

奶牛卵胞质内单精注射 (ICSI) 的研究

陈少轻, 孙瑞珍, 吴江鸿, 苏米娅, 张家新 (内蒙古农业大学动物遗传育种与繁殖重点实验室, 内蒙古呼和浩特 010018)

摘要 [目的] 探讨不同状态奶牛精子卵胞质内单精注射 (ICSI) 的效果。[方法] 体外成熟培养 24 h 的奶牛卵母细胞注入不同状态精子, 观察其体外发育情况。[结果] 结果表明, 试验 1, 研究精子用 5 mmol DTT (二硫苏糖醇) 预处理与精子不经过预处理的对照组的效果, 经 DTT 处理后, 精子解聚率和雄原核率显著高于对照组 (30.4% 和 11.6%, 47.8% 和 27.9%, $P < 0.05$), 两组的卵裂率差异不显著 (85.0% 和 80.0%), 囊胚率和孵化率显著高于对照组 (45.8% 和 26.0%, 31.3% 和 14.0%, $P < 0.05$)。试验 2, 比较死、活精子的卵胞质内单精注射的效果, 两者之间卵裂率 (75.0% 和 79.4%)、囊胚率 (27.9% 和 30.9%) 和孵化率 (13.2% 和 16.2%) 均无显著性差异 ($P > 0.05$)。试验 3, 比较睾丸或附睾 (头、体、尾) 精子卵胞质内单精注射的效果, 卵裂率 (79.1%、81.8%、73.2% 和 75.0%)、囊胚率 (23.3%、20.4%、19.5% 和 18.2%) 和孵化率 (14.0%、13.4%、12.2% 和 9.1%) 均无显著性差异 ($P > 0.05$)。[结论] DTT 预处理奶牛精子有助于提高 ICSI 的效率; 死精子能用于奶牛卵母细胞的 ICSI; 从睾丸精子到附睾尾精子, 虽其成熟程度有很大不同, 但对 ICSI 受精不产生显著影响。

关键词 奶牛; ICSI; 精子解聚; 雄原核; 体外胚胎

中图分类号 S823.9⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)02-00599-03

Studies on Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) in Cow

CHEN Shao-qing et al (Key Lab of Animal Genetics, Breeding and Production, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018)

Abstract [Objective] This study aimed to evaluate sperm of different states affecting ICSI so as to improve the efficiency of ICSI in cow. [Method] Cow oocytes were collected from slaughterhouse ovaries and matured *in vitro* for 24 h. Sperm of different states was injected into oocytes by assistance of a micromanipulation system. Development of injected oocytes was examined. [Result] The results indicated that the development of oocytes with the DTT-treated group and the non-treated group were compared in experiment 1. Significantly higher rate of sperm decondensation and male pronuclear rate were found in the DTT-treated group than the non-treated group (30.4% and 11.6%, 47.8% and 27.9%, $P < 0.05$, respectively). There was no significant difference with cleavage between two groups (85.0% and 80.0%), significantly higher blastocyst and hatched blastocyst rates were found in the DTT-treated group than the non-treated group (45.8% and 26.0%, 31.3% and 14.0%, $P < 0.05$, respectively). The development of oocytes injected with dead or lived sperm were compared in experiment 2. No significant difference was found in cleavage, blastocyst and hatched blastocyst (75.0% and 79.4%, 27.9% and 30.9%, 13.2% and 16.2%, $P > 0.05$, respectively). In experiment 3, No significant difference was found in cleavage, blastocyst and hatched rates between testicular sperm and epididyma sperm (caput, corpus, cauda) (79.1%, 81.8%, 73.2% and 75.0%; 23.3%, 20.4%, 19.5% and 18.2%; 14.0%, 13.4%, 12.2% and 9.1%, $P > 0.05$, respectively). [Conclusions] Efficiency of ICSI in cow can be improved by sperm pretreatment with DTT. Dead sperms can be used for ICSI in cow. Although their maturity is different from testicular sperm to epididyma sperm, significant affecting on the fertility and development of ICSI was not found.

Key words Cow; ICSI; Sperm decondensation; Male pronucleus; Embryo

卵胞质内单精注射 (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 是 20 世纪 80 年代后期发展起来的一种新型的体外受精技术, 它是借助显微操作仪, 将处理后的精子或生精细胞直接注入卵母细胞质内, 从而完成受精过程。ICSI 技术可排除透明带和卵质膜对精子入卵的阻碍作用, 对精子的死活及其完整性无严格要求, 因此在畜牧业生产及人临床实践中都有极为广阔的应用前景。第一, 利用 ICSI 技术可以进行同种和异种动物受精机理的研究, 探讨精卵互作的某些特征, 如受精的准确时间、精子在卵子中的确切位置和不同精子成分在受精过程中的作用等, 对于解决发育生物学和生殖生物学中有关受精机理问题具有重要的理论意义。第二, ICSI 技术在提高良种公畜和珍稀野生动物的精液利用率, 减少精子获能和精液储存技术要求等方面也具有重要的利用价值。第三, 可以使形态异常、弱动或不运动的精子进入卵母细胞质内受精, 故该技术对于治疗人类、家畜和珍稀野生动物的某些男 (雄) 性不育症具有特殊的临床意义。第四, ICSI 技术与其他生物工程技术相结合, 在家畜育种、转基因动物和性别控制等方面发挥一定的作用。例如, 用精子作为外源 DNA

载体已成为转基因的主要方法之一, 并且还可以解决性别控制技术中 X、Y 精子分离后活力下降、游动速度降低等问题。该项技术已在兔^[1]、牛^[2]、小鼠^[3]、马^[4]等动物和人^[5]获得成功。虽然在奶牛上已有通过 ICSI 技术成功产下后代的报道, 但 ICSI 技术在奶牛上的应用仍有很大局限性 (发育率低, 出现孤雌现象), 需要深入研究。因此, 笔者通过研究不同状态精子的 ICSI 效果, 以期为提高奶牛 ICSI 的效率提供基础依据。

1 材料与方 法

1.1 奶牛卵母细胞的准备 从屠宰场收集奶牛卵巢, 置于含有 30 ℃ 的生理盐水保温瓶内 3 h 后送回实验室。用 10 ml 的注射器和 12 号针头穿刺抽吸卵巢上面卵泡内的卵丘-卵母细胞复合体, 挑选细胞质均匀, 并具有完整卵丘细胞层的卵母细胞在洗卵液 PBS + 2% FBS 中洗涤 3 次, 成熟液中洗涤 3 次, 转入已平衡 2 h 的成熟液微滴中 (20 枚/100 μl)。成熟培养液是由 M199 (Sigma)、10% 胎牛血清 (FBS, Gibco)、10 μg/ml 促卵泡激素 (FSH, Follitropin V, Canada)、20 μg/ml 促黄体激素 (LH, Luteotropin, Canada) 和 1 μg/ml 雌二醇 (Sigma) 构成。然后在 5% CO₂、38.5 ℃ 饱和湿度的培养箱培养 24 h。成熟培养后在含 0.2% 透明质酸酶的 PBS 中反复吹打脱去卵丘细胞, 将具有第一极体的成熟卵母细胞移入含有 5 μg/ml 细胞松弛素 B (CB) 的显微操作微滴中, 并覆盖石蜡

基金项目 内蒙古自治区自然科学基金项目 (200711020410)。

作者简介 陈少轻 (1982 -), 女, 河北邢台人, 硕士研究生, 研究方向: 动物繁殖生物学与繁殖技术。

收稿日期 2008-10-21

油,显微操作微滴为 M-199 + Earle's Salts + L-Glutamine + 2.2 g/L NaHCO₃ + 25 mmol/L 6 mmol NaHCO₃ + 5 mmol HEPES + 5% FBS + 5 μg/ml CB + 10 μl 双抗。

1.2 颗粒细胞单层细胞的制备 体外成熟的卵丘-卵母细胞复合体经反复抽打后,将颗粒细胞收集起来,用 M-199 + 10% FBS 离心洗涤 2 次(1 500 r/min, 5 min),第二次离心后所得的颗粒细胞用 M-199 + 10% FBS 制成细胞密度为 1.2×10^6 /ml 的悬浮液,在 60 mm × 15 mm 的塑料培养皿中做成 100 μl 的微滴,并覆盖石蜡油。在 38.5 °C、5% CO₂ 和最大湿度的培养箱中培养,待颗粒细胞贴壁并开始生长,即可使用。将注射卵移入单层细胞培养皿中培养前,先换入新鲜培养液,在培养期间,每 2 d 换液 1 次。

1.3 精子的准备

1.3.1 冷冻精子的解冻。将荷斯坦奶牛细管冷冻精液在 37 °C 水浴中解冻后,取 0.25 ml 精液小心置于含有 1.5 ml BO 受精液(添加 25 μg/ml 肝素钠 + 6 mg/ml BSA)的圆底试管底部,置入培养箱悬浮 15 min 后,活精子上游,然后将上层液吸出,离心洗涤 2 次(1 800 r/min, 5 min),取 4 μl 洗涤后的精液添加到 6 μl 的精子操作液中备用,精子操作液为 M-199 Earle's Salts + L-Glutamine + 2.2 g/L NaHCO₃ + 25 mmol/L HEPES + 8% PVP。

1.3.2 睾丸和附睾精子的获取。将屠宰场采集的睾丸用保温瓶干贮保存,3 h 内运回实验室。在无菌滤纸上剥去总鞘膜,分离出附睾。用无菌滤纸吸去血液,然后用抽吸法,抽吸睾丸或附睾(头、体、尾)精液,睾丸中吸取的精液放入预先平衡在 CO₂ 培养箱中的 6 ml BO 受精液(添加 25 μg/ml 肝素钠 + 6 mg/ml BSA)中洗 2 次备用。附睾(头、体、尾)中吸取的精液放入预先平衡在 CO₂ 培养箱中的 2 ml BO 受精液(添加 25 μg/ml 肝素钠 + 6 mg/ml BSA)中孵育 30 min,取上清液,离心洗涤 2 次(1 800 r/min, 5 min),取 4 μl 洗涤后的精液添加到 6 μl 的精子操作液中备用。

1.4 卵胞质内显微注射 在 Nikon 倒置显微操作仪下进行奶牛操作。精子注射针内径为 8 ~ 10 μm,固定针内径为 20 ~ 30 μm,均安装在显微操作仪上。在 60 mm × 15 mm 的培养皿中,至上而下做 4 个小滴,上面 3 滴小(添加 PVP 的精子操作液,约 6 μl),分别供润洗注射针、放置精子用,下面 1 滴长(操作液,约 30 μl),放置约 20 个待注射的卵母细胞。显微操作时,首先将注射针移到第一滴 PVP 液中反复吹吸润洗,再将注射针移到第二滴含有精子的 PVP 液中,选择直线前进运动的精子,从垂直于精子尾巴中段的方向迅速划过,以制动精子,然后将单个精子从尾部吸入注射针近口端,移到最下面一滴含有卵母细胞的操作液中。这时用固定针固定卵母细胞,使卵母细胞的第一极体朝液滴内相当于时针“12”点或“6”点的位置,注射针在相当于“3”点的位置穿过透明带,向着“9”点的方向深入,先回吸少量细胞质,确定卵质膜已破,再将单个精子连同微量的 PVP 操作液注入卵胞质。随后,轻轻地撤出注射针,并将卵母细胞从固定针释放下去。至此完成一个卵子的注射过程。

1.5 注射后卵母细胞的化学激活处理 注射完毕后,将卵母细胞放在培养液中洗 2 遍,然后移入 M-199 + 10% FBS 微

滴中,在培养箱中置 30 min,注射后的卵母细胞均用 5 μmol Ionomycin 处理 5 min 后放置 M-199 + 10% FBS 滴中 3 h,然后用 2 mmol 6-DMAP 处理 3 h。而后移入已准备好的颗粒单层微滴中进行体外培养。

1.6 胚胎培养及发育的评定 ICSI 后 48 h 检查卵裂率,挑选出 4 ~ 8 细胞的胚胎与颗粒细胞单层细胞共培养,第 7 天记录囊胚率,第 9 天记录孵化率。

1.7 试验设计

1.7.1 试验 1。该试验研究 DTT (dithiothreitol) 预处理精子和未预处理精子对精子解聚、雄原核发育和胚胎体外发育效果。经 ICSI 20 h 后各取部分注射卵进行 H33342 染色,其余的继续培养。观察不同组注射后精子解聚率、雄原核率和体外胚胎发育率。

1.7.2 试验 2。该试验研究死、活精子对 ICSI 卵受精及胚胎发育的效果。冷冻精子经解冻,利用上浮法分离死、活精子。观察体外胚胎发育率。

1.7.3 试验 3。该试验研究奶牛睾丸和附睾(头、体、尾)精子 ICSI 效果。观察体外胚胎发育率。

1.8 统计分析 试验所得数据均用卡方检验(χ^2)进行统计分析,确定差异的显著性。

2 结果与分析

2.1 精子经 DTT 预处理后的 ICSI 效果 如表 1 所示,DTT 预处理精子 1 h,精子解聚率和雄原核率显著高于对照组(30.4% 和 11.6%, 47.8% 和 27.9%, $P < 0.05$),卵裂率与对照组差异不显著(85.0% 和 80.0%),囊胚率和孵化率显著高于对照组差异显著(45.8% 和 26.0%, 31.3% 和 14.0%, $P < 0.05$)。

该研究表明,DTT 预处理奶牛精子有助于提高 ICSI 的效率。奶牛的精核由于含有 I 型精蛋白而不易发生解聚,造成受精的失败,因此常选用一些化学试剂来预处理精子,通过促进其解聚来提高雄原核的形成。二硫苏糖醇(DTT)是一种分解二硫键的化学试剂,它能够促进哺乳动物核染色质解聚。因此被用来预处理精子,作为提高雄原核的形成率的一种方法。这可能是经 DTT 作用后的精子头部部分二硫键被打开,精子头膨大,染色质部分去凝集,使卵胞质内精核解聚的因子容易作用于精核,从而提高了精子的解聚率。Perreault 等用 DTT 处理牛精子,超声波分离的精子头,注入仓鼠的卵子内,精核可以很快地解聚并形成雄原核,从而更全面地参与卵子内的 DNA 合成^[6]。该试验用 5 mmol DTT 预处理完整的精子,1 h 后在倒置显微镜下观察到,精子尾部中段以下弯曲,有些甚至打折,这种现象在不用 DTT 处理的精子上是没的。这些形态的变化可能说明精子的质膜,特别是靠近尾部中段部位的质膜。在 DTT 的作用下变得薄弱,因而,用 DTT 处理精子进行 ICSI 能够提高注射卵的精子解聚率和原核形成率,卵裂率和囊胚率及孵化率。但 Suttner 的试验结果显示,DTT 虽然提高了 ICSI 卵的受精率,分裂率却下降了。他推测这可能是由于 DTT 的化学性质不稳定,可能会抑制与获能相关的精子蛋白的酪氨酸磷酸化,从而抑制精子获能,而且 DTT 也会破坏染色质的稳定性^[7]。Ward 等用新鲜配制的 DTT 处理精子,注入小鼠卵母细胞质内,没有产生一个后代。相反,用放置 1 周后的 DTT 处理精子,大约有

30% 的注射卵产生后代^[8]。因此,对于 DTT 预处理精子有待进一步研究。

表 1 DTT 对精子解聚、雄原核和胚胎发育的影响

Table 1 Effects of DTT on the sperm depolymerization, male pronucleus and embryonic development

处理 Treatment group	雄原核检查 Detection of male pronucleus			胚胎发育 Embryonic development			
	注射卵数 Number of injected oocytes	精子解聚率//% Sperm depolymerization rate	雄原核率//% Male pronucleus rate	注射卵数 Number of injected oocytes	卵裂率//% Cleavage rate	囊胚率//% Blastocyst rate	孵化率//% Hatching rate
DTT	46	30.4 ^a (14)	47.8 ^a (23)	48	85.0 (41)	45.8 ^a (22)	31.3 ^a (15)
对照组 CK	43	11.6 ^b (5)	27.9 ^b (12)	50	80.0 (40)	26.0 ^b (13)	14.0 ^b (7)

注:a、b 表示同列内不同上标的值差异显著 ($P < 0.05$); 括号内数字表示卵数。下同。

Note: a and b stand for significant differences ($P < 0.05$); data in the brackets mean the oocyte number. The same as follows.

2.2 死、活精子卵胞质内单精注射的效果 如表 2 所示,活精子、死精子卵胞质内单精注射后的卵其雄原核率 (28.3% 和 31.7%)、卵裂率 (75.0% 和 79.4%)、囊胚率 (27.9% 和 30.9%) 和囊胚孵化率 (13.2% 和 16.2%), 均无显著性差异 ($P > 0.05$), 说明死精子同样可用于奶牛卵母细胞的 ICSI。

研究表明,注射精子的表型并不影响其基因的表达^[9-10]。许多报道研究了死亡精子的受精发育潜力。Goto 等从牛附睾中采取精子,使精子获能后用冷冻 (-20 °C) 的方法杀死精子。然后用于单精子注射,获得了正常犊牛^[2]。Yanagida 等分别采集仓鼠、小鼠、人、鸟和鱼的精子,用超声波去除之膜、顶体及尾部后,精子核于 60 ~ 125 °C 水浴或蒸汽中处理 20 ~ 120 min,然后将单个精子注入卵母细胞之内。结果表明,精子核于 90 °C 下处理 30 min 后,仍具有原核发育潜力。鸟、鱼、仓鼠和小鼠不成熟的精子核耐热性较差,在 90 °C 下处理后,虽可去致密,但却不能形成雄原核^[11]。将小鼠的附睾精子^[12]和兔精子^[13]冻干后,进行卵母细胞质内单个精子注射,不仅可以获得正常的胚胎,而且移植后获得了发育正常的后代。该试验用冻精中的死精子 ICSI 后也获得了同活精子相同的发育效果。由此可见,死精子也能用于 ICSI,从而可以极大提高冻精的利用效率。

表 2 死活精子的 ICSI 效果比较

Table 2 Comparison of ICSI effect of dead sperm

处理组 Treatment group	注射卵数 Number of injected oocytes	卵裂率//% Cleavage rate	囊胚率//% Blastocyst rate	孵化率//% Hatching rate
死精子 Dead sperm	68	75.0 (51)	27.9 (19)	13.2 (8)
活精子 Live sperm	68	79.4 (54)	30.9 (21)	16.2 (9)

2.3 睾丸和附睾 (头、体、尾) 精子 ICSI 效果 如表 3 所示,睾丸或附睾 (头、体、尾) 的精子卵胞质内单精注射后的卵裂率、囊胚率和孵化率差异不显著 (79.1%、81.8%、73.2% 和 75.0%, 23.3%、20.4%、19.5% 和 18.2%, 14.0%、13.4%、12.2% 和 9.1%, $P > 0.05$)。

精子是经过在附睾中不断发育成熟才具备受精潜力的。Bedford 等研究表明,对大多数哺乳动物,不同附睾段的精子进行体内或体外受精时,附睾体或尾以前的精子不能完成受精^[14],但对于 ICSI 睾丸与附睾精子的注射效果同样很好。Goto 等对牛的比较试验表明,睾丸或附睾 (头、体、尾) 的精子与射出精子的 ICSI 受精卵发育到 2 ~ 8 细胞和桑椹胚的比率分别为 31.0% ~ 37.8% 和 11.1% ~ 18.2%, 差异不显著,但睾丸和附睾头精子受精卵发育到囊胚的比率 (11.4% 和

8.9%) 稍高于附睾体、附睾尾和射出精子 (7.1%、4.4% 和 6.7%) 受精卵的发育率,差异也不显著^[15]。该试验结果表明,睾丸和附睾 (头、体、尾) 受精卵的卵裂率和囊胚率及卵化率差异不显著。由此可见,从睾丸精子到附睾尾的精子,虽其成熟程度有很大不同,但对 ICSI 受精不产生显著影响,睾丸精子到附睾尾的精子都能用于 ICSI。

表 3 不同部位精子的 ICSI 效果

Table 3 ICSI effect of sperms at different positions

不同部位精子 Sperms from different section	注射卵数 Number of injected oocytes	卵裂率//% Cleavage rate	囊胚率//% Blastocyst rate	孵化率//% Hatching rate
睾丸 Testicular sperm	43	79.1 (34)	23.3 (10)	14.0 (6)
附睾 Epididyma sperm				
头 Caput	44	81.8 (36)	20.4 (9)	13.4 (8)
体 Corpus	41	73.2 (30)	19.5 (8)	12.2 (5)
尾 Cauda	44	75.0 (33)	18.2 (8)	9.1 (4)

3 结论

- (1) DTT 预处理奶牛精子有助于提高 ICSI 的效率。
- (2) 从冻精中分离的死精子能用于奶牛卵母细胞的 ICSI。
- (3) 从睾丸精子到附睾尾精子,虽其成熟程度有很大不同,但对 ICSI 受精不产生显著影响。

参考文献

- [1] IRITANI A, HOSOI Y. Microfertilization by various methods in mammalian species [J]. Prog Clin Biol Res, 1989, 294: 145 - 149.
- [2] GOTO K, KINOSHIEA A, TAKUMA Y, et al. Fertilisation of cow oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa [J]. Vet Res, 1990, 127: 517 - 520.
- [3] YANAGIMACHI R. Intracytoplasmic sperm injection experiments using the mouse as a model [J]. Hum Reprod, 1998, 13 (1): 87 - 98.
- [4] SQUIRES E L, WILSON J M, KATO H, et al. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection to equine oocytes matured in vitro [J]. Theriogenology, 1996, 45: 306.
- [5] PALERMO G, JORIS H, DEVROEY P, et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte [J]. Lancet, 1992, 340 (1): 17 - 18.
- [6] PERREAULT S D, ZIRKIN B R. Sperm nuclear decondensation in mammals: Role of sperm associated proteinase *in vivo* [J]. J Exn Zool, 1982, 224 (2): 253 - 257.
- [7] SUTTNER R, ZAKHARTCHENKO V, STOJKOVIC P, et al. Intracytoplasmic sperm injection in bovine: effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique [J]. Theriogenology, 2000, 54: 935 - 948.
- [8] WARD W S, KISHIKAWA H, AKUTSU H, et al. Further evidence that sperm nuclear proteins are necessary for embryogenesis [J]. Zygote, 2000, 8 (1): 51 - 56.
- [9] UEHARA T, YANAGIMACHI R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transfer of sperm nuclei into male pronuclei [J]. Biol Reprod, 1976, 15: 467 - 470.
- [10] MARKERT C L. Fertilization of mammalian eggs by sperm injection [J]. The Journal of Experimental Zoology, 1983, 228: 195 - 201.

(下转第 615 页)

浓度,比较后分析混合酸的最佳消化时间(图3)。由图3可知,对海胆样品微波消化的最优时间为3 min。

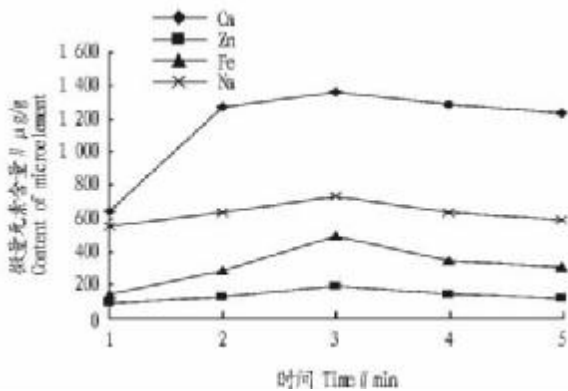


图3 不同消化时间对消化的影响

Fig. 3 Effects of different assimilation time on assimilation

2.3 方法的精确度 为考察方法的可靠性,以Ca、Cu、Mn、Zn、Fe、Na和Mg为测定指标,研究了该方法的加标回收率和精密度(测定次数 n 为3,表5)。由表5可知,该方法的回收率为93.8%~106.3%,相对标准偏差(RSD)小于5%,说明该研究方法具有良好的准确度和精密度。

表5 方法的精确度

Table 5 Precision of the method

元素 Index	样品含量 µg/g Sample content	加入量 µg/g Addition amount	回收量 µg/g Recovery quantity	回收率 % Recovery rate	RSD %
Ca	0.27	2.0	2.33	106.3	4.1
Cu	0.21	2.0	2.14	96.5	3.9
Mn	0.54	1.5	1.97	93.8	2.9
Zn	3.00	3.0	5.01	104.7	4.6
Fe	0.43	2.5	2.98	102.0	3.2
Na	0.80	1.0	1.65	97.0	3.1
Mg	1.25	2.5	2.98	94.0	3.2

2.4 样品的测定结果 称量好3份质量为0.2 g的海胆样品粉末于消解罐中,根据上述试验所得到的优化条件,向样品中加入HNO₃+H₂SO₄比例为5:1的混酸溶液,然后将消解罐封紧微波3 min,待样品完全冷却至室温后,用原子吸收光谱仪测Ca、Cu、Mn、Zn、Fe、Na和Mg 7种微量元素的浓度,3次测定的平均值分别为1 348.66、18.14、17.36、202.10、508.19、727.40和17.21 µg/g。

3 结论与讨论

通过对样品处理条件的优化及测定条件的优化,找到了海胆微量元素准确、灵敏的测定方法。该方法用微波消解2ICP2M S测定海胆中各种微量元素,具有良好的准确度、精密度,灵敏度高、线性范围宽,元素之间的干扰相对少,样品前处理简单,是高效可行的检测方法。该研究采用HNO₃+H₂SO₄混酸体系(5:1)作消化液,混合酸消化3 min可达最佳消化效果,各元素在试验范围内,加标回收率和精密度较好,加标回收率达93.8%~106.3%,相对标准偏差(RSD)小于5%。

从测定结果可知,海胆中人体所需的微量元素含量丰富,海胆中微量元素含量表现为Ca>Na>Fe>Zn>Cu>Mn>Mg,海胆中Ca、Zn、Na和Fe含量较高。钙既可以促进骨骼和体格发育,还可以加强大脑表层的抑制过程,调节兴奋和抑制过程的平衡失调,还有消炎、消肿、抗过敏作用以及解毒作用,并与血压呈负相关^[6]。锌参与人体内糖的代谢,能促进胰岛素转变为胰岛素,并延长胰岛素的作用^[7]。锌参与体内100多种酶的合成,缺锌可降低有关酶的活性而影响人体生长发育、免疫防卫、创伤愈合、生殖生育等生理功能。动物试验表明,人体内若长期缺镁有可能导致染色体突变,而这种突变会诱发肿瘤,缺镁可能会使免疫功能降低,使肿瘤细胞得以迅速增殖^[8]。铁是血红蛋白和肌红蛋白的核心部分,缺铁容易导致贫血,引起氧的运输和储存不足^[9]。海胆中含有大量的钾,有利于降低血压,减少心血管疾病,促进糖类代谢。海胆含有丰富的微量元素,具有丰富的生物活性,在医学上具有广泛的应用前景,海胆有可能成为开发新型药物的资源。

参考文献

- [1] 廖玉麟. 我国的海胆[J]. 生物学通报, 2001, 35(9): 1-3.
- [2] 王艳, 周培根, 戚晓玉. 海洋生物中毒素的研究进展[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(3): 283-288.
- [3] 陈军, 周群, 郁露, 等. 海刺参及其产品红外光谱的分析与鉴定[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(9): 1723-1726.
- [4] 樊绘曾. 海胆: 关于海胆及其成分保健医疗功能的研究与开发[J]. 中国海洋药物, 2001(4): 37-44.
- [5] 周慈由, 陈志刚, 黄金龙. 海胆水解方法和化学成分研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2007, 46(2): 236-238.
- [6] 王悦晴, 金天大, 陈仲康. 近年我国海洋药物研究现状及发展概况[J]. 药物流行病学杂志, 2004, 14(3): 134-136.
- [7] 高辉, 陈淑梅. 紫海胆提取物SNC药理研究[J]. 中国药理学通报, 1987, 3(3): 166-168.
- [8] 韩金土, 刘彦明, 王辉. 原子吸收光谱法测定清热解毒类中草药中的11种微量元素[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(10): 1931-1934.
- [9] 孙瑞霞, 周玲妹, 薛万刚, 等. 原子吸收光谱法测定中成药中微量元素[J]. 光谱学与光谱分析, 2002, 22(5): 853-855.

(上接第601页)

- [11] YANAGIDA K, YANAGIMACHI R, PERREAULT S D, et al. Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection into hamster oocytes[J]. Biol Reprod, 1991, 44: 440-447.
- [12] 朱锦亮, 严阿勇, 陈学进, 等. 用冻干精子生产ICSI小鼠[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(1): 177-178.
- [13] LIU J L, HIROKAZU KUSAKABE, CHANG C C, et al. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits[J]. Biol Re-

prod, 2004, 70: 1776-1781.

- [14] BEDFORD J M. The bearing of epididymal function in strategies for *in vitro* fertilization and gamete intrafallopian transfer[J]. AM NY Acad Sci, 1988, 54: 284-291.
- [15] GOTO K, KINOSHIEA A, NAKANISHI Y, et al. Blastocyst formation following intracytoplasmic injection of *in vitro* or *in vitro* derived spermatids into bovine oocytes[J]. Hum Reprod, 1996, 11: 824-829.