

壳寡糖对小鼠胚胎体外发育的影响

高 阳¹, 王伦学², 章美玲¹, 宋丹丹¹, 李运生¹, 张运海^{1*}

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023)

摘 要: 本研究旨在通过向小鼠体内受精和体外受精原核胚胎的培养基中添加壳寡糖(对照组: 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 试验组: 5、10、50、100 和 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 研究其对小鼠胚胎着床前发育效率(卵裂率、囊胚率)和囊胚质量(囊胚总细胞数、内细胞团数(ICM)与总细胞数的比率)的影响。结果表明, 对于自然受精胚胎, 添加 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 壳寡糖组的囊胚总细胞数显著高于对照组($P<0.05$), 添加 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 壳寡糖组的卵裂率和囊胚率均显著低于对照组($P<0.05$)。对于体外受精胚胎, 添加 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 壳寡糖组的囊胚率显著高于对照组($P<0.05$), 添加 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 壳寡糖组的囊胚率显著低于对照组($P<0.05$)。本试验表明, 在化学限定培养基中添加适量的壳寡糖有利于改善小鼠胚胎的质量, 但高剂量的壳寡糖可能不利于小鼠胚胎的早期发育。

关键词: 壳寡糖; 小鼠; 胚胎; 体外发育

中图分类号: S814.8; S865.13

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)02-0196-05

Effect of chitooligosaccharides on *in vitro* development of mouse embryos

GAO Yang¹, Wang Lunxue², ZHANG Meiling¹, SONG Dandan¹, LI Yunsheng¹, ZHANG Yunhai¹

(1. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023)

Abstract: The present study was to examine the effect of chitooligosaccharides on pre-implantational development of mouse embryos. Chitooligosaccharides at different concentrations 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (control), 5, 10, 50, 100, and 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ were added into the culture medium. Pronuclear-stage embryos derived from *in vivo* and *in vitro* fertilization were randomly divided into six groups. The rate of cleavage, blastocyst formation, and blastocyst quality (total cell number and the ratio of inner cell mass (ICM) to total cell number) were recorded at 24 h and 72 h after the onset of *in vitro* culture. For the *in vivo* fertilized embryos, the total cell number of the 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$), but the cleavage rate and the blastocyst rate of the 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group were significantly lower than that of the control group ($P<0.05$). For the *in vitro* fertilized embryos, the blastocyst rate of the 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$), but the blastocyst rate of the 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group was significantly lower than that of the control group ($P<0.05$). In conclusion, the embryo culture medium supplemented with the appropriate chitooligosaccharides might be helpful to improve the quality of mouse embryos; however, the high dose chitooligosaccharides may be unfavorable to the early development of mouse embryos.

Key words: chitooligosaccharides; mouse; embryo; *in vitro* development

胚胎培养基的成份是影响动物胚胎质量和发育命运的关键因素。与体内自然的发育环境相比, 体外培养基支持胚胎发育的效率和质量还不够理想^[1]。胚胎体外培养基主要含有能量物质、蛋白质和盐类等, 糖类作为能量物质之一, 为哺乳动物胚

胎的发育提供能量支持。有研究表明糖类存在于哺乳动物生殖道中^[2], 并且对于胚胎发育至囊胚阶段是一种必须添加的组份^[3]。

壳寡糖是天然多糖中唯一大量存在的碱性氨基寡糖^[4-6], 其由 2~10 个氨基葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键

收稿日期: 2014-11-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372347)资助。

作者简介: 高 阳, 硕士研究生。

* 通信作者: 张运海, 博士, 教授。E-mail: yunhaizhang@ahau.edu.cn

连接而成,并具有相对分子量小、毒性低和水溶性好等优势^[7]。此外,壳寡糖还具有抗肿瘤^[8],促进有益菌生长^[9],提高免疫力^[10],降低血压、血糖、血脂和胆固醇^[11]等多种生理功能。唐晓琳等^[12]证明壳寡糖螯合锌可以改善和促进雌性小鼠的生长和繁殖性能。吕中等^[13]证明壳寡糖可以明显提高小鼠细胞免疫和体液免疫的功能。王秀武等^[14]表明日粮中添加壳寡糖可显著降低仔猪死亡率和次品率,提高饲料转换率和增重。

目前,国内外关于壳寡糖在动物生产方面的研究多集中在其对于机体整个生殖系统的作用,但由于其组成复杂及各组分之间的相互影响,究其对于生殖系统某个环节如胚胎发育等方面的作用还尚未知晓。因此,本研究以昆明小鼠作为试验动物,通过向胚胎培养基中添加不同浓度的壳寡糖,研究其对小鼠胚胎早期发育效率及胚胎质量的影响,为揭示壳寡糖对小鼠体外胚胎早期发育的作用机制,及探索壳寡糖在生殖调控方面的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

昆明小鼠购自安徽医科大学实验动物中心;壳寡糖壳聚合度在 2~8 之间,脱乙酰度在 95%以上,分子量在 300~2000 Da 之间,由中国科学院大连化学物理研究所 1805 课题组提供;孕马血清促性腺激素(PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(hCG)均购自宁波第二激素厂;胚胎培养液为化学限定型培养液 KSOM(K⁺-simple optimized medium, Millipore);除非特别说明,其余化学试剂均购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 超数排卵

选取 6~8 周龄的昆明雌鼠腹腔注射 10 IU 的 PMSG,间隔 48 h 腹腔注射 10IU 的 hCG。

1.3 胚胎收集及制备

1.3.1 体内受精胚胎的制备 雌鼠注射 hCG 后立即与性成熟雄鼠按 1:1 合笼交配,次晨检查有阴道栓者提示已经成功交配。注射 hCG 22 h 后用颈椎脱臼法处死有阴栓的雌鼠,迅速分离出两侧输卵管,放在预热的 N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸(HEPES)操作液中,在体视显微镜下用 1 mL 注射器针头划破输卵管膨大部,使卵丘卵母细胞复合体(Cumulus oocyte complexes, COCs)充分逸出,用移液枪将 COCs 移入透明质酸酶(4 mg·mL⁻¹)中消化去除卵丘细胞,经在人输卵管液(human tubal fluid, HTF)中洗涤 3 次。挑选有雌雄原核或排出第二极体

的受精卵备用。

1.3.2 体外受精胚胎的制备 颈椎脱臼法处死 8~10 周龄雄鼠,打开腹腔取出两侧附睾尾,置于 HTF 获能液中释放精子,将其置于 5%CO₂、95%空气、37℃饱和湿度的 CO₂ 培养箱中获能 40~60 min。注射 hCG 15~16 h 后,颈椎脱臼法处死雌鼠,分离出两侧输卵管,放在预热的 HEPES 操作液中,在体视显微镜下用 1 mL 注射器针头划破输卵管膨大部,使 COCs 充分逸出。将 COCs 移入平衡好的 HTF 受精皿中,将精子按 1×10⁶ 个·mL⁻¹ 的密度加入受精液滴中,精卵共孵育 6 h。挑选有雌雄原核或排出第二极体的受精卵备用。

1.4 免疫荧光染色

取小鼠囊胚于 DPBS+0.3%PVP 试剂中快速洗 3 次,移入 4%多聚甲醛中室温固定 15 min,DPBS+0.3%PVP 试剂中洗涤 3 次,每次 5 min 进行固定。将固定好的胚胎放入 DPBS+0.5%Triton X-100 中穿孔 30 min,然后在 DPBS+0.3%PVP 中洗涤 3 次,每次 5 min;再将其移入封闭液(DPBS+1%BSA)中常温封闭 2 h;将胚胎移入一抗(含 1%Anti-Cdx2 antibody(ab88129)抗体的 DPBS+1%BSA)中 4℃过夜孵育约 18 h,再用 DPBS+0.3%PVP 洗 3 次,每次 5 min;避光下将胚胎移入二抗(含 0.5%FITC 标记的山羊抗兔 IgG(H+L)抗体的 DPBS+1%BSA)中 38.5℃孵育 60 min,再用 DPBS+0.3%PVP 洗 3 次,每次 5 min;将胚胎放入 1 μg·mL⁻¹ DAPI 中室温处理 10 min,DPBS+0.3%PVP 洗 3 次,每次 5 min。将胚胎转移至载玻片的甘油液滴中,用凡士林进行封片。于倒置荧光显微镜下激发、拍照,进行内细胞团数和囊胚总细胞数计数。

1.5 试验设计

试验 1: 比较培养基中添加不同浓度壳寡糖对昆明小鼠体内受精原核胚胎早期发育及囊胚质量的影响。试验共分 5 组,每组重复 7 次。每个重复以 14~15 枚/50 μL 液滴的培养密度将原核期胚胎培养在添加 0、10、50、100 和 200 μg·mL⁻¹ 5 种不同浓度壳寡糖的培养基中,于 24 h 和 72 h 后统计卵裂率和囊胚率。

试验 2: 根据试验 1 的结果,为进一步探索壳寡糖对小鼠体内受精原核胚胎早期发育的最佳浓度,试验共分 3 组,每组重复 8 次。每个重复以 14~15 枚/50 μL 液滴的培养密度将原核期胚胎培养在添加 0、5 和 10 μg·mL⁻¹ 3 种不同浓度壳寡糖的培养基中,于 24 h 和 72 h 后统计卵裂率和囊胚率。

试验 3: 比较培养基中添加不同浓度壳寡糖对

昆明小鼠体外受精原核胚胎早期发育及囊胚质量的影响。试验共分5组, 每组重复8次。每个重复以13~14枚/50 μL 液滴的培养密度将体外受精原核胚胎培养在添加0、5、10、100和200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 4种不同浓度壳寡糖的培养基中, 于24 h和72 h后统计卵裂率和囊胚率。

1.6 数据处理

采用 SPSS(17.0 版) 软件单因素方差分析 (ANOVA) 法对卵裂率、囊胚率、囊胚总细胞数、内细胞团数占囊胚总细胞数的比率等数据进行统计分析, 并用 LSD 检验方法比较各试验组间的差异显著性, $P < 0.05$ 时为差异显著。

2 结果与分析

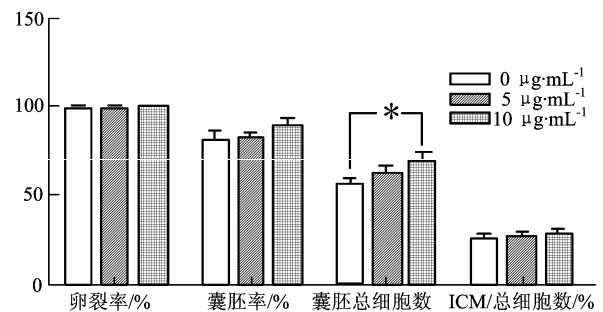
2.1 不同浓度壳寡糖对小鼠体内受精原核胚胎发育的影响

培养液中添加不同浓度的壳寡糖时小鼠体内受精原核胚胎的培养结果及囊胚细胞计数见表1和图1。添加低浓度的壳寡糖有促进小鼠原核胚胎的卵裂率和囊胚率提高的趋势, 但无差异显著性 ($P > 0.05$)。当壳寡糖浓度达到200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 卵裂率 ($83.87\% \pm 3.92\%$ vs. $93.65\% \pm 3.00\%$) 和囊胚率 ($33.62\% \pm 9.67\%$ vs. $75.57\% \pm 7.01\%$) 与对照组相比明显降低 ($P < 0.05$)。对各试验组囊胚进行免疫荧光染色统计囊胚总细胞数, 发现10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 试验组的囊胚总细胞数 (68.20 ± 3.0 vs. 57.00 ± 2.64) 显著高于其他各试验组 ($P < 0.05$)。

2.2 不同浓度壳寡糖对小鼠体外受精原核胚胎发育的影响

培养液中添加不同浓度的壳寡糖时小鼠体外受精原核胚胎的培养结果及囊胚细胞计数见表2。添加不同浓度的壳寡糖对小鼠体外受精原核胚胎的卵裂

率均无显著影响 ($P > 0.05$), 但10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 壳寡糖组的囊胚率 ($89.24\% \pm 4.30\%$ vs. $67.12\% \pm 8.63\%$) 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。当壳寡糖浓度达到200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 囊胚率 ($18.67\% \pm 8.66\%$ vs. $67.12\% \pm 8.63\%$) 显著低于对照组 ($P < 0.05$)。对各试验组囊胚进行免疫荧光染色统计囊胚总细胞数, 发现各试验组的囊胚总细胞数和内细胞团数占总细胞数的比率均无显著差异 ($P > 0.05$)。



1) 卵裂率=卵裂数/培养数; 2) 囊胚率=囊胚数/卵裂数; 同列标*表示差异显著 ($P < 0.05$)

1) Cleavage rate is defined as the number of cleaved embryos/the number of cultured embryos; 2) Blastocyst development rate is defined as the number of blastocysts/the number of cultured embryos; values with * within a column present significantly different ($P < 0.05$)

图1 不同浓度壳寡糖对小鼠体内受精原核胚胎发育影响
Figure 1 Effects of chitoooligosaccharides on preimplantation development of mouse pronuclear stage embryos derived from *in vivo* fertilization

3 讨论

本试验研究了壳寡糖在小鼠体内受精胚胎和体外受精胚胎体外发育过程中的作用, 检测了胚胎的发育效率和囊胚质量。结果发现, 在小鼠体内受精胚胎培养液中添加不同浓度的壳寡糖, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的壳寡糖可以显著提高囊胚总细胞数, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

表1 不同浓度壳寡糖对小鼠体内受精原核胚胎发育的影响

Table 1 Effect of chitoooligosaccharides on preimplantation development of mouse embryos derived from *in vivo* fertilization at the pronuclear stage

组别 Group	培养胚胎数 No. of presumptive zygotes cultured	卵裂数(卵裂率/%) No. of embryos cleaved (% , mean \pm S.E.M)	囊胚数(囊胚率/%) No. of blastocysts (% , mean \pm S.E.M)	囊胚总细胞数(N=10) Total cell No. of blastocyst (mean \pm S.E.M, n=10)	ICM/总细胞数%(N=10) Ratio of ICM to total cell number (% , mean \pm S.E.M, n=10)
0	103	95(93.65 \pm 3.00 ^a)	73(75.57 \pm 7.01 ^a)	57.00 \pm 2.64 ^a	25.97 \pm 1.64 ^{ab}
10	104	103(98.98 \pm 1.02 ^a)	80(75.81 \pm 7.42 ^a)	68.20 \pm 3.08 ^b	27.71 \pm 1.45 ^a
50	105	99(93.82 \pm 2.61 ^a)	67(61.59 \pm 8.84 ^b)	64.10 \pm 4.15 ^{ab}	29.79 \pm 1.17 ^a
100	103	100(98.41 \pm 1.59 ^a)	62(58.33 \pm 6.03 ^a)	63.40 \pm 5.22 ^{ab}	22.22 \pm 1.89 ^b
200	103	88(83.87 \pm 3.92 ^b)	36(33.62 \pm 9.67 ^b)	57.20 \pm 2.80 ^a	22.99 \pm 1.45 ^b

注: 1) 卵裂率=卵裂数/培养数; 2) 囊胚率=囊胚数/培养数; 同列上标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Note: 1) Cleavage rate is defined as the number of cleaved embryos/the number of cultured embryos; 2) Blastocyst development rate is defined as the number of blastocysts/the number of cultured embryos; values with different superscript letters within a column present significantly different ($P < 0.05$). The same below.

表 2 不同浓度壳寡糖对小鼠体外受精原核胚胎发育的影响

Table 2 Effects of chitooligosaccharides on *in vitro* development of mouse embryos derived from *in vitro* fertilization

组别 Group	培养胚胎数 No. of presumptive zygotes cultured	卵裂数(卵裂率/%) No. of embryos cleaved (%, mean±S.E.M)	囊胚数(囊胚率/%) No. of blastocysts (%, mean±S.E.M)	囊胚总细胞数(N=10) Total cell No. of blastocyst (mean±S.E.M, n=10)	ICM/总细胞数%(N=10) Ratio of ICM to total cell number (%, mean±S.E.M, n=10)
0	109	104(93.89±2.86)	79(67.12±8.63 ^{ab})	58.90±3.05	22.62±2.41
5	109	108(99.43±0.57)	90(79.62±4.61 ^{ac})	61.80±3.08	21.65±1.91
10	108	107(99.43±0.57)	99(89.24±4.30 ^c)	64.30±2.40	24.33±1.49
100	109	107(97.35±2.08)	61(49.76±8.04 ^b)	59.90±6.09	24.06±1.76
200	111	105(91.99±5.38)	24(18.67±8.66 ^d)	53.90±2.83	23.93±2.11

的壳寡糖可以显著降低囊胚率; 在小鼠体外受精胚胎培养液中添加不同浓度的壳寡糖, $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的壳寡糖可以显著提高原核胚胎发育到囊胚的效率, $200 \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的壳寡糖可以显著降低囊胚率。

壳寡糖具有抗肿瘤、促进有益菌生长、提高免疫力、降低血压和血糖等多种生理功能。本试验发现 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 壳寡糖组可以显著提高体内受精胚胎的囊胚总细胞数和体外受精胚胎的囊胚率, 这一结果与 Liu 等^[15]等结果相似, Liu 在断奶仔猪的日粮中添加壳寡糖能够提高其日增重、日采食量和料肉比等指标而促进仔猪生长发育。张元等^[16]在小鼠细胞培养液里添加壳寡糖可以明显地促进脾细胞和巨噬细胞的增殖, 这说明壳寡糖对动物的繁殖性能和细胞增殖具有一定的促进作用。研究显示, 壳寡糖能够提高仔猪的胰岛素样生长因子-1(IGF-1)和生长激素(GH)的表达水平^[17], 而 IGF-1 能提高体外受精囊胚的形成能力^[18]。但壳寡糖究竟是不是经由 GH-IGF-I 信号通路而发挥促进动物胚胎早期发育的作用还有待进一步探索。

壳寡糖具有水溶性好、容易被人体吸收等生物活性, 在生物体内降解后变成氨基葡萄糖, 其能与蛋白质形成糖蛋白、蛋白聚糖和糖脂等糖类物质。研究表明, 在培养液中添加高浓度的葡萄糖能够显著抑制胚胎着床前的发育^[19], 本实验发现在胚胎培养液中添加 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的壳寡糖抑制了小鼠早期胚胎的发育效率, 显著降低了囊胚率。倪永林研究发现高浓度葡萄糖环境下小鼠卵母细胞、2 细胞胚胎、囊胚存活率均较正常浓度葡萄糖环境低, 促进了早期卵母细胞和胚胎细胞的凋亡^[20]。彭礼繁等^[21]在牛体外受精胚胎培养液中添加葡萄糖, 发现添加 6.10mmol 的葡萄糖时能够显著提高囊胚率, 葡萄糖的添加量超过 9.15mmol 时不仅不能促进胚胎的早期发育, 反而抑制了胚胎发育到囊胚的效率。这可能是由于高浓度糖类物质在胚胎发育过程中诱导产生较多的活性氧簇, 导致了胚胎发育阻滞^[22]。

总之, 本研究表明壳寡糖在小鼠体内受精和体

外受精胚胎发育过程中具有重要作用, 但具有剂量依赖性。低浓度的壳寡糖能够提高小鼠胚胎发育到囊胚的效率, 改善囊胚质量, 但高浓度的壳寡糖会显著抑制胚胎发育到囊胚的效率。

参考文献:

- [1] Prather R S, Day B N. Practical considerations for the *in vitro* production of pig embryos[J]. Theriogenology, 1998, 49: 23-32.
- [2] Gardner D K, Leese, H J. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*[J]. J Reprod Fertil, 1990, 88: 361-368.
- [3] Chatot C L, Ziomek C A, Bavister B D, et al. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*[J]. J Reprod Fertil, 1989, 86(2): 679-688.
- [4] Synowiecki J, Al-Khateeb N A. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives[J]. Crit Rev Food Sci, 2003, 43(2): 145-171.
- [5] Romoren K, Thu B J, Evensen O, et al. Immersion delivery of plasmid DNA II. A study of the potentials of a chitosan based delivery system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry[J]. J Control Release, 2002, 85(1-3): 215-225.
- [6] VandeVord P J, Matthew H W T, DeSilva S P, et al. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice[J]. J Biomed Mater, 2002, 59(3): 585-590.
- [7] 胡志鹏. 壳寡糖的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(4): 210-212.
- [8] Suzuki K, Tokoro A, Okawa Y, et al. Effect of N-acetylchito-oligosaccharides on activation of phagocytes[J]. Microbiol Immunol, 1986, 30(8): 777-787.
- [9] 杜昱光, 白雪芳, 虞星炬, 等. 寡聚糖类物质生理活性的研究[J]. 中国生化药物杂志, 1997, 18(5): 268-271.
- [10] 窦江丽, 谭成玉. 壳寡糖对小鼠免疫的调节作用[J]. 中国海洋药物, 2005, 5(1): 33-35.
- [11] Choi Y J, Kim E J, Piao Z, et al. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. Strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides[J]. Appl Environ Microb, 2004, 70(8): 4522-4531.
- [12] 唐晓琳, 丁琳琳, 杨洋, 等. 壳寡糖螯合锌对雌性昆明小鼠生长和繁殖性能的影响[J]. 营养学报, 2013, 35(3):

- 262-267.
- [13] 吕中明, 石根勇, 陈新霞, 等. 壳聚糖免疫调节作用的研究[J]. 实用预防医学, 2001, 8(5): 330-332.
- [14] 王秀武, 张丽, 杜昱光, 等. 海洋寡聚糖对仔猪生产性能及血液理化指标的影响[J]. 2005, 17(6): 794-796.
- [15] Liu P, Piao X S, Kim S W, et al. Effect of chito- oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility intestinal morphology, and fecal shedding of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs[J]. J Anim Sci, 2008, 86(10): 2609-2618.
- [16] 张元, 林强, 宋玥. 壳寡糖及其磷酸化修饰产物对小鼠脾淋巴细胞增殖及诱生细胞因子的影响[J]. 食品科技, 2012, 37(2): 11-15.
- [17] Tang Z R, Yin Y L, Nyachoti C M, et al. Effect of dietary supplementation of chitosan and galacto-mannan- ligo-saccharide on serum parameters and the insulin-like growth factor-I mRNA expression in early-weaned pig-lets[J]. Domest Anim Endocrin, 2005, 28(4): 430-441.
- [18] Lighten A D, Moore G E, Winston R M, et al. Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical *in-vitro* fertilization culture[J]. Hum Reprod, 1998, 13(11): 3144-3150.
- [19] Ludwig T E, Squirrell J M, Palmenberg A C, et al. Relationship between development, metabolism, and mitochondrial organization in 2-cell hamster embryos in the presence of low levels of phosphate[J]. Biol Reprod, 2001, 65(6): 1648-1654.
- [20] 倪永林. 高糖环境下小鼠卵母细胞和早期胚胎中 Bcl-2 表达及其意义[D]. 汕头: 汕头大学, 2010.
- [21] 彭礼繁, 罗光彬, 李东全, 等. 葡萄糖在牛体外受精及胚胎发育中的影响[J]. 中国草食动物, 2008, 28(5): 3-6.
- [22] Almeida P A, Bolton V N. Cytogenetic analysis of human preimplantation embryos following developmental arrest *in vitro*[J]. Reprod Fert Develop, 1998, 10(6): 505-513.