100中室温破膜20 min。PBS清洗3次后使用封闭液室温封闭1 h。将卵母细胞移入相应的一抗中4 °C过夜, PBS清洗3次后避光室温孵育二抗1 h。PBS清洗3次后使用DAPI染细胞核,封片。共聚焦显微镜下进行拍照观察,使用Image J软件进行共定位及半定量分析。实验至少重复3次,每次每组使用15枚卵母细胞。

### 1.2.5 透射电镜拍摄

每组收集至少20枚M II期卵母细胞,首先在2.5%戊二醛中室温固定2 h,然后使用伊红染色,包裹于1.5%琼脂糖中并离心,使卵母细胞聚集于EP管底。待琼脂糖凝固后再加入戊二醛固定,冰上送至南京医科大学分析测试中心进行下一步制样及切片工作。最后使用JEM-1400Flash透射电子显微镜观察。

### 1.2.6 Ca<sup>2+</sup>水平测定

分别使用Fluo-4 AM、Rhod-2 AM和Mag-Fluo-4AM测定M II期卵母细胞质、线粒体和内质网Ca<sup>2+</sup>水平。按照说明书推荐浓度配制染色工作液。将卵母细胞在染色工作液中孵育30 min,使用M2培养液清洗3次后再次在新鲜的M2培养液中孵育30 min,

以促进完全去酯化。孵育均在37 °C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中完成,使用Nikon Eclipse Ti共聚焦显微镜拍摄。每种指标每组使用15枚卵母细胞进行染色,实验至少重复3次。

### 1.2.7 ROS和线粒体膜电位测定

分别使用DCFH-DA和JC-1检测M II期卵母细胞ROS和线粒体膜电位水平。将卵母细胞分别与DCFH-DA和JC-1在37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育30 min,然后使用M2培养液清洗3次后置于共聚焦皿中。使用Nikon Eclipse Ti共聚焦显微镜检测荧光强度。每种指标每组使用10~15枚卵母细胞,实验至少重复3次。

### 1.2.8 ATP水平测定

使用增强型ATP检测试剂盒测量卵母细胞ATP含量。每组使用20枚M II期卵母细胞,在PBS中清洗3次后移至10 μL裂解液中,使每组液体总量为20 μL。根据说明书配制标准液。将ATP检测试剂和ATP检测试剂稀释液按1:4的比例配制成ATP检测工作液。每个EP管内加入100 μL ATP检测工作液,室温静置3~5 min,消除本底ATP。每个检测管内加入20 μL标准品或样品混匀,使用GloMax 20/20发光检测仪测定相对荧光亮度单位(relative luminescence unit, RLU)值,并计算每个样本的ATP浓度。

### 1.2.9 RNA提取及qPCR

使用QIAGEN Micro RNA Kit提取M II期卵母细胞总RNA,随后加入逆转录试剂将RNA逆转录为cDNA。各组基因表达通过实时荧光定量PCR仪进行扩增检测,条件为95 °C预变性5 min、PCR反应为95 °C 15 s、65 °C 1 min共40个循环,熔解曲线为65~95 °C,每隔0.5 °C进行信号检测绘制。各组基因表达差异采用2<sup>-ΔΔCT</sup>相对定量法进行分析,引物序列见表1。

表1 引物序列表

Table 1 Primer sequences

Gene	Forward(5'→3')	Reverse(5'→3')
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
IP3R	CGTTTTGAGTTTGAAGGCGTTT	CATCTTGCGCCAATTCCCCG
GRP75	ATGGCTGGAATGGCCTTAGC	CATCTTGCGCCAATTCCCCG
VDAC1	CCCACATACGCCGATCTTGG	GTGGTTTCGGTGTGGCAGA

IP3R: the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor; GRP75: G protein-coupled receptor 75; VDAC1: voltage dependent anion channel 1.

### 1.3 统计学方法

所有数据均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组资

料间比较采用独立样本t检验,多组资料间比较采用单因素方差分析,所有统计学结果均采用GraphPad



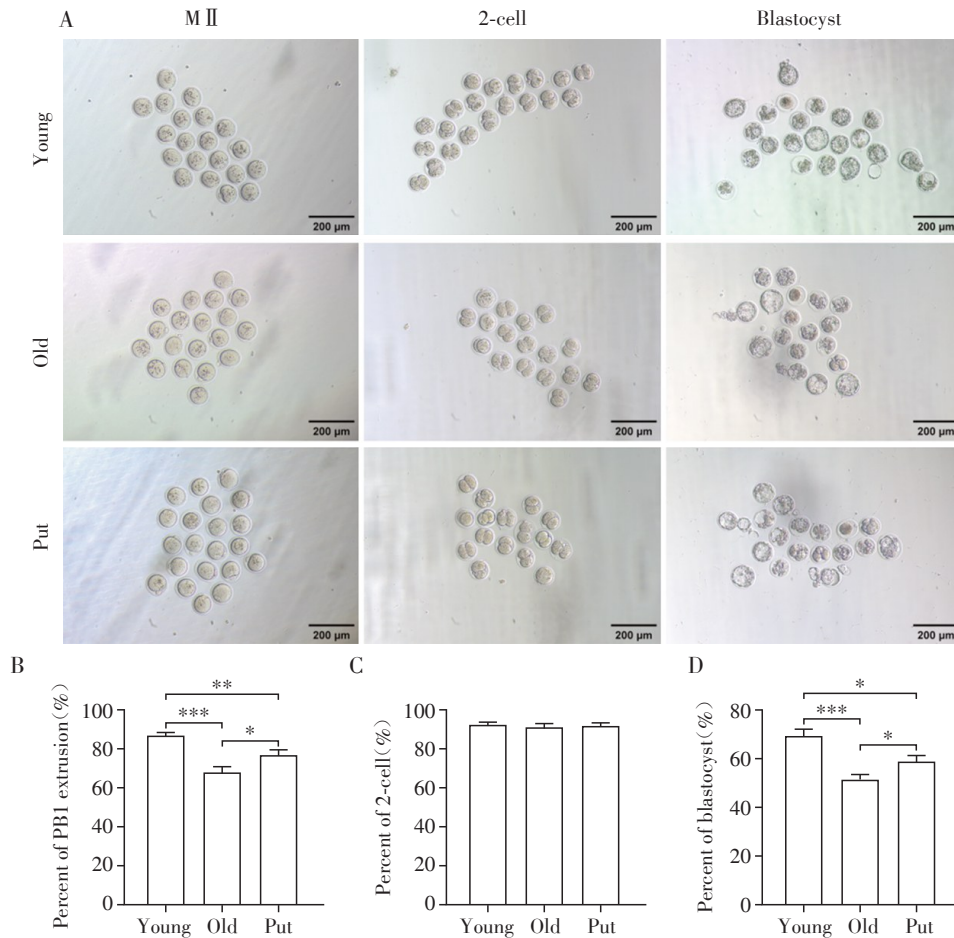
Prism 8 进行分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 腐胺促进高龄小鼠卵母细胞成熟

观察各组小鼠卵母细胞体外培养和体外受精情况(图 1A)。与年轻组比较, 高龄组小鼠卵母细胞第

一极体排出率显著下降, 添加腐胺后显著升高( $P < 0.05$ , 图 1B)。高龄小鼠卵母细胞受精后二细胞率有下降趋势, 但无显著性差异(图 1C)。高龄小鼠卵母细胞囊胚率显著下降, 而腐胺组囊胚率显著提高( $P < 0.05$ , 图 1D), 提示 IVM 培养液中添加腐胺能够促进高龄小鼠卵母细胞核成熟和胚胎发育。



A: Representative images of the M II, 2-cell, and blastocyst stages of oocytes (scale bars=200  $\mu$ m). B-D: The percent of the PB1 extrusion (B), 2-cell (C), and blastocyst formation (D) in the Young, Old, and Put groups ( $n=20$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ . PB1: first polar body.

图1 卵母细胞成熟和胚胎培养

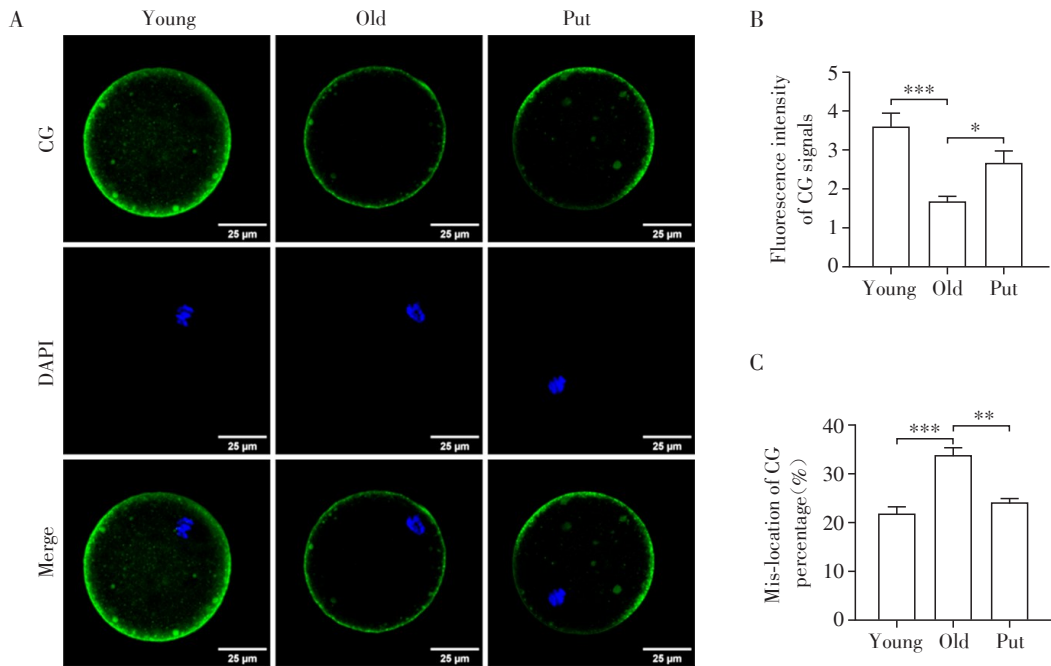
Figure 1 Oocyte maturation and blastocyst formation

### 2.2 腐胺改善高龄小鼠卵母细胞皮质颗粒的分布

使用 LCA-FITC 染色评估 M II 期卵母细胞皮质颗粒(cortical granule, CG)的分布(图 2A)。在年轻组 M II 期卵母细胞中, 除了染色体附近无 CG 结构域外, CG 均匀分布在卵母细胞皮质下区域。但在高龄组 M II 期卵母细胞中, CG 失去正常定位( $P < 0.001$ ), 且荧光信号强度显著减弱( $P < 0.001$ )。补充腐胺可显著挽救 CG 的错误定位( $P < 0.01$ ), 提高 CG 的荧光信号强度( $P < 0.05$ , 图 2B~C)。这表明腐胺可促进高龄卵母细胞胞质成熟。

### 2.3 腐胺改善高龄 M II 期卵母细胞纺锤体组装和染色体排列

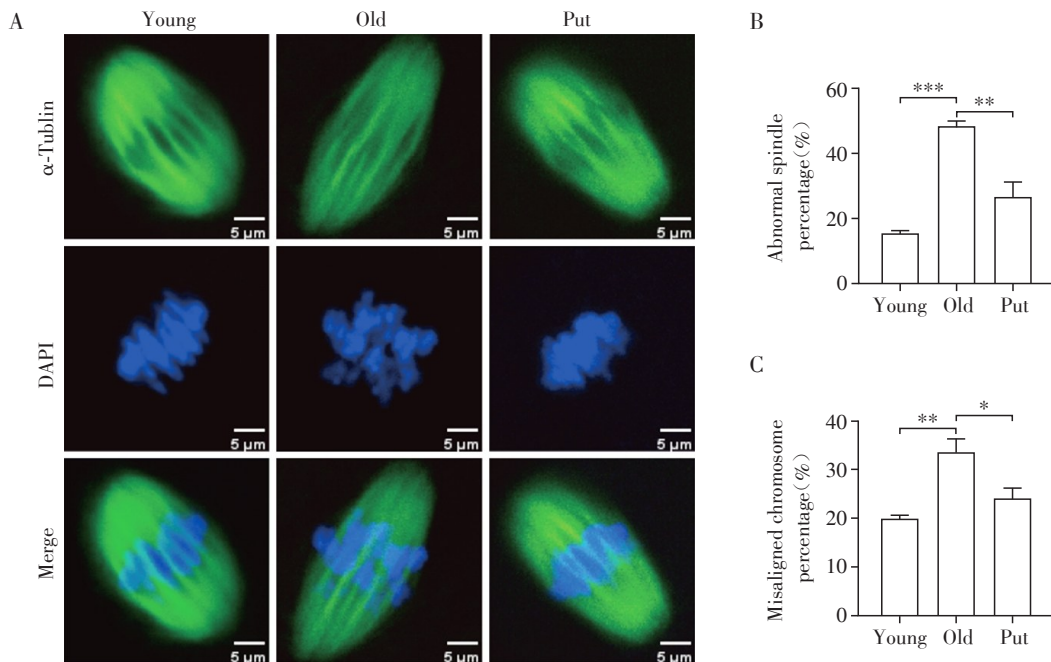
通过免疫荧光染色图像评估发现, M II 期的高龄卵母细胞中存在染色体错位和纺锤体结构紊乱(图 3A)。与年轻卵母细胞相比, 高龄卵母细胞 M II 期纺锤体异常率( $P < 0.001$ , 图 3B)和染色体异常率( $P < 0.01$ , 图 3C)显著提高, 但在补充腐胺后均显著下降( $P < 0.05$ , 图 3A~C)。这些结果表明腐胺可通过保持正确的纺锤体和染色体结构提高高龄小鼠卵母细胞的成熟能力。



A: Representative figures of CG distribution in the Young, Old, and Put groups (scale bars=25  $\mu\text{m}$ ). B: The statistical analysis of CG signals ( $n=15$ ). C: The statistical analysis of the rates of mislocalized CG in oocytes ( $n=15$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ . CG: cortical granule.

图2 M II期卵母细胞CG分布

Figure 2 Distribution of CGs in M II-stage oocytes



A: Representative images of the spindle morphology and chromosome alignment in metaphase II oocytes (scale bars=5  $\mu\text{m}$ ). B: The rate of abnormal spindles ( $n=15$ ). C: The rate of misaligned chromosomes ( $n=15$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

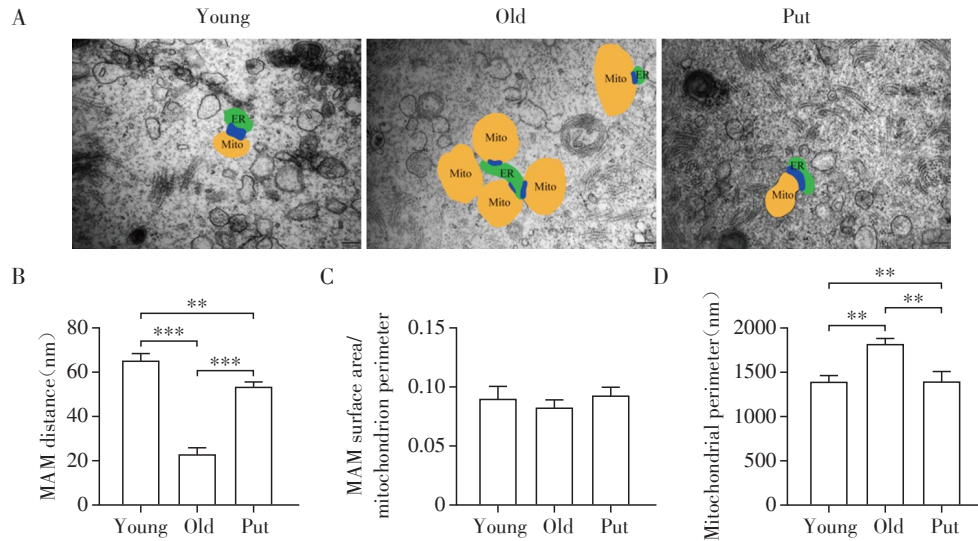
图3 M II期卵母细胞纺锤体组装和染色体排列

Figure 3 Spindle assembly and chromosome alignment in M II-stage oocytes

#### 2.4 腐胺降低高龄小鼠卵母细胞MAM水平

在透射电子显微镜下观察各组小鼠M II期卵母细胞内的MAM(图4A),通常以MAM中内质网和线

粒体间距、邻近内质网的线粒体长度与其周长的比值两个指标衡量MAM的数量及状态。统计分析发现,高龄小鼠M II期卵母细胞内MAM间距显著缩



A: Characteristic TEM images of mitochondria and ER in the M II-stage oocytes (scale bars=200 nm). The yellow parts represent mitochondria, the green parts represent ER, and the blue parts represent MAM. B: Statistical analysis of the distances between the ER and mitochondria. C: Ratio of the length of the mitochondria adjacent to the ER to mitochondrial circumference. D: Statistical analysis of mitochondrial perimeter ( $n=20$ ). \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . TEM: transmission electron microscopy; Mito: mitochondria; ER: endoplasmic reticulum; MAM: mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane.

图4 M II期卵母细胞MAM水平

Figure 4 MAM levels in M II-stage oocytes

短,而腐胺组MAM间距显著增加( $P < 0.001$ ,图4B)。3组间卵母细胞的线粒体中组成MAM部分长度与其周长的差异无统计意义(图4C),可能与高龄小鼠卵母细胞内线粒体肿胀变形,周长增加相关( $P < 0.01$ ,图4D)。这些结果表明腐胺可使高龄卵母细胞内线粒体和内质网间距离增加,并因此降低其MAM水平。

#### 2.5 腐胺降低高龄M II期卵母细胞MAM间 $Ca^{2+}$ 传递关键分子的表达

三磷酸肌醇受体(75-KDA inositol 1,4,5-triphosphate receptor, IP3R)、葡萄糖调节蛋白75(glucose regulated protein 75, GRP75)和电压依赖性阴离子通道1(voltage dependent anion channel 1, VDAC1)是MAM间 $Ca^{2+}$ 转移的关键分子<sup>[11]</sup>。使用qPCR分别测定M II期卵母细胞中IP3R、GRP75和VDAC1的基因相对表达量。结果显示,高龄小鼠M II期卵母细胞内IP3R的相对mRNA含量显著增高,添加腐胺后显著下降( $P < 0.05$ ,图5A)。同时,高龄小鼠M II期卵母细胞内GRP75的相对mRNA含量显著增高,添加腐胺后显著下降( $P < 0.001$ ,图5B)。3组M II期卵母细胞内VDAC1的相对mRNA含量差异无统计学意义(图5C)。

#### 2.6 腐胺缓解高龄小鼠卵母细胞线粒体钙超载

分别使用Fluo-4 AM、Rhod-2 AM和Mag-Fluo-4

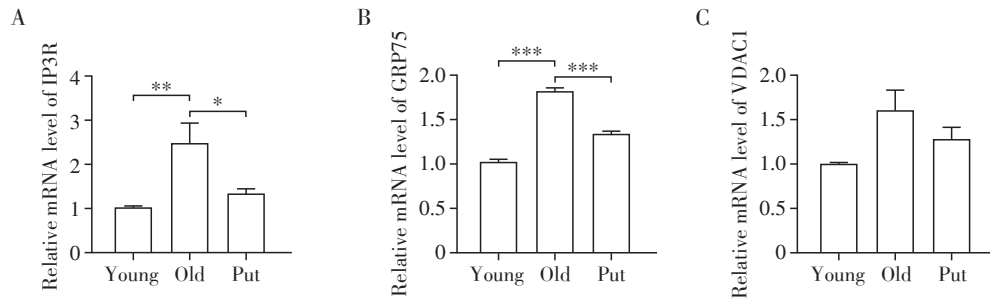
AM测定小鼠M II期卵母细胞内细胞质、线粒体和内质网 $Ca^{2+}$ 浓度,即 $[Ca^{2+}]_i$ 、 $[Ca^{2+}]_m$ 和 $[Ca^{2+}]_{ER}$ (图6A)。实验表明,IVM培养液中添加腐胺能够显著缓解高龄小鼠M II期卵母细胞线粒体钙超载( $P < 0.001$ ,图6B)。此外,高龄小鼠M II期卵母细胞 $[Ca^{2+}]_{ER}$ 水平降低( $P < 0.001$ ,图6C),添加腐胺后水平显著升高( $P < 0.001$ ,图6C)。而3组卵母细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 无显著性差异(图6D)。由此推测:高龄小鼠卵母细胞线粒体内超载的 $Ca^{2+}$ 来源于内质网,且腐胺能够通过影响MAM间 $Ca^{2+}$ 运输缓解线粒体钙超载。

#### 2.7 腐胺改善高龄小鼠卵母细胞线粒体功能

使用JC-1染色评估小鼠M II期卵母细胞的线粒体膜电位(图7A)。高龄M II期卵母细胞线粒体膜电位水平( $\Delta\psi_m$ )显著下降( $P < 0.001$ ,图7C),ATP含量下降( $P < 0.001$ ,图7D),ROS水平升高( $P < 0.001$ ,图7B、E)。腐胺添加恢复了 $\Delta\psi_m$ ( $P < 0.05$ ,图7C),同时增加了ATP含量( $P < 0.01$ ,图7D),降低ROS水平( $P < 0.001$ ,图7E)。提示腐胺可改善高龄小鼠M II期卵母细胞的线粒体功能,缓解氧化应激。

### 3 讨论

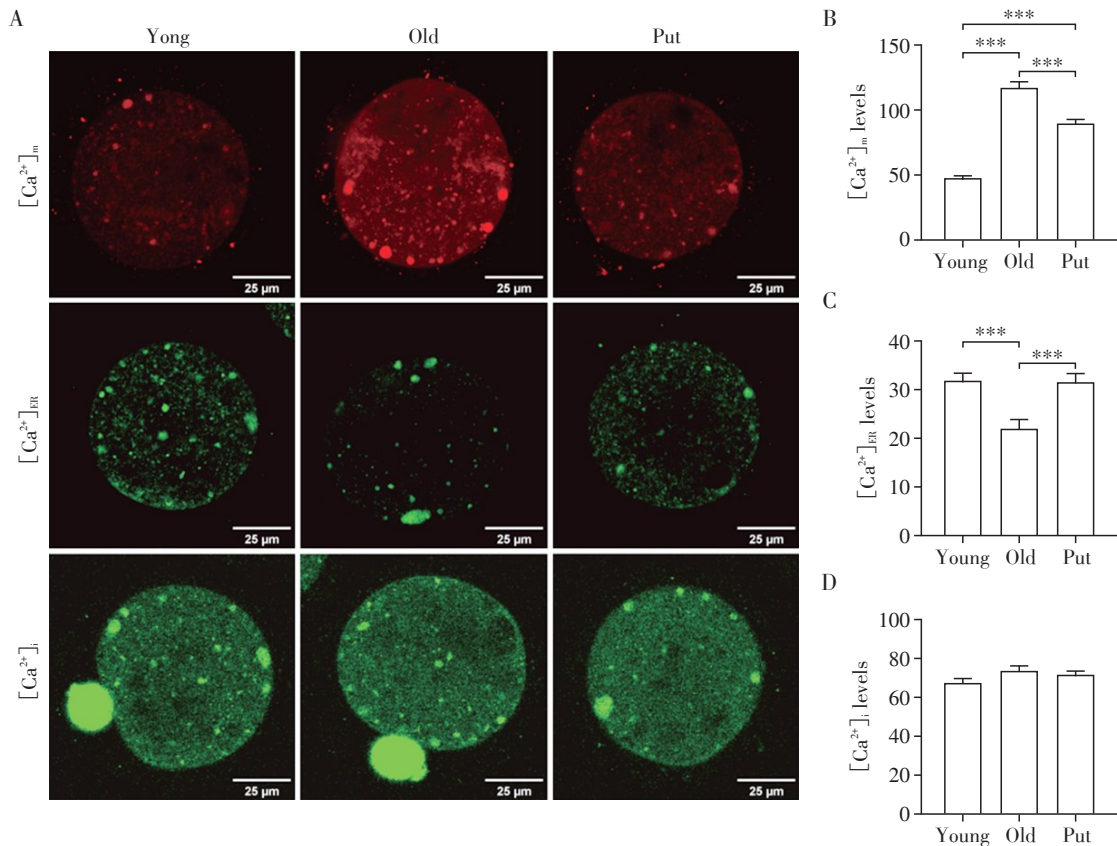
女性35岁以后的卵巢储备功能迅速下降<sup>[12]</sup>,卵母细胞的衰老使生育力降低。卵母细胞是人体中最大的细胞,对其老化的机制和过程,以及可能逆



A-C: The relative mRNA expression levels of IP3R(A), GRP75(B) and VDAC1(C) in M II-stage oocytes were measured by qPCR. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=20$ ).

图5 MAM间Ca<sup>2+</sup>传递关键分子的相对表达量

Figure 5 Relative expression of key molecules for Ca<sup>2+</sup> transfer between MAM



A: Representative images of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>m</sub>, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub>, and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signal in M II-stage oocytes (scale bars=25 μm). [Ca<sup>2+</sup>]<sub>m</sub>: mitochondrial calcium content. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub>: ER calcium content; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: intracellular calcium content. B-D: Quantitative analysis of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>m</sub>(B), [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub>(C), and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>(D) fluorescence intensity, \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=15$ ).

图6 M II期卵母细胞Ca<sup>2+</sup>分布

Figure 6 Distribution of Ca<sup>2+</sup> in M II-stage oocytes

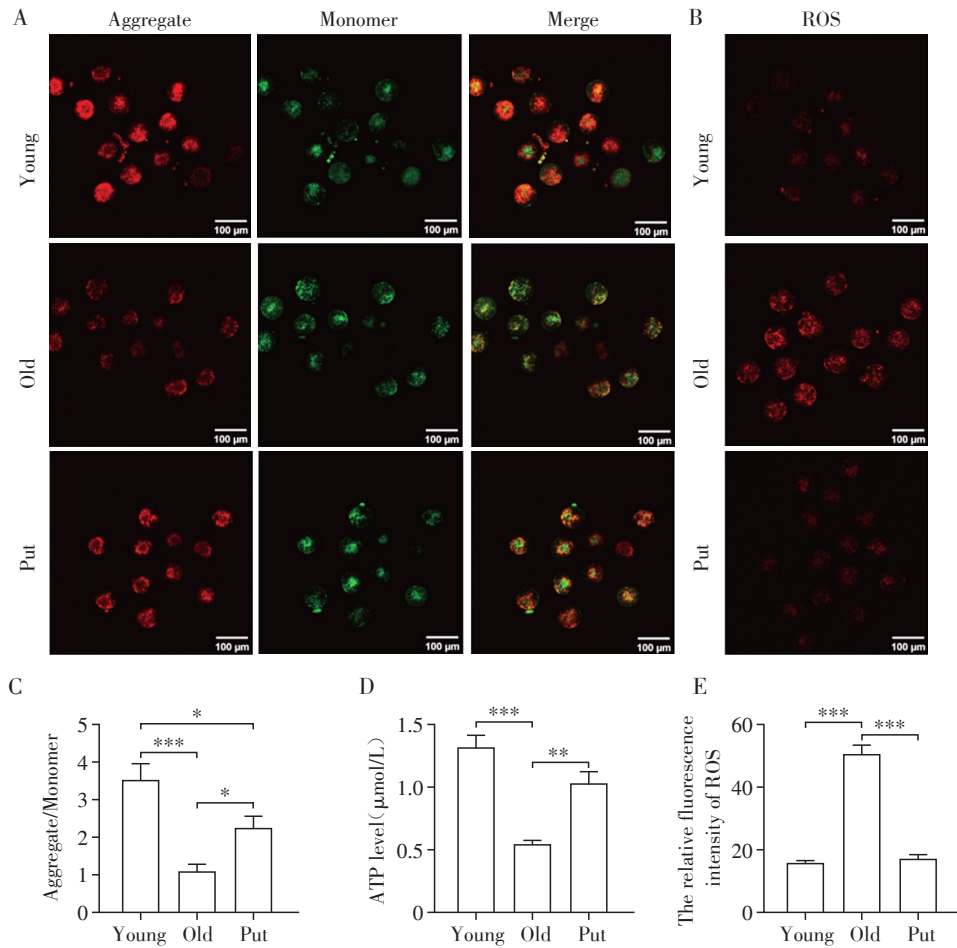
转衰老的干预研究,是目前人类拯救生育能力的重要方向之一。

卵母细胞衰老的重要机制是细胞内氧化应激失衡,氧自由基浓度增加,线粒体能量代谢功能被破坏,线粒体作为生成和处理 ROS 的重要场所,其功

能紊乱加重氧化应激,造成纺锤体和染色体结构缺陷和减数分裂停滞<sup>[13]</sup>,卵母细胞质量下降。表现为卵母细胞 CG 分布异常,第一极体排出率、囊胚形成率显著降低。

近年来,对细胞衰老的研究发现,内质网-线粒





A: JC-1 fluorescence signal in M II-stage oocytes (scale bars=100 μm). B: Representative images of ROS levels in M II-stage oocytes (scale bars=100 μm). C: Statistical analysis of JC-1 fluorescence signal in figure 7A (n=15). D: Statistical analysis of ATP content in M II-stage oocytes (n=20). E: Quantitative analysis of ROS fluorescence signal in figure 7B (n=15). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001.

图7 M II期卵母细胞线粒体功能

Figure 7 mitochondrial function of M II-stage oocytes

体轴的膜间距MAM变化反映了内质网应激机制的激活,从而产生Ca<sup>2+</sup>超载,导致线粒体的损伤。线粒体相关内质网膜MAM已在骨骼肌细胞、心肌细胞、神经元、肾小管上皮细胞<sup>[14]</sup>、卵巢癌细胞等多种细胞中被验证,卵母细胞中也存在MAM。MAM在衰老相关疾病,如神经退行性病变、糖尿病相关病变、心血管疾病、肿瘤以及代谢疾病中多有报道<sup>[15]</sup>。在阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化和帕金森病等神经退行性病变中,MAM是其关键分子和细胞中枢。在各种神经退行性病变中发现MAM参与调节多种细胞功能失调或不足的生物反应过程,包括线粒体自噬、Ca<sup>2+</sup>转移、磷脂合成等。

通常以线粒体中邻近内质网部分的长度与其周长的比值,和内质网和线粒体间的距离作为判断MAM数量和内部联系程度的指标<sup>[16]</sup>。课题组前期研究已证明:小鼠卵母细胞中存在MAM结构<sup>[17]</sup>,且

过氧化处理的小鼠卵母细胞内MAM数量增加,MAM间距离缩短<sup>[18]</sup>。在此基础上,本研究使用自然衰老模型,验证了高龄小鼠卵母细胞中MAM数量增加,和MAM间距离缩短。虽然组成MAM部分的线粒体长度占比未见显著差异,可能是由于线粒体肿胀变形,周长增加导致。

内质网是细胞内重要的Ca<sup>2+</sup>储存仓库,也是线粒体中Ca<sup>2+</sup>的重要来源。内质网和线粒体间相互靠近,即在MAM距离范围内,形成独特的高Ca<sup>2+</sup>微域<sup>[19]</sup>。IP3R-GRP75-VDAC1复合体是MAM界面Ca<sup>2+</sup>传输的主要工具<sup>[11]</sup>。在猪卵母细胞中敲除IP3R1,线粒体Ca<sup>2+</sup>浓度显著降低<sup>[20]</sup>。在卵巢癌细胞系中敲低GRP75显著降低卵巢癌细胞线粒体Ca<sup>2+</sup>水平,反之,过表达GRP75显著增强了它们在MAM中的相互作用,且线粒体Ca<sup>2+</sup>水平升高<sup>[11]</sup>。本研究发现,高龄小鼠M II期卵母细胞内IP3R和GRP75在基因水平的



相对表达量显著增加,同时线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  水平显著升高,且内质网  $\text{Ca}^{2+}$  水平显著降低,而胞质  $\text{Ca}^{2+}$  水平无明显变化,证明高龄卵母细胞内 MAM 数量增多,间距缩短,且  $\text{Ca}^{2+}$  传输关键分子的含量显著增加,导致线粒体钙超载损伤。

线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  是一把双刃剑。适当水平的  $\text{Ca}^{2+}$  可以维持线粒体功能,促进线粒体高效产能。而线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  超载则会导致线粒体功能紊乱和 ATP 生成障碍,诱导细胞凋亡<sup>[21]</sup>。糖尿病视网膜病变中 MAM 的形成增加,导致线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  超载,并加速了  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性的细胞凋亡<sup>[5]</sup>。肥胖诱导的骨骼肌细胞 MAM 形成增加,IP3R-GRP75-VDAC1 复合体相互作用增强,在复合体的作用下进入线粒体的  $\text{Ca}^{2+}$  积累,导致线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  超载和线粒体功能障碍<sup>[16]</sup>。本研究也证实了这个过程同样发生在高龄卵母细胞的老化过程中,表现为线粒体膜电位下降,ATP 生成减少,ROS 增加。

既往研究发现,腐胺可以通过调节抗氧化系统和减少 ROS 的产生缓解氧化应激<sup>[9]</sup>。同时,腐胺可以通过恢复卵母细胞成熟潜能,降低老龄小鼠卵母细胞的非整倍性<sup>[22]</sup>,改善卵母细胞和胚胎质量,降低流产率<sup>[8]</sup>。卵母细胞体外成熟是一种辅助生殖技术,目前主要应用于多囊卵巢综合征的患者,以及恶性肿瘤患者的生育力保存。近年来 IVM 培养方法取得了重大进展,推动其在临床中的常规应用<sup>[23]</sup>。笔者课题组的前期研究发现,在 IVM 液中添加腐胺有助于衰老小鼠卵母细胞的成熟和胚胎发育,且对其后代具有遗传和整体表观遗传学的长期安全性<sup>[24]</sup>。与既往研究一致,本研究观察到在 IVM 液中添加腐胺能够促进卵母细胞成熟,高龄小鼠腐胺组的卵母细胞中 MAM 数量减少,内质网和线粒体间距离增加, $\text{Ca}^{2+}$  传输关键分子的含量显著降低,线粒体钙超载显著缓解,并因此改善了线粒体功能,缓解了氧化应激。

本研究表明,腐胺可以通过减少高龄小鼠卵母细胞内异常增多的 MAM,并使内质网和线粒体间距离增加,降低二者间  $\text{Ca}^{2+}$  传输关键分子的含量,从而减少  $\text{Ca}^{2+}$  传递,缓解线粒体钙超载,恢复线粒体功能,最终改善高龄卵母细胞质量,为卵母细胞抗衰老的干预方法提供了新线索,成为腐胺临床应用的新证据。

#### [参考文献]

- [1] TELFER E E, GROSBOIS J, ODEY Y L, et al. Making a good egg: human oocyte health, aging, and in vitro development[J]. *Physiol Rev*, 2023, 103(4): 2623-2677

- [2] LIU Y, HUO J L, REN K D, et al. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM): a dark horse for diabetic cardiomyopathy treatment [J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 148
- [3] VALLESE F, BARAZZUOL L, MASO L, et al. ER-mitochondria calcium transfer, organelle contacts and neurodegenerative diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1131: 719-746
- [4] ZHU Y L, BURG T, NEYRINCK K, et al. Disruption of MAM integrity in mutant FUS oligodendroglial progenitors from hiPSCs[J]. *Acta Neuropathol*, 2024, 147(1): 6
- [5] LI Y, LI H Y, SHAO J, et al. GRP75 modulates endoplasmic reticulum-mitochondria coupling and accelerates  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent endothelial cell apoptosis in diabetic retinopathy[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(12): 1778
- [6] ZHAO L H, LU T F, GAO L, et al. Enriched endoplasmic reticulum-mitochondria interactions result in mitochondrial dysfunction and apoptosis in oocytes from obese mice[J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2017, 8: 62
- [7] HOLBERT C E, CULLEN M T, CASERO R A JR, et al. Polyamines in cancer: integrating organismal metabolism and antitumour immunity [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(8): 467-480
- [8] TAO Y, LIU D D, MO G L, et al. Peri-ovulatory putrescine supplementation reduces embryo resorption in older mice[J]. *Hum Reprod*, 2015, 30(8): 1867-1875
- [9] XU W D, LI L J, SUN J W, et al. Putrescine delays post-ovulatory aging of mouse oocytes by upregulating PDK4 expression and improving mitochondrial activity[J]. *Aging*, 2018, 10(12): 4093-4106
- [10] LIU D D, MO G L, TAO Y, et al. Putrescine supplementation during in vitro maturation of aged mouse oocytes improves the quality of blastocysts [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2017, 29(7): 1392-1400
- [11] LI J, QI F Z, SU H S, et al. GRP75-facilitated mitochondria-associated ER membrane (MAM) integrity controls Cisplatin-resistance in ovarian cancer patients [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(7): 2914-2931
- [12] SECOMANDI L, BORGHESEAN M, VELARDE M, et al. The role of cellular senescence in female reproductive aging and the potential for senotherapeutic interventions [J]. *Hum Reprod Update*, 2022, 28(2): 172-189
- [13] MIAO Y L, CUI Z K, GAO Q, et al. Nicotinamide mononucleotide supplementation reverses the declining quality of maternally aged oocytes [J]. *Cell Rep*, 2020, 32(5):

107987

[14] LI C R, LI L, YANG M, et al. PACS-2 ameliorates tubular injury by facilitating endoplasmic reticulum-mitochondria contact and mitophagy in diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2022, 71(5): 1034-1050

[15] GIL-HERNÁNDEZ A, SILVA-PALACIOS A. Relevance of endoplasmic reticulum and mitochondria interactions in age-associated diseases[J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 64: 101193

[16] THOUDAM T, HA C M, LEEM J, et al. PDK4 augments ER-mitochondria contact to dampen skeletal muscle insulin signaling during obesity[J]. *Diabetes*, 2019, 68(3): 571-586

[17] 戴王娟, 覃莲菊, 崔毓桂, 等. 卵母细胞中线粒体相关内质网膜结构与功能的研究进展[J]. *生殖医学杂志*, 2022, 31(1): 135-139

[18] DAI W J, ZOU X F, JIA H Y, et al. Peroxiredoxin 4 secreted by cumulus cells ameliorates the maturation of oocytes *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 636(Pt1): 155-161

[19] JANIKIEWICZ J, SZYMAŃSKI J, MALINSKA D, et al. Mitochondria-associated membranes in aging and senescence: structure, function, and dynamics[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 332

[20] ZHANG C, GAO L P, WU D Y, et al. IP3R1 regulates calcium balance in porcine oocyte maturation and early embryonic development [J]. *Theriogenology*, 2023, 209: 151-161

[21] WALKON L L, STRUBBE-RIVERA J O, BAZIL J N. Calcium overload and mitochondrial metabolism[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(12): 1891

[22] TAO Y, LIU X J. Deficiency of ovarian ornithine decarboxylase contributes to aging-related egg aneuploidy in mice[J]. *Aging Cell*, 2013, 12(1): 42-49

[23] GILCHRIST R B, SMITZ J. Oocyte *in vitro* maturation: physiological basis and application to clinical practice[J]. *Fertil Steril*, 2023, 119(4): 524-539

[24] SHI C N, ZHANG J Y, YAN Z J, et al. Epigenetic effect of putrescine supplementation during *in vitro* maturation of oocytes on offspring in mice[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2022, 39(3): 681-694

[收稿日期] 2024-03-30

(本文编辑:戴王娟)

