

黄芩苷、川芎嗪对小鼠体外培养胚胎 冷冻-解冻及移植效果的研究

高建明¹, 孙玉成¹, 穆祥¹, 陈武¹, 于同泉², 杨柳²,
路莘², 张建芳¹, 范涛¹, 苏辉¹

(1. 北京农学院动物科学技术系, 北京 102206; 2. 农业应用新技术北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要: 将中药有效成分黄芩苷(Baicalin, Bai)和川芎嗪(Ligustrazine, Lig)添加到小鼠 2-细胞胚胎培养液中进行体外培养, 比较其体外发育能力, 并将体外发育的桑椹胚、囊胚进行 2 种程序常规冷冻。解冻后形态正常的桑椹胚、囊胚分别培养 8~14 h、6~8 h, 比较各组胚胎的冷冻-解冻发育效果及冷冻胚胎移植妊娠率和产仔率等。结果: 各试验组胚胎孵化率, Bai 组(80.6%)、Lig 组(78.3%)极显著高于对照组(51.8%)($P < 0.01$)。孵化胚胎细胞计数结果显示, Bai 组(81.9 ± 6.2)和 Lig 组(83.9 ± 7.7)与对照组(77.4 ± 5.6)差异极显著($P < 0.01$); 程序 1 和 2 的桑椹胚解冻囊胚发育率, 以 Bai、Lig 组显著高于对照组; 其囊胚解冻存活率, 2 个试验组均好于对照组。受体妊娠率、产仔率以及初生仔鼠、离窝仔鼠平均体重、离窝成活率等指标, 各组间均无显著差异($P > 0.05$), 但以中药有效成分各组别均好于对照组。结果表明: 中药有效成分 Bai 和 Lig 能显著地提高小鼠 2-细胞胚胎体外发育能力, 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; 体外培养; 冷冻-解冻; 胚胎移植; 小鼠

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)10-1120-06

Study on Effects of Baicalin and Ligustrazine on Early Embryos *in vitro* Culture and the Froze Embryos Transfer in Mice

GAO Jian-ming¹, SUN Yu-cheng¹, MU Xiang¹, CHEN Wu¹, YU Tong-quan²,
YANG Liu², LU Ping², ZHANG Jian-fang¹, FAN Tao¹, SU Hui¹

(1. Department of Animal Science and Technology, Beijing Agricultural
College, Beijing 102206, China; 2. New Technology Key
Laboratory of Agricultural Application in Beijing, Beijing 102206, China)

Abstract: The effect supplementing with Chinese Medicine effective constituents Baicalin(Bai) and Ligustrazine(Lig) into culture medium on 2-cell mouse embryos *in vitro* culture was compared in this study. And the morula and blastocyst *in vitro* culture were conserved through two freezing process. The frozen-thawed modality choiceness embryos were cultured to blastocyst by 8-14 h or 6-8 h and transferred to recipient uterus. The results showed that the hatching rate of embryos at 120 h from Bai(80.6%) and Lig(78.3%) were significant higher than control group (51.8%), respectively ($P < 0.01$). According to the cell amount of embryos hatched, the difference between experiment groups Lig(83.9 ± 7.7), Bai(81.9 ± 6.2) and control group(77.4 ± 5.6) were extremely significant ($P < 0.01$). The development rates of morula cultured for 8-14 hours after frozen-thawed in two freezing process, the Bai and the Lig groups were significantly higher than the control group. The livability of Blastocyst cultured for 6-8 hours after frozen-thawed in two freez-

收稿日期: 2006-09-18

基金项目: 北京市委组织部优秀人才培养专项经费 D 类资助项目; 农业应用新技术北京市重点实验室开放课题项目(KF2003-04)

作者简介: 高建明(1960-), 女, 北京人, 教授, 硕士, 主要从事动物繁殖生物技术方面的研究, Tel: 010-80799424, E-mail: gjmbac@sohu.com

ing process, the Bai and the Lig groups were better than the control group. The recipient pregnancy rates, littering rates of embryos, initial weight of baby mouse, mean weight of away cote and living rate of away cote of Bai and Lig groups were better than control group. These results indicated the two Chinese Medicine effective constituents can improve 2-cell mouse embryo quality *in vitro* culture and make for the developmental potential of frozen-thawed transfer embryos.

Key words: Chinese Medicine effective constituents; early embryos; *in vitro* culture; frozen-thawed; embryo transfer; mouse

哺乳动物胚胎体外生产技术以体外受精技术 (*In vitro* fertilization, IVF) 为依托,其主要技术环节为卵母细胞的体外成熟、成熟卵母细胞的体外受精和受精卵的体外培养,以获得大量可供使用的优质卵母细胞和胚胎,并利用胚胎移植技术将各种人工操作制备的胚胎移入受体动物体内,达到较高的妊娠率,从而建立起完善的技术体系,籍此走向市场。然而,目前胚胎体外培养体系还存在许多问题,虽经采用改进培养液成分,改善培养条件,建立体细胞与胚胎共培养体系和添加生长因子、细胞因子等手段后胚胎质量有所提高,但体外受精卵的囊胚发育率仍远低于体内受精,与体内受精囊胚相比,体外受精囊胚的细胞总数和内细胞团细胞数量明显减少,胚胎移植妊娠率和产仔率较低,这些问题均严重影响了胚胎工厂化生产和产业化发展。因此,探索开辟胚胎体外培养生长发育的新途径,提高其发育率和移植妊娠率十分必要。目前,国内外有关中草药有效成分对体外胚胎发育作用的研究甚少,本试验在笔者探讨中药有效成分对小鼠胚胎体外培养的前期研究结果的基础上^[1~3],进一步探讨了黄芩苷(Baicalin, Bai)和川芎嗪(Ligustrazine, Lig) 2种中药有效成分对体外培养的小鼠胚胎冷冻-解冻及移植的效果,以期建立完善的哺乳动物早期胚胎体外培养体系提供一定的参考。

1 材料与方 法

1.1 2-细胞胚胎获取

以健康、性成熟的 ICR 品系 SPF 小鼠(购自北京实验动物中心)为试验动物,雌鼠体重 23~34 g,雄鼠体重 33~35 g。根据雌鼠阴部变化选择发情间期和发情前期雌性小鼠^[4]腹腔注射 PMSG(天津实验动物中心,20040329),间隔 48 h 再注射 hCG(宁波市激素制药厂,040601)并与公鼠 1:1 合笼,于注射 hCG 46 h 后采集见栓小鼠的输卵管,在体视显微镜下收集 2-细胞胚胎。

1.2 试验设计与方法

1.2.1 Bai 和 Lig 对小鼠 2-细胞胚胎体外发育效果的影响

1.2.1.1 体外培养:以 mCZB 为基础液,添加双抗(青霉素 0.06 mg/mL+链霉素 0.07 mg/mL)的 mCZB 液为对照组,分别添加 Bai (4 μ g/mL, 纯度 $\geq 97\%$) 和 Lig (0.5 μ g/mL, 纯度 $\geq 99\%$) 为中药试验组。采用微滴法在 5% CO₂、95% 空气、37℃、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养,入胚后 24、72 h 换液并在培养液中均加入葡萄糖(0.1 g/100 mL),入胚后 48、72、96、120 h 检查胚胎发育情况。

1.2.1.2 胚胎细胞计数:将培养 120 h 至孵化时期的胚胎置于 0.5% 柠檬酸钠低渗液中作用 0.5~1 min 后移到载玻片上,加 1 滴(约 20 μ L)4% 乙酸,30 s 后慢慢吸去乙酸使胚胎顺势铺展,空气中稍干,以 10% Giemase 染液染色 1 min,用低渗液洗片,镜检孵化胚胎细胞数目,比较不同处理组对胚胎细胞数量的影响。

1.2.2 Bai 和 Lig 对体外培养小鼠胚胎的冷冻-解冻发育效果的影响:将上述组别培养的桑椹和囊胚期胚胎分别采用 CL-8800 程序控温仪进行两种控温程序冷冻,并解冻观察冷冻胚胎复苏率、培养发育率。

冷冻液为用 PBS 配制的 1.5 mol/L 乙二醇,每支细管装 10 枚左右胚胎。

1.2.2.1 冷冻程序:程序 1,将装有胚胎的细管放入起始温度为 20℃ 的冷冻仪,以 1℃/min 的速度下降至 -6℃,平衡 5 min 后植冰,植冰后平衡 10 min,以 0.5℃/min 的速度降至 -35℃,平衡 5 min 后投入液氮保存;程序 2,将装有胚胎的细管放入起始温度为 18℃ 的冷冻仪,以 4℃/min 的速度下降至 0℃,再以 1℃/min 的速度下降至 -6℃,平衡 5 min 后植冰,植冰后平衡 8 min,以 0.5℃/min 的速度降至 -30℃,平衡 5 min,再以 2℃/min 的速度降至 -36℃,平衡 5 min 后投入液氮

保存。

1.2.2.2 冷冻胚胎解冻培养:将冷冻细管从液氮中取出,投入 37℃水中 10~15 s 取出,推出细管中胚胎,转入 0.5 mol/L 蔗糖溶液中,平衡 5 min 以脱去冷冻液,再用各组别培养液分别清洗 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 8~14、6~8 h,观察并记录桑椹胚发育至囊胚期的发育率和囊胚的存活率。

1.2.3 Bai 和 Lig 对冷冻-解冻胚胎移植效果的影响 将上述冷冻-解冻复苏后培养发育正常的囊胚进行移植,以观察各组胚胎妊娠和产仔效果。

1.2.3.1 假孕鼠的处理:受体母鼠与按常规方法进行输精管结扎的雄鼠 1:1 或 2:1 于夜间合笼,第 2 天早 08:00 开始,每间隔 5 h 检查阴栓一次,有栓者记为假孕 0 h。根据所移植胚胎从体内受精发育到体外培养、冷冻-解冻后再培养,约 90 h,因此,选

择见栓 90 h 的受体母鼠进行胚胎移植。

1.2.3.2 胚胎移植:按常规方法将胚胎移植于子宫角部位。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体重,仔鼠出生后的第 18 天分窝,并称取体重、记录仔鼠成活数目。

1.3 数据处理

利用 DPS 软件进行单因素方差分析和 t 检验、 χ^2 检验。

2 结果

2.1 Bai 和 Lig 对小鼠 2-细胞胚胎体外发育效果的影响

2.1.1 Bai 和 Lig 体外培养小鼠 2-细胞胚胎 120 h 的效果由表 1 可见,体外培养 24、48 h,各组间其胚胎发育率均无显著差异($P>0.05$);72、96 h 试验各

表 1 Bai 和 Lig 对小鼠 2-细胞胚胎体外发育的影响

Table 1 Effect of Bai and Lig on 2-cell mouse embryos *in vitro* development

组别 Groups	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	2-细胞胚胎数/枚 No. of 2-cell embryos	(4-8 C)/%	(M-B)/%	(B-XB)/%	(XB-HB)/%	HB/%
对照组 Control	228	94.7 ^a (216/228)	96.5 ^a (220/228)	76.8 ^{aA} (175/228)	63.2 ^A (144/228)	51.8 ^A (118/228)
Bai 组 Bai	222	98.7 ^a (219/222)	98.7 ^a (219/222)	91.4 ^{Bc} (203/222)	90.5 ^{Bb} (201/222)	80.6 ^{Bb} (179/222)
Lig 组 Lig	221	92.8 ^a (205/221)	96.4 ^a (213/221)	90.1 ^{Bc} (199/221)	86.0 ^{Bb} (190/221)	78.3 ^{Bb} (173/221)

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

M. 桑椹胚; B. 囊胚; XB. 扩张囊胚; HB. 孵化囊胚。下同

The same capital and same small letters in superscripts don't differ significantly ($P>0.05$), different small letters in superscripts are differ significantly ($P<0.05$), different capital letters in superscripts are significantly different ($P<0.01$). M. Morula; B. Blastocyst; XB. Expand blastocyst; HB. Hatched blastocyst. The same as below

组胚胎发育率均显著或极显著高于对照组($P<0.05$, $P<0.01$);120 h 试验各组囊胚孵化率均极显著高于对照组($P<0.01$)。

2.1.2 Bai 和 Lig 体外培养 2-细胞胚胎 120 h 孵化胚胎细胞数由表 2 可见,各试验组体外培养 120 h 孵化胚胎细胞数均极显著高于对照组($P<0.01$)。

2.2 Bai 和 Lig 对体外培养小鼠胚胎的冷冻-解冻发育效果的影响

2.2.1 Bai 和 Lig 对小鼠 2-细胞胚胎体外培养效果及冷冻情况由表 3 可见,体外培养小鼠 2-细胞胚胎

表 2 体外培养小鼠 2-细胞胚胎 120 h 孵化胚胎细胞数目
Table 2 The average cell number of 2-cell mouse embryos *in vitro* culture after 120 h

组别 Groups	胚胎数量/枚 No. of embryos	孵化胚胎细胞平均数目/个 ($\bar{x} \pm SD$) The average cell number of HB
Control	35	77.4 \pm 5.6 ^A
Bai	29	81.9 \pm 6.2 ^C
Lig	34	83.9 \pm 7.7 ^B

表 3 Bai 和 Lig 对小鼠 2-细胞胚胎体外培养效果及冷冻情况

Table 3 Effect of Bai and Lig on 2-cell mouse embryos *in vitro* culture and freezing

组别 Groups	0 h		43~48 h		程序 1 Freezing process 1		程序 2 Freezing process 2	
	2-细胞胚胎数/枚 No. of 2-cell embryos		M/%	B/%	桑椹胚数/枚 No. of M	囊胚数/枚 No. of B	桑椹胚数/枚 No. of M	囊胚数/枚 No. of B
	Control	286	50.3 ^a (144/286)	41.3 ^a (118/286)	77	41	67	64
Bai	337	51.6 ^a (174/337)	48.1 ^a (162/337)	102	96	72	66	
Lig	282	51.1 ^a (144/282)	43.6 ^a (123/282)	74	69	70	54	

43~48 h,其桑椹胚和囊胚发育率,各组间均无显著差异($P>0.05$)。

2.2.2 Bai 和 Lig 对小鼠桑椹胚解冻后体外培养效果的影响由表 4 可见,桑椹胚解冻后体外培养 8~

表 4 Bai 和 Lig 对小鼠桑椹胚解冻后体外培养效果的影响

Table 4 Effect of Bai and Lig on mouse morula thawing and *in vitro* culture

组别 Groups	程序 1 Freezing process 1				程序 2 Freezing process 2			
	解冻胚胎/枚 No. of thawed embryos	死亡胚胎/枚 No. of died embryos	培养胚/枚 No. of cultured embryos	8~14 h 囊胚发育率/% Blastocyst rates after 8-14 h	解冻胚胎/枚 No. of thawed embryos	死亡胚胎/枚 No. of died embryos	培养胚/枚 No. of cultured embryos	8~14 h 囊胚发育率/% Blastocyst rates after 8-14 h
	Control	74	23	51	48.6 ^{Aa} (36/74)	67	8	59
Bai	76	5	71	65.8 ^B (50/76)	72	5	67	80.6 ^B (58/72)
Lig	74	5	69	81.1 ^{Bb} (60/74)	69	1	68	78.3 ^B (54/69)

14 h 囊胚发育率,程序 1 中 Bai 组显著高于对照组($P<0.05$),Lig 组极显著高于对照组($P<0.01$);程序 2 中 Bai 组和 Lig 组极显著高于对照组($P<0.01$);两程序中 Bai 组与 Lig 组无显著差异($P>0.05$)。

2.2.3 Bai 和 Lig 对小鼠囊胚解冻后体外培养效果的影响由表 5 可见,囊胚解冻后体外培养 6~8 h 囊胚存活率,程序 1 中各组间无显著差异($P<0.05$);程序 2 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 1 对照组极显著高于程序 2($P<0.01$),其他组间差异不显著($P>0.05$)。

2.3 Bai 和 Lig 对冷冻-解冻后胚胎移植效果的影响

由表 6 可见,受体妊娠率、产仔率、初生仔鼠和离窝仔鼠平均体重、离窝成活率,各组间均无显著差异($P>0.05$),但中药有效成分 Bai 组和 Lig 组均好于对照组。

3 讨论

本试验结果显示,2 种中药有效成分 Bai、Lig 的

胚胎孵化率(80.6%、78.3%)和孵化胚胎细胞数量(81.9±6.2,83.9±7.7)均极显著高于对照组(51.8%,77.4±5.6)($P<0.01$),这与笔者前期进行的有关研究结果相符合^[2,3];其胚胎发育效果和胚胎细胞数量亦均好于其他研究者在 CZB 中添加瘦素(囊胚孵化率为 36.23%)^[5]、EGF 生长因子(囊胚孵化率为 21.2%、囊胚细胞数 53.40±16.35)^[6]的结果;以及在 KSOM 中添加适量氨基酸、葡萄糖、BSA(囊胚孵化率为 64.8%)^[7]、在人输卵管液(HTL)添加白血病抑制因子(LIF)(囊胚孵化率为 32.5%)^[8]、P-1 培养液添加粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)(囊胚率为 89%)^[9]的结果。可见,中药有效成分 Bai 和 Lig 对早期胚胎体外培养的作用已客观存在,能极显著地促进早期胚胎体外发育及胚胎细胞的增殖。连方等^[10]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^[11]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

表 5 Bai 和 Lig 对小鼠囊胚解冻后体外培养效果的影响

Table 5 Effect of Bai and Lig on mouse Blastocyst thawing and *in vitro* culture

组别 Groups	程序 1 Freezing process 1				程序 2 Freezing process 2			
	解冻胚胎/枚 No. of thawed embryos	死亡胚胎/枚 No. of died embryos	培养胚/枚 No. of cultured embryos	6~8 h 囊胚存活率/% Blastocyst livability after 6-8 h	解冻胚胎/枚 No. of thawed embryos	死亡胚胎/枚 No. of died embryos	培养胚/枚 No. of cultured embryos	6~8 h 囊胚存活率/% Blastocyst livability after 6-8 h
Control	41	1	40	87.8(36/41) ^{Ab}	49	9	40	61.2(30/49) ^{Bb}
Bai	46	1	45	93.5(43/46) ^a	56	2	54	82.1(46/56) ^a
Lig	69	5	64	84.5(58/69) ^a	53	3	50	83.0(44/53) ^a

表 6 胚胎移植效果

Table 6 Effect of embryos transfer

组别 Groups	受体数目/只 No. of recipient	妊娠率/% Pregnancy rates	移植囊胚数/枚 No. of transfer blastocyst		胚胎移植产仔率/% Littering rate of embryos	仔鼠初生重/g Initial weight of baby mouse	离窝成活率/% Living rate of away cote	离窝鼠平均体重/g Mean weight of away cote
			总数 Total number	妊娠受体 Pregnancy recipient				
Control	13	46.2 ^a (6/13)	118	53	52.8 ^a (28/53)	1.45 ^a	60.7 ^a (17/28)	9.9 ^a
Bai	16	56.3 ^a (9/16)	145	90	63.3 ^a (57/90)	1.63 ^a	64.9 ^a (37/57)	10.1 ^a
Lig	19	52.6 ^a (10/19)	194	101	67.3 ^a (68/101)	1.52 ^a	64.7 ^a (44/68)	10.6 ^a

4-细胞及 8-细胞期胚胎的发育有显著促进作用。然而利用中药有效成分对体外培养胚胎的发育及细胞增殖作用的研究尚未见其他报道。

早期胚胎的发育和细胞的增殖与其适宜的微环境密切相关。近年来,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应用于医药、饲料、化妆、食物等领域,其新的作用和机理也不断的被发现。其中,中草药制剂对 cAMP 的影响^[12,13]、抗氧自由基^[14,15]、保胎^[16]、促精子活力^[17]等方面的研究,显示了中草药能从整体上、多靶点、全方位改善机体生理状况的作用特点。有研究表明,用 cAMP 类似物培养早期胚胎有利于囊胚腔的扩张^[18], NO 在胚胎发育中发挥着重要作用,但对剂量敏感,10⁻⁷ mol SNP(亚硝基硫醇)所产生的 NO 能显著促进胚胎后期滋养层的生长,有利于胚胎着床^[19]。在其他方面的试验结果表明,Bai 和 Lig 均具有抗氧化和防止细胞凋亡的作用,并对 NO 的生成有调节作用^[20~26]。本试验所采用的这两种中药有效成分在一定程度上促进了体外胚胎的发育,可能与其具有抗氧化作用有关,减少了自由基对胚胎体外发育的损伤,并可能对 cAMP 和 cGMP 含量具有一定的调控作用,使体外培养微环境更有利于其

生长发育。但其作用机理还有待进一步探讨。

徐平等^[27]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,取得复苏率为 69.59%和 72.61%,朱孝荣等^[28]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)。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-解冻的效果优于对照组,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 4 和 5 可见,2 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的影响无显著差异;各组囊胚的冷冻效果及解冻后胚胎体外发育,程序 1 对照组(87.8%)极显著高于程序 2(61.2%)($P < 0.01$),而程序间 2 种中药有效成分各组对应比较无显著差异($P > 0.05$)。说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。

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 GSHPx 活

力,调节 TXA₂/PGI₂ 平衡,促进胎儿生长^[29]。由表 6 可见,2 种中药有效成分与对照组在妊娠率、产仔率、离窝成活率及离窝体重等方面虽无统计学差异,但均高于对照组,并高出孙艳香等^[30]采用玻璃化冷冻囊胚子宫移植给假孕 3 d 的受体鼠的产仔率 50%。这可能与移植胚胎的质量有关。从而进一步说明,Bai、Lig 对提高体外培养胚胎质量的作用,也可能有助于胚胎正常着床和发育,这还有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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[J]. 中国兽医医药杂志,2005(专辑):24:146~150.
- [3] 孙玉成,高建明,于同泉,等. 3 种中药有效成分对小鼠胚胎体外发育的影响[J]. 中国兽医学报,2006,26(5):570~573.
- [4] 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.
- [5] 陈 骞,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.
- [6] 白照岱. 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.
- [7] 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,2005,25(3):256~261.
- [8] Horng D T, Chang C C, Hsieh Y Y, *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.
- [9] Berh B, Mooney S, Wen Y, *et al.* Preliminary experience with low concentration of 7granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a potential regulator in preimplantation mouse embryo development and apoptosis[J]. J Assist Reprod Genet, 2005, 22(1):25~32.
- [10] 连 方,孙振高,张建伟,等. 二至天葵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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 阮 娜,宋晓平. 补益药对体外培养细胞的影响[J]. 中兽医研究进展,2003,7:158~160.
- [15] 房俊芳,钟秀会. 黄芩的药理研究概述[J]. 中药药理研究进展,2003,7:187~189.
- [16] 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 [D]. 保定:河北农业大学,2004.
- [17] 梁培育. 黄芪注射液体外对人精子运动参数的影响[J]. 中华男科学,2001,10(5):335~337.
- [18] Manejwala F M, Kaji E, Sehultz R M. Development of activatable adenylate cyclase in the preimplantation mouse embryo and a role for camb in blastocoel formation[J]. Cell, 1986, 46:95~103.
- [19] 张靖飞,李裕强,刘月凤. 动物胚胎体外培养研究进展[J]. 动物科学与动物医学,2002,2(19):19~22.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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[J]. 生物化学杂志,1991,7(6):753.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 孙 蓉,孙 玲,刘持年. 川芎抗氧化的研究进展和应用前景[J]. 中国新医药,2003,2(9):47~49.
- [26] 刘晓丽,霍展祥,张金莲. 盐酸川芎嗪体外抗氧化作用的研究[J]. 中国航天医药杂志,2003,2(5):37~39.
- [27] 徐 平,川野佳代,刘丽均,等. 试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,2002,20(4):261~265.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.