

分类号: S814.8

单位代码: 10758

学 号: 2003162

新疆农业大学

硕士学位论文

三种中药有效成分对小鼠 2-细胞胚胎体外培养 抗氧化作用及冷冻胚胎移植效果研究

Study on the Antioxidant Functions of Three Kinds of Chinese Medicine
effective Constituents on 2-cell Embryos *in vitro culture* and the Effects
of Froze Embryos Transfer on Mouse

研 究 生: 孙玉成

指 导 教 师: 高建明 教授

合 作 指 导 老 师: 王子荣 副教授

申请学位门类级别: 农学硕士

专 业 名 称: 动物遗传育种与繁殖

研 究 方 向: 胚胎生物技术

所 在 学 院: 动物科学学院

新疆·乌鲁木齐

二〇〇六年五月

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得新疆农业大学或其他教育单位的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名: 孙. 2. 27

时间: 2006年 6月 6日

关于学位论文使用授权的说明

本人完全了解新疆农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：新疆农业大学有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子文档，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文，允许论文被查阅和借阅。本人授权新疆农业大学将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以公布（包括刊登）论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名: 孙. 2. 27

时间: 2006年 6月 6日

导师签名: 孙. 2. 27

时间: 2006年 6月 6日

目 录

第一章 文献综述	1
综述一 氧自由基对早期胚胎发育影响的研究进展	2
1.1 自由基的病理作用	2
1.2 自由基与早期胚胎发育	3
综述二 中药抗氧自由基的研究及其在早期胚胎体外培养的应用前景	7
2.1 自由基清除剂与中药	7
2.2 抗氧自由基单味药及其有效成分	7
2.3 抗氧自由基复方	8
2.4 抗氧自由基中药有效成分在早期胚胎体外培养的应用前景	9
综述三 哺乳动物胚胎冷冻及移植的相关概况	12
3.1 胚胎冷冻保存历史	12
3.2 胚胎冷冻生物学原理	12
3.3 胚胎冷冻保存方法	13
3.4 胚胎移植技术的发展及影响因素	14
3.5 体外培养囊胚的意义	15
4 本研究的内容、目的及意义	16
第二章 试验部分	17
试验一 黄芩苷、川芎嗪、小檗碱对小鼠 2-细胞胚胎体外培养抗氧化作用 初步研究	17
1 材料与方法	17
1.1 材料	17
1.2 试验方法	19
1.3 数据处理	20
2 结果	20
2.1 三种中药有效成分对小鼠 2-细胞胚胎体外发育效果与 NO 生成量 变化	20
2.2 三种中药有效成分对小鼠 2-细胞胚胎体外发育效果与 MDA 生成量 变化	21
2.3 三种中药有效成分对体外培养孵化胚胎细胞数目的影响	23
3 讨论	23

试验二 黄芩苷、川芎嗪、小檗碱对小鼠桑椹胚及囊胚冷冻解冻效果影响...	26
1 材料与amp;方法	26
1.1 试验动物	26
1.2 试验仪器设备	26
1.3 药品试剂及溶液配制	26
1.4 试验方法	27
1.5 数据处理	29
2 结果	29
2.1 三种中药有效成分对小鼠 2-细胞胚胎体外培养效果及胚胎冷冻	29
2.2 黄芩苷、川芎嗪、小檗碱对桑椹胚解冻及体外培养效果比较	29
2.3 黄芩苷、川芎嗪、小檗碱对囊胚解冻及体外培养效果比较	30
3 讨论	31
试验三 黄芩苷、川芎嗪、小檗碱对小鼠冷冻胚胎移植效果影响	32
1 材料与amp;方法	32
1.1 试验动物选择与处理	32
1.2 仪器与器械	32
1.3 药品	32
1.4 雄鼠输精管结扎	33
1.5 移植胚胎发育时期与受体母鼠的准备	33
1.6 胚胎移植方法	33
1.7 胚胎移植与观察记录	34
1.8 数据处理	34
2 结果	34
2.1 不同试验组别胚胎移植效果比较	34
3 讨论	35
第三章 结论	36
参考文献	37
附表	45
致谢	48
作者简介	49

中文摘要

本研究主要探讨 mCZB 分别添加黄芩苷 (Baicalin, Bai)、川芎嗪 (Ligustrazine, Lig)、小檗碱 (Berberine, BR) 对小鼠 2-细胞胚胎体外发育抗氧化作用的影响, 并比较各组胚胎冷冻解冻效果及冷冻胚胎移植妊娠率和产仔率等, 以进一步探讨利用三种中药有效成分改善小鼠早期胚胎体外培养微环境、提高体外培养胚胎质量和移植胚胎的发育潜力, 为更好地改进哺乳动物胚胎培养液成分和培养条件提供可借鉴的资料和途径。

试验一: 以 mCZB 添加抗生素为对照组, 分别添加 4 μ g/ml Bai、0.5 μ g/ml Lig 和 0.1 μ g/ml BR 为试验组, 比较各组胚胎孵化率、微滴中一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量及孵化胚胎的细胞数量。结果: 各试验组胚胎孵化率, Bai 组 (80.2%, 81.3%)、Lig 组 (78.9%, 77.6%) 及 BR 组 (76.7%, 71.6%) 极显著高于对照组 (50.7%, 47.8%) ($P < 0.01$)。各组间 NO 含量, 72 h 较 24 h 均有减少, 而 120 h 又均有增加且最高。各组间 MDA 含量, 72 h 和 120 h 与 24 h 比较呈现增加趋势, 除 120h Bai 组, 对照组均高于试验组。孵化胚胎细胞计数结果显示, BR 组、Lig 组和 Bai 组 (87.2 \pm 8.6, 83.9 \pm 7.7, 81.9 \pm 6.2) 与对照组 (77.4 \pm 5.6) 差异极显著 ($P < 0.01$)。表明, 三种中药有效成分均能显著促进小鼠早期胚胎体外发育及胚胎细胞增殖, 并对 NO 和 MDA 含量有一定影响。

试验二: 以试验一为基础, 2-细胞胚胎体外培养至桑椹、囊胚期进行常规冷冻, 比较各组胚胎冷冻解冻效果及两种程序对胚胎冷冻解冻的影响。结果: 冷冻解冻桑椹胚体外培养 8~14 h 囊胚发育率, 程序一中 Bai 组 (65.8%) 显著高于对照组 (48.6%) 和 BR 组 (46.7%) ($P < 0.05$), Lig 组 (81.1%) 极显著高于对照组 (48.6%) 和 BR 组 (46.7%) ($P < 0.01$); 程序二中 Bai 组 (80.6%)、Lig 组 (78.3%) 极显著高于对照组 (55.2%) 和 BR 组 (47.6%) ($P < 0.01$)。冷冻解冻囊胚体外培养 6~8 h 囊胚发育率, 程序一中各组间无显著差异 ($P > 0.05$); 程序二中, 中药有效成分各组间差异不显著 ($P > 0.05$), 但均显著高于对照组 (61.2%) ($P < 0.05$)。两种冷冻程序冷冻效果差异不显著 ($P > 0.05$)。表明, 添加 Bai、Lig 对提高胚胎体外发育质量效果明显, 显著提高了冷冻胚胎发育率。

试验三: 以试验二为基础, 将各组冷冻解冻胚胎培养发育至囊胚期进行子宫移植。结果: 移植妊娠率以 Bai 组 (56.3%)、Lig 组 (52.6%) 和 BR 组 (55.0%) 均高于对照组 (46.2%); 产仔率以 Bai 组 (63.3%)、Lig 组 (67.3%) 和 BR 组 (60.5%), 均高于对照组 (52.8%), 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

综上所述表明: 三种中药有效成份 Bai、Lig、BR 能显著提高小鼠 2-细胞胚胎体外发育质量, 并有利于提高冷冻解冻后移植胚胎的发育潜力。

关键词: 中药有效成分, 早期胚胎, 一氧化氮, 丙二醛, 胚胎移植

Abstract

This study was mainly approached the antioxidation effect of adding *Baicalin* (*Bai*), *Ligustrazine* (*Lig*) and *Berberine* (*BR*) in mCZB respectively on 2-cell mouse embryos *in vitro* culture, and compared the effect of froze-thaw, pregnancy rate and litter rate after embryos transfer etc. in order to further investigate the value of these three Chinese Medicine effective constituents on improving the micro-environment of preimplantation embryos *in vitro* culture on mouse and enhancing the embryo quality and the developmental potential of embryos after embryos transfer, which can provide valuable data and access to enhance the mammalian embryo culture medium composition and culture condition.

The group added antibiotics to mCZB was regarded as the control, while the others supplemented with 0.1 μ g/ml BR, 0.5 μ g/ml Lig and 4 μ g/ml Bai respectively as experiment groups in the first experiment to compare the rates of hatched embryos, the contents of nitric oxide(NO) and malondialdehyde(MDA) in the microdrop, and the cell amount of hatched embryos. As a result, the rates of hatched embryos from the three groups of Bai (80.2%, 81.3%), Lig (78.9%, 77.6%) and BR (76.7%, 71.6%) was significantly higher ($P < 0.01$) than control group (50.7%, 47.8%). The content of NO decreased at 72h as compared with that of 24h in every experiment group, but it increased to the highest point at 120h. As a whole, raise trend was evident for the content of MDA in every group at 72h and 120h, and the content of MDA in the control was higher than that in experiment groups at 120h except for Bai group. According to the cell amount of hatched embryos, the difference between experiment groups (BR(87.2 \pm 8.6), Lig(83.9 \pm 7.7), Bai(81.9 \pm 6.2)) and control group (77.4 \pm 5.6) were extremely obvious ($P < 0.01$). The result showed that these three kinds of Chinese Medicine effective constituents could efficiently promote early embryos development and increase the cell amount of hatched embryo, and the contents of NO and MDA were affected as well *in vitro* culture on mouse.

Based on the first experiment, the second one in which each group were conserved through conventional freezing process from 2-cell embryo *in vitro* culture to the stage of morula and blastocyst was oriented to compare the effects of froze-thaw in each group and the difference between the two methods. The results of morula and blastocyst showed that in the first procedure the development rate of blastocyst cultured for 8~14 hours after froze-thaw in the Bai (65.8%) was superior ($P < 0.05$) to that of the control (48.6%) and the BR (46.7%), and the Lig (81.1%) was significantly higher ($P < 0.01$) than that of the control and the BR (46.7%). In the second procedure, the Bai (80.6%) was significantly higher ($P < 0.01$) than the control (55.2%) and the BR (47.6%) *in vitro* culture. Through analysis of the development rate of blastocyst cultured for 6~8 hours in the first procedure, there was no significant difference ($P > 0.05$) in each group. In the second procedure, there was no significant difference ($P > 0.05$) in each group, but the effect of Chinese Medicine was superior ($P < 0.05$) to that of control group (61.2%) *in vitro* culture. The results indicated there was no significant difference ($P > 0.05$) in the different procedures. Bai and Lig can significantly enhance the development quality of embryos and the development rate of freezing embryos *in vitro* culture.

Based on Experiment two, froze-thaw embryos were cultured to the stage of blastula and then transferred to uterus in experiment three. As a result, the pregnancy rate from the three groups of Bai (56.3%), Lig (52.6%) and BR (55.0%) was higher than that of control group (46.2%), but there was not obvious difference between experiment groups and control group; the birth rate from the three groups of Bai (63.3%), Lig (67.3%) and BR (60.5%) was higher than control group (52.8%), but there was not significant difference either.

These results indicated the three Chinese Medicine effective constituents (Bai, Lig, BR) can distinctly improve the quality of 2-cell mouse embryo *in vitro* culture and be propitious to the developmental potential of embryos following embryos transfer after froze-thaw embryos.

Key words: Chinese Medicine effective constituents, early embryos, nitric oxide, malondialdehyde, embryo transfer

缩 略 词 表

缩略词	英文名称	中文名称
B	Blastocyst	囊胚
Bai	Baicalin	黄芩苷
BR	Berberine	小檗碱
BSA	Bovine serum album	牛血清白蛋白
CAT	Catalase	过氧化氢酶
EDTA-Na ₂	Ethylene diaminetetraacetic acid	乙二氨四乙酸二钠
ET	Embryo transfer	胚胎移植
HB	Hatched blastocys	孵化胚胎
hCG	human chorionic gonadtropin	人绒毛膜促性腺激素
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide	过氧化氢
IU	International unit	国际单位
IVC	<i>in vitro</i> culture	体外培养
Lig	Ligustrazine	川芎嗪
M	Morula	桑椹胚
mCZB	mCZB	mCZB 培养液
MDA	Malondialdehyde	丙二醛
mPBS	modified phosphate buffered saline	改良磷酸盐缓冲液
NO	Nitric oxide	一氧化氮
NOS	Nitric oxide synthase	一氧化氮合酶
O ²⁻ ·	Superoxide anion radical	超氧阴离子
OH	Hydroxyl Radical	羟基自由基
PMSG	Pregnant mare serum gonadtropin	孕马血清促性腺激素
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
SOD	Superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
XB	Expanded blastocys	扩张囊胚

第一章 文献综述

胚胎生物技术是生物工程的核心内容，是主导 21 世纪产业界的尖端技术之一。卵母细胞体外培养、体外受精、核移植、胚胎冷冻、胚胎干细胞培养、转基因动物、基因打靶、动物生物反应器、胚胎性别鉴定及性别控制等都属于胚胎生物技术的范畴。但无论是建立动物模型或是改良动物品种，还是体外受精、建立胚胎库、胚胎移植前的基因诊断及供体胚胎与受体的同期植入，都必须对离体后的胚胎进行体外培养。所以，适宜的体外培养系统是获得优质胚胎的基础条件和有效工具。

人们尽可能的模拟体内胚胎发育环境，满足早期胚胎发育所需条件来建立胚胎体外发育的最佳培养体系，以提高体外培养胚胎的质量，从而提高胚胎移植的效率。但是，要获得更多具有活力的可操作的桑椹胚及囊胚，必须从根本上解决体外培养体系存在的严重缺陷，以提高囊胚发育率、移植妊娠率等。因此，改善体外培养条件，提高体外培养胚胎质量是哺乳动物胚胎体外培养技术研究中必不可少的课题之一，也是胚胎移植技术应用于生产实际的保障，从而提高胚胎生物技术在实际应用中的经济效益。

综述一 氧自由基对早期胚胎发育影响的研究进展

自由基是一种外层轨道上含有未配对电子的原子、原子团或呈特殊状态的分子。机体的正常代谢、中性粒细胞活化耗氧剧增、金属离子氧化还原反应、组织缺血再灌注以及外源性化学和放射作用等过程均易产生自由基，一般分为氧自由基和脂质自由基。其中，氧自由基包括超氧阴离子（Superoxide Anion Radical, $O_2^{\cdot-}$ ）、羟基自由基（Hydroxyl radical, $\cdot OH$ 、 $HO\cdot$ 、 $\cdot HO$ 或 OH ）、一氧化氮（Nitric oxide, NO）、烷氧自由基 $RO\cdot$ 以及烷过氧自由基 $ROO\cdot$ 等。自由基通常非常活泼，寿命极短，一般难以直接检测^[1]。

1.1 自由基的病理作用

细胞膜脂受自由基作用易发生脂质过氧化反应，脂质过氧化可使细胞膜的功能受到破坏，破坏过程中产生的多种活泼自由基将进攻细胞中的酶及其它成分并使之丧失功能，而且产物中的醌类化合物，如丙二醛（malondialdehyde, MDA）等对细胞有毒害作用。自由基不但可使蛋白质变性、影响酶活性，而且可直接作用于核酸使其碱基改变而导致由基因控制下进行的许多过程受到破坏，或使核酸分子断裂，甚至可导致细胞死亡。

1.1.1 氧自由基的生理、病理作用

据估计，人体内总自由基中95%以上属氧自由基。生理情况下，人体内约有1%~5%的分子氧通过多种途径产生氧自由基，其产生与清除处于动态平衡，此时机体所产生的自由基具有重要的生理功能。前列腺素、甲状腺素、凝血酶原及胶原蛋白等的合成，核糖核苷的还原、解毒作用及吞噬细胞的杀菌等过程均有氧自由基的参与。然而，当某种因素使氧自由基生成过多，超出机体的清除能力或清除能力减弱时，过多的氧自由基将通过损伤生物大分子，破坏细胞的结构和功能，促使疾病的发生与发展^[2]。

无论是受精卵的发育，还是已进入多细胞阶段的胚胎发育，都需要在合适的氧浓度下进行，浓度过高或过低都不利于其发育。体外实验和在体实验均表明，胚胎组织的需氧水平较低，但随着发育过程的推进而有所增加，推测低水平的氧更适合于胚胎的正常发育，由氧自由基诱导的细胞功能失调是胚胎体外发育阻滞的重要因素之一。

1.1.2 NO自由基结构及功能

NO是目前在体内发现的最小、最轻、最简单的生物信息分子，是一种自由基性质的物质^[3]。NO带有不成对电子，具有“顺磁性”，其化学性质非常活泼。因此，它能与分子氧、超氧阴离子以及铁、铜、镁等生物活性金属发生反应，几乎存在于所有类型的组织细胞中。NO合酶（nitric oxide synthase, NOS）有3种亚型，分别为神经元型NOS（nNOS）、内皮型NOS（eNOS）和诱导型NOS（iNOS），前两种又称为结构型NOS（cNOS），负责NO的持续基础释放。eNOS属于原生型，具有Ca²⁺依赖性；iNOS仅在细胞因子及细菌脂多糖（LPS）作用下表达^[4]。自NO被发现以来，其研究就迅速扩展到生命科学的各个领域，包括神经生物学、免疫生物学、生理学、病理学、药理学等^[5]。

体内NO由NOS催化L-精氨酸与氧分子经多步氧化还原反应生成。NO具有亲脂性，可透过细胞膜并扩散到临近的靶细胞中，并与细胞中的水溶性鸟苷酸环化酶的亚铁血红素分子中的铁离子结合，激活该酶促使环磷酸鸟苷（cGMP）的产生增多^[6]。众所周知，cGMP是体内重要的第一信使，可产生一系列生理反应。研究表明，cAMP/cGMP比例对胚胎的生长发育和分化具有重要的调节作用。NO刺激鸟苷酸环化酶促使cGMP生成，是cAMP/cGMP比例的主要调节者。因此，正常的胚胎发育需要NO的调节^[7]。

1.2 自由基与早期胚胎发育

早期胚胎发育是指受精后合子进行卵裂，并同时向子宫移动，在特定阶段进入子宫，然后进行定位和附植的过程。早期胚胎在脱出透明带之前一直处于游离状态，尚未同母体建立紧密联系。牛、绵羊和猪的胚胎大约有25%~40%是在精子穿入卵子和附植结束时发生死亡，而且绝大多数的死亡发生在附植前后，结果是孕体完全被吸收。这是由于母体的遗传、营养、年龄、子宫内胚胎过多，激素不平衡和热应激都能导致早期胚胎死亡^[8]。研究表明，母体缺乏VE可造成胚胎发育异常或胚胎吸收，而补充VA、VE、β-胡萝卜素等可降低胚胎死亡率，提高母猪的产仔数，这些物质在体内均有抗氧化的作用^[9]。哺乳动物体外胚胎发育在附植前往往会出现“发育阻滞现象”，老鼠和仓鼠发生在2-细胞时期，称为“2-细胞阻滞”（2-cell block）；绵、山羊发生在8~16-细胞期；奶牛发生在4~8-细胞阶段；猪发生在4-细胞期；而人的体外阻滞发生在4~8-细胞期。研究表明，胚胎体外培养体系中产生的超氧阴离子（O²⁻）、过氧化氢（H₂O₂）及羟基自由基

($\cdot\text{OH}$) 等氧的有毒代谢物将会引起胚胎的异常发育^[10], 因此早期胚胎发育阻滞或延迟与培养过程中遭受氧自由基的损伤有关。

1.2.1 氧自由基与早期胚胎发育

Quinn等(1978)采用不同氧浓度环境进行附植前小鼠胚胎体外培养时发现, 无氧条件下胚胎发育率明显低于有氧条件。当氧浓度在2.5%~5%之间时, 各发育阶段得以发育的胚胎数目最多。超过这个水平, 随着氧浓度增加, 得以发育胚胎的数目直线下降。当培养环境中氧浓度为5%时, 平均98%的胚胎发育成为晚期囊胚。在超过最适氧浓度的培养环境中, 大多数小鼠受精卵发育终止于2-细胞阶段。结果表明, 体外培养的小鼠附植前胚胎发育的最适氧浓度为2.5%~5%, 而且胚胎在1~2-细胞期比8-细胞期和桑椹胚期对氧浓度更为敏感^[10]。其机理可能是非生理性的氧可与许多可溶性细胞成分如氢醌、儿茶酚胺、黄素等反应生成氧自由基; 高浓度氧还可能使糖原合成和分解之间的平衡失调, 葡萄糖代谢紊乱, 则能通过磷酸戊糖旁路产生的NADPH而形成自由基。自由基损伤造成的胚胎细胞膜脂质过氧化和线粒体的结构异常是胚胎发育终止的一个重要原因^[11]。Laloraya等(1989)用电子自旋共振的方法对早期胚胎发育过程中产生的活性氧进行了研究^[12]。Nasr-Esfahani等(1990)发现未受精卵 H_2O_2 水平很低, 但由刚从小鼠生殖道冲取的受精卵到8-细胞期而逐渐升高; 在体外培养过程中, 2-细胞中期胚胎的 H_2O_2 水平升高, 但进入4-细胞期后又降低。在那些发生2-细胞阻滞品种小鼠胚胎的 H_2O_2 水平也升高, 而且胚胎细胞质中缺乏保护性的酶如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等, 所以不能清除其发育过程中产生的活性氧^[13]。Noda等(1991)研究表明, 在ICR系小鼠胚胎的培养基中加入6100IU/ml的Cu、Zn-SOD, 可促使其克服2-细胞阻滞, 并使胚胎发育至囊胚的比例从4%提高到64%^[14]。Li等(1993)也发现5% CO_2 、95%空气的环境下, 在不含大分子的兔胚胎培养基中加入牛磺酸、SOD等抗氧化剂可显著提高从受精卵发育至囊胚的比例^[15]。而Payne等研究表明SOD只对某些品系的小鼠胚胎起作用, 而对另外一些品系的小鼠胚胎无效^[16]。Thomas等(1997)发现囊胚在孵出前后的短暂时期内产生了大量的活性氧自由基, 他们认为这种程序化的氧自由基爆发(programmed oxyradical burst)引起了小鼠囊胚的孵出, 超氧阴离子在透明带的潜在作用位点可能是维持这层蛋白包被完整性的配糖键^[17]。

1.2.2 NO自由基与早期胚胎发育

动物早期胚胎的发育是个体发育的重要阶段，其发育过程受到体内各种因素的调节和影响。近年来，研究者们对NO在胚胎发育过程中可能产生的生理调节作用做了大量的研究。

1.2.2.1 NO自由基对早期胚胎发育的调节

Kuo等（2000）在Nature报道，海胆的精子在发生顶体反应后NO及NOS浓度显著升高，卵子在受精后数秒钟亚硝化作用显著升高并先于受精作用所引起的钙波。向未受精卵胞浆中注射能产生NO的硝普钠（SNAP）或重组NOS，均可导致卵子的激活。他们认为，NOS及NO相关的生物活性是卵子活化的充分必要条件，可作为卵子活化的首要标准^[18]。

Novaro等（1997）发现胚胎附植前子宫组织中Ca²⁺依赖性NOS逐步增加，而iNOS仅在附植启动时增加，附植时两种NOS活性均下降，而用雌激素（E₂）的拮抗剂他莫西芬（Tamoxifen）处理后两种NOS活性均下降。因此子宫内NOS的活性可能受雌激调控。子宫角注射NOS的竞争性抑制剂L-NAME，该侧子宫角内附植的胚胎数目减少了50%^[19]。Duran-Reyes等（1999）采用宫角注射NOS抑制剂L-NA的方法，发现注射侧子宫角的附植位点比对照组少了34.7%，妊娠第19d注射侧子宫角无胚胎存活，而对侧的存活率为74.4%，而且注射侧cGMP的浓度下降^[20]。

Gouge 等研究表明，妊娠第1d~第4d的胚胎均产生了NO，当2-细胞期后的胚胎在含有NOS竞争性抑制剂L-硝基-精氨酸（L-NA）的培养液中进行培养时，其发育到相应的后一个时期的比例明显低于对照组^[21]。Abe等（1999）用反转录PCR（RT-PCR）的方法在附植前各个时期的胚胎均检测到了神经型NOS（nNOS），并观察到了与Gouge等类似的现象^[22]。

Athanassakis等（2000）研究胚胎毒素性因子（IFN- γ 、TNF- α 或LPS等）对胚胎发育影响时，发现NO浓度显著升高，他们猜想NO在早期胚胎死亡中起重要作用^[23]。NO参与早期胚胎发育，适量浓度NO是正常胚胎发育所必需的，当其失衡时则导致胚胎发育阻滞或胚胎的凋亡^[24-25]。

1.2.2.2 NO 自由基对早期胚胎附植的调节

Purcell 等报道了小鼠附植期 NOS 的表达时间与位置。与非附植位点相比,妊娠第 6d 附植位点 iNOS 水平显著增加,且此种增加持续到第 8d。eNOS 与 iNOS 相似,但峰值出现在第 6d 和第 8d。iNOS 定位于蜕膜处、子宫肌层血管的周围及外胎盘锥内。eNOS 位于邻近胚胎的初级蜕膜区的血管内。nNOS 主要位于子宫系膜及子宫肌层,在整个围附植期无变化。在附植过程中,附植位点 iNOS 及 eNOS 的表达说明 NO 可能在附植过程中起重要作用^[26]。

Farina 等报道了在妊娠大鼠子宫中 IL-1 α 能够增加 NO 及前列腺素的合成;用 NOS 抑制剂 NMMA (NG-monomethyl-L-arginine), iNOS 抑制剂氨基胍 (aminoguanidine) 及 COX-2 抑制剂 NS-398 处理大鼠,能够消除 IL-1 α 对前列腺素合成的效应。这说明子宫肌层产生的 IL-1 α 调节 NO 的产生,NO 的一个可能作用是调节 PGE 的产生^[27]。

胚胎发育不良或子宫环境不适宜均可导致附植失败。因为胚泡附植的发生既决定于胚泡的主动性,也决定于子宫内膜是否做好准备,它们必须保持同步,才能使胚泡的附植顺利进行^[28]。Biswas (1998) 等报道,将 L-NAME 注入妊娠 2d、3d、5d 的小鼠子宫内,第 8d 处死所有小鼠时发现:L-NAME 使妊娠 3d 和 5d 的鼠妊娠终止,胚胎发育受阻,不能终止妊娠 2d 的鼠,但与对照组相比,胚胎附植点大大减少^[29]。而将 L-NAME 与 SNP 共同注入小鼠子宫则不能终止妊娠,与对照组相比,附植点没有什么差别,这说明 L-NAME 的作用可通过 SNP 来逆转。另外,附植是否成功,子宫的环境起着重要的作用,附植前子宫 NOS 活性明显增加,附植发生时附植点子宫组织中 iNOS 的含量也显著上升^[30],这说明 NO 参与子宫微环境的建造。Gouge 等 (1998) ^[21] 在小鼠附植前胚胎中检测出 iNOS 和 eNOS,产生的 NO 作为对子宫的信号之一,刺激局部血管舒张并且增加毛细血管的通透性,为成功的附植创造条件。实验证明,阻碍 NO 产生,将导致胚胎附植失败。

综上所述,自由基的生理学作用和胚胎毒性作用不容忽视,探讨胚胎体外培养过程中氧自由基的生成及变化意义重大,它将为改善哺乳动物早期胚胎体外培养微环境,更好地改进胚胎培养液的成分和培养条件,提高胚胎质量和移植胚胎的发育潜力提供可借鉴的资料。

综述二 中药抗氧自由基的研究及其在早期胚胎体外培养的应用前景

目前, 中药抗氧化剂的研究日趋活跃。研究表明, 很多中药能提高机体内抗氧化酶活性, 减少氧自由基对机体的损伤, 减少脂质过氧化物 (LPO) 和丙二醛 (MDA) 的产生。而且与人工合成的抗氧化剂相比较, 中药抗氧化剂具有经济、低毒等明显的优点。

2.1 自由基清除剂与中药

自由基既是损害机体、导致疾病、促使衰老的重要因素, 又是机体无法回避的代谢产物。凡能和自由基反应使之还原成非自由基的化合物称为自由基清除剂。具有还原性, 可抑制启动自由基链反应, 阻止自由基反应传播, 终止自由基反应的化合物称为抗氧化剂。机体内清除自由基主要依赖的酶系统与非酶系统。非酶类抗氧化剂, 如: 胡萝卜素类、VC、VE、GSH 及锌、硒、铜、锰等微量元素; 而酶类抗氧化剂, 如: SOD、CAT、GSH-px 等。它们的主要作用是使自由基产生与清除之间保持平衡、直接提供使自由基还原的电子、增强 SOD 的活性等, 以利自由基的清除。

“正气存内, 邪不可干”、“邪之所凑, 其气必虚”。无论是外源性还是内源性的抗氧化剂都必须通过机体内氧化还原链才能实现其生理功能或药理作用。若要保持健康的机体, 延长生命的有效过程, 就必须维护机体内环境的协调, 并能新的水平上建立新的阴阳平衡。因此, 维护机体内环境的协调, 首先可以运用中医药燮理自由基与 SOD 的平衡, 保持 SOD 的活性状态; 其次可调动 SOD 活性效价, 增强清除自由基毒性的作用; 再次可以通过中药对机体非酶系统的增强作用, 以对抗自由基对机体的毒性损伤^[31]。

2.2 抗氧自由基单味药及其有效成份

2.2.1 黄酮类 Robak 等在比较氯丙嗪等非黄酮抗氧化剂和七种黄酮类化合物的抗氧化作用时, 发现它们都能有效地抑制鼠肾微粒体 MDA 的生成, 对于酶和非酶体系产生的超氧阴离子, 后者有很强的清除作用 (其中以槲皮素、杨梅黄酮、芦丁作用最强) 而前者没有明显清除作用, 推论它们的抗氧化作用主要是通过作用于自由基链式反应的中间

产物（如羟基自由基）实现的^[32]；Husain 等人证实了十二种黄酮类化合物对羟自由基的清除作用，并推论只有其 B 环上的羟基被取代时才具有此作用^[33]，芦丁、黄芩苷、茶多酚对羟自由基引起的 DNA 化学发光有强抑制和延迟作用；从抑制强度来看，三者的 IC50 值分别为 $4.5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $7.9 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $2.4 \times 10^{-5} \text{M}$ 对羟自由基引起的质粒 DNA 损伤也有保护作用，表现为电泳图谱上超螺旋 DNA 增加而开环状 DNA 减少^[34]。

2.2.2 酚类及其衍生物 1mg 茶多酚对 O_2^- 清除作用相当于 $9 \mu\text{gCu-ZnSOD}$ ^[35]；从当归、川芎根茎中提出的阿魏酸 $5.1 \times 10^{-3} \text{M}$ 时能使大鼠脑匀浆 LPO 形成减少 70.9%^[36]，此外还有丹皮酚、单宁、五味子酚等酚类物质都具有类似作用。

2.2.3 多糖类 詹皓等观察到枸杞子多糖可明显抑制物理（ γ 射线等）应激引起的大鼠肝脾 LPO 上升^[37]；波叶大黄可增加 1 月龄小鼠红细胞和脑组织中 SOD 的活力，降低肝组织中 LPO 和心肌中 LF 的含量^[38]，此外还有茯苓多糖、银耳多糖、黄芪多糖、银杏叶外种皮多糖等都显示出不同程度的抗氧自由基能力。

2.2.4 皂苷类 研究表明，人参总皂苷能清除和抑制脂质过氧化，人参芦头总皂苷、茎叶总皂苷、人参果总皂苷可明显减少老年大鼠脑、心肌中脂褐质的生成并提高血中 CAT 的活性^[36]；三七总皂苷明显减少脊髓损伤大鼠伤区组织中 MDA 的生成（ $P < 0.01$ ），与 DMSO 组（抗氧化阳性对照）相近，抑制 SOD 活力降低（ $P < 0.01$ ）^[39]，此外还有绞股蓝皂苷、柴胡皂苷、甘草次酸等一些四环或五环三萜类皂苷也有类似作用。

2.2.5 其它 脑缺血大鼠腹腔注射粉防己碱 20、40、100mg/kg，均可升高其嗜中性血细胞内 SOD 活性，减少超氧阴离子的生成^[40]；红参中的麦芽醇可抗红细胞自氧化及外源氧化剂对红细胞的损伤，并可激活体内抗氧化酶类，增加谷胱甘肽含量^[36]。

2.3 抗氧自由基复方

遵照中医辨证论治规律用药，利用中药方剂具备全方位、多功效的特点，以期对抗自由基是值得关注的。

黄连解毒汤由黄连、黄柏、黄芩、栀子四味药组成，为清热解毒的代表方。体外给药能明显抑制红细胞自氧化或 H_2O_2 所致红细胞溶血，并抑制小鼠肝匀浆自发性或

Fe²⁺-VC 诱发的脂质过氧化反应。对 H₂O₂ 所产生的羟自由基亦有直接的清除作用，对血细胞和组织细胞具有膜保护作用^[41]。

以四君子汤（人参、茯苓、白术、甘草）为代表的补气方和以四物汤（熟地、当归、白芍、川芎）为代表的补血方均有清除自由基，提高血浆 SOD 活性和降低血浆、肝、脑组织 LPO 的作用^[42]；复方向首乌制剂能降低大鼠完整红细胞膜的荧光偏振度及微粘度值，从而增加膜的流动性，其作用与 VE 相似^[43]。此外，如传统抗衰老中药清宫寿桃粉、复方西洋参、八味丹坤汤等许多复方药都与自由基的清除密切相关。

2.4 抗氧自由基中药有效成分在早期胚胎体外培养的应用前景

胚胎代谢过程产生的活性氧能改变细胞内的一些分子，对胚胎的发育有阻滞或延迟效果。生理情况下，胚胎细胞存在多种抗氧化作用的机制。卵泡或生殖道内有牛磺酸、次牛磺酸以及 VC 等物质，这些非酶性物质对胚胎发挥外部抗氧化效应。细胞内抗氧化作用主要通过一些抗氧化酶来实现的，卵母细胞及胚胎细胞内都有 SOD、CAT 和 GSH-px 等，这些物质对胚胎的正常发育是不可缺少的^[44]。也就是说，体内过量的自由基可用各种抗氧化剂加以清除。

2.4.1 早期胚胎的抗氧化系统

体内抗氧自由基的防御系统可分为酶促系统和非酶促系统，它们清除体内的自由基以维持生理平衡使机体免受伤害。

SOD、CAT 和 GSH-px 属于胚胎抗氧化酶系统。1968 年 Mccord 与 Fridovich 等发现了清除氧自由基的超氧化物歧化酶（SOD）。SOD 在生物体系中普遍存在，是需氧生物抵抗氧化损伤的重要酶之一，现已公认 SOD 是清除自由基的主要物质之一。由于 SOD 所含金属离子的不同，可分为 4 种即 Cu、Zn-SOD、Mn-SOD、Fe-SOD 和 EC-SOD，另外还发现有 Ni-SOD 的存在^[45]。Umaoka 等研究了氧浓度及 SOD 对早期胚胎发育的影响，结果表明：在 5% 的氧浓度环境中，当不加 SOD 时，囊胚发生率为 28.5%；当加入 SOD（500mg/ml）时，囊胚发生率可达 75.2%。在正常大气压环境下（氧浓度为 20%），不加 SOD 时囊胚发生率只有 1.5%；当加入 SOD（50mg/ml）时，囊胚发生率可达到 31%，这说明了体外胚胎在发育早期对氧极其敏感，在高氧条件下加入 SOD 可消除损害^[46]。

研究表明, 活性氧参与 2-细胞阻滞而且能损害输卵管中的 SOD, 而 SOD 具有保护输卵管免受氧自由基损害的作用。Jenkinso 等将着床后大鼠胚胎与黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶共同培养, 发现出现死亡, 生长迟缓和畸形。然而, 若在体外培养体系中加入 SOD、CAT 和高浓度的 GSH-px, 可明显抑制胚胎毒性发生, 表明胚胎毒性与 ROS 有关。SOD、CAT 和 GSH-Px 是很好的抗氧化剂对早期胚胎的正常发育起着非常重要的作用。

VE、VC、尿酸、褪黑素 (MLT) 和 GSH 等小分子属于胚胎抗氧化非酶促系统。维生素 E 又称生育素或抗不育因子, 它是动物体内主要的脂溶性抗氧化剂, 其生物学功能是抗氧化作用。脂溶性 VE 和水溶性的维生素协同作用时, 抗氧化能力更高。研究表明, 母体缺乏 VE 可造成胚胎发育异常或胚胎吸收, 而补充 VA、VE 和 β -胡萝卜素等, 可降低胚胎的死亡率, 提高母猪的产子数, 这些物质在体内均有抗氧化的作用^[47]。MLT 作为一种古老的生物信息分子, 在动物体内分布广泛。近年来, MLT 的抗氧化作用已引起了人们的普遍关注。研究发现 MLT 不仅能直接中和 \cdot OH 和过氧化氢, 还能通过激活 GSH-px, 抑制 NOS 的活性, 起到间接的抗氧化作用, 是目前已知的抗氧化作用最强的自由基清除剂, 它的抗氧能力是 VE 的 2 倍。MLT 有利于受精和早期胚胎的发育^[48]。

2.4.2 抗氧自由基中药有效成分进行胚胎体外培养的可行性

随着动物繁殖技术、胚胎生物工程研究的迅速发展, 人们对早期胚胎发育与微环境、自身代谢特征等方面的认识在不断深入。目前, 普遍采用改变培养液的成分、改善培养的条件和方法来提高囊胚发育率, 并建立了体细胞与胚胎共培养体系以及各种生长因子的利用。这样虽然提高了克服阻断的成功率, 胚胎的质量也得到了相应的提高, 但还是无法从根本上解决培养系统存在的缺陷, 囊胚率及囊胚质量仍然很低。因此, 为了解决胚胎体外发育受阻等现象的发生, 根据不同发育阶段营养和代谢特征的不同建立起一些适宜胚胎体外生长发育的培养系统及选择一种较好的培养液和培养条件, 以寻找新的途径和方法改善胚胎体外培养的微环境和调控胚胎发育势在必行。

近年来, 中草药以其低毒、无抗药性、相对安全、不良反应少等特点被广泛的应用于医药、饲料、化妆、食物等领域。其中, 中药制剂对 cAMP 的影响^[49-50]、抗氧自由基^[51-52]、保胎^[53]、促精子活力^[54]等方面的研究显示出其能从整体上、多靶点、全方位改善机体生理状况的药理特点。邸冉等(2004)^[55]和傅文栋(2005)^[56]将中药有效成分用于胚胎的体外培养的相关研究已经发现其对胚胎发育具有一定的促进作用。

根据动物胚胎体外培养微环境的不足来看，有些中药恰好具备弥补这些不足的优势，另外还有更多的有益之处，但其具体药理机制较为复杂。从所查阅到的文献看，有关中药及其有效成分运用于小鼠胚胎体外培养等方面影响的研究国内外相关报道甚少。若将具有抗氧自由基作用的中药有效成分应用于调控小鼠胚胎体外培养微环境，发挥其有利于早期胚胎发育的作用，便能为提高囊胚发育率和胚胎质量开辟一条新的途径。

综述三 哺乳动物胚胎冷冻及移植的相关概述

胚胎冷冻保存是胚胎移植技术真正走向商业化生产的关键因素之一，而如何提高胚胎移植效率，既是解决人类不育问题的关键，又是加速畜牧业品种改良、扩大种群及推动畜牧业发展的途径之一。因此，胚胎冷冻保存和胚胎移植在保护动物遗传资源，挽救濒临灭绝的野生动物等方面也起着重要的作用，且对实验动物学研究和生命科学研究有着重要的意义。

3.1 胚胎冷冻保存历史

1949年英国科学家 Polge 和 Smith 等在偶然的情况下，发现低温保存精子时加入甘油，可以增加精子的活力，揭开了低温生物学发展的里程碑^[57]。受此启发，Smith 又用甘油作为防冻剂，将 600 枚 1-细胞兔胚胎分别于-79℃、-160℃、-196℃的条件下低温冷冻，经解冻后培养，结果有 6 枚胚胎发育^[58]。后来，Whillingham 等^[59-60]报道小鼠胚胎在-196℃和-269℃条件下冷冻保存获得成功，而后又在牛（Wilmot & Rowson, 1973），绵羊（Willadsen, 1976）、山羊（Bilton & Moor, 1976）、马（Yamamoto, 1982）、猪（Hayashi et al, 1989; Kameyama, 1990）等实验动物以及羚羊、狗、狒狒、猴和人等方面获得成功，并得到移植后代^[61]。1983年首例人（Trounson & Mohr）的胚胎冷冻保存后，复苏移植也取得了成功。

随着冷冻生物学研究的深入，胚胎冷冻主要围绕低温保护剂、冷冻方法、解冻方法等方面进行研究，所有程序和方法都试图通过防止胚胎在冷冻和解冻过程中形成细胞内冰晶，来减小冷冻和解冻过程对细胞造成的物理损伤。目前胚胎冷冻技术的研究正向着进一步简化冷冻程序的方向发展^[62]。

3.2 胚胎冷冻低温生物学原理

生物细胞在水溶液中冷却时，其温度通常先降至细胞和培养液的冰点以下，而后发生冻结，即细胞和培养液均处于过冷状态。大多数情况下，细胞的过冷程度比周围溶液更深，冰晶首先在细胞外液形成，此时冰晶与溶质分离使细胞外液未冻结的部分溶液浓度升高，从而使细胞外液的渗透压增加，导致细胞内水分向外渗透，细胞脱水，发生“溶

液效应”。细胞解冻时则发生方向相反的溶液效应，冰晶首先在细胞外液中融化，从而使细胞内液的渗透压增加，导致水分由细胞外向细胞内渗透。如果降温足够慢，细胞长时间处于高渗环境中，则会对细胞产生渗透性休克，此时可通过脱水来维持细胞内外环境的渗透压平衡；如果降温过快，细胞内水分来不及移至细胞外，从而在细胞内形成冰晶，胞浆内冰晶形成过多会破坏细胞器，刺破细胞膜，最终导致细胞死亡。通过冻前在稀释液中加入一定浓度的低温保护剂，使细胞在保护剂中平衡并适当脱水，将损伤降到最低限度。胚胎细胞内水分含量达 80%以上，在冷冻过程中约有 90%的水分形成游离水，而游离水在低温下易形成冰晶。细胞内冰晶可破坏蛋白质的硫氢键，发生不可逆变化，导致细胞死亡。一般胚胎在冷冻过程中不可避免要形成细胞内冰晶，但只要不形成大冰晶，而是维持微晶(冰核)状态，细胞将不受伤害。胚胎在冷冻过程中，大约在 -10°C 以上细胞内不结冰，但处于过冷状态的胞质产生溶液效应和细胞内外化学势差异，导致胞质水分在胞内和胞外冻结，这两种情况谁占优势对细胞存活尤为重要。当温度降到 -10°C 以下，过冷胞质就形成冰晶。胚胎在冷冻和解冻过程中必须分别通过易形成冰晶的致死温区($-15^{\circ}\text{C}\sim-50^{\circ}\text{C}$)，减少降温和复温过程中胞内大冰晶的形成及溶液效应是胚胎冷冻保存的关键环节。胚胎冷冻前，将胚胎在可渗透性保护剂(如甘油、乙二醇等)中平衡一段时间，使其渗透至细胞中，一方面使细胞内溶质含量增加，冷冻时可减少细胞内外渗透压变化，改变细胞膜对水的通透性，从而削弱溶液效应和渗透压差异；另一方面由于细胞内溶质浓度升高，可减少甚至避免冷冻时胞内大冰晶的形成，从而保护胚胎细胞。因此，需要对胚胎进行冷冻前处理，使胚胎在冷冻前脱水，减少大冰晶的形成和冰晶的数量，从而获得较高的存活率。胚胎常规冷冻保存法通常是在胚胎脱水前先诱导结晶，然后缓慢降温脱水，解冻时快速复温到常温。

3.3 胚胎冷冻保存方法

常规冷冻(conventional freezing)又称程序控制冷冻(standard controlled freezing)。冷冻程序一般为:以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 从室温降到植冰温度,平衡10min左右植冰(人工诱发结晶)。再平衡10min左右,以 $-0.1\sim-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 下降到 $-30\sim-35^{\circ}\text{C}$,然后投入液氮中保存。植冰温度一般以($5.0\sim5.3^{\circ}\text{C}$)为宜。

玻璃化冷冻首先由 Fahy GM (1985) 报道成功^[63], 其关键是胚胎在玻璃化液中的脱水, 防止可使胚胎致死的冰晶的形成。此技术很大程度上简化了冷冻程序, 操作简单, 现已得到较为广泛的应用, 但此法对胚胎的毒性较大, 现正处在逐步完善之中^[64]。

两步冷冻法是将胚胎在室温下在由渗透性和非渗透性保护剂组成的冷冻液中平衡脱水 10~20min, 然后降温到-20~-60℃。平衡一段时间后, 直接投入液氮中保存。两步冷冻溶液大部分仍维持非冻结状态, 晶体与非晶体混合存在, 从-40℃到投入液氮这一个过程中胚胎内不形成冰晶, 因此可对胚胎起保护^[65]。

3.4 胚胎移植技术的发展及影响因素

胚胎移植 (embryo transfer, ET) 是胚胎生物工程中的一项重要的技术, 是体外受精、制作嵌合体动物、转基因动物和克隆动物等所必须的环节。哺乳动物胚胎移植技术的研究已有一百年的历史。英国学者 Heape (1890) 首次将安哥拉兔的受精卵移植到比利时兔的输卵管内并得到 2 只仔兔。随后人们在山羊 (1932)、大鼠 (1933)、绵羊 (1933)、小鼠 (1942)、奶牛及猪 (1951) 也都相继获得成功。20 世纪 60 年代, 以牛为主的胚胎移植技术发展迅速, 从供体的超数排卵、胚胎采集和移植方法等关键技术环节都取得了令人鼓舞的成果^[66]。1971 年成立了第一个商业胚胎移植公司, 1974 年, 国际胚胎移植协会 (IETS) 成立^[67]。1978 年诞生的试管婴儿为人类生殖的自我调控开创了新纪元。与此同时, 人们已经开始注意到从生理学角度研究胚胎的发育、代谢、受胎等条件和环境。现代生殖技术涉及到对种质细胞—精子、卵和胚胎在体外进行细胞或遗传水平的操作, 再通过胚胎移植产生人们所需要的个体乃至群体。从 20 世纪 80 年代开始, 胚胎移植技术进入产业化发展阶段, 主要用于奶牛的生产, 目前运用超数排卵技术处理一头供体牛平均可获得 6 枚可用胚胎, 鲜胚的移植妊娠率为 60%~65%, 冷冻胚胎为 45%~55%。80~90 年代开始也应用于超细毛羊、优质肉羊品种的培育与扩群^[66]。人类用小鼠进行发育生物学研究, 包括胚胎的发生、发育、突变基因的研究、转基因动物的研究、基因打靶技术及小鼠胚胎冷冻种子库技术等涉及胚胎体外操作的各种研究, 均需要进行胚胎移植技术^[68]。

胚胎移植后, 受体动物妊娠的建立是多因素综合作用的结果, 是一种高度进化和完善的生理过程。影响移植后妊娠是否成功因素较多, 如胚胎发育阶段与受体生理状态的

同步性，胚胎移植的数目，胚胎质量，受体动物的健康状况，胚胎的移植技术以及子宫的内环境和动物的应激等。但目前认为影响胚胎移植的三个关键因素为：胚胎的质量、受体的生理状态以及胚胎移植的操作技术。因此这些都属于动物生物工程和生殖生物学研究的重要内容。

3.5 体外培养囊胚的意义

囊胚形成是胚胎早期发育过程中一个重要阶段，囊胚培养对于胚胎的着床前诊断、冷冻保存和分离内细胞团用于人类胚胎干细胞研究都有重要意义。囊胚培养不但为分裂期胚胎活检及植入前遗传学诊断提供了充足的时间，而且滋养层细胞还为活检提供了较多的细胞来源，活检滋养层细胞并不会对胚胎造成损伤，从而避免了活检对胚胎发育的不利影响^[69]。

研究证明，发育至囊胚期的胚胎在移植入子宫后更易于在母体内着床和后期的发育^[70]。胚胎能否发育至囊胚与其自身的基因有关，当胚胎没有发育潜能或携有异常的基因时，在培养至囊胚的过程中可因自身发育异常被自然淘汰，只有质量最好的胚胎才能发育至囊胚期^[71]。囊胚移植入子宫腔后缩短了胚胎进一步发育与着床之间的间隔，也减少了母胎相互间某些不利因素的影响。因此在生殖医学上可使在保持相同甚至更高妊娠率的前提下，通过囊胚移植减少移植胚胎的数目，从而减少多胎妊娠^[72]。国外许多 IVF 中心已将此作为常规技术进行应用，国内近年来也有少数实验室开展了这项研究。

综上所述，有效地提高体外培养囊胚质量、冷冻保存效果及冷冻胚胎移植效率，将为解决人类不育问题及加速推动畜牧业发展作出重大贡献。

4 本研究的内容、目的及意义

本研究通过观察和比较小鼠 2-细胞胚胎体外培养发育率、胚胎细胞数量以及培养液中 NO 和 MDA 含量，探讨黄芩苷 (Baicalin, Bai)、川芎嗪 (Ligustrazine, Lig)、小檗碱 (Berberine, BR) 对胚胎体外发育和胚胎细胞增殖的作用、抗氧化作用及自由基对体外胚胎发育的影响；并通过比较各培养组别胚胎的冷冻效果及冷冻解冻培养至囊胚的移植妊娠率、产仔率等进一步检验各组胚胎体外发育的质量。以期改善小鼠 2-细胞胚胎体外培养微环境，提高体外培养胚胎质量和移植胚胎的发育潜力，为更好地改进哺乳动物胚胎培养液成分和培养条件提供可借鉴的资料和途径。

第二章 试验部分

试验一 黄芩苷、川芎嗪、小檗碱对小鼠 2-细胞胚胎体外培养抗氧化作用初步研究

早期胚胎体外培养是胚胎生物技术、发育生物学等研究领域的重要基础条件和关键环节之一，建立稳定、可靠的体外培养系统是当前这一领域的重要研究课题。培养过程中培养液成分、浓度以及培养条件的不适将引起早期胚胎发育阻断和发育不良，其代谢产生的自由基及一些未知因素会对胚胎生存的微环境产生一定影响，进而影响胚胎发育的质量。NO 自由基是影响胚胎正常卵裂不可忽略的因素之一^[73-74]。目前，利用中药在动物繁殖中治疗不孕症、流产、保胎及促进精子活力等方面作用突出^[75-77]，中药抗脂质过氧化效应、自由基清除作用和促进细胞增殖方面的研究也屡见不鲜^[78-80]。鉴于中药抗氧化及促细胞增殖方面的研究进展及中药有效成分能多靶点、全方位改善机体生理状况等药理特点，并基于本实验室前期研究结果^[81-82]，本实验以小鼠 2-细胞胚胎为材料，通过添加黄芩苷 (Baicalin, Bai)、川芎嗪 (Ligustrazine, Lig)、小檗碱 (Berberine, BR) 三种中药有效成分，观察体外培养效果、检测体外培养中 NO 及 MDA 含量，从而探讨中药有效成分对胚胎体外发育和细胞增殖的作用，及其抗氧化作用和自由基对体外培养胚胎发育的影响，以改善小鼠早期胚胎体外培养微环境，提高其胚胎发育率，为建立完善的哺乳动物早期胚胎体外培养体系提供可借鉴的资料和途径。

1 材料与方方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 健康、性成熟的 ICR 品系 SPF 级（无特定病源）小鼠（购自北京实验动物中心），雌鼠体重 23~34 g，雄鼠体重 33~35 g。

1.1.2 主要仪器设备

CO ₂ 培养箱	SANYO, MCO-15A
电热恒温板	广州市富家电器厂, KH-P331
体视显微镜	MOTIC, M-400(H)
倒置显微镜	OLYMPUS, IX71
超洁净工作台	苏州净化设备公司产品, YJ-875SA
MILIQ 纯水器	Milipore, 基础型
紫外分光光度计	上海第三仪器厂, 756 型
分光光度计	Unico, Unico2000
4℃冰箱	海尔电冰箱厂, BCD-289BSW
-20℃冰柜	海尔集团青岛电冰柜总厂, BD-200A
精密电子天平	ACCULAB, ALC-110.4
培养皿	丹麦 NUNC 公司, Ø=35mm×10mm
滤膜	上海医药工业研究院, 22 μ m
移液器	Germany BRAND / France GILSON, 各种规格
加压塑料小滤器	国产, 针头式
无菌移卵吸管	自制

1.1.3 主要试剂及溶液配制

1.1.3.1 药品试剂

小檗碱(Berberine, BR)	纯度≥97%
黄芩苷(Baicalin, Bai)	纯度≥97%
川芎嗪(Ligustrazine, Lig)	纯度≥99%
孕马血清促性腺激素(PMSG)	天津试验动物中心, 20040329
人绒毛膜促性腺激素(hCG)	宁波市激素制药厂, 040601
氯化钠 (NaCl)	北京化工厂, 981030, A.R.
氯化钾 (KCl)	北京双环化学试剂厂, 960330, A.R.
磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	北京红星化工厂, 850228-1, A.R.
结晶氯化钙 (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	浙江省兰溪城南化工厂, 961030, A.R.

结晶硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	广东汕头市西陇化工厂, 030208, A.R.
碳酸氢钠 (NaHCO_3)	北京市化学试剂厂, 950213, A.R.
丙酮酸钠 (Sodium Pyruvate)	GIBCOBRL, 1013865
乳酸钠 (DL-Lactic acid)	Sigma, 16H50495
牛血清白蛋白 (BSA)	Sigma, BP0024
谷氨酰胺 (L-Glutamine)	GIBCOBRL, 2AP4171
葡萄糖 (Glucose)	北京化工厂, 20030325, A.R.
青霉素 (Penicillin)	Sigma, BAO945-3
硫酸链霉素 (Dihydrostreptomycin)	Sigma, BA0920
mPBS	GIBCOBRL, 450-1500EA
矿物油 (Minoral Oil)	Sigma, M8410
乙二氨四乙酸二钠 (EDTA-Na_2)	Sigma, BH0054
牛磺酸	Sigma, BS0012
酚红	军事医学科学院, A.R.
MDA 试剂盒	南京建成

1.1.3.2 溶液配制[见附表 1, 2]

1.2 试验方法

1.2.1 超排及收集胚胎 参照前文^[83]选择间情期和发情前期的雌性小鼠, 腹腔注射 PMSG, 间隔 48 h 再注射 hCG 并与公鼠 1:1 合笼。于注射 hCG 后 46 h 处死见栓鼠, 体视显微镜收集 2-细胞胚胎。

1.2.2 试验组别 以 mCZB^[84]为基础液, 添加青霉素 (0.006g/100mL) 和链霉素 (0.007g/100mL) 为对照组, 分别添加 BR (0.10 $\mu\text{g/ml}$)、Lig (0.50 $\mu\text{g/ml}$) 和 Bai (4 $\mu\text{g/ml}$) 为中药试验组; 入胚后 24 h 和 72 h 换液时, 每组培养液中均加入葡萄糖 (0.1g/100mL)。

1.2.3 胚胎培养 100 μl 微滴, 覆以矿物油, 在 5% CO_2 、95%空气及 37 $^\circ\text{C}$ 饱和湿度的 CO_2 培养箱中平衡 ≥ 2 h, 10~15 枚/滴入培。入培后 24 h、72 h 换液, 每间隔 24 h 观察 (倒

置显微镜)记录胚胎发育情况直至培养 120h 结束。

1.2.4 NO测定 采用Griess试剂法,参照文献^[21,85]稍加改进后,以Unico2000分光光度计 550nm条件下分别检测24 h、72 h及120 h培养液吸光度,重复5次。

1.2.5 MDA 测定 分别于 24 h、72 h 和 120 h 收集各组培养液,按 MDA 试剂盒要求,使用 756 型紫外分光光度计测定吸光度,共 5 次重复。

1.2.6 胚胎细胞计数 将胚胎置于 0.5 %柠檬酸钠低渗液中作用 0.5~1 min 后移到载玻片上,尽量少带液体,加 1 滴(约 20 μ l) 4%乙酸,约 30s 后慢慢吸去 4%乙酸便可使胚胎顺势铺展,空气中稍干,即可以 10 % Giemase 染液染色 1 min,用低渗液洗片,勿将染液完全洗净以防退色,镜检计数。

1.3 数据处理 试验数据利用 DPS 软件进行独立性卡方检验和 t 检验。

2 结果

2.1 三种中药有效成分对小鼠 2-细胞胚胎体外发育效果与 NO 生成量变化

三种中药有效成分对 2-细胞胚胎体外培养效果比较表明(表 1-1),体外培养 24 h 及 48 h,除 24 h Lig 组胚胎发育率与其他组有显著差异外,各组间其发育率差异均不显著($P>0.05$);72 h、96 h 及 120 h 各组别存在统计学差异,且 120h 试验各组囊胚孵化率均极显著高于对照组($P<0.01$)。NO 检测结果显示(图 1-1),各组 NO 含量,72 h 较 24 h 均有减少,而 120 h 又均有增加且最高。其中,24 h 对照组与 Bai 组、Lig 组差异显著($P<0.05$);72 h 对照组与 Bai 组、Lig 组差异显著($P<0.05$),与其他各组无显著差异($P>0.05$);120 h Lig 组和 Bai 组 NO 含量高于对照组与 BR 组,但各组间差异均不显著($P>0.05$)。

表 1-1 三种中药有效成分对 2-细胞胚胎体外培养效果比较

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	2-细胞胚胎数/ 枚	(4~8-细胞)/%	(M~B)/%	(B~XB)/%	(XB~HB)/%	HB/%
对照组	126	95.2 (120/126) ^a	99.2(125/126) ^a	72.2(91/126) ^{aA}	64.2 (81/126) ^A	50.0(63/126) ^A
BR 组	127	98.4 (125/127) ^a	96.9(123/127) ^a	88.2(112/127) ^b	83.5(106/127) ^{Ba}	76.7(97/127) ^{Ba}
Lig 组	123	90.2 (111/123) ^b	97.6 (120/123) ^a	91.9(113/123) ^{Bc}	88.6(109/123) ^{Bb}	78.9(97/123) ^{Bb}
Bai 组	126	100 (126/126) ^a	100 (126/126) ^a	92.1(116/126) ^{Bc}	92.1(116/126) ^{Bb}	80.2(101/126) ^{Bb}

注：同一竖栏肩注不同大写字母之间表示差异极显著($P<0.01$)，不同小写字母之间表示差异显著($P<0.05$)，相同字母之间表示差异不显著($P>0.05$)。

M: 桑椹胚; B: 囊胚; XB: 扩张囊胚; HB: 孵化囊胚

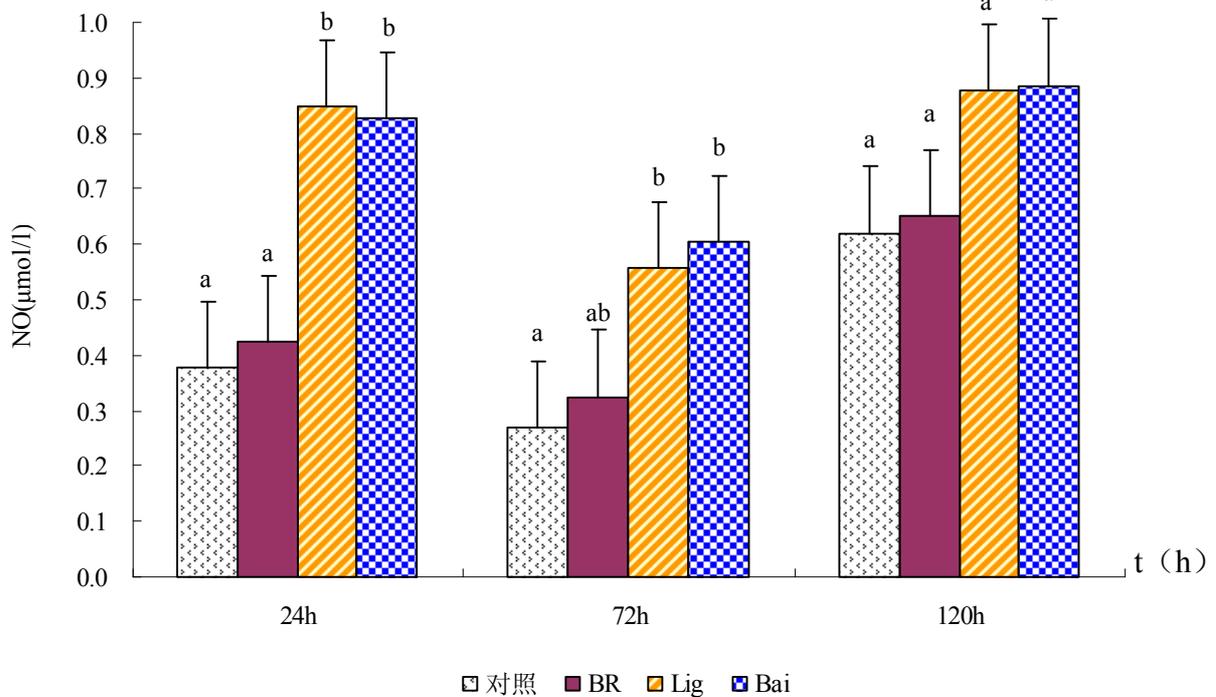


图 1-1 小鼠 2-细胞胚胎体外培养过程中 NO 生成量变化

注：不同大写字母之间表示差异极显著($P<0.01$)，不同小写字母之间表示差异显著($P<0.05$)，相同字母之间表示差异不显著($P>0.05$)。

2.2 三种中药有效成分对小鼠 2-细胞胚胎体外发育效果与 MDA 生成量变化

由表 1-2 可见，体外培养 120 h，胚胎孵化率各试验组极显著高于对照组 ($P<0.01$)，其中 Bai 组和 Lig 组显著高于 BR 组 ($P<0.05$)。MDA 检测结果显示(图 1-2)，各组 MDA 含量，72 h 和 120 h 与 24 h 比较呈现增加趋势，对照组均高于试验组，但 24 h Lig、120h

Bai 组例外。其中, 24 hMDA 含量试验各组间无显著性差异 ($P>0.05$); 72 h 对照组 MDA 含量与 BR 组、Bai 组差异极显著 ($P<0.01$); 120 h 对照组与各试验组差异不显著 ($P>0.05$)。

表 1-2 三种中药有效成分对 2-细胞胚胎体外培养效果比较

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	2-细胞胚胎数/ 枚	(4~8-细 胞)/%	(M~B)/%	(B~XB)/%	(XB~HB)/%	HB/%
对照组	102	94.1 (96/102) ^a	93.1(95/102) ^a	82.4 (84/102) ^{Aa}	61.8 (63/102) ^A	53.9 (55/102) ^A
BR 组	97	93.8 (91/97) ^a	93.8 (91/97) ^a	87.6 (85/97) ^b	83.5 (81/97) ^{Ba}	71.6 (73/97) ^{Ba}
Lig 组	98	95.9 (94/98) ^a	94.9 (93/98) ^a	87.8 (86/98) ^b	82.7 (81/98) ^{Ba}	77.6 (76/98) ^{Bb}
Bai 组	96	96.9 (93/96) ^a	96.9 (93/96) ^a	90.6 (87/96) ^{Bc}	88.5 (85/96) ^{Bb}	81.3 (78/06) ^{Bb}

注: 同一竖栏肩注不同大写字母之间表示差异极显著 ($P<0.01$), 不同小写字母之间表示差异显著 ($P<0.05$), 相同字母之间表示差异不显著 ($P>0.05$)。

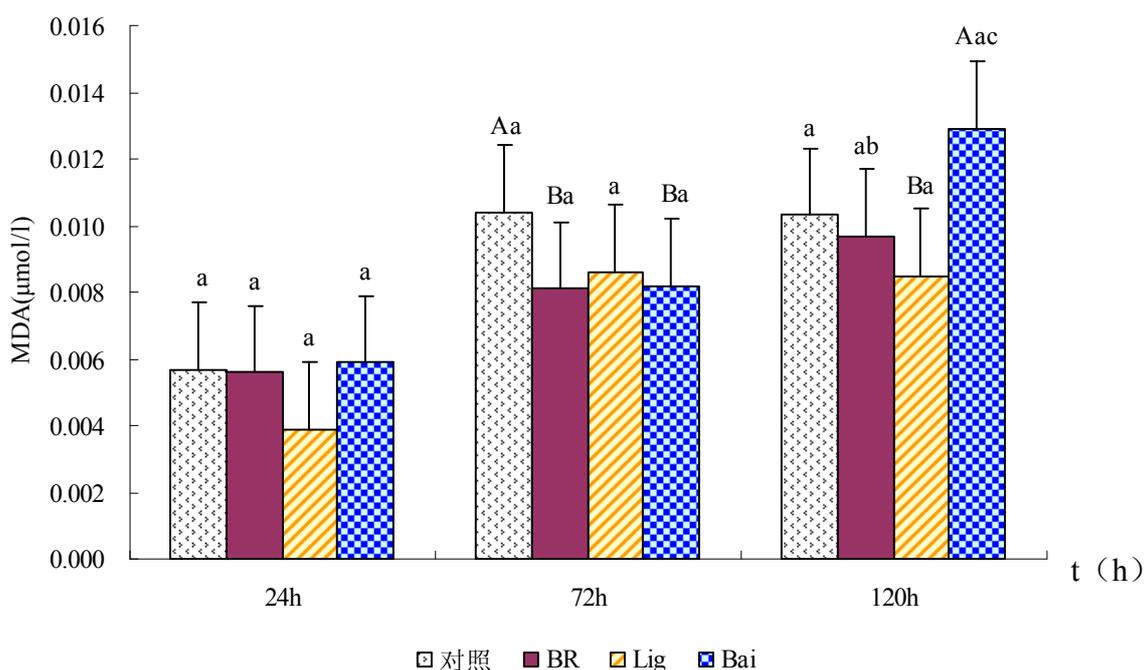


图1-2 小鼠2-细胞胚胎体外培养过程中MDA生成量变化

注: 不同大写字母之间表示差异极显著 ($P<0.01$), 不同小写字母之间表示差异显著 ($P<0.05$), 相同字母之间表示差异不显著 ($P>0.05$)。

2.3 三种中药有效成分对体外培养孵化胚胎细胞数目的影响

由表 1-3 可见, 各试验组体外培养 120 h 孵化胚胎细胞数目均极显著高于对照组 ($P<0.01$), 且 BR 组胚胎细胞数目最多, 其次为 Lig 组、Bai 组。

表 1-3 体外培养 120 h 孵化胚胎细胞数目比较

组别	胚胎数量/枚	孵化胚胎细胞平均数目/个 ($X\pm S$)
对照组	35	77.4±5.6 ^A
BR 组	31	87.2±8.6 ^B
Lig 组	34	83.9±7.7 ^B
Bai 组	29	81.9±6.2 ^C

注: 同一竖栏肩注不同大写字母之间表示差异极显著($P<0.01$), 不同小写字母之间表示差异显著($P<0.05$), 相同字母之间表示差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

连方等 (2004)^[86]研究发现, 服用二至天葵方可促进昆明种小鼠早期胚胎的分化和发育。杨桂云等 (2001)^[87]在 M16 培养液中添加补肾活血汤提取物制备的兔含药血清, 能显著提高小鼠的体外受精率, 并可促进其后各期的胚胎发育, 尤其对 4-细胞及 8-细胞期胚胎的发育有显著促进作用。然而对体外培养胚胎的发育及细胞增殖作用的研究却不多见。本试验结果显示, 以 mCZB 分别添加 0.1 $\mu\text{g/ml}$ BR, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Lig 和 4 $\mu\text{g/ml}$ Bai 为试验组, 试验各组胚胎孵化率以 Bai 组 (80.2%, 81.3%), Lig 组 (78.9%, 77.6%) 及 BR 组 (76.7%, 71.6%) 极显著高于对照组 (50.7%, 47.8%) ($P<0.01$); 孵化胚胎细胞计数结果以 BR 组、Lig 组和 Bai 组 (87.2±8.6、83.9±7.7、81.9±6.2) 与对照组 (77.4±5.6) 差异极显著 ($P<0.01$), 并与作者前期进行的有关研究结果相符合^[81,82]。陈骞等 (2004) 以 CZB 添加 500ng/ml 瘦素, 囊胚孵化率为 36.23%^[88]; 白照岱等 (2004) 以 CZB 添加 0.1ng/ml 表皮生长因子 (EGF), 囊胚孵化率为 21.2%、囊胚细胞数 53.40±16.35^[89]。黄吴键等 (2005) 添加适量氨基酸、葡萄糖、BSA 的 KSOM 改良培养基中囊胚孵化率为 64.8%^[90]; Berh (2005) 报道, P-1 培养液添加 0.125 ng/ml 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 时的囊胚率为 89% (对照组为 80%)^[91]; TSAI 等 (2000) 在人输卵管液 (HTL) 添加 500 IU/ml 白血病抑制因子 (LIF) 时的囊胚孵化率为 32.5%^[92]。可见, 本

试验的中药有效成分 Bai、Lig 和 BR 能极显著地促进了早期胚胎体外发育及胚胎细胞的增殖。

NO 是在还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原型辅酶 (NADPH) 和氧气 (O_2) 存在下, 通过 NO 合酶 (NOS) 催化 L-精氨酸胍基氮原子氧化而生成, 可作为一种多功能信号分子调节各种细胞功能, 是一种具有生物活性的自由基, 通常很快就被氧化成稳定的亚硝酸盐 (NO^{2-}) 或硝酸盐 (NO^{3-}) 形式。cAMP 促进细胞分化, cGMP 则促进细胞分裂, cAMP/cGMP 的比例及含量与细胞的增殖、分化和代谢密切相关。NO 能刺激鸟苷酸环化酶, 促使 cGMP 生成, 是 cAMP/cGMP 比例的主要调节者, 因此正常的胚胎发育需要 NO 的调节^[7]。Manejwala 等^[93]用 cAMP 类似物培养早期胚胎促进了囊胚腔的扩张。本试验三种中药有效成分可能对早期胚胎体外发育过程中 cAMP 和 cGMP 含量具有一定的调控作用, 有待今后进一步研究。

胚胎的正常卵裂易受 NO 自由基的影响^[73-74], 而且囊胚对过氧化脂质导致的损伤十分敏感^[94]。研究表明, NO 参与早期胚胎发育, 适量浓度 NO 是正常胚胎发育所必需的, 当其失衡时则导致胚胎发育阻滞或胚胎的凋亡^[24]。Gouge (1998) 等研究发现^[21], 妊娠第 1~4d 的胚胎均产生 NO, 当 2-细胞期以后的胚胎在含有一氧化氮合酶 (NOS) 竞争性抑制剂 L-硝基-精氨酸(L-NA)的培养液中进行培养时, 发育到相应的后一个时期的比例明显低于对照组。Abe 等 (1999) ^[23]用反转录 PCR 的方法在附植前各个时期的胚胎均检测到神经型 NO 合酶 (nNOS), 并观察到与 Gouge 等类似的现象。生理情况下, 由于机体具有抗氧化作用的酶系及非酶系统的保护作用, 使自由基不断产生又不断的消除, 以保护组织细胞不受自由基及其产物的损害, 然而自由基及其诱导的氧化反应是引起细胞膜损伤的重要原因。生物膜和亚细胞器是脂质过氧化反应的主要部位, 其醛式产物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 常作为脂类过氧化的检测指标。Bai 可明显降低由二甲基亚硝胺诱导的大鼠肝纤维化模型中肝脏线粒体脂质过氧化产物丙二醛 (MDA) 含量的作用^[95], 能够抑制细胞因子刺激成纤维细胞诱导型 NOS (iNOS) 的蛋白表达, 减少 NO 的产生, 发挥抗炎和治疗银屑病的作用^[96]; Lig 能降低线粒体 NOS 活性、减轻 NO 所致的自由基损伤及脂质过氧化物的生成^[97], 可能通过抑制自由基的产生和提高抗氧化能力来防止大鼠视网膜缺血在灌注诱导的细胞凋亡^[98], 促进软骨细胞分泌合成代谢因子, 刺激细胞增殖和蛋白质合成^[99], 清除氧自由基防止白细胞对组织的损伤^[100]; BR 能抑制白细胞呼吸爆发和体外氧自由基的生成^[101], 诱导 HL-60 细胞向成熟细胞分化

^[102]。本试验在 mCZB 中分别添加 Bai、Lig、BR，各组囊胚孵化率得到显著提高，24 h、72 h 及 120 h 各组 NO 含量均较高于对照组，而且各组 NO 含量 72 h 与 24 h 比较均有减少，而 120 h 又均有增加，即呈现出桑椹期及以前含量较高（24 h），桑椹期以后及囊胚期时有减少（72 h），当囊胚孵化时 NO 含量又增加（120 h）的变化趋势。当 2-细胞胚胎体外培养 24 h，即妊娠的第 3d 各组 NO 生成量较高，说明该时期处于卵裂中合子已完成由母源型基因控制过渡到合子型基因调控的阶段，胚胎细胞数量快速增加，在这一特定阶段中，较高浓度的 NO 可能是调节胚胎早期发育过程所需要的，并具有实质性的生理意义。试验中 NO 含量的变化趋势类似于杨青等（2003）^[103]的报道，即对照组妊娠第 1d 至第 2d 的胚胎中，NO 的生成量随胚胎的发育而逐渐增高，妊娠第 3d 达到高峰；妊娠第 4d 胚胎 NO 生成量下降至妊娠第 2d 的水平；而植入前后血清 NO 水平的升高可能对植入具有重要作用^[24]，与本试验 120 h 各组 NO 升高的趋势相符。试验中，除 120 h Bai 组需进一步探讨，24 h、72 h 及 120 h 各组 MDA 含量均较对照组低，体现了三种中药有效成分在一定程度上具有的抗氧化作用，减少了自由基对胚胎体外发育的损伤，使体外培养微环境更有利于其生长发育。

综上所述，中药有效成分对早期胚胎体外培养的作用已客观存在，但其抗氧化、促胚胎发育和细胞增殖等方面的作用机制还有待进一步深入研究，以期为哺乳动物胚胎体外培养技术开辟新途径。

试验二 黄芩苷、川芎嗪、小檗碱对小鼠桑椹胚及囊胚 冷冻解冻效果影响

基于本研究试验一 Bai、Lig、BR 对早期胚胎体外发育和细胞增殖的影响及其抗氧化作用的结果，为进一步探讨 Bai、Lig、BR 对胚胎体外培养发育效果，本试验将不同组别培养至桑椹、囊胚期的胚胎进行常规冷冻，以比较各组胚胎及两种程序冷冻解冻效果，从而检验三种中药有效成分体外培养胚胎的质量。

1 材料与amp;方法

1.1 试验动物

同试验一，选择健康、性成熟的 ICR 品系 SPF 级小鼠，雌鼠体重 23~34g，雄鼠体重 33~35g。

1.2 试验仪器设备

CL-8800 程序控温仪（澳大利亚），其他同试验一

1.3 药品试剂及配制

1.3.1 药品试剂

乙二醇(Ethylene glycol, EG)	北京化工厂, 20021112
蔗糖(Sucrose, S)	北京化工厂, 20030318
胚胎保存液	新西兰 ICPbio 公司, 3204

1.3.2 溶液配制

1.3.2.1 1.5mol/L 乙二醇冷冻液

称取 8.3652ml 乙二醇,用胚胎保存液溶解并定容至 100ml,混匀抽滤后即得 1.5mol/L 乙二醇。

1.3.2.2 0.5mol/L 蔗糖解冻液

称取 17.115g 蔗糖,用胚胎保存液溶解并定容至 100ml,混匀抽滤后即得 0.5mol/L 蔗糖。

其他药品同试验一。

1.4 试验方法

1.4.1 试验设计

试验分组方案同试验一,分别为对照组、Bai 组、Lig 组及 BR 组;采用两种程序将不同组别体外培养至桑椹和囊胚期胚胎进行冷冻,观察冷冻胚胎解冻复苏率、培养发育率以及比较两种冷冻程序冷冻效果的差异。

1.4.3 桑椹胚和囊胚的冷冻及解冻

1.4.3.1 胚胎处理及装管

将需冷冻的胚胎从培养微滴中取出,然后放入浓度为 1.5mol/L 乙二醇中,平衡 3min,转入另一浓度为 1.5mol/L 乙二醇中,平衡 3min,装管。

装管步骤:用 0.25ml 的塑料细管按顺序吸入冷冻液→空气柱→含胚胎的冷冻液→空气柱→冷冻液,最后用聚乙烯醇粉封口,见图 3-1。各组桑椹胚和囊胚分开装管,每支细管装 10 枚左右的胚胎。

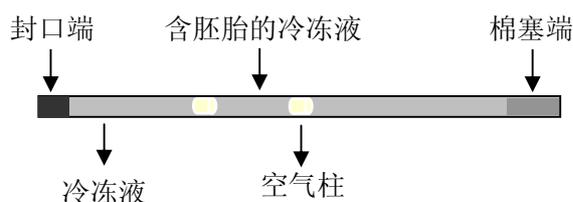


图 3-1 装管示意图

1.4.3.2 胚胎冷冻程序

利用程序控温仪，以自设程序为冷冻程序一、所选用的内置程序为冷冻程序二对由 2-细胞培养至桑椹和囊胚期的胚胎进行常规冷冻，具体程序如下：

程序一：将冷冻腔放入液氮中，起始温度 20℃，将装好的细管放入冷冻腔，以 1℃/min 的速度下降至-6℃，平衡 5min 后用与液氮接触过的棉签在装有胚胎的细管上端轻触（约 2s）植冰。植冰后平衡 10min，以 0.5℃/min 的速度从-6℃降到-35℃，平衡 5min，投入液氮保存。

程序二：将冷冻腔放入液氮中，起始温度 18℃，将装好的细管放入冷冻腔，以 4℃/min 的速度下降至 0℃，再以 1℃/min 的速度下降至-6℃，平衡 5min 后用与液氮接触过的棉签在装有胚胎的细管上端轻触（约 2s）植冰。植冰后平衡 8min，以 0.5℃/min 的速度从-6℃降到-30℃，平衡 5min，再以 2℃/min 的速度降到-36℃，再平衡 5min，投入液氮保存。

1.4.3.4 胚胎解冻、培养

冷冻细管从液氮中取出，迅速投入 37℃水中，轻轻振动约 10~15s 即可取出（乳白色转为透明），用吸水纸将细管外表的水珠擦净，剪掉细管封口端，用比细管内径略细的金属丝推出管里的胚胎，转入盛有 0.5mol/L 蔗糖溶液表面皿中，平衡 5min 以脱去防冻液，再用培养液清洗 3 遍，观察其解冻复苏率，并将形态正常的胚胎进行体外培养。解冻的桑椹胚、囊胚分别培养 8h~14 h、6h~8 h，分别观察和记录囊胚发育率和囊胚存活率。

1.4.4 桑椹胚和囊胚解冻检查

采用形态学法在显微镜下观察解冻后的胚胎，透明带完整，胚内细胞结合紧密，卵周隙适中，细胞间界限清晰，可认为是存活的胚胎。如果透明带破损，内细胞团松散或部分脱出，胚内细胞变暗或变亮呈玻璃状，以及不能恢复到冻前大小或整个胚胎崩解，说明其在冷冻或解冻的过程中受到严重的损伤，可判断为死亡的胚胎。

死亡数：指冷冻胚胎解冻后，认为不具备恢复到冻前状态及发育潜能的胚胎数量。

入胚数：指冷冻胚胎解冻后，认为具备恢复到冻前状态及发育潜能的胚胎数量。

囊胚率：指解冻桑椹胚体外培养 8 h~14 h 及解冻囊胚体外培养 6~8 h 后，胚胎发育至囊胚期或囊进一步扩大数占解冻桑椹期或囊胚数量的比率。

1.5 数据处理

利用 DPS 软件进行独立性卡方检验。

2 结果

2.1 三种中药有效成分对小鼠 2-细胞胚胎体外培养效果及胚胎冷冻

试验共重复 14 批次，共培养 2-细胞胚胎 1299 枚，共冷冻胚胎 1231 枚，其中程序一 6 个批次冷冻胚胎 656 枚，程序二 8 个批次冷冻胚胎 575 枚。

表 2-1 三种中药有效成分对 2-细胞胚胎体外培养效果及各组冷冻情况

组别	0 h	43~48 h		程序一冷冻		程序二冷冻	
	2-细胞总枚数/枚	桑椹率/%	囊胚率/%	桑椹胚数/枚	囊胚数/枚	桑椹胚数/枚	囊胚数/枚
对照组	286	50.3(144/286) ^A	41.3(118/286) ^a	77	41	67	64
Bai 组	337	51.6(174/337) ^A	48.1(162/337) ^{Aa}	102	96	72	66
Lig 组	282	51.1(144/282) ^A	43.6(123/282) ^{Aa}	74	69	70	54
BR 组	394	64.7(255/394) ^B	33.5(132/394) ^{Bb}	144	53	105	77

注：同一竖栏肩注不同大写字母之间表示差异极显著($P < 0.01$)，不同小写字母之间表示差异显著($P < 0.05$)，相同字母之间表示差异不显著($P > 0.05$)。

由表 2-1 可见，43~48 h 发育情况，桑椹胚的发育率，BR 组与其他三组间差异极显著 ($P < 0.01$)；囊胚的发育率，对照组与 Bai 组和 Lig 组无显著差异 ($P > 0.05$)，与 BR 组差异显著 ($P < 0.05$)，而 BR 组与 Bai 组和 Lig 组差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.2 黄芩苷、川芎嗪、小檗碱对桑椹胚解冻及体外培养效果比较

将程序一和程序二冷冻的桑椹胚进行解冻、复苏和培养，共解冻桑椹胚 670 枚，其中程序一 359 枚，程序二 311 枚。

表 2-2 黄芩苷、川芎嗪、小檗碱对桑椹胚解冻及体外培养效果比较

组别	程序一				程序二			
	解冻数/枚	死亡数/枚	入胚数/枚	8~14 h 囊胚发育率/%	解冻数/枚	死亡数/枚	入胚数/枚	8~14 h 囊胚发育率/%
对照组	74	23	51	48.6(36/74) ^{Aa}	67	8	59	55.2(37/67) ^A
Bai 组	76	5	71	65.8(50/76) ^b	72	5	67	80.6(58/72) ^B
Lig 组	74	5	69	81.1(60/74) ^{Bb}	69	1	68	78.3(54/69) ^B
BR 组	135	24	111	46.7(63/135) ^{Aa}	103	12	91	47.6(49/103) ^A

注：同一竖栏和同一横栏肩注不同大写字母之间表示差异极显著(P<0.01)，不同小写字母之间表示差异显著(P<0.05)，相同字母之间表示差异不显著(P>0.05)。

由表 2-2 可见，8~14 h 囊胚发育率，程序一中 Bai 组显著高于对照组、BR 组 (P<0.05)，Lig 组极显著高于对照组、BR 组 (P<0.01)；程序二中 Bai 组、Lig 组极显著高于对照组、BR 组；两程序中 Bai 组与 Lig 组桑椹胚冷冻效果无显著差异 (P>0.05)；两程序同一横行之间桑椹胚冷冻效果差异不显著 (P>0.05)。

2.3 黄芩苷、川芎嗪、小檗碱对囊胚解冻及体外培养效果比较

将程序一和程序二冷冻的囊胚进行解冻、复苏和培养，共解冻囊胚 434 枚，其中程序一 201 枚，程序二 233 枚。

表 2-3 黄芩苷、川芎嗪、小檗碱对囊胚解冻及体外培养效果比较

组别	程序一				程序二			
	解冻数/枚	死亡数/枚	入胚数/枚	6~8 h 囊胚发育率/%	解冻数/枚	死亡数/枚	入胚数/枚	6~8 h 囊胚发育率/%
对照组	41	1	40	87.8(36/41) ^{Aa}	49	9	40	61.2(30/49) ^{Bb}
Bai 组	46	1	45	93.5(43/46) ^a	56	2	54	82.1(46/56) ^a
Lig 组	69	5	64	84.5(58/69) ^a	53	3	50	83.0(44/53) ^a
BR 组	45	1	44	88.9(40/45) ^a	75	0	75	84.0(63/75) ^a

注：同一竖栏和同一横栏肩注不同大写字母之间表示差异极显著(P<0.01)，不同小写字母之间表示差异显著(P<0.05)，相同字母之间表示差异不显著(P>0.05)。

由表 2-3 可见，6~8 h 囊胚发育率，程序一中各组间无显著差异 (P<0.05)；程序二中，中药有效成分各组间差异不显著 (P>0.05)，但均显著高于对照组 (P<0.05)；两程序间，程序一对照组极显著高于程序二 (P<0.01)，同一横行其他组间差异不显著 (P>0.05)。

3 讨论

本试验结果表明, 冷冻解冻桑椹胚 8~14 h 囊胚发育率, 程序一中 Bai 组 (65.8%) 和 Lig 组 (81.1%) 显著、极显著高于对照组 (48.6%) 和 BR 组 (46.7%) ($P<0.05$, $P<0.01$); 程序二中 Bai 组 (80.6%)、Lig 组 (78.3%) 极显著高于对照组 (55.2%) 和 BR 组 (47.6%) ($P<0.01$); 两程序中 Bai 组与 Lig 组间无显著性差异。冷冻解冻囊胚培养 6~8 h 囊胚发育率, 中药有效成分各组间无显著差异 ($P>0.05$), 但程序二中均显著高于对照组 (61.2%) ($P<0.05$)。可见, 中药有效成分 Bai 和 Lig 对提高冷冻解冻体外胚胎的质量效果显著, 这与试验一的结果相一致; 而 BR 组桑椹胚冷冻解冻发育效果欠佳可能与囊胚使用浓度不同有关, 因而未能与试验一结果相一致。

徐平等采用玻璃化冷冻法和缓慢冷冻法冷冻体内 8~16-细胞期小鼠胚胎取得复苏率 69.59% 和 72.61%^[57]。朱孝荣等 (2005) 将体内获得的早囊和桑椹胚玻璃化冷冻后, 以 M16 培养胚胎的发育率为 87.1% (74/103)^[104]。本试验冷冻的桑椹和囊胚均源于中药有效成分体外培养获得, 冷冻方法与他人也有所不同, 但其冷冻解冻的效果好于对照组, 且与引用资料结果类似。虽然本试验采用的两种冷冻程序间的降温速率差异较大, 但由表 2-2 和表 2-3 可见, 两种冷冻程序对各组桑椹胚的冷冻效果及解冻后胚胎体外发育均无显著差异; 各组囊胚的冷冻效果及解冻后胚胎体外发育, 以程序一对照组 (87.8%) 极显著高于程序二 (61.2%) ($P<0.01$), 而程序间三种中药有效成分各组对应比较均无显著差异 ($P>0.05$)。表明, 冷冻效果与所冷冻胚胎的质量相关, 进而表明其中药有效成分对体外培养冷冻胚胎质量的影响效果显著。

试验三 黄芩苷、川芎嗪、小檗碱对小鼠冷冻胚胎

移植效果影响

体外培养系统的缺陷往往导致胚胎吸收、死亡、流产、死胎或出生后死亡、以及胎儿过大综合症（overgrowth syndromes）等^[105-106]。体内产生的不同质量的囊胚移植妊娠率较稳定，变化不是很大；而体外产生的不同质量的囊胚移植妊娠率不稳定，变化大，这表明胚胎质量对选择移植的胚胎来说十分重要^[107]；Papadopoulos（2002）等研究报道也表明体外培养的胚胎质量远低于体内发育胚胎质量^[108]。因此，体外培养囊胚的发育率不能作为评价囊胚随后发育潜力的最佳指标，也不能很好预测培养基保持胚胎体外发育能力的适宜性，而将其移植给性周期同步化受体，观察受体妊娠率和产仔率等才是检测胚胎活力的最终方法。鉴于前期试验结果，将试验二各组冷冻解冻培养发育至囊胚的胚胎进行移植，以进一步探讨 Bai、Lig、BR 对囊胚质量及移植胚胎发育潜力的影响，以期为更好地改进培养液的成分和培养条件提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验动物选择与处理

8~10 周龄 ICR 系 SPF 性成熟小鼠（购自北京试验动物中心）。雌鼠体重 29~32 g，雄鼠体重 34~36 g，购进后分笼饲养在室温、自然光照、自由饮水的条件下，采用全价繁殖颗粒饲料饲养。经一周的适应性饲养后方可试验。

1.2 仪器和器械

手术器械（眼科剪、眼科镊、无齿镊、持针钳、拆线剪、剪毛剪、手术缝合针 5×17、手术缝合线 0[#]），4 号针头，吸卵针、移卵针（细端应以仅容纳一个胚胎的直径为宜）。

1.3 药品

戊巴比妥钠

北京化学试剂公司（德国进口分装，Q/H82-F158-2002）

其他药品同试验一

1.4 雄鼠输精管结扎

雄鼠用 0.2%的戊巴比妥钠麻醉 (0.2ml/10g) 后, 固定, 剪除手术部位的毛, 并用 75%酒精消毒手术部位, 无齿镊夹起皮肤, 使之离开腹腔。沿腹中线在适当的位置 (尿道口前) 开 1cm 长的切口。把一侧睾丸从阴囊推入腹腔。用小镊子夹住腹腔切口一缘, 找到附于睾丸的脂肪部分。用无齿镊夹住脂肪部分, 将其轻轻拉出切口, 继而睾丸、输精管等也被拉出, 请勿直接接触及或操作睾丸, 只能通过操作脂肪部分使睾丸移动或定位。将附睾尾下方的输精管用小镊子夹起, 用缝合线在夹起的输精管段的结扎或烧热的眼科镊夹断。结扎完后, 轻轻牵动脂肪部分, 使睾丸等复位。撒上适量的抗菌素, 缝合刀口。另侧同。术后认真护理, 两周后恢复健康者可使用。

1.5 移植胚胎发育时期与受体母鼠的准备

受体母鼠与术后恢复完全的结扎公鼠按 1:1 或 2:1 于夜间合笼, 第 2d 早 8:00 开始, 且每隔 5 h 检查阴栓一次, 将见栓者记为假孕 0 h。

受体鼠的生理状态是否适合于体外培养胚胎的生存是移植成功的关键, 本试验移植胚胎来源于试验二解冻的桑椹胚和囊胚分别经过 8~14 h、6~8 h 后处于囊胚期的胚胎, 此时这些胚胎从体内受精发育到体外培养经历了约 90 h。因此, 选择见栓 90 h 的受体母鼠进行胚胎移植。

1.6 胚胎移植方法

根据受体母鼠的体重, 按 0.2ml/10g 进行麻醉。待动物进入麻醉状态后, 将手术部位 (最后一个肋骨前缘水平位置) 的毛剪干净。75%酒精消毒后, 在手术部位切开约 1cm (尽可能短) 纵向口。注意开口时不要伤及较大的静脉。用无齿镊夹住脂肪部分, 从切口拉出。继而卵巢、输卵管、子宫相继被拉出。使卵巢和输卵管留在外面。用无齿镊轻轻夹住子宫上端, 用 4 号针头蘸少许台盼蓝在子宫下半部 (靠近输卵管处) 扎 1 小孔。要保证扎入子宫内腔, 注意不要触及血管。沿该孔将移植管插入子宫腔内, 轻轻将所有的胚胎注入子宫内。然后用无齿镊夹住脂肪部分, 把子宫、卵巢、输卵管推回腹腔复位、缝合、消毒。

1.7 胚胎移植与观察记录

试验分四组，即对照组、Bai、Lig、BR，选择解冻复苏后培养发育正常的囊胚，以同期假孕鼠见栓早晚顺序进行移植。准确记录每只受体移植囊胚数目，观察其移植后恢复情况及是否妊娠。仔鼠出生后及时记录产仔数目并称取仔鼠体重；仔鼠出生后的第 18d 分窝，并称取体重、记录仔鼠成活数目。

1.8 统计方法

利用 DPS 软件进行独立性卡方检验。

2 结果

2.1 不同试验组别移植效果比较

本试验共移植受体 68 只，分别对试验各组移植妊娠率、产仔率、仔鼠初生重等指标进行了比较，结果如下。

表 3-1 不同试验组别移植效果比较

组别	移植受体数/只	妊娠率/%(妊娠数/移植数)	移植囊胚数		产仔率/%(出生鼠/移入胚胎数)	仔鼠初生重/g	离窝成活率/%(离窝/出生)	离窝鼠平均体重/g
			总数/枚	妊娠囊胚/枚				
对照组	13	46.2(6/13) ^a	118	53	52.8(28/53) ^a	1.45 ^a	60.7(17/28) ^a	9.9 ^a
Bai 组	16	56.3 (9/16) ^a	145	90	63.3 (57/90) ^a	1.63 ^a	64.9 (37/57) ^a	10.1 ^a
Lig 组	19	52.6(10/19) ^a	194	101	67.3(68/101) ^a	1.52 ^a	64.7(44/68) ^a	10.6 ^a
BR 组	20	55.0(11/20) ^a	227	114	60.5(69/114) ^a	1.35 ^a	75.4(49/65) ^a	10.9 ^a

注：同一竖栏肩注不同大写字母之间表示差异极显著(P<0.01)，不同小写字母之间表示差异显著(P<0.05)，相同字母之间表示差异不显著(P>0.05)。

由表 3-1 可见，受体妊娠率，各组间无显著差异 (P>0.05)；受体产仔率，对照组与黄芩苷组、川芎嗪组及小檗碱组均无显著差异 (P>0.05)；初生仔鼠、离窝仔鼠平均体重、离窝成活率，各组间无显著差异 (P>0.05)；但中药有效成分组别均好于对照组。

3 讨论

名医朱丹溪在《丹溪心法》中提到“黄芩，安胎之圣药也”。古代安胎常用药歌中也提到：“清热安胎用黄芩”，而黄芩苷是黄芩主要的有效成分。川芎嗪可抑制氧自由基的生成并增强 SOD 和 GSH-px 活力，调节 TXA₂/PGI₂ 平衡，促进胎儿生长^[109]；可促进兔关节软骨细胞分泌合成代谢因子，刺激细胞增殖和蛋白质合成^[99]；可以不抑制白细胞氧化代谢的功能而通过清除氧自由基防止白细胞对组织的损伤^[100]。小檗碱除了作为一种广谱抗菌药物^[110]，还有抗心律失常、扩张冠状血管、降血脂、降血糖、抗血小板、抗消化性溃疡、抗肿瘤等药理作用；宋淑娟^[111]、高雨农^[112]研究表明小檗碱并无毒副作用。本论文试验一结果表明，Bai、Lig、BR 具有调节体外培养小鼠 2-细胞胚胎抗氧化、改善体外培养液微环境的作用。

Kevin (2001) 认为，第 5d 扩张囊胚的内细胞团相比第 4d 的明显变小和拉长，较慢的发育速度和较差的形态都反映了其生存能力的下降，这在人类胚胎上也如此^[113]。本实验移植胚胎均选自 hCG 注射后获取的 2-细胞，经体外培养、冷冻处理、解冻后发育或有发育潜能的囊胚，历时 88~96h，即相当于体内第 4d 形成的囊胚。由表 3-1 可见，本试验不同中药有效成分组与对照组的妊娠率、产仔率、成活率及离窝体重相比虽无统计学差异，但均高于对照组。这可能与所选择的移植胚胎均是各组解冻后发育较好的胚胎有关。然而高于孙艳香等采用玻璃化冷冻囊胚子宫移植给假孕 3d 的受体鼠的产仔率 50%^[114]。进一步说明，Bai、Lig、BR 能显著提高体外培养胚胎的质量，对于移植胚胎植入子宫发育潜力可能具有一定促进作用，还有待今后进一步探讨。

第三章 结论

通过添加 4 μ g/ml Bai、0.5 μ g/ml Lig、0.1 μ g/ml BR 三种中药有效成分，观察体外培养效果，检测体外培养中 NO 及 MDA 含量，以及比较各组别桑囊胚的冷冻效果、解冻培养至囊胚的移植妊娠率、产仔率等试验研究，得出以下结论：

1. Bai、Lig、BR 极显著地促进 2-细胞胚胎的体外发育及胚胎细胞的增殖。
2. Bai、Lig、BR 可能对早期胚胎体外发育过程中 NO、MDA 生成起到一定调节作用。
3. 两种冷冻程序冷冻桑椹胚、囊胚效果无显著性差异。
3. 两种冷冻程序冷冻桑椹胚解冻培养 8~14 h 囊胚发育率，以 Bai、Lig 显著高于对照组和 BR，进一步表明添加 Bai、Lig 能有效提高桑椹胚质量。
4. 两种冷冻程序冷冻囊胚解冻培养 6~8 h 囊胚发育率，程序一中各组间无显著差异 ($P>0.05$)；程序二中，Bai、Lig、BR 与对照组差异显著 ($P<0.05$)，进一步表明添加 Bai、Lig、BR 能提高早期胚胎体外发育质量。
5. Bai 组、Lig 组、BR 组体外培养胚胎冷冻解冻培养至囊胚的移植妊娠率、产仔率高于对照组。

综上所述，三种中药有效成份 Bai、Lig、BR 能显著地提高小鼠 2-细胞胚胎体外发育质量，并有利于提高冷冻解冻后移植胚胎的发育潜力。有关中药有效成分对体外胚胎发育质量及移植胚胎发育潜力的机制还有待今后进一步探讨。

参考文献

- [1]郑荣梁, 黄中洋. 自由基医学与农学基础[M]. 北京: 高等教育出版社&施普林格出版社, 2001: 1~27
- [2]赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学技术出版社, 1999
- [3]刘建国, 王宪, 陈明哲. 一氧化氮和细胞因子之间的相互调节作用[J]. 生理科学进展, 2000, 31(1): 61~64
- [4]王雁. 一氧化氮对女性生殖系统的影响[J]. 首都医药, 2003, 10(4): 44~45
- [5]Rosselli M, Keller PJ, Dubey PK. Role of nitric oxide in biology, physiology and pathophysiology of reproduction[J]. Hum Reprod Up date, 1998, 4(1): 3~24
- [6]郑荣梁, 张红. 自由基对人精子功能的调控[J]. 扬州大学学报(自然科学版), 1999, 35(3): 135~138
- [7]Dey SK, Komura F, Mukherjee A, et al. Cyclic AMP and Cyclic GMP in rabbit blastocysts[J]. ReProd Fertil, 1978, 52(2): 235~237
- [8]王元兴, 郎介金. 动物繁殖学[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1993, 166~174
- [9]Brief S, Chew BP. effect of vitamin A and β -carotene on reproductive performance in gilts[J]. J Anim Sci, 1985, 60(4): 998~1004
- [10]Quinn P, Harlow GM. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro[J]. J Exp Zool, 1978, 206(1): 73~80
- [11]Flood MR, Wiebold JL. Glucose metabolism by preimplantation pig embryos[J], J Reprod Fert, 1988, 84(1): 7~12
- [12]Laloraya M, Kumar GP, Laloraya MM. A possible role of superoxide anion radical in the process of blastocyst implantation in musculus. Biochem Biophys Res Commun, 1989, 161(2): 762~770
- [13]Nasr-Esfahani MH, Aitken JR, Johnson MH. hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo[J]. Development, 1990, 109(2): 501~507
- [14]Noda Y, Watsumoto H, Umadka Y, et al. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block[J]. Mol Reprod Dev. 1991, 28(4): 356~360
- [15]Li JM, Foote RH, Simkin M. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine or superoxide dismutase[J]. Biol Reprod, 1993, 49(1): 33~37
- [16]Payne SR, Munday R, Thompson JG. Addition of superoxide dismutase and catalase

does not necessarily overcome developmental retardation of one-cell mouse embryo during in-vitro culture[J]. *Reprod Fertil Dev*, 1992, 4(2): 167~174

[17]Thomas M, Jain S, Kumar GP, et al. A programmed oxyradical burst causes hatching of mouse blastocysts[J]. *Journal of cell science*, 1997, 110(14): 1597~1602

[18]Kuo RC, Baxter GT, Thompson SH, et al. NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization[J]. *Nature*, 2000, 406(6796): 633~636

[19]Novaro V, Gonzalez E, Rettori V, et al. Nitric oxide synthase regulation during embryonic implantation[J]. *Reprod Fertil Dev*, 1997, 9(5): 557~564

[20]Duran-Reyes G, Gomez-Melendez MR, Brena G. Nitric oxide Synthase inhibition suppresses implantation and decreases cGMP concentration and protein peroxidation[J]. *Life Science*, 1999, 65(21): 2259~2268

[21]Gouge RC, Marshburn P, Gordon BE, et al. Nitric oxide as a regulator embryonic development[J]. *Biol Reprod*, 1998, 58(4): 875~879

[22]Abe K, Matsuoka K, Inoue N, et al. Messenger RNA of neuronal nitric oxide synthase is expressed and possibly functions in mouse oocytes and embryos during preimplantation development[J]. *Biomed Res*, 1999, 20(1): 61~65

[23]Athanasakis I, Aifantis I, Baritakis S, et al. Nitric Oxide production by pre-implantation embryo in response to embryotoxic factors. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2000, 10(3): 169~176

[24]解启发, 邓泽沛. NO 在小老鼠早期胚胎吸收过程中的作用[J]. *中国兽医学报*, 2002, 22(1): 90~93

[25]周思畅, 周剑涛. 一氧化氮介导细胞凋亡的分子基础[J]. *生命科学*, 2002, 14(3): 135~138

[26]Purcell TL, Given R, Chwalisz K, et al. Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse[J]. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5(5): 467~475

[27]Farina M, Ribeiro ML, Ogando D, et al. IL-1 alpha augments prostaglandin synthesis in pregnant rat uteriby a nitric oxide mediated mechanism[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2000, 62(4): 243~247

[28]王建辰, 章孝荣. 动物生殖调控[M]. 安徽: 安徽科学技术出版社. 1998: 102

[29]Biswas S, Kabir SN. Therole of Nitric oxide in the process of implantation in rats[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1998, 114(1): 157~161

[30]朱猛进, 丁家酮. 一氧化氮(NO)对动物妊娠生理的调节[J]. *贵州畜牧兽医*, 2000, 24(1): 10~11

[31]林毅宏. 自由基与中药 BRM 效应[J]. *福建中医药*, 1992, (4): 41

- [32]Robak J. Flavonoids are scavengers of super oxideanions Biochemical [J]. Pharmacology, 1988, 37: 837
- [33]Husain SR. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids[J]. Phytochemistry, 1987, 26(9): 2489
- [34]吴文林, 胡天喜. 几种黄酮类化合物对羟自由基引起的损伤的保护作用. 自由基生命科学进展(第 5 集)[M]. 北京: 原子能出版社, 1997, 101
- [35]康鑫, 方允中, 刘学英. 茶多酚清除超氧化物自由基的效能及其对肿瘤细胞 DNA 生物合成的影响. 自由基生命科学进展(第 1 集)[M]. 北京: 原子能出版社, 1993, 163
- [36]宋洪涛, 郭涛, 宓鹤鸣. 天然药物中的抗氧化剂[J]. 中草药, 1991, 22(7): 331
- [37]詹皓, 沈竟民, 姜桂荣. 中药抗氧化作用的研究概况[J]. 中国中药杂志, 1990, 15(10): 54
- [38]姚文兵, 高向东, 周慧萍, 等. 大黄的生化学研究 XXXVI 波叶大黄多糖抗衰老作用的实验研究[J]. 中国药科大学学报, 1991, 22(3): 167
- [39]劳汉昌, 张宝华, 胡侦明. 脊髓损伤早期三七总皂苷抗氧化作用的实验研究[J]. 云南医药, 1995, 16(5): 355
- [40]何凤慈, 唐汝愚, 姚丹帆. 粉防己碱对急性炎症血管通透性和嗜中性白细胞功能的影响[J]. 中国药理学报, 1989, 10(3): 249.
- [41]王利津, 徐强. 黄连解毒汤的抗氧化作用研究[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(1): 51~53
- [42]龚跃新, 孙云, 林安平. 补气法、补血法抗自由基操作的比较研究[J]. 中国中药杂志, 1993, 18(7): 438
- [43]张其兰, 孙志福. 复方何首乌抗氧化作用的研究[J]. 自由基生命科学进展(第 1 集)[M]. 北京: 原子能出版社, 1993: 189
- [44]Guerin P, Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings[J]. Hum Reprod Update, 2001, 7: 175~189
- [45]Noda Y, Goto Y, Umaoka Y, et al. Culture of Human Embryos in Alpha Modification of Eagle's Medium under Low Oxygen Tension and Low Illumination[J]. Fertil Steril, 1994, 62: 1022~1027
- [46]Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, et al. Developmental Potentiality Of Embryos Cultured under Low Oxygen Tension with Superoxide Dismutase[J]. J In Vitro Fert Embryo Transf, 1991, 8(5): 245~249
- [47]Herrick JB. Injectable β -carotene Appears to Improve Reproduction[J]. Feed stuff, 1993, 7: 13~17

- [48]吴师光,董孝国. 一种古老的生物信息分子-褪黑素[J]. 商丘师范学院学报, 2003, 19(2): 102~103
- [49]关钧. 环核苷酸与中药效功能综述[J]. 浙江中医杂志, 1989, 244(5): 234~236
- [50]孙忠亲. 中草药对环核苷酸影响的研究进展[J]. 中草药, 1990, 21(12): 31~32
- [51]阮娜, 宋晓平. 补益药对体外培养细胞的影响[A]. 中兽医药研究进展, 2003, 7: 158~160
- [52]房俊芳, 钟秀会. 黄芩的药理研究概述[A]. 中药药理研究进展, 2003, 7: 187~189
- [53]房俊芳. 中药黄芩、白术在胚胎着床、胚胎移植过程中的作用及机制研究: [硕士学位论文]. 保定: 河北农业大学, 2004
- [54]梁培育. 黄芪注射液体外对人精子运动参数的影响. 中华男科学, 2001, 10(5): 335~337
- [55]邸冉, 高建明. 中药成分对小鼠 2-细胞胚胎体外生长发育的影响初探[J]. 北京农学院学报, 2004, 19(增): 61~65
- [56]傅文栋. 小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖对小鼠 2-细胞胚胎体外培养及移植效果的研究: [硕士学位论文]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2005
- [57]徐平, 川野佳代, 刘丽均, 等. 实验大鼠、小鼠胚胎的缓慢冷冻和玻璃化冷冻的比较[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2002, 20(4): 261~265
- [58]冯涛. 动物胚胎冷冻保存技术的研究进展[J]. 中国草食动物, 2004 专辑: 58~60
- [59]常万存, 贾青, 路兴中. 以冷冻胚子和胚胎保存动物遗传资源的可行性[J]. 中国畜牧杂志, 1998, 34(1): 49~50
- [60]包华琼, 李跃民. 哺乳动物胚胎冷冻的研究进展[J]. 草食家畜, 2001, 4(113): 1~5
- [61]付永伦. 人类卵母细胞冷冻保存[J]. 生殖与避孕, 1996, 16(3): 163~166
- [62]李善国. 人类胚胎和卵子的冷冻保存[J]. 生殖与避孕, 1997, 17(1): 3~7
- [63]Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification[J]. Nature, 1985, 313(6003): 573~575
- [64]张爱民编译. 牛胚胎移植的现状与展望[J]. 草食家畜, 1994, 2: 27~29
- [65]王新压, 窦忠英. 影响哺乳动物胚胎冷冻效果的因素分析[J]. 黄牛杂志, 1996, 22(2): 40~42
- [66]谭瑛, 孙振权. 家畜胚胎移植技术研究历史及应用现状[J]. 呼伦贝尔学院学报, 2001, 2(9): 25~28

- [67]黄莉, 戴立军. 小鼠胚胎移植初试[J]. 广州医学院学报, 2001, 4 (29): 36~38
- [68]刘丽均, 徐平. 小鼠桑椹期、囊胚期胚胎移植方法的探讨[J]. 上海实验动物科学, 2000, 2 (20): 109~112
- [69]Bolton VN, Wren ME, Parsons JH. Pregnancies after in vitro fertilization and transfer of human blastocysts[J]. Fertil Steril, 1991, 55: 830~832
- [70]Marek D, Langley M, Gardner DK, et al. Introduction of blastocyst culture and transfer for ail patients in vitro fertilization program[J]. Fertil Steril, 1999, 72: 1035~1040
- [71]Gardner DK, Phil D, Vella P, et al. Culture and transfer of human blastocysts implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers[J]. Fertil Steril, 1998, 69: 84~88
- [72]Toledo AA, Wright G, Jones AE, et al. Blastocyst transfer: a useful tool for reduction of high-order multiple gestations in a human assisted reproduction program[J]. Am J Obstet Gynecol, 2000, 183: 377~379
- [73]Barroso RP, Osuamkpe C, Nagamana M, et al. Nitric oxide inhibits development of embryos and implantation in mice[J]. Mol Hum Reprod, 1998, 4(5): 503~507
- [74]Huang R, Zhu GJ. The Role Nitric Oxide in the Process of implantation in mice[J]. Acta Univ Med Tongji, 2001, 30(1): 42~45
- [75]彭守静, 陆仁康, 俞丽华, 等. 菟丝子、仙茅、巴戟天对人精子体外运动和膜功能影响的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(3): 145
- [76]曾金雄, 戴西湖, 刘建华, 等. 中药还精方对人精子运动及相关参数的影响[J]. 中国男科学杂志, 2002, 16(4): 319
- [77]姚石安. 中药促排卵的研究[J]. 中国药业, 1996, 2: 12
- [78]刘玉鹏, 刘梅, 刘俊英, 等. 30种中草药的抗氧化活性研究[J]. 烟台大学学报, 2000, 1(1): 70~73
- [79]先宏, 吴可, 孙存普. 中药抗氧化活性的主要成分及其自由基清除作用[J]. 国外医学中医中药分册, 2003, 25(3): 150~153
- [80]阮娜, 宋晓平. 补益药对体外培养细胞的影响. 中兽医药研究进展(论文集) [C]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学出版社, 2003, 158~160
- [81]邸冉, 高建明. 中药成分对小鼠 2-细胞胚胎体外生长发育的影响初探[J]. 北京农学院学报, 2004, 19(增): 61~65
- [82]傅文栋, 高建明, 陈武, 等. 小檗碱及黄芩苷对小鼠 2-细胞胚胎体外培养效果的初步研究[A]. 中国兽医医药杂志, 2005(专辑): 24: 146~150
- [83]傅文栋, 孙玉成, 索伦, 等. 小鼠发情周期观察与最佳超排时期的确定[J]. 北

京农学院学报, 2005, 20(2): 19~21

[84]Chatot CL, Lewis JL, Torris I, et al. One-minute exposure of 4-cell mouse embryos to glucose overcomes morula block in CZB medium[J]. Mol Reprod Dev, 1994, 37(4): 407~412

[85]庞战军, 周玫, 陈瑗. 自由基医学研究方法[M]. 北京: 人民生出版社, 2000: 224~226

[86]连方, 孙振高, 张建伟, 等. 二至天癸方对小鼠卵细胞质量影响的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(7): 627~629

[87]杨桂云, 王佩娟, 贾晓斌, 等. 补肾活血汤对小鼠体外受精及其早期胚胎发育的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(7): 522~524

[88]陈騫, 李尚为, 唐海峰, 等. 瘦素对小鼠着床前胚胎发育影响的体外研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2004, 35(6): 806~808

[89]白照岱, 刘凯, 邴鲁军. 表皮生长因子对小鼠早期胚胎体外发育影响的研究[J]. 山东大学学报(医学版), 2004, 42(2): 150~158

[90]黄吴键, 袁进, 邓星, 等. KSOM 培养基营养成分调整对小鼠植入前期胚体外发育的影响[J]. 第一军事医科大学学报[J], 2005, 25(3): 256~261

[91]Berh B, Mooney S, Wen Y, et al. Preliminary experience with low concentration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a potential regulator in preimplantation mouse embryo development and apoptosis[J]. J Assist Reprod Genet, 2005, 22(1): 25~32

[92]Horng-Der TSAI, Chi-Chen Chang, Yao-Yuan HSIEH, et al. Effect of Different Concentrations of Recombinant Leukemia Inhibitory Factor on Different Development Stage of Mouse Embryo In Vitro[J]. J Assist Reprod Genet, 2000, 17(6): 352~355

[93]Manejwala FM, Kaji E, Sehultz RM. Development of activatable adenylate cyclase in the preimplantation mouse embryo and a role for cAMP in blastocoel formation[J]. Cell, 1986, 46(1): 99~103

[94]Nonogaki T, Noda Y, Goto Y, et al. Developmental block age of mouse embryos caused by fatty acids[J]. J Assist Reprod Genet, 1994, 11(9): 482~488

[95]Shiimizu I, Ma Y R, Mizobuchi Y, et al. Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats[J]. Hepatology, 1999, 29(1): 149~160

[96]王砚宁, 毕新岭, 顾军, 等. 黄芩甙影响人成纤维细胞诱导型一氧化氮合酶蛋白表达研究[J]. 中国中西医结合皮肤性病杂志, 2003, 2(3): 152~154

[97]黎玉, 万福生, 李少华. 川芎嗪对大鼠缺血心肌线粒体 NO 及自由基的影响[J]. 中医药学报, 2004, 32(2): 47~49

[98]施月欢, 邹秀兰, 赵松滨. 川芎嗪对大鼠缺血在灌注视网膜 SOD、MDA 和 NO

水平及细胞凋亡的影响[J]. 眼科研究, 2001, 19(4): 301~303

[99]晏雪生, 彭亚琴, 明安萍. 川芎嗪注射液对体外培养软骨细胞影响的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2002, 10(1): 15~17

[100]张兆辉, 余绍祖, 赵保路. 四甲吡嗪对人类白细胞呼吸爆发氧代谢的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2001, 6(1): 8~11

[101]Jiang JY, Geng DS, Tursonjan T, et al. Anti-inflammatory effect and mechanism of berberine[J]. chin pharmacol Bull, 1998, 14(5): 434~437

[102]王志红, 林菁. 盐酸小檗碱对 HL-60 细胞增殖与分化的影响[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(11): 1305~1308

[103]杨青, 薛立群, 刘斌, 等. 维生素 E 对附植前小鼠胚胎发育与一氧化氮生成的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2003, 29 (4): 288~290

[104]朱孝荣, 彭长凌, 袁红花. 小鼠胚胎冷冻研究[J]. 徐州医学院学报, 2005, 25(1): 45~47

[105]Sinclair KP, Young LE, Wilmut I, et al. In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men[J]. Hum Reprod, 2000, 15(Suppl 5): 68~86

[106]Lane M. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress in vitro[J]. Theriogenology, 2001, 55: 225~236

[107]Farin PW, Stockburger EM, Rodriguez KF, et al. Placental morphology is altered following transfer of bovine embryos produced invitro[J]. Theriogenol, 2000b, 53: 474~482

[108]Papadopoulos S, Rizos D, Duffy P, et al. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts[J]. Anim Reprod Sci, 2002, 74: 35~44

[109]许建平, 马庭元, 闻良珍. 川芎嗪治疗胎儿宫内生长迟缓中氧自由基与血栓素 β_2 、6-酮-前列腺素 1α 的相关性研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(5): 265~268

[110]Cernakova M, Kostalova D. Antimicrobial activity of berberine a constituent of Mahonia aquifolium[J]. Folia Microbiol, 2002, 47(4): 375~378

[111]宋淑娟. 黄连素治疗妊娠合并心律失常 16 例临床观察[J]. 吉林中医药, 1997, 5: 19

[112]高雨农, 高晓山. 妊娠晚期服用盐酸小檗碱对新生儿血清胆红素影响的回顾性调查简报[J]. 中国中药杂志, 2000, 9(25): 564~565

[113]Kevin S, Richter D, Dee C, et al. Quantitative grading of a human blastocyst:

optimal inner cell mass size and shape[J]. *Fern Steri*, 2001, 76: 1157~1167

[114]孙艳香, 姜国诚, 雷俊英. 小鼠囊胚玻璃化冷冻保存研究[J]. *广西师范大学学报(自然科学版)*, 2002, 20(3): 73~75

附表

附表 1 基础培养液 mCZB

成分	含量 (g/100mL)	成分	含量 (g/100mL)	成分	含量 (mL/ 100mL)
NaCl	0.56995	BSA	0.1	乳酸钠	6.3mL
KCl	0.04305	丙酮酸钠	0.003	酚红	10mL
KH ₂ PO ₄	0.0192	EDTA	0.0049		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.03475	谷氨酰胺	0.0146		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02985				
NaHCO ₃	1.2937				

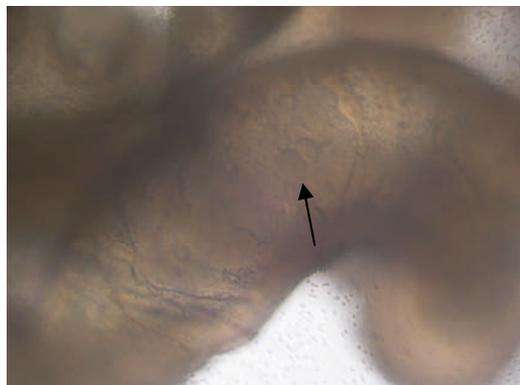
附表 2 改良磷酸缓冲溶液 mPBS

A 液		B 液		C 液	
成分	含量 (mg/L 水)	成分	含量 (mg/L 水)	成分	含量 (mg/L 水)
CaCl ₂	100	NaCl	8000	犊牛血清	1%
MgSO ₄	121	KCl	200	酚红	1%
		Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2881	青霉素	62.5
		葡萄糖	1000	链霉素	100
		丙酮酸钠	36		

附图



附图 1 合笼后验栓



附图 2 注射 hCG46h 后输卵管中的 2-cell



附图 3 注射 hCG46h 后获得的 2-cell 胚胎



附图 4 体外培养 24h 的 4~8-cell 胚胎



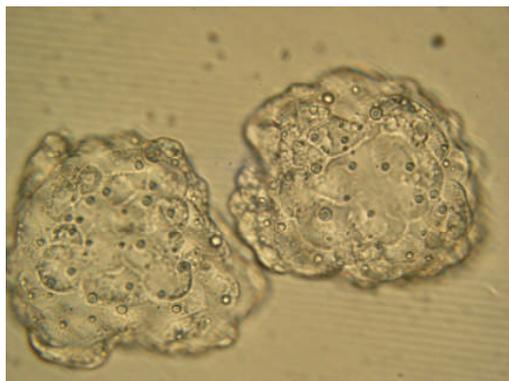
附图 5 体外培养 48h 的桑椹胚及囊胚



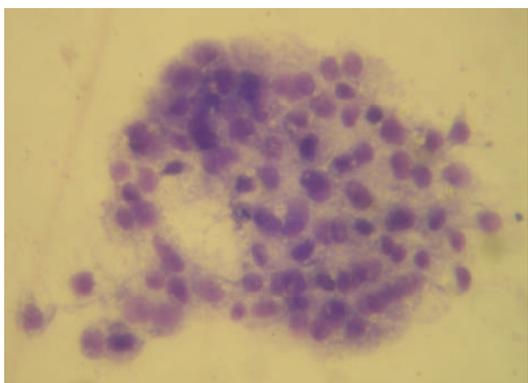
附图 6 体外培养 72h 囊胚



附图 7 体外培养 96h 囊胚及扩张囊胚



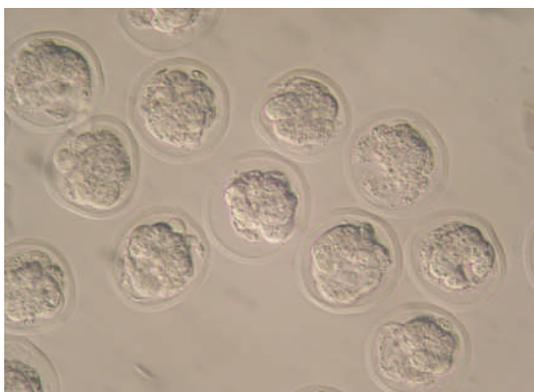
附图 8 体外培养 120h 孵化胚胎



附图 9 体外培养 120h 孵化胚胎细胞计数



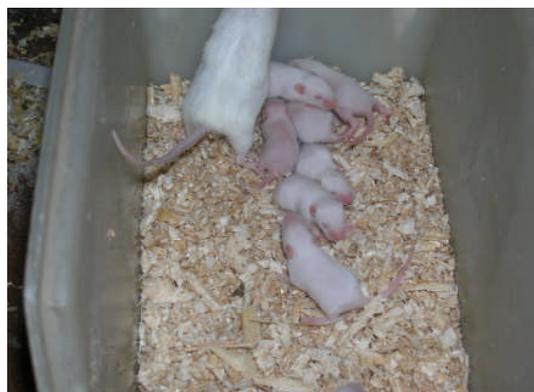
附图 10 对照组桑椹胚解冻后培养 8~14h



附图 10 Bai 组解冻液中囊胚的状态



附图 11 Bai 组囊胚解冻后培养 6~8h



附图 12 胚胎移植成活仔鼠



附图 13 胚胎移植离窝小鼠

致 谢

本论文是在恩师高建明教授悉心指导下完成的。论文的设计、实施到撰写过程中恩师都倾注了大量的时间和精力。恩师渊博的学识、严密的逻辑思维方式和诲人不倦的高尚品德使我终生受益。在两年的学习生涯中，恩师培养了我对科研的创新意识，提高了我分析和解决问题的能力，教诲我人生的哲理。在此，谨向恩师致以崇高的敬意和衷心的感谢！

在七年的求学生涯中，得到王子荣副教授的精心指导。王老师治学严谨，学识渊博，思想深邃，视野雄阔，授人以鱼不如授人以渔，使我不仅接受了全新的思想观念，树立了宏伟的学术目标，领会了基本的思考方式，掌握了通用的研究方法，而且还明白了许多待人接物与为人处世的道理。在此，谨向恩师王子荣副教授致以崇高的敬意和衷心的感谢，愿恩师合家欢乐，一生平安！

感谢新疆农业大学保善、余雄、杨开伦、陈勇、时磊、王旭光、刘素萍等老师给予的帮助！

感谢胡明信、吴学清、朱士恩教授及陈静波研究员在论文修改中给予的帮助！

感谢北京农学院刘云海研究员，索占伟、穆祥等老师在论文实施过程中的帮助！

感谢师兄傅文栋、王端明、管仲新、陆彦；师妹张建芳、孟令君、李宋；师弟王荣祥、李冬冬、范涛、苏辉在试验过程中给予的帮助！

感谢吴红军、李新华、刘吉、程宇、徐志光、李新国、肖海霞、王玉红、霍飞、张家友等 2003 级研究生的大力支持和帮助！

特别感谢我的家人给予我生活上的亲切关心和精神上的支持！

再次向一直以来给予我理解、支持、关心和帮助的家人、老师、同学和朋友们表示最衷心的感谢，并致以最崇高的敬意！

孙玉成
2006 年 5 月

作者简历

孙玉成，男，汉，1979年3月8日出生，籍贯重庆，新疆农业大学&北京农学院联合培养硕士研究生。2004~2006年参加参加了导师高建明教授的北京市委组织部优秀人才培养专项经费D类资助项目和北京农业应用新技术实验室开放课题项目《添加中药成份对哺乳动物早期胚胎体外生长发育培养基的研究》课题的研究工作，并在中国科技核心期刊上发表以下文章：

- 1 孙玉成，张建芳，孟令君，高建明★. 影响小鼠超数排卵效果的因素[J]. 北京农学院学报，2005，20(4)：17~19
- 2 孙玉成，高建明★，于同泉，等. 三种中药有效成分对小鼠胚胎体外发育影响的研究[J].中国兽医学报，2006，5
- 3 傅文栋，孙玉成，高建明★，张建芳. 小鼠囊胚及孵化胚胎细胞计数方法的探讨[J].北京农学院学报，2005，20(1)：41~43
- 4 傅文栋，孙玉成，索伦，高建明★. 小鼠发情周期观察与最佳超排时期的确定[J].北京农学院学报，2005，20(2)：19~21
- 5 傅文栋，高建明★，陈武，万善霞，于同泉，孙玉成. 小檗碱及黄芩苷对小鼠2-细胞胚胎体外培养效果的初步研究[A]. 中国兽医医药杂志，2005(专辑)，24：146~150
- 6 高建明，王占赫，张中文，刘云海，倪和民，李利平，孙玉成. 肉用种绵羊精液低温保存试验[J]. 北京农学院学报，2006，21(1)：55~57