

分类号：  
密 级：普通

单位代码：10758  
学 号：2002110

# 新疆农业大学

硕士学位论文

## 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

**Study on Effect of Berberine, Baicalin and Astragalus  
Polysacharin on Two-cell Embryos Development  
*in vitro* and Embryos Transplant in Mouse**

研 究 生： 傅文栋

指 导 教 师： 高建明 教授

合作指导教师： 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： 动物科技学院

新疆·乌鲁木齐

二〇〇五年六月

新疆农业大学硕士学位论文

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

傅文栋

导 师： 高建明 教 授

（北京农学院）

王子荣 副教授

（新疆农业大学）

二〇〇五年六月

## 独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在北京农学院 高建明 导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果，成果归北京农学院和 高建明 导师共同所有。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，也不包含为获得其他大学或科研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：傅文辉

时间：2005 年 5 月 12 日

关于北京农学院与 新疆农业 大学（单位）

### 联合培养研究生毕业论文使用授权的说明

本人完全了解北京农学院和 新疆农业 大学（单位）有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意北京农学院导师可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位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：傅文辉

时间：2005 年 5 月 12 日

导师签名：高建明

时间：2005 年 5 月 12 日

# 目 录

|  |     |
|--|-----|
| 中文摘要.....                                    | I   |
| 英文摘要.....                                    | II  |
| 缩略词表.....                                    | III |
| <u>第一章 绪论</u> .....                          | 1   |
| <u>1. 哺乳动物早期胚胎体外培养技术</u> .....               | 1   |
| 1.1 培养液的种类.....                              | 1   |
| 1.2 培养液的基本成分及其作用.....                        | 2   |
| 1.3 胚胎的体外培养系统.....                           | 8   |
| 1.4 胚胎体外培养存在的问题及展望.....                      | 10  |
| 2. 小檗碱、黄芩苷和黄芪多糖在体外实验中的应用现状.....              | 11  |
| 2.1 小檗碱.....                                 | 11  |
| 2.2 黄芩苷.....                                 | 12  |
| 2.3 黄芪多糖.....                                | 14  |
| 2.4 展望.....                                  | 15  |
| 3. 本研究的目 的、意义及内容.....                        | 16  |
| 第二章 试验部分.....                                | 17  |
| 试验一 小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖对小鼠 2-细胞胚胎体外培养效果的筛选试验.....   | 18  |
| 1. 材料与方法.....                                | 18  |
| 1.1 材料.....                                  | 18  |
| 1.2 试验方法.....                                | 20  |
| 1.3 小鼠胚胎发育时期判定.....                          | 22  |
| 1.4 数据处理.....                                | 21  |
| 2. 结果.....                                   | 22  |
| 2.1 小檗碱对小鼠 2-细胞胚胎体外培养效果的筛选结果.....            | 22  |
| 2.2 黄芩苷对小鼠 2-细胞胚胎体外培养效果的筛选结果.....            | 24  |
| 2.3 黄芪多糖对小鼠 2-细胞胚胎体外培养效果的筛选结果.....           | 24  |
| 3. 讨 论.....                                  | 25  |
| 试验二 小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖对小鼠 2-细胞胚胎发育至孵化期细胞数目的影响..... | 28  |
| 1. 材料与方法.....                                | 28  |
| 1.1 材料.....                                  | 28  |
| 1.2 试验方法.....                                | 29  |

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| 1.3 数据处理 .....                       | 30 |
| 2. 结果 .....                          | 30 |
| 2.1 添加小檗碱培养小鼠 2-细胞胚胎至孵化胚胎细胞数目 .....  | 30 |
| 2.2 添加黄芩苷培养小鼠 2-细胞胚胎至孵化胚胎细胞数目 .....  | 30 |
| 2.3 添加黄芪多糖培养小鼠 2-细胞胚胎至孵化胚胎细胞数目 ..... | 31 |
| 3. 讨论 .....                          | 31 |
| 试验三 小檗碱、黄芩苷对小鼠早期胚胎移植效果的影响 .....      | 32 |
| 1. 材料与方法 .....                       | 32 |
| 1.1 材料 .....                         | 32 |
| 1.2 试验设计 .....                       | 33 |
| 1.3 统计方法 .....                       | 35 |
| 2. 试验结果 .....                        | 35 |
| 2.1 不同试验组别胚胎发育情况 .....               | 35 |
| 2.2 受体假孕不同时间移植效果 .....               | 35 |
| 2.3 胚胎移植效果 .....                     | 36 |
| 3. 讨论 .....                          | 36 |
| 3.1 不同假孕时间移植效果的影响 .....              | 36 |
| 3.2 小檗碱和黄芩苷对胎移植效果的探讨 .....           | 37 |
| 第三章 结论 .....                         | 38 |
| <a href="#">参考文献</a> .....           | 39 |
| <a href="#">附 录</a> .....            | 48 |
| <a href="#">致 谢</a> .....            | 51 |
| 作者简历 .....                           | 52 |

## 图 表 目 录

|       |                          |        |
|-------|--------------------------|--------|
| 表 1—1 | 试验组别设计                   | 第 21 页 |
| 表 1—2 | 胚胎形态判定                   | 第 22 页 |
| 表 1—3 | 小檗碱对小鼠 2-细胞胚胎发育的影响       | 第 23 页 |
| 表 1—4 | 黄芩苷对小鼠 2-细胞胚胎发育的影响       | 第 24 页 |
| 表 1—5 | 黄芪多糖对小鼠 2-细胞胚胎发育的影响      | 第 25 页 |
| 表 2—1 | 小檗碱培养小鼠 2-细胞胚胎至孵化胚胎细胞数目  | 第 30 页 |
| 表 2—2 | 黄芩苷培养小鼠 2-细胞胚胎至孵化胚胎细胞数目  | 第 30 页 |
| 表 2—3 | 黄芪多糖培养小鼠 2-细胞胚胎至孵化胚胎细胞数目 | 第 31 页 |
| 表 3—1 | 不同试验组别胚胎发育情况             | 第 35 页 |
| 表 3—2 | 不同假孕时间移植效果的对比            | 第 35 页 |
| 表 3—3 | 胚胎移植效果                   | 第 36 页 |
| 附表 1  | 杜氏磷酸缓冲溶液 (mPBS)          | 第 48 页 |
| 附表 2  | 基础培养液 mCZB               | 第 48 页 |
| 附图 1  | 注射 hCG47h 后获取的 2-cell 胚胎 | 第 49 页 |
| 附图 2  | 体外培养 48h 的桑椹胚            | 第 49 页 |
| 附图 3  | 体外培养 72h 的囊胚             | 第 49 页 |
| 附图 4  | 体外培养 96h 的扩张囊胚           | 第 49 页 |
| 附图 5  | 对照组体外培养 120h 的孵化胚胎       | 第 49 页 |
| 附图 6  | 添加小檗碱体外培养 120h 的孵化胚胎     | 第 49 页 |
| 附图 7  | 体外培养 120h 的孵化胚胎形态        | 第 50 页 |
| 附图 8  | 体外培养 120h 的孵化胚胎细胞计数照片    | 第 50 页 |
| 附图 9  | 胚胎移植初产仔鼠                 | 第 50 页 |
| 附图 10 | 胚胎移植离窝仔鼠                 | 第 50 页 |

## 摘 要

为探讨小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖三种中药成分对小鼠胚胎体外生长发育的效果,本研究以 ICR 小鼠 2-细胞胚胎为试验材料,设计三个试验:小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖对小鼠 2-细胞胚胎体外培养效果的筛选试验;小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖对小鼠 2-细胞胚胎发育至孵化期细胞数目的影响;小檗碱、黄芩苷对小鼠早期胚胎移植效果的影响。以期为提高体外培养胚胎发育率开拓一条新的途径。

试验一:以 mCZB 基础液为试验对照组,设计添加小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖三个试验内容,每种药物在进行多个批次的试验后,初步筛选出四个或五个浓度后再进一步筛选最佳浓度。试验结果:小檗碱最佳浓度 0.10 $\mu$ g/ml,其 120h 孵化胚胎发育率(89.9%)极显著高于对照组(50.7%) ( $P < 0.01$ ),组间无显著差异( $P > 0.05$ );黄芩苷最佳浓度 4 $\mu$ g/ml,其 120h 孵化胚胎发育率(64.1%)显著好于对照组(47.8%)( $P < 0.05$ );黄芪多糖最佳浓度为 60 $\mu$ g/ml,其 120h 孵化胚胎发育率对照组(41.0%)与试验 2(35.0%)、3 组(35.0)间无显著差异( $P > 0.05$ )。结果表明:在 mCZB 基础液中添加小檗碱、黄芩苷能有效促进 2-细胞胚胎体外生长发育。

试验二:为验证试验一 2-细胞胚胎体外培养的效果,试验二以试验一培养的孵化胚胎为试验材料,比较各试验组中不同中药浓度与对照组中 2-细胞胚胎体外培养发育至孵化胚胎细胞数目的差异。试验结果:添加小檗碱各浓度培养的孵化胚胎细胞数目极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ),小檗碱最佳浓度 0.10 $\mu$ g/ml 的孵化胚胎细胞数目为 83.7 $\pm$ 9.10,对照组为 69.5 $\pm$ 7.14;添加黄芩苷、黄芪多糖试验中各浓度培养的孵化胚胎细胞数目与对照组间无差异( $P < 0.05$ )。结果表明:小檗碱能有效促进体外培养胚胎的细胞数目。

试验三:根据试验一和试验二的结果,以添加双抗 mCZB 为试验对照组,添加小檗碱、黄芩苷为试验组。通过对体外培养 2-细胞胚胎至囊胚期后移植,来观察小檗碱、黄芩苷对小鼠胚胎移植效果和产仔发育的影响。试验结果:受体妊娠率以小檗碱培养囊胚移植妊娠率(66.7%)显著高于对照组(50%)和黄芩苷试验组(45.5%)( $P < 0.05$ ),其各试验组间产仔率、初产仔鼠平均体重、离窝小鼠平均体重均无差异( $P > 0.05$ );离窝成活率小檗碱、黄芩苷组显著好于对照组( $P < 0.05$ )。且胚胎和假孕母鼠完全同步移植妊娠效果较好。结果表明:小檗碱、黄芩苷对早期胚胎附植及出生仔鼠无不良影响。

由以上结果说明,小檗碱、黄芩苷对体外胚胎生长发育和细胞增殖有促进作用,其中以小檗碱的作用显著;小檗碱、黄芩苷对胚胎附植及出生仔鼠无不良影响。

**关键词:** 小檗碱, 黄芩苷, 黄芪多糖, 小鼠 2-细胞胚胎, 体外培养, 细胞计数, 胚胎移植

## Abstract

The investigation studied the effect of Berberine, Baicalin and Astragalus Polysacharin using the two-cell embryos of ICR mouse as explant. Three experiments were set: the effect of Berberine, Baicalin and Astragalus Polysacharin on Two-cell Embryos Development in vitro; the effect of Berberine, Baicalin and Astragalus Polysacharin on the cell numbers from development to hatched ; the effect of Berberine, Baicalin and Astragalus Polysacharin on embryos earlier transplant .

Experiment 1 used the mCZB as control, supplemented with Berberine, Baicalin and Astragalus Polysacharin respectively. After several replicated, 4-5 concentrations were selected to further selection. The result showed that the best concentration of Berberine is 0.10ug/ml which 120h embryo incubated rate of 89.9% was much higher than the control(50.7%), there was no big difference group; The mCZB supplemented with Berberine, Baicalin and Astragalus Polysacharin significant improved the development of two-cell embryo in vitro.

Experiment 2 compared the number of incubated embryos under different concentration of Berberine, Baicalin and Astragalus Polysacharin with control using the incubated embryos of experiment 1. the number of embryos supplemented with different concentration of Berberine( $83.7 \pm 9.10$ ) were much higher than the control( $69.5 \pm 7.14$ ). there was no difference between the mCZB supplemented with Baicalin or Astragalus Polysacharin with the control. The result showed that Berberine effectively improved the number of embryos in vivo.

Experiment 3 used the antibiotics mCZB as the control, supplemented with Baicalin and Astragalus Polysacharin respectively. The two-cell embryos were transplanted after blast in vitro to study the effect of Berberine, Baicalin and Astragalus Polysacharin on transplant efficiency and reproduction.

The results showed that Berberine and Baicalin improved the embryos' development and replication in vivo, Berberine, Baicalin had no harm to embryos transplant and birth mouse.

**Key words:** Berberine, Baicalin , Astragalus Polysacharin, mouse the two-cell embryos, in vitro culture, cell counting, embryos transplant

## 缩 略 词 表

| 缩略词    | 英文名称  | 中文名称      |
|--------|---|-----------|
| APS    | Astragalus Polysacharin                       | 黄芪多糖      |
| B      | Blastocyst                                    | 囊胚        |
| Bai    | Baicalin                                      | 黄芩苷       |
| BR     | Berberine                                     | 小檗碱       |
| BSA    | Bovine serum albumin                          | 牛血清白蛋白    |
| EDTA   | Ethylene diaminetetraacetic acid              | 已二氨四已酸    |
| g      | gram  | 克         |
| h      | hour  | 小时        |
| HB     | hatched blastocys                             | 孵化胚胎      |
| hCG    | human chorionic gonadtropin                   | 人绒毛膜促性腺激素 |
| IU     | International unit                            | 国际单位      |
| IVC    | In vitro culture                              | 体外培养      |
| kg     | kilogram                                      | 千克        |
| M      | Morula  | 桑椹胚       |
| mCZB   | mCZB  | mCZB 培养液  |
| mg     | milligram                                     | 毫克        |
| min    | minute  | 分钟        |
| ml     | milliliter                                    | 毫升        |
| mol/l  | mole/liter                                    | 摩尔/升      |
| mPBS   | modified dulbecco's phosphate buffered saline | 杜氏磷酸盐缓冲液  |
| mmol/l | millimole/liter                               | 毫摩尔/升     |
| PMSG   | pregnant mare serum gonadtropin               | 孕马血清促性腺激素 |
| μg     | microgram                                     | 微克        |
| μl     | microliter                                    | 微升        |
| XB     | expanded blastocys                            | 扩张囊胚      |

# 第一章 绪 论

## 1. 哺乳动物早期胚胎体外培养技术

哺乳动物附植前的胚胎具有发育成为成体动物的全套基因组信息，存在着由母源性基因调节向胚胎基因的转化过程。由桑椹胚向囊胚时期的发育，则是开始向成体动物发育复杂分化过程的第一步。目前，体外受精、胚胎分割、动物克隆、胚胎嵌合、胚胎干细胞、转基因动物等胚胎生物技术的应用，都需借助于胚胎体外培养系统。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。

哺乳动物早期胚胎的体外培养开始于 1880 年 Schenk 的工作，1929 年 Lewis 和 Gregory 采用血清和血浆等天然培养基对兔胚的体外培养进行了研究，首次成功地将兔胚从卵裂胚培养到囊胚；1949 年 Hammond 用生理盐水加蛋黄将 8-细胞小鼠胚胎培养至囊胚；Whitten 在 1956 年设计出第一个专为哺乳动物体外培养的培养液，并以乳酸和丙酮酸代替葡萄糖作为早期胚胎培养的能量物质，克服了 2-细胞后的发育阻滞现象，从而找到了哺乳动物早期胚胎的体外培养的突破口；Biggers 等(1962)首次在离体小鼠输卵管膨大部内培养小鼠原核胚，使其顺利发育到囊胚；这表明输卵管上皮细胞分泌的物质可以支持小鼠胚胎发育，而体外培养液中缺少某些供胚胎发育的物质；1963 年 Brinster 创建了胚胎的微滴培养法，并于 1965 年改良培养液成分增加了乳酸钙和丙酮酸钠，也成功地将 2-细胞的早期胚胎培养发育至囊胚阶段(Brinster,1965)。此后为提高体外培养效果人们在温度控制、混合气体比例、渗透压、培养液 pH 及添加各种发育所需物质如氨基酸、维生素、血清等方面作了大量研究工作，其目的就是为了尽量模拟体内环境，提高胚胎体外生产效率。

### 1.1 培养液的种类

不同动物种类发育时期等情况所需的培养液也不一样，目的是为了获得较好的培养结果。动物早期胚胎培养液成分是根据动物输卵管或子宫内液的化学组成，以及参照一般组织、细胞培养液而设计的，争取造成与体内尽可能相似的环境，有利于胚胎的培养。目前，在国际上通常使用的培养液有 TCM-199 培养液(Parker,1950)，广泛使用于多种动

物的胚胎培养; CZB 培养液主要用于小鼠的胚胎培养(Chatot *et al.*,1990); SOF 培养液和 CR1 培养液多用于牛、绵羊和山羊的胚胎培养; NCSU-23 培养液主要用于猪的胚胎培养; G1/G2 序贯培养液,主要用于人胚胎的培养; Ham-F-10 适宜细胞克隆等(张靖飞,2002; 王旭光,2002)。

## 1.2 培养液的基本成分及其作用

培养液的基本成分主要包括水、无机盐、氨基酸、维生素、碳水化合物和蛋白质等。按其功能可分为渗透压维持因子, 代谢底物和代谢调节因子等。

### 1.2.1 水

所有培养液中水的含量均在 98%以上, 因而水的质量直接影响到胚胎的培养。几乎各种来源的水都曾被用于胚胎培养, 如雨水、泉水、自来水等。Whitting(1971)用单蒸、双蒸和三蒸水对小鼠 2-细胞胚胎进行培养, 发现三蒸水效果最好; 刘忠华, 谭景和等(1999)用三蒸水、五蒸水、去离子水对小鼠 1-细胞胚胎培养, 发现五次蒸馏水效果最好; 苗聪秀, 刘锦宏等(1999)通过实验也证明高纯的五蒸水培养效果较好。然而, 单靠蒸馏是难以去除其中的有毒成分。因而, 人们在蒸馏的同时, 又加上超滤, 以去除有机物和无机离子。培养液用水最好使用新制的, 存放时间过长, 会产生一些污染, 尤其是细菌造成的污染(严云勤等,1995; 鄂征,1995)。

### 1.2.2 无机离子

培养液中的  $\text{HCO}_3^-$  的作用之一是调节培养液的 pH 值。大部分培养液均需经 5% $\text{CO}_2$  气相平衡一段时间,  $\text{CO}_2$  浓度过高会使溶液的 pH 值降低。另一作用是参与胚胎的能量代谢。胚胎通过  $\text{HCO}_3^-$  整合与乙酸盐、苹果酸盐、柠檬酸盐和酮戊二酸盐, 而且通过羧化酶把丙酮酸与  $\text{CO}_2$  形成草酰乙酸, 参与三羧循环(李光鹏等,1994; Herr *et al.*,1988)。 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  对仓鼠胚胎的影响极大, 磷与葡萄糖的共同作用能够完全抑制仓鼠 2-细胞胚胎的发育, 这二者的存在是造成仓鼠 2-细胞阻断的原因(Schini *et al.*,1988)。最近, 人们发现磷和葡萄糖对小鼠、猪早期胚胎培养可能具有相似的作用。

NaCl 是培养液中渗透压的主要调节者。目前所用的胚胎培养液, 其中 NaCl 含量约

为 140mmol/L。 $K^+$ 是胚胎的发育所必需的，对桑椹胚期以后的发育尤其重要。Wales 等(1970)研究当无  $K^+$ 时，胚胎发育几乎完全被抑制。 $Na^+/K^+$ 泵， $Na^+/K^+$ -ATP 酶参与囊胚腔形成起重要作用。王武陵等(1994)研究结果表明，培养液中的  $Na^+/K^+$ 比显著影响牛胚胎在体外的发育，提高  $K^+$ 浓度会降低囊胚率。最适的  $Na^+/K^+$ 比为 114:3.2。Tervit 等(1978)根据输卵管和子宫中分泌的  $K^+$ 含量，设计了含同样浓度  $K^+$ 的培养液，对牛和羊胚胎进行培养，效果很好。正常细胞的细胞质  $Ca^{2+}$ 维持在很低水平，细胞外  $Ca^{2+}$ 浓度是细胞内  $Ca^{2+}$ 浓度的 1000 倍，但这并不意味着  $Ca^{2+}$ 不重要，相反，细胞内许多重要生理活动都离不开  $Ca^{2+}$ ， $Ca^{2+}$ 是细胞内的第二信使，在胚胎培养时  $Ca^{2+}$ 缺乏就会抑制卵裂发生，并且阻止桑椹胚的致密化。

### 1.2.3 能量底物

能量代谢是胚胎在体外发育过程中的基本生命运动，所以能量底物也是胚胎培养液中的一种重要成分。胚胎培养液中最常添加的能量底物是葡萄糖、丙酮酸钠、乳酸钠和谷氨酰胺等，随着胚胎发育阶段的不同它们对胚胎发育的作用亦不一样。

#### 1.2.3.1 谷氨酰胺

在其它能源物质缺乏情况下，谷氨酰胺是生糖氨基酸，可以作为能源物质参与代谢。培养液中加入谷氨酰胺可使仓鼠、猪胚发育通过阻断期。人和小鼠输卵管液也含有较高水平的谷氨酰胺，几种动物移植前的早期胚胎都是把谷氨酰胺作为重要的能量来源来吸收和利用的(Rieger *et al.*, 1992)。Lane or Gardner(1997)研究发现，谷氨酰胺、必需氨基酸、EAA 一起加入到培养液中，可以显著提高滋养层细胞数量和孵化的胚胎。在细胞培养的研究结果中也表明(章静波,2002)，几乎所有的细胞对谷氨酰胺都有较高的要求，细胞需要谷氨酰胺合成核酸和蛋白质，当缺少谷氨酰胺时，细胞常会出现生长不良或死亡。

#### 1.2.3.2 葡萄糖

在小鼠、绵羊、牛等动物的早期胚胎在致密化之前，以丙酮酸和乳酸为能量代谢底物，葡萄糖不作为主要的能量来源。葡萄糖对小鼠(Chatot *et al.*,1988)、仓鼠(Schini and Baviste,1988)、猪(Petters *et al.*,1990)等的早期胚胎发育具有抑制作用。葡萄糖对早期胚

胎发育的抑制作用可能是由于早期胚胎缺乏相应的糖代谢酶,但葡萄糖对于桑椹胚以后阶段的胚胎发育则有促进作用。早期胚胎虽然不以葡萄糖为能量底物,但葡萄糖可通过磷酸戊糖途径代谢的残基参与细胞中一些物质的合成。而且在自然情况下,动物输卵管液及子宫液中也含有葡萄糖这说明体外培养液中低剂量的葡萄糖的添加是必要的(Gardner *et al.*, 1998)。而且高浓度的葡萄糖能够抑制早期胚胎的发育,因为葡萄糖氧化后产生的氧自由基会对胚胎发育造成损害(Ludwig *et al.*, 2001 or Kwon *et al.*, 2002)。Kwon 等认为(2002)葡萄糖和果糖具有协同作用,在重组胚胎培养液中同时加入两者,可以提高移植前胚胎的存活和发育。

### 1.2.3.3 丙酮酸钠和乳酸钠

丙酮酸钠和乳酸钠是早期胚胎发育的主要能量代谢底物,因此大多数胚胎的培养液都添加有这两种能量底物。它们对支持早期胚胎卵裂起重要作用。动物胚胎种类不同作用亦不同,丙酮酸盐和草酸乙酸盐能促进小鼠 1-细胞胚胎卵裂;而乳酸盐类和磷酸烯醇丙酮酸盐类物质可支持 2-细胞卵裂;而乳酸盐类物质可能对牛胚第一次卵裂起重要作用,在绵羊早期胚胎培养也证实了它们的作用(Rosenkrans *et al.*, 1993)。

在大多数培养液中的能量底物水平均依据 2-细胞小鼠胚胎发育到囊胚的情况来确定的。对哺乳动物生殖道体液组成的分析表明:1)在各种动物生殖道体液的营养物水平十分相似。2)有些营养物水平与胚胎培养液相差很大,培养液中代谢物的浓度对胚胎及其代谢通路的活动有直接影响(Gardner & Lane, 1993)。

### 1.2.4 氨基酸和维生素

#### 1.2.4.1 氨基酸

氨基酸是蛋白质合成的前体,同时也参与胚胎的能量代谢。动物输卵管和子宫液中都有相当数量的游离氨基酸,故大多数胚胎培养液中都含有氨基酸。许多研究证明氨基酸是兔(Kane, 1989)、仓鼠(Carney & Bavister, 1987)、人(Winkle, 2001)等胚胎发育到囊胚所必需的。Gardner 和 Lane(1993)发现 EBSS 培养液(一种人胚胎培养液)中添加多种氨基酸和己二胺四乙酸(EDTA)可以促进 48h 前的胚胎发育,氨基酸缺乏,则 2-细胞阻断的机率明显增加。单独缺乏甘氨酸或牛磺酸对结果无影响。必需氨基酸(EAA)和

非必需氨基酸 (NEAA) 在胚胎不同发育阶段的作用不同。Thompson 等(1992)报道 EAA 和维生素对 16-细胞期后绵羊胚胎的发育有抑制作用, NEAA 有促进作用; Lane(1994)报道, 胚胎在致密化之前 EAA 没有作用, 甚至对胚胎产生副作用。Lane or Gardner(1997)和 Gardner 等(1998)发现 EAA 对后期胚胎的发育有促进作用, 主要表现在增加 ICM 细胞分裂率和植入后胎儿的发育能力。但氨基酸除可以提供胚胎生长所需的物质之外, 还可以调节细胞内渗透压和 pH 值。

#### 1.2.4.2 维生素

维生素作为碳水化合物和氨基酸代谢过程中必不可少的成份, 能促进细胞对葡萄糖的摄取和乳糖的合成, 从而影响胚胎的代谢和发育。研究表明, 肌醇、泛酸和胆碱能促进仓鼠(Carney & Bavister, 1987)、兔(Kane, 1989)和牛(Takahashi 等, 1992)胚胎的发育。在培养液中添加维生素 E 和维生素 C 能减轻氧自由基对胚胎产生的有害作用。Olson 和 Seidel(2000)的研究发现, 在培养液中加入维生素 E、维生素 C 和 EDTA 来培养牛体外受精卵, 结果培养液中添加 100 $\mu$ mol/L 维生素 E 时有更多受精卵发育到囊胚, 但培养液中同时添加维生素 E 和维生素 C 时受精卵发育到早期囊胚、扩展囊胚与孵化囊胚的百分率比单独添加维生素 E 时低。

#### 1.2.5 蛋白质和血清

一般认为胚胎发育阻断和胚胎基因组转录都与胚胎细胞内蛋白质缺陷有关。而培养液中蛋白质含量的不足或过量都可能对早期胚胎发育有负面影响。Takahashi (1992)研究表明受精卵在无蛋白质培养液中培养, 其囊胚率显著下降。目前常用于培养液中的蛋白质类物质有 BSA(牛血清白蛋白)、FCS (新生牛血清)、SS(羊血清) 和 HS (人血清) 等。其中胚胎培养效果较好的有 OCS、SS (陈鸿冰等,1994) 和 HS (Thompson 等, 1992 or Walker 等, 1992)。血清的成份包括生长因子、激素、维生素、矿物质、细胞因子以及其它一些尚未确定的物质。有研究表明 FCS 中有九种转录因子(Knepper *et al.*,1998), 血清成分的多样性决定了它对胚胎的影响也是复杂多元的, 血清对胚胎的最初发育有损害作用, 而对后期胚胎的发育有利(Pinyopummintr & Bavister,1994,Carolan 等, 1995)。血清对受精卵的第一次卵裂有负面影响, 在胚胎培养 24~48h 后加入。Gardner 等(1998)也指出血清中的有些物质可能会影响早期胚胎的发育, 致密化前胚胎在无血清培养液中

发育效果好,但之后的发育依赖于血清;Mclaughlin等(1990)和Walker等(1992)实验证明,在SOF液中加入20%左右的HS用于牛、羊早期胚胎的培养可以获得较高的囊胚率;Bavister等(1992)将不灭活的血清加入培养液培养牛的早期胚胎增加了桑椹胚的致密性和胚胎内的细胞数;Thompson等(1992)报道HS是绵羊胚胎培养液的一种有效的添加物;HS中某些非白蛋白因子是促进胚胎发育的主要因子。HS中有利于胚胎发育的因子通过两种机理起作用:一是消除培养环境中有害因子的不良影响而对胚胎有保护作用;二是直接激发细胞分裂。胚胎在孵化过程中,各种代谢活动都比较旺盛,因此,通常血清浓度也需要相应提高,一般要在10%左右(桑润滋,2002)。

尽管培养液中添加血清可能引起线粒体超微结构和细胞代谢及卵裂球早熟等胚胎发育异常现象的发生,但为了保证培养效果,目前,在胚胎的体外生产实践中仍然使用血清,不过目前血清用量已大为减少,由10年前的10~20%降低为3~5%(桑润滋,2002)。

近年来,无血清培养基的应用越来越受到人们的关注,并取得了长足进展。依靠无血清培养基研究者可以避免血清中多种生物因子的复合作用的影响,可以更准确的界定培养液中的各种营养成分对胚胎发育的作用,BSA是哺乳动物培养液中最常用的一种蛋白质源物质。培养液中添加适量BSA胚胎的蛋白质合成提供必需的,固定的氮源能增加胚胎中的细胞数量,同时BSA能结合培养液中的一些胚胎毒性物质,对胚胎起保护作用。但单独BSA并不能完全取代血清的作用(Takahashi等,1992)。在血清存在的情况下,BSA的加入能促进胚胎的发育。研究者为了确定胚胎体外发育的营养需要以及在使用无蛋白培养液时为了避免胚胎粘着,用一些合成大分子物质,如聚乙烯醇(PVA)或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)来代替BSA或血清(Takahashi等,1992)。柠檬酸钠和肌醇与PVA配合使用可以取代血清及BSA在胚胎培养液中的添加,研究表明,柠檬酸钠+肌醇+PVA加入SOF培养牛胚胎,得到了较好的实验结果(Holm等,1999)。柠檬酸可参与脂肪酸的合成,并且是一些金属离子的螯合剂,其原因可能是对于保持细胞间连接促进囊胚的形成起重要作用,肌醇或其代谢产物是细胞信号转导的基本物质,在胚胎发育中也起到非常重要的作用。

### 1.2.6 生长因子和细胞因子

胚胎发育的实质是细胞分裂与分化的过程,有许多因子参与这一过程。家畜早期胚胎可以合成并分泌血小板活化因子(PAF)、白细胞介素-1、-6(IL-1、IL-6)肿瘤坏死因子

(TNF)等。它们单独或协同作用于母体,使母体应答并产生某些特殊因子。如早孕因子(EPF)、胰岛素样生长因子(IGF-1、IGF-2)等,这些因子对早期胚胎的发育发挥着重要作用。PAF是多种细胞和组织的代谢激活因子,能刺激小鼠胚胎的能量和氧化代谢,增强胚胎的活力。有研究表明,牛胚胎用 CR1aa+BSA 群体高密度培养时,IL-1 $\beta$  的加入能增加囊胚的发育率,能增加胚胎发育到 8~16 细胞期胚胎的数量和 ICM 细胞的数量(Paula-Lopes *et al.*, 1998)。IGF-1 与卵母细胞的成熟,受精和早期胚胎的发育有关(Spicer & Zavy,1992)。表皮生长因子(EGF)是一种促细胞分裂剂,不仅能促进颗粒细胞增殖和卵母细胞成熟,还能显著提高受精卵在体外发育至桑椹胚和囊胚的能力(Yang *et al.*, 1993)。

目前,对囊胚发育调控研究较多的是 Na/KATP 酶和生长因子的调控作用。在囊胚形成过程中,滋养层细胞基底膜上 Na/K 泵不断地把细胞外液中的 Na<sup>+</sup>运送到内层细胞间,导致内层细胞间离子浓度升高,在渗透压的作用下,水分子通过外层细胞向胚胎内集中,导致胚胎内出现囊腔,从而囊胚形成;Dardik 等(1991)将 EGF 受体人为激活后胚胎内的 cAMP(环腺苷酸)水平升高,囊胚出现明显扩张。生长因子通过调节 Na/KATP 酶活性促进囊胚形成和扩张的模式,也是与滋养层细胞顶部质膜相应受体相结合后,激活细胞内的信号传导系统,导致细胞内 cAMP 水平升高,进而激活 Na/KATP 酶的活性,结果促进 Na<sup>+</sup>的内转运,导致囊胚的形成和扩张(桑润滋,2002;秦鹏春,2001)。由此可见,在胚胎的发育过程中第二信使 cAMP 系统有着重要的作用。

### 1.3 胚胎体外培养系统

胚胎的体外培养系统包括实验室灭菌,培养器皿等的选择、清洗、湿度、培养的气体环境、光照、温度和培养液在内的所有培养要求。只有严格按照这些要求进行,才有可能获得良好的培养效果。培养液的成分、浓度以及培养条件的不适,在不同动物中均会引起胚胎发育阻断和较低发育率(严云勤等,1995;高建明,1996)。培养温度则应该与相应动物的正常体温相一致。各种动物的正常体温为:猫 38.6 $^{\circ}\text{C}$ 、牛 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、仓鼠 38 $^{\circ}\text{C}$ 、马 37 $^{\circ}\text{C}$ 、人 37 $^{\circ}\text{C}$ 、小鼠 37.8 $^{\circ}\text{C}$ 、兔 39.4~39.6 $^{\circ}\text{C}$ 、大鼠 38.0~38.2 $^{\circ}\text{C}$ 、羊 39.1 $^{\circ}\text{C}$ (Boone *et al.*, 1990; Allison *et al.*, 1965)。Brinister 等(1969)研究了 42~45 $^{\circ}\text{C}$ 就会对小鼠胚胎造成严重的损害。甚至是致死性的;Putney 等(1988)研究表明温度过高还会增加怀孕母牛的胚胎死亡率或流产率。在气象环境中,CO<sub>2</sub>是关键因素,应该用 CO<sub>2</sub>检测仪测试培养

箱中的浓度。商业用的 CO<sub>2</sub> 气体中，一般混有 CO 或酒精，它们对胚胎有不利影响，应该设法除去(秦鹏春等,2001)。光对胚胎的发育也日益引起人们的重视。虽然还没有光的强度与胚胎活力关系的资料，但事实已经证明，光对胚胎有不良的作用。为了防止培养液浓度变化和 pH 的变化对胚胎发育的不利影响，CO<sub>2</sub> 培养箱中一定要保持 99%~100% 的相对湿度。培养系统中还有很多因素对胚胎来说都很关键，如器具的选择和洗涤、培养液的渗透压、pH 等(严云勤等,1995)。

### 1.3.1 常规培养系统

常规培养法目前已经成为胚胎体外生产的主要方法。常规培养系统分为微滴法和培养板法(Cross P C *et al.*,1973)。胚胎培养一般用微滴法培养，刘恩岐等(2002)对小鼠胚胎用 24 孔培养板和 3.5cm 培养皿微滴培养作了比较，统计分析显示，胚胎短期培养时，两种培养方法在胚胎发育方面无明显差异( $P>0.05$ )，但较小培养液体积更容易建立一个有利于胚胎发育的微环境。采用微滴培养，一般是在塑料培养皿中制作 30~100ul 的微滴，上覆盖石蜡油，然后将胚胎置入其中培养，培养数目一般在 20 枚左右发育效果较好(陈系古等,1998；张守全等,1995；刘忠华等,1999)。采用四孔板培养法这样的操作相对比较简单，直接将胚胎置入 500~800ul 培养液的四孔培养板中培养(苗聪秀等,1999)。

### 1.3.2 共培养系统

共培养 (Co-Culture) 是通过把胚胎与体细胞在体外共同培养，以促进胚胎体外发育提高胚胎质量的一种胚胎培养方法。用于共培养系统的体细胞有输卵管上皮细胞、滋养层细胞、颗粒细胞、子宫内膜细胞、肾细胞和水牛、大鼠肝细胞等。Gandofil(1998) 将牛胚胎与输卵管上皮细胞等共同培养有效地克服了胚胎阻滞；杨健之等(1999) 通过人子宫内膜上皮与小鼠胚胎共培养，发现 2-细胞胚胎阻断数目显著减少，而且胚胎质量有了很大的提高；钟瑜等(1996)研究证明人输卵管上皮细胞共培养系统可以促进小鼠胚胎体外发育率。但目前共培养的作用机理目前还不是很清楚，比较认同的推理有(王旭光,2003)：1)体细胞能分泌一些有益因子，如各种分子量的生长因子和细胞激酶，加速细胞分裂；2)去除了培养液中的重金属物质代谢抑制剂和细胞毒性物质；3)降低培养基的氧分压，从而减少过氧化物自由基的产生(Bavister, 1988)。

胚胎体外共培养系统有效地促进了哺乳动物早期胚胎的发育。但也存在一些缺点如

体细胞可能充当病原的传播载体, 由于现有的培养方法还不能完全模拟出与哺乳动物生殖道一样的胚胎发育环境, 因此, 对体外共培养系统的研究还有待于改善和进一步优化。

### 1.3.3 序贯培养系统

哺乳动物胚胎移植前从母型调控向合子型调控的过渡过程中, 尤其是胚胎从输卵管进入子宫的过程中, 经历了许多重要的生理, 环境变化, 同时对营养物吸收的方式也发生了改变, 对养分的需求也各不相同, 因此, 可以根据胚胎发育的特点, 适时、适量的调整培养基成分, 使之更适合于胚胎的发育。在早期胚胎的发育过程中, 可以使用两种或两种以上的培养基以适应胚胎发育的需要(Gardner 等, 2000)。可见, 序贯培养是根据所培养的胚胎在不同生长时间里对不同物质的需求和代谢的不同, 针对不同发育时期的胚胎采用不同的培养基的一种培养方法。Gardner 等(2000)配置了 G1/G2 序贯培养液, G1 含有与输卵管液相同的碳水化合物以及早期胚胎分裂期必需的 EAA、NEAA, 谷氨酰胺和 EDTA, 用于配子至 8-细胞期的体外培养, G2 和 G1 的主要区别是去除了抑制 ICM 发育和囊胚形成的 EDTA 成分, 碳水化合物含量与子宫相同。同时含有 EAA 和 NEAA 从而用于 8-细胞期至囊胚的培养。G1/G2 是目前最常用的序贯培养液, 其他常用的商品化序贯培养液还有 S1、S2、Q1、Q2、Q3、P1、P2 等系列培养液。目前, 在人胚胎的体外培养上应用序贯培养基后, 52%的受精卵发育到囊胚期, 临床妊娠率达 38.2%(Jones 等, 1998)。

## 1.4 胚胎体外培养存在的问题及展望

胚胎的体外培养已有百余年的发展历史, 就维持胚胎存活而言, 目前胚胎培养的基本问题已经解决, 体外培养作为基础技术已经广泛地应用于胚胎工程研究和实践的各个方面。但胚胎体外培养的效率和质量还不高, 还存在许多尚未解决的问题: 1) 体外受精卵的囊胚发育率远低于体内受精卵, 与体内囊胚相比, 体外受精囊胚细胞数目少, 产犊率低, 胎儿出生过重等(Sinclair 等, 2000 or Lane, 2001)。蒋和生等(1994)提到评定牛胚胎活力最常用的标准是胚胎细胞核数量和形态, 胚胎的活力随着细胞核数量的减少而降低。实践也证明, 体外培养的胚胎移植妊娠率和胎儿出生率与囊胚细胞球的数量密切相关(郭年藩摘译, 1993)。2) 胚胎发育到桑椹期后有相当比例的胚胎凋亡, 不能发育至囊胚期等(高建明, 2003)。3) 几乎所有的哺乳动物在体外培养过程中都存在着早期发育阻

断 (in vitro block of development) 现象, 即胚胎发育到一定阶段后停止并发生退化现象。小鼠胚胎发生在 2-细胞早期, 仓鼠在 2-、4-、8-细胞期, 大鼠在 2-、4-细胞期, 猪在 4-细胞期, 牛、山羊、绵羊、猕猴在 8~16-细胞期, 人在 4~8-细胞期 (Brackett 等, 1982)。4) 胚胎代谢所产生的自由基, 如过氧化氢、过氧化物阴离子及氢氧根离子等影响胚胎的正常卵裂(严云勤等,1995)。高氧浓度可通过氧自由基对胚胎产生毒性作用(云玉琴等,2002; 刘斌, 2002); 囊胚对过量的脂质自由基的损伤也极为敏感(Nonogakit 等, 1994)。5) 培养液的成分、浓度以及培养条件的不适, 在不同动物中也会引起胚胎发育阻断和发育率不良(严云勤等,1995)。以上种种问题均严重影响了胚胎工厂化生产, 影响了胚胎产业化的进程。因此, 如何获得更多地具有高活力的可操作的桑椹胚、囊胚一直是胚胎体外培养的研究热点。

目前, 普遍采用的方法是改变培养液的成分, 改善培养的条件、方法来提高囊胚发育率。虽然, 建立了体细胞与胚胎共培养的体系以及各种生长因子的利用, 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, 从改善胚胎体外培养的微环境和调控胚胎发育的分子水平上来寻找新的途径和方法就十分有必要。

## 2 小檗碱、黄芩苷和黄芪多糖在体外试验中的应用现状

近年来, 中草药的研究引起了国内外学者的高度重视, 新的作用和机理不断涌现, 由于多效、长效和低毒副作用等优点, 其有效成份在体外实验中得到广泛的应用。本文以常见中草药黄连、黄芩、黄芪的主要成分小檗碱、黄芩苷和黄芪多糖在体外实验中应用现状做以下综述。

### 2.1 小檗碱

小檗碱(BR)是存在于中药黄连中的主要生物碱。中药黄连主要指的是毛茛科(Ranunculaceae)黄连(*Coptis chinensis* Franch)、三角叶黄连(*Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao)、云连(*Coptis teeta* wall)的干燥根茎。黄连味苦、性寒。入心、肝、胃、大肠经。具有清火燥湿、泻火解毒的功效。在《全国中成药品种目录》中, 以黄连作为原料的中成药品种就有 108 种(兰进等, 2001)。作为黄连有效成份的小檗碱是一种苯并异喹啉类季胺型生物碱; 最初作为清热解毒药和抗菌药应用于临床, 是一种没有细胞毒和致突变作用的、具有广泛用途的药物。

#### 2.1.1 抗微生物

体外抑菌实验证明(吴移谋等,1994; 严梅桢等,1998), 小檗碱具有广谱抗菌作用(Cernakova 等, 2002)。对葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌、霍乱弧菌、炭疽杆菌及除宋内氏以外的痢疾杆菌均有较强的抗菌作用; 对枯草杆菌、结核杆菌、鼠疫杆菌、布氏杆菌等也有抗菌作用。小檗碱低浓度抑菌而高浓度杀菌。小檗碱抗微生物作用的机制至今尚未阐明。曾有报道(刘锡光,1984), 小檗碱能强烈抑止酵母和细菌糖代谢中间环节丙酮酸的氧化脱羧过程; 可与 DNA 形成复合物, 从而抑制 DNA 的合成、复制和转录。王本祥(1999)认为小檗碱可能是一种细菌细胞的毒性物质, 其作用机理尚待深入研究。

#### 2.1.2 对血小板聚集和释放的作用

小檗碱对胶原、花生四烯酸(AA)等多种诱导剂所诱发的血小板聚集和 ATP 释放的抑制作用最为强烈。小檗碱的作用机理, 可能与抑制 AA 代谢和胞内  $Ca^{2+}$  升高和(或)升高 cAMP 有关, Hui 等(1991)在人血小板体外实验中还证明小檗碱可使 cAMP 升高,

亦可抑制其升高，视不同条件而定。

### 2.1.3 细胞免疫调节作用

小檗碱有增强非特异性免疫功能，抑制特异性免疫作用，有免疫调节作用。郝钰等(1999)体外实验研究证明小檗碱对淋巴细胞与血管内皮细胞粘附及粘附分子的影响，结果证明通过抑制细胞表面粘附分子的表达而抑制淋巴细胞与内皮细胞的粘附，从而抑制淋巴细胞再循环，可能是小檗碱发挥免疫抑制作用的机制之一。另外，体外肝细胞研究表明(Huang 等, 2002)，BR0.01~1.0mmol/L 能明显降低叔丁基过氧化氢(t-BHP)诱导的LDH 和 ALT 的释放以及丙二醛的生成，并且小檗碱还能够减轻 t-BHP 诱导的谷胱甘肽的降低。

Ko 等(2000)对离体大鼠肠系膜动脉研究显示，BR 是通过作用于血管内皮和平滑肌细胞两种途径而产生血管松弛作用。血管内皮释放 NO 是 BR 产生血管松弛作用的内皮依赖性机制，非内皮依赖性的松弛作用可能是通过激活 4-戊胺、4-氨基吡啶、Ba<sup>2+</sup>敏感的 K<sup>+</sup>通道和抑制细胞内咖啡因敏感的钙池 Ca<sup>2+</sup>释放或者是直接的血管松弛作用。推测小檗碱还有促进细胞分泌 NO 的作用。

## 2.2 黄芩苷

黄芩苷(Baicalin, C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>)是唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis georgi*)的有效成份之一，属葡萄糖醛酸苷类，水解后产生黄芩素和葡萄糖醛酸，具有清热解毒、抗炎、利胆、降压、利尿、抗变态反应等多方面的作用。黄芩苷是黄芩最主要的有效成分。近年来随着国际上对黄芩苷研究的持续升温以及认识的逐步深入，认为黄芩苷在清除氧自由基、减轻组织的缺血再灌注损伤、调节免疫、抑止细胞凋亡以及抗肿瘤和 HIV 等多方面均有作用。

### 2.2.1 清除氧自由基及抗氧化作用

研究表明(Ng TB 等, 2000)，黄酮类的自由基清除活性与其所含有的酚羟基数量和结构密切相关，黄芩苷的酚羟基数量较黄芩中其它的有效成分为多，且 A 环中含有邻二酚结构，因而具有较强的自由基清除活性。谭廷华等(1997)用荧光法检测黄芩苷对 Fenton

反应生成的 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用的体外研究结果证实,黄芩苷对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用强于 $\cdot\text{OH}$ 特异性清除剂甘露醇,两者的半数有效浓度 $\text{EC}_{50}$ 。分别为 $0.039\text{ mmol/L}^{-1}$ 和 $6.7\text{ mmol/L}^{-1}$ 。黄芩苷还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(Shimizu 等, 1999)。

### 2.2.2 对微生物的抑制作用

黄芩的抗微生物的作用已早为医学界所认识,其清热解毒作用的实质就是对细菌和病毒等致病原的抑制或杀灭作用。近年来对黄芩的黄酮类提取物对微生物的作用有了进一步的深入研究。体外培养证实,黄芩苷能抑制金黄色葡萄球菌外毒素诱发的T淋巴细胞的增殖,降低炎症介质IL-1、IL-6及TNF和巨噬细胞炎症蛋白(macrophage inflammatory protein, MIP)的水平,进一步的分子生物学研究还证实,黄芩苷降低了MILp及其mRNA的表达。Krakauer 等(2001)认为黄芩苷减轻金黄色葡萄球菌外毒素诱发的病理损害可能是通过阻断细胞的信号通讯通路而发挥作用。

### 2.2.3 对细胞凋亡的影响

近年来国内外对中药治疗肿瘤的研究发现(Dong *et al.*,1997; Matsuzaki 等, 1996),复方或单味药的有效成分如生物碱和黄酮类化合物能有效抑制肿瘤细胞的生长及诱导肿瘤细胞的凋亡。离体细胞培养试验显示,黄芩苷能抑制3种人肝癌细胞株(Human hepato cellular carcinoma cell lines)的增殖,诱导KIM1细胞发生凋亡。Matsuzaki 等(1996)认为黄芩苷诱导肿瘤细胞发生凋亡的机制与有效抑制DNA复制的拓扑异构酶2活性有关,但拓扑异构酶2活性抑制尚不足以完整解释其诱导细胞凋亡的机制。Chenn 等(2001)认为,黄芩苷不仅能调节细胞周期,而且能够通过上调促进凋亡基因p53、Bax,下调凋亡抑制基因bcl2、bcl6的表达,同时抑制肿瘤细胞的增殖而表现为抑制肿瘤的生长。在黄芩苷的保肝机制研究中发现不同浓度的黄芩苷对肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ )诱导的大鼠肝细胞凋亡均有明显的抑制作用,浓度越低,作用越明显,推测这一现象可能与随着黄芩苷浓度的增加,细胞毒作用也随之增强有关。胡聪等(2001)等也研究表明黄芩苷能抑止肝细胞凋亡。

## 2.3 黄芪多糖

黄芪又称黄耆，为豆科植物内蒙黄芪的根，野生或栽培。味甘、性微温，入脾肺二经。是我国著名的常用滋补中草药，已有 2000 多年的历史，中医认为具有“补中益气，扶正固本”的药理作用。在兽医临床上主要作为补虚药或预防用药，常配合它药使用，如补中益气汤和玉屏风散。但也有用作禽、猪、兔、羊、鹿的添加剂，取得了较好的效果。

黄芪多糖(astragalus polysaccharides, APS)是黄芪的主要活性成分之一。主要由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖组成。

### 2.3.1 免疫调节作用

黄芪多糖能够促进巨噬细胞的吞噬功能，又能促进 B 细胞的增殖，并且抑止总补体活性。周淑英等(1994)黄芪多糖对白细胞介素-2(IL-2)功能的影响研究表明，黄芪多糖能促进外周血淋巴细胞(PBL)的增殖，对辅助性 T 细胞(Th)功能有明显的促进作用，而对抑止性 T 细胞(Ts)无明显刺激作用。黄芪多糖抑止病毒感染的作用与诱生干扰素作用有关。黄芪多糖通过促进病毒诱生使肺及血清的干扰素显著增加，且提高细胞对干扰素的敏感性。黄芪多糖还有增强自然杀伤细胞(NK)的作用(金虹等,1989)。

### 2.3.2 抗病原微生物的作用

黄芪多糖在体外对志贺氏痢疾杆菌、炭疽杆菌、 $\alpha$ -溶血性链球菌、 $\beta$ -溶血性链球菌、白喉杆菌、假白喉杆菌、肺炎双球菌、金黄色葡萄球菌、柠檬色葡萄球菌、白色葡萄球菌和杆草杆菌等有抗菌作用(赵永华等,2000)。

在鼠肾细胞培养中，不论在滤泡性口腔炎病毒攻击前或后加入黄芪多糖，用药组细胞上病毒都比对照组为低，说明黄芪多糖对病毒在细胞培养中对细胞的致病性有一定的抑制作用。

孙成文等(1996)研究证明，黄芪多糖可能通过增强超氧化物歧化酶(SOD)活性，促进氧自由基清除起作用。

黄芪可以促进细胞增殖作用，目前报道很多(雷燕等,2003；张子理等,2002)。作为黄芪主要成分的黄芪多糖也有促进细胞增殖的作用，李光善等(2004)研究证明黄芪多糖对实验性糖尿病大鼠创面成纤维细胞有增殖作用；李萍等(2004)研究证明黄芪多糖对成纤维细胞有增殖作用；而目前报道最多的是关于黄芪多糖促进免疫细胞的增殖(赵永华

等,2000; 孔祥峰等, 2003)。

## 2.4 展望

目前, 中草药以其低毒副作用、无抗药性、相对安全、不良反应少等特点。被广泛的运用于医药、饲料、化妆、食物等领域。随着他重视程度的提高, 新的作用和机理不断的被发现。

中草药及方剂的一个最大特点是能从整体上、多靶点、全方位改善机体的生理状况。由于中草药抗菌抗病毒作用的优点是范围广、毒性底、无残留以及与西药合用有增效与减毒等优点(阮娜等,2003), 由于中草药中的某些有效成份对细胞的增殖有促进作用(刘玉鹏等,2000); 一些中草药是天然抗氧化剂资源, 而且各种抗衰老的中药产品应用越来越多。一些细胞培养中添加中草药成分也取得了很好的效果; 近年来, 中药制剂对 cAMP 的影响(关钧,1989; 孙忠亲,1990)、抗氧自由基(房俊芳等,2003; 阮娜等,2003)、保胎(房俊芳,2004)、促精子活力(梁培育等,2001)等方面的研究报道中表明中药有着重要作用。将中药用于胚胎的体外培养, 邸冉、高建明(2004)的相关研究已经发现, 中药对胚胎的发育具有一定的促进作用, 而国内外未见诸其他报道。中药有效成份是否能够调控胚胎生长发育的微环境, 并且在抗菌、抗过氧化物方面、促进胚胎细胞增殖等方面发挥了综合作用, 还有待进一步深入研究。鉴于目前胚胎体外培养的研究现状和试验室的研究基础及中药有效成分的药理作用特点, 添加中药成份对胚胎体外培养, 可能为提高囊胚发育率和胚胎质量开辟一条新的途径, 有待研究。

### 3 本研究的目、意义及内容

本研究以添加双抗的 mCZB 液为对照组，主要比较在 mCZB 液中直接添加小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖成分对小鼠 2-细胞胚胎体外生长发育的影响，筛选其最佳浓度；并将三种药物最佳浓度所培养的孵化胚胎进行细胞计数，观察中药成分对胚胎细胞数目增殖的作用；通过将体外培养发育的囊胚进行移植，进一步观察中药成分对小鼠胚胎移植效果和产仔发育的影响。以期通过添加一定的中药有效成分来改善小鼠胚胎体外培养的微环境，从而提高胚胎体外发育率和胚胎质量，为其他哺乳动物胚胎体外培养提供有价值的参考方案，也为进一步克服胚胎体外培养系统存在的缺陷开辟一条新的途径。

本研究主要探讨以下三方面的内容：

- 1、小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖对小鼠 2-细胞胚胎体外培养效果的筛选试验；
- 2、小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖对小鼠 2-细胞胚胎发育至孵化期细胞数目的影响；
- 3、小檗碱、黄芩苷对小鼠早期胚胎移植效果的影响。

## 第二章 试验部分

### 试验一 小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖对小鼠 2-细胞胚胎 体外培养效果的筛选试验

目前,小鼠胚胎的体外操作已经成为有关实验室进行胚胎生物工程操作的基本技术之一。在体内生理条件下,胚胎的发育主要从输卵管和子宫壁腺体分泌物中汲取营养。显然,在体外培养条件下,培养液模拟的体内环境对早期胚胎的存活和发育至关重要。胚胎移植、胚胎分割、动物克隆(胚胎细胞克隆、体细胞克隆)、胚胎的性别鉴定和转基因等胚胎操作技术的应用也需要为早期胚胎提供一个适宜、可行的体外培养环境。目前,体外培养的胚胎发育至桑椹期后有相当比例的胚胎凋亡,不能发育至囊胚期(高建明,2003)。而胚胎发育至囊胚阶段,胚胎移植妊娠成功率则会大大增加。因而,体外培养的早期胚胎的活力是一十分重要的因素。然而,目前体外培养胚胎发育率较低,其细胞数量偏少,移植妊娠率低,因此,探讨改进胚胎体外培养体系十分必要。

体外培养的基本条件之一是无菌操作,为了防止因操作不严格而造成的污染,培养液内一般常常加入一定量的抗菌素,最常用的是青霉素和链霉素,而抗菌素对体外胚胎的生长发育是否有不良影响,还有待探讨;体外培养条件下的胚胎,其代谢会产生一定的自由基,高氧浓度的自由基对胚胎产生毒性(Flood *et al.*,1988),如过氧化氢、过氧化物阴离子、氢氧根离子等影响胚胎的正常卵裂和进一步发育。目前的研究表明,中草药中的某些有效成份对细胞的增殖有促进作用(阮娜,2003),而且具有一定的抗氧化作用(刘玉鹏,刘梅等,2000)和激素作用(姚石安,1996)等。鉴于中药有效成分多靶点、全方位的药理作用特点,基于本实验室前期应用中药成份对小鼠胚胎体外培养的初步研究(邸冉,高建明,2004),本试验以小鼠 2-细胞胚胎为材料,在培养液中直接添加小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖成分,比较其对胚胎体外发育的影响,并筛选其最佳浓度,以期初步建立适宜胚胎体外发育的添加中药成份的培养体系,从而期望提高胚胎体外发育率和胚胎质量,为今后进一步克服胚胎体外培养系统存在的缺陷开辟一条新的途径。

## 1. 材料与方 法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验动物

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 29~32g, 雄鼠体重 33~35g, 雌雄分笼饲养在室温、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, 按常规方法对雌鼠进行超数排卵处理。

#### 1.1.2 主要仪器设备

|  |                               |                    |
|--|-------------------------------|--------------------|
| CO <sub>2</sub> 培养箱                        | 日本三洋公司                        | 型号: SANYO MCO-15A  |
| 电热恒温板                                      | 广州市富家电器厂                      | 型号: KH-P331        |
| 体视显微镜                                      | 麦克奥迪实业有限公司                    | 型号: MOTIC、M-400(H) |
| 超洁净工作台                                     | 苏州净化设备公司产品                    | 型号: YJ-875SA       |
| MILIQ 纯水器                                  | Milipore                      | 型号: 基础型            |
| 4℃冰箱                                       | 海尔电冰箱厂                        | 型号: BCD-289BSW     |
| -20℃冰柜                                     | 海尔集团青岛电冰柜总厂                   | 型号: BD-200A        |
| 电子天平(Max=110g d=0.0001g)                   | ACCULAB                       | 型号: ALC-110.4      |
| 培养皿(∅=35mm×10mm)                           | 丹麦 NUNC 公司                    | 批号: 039398         |
| 滤膜(22 μ m)                                 | 上海医药工业研究院                     | 批号: 030927         |
| 移液器(规格:0.5~5ul、5~50ul、20~200ul、100~1000ul) | Germany BRAND / France GILSON |                    |
| 针头式加压塑料小滤器                                 | (国产)                          |                    |
| 玻璃注射器(2ml、5ml、10ml)及国产 4 号针头               |                               |                    |
| 自制无菌移卵吸管                                   | (巴氏管)                         |                    |
| 眼科手术剪                                      | (国产)                          |                    |
| 眼科手术镊子                                     | (国产)                          |                    |
| 表面皿  | (国产)                          |                    |

### 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% 天津药物研究院         |
| 黄芩苷(Baicalin, Bai),                                 | 纯度≥97% 天津药物研究院         |
| 黄芪多糖(Astragalus Polysacharin, APS),                 | 纯度=75% 本实验室提取          |
| 孕马血清促性腺激素 (PMSG) 1000IU/支,                          | 批号: 20040403, 天津试验动物中心 |
| 人绒毛膜促性腺激素 (hCG) ,1000IU/支,                          | 批号: 20031012, 宁波市激素制药厂 |
| 氯化钠 (NaCl), A.R.                                    | 批号: 981030, 北京化工厂      |
| 氯化钾 (KCl), A.R.                                     | 批号: 960330, 北京二环化学试剂厂  |
| 磷酸二氢钾 (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), A.R.      | 批号: 850228-1, 北京红星化工厂  |
| 结晶氯化钙 (CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O), A.R. | 批号: 961030, 浙江省兰溪城南化工厂 |
| 结晶硫酸镁 (MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O), A.R. | 批号: 820917, 北京五七六〇化工厂  |
| 碳酸氢钠 (NaHCO <sub>3</sub> ), A.R.                    | 批号: 950213, 北京市化学试剂厂   |
| 丙酮酸钠 (Sodium Pyruvate),                             | 批号: 1013865, GIBCOBRL  |
| 乳酸钠 (DL-Lactic acid),                               | 16H50495, Sigma        |
| 牛血清白蛋白 (BSA),                                       | BP0024, Sigma          |
| 谷氨酰胺 (L-Glutamine),                                 | 2AP4171, GIBCOBRL      |
| 葡萄糖 (Glucose), A.R.                                 | 批号: 841123, 天津化学试剂三厂   |
| 青霉素 (Penicillin),                                   | BAO945-3, Sigma        |
| 硫酸链霉素 (Dihydrostreptomycin),                        | BA0920, Sigma          |
| mPBS(杜氏磷酸缓冲液),                                      | 450-1500EA, GIBCOBRL   |
| 矿物油 (Minoral Oil),                                  | M8410, Sigma           |
| 已二氨四乙酸二钠 (EDTA-Na <sub>2</sub> ),                   | BH0054, Sigma          |
| 牛磺酸   | BS0012, Sigma          |
| 酚红(Phenol red), A.R.                                | 批号: 891388, 军事医学科学院    |

#### 1.1.3.2 溶液配制

### **mCZB 基础培养液:**

mCZB 基础培养液由 mCZB 贮液 A 液(NaCl、KCl、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )和贮液 B 液( $\text{NaHCO}_3$ )充分混匀后,添加葡萄糖、谷氨酰胺、丙酮酸钠、BSA 等混合而成的。详见附表 1(Chatot *et al.*,1989)。基础培养液一般需要现用现配。其中 A、B 液,葡萄糖、谷氨酰胺、丙酮酸钠等可事先配制成贮液于 4℃或-20℃温度下贮藏。配制时所称量药物依次加入超纯水中,待前一种药物完全溶解后再加入后一种药物,然后定容,抽滤除菌,分装,标记后于冰箱中保存备用。

### **mPBS 冲卵液:**

取  $\text{CaCl}_2$ 100mg、 $\text{MgSO}_4$ 121mg 和  $\text{NaCl}$ 800mg、 $\text{KCl}$ 200mg、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2881mg、葡萄糖 1000 mg、丙酮酸钠 36 mg 分别用 500ml 纯水溶解并定容,然后将后者缓缓加入前者中,并不断的摇动,充分混匀后,加入青霉素 0.625g、硫酸链霉素 0.1g、血清 10ml,抽滤除菌,分装,标记后于 4℃冰箱冷藏备用(附表 2)。

### **添加中药有效成分培养液:**

在 mCZB 基础培养液中分别加入中药有效(小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖)成分,充分混匀后,抽滤除菌,标记。

## **1.2 试验方法**

### **1.2.1 2-细胞胚胎获取**

根据小鼠阴部变化选择动情间期和动情前期雌性小鼠于 19:00 腹腔注射 PMSG10IU/只,48h 后腹腔注射 hCG10IU/只(傅文栋等,2005)。注射 hCG 后即与公鼠按 1:1 合笼。次日 8:00 检查阴道栓,凡阴门处有黄色(白色)物堵塞的判为有栓。注射 hCG 47h 后以颈部脱臼法处死雌鼠,腹部消毒后,打开腹腔,取出输卵管和卵巢,将卵巢和子宫浸泡在盛有 mPBS(2ml 左右)的表面皿中,分离子宫和卵巢上的脂肪等,体视显微镜下找到输卵管壶腹膨大部,挑破膨大部获得 2-细胞胚胎。迅速将胚胎转入 37℃的 mPBS。选择形态正常、卵裂球均一、透明带完整的胚胎转入基础培养液洗涤 3 次,然后平均分布到各试验组培养液中洗涤 2 次后入微滴进行培养。

### 1.2.2 胚胎培养

在培养皿中制备 50 $\mu$ l 的培养液(不同试验组别)小滴, 然后覆以矿物石蜡油。放入饱和湿度, 5%CO<sub>2</sub>、95%空气、37℃的 CO<sub>2</sub> 培养箱中平衡 2h 以上。然后将已洗涤好的胚胎, 用移卵针吸入到平衡好的培养小滴中, 置入培养箱开始培养。每个微滴中移入 10 枚左右的胚胎。入胚后 15h 换加葡萄糖 mCZB 培养液, 以后每间隔 48h 换液一次, 分别于入培后 48h、72h、96h、120h 检查胚胎发育状况。

### 1.2.3 试验设计

以 mCZB 为基础培养液。根据中药成分药理作用和药品来源初步选出黄连有效成分小檗碱 (BR)、黄芩有效成分黄芩苷 (Bai)、黄芪有效成分黄芪多糖 (APS), 作为添加的中药成分来筛选其对早期胚胎体外发育的影响。共设置 3 个试验 (BR 试验、Bai 试验、APS 试验), 分别筛选其适宜浓度。其设计方案见表 1-1。

表 1-1 试验组别设计

| 试验方案   | 对照组  |   | 试验 1 组                           | 试验 2 组                           | 试验 3 组                           | 试验 4 组                           | 试验 5 组                           |
|--------|------|---|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|        | 基础液  | 添加双抗                                      |                                  |                                  |                                  |                                  |                                  |
| BR 试验  | mCZB | 青霉素<br>(0.06mg/ml)<br>+链霉素<br>(0.07mg/ml) | mCZB<br>+BR<br>(0.08 $\mu$ g/ml) | mCZB<br>+BR<br>(0.09 $\mu$ g/ml) | mCZB<br>+BR<br>(0.10 $\mu$ g/ml) | mCZB<br>+BR<br>(0.11 $\mu$ g/ml) | mCZB<br>+BR<br>(0.12 $\mu$ g/ml) |
| Bai 试验 | mCZB | 青霉素<br>(0.06mg/ml)<br>+链霉素<br>(0.07mg/ml) | mCZB<br>+Bai<br>(2 $\mu$ g/ml)   | mCZB<br>+Bai<br>(3 $\mu$ g/ml)   | mCZB<br>+Bai<br>(4 $\mu$ g/ml)   | mCZB<br>+Bai<br>(5 $\mu$ g/ml)   | mCZB<br>+Bai<br>(6 $\mu$ g/ml)   |
| APS 试验 | mCZB | 青霉素<br>(0.06mg/ml)<br>+链霉素<br>(0.07mg/ml) | mCZB<br>+APS<br>(30 $\mu$ g/ml)  | mCZB<br>+APS<br>(45 $\mu$ g/ml)  | mCZB<br>+APS<br>(60 $\mu$ g/ml)  | mCZB<br>+APS<br>(75 $\mu$ g/ml)  | —                                |

### 1.3 小鼠胚胎发育时期判定

本试验不同培养时间胚胎发育形态见表 1-2。

表 1-2 胚胎形态学判定

| 发育时期     | 形态特征  |
|----------|---|
| 桑椹胚(M)   | 卵裂球隐约可见, 细胞团的体积几乎占满卵周隙.                             |
| 致密桑椹(CM) | 卵裂球在桑椹的基础上进一步分裂变小, 看不清楚卵裂球的界线, 细胞团收缩至卵周间隙的 60%~70%。 |
| 早期囊胚(EB) | 出现透明的囊胚腔, 但难以区分清内细胞团和滋养层, 细胞团占卵周间隙的 70%~80%。        |
| 囊胚(B)    | 囊胚腔增大明显, 内细胞团和滋养层细胞界线清晰, 细胞充满了卵周间隙。                 |
| 扩张囊胚(XB) | 囊胚腔充分扩张, 体积增至原来的 1.2~1.5 倍, 透明带变薄, 相当于厚度的 1/3。      |
| 孵化囊胚(HB) | 透明带破裂, 内细胞团脱出透明带。                                   |

## 1.4 数据处理

采用 DPS 专业版统计软件对数据进行卡方独立性检验。

## 2 结果

### 2.1 小檗碱对小鼠 2-细胞胚胎体外培养效果的筛选结果

试验设立基础液为对照组; 小檗碱(BR)浓度经 8 个批次, 538 枚胚胎的体外培养后, 初步筛选出 5 个浓度组, 再进一步筛选其最佳浓度。观察对照组与试验组对胚胎体外生长发育的影响。其结果见表 1-3。

表 1-3 小檗碱对小鼠 2-细胞胚胎发育的影响

| 试验设计 | 批次/次 | 培养数目/枚 | 48h                         | 72h                         | 96h                        | 120h                        |
|------|------|--------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|      |      |        | (M/入培数) M%                  | (B/入培数) B%                  | (XB/入培数) XB%               | (HB/入培数) HB%                |
| 对照组  | 9    | 73     | (73/73) 100 <sup>a</sup>    | (64/73) 87.6 <sup>a</sup>   | (53/73) 72.6 <sup>a</sup>  | (37/73) 50.7 <sup>Aa</sup>  |
| 试验 1 | 8    | 74     | (72/74) 97.3 <sup>a</sup>   | (71/74) 95.9 <sup>a</sup>   | (67/74) 90.1 <sup>b</sup>  | (58/74) 78.3 <sup>Bb</sup>  |
| 试验 2 | 8    | 105    | (104/105) 99.0 <sup>a</sup> | (102/105) 97.1 <sup>a</sup> | (99/105) 94.2 <sup>b</sup> | (93/105) 88.6 <sup>Bc</sup> |
| 试验 3 | 8    | 99     | (97/99) 98.0 <sup>a</sup>   | (96/99) 97.0 <sup>a</sup>   | (96/99) 97.0 <sup>b</sup>  | (93/99) 89.9 <sup>Bc</sup>  |
| 试验 4 | 9    | 97     | (95/97) 97.9 <sup>a</sup>   | (89/97) 91.8 <sup>a</sup>   | (85/97) 87.6 <sup>b</sup>  | (81/97) 83.5 <sup>Bc</sup>  |
| 试验 5 | 8    | 72     | (67/72) 93.1 <sup>a</sup>   | (65/72) 90.2 <sup>a</sup>   | (62/72) 86.1 <sup>b</sup>  | (51/72) 70.8 <sup>Bb</sup>  |

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 1-3 可见，体外培养 48h、72h，2-细胞胚胎发育至桑椹胚和囊胚发育率，对照组和试验各组间及试验组之间均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。体外培养 96h，试验各组扩张囊胚发育率均显著好于对照组 (72.6%) ( $P < 0.05$ )，各试验组间无显著差异 ( $P > 0.05$ )，其中以试验 3 组发育率最高 (97.0%)；试验各组 120h 孵化胚胎发育率极显著高于对照组 (50.0%) ( $P < 0.01$ )，试验组间以试验 2、3、4 组孵化胚胎发育率显著高于试验 1、5 组 ( $P < 0.05$ )，其中以试验 3 组发育率最好 (89.9%)。

## 2.2 黄芩苷对小鼠 2-细胞胚胎体外培养效果的筛选结果

同 BR 试验，试验设立基础液为对照组；黄芩苷 (Bai) 经 5 个批次，221 枚胚胎的体外培养初步筛选后，选出 5 个浓度组再进一步筛选其最佳浓度。观察对照组与试验组对胚胎体外生长发育的影响。其结果见表 1-4。

表 1-4 黄芩苷对小鼠 2-细胞胚胎发育的影响

| 试验设计 | 批次/次 | 培养数目/枚 | 48h                       | 72h                       | 96h                       | 120h                      |
|------|------|--------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|      |      |        | (M/入培数)<br>M%             | (B/入培数)<br>B%             | (XB/入培数)<br>XB%           | (HB/入培数)<br>HB%           |
| 对照组  | 8    | 90     | (85/90) 94.4 <sup>a</sup> | (72/90) 80.0 <sup>a</sup> | (64/90) 71.1 <sup>a</sup> | (43/90) 47.8 <sup>a</sup> |
| 试验 1 | 8    | 90     | (81/90) 90.0 <sup>a</sup> | (71/90) 78.9 <sup>a</sup> | (55/90) 61.1 <sup>a</sup> | (43/90) 47.8 <sup>a</sup> |
| 试验 2 | 8    | 84     | (71/84) 84.5 <sup>a</sup> | (72/84) 85.7 <sup>a</sup> | (55/84) 65.5 <sup>a</sup> | (48/84) 57.1 <sup>b</sup> |
| 试验 3 | 7    | 78     | (72/78) 92.3 <sup>a</sup> | (66/78) 84.6 <sup>a</sup> | (62/78) 79.5 <sup>a</sup> | (50/78) 64.1 <sup>b</sup> |
| 试验 4 | 8    | 89     | (88/89) 98.9 <sup>a</sup> | (77/89) 86.5 <sup>a</sup> | (67/89) 75.3 <sup>a</sup> | (51/89) 57.3 <sup>b</sup> |
| 试验 5 | 6    | 70     | (61/70) 87.1 <sup>a</sup> | (57/70) 81.4 <sup>a</sup> | (49/70) 70.0 <sup>a</sup> | (32/70) 45.7 <sup>a</sup> |

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 1-4 可见，体外培养 2-细胞胚胎 48h、72h、96h，对照组和各试验组及试验组间胚胎发育率均无显著差异 ( $P > 0.05$ )；体外培养 120h，试验 2 组(57.1%)、试验 3 组(64.1%)、试验 4 组(57.3%)孵化胚胎发育率显著高于对照组(47.8%) ( $P < 0.05$ )，试验组间以试验 2、3、4 组孵化胚胎发育率显著高于试验 1、5 组 ( $P < 0.05$ )，其中试验 3 组孵化胚胎发育率最高(64.1%)。

### 2.3 黄芪多糖对小鼠 2-细胞胚胎体外培养效果的筛选结果

同 BR 和 Bai 试验，试验设立基础液为对照组；黄芪多糖(APS) 浓度经 8 个批次，500 枚胚胎的初步培养筛选后，选出了 4 个浓度组再进一步筛选其最佳浓度。观察对照组与试验组对胚胎体外生长发育的影响。其结果见表 1-5。

表 1-5 黄芪多糖对小鼠 2-细胞胚胎发育的影响

| 试验设计 | 批次/批 | 培养数目/枚 | 48h                       | 72h                       | 96h                       | 120h                      |
|------|------|--------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|      |      |        | (M/入培数)<br>M%             | (B/入培数)<br>B%             | (XB/入培数)<br>XB%           | (HB/入培数)<br>HB%           |
| 对照组  | 4    | 39     | (37/39) 94.9 <sup>a</sup> | (30/35) 76.9 <sup>a</sup> | (24/35) 61.5 <sup>a</sup> | (16/35) 41.0 <sup>a</sup> |
| 试验 1 | 2    | 25     | (23/25) 92.0 <sup>a</sup> | (16/25) 64.0 <sup>a</sup> | (11/25) 44.0 <sup>a</sup> | (6/25) 24.0 <sup>b</sup>  |
| 试验 2 | 5    | 40     | (33/40) 82.5 <sup>a</sup> | (25/40) 62.5 <sup>a</sup> | (19/40) 47.5 <sup>a</sup> | (14/40) 35.0 <sup>a</sup> |
| 试验 3 | 5    | 40     | (34/40) 85.0 <sup>a</sup> | (24/40) 60.0 <sup>a</sup> | (22/40) 55.0 <sup>a</sup> | (14/40) 35.0 <sup>a</sup> |
| 试验 4 | 3    | 19     | (13/19) 68.4 <sup>b</sup> | (9/19) 47.4 <sup>b</sup>  | (6/19) 31.6 <sup>b</sup>  | (5/19) 26.3 <sup>b</sup>  |

注：同一整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 1-5 可见，体外培养 48h、72h、96h 后，对照组和试验 1、2、3 组间均无显著差异 ( $P > 0.05$ )，均显著高于试验 4 组 ( $P < 0.05$ )，组内试验 1、2、3 组均显著高于试验 4 组 ( $P < 0.05$ )；体外培养 120h，对照组和试验 2、3 组间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。显著好于试验 1、4 组 ( $P < 0.05$ )，试验组间以试验 2、3 组显著高于试验 1、4 组 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

本试验结果表明小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖三种中药成分，以小檗碱对胚胎体外培养发育的效果最好。其体外培养的最佳浓度组和孵化胚胎发育率为：小檗碱最佳浓度为  $0.10\mu\text{g/ml}$ ，孵化胚胎发育率 89.9%；黄芩苷最佳浓度为  $4\mu\text{g/ml}$ ，孵化胚胎发育率 64.1%；黄芪多糖最佳浓度为  $60\mu\text{g/ml}$ ，孵化胚胎发育率 35.0%。而三个试验中对照组孵化胚胎的发育率分别为 50.7%、47.8%、41.0%。对比各试验结果可以看出中药成分小檗碱和黄芩苷对胚胎体外生长发育起到了积极的促进作用。白照岱等(2004)在 CZB 中添加不同浓度的胰岛素和葡萄糖，以及添加不同浓度的表皮生长因子对小鼠 2-细胞胚胎体外培养孵化囊胚发育率分别为 25.3%和 21.2%。可见，本试验结果，中药成分对胚胎发育的促进作用。

小檗碱是存在于中药黄连中的主要生物碱，是一种苯并异喹啉类季铵型生物碱。长期以来对其生化、药理、临床的研究证明，它是一种没有细胞毒和致突变作用、具有广泛用途的药物(王小逸等,2004)。大量研究表明小檗碱具有广谱的体外抗菌效果，其低浓

度可以抑菌，高浓度可以杀菌，另报道小檗碱抗痢疾杆菌作用强度与磺胺相近，但其作用不受血清的影响，另一方面小檗碱的抗药菌株产生较多，且无交叉感染(沈映君,2000)。黄芩苷的抗微生物的作用已早为医学界所认识，其清热解毒作用的实质就是对细菌和病毒等致病原的抑制或杀灭作用。黄芪多糖在体外对志贺氏痢疾杆菌、炭疽杆菌、 $\alpha$ -溶血性链球菌、 $\beta$ -溶血性链球菌、白喉杆菌、假白喉杆菌、肺炎双球菌、金黄色葡萄球菌、柠檬色葡萄球菌、白色葡萄球菌和杆草杆菌等有抗菌作用(赵永华等,2000)。本试验中，三种中药成分各试验组均未添加抗菌素，其所筛选的最佳浓度组中，除黄芪多糖(药物纯度为75%)外，小檗碱(药物纯度为97%)和黄芩苷(药物纯度为97%)对胚胎发育均有明显的促进作用，可能与添加的中药成分的抑菌作用有关。

cAMP 和 cGMP 与细胞的增殖、分化和代谢密切相关。cAMP 有促进细胞分化的作用，cGMP 则具有促进细胞分裂的作用。Manejwala 等(1986)研究证明，用 cAMP 类似物培养早期胚胎，能促进囊胚腔的扩张。Hui 等(1991)在人血小板体外试验证明小檗碱可使 cAMP 升高，亦可抑制其升高，视不同条件而定。推测 BR 可能对胚胎 cAMP 和 cGMP 有积极的作用。生理水平的 NO 作为信号分子可以对早期胚胎发育产生调节作用也需要通过 cGMP 实现(关均,1989)，而 NO 是一种自由基性质的气体，分子量小，化学结构简单，由于其含有一个未成对电子，故有很大的生物活性，它可以自由穿过生物膜，作用于细胞内的靶分子，作为第二信使而发挥信息传递的功能，并以相对特异的方式控制多种细胞的功能或生理作用，在受到各种刺激因素，如外来抗原、细菌内毒素或细胞因子等诱导活化时，诱导 NOS (iNOS) 可生成大量的有持续活性的 NO，参与免疫系统的非特异性防御功能。NO 在免疫与炎症反应中的细胞毒作用也可损伤正常的组织，导致 NO 的保护与损伤双重作用(Ma et al,1993; 陈君,2003)。NO 生成过多且时间过长，可能导致多种病理改变，反之，若 NO 合成不足又会使 NO 的生理功能得不到正常的发挥，所以说 NO 具有两面性。刘斌(2002)研究证明 NO 作为一种调节因子参与早期胚胎的发育，NO 生成过量对胚胎有损害作用。Ko 等(2000) 通过离体大鼠肠系膜动脉研究报道，小檗碱是通过作用于血管内皮和平滑肌细胞两种途径而产生血管松弛作用的。血管内皮释放 NO 是小檗碱产生血管松弛作用的内皮依赖性机制，说明小檗碱与细胞分泌 NO 的作用相关。本试验中，小檗碱极显著的促进了胚胎的生长发育，是否与直接或间接对胚胎发育的微环境起调节作用还有待进一步研究。

胚胎代谢所产生的自由基，如过氧化氢、过氧化物阴离子及氢氧根离子等影响

胚胎的正常卵裂。囊胚对过氧化脂质导致的损伤十分敏感(秦鹏春,2001), 正常小鼠卵母细胞中的  $H_2O_2$  水平较低, 1-至 8-细胞期的  $H_2O_2$  水平略高于以后各期胚胎的水平。但当在体外培养 1-细胞或 2-细胞胚胎时, 到 2-细胞中期时的  $H_2O_2$  水平已经很高, 而且一直到整个 4-细胞期均居高不下(Nasr-esfahani *et al.*,1990)。这种水平的  $H_2O_2$  水平恰好发生在胚胎基因的激活时期。而黄芩苷清除自由基作用效果明显。高中洪等(1991)研究表明黄芩苷对羟自由基、超氧阴离子自由基、烷过氧自由基及 DPPH 自由基有较强的清除作用。钱江等(1995)研究报道黄芩苷对过氧化脂质生成的抑制作用也很明显; 谭廷华等(1997)研究证明了黄芩苷对羟基自由基( $\cdot OH$ )的清除作用极为明显。这可能是黄芩苷试验中添加黄芩苷最佳浓度组结果优于对照组的原因。

梁培育等(2001)研究了黄芪注射液体外对人精子运动参数的影响, 研究证明黄芪能提高人精子运动参数的机理具有潜在的临床应用价值。而胚胎细胞属于生殖细胞, 可能有相同的作用。孙成文等(1996)研究证明黄芪多糖对培养的心肌细胞和离体心脏均有抗自由基损伤作用。王道苑等(1982)研究证明黄芪多糖还可明显增加小鼠脾脏 RNA、DNA 和蛋白质的含量。但试验结果显示, 其添加黄芪多糖试验组比对照组发育率还低, 其可能原因为, 黄芪多糖的纯度较低(75%), 可能含有对胚胎有负作用和抑制作用的物质, 所以其对胚胎的作用还有待于进一步的深入探讨。

通过本试验可以看出小檗碱、黄芩苷对 2-胚胎细胞发育的促进作用是明显的, 但其作用机理目前还尚不十分清楚, 今后有必要做进一步的研究和探讨。

## 试验二 小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖对小鼠 2-细胞胚胎发育至 孵化期细胞数目的影响

胚胎体外培养是胚胎生物技术的一个重要环节，无论是体外受精、胚胎分割、胚胎移植、胚胎克隆、胚胎嵌合，还是转基因等都对显微操作的胚胎质量有很高的要求。因此，对胚胎质量和活力的检测具有非常重要的意义。胚胎的细胞数量是真实反映胚胎质量的一项客观指标，尤其是体外培养的胚胎，其细胞数量明显少于体内生产的胚胎，实践证明，体外培养的胚胎移植妊娠率和胎儿出生率与囊胚细胞的数量密切相关(郭年藩摘译,1993)。如何提高胚胎细胞数目，一直是胚胎体外培养的难点和重点，传统中药对物质代谢有调节作用，能促进 DNA、RNA 及蛋白质的合成和细胞增殖作用(房俊芳等,1982)；可以调节细胞钠钾泵-酶活性(王本祥等,1999)。促进细胞产生 NO，而 NO 作为信号传导物质，对细胞代谢有很好的调节作用(凌亦凌等,1999)。本试验在试验一的研究基础上，以试验一中的孵化胚胎为试验材料，进一步观察小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖等中药成份对胚胎细胞数目增殖作用的影响，验证其对小鼠胚胎生长发育的作用。

### 1. 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 胚胎来源

试验一中培养 120h 的各试验组孵化胚胎。

##### 1.1.2 主要仪器设备

|         |                   |                   |
|---------|-------------------|-------------------|
| 体视显微镜   | 麦克奥迪实业有限公司        | 型号：MOTIC M-400(H) |
| 生物显微镜   | 南京江南电器集团公司        | 型号：尼康 YS2-H       |
| 数码照相显微镜 | 麦克奥迪实业有限公司(Motic) | 型号：DMB5-2235IPL-5 |
| 倒置显微镜   | Olympus           | 型号：IX71           |

## 计数器

### 1.1.3 主要试剂及溶液配制

#### 1.1.3.1 主要药品试剂

|                  |                       |
|------------------|-----------------------|
| 氯化钠 (NaCl), A.R. | 批号: 981030, 北京化工厂     |
| 柠檬酸钠 A.R.        | 批号: 980401, 哈尔滨市化工试剂厂 |
| Ehrlich 苏木精染液    | 自配                    |

#### 1.1.3.2 溶液配制

##### Ehrlich 苏木精液配制

首先将苏木精溶于 25ml 乙醇及醋酸中, 然后加甘油, 混匀后加入其余 75ml 乙醇, 然后将钾明矾溶于水中加热溶化后慢慢加入苏木精溶液中, 边加边搅, 混合后在光亮处成熟 3 个星期左右。成熟后成红色, 即可用。

##### 0.5%柠檬酸钠低渗液配制

去离子水 100ml、柠檬酸钠 0.5g 完全溶解后, 过滤, 标记。

## 1.2 试验方法

### 1.2.2 试验设计

试验取小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖三种中药成分不同组别所培养的 120h 孵化期胚胎, 胚胎培养方法和各试验组别设计同试验一。

#### 1.2.1 孵化胚胎细胞计数

将孵化胚胎分别置于 0.5%的柠檬酸钠溶液液中低渗处理 10min, 然后用 Ehrlich 苏木精染液(郑若玄等,1980)染色 2.5h, 经 0.9%的生理盐水洗涤 3 次后置于载玻片上压片, 生物显微镜下观察,按前文方法计数胚胎细胞数目(傅文栋等,2005)。

## 1.3 数据处理

采用卡方独立性检验和方差分析。

## 2 结果

### 2.1 添加小檗碱培养小鼠 2-细胞胚胎至孵化期胚胎细胞数目

结果见表 2-1。

表 2-1 小檗碱培养小鼠 2-细胞胚胎至孵化胚胎细胞数目

| 试验设计   | 计数胚胎数目/枚 | 孵化胚胎细胞平均数目/个( $\bar{x} \pm S$ ) |
|--------|----------|---------------------------------|
| 对照组    | 29       | 69.5 ± 7.14 <sup>A</sup>        |
| 试验 1 组 | 26       | 80.6 ± 6.48 <sup>B</sup>        |
| 试验 2 组 | 39       | 82.4 ± 8.37 <sup>B</sup>        |
| 试验 3 组 | 37       | 83.7 ± 9.10 <sup>B</sup>        |
| 试验 4 组 | 39       | 84.4 ± 10.39 <sup>B</sup>       |
| 试验 5 组 | 34       | 82.6 ± 6.52 <sup>B</sup>        |

注：同一整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，添加小檗碱培养液培养 2-细胞胚胎 120h 孵化胚胎的细胞数目各试验组均极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )，试验组组间无显著差异 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 添加黄芩苷培养小鼠 2-细胞胚胎至孵化胚胎细胞数目

结果见表 2-2。

表 2-2 黄芩苷培养小鼠 2-细胞胚胎至孵化胚胎细胞数目

| 试验设计   | 计数胚胎数目/枚 | 孵化胚胎细胞平均数目/个( $\bar{x} \pm S$ ) |
|--------|----------|---------------------------------|
| 对照组    | 23       | 69.9 ± 6.27 <sup>a</sup>        |
| 试验 1 组 | 33       | 72.9 ± 8.73 <sup>a</sup>        |
| 试验 2 组 | 31       | 75.1 ± 10.30 <sup>a</sup>       |
| 试验 3 组 | 26       | 74.2 ± 8.05 <sup>a</sup>        |
| 试验 4 组 | 30       | 74.9 ± 10.62 <sup>a</sup>       |
| 试验 5 组 | 31       | 72.0 ± 10.11 <sup>a</sup>       |

注：同一整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, 添加黄芩苷培养液培养 2-细胞胚胎 120h 孵化胚胎的细胞数目各试验组与对照组及试验组间均无显著差异( $P < 0.05$ )。

### 2.3 添加黄芪多糖培养小鼠 2-细胞胚胎至孵化胚胎细胞数目

结果见表 2-3。

表 2-3 黄芪多糖培养小鼠 2-细胞胚胎至孵化胚胎细胞数目

| 试验设计   | 计数胚胎数目/枚 | 孵化胚胎细胞平均数目/个( $\bar{X} \pm S$ ) |
|--------|----------|---------------------------------|
| 对照组    | 11       | 70.6 ± 11.19 <sup>a</sup>       |
| 试验 1 组 | 6        | 75.0 ± 9.75 <sup>a</sup>        |
| 试验 2 组 | 10       | 74.4 ± 10.23 <sup>a</sup>       |
| 试验 3 组 | 12       | 73.9 ± 7.65 <sup>a</sup>        |
| 试验 4 组 | 5        | 71.5 ± 9.10 <sup>a</sup>        |

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 2-3 可见, 添加黄芪多糖培养液培养 2-细胞胚胎 120h 孵化胚胎的细胞数目各试验组与对照组及试验组间均无显著差异( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

目前胚胎研究工作者多把胚胎细胞数目作为一个检测胚胎质量的指标, 而从如何提高胚胎细胞数目的角度研究报道甚少。蒋和生等(1994)提到评定牛胚胎活力最常用的标准是胚胎细胞核数量和形态, 胚胎的活力随着细胞核数量的减少而降低。为了明显观察对比出细胞数目之间的差异, 根据试验一的培养结果, 本试验选取了孵化时期的胚胎作为试验材料, 研究了小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖对孵化胚胎的细胞数目的影响。

对比试验结果可以看出, 添加小檗碱各试验组孵化胚胎细胞数目极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。不同浓度组间无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 黄芩苷试验和黄芪多糖试验中试验组与对照组间细胞数目无显著差异 ( $P < 0.01$ )。从而也更进一步验证了试验一中小檗碱能极显著促进 2-细胞胚胎发育率的试验结果。说明小檗碱对胚胎细胞的增殖具有极显著的促进作用。

## 试验三 小檗碱、黄芩苷对小鼠早期胚胎移植效果的影响

自五十年代以来人类建立了受精卵和早期胚胎的采集技术之后，很快就完成了早期胚向受体输卵管及子宫移植的胚胎移植技术的开发和研究。小鼠的胚胎移植技术对于试验动物学研究及生命科学研究具有重要价值。但目前体外培养的胚胎，移植妊娠率仍然不高，参考人类中医学和动物繁殖中治疗不孕症、流产、保胎、促进胚胎着床等。中药发挥的重要作用。本试验以添加双抗 mCZB 为试验的对照组，根据试验一胚胎发育效果和试验二胚胎细胞数量计数结果，进一步验证小檗碱、黄芩苷对小鼠胚胎移植效果和产仔发育的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 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 29~32g，雄鼠体重 32~35g，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。

##### 1.1.1.1 雄鼠输精管结扎

选用 6 周龄(体重在 32~35g)以上雄鼠进行输精管结扎。雄鼠用 0.2%的戊巴比妥钠麻醉(0.2ml/10g)后，固定，剪除手术部位的鼠毛，75%酒精消毒手术部位，钝镊子夹起皮肤，使之离开腹腔。沿腹中线在适当的位置(尿道口前)开口。用小镊子夹住体壁，提起，使其离开肠管。再用眼科剪子夹住腹中线轻轻剪 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垫。用钝镊子夹住脂肪体，将其轻轻拉出切口，继之睾丸、输精管等也被拉出。不能直接接触及或操作睾丸，只能通过操作脂肪体使睾丸移动或定位。仔细辨认睾丸和附睾，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，轻轻牵动脂肪体，使睾丸等复回腹腔。另一侧同上。外科手术法缝合刀口，撒上适量的抗菌素。

手术后的公鼠要认真护理，提高周围的环境温度。一般术后两周后可使用。

### 1.1.1.2 假孕受体准备

本试验所用初产母鼠与手术后恢复完全的结扎公鼠合笼。再根据所移植的胚胎时期，准备比供体多一倍的受体母鼠在供体合笼的同时与输精管结扎的公鼠按 1:1 或 2:1 合笼。

### 1.1.2 仪器和器械

手术器械(眼科剪、眼科镊、持针钳、拆线剪、剪毛剪、手术缝合针 5×16、手术缝合线 1<sup>#</sup>)，4 号针头，吸卵针、移卵针(窄端应为 2~3cm 长，直径 120~180 μm，末端磨光，以只能容纳一个胚胎的直径为宜)。

### 1.1.3 药品

盐酸小檗碱(Berberine, BR), 纯度≥97% 天津药物研究院  
黄芩苷(Baicalin, Bai), 纯度≥97% 天津药物研究院  
0.2%的戊巴比妥钠，青霉素等。  
其他药品同试验一。

## 1.2 试验设计

本试验以添加双抗的 mCZB 为试验对照组，根据试验一胚胎发育效果和试验二胚胎细胞计数结果，设计以下试验组别：

- 对照组： 基础培养液+双抗
- 试验 1 组： 基础培养液+小檗碱 0.1μg/ml
- 试验 2 组： 基础培养液+黄芩苷 4μg/ml

### 1.2.1 供体的超排及胚胎培养

供体鼠的超排和胚胎培养方法同试验一。

### 1.2.2 胚胎发育时期与假孕鼠的同步

供体鼠和受体鼠在同一时间(18:00)合笼, 分别于第二天早上 8:00、12:00、4:00 检查阴栓, 见栓母鼠分笼后标记, 认真饲养待用。

供体母鼠在合笼后 47h 处死, 获取 2-细胞胚胎, 胚胎在上述培养液中培养 54h 获得 B 期胚胎后进行移植试验, 即见栓后 88h。此时受体假孕鼠距验栓时间分别为: 88h、84h、80h。

### 1.2.3 胚胎移植方法

根据胚胎发育时期, 胚胎移植部位为子宫角。移植前, 根据假孕受体鼠的体重, 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%酒精消毒后在背部近中线处, 用 75%酒精拭刀口, 在最后肋骨水平上, 切开约 1cm(尽可能短)纵向口。并去除其中带入的鼠毛。拉动皮肤开口, 可见下面的白色脂肪体。用小剪子在脂肪体上方开一小口。开口时, 注意不要伤及较大的静脉。用钝镊子夹住脂肪体, 从切口拉出。继之卵巢、输卵管、子宫相继被拉出。使卵巢和输卵管留在外面。用钝镊子轻轻夹住子宫上端(最好是卵巢上的脂肪体), 用适当的针头(国产 4 号)或缝合针在子宫下半部(靠近输卵管处)扎 1 小孔。注意不要触及血管。要保证扎入子宫内腔。可轻轻抽出, 以验证是否扎入。如果抽动容易, 说明针已扎入子宫腔。不要移动针头, 否则伤及子宫壁。仔细注视刚扎的小孔, 轻轻拔出针头, 沿该孔将移植管插入约 5mm, 轻轻吹吸管, 使所有的胚胎都进入子宫内。然后钝头镊子夹住脂肪体, 把子宫、卵巢、输卵管推回腹腔复位、缝合、消毒。

### 1.2.4 胚胎移植效果观察

2-细胞胚胎体外培养 54h, 选择形态正常囊胚期胚胎, 假孕鼠以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, 并在仔鼠出生后马上记录产仔数目和称取体重, 待仔鼠可以睁眼觅食时(离窝)再记录仔鼠数目和称取体重。

## 1.3 统计方法

采用卡方独立性检验。

## 2 试验结果

### 2.1 不同试验组别胚胎发育情况

各试验组别 2-细胞胚胎体外生长 54h 囊胚发育率见表 3-1

表 3-1 不同试验组别胚胎发育情况

| 试验设计   | 批次/次 | 培养数目/枚 | 54h                         |
|--------|------|--------|-----------------------------|
|        |      |        | B% (B/入培数)                  |
| 对照组    | 5    | 143    | (123/143) 85.9 <sup>a</sup> |
| 试验 1 组 | 5    | 155    | (147/155) 94.7 <sup>a</sup> |
| 试验 2 组 | 6    | 180    | (158/180) 87.6 <sup>a</sup> |

注：同一整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 ( $P > 0.05$ )。

由上表可以看出 54h 各试验组囊胚发育率无明显差异 ( $P > 0.05$ )，此试验结果和试验一的结果一致，其中以试验 2 组(添加小檗碱)囊胚发育率最高(94.7%)。

### 2.2 受体假孕不同时间移植效果

假孕母鼠由见栓到移植不同时间(80h、84h、88h)的囊胚移植成功率结果见表 3-2。

表 3-2 不同假孕时间移植效果的对比

| 试验组别   | 移植囊胚数 (枚) | 移植受体数 (只) | 受体妊娠数 (只) | 妊娠率 (%)           | 产仔数 (只) | 平均产仔数 (只)        |
|--------|-----------|-----------|-----------|-------------------|---------|------------------|
| 假孕 88h | 231       | 15        | 10        | 66.7 <sup>a</sup> | 86      | 8.6 <sup>a</sup> |
| 假孕 84h | 103       | 8         | 3         | 37.5 <sup>b</sup> | 27      | 9 <sup>a</sup>   |
| 假孕 80h | 81        | 5         | 2         | 40.0 <sup>b</sup> | 13      | 6.5 <sup>b</sup> |

注：同一整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 3-2 可以看出：不同假孕时间移植妊娠率以假孕 88h(66.7%)显著高于假孕 84h(37.5%)和 80h(40.0%) ( $P < 0.05$ )；平均产仔数目以假孕 88h(8.6 只)和假孕 84h(9 只)

显著高于 80h(6.5 只)( $P < 0.05$ )。

## 2.3 胚胎移植效果

囊胚移植效果见表 3-3。

表 3-3 胚胎移植效果

| 试 验<br>设 计 | 移植受<br>体数<br>(只) | 妊娠率(妊<br>娠数/移<br>植数)     | 移植囊胚数     |             | 产仔率<br>(出生鼠<br>/移入胚<br>胎) | 初产仔鼠<br>平均体重<br>(g) | 离窝成活<br>率(离窝鼠/<br>出生鼠)       | 离窝小鼠<br>平均体重<br>(g) |
|------------|------------------|--------------------------|-----------|-------------|---------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|
|            |                  |                          | 总数<br>(枚) | 妊娠受<br>体(枚) |                           |                     |                              |                     |
| 对照组        | 8                | (4/8) 50.0 <sup>a</sup>  | 115       | 57          | (31/57) 54.3 <sup>a</sup> | 1.66 <sup>a</sup>   | (14/31) 45.2 <sup>a</sup>    | 8.38 <sup>a</sup>   |
| 试验 1 组     | 9                | (6/9) 66.7 <sup>b</sup>  | 142       | 94          | (52/94) 55.3 <sup>a</sup> | 1.62 <sup>a</sup>   | (29/52)<br>55.8 <sup>b</sup> | 9.64 <sup>a</sup>   |
| 试验 2 组     | 11               | (5/11) 45.5 <sup>a</sup> | 158       | 79          | (33/79) 41.8 <sup>a</sup> | 1.48 <sup>a</sup>   | (20/33)<br>66.6 <sup>b</sup> | 8.66 <sup>a</sup>   |

注：同一整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 3-3 可知：受体妊娠率以试验 1 组(66.7%)显著高于对照组(50.0%)和试验 3 组(45.5%)( $P < 0.05$ )，试验 2 组与对照组间无差异( $P > 0.05$ )；产仔率、初产仔鼠平均体重、离窝小鼠平均体重对照组，试验 1、2 组间均无差异( $P > 0.05$ )；离窝成活率则试验 1、2 组均显著高于对照组( $P < 0.05$ )。

## 3 讨 论

### 3.1 不同假孕时间移植效果的影响

由本试验结果可见，以假孕 88h 的母鼠囊胚移植妊娠率显著高于假孕 84h 和 80h( $P < 0.05$ )，其产仔率分别为 66.7%、37.5%和 40.0%，平均产仔数目分别为 8.6 只、9 只和 6.5 只，说明假孕母鼠时间和移植囊胚发育时期完全同步，有利于胚胎在子宫中生长发育。这与黄莉等(2001)、王敏康等(2000)的报道假孕母鼠与供体鼠完全同步为 3.5d 的移植效果最好相一致。说明此时假孕母鼠子宫内膜发育与胚胎发育所需环境是同步的，从而利于胚胎着床。

### 3.2 小檗碱和黄芩苷对胎移植效果的探讨

1978年,新加坡政府宣布黄连或小檗碱为毒品,禁止使用,认为孕妇服用黄连或小檗碱,可通过胎盘将小檗碱引进胎儿体内,有可能导致新生儿溶血,但没有提供相应的证据。但宋淑娟(1997)、高雨农等(2000)研究表明小檗碱并无毒副作用。本试验结果也证明小檗碱对妊娠小鼠并无副作用,相反,还有一定的促进作用。

古代安胎常用药歌中就有:“清热安胎用黄芩”。金元四大家之一的名医朱丹溪在《丹溪心法》中提到“黄芩,安胎之圣药也”。而黄芩苷是黄芩主要的有效成分。

胚泡的附植易引起子宫内膜炎性反应(张忠诚,2004)。试验一中已提到小檗碱、黄芩苷的抗菌、抗炎作用,推测小檗碱、黄芩苷培养的胚胎为胚泡的滋养层与子宫的进一步接触创造了有利的条件,乃至为胎盘的形成为奠定了基础。

Tsunoda等(1983)研究表明囊胚的卵裂球数目与移植后受体妊娠率和胎儿出生率有关。Ellingto等(1990)对体内发育胚胎与体外培养胚胎的比较结果表明,卵裂球数目可以用来衡量牛胚胎的生活力。而本试验二结果表明了,添加小檗碱培养液培养的胚胎细胞数目极显著高于对照组( $P < 0.01$ )。而本试验结果表明添加小檗碱培养的囊胚经过移植试验后,妊娠率和离窝成活率均显著高于对照组;而产仔率、离窝小鼠平均体重也好于对照组。

通过本试验进一步验证了试验一和试验二的结果,并且通过仔鼠出生到离窝也表明小檗碱、黄芩苷对胚胎附植和胎儿生长发育无不良影响。

## 第四章 结 论

本文通过研究小檗碱、黄芩苷、黄芪多糖对小鼠 2-细胞胚胎体外培养效果和 2-细胞胚胎发育至孵化期细胞数目的影响以及小檗碱、黄芩苷对小鼠早期胚胎移植效果的影响，得出以下结论：

- 1、在 mCZB 基础液中添加小檗碱和黄芩苷中药成分较对照组（mCZB 基础液中加入青、链霉素）有利于体外培养的小鼠 2-细胞胚胎生长发育。且以小檗碱组好于黄芩苷组。
- 2、所筛选出的最佳药物浓度，小檗碱 0.10 $\mu\text{g/ml}$ ，其孵化胚胎发育率为 89.9%，胚胎细胞数目为  $83.7\pm 9.10$ ；黄芩苷 4 $\mu\text{g/ml}$ ，其孵化胚胎发育率为 64.1%，胚胎细胞数目为  $74.2\pm 8.05$ 。
- 3、胚胎细胞计数结果验证，小檗碱对体外培养胚胎细胞有增殖的作用，其孵化囊胚细胞数目（ $83.7\pm 9.10$ ）极显著高于对照组（ $69.5\pm 7.14$ ）（ $P < 0.01$ ）。
- 4、添加小檗碱成分体外培养的 2-细胞胚胎发育至囊胚的移植妊娠率（66.7%）显著好于对照组（50.0%）（ $P < 0.05$ ）。
- 5、假孕受体鼠时间和移植囊胚发育时期完全同步，有利于胚胎在子宫中生长发育，移植妊娠效果最好。
- 6、小檗碱、黄芩苷对体外胚胎生长发育和细胞增殖有促进作用，其中以小檗碱的作用显著；小檗碱、黄芩苷对胚胎附植及出生仔鼠无不良影响。

由以上结论说明，小檗碱、黄芩苷对小鼠 2-细胞胚胎体外培养和移植效果显著，但具体作用机理还有待进一步研究。

## 参考文献

- 白照岱等.表皮生长因子对小鼠早期胚胎体外发育影响的研究.山东大学学报(医学版),2004,42(2):150~158
- 白照岱等.胰岛素对小鼠早期胚胎体外发育影响的研究.生殖医学杂志,2004,13(5):286~290
- 陈鸿冰,卢克焕.蛋白质添加剂对牛卵母细胞体外成熟体外受精及早期胚胎体外发育的影响.广西农业大学学报,1994,13(1):1~10
- 陈君.一氧化氮及一氧化氮合成酶抑止剂对脑缺血缺氧损害的双重作用.中国麻醉与镇痛,2003,1(9):15~18
- 陈系古等.小鼠胚胎体外培养条件的研究.中国实验动物学报,1998,6(6):42~47
- 邸冉,高建明(通讯作者).中药成分对小鼠 2-细胞胚胎体外生长发育的影响初探.北京农学院学报,2004,19(增):61~65
- 鄂征.组织培养.北京:北京出版社.1995
- 房俊芳,王道苑等.黄芪多糖对小鼠肝脾细胞核酸代谢的影响,中国药理学报,1982,3(3):204
- 房俊芳,钟秀会.黄芩的药理研究概述.中药药理研究进展,2003,7(论文集):187~189
- 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,河北农业大学(硕士论文),2004
- 房喻,胡道道,李晓军等.黄芩甙及铜(II)、锌(II)配合物对超氧自由基的清除作用.生物化学杂志,1991,7(6):753
- 傅文栋等.小鼠囊胚及孵化胚胎细胞计数方法的探讨.北京农学院学报,2005(1):41~43
- 傅文栋等.小鼠发情周期观察与最佳超排时间的选择.北京农学院学报,2005(2):19~21
- 高雨农等.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.中国中药杂志,2000,9(25):564~565
- 高建明.动物繁殖学.中央广播电视大学出版社,2003

- 高建明.牛体外受精卵体外培养研究进展(上、下).草食家畜,1996,92(3):14~19;(4):21~23
- 高中洪,黄开勋.黄芩、黄酮对自由基的清除作用的 ESR 研究.华中理工大学学报,1991;27(1):97
- 关钧.环核苷酸与中药效功能研究综述.浙江中医杂志,1989,244(5):234~236
- 郭年藩摘译.牛绵羊猪胚胎发育至囊胚的体外培养.国外畜牧科技,1993,6:2~13
- 黄莉等.小鼠胚胎移植初试.广州医学院学报, 2001,29(4):36~38
- 郝钰等.小檗碱对淋巴细胞与血管内皮细胞粘附及粘附分子的影响.中国免疫学杂志,1999,15:523~525
- 胡聪,韩聚强.黄芩苷对大鼠肝细胞凋亡的影响.中国中药杂志,2001,26(2):124~127
- 胡聪等.黄芩苷对大鼠肝细胞凋亡的影响,中国中药杂志, 2001,2(26)2:124~127
- 金虹等.从 IL-2 水平探讨黄芪及黄芪多糖的免疫调节作用.中国免疫学杂志,1989,5(5):308
- 蒋和生等.牛体外胚胎质量检测与评价.广西农业大学学报,1994,13(1):49~54
- 孔祥峰等,黄芪多糖的免疫药理学研究进展.中兽医学杂志,2003,3:34
- 梁培育等.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
- 雷燕等.黄芪、当归及其组方促血管内皮细胞增殖作用的研究.中国中西医结合杂志,2003,23(10):753~756
- 雷红,祁成年.中草药作为免疫增强剂的应用.塔里木农垦大学学报,1999,9(3)
- 凌亦凌等.过氧亚硝基阴离子的细胞代谢及病理损伤作用.生理科学进展,1999(30)1:71~73
- 兰进,杨世林,郑玉权等.黄连的研究进展.中草药,2001,32(2):1139~1141
- 刘斌.小鼠早期胚胎发育过程中活性自由基生成机制初探.湖南农业大学学报,硕士论文,2002
- 刘恩岐等.小鼠胚胎的收集培养和移植.中国兽医科技, 2002(32)11:87~88
- 刘丽均.小鼠桑胚期、囊胚期胚胎移植方法的探讨.上海实验动物科学,2000, (20)2:109~112.
- 刘锡光等.大蒜等 3 种中药对金黄色葡萄球菌的超微结构观察.武钢医讯,1984,7(3):214

- 刘玉鹏,刘梅等.30 种中草药的抗氧化活性研究.烟台大学学报,2000,1(1):70~73
- 刘忠华等,小鼠 1-细胞胚胎体外培养条件的研究,1999, (30)4:376~378
- 李光鹏,严云勤.无机离子对哺乳动物早期胚胎培养的影响.黑龙江畜牧兽医,1994,(2):33~34
- 李光鹏, 张心田等.乳酸钠对小鼠胚胎体外发育的影响.东北农学院学报,1993,24(3):292~294
- 李光善等.黄芪多糖、桂皮醛、川芎嗪对实验性糖尿病大鼠创面成纤维细胞增殖作用的影响.中国中医基础医学杂志,2004,10(4):260~262
- 李萍等.黄芪多糖对细胞增殖及血管内皮细胞与白细胞粘附作用的影响.中国病理生理杂志, 2004,20(9):1677~1680
- 苗聪秀,刘锦宏等.小鼠胚胎体外发育的影响因素分析.长治医学院学报,1999,13(2):88~90
- 秦鹏春等.哺乳动物胚胎学.北京:科学出版社,2001,457
- 钱江,刘漩等.黄芩苷对过氧化脂质生成的抑制作用.中国药科大学学报,1995,26(5):308~310
- 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,2003,7(论文集): 158
- 沈映君,中药药理学.人民卫生出版社,2000,10:208~218
- 孙忠亲.中草药对环核苷酸影响的研究进展.中草药,1990,21(12):31~32
- 孙成文,钟国赣等.黄芪多糖抗氧化损伤作用的研究.中国药理学通报,1996,12(2):161~163
- 宋淑娟.黄连素治疗妊娠合并心律失常 16 例临床观察.吉林中医药,1997, 5 :19
- 桑润滋.动物繁殖生物技术.中国农业出版社,2002,322~346
- 田小利.转基因动物原理、技术与应用.吉林科学技术出版社,1994,54~64.
- 谭廷华,刘爱芳.黄芩苷和芸香苷对  $\cdot\text{OH}$  的清除作用.西安医科大学学报,1997,18(1):41~43
- 刘忠华,谭景和等.小鼠 1-细胞胚胎体外培养条件的研究.解剖学报,1999,(30)4:377~378
- 王道苑等.黄芪多糖对小鼠肝脾细胞核酸代谢的影响.中国药理学报,1982,(3)3:204
- 王敏康等.小鼠的胚胎移植方法.动物学杂志,2000,35(6):31~35

- 王本祥.现代中药药理学.天津科学技术出版社,1999,6(1):302~309
- 王小逸,史亦丽,曾衍钧.小檗碱的研究进展.中国新药杂志,2003,12(7):523~525
- 王今达.抗生素:杀菌以外的作用.中国危重病急救医学,1998,10(5):257~258
- 王武凌,卢克焕.无机盐离子对早期牛胚胎发育的影响.广西农业大学学报,1994,13:43~48
- 王旭光.绵羊卵母细胞体外成熟和孤雌激活的研究,新疆农业大学(硕士学位论文),2003
- 吴移谋,余敏君,尹卫国等.小檗碱体外抗五种支原体的活性研究.第衡阳医学院学报,1994,(22):1
- 薛庆善.体外培养的技术与原理.科学出版社,2001,26
- 杨健之等.共培养在小鼠胚胎发育过程中的作用.南京医科大学学报,1999,19(4):275~277
- 严梅桢等.黄连与黄芩、甘草配伍前后对金黄色葡萄球菌生长抑止作用的观察.中国中药杂志,1998,23(6):375~377
- 严云勤等.发育生物学原理与胚胎工程.黑龙江科学技术出版社,1995,69~72,133~134
- 云玉琴,李彦.抗菌抗病毒中草药的开发应用.疾病防治,2002,5:19
- 姚石安.中药促排卵的研究.中国药业,1996,2:12
- 张子理等.党参、黄芩、白术提取物配伍应用对小肠上皮细胞增殖的影响.广州中医药大学学报,2002,19(2):137~140
- 张靖飞,李裕强,刘月凤.动物胚胎体外培养研究进展.动物科学与动物医学,2002,19(2):19~22
- 张忠诚.家畜繁殖学.北京:中国农业出版社,2004
- 张守全等.昆明白小鼠 1-细胞体外培养系统的研究.动物学报,1995, (41)4:432~438
- 赵永华等.黄芪.北京:中国中兽医出版社,2000
- 郑若玄主编.实用细胞学技术.北京:科学出版社,1980:58~59
- 章静波.组织和细胞培养技术.北京:人民卫生出版社,2002
- 周淑英,卢振初等.黄芪多糖对重组白介素 2 激活 LAK 细胞活性的调节作用.南京中医学院学

- 报,1994,10(6):29~31
- 钟瑜等.人输卵管上皮细胞共培养系统对小鼠胚胎体外发育的影响.生殖医学杂志,1996,5(3):162~165
- Allison C W, Jr B Howarth and L C Ulbery.Embryonic mortality following culture in vitro of one-and two cell rabbit eggs at elevated temperatures.J Reprod Fert,1965,9:337~341
- Bavister R L.Studies on the development of mouse embryo in vitro2.The effect of energy source.J Exp Zool,1965,158:59~68
- Bavister B D.Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro.Theriogenology.1988,29:143~154
- Bavister B D, Rose-Hellekant TA,Pinyopummintr T.Development of in vitro matured in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media.Theriogenology. 1992,37: 127~146
- Biggers J D ,Gwatkin R B L,Brinster R L.Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes in a chemically defined medium.Nature,1962,194:747~749
- Brackett, R.G.Bousquet,D.*et al*.Normal development following in vitro fertilization in early mouse embryos.Dev Biol,1982,89:362~378
- Boone W R and S S Shapiro. Quality control in the in vitro fertilization laboratory. theriogenology, 1990,33(1):23~50
- Brinster R L.In vitro cultivation of mammalian ova.Adv Biosci 1969,4:199~233
- Carolan C, Lonergan P, van Langendonck A,et al.Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro.Theriogenology. 1995,43:1115~1128
- Carney EW and Bavister B D. Regulation of hamster embryo development in vitro by carbon dioxide. Biol Reprod.1987,36:1155~1163
- Cernakova M, Kostalova D.Antimicrobial activity of berberine a constituent of Mahonia aquifolium[J].Folia Microbiol,2002,47(4):375~378
- Chenns.Invitro mechanism of PCSPES.Urology, 2001,58(2):28~35

- Chatot C L *et al.* An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fert*, 1989, 86: 679~688
- Cross P C, Brinster RL. The sensitivity of One-cell Mouse Embryos to Pyruvate and Lactate. *Exp Cell Res*, 1973, 77(1): 57~62
- Dardik A and Schultz R M. Lastocoel expansion in the preimplantation mouse embryos: Stimulatory effect of TGE-a and EGF. *Development*. 1991, 113: 919~930
- Dong Y, Yang MMP, Kwan C Y *et al.* In vitro inhibition on proliferation of FHL 60 cells by tetrandrine and co-receptor peptide derived from Chinese medicinal herbs. *Life Sci*, 1997, 60(8): 1135~1401
- Flood M R and J L Wiebold. Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. *J Reprod Fert* 1988, 84: 7~12
- Gandolfi F, Milanesi E, Pocar P, *et al.* Comparative analysis of calf and cow oocyte during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 1998, 49(2): 168~175
- Gardner D K, Lane M. Amino acids and ammonium regulate the development of preimplantation mouse embryos in culture. *Biol Reprod*. 1993, 48: 377
- Gardner D K, Lane M. Embryo culture systems. In: Trounson A, Gardner D K, eds. *Handbook of in vitro fertilization*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000: 195~254
- Gardner DK. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*. 1998, 49(1): 83~102
- Gardner DK, Lane MW, Lane M. EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibits blastocyst development and differentiation. *Mol Reprod Dev*. 2000, 57(3): 256~261
- Huang J M, Wang C J, Chou F P, *et al.* Inhibitory effect of berberine on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in rat liver. *Arch Toxicol*, 2002, 76(11): 664~670
- Hui KK, Yu JL, Chan WFA, *et al.* Interaction of berberine with human platelet  $\alpha_2$  adrenoceptors. *Life Sci* 1991, 49: 315
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, *et al.* High bovine blastocyst development in a static in vitro

- production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*. 1999,52: 683~700.
- Herr C M and R Wright. Cold culture of different stage mouse embryos in bicarbonated and bicarbonate-free media. *Theriogenology*, 1988,30(1):159~68
- Ison SE, Seidel GE. Culture of in vitro produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biol Reprod*. 2000,62:248~252
- Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, *et al*. Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod*. 1998,13(1):169~177
- Kane MT. Effects of the putative phospholipid precursors, inositol, choline, serine and ethanol amine, on formation and expansion of rabbit blastocysts in vitro. *Reprod Fertil*. 1989,87:275~279
- Krakauer T, Li BQ, Yong HA *et al*. The flavonoid baicalin inhibits superantigen induced inflammatory cytokines and chemokines. *FEBS Lett*, 2001,600(1~2):52~55
- Ko W H, Yao X Q, Lau C W, *et al*. Vaso relaxant and antiproliferative effects of berberine. *Eur J Pharmacol*, 2000,399(2~3):187~196.
- Knepper PA, Mayanil CS, Goossens W, *et al*. The presence of transcription factors in fetal bovine sera. *In Vitro Cell. Dev Biol- Animal*. 1998,34:170~174
- Kwon J, Jang KH, Park JI, *et al*. A combination of fructose and glucose enhances nuclear transferred embryo development, blastocyst formation and viability. *Theriogenology*. 2002,57(1):425.
- Lane M and Gardner DK. Increase in postimplantation of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *Reprod Fertil*. 1994,102:305~312
- Lane M and Gardner DK. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil*. 1997,109:153~164
- Lane M. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress in vitro. *Theriogenology*, 2001,55: 2001,55:225~236
- Ludwig TE, Lane M, Bavister BD. Differential effect of hexoses on hamster embryo development in culture. *Biol Reprod*. 2001,64:1366~1374

- Matsuzaki Y, Kurokawa N, Terai Setal. Cell death induced by Baicale in inhuman hepatocellular carcinoma cell lines. *Jpn J cancer Res*, 1996, 87(2): 170~177
- Ma X L, Wegrich A S, Lefer D S, *et al.* Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res*. 1993, 72(2): 403~414
- McLaughlin KJ, McLean DM, Stevens G, *et al.* Viability of one-cell bovine embryos cultured in synthetic oviduct fluid medium. *Theriogenology*. 1990, 33: 1191~1199
- Nasr-esfahani M H, J R Aitken and M H Johnson. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. *Development*, 1990, 109: 501~507
- Ng TB, Liu F, Wang ZT *et al.* Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sci*, 2000, 66(8): 709~723
- Nonogaki *et al.*, Development blockage of mouse embryos caused by fatty acids. *J Assist Reprod Genet*, 1994, 11(9): 482~488
- Petters R M, *et al.*, Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryos in vitro. *J Reprod Fert*, 1990, 89: 269~275
- Paula-Lopes FF, de Moraes AA, Edwards JL. Regulation of preimplantation development of bovine embryos by interleukin-1 beta. *Biol Reprod*. 1998, 59: 1406~1412
- Pinyopummintr T and Bavister BD. Effect of gaseous atmosphere on in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1994, 41: 276
- Putney, D J, M Drost and W W Thatcher. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperature between days 1 to 7 postinsemination. *Theriogenology*, 30: 195~209
- Schini S A and B D Bavister. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol Reprod*, 1988, 39: 1183~1192
- Schini P B and B D Bavister. Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryos in vitro. *Biol Reprod*, 1989, 40: 599~606
- Shimizu I, IVb YR, IVbzobuchi Y *et al.* Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology*, 1999, 29(1): 49~60

- Sinclair K D, Young L E, Wilmuti, *et al.* In-utero overgrowth in run inants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. *Hum. Reprod.* 2000, 15(115): 68~86
- Spicer L J and Geisert RD. Concentrations of insulin-like growth factor, estradiol and progesterone in follicular fluid of ovarian follicles during early pregnancy in cattle. *Theriogenology.* 1992, 37: 749~760
- Takahashi T and First NL. In vitro development of bovine one-cell embryos influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology.* 1992, 37: 963~978
- Tervit H R and D G Gould. Cululter of sheep embryos in either a bicarbonate-buffered medium or aphosphate buffered medium enriched with serum. *Theriogenology,* 1978, 9: 251
- Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, *et al.* Requirement for glucose during in vitro culture of sheep preimplantation embryos. *Mol Repro Dev.* 1992, 31: 253~257.
- Tsunoda Y *et al.* *J. Reprod. Fertil,* Vol. 1983, 69: 315~322
- Walker SK, Heard TM and Seamark RF. In vitro culture of sheep embryos without co-culture: successes and perspectives. *Theriogenology.* 1992, 37: 111~126
- Wales R C. Effects of ions on the development of the preimplantation mouse embryo in vitro. *Aust J Biol Sci,* 1970, 23: 421
- Whitting ham D G. Culture of Mouse ova. *J Reprod Fert, Suppl,* 1971, 14: 7~21
- Winkle LJV. Amino Acid Transport Regulation and Early Embryo Development. *Biol Reprod.* 2001, 64: 1~12
- Yang B K, Yang X, Foote R H. The effects of growth factors on development of (IVF/IVM) bovine embryos. *Theriogenology.* 1993, 39: 342

## 附 表

### 附表 1 杜氏磷酸缓冲溶液 (mPBS)

| A 液               |                 | B 液  |                 | C 液  |                 |
|-------------------|-----------------|--|-----------------|------|-----------------|
| 成分                | 含量<br>(mg/1l 水) | 成分   | 含量<br>(mg/1l 水) | 成分   | 含量<br>(mg/1l 水) |
| CaCl <sub>2</sub> | 100             | NaCl   | 800             | 犊牛血清 | 1%              |
| MgSO <sub>4</sub> | 121             | KCl  | 200             | 酚红   | 1%              |
|                   |                 | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·<br>12H <sub>2</sub> O | 2881            | 青霉素  | 62.5            |
|                   |                 | 葡萄糖  | 1000            | 链霉素  | 100             |
|                   |                 | 丙酮酸钠   | 36              |      |                 |

### 附表 2 基础培养液 mCZB

| A 液                                      |                 | B 液                |                 | C 液  |                 |
|--|-----------------|--------------------|-----------------|------|-----------------|
| 成分                                       | 含量<br>(g/100ml) | 成分                 | 含量<br>(g/100ml) | 成分   | 含量<br>(g/100ml) |
| NaCl                                     | 0.56995         | NaHCO <sub>3</sub> | 1.2937          | BSA  | 0.5             |
| KCl                                      | 0.04305         |                    |                 | 葡萄糖  | 0.1             |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>          | 0.0192          |                    |                 | 乳酸钠  | 0.63ml          |
| MgSO <sub>4</sub> ·<br>7H <sub>2</sub> O | 0.03475         |                    |                 | 丙酮酸钠 | 0.003           |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O     | 0.02985         |                    |                 | EDTA | 0.0049          |
|  |                 |                    |                 | 谷氨酰胺 | 0.0146          |
|  |                 |                    |                 | 酚红   | 1ml             |
|  |                 |                    |                 | 青霉素  | 0.006           |
|  |                 |                    |                 | 链霉素  | 0.007           |

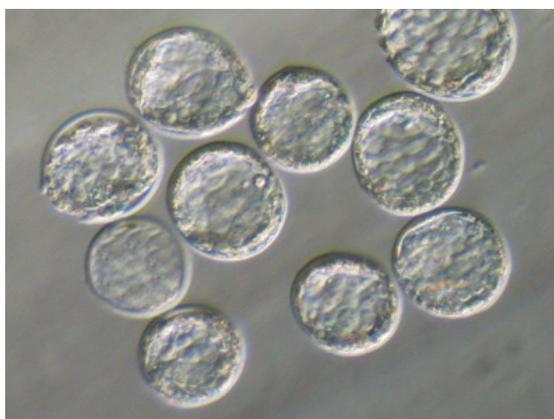
# 附 图



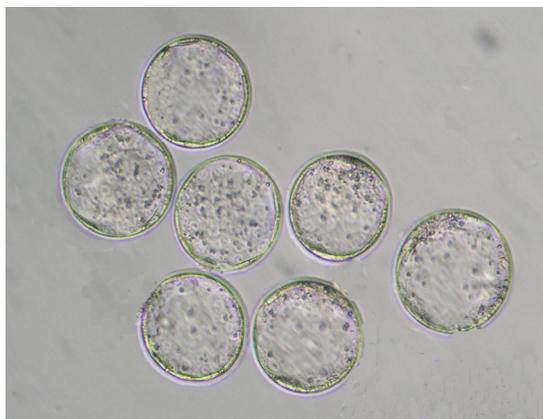
附图 1 注射 hCG47h 后获取的 2-cell 胚胎



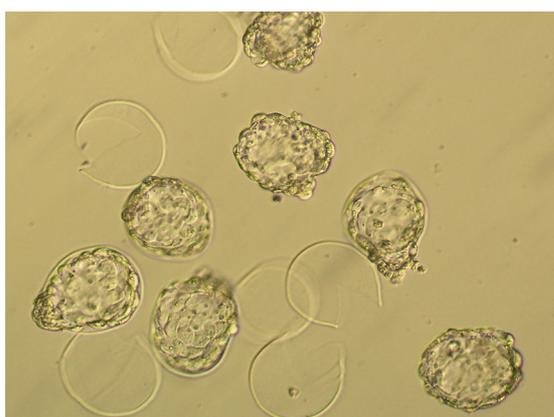
附图 2 体外培养 48h 的桑椹胚



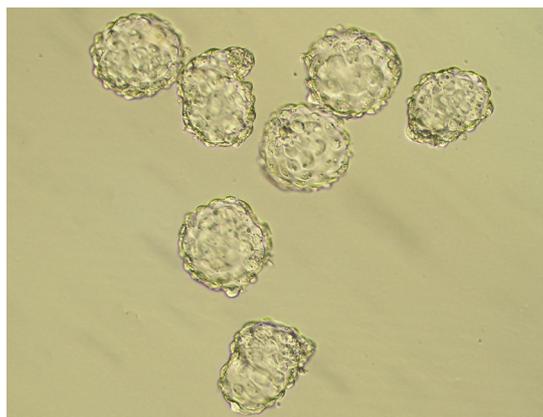
附图 3 体外培养 72h 的囊胚



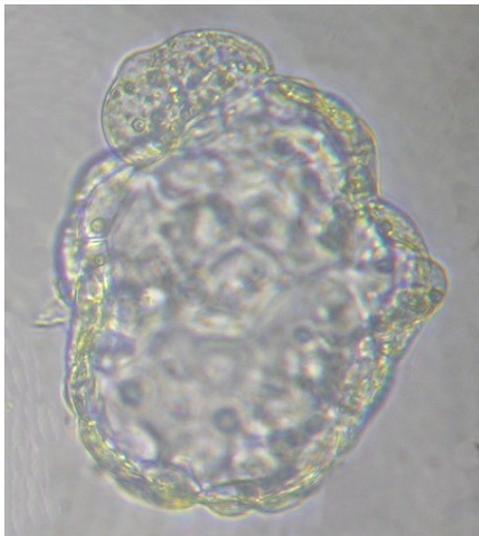
附图 4 体外培养 96h 的扩张囊胚



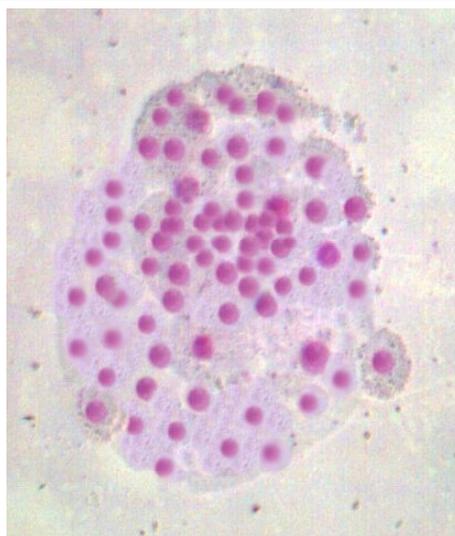
附图 5 对照组体外培养 120h 的孵化胚胎



附图 6 添加小檗碱体外培养 120h 的孵化胚胎



附图 7 体外培养 120h 的孵化胚胎形态



附图 8 体外培养 120h 的孵化胚胎细胞计数



附图 9 胚胎移植初产仔鼠



附图 10 胚胎移植离窝仔鼠

## 致 谢

本论文是在恩师高建明教授悉心指导下完成的。从论文的设计、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、严谨的治学态度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，在我学习上的精心指导和生活上无微不至的关怀，使我终身难忘。在此，谨向恩师致以崇高的敬意和衷心的感谢！

感谢导师王子荣副教授在新疆农业大学学习过程中给予的帮助，感谢导师在学习上的精心指导和生活上无微不至的关怀，在此，谨向导师王子荣副教授致以崇高的敬意和衷心的感谢！

感谢杨开伦副教授、李胜忠副教授在论文修改过程中给予的帮助！

感谢北京农学院的索占伟、刘云海、穆祥、胡格、段慧琴等老师在论文实施过程中给予的帮助！

感谢新疆农业大学的保善、余雄、马晓燕、刘素萍等老师给予的帮助！

感谢我的师弟孙玉成、索伦、李冬冬、王荣祥，师妹张建芳、孟令君、邸冉、王云云在试验过程中给予的帮助以及精神上的鼓励！

感谢北京林业大学的罗莉，河北农业大学的张涛，沈阳农业大学的王新，中国农业大学的褚耀成、王自力等硕士研究生在试验过程中的热情帮助！

感谢新疆农业大学和北京农学院所有的同学及师弟师妹们！在如火的青春岁月里，我们有缘相逢在这里，共同有甜有苦的三年，我会将你们的名字永远铭刻在心里！在此，特别感谢王端明、王红军、彭建、谷巍、朱文渊、陆彦、管仲新、戴小花、王典仁、吴红军等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关心与工作上的支持！

再次向三年来给予我理解、支持、关心和帮助的老师、家人、同学和朋友们表示最衷心的感谢，并致以最崇高的敬意！

傅文栋  
2005年5月