

热应激对小鼠卵母细胞和附植前胚胎 及其生长内环境氧化损伤的影响

李辉辉, 田文儒, 张志宏, 张启耀, 高善颂

(青岛农业大学动物科技学院, 山东青岛 266109)

摘要: 【目的】研究热应激对机体(肝脏)以及生殖系统氧化、卵母细胞和附植前胚胎氧化及发育能力的影响, 探讨热应激影响卵母细胞及附植前胚胎发育能力的机制。【方法】分别用总谷胱甘肽和微量丙二醛测定试剂盒检测热应激后小鼠卵母细胞、附植前胚胎和组织器官内总谷胱甘肽(total Glutathione, γ GSH)、丙二醛(MDA)的含量, 并且观察后续胚胎的发育情况。【结果】母体经 35℃处理 6 和 12 h 后, 其体内的卵母细胞(6 h)和发育至 1~3 d 的胚胎(桑椹胚前期, 12h)的后续胚胎发育率显著降低, 胚胎中 γ GSH 含量下降($P < 0.01$), MDA 含量升高($P < 0.01$), 卵母细胞中二者的含量未有变化; 发育至第 4 天、第 5 天的胚胎(桑椹胚和囊胚)中 γ GSH 和 MDA 的含量及胚胎发育率均未有变化($P > 0.05$); 发育至第 1~5 天的体外培养的胚胎分别经 39℃处理 12 h 后, 胚胎中 γ GSH 和 MDA 及其发育率均未有变化($P > 0.05$); 随着热应激温度升高和时间的延长, 肝脏和输卵管中 γ GSH 显著降低、MDA 显著升高; 当温度达到 41℃时, 卵巢和子宫中 γ GSH 显著降低、MDA 显著升高。【结论】桑椹胚以前的胚胎遭受母体热应激后, 发育能力降低, 这与热应激所诱导的氧化损伤密切相关, 但是母体热应激后卵母细胞后续胚胎的发育能力降低与氧化损伤无关。体外培养的胚胎经 39℃处理 12 h 后, 对附植前胚胎氧化损伤和孵出率均无影响。

关键词: 热应激; 卵母细胞; 附植前胚胎; 氧化损伤; 发育能力

Oxidative Damage of Heat-Stressed Mouse Oocytes and Preimplantation Embryos and Their Environments

LI Hui-hui, TIAN Wen-ru, ZHANG Zhi-hong, ZHANG Qi-yao, GAO Shan-song

(Department of Animal Science and Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong)

Abstract: 【Objective】 This study was conducted to determine the effects of heat stress on the oxidate damage of organism(liver), genital system, oocytes and preimplantation embryos, and to observe oocytes' and embryos' subsequently developmental competence. 【Method】 γ GSH and MDA in the oocytes, preimplantation embryos and several organs were determined by using total glutathione and malonaldehyde assay kit, respectively. The subsequently developmental competence of heat-stressed oocytes and embryos was determined. 【Result】 The subsequently developmental competence of the oocytes (6 h) and embryos (12 h) on day 1 to day 3 (before morula) in the mice heat-stressed at 35℃ for 6 h or 12 h decreased significantly. The γ GSH content decreased and MDA output increased significantly in heat-stressed embryos on days 1, 2 and 3, but not in heat-stressed oocytes. However, nothing changed in embryos on days 4 and 5 of age cultured *in vivo* and the embryos on days 1 to 5 of age heat-stressed at 39℃ for 12 h cultured *in vitro*. The γ GSH content increased and MDA output decreased significantly in liver and oviduct with the increased grading of heat stress and prolonged time, and in the ovary and uterus with 41℃ heat stress only. 【Conclusion】 The results demonstrate that the loss of developmental competence of early embryos is associated with oxidate damage of maternally heat-stressed embryos before morula, but neither of maternally heat-stressed oocytes nor *in vitro* cultured 1 to 5d embryos.

Key words: heat stress; oocyte; preimplantation embryo; oxidative damage; developmental competence

收稿日期: 2008-08-25; 接受日期: 2009-01-05

基金项目: 国家自然科学基金(30571338)

作者简介: 李辉辉(1983-), 女, 陕西韩城人, 硕士研究生, 研究方向为动物生殖生理与繁殖障碍性疾病。E-mail: lxw830618@126.com。通信作者田文儒(1959-), 男, 黑龙江兰西人, 教授, 研究方向为动物生殖生理与障碍性疾病。Tel: 0532-86080849; E-mail: wrtian@yahoo.com.cn

0 引言

【研究意义】高温环境下, 母畜机体处于热应激状态下可导致卵母细胞和早期胚胎死亡^[1], 而卵母细胞和早期胚胎对热敏感的原因尚不清楚。因此, 研究热应激对卵母细胞和早期胚胎损伤的机制, 对提高高热环境下母畜的生殖能力, 具有重要意义。【前人研究进展】高温常常导致各种哺乳动物^[2-6]出现暂时性不孕。较高的环境温度可降低胚胎活力和发育率^[7-8]。牛^[9]和羊^[10]卵母细胞遭受热应激后, 其受精后的胚胎发育力降低。小鼠卵母细胞和合子期胚胎受热应激后, 胚胎发育能力降低^[11-12]。热应激时机体体温升高, 并常伴随着机体的氧化损伤^[13], 活性氧 (active oxygen, ROS) 的合成增加并且与细胞内的生物大分子相互作用而损伤细胞^[14]。谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 是胚胎中重要的非酶性抗氧化剂^[15], 对卵母细胞和早期胚胎发育具有重要的作用。在卵母细胞成熟期间, GSH 的积累将会改善卵母细胞的胞质成熟质量、保护卵母细胞在受精后的胚胎发育阶段免于受到氧化损伤^[16]。因此, 笔者推测是氧化损伤介导卵母细胞及早期胚胎的热损伤。丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 是脂质过氧化反应链式终止阶段产生的小分子产物, 具有很强的生物毒性, 可引起细胞损伤, 导致细胞结构和功能的改变。因此其含量可以间接反映自由基的产生情况和机体组织或细胞的脂质过氧化程度。【本研究切入点】关于热应激对胚胎发育的影响, 其研究主要集中于热休克蛋白对胚胎发育的影响, 但是胚胎发育过程中涉及的分子机制是复杂繁多的, 难以用一种机制来完全诠释。卵母细胞成熟过程和早期胚胎受损, 将影响其后续胚胎的成活率。热应激诱导卵母细胞和附植前不同发育时期胚胎过氧化损伤的研究尚未见报道。因此, 本文就热应激是否诱导卵母细胞、附植前胚胎 (体内和体外)、生殖系统氧化损伤这一问题加以研究。【拟解决的关键问题】通过观察母体热应激对卵母细胞后续胚胎、附植前不同发育时期胚胎以及体外热应激对不同发育时期胚胎发育能力的影响, 同时检测卵母细胞、不同处理组胚胎和某些器官组织中 γ -GSH 和 MDA 的含量, 以确定相同强度的体内、体外热应激是否诱导卵母细胞和附植前不同发育时期胚胎发生氧化损伤, 以及体内、体外不同发育时期胚胎对热应激的耐受性是否一致, 从而进一步明确热应激影响母畜生殖能力的机制。

1 材料与方法

1.1 试验动物

昆明白小鼠, 8~10 周龄, 购自山东大学实验动物中心, 于试验前预饲养 1 周。

1.2 供试动物的处理

1.2.1 受试动物分组及热应激处理 根据热应激强度的不同, 将受试鼠分为 6 个热应激处理组: 37℃ (1 h)、37℃ (2 h)、39℃ (1 h)、39℃ (2 h)、41℃ (1 h)、41℃ (2 h)。每组 3 只, 每天热应激 1 次, 连续热应激 1 周。

1.2.2 体内热应激卵母细胞及其合子期胚胎 将超排后的小鼠置于 35℃ 环境中持续 6 h, 获得受热应激卵母细胞; 然后再将热应激后的雌鼠与公鼠 1:1 合笼, 于次日凌晨检阴栓, 从而获得来自热应激卵母细胞的合子期胚胎。

1.2.3 体内热应激的胚胎 将超排后的雌鼠与公鼠 1:1 合笼过夜 (此时记为第 1 天), 于次日凌晨检阴栓。将检出阴栓的小鼠置于 35℃, 持续 12 h, 获得发育至第 1 天、遭受热应激的胚胎 (合子期); 第 2 天, 将见阴栓的小鼠于同一时间施以同样的热应激, 获得发育至第 2 天、遭受热应激的胚胎 (2-细胞期); 依次类推, 分别获得发育至第 3 天 (4-细胞~桑椹胚初期)、第 4 天 (桑椹胚~囊胚) 和第 5 天 (囊胚) 受热应激的胚胎。热应激处理结束的胚胎一部分用于 γ -GSH 和 MDA 的检测, 一部分继续体外培养至孵出囊胚 (检阴栓后的第 6 天) 观察胚胎的发育率, 试验共重复 3 次, 每组 50~400 枚胚胎。

1.2.4 体外培养胚胎的热应激处理 将超排后的小鼠合笼, 把次日检出阴栓的小鼠处死, 取出原核期胚胎进行体外培养。将发育至第 1~5 天的胚胎分别经 39℃ 处理 12 h, 如此分别获得发育至第 1~5 天受热应激的胚胎。体外热应激结束的胚胎的处理同于体内热应激胚胎。

1.3 样品采集和处理

1.3.1 组织的采集 用颈部脱臼法致死小鼠, 分别取其肝脏、卵巢、输卵管和子宫, 加液氮研磨, 按重量: 体积=1:19 加生理盐水, 在 4℃ 条件下以 2 000 r/min 离心 15 min, 用 EP 管分装上清, -70℃ 冻存。

1.3.2 卵母细胞的采集和处理 处死小鼠后, 在体视显微镜下从输卵管壶腹部冲取卵母细胞, 用含 0.3 mg·ml⁻¹ 透明质酸酶的 hepes-CZB 去除周围的颗粒细胞, 清洗后用液氮和 37℃ 水浴进行 3 次快速的冻融,

-70℃冻存。

1.3.3 胚胎的采集、培养和处理 处死小鼠后，在体视显微镜下从输卵管或从子宫中冲取不同发育阶段的胚胎，以 CZB 为培养液在 37℃ 含 5% 的 CO₂ 的培养箱中培养，4-细胞以后的胚胎使用含有葡萄糖的 CZB 培养液。胚胎样品的处理同卵母细胞。

1.4 γGSH 和 MDA 的测定 用微量丙二醛测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）和总谷胱甘肽检测试剂盒（碧云天生物科技研究所）在紫外可见分光光度计（NEWLABO）和酶标仪（BIO-TEK）上进行测定。卵母细胞和胚胎中二者的含量分别以每卵母细胞（pmol/oocyte）和每胚胎（pmol/embryo）表示，组织中 γGSH 和 MDA 的含量以每毫克蛋白（nmol·mg⁻¹ prot）表示。用 Bradford 蛋白质定量试剂盒（南京建

成生物工程研究所）测定组织上清液总蛋白浓度。

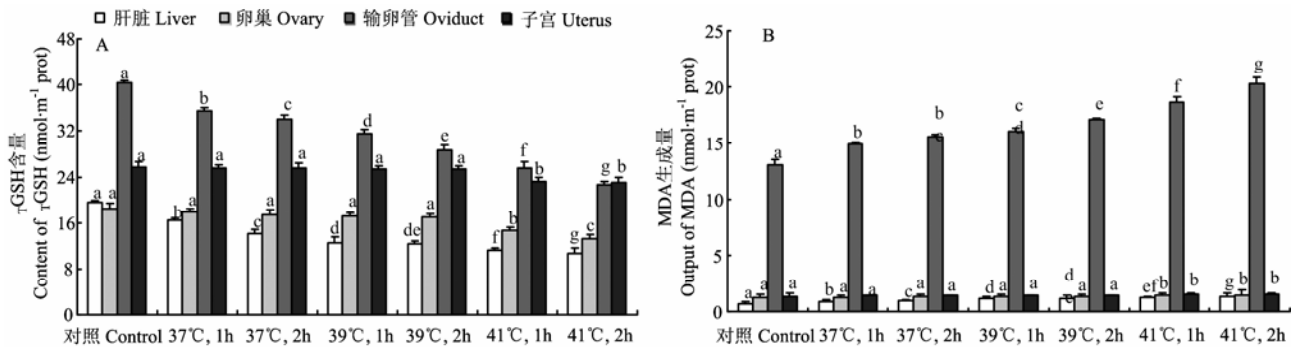
1.5 数据处理

采用 SPSS13.0 软件对所得数据进行统计分析，所有数据均以 x±SD 表示。

2 结果与分析

2.1 受热应激小鼠肝脏、卵巢、输卵管和子宫中 γGSH 和 MDA 含量的变化

由图 1（A 和 B）可知，随着热应激温度的升高和时间的延长，肝脏和输卵管中 γGSH 的含量显著下降，MDA 的生成量显著增加；而在受 37 和 39℃ 热应激时，卵巢和子宫中 γGSH 和 MDA 的含量均未发生显著变化（P>0.05），当温度升至 41℃ 时，γGSH 的含量显著下降，MDA 生成量显著增加。



在同一组织中标不同字母表示差异显著，P<0.05 Different letters within the same tissue indicate different significantly, P<0.05

图 1 受热应激小鼠肝脏、卵巢、输卵管和子宫中 γGSH (A) 和 MDA (B) 的含量

Fig. 1 Content of γGSH (A) and MDA (B) in liver, ovary, oviduct and uterus of the heat-stressed mouse

2.2 受热应激小鼠卵母细胞及其合子期胚胎 γGSH 和 MDA 含量以及后续胚胎发育率

受热应激后，卵母细胞及其受精后合子期胚胎的 γGSH 和 MDA 均未发生显著变化（P>0.05），而后续胚胎的发育率显著下降（P<0.01）（表）。

2.3 受热应激小鼠附植前不同时期胚胎中 γGSH、MDA 含量及其发育率

母体受热应激后，发育至 1、2 和 3 d 的胚胎中 γGSH 和 MDA 的含量都较对照组发生了显著变化（P<0.01），而且胚胎的囊胚孵出率也显著降低（P<0.01）；发育至第 4 天、5 天的胚胎，其 γGSH 和 MDA 的含量以及囊胚孵出率均未发生显著变化（P>0.05）；当胚胎发育至第 4 天时，对照组胚胎中 γGSH 的量较第 3 天时显著增加（P<0.05）（图 2）。

表 体内热应激小鼠卵母细胞及其合子期胚胎 γGSH 和 MDA 含量以及后续胚胎发育率

Table Developmental competence and γGSH and MDA content of maternally heat-stressed oocytes and its zygotes

处理 Treatments	卵母细胞 Oocytes		合子期胚胎 Zygotes		受精后胚胎的孵出囊胚率 Hatched blastocytes rate (%)
	γGSH (pmol/oocyte)	MDA (10 ⁻² pmol/oocyte)	γGSH (pmol/zygote)	MDA(10 ⁻² pmol/zygote)	
对照 Control	1.80±0.08	7.42±0.17	1.53±0.05	7.82±0.18	64.00±3
热应激 Heat stress	1.81±0.11	7.34±0.09	1.51±0.04	7.80±0.11	40.00±3**

**表示显著水平为 0.01。下同 **Significant at 0.01 level. The same as below

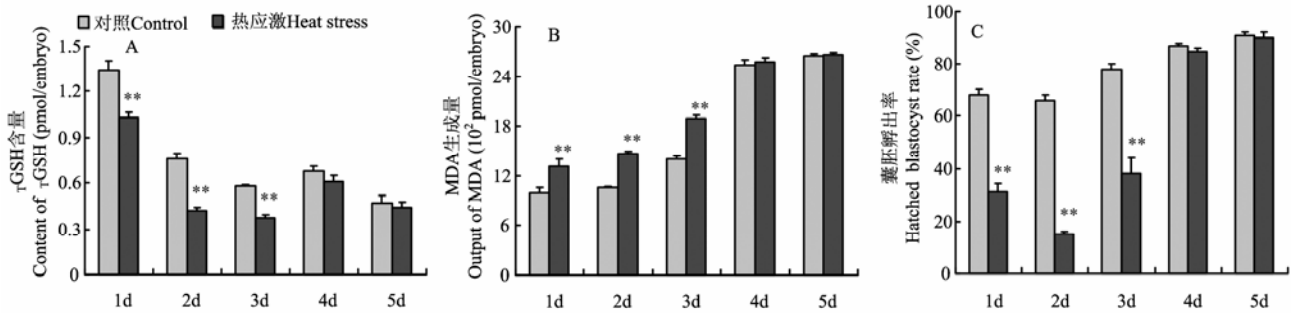


图 2 体内热应激小鼠附植前不同发育时期胚胎中 γGSH (A) 和 MDA (B) 含量及其发育率 (C)

Fig. 2 Developmental competence (C), γGSH (A) and MDA (B) content of maternally heat-stressed mouse embryos within differently developmental stages

2.4 热应激后体外培养的附植前小鼠胚胎中 γGSH 和 MDA 含量以及其发育率
体外培养的 1~5 d 的胚胎分别受 39℃、12 h 热应

激后, 胚胎中 γGSH、MDA 含量以及囊胚孵出率与对照组相比均无显著差异 (P>0.05)。由此表明, 39℃ 对于体外培养的胚胎并不能引起热损伤 (图 3)。

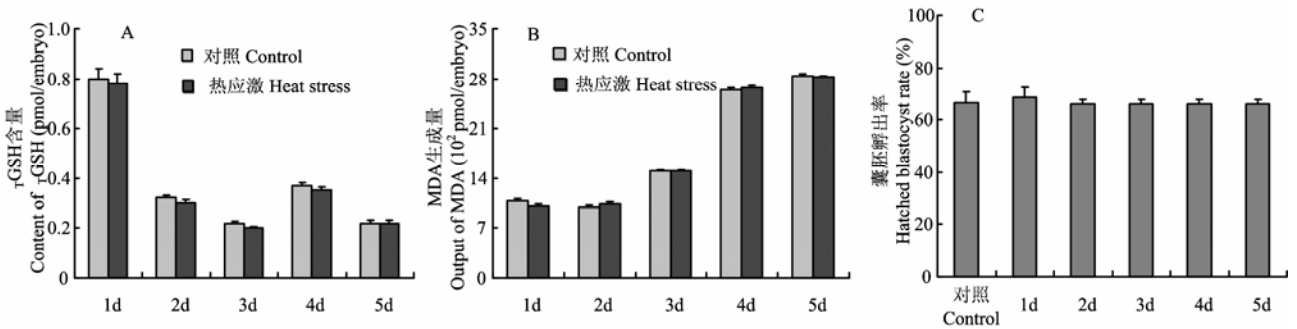


图 3 热应激后体外培养的附植前不同发育时期小鼠胚胎中 γGSH 和 MDA 含量以及其发育率

Fig. 3 Developmental competence, γGSH and MDA content of heat-stressed mouse embryos in vitro within differently developmental stages

3 讨论

本研究发现, 母体遭受热应激后其卵母细胞并不发生氧化损伤, Matsuzuka T 也发现热应激后卵母细胞中 GSH 含量未发生变化^[11], 这可能与卵丘细胞的保护有一定关系, 因为 Zhou 等^[17]人发现, 半胱胺能够增强卵丘卵母细胞复合体和卵母细胞中 GSH 的合成以及胚泡的数目, 但是它的前提条件是有卵丘细胞的存在, 即卵丘卵母细胞复合体或卵母细胞和卵丘细胞一起培养, 由此可见, 卵母细胞须与卵丘细胞相互作用, 才能使卵母细胞中 GSH 的合成增加。因此, 在本试验中卵母细胞之所以不受氧化损伤, 笔者推测其原因是: 从输卵管中取出的卵母细胞都有一团卵丘细胞

包绕, 卵丘细胞可以通过缝隙连接将小的热保护分子 GSH 输送给卵母细胞^[18], 使卵母细胞免受氧化损伤。本研究还发现母体受热应激后, 其卵母细胞受精后的胚胎发育率显著降低, 表明卵母细胞的实质受到了影响。有人在牛的试验中发现, 高温可引起成熟卵母细胞的微管和微丝改变^[19], 并形成异常的 M I 纺锤体^[20], 从而抑制卵母细胞的核成熟。对于哺乳动物的卵母细胞来说, 核成熟启动胞质成熟, 这一过程决定其受精能力以及后期胚胎的发育能力^[21-22]。王军佐^[23]发现, 受热应激卵母细胞的发育能力低主要是由于热应激干扰了卵母细胞的胞质成熟。而本试验发现, 受热应激的卵母细胞受精后其胚胎发育能力降低并非氧化损伤所致, 这在某种程度上证实, 热应激可导致卵

母细胞的结构损伤而并非化学因素改变。

在本研究中,母体遭受热应激后其体内发育至 1~3 d 的胚胎中 γ GSH 下降、MDA 增加的结果表明,胚胎发生了氧化损伤,并且胚胎的这种损伤已经影响到了其后续发育能力。当然,桑椹胚期胚胎(发育至第 4 天)中的 γ GSH 含量较桑椹胚前的胚胎(发育至第 3 天)显著增加的结果说明,只有到桑椹胚期的胚胎才能合成 GSH, Gardiner 也得到了同样的结论^[24]。已知,合子期胚胎的正常发育主要依赖于卵子发生过程中合成的蛋白质和 RNA,直到 2-细胞中期,许多胚胎基因才被启动,从本研究中发现,发育至第 4 天时胚胎中 GSH 的基因开始被启动表达,此时母体遭受热应激后,其体内胚胎 MDA 生成量不增加,说明胚胎合成的 GSH 使胚胎免受热应激导致的氧化损伤,并且胚胎的后续发育也正常。从结果能够看出,桑椹胚前的胚胎较桑椹胚后的胚胎热耐受性差,而桑椹胚前的胚胎自身不能合成 GSH(桑椹胚能够合成 GSH),由此可见,胚胎的热耐受性与 γ GSH 直接相关,即热应激是否导致氧化损伤,直接决定胚胎的热耐受性。

在本研究还发现,39℃ 的热应激并不能使体外培养的附植前胚胎发生氧化损伤,而且胚胎的发育率也不受影响,Ozawa M 也发现体外培养的小鼠合子期胚胎经 39℃ 处理 12 h 后,胚胎中 GSH 和发育率都未发生变化^[25],这表明 39℃ 高温对体外培养的胚胎没有影响。至于不同梯度的高温对体外培养的小鼠附植前胚胎是否有影响,还需要进一步深入研究。

综合体内和体外对小鼠和其胚胎热应激所得的结果可以认为,仅仅高温不能使胚胎发育阻滞,母体内环境生理因素改变对小鼠胚胎也起着至关重要的作用。因为肝脏中 γ GSH 减少和 MDA 增多的结果表明,热应激后机体发生氧化损伤;对于生殖系统来说,输卵管受热应激后发生明显的氧化损伤,而子宫受到 41℃(不是 37 和 39℃)高温后,才会发生氧化损伤,这与热应激对不同发育阶段胚胎的氧化损伤的结果恰恰一致,因为 1~3 d 的胚胎处于输卵管中,热应激后发生氧化损伤;而 4、5 d 的胚胎处于子宫中,热应激后不发生氧化损伤。这也许恰恰解释了为什么桑椹胚期后的胚胎较桑椹胚期前胚胎的热耐受性强的原因。因此,附植前胚胎的热耐受性由胚胎自身及其生长内环境双重因素决定。

4 结 论

肝脏和输卵管受热后发生氧化损伤,而卵巢和子

宫在 41℃ 时发生氧化损伤;卵母细胞和其合子期胚胎不受体内热应激的影响,但后续胚胎发育率降低;体内热应激能够使早于桑椹胚期的胚胎发生损伤,桑椹胚及其后期胚胎 γ GSH 含量增加;体外 39℃、12 h 的热应激对附植前胚胎氧化损伤和孵出率均无影响。

References

- [1] Hansen P J, Drost M, Rivera R M, Paula-Lopes F F, al-Katanani Y M, Krininger C E 3rd, Jr Chase C C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*, 2001, 55(1): 91-103.
- [2] Baumgartner A P, Chrisman C L. Embryonic mortality caused by maternal heat stress during mouse oocyte maturation. *Animal Reproduction Science*, 1987, 14: 309-316.
- [3] Kojima T, Udagawa K, Onishi A, Iwahashi H, Komatsu Y. Effect of heat stress on development *in vitro* and *in vivo* and on synthesis of heat shock proteins in porcine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 1996, 43(4): 452-457.
- [4] Dutt R H. Critical period for early embryo mortality in ewes exposed to high ambient temperature. *Journal of Animal Science*, 1963, 22: 713-719.
- [5] Biggers B G, Geisert R D, Wetteman R P, Buchanan D S. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. *Journal of Animal Science*, 1987, 64(5): 1512-1518.
- [6] Putney D J, Mullins S, Thatcher W W, Drost M, Gross T S. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated temperatures between the onset of estrus and insemination. *Animal Reproduction Science*, 1989, 19: 37-51.
- [7] Ealy A D, Drost M, Hansen P J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *Journal of Dairy Science*, 1993, 76: 2899-2905.
- [8] Wildt D E, Riegler G D, Dukelow W R. Physiological temperature response and embryonic mortality in stressed swine. *American Journal of Physiology*, 1975, 229: 1471-1475.
- [9] al-Katanani Y M, Webb D W, Hansen P J. Factors affecting seasonal variation in 90-day non-return rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82: 2611-2616.
- [10] Dutt R H. Critical period for early embryo mortality in ewes exposed to high ambient temperature. *Journal Animal Science*, 1963, 22: 713-719.
- [11] Matsuzuka T, Ozawa M, Hirabayashi M, Ushitani A, Kanai Y. Developmental competence and glutathione content of maternally heat-stressed mouse oocytes and zygotes. *Animal Science Journal*, 2004, 75: 117-124.

- [12] Matsuzuka T, Ozawa M, Nakamura A, Ushitani A, Hirabayashi M, Kanai Y. Effect of heat stress on the redox status in the oviduct and early embryonic development in mice. *Journal of Reproduction and Development*, 2005, 51(2): 281-287.
- [13] Amaud C, Joyeux M, Garrel C, Godin-Ribuot D, Demenge P, Ribuot C. Free-radical production triggered by hyperthermia contributes to heat stress-induced cardioprotection in isolated rat hearts. *British Journal of Pharmacology*, 2002, 135: 1776-1782.
- [14] Saltman P. Oxidative stress: a radical view. *Seminars in Hematology*, 1989, 26(4): 249-256.
- [15] Guérin P, El Moutassim S, Ménéz Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, 2001, 7: 175-189.
- [16] de Matos D, Furnus C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: Effect of β -mercaptoethanol, cystein and cystin. *Theriogenology*, 2000, 53(3): 761-771.
- [17] Zhou P, Wu Y G, Li Q, Lan G C, Wang G, Gao D, Tan J H. The interactions between cysteamine, cystine and cumulus cells increase the intracellular glutathione level and developmental capacity of goat cumulus-denuded oocytes. *Reproduction*, 2008, 135(5): 605-611.
- [18] Aréchiga C F, Ealy A D, Hansen P J. Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation murine embryos. *Biology of Reproduction*, 1995, 52: 1296-1301.
- [19] Tseng J K, Chen C H, Chou P C, Yeh S P, Ju J C. Influences of follicular size on parthenogenetic activation and *in vitro* heat shock on the cytoskeleton in cattle oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 2004, 39(3): 146-153.
- [20] Roth Z, Hansen P J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*, 2005, 129: 235-244.
- [21] Eppig J J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reproduction, Fertility and Development*, 1996, 8: 485-489.
- [22] Moor R M, Dai Y, Lee C, Fulka J J. Oocyte maturation and embryonic failure. *Human Reproduction Update*, 1998, 4: 223-236.
- [23] 王军佐. 小鼠卵母细胞体外成熟过程中热应激对胞质成熟的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.
- Wang J Z. Effect of heat stress on the cytoplasmic maturation of mouse oocyte during *in vitro* maturation[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2007. (in Chinese)
- [24] Gardiner C S, Reed D J. Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995, 318(1): 30-36.
- [25] Ozawa M, Hirabayashi M, Kanai Y. Developmental competence and oxidative state of mouse zygotes heat-stressed maternally or *in vitro*. *Reproduction*, 2002, 124: 683-689.

(责任编辑 林鉴非)