

胡传水, 陆 媚, 唐胤晟, 等. 3 种抗凋亡试剂在猪精液常温保存中的应用效果[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(3): 138–141.

# 3 种抗凋亡试剂在猪精液常温保存中的应用效果

胡传水<sup>1,2</sup>, 陆 媚<sup>2</sup>, 唐胤晟<sup>3,4</sup>, 许春荣<sup>3,4</sup>, 李美珍<sup>3</sup>, 黄明光<sup>4,5</sup>, 胡传活<sup>2,4</sup>

(1. 广西农业职业技术学院, 广西南宁 530007; 2. 广西大学动物科技学院, 广西南宁 530005;

3. 广西畜禽品种改良站, 广西南宁 530001; 4. 广西科达畜禽改良有限责任公司, 广西南宁 530001;

5. 广西畜牧研究所, 广西南宁 530001)

**摘要:**将抗凋亡试剂葛根素(0.02、0.10、0.50、2.50 mmol/L)、酒石酸美托洛尔(0.02、0.10、0.50、2.50 mmol/L)、二氯乙酸钠(0.04、0.20、1.00、5.00 mmol/L)加入稀释液中, 探讨它们在猪精液常温保存中的效果。结果表明: 0.50 mmol/L 葛根素可以延长精子保存时间及存活指数( $P < 0.05$ ); 0.50 mmol/L 酒石酸美托洛尔能降低精子畸形率( $P < 0.05$ ); 5.00 mmol/L 二氯乙酸钠可以缩短精子存活时间和存活指数( $P < 0.05$ )。总之, 合适浓度的葛根素或酒石酸美托洛尔可以显著提高猪精液常温保存后的品质, 而二氯乙酸钠对猪精液常温保存效果没有明显的改善作用。

**关键词:**猪; 精液; 常温保存; 抗凋亡试剂

**中图分类号:** S828.3<sup>+</sup>4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0138-03

随着人工授精(AI)技术在现代养猪业中发挥出更加巨大的作用, 精液保存技术显得日益重要, 并愈加显示出其在降低公猪饲养成本、提高经济效益、加快育种速度、防止疾病传播等方面的优势<sup>[1]</sup>。与冷冻精液相比, 常规液态保存精液具有设备要求低、操作过程简单、所需费用低、繁殖成绩好(受胎率、分娩率和窝产仔数较高)等优点<sup>[2]</sup>, 所以, 在猪人工授精技术中以使用常温精液为主, 占到使用精液总量的99%<sup>[3]</sup>。因此, 猪精液常温液态保存的研究对猪人工授精技术的发展乃至养猪生产具有很高的实用价值。相关的文献<sup>[4-10]</sup>认为, 人和动物精液射出体外之后, 各种理化条件均会促进精子发生凋亡, 而葛根素(Pur)、酒石酸美托洛尔(MTA)及二氯乙酸钠(DCA)3种试剂可以抑制胞浆内游离Ca<sup>2+</sup>浓度的持续性升高, 从而阻止细胞凋亡的发生<sup>[11-14]</sup>; 但是, 迄今为止未见这3种试剂在猪精液保存方面的应用报道。因此, 本试验探讨Pur、MTA及DCA在猪精液常温保存中的效果, 为猪精液常温保存稀释液配方的改良提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器设备及试剂

Haier药品保存箱(深圳市凯铭杰仪器设备有限公司), 电子恒温水浴锅(广州市富家电器厂), 相差显微镜(OLYMPUS CH3\_DO 6M01434), 电子冷暖箱(北京福意联电器有限公司), DJ-200电子天平(北京宏宇振兴科贸有限公司)。乙二胺四乙酸二钠(EDTA)(国药集团化学试剂有限公司), N-乙酰半胱氨酸(NAC), Pur、MTA(阿拉丁试剂上海公司), DCA(西格玛奥德里奇上海贸易有限公司), 苯胺蓝(天津市

科密欧化学试剂开发中心), 龙胆紫(天机博迪化工公司)。

### 1.2 精液的采集与处理

采用手握法采集健康、正常采精的长白、约克和杜洛克种公猪(饲养于广西科达畜禽改良有限责任公司)中段精子浓密精液, 用4层脱脂纱布过滤去除胶状物, 原精精子活力0.7以上, 气味、色泽正常者供稀释保存用。

### 1.3 精液的稀释与保存

按配方准确配制稀释液, 37℃等温条件下按1:2的比例稀释, 用纱布包裹后保存在16~18℃的常温环境中。

### 1.4 精液品质检查

**1.4.1 精子存活时间** 每隔一定时间检查活力, 直到精子全部死亡为止。记录精子有效存活时间(精子活力为0.4的保存时间)、总存活时间(精子全部死亡的保存时间), 并计算精子存活指数 $\{ \Sigma[(\text{上次活力} + \text{下次活力})/2 \times \text{时间间隔}] \}$ 。

**1.4.2 精子的畸形率、顶体完整率** 于保存72h时进行检查, 具体步骤为: 精液涂片→干燥→10%福尔马林生理盐水固定15s→水洗→5%苯胺蓝溶液染色15~20s→水洗→0.5%龙胆紫水溶液染色4~6s→水洗→干燥→镜检。

### 1.5 试验设计

添加3种试剂的试验均分为5个组, 对照组的稀释液为常用的葡萄糖-柠檬酸钠-EDTA液(葡萄糖3.71%, 柠檬酸钠0.53%, 碳酸氢钠0.13%, NAC 0.02%, EDTA 0.13%, KCl 0.08%, 青霉素0.06%, 链霉素0.10%)<sup>[15]</sup>, 试验组1~4的稀释液在对照组的基础上分别添加0.02、0.10、0.50、2.50 mmol/L的Pur或MTA, 或0.04、0.20、1.00、5.00 mmol/L的DCA。所有试验均重复6次。

### 1.6 数据处理

试验所得的各组数据均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 采用SPSS 13.0软件进行方差分析, 检验各组之间差异的显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 Pur在猪精液常温保存中的应用效果

如表1所示, 从稀释后活力、顶体完整率及畸形率来看,

收稿日期: 2013-11-07

基金项目: 广西南宁市科技开发计划(编号: 201107016C)。

作者简介: 胡传水(1967—), 男, 广西平南人, 硕士, 讲师, 主要从事猪生产学研究。E-mail: huchuanhui@163.com。

通信作者: 胡传活, 博士, 副教授, 主要从事动物解剖及组织胚胎学研究。E-mail: hch64815@gxu.edu.cn。

添加 Pur 的各个试验组与对照组相比,差异不显著 ( $P>0.05$ )。在有效存活时间、总存活时间及存活指数方面,添加 0.50 mmol/L Pur 的试验组显著高于其他各组 ( $P<$

0.05)。结果表明,在本试验条件下,0.50 mmol/L 是 Pur 在猪精液常温保存稀释液中的最佳添加浓度。

表 1 Pur 对猪精液常温保存效果的影响

Pur 浓度 (mmol/L)	稀释后活力	有效存活时间 (h)	总存活时间 (h)	存活指数 (h)	顶体完整率 (%)	畸形率 (%)
0	0.80 ± 0.01	136.00 ± 5.06b	192.05 ± 8.01b	77.60 ± 2.23b	82.28 ± 3.46	27.48 ± 3.52
0.02	0.80 ± 0.02	124.00 ± 4.00c	190.31 ± 6.74b	76.10 ± 1.41b	82.30 ± 2.81	25.63 ± 3.10
0.10	0.80 ± 0.01	136.00 ± 5.06b	193.10 ± 7.59b	78.00 ± 2.42b	82.18 ± 2.38	26.38 ± 3.37
0.50	0.80 ± 0.01	168.00 ± 6.20a	216.00 ± 6.85a	97.60 ± 3.67a	85.43 ± 3.38	20.75 ± 2.68
2.50	0.78 ± 0.03	140.00 ± 4.00b	184.00 ± 5.06c	76.70 ± 4.50b	78.33 ± 3.19	27.85 ± 2.92

注:同一列数据后字母相同或无标注表示差异不显著 ( $P>0.05$ ),字母不同表示差异显著 ( $P<0.05$ )。下同。

2.2 MTA 在猪精液常温保存中的应用效果

如表 2 所示,从稀释后活力来看,添加 0.02、2.50 mmol/L MTA 的试验组显著高于对照组 ( $P<0.05$ )。在有效存活时间、总存活时间、存活指数、顶体完整率方面,添加不同浓度

MTA 的各试验组与对照组相比差异不显著 ( $P>0.05$ )。从畸形率来看,添加 0.50 mmol/L MTA 的试验组显著低于对照组 ( $P<0.05$ )。结果表明,在本试验条件下,0.50 mmol/L 是 MTA 在猪精液常温保存稀释液中的最适添加浓度。

表 2 MTA 对猪精液常温保存效果的影响

MTA 浓度 (mmol/L)	稀释后活力	有效存活时间 (h)	总存活时间 (h)	存活指数 (h)	顶体完整率 (%)	畸形率 (%)
0	0.77 ± 0.02b	132.00 ± 5.37	192.00 ± 6.29	61.80 ± 1.06	80.93 ± 2.91	29.88 ± 2.56a
0.02	0.83 ± 0.01a	132.00 ± 5.37	184.00 ± 5.06	62.5 ± 3.38	84.03 ± 2.67	26.35 ± 2.08ab
0.10	0.80 ± 0.01ab	128.00 ± 5.06	188.00 ± 4.00	60.60 ± 0.98	86.15 ± 2.17	24.60 ± 2.61ab
0.50	0.76 ± 0.02b	128.00 ± 5.06	184.00 ± 5.06	58.50 ± 1.57	87.55 ± 2.70	19.75 ± 2.89b
2.50	0.83 ± 0.01a	132.00 ± 4.00	188.00 ± 4.00	58.80 ± 2.15	83.88 ± 2.63	23.58 ± 2.44ab

2.3 DCA 在猪精液常温保存中的应用效果

如表 3 所示,从总存活时间和存活指数来看,添加高浓度 (5.00 mmol/L) DCA 的试验组显著低于对照组 ( $P<0.05$ )。

而在其他指标,各试验组与对照组相比差异均不显著 ( $P>0.05$ )。结果表明,在现有条件下,稀释液中添加 DCA 对猪精液常温保存没有改良作用。

表 3 DCA 对猪精液常温保存效果的影响

DCA 浓度 (mmol/L)	稀释后活力	有效存活时间 (h)	总存活时间 (h)	存活指数 (h)	顶体完整率 (%)	畸形率 (%)
0	0.79 ± 0.02ab	120.00 ± 6.20ab	188.00 ± 4.00a	59.60 ± 1.74a	81.93 ± 3.31	27.52 ± 2.08
0.04	0.81 ± 0.01a	124.00 ± 7.38a	188.00 ± 4.00a	56.90 ± 1.77a	83.18 ± 2.50	24.60 ± 3.28
0.20	0.81 ± 0.01a	128.00 ± 10.12a	180.00 ± 5.37ab	57.00 ± 1.97a	83.55 ± 3.19	23.53 ± 2.17
1.00	0.82 ± 0.02a	128.00 ± 5.06a	184.00 ± 5.06ab	55.20 ± 1.93a	82.70 ± 2.59	26.50 ± 2.64
5.00	0.74 ± 0.03b	100.00 ± 4.00b	172.00 ± 7.38b	44.43 ± 1.78b	79.28 ± 2.12	23.03 ± 4.07

3 讨论

3.1 Pur 对猪精液常温保存效果的影响

Pur 为豆科葛属植物野葛及甘薯藤根异黄酮中的主要有效成分<sup>[16]</sup>,由于具有钙离子拮抗和抗凋亡等多种药理作用<sup>[11-12]</sup>而得到广泛的临床应用,特别是在心脑血管等疾病的治疗<sup>[17]</sup>方面,近年来深受学者们的关注和重视,进行了大量的研究工作,取得了许多重要的研究进展。大量研究表明,在被各种因素诱导细胞凋亡出现之前,胞浆内游离  $Ca^{2+}$  的浓度均持续性升高,抑制其升高则可阻止诱导的细胞发生凋亡。中山大学眼科中心发现 Pur 药物治疗可延缓视网膜脱离 rd 小鼠视网膜光感受器细胞层数或密度的减少,延缓外段盘膜部位的线粒体、盘膜以及外界膜的破坏,明显降低 7、14、21、28 和 35 d 时 rd 小鼠视网膜光感受器细胞的凋亡率,同时增

强 rd 小鼠视网膜外核层间质及其光感受器细胞外段 *Bcl-2* 的表达<sup>[18]</sup>。Pur 不仅具有扩张冠状动脉血管,抑制血小板聚集,提高心肌细胞耐缺血、缺氧的能力<sup>[19]</sup>,而且能抑制茶酚胺诱导的心肌损伤过程中 FSA 蛋白的表达,影响心肌细胞的凋亡,产生对心肌损伤的保护作用<sup>[20]</sup>。研究还发现,Pur 可保护由于高压引起的血管内皮细胞损伤,其主要原因可能与 Pur 的抗氧化、钙离子拮抗和  $\beta$  受体阻滞等作用有关<sup>[21-22]</sup>。Pur 对缺血再灌注损伤导致的心肌细胞凋亡具有抑制作用,多数学者认为其机理主要是由于灌注后胞内钙离子、氧自由基增多导致细胞凋亡。在缺血再灌注前后,*Bcl-2* 蛋白表达量发生改变,这是机体对抗凋亡的一种反应。Pur 对氧自由基有清除作用,并能预防对抗各种氧化剂诱导引起的氧化性损伤<sup>[23]</sup>。通过试验可见,在常温稀释液中添加 0.5 mmol/L 的 Pur 对改善猪精子的有效存活时间、总存活时间及存活指数

均有良好效果,这可能与 Pur 增强了长寿基因即 *Bcl-2* 的表达、钙离子拮抗、 $\beta$  受体阻滞并发挥了抗氧化作用有关,而 2.5 mmol/L Pur 会显著缩短猪精子存活时间,这说明 Pur 需要在一定浓度范围内才能发挥对精子的保护作用。

### 3.2 MTA 对猪精液常温保存效果的影响

MTA 属抗心律失常/抗高血压类药,为 2A 类即无部分激动活性的  $\beta_1$  - 受体阻断药(心脏选择性  $\beta$  - 受体阻断药),除了药效学上具有  $\beta$  - 受体阻滞剂的优点外,还可抑制中性粒细胞浸润、减轻钙负荷及清除氧自由基<sup>[13,24]</sup>。该药品临床应用多年,能有效治疗高血压、心绞痛、心肌梗塞、心律失常和慢性心力衰竭等心血管方面的疾病<sup>[25-27]</sup>。陈跃峰等的研究表明,MTA 能减少急性心肌梗死、边缘区和非梗死区的心肌细胞凋亡,它主要是通过增加 *Bcl-2* 的表达和抑制促细胞凋亡蛋白合成来实现这一功能<sup>[28]</sup>。赵梅等的研究结果表明,MTA 能减少 Fas 和 NF - KB 蛋白的表达,而且大剂量的 MTA 干预对 Fas 和 NF - KB 的影响效果大于小剂量 MTA,提示 MTA 的抗心肌细胞凋亡率取决于它对凋亡相关基因表达影响程度的差异和  $\beta$  - 受体的阻断作用<sup>[29]</sup>。本试验在猪精液常温稀释液中添加不同浓度的 MTA,结果显示 0.02、2.50 mmol/L MTA 能够提高精子稀释后活力,0.50 mmol/L MTA 能降低精子畸形率,这可能是 MTA 减轻钙负荷、清除氧自由基、增加 *Bcl-2* 的表达和抑制促细胞凋亡蛋白合成,从而阻断了细胞凋亡的缘故。

### 3.3 DCA 对猪精液常温保存效果的影响

DCA 是一种多用于治疗乳酸酸中毒的小分子药物,近来的研究发现,它可以通过促进乳酸氧化、降低血液乳酸水平、改善机体的代谢平衡来治疗一些代谢性疾病,如先天性或代偿性乳酸酸中毒。在组织缺氧情况下,激烈运动会造成组织缺氧及高乳酸水平,DCA 可通过增加氧摄取、激活丙酮酸脱氢酶复合物、促进乳酸氧化来补充能量供应,从而改善缺氧组织的能量代谢状况<sup>[30]</sup>。何作云等的研究显示,0.1、1、10 mmol/L DCA 均能显著降低缺氧后复氧的心肌细胞的凋亡率<sup>[14]</sup>。鉴于上述试验基础,本试验把 DCA 添加到常温稀释液中看是否对猪精子同样具有抗凋亡作用,结果表明,添加 5.00 mmol/L DCA 降低了精子的存活时间和存活指数,而其他剂量 DCA 效果不显著;0.04、0.20、1.00 mmol/L DCA 对猪精液常温保存无显著影响,其机制可能是与这些浓度下 DCA 不能有效改善精子的能量代谢状况或降低精子的凋亡率有关;5.00 mmol/L DCA 可以显著降低精子的存活时间和存活指数。与学者们针对乳腺癌<sup>[31]</sup>、子宫内膜癌<sup>[32]</sup>、前列腺癌细胞<sup>[33]</sup>的研究结果类似,他们在 DCA 浓度为 5 mmol/L 左右时即检测到了对细胞明显的增殖抑制及凋亡诱导作用。因此,DCA 在较低浓度时对精子可能有改善能量代谢状况及降低凋亡率的作用,而在较高浓度时反而会有诱导凋亡的作用,其在猪精液常温保存的适宜浓度有待进一步研究。

## 4 结论

在本试验条件下,合适浓度的 Pur 或 MTA 可以显著提高猪精液常温保存后的品质,而 DCA 对猪精液常温保存效果没有明显的改善作用。

致谢:广西畜禽品种改良站吴柱月研究员,韦干显兽医

师,刘德玉、李芳芳、王英群、邓祝新畜牧师;广西科达禽畜改良有限责任公司彭夏云、韦永强、韦诗祥技术员;广西大学动物科学专业 2009 级周文婷同学,在试验中给予帮助,特致谢忱。

### 参考文献:

- [1] 徐振军,任康,王彦平,等. 猪精液常温保存技术的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2007(4):40-41.
- [2] 高建明,虞桂平,邵世义,等. 不同稀释液对猪精液常温保存效果的影响[J]. 中国畜牧杂志,2007,43(13):12-14.
- [3] 张宝珣,戈新,王建华,等. 猪常温精液保存的研究进展[J]. 猪业科学,2009,26(8):68-71.
- [4] Garner D L, Thomas C A. Organelle - specific probe JC - 1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm[J]. Molecular Reproduction and Development, 1999, 53(2): 222-229.
- [5] Kurpisza M, Monika F, Málgorzata P, et al. Oxidative stress, innate immunity and sperm quality[J]. Journal of Reproductive Immunology, 2011, 90(2):131-163.
- [6] Brum A M, Sabeur K, Ball B A. Apoptotic - like changes in equine spermatozoa separated by density - gradient centrifugation or after cryopreservation[J]. Theriogenology, 2008, 69(9):1041-1055.
- [7] Trzcińska M, Bryła M, Smorąg Z. Apoptotic - like changes in the spermatozoa of fresh and stored boar semen and the quality of embryos produced *in vivo* [J]. Animal Reproduction Science, 2011, 124(1/2):90-97.
- [8] Başpınar N, Cayan K, Bucak M N, et al. Effects of dithioerythritol on ram semen after the freeze - thawing process[J]. Cryobiology, 2011, 63(3):152-156.
- [9] Thuwanut P, Chatdarong K, Bergqvist A S, et al. The effects of antioxidants on semen traits and *in vitro* fertilizing ability of sperm from the flat - headed cat (*Prionailurus planiceps*) [J]. Theriogenology, 2011, 76(1):115-125.
- [10] Khan D R, Ahmad N, Anzar M, et al. Apoptosis in fresh and cryopreserved Buffalo sperm [J]. Theriogenology, 2009, 71(5):872-876.
- [11] 肖桂凤,宁钢民,葛亚坤,等. 葛根素对培养人脐静脉内皮细胞钙超载的影响[J]. 中国药理学通报,2005,21(11):1388-1392.
- [12] 张颖,张涛,石凤如,等. 葛根素对血管平滑肌细胞凋亡的影响[J]. 中国药理学通报,2001,17(6):717-718.
- [13] 徐叔云. 现代实用临床药理学[M]. 北京:华夏出版社,1996:572.
- [14] 何作云,刘伟,冯兵,等. 丙酮酸脱氢酶活性对缺氧后复氧的肥大心肌细胞凋亡的效应[J]. 中华心血管病杂志,2005,33(增刊1):351-352.
- [15] 胡传活. 牛猪精液冷冻保存技术相关问题的研究[D]. 南宁:广西大学,2009:78.
- [16] 中国医学科学院药物研究所. 中草药现代研究[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1995:258-268.
- [17] 季宇彬. 中药有效成分药理与应用[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1995:360-364.
- [18] 邓新国,张清炯,何梅凤,等. 葛根素对遗传性视网膜色素变性 rd 小鼠的干预作用及其抗凋亡机制研究[J]. 中国药理学通报,2007,23(2):223-227.

张利,汪立芹,蒋香菊,等.不同直径卵泡对绵羊卵母细胞体外发育能力的影响[J].江苏农业科学,2014,42(3):141-144.

# 不同直径卵泡对绵羊卵母细胞体外发育能力的影响

张利<sup>1,2</sup>,汪立芹<sup>2</sup>,蒋香菊<sup>1,2</sup>,林嘉鹏<sup>2</sup>,吴阳升<sup>2</sup>,杨楠<sup>2,3</sup>,古丽米热<sup>2,3</sup>,刘莉<sup>2,3</sup>,黄俊成<sup>2</sup>

(1.石河子大学动物科技学院,新疆石河子 832000; 2.农业部草食家畜遗传育种与繁殖重点实验室,新疆乌鲁木齐 830000;

3.新疆农业大学,新疆乌鲁木齐 830000)

**摘要:**以屠宰场绵羊卵巢为材料,采用抽吸法收集小卵泡、中卵泡、大卵泡卵母细胞,研究不同卵泡直径对卵母细胞回收效果、比例分布以及对卵母细胞直径、谷胱甘肽(GSH)含量和体外发育能力的影响。结果表明,3种卵泡卵母细胞比例分布差异极显著( $P < 0.01$ );3种卵泡卵母细胞的回收率无显著差异( $P > 0.05$ ),但中、大卵泡卵母细胞可用率极显著高于小卵泡卵母细胞( $P < 0.01$ );小卵泡卵母细胞的直径极显著小于中、大卵泡卵母细胞( $P < 0.01$ );中、大卵泡卵母细胞成熟培养 24 h 后 GSH 含量显著高于小卵泡卵母细胞( $P < 0.05$ );经孤雌激活体外培养后,中、大卵泡卵母细胞的成熟率分别极显著( $P < 0.01$ )、显著( $P < 0.05$ )高于小卵泡卵母细胞,中、大卵泡卵母细胞囊胚率极显著高于小卵泡卵母细胞( $P < 0.01$ );中卵泡卵母细胞囊胚细胞总数显著高于小卵泡卵母细胞( $P < 0.05$ ),但与大卵泡卵母细胞差异不显著( $P > 0.05$ )。因此,直径 $\geq 2$  mm 的卵泡的卵母细胞适合体外培养和体外胚胎的生产。

**关键词:**卵泡直径;绵羊;卵母细胞;孤雌激活

**中图分类号:** S826.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2014)03-0141-04

随着哺乳动物体外受精、克隆、转基因等生物技术的不断深入,对动物卵母细胞的数量、质量要求越来越高。目前,胚胎体外生产(*in vitro* production, IVP)的卵母细胞主要来

源于屠宰场收集的卵巢,由于屠宰动物的年龄及卵巢表面卵泡的大小等存在差异,培养后获得的胚胎质量也有很大差异<sup>[1]</sup>,一般收集的卵泡卵母细胞囊胚率都很低<sup>[2]</sup>。与体内自然成熟的卵母细胞相比,体外培养的卵母细胞成熟率、受精率和早期胚胎发育能力呈现不同程度的下降趋势。在体内,卵母细胞在卵泡内发育成熟,作为卵母细胞的生长环境,卵泡的大小对卵母细胞的成熟和后期发育潜力起着至关重要的作用<sup>[3]</sup>。Crozet 等早期报道,不同直径卵泡中的卵母细胞发育能力不同,所以研究卵泡大小对后期发育潜力的影响十分必要<sup>[4]</sup>。目前,国内外很多研究者只报道了山羊<sup>[5-6]</sup>、牛<sup>[3]</sup>的卵泡大小对卵母细胞发育的影响,且国内还未见对绵羊的报道。本研究分析卵泡直径对卵母细胞的回收效果、比例分布以及

收稿日期:2013-07-15

基金项目:国家自然科学基金(编号:U1203381);新疆维吾尔自治区科技计划(编号:201111113);新疆维吾尔自治区科技支疆项目(编号:201291147);国家转基因重大专项(编号:2014ZX08008-003)。

作者简介:张利(1987—),男,新疆石河子人,硕士,主要从事动物繁殖技术研究。E-mail:lovemyzhangli@163.com。

通信作者:黄俊成,博士,研究员,主要从事家畜繁殖与胚胎生物技术研究。E-mail:h\_jc@sina.com。

[19]赵虹,魏嘉平,李耘,等.普乐林注射液对急性心肌梗死患者心肌梗死面积和缺血总负荷的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2001,8(6):367-369.

[20]俞坚武,屈百鸣,赵仲生,等.葛根素对儿茶酚胺诱导大鼠心肌梗死时凋亡相关蛋白的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2002,9(1):30-32.

[21]肖礼祖,罗伟,苏海,等.葛根素对高压培养血管内皮细胞分泌 NO 和 ACE 活性的影响[J].新中医,2000,32(12):31-33.

[22]王伟,张涛,赵明镜,等.5 种中药黄酮对血管平滑肌细胞凋亡的交互作用[J].北京中医药大学学报,2000,23(4):18-21.

[23]朱庆磊,吕欣然,何爱霞.葛根素对氧自由基的清除和抗氧化性损伤作用[J].解放军药科学学报,2001,17(1):1-3,13.

[24]Lysko P G, Webb C L, Gu J L, et al. A comparison of carvedilol and metoprolol antioxidant activities *in vitro*[J]. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2000, 36(2):277-281.

[25]王金香,林静吟.高效液相色谱荧光检测法测定人体内血浆中美托洛尔的浓度[J].中外医疗,2009,28(16):104-105.

[26]谢虹虹,刘杰,黄哲丹. HPLC 法测定酒石酸美托洛尔骨架缓释片的含量[J].中国现代药物应用,2009,21(17):31-32.

[27]雷兆军,王小宁,王瑛,等.美托洛尔嚼服转复阵发性室上性心动过速的疗效观察[J].疑难病杂志,2009,17(9):546-547.

[28]陈跃峰,杨跃进,陈曦,等. $\beta$ 受体阻滞剂阿替洛尔和酒石酸美托洛尔对大鼠急性心肌梗死后心肌细胞凋亡及凋亡相关基因表达的作用[J].中国医学科学院学报,2006,28(4):538-543,插 5,插 6.

[29]赵梅,崔耀金,丁思华,等.不同剂量美托洛尔对家兔缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡的影响[J].中国现代医药杂志,2009,11(7):19-22.

[30]关于二氯乙酸盐[EB/OL]. [2014-03-05]. <http://quan.yaoliwang.com/topic/7428.html>.

[31]Belzacq A S, Vieira H L, Kroemer G, et al. The adenine nucleotide translocator in apoptosis[J]. Biochimie, 2002, 84(2/3):167-176.

[32]Youle R J, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9(1):47-59.

[33]Chipuk J E, Green D R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? [J]. Trends in Cell Biology, 2008, 18(4):157-164.