

肉苁蓉及淫羊藿 对小鼠早期胚胎体外发育的影响

谢安 厉世伟 李龙 况玲*

(新疆农业大学 动物医学学院 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要: 研究肉苁蓉及淫羊藿对小鼠早期胚胎体外发育的影响。试验选取6~8周龄昆明小鼠早期胚胎,以不添加中药培养液组为空白对照,分以下试验组:Ⅰ组:早期胚胎在纯培养液 $M_{16} + 5\% \text{FBS}$ (M_1)与 $M_{16} + 5\% \text{FBS} + \text{EDTA} + \text{牛磺酸}$ (M_2)中的体外发育情况;Ⅱ组:早期胚胎添加至中药体积浓度为0.1%的 M_1 与 M_2 培养液中。Ⅲ组:早期胚胎添加至不同体积浓度中药成分的培养液中。Ⅳ组:将早期胚胎加入中药不同组合体积浓度培养液中。试验结果:(1) M_2 液优于 M_1 液,特别是在克服2细胞发育阻滞上。(2)添加0.1%肉苁蓉桑葚胚率与囊胚率高于0.1%淫羊藿组,差异极显著($P < 0.01$),中药组桑葚胚率与囊胚率显著高于培养液空白对照,差异极显著($P < 0.01$)。(3)高浓度中药会对胚胎活力产生副作用,抑制胚胎后阶段发育,与其他组对比差异极显著($P < 0.01$)。(4)添加高浓度中药组合培养液对早期胚胎成活率、2细胞发育率,与低浓度组合中药和空白组相比有显著差异性($P < 0.05$),与低浓度组合中药和空白对照相比桑葚胚及囊胚发育率差异极显著($P < 0.01$)。在小鼠胚胎体外培养液中添加一定浓度EDTA、牛磺酸能克服2细胞阻滞;0.1%肉苁蓉能有效促进胚胎体外发育,同时添加低浓度中药及低浓度组合中药也有促进作用。

关键词: 肉苁蓉;淫羊藿;卵母细胞;体外培养

中图分类号:Q813.7 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2011)05-0955-05

Effects of *Cistanche* and *Epimedium* on Development of Early Mouse Embryo

XIE An, LI Shi-wei, LI Long, KUANG Ling*

(College of Animal Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: A study on the influence of *Cistanche* and *Epimedium* on development of early mouse embryos in vitro was conducted. Early embryos of 6-8 week-old KM mice were selected for test. A group of no medicine was taken as the blank control, The others were divided into the following groups, Group I: early embryos in medium of M_1 and M_2 . Group II: early embryos in the medium of 0.1% of M_1 and M_2 . Group III: early embryos in medium of Chinese medicines of different concentrations. Group IV: early embryos in medium of different combinations of Chinese medicines. The results showed that, (1) M_2 was better than M_1 , especially in overcoming the block of 2-cells. (2) Addition 0.1% *Cistanche* was better than that of 0.1% *Epimedium* in Morula and blastula ($P < 0.01$), the rates of Morula and blastula in the medicine groups were higher than that in the control ($P < 0.01$). (3) High concentration of Chinese medicines had bad effects on viability of embryo,

收稿日期:2011-06-27 修回日期:2011-08-04

基金项目:国家自然科学基金(30960292)

作者简介:谢安(1985—)男,硕士生,主要从事胚胎工程研究, E-mail: xa1985@163.com; * 通讯作者:况玲,教授,博士, E-mail: kuangling90@sohu.com。

and restrained the rates of development of Morula and blastula ($P < 0.01$). (4) Compared with the control, there was significant difference between addition of portfolio of high concentration of Chinese medicines and that of low concentration in survival rate and development rate ($P < 0.05$). At the same time, the development rates of Morula and blastula compared with those in the low concentration groups and the control were significantly different ($P < 0.01$). It means with high concentration of Chinese medicine will inhibit the development. Conclusion: medium added with EDTA, taurine, 0.1% *Cistanche* can overcome the block of 2-cells in vitro, and addition of low concentrations or combination of medicines has good effects.

Key words: *Cistanche*; *Epimedium*; oocytes; in vitro

随着胚胎生物工程研究的发展,人们对早期胚胎发育与微环境、自身代谢特征等方面的认识在不断深入,目前大多数研究者普遍采用改变培养液的成分、改善培养的条件提高胚胎发育率,并建立了胚胎共培养体系。传统中药相对于化学药物来说具有经济、低毒等明显的优点,目前国内外在研究中药对胚胎体内外发育的影响方面几乎都在研究中药有效成分中多糖类和黄酮类抗自由基的特性,而从中药全药的特性出发来研究中药对早期胚胎发育的影响方面,国内外报道不多。本研究在前人基础上探索如何进一步提高早期胚胎体外发育率,研究添加中药对孕期胚胎发育的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 动物及药材 6~8周龄清洁级昆明小鼠(购自新疆医科大学实验动物中心) 雌性120只,雄性20只,体质量18~22g,实验动物生产许可证号SCXK(新)2003-2002,使用许可证号:SY(新)2003-003。肉苁蓉及淫羊藿原药材,均购自乌鲁木齐市百草堂大药房。

1.1.2 仪器设备及试验试剂 Moti K系列倒置显微镜; NikonT-SAM倒置显微镜(NT-88-V3, Japan); 手术器械(苏州六六视觉); 拣卵针(自制); 5% FBS(杭州四季青); DPBS+0.5% PVP冲胚液; Galaxy-48R CO₂培养箱(New brunswick); 微量移液器(Eppendorf); 96孔细胞培养板(greiner bio-one); 青、链霉素(华北制药股份有限公司); M₁₆培养液(Sigma); EDTA(天津福晨化学试剂厂); 牛磺酸(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 小鼠发情鉴定及合笼 购回小鼠后随机分笼饲养1周,待其适应环境后备用,参照李聚学等^[1]制定的判断标准,采用阴门直接观察法进行鉴定,将处于发情盛期的母鼠于当日下午19:00左右按1:1比例与公鼠合笼过夜,次日08:00左右检查阴道栓,见栓当日记为第0天,将见栓小鼠标记置于笼中饲养,给予人道关怀,自由采食与饮水,备用。

1.2.2 中药肉苁蓉及淫羊藿的熬制 取5g原药置于100mL烧杯中并加Milli-Q水浸没,经大火煮沸与文火维持沸腾20min后收取药汤,重复以上过程连续收取3次后定容至100mL后0.22μm滤膜过滤备用。

1.2.3 小鼠早期胚胎的获取及形态鉴定 于见栓后第0.5天将见阴道栓小鼠颈椎脱臼处死,φ=75%酒精浸泡5min,无菌打开腹腔,用手术剪和手术镊剪下输卵管迅速将其置于冲胚液中洗涤数遍,去除血渍,在倒置显微镜下用连有1mL注射器的5号针头将输卵管壶腹部明显膨大处撕破,冲出卵丘-卵母细胞团,置于添加有青链霉素的培养皿中清洗后即得到小鼠早期胚胎。

1.2.4 胚胎的培养 本试验采用96孔板微滴法(50μL/滴,10-15枚/滴)培养,收集小鼠早期胚胎,分别加入经过5%CO₂、37℃饱和湿度的CO₂培养箱平衡4h后的M₁₆+5%FBS(标记为M₁液)和M₁₆+5%FBS+EDTA+牛磺酸中(标记为M₂液)(牛磺酸添加浓度为215mmol/L即0.027g/mL; EDTA添加浓度为100mmol/L即0.037g/mL),每24h观察记录胚胎发育情况,待胚胎在M₁₆+5%FBS+EDTA+牛磺酸培养液中培育越过2细胞阻滞期后将胚胎换液转入M₁₆+5%FBS中继续培养。按10~15枚/组/滴进行分组:(1)纯培养液组:将M₁、M₂培养液分别加入96孔板内,加入早期胚胎并对比观察其在培养液中发育情况。(2)等体积浓度中药组:分别添加0.1%(V/V)浓度的肉苁蓉与淫羊藿中药至M₁

液和 M_2 液中,与不添加中药成分空白组 M_1 液、 M_2 液对照,加入早期胚胎,观察胚胎发育情况,判断2种中药成分是否对早期胚胎体外发育有效果。(3)不同浓度中药组:将早期胚胎分别放入到加有0% (空白对照)、0.15% (V/V)、0.2% (V/V) 肉苁蓉和淫羊藿的 M_1 、 M_2 两种培养液中,96孔板培养,判断不同浓度的肉苁蓉及淫羊藿对早期胚胎发育的影响。(4)不同组合浓度中药组:设定2种中药不同的组合浓度:A:0.1%肉苁蓉+0.1%淫羊藿组;B:0.15%肉苁蓉+0.1%淫羊藿组;C:0.2%肉苁蓉+0.1%淫羊藿组;D:0.1%肉苁蓉+0.15%淫羊藿组;E:0.1%肉苁蓉+0.2%淫羊藿组;空白对照组:不添加中药成分空白组 M_1 液与 M_2 液,加入早期胚胎观察发育情况。

1.3 测定指标

1.3.1 早期胚胎形态学评级及成活率测定 胚胎形态评级参照王敏康等^[2]建立的标准,显微镜下选择胞质与透明带完整,无碎片,颜色透亮的I级胚胎备用。

$$\text{成活率}(\%) = \frac{\text{培养后胚胎成活数(个)}}{\text{总卵母细胞数(个)}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.2 早期胚胎发育情况及发育率测定 胚胎发育情况按照小鼠胚胎发育图谱与标准^[2]鉴定,记录胚胎所处各个时期发育情况及数目并计算胚胎发育率。

$$\text{胚胎发育率}(\%) = \frac{\text{各发育阶段胚胎发育数(个)}}{\text{总卵母细胞数(个)}} \times 100\% \quad (2)$$

1.4 数据处理

所有数据采用 SPSS17.0 进行分析。

2 结果与分析

2.1 早期胚胎在2种培养液中的体外发育情况(存活情况及发育率)

由表1可以看出在2种不同培养液中,早期胚胎成活率均较高($P > 0.05$),由卵母细胞发育至2细胞过程中发育率无显著差异($P > 0.05$),但2组培养液桑葚胚与囊胚发育率差异极显著($P < 0.01$),表明 $M_{16} + 5\% \text{ FBS} + \text{EDTA} + \text{牛磺酸培养液}(M_2 \text{液})$ 在体外培养早期胚胎时优于 $M_{16} + 5\% \text{ FBS}$ 培养液(M_1 液),特别是在克服2细胞发育阻滞率上具有显著优势。

表1 早期胚胎在2种培养液中发育情况

Tab.1 The development of early embryo in different medium

培养液类别 Medium category	卵母细胞数/n Oocytes	成活率/% Rate of survival	2-cell 率/% Rate of 2-cell	桑葚胚率/% Rate of morula	囊胚率/% Rate of blastula
M_1	98	93(94.9%)	74(75.5%)	14(14.3%) A	4(4.1%) A
M_2	87	83(95.4%)	69(79.3%)	52(59.8%) B	14(16.1%) B

同一列数值上不同大写字母代表差异极显著($P < 0.01$)。

Value on the same column that the capital letters were different means significant difference ($P < 0.01$).

表2 中药成分对不同培养液中早期胚胎体外发育的影响

Tab.2 The effects of development of early embryo with Chinese medicine in different medium

培养液类别 Medium category	卵母细胞数/n Oocytes	成活率/% Rate of survival	2-cell 率/% Rate of 2-cell	桑葚胚率/% Rate of morula	囊胚率/% Rate of blastula
$M_1 + 0.1\% \text{ 肉苁蓉 Cistanche}$	202	183(90.6%)	144(71.3%)	84(41.6%)	47(23.3%)
$M_1 + 0.1\% \text{ 淫羊藿 Epimedium}$	143	112(78.3%) **	86(60.1%)	45(31.5%)	18(12.6%) **
$M_2 + 0.1\% \text{ 肉苁蓉 Cistanche}$	122	113(92.6%)	101(82.8%)	89(72.9%) **	73(59.8%)
$M_2 + 0.1\% \text{ 淫羊藿 Epimedium}$	107	86(80.4%) **	71(66.4%)	52(48.5%)	40(37.4%)
M_1 (空白对照)(Blank control)	78	71(91.1%)	44(56.4%)	10(12.8%) **	4(5.1%) **
M_2 (空白对照)(Blank control)	114	109(95.6%)	88(77.2%)	26(29.5%)	18(15.8%)

* 代表差异显著($P < 0.05$), ** 代表差异极显著($P < 0.01$)。

* means significant difference($P < 0.05$), ** means significant difference ($P < 0.01$).

2.2 添加2种中药成分对不同培养液中早期胚胎体外发育的影响

由表2可以看出添加中药后早期胚胎成活率较高,与不添加中药组对比无显著差异($P > 0.05$),添加0.1%肉苁蓉桑葚胚率与囊胚率均显著高于0.1%淫羊藿组,差异极显著($P < 0.01$),中药组桑葚胚率与囊胚发育率显著高于培养液空白对照组,差异极显著($P < 0.01$)。说明添加一定浓度中药成分能有效促进胚胎发育,其中以添加0.1%肉苁蓉效果为最佳。

2.3 2种中药成分不同添加浓度对鼠胚早期发育的影响

由表3可以看出添加高浓度中药后,胚胎成活率显著降低,与M₂液对比有显著差异($P < 0.05$),说明高浓度中药会对胚胎活力产生一定副作用,同时过高浓度中药可能会抑制桑葚胚与囊胚发育率,与其他组对比差异极显著($P < 0.01$)。

表3 中药成分不同添加浓度对鼠胚早期发育的影响

Tab.3 The effects of development of early embryo with different concentration of Chinese medicine

中药添加浓度/% Concentration of medicine	卵母细胞数/n Oocytes	成活率/% Rate of survival	2-cell 率/% Rate of 2-cell	桑葚胚率/% Rate of morula	囊胚率/% Rate of blastula
M ₁ (空白对照) (Blank control)	48	44(91.7%)	39(81.3%)	12(25.0%)*	4(8.3%)
M ₂ (空白对照) (Blank control)	35	35(100%)**	30(85.7%)	23(65.7%)	14(40.0%)
M ₁ +0.15% 肉苁蓉 <i>Cistanche</i>	50	38(76.0%)	30(60.0%)	14(28.0%)	6(12.0%)
M ₁ +0.15% 淫羊藿 <i>Epimedium</i>	60	42(71.3%)	40(66.7%)	24(40.3%)	9(15.0%)
M ₁ +0.2% 淫羊藿 <i>Epimedium</i>	54	38(70.4%)	29(53.7%)	11(20.4%)	0(0%)**
M ₁ +0.2% 肉苁蓉 <i>Cistanche</i>	32	22(68.8%)	16(50.0%)	7(21.8%)	0(0%)**
M ₂ +0.15% 肉苁蓉 <i>Cistanche</i>	40	35(87.5%)	30(75.0%)	12(30.0%)	7(58.3%)
M ₂ +0.15% 淫羊藿 <i>Epimedium</i>	35	20(57.1%)	14(40%)	11(31.4%)	6(17.2%)
M ₂ +0.2% 肉苁蓉 <i>Cistanche</i>	46	40(86.9%)	31(67.4%)	0(0%)**	0(0%)**
M ₂ +0.2% 淫羊藿 <i>Epimedium</i>	60	47(71.3%)	43(71.7%)	6(10.0%)*	0(0%)**

* 代表差异显著($P < 0.05$),** 代表差异极显著($P < 0.01$)。

* means significant difference($P < 0.05$), ** means significant difference ($P < 0.01$).

2.4 2种中药不同组合浓度对鼠胚早期发育的影响

由表4可以看出添加高浓度中药组合培养液使早期胚胎成活率、2细胞发育率也显著降低,与低浓

表4 2种中药不同组合浓度对鼠胚早期发育的影响

Tab.4 The effects of development of early embryo with different portfolio concentration of Chinese medicine

培养液类别 Medium category	卵母细胞数/n Oocytes	成活率/% Rate of survival	2-cell 率/% Rate of 2-cell	桑葚胚率/% Rate of morula	囊胚率/% Rate of blastula
A + M ₁	30	29(96.7%)	19(63.3%)	12(40.0%)	10(33.3%)
B + M ₁	25	13(52.0%)	10(40.0%)	10(40.0%)	4(16.0%)
C + M ₁	40	17(42.5%)*	13(32.5%)	3(7.5%)**	1(2.5%)**
D + M ₁	26	25(96.7%)	19(73.1%)	14(53.8%)*	10(38.5%)
E + M ₁	19	9(47.3%)**	4(21.1%)**	0(0%)**	0(0%)**
A + M ₂	22	20(90.9%)	17(77.3%)	15(68.3%)	13(59.1%)
B + M ₂	22	16(72.7%)	10(45.5%)	6(27.2%)	6(27.3%)
C + M ₂	20	10(50.0%)	6(30.0%)*	4(20.0%)	2(10.0%)
D + M ₂	45	33(73.3%)	28(62.2%)	20(44.4%)	20(44.4%)
E + M ₂	35	16(45.7%)*	15(42.9%)	10(28.6%)	2(5.7%)**
M ₁ (空白对照) (Blank control)	30	28(93.3%)	23(76.7%)	20(66.7%)	14(46.7%)
M ₂ (空白对照) (Blank control)	30	30(100.0%)**	28(93.3%)	25(83.3%)	22(73.3%)

* 代表差异显著($P < 0.05$),** 代表差异极显著($P < 0.01$)。

* means significant difference($P < 0.05$), ** means significant difference ($P < 0.01$).

度组合中药和空白对照组相比具有显著差异性($P < 0.05$),同时,在桑葚胚发育率及囊胚发育率上,与低浓度组合中药和空白对照组相比具有极显著差异性($P < 0.01$),同样说明高浓度中药组合培养液可能对发育率有抑制作用。

3 讨论

3.1 添加 EDTA 及牛磺酸对胚胎体外发育影响

影响胚胎体外发育的因素很多,涉及物种、血清、培养基、培养环境、生长因子等^[4-5],其中培养环境是一重要因素,哺乳动物子宫内环境与胚胎体外培养环境有很大差异,体外培养发育的胚胎在发育过程中会产生并累积一些不利于发育的毒性物质,比如自由基、NO等,这对处于体外发育环境中的胚胎具有不利影响,会降低其成活率及发育率,因此会发生发育阻滞,杨清等^[6]研究证明NO作为一种调节因子参与早期胚胎的发育,当生成过量时对胚胎有损害作用。古丽努尔^[7]报道中药成分能在一定程度上消除NO自由基,同时Ricci^[8]报道小鼠正常子宫内含有一种上皮细胞液,当在体外培养环境中添加这种子宫上皮液时能使早期胚胎越过2细胞发育阻滞。本试验发现在培养液适当添加一定浓度的EDTA与牛磺酸,希望其能替代体内环境中所需的特殊物质,在本实验中其作用也很明显,胚胎体外发育率显著高于对照组,说明EDTA与牛磺酸在一定程度上清除体外培养环境中的毒性因素,起到了替代子宫内某种特殊物质的作用。这一结果与相关报道^[9-11]一致。同时有报道表明^[12-14],EDTA和牛磺酸的添加浓度过高会造成胚胎发育率降低甚至死亡,其机理是否是过量化学物质对胚胎发育过程中相关细胞因子产生了变化影响,这将在本人后续试验中验证。

3.2 添加中药及其浓度变化对胚胎体外发育影响

在早期胚胎体外培养过程中,适当添加中药可以促使卵母细胞改善胞质成熟质量,促进胚胎的体外发育,肉苁蓉及淫羊藿做为传统壮阳补肾药^[15],具有补肾益精、促进生殖发育的功效,故本试验将2种滋阴壮阳中药加入培养液中,目的在于研究2种中药对早期胚胎体外发育的效果,结果表明中药组的胚胎发育率高于空白对照组。与之前报道显示在培养液中添加中药促进胚胎体外发育基本相符^[16]。但本试验中肉苁蓉对胚胎体外发育有极显著影响,可能是其有效成分直接或间接对胚胎发育微环境有更好的调节作用,但具体机理还需进一步研究。中药具有安全、低毒等特性,本试验发现中药添加浓度对胚胎体外发育也有较大影响,试验中发现添加合适浓度的中药能促进胚胎体外发育,可能是中药的某些有效成分同样能起到清除体外环境中毒性物质的功效,但其具体影响机理还需进一步研究。添加高浓度中药及高浓度组合中药时对胚胎发育产生副作用,故在临床医学上重要启示,注意用药量的控制来确保用药安全性,这也符合基本用药要求。同时,本实验对无菌环境要求较高,这对实验结果影响也较大。

3.3 在理论和生产中应用前景

本试验初步研究了2种滋阴壮阳类中药对早期胚胎发育的影响,在前人的研究理论上创新性研究了2种中药的全药特性,不局限于某单一有效成分上,同时对2种中药的组合特性和功能进行了研究,丰富了传统中医用药理论,同时,在生产实践应用也有较大的意义,既能提高动物胚胎的体外发育率,最终体现在获得更高的产仔率,也对2种中药能更好造福于人类具有一定价值和意义。

参考文献:

- [1]李聚学,魏雁.影响小鼠超数排卵的若干因素[J].湖北农业科学,2004(4):120-122.
- [2]王敏康,廉莉,朱子玉,等.卵母细胞、受精卵及早期胚胎质量判断方法的探讨[J].生殖医学杂志,2002(6):171-175.
- [3]孙青原.小鼠胚胎实验操作手册(第3版)[M].陈大元译.北京:化学工业出版社,2006.
- [4]Furnus C C, Dematos D G, Picco S et al. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes[J]. Anim Reprod Sci, 2008, 109(1): 88-99.
- [5]Paul, Booth J, Peter G H, et al. Amino acid depletion and appearance during porcine preimplantation embryo development in vitro[J]. Reproduction, 2005, 13(2): 655-668.
- [6]杨青,薛立群,刘斌,等.维生素E对附植前小鼠胚胎发育与一氧化氮生成的影响[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2003,29(4):288-290.
- [7]古丽努尔,木特列夫,雷丽,屠鹏飞,等.松果菊苷抗衰老作用机理研究[J].生物物理学报,2004,20(3):183-187.

(下转第1011页)

(2) 接种与管理技术要点。常规无菌操作接种。菌丝生长控制温度 28 ~ 30 °C ,空间湿度 75% 左右 黑暗环境中培养。

(3) 出菇与管理技术要点。原基分化适宜温度 18 ~ 25 °C ,子实体发育温度 20 ~ 28 °C ,需要 800 ~ 1500 lx 的较强光照 ,调控菇房内空气清新。

参考文献:

- [1] 卯晓岚. 中国经济真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 2 - 3.
- [2] 杨新美. 中国食用菌栽培学[M]. 北京: 农业出版社, 1988: 5.
- [3] 常明昌. 食用菌栽培学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 121, 124.
- [4] 杨淑云, 羿红, 谢福泉, 等. 红平菇菌丝生物学特性研究[J]. 菌物学报, 2007, 26(增刊): 81 - 85.
- [5] 池玉杰, 伊洪伟, 刘智会. 红平菇菌株 H₁ 的培养特性与营养成分分析[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(1): 53 - 57.
- [6] 竹文坤, 贺新生. 红平菇化学诱变育种研究[J]. 食用菌, 2008(4): 17 - 19.

(上接第 959 页)

- [8] Ricci E L, Telloli C S, Dalmolin D P, et al. Developmental toxicology of monocrotaline physical and neurobehavioral evaluation rat offspring[J]. Toxicol Lett, 2010(96): 181-183.
- [9] Hoa N, Myers M P, Douglas T G, et al. Molecular mechanisms of paraptosis induction implications for a non - genetically modified tumor vaccine[J]. PlosOne, 2009, 4(2): 4631-4635.
- [10] Shi J, Xue S J, Shi, et al. Isolation and characterization of leptin from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) [J]. Process Biochem, 2007, 42(10): 1436-1438.
- [11] Barreto R A, Sousa C S, Silva V D A, et al. Monocrotaline pyrrolizidine is cytotoxic and alters the patterns of GFAP expression on astrocyte primary cultures[J]. Toxic in Vitro, 2008(22): 1191-1194.
- [12] Erksuz Y, Ceribasi A O, Cevik A, et al. Toxicity of heliotropium dolosum, heliotropium circinatum and senecio vernalis in parental quail and their progeny, with residue evaluation of eggs[J]. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 2008, 32(6): 475-482.
- [13] Song L L, Ge L, Peter P F, et al. Identification of five hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in a commonly used traditional Chinese medicinal herb, Herba senecionis scandentis[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008, 22(4): 591-602.
- [14] Ohtkae K, Shinada N, Uchida H. Efficient production of omega - 3 fatty acid denatures (sFat - 1) - transgenic pigs by somatic cell nuclear transfer[J]. Science China(Life Sciences), 2010(4): 457-460.
- [15] 李玉芳, 徐芹伟, 张丽, 等. 中草药肉苁蓉及黄芪对猪早期胚胎体外发育的影响[J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(5): 805-808.
- [16] 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(24): 146-150.