

## 花生四烯酸对小鼠卵泡衰老的影响

张 怡, 李晓曦, 林 艳, 毕欣耘, 于鹏丽, 赵子建\*

(南京医科大学基础医学院代谢疾病研究中心, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 研究花生四烯酸(arachidonic acid, AA)对小鼠卵泡发育的影响, 探讨 AA 与卵巢早衰的关系。方法: 10% AA 饲料喂食 4 周龄 ICR 雌鼠, 4 个月后观察小鼠子宫卵巢重量、卵巢组织脂肪酸分析、卵巢组织学改变。结果: 10% AA 组与对照组相比子宫卵巢体重下降; 脂肪酸分析结果显示 10% AA 组卵巢 n-6/n-3 不饱和脂肪酸比值增大; 光镜下, 10% AA 组可见卵巢退化性黄体增多、间质纤维化、卵巢闭锁卵泡所占比例增加。结论: 喂食 10% AA 饲料可引起小鼠卵巢衰老。

**[关键词]** 多不饱和脂肪酸; 卵巢早衰; 颗粒细胞; 卵泡膜细胞

**[中图分类号]** R363.1+3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)09-1202-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20140910

## Effects of arachidonic acid on follicle failure of mice

Zhang Yi, Li Xiaoxi, Lin Yan, Bi Xinyun, Yu Pengli, Zhao Zijian\*

(Metabolic Disease Research Center, School of Basic Sciences, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of arachidonic acid (AA) on follicle development of female mice and explore the relationship between AA and premature ovarian failure. **Methods:** ICR female mice of 4-week-old were fed with 10% AA. The weight of uterus and ovary, fatty acid analysis of ovaries, histological changes in ovaries were examined after four months. **Results:** The uterus and ovary weight of the 10% AA group were lower than those of the control group. Fatty acid analysis showed that the n-6/n-3 ratio of ovaries was increased in the 10% AA group. Under optical microscope, ovaries from the 10% AA group showed increased visible ovarian degenerative corpus luteum, interstitial fibrosis and increased proportion of atretic follicles. **Conclusion:** 10% AA can cause obvious ovarian failure in mice.

**[Key words]** polyunsaturated fatty acid; premature ovary failure; granular cell; theca cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(09): 1202-1205]

多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFAs) 是包括 2 个及 2 个以上双键的长链脂肪酸, 其中 n-3 和 n-6 系列的脂肪酸具有重要的生物学意义。目前膳食中 n-6/n-3 PUFAs 比例极不平衡, 比例已由过去的(1~2):1 提高至现在的(20~30):1, 根据 2006 年澳大利亚健康与医疗委员会的研究, 膳食中 n-6/n-3 PUFAs 的最佳比例为(2~4):1<sup>[1]</sup>。膳食中 n-6

与 n-3 PUFAs 摄取比例失衡会导致心脑血管疾病、癌症、炎症以及自身免疫性疾病的发生<sup>[2]</sup>。花生四烯酸(arachidonic acid, AA)属于 n-6 PUFAs, 为人体必需的一种脂肪酸, 2013 年 Marei 等<sup>[3]</sup>指出 AA 作为前列腺素合成的前体在调节动物生殖过程中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是指卵巢功能衰竭所导致的 40 岁之前即闭经的现象, 特点是原发或继发闭经伴随血促性腺激素水平升高和雌激素水平降低<sup>[4]</sup>。从病理生理角度考虑, POF 病因可分为两大类: 卵泡衰竭和卵泡功能失调。原始卵泡池不足和卵泡闭锁加速是导致卵泡衰竭的原因<sup>[5]</sup>。

2007 年 Wathes 等<sup>[6]</sup>研究指出饮食中 n-6 和 n-3 PUFAs 可以通过多种机制影响生殖过程, 他们提供

**[基金项目]** 国家重大科学研究计划(2013CB945200); 国家自然科学基金面上项目(81170780, 81372798, 81200570); 教育部博士学科点基金(20113234110005); 江苏省科技支撑计划(BE2012756); 江苏省自然科学基金(BK20130059, BK20111766)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: babyhafo@163.com

前列腺素合成的前体和调节许多关键酶的表达模式来参与前列腺素和类固醇代谢<sup>[6]</sup>。2008 年 Wakefield 等<sup>[4]</sup>研究 n-3 PUFAs 对生殖的影响,发现 n-3 PUFAs 可以增加受精卵数量并能提高卵泡的线粒体功能和氧含量。2010 年 Wonnacott 等<sup>[8]</sup>研究表明脂肪酸饮食可以调节卵泡的脂肪酸含量以及代谢情况。综上所述,PUFAs 可以影响卵巢的脂肪酸含量、卵泡的线粒体功能以及卵泡的氧化应激作用,并且 AA 对卵巢的作用还不明确,这提示我们观察和监测 n-6 PUFAs 对卵巢发育的影响以及对卵巢早衰机制的探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

4 周龄清洁级雌性 ICR 鼠 12 只,体重 17~19 g,由南京医科大学实验动物中心提供。饲养环境为昼夜 12 h 交替,控制室内温度在 18~22℃,湿度在 50%~60%,食物和水自由摄取。

#### 1.1.2 主要仪器和试剂

光学显微镜和摄像系统(Nikon 公司,日本),脂肪酸分析仪、4%福尔马林、无水乙醇、石蜡(Sigma 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 饲料的配置

10%AA 饲料脂肪酸分析结果显示其 n-6/n-3 为 20:1,最接近目前人体内比值。10%AA 饲料为花生四烯酸油溶液 33.3 g,基础饲料 100 g,购于湖北武汉嘉必优生物工程有限公司。

#### 1.2.2 实验动物分组

动物检测 1 周后将 12 只 ICR 雌鼠,随机分成 2 组,每组 6 只,分别为 10%AA 组以及对照组,喂食特定饲料,连续喂食 4 个月。

#### 1.2.3 动物的一般状态观察

观察处理后各组小鼠的活动、饮食及皮毛变化等情况。

#### 1.2.4 子宫卵巢重量的测定

处死小鼠后开腹取子宫卵巢,称重,读数稳定后迅速读数,称重 1 次。若有小数位,则按照“四舍五入”原则修约。

#### 1.2.5 卵巢脂肪酸分析

摘取卵巢去除周围的脂肪组织,将它们衍生为易挥发的甲酯,经气相色谱分离,分析脂肪酸<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.6 卵巢组织形态学观察

剖腹摘取卵巢,去除周围的脂肪组织,放入 4% 的福尔马林中固定 48 h,经脱水、浸蜡、包埋、切片、HE 染色,封片后电镜下观察其组织学变化。

#### 1.2.7 卵巢连续切片卵泡计数

卵巢用 4%福尔马林固定 48 h,石蜡包埋,5 μm 厚度连续切片,每隔 20 μm 取 1 张,常规 HE 染色后光镜下计数各组卵泡数目,乘以常数 5 后得到最终数目<sup>[10]</sup>。然后将闭锁卵泡最终数目除以各组卵泡最终数目的总和,得到闭锁卵泡所占比例。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS12.0 统计软件进行统计分析,采用独立样本 *t* 检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 动物一般情况

10%AA 组动物处理后出现毛发簇状生长,精神萎靡,活动明显减少。对照组动物皮毛光亮,活动、摄食等一般情况正常,对外界刺激反应性好,灵活性强。

### 2.2 子宫卵巢的重量测定

与对照组相比,10%AA 组子宫卵巢重量平均值为  $(0.200 \pm 0.013)$ g,对照组子宫卵巢重量平均值为  $(0.290 \pm 0.076)$ g,两组数据通过 *t*-test 比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.3 卵巢组织脂肪酸分析

与对照组相比,10%AA 组卵巢组织中 n-6 PUFAs 出峰面积明显增高,n-3 PUFAs 出峰面积明显降低,二者比值增大。这说明用 10%AA 饲料处理小鼠效果明显,符合后续实验要求(图 1)。

### 2.4 卵巢组织形态学观察

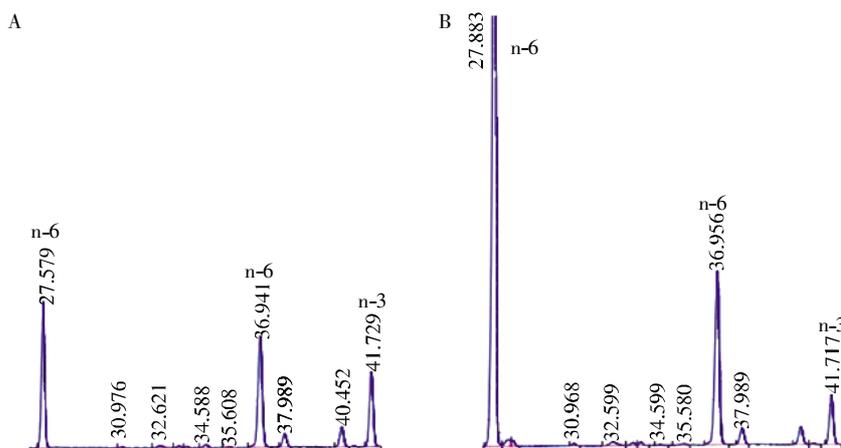
对照组组织结构层次清晰,可见大小不等的原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡以及成熟卵泡,各级卵泡生长活跃。与对照组相比,10%AA 组卵巢各阶段生长卵泡数目明显减少,闭锁卵泡增多,卵巢间质严重纤维化,卵巢由多个大的黄体样物质形成(图 2)。

### 2.5 卵巢闭锁卵泡计数

与对照相比,10%AA 组卵巢闭锁卵泡数占总卵泡数比例的平均值为  $(31.00 \pm 2.79)\%$ ,对照组闭锁卵泡所占比例平均值为  $(11.00 \pm 1.04)\%$ ,二者差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。

## 3 讨论

本研究中,我们用 10%AA 饲料从 4 周龄开始喂养小鼠,喂食 4 个月后发现与对照组相比,10%AA 组的子宫卵巢重量下降;10%AA 组小鼠卵巢 n-6



A:对照组;B:10%AA 组。

图 1 花生四烯酸对卵巢脂肪酸分析的影响

Figure 1 Effects of AA on the fatty acid analysis of ovary

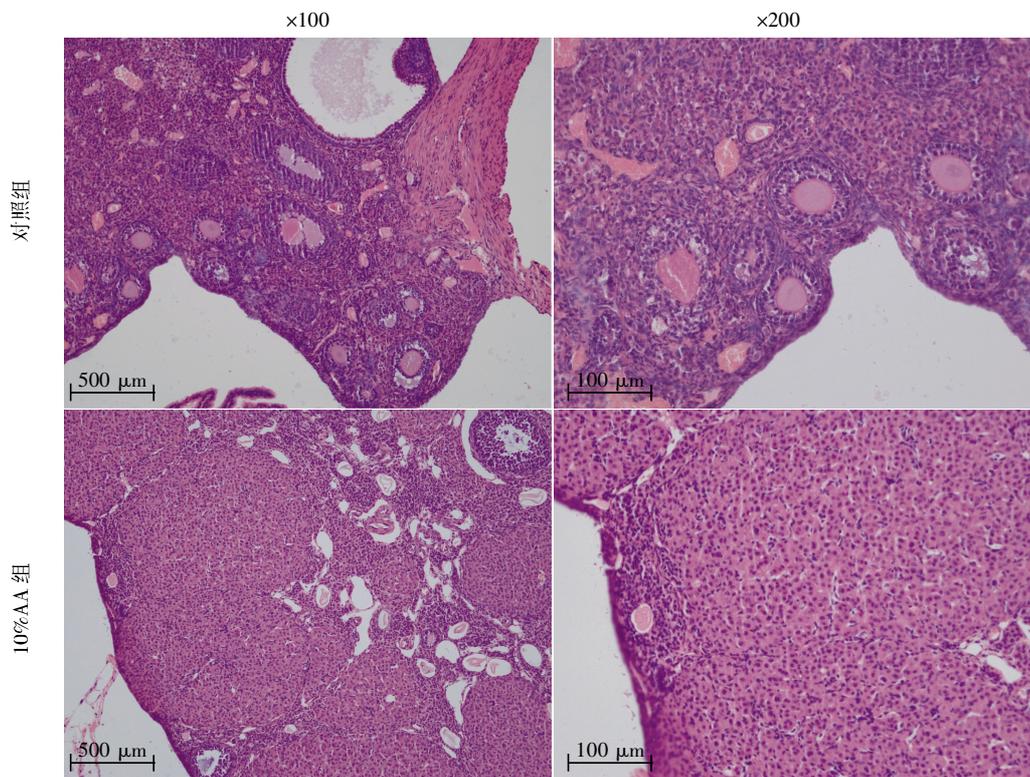


图 2 花生四烯酸对小鼠卵巢组织形态的影响(HE 染色)

Figure 2 Effects of AA on the morphological changes of ovary(HE staining)

PUFAs 出峰面积明显增高,n-3 PUFAs 出峰面积降低, n-6/n-3 比值增高。组织结构上,对照组小鼠卵巢色泽红,内见原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、成熟卵泡的颗粒细胞层次多,卵泡液丰富,形态良好。然而 10%AA 组内见大量闭锁卵泡,黄体明显增多,卵巢大范围纤维化。相关研究表明,卵巢内存活卵泡计数为评估卵巢受损的确切方法<sup>[11]</sup>。本研究结果发现,与对照组相比,10%AA 组闭锁卵泡比例增多,说明 n-6 PUFAs 对小鼠卵巢及卵泡发育均产生了促进衰老的影响。

综上所述,10%AA 饲料长期喂食使小鼠卵巢老化,并且干预小鼠的卵泡发育。其原因可能是 10% AA 长期干预影响小鼠卵泡膜细胞的正常功能。2010 年 Kirkup 等<sup>[12]</sup>研究指出 PUFAs 在生殖方面有一定调节功能<sup>[12]</sup>。2013 年 Rosewell 等<sup>[13]</sup>研究表明卵泡膜细胞可为卵泡发育提供所必需的雄激素;参与血管形成系统并为卵泡发育提供营养物质和性激素;介导卵母细胞与颗粒细胞之间的交互作用进而参与调控细胞凋亡和卵泡发育过程<sup>[13]</sup>。AA 作为前

列腺素的前体,通过对膜功能影响以及氧化应激作用长期影响卵泡膜细胞的功能,进一步干扰了卵泡发育。另一方面,长期食用 n-6 PUFA 使小鼠卵巢闭锁卵泡增多,卵泡凋亡加速则与卵泡发育过程中的分子调控机制有关。根据相关研究,PKB 在卵巢卵泡中表达<sup>[14]</sup>,并且颗粒细胞的凋亡是导致卵巢卵泡闭锁的直接因素<sup>[15]</sup>。因此,PI3K-PKB 信号通路在卵巢卵泡发育中的作用也成为进一步研究的重点,以便更好的探讨卵巢早衰机制,寻找更好地治疗卵巢早衰的方法<sup>[16]</sup>。

#### [参考文献]

- [1] 黄宝玺,王大为,王金凤.多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 农业工程技术:农产品加工业,2009,4(8):26-30
- [2] Xu H,Dong X,Ai Q,et al. Regulation of tissue LC-PUFA contents,Delta6 fatty acyl desaturase (FADS2) gene expression and the methylation of the putative FADS2 gene promoter by different dietary fatty acid profiles in japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*)[J]. PLoS One 2014,9(1):e87726
- [3] Marei WF,Abayasekara DR,Wathes DC,et al. Role of PTGS2-generated PGE during gonadotrophin-induced bovine oocyte maturation and cumulus cell expansion[J]. Reprod Biomed Online,2014,28(3):388-400
- [4] 胡晓华,陈冬梅,贾磊. 卵巢功能早衰的实验研究概述[J]. 中国中医药现代远程教育,2013,11(22):164-164
- [5] 陈新娜,陈贵安,李美芝. 抑制素 a 基因与卵巢早衰的相关性研究[J]. 生殖医学杂志,2006,15(5),289-292
- [6] Wathes DC,Abayasekara DR,Aitken RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction[J]. Biol Reprod,2007,77(2):190-201
- [7] Wakefield SL,Lane M,Schulz SJ,et al. Maternal supply of omega-3 polyunsaturated fatty acids alter mechanisms involved in oocyte and early embryo development in the mouse [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab,2008,294(2):E425-434
- [8] Wonnacott KE,Kwong WY,Hughes J,et al. Dietary omega-3 and -6 polyunsaturated fatty acids affect the composition and development of sheep granulosa cells, oocytes and embryos [J]. Reproduction,2010,139(1):57-69
- [9] 李金穗,汪苹,李奥博. 粉中亚油酸 GC 测定的预处理方法研究[J]. 北京工商大学学报:自然科学版,2011,5:25-29
- [10] Tilly JL. Ovarian follicle counts--not as simple as 1,2,3 [J]. Reprod Biol Endocrinol,2003,1:11
- [11] Alserri A,Kuriya A,Holzer H,et al. Lateralization of ovarian follicles [J]. Gynecol Obstet Invest,2014,77(2):117-120
- [12] Kirkup SE,Cheng Z,Elmes M,et al. Polyunsaturated fatty acids modulate prostaglandin synthesis by ovine amnion cells *in vitro*[J]. Reproduction,2010,140(6):943-951
- [13] Rosewell KL,Li F,Puttabyatappa M,et al. Ovarian expression,localization,and function of tissue inhibitor of metalloproteinase 3(TIMP3) during the periovulatory period of the human menstrual cycle [J]. Biol Reprod,2013,89(5):121
- [14] Ding W,Wang W,Zhou B,et al. Formation of primordial follicles and immunolocalization of PTEN,PKB and FOXO3A proteins in the ovaries of fetal and neonatal pigs[J]. J Reprod Dev,2010,56(1):162-168
- [15] Uhlenhaut NH,Treier M. Forkhead transcription factors in ovarian function[J]. Reproduction,2011,142(4):489-495
- [16] Tzivion G,Dobson M,Ramakrishnan G. FoxO transcription factors;regulation by AKT and 14-3-3 proteins[J]. Biochim Biophys Acta,2011,1813(11),1938-1945

[收稿日期] 2014-03-17