

程序化冷冻前后小鼠孵化囊胚和休眠胚胎的 *Hba-α* 蛋白分布和差异表达

刘迪,倪和民,顾美超,李征,王力红,盛熙晖,齐晓龙,王相国,郭勇*

(北京农学院动物科学技术学院/兽医学(中医药)北京市重点实验室,北京 102206)

【摘要】 目的 利用程序化冷冻的方法,探究冷冻前、后小鼠孵化囊胚和休眠胚胎中 *Hba-α* 蛋白的分布和差异表达的变化,为今后开发和利用新型哺乳动物源抗冻蛋白提供理论依据。**方法** 从妊娠 d5 小鼠体内获取孵化囊胚;从小鼠延迟着床模型获取休眠胚胎,利用 Confocal 显微镜和 Western Blot 技术对程序化冷冻前、后的各组胚胎进行 *Hba-α* 蛋白的分布和表达检测。**结果** 孵化囊胚和休眠胚胎在程序化冷冻前、后均有 *Hba-α* 蛋白的表达;孵化囊胚经程序化冷冻后 *Hba-α* 蛋白的表达与冷冻前相比差异无显著性 ($P > 0.05$);冷冻前休眠胚胎与程序化冷冻前后的孵化囊胚相比,*Hba-α* 蛋白的表达量显著下调 ($P < 0.05$);冷冻后休眠胚胎 *Hba-α* 蛋白的表达量显著低于其他各组 ($P < 0.05$)。**结论** 程序化冷冻处理对小鼠休眠胚胎 *Hba-α* 蛋白的表达影响明显大于孵化囊胚;*Hba-α* 基因具有作为新型哺乳动物源抗冻蛋白的潜力。

【关键词】 小鼠;孵化囊胚;休眠胚胎;程序化冷冻;*Hba-α* 蛋白

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0579-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.005

Distribution and differential expression of *Hba-α* in mouse normal hatched blastocysts and dormant embryos before and after cryopreservation

LIU Di, NI He-min, GU Mei-chao, LI Zheng, WANG Li-hong, SHENG Xi-hui,
QI Xiao-long, WANG Xiang-guo, GUO Yong*

(1. College of Animal Science and Technology; 2. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

【Abstract】 Objective This study is aimed to investigate the distribution and differential expression of *Hba-α* protein in mouse normal hatched blastocysts and dormant embryos before and after cryopreservation, and to provide theoretical basis of the development and use of new mammalian antifreeze proteins. **Methods** Normal hatched blastocysts were obtained from d5 pregnant mice while dormant embryos were collected from mouse delayed implantation models. Confocal microscopy and western blot were used to detect the differential expression of *Hba-α* protein among those groups. **Results** *Hba-α* protein expressed in mouse normal hatched blastocysts and dormant embryos before and after cryopreservation. There were no significant differences of expression of *Hba-α* protein between normal hatched blastocysts before and after cryopreservation ($P > 0.05$). Compared with the normal hatched blastocysts before and after cryopreservation, the expression of *Hba-α* protein in dormant embryos was significantly lower ($P < 0.05$). The expression of *Hba-α* protein in dormant embryos after cryopreservation was significantly lower than the other groups ($P < 0.05$). **Conclusions** The effect of cryopreservation on the expression of *Hba-α* protein in mouse dormant embryos is significantly higher than normal hatched blastocysts.

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目 (No. 31272526);2013 年度北京市教委北京市属高等学校创新团队建设与教师职业发展规划项目 (No. PXM2013_014207_000067)。

【作者简介】 刘迪 (1991-),女,硕士生,研究方向:动物产科及胚胎工程。E-mail: ardieliu@163.com

【通讯作者】 郭勇,男,教授,研究方向:动物生殖生理与生物技术。E-mail: y63guo@126.com

Hba- α protein has a potential to be used as a novel mammalian-derived antifreeze protein.

【Key words】 Mouse; Blastocysts; Dormant embryo; cryopreservation; *Hba- α* protein

Corresponding author: GUO Yong. E-mail: y63guo@126.com

随着低温冷冻保存技术研究的不断深入,哺乳动物胚胎冷冻技术也在逐步优化和革新^[1-3]。为使胚胎的冷冻保存技术更加稳定高效,学者们在努力改进冷冻方法和程序的同时,也在不断发掘更好的抗冻保护剂,其中包括抗冻蛋白。抗冻蛋白(AFP)最早是在昆虫当中发现,1964 年 Ramsay 在黄粉甲幼虫中发现一种冰点低于熔点的物质,1968 年 Grimstone 通过实验证明这种物质是蛋白质。鱼类抗冻蛋白是 1969 年 Devries 在南极 Mcmurdo 海峡一种叫做 *Notothernioid* 的极地鱼体内发现的^[4],这类抗冻蛋白也成为迄今为止研究最广泛的一类抗冻蛋白^[5]。应用鱼类抗冻蛋白已成功实现牛、羊胚胎及猪卵母细胞的玻璃化冷冻。有报道表明,在常规冷冻方法中使用鱼类抗冻蛋白对小鼠囊胚没有影响,且在牛囊胚的玻璃化冷冻中使用植物抗冻蛋白,并没有提高解冻后的胚胎成活率^[6-9]。费云标等^[10]给猪的扩张、孵化囊胚添加植物抗冻蛋白,可提高其冷冻-解冻后胚胎的体外存活率。但是,迄今为止,尚未发现有关哺乳动物源抗冻蛋白的报道。

一直以来,哺乳动物胚胎延迟植入的机理都是生殖生物学领域的研究热点,胚胎的植入与其后续正常的生长发育息息相关。然而,虽然动物胚胎冷冻保存技术有了日新月异的发展,但是,针对哺乳动物休眠胚胎低温保存的研究却鲜有报道。本实验室早期研究发现:经程序化冷冻处理的小鼠休眠胚胎存活率显著高于孵化囊胚,说明休眠胚胎具有更好的抗冻性,且在后续基因芯片扫描结果中进一步发现:*Hba- α* (血红蛋白 α 链)基因在休眠胚胎冷冻前后表达具有明显差异^[11],且两者在亚细胞结构上也存在一定差异^[12]。血红蛋白由 4 条肽链构成, α 和 β 链各 2 条,小鼠的血红蛋白 α 亚基含 142 个氨基酸。有研究证实,加入 Hb 的培养基可促进小鼠着床前各阶段胚胎的发育^[13-14],即在第 2 次卵裂前的自身基因组激活,发育至 8-细胞阶段,以及桑椹胚到囊胚的转化过程中血红蛋白均发挥促进小鼠胚胎发育的功能。这些研究结果均提示:血红蛋白在胚胎发育过程中具有重要作用。据报道,生存在南极零度以下极寒环境中的抗冻鱼(*notothernioid fish*),其血细胞数量显著减少,Hb 的含量也明显降低^[15]。绝大多数南极抗冻鱼的 Hb 为单体形式,而不是脊

椎动物 Hb 通常的四聚体结构^[16],这暗示了低浓度的 *Hba- α* 本身可能就具有一定的抗冻功能,而并不需要组装成完整的 Hb 蛋白。

综上所述,本研究拟从 *Hba- α* 具有的潜在抗冻功能角度,利用程序化冷冻的方法,探究冷冻前后小鼠孵化囊胚和休眠胚胎中 *Hba- α* 蛋白的分布和差异表达情况,旨在阐明休眠胚胎具有更强抗冻性的原因,为今后开发和利用新型哺乳动物源抗冻蛋白提供理论依据。这或许将在一定程度上颠覆低温生物学领域针对胚胎冷冻技术的传统革新方式—添加外源抗冻保护剂,而是从调控胚胎本身代谢水平和物质合成的角度对冷冻过程中即将带来的刺激采取预防和保护措施,尽可能降低外源人工合成物质对胚胎造成的化学毒害作用,进而避免冷冻保存对胚胎后续生长发育产生的不可预知的风险。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验选用 10 ~ 12 周龄性成熟,体重为 28 g 左右的 ICR 系雌性小鼠,购自北京维通利华实验动物科技有限公司【SCXK(京)2012-0001】,实验在北京农学院屏障动物实验设施进行【SYXK(京)2010-0003】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 实验试剂

胚胎冷冻保护剂,购自 ICP Bio Reproduction,货号:101129;兔抗鼠 *Hba- α* 多克隆抗体,购自 Santa Cruz Biotechnology,货号:sc-21005;驴抗兔 FITC 标签 IgG 抗体,购自 Abcam,货号:ab6798;HRP 标签抗兔 IgG,购自 Cell Signaling Technology,货号:7074;核染料 Hoechst3342,购自 Bisbenzimidazole,货号:B2261;哺乳动物蛋白抽提试剂盒,购自康为世纪,货号:CW0889S;TBST(pH8.0, 10 $\times$),购自康为世纪,货号:CW0043S。

1.3 实验仪器

CO₂ 培养箱:Thermo 371;普通光学显微镜:Nikon YS2-H;胚胎冷冻仪:Cryobath;电子天平:北京赛多利斯仪器系统有限公司,BS124S;台面式 pH/ISE 测试仪:Thermo 868;精密加热板:贝达仪器公司,MEH-2;掌心离心机:Bratt,美国;四孔水浴锅:北京

长安科学仪器厂, HH. S1-Ni; 体视显微镜: 江南显微镜厂, XTB-1; 超净工作台: 上海智城分析仪器制造有限公司; 移液器: 北京百晶移液器(1 mL、200 μ L、100 μ L、10 μ L); 离心机: Beckman Coulter, Allegra 64R Centrifuge; 脱色摇床: 其林贝尔, TS1000; 计时器、培养皿、EP 离心管、PVDF 膜等。

1.4 实验方法及分组

1.4.1 超排处理

选择阴门淡粉色的雌鼠, 当日晚 8 点腹腔注射 PMSG 10IU/只, 48 h 后注射 hCG 10 IU/只, 随后立即与性成熟公鼠 1:1 合笼过夜, 次日早 8 点检查交配情况, 有阴栓雌鼠可用于后续实验。

1.4.2 孵化囊胚的获取

于见栓 d5 上午 8 点脱颈法处死小鼠, 取下小鼠两侧子宫, 用 PBS 工作液冲洗回收子宫中的孵化囊胚。回收的胚胎用 PBS 工作液洗涤 3 遍后进行程序化冷冻及解冻处理(详见 1.4.4), 随后移入高压过的 EP 管中, -80°C 冰箱储存。

1.4.3 休眠胚胎的获取

于见栓 d4 上午 8~9 点摘除小鼠双侧卵巢(保留输卵管), 随后连续 3 d 在其颈部皮下注射 0.2 mg/mL 孕酮 0.1 mL/只, 术后第 4 天早 8 点从双侧子宫角回收休眠胚胎。洗涤、处理及储存方法同 1.4.2。

1.4.4 胚胎的程序化冷冻及冷冻后胚胎的收集

将获取的新鲜胚胎用 PBS 工作液洗涤 2 遍, 然后三步法脱去 PBS 再放到冷冻液中平衡 5 min, 用 0.25 mL 塑料麦管装取胚胎。装好的麦管置于冷冻仪中, 以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度降到 -5°C , 平衡 10 min, 期间用预冷的镊子夹住装有胚胎的麦管上端冷冻液处 3~5 s 出现冰晶即植冰完成, 随后再平衡 10 min, 以 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度降至 -35°C 。解冻时把冷冻麦管从液氮中取出, 室温下轻轻晃动 5~10 s 后, 投入 35°C 水中 10~15 s 取出。剪掉麦管两端栓部, 将细管里的胚胎置于表面皿中, 按三步法脱去冷冻液。将收集的胚胎用 PBS 工作液洗涤 2 次放入 CO_2 培养箱中复苏培养 2 h 后用于后续实验。

1.4.5 Confocal 检测 *Hba*- α 蛋白在胚胎上的分布

①固定: 将洗涤后的胚胎迅速置于 3.7% 甲醛-PBS 溶液中室温固定 15~30 min; ②清洗: 固定后的胚胎用 0.1% BSA-PBS 室温下洗涤 3 次, 每次 10 min; ③通透: 用 2.5% Tween 20-PBS 室温通透 5 min; ④清洗: 用 0.1% BSA-PBS 充分洗涤 5~6 次, 每次 5 min; ⑤一抗孵育: 将胚胎置于稀释好的 *Hba*-

α 一抗中 4°C 过夜; ⑥清洗: 用 0.2% Triton X-100, 0.1% BSA-PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min; ⑦二抗孵育: 将胚胎置于稀释好的 FITC 标签二抗中, 37°C 孵育 1 h; ⑧清洗: 用 0.2% Triton X-100, 0.1% BSA-PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min; ⑨染核: 充分洗涤的胚胎在染核液 Hoechst3342 中染色 3~5 min 后迅速移入 0.1% BSA-PBS 中; ⑩将胚胎及少量液体置于酒精洗涤过的洁净载玻片中心区域, 小心盖上盖玻片注意不要将胚胎压扁; ⑪用透明指甲油小心将盖玻片的四周封闭, 以防止液体挥发, 尽快置于共聚焦仪器中成像。

1.4.6 Western Blot 检测胚胎冷冻前后 *Hba*- α 蛋白的表达变化

①将收集到的胚胎从 -80°C 冰箱取出, 按 100 枚胚胎/10 μ L 裂解液的比例加入蛋白抽提液; ②冰上孵育 30~40 min, 使胚胎蛋白充分被抽提出来; ③12 000 r/min, 4°C 离心 5 min 后吸取上清, 加入等体积 $2 \times$ Laemmli sample buffer; ④ 98°C 处理 8~10 min, 待冷却至室温后上样; ⑤12% SDS-PAGE 分离凝胶进行电泳分析, 电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜上; ⑥膜在 5% 脱脂奶粉-TBST 中室温封闭 2 h; ⑦将膜置于稀释好的兔抗小鼠 *Hba*- α 一抗中 4°C 过夜孵育; ⑧在 $1 \times$ TBST 中洗涤 3 次, 每次 15 min; ⑨将膜转移至带有 HRP 标签的二抗中 37°C 孵育 1 h; ⑩重复 8, 常规 ECL 化学显色后立即放入凝胶成像仪。

1.4.7 图像分析

用 Image J 软件进行灰度值分析, 对信号表达进行比较。

1.4.8 统计方法

用 SPSS 22.0 对数据进行单因素方差分析(结果采用平均数 $\pm$ 标准差表示), $P < 0.05$ 代表数据间差异显著。

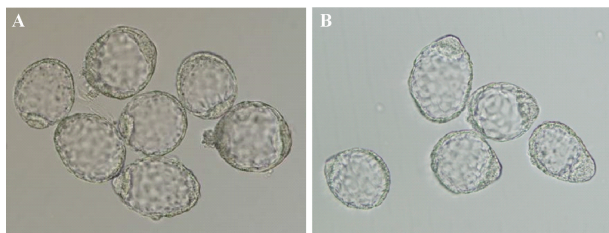
2 结果

2.1 小鼠孵化囊胚和休眠胚胎

体内获取的小鼠妊娠 d5 孵化囊胚与休眠胚胎(图 1), 胚胎整体形态完好, 内细胞团与滋养外胚层轮廓结构清晰, 可用于后续实验。

2.2 程序化冷冻前后 *Hba*- α 在胚胎中的分布情况

如图 2 所示, confocal 结果表明, 在程序化冷冻前后的小鼠孵化囊胚和休眠胚胎中均存在 *Hba*- α 蛋白的分布表达。

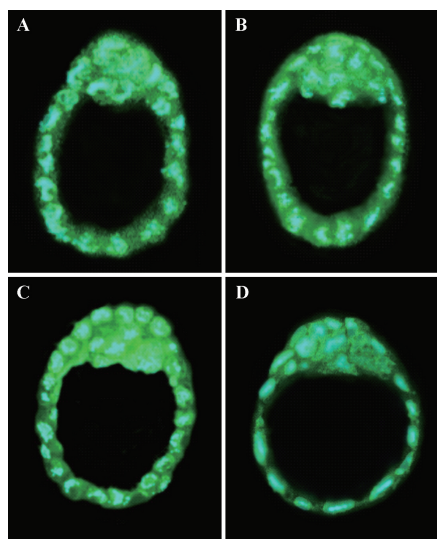


注: A. 孵化囊胚; B. 休眠胚胎。

图 1 小鼠孵化囊胚和休眠胚胎

Note. A: Normal hatched blastocysts; B: Dormant embryos.

Fig. 1 Normal hatched blastocysts and dormant embryos of mice



注: A. 孵化囊胚冷冻前; B. 休眠胚胎冷冻前; C. 孵化囊胚冷冻后; D. 休眠胚胎冷冻后。绿色荧光代表 *Hba-α* 蛋白分布区域; 蓝色荧光代表细胞核位置。

图 2 *Hba-α* 蛋白在各组胚胎中的分布表达情况

Note. A. Normal blastocysts, before cryopreservation; B. Dormant embryos, before cryopreservation; C. Normal blastocysts, after cryopreservation; D. Dormant embryos, after cryopreservation. Green fluorescent signal indicates the region of *Hba-α* protein. Blue fluorescent signal indicates the location of cell nuclei.

Fig. 2 Distribution of *Hba-α* protein in the embryos of each group

2.3 Western blot 检测结果

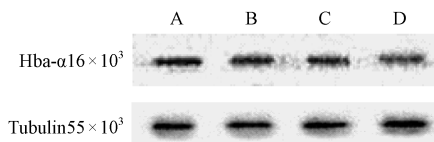
2.3.1 凝胶成像显影图

该实验重复 3 次,从凝胶成像结果可看出,看家基因 *Tubulin* 表达稳定,表明提取的胚胎蛋白质质量较好。见图 3。

2.3.2 Western blot 分析结果

凝胶成像所得图片用 Image J 软件分析得到灰度值。利用 SPSS 22.0 软件中的 ANOVA 单因素方差分析处理灰度值数据,结果如图 4 所示:程序化冷冻前后的小鼠孵化囊胚和休眠胚胎均能检测到

Hba-α 蛋白的表达;程序化冷冻前后孵化囊胚(组 A 和组 B) *Hba-α* 蛋白的表达变化差异无显著性 ($P > 0.05$);冷冻前休眠胚胎(组 C)与程序化冷冻前后的孵化囊胚(组 A 和组 B)相比 *Hba-α* 蛋白表达量显著下调 ($P < 0.05$);冷冻后休眠胚胎(组 D)的 *Hba-α* 蛋白的表达量显著低于其他各组 ($P < 0.05$)。

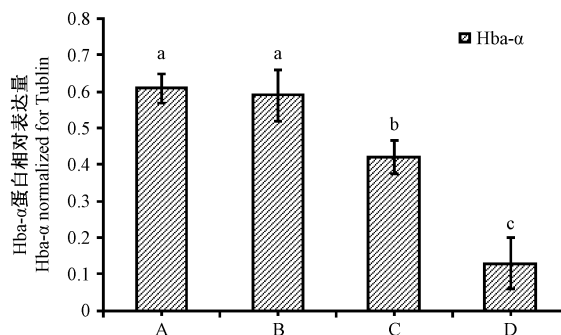


注: A. 冷冻前孵化囊胚; B. 冷冻后孵化囊胚; C. 冷冻前休眠囊胚; D. 冷冻后休眠囊胚。

图 3 Western blot 检测 *Hba-α* 蛋白在
各组胚胎中的相对表达量

Note. A. Normal hatched blastocysts, before cryopreservation; B. Normal hatched blastocysts, after cryopreservation; C. Dormant blastocysts, before preservation; D. Dormant blastocysts, after cryopreservation.

Fig. 3 Western blot analysis of the relative expression of *Hba-α* protein in the blastocysts



注: A. 冷冻前孵化囊胚; B. 冷冻后孵化囊胚; C. 冷冻前休眠囊胚; D. 冷冻后休眠囊胚。上标相同字母表示差异无显著性, $P > 0.05$; 不同字母表示差异有显著性, $P < 0.05$ 。

图 4 Western blot 检测 *Hba-α*
蛋白相对表达量分析图

Note. A. Normal hatched blastocysts, before cryopreservation; B. Normal hatched blastocysts, after cryopreservation; C. Dormant blastocysts, before cryopreservation; D. Dormant blastocysts, after cryopreservation. The same letters indicate non-significant differences among them ($P > 0.05$). The different letters indicate a significant difference among them ($P < 0.05$).

Fig. 4 Western blot analysis of the relative expression of *Hba-α*

3 讨论

目前,有关抗冻蛋白发挥作用的机制主要存在

以下几种假说:吸附抑制学说、“晶格匹配/占有”模型、“偶极子-偶极子”假说、氢原子结合模型、刚体能量学说和冰核抑制学说^[17]。无论是哪种假说,围绕的核心都是抗冻蛋白如何降低进而避免在冷冻及解冻过程中冰晶形成对胚胎造成的物理损伤。近些年来,低温生物学先驱们将研究重点放在抗冻蛋白间、抗冻蛋白与细胞膜间以及抗冻蛋白与冰晶复合体间相互作用的具体机制上,旨在寻求新的低温生物保存技术的突破口^[18-20]。

过去一直认为,动物 Hb 的生物学功能仅限于运输和储存氧气。然而,近十几年的研究结果发现,脊椎动物的 Hb 除运输和储存氧气外,还具有调节 pH 值、控制体内一氧化氮水平、参与免疫反应等多种生物学功能^[21-23]。一些低等脊椎动物由于长期处于极端的生存环境,其 Hb 的含量与结构在进化中发生了显著的变化。在 Hb 含量上,南极冰鱼(Channichthyidae)是目前发现的惟一不含有 Hb 的脊椎动物,与早期胚胎类似,其血液、鳃和内脏均是无色的,血液的氧运载能力也只有一般鱼类的 10%^[24],这恰恰与我们实验结果中休眠胚胎在冷冻前后 Hba- α 蛋白表达均显著下调相一致。

程序化冷冻前后的小鼠正常孵化囊胚和休眠胚胎均能检测到 Hba- α 蛋白的表达,充分表明 Hba- α 在早期胚胎发育过程中具有重要作用,同时验证了本实验室前期研究中基因芯片的扫描筛选结果。

该实验结果显示,程序化冷冻前后孵化囊胚(组 A 和组 B) Hba- α 蛋白的表达变化差异不显著($P > 0.05$),说明对于正常孵化并即将进入着床窗口期的小鼠胚胎,低温刺激对其 Hba- α 蛋白的表达调控并未产生实质性的影响。这个时期的胚胎充分调动自身机制与母体建立物质和信息上的联系,为着床作好准备。此时的寒冷刺激会扰乱胚胎的正常着床程序,胚胎无法对突然产生的环境变化做出快速调整反应, Hba- α 蛋白的表达量也就无法在短时间内被调节。脊椎动物 Hb 中的一些基团能结合 H^+ , 是一种 H^+ 缓冲物质,因此在运输 CO_2 的过程中 Hb 和 HCO_3^- 对血液的酸碱平衡能起到重要的缓冲作用^[25]。无脊椎动物 Hb 作为体液的主要蛋白质组分,可能也参与了体液酸碱平衡的调节^[26]。鉴于 Hb 除运输氧外,还具有维持血液酸碱平衡即调节血液 pH 值的功能,胚胎 Hba- α 蛋白的表达变化或许与低温造成的内环境改变有关。

冷冻前小鼠休眠胚胎(组 C)与程序化冷冻前

后的孵化囊胚(组 A 和组 B)相比,其 Hba- α 蛋白表达量均显著下调($P < 0.05$),表明低水平 Hba- α 蛋白含量可能有利于休眠胚胎抵御冷冻打击。早先关于小鼠休眠胚胎的研究表明,处于延迟着床状态的胚胎,与其对应时期处于正常发育过程中的胚胎相比,存在相当数量的差异表达基因^[27]。这些基因使胚胎在母体还未调整至着床最佳状态前,维持稳定的代谢状态,待条件适宜时重新恢复正常发育^[28]。通常来说 Hba- α 作为血红蛋白的组成元件短暂存在于红细胞当中,承担着储存并运输氧气的任务,关于 Hba- α 最早出现于哪个时期的小鼠胚胎并无明确的文献记载,可以假设在胚胎时期这一功能已进入其原始的物质准备阶段,在胚胎休眠的过程中,胚胎代谢速率减慢,需氧量降低, Hba- α 蛋白合成量也随之下降,这可能就是休眠胚胎中 Hba- α 蛋白表达低于正常胚胎的原因。Trewitt 等^[29]发现摇蚊(*Chironomus thummi*)幼虫血淋巴中的 Hb 可能具有类卵黄蛋白原的功能,该蛋白不仅能够运输和储存氧气,可能还具有卵黄储存功能^[30-31]。假设小鼠早期胚胎中 Hba- α 也具有一定的营养作用,低温刺激可能会调动某种产能机制,将 Hba- α 蛋白分解以产生热量抵御寒冷。

冷冻后休眠胚胎(组 D)的 Hba- α 蛋白表达量显著低于其他各组($P < 0.05$),表明处于休眠状态的胚胎时刻关注自身所处环境的变化,即便是微小的改变都会使其内部调节机制迅速做出相应的反应,在程序化冷冻开始阶段,胚胎受到寒冷刺激(冷冻打击),胚胎为了保护自身结构和功能的完整性,降低代谢速率,停止不必要的蛋白合成和加工,这时 Hba- α 蛋白由于其特殊的功能性,表达量急剧下降,水平远远低于孵化囊胚和冷冻前的休眠胚胎。

由此可见, Hba- α 基因对于胚胎在冷冻刺激下发生的自身调控具有不可忽视的作用。胚胎 Hba- α 蛋白的下调可能在一定范围内增强胚胎的抗冻性,这一作用的具体机制尚不清楚,需在下一步的探究实验中通过添加或导入外源 Hba- α 重组蛋白或相应抑制剂加以分析和阐明。

参 考 文 献

- [1] Whittingham DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing[J]. Nature, 1971, 233: 125-126.
- [2] Wilmut I, Rowson LE. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos [J]. Vet Rec. 1973, 92:686-690.
- [3] Willadsen SM, Polge C, Rowson LE. et al. Deep freezing of sheep embryos [J]. J Reprod Fertil, 1976, 46:151-154.

- [4] 姚佳. 抗冻蛋白及其抗冻机理研究进展[J]. 四川畜牧兽医, 2013, 04(总 271): 30–32.
- [5] Hardison RC. A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist and bacteria[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(12): 5675–5679.
- [6] Lim JM, Hansel W. Improved development of in vitro-derived bovine embryos by use of a nitric oxide scavenger in a cumulus-granulosa cell coculture system [J]. *Mol Reprod*, 1998, 50: 45–43.
- [7] Lim JM, Mei Y, Chen B, et al. Development of bovine IVF oocytes cultured in medium supplemented with a nitric oxide scavenger or inhibitor in a coculture system [J]. *Theriogenology*, 1999, 51: 941–949.
- [8] Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation[J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12: 731–746.
- [9] Ruud JT. Vertebrates without erythrocytes and blood pigment [J]. *Nature*, 1954, 173(4410): 848–850.
- [10] 费云标, 魏令波, 高素琴. 添加植物抗冻蛋白提高猪胚胎冷冻保存成活率的初步试验[J]. 黑龙江动物繁殖, 1995, 3(2): 21–23.
- [11] 张劭侯, 刘云海, 倪和民, 等. 经程序化冷冻的小鼠休眠胚胎的基因表达谱差异分析[J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(5): 15–20.
- [12] 顾美超, 卢天罡, 刘云海, 等. 冻融后小鼠休眠胚胎超微结构变化的研究[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 53–56.
- [13] Park SE, Chung HM, Ko JJ, et al. Embryotropic role of hemoglobin and ethylenediaminetetraacetic acid in preimplantation development of ICR mouse 1-cell embryos [J]. *Fertil Steril*. 2000, 74: 996–1000.
- [14] Park SE, Chung HM, Cha KY, et al. Establishment of an animal embryo culture system containing various embryotropins and its efficacy for culturing ICR mouse one-cell embryos derived in vivo or in vitro [J]. *Fertil Steril*. 2001, 76: 167–174.
- [15] Wells RMG, Ashby MD, Duncan SJ, et al. Comparative studies of the erythrocytes and hemoglobins in nototheniid fishes from Antarctica[J]. *J Fish Biol*, 1980, 17(5): 517–527.
- [16] Verde C, Lecointre G, diPrisco G. The phylogeny of polar fishes and the structure, function and molecular evolution of hemoglobin [J]. *Polar Biol*, 2007, 30(5): 523–539.
- [17] 汪少芸, 李晓坤, 周焱富, 等. 抗冻蛋白的作用机制及基因工程研究进展[J]. 北京工商大学学报, 2012, 30(2): 58–62.
- [18] 谢秀杰, 贾宗超, 魏群. 抗冻蛋白结构与抗冻机制[J]. 细胞生物化学杂志, 2005, 27: 5–8.
- [19] 樊绍刚, 张党权, 邓顺阳, 等. 抗冻蛋白和冰核蛋白对植物抗冻性能的作用机制[J]. 经济林研究, 2009, 27(2): 125–130.
- [20] Yu SO, Brown A, Iddleton AJ, et al. Ice restructuring inhibition activities in antifreeze proteins with distinct differences in thermal hysteresis [J]. *Cryobiology*, 2010, 61: 327–334.
- [21] Hausladen A, Grow A, Stamler JS. Nitrosative stress: Metabolic pathway involving the flavo hemoglobin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(24): 14100–14105.
- [22] Antonini E, Brunori M. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands [M]. Amsterdam: North Holland, 1971, 21: 436.
- [23] Perutz MF, Steinrauf LK, Stockell A, et al. Chemical and crystallographic study of the two fractions of adult horse hemoglobin [J]. *J Mol Biol*, 1959, 1(4–5): 402–404.
- [24] Ruud JT. Vertebrates without erythrocytes and blood pigment [J]. *Nature*, 1954, 173(4410): 848–850.
- [25] Buttari B, Profumo E, Tagliani A. Free hemoglobin: A chemotactic stimulus for the innate immunity [C]. Abstracts 77th Congress of the European Atherosclerosis Society, 2008, 9(1): 14.
- [26] Toulmond A. Properties and functions of extracellular heme pigments [J]. *Adv Comp Environ Physiol*, 1992, 13(3): 231–256.
- [27] Paria B, Das SK, Andrews GK, et al. Expression of the epidermal growth factor receptor gene is regulated in mouse blastocysts during delayed implantation [J]. *Proc Nat Acad Sci U S A*. 1993, 90(1): 55–59.
- [28] Paria, B, Huet-Hudson Y, Dey S. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus [J]. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 1993, 90(21): 10159–10162.
- [29] Trewitt PM, Boyer DR, Bergtrom G. Characterization of maternal hemoglobins in the eggs and embryos of *Chironomus thummi* [J]. *Insect Physiol*, 1986, 32(11): 963–969.
- [30] Fabb SA, Cheong MF, Lee BTO, et al. A sex-influenced protein in *Chironomus* (Diptera) [J]. *Insect Biochem*, 1990, 20(2): 135–140.
- [31] Chen ZZ, Fabb SA, Martin J. Comparison of a gene for a possible sex-influenced protein in *Chironomus* and *Kiefferulus* [J]. *Genes Ecosyst*, 1999: 49–55.

[收稿日期] 2016–07–18