

鱼油或共轭亚油酸对小鼠卵母细胞体外发育能力和线粒体功能的影响

易丹¹ 曾申明² 吕于明^{1*}

(1. 中国农业大学 动物科学技术学院/动物营养学国家重点实验室,北京 100193;

2. 中国农业大学 动物科学技术学院/动物胚胎生物技术实验室,北京 100193)

摘要 为研究富含 n-3 或 n-6 多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid,PUFA)日粮对小鼠卵母细胞体外发育和线粒体功能的影响,把 90 只 14 g 左右昆明雌鼠随机分为 3 组,分别饲喂 40 g/kg 豆油日粮,40 g/kg 鱼油日粮或 40 g/kg 共轭亚油酸(conjugated linoleic acid,CLA)日粮 30 d;注射雌激素诱导小鼠超数排卵后,检测卵母细胞活性线粒体分布、线粒体钙浓度、膜电位以及脂肪滴分布;利用体外受精技术,评价卵母细胞体外发育能力。结果表明:相对于每个活性线粒体的分布,饲喂鱼油日粮的小鼠卵母细胞内层钙的分布比豆油日粮组有所升高($P < 0.05$),但是各组卵母细胞的活性线粒体比例和膜电位均没有显著性改变。另外,鱼油日粮组小鼠卵母细胞内脂滴密集,而 CLA 日粮组小鼠卵母细胞脂肪滴分布不均匀,每个卵母细胞所含脂肪较少。各日粮组卵母细胞受精率(2-细胞)没有显著性差异,但是 CLA 日粮组受精卵发育至桑葚胚和囊胚的比率分别比豆油组降低 51.80%($P < 0.05$)和 62.19%($P < 0.05$),比鱼油组降低 52.97%($P < 0.05$)和 60.89%($P < 0.05$)。因此,小鼠饲喂鱼油日粮可扰乱卵母细胞内钙平衡,但未改变其体外发育能力;CLA 日粮可能通过促进卵母细胞内脂肪的降解从而降低受精卵体外发育率。

关键词 鱼油; 共轭亚油酸; 小鼠; 卵母细胞; 线粒体; 囊胚

中图分类号 S 816.79; S 852.2

文章编号 1007-4333(2012)03-0107-07

文献标志码 A

Effects of diet supplemented fish oil or conjugated linoleic acid (CLA) on mitochondrial function and developmental ability of the mice oocyte

YI Dan¹, ZENG Shen-ming², GUO Yu-ming^{1*}

(1. State Key Laboratory of Animal Nutrition/College of Animal Science and Technology,

China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Laboratory of Animal Embryonic Biotechnology/College of Animal Science and Technology,

China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The study was conducted to investigate the effects of a diet supplemented n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acid (PUFA) on mitochondrial function and developmental ability of mice oocyte. Ninety Kunming weaning mice with 14 grams body weight were randomly assigned to three groups, and feed with a diet of 4% soybean oil, 4% fish oil, or 4% conjugated linoleic acid (CLA). After 30 days, the mice were treated with PMSG and hCG to induce superovulation. Oocytes were collected to examine mitochondrial parameters (active mitochondrial distribution, mitochondrial calcium, membrane potential and fat droplet distribution), and to assess embryo developmental ability after in vitro fertilization. The results showed that: 1) Though there were no differences in active mitochondrial distribution, mitochondrial calcium,

收稿日期: 2011-12-03

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(30425037)

第一作者: 易丹, 博士研究生, E-mail: yidan810204@163.com

通讯作者: 吕于明, 教授, 博士生导师, 主要从事家禽营养与饲料研究, E-mail: guoym9899@yahoo.com.cn

and membrane potential between different diets, the ratio of mitochondrial calcium to active mitochondria increased significantly in animals fed with a diet of fish oil ($P < 0.05$); 2) The distribution of fat droplets within oocytes of fish oil group were intensive, whereas less and non-uniform fat droplet were observed in oocytes of CLA group; 3) Consumption of CLA significantly reduced the ability of the *in vitro*-fertilized zygotes to cleave and develop to either morula or blastocyst stage by 38.12% and 30.67% respectively, even though no difference was observed in *in vitro* fertility among these three diets. These results suggested that a diet of CLA may increase the cellular lipolysis, leading to decreased embryo developmental ability. In addition, diet supplemented with fish oil did not affect the developmental ability of oocytes where the Ca^{2+} homeostasis was perturbed.

Key words fish oil; conjugated linoleic acid; mice; oocyte; mitochondria; blastocyst

长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)是细胞膜的重要组成部分,在激素和生长因子的作用下可以转变成二十烷类活性物质。研究表明^[1], LC-PUFA还可以影响细胞膜流动性、氧化应激、类二十烷酸合成和细胞信号传递等。根据其化学结构, LC-PUFA可以分为 n-3 和 n-6 系列 PUFA, n-3 PUFA 包括有 α -亚麻酸(ALA)、二十碳二五烯酸(EPA)及二十二碳六烯酸(DHA)。ALA 在体内可以转化为 EPA 和 DHA,但是效率很低。因此日粮中通常添加鱼类产品来补充动物对 n-3 PUFA 的需要。亚油酸(LA)是 n-6 系列 PUFAs 中的重要一员,它主要存在于植物油中,而且在体内可以转化成花生四烯酸(AA)。AA 主要存在于肉类和蛋类食物中,它在体内是 2 系列前列腺素(PG)的前提物质^[2]。共轭亚油酸(CLA)是一类与 LA 分子式相同但结构不同的混合物总称,其中 c9, t11-CLA 和 t10, c12-CLA 含量最丰富,而且生物活性较高^[3]。CLA 主要存在于反刍动物食物产品中。

LC-PUFA 对于机体免疫和预防心血管疾病有积极的作用。但是 n-3 和 n-6 PUFA 对动物生殖性能影响的研究资料非常有限。而且它们对动物排卵、卵母细胞质量以及受精影响的研究结果并不一致^[2]。以往的研究表明, n-3 PUFA 日粮降低了小鼠的精子质量^[4]。Ambrosey 等^[5]研究表明, n-3 或 n-6 PUFA 可以提高母牛的受精率;而 Juchem 等^[6]给母牛饲喂 n-3 PUFA 日粮并没有观察到这种现象。此外, Trujillo 等^[7]和 Broughton 等^[8]的研究结果表明,富含 n-3 PUFA 的日粮对大鼠的排卵率有相反的作用效果。有研究表明对于提高卵母细胞和胚胎的质量及发育能力,多不饱和脂肪酸日粮要优于饱和脂肪酸日粮^[2,9],但由于多不饱和脂肪酸容易引发脂质过氧化,造成细胞内活性氧增多,不利于胚胎的发育^[10]。最近, Wakefield 等^[11]的研究表明,给小鼠饲喂高水平 n-3 多不饱和脂肪酸日粮,提高

了小鼠卵母细胞内活性氧水平,但破坏了细胞内钙平衡,导致合子卵裂率降低。以上不同的研究结果除了日粮脂类组成不同的原因以外,还有很多有待澄清的因素。

由于脂肪酸与卵母细胞发育能力密切相关,特别是存在于细胞膜上的磷脂对受精前后的卵母细胞至关重要。所以,本试验选择可以整合到磷脂上的多不饱和脂肪酸作为材料,通过给小鼠饲喂多不饱和脂肪酸日粮,研究卵母细胞内线粒体功能的变化和脂肪的分布与体外发育能力的关系,旨在为研究脂类营养物质改善动物的繁殖性能提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验日粮、动物及饲养管理

100 只断奶昆明雌鼠随机分为 3 组,分别饲喂 40 g/kg 豆油日粮(依据美国营养学会 AIN-93^[11], 对照组), 40 g/kg 鱼油日粮和 40 g/kg 的 CLA(甲酯)日粮(c9, t11-CLA : t10, c12-CLA = 40 : 60, Lipid Nutrition, Netherlands), 其他日粮成分完全相同(表 1)。各种脂肪酸组成分析见表 2。

所有小鼠在塑料笼(SLIM LINE™)中进行饲养。12 h 光照与黑夜循环,温度为(21±1)℃,湿度为 60%±10%。断奶小鼠先适应 3 d,采食对照组日粮,自由饮水。然后挑选 14 g 左右小鼠(每组 30 只,各组体重无显著差异),分别饲喂 3 种日粮 30 d。所有试验程序按照中国农业大学动物实验相关规定进行,符合动物福利要求。

在饲喂 30 d 后,记录各组小鼠体重。然后对小鼠进行超数排卵。腹腔注射 10 IU 的孕马血清促性腺激素(PMSG)(宁波第二激素制药厂),48 h 后,腹腔注射 10 IU 的人绒毛膜促性腺激素(hCG)(宁波第二激素制药厂),14 h 后,处死小鼠,从输卵管膨大部收集卵丘细胞-卵母细胞复合物(COCs)放入 M2 液(Sigma)中,用 32 IU/mL 的透明质酸酶

(Sigma)消化去掉卵丘细胞,将卵母细胞在 M2 液中清洗 3 次,用于后续指标检测。

表 1 日粮组成和营养水平(干物质基础)			
Table 1 Composition and nutrient levels of diets (dry basis)			
指 标	日粮类型		
	豆油	鱼油	CLA
日粮组成/(g/kg)			
玉米	374.60	374.60	374.60
次粉	280.00	280.00	280.00
大豆粕	210.00	210.00	210.00
大豆油	40.00	0.00	0.00
鱼油	0.00	40.00	0.00
CLA	0.00	0.00	40.00
鱼粉	30.00	30.00	30.00
啤酒酵母粉	20.00	20.00	20.00
磷酸氢钙	19.70	19.70	19.70
石粉	13.70	13.70	13.70
矿物质预混料 ^①	5.00	5.00	5.00
氯化钠	3.00	3.00	3.00
氯化胆碱	2.00	2.00	2.00
蛋氨酸	1.00	1.00	1.00
维生素预混料 ^②	0.50	0.50	0.50
抗氧化剂	0.50	0.50	0.50
营养水平 ^③			
能量/(MJ/kg)	14.47	14.47	14.47
ω(粗蛋白质)/%	20.31	20.31	20.31
ω(钙)/%	1.18	1.18	1.18
ω(有效磷)/%	0.81	0.81	0.81
ω(赖氨酸)/%	1.07	1.07	1.07
ω(蛋氨酸)/%	0.43	0.43	0.43

表 2 气相色谱检测各种油脂的脂肪酸组成*			
Table 2 Fatty acids composition of experimental oils			
g/100 g			
脂肪酸	大豆油	鱼油	CLA
C14:0	0.03	8.20	—
C14:1	—	0.35	—
C16:0	12.36	15.42	0.68
C16:1	0.14	7.92	—
C18:0	1.84	4.21	—
C18:1	28.17	26.96	0.82
C18:2n-6	55.79	—	1.46
C18:3n-3	0.81	1.05	—
c9,t11-18:2	—	—	38.55
t10,c12-18:2	—	—	58.45
C20:0	—	—	—
C20:1	0.33	13.88	—
C20:2	0.02	0.45	—
C20:3	—	0.68	—
C20:4n-6	—	0.16	—
C20:5n-3	—	10.02	—
C22:0	0.12	—	—
C22:6n-3	—	10.61	—
C24:0	0.40	—	—

注：* 100 g 总脂肪酸甲酯中各种脂肪酸的量。—为未检测到。

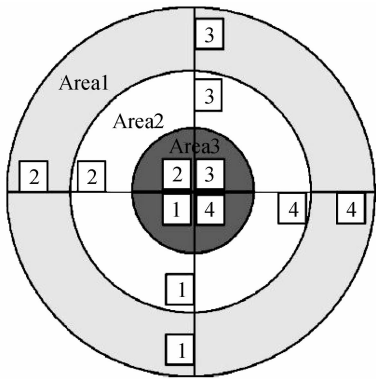
1.2 卵母细胞线粒体分布、钙浓度及膜电位

用线粒体特异性探针和共聚焦显微镜(Nikon TE2000E)分析卵母细胞的线粒体^[1]。利用 MitoTracker green FM 和 rhod-2 AM (Invitrogen) 2 种染料探针分析卵母细胞活性线粒体分布和线粒体钙浓度。从各日粮组中选取超过 30 枚卵母细胞,放入含有 200 nm/L MitoTracker green FM 和 10 μm/L rhod-2 AM 的染液中,37 ℃避光孵育 15 min。然后将卵母细胞在 mPBS(Sigma)中洗 3 次,制片,迅速在共聚焦显微镜下观察,拍片。

用 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) (Invitrogen)检测线粒体膜电位^[1]。同样各日粮组选取超过 30 枚卵母细胞,然后放入含有 0.75 mm/L JC-1 染液中,37 ℃避光孵育 15 min,mPBS 中洗 3

注:①维生素预混料为每 kg 日粮提供 VA 140 00 IU,VD 1 500 IU,VE 120 IU,VK 5.0 mg,VB₁ 13 mg,VB₂ 12 mg,VB₆ 12 mg,烟酸 60 mg,泛酸 24 mg,叶酸 6 mg,生物素 0.2 mg,VB₁₂ 22 μg,胆碱 1 250 mg。②微量元素预混料为每 kg 日粮提供:镁 Mg 2 000 mg,钠 2 000 mg,钾 5 000 mg,铁 120 mg,锰 75 mg,锌 30 mg,铜 10 mg,硒 0.2 mg,碘 0.5 mg。③为计算值。

次,制片,迅速在共聚焦显微镜下观察。通过 Nikon EZ-C1 FreeViewer(Version 3.00.502)对荧光标记的卵母细胞图片进行分析。选取卵母细胞图片(极体和中期板均可见),将其荧光强度分为3个域和4个区,如图1所示。计算3个域的绿色和红色荧光强度,各组卵母细胞每个域的荧光强度比值可以反映活性线粒体分布和钙浓度。同样线粒体膜电位可以通过各个域的红光与绿光强度比值来比较,JC-1在高膜电位时发出红色荧光,而在低膜电位时出绿色荧光。



参照 wakefield 等^[1]方法,将其分为3个域(Areas 1~3)和4个区(Regions 1~4)。

图1 分析卵母细胞线粒体的相关参数

Fig.1 Schematic of the template used to analyze mitochondrial parameters

1.3 卵母细胞脂肪滴分布

用 Nile Red(Sigma)荧光染料来检测卵母细胞的脂肪滴分布^[12],卵母细胞的脂类水平与散发的荧光强度呈正比。各日粮组选取超过20枚卵母细胞,在500 μL 2%的戊二醛中固定24 h,然后转移到25 μL 含有10 μg/mL Nile red 和1 mg/mL 聚乙烯比咯烷酮(Polyvinylpyrrolidone, Sigma)染液中,室温避光过夜后用 mPBS 洗3次,制片,迅速在共聚焦显微镜下观察。

1.4 卵母细胞体外发育能力

将各组收集好的卵母细胞洗涤后置于提前预平衡好的75 μL 受精滴中,然后吸取10 μL 在 HTF's medium(sigma)液中孵育1~1.5 h 的获能精子,移入含卵母细胞的受精液小滴中,在37℃、5% CO₂ 的培养箱中受精4~6 h 后,将受精卵洗净后移入预先平衡好的 Quinn's HTF medium(Sigma)培养液中继续培养^[13],每隔24 h 观察卵裂情况,统计受精率、桑葚胚和囊胚率。

1.5 数据统计与分析

数据以平均值±标准误表示。数据分析采用 SPSS 13.0 中的 ONE-way ANOVA 单因素方差分析进行数据分析,利用 Duncan's 多重比较各日粮组间的差异性,显著性差异以 $P<0.05$ 表示。

2 结果

2.1 小鼠最终体重

经过30 d 的饲喂,各组小鼠最终体重并无显著差异($P>0.05$),豆油日粮组为(35.47±0.56)g;鱼油日粮组为(35.39±0.65)g;CLA 日粮组为(35.63±0.53)g。

2.2 卵母细胞线粒体相关参数

饲喂鱼油日粮或 CLA 日粮30 d 后,与豆油日粮相比较,小鼠卵母细胞活性线粒体和钙的分布没有改变(表3)。然而,从钙相对于每个活性线粒体

表3 豆油、鱼油和 CLA 日粮组小鼠卵母细胞活性线粒体分布、平和膜电位*

Table 3 Distribution of active mitochondria, mitochondrial calcium, and membrane potential of oocytes from animals fed a diet of soybean oil, fish oil, or CLA

项 目	豆油组	鱼油组	CLA 组	SEM	P
活性线粒体分布					
域 2 : 1	1.12	1.14	1.19	0.041	0.752
域 3 : 1	1.14	1.13	1.28	0.070	0.642
域 3 : 2	1.03	0.98	1.06	0.030	0.713
线粒体钙分布					
域 2 : 1	1.12	1.23	1.19	0.146	0.917
域 3 : 1	1.15	1.29	1.30	0.066	0.901
域 3 : 2	1.02	1.04	1.08	0.032	0.925
钙 : 线粒体					
域 1	0.99	1.09	0.86	0.182	0.169
域 2	0.93 b	1.20 a	0.85 b	0.107	0.001
域 3	0.99 b	1.28 a	0.86 b	0.102	0.001
高膜电位 : 低膜电位					
域 1	1.92	1.34	1.52	0.182	0.556
域 2	2.09	1.45	1.66	0.194	0.314
域 3	2.08	1.49	1.72	0.206	0.329

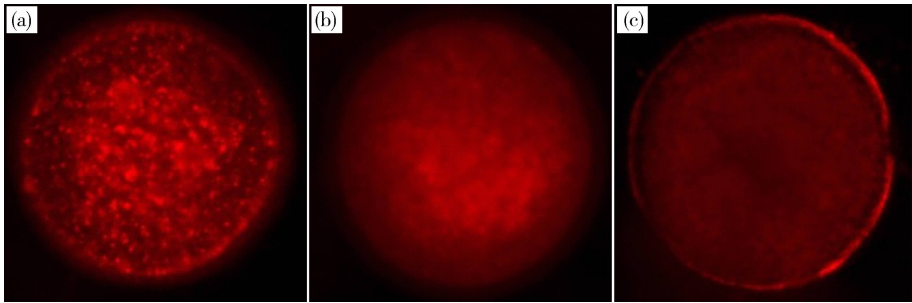
注 : * 为每种日粮组卵母细胞数≥30。同行字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

的分布分析,饲喂鱼油日粮的小鼠卵母细胞域 2 和域 3 内钙的分布比豆油日粮组高($P<0.05$)。各处理组卵母细胞线粒体的膜电位在各个域中没有显著差异。

2.3 卵母细胞内脂肪滴分布

饲喂豆油日粮小鼠的卵母细胞内脂肪滴分布均

匀,域 2 和域 3 所含脂肪水平较高(图 2(a))。鱼油组小鼠卵母细胞内脂滴比较密集,脂类含量高(图 2(b))。而 CLA 组小鼠卵母细胞脂肪滴分布不均匀,域 2 所含脂肪相对较多,每个卵母细胞所含脂肪相对较少(图 2(c))。



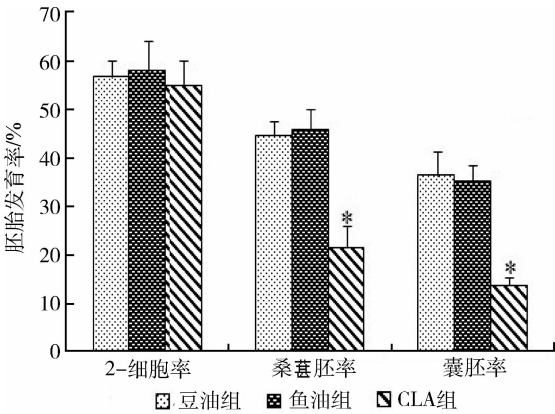
Nile red染色, $n \geq 15$

图 2 豆油(a)、鱼油(b)和 CLA 日粮组(c)小鼠卵母细胞脂滴分布($\times 200$)

Fig. 2 Nile red staining of lipid droplet of oocytes from mice fed a diet of soybean oil, fish oil, or CLA($\times 200$)

2.4 卵母细胞体外发育能力

将收集到的各组卵母细胞进行体外受精,观察卵母细胞体外受精及胚胎发育能力。饲喂鱼油日粮小鼠的卵母细胞体外受精率和囊胚率与豆油组没有显著性差异,而饲喂 CLA 日粮小鼠的卵母细胞体外受精后,虽然受精率(2-细胞率)没有改变、但是发育至桑葚胚和囊胚的比率分别比豆油组低 51.80% ($P<0.05$)和 62.19% ($P<0.05$),比鱼油组降低了 52.97% ($P<0.05$)和 60.89% ($P<0.05$)(图 3)。



数据以平均值±SE 表示;每种日粮组卵母细胞数 $n \geq 40$, 3 个重复。* 表示 $P < 0.05$ 。

图 3 豆油、鱼油和 CLA 日粮组小鼠卵母细胞体外发育至 2-细胞率、桑葚胚率和囊胚比率

Fig. 3 Development potential of in vitro-fertilized zygotes from mice fed a diet of soybean oil, fish oil, or CLA

3 讨论

3.1 小鼠体重

经过 30 d 的饲喂,各日粮组雌鼠的最终体重没有差异。Mori 等^[14]给 C57BL/6J 小鼠饲喂 4 g/kg 鱼油日粮 5 个月后,体增重和体重均没有改变。同样 Veaute 等^[15]给 CF1 小鼠饲喂 3%CLA 日粮 30 d 后,体增重也没有改变。

3.2 卵母细胞的线粒体功能

线粒体对于卵母细胞和早期胚胎的能量代谢(ATP 的生成)以及细胞内环境十分重要^[1]。本研究结果表明,虽然分布在各个域的活性线粒体和钙浓度没有变化,但是在鱼油日粮组卵母细胞内层,钙相对于每个活性线粒体浓度却有显著提高。由于在卵母细胞受精过程中,由精子引发的钙振荡可以直接将钙信号传递给线粒体^[16],同样创伤或应急其他环境如下,细胞内的钙浓度也会提升^[17-18]。因此钙浓度的变化可以指示细胞的健康状态。在胚胎细胞内,线粒体可以通过自身钙的分泌来调控细胞内的钙水平,而提高细胞内游离钙浓度可降低早期胚胎的发育能力^[19]。以上这些都显示,在卵母细胞内存在一个维持细胞正常功能的线粒体钙浓度。尽管细胞内线粒体钙浓度变化的重要性还不清楚,但是本试验中扰乱的钙平衡与日粮中添加的鱼油密切相关。Wakefield 等^[1]报道给大鼠饲喂含 7% n-3 PUFA 的日粮,尽管提高了卵母细胞活性线粒体比

例和体外胚胎发育能力,但同样提高了卵母细胞活性氧的水平,从而扰乱了线粒体钙平衡。线粒体钙水平与细胞内钙水平密切相关,而后的升高可以降低仓鼠胚胎的发育能力^[19]。结合卵母细胞内脂肪含量分析,可能是 n-3 多不饱和脂肪酸在卵母细胞的沉积造成了一定的氧化应激,导致线粒体钙水平升高。但从体外受精及胚胎发育能力来看,饲喂鱼油日粮的小鼠卵母细胞体外发育能力并未受到不良影响,说明卵母细胞可迅速合成抗氧化酶类来调节自身氧化状态以维持生存的需要。

值得注意的是,尽管线粒体钙水平发生了变化,但是与卵母细胞发育和分裂相关的线粒体膜电位却没有受到日粮因素的影响^[20]。体外试验表明,结肠细胞的膜电位与培养液中 DHA 的浓度正相关,但日粮中添加这种 PUFA 却降低了大鼠结肠细胞的膜电位。因此,预测 PUFA 与细胞膜电位的关系是困难的^[21]。

3.3 卵母细胞的脂肪

脂类物质是细胞发育所必须的能量和物质基础,卵母细胞脂肪颗粒能够为线粒体提供产能的物质基础^[22]。脂肪颗粒的形态和分布变化也影响着卵母细胞的核成熟^[23]。因此卵母细胞内脂肪对受精及后期的胚胎发育至关重要。用 Nile red 处理卵母细胞,通过激光共聚焦显微镜观察其脂肪滴分布和形态,发现饲喂 CLA 日粮的小鼠卵母细胞中脂肪滴分布不均匀,含量相对较少,而鱼油组卵母细胞中脂肪滴分布比较密集,含量相对较多。Pereirad 等^[24]研究表明在培养液中添加 *t10, c12*-CLA 降低了胚胎细胞质中脂肪的沉积,但可以提高冷冻胚胎的体外发育能力。研究报道 *t10, c12*-CLA 一方面通过抑制脂肪的从头合成以及和脂肪合成限速酶的表达来降低细胞的脂肪含量^[25],另一方面可以促进脂肪细胞中脂肪分解,改变脂肪滴的组织形态^[26]。而 *c9, t11*-CLA 的功能则主要对机体的免疫功能有积极的作用。本试验中,CLA 基本由这 2 种异构体组成(97%; *c9, t11*-CLA; *t10, c12*-CLA = 40 : 60),*t10, c12*-CLA 很可能是改变卵母细胞脂肪滴分布和含量的主要因素。

3.4 卵母细胞的体外发育能力

卵母细胞和胚胎的发育能力与其脂肪酸组成密切相关,特别是细胞中的磷脂组成对受精卵母细胞意义重大。研究表明,小鼠卵母细胞中的脂类含量为 4 ng,其中 PUFA 所占的比例小于 20%^[27]。而

受精失败的卵母细胞中则含有饱和或不饱和脂肪酸的比例比较高,PUFA 比例很低^[28]。因此,日粮中添加 PUFA 可能会改变卵母细胞或胚胎的脂肪酸组成,改善其受精率或发育能力。本试验体外受精结果表明,各组卵母细胞受精率没有差异。通过前期的试验发现,小鼠卵巢磷脂中饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸的比例均没有发生变化,只是鱼油组小鼠卵巢的 LA 和 AA 比例有显著的降低(数据即将发表)。由于卵母细胞对 PUFA 的吸收是选择吸收而且受到严格调控的^[29],因此,日粮中 PUFA 对改变卵母细胞脂肪酸组成的作用是有限的。

卵母细胞在受精后,经过卵裂发育成为胚泡。研究表明胚胎从 2-细胞发育至胚泡,甘油三酯的含量保持稳定^[30],给小鼠饲喂 CLA 日粮促进卵母细胞内脂肪分解,使细胞发育所需的能量和物质基础减少,从而影响了合子成功发育至胚泡的比例。这可能就是 CLA 组囊胚率明显低于豆油组和鱼油组的原因。关于 PUFA 对卵母细胞体外发育影响的研究结果并不一致,Nonogaki 等^[10]在培养液中添加 α -亚麻油酸降低了 2-细胞率和 4-细胞率;而 Wakefield 等^[1]给大鼠饲喂鱼油日粮尽管提高了卵母细胞活性氧的水平,但同样提高了卵母细胞体外发育能力。Fouladi-Nashta 等^[31]研究则表明 n-6 或 n-3PUFA 日粮对受精后卵母细胞的发育没有影响。因此,很难预测 LC-PUFA 对卵母细胞发育能力的作用效果,这进一步说明了卵母细胞对日粮中的 PUFA 的吸收是选择性而且是受到严格调控的。本试验也表明 4% 鱼油日粮扰乱了线粒体内钙平衡,但并未影响受精的卵母细胞受精后发育至囊胚的能力。

4 结 论

小鼠食用鱼油日粮破坏了卵母细胞内钙平衡,但未改变其体外发育能力;CLA 日粮可能通过促进卵母细胞脂肪的降解而降低了小鼠合子体外发育率。

参 考 文 献

- [1] Wakerfield S L, Lane M, Schulz S J, et al. Maternal supply of omega-3 polyunsaturated fatty acids alter mechanisms involved in oocyte and early embryo development in the mouse[J]. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2008, 294(2): E425-E434

- [2] Santos J E, Bilby T R, Thatcher W W, et al. Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2008, 43(Suppl 2): 23-30
- [3] Veaute C, Andreoli M F, Recca, et al. Effects of isomeric fatty acids on reproductive parameters in mice[J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2007, 58: 487-496
- [4] Yi D, Zeng S M, Guo Y M. Decreased sperm quality in mice fed a diet with fish oil [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2011, 2(3): 165-173
- [5] Ambrose D J, Kastelic J P, Corbett R, et al. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in alpha-linolenic acid[J]. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89(8): 3066-3074
- [6] Juchem S O, Cerri R L, Villasenor M, et al. Supplementation with calcium salts of linoleic and trans-octadecenoic acids improves fertility of lactating dairy cows[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2010, 45(1): 55-62
- [7] Trujillo E P, Broughton K S. Ingestion of n-3 polyunsaturated fatty acids and ovulation in rats[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1995, 105(2): 197-203
- [8] Broughton K S, Rule D C, Ye Y, et al. Dietary omega-3 fatty acids differentially influence ova release and ovarian cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in rats[J]. *Nutrition Research*, 2009, 29(3): 197-205
- [9] Zeron Y, Sklan D, Arav A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2002, 61(2): 271-278
- [10] Nonogaki T, Noda Y, Goto Y, et al. Developmental blockage of mouse embryos caused by fatty acids[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1994, 11(9): 482-488
- [11] Reeves P G, Nielsen F H, Fahey G C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet[J]. *Journal of Nutrition*, 1993, 123: 1939-1951
- [12] Genicot G, Leroy J L, Soom A V, et al. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes[J]. *Theriogenology*, 2005, 63(4): 1181-1194
- [13] Jeffs B, Ito M, Yu R N, et al. Sertoli cell-specific rescue of fertility, but not testicular pathology, in Dax1 (Ahch)-deficient male mice[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(6): 2481-2488
- [14] Mori T, Kondo H, Hase T, et al. Dietary fish oil upregulates intestinal lipid metabolism and reduces body weight gain in C57BL/6J mice[J]. *Journal of Nutrition*, 2007, 137(12): 2629-2634
- [15] Veaute C, Andreoli M F, Racca A, et al. Effects of isomeric fatty acids on reproductive parameters in mice[J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2007, 58(6): 487-496
- [16] Dumollard R, Duchon M, Sardet C. Calcium signals and mitochondria at fertilisation [J]. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2006, 17(2): 314-323
- [17] Hoffman J J, Gilbert T B, Poston R S, et al. Myocardial reperfusion injury: etiology, mechanisms, and therapies [J]. *Journal of Extra Corporeal Technology*, 2004, 36(4): 391-411
- [18] Perlman J M. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury [J]. *Clinical Therapeutics*, 2006, 28(9): 1353-1365
- [19] Lane M, Bavister B D. Calcium homeostasis in early hamster preimplantation embryos[J]. *Biology of Reproduction*, 1998, 59(4): 1000-1007
- [20] Ng Y, Barhoumi R, Tjalkens R B, et al. The role of docosahexaenoic acid in mediating mitochondrial membrane lipid oxidation and apoptosis in colonocytes[J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26: 1914-1921
- [21] Hong M Y, Chapkin R S, Barhoumi R, et al. Fish oil increases mitochondrial phospholipid unsaturation, upregulating reactive oxygen species and apoptosis in rat colonocytes [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23: 1919-1925
- [22] Isachenko V, Isachenko E, Michelmann H W, et al. Lipolysis and ultrastructural changes of intracellular lipid vesicles after cooling of bovine and porcine GV-oocytes [J]. *Anatomia Histologia Embryologia*, 2001, 30(6): 333-338
- [23] Sueo N, Hiroko T, Akira O. Changes in the amount of proteins, glycogen and lipids in porcine oocytes during *in vitro* meiotic maturation[J]. *Animal Science Journal*, 2002, 73: 327-332
- [24] Pereira R M, Carvalhais I, Pimenta J, et al. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid supplementation during *in vitro* embryo culture[J]. *Animal Reproductive Science*, 2008, 106(3-4): 322-332
- [25] Pariza M W, Park Y, Cook M E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid [J]. *Progress in Lipid Research*, 2001, 40(4): 283-298
- [26] Chung S, Brown J M, Sandberg M B, et al. Trans-10, cis-12 CLA increases adipocyte lipolysis and alters lipid droplet-associated proteins: role of mTOR and ERK signaling [J]. *Journal of Lipid Research*, 2005, 46(5): 885-895
- [27] Santos J E P, Bilby T R, Thatcher W W, et al. Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2008, 43(suppl. 2): 23-30
- [28] Matorras R, Ruiz J I, Mendoza R, et al. Fatty acid composition of fertilization-failed human oocytes[J]. *Human Reproduction*, 1998, 13(8): 2227-2230
- [29] Zeron Y, Sklan D, Arav A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2002, 61: 271-278
- [30] Ferguson E M, Leese H J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1999, 116(2): 373-378
- [31] Fouladi-Nashta A A, Wonnacott K E, Gutierrez C G, et al. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids[J]. *Reproduction*, 2009, 138(5): 771-781