

哺乳动物卵母细胞减数分裂研究进展*

朱必才 张子峰 高建国 张永 高俊芳

(徐州师范大学生物学系 徐州 221116)

摘要: 介绍了国内外哺乳动物卵母细胞减数分裂研究的现状、内容、技术、方法及意义。特别指出了哺乳动物卵母细胞体外成熟及其相关技术在畜牧业生产、医疗卫生事业中的广泛应用前景和重要的实践意义。

关键词: 卵母细胞; 减数分裂; 体外成熟培养; 哺乳动物

中图分类号: Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)04-79-05

Recent Progress in Mammalian Oocyte Meiosis Study

ZHU Bi-Cai ZHANG Zi-Feng GAO Jian-Guo ZHANG Yong GAO Jun-Fang

(Department of Biology, Xuzhou Normal University Xuzhou 221116, China)

Abstract: This paper introduces the progress on the meiosis of mammalian oocytes. Specially, points out the wide foreground and important practical perspective in the field of animal production and medical treatment.

Key words: Oocyte; Meiosis; *In vitro* maturation; Mammalian

一般认为,哺乳动物卵母细胞的减数分裂过程存在两次自发的停滞现象。雌性动物早在胚胎时期(或出生后不久),其卵原细胞就已陆续分裂分化产生初级卵母细胞,进行到减数分裂 I 前期的双线期,这是减数分裂第一次间隙期,这一静止期持续时间较长,一直到雌性动物性成熟。在促性腺激素的作用下,初级卵母细胞的减数分裂才重新启动,在完成减数第一次分裂后,又停滞在减数分裂的中期 II(狗、狐例外),这是减数分裂第二次间隙期。在精子的作用下,再完成减数分裂 II。1935 年,Pinus 和 Enzman 观察到兔卵母细胞可在体外自发地排出第一极体。生殖工程研究由此诞生一项新技术——卵母细胞的体外成熟培养(*in vitro* maturation, IVM)。这一技术的产生和完善大大推动了卵母细胞减数分裂的研究,从此,研究者可以在人工培养的条件下,对卵母细胞减数分裂进行研究。作者根据研究的需要,查阅了大量国内外关于卵母细胞减数分裂的资料,现将这方面研究现状作一综述。

1 卵母细胞减数分裂研究的现状和内容

从近年来的文献看,国内外对哺乳动物减数分裂

的研究,主要集中在精母细胞减数分裂,而对卵母细胞的研究比较少。这是因为:(1)材料获得困难,雌性哺乳动物排卵量少,加之排卵周期长,因而要从正常雌体身上获取卵母细胞进行研究几乎不可能;(2)培养、分析等实验技术的限制。对卵母细胞的研究需要有一整套完备的卵母细胞体外培养实验条件和技术,而且需要良好的分析技术,这些都成为对卵母细胞进行研究的制约因素。卵母细胞的研究多集中在卵母细胞成熟的调控机制方面,包括卵母细胞成熟的启动调控、成熟分裂的两次阻滞和恢复调控^[1]。

1.1 促性腺激素 促性腺激素由脑下垂体后叶、胎盘和子宫内膜分泌,它包括:卵泡刺激素(FSH)、促黄体生成素(LH)、人绝经期促性腺激素(HMG)、促乳素和人绒毛膜促性腺激素(HCG)。其中 FSH 和 LH 是参与卵母细胞成熟的最主要蛋白激素,它们与颗粒细胞、内膜细

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39970405);

第一作者介绍 朱必才,56岁,男,硕士,教授;主要从事细胞分子遗传学研究;E-mail: bicaizhu0054@sina.com。

收稿日期:2001-09-30,修回日期:2002-04-26

胞上受体结合,从腔前卵泡阶段起,卵泡颗粒细胞和内膜细胞就分别拥有 FSH 和 LH 受体,所以卵泡在非常早的阶段就具有对 FSH 和 LH 应答的能力^[2]。受体诱导卵母成熟的机理有两种:正向刺激和抑制性输入中断。Downs 等提出,促性腺激素的作用方式可能有以下几种:(1)作用于卵泡细胞,使其产生孕酮,孕酮作用于卵母细胞,参与 MPF 的激活;(2)作用于卵丘细胞,使卵母和卵丘细胞之间的通讯联系中断,使卵丘细胞产生的 cAMP 不能进入卵母细胞,致使卵母细胞内的 cAMP 浓度下降,诱使卵母细胞恢复减数分裂^[3]。1994~1999 年夏国良、Byskov、Andersen 等连续报道在用 FSH、Forsilin 刺激体外培养的哺乳动物卵母细胞恢复减数分裂过程中,卵丘细胞分泌一种可弥散物质,该物质能自由扩散到卵母细胞从而使之克服抑制因素,恢复减数分裂。经分析,他们认为该物质可能是甾类物质,就是在哺乳动物体内存在的两种促减数分裂甾醇(MAS),并提纯和分析了它们的化学结构和代谢途径,进一步提出 MAS 可能作为一种特化的旁分泌激素,它在由促性腺激素启动的卵母细胞减数分裂恢复中起生理性信号物质的作用^[4,5]。

然而促性腺激素对卵母细胞成熟、受精及卵泡早期发育的影响仍有争议。Brackett 认为,LH 能促进卵母细胞发育,并有利于体外受精和培养,而 Fukui 等认为 LH 无此作用^[6,7]。Singh 等报道猪卵母细胞减数分裂体外成熟在雌二醇和 FSH 存在时,卵泡损伤百分率下降。促乳素也参与调节多种动物的发情周期。Dieleman 等认为促乳素对体内牛卵母细胞成熟无调节作用^[8,9]。Garverick 等研究表明,小于 8 mm 的卵泡,其颗粒细胞仅有 FSH 受体 mRNA 而无 LH 受体 mRNA,LH 受体 mRNA 仅存在于卵泡膜组织上^[10]。

1.2 cAMP 在研究中,人们发现 cAMP 及其类似物 dbcAMP,腺苷酸环化酶及其活化物都能抑制 GVBD 发生。小鼠^[11]和大鼠^[12]细胞融合实验表明,一旦 MPF 被激活,其诱导减数分裂的能力就不受 cAMP 水平的影响。因此 cAMP 是 p34^{cdc2} 的翻译后调控因子,抑制 p34^{cdc2} 的磷酸化。当卵母细胞内 cAMP 水平下降时,cAMP 依赖蛋白激酶活性下降,细胞内磷酸化和去磷酸化的水平发生相应的改变,激活酪氨酸磷酸酶,催化发生 p34^{cdc2} 去磷酸化,使其活化,进而使 RNA 聚合酶 II、波形蛋白等多种蛋白发生磷酸化,这些物质分别在转录和翻译水平上控制减数分裂周期,而使卵母细胞恢复减数分裂。李朝军等 1994 年报道腺嘌呤对体外小鼠卵母细胞减数分裂起到抑制作用^[13]。

Downs 等 1995 年提出小鼠卵母细胞和卵丘细胞存

在有不同形式的 PKA:卵母细胞中存在 I 型 PKA,激活型的 I 型 PKA 能抑制卵母细胞的减数分裂;卵丘细胞内存在 II 型 PKA,激活型的 II 型 PKA 能诱导卵母细胞减数分裂的恢复^[14]。在牛和大鼠均有类似结果的报道^[15]。FSH 诱导猪卵母细胞成熟首先刺激卵丘细胞内 cAMP 的迅速上升,该 cAMP 峰诱导卵母细胞内 cAMP 峰的产生,卵丘细胞开始扩展,随后卵母细胞内 cAMP 下降,卵母细胞克服抑制开始恢复减数分裂,这说明在生理条件下卵丘细胞内 cAMP 峰的产生是卵母细胞成熟的关键^[15]。

1.3 Ca²⁺ 早期对 Ca²⁺ 在卵母细胞成熟分裂中作用的研究,主要是通过控制细胞外 Ca²⁺ 水平来进行的。但由于使用培养基差异、控制条件的不同以及实验动物不同,往往得出相互矛盾的结论。近年来,研究集中在卵母细胞内 Ca²⁺ 波动对成熟分裂的影响上。1992 年,Carroll 和 Swann 发现小鼠卵母细胞减数分裂过程中存在着 Ca²⁺ 的自发波动现象(Ca²⁺ oscillation),他们认为这种波动和卵母细胞的胞质成熟有关^[16]。

国内的王晨光等研究表明:小鼠卵母细胞 GVBD 的发生不依赖细胞内钙离子水平,M I 期的卵母细胞发育至 M II 的过程依赖钙离子和钙调素,并可能与细胞内钙离子的核周区分布有关,钙离子和钙调素与卵母细胞成熟过程中 MPF 的活性变化没有关系^[17]。最近 Deng 等报道通过激光共聚焦显微镜证明小鼠卵母细胞减数分裂恢复过程时有钙离子的自发释放波^[18]。

1.4 MPF 研究表明,MPF 可能是调节卵母细胞成熟的核心因素。MPF 由催化亚基 p34^{cdc2} 和调节亚基 cyclinB 组成。cyclinB 在细胞周期中间断性存在,它在 S 期前期合成,在 M 期后消失,因此 MPF 的活性也随着 cyclinB 的合成而周期性变化^[19]。Eppig 等 1996 年报道,在 GVBD 后小鼠卵母细胞合成大量 cyclinB,以提高 MPF 水平,使其进入 M I 期并继续成熟至 M II 期^[20]。

目前,人们认为卵母细胞之所以能维持在 M II 期,是由于卵母细胞中存在细胞静止因子(CSF),高活性的 CSF 维持 MPF 处于高活性状态,阻止卵母细胞向后期转变的缘故。CSF 活性出现在 GVBD 后不久,而减数分裂并不停滞于 M I 期,表明 M I 期的纺锤体和 MPF 不受 CSF 的阻滞^[21]。

1997 年, Taieb 等发现向胞质内注射 cyclinB 或 cyclinA,可能募集胞质中的 cdc2,并形成复合体,当达到阈值时,促进前 MPF 激活,导致 MPF 水平升高,说明 MPF 具有自动催化扩增功能^[22]。

1.5 其它方面的研究 除了卵母细胞成熟分裂调控方面的研究外,国内外学者还在其它方面做了一些相

对较为零碎的研究。

Wakayama 等(1997~1998)的研究结果表明:将第一极体(Pb I)注入去核卵母细胞后注入精子或将第二极体(Pb II)注入去除雌原核的受精卵均可产生具有生殖能力的小鼠后代^[23,24]。

Yoon 等在 1996 年的研究中指出卵母细胞在体内或体外经历 M I 时,功能单价体(functional univalent)的出现存在明显的年龄效应^[25]。

2001 年,王钦文等把外源性的 mRNA 注射到卵母细胞内,由其翻译系统进行表达,再通过电生理技术研究表达受体,这是一种先进的生理学研究方法^[26]。

这些研究都为畜牧业和人类医学的发展做出了贡献。

2 研究卵母细胞减数分裂的技术方法

在卵母细胞减数分裂研究中,新技术、新方法引入还较少。多数研究仍采用传统的卵母细胞培养法,向培养液内加添加物,然后用传统的分析方法解释添加物的作用和功能,以此来推论卵母细胞减数分裂的机制。实验方法的改进是生物学研究发展的前提和基础,每一次新技术的诞生总能带来生物学研究的蓬勃发展。随着细胞生物学和分子生物学的发展,人们越来越多地将眼光投向卵母细胞减数分裂的分子调控机制。而原位杂交、PCR 等新技术的引入,无疑将大大推动卵母细胞减数分裂的研究。

2.1 卵母细胞的获得和培养 长期以来,卵母细胞获得和培养难度一直是卵母减数分裂研究的最大制约因素。虽然 IVM 技术出现较早,但其发展十分缓慢。1977 年 Eppig 第一次利用小鼠卵母细胞进行体外培养,发现从 8 日龄小鼠卵巢中采集到的小生长卵母细胞,经体外培养,部分卵母细胞可以发育成熟^[27]。近年来,胚胎体外生产技术的迅速发展,对具发育潜力和有受精能力的卵母细胞需求量日益增加。许多研究者为此建立了许多卵母细胞体外培养体系,主要有以下几种。

2.1.1 卵母细胞-颗粒细胞复合体(oocyte-grain cell complex, OGCs)培养 其特点是分离得到大量 OGCs,将其培养在用 I 型和 II 型胶原预先浸润的衬膜上来阻止颗粒细胞游离。这种方法的优点是去除了培养液和卵丘-卵母细胞复合体间的膜颗粒细胞层(卵泡培养法存在);缺点是卵母细胞分泌的有利卵母细胞成熟作用因子不能聚集到有效浓度,还需要外源添加^[27]。

2.1.2 卵巢器官或皮质薄片培养 卵巢器官培养优点是使卵母细胞和颗粒细胞及不同卵母细胞之间保持很好的联系,但在培养时需灌流,不利长期培养。皮质薄

片培养是很好的改进,它既保留了器官培养的优点,又克服了其缺点^[27]。

2.1.3 其它培养方法 卵母细胞培养还有许多方法,如卵巢培养法、胚胎卵巢细胞体外重建卵泡法等。这些方法各有优缺点,而且卵母细胞培养要求高,所以任何方法只能作参考,只有自己摸索调整,才能取得适合自己实验的最佳方法。

2.2 C-显带 染色体显带技术产生于 60 年代末,它是一项借助于某些特殊的分带程序,使染色体在一定部位上显现出染色深浅不一带纹的细胞遗传学技术。由于特定染色体有其特定的带纹,因此显带可作为鉴别染色体组和单个染色体的手段,从而深入地认识染色体结构成分的遗传关系^[28]。分带技术操作简便、实用。可用于核型分析、染色体比较分析、易位片段分析等,是卵母细胞减数分裂研究中应用较为广泛的一项技术。其缺点是识别不够准确,有时甚至不能识别整个染色体臂,显然不能满足小片段易位的鉴别、基因定位等方面的要求。

2.3 原位杂交技术 原位杂交技术同样产生于 60 年代末,其运用细胞遗传学和分子生物学的原理,作为细胞生物学和分子生物学之间的桥梁,已被广泛用于医学、农学、生物学的各研究领域。原位杂交技术发展迅速,早期用放射性标记做探针,虽然灵敏、特异性高,对各酶促反应无不良影响,但其所需时间长、分辨率低,同时对实验人员身体有害。现在采用较多的是非放射性标记,用荧光素、生物素、地高辛标记等,这些标记物各有优缺点。其中荧光原位杂交技术具有操作简便、灵敏,可以多探针同时检测等优点,应用尤其广泛^[29]。

原位杂交技术在染色体分析、易位分析、基因定位方面比分带技术更精确。但在核型分析方面分带技术有独特的优越性。因此,目前较多的是把两者结合起来使用。

2.4 RT-PCR 反转录-多聚酶链式反应(RT-PCR)就是以 mRNA 为模板,在反转录酶的催化下合成与 mRNA 互补的 cDNA,再以 cDNA 为模板进行 PCR,可用来测定基因转录本的存在与否和表达量的多少^[30]。可在不需要构建 cDNA 文库的情况下克隆 cDNA,因而具有 Northern 印迹法、RNase 保护分析法、原位杂交、点印迹和 S I 分析法等不可比拟的优点。因此将这种方法引入对卵母细胞减数分裂中调控物质的表达情况具有广阔前景。

另外,2001 年,王钦文等通过外源 mRNA 注射到卵母细胞内,通过电生理技术研究表达受体^[26]。

我们相信随着研究的发展,更多有效、实用的新技术将被引入卵母细胞减数分裂中,也必将导致该研究

的革命性发展。

3 卵母细胞减数分裂研究展望

总体来说国内外研究卵母细胞减数分裂方面文献不多,研究的系统性较差,这与此项研究技术难度较大、研究人力投入较少等因素不无关系。在卵母细胞减数分裂的机制研究方面,多数是阐述卵母细胞减数分裂过程中生理生化的变化情况,以此来推论卵母细胞减数分裂的调控途径。因此存在着一些水平较低的重复研究。少有涉及卵母细胞减数分裂的分子调控机制的研究。作者认为卵母细胞成熟作为动物正常生理的一部分是受基因严格控制的。因此,研究可以从调节卵母细胞成熟的基因产物入手,反推回到其编码基因,再研究其基因,从而解开卵母细胞成熟之谜。

卵母细胞减数分裂的染色体研究比较少,多数研究只是分析核型,研究染色体进化途径。作者认为此方面研究可以和基因定位、基因进化、胚胎发育早期基因在卵母细胞中的转录、表达等研究结合起来。

发育生物学是现代生物学的研究热点之一,发育过程主要是通过选择性基因表达,从而导致细胞分化来实现的。细胞分化受内源和外源两种信号控制。在早期发育中,内源性指令被作为多样性的惟一机制。这些内源性指令可以追溯到卵母细胞成熟时期一些早期调控因子的表达。它们造成了卵细胞的内源性生化不对称性。这种不对称性决定了胚胎的早期发育。因此,研究卵母细胞成熟过程中早期基因的表达对揭示早期发育机制具指导性意义。

另外,卵母细胞能有效地表达外源性 mRNA,目前,两栖类动物的卵母细胞已是生理学上常用的基因表达体系,所以可以考虑建立哺乳动物卵母细胞基因表达体系。

我们希望能加强卵母细胞减数分裂的研究,最终取得良好的社会效应和经济效应。

4 研究卵母细胞减数分裂的实践意义

研究卵母细胞减数分裂不仅具有重要的理论意义,而且具有较强的实践意义。

首先,在畜牧业生产中目前采用的是自然繁殖法,雌性哺乳动物的排卵量少,生育周期长,造成畜牧生产的成本高、效益低。卵母细胞体外成熟技术(IVM)以及正在研究的将极体成熟为可育生殖细胞的技术^[31],无疑为畜牧业生产的产业化提供了条件。

其次,在辅助生殖生物学中,利用体外成熟(*in vitro* maturation, IVM) + 体外受精(*in vitro* fertilization, IVF) +

胚胎移植(embryo transfer, ET)技术为不孕症患者提供正常的胚胎。这种技术不仅能够给患严重的、有明显遗传倾向的遗传病人提供正常的胚胎,同时作为控制遗传病传代的优生学方法^[32],也给众多因卵子成熟障碍的不孕患者带来了福音。由于 MAS 的内源性积聚可诱导卵母细胞减数分裂的恢复,促进成熟、受精及早期胚胎的发育,因此阻止 MAS 的积聚可能导致不育。所以 MAS 可能成为一种理想的避孕药^[33]。

第三,建立卵子库,应用解冻卵体外受精和冷冻胚胎及“胚胎托管”技术,不仅使丧失生育能力或提早停经的女性获得生育的希望,而且适用于任何一对育龄夫妇,特别对那些因事业或其它原因推迟婚育的妇女具有很重要的意义。生育专家发现冷冻卵子技术比精子冷冻技术复杂,成功率也相对低得多,因为人类卵子较难保存,卵子精细脆弱,解冻时很容易受损。如果将冷冻液的蔗糖浓度提高,增加卵子接触冷冻液的时间,就可让卵子的存活率增加两倍。以往卵子的存活率为 35% ~ 60%,使用新技术卵子的存活率约为 80% ~ 83%。

第四,许多遗传病是在卵母细胞的减数分裂过程中由于染色体数量和结构发生变化引起的。研究卵母细胞减数分裂中的染色体变化可以预防和治疗此类遗传病。如:哺乳动物 XO 个体中,人类女性 XO 个体为 Turner 综合征,是不育的,而棕色田鼠 XO 个体是可育的^[34]。因此,研究棕色田鼠 XX、XO 个体卵母细胞的减数分裂过程中染色体数目的比较,研究 XO 个体的形成和育性机制对预防和治疗人类 XO 个体有指导意义。

以上仅是卵母细胞减数分裂研究意义和应用前景的几点抛砖引玉的讨论。随着卵母细胞减数分裂研究的不断深入,此项研究终将在人们的日常生活和经济生活中产生越来越广泛的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Hinrichs K, Martin M G, Schmidt A L *et al.* Effect of follicular components on meiotic arrest and resumption in horse oocytes. *J Reprod Fertil*, 1995, **104**(1): 149 ~ 156.
- [2] Ireland J J. Control of follicular growth and development. *J Reprod Fert*, 1987, **34**(suppl.): 39 ~ 54.
- [3] Downs S M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology*, 1993, **39**: 65 ~ 54.
- [4] Xia G L, Byskov A G, Andersen C Y. Cumulus cells secrete a meiosis-inducing substance by stimulating with forskolin and dibutyryl cyclic adenosine monophosphate. *Mol Reprod Dev*, 1994, **39**: 17 ~ 24.

- [5] Byskov A G, Andersen C Y, Xia G L *et al.* Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature*, 1995, **374** (6): 559 ~ 562.
- [6] Brackett B G. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Res*, 1989, **23**: 189 ~ 201.
- [7] Fukui Y H Ono. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocyte. *J Reprod Fertil*, 1989, **86**: 501 ~ 506.
- [8] Singh B. Factors influencing resumption of maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 1993, **36**: 113 ~ 119.
- [9] Dieceman S J. Induction of ovulation in seasonally anoestrous ewe by continuous infusion of cow dose of GnRH. *J Reprod Fertile*, 1983, **68**: 641 ~ 649.
- [10] Garverick H. A expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod*, 1995, **53**: 951 ~ 958.
- [11] Choi T, Aoki F, Mori M *et al.* Activation of protein p34^{cdc2} kinase activity in meiotic and mitotic cell cycle in mouse oocytes and embryos. *Development*, 1991, **113**: 789 ~ 795.
- [12] Gorens N Dekel. Maintenance of meiotic arrest by a phosphorylated p34^{cdc2} is independent of cyclic adenosine 3' 5'-monophosphate. *Biol Reprod*, 1994, **51**: 956 ~ 962.
- [13] 李朝军, 王斌, 范必勤. 腺嘌呤对体外小鼠卵母细胞减数分裂的抑制. *实验生物学报*, 1994, **27**(4): 457.
- [14] Downs S M, unzicker M Durn. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by sitespecific analogs of cyclic adenosine monophosphate. *Dev Biol*, 1995, **172**: 72 ~ 85.
- [15] 苏友强, 夏国良, 杨传任. 卵母细胞成熟过程中信号转导及调控研究进展. *生理科学进展*, 1999, **30**(4): 345 ~ 348.
- [16] Carroll J, Swann K. Spontaneous cytosolic calcium oscillations driven by inositol triphosphate occur during *in vitro* maturation. *J Biol Chem*, 1992, **267**(16): 11 196 ~ 11 201.
- [17] 邓满齐, 辛俭, 黄秀英. 小鼠卵母细胞成熟和老化的不同阶段受精诱导的胞质 Ca²⁺ 波动. *科学通报*, 1996, **42**(3): 317 ~ 320.
- [18] Deng M Q, Huang X Y, Tang T S *et al.* Spontaneous and fertilization-induced Ca²⁺ oscillations in mouse immature germinal vesicle stage oocytes. *Biol Reprod*, 1998, **58**: 807 ~ 813.
- [19] Jenkins C D. Genetic segregation and the maintenance of sexual reproduction. *Nature*, 1989, **339**: 300 ~ 301.
- [20] Eppig J J, Brine M O, Wigglesworth K. Mammalian oocyte growth and development. *Mol Reprod Dev*, 1996, **44**: 260 ~ 273.
- [21] Kanki J P, Donoghue D J. Progression from meiosis I to meiosis II in xenopus oocytes required de novo translation of the mouse protooncogene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 5 797 ~ 5 798.
- [22] Taieb F, Thibier C, Jessu C. On cyclins, oocytes and eggs. *Mol Reprod Dev*, 1997, **48**: 397 ~ 411.
- [23] Wakayama T, Hayashi Y, Ogura A. Participation of the female pronucleus derived from the second polar body in full embryonic development of mice. *J Reprod Fertic*, 1997, **110**: 263 ~ 266.
- [24] Wakayama T, Yanagimachi R. The first polar body can be used for the production of normal offspring in mice. *Biol Reprod*, 1998, **59**: 100 ~ 104.
- [25] Yoon P W, Freeman S B, Sherman S L *et al.* Advanced maternal age and the risk of Down syndrome characterized by the meiotic stage of chromosome error: a population-based study. *Am J Hum Genet*, 1996, **58**(3): 628 ~ 633.
- [26] 王钦文, 王秀清, 王凤等. D₁ 及 α_2 受体激动剂对卵母细胞表达的 GABA_A 受体的抑制. *中国应用生理学杂志*, 2001, **17**(4): 333 ~ 337.
- [27] 王海滨, 夏国良, 李美玲等. 哺乳动物卵母细胞体外培养体系的研究进展. *农业生物技术学报*, 2000, **8**(3): 297 ~ 310.
- [28] Gill B S, Sears R G. The current status of chromosome analysis in wheat: in chromosome structure and function. *Standler Genet Symp*, 1988, **18**: 299 ~ 322.
- [29] 陈乐真, 张杰. 荧光原位杂交技术及其应用. *细胞生物学杂志*, 1999, **21**(4): 177 ~ 179.
- [30] Fung M C, Fung K Y M. PCR amplification of mRNA directly from a crude cell lysate prepared by thermophilic protease digestion. *Nucleic Acid Res*, 1991, **19**: 4 300 ~ 4 303.
- [31] 范必勤. 哺乳动物第一和第二极体的研究. *农业生物技术学报*, 2000, **8**(2): 103 ~ 105.
- [32] Edwards R G, Wales D S, Edin P H. Maturation *in vitro* of human ovarian oocytes. *Lancet*, 1965, **11**: 926.
- [33] 夏国良, 吕忠显. 促减数分裂甾醇 (MAS) 在辅助生殖生物学中的作用及应用前景. *农业生物技术学报*, 2000, **8**(1): 7 ~ 11.
- [34] 朱必才, 王红艳, 屈艾. 棕色田鼠 XO 雌体育性研究. *动物学报*, 1998, **44**(2): 209 ~ 212.