

李倩,赵振军,崔龙波,等. MG132 对小鼠卵母细胞排卵后老化的调控作用[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):217-220.

# MG132 对小鼠卵母细胞排卵后老化的调控作用

李倩<sup>1,2</sup>, 赵振军<sup>1</sup>, 崔龙波<sup>1</sup>, 石慧<sup>1</sup>, 刘晓玲<sup>1</sup>, 王敏强<sup>1</sup>

(1. 烟台大学生命科学学院, 山东烟台 264005; 2. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018)

**摘要:**为了研究蛋白酶体抑制剂 MG132 对小鼠卵母细胞排卵后老化的调控作用,找到抑制卵母细胞老化的方案,通过孤雌激活和胚胎发育试验系统研究了 MG132 在不同温度下对小鼠卵母细胞老化的调控作用,并通过体外受精发育以及细胞免疫组化试验,分别研究了 15 °C 时 MG132 对卵母细胞受精后胚胎发育能力、皮质颗粒分布与 BCL2 蛋白水平的影响。结果表明,15 °C 时卵母细胞在添加 1 μmol/L MG132 的 HCZB 中培养 12 h,然后在 37 °C 恢复 6 h,是筛选的抑制卵母细胞老化的优化方案,说明一定低温联合适当浓度的蛋白酶体抑制剂 MG132,可以有效抑制小鼠卵母细胞排卵后老化。

**关键词:**小鼠;卵母细胞;MG132;老化;皮质颗粒;BCL2

**中图分类号:** Q492 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0217-04

停滞在 M II 期的哺乳动物卵母细胞若不及时受精或激活,就会发生老化<sup>[1]</sup>。老化卵母细胞表现为孤雌激活率和碎裂率都增高、促成熟因子(maturation promoting factor, MPF)和促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)活性下降、皮质颗粒分布异常以及 BCL2 基因表达下降。许多研究和临床应用的试验设计都涉及成熟卵母细胞在显微操作和受精前的体外培养。如果用老化卵母细胞作为受体胞质进行体细胞克隆,将会显著降低细胞融合率、核移植和胚胎发育率<sup>[2-3]</sup>。目前为止,关于卵母细胞老化调控的研究还很少,还没有建立有效的抑制卵母细胞老化的方案。找到控制卵母细胞老化的方法,对体外受精、精子胞浆内注射以及核移植等辅助生殖技术与胚胎工程技术会大有益处。

蛋白酶体是由多个亚单位组成的蛋白酶复合体,占哺乳动物细胞蛋白质总量的 1%,在主要的细胞蛋白降解途径中发挥作用<sup>[4]</sup>。在进入第 1 次减数分裂的卵母细胞中,蛋白酶体系统导致泛素介导的细胞周期蛋白 B 的水解<sup>[5-6]</sup>。蛋白酶体抑制剂 MG132 通过泛素-蛋白酶体途径抑制细胞周期蛋白 B 的降解<sup>[5]</sup>。Josefsberg 等报道,在大鼠卵母细胞减数分裂恢复期间,蛋白酶体转移到纺锤体上<sup>[7]</sup>。加入蛋白酶体抑制剂 MG132 后,导致细胞周期蛋白 B 的累积,维持了 MPF 活性,通过阻止第一极体的排出使卵母细胞阻滞在中期 I。在胚胎克隆中,MG132 是常用的蛋白酶体抑制剂。Zhou 等利用蛋白酶体抑制剂 MG132 首次成功克隆出大鼠<sup>[8]</sup>。Gao 等发现蛋白酶体抑制剂 MG132 促进了大鼠的克隆发育<sup>[9]</sup>。阻滞在第 2 次减数分裂中期的卵母细胞保持较高的 MPF 活性,但是随着卵母细胞的老化,其 MPF 活性逐渐降低。我们猜测在老化液中加入适当浓度的 MG132,可以抑制细胞周期蛋白 B 的降解,维持高的 MPF 活性,使卵母细胞阻滞在第 2 次减数分裂中期,从而延缓卵母细胞的老化。

低温降低了细胞的代谢以及 ROS 的产生<sup>[10-12]</sup>。不同动物的卵母细胞对温度的敏感性是不同的。因此,我们猜想在更低的温度下培养卵母细胞,能够抑制卵母细胞老化或者至少降低抑制卵母细胞老化的 MG132 使用剂量。本试验研究了 37、25、15 °C 3 种不同温度下添加 MG132 对卵母细胞老化的抑制情况<sup>[13]</sup>,目的是检验卵母细胞对温度的敏感性,研究在抑制卵母细胞老化过程中,培养温度、时间和 MG132 使用浓度之间的相互作用,从而确立低温下添加低浓度的 MG132 在一定时间内有效抑制卵母细胞老化的方案。本研究不仅有利于理解卵母细胞老化和调控的机制,而且有利于辅助生殖技术与胚胎工程技术的发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及配制

除特殊说明,本试验所用试剂均购自 Sigma 化学试剂公司。

### 1.2 试验动物及超排处理

试验所用小鼠均为昆明白品系。雌鼠(6~8 周)和雄鼠(10~12 周)购自山东省泰安市生物制品研究所。雌鼠腹腔注射 PMSG(浙江省宁波激素制品厂)10 IU/只小鼠,48 h 后注射 HCG(浙江省宁波激素制品厂)10 IU/只。

### 1.3 体内成熟卵母细胞的获取

注射 HCG 13 h 后用颈椎脱臼法处死雌鼠,把卵巢和输卵管放入 M2 操作液中,在实体显微镜下收集卵丘卵母细胞复合体(COCs),吹打分散并混匀后进行分组(20~25 个/组)。

### 1.4 卵母细胞体外老化处理

将分好组的 COCs 放入添加不同浓度 MG132 的 HCZB 培养孔中,覆盖石蜡油,放入不同温度的人工气候箱老化不同时间(避光)。

### 1.5 乙醇结合 6-DMAP 激活

将老化处理的 COCs 移入含 0.1% 透明质酸酶的 M2 液中处理 1 min 脱去卵丘,将卵母细胞放入含 5% 乙醇的 M2 液中处理 5 min,用 M2 液和含 2 mmol/L 6-DMAP 的无糖 CZB 液分别洗 3 次,移入含 2 mmol/L 6-DMAP 的无糖 CZB 液中

收稿日期:2013-07-24

基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR2011CQ003)。

作者简介:李倩(1980—),女,山东临沂人,博士,讲师,主要研究方向为动物细胞工程。E-mail: ydskysyx@163.com。

培养 6 h 后观察激活情况。只有出现 1 个原核 1 个极体、2 个原核或 2 - 细胞各具 1 个原核的卵母细胞判断为激活。

### 1.6 SrCl<sub>2</sub> 激活处理

将老化处理的 COCs 脱卵丘,清洗(用 M2 及含 10 mmol/L SrCl<sub>2</sub> 的无钙无糖 CZB 液)后转入含 5 μg/mL CB、10 mmol/L SrCl<sub>2</sub> 的无钙无糖 CZB 液中培养 2.5 h,然后转入含 5 μg/mL CB、不含 SrCl<sub>2</sub> 的无糖 CZB 液中继续培养 3.5 h,观察原核统计激活率。2 个原核或 2 - 细胞各具 1 个原核的卵母细胞判断为激活。

### 1.7 胚胎培养

将 SrCl<sub>2</sub> 激活后的卵母细胞转入无糖 CZB 中培养。当有 2/3 的胚胎到达 4 - 细胞时,换液于含 5.5 mmol/L 葡萄糖的 CZB 液。观察并记录 4 - 细胞率(激活后 48 h)和囊胚率(激活后 96 h)。

### 1.8 皮质颗粒染色

除特殊说明外,各步骤均在室温下操作。脱卵丘的卵母细胞放入含 0.5% 链霉菌蛋白酶的 M2 液中于 37 °C 处理 3 ~ 5 min 除去透明带。用 M2 液洗 3 次,用含 3.7% 多聚甲醛的 PBS 液固定 30 min;用封闭液(含 0.3% BSA 和 100 mmol/L 甘氨酸的 M2 液)洗 3 次,放入含 0.1% TritonX - 100 的 M2 液透膜 5 min;封闭液洗 2 次后放入含 100 μg/mL 异硫氰酸荧光素标记的扁豆凝集素(FITC - LCA)的 M2 液中孵育 30 min(避光)。用含 0.3% BSA 和 0.01% TritonX - 100 的 M2 液洗 3 次后,染细胞核 5 min(用含 10 μg/mL Hoechst 33342 的 PBS 液),卵母细胞用 M2 液清洗压片后在激光共聚焦显微镜下观察。

### 1.9 BCL2 蛋白染色

去透明带的卵母细胞放入 3.7% 多聚甲醛的 M2 液中固

定 30 min 后,转入含 0.1% TritonX - 100 的 PBS - PVA 中透化 5 min,与兔抗 BCL2 多克隆抗体(1 : 1,Novogene 公司)室温孵育 1 h 后,与 1 : 200 稀释的 Cy3 连接的山羊抗兔免疫球蛋白(Novogenew公司)孵育;卵母细胞清洗压片后到激光共聚焦显微镜下观察<sup>[14]</sup>。观察结果用 Image - Pro plus 6.0 软件进行定量分析。

### 1.10 激光扫描共聚焦显微术

压片用装有氩 - 氦离子激光管的 Leica TCS SP II 型激光扫描共聚焦显微镜观察并照相。用二极管激光管的 405 nm 波长激发 Hoechst 33342 荧光;用氩激光管的 488 nm 和氦/氖激光管的 543 nm 波长分别激发 FITC 和 Cy3 荧光。

### 1.11 数据统计分析

利用 SPSS 软件处理数据。所有试验都至少重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 MG132 对卵母细胞激活率的影响

取注射 HCG 13 h 后的卵母细胞置于添加不同浓度 MG132 的 HCZB 培养孔中,于 37、25、15 °C 下处理不同时间后,用乙醇联合 6 - DMAP 激活方法激活。从表 1 可见,同一温度下,卵母细胞的孤雌激活敏感性随着培养时间的延长而增强,添加一定浓度的 MG132 能抑制卵母细胞孤雌激活敏感性的,而且抑制效果随着 MG132 添加浓度的升高而增强。卵母细胞激活率随着培养温度的降低而降低。25 °C 培养 12 h 及 15 °C 培养 48 h,各处理组的卵母细胞都维持较低的孤雌激活率;37 °C 培养 6 h,25 °C 培养 24 h 及 15 °C 培养 60 h,添加 4 μmol/L MG132 可以使卵母细胞维持较低的孤雌激活率;37 °C 培养 12 h,添加 2 μmol/L MG132 就可以使卵母细胞维持较低的孤雌激活率。

表 1 添加 MG132 对卵母细胞激活率的影响

温度 (°C)	时间 (h)	不同 MG132 浓度下卵母细胞激活率(%)			
		0 μmol/L	1 μmol/L	2 μmol/L	4 μmol/L
37	6	60.7 ± 3.7aA	48.4 ± 1.9bA	31.9 ± 2.7cA	6.1 ± 3.3dA
37	12	81.7 ± 3.5aB	32.6 ± 2.4bB	4.8 ± 2.4cC	7.0 ± 2.1cA
25	12	8.2 ± 0.8aC	3.4 ± 2.1Ca	7.1 ± 2.0aC	8.4 ± 1.0aA
25	24	61.4 ± 3.3aA	35.6 ± 2.3bB	21.4 ± 2.1cB	5.1 ± 1.3dA
15	24	6.3 ± 1.4aC	5.8 ± 1.9aC	7.3 ± 2.1aC	4.5 ± 3.0aA
15	48	8.9 ± 0.9aC	4.8 ± 1.1aC	5.9 ± 3.1aC	7.4 ± 2.1aA
15	60	66.3 ± 2.2aA	31.0 ± 1.4bB	20.6 ± 2.6cB	3.6 ± 2.0dA

注:同列数据后不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ );同行数据后不同小写表示差异显著( $P < 0.05$ )。

### 2.2 MG132 对卵母细胞孤雌胚胎发育能力的影响

根据第 1 个试验,选择能有效维持卵母细胞低孤雌激活率的处理条件,然后利用氯化镉激活后胚胎发育试验来进一步研究在这些情况下添加 MG132 是否对卵母细胞的发育能力造成影响。以 37 °C 培养 6 h 的卵母细胞作为对照组 1,其他处理组恢复培养(恢复培养是指卵母细胞在不添加 MG132 的正常 CZB 液中于 37 °C 下培养 6 h,目的是为了消除 MG132 的毒性)后利用氯化镉激活,进行胚胎培养,只要囊胚率与对照组 1 的囊胚率相比无显著差异,就说明该处理组可以维持卵母细胞的发育能力。从表 2 可以看出,各组的孤雌激活率差异不显著。在添加 1 μmol/L MG132 的 HCZB 培养孔中,卵母细胞在 15 °C 培养 12 h,再在 37 °C 恢复培养 6 h,不影响

卵母细胞的发育能力,但随着添加 MG132 浓度的升高,囊胚率呈下降的趋势。其他处理组的卵母细胞囊胚率均低于对照组 1,而且也存在囊胚率随着添加 MG132 浓度升高而下降的现象。

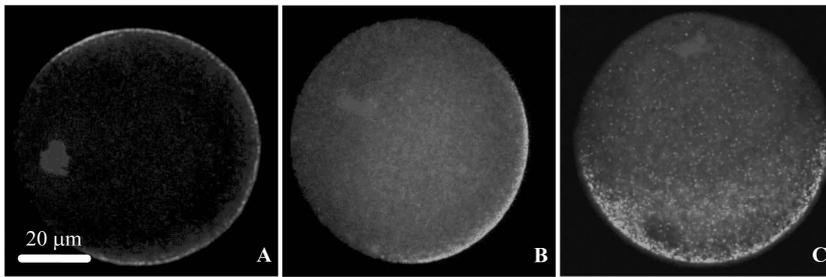
### 2.3 MG132 对卵母细胞皮质颗粒分布以及抗凋亡蛋白 BCL2 水平的影响

在 15 °C 时的发育结果可以看出,1 μmol/L MG132 处理卵母细胞 12 h 恢复后能维持卵母细胞的发育能力,但是处理卵母细胞 24 h 恢复后不能维持卵母细胞的发育能力。为了找出原因,在 1 μmol/L MG132 处理卵母细胞 12、24 h 恢复前后,对卵母细胞的皮质颗粒分布以及抗凋亡蛋白 BCL2 的水平进行研究。取注射 HCG 13 h 后的卵母细胞,在 15 °C 下含

表2 添加 MG132 对卵母细胞孤雌胚胎发育能力的影响

温度 (°C)	时间 (h)	MG132 (μmol/L)	处理卵母细胞数	卵母细胞激活率 (%)	囊胚率 (%)	
37	6	(对照组)	10	97	89.6 ± 1.1a	72.7 ± 2.8a
37	6*	4	90	89.9 ± 2.2a	59.4 ± 1.6bc	
37	12*	2	91	88.3 ± 2.9a	11.3 ± 1.5h	
		4	92	90.1 ± 1.1a	6.0 ± 1.2h	
25	12*	0	93	91.3 ± 1.4a	48.5 ± 2.0de	
		1	91	89.2 ± 2.3a	64.3 ± 2.1b	
		2	94	89.4 ± 0.6a	55.1 ± 4.4cd	
		4	90	87.8 ± 1.1a	39.1 ± 1.6fg	
25	24*	4	92	91.3 ± 2.0a	12.1 ± 1.4h	
15	12*	0	94	90.4 ± 1.7a	54.1 ± 2.5cd	
		1	99	91.9 ± 2.0a	73.6 ± 2.3e	
		2	94	92.4 ± 1.4a	59.3 ± 3.4bc	
		4	101	92.0 ± 2.2a	41.7 ± 3.0ef	
15	24*	0	94	90.2 ± 2.4a	37.6 ± 2.5fg	
		1	91	87.1 ± 3.3a	56.9 ± 1.6bc	
		2	92	89.2 ± 2.6a	51.8 ± 2.2cd	
		4	95	89.2 ± 2.6a	32.9 ± 3.2g	

注: \*表示卵母细胞激活前在 37 °C 培养 6 h。同列数据后不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。



A—皮质颗粒正常分布/染色体聚集;B—皮质颗粒早迁移/染色体聚集;C—皮质颗粒晚迁移/染色体聚集

图1 皮质颗粒分布

表3 15 °C 时 1 μmol/L MG132 对卵母细胞皮质颗粒分布的影响

温度 (°C)	时间 (h)	正常/聚集 (%)	早迁移/聚集 (%)	晚迁移/聚集 (%)
恢复前				
C	0	93.3 ± 1.7a	6.7 ± 1.7a	0a
37	6	89.0 ± 2.6a	11.0 ± 2.6a	0a
15	12	43.2 ± 2.3b	56.8 ± 2.3b	0a
15	24	23.7 ± 1.9c	48.0 ± 2.0c	28.3 ± 1.7b
恢复后				
15	12	91.8 ± 1.3a	8.2 ± 1.3a	0a
15	24	78.9 ± 2.0d	21.1 ± 2.0d	0a

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

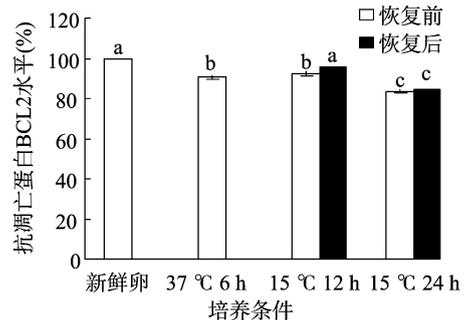
#### 4 结论与讨论

抑制卵母细胞孤雌激活敏感性的升高和维持卵母细胞的发育能力是能有效抑制卵母细胞老化的 2 个必要条件<sup>[3]</sup>。本研究采用能反映不同老化程度卵母细胞的激活强度相对较弱的乙醇联合 6-DMAP 的方法,通过激活率反映卵母细胞的孤雌激活敏感性;采用发育效果较好的氯化锶激活方案,通过

有 1 μmol/L MG132 的 HCZB 培养孔中培养 12、24 h,在恢复前后进行染色压片和激光共聚焦显微镜观察。对照 1(C)为新鲜卵,对照 2 为注射 HCG 13 h 后的卵母细胞在 37 °C 不含 MG132 的老化液中老化 6 h。

2.3.1 MG132 对卵母细胞皮质颗粒分布的影响 根据皮质颗粒染色结果,皮质颗粒分布被分为 3 种类型(图 1)。从表 3 可以看出,对照和试验组卵母细胞的染色体在各种条件下均以聚集的形式存在。1 μmol/L MG132 抑制卵母细胞老化 12 h 后,皮质颗粒主要以正常和早迁移的分布形式存在,恢复后几乎都具正常分布,与对照 1 和对照 2 差异不显著。1 μmol/L MG132 抑制卵母细胞老化 24 h 后,皮质颗粒以正常、早迁移和晚迁移的分布形式存在,恢复后皮质颗粒主要以正常分布的形式存在,但是低于对照 1 和对照 2,差异显著。

2.3.2 MG132 对卵母细胞 BCL2 水平的影响 在卵母细胞 BCL2 水平的检测中,新鲜卵的平均荧光值被定为 100%,其他处理组的卵母细胞的 BCL2 水平用相对值表示,相对值是用各处理组卵母细胞平均荧光值与新鲜卵的平均荧光值相比得到的。从图 2 可以看出,1 μmol/L MG132 抑制卵母细胞老化 12 h 恢复前后,BCL2 蛋白都维持高水平状态,但是 1 μmol/L MG132 抑制卵母细胞老化 24 h 恢复前后,BCL2 蛋白水平明显降低。



恢复培养指 37 °C 下在含 0.27 mmol/L 丙酮酸的 CZB 液中培养; a、b、c—不同字母的两项之间差异显著 ( $P < 0.05$ )

图2 15 °C 时 1 μmol/L MG132 对卵母细胞 BCL2 水平的影响

囊胚率的高低评价卵母细胞的胚胎发育能力。从乙醇联合 6-DMAP 的激活结果可以看出,在 25 °C 培养 12 h 以及 15 °C 培养 48 h 以前,低温本身就能抑制卵母细胞孤雌激活敏感性的升高,这可能和低温能降低细胞代谢、减少 ROS 产生以及降低细胞凋亡有关。25 °C 培养 24 h、15 °C 培养 60 h 以及 37 °C 培养不同时间,添加适当浓度的 MG132 能完全抑

制卵母细胞孤雌激活敏感性的升高,说明 MG132 因能维持高的 MPF 活性,从而抑制了卵母细胞孤雌激活敏感性的升高。而且,培养相同时间,抑制卵母细胞孤雌激活敏感性升高所需要的 MG132 浓度随着温度降低而降低。从氯化锶激活发育结果可以看出,15 °C 培养 12 h,添加 1  $\mu\text{mol/L}$  MG132 因维持了卵母细胞高的 MPF 活性,不仅抑制了卵母细胞孤雌激活敏感性的升高,而且维持了卵母细胞的发育能力,因此有效抑制了卵母细胞的老化。这验证了该假设:在更低的温度下培养卵母细胞,降低了抑制卵母细胞老化的试剂使用剂量。但是添加高浓度的 MG132 或者 MG132 处理时间过长降低了卵母细胞的囊胚率,笔者猜测虽然蛋白酶体活性被 MG132 抑制、维持了高的 MPF 活性,但 MG132 浓度过高或作用时间过长可能也同时抑制了一些胚胎发育必须的蛋白的降解,因此造成卵母细胞恢复后发育能力下降<sup>[7-9]</sup>。筛选抑制卵母细胞老化的最优化方案是在 15 °C 添加 1  $\mu\text{mol/L}$  MG132 的 HCZB 培养孔中培养 12 h,37 °C 恢复培养 6 h。但培养 24 h 恢复后的发育能力降低。为了寻找 15 °C 培养不同时间造成卵母细胞不同发育能力的原因,笔者研究了 15 °C 添加 1  $\mu\text{mol/L}$  MG132 培养卵母细胞恢复前后对皮质颗粒分布和抗凋亡蛋白 BCL2 水平的影响。当 1  $\mu\text{mol/L}$  MG132 处理卵母细胞 12、24 h 恢复前,绝大多数卵母细胞都不具正常的皮质颗粒分布,且 BCL2 蛋白水平都低于新鲜卵。恢复培养后,1  $\mu\text{mol/L}$  MG132 处理 12 h 的卵母细胞恢复了正常的皮质颗粒分布,且 BCL2 蛋白恢复到高水平状态;而处理 24 h 的卵母细胞不能恢复正常的皮质颗粒分布,BCL2 蛋白水平仍然很低,说明 BCL2 蛋白水平和皮质颗粒的分布是有密切联系的。在老化的卵母细胞中存在皮质颗粒向内迁移的现象<sup>[15]</sup>,微丝控制着皮质颗粒的迁移<sup>[16]</sup>。笔者推测,15 °C 长时间(24 h)培养时, MG132 对卵母细胞造成了损害,破坏了卵母细胞的微丝结构,并降低了 BCL2 水平,引起卵母细胞凋亡,从而影响胚胎发育能力。

总之,通过在一定的低温下降低 MG132 的使用剂量,能达到在一定时间内有效抑制卵母细胞老化的目的。本研究对健康生殖和辅助生殖技术来说都非常有意义。本研究筛选的抑制卵母细胞老化方案下培养的卵母细胞是否能维持受精后正常胚胎发育以及通过胚胎移植后是否能产生正常后代,还有待进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, et al. Maturation/M - phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes [J]. *Biology of Reproduction*, 2000, 63(3): 715 - 722.
- [2] Cervera R P, García - Ximénez F. Oocyte age and nuclear donor cell type affect the technical efficiency of somatic cloning in rabbits [J]. *Zygote*, 2003, 11(2): 151 - 158.
- [3] Iwamoto M, Onishi A, Fuchimoto D, et al. Effects of caffeine treatment on aged porcine oocytes: parthenogenetic activation ability, chromosome condensation and development to the blastocyst stage after somatic cell nuclear transfer [J]. *Zygote*, 2005, 13(4): 335 - 345.
- [4] Strous G J, Govers R. The ubiquitin - proteasome system and endocytosis [J]. *Cell Sci*, 1999, 112(Pt 10): 1417 - 1423.
- [5] Glotzer M, Murray A W, Kirschner M W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway [J]. *Nature*, 1991, 349(6305): 132 - 138.
- [6] Hershko A, Ganoth D, Pehrson J, et al. Methylated ubiquitin inhibits cyclin degradation in clam embryo extracts [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(25): 16376 - 16379.
- [7] Josefberg L B, Galiani D, Dantes A, et al. The proteasome is involved in the first metaphase - to - anaphase transition of meiosis in rat oocytes [J]. *Biology of Reproduction*, 2000, 62(5): 1270 - 1277.
- [8] Zhou Q, Renard J P, Le Friec G, et al. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation [J]. *Science*, 2003, 302(5648): 1179.
- [9] Gao S, McGarry M, Latham K, et al. Cloning of mice by nuclear transfer [J]. *Cloning and Stem Cells*, 2003, 5(4): 287 - 294.
- [10] Chip S, Zelmer A, Ogunshola O O, et al. The RNA - binding protein RBM3 is involved in hypothermia induced neuroprotection [J]. *Neurobiology of Disease*, 2011, 43(2): 388 - 396.
- [11] Kil H Y, Zhang J, Piantadosi C A. Brain temperature alters hydroxyl radical production during cerebral ischemia/reperfusion in rats [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1996, 16(1): 100 - 106.
- [12] Shao Z H, Sharp W W, Wojcik K R, et al. Therapeutic hypothermia cardioprotection via Akt - and nitric oxide - mediated attenuation of mitochondrial oxidants [J]. *American Journal of Physiology - heart and Circulatory Physiology*, 2010, 298(6): 2164 - 2173.
- [13] Li Q, Wang G, Zhang J, et al. Combined inhibitory effects of pyruvate and low temperature on postovulatory aging of mouse oocytes [J]. *Biology of Reproduction*, 2012, 87(5): 105.
- [14] Tatone C, Carbone M C, Gallo R, et al. Age - associated changes in mouse oocytes during postovulatory in vitro culture: possible role for meiotic kinases and survival factor BCL2 [J]. *Biology of Reproduction*, 2006, 74(2): 395 - 402. M
- [15] Szollosi D. Morphological changes in mouse eggs due to aging in the fallopian tube [J]. *The American Journal of Anatomy*, 1971, 130(2): 209 - 225.
- [16] Sun Q Y, Schatten H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization [J]. *Reproduction*, 2006, 131(2): 193 - 205.