

输卵管上皮细胞共培养促进小鼠早期胚胎发育机理的探索

庄利利 胡德宝 蔡丽娟 张也 李钟淑 方南洙*

(延边大学 农学院,吉林 延吉 133002)

摘要 为研究输卵管上皮细胞对小鼠早期胚胎发育质量及胚胎对共培养细胞活力和基因转录量的影响,探索输卵管上皮细胞共培养促进小鼠早期胚胎发育的机理,建立纯化的小鼠输卵管上皮细胞系并对合子进行共培养,用DCHFDA测定胚胎内部的 H_2O_2 含量,以MTT法测定输卵管上皮细胞活力,用RT-PCR检测CAT及GPX的转录状况。结果表明:1)共培养能够提高2-细胞早期、4-细胞期胚胎发育率(0.951 3% VS 0.903 3%,0.857 6% VS 0.700 5%, $P<0.05$)和囊胚发育率(0.537 9% VS 0.573 3%, $P>0.05$);2)2-细胞早期胚胎内部的 H_2O_2 含量显著降低(0.047 9 VS 0.068 2, $P<0.05$);3)I和II型阻滞胚胎的比例降低(0.158 3% VS 0.192 6%,0.213 3% VS 0.433 9%, $P>0.05$),III型阻滞胚胎的比例提高(0.621 6% VS 0.373 3%, $P<0.05$);4)共培养细胞活性上升(0.216 7 VS 0.195 7, $P>0.05$);5)CAT及GPX的转录量增加(1.202 0 VS 0.984 9,1.310 1 VS 0.998 3, $P>0.05$)。结果显示输卵管上皮细胞共培养通过增强自身的抗氧化能力,利用细胞-细胞间的相互作用降低胚胎细胞内部的活性氧,提高胚胎质量,促进胚胎发育。

关键词 输卵管上皮细胞; 共培养; 早期胚胎; 阻滞; 活性氧; 小鼠

中图分类号 S 814.8

文章编号 1007-4333(2013)04-0155-07

文献标志码 A

To explore the development promoting mechanism of oviduct epithelial cells co-culture on the early embryos in mouse

ZHUANG Li-li, HU De-bao, CAI Li-juan, ZHANG Ye, LI Zhong-shu, FANG Nan-zhu*

(Agricultural College of Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract The objective of this study was to investigate the effect of oviduct epithelial cells on the development and quality of early embryos, as well as to study the impact of embryos on the activity and gene transcriptions of co-cultured oviduct epithelial cells, and explore the mechanisms on how oviduct epithelial cells improving the development of early embryo in mouse. Mouse oviduct epithelial cell lines were purified and used to co-culture with zygotes. H_2O_2 content in embryos was measured by DCHFDA, epithelial cell activity was measured by MTT, RT-PCR was applied to test the transcription of CAT and GPX gene. Results are as follows: 1) co-culture can significantly improve the early 2-cell and 4-cell rates (0.951 3% VS 0.903 3%, 0.857 6% VS 0.700 5%, $P<0.05$) as well as blastocyst rate (0.537 9% VS 0.573 3%, $P>0.05$); 2) it can decrease the H_2O_2 content in early 2-cell embryos (0.047 9 VS 0.068 2, $P<0.05$); 3) rates of type I and II arrested embryos tend to decrease (0.158 3% VS 0.192 6%, 0.213 3% VS 0.433 9%, $P>0.05$), rate of type III arrested embryos was increased (0.621 6% VS 0.373 3%, $P<0.05$); 4) cellular activity had improving trend when embryos developed to early 2-cell phase (0.216 7 VS 0.195 7, $P>0.05$); 5) the transcription of CAT and GPX were slightly increased (1.202 0 VS 0.984 9, 1.310 1 VS 0.998 3, $P>0.05$) though not significant. Those results indicated that oviduct epithelial cell co-culture can improve the development of embryos by increasing anti-oxidative ability of themselves, then decreasing ROS content in embryos by cell-cell contact, therefore it can improve embryo quality and promote embryo development.

Key words oviduct epithelial cells; co-culture; early embryos; arrest; ROS; mouse

收稿日期: 2013-01-11

基金项目: 延边大学 211 工程第三期重点学科建设项目(2009-002); 动物高效快繁及胚胎工程高新技术研究

第一作者: 庄利利, 硕士研究生, E-mail: zhuang_lili2006@126.com

通讯作者: 方南洙, 教授, 博士后, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: nzfang@ybu.edu.cn

在胚胎体外培养时必须控制氧化应激以生产出更高质量的体外胚胎,为生物研究提供优质的早期胚胎。输卵管上皮细胞共培养能够提高囊胚生产率,在一定程度上保护胚胎免受氧化应激。

ROS 和抗氧化酶系统是哺乳动物繁殖功能的重要影响因子,它们涉及到卵泡发生、排卵、受精、黄体发生、胚胎发育、附植及早期孕体的生长发育^[1]。

哺乳动物的早期胚胎在体外发育过程中,无论其自身还是生长环境都有可能产生活性氧(Reactive oxygen species, ROS)。ROS 是胚胎代谢的副产物,主要包括超氧阴离子、过氧化氢、羟自由基、一氧化氮^[2]等。卵母细胞以及早期胚胎的酶类抗氧化剂主要包括 SOD、GPX 和 CAT^[3]。SOD 在细胞的线粒体(Mn-SOD)和细胞质(Cu、Zn-SOD)中存在,将超氧阴离子转换成 H₂O₂,然后由过氧化物酶体中的 CAT 或细胞质和线粒体中的 GPX 清除^[4]。

在卵母细胞发生过程中,母源性的 mRNA 和蛋白质将会储存在卵母细胞中^[5],卵母细胞受精后,这些储存在卵母细胞中的母源基因组控制早期胚胎的发育,随着胚胎发育的进行,母源分子消耗待尽,胚胎发生开始依靠胚胎基因组中的遗传信息^[6],即发生母型合子型转换(Maternal-to-zygotic transition, MZT)来调控胚胎的后期发育,小鼠胚胎的 MZT 时期为 2-细胞早期^[7]。在体外培养过程中,ROS 能够引起细胞脂质、蛋白质、核 DNA^[8]及线粒体 DNA^[9]的损伤,影响母体到合子遗传调控的转换,将胚胎发育阻断于 MZT 阶段^[10],引起体外发育阻滞,严重者将会产生细胞碎片^[11]。

在体内,哺乳动物的卵母细胞和早期胚胎处于一种动态的环境之中,首先,卵母细胞在卵泡中生长和成熟,随后在输卵管中受精,早期胚胎在输卵管中发育,最后在子宫中发育成囊胚、变长并逐渐附植到子宫壁上^[12]。在这一整个生理过程中,卵泡、输卵管、子宫及胎盘形成了在胚胎发育中抵抗 ROS 的外在保护^[13]。

输卵管的功能包括雌雄性配子的成熟和运输、受精、早期胚胎的发育和运输^[14-16]。输卵管作为雌性生殖系统的微环境之一,是动物繁殖领域中一个热点研究对象,是生物技术研究中的常用模型^[17]。Gardiner 等^[18]报道,输卵管液中的非酶抗氧化剂能

防止 ROS 对哺乳动物早期胚胎的危害作用。同时小鼠的输卵管能编码 GPX 和 CAT 的转录物^[19],输卵管上皮细胞促进胚胎发育、克服发育阻滞的作用可能与 ROS 的清除有关。

输卵管上皮细胞最普遍的应用就是作为胚胎体外发育的饲养层细胞^[20],有试验用小鼠输卵管上皮细胞对小鼠^[21]和牛^[22]体内原核胚共培养发现,尽管牛和小鼠胚胎在发育时程中存在很大的差异,但是小鼠输卵管上皮细胞仍能支持牛的合子发育到囊胚。

输卵管上皮细胞共培养促进早期胚胎发育的相关研究较为广泛,例如,其可以分泌促进胚胎发育的因子,清除 ROS 等对细胞有害的分子^[23]。但是以上研究大多局限于共培养体系中培养液内物质的变化,而对 MET 时期共培养胚胎内源分子变化的直接研究较少。另外,在体内的胚胎发育过程中,生殖道中的母体环境会主动地发生调整以迎合胚胎发育的需要^[24]。关于胚胎对共培养的输卵管上皮细胞影响^[25]及关于发育的胚胎引起共培养上皮细胞基因表达变化方面的研究甚少^[24]。

本试验研究输卵管上皮细胞共培养对小鼠胚胎 MET 时期内源性 ROS 含量和胚胎质量的影响,同时研究胚胎对共培养细胞的影响,旨在探索输卵管上皮细胞共培养克服胚胎发育阻滞的机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料及试剂

本试验用昆明白系小鼠,购自延边大学实验动物中心,孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)购自宁波市激素制品有限公司,其他所用试剂均购自 SIGMA 公司(美国)。

1.2 试验方法

1.2.1 胚胎的收集

挑选健康的雌性小鼠,每只供试小鼠于第 1 天的 18:00 腹腔注射 5 IU 的 PMSG,48 h 后腹腔注射 5 IU 的 hCG,注射 hCG 后立即与公鼠合笼,公母比例为 1:1,在合笼的第 2 天 6:00 检查阴道栓。于注射 hCG 后(post hCG, phCG)的 21 h 后用颈脱臼法处死见栓雌鼠,剪下输卵管置于 M2 培养液中,挑

破输卵管壶腹部,用含 300 mg/L 透明质酸酶的 M2 脱去合子周围的卵丘细胞,采集体内的 2-细胞早期胚胎。

1.2.2 小鼠输卵管上皮细胞系的建立及纯化

收集胚胎后的输卵管在 PBS 中充分漂洗去除红细胞,置于实体显微镜下剔除脂肪组织及管腔中的物质,剪碎,加入 0.5% 胰蛋白酶消化液,在饱和湿度、5% CO₂ 和 95% 空气的气相条件,37 °C 下消化 4 h,用 10% FBS+DMEM 终止消化,接种于 24 孔培养皿。采用差速贴壁法进行纯化,2 h 后将孔中的液体转移至另一孔中。待细胞长到 80% 后用 0.5% 胰蛋白酶消化液消化 2 min 后吸去消化液,再加消化液消化 3 min,进行传代。传代后的细胞 2 h 后再转移至另一孔中。

1.2.3 输卵管上皮细胞共培养

细胞长到 80% 汇合后以 10⁵ 的密度接种于 96 孔板,每孔 200 μL。在胚胎培养前的 24 h 换 10% FBS+M16 的胚胎培养液培养,培养液上层覆盖 100 μL 的矿物油,每孔 20 枚胚胎,本试验中用 M16 为胚胎的基础培养液,可降低其他抗氧化剂的影响,尽量控制成单因素。

1.2.4 胚胎内部 ROS 含量检测

将 10 枚胚胎置于 10 μmol/L DCHFDA 染色液微滴中,放入培养箱中孵育 15 min。将孵育后的胚胎冲洗干净,放在荧光显微镜下照相。荧光图片使用 Image-ProPlus 6.0 软件进行量化,结果用荧光平均相对荧光强度(相对值)表示。

1.2.5 阻滞胚胎分类

将阻滞胚胎根据细胞碎片情况分为以下 3 类: I 型为完全裂解,死亡和/或破碎的胚胎; II 型为有部分裂解或破碎卵裂球的胚胎; III 型为有完整的卵裂球和/或细胞质的胚胎。

1.2.6 细胞活性检测

不同处理的输卵管上皮细胞培养到相应时间后,在避光的情况下,每孔加入 10 μL 的 5 mg/mL MTT,继续培养 4 h,吸去孔中的液体,每孔加入 150 μL DMSO,震荡 10 min,用酶联免疫检测仪测定波长 492 nm 处的 OD 值(相对值)。

1.2.7 抗氧化基因转录量变化检测

用 Total RNA purification kit 提取不同处理输卵管上皮细胞的总 RNA,然后用 PrimScript RT-PCR kit 对 CAT、GPX 和 GAPDH 基因进行反转录,扩增出的片段用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,亮度用 Gel-pro application 软件进行量化,用所得的 CAT 和 GPX 的亮度分析值与 GAPDH 的亮度分析值作比,检测 CAT 和 GPX 的转录量变化,相对值,无单位。逆转录的反应条件为 65 °C 5 min 4 °C 变性退火,30 °C 10 min,42 °C 20 min,95 °C 5 min,4 °C 逆转录,CAT 的扩增条件为 93 °C 40 s,54 °C 40 s,72 °C 2.5 min,33 个循环,GPX 的扩增条件为 94 °C 45 s,56 °C 30 s,72 °C 1 min,35 个循环,GAPDH 的扩增条件为 94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 2.5 min,30 个循环,每个基因重复 4 次,所用引物见表 1。

表 1 扩增基因所用引物
Table 1 Sequence of primers

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	引物大小/bp Product size
GAPDH	5'-ATTCAACGAGTCAAGG-3'	473
	5'-CACCAGTGGATGCAAT-3'	
CAT	5'-GGATACTTTGATCAACGAT-3'	894
	5'-GTAGACAGTTCACAGGTAT-3'	
GPX	5'-CACTACACAGATGAACGA-3'	487
	5'-AAGTAATCACCAAGCAATGC-3'	

1.2.8 试验设计

胚胎处理方法为:A1 组,对收集的合子用 10%

FBS+M16 的胚胎培养液培养进行培养;B1 组,对收集的合子用输卵管上皮细胞进行共培养。

输卵管上皮细胞处理方法为:A2组,铺板后只用10% FBS+DMEM体外培养;B2组,用铺板的细胞进行共培养。

1.2.9 数据统计

数据应用 spss17.0 进行 t 检验, P<0.05 有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 输卵管上皮细胞共培养体系的建立

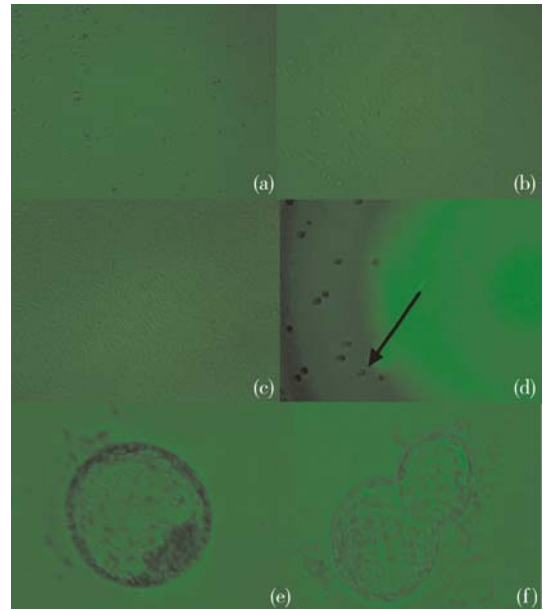
如图1所示原代的输卵管上皮细胞中混有大量的杂细胞和组织(a),在纯化过程中(b),上皮细胞中主要混有成纤维细胞,经三代后得到纯化的上皮细胞系(c),成铺路石状集落,将收集的合子用纯化的输卵管上皮细胞共培养(d)。

2.2 共培养对合子发育的作用

由表2可知,与正常体外培养相比(A1组),共培养(B1组)能够显著的提高合子发育到2-细胞早期、4-细胞期胚胎的比例(P<0.05),同时囊胚率也有所提高(P>0.05),说明共培养能够促进早期胚胎体外发育。

2.3 胚胎内部 ROS 含量检测

由表3和图2可见,2-细胞早期时,体外发育胚胎(B1、B2)的内源性 H₂O₂ 含量显著高于体内发育胚胎(A1、A2)(P<0.05),而共培养胚胎(C1、C2)内部的 H₂O₂ 显著地低于体外发育胚胎(B1、B2)(P<0.05)。



(a)原代输卵管上皮细胞;(b)纯化过程中的输卵管上皮细胞;(c)纯化后的输卵管上皮细胞;(d)用纯化的输卵管上皮细胞与合子共培养;箭头所指为合子;(e)、(f)共培养后发育出的囊胚与孵化囊胚。

(a) Primary oviduct epithelial cell; (b) Oviduct epithelial cells during purification; (c) Oviduct epithelial cell colony; (d) Zygotes are co-cultured with purified oviduct epithelial cells, arrow shows zygotes; (e), (f) Blastocyst and hatching blastocyst after co-culture.

图1 输卵管上皮细胞共培养体系的建立(10×10, 25)

Fig. 1 Establishment of oviduct epithelial cell co-culturing system(10×10, 25)

表2 共培养对合子体外发育的影响(x̄±s, n=4)

Table 2 Effect of co-culture on the development of zygotes

处理 Treatments	合子数 Zygote number	各细胞期所占比例/% Cell phase		
		2-细胞早期 Early 2-cell	4-细胞期 4-cell	囊胚 Blastocyst
A1	229	0.903 3±0.011 3 a	0.700 5±0.035 4 a	0.537 9±0.027 8 a
B1	224	0.951 3±0.009 4 b	0.857 6±0.013 4 b	0.573 3±0.105 4 a

注:同列数据后所标字母相异表示差异显著(P<0.05),所标字母相同表示差异不显著(P>0.05)。下表同。
Note: Different letters in the same line means significant difference between the treatments(P<0.05), same letter in the same line means not significant difference between treatments(P>0.05). The same as below.

表3 胚胎内部 H₂O₂ 含量(x̄±s, n= 4)

Table 3 Embryonic H₂O₂ content

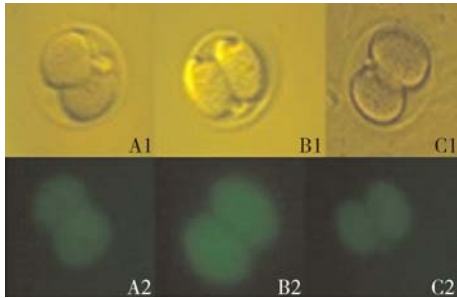
胚胎类型 Type	胚胎数 Embryo number	2-细胞早期 Early 2-cell
体内 In vivo	57	0.035 2±0.010 6 a
体外 In vitro	73	0.068 2±0.015 5 b
共培养 Co-cultured	65	0.047 9±0.014 0 a

2.4 共培养对阻滞胚胎类型的影响

如图3所示,分别为I、II和III型阻滞胚胎, I型为完全裂解,死亡和/或破碎的胚胎; II型为有部分裂解或破碎卵裂球的胚胎; III型为有完整的卵裂球和/或细胞质的胚胎。

统计3种类型的阻滞胚胎占总阻滞胚胎的结果见表4,与正常体外培养(A1组)相比,共培养(B1

组)能够降低 I 和 II 型阻滞胚胎所占的比例 ($P > 0.05$),显著地提高 III 型胚胎所占的比例 ($P < 0.05$)。



A1~C1 为可见光下的体内、体外及共培养的 2-细胞早期胚胎。A2~C2 为体内、体外及共培养 2-细胞早期胚胎 H_2O_2 荧光染色。A1-C1: *In vivo*, *in vivo* and co-cultured early 2-cell embryos under visible light. A2-C2: *In vivo*, *in vivo* and co-cultured early 2-cell embryonic H_2O_2 fluorescence staining.

图 2 胚胎 H_2O_2 含量染色图 ($10 \times 10, 25$)

Fig. 2 Embryonic H_2O_2 content staining ($10 \times 10, 25$)

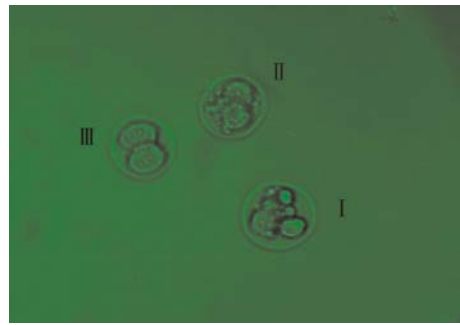


图 3 阻滞胚胎类型 ($10 \times 10, 25$)

Fig. 3 Arrested embryo types ($10 \times 10, 25$)

2.5 共培养细胞活性变化

由表 5 可知,当培养到 2-细胞早期(36 h phCG)时,共培养细胞(B2 组)的活性高于只进行体外培养(A2 组)的细胞 ($P > 0.05$)。

表 4 共培养对阻滞胚胎类型分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of co-culture on the distribution of arrested embryos

处理 Treatments	胚胎数 Embryo number	阻滞胚胎类型所占比例/% Arrested embryo type		
		I 型 Type I	II 型 Type II	III 型 Type III
A1	92	0.192 6 \pm 0.097 9 a	0.433 9 \pm 0.128 7 a	0.373 3 \pm 0.123 3 a
B1	66	0.158 3 \pm 0.030 1 a	0.213 3 \pm 0.150 7 a	0.621 6 \pm 0.082 9 b

表 5 共培养细胞活性变化 ($D(\lambda)_{492nm}, \bar{x} \pm s, n=4$)

Table 5 Effect of co-culture on the activity of oviduct epithelial cells

时间/h(phCG)	处理 Treatments	
Time	A2	B2
36	0.195 7 \pm 0.028 6 a	0.216 7 \pm 0.038 0 a

2.6 共培养细胞内部抗氧化相关基因转录量的变化

如图 4 所示,共培养的输卵管上皮细胞中抗氧化基因 CAT 和 GPX 的转录量高于只进行体外培养的细胞 ($P > 0.05$)。

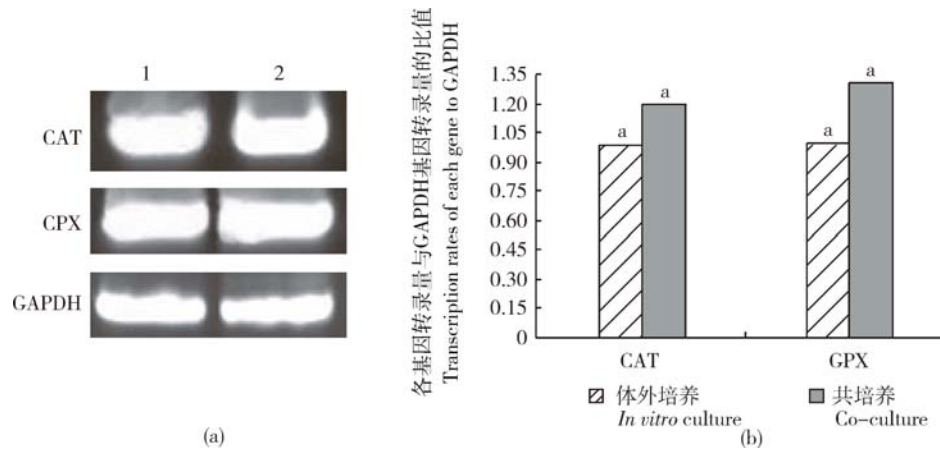
3 讨论

研究表明,现已成功地建立起小鼠、兔、牛和人的输卵管上皮细胞共培养体系,并均能提高胚胎体外发育能力及质量^[20],在本试验中,经过三代的差速贴壁之后形成较为纯化的输卵管上皮细胞系用于共培养,与体外培养相比,输卵管上皮细胞共培养的

胚胎 2-细胞早期、4-细胞期胚胎发育率显著升高 (0.951 3% VS 0.903 3%, 0.857 6% VS 0.700 5%, $P < 0.05$),同时囊胚发育率也升高 (0.537 9% VS 0.573 3%, $P > 0.05$)。在阻滞胚胎中,共培养能够降低 I 和 II 型阻滞胚胎的比例 (0.158 3% VS 0.192 6%, 0.213 3% VS 0.433 9%, $P > 0.05$),提高 III 型阻滞胚胎的比例 (0.621 6% VS 0.373 3%, $P < 0.05$)。

共培养促进胚胎发育作用机制可能为:第一,共培养细胞可分泌一些对早期胚胎发育有利的物质;第二,去除培养环境中对早期胚胎发育不利的物质;第三,共培养细胞可稳定或改变某些物理化学条件^[26-28]。

在本试验中,经共培养的胚胎在 2-细胞早期内部的 H_2O_2 含量虽然高于体内胚胎 (0.035 2 VS 0.068 2, $P > 0.05$),但是与体外胚胎相比已经显著地降低 (0.047 9 VS 0.068 2, $P < 0.05$),说明输卵管上皮细胞共培养对胚胎内源性 ROS 有直接的影响。



M为DL 2000 DNA Marker;1为体外培养的输卵管上皮细胞;2为共培养的输卵管上皮细胞。(a)分别为CAT,GPX和GAPDH的扩增产物;(b)为对CAT,GPX电泳条带亮度与GAPDH进行亮度对比的统计分析结果。不同处理间相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)。

M. DL 2000 DNA marker;1. *In vitro* cultured oviduct epithelial cells;2. Co-cultured oviduct epithelial cells;From (a) Are CAT,GPX and GAPDH gene amplified produces ;(b) The brightness of CAT and GPX are compared with GAPDH gene. The same letters mean that there is no significant difference between treatments($P > 0.05$).

图4 输卵管细胞抗氧化基因转录图

Fig. 4 Transcription of anti-oxidative genes in oviduct epithelial cells co-culturing system

输卵管上皮细胞共培养体系是一种比较理想的共培养体系^[29-30],胚胎和输卵管细胞之间的相互作用对输卵管上皮和胚胎均能产生特定的生理反应^[31-34],但是胚胎对共培养的输卵管上皮细胞影响的研究却很少。在本试验中,共培养的胚胎能够提高细胞活力(0.216 7 VS 0.195 7, $P > 0.05$),提高抗氧化相关基因-CAT和GPX的转录量(1.202 0 VS 0.984 9, 1.310 1 VS 0.998 3, $P > 0.05$)。

4 结论

以上结果表明,输卵管上皮细胞共培养能够降低MZT时期小鼠胚胎的内源性ROS,促进母型向合子型的过渡,克服胚胎体外发育阻滞;同时输卵管上皮细胞共培养能够减少细胞碎片,降低体外培养对细胞的损伤作用,提高胚胎质量。输卵管上皮细胞共培养体系存在着细胞-细胞间的相互作用,共培养的胚胎能够使细胞加强自身的抗氧化能力及细胞活力进而促进胚胎发育。

参 考 文 献

- [1] Garrel C, Fowler P A, Al-Gubory K H. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes[J]. *J Endocrinol*, 2010, 205: 107-116
- [2] Al-Gubory K H, Fowler P A, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes[J]. *Int J Biochem Cell B*, 2010, 42: 1634-1650
- [3] Guerin P, Mouatassim S E, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings[J]. *Hum Reprod*, 2001, 7(2): 175-189
- [4] Goto K, Noda Y, Mori T, et al. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*[J]. *Free Radical Bio Med*, 1993, 15(1): 69-75
- [5] Wael Tadros, Howard D Lipshitz. The maternal-to-zygotic transition: A play in two acts[J]. *Development*, 2009, 136: 3033-3042
- [6] Lequarre A S, Marchandise J, Moreau B, et al. Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for *in vitro* produced bovine embryos[J]. *Biol Reprod*, 2003, 69: 1707-1713
- [7] Goto K, Noda Y, Mori T, et al. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*[J]. *Free Radical Bio Med*, 1993, 15: 69-75
- [8] Lopes S, Jurisicova A, Sun J G, et al. Reactive oxygen species: Potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa [J]. *Hum Reprod*, 1998, 13: 896-900
- [9] Wenya Zhang, Yingxia Liu, Zhen An. Mediating effect of ROS on mtDNA damage and low ATP content induced by arsenic trioxide in mouse oocytes[J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25: 979-984
- [10] 李福祥, 惠宏襄. 氧自由基对基因表达的调节机理[J]. *生命科学*, 1999(S1): 28-31

- [11] Yang H W, Hwang K J, Kwon H C, et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos[J]. Hum Reprod, 1998, 13: 998-1002
- [12] Leese H J, Hugentobler S A, Gray S M, et al. Female reproductive tract fluids; Composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease[J]. Reprod Fert Develop 2008, 20: 1-8
- [13] Hugentobler S A, Diskin M G, Leese H J, et al. Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine[J]. Mol Reprod Dev, 2007, 74: 445-454
- [14] Schoen J, Bondzio A, Topp K, et al. Establishment and characterization of an adherent pure epithelial cell line derived from the bovine oviduct[J]. Theriogenology, 2008, 69: 536-545
- [15] Sun Yongfeng, Zhang Jing, Li Chunjin, et al. Interaction between neurotrophin 4 and gonadotrophin in bovine oviducts [J]. Theriogenology, 2012, 78: 39-48
- [16] Kolle S, Reese S, Kummer W. New aspects of gamete transport, fertilization, and embryonic development in the oviduct gained by means of live cell imaging [J]. Theriogenology, 2010, 73: 786-795
- [17] Gardiner C S, Salmen J J, Brandt C J, et al. Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically-induced glutathione depletion [J]. Biol Reprod, 1998, 59: 431-436
- [18] Gardiner C S, Salmen J J, Brandt C J, et al. Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically-induced glutathione depletion [J]. Biol Reprod, 1998, 59: 431-436
- [19] Rizos D, Ramirez M A, Pintado B, et al. Culture of bovine embryos in intermediate host oviducts with emphasis on the isolated mouse oviduct[J]. Theriogenology, 2010, 73: 777-785
- [20] Ulbrich S E, Zitta K S. Hiendleder *in vitro* systems for intercepting early embryo-maternal cross-talk in the bovine oviduct[J]. Theriogenology, 2010, 73: 802-816
- [21] Miessen K, Sharbati S, Einspanier R, et al. Modelling the porcine oviduct epithelium; A polarized *in vitro* system suitable for long-term cultivation [J]. Theriogenology, 2011, 76: 900-910
- [22] 谭秀文, 马所峰, 刘新勇. 不同物种输卵管上皮细胞培养、纯度检测及支持小鼠胚胎发育的能力[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(9): 878-882
- [23] Guerin P, Mouatassim S E I, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings [J]. Human Reproduction Update, 2001, 7: 175-189
- [24] Ana W, Cheong Y, Yin-Lau Lee, et al. Oviductal microsomal epoxide hydrolase (EPHX1) reduces reactive oxygen species (ROS) level and enhances preimplantation mouse embryo development[J]. Biol Reprod, 2009, 81: 126-132
- [25] Lee Kai-fai, Yao Yuan-qing, Kwok Ka-leung. Early developing embryos affect the gene expression patterns in the mouse oviduct[J]. Biochem Biophys Res Co, 2002, 292: 564-570
- [26] Desai N, Goldfarb J. Co-culture human embryos maybe subjected to widely different microenvironments; Pattern of growth factor/cytokine release by Vero cells using the co-culture interval[J]. Hum Reprod, 1998, 13: 1600-1605
- [27] Watson A J, Westhusin M E, Winger Q A. IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct [J]. Reprod Fertil, 1999, 54: 303-315
- [28] Joo B S, Kim M K, Na Y J, et al. The mechanism of action of co-culture on embryo development in the mouse model; Direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components[J]. Fertil Steril, 2001, 75: 193-199
- [29] Wegner C C, Carson D D. Mouse uterine stromal cells secrete a 30-kilodalton protein in response to co-culture with uterine epithelial cells[J]. Endocrinology, 1992, 131(6): 2565-2572
- [30] 于建宁, 邹晓庭, 刘进国. 山羊卵泡颗粒细胞和输卵管上皮细胞共培养对山羊外受精胚胎发育的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2004(2): 25-27
- [31] Reischl J, Prella K, Schol H, et al. Factors affecting proliferation and dedifferentiation of primary bovine oviduct epithelia cells *in vitro*[J]. Cell Tissue Res, 1999, 296(2): 371-383
- [32] Lee K F, Yao Y Q, Kwok K L, et al. Early developing embryos affect the gene expression patterns in the mouse oviduct[J]. Biochem Biophys Res Co, 2002, 292(2): 564-570
- [33] Fazeli A, Affara N A, Hubank M, et al. Sperm-induced modification of the oviductal gene expression profile after natural insemination in mice[J]. Biol Reprod, 2004, 71: 60-65
- [34] Georgiou A S, Sostaric E, Wong C H, et al. Gametes alter the oviductal secretory proteome[J]. Mol Cell Proteomics, 2005(4): 1785-1796

责任编辑: 苏燕