

- of chronic dacryocystitis. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2005, 25(3): 261
- [11] Marthin JK, Lindegaard J, Prause JU, Heegaard S. Lesions of the lacrimal drainage system: a clinicopathological study of 643 biopsy specimens of the lacrimal drainage system in Denmark 1910—1999. *Acta Ophthalmol Scand.* 2005, 83(1): 94
- [12] 马丽. 泪小管炎伴结石形成 4 例. *中国实用眼科杂志*, 2002, 20(9): 659
- [13] Valenzuela AA, McNab AA, Selva D, O'Donnell BA, Whitehead KJ, Sullivan TJ. Clinical features and management of tumors affecting the lacrimal drainage apparatus. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 2006, 22(2): 96
- [14] Yazici B, Hammad AM, Meyer DR. Lacrimal sac dacryoliths: predictive factors and clinical characteristics. *Ophthalmology.* 2001, 108(7): 12
- [15] 李小燕, 曹永葆. 老年人结膜松弛状况调查. *临床眼科杂志*, 2004, 12(1): 37
- [16] Don Liu. Conjunctivochalasis: A cause of tearing and its management. *Ophthalmic plastic and Reconstructive Surg.* 1986, 2: 25
- [17] 谢继峰. 泪小点睫毛异物 14 例分析. *美中国际眼科杂志*, 2002, 2(3): 36
- [18] Uraloglu M, Erkin Unlu R, Ortak T, Sensoz O. Delayed assessment of the nasolacrimal system at naso-orbito-ethmoid fractures and a modified technique of dacryocystorhinostomy. *J Craniofac Surg.* 2006, 17(1): 184
- [19] Osguthorpe JD, Hoang G. Nasolacrimal injuries. Evaluation and management. 1991, 24(1): 59
- [20] 胡楠, 龚启荣. 先天性泪囊炎 30 例诊治分析. *交通医学*, 1998, 12(1): 89
- [21] Alexandrakis G, Hubbell RN, Aitken PA. Nasolacrimal duct obstruction secondary to ectopic teeth. *Ophthalmology.* 2000, 107(1): 189
- [22] 张纲, 谭颖徽. 上颌窦异位牙 1 例. *第三军医大学学报*, 2003, 25(13): 1 160
- [23] 魏红, 肖利华. Wegener 肉芽肿 1 例. *中国实用眼科杂志*, 2004, 22(10): 839
- [24] Tsalic M, Gilboa M, Visel B, Miller B, Haim N. Epiphora (excessive tearing) and other ocular manifestations related to weekly docetaxel: underestimated dose-limiting toxicity. *Med Oncol.* 2006, 23(1): 57
- [25] Stevens A, Spooner D. Lacrimal duct stenosis and other ocular toxicity associated with adjuvant cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil combination chemotherapy for early stage breast cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2001, 13(6): 438

(2007-11-05 收稿, 责任编辑 梁秋野)

年龄、线粒体与女性生殖能力的关系

杨华¹ 刘锋¹ 综述 卢克焯² 审校 (¹广西南宁市第二人民医院生殖医疗中心, 南宁 530000; ²广西大学动物科学技术学院动物繁殖研究所, 南宁 530000)

【关键词】 年龄 线粒体 生殖能力 女性

【中国图书分类号】 R322.6

女性生殖能力随着年龄的增加逐渐下降, 自然妊娠率逐年降低, 到 40 岁以后, 仅有一半的妇女还具备生育能力。通常妇女在绝经之前 (45 岁左右) 就发生月经周期的不规律以及排卵功能的障碍。在此之前大约 10 年, 虽然仍有规律的排卵, 但是其生殖能力已经明显地降低。

在人类辅助生育治疗中, 也同样存在着这一现象: 高龄妇女的妊娠率以及胚胎种植率都显著低于年轻妇女。尽管在近二十几年里, 辅助生育技术有了巨大的进展, 高龄妇女的生殖问题仍然是生殖医学领域的大难题。

1 年龄对女性生殖的影响

长期以来, 关于高龄妇女生殖能力降低的主要靶器官是卵巢还是子宫的争论一直存在。早期的资料主要来源于动物实验, 提示子宫容受性的降低在与年龄相关的生殖能力降低中发挥了重要的作用。但是对人类子宫和内膜的组织学检查并没有观察到类似的随年龄而发生的改变。同时, 对高龄妇女进行赠卵治疗, 可以获得与年轻妇女相同的妊娠率。

这显示: 至少在外源性激素替代的情况下, 与年轻妇女相比, 高龄妇女子宫内膜的容受性并没有下降, 因此多数学者认为, 年龄主要通过影响卵母细胞而降低生殖能力^[1]。这主要表现为两点: 其一, 卵母细胞的数量随着年龄的增长逐渐下降; 其二, 也是更为重要的, 卵母细胞质量逐渐降低, 也即卵子老化。

2 卵子老化的含义

关于卵子老化, 尚没有一个统一的定义。通常把卵子老化分为排卵前老化和排卵后老化。排卵后老化是指排卵后由于不能及时受精, 卵子出现生化和生理改变, 无法支持正常的受精以及胚胎发育; 而排卵前老化是指卵母细胞在排卵之前, 由于各种机制导致卵母细胞发育潜能的降低。排卵前老化是由卵子发生机制所决定的。人的卵子停留于双线期可长达 40~50 年, 在这个漫长的时间里, 在各种不利因素的影响下, 卵子发生老化。在辅助生育技术中, 掌握一个适当的受精时机是提高成功率的关键。目前, 在实际工作中, 常见的排卵后老化见于补救 (Intracytoplasmic sperm injection, IC-SI)。无论排卵前老化还是排卵后老化, 都可以导致卵子发育潜能低下, 从而降低受精率、胚胎发育质量、卵裂率和妊娠

率。通常认为排卵前老化与女性的年龄相关,但是老化并不是以相同的速度影响每个人,卵子的老化速度也是因人而异的,即使是同一个人同一簇卵泡中的不同卵母细胞,老化的速度也是不一致的。

3 卵子老化的机制

目前,有许多不同的机制试图解释卵子老化的原因,包括非整倍体学说、氧自由基—线粒体损伤学说等,但都不能完全满意地解释这一现象。

早有研究发现,随着妇女年龄的增加,自然流产率增加,同时流产物的非整倍体发生率增加,这提示高龄妇女生殖能力的下降可能与卵母细胞非整倍体有关。Dailey 等^[2]估计,25~34岁、35~39岁以及40~45岁妇女MⅡ期卵母细胞的非整倍体率分别为:4.9%、11.5%和29.8%。Pellestor 等^[3]分析了1337例人卵的核型,其中22.1%的卵母细胞有染色体数目异常,非整倍体率为10.8%,且非整倍体率与妇女年龄呈正相关。因此有研究人员提出卵子老化的非整倍体学说,即随着妇女年龄的增加,卵母细胞非整倍体率也增加,导致卵子老化,从而引起生殖能力降低。

高龄妇女的卵母细胞何以会发生非整倍体率的原因及机制并未完全明了。有研究人员认为,尽管染色体异常是核源性,但其根本原因可能是胞浆因子功能的异常。形成有功能的纺锤体是完成正常减数分裂的前提,有研究人员推测纺锤体异常是导致卵母细胞和第一极体间染色体不适当分离的重要原因。已有研究证实,高龄妇女较之年轻妇女减数分裂纺锤体形成异常的发生率增加。由于纺锤体是由胞浆中的微管组织中心形成,在细胞核外组装;同时,减数分裂的进展也为胞浆中的蛋白质调节,因此,胞浆的异常、细胞器的老化必然会影响纺锤体平衡分离染色体的能力。

4 线粒体

线粒体是卵浆中含量最为丰富的细胞器;其结构和分布在卵母细胞发育成熟过程中出现了显著变化;正常减数分裂中期,线粒体分布于纺锤体四周,为微管活动,包括纺锤体的组装、染色体的分离提供能量,对于细胞的分裂和染色体的活动都是很重要的。因此,如线粒体功能异常造成能量储备不足,就可能通过影响纺锤体的结构和功能,导致减数分裂异常而引起卵母细胞非整倍体增加。

线粒体除了在卵母细胞的核成熟(减数分裂)过程中发挥作用以外,它产生的ATP还是卵母细胞、受精卵以及胚胎主要的能量来源;在整个胚胎发育过程中线粒体的形态、数量以及分布也随胚胎的能量需求发生改变^[4,5];同时,由于线粒体在身体其他器官和组织老化过程中发挥了重大的作用,因此,线粒体在卵子老化过程中的作用,可能不仅仅是通过影响卵母细胞纺锤体的组装、染色体的分离,还有其他的机制。

以前人们往往只把线粒体当成细胞的“动力工厂”——一种重要但又单调的角色,只为细胞的各种生理活动提供所需

的能量。但是过去几年的研究表明,线粒体还有着更为神秘的力量,它可能控制了生命中许多关键的环节,从决定哪些生殖细胞可发育成成熟的卵细胞,到决定人长命百岁的可能性,并且在许多老年性疾病中可能扮演了重要角色,甚至提供了为什么高等动物会有雌雄两性之别的原因^[6]。

美国学者 Krakauer 等^[7]的报道显示,在排卵期间线粒体可以决定卵细胞的释放,从而决定人类的生殖。他们在研究闭锁过程中得出上述结论,闭锁过程发生在正在发育的女性胚胎的卵巢中,在此过程中,处于发育阶段的卵巢中的500万个卵细胞,有80%都会进入细胞程序化死亡。

5 线粒体与卵子老化

人始基卵泡中的卵子停留于双线期可长达40~50年,这与有丝分裂后组织相似。在这漫长的过程中,由于各种因素的影响,线粒体及其DNA可能遭受损害,从而影响卵母细胞成熟以及其后的胚胎发育,导致卵子老化。

St John 等^[8]认为,高龄妇女卵子老化可能是由卵母细胞中完整的mtDNA拷贝数下降,或者mtDNA转录水平下降所致。近来已有研究显示,与胚胎相比,人卵线粒体氧化磷酸化基因的转录水平下降,提示mtDNA转录水平与卵母细胞的发育潜能有关。此外,Reynier 等^[9]研究发现卵母细胞的mtDNA拷贝数与同簇卵泡卵母细胞的受精率明显相关。这些研究表明,卵母细胞中mtDNA的拷贝数和转录水平都与卵母细胞的发育潜能相关,因此可能会参与卵子的老化过程。

此外,Wilding^[10]等检测人卵及着床前胚胎的线粒体活性,发现MⅡ期卵子的线粒体活性与母亲年龄呈负相关。Muller-Hoeker 等^[11]获得41名妇女(年龄为27~39岁)的卵母细胞,检测其mtDNA突变,呼吸链缺陷,以及在老化过程中线粒体容量的改变。结果发现,随着妇女年龄的增长,线粒体基质密度增加,容量比例也增加,笔者认为随着年龄的增长,线粒体容量的增加反映了线粒体氧化磷酸化能力的轻微改变,但这与mtDNA突变或酶活性改变无关。因此,线粒体的功能改变可能也在卵子老化过程中发挥作用。

6 线粒体改变引起卵子老化的可能机制

6.1 线粒体参与卵子的凋亡 Tarin 等^[12]发现老龄小鼠经超排刺激后获得的卵母细胞凋亡发生率增加,同时这些卵母细胞中线粒体异常聚集。Krakauer 等^[7]提出卵子的死亡是对线粒体DNA突变堆积的一种解救方式,使得那些带有突变mtDNA的卵母细胞被清除。为了检验二者的推测,Perez 等^[13]从卵泡颗粒细胞分离出线粒体,然后将少量的线粒体(约 5×10^3)输注给在体外易于凋亡的FVB小鼠的卵母细胞中,观察其是否可以阻止这些卵母细胞的凋亡,结果发现实验组24h内36%的卵母细胞发生凋亡,而对照组(未输注线粒体或仅输注缓冲液)70%的卵母细胞发生了凋亡。mtDNA缺失或线粒体功能发生异常,可能会通过影响线粒体膜电位,导致卵母细胞的凋亡,从而参与卵子的老化过程。

6.2 线粒体功能异常参与卵子非整倍体的发生 线粒体的

数量、结构与分布在卵母细胞的生长发育过程中,随着卵母细胞对能量需求的改变而变化。减数分裂中期,线粒体分布于纺锤体四周,为微管活动,包括纺锤体的组装、染色体的分离提供了必要的能量。影响线粒体功能和线粒体在卵子纺锤体周围聚集的化学物质都可引起减数分裂停滞、延迟,以及染色体的提前分裂或不分离。此外,线粒体功能异常以及ATP含量减少,卵子中动力蛋白、其它纺锤体形成过程中的调节因子以及细胞周期调节蛋白的活动也都将受损。在这种情况下,胞浆成熟与胞核成熟间的协调统一、纺锤体的形成以及染色体分离的保真性都会受到严重的影响。

6.3 线粒体与胚胎发育 老化卵子的一个重要特征就是形成的胚胎发育潜能降低,由于线粒体是母系遗传,且胚胎从受精到囊胚着床前,其线粒体都没有复制,故胞浆内的线粒体对胚胎的发育起着重要的作用。

线粒体氧化磷酸化产生的ATP对胚胎着床前发育的贡献在小鼠、牛、猫和人的胚胎中都进行了研究。这些研究都提示在紧密连接前,胚胎主要依赖氧化磷酸化提供其所需的能量,而囊胚形成后,糖酵解逐渐成为能量的主要来源。因此,线粒体功能异常可以通过降低ATP的产生影响受精和其后形成的胚胎着床前的发育;此外,线粒体是细胞内重要的钙库,线粒体功能异常还可通过影响 Ca^{2+} 调节功能而导致受精和胚胎发育的障碍。

Van Blerkom等^[14]检测了人卵及胚胎中ATP的含量,发现同簇卵泡中,形态正常的MII卵子的ATP含量差异很大,但只有从 $ATP \geq 2$ pmol/卵的那簇卵泡中获得的卵产生的胚胎才具有较高的发育潜能。此外,他们还发现,在那些发育正常的8细胞及12细胞胚胎中,各卵裂球ATP含量相同,而发育迟缓的胚胎各卵裂球ATP含量相差很大;同时这些胚胎卵裂球中线粒体也呈现非对称分布;而在胚胎的碎片中则缺乏线粒体。这些结果都提示在卵裂球之间的线粒体遗传可能是影响胚胎继续发育能力的一个重要因素,卵裂过程中,线粒体不均匀分布,部分卵裂球缺乏线粒体或线粒体含量降低可导致该卵裂球的发育阻滞或灭亡。Wilding等^[10]研究也证实着床前胚胎的形态学评分与线粒体的聚集方式有关,评分高的胚胎,胞浆四周线粒体呈颗粒状分布,卵裂球中心线粒体则呈现均质分布;而质量差的胚胎,整个胚胎线粒体都为均质分布。

7 研究线粒体在卵子老化中作用的意义及前景

研究线粒体在卵子老化中作用及其机制具有重要的临床意义。卵浆移植和生殖泡移植(GV transfer)的提出和应用就是基于对卵浆质量重要性的认识。尽管目前仍不清楚卵浆移植和GV移植的具体作用机制,但两种技术移入的供者卵浆中都包含线粒体、mRNA、蛋白质以及其它一些因子,可以肯定的是作为卵浆中最为丰富的细胞器,线粒体在改善受

者胚胎发育中起着重要的作用。而线粒体移植^[11]的开展,及由此而获得的临床妊娠则更有力地证实了线粒体在卵子老化中的作用。但是,虽然人们认识到线粒体作为细胞内的能量加工厂,在卵子的老化过程中可能发挥了重要作用,但这种作用的具体机制却并不清楚。对卵母细胞中线粒体的研究,不仅有利于探讨卵子老化的机制,而且为新的辅助生育技术的开展提供了理论依据,并为解决辅助生育技术中所面临的难题提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Krey LC, Grifo JA. Poor embryo quality: the answer lies (mostly) in the egg. *Fertil Steril*, 2001, 75(3): 466
- [2] Dailey T, Dale B, Cohen J *et al*. Association between nondisjunction and maternal age in meiosis - II human oocytes. *Am J Hum Genet*, 1996, 59: 176
- [3] Pellester F, Andreo B, Arnal F *et al*. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet* 2003, 112: 195
- [4] Shoubridge E. Mitochondrial segregation in the developing embryo. *Hum Reprod* 2000, 15(suppl 2): 229
- [5] Jansen RPS. Origin and persistence of the mitochondrial genome. *Hum Reprod* 2000, 15(suppl 2): 1
- [6] 线粒体的力量. *自然杂志*, 2000, 10(1): 16
- [7] Krakauer DC, Mira A. Mitochondria and germ cell death. *Nature*, 1999, 400: 125
- [8] St Jhon JC. Ooplasm donation in humans - The need to investigate the transmission of mitochondrial DNA following cytoplasmic transfer. *Hum Reprod* 2002, 17: 1954
- [9] Reynier P, May - Panloup P, Chretien M - F *et al*. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocyte. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7: 425
- [10] Wilding M, Dale B, Marino M *et al*. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod*, 2001, 16: 909
- [11] Muller - Hocker J, Schafer S, Weis S *et al*. Morphological - cytochemical and molecular genetic analyses of mitochondrial in isolated human oocytes in reproductive age. *Mol Hum Reprod*, 1996, 2: 951
- [12] Tarin JJ, Perez - Albala, Cano A. Cellular and Morphological Traits of Oocytes Retrieved from Aging Mice after Exogenous Ovarian Stimulation. *Bio Reprod* 2001, 65: 141
- [13] Perez GI, Trbovich AM, Gosden RG *et al*. Mitochondria and death of oocytes. *Nture* 2000, 403: 500
- [14] Van Blerkom J, Henry G. Cytogenetic analysis of living human oocytes: cellular basis and developmental consequences of perturbations in chromosomal organization and complement. *Hum Reprod*, 1998, 3: 777

(2007-11-09 收稿, 责任编辑 张柏林)