

王淑娟, 刘文举, 庞训胜, 等. 褪黑素对牛卵母细胞体外成熟及孤雌胚胎发育的影响[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 361-366.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.019

褪黑素对牛卵母细胞体外成熟及孤雌胚胎发育的影响

王淑娟¹, 刘文举¹, 庞训胜¹, 刘宝如², 王立克¹, 闻爱友¹, 杨利国²

(1. 安徽科技学院动物科学学院, 安徽 凤阳 233100; 2. 华中农业大学动物科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 褪黑素对生殖系统发挥着重要调节作用, 本研究旨在探究褪黑素对牛卵母细胞体外成熟和孤雌胚胎发育的影响及作用机制。本试验用化学激活法对牛卵母细胞孤雌激活, 且在卵母细胞体外成熟液和胚胎体外培养液中添加不同浓度(0 pmol/ml、10 pmol/ml、20 pmol/ml、30 pmol/ml)的褪黑素, 以检测牛卵母细胞成熟率和孤雌胚胎发育效果, 同时利用 DCHF-DA 染色方法检测卵母细胞中 ROS 水平, 采用免疫荧光技术检测褪黑素受体 MT1 在牛早期胚胎发育过程中的表达。结果表明, 外源褪黑素可促进卵母细胞体外成熟, 卵母细胞成熟率随褪黑素浓度的增加而升高。褪黑素显著降低了卵母细胞中的 ROS 水平($P < 0.05$), 且卵母细胞中的 ROS 水平随着褪黑素浓度增加而降低。褪黑素可显著提高孤雌胚胎的卵裂率、桑葚胚率和囊胚率($P < 0.05$), 促进胚胎发育。相比对照组, 10 pmol/ml 褪黑素剂量更有利于胚胎发育, 桑葚胚率和囊胚率都显著高于其他试验组。另外, 本研究首次探究了褪黑素受体 MT1 在早期胚胎发育过程中的表达分布。MT1 在未卵裂的激活卵母细胞中主要分布于细胞膜上, 随着孤雌胚胎卵裂的进行, 受体表达量逐渐增加, 主要表达定位于细胞膜上, 随着胚胎发育的进行, MT1 在卵裂球内部开始表达和分布, 退化胚胎中 MT1 表达水平较低。可见, 褪黑素可促进卵母细胞成熟和胚胎发育, 且褪黑素受体 MT1 在胚胎发育早期已开始表达。

关键词: 褪黑素; 牛; 卵母细胞; 活性氧(ROS); 孤雌胚胎; MT1

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)02-0361-06

Influence of melatonin on oocyte *in vitro* maturation and parthenogenetic embryo development in bovine

WANG Shu-juan¹, LIU Wen-ju¹, PANG Xun-sheng¹, LIU Bao-ru², WANG Li-ke¹, WEN Ai-you¹, YANG Li-guo²

(1. College of Animal Science, University of Science and Technology of Anhui, Fengyang 233100, China; 2. Huazhong Agricultural University, College of Animal Science and Technology, Wuhan 430070, China)

Abstract: Melatonin plays an important role in the pathogenesis of many reproductive processes. The study aimed to investigate the effects of melatonin on *in vitro* maturation of bovine oocytes and *in vitro* parthenogenetic embryos development. The oocytes collected from bovine ovaries were cultured in *in vitro* maturation medium. The parthenogenetic embryos were cultured *in vitro* after the chemical activation of oocytes. The different concentrations of melatonin were added to *in vitro* maturation medium and embryo culture medium (0 pmol/ml, 10 pmol/ml, 20 pmol/ml, 30 pmol/ml). *In vitro* maturation rates of bovine oocytes and the parthenogenetic embryos development were detected. The levels of reactive oxygen species (ROS) were detected in bovine oocytes by DCHF-DA staining. The expression of melatonin receptor MT1 was detected in bovine early embryo. The results showed that melatonin improved *in vitro* maturation of

收稿日期: 2016-10-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301972); 安徽省自然科学基金项目(1308085QC66); 安徽省教育厅重点项目(KJ2009B090); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-37-04B)

作者简介: 王淑娟(1980-), 女, 山东菏泽人, 博士, 讲师, 主要从事动物生殖生理研究。(E-mail) wangshujuan2012@hotmail.com

通讯作者: 杨利国, (E-mail) ylg@mail.hzau.edu.cn

in vitro maturation medium and embryo culture medium (0 pmol/ml, 10 pmol/ml, 20 pmol/ml, 30 pmol/ml). *In vitro* maturation rates of bovine oocytes and the parthenogenetic embryos development were detected. The levels of reactive oxygen species (ROS) were detected in bovine oocytes by DCHF-DA staining. The expression of melatonin receptor MT1 was detected in bovine early embryo. The results showed that melatonin improved *in vitro* maturation of

oocytes, and *in vitro* maturation rates of oocytes were increased with increased concentration of melatonin. Meanwhile, the levels of ROS were decreased with increased concentration of melatonin in oocytes. And the rates of cleavage, morula and blastocyst in parthenogenetic embryos were significantly increased, indicating that melatonin promoted the development of embryo. Compared with the control group, 10 pmol/ml melatonin was more conducive to the development of parthenogenetic embryos, reflected by higher rates of morula and blastocyst. Melatonin receptor MT1 was expressed in the cell membrane of noncleaved activated oocytes, and the expression level was lower than that in 16 cells embryos. The expression of MT1 was increased with the development of embryos, and mainly in the cell membrane and blastomeres of embryos. However, MT1 reduced its expression in degenerated embryos. It was inferred that melatonin could induce the level of ROS to improve *in vitro* maturation of bovine oocytes, the development of embryo, and melatonin receptor MT1 was expressed in early embryo.

Key words: melatonin; bovine; oocyte; reactive oxygen species(ROS); parthenogenetic embryo; MT1

动物辅助生殖技术的发展和应用在加速品种改良、提升和保护品种种质等方面具有重要的理论和实践意义。单性生殖技术是动物辅助生殖技术之一,在自然界中,存在很多孤雌生殖的物种,但对于哺乳动物而言,孤雌生殖不是自然生殖方式。目前只能依靠卵母细胞激活方法获得孤雌胚胎,但其并不能发育成个体,主要归咎于其发育过程中缺乏功能胎盘形成所需要的父母基因印迹的表达。孤雌生殖只能作为基础科学研究的基本材料,如用于多功能干细胞研究和胚胎发育、体细胞克隆或卵母细胞核移植等调节机制研究等^[1]。

胚胎在体外和体内的发育有着显著不同,体外胚胎发育能力显著低于体内胚胎,主要原因可能是胚胎在体外培养和发育过程中受到不确定因素较多,在体外很难模拟体内生长环境。活性氧(Reactive oxygen species, ROS)是线粒体呼吸链中的一个正常的产物,然而,其在胚胎体外培养中,却会造成氧化应激,影响胚胎发育^[2]。在体内,胚胎发育产生的 ROS 可以通过细胞内抗氧化酶降解,使得 ROS 和内源自由基清除剂处于平衡状态。因此,在体外培养液中添加抗氧化剂保护卵母细胞和降低胚胎体外培养氧化压力是提高体外胚胎发育的途径之一。

褪黑素(Melatonin, MLT)是一种有效的抗氧化剂和自由基清除剂,其具有亲水性和亲脂性,这一特性决定了褪黑素无需任何载体就可通过细胞膜进入细胞内各个部分,包括亚细胞结构,发挥其抗氧化作用。先前的很多研究结果已经证实,在培养液中添加褪黑素,可以增加小鼠、羊、牛和猪的卵母细胞的成熟率和裂解率,也可促进体外胚胎发育,同时培养液中 ROS 浓度减少^[3-7]。

褪黑素与其受体结合是褪黑素发挥生理功能的另一途径。哺乳动物中存在 2 种褪黑素受体亚型,分

别为 MT1 和 MT2。在动物机体中,其主要分布于神经系统和周边组织,如大脑、下丘脑、中脑、嗅球和视交叉等脑区,在心、肝、脾、肺、肾、胃肠、胸腺、性腺等组织也有表达。有关褪黑素受体在动物机体中的表达开始时间的研究还比较少见,但有研究结果证明,褪黑素受体表达始于早期胚胎。Danilova 等^[8]报道在斑马鱼的胚胎中存在褪黑素受体的表达,且早期胚胎中表达量比较高。在日本鹌鹑中也发现了褪黑素受体在早期胚胎中表达^[9]。这些结果可能说明了褪黑素受体参与褪黑素促进胚胎发育的过程。

目前,国内外关于褪黑素对卵母细胞成熟和胚胎发育影响的研究已有报道^[10],但对其作用机理的研究还有待完善。基于此,本试验通过在牛卵母细胞成熟和孤雌胚胎体外培养体系中添加不同浓度(0 pmol/ml, 10 pmol/ml, 20 pmol/ml, 30 pmol/ml)的褪黑素,观察统计卵母细胞成熟率、ROS 水平、卵裂率、囊胚率,揭示褪黑素促进卵母细胞成熟,MT1 参与早期胚胎发育作用机理,为改善牛体外卵母细胞成熟和早期胚胎发育体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 牛卵巢采自周边屠宰场,在牛屠宰后 30 min 内收集,用生理盐水清洗干净后,放入含有 1% 青-链霉素的 PBS 液(Phosphate buffer saline)中保存于 37 ℃ 保温杯中带回实验室,以进行卵母细胞的分离及培养、体外孤雌胚胎的构建。

1.1.2 试剂及耗材 试剂有 TCM-199、FCS、17 β -E2、EGF、Hepes、BSA、LH、FSH、DMSO、离子霉素、6-DMAP、Hoechst、Triton X-100、多聚甲醛、PI。

耗材有用于显微操作的毛细玻璃管、用于捡卵/胚的毛细玻璃管、不同规格(直径 90 mm, 60 mm,

35mm)的细胞培养皿、载玻片、盖玻片等。

1.1.3 主要试剂的配制

1.1.3.1 卵母细胞用液

(1)卵母细胞体外成熟液(Oocyte *in vitro* mature medium, OMM)配制:15.0 μ g FSH、150.0 ng EGF、30.0 μ g E2、150.0 μ g LH、3.0 ml FCS、0.3 ml 青-链霉素、6.6 mg 丙酮酸盐,加 TCM-199 至 30.0 ml,过滤灭菌,4 $^{\circ}$ C 保存。

(2)卵母细胞操作液配制:0.666 2 g NaCl、0.231 0 g KCl、0.016 8 g NaHCO₃、0.003 6 g NaH₂PO₄、0.238 3 g Hepes、0.300 0 g BSA、200 μ l 丙酮酸钠、144 μ l 乳酸钠、1 ml P/S、0.029 0 g CaCl₂·2H₂O、0.010 2 g MgCl₂·6H₂O、0.5 mg CB, 加超纯水至 100 ml,然后滴入少许酚红,用 NaOH 溶液调节 pH 值为 7.2,过滤灭菌 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

(3)染色液 DCHF-DA 配制:将 DCHF-DA (二氯荧光素)用 DMSO 配制成 1×10^{-3} mol/L 的存储液,避光,-20 $^{\circ}$ C 保存。每次试验前,用 M2 操作液稀释为 1×10^{-5} mol/L。

1.1.3.2 体外胚胎用液

(1)胚胎培养液(Synthetic Oviduct Fluid, SOF)配制:0.015 g 肌醇、300 μ l Non-Eaa、0.090 g BSA、900 μ l Eaa、300 μ l P/S、600 μ l 丙酮酸钠、30 μ l Stock G, 加 Stock C 至 30 ml,过滤灭菌,4 $^{\circ}$ C 保存。

(2)激活剂 激活剂 1 配制:以 OMM 为基础液,配制 5 μ mol/L 的离子霉素溶液。每次试验前新配制。激活剂 2 配制:以 SOF 为基础液,配制 2 mmol/L 的 6-DMAP 溶液。每次试验前新配制。

1.2 试验方法

1.2.1 卵母细胞的分离与培养 用注射器抽取表面颜色明亮、微透明、血管丰富的 3 ~ 6 cm 卵泡内的卵泡液,卵泡液在离心管中沉淀 10 min 后,吸取底部沉淀至盛有捡卵液的平皿中,然后用捡卵针在体式显微镜下捡出至少包裹 1 层卵丘细胞且胞质均匀的卵丘卵母细胞复合体(Cumulus oocyte complexes, COCs)。用卵母细胞成熟液将 COCs 洗涤 3 次,然后分散转入细胞培养皿中不同卵母细胞培养液微滴(卵母细胞培养液中含浓度为 0 pmol/ml、10 pmol/ml、20 pmol/ml、30 pmol/ml 的褪黑素)中,38.5 $^{\circ}$ C 下 5% CO₂ 培养箱中成熟培养 22~24 h。

1.2.2 卵母细胞成熟鉴定 COCs 在卵母细胞成熟液中培养 22~24 h 后,取出移至加入 200 μ l 透

明质酸酶(HAase)的离心管中,37 $^{\circ}$ C 水浴锅中水浴 5 min 消化,然后用移液器轻轻吹打,使卵丘细胞从卵母细胞上脱落,用成熟液洗涤 3 次,将干净的卵母细胞移至卵母细胞操作滴中,观察是否有极体出现,若有,则卵母细胞成熟,反之,则未成熟。

1.2.3 卵母细胞中 ROS 测定 在卵母细胞成熟液中培养 22~24 h 的 COCs,脱去卵丘层后,将其移至配制好的 DCHF-DA 微滴中,在 38.5 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱中孵育 15 min,随后用成熟液洗涤 3 次,洗涤干净的卵母细胞移至成熟液微滴中,在荧光显微镜下观察荧光强度并拍照。

1.2.4 孤雌胚胎的构建与培养 将成熟卵母细胞转入激活剂 1 中,在 38.5 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱中孵育 5 min,然后转入激活剂 2 中,在 38.5 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱中孵育 4 h,最后转入含不同浓度(0 pmol/ml、10 pmol/ml、20 pmol/ml、30 pmol/ml)褪黑素的 SOF 培养液中,继续在 38.5 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱中培养。

1.2.5 胚胎中 MT1 蛋白表达检测 采用胚胎荧光免疫组化方法检测胚胎中 MT1 蛋白表达,用共聚焦显微镜观察 MT1 蛋白在胚胎中的分布。

1.3 数据分析

应用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析卵母细胞中 ROS 累积光密度值(IOD 值)。试验数据利用 SAS8.0 软件进行统计分析,所有数据均以 Mean \pm SD 表示,方差分析以 $P<0.05$ 时为差异显著。

2 结果与分析

2.1 褪黑素对牛卵母细胞体外成熟的影响

不同浓度的褪黑素添加到卵母细胞体外成熟液中,发现其对卵母细胞体外成熟有显著的影响($P<0.05$)。与对照组相比,卵母细胞成熟率随褪黑素浓度的增加而升高。当成熟液中添加 30 pmol/ml 褪黑素时,成熟率最高(66.13 \pm 4.99)(表 1)。

表 1 褪黑素对牛卵母细胞体外成熟的影响

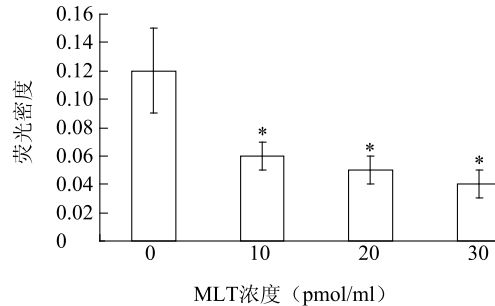
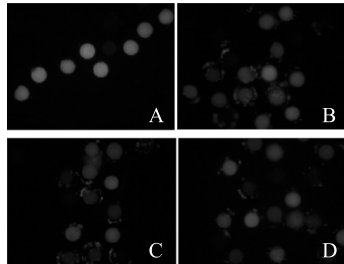
Table 1 Effects of melatonin on oocytes *in vitro* maturation

MLT 浓度 (pmol/ml)	卵丘卵母细胞 复合体个数	成熟率 (%)
0	191	30.36 \pm 6.44a
10	297	50.52 \pm 5.03b
20	221	55.51 \pm 4.90bc
30	231	66.13 \pm 4.99c

同一列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.2 褪黑素对牛卵母细胞中 ROS 的影响

牛卵母细胞体外成熟培养液中添加不同剂量 (0 pmol/ml、10 pmol/ml、20 pmol/ml、30 pmol/ml) 褪黑素,检测其对卵母细胞内 ROS 含量的影响。结果



A、B、C、D 分别为 0 pmol/ml、10 pmol/ml、20 pmol/ml、30 pmol/ml 褪黑素处理后卵母细胞内 ROS 检测 ($\times 100$); * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 1 不同剂量褪黑素对牛卵母细胞内 ROS 水平的影响

Fig.1 Effect of melatonin on ROS in bovine oocytes

2.3 褪黑素对牛孤雌胚胎发育的影响

胚胎培养液 SOF 中添加不同剂量褪黑素 (0 pmol/ml、10 pmol/ml、20 pmol/ml、30 pmol/ml), 培养 7 d 后发现,褪黑素可显著提高孤雌胚胎的卵裂率、桑葚胚率和囊胚率 ($P < 0.05$)。相比对照组,20 pmol/ml 褪黑素剂量组的卵裂率最高。不同浓度褪黑素对孤雌胚胎发育的影响不同,10 pmol/ml 褪黑素剂量组更有利于胚胎发育,桑葚胚率和囊胚率都显著高于其他试验组 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 褪黑素对牛孤雌胚胎发育的影响

Table 2 Effect of melatonin on the development of bovine parthenogenetic embryos

浓度 (pmol/ml)	成熟卵母细胞数	卵裂率 (%)	桑葚胚率 (%)	囊胚率 (%)
0	84	42.32 \pm 17.15a	31.54 \pm 3.76a	6.00 \pm 1.02a
10	102	70.23 \pm 11.01b	66.09 \pm 4.71c	23.90 \pm 4.92c
20	105	71.32 \pm 19.27b	40.75 \pm 5.72ab	13.45 \pm 1.79b
30	90	61.80 \pm 16.95ab	46.76 \pm 9.08b	14.73 \pm 3.63b

同一列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4 牛孤雌胚胎中 MT1 的表达

采用荧光免疫组化方法检测牛孤雌胚胎发育过程中褪黑素受体 MT1 的表达,结果 (图 2) 表明,褪黑素受体的表达随着胚胎发育而变化。当胚胎退化时,受体表达逐渐减弱 (图 2 A、图 2 B、图 2 C);而在未卵裂的卵母细胞中其主要在卵母细胞膜上表达 (图 2 D、图 2 E、图 2 F);随着胚胎卵裂,受体表达逐

(图 1) 表明,与对照组相比,褪黑素显著地降低了卵母细胞内的 ROS 水平 ($P < 0.05$),但各试验组间没有显著的差异。

渐增加,主要集中在外缘细胞膜上 (图 2 G、图 2 H、图 2 I);当胚胎继续卵裂,其内部开始有受体的表达 (图 2 J、图 2 K、图 2 L)。

3 讨论

褪黑素在机体内有着广泛的生理功能,其中其对动物的生殖系统有着重要的调节作用。松果体分泌的褪黑素通过下丘脑-垂体-性腺轴调节动物卵巢功能,首先褪黑素调节下丘脑分泌的促性腺激素释放激素 (Gonadotropin-releasing Hormone, GnRH),而 GnRH 调控黄体生成激素 (Luteinizing Hormone, LH) 和促卵泡激素 (Follicle-stimulating Hormone, FSH) 的分泌,进而调节性腺水平下的卵巢功能^[11]。然而,近年来的研究结果表明,卵巢卵泡中亦可分泌褪黑素,其浓度高于血液中的浓度^[12],且大卵泡中褪黑素浓度高于小卵泡中褪黑素浓度,卵巢中亦存在褪黑素受体结合位点,提示卵泡中的褪黑素亦可直接作用于卵巢,调节卵母细胞发育和成熟^[13]。目前为止,许多研究结果已经证实褪黑素可促进卵泡的发育和成熟^[13],外源褪黑素可促进体外卵母细胞成熟和胚胎的发育^[14-16]。本试验研究了褪黑素对湖北黄牛卵母细胞体外成熟及胚胎体外发育的影响,结果与先前的研究结果一致,卵母细胞体外成熟液中添加褪黑素可显著提高卵母细胞的体外成熟率,并呈现剂量依赖性。

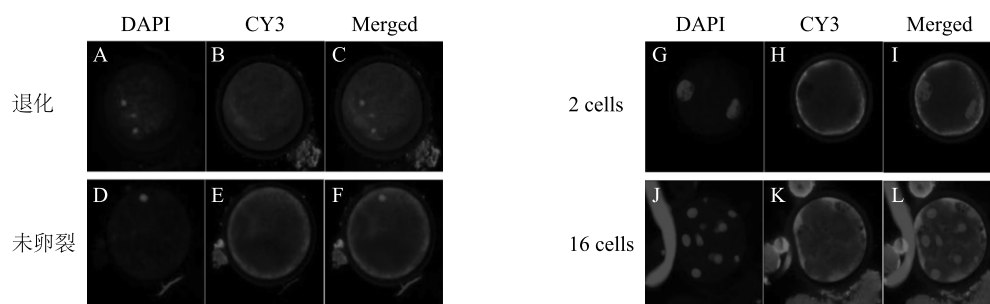


图2 牛孤雌胚胎中褪黑素受体的表达

Fig.2 The expression of melatonin receptor in bovine parthenogenetic embryo

体外培养的卵子或胚胎,因暴露于光、高浓度氧及代谢物中,可加剧氧化应激的发生,产生大量ROS。过高的ROS可破坏细胞膜结构,诱导细胞凋亡,而且损坏线粒体,影响卵母细胞或胚胎的质量^[17-18]。因此,在体外培养体系中添加抗氧化剂抑制氧化应激是优化和改善体外培养技术的重要措施之一。研究表明,褪黑素是一种有效的抗氧化剂和自由基清除剂,其可降低卵母细胞中ROS水平,Zhao等^[16]的研究结果表明,褪黑素添加在冷冻牛卵母细胞体外培养体系中,可显著降低ROS水平,其他研究人员在猪和小鼠体外培养的卵母细胞的研究结果中也得以证实^[7,19]。本试验也得到相似的结果,在牛卵母细胞体外培养体系中添加不同剂量(0 pmol/ml、10 pmol/ml、20 pmol/ml、30 pmol/ml)的外源褪黑素,降低卵母细胞内ROS水平,且褪黑素对卵母细胞内ROS水平减少具有剂量依赖性。由此可见,高剂量的外源褪黑素可通过降低ROS的产生促进卵母细胞成熟。Takada等^[20]证实了褪黑素可保护牛卵丘卵母细胞复合体上卵丘细胞免受DNA损伤,从而提高卵母细胞体外成熟率。Chattoraj等^[21]研究结果表明褪黑素促进成熟诱导激素(Maturaiion-inducing Hormone, MIH)的分泌,而MIH是合成成熟促进因子(Mature Promoting Factor, MPF)的前提;另外,褪黑素抑制颗粒细胞凋亡^[22],是褪黑素促进卵母细胞成熟的另一途径。褪黑素促进卵母细胞成熟机制的研究对提高卵母细胞质量有着重要意义。

先前有研究表明,褪黑素可促进胚胎发育。Shi等^[23]通过研究发现在培养体系中添加一定量的褪黑素可以提高猪卵母细胞体外成熟及胚胎的体外

发育能力,他们发现最适合的浓度为 10^{-9} mol/L,当在成熟液和培养液中都添加 10^{-9} mol/L褪黑素时,可以显著促进猪的卵母细胞成熟及孤雌胚的体外发育。当在成熟液及培养液中都添加 10^{-9} mol/L褪黑素时,其卵裂率,囊胚率分别为79%和35%。褪黑素对体外胚胎发育的促进作用在猪^[23]和羊^[24]等动物中得以证实,推测可能是褪黑素降低了ROS水平,抑制了细胞凋亡。Choi等^[25]通过在mNCSU-23培养液中添加100 pmol/L的褪黑素,发现与没有添加褪黑素的对照组相比,猪孤雌囊胚中的细胞凋亡率显著降低,并且囊胚细胞数也比对照组有显著增加。本试验探究了褪黑素对牛孤雌胚胎体外发育的影响,在牛的孤雌胚胎培养液中添加不同浓度的褪黑素。结果表明,10 pmol/ml组的卵裂率和囊胚率分别达到70.23%和23.90%,显著高于对照组。可见,褪黑素可促进胚胎早期发育,且不同物种间适宜剂量不同。

在哺乳动物中,褪黑素受体MT1和MT2 mRNA在神经系统和周边组织中广泛表达。然而,在牛胚胎早期发育中的表达分布还未见报道,本研究首次证实了褪黑素受体MT1蛋白在牛孤雌胚胎早期发育中的表达,其随着胚胎发育阶段的变化而变化。MT1在牛孤雌胚胎发育的各个时期均有表达,且有逐渐增多的趋势。Danilova等^[8]在斑马鱼上有相似研究,褪黑素受体MT1在斑马鱼早期胚胎和新生儿中均有表达,且表达量高于成年鱼。随着鱼胚胎发育,褪黑素受体mRNA在受精后18 h已经开始表达,随后开始广泛表达,24 h时,在脑部表达量增加,而主动脉、躯干和尾部表达变弱,直至36 h时还在减弱,而脑部的表达依然很强,呈现了组织特异性

分布。褪黑素受体的存在是褪黑素作用的前提,这一结果进一步证明了褪黑素通过与褪黑素受体 MT1 结合,对胚胎早期发育具有重要的调节作用。

参考文献:

- [1] BOS-MIKICH A, BRESSAN F F, RUGGERI R R, et al. Parthenogenesis and human assisted reproduction [J]. Stem Cell Int, 2016, 2016(2): 1-8.
- [2] ROCHA-FRIGONI N A, LEÃO B C, DALLACQUA P C, et al. Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured *in vitro* with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development [J]. Theriogenology, 2016, 86(6): 1897-1905.
- [3] DEGHANI-MOHAMMADABADI M, SALEHI M, FARIFTEH F, et al. Melatonin modulates the expression of Bcl-xl and improve the development of vitrified embryos obtained by IVF in mice [J]. J Assist Reprod Genet, 2014, 31(4): 453-461.
- [4] WANG F, TIAN X, ZHOU Y, et al. Melatonin improves the quality of *in vitro* produced (IVP) bovine embryos: implications for blastocyst development, cryotolerance, and modifications of relevant gene expression [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93641.
- [5] VAZQUEZ M I, FORCADA F, SOSA C, et al. Effect of exogenous melatonin on embryo viability and uterine environment in undernourished ewes [J]. Anim Reprod Sci, 2013, 141(1/2): 52-61.
- [6] ABECIA J A, FORCADA F, CASAO A, et al. Effect of exogenous melatonin on the ovary, the embryo and the establishment of pregnancy in sheep [J]. Animal, 2008, 2(3): 399-404.
- [7] KANG J T, KOO O J, KWON D K, et al. Effects of melatonin on *in vitro* maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells [J]. J Pineal Res, 2009, 46(1): 22-28.
- [8] DANILOVA N, KRUPNIK V E, SUGDEN D, et al. Melatonin stimulates cell proliferation in zebrafish embryo and accelerates its development [J]. FASEB J, 2004, 18(6): 751-753.
- [9] OBLAP R, OLSZANSKA B. Expression of melatonin receptor transcripts (mel-1a, mel-1b and mel-1c) in Japanese quail oocytes and eggs [J]. Zygote, 2001, 9(3): 237-244.
- [10] 王淑娟, 刘文举, 王立克, 等. 褪黑激素对雌性动物生殖系统调节作用的研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 15-20.
- [11] SHI L, LI N, BO L, et al. Melatonin and hypothalamic-pituitary-gonadal axis [J]. Curr Med Chem, 2013, 20(15): 2017-2031.
- [12] YIE S M, BROWN G M, LIU G Y, et al. Melatonin and steroids in human pre-ovulatory follicular fluid: seasonal variations and granulosa cell steroid production [J]. Hum Reprod, 1995, 10(1): 50-55.
- [13] TAMURA H, NAKAMURA Y, KORKMAZ A, et al. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications [J]. Fertil Steril, 2009, 92(1): 328-343.
- [14] LORD T, NIXON B, JONES KT, et al. Melatonin prevents postovulatory oocyte aging in the mouse and extends the window for optimal fertilization *in vitro* [J]. Biol Reprod, 2013, 88(3): 67.
- [15] WANG F, TIAN X, ZHANG L, et al. Beneficial effects of melatonin on *in vitro* bovine embryonic development are mediated by melatonin receptor 1 [J]. J Pineal Res, 2014, 56(3): 333-342.
- [16] ZHAO X M, HAO H S, DU W H, et al. Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes [J]. J Pineal Res, 2016, 60(2): 132-141.
- [17] SIMON H U, HAJ-YEHIA A, LEVI-SCHAEFFER F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction [J]. Apoptosis, 2000, 5(5): 415-418.
- [18] YONEDA A, SUZUKI K, MORI T, et al. Effects of delipidation and oxygen concentration on *in vitro* development of porcine embryos [J]. J Reprod Dev, 2004, 50(3): 287-295.
- [19] NIKMARD F, HOSSEINI E, BAKHTIYARI M, et al. Effects of melatonin on oocyte maturation in PCOS mouse model [J]. Anim Sci J, 2017, 88(4): 586-592.
- [20] TAKADA L, JUNIOR A M, MINGOTI G Z, et al. Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during *in vitro* maturation (IVM) and on *in vitro* embryo development [J]. Res Vet Sci, 2012, 92(1): 124-127.
- [21] CHATTORAJ A, BHATTACHARYA S, BASU D, et al. Melatonin accelerates maturation inducing hormone (MIH): induced oocyte maturation in carps [J]. Gen Comp Endocrinol, 2005, 140(3): 145-155.
- [22] WANG S J, LIU W J, WU C J, et al. Melatonin suppresses apoptosis and stimulates progesterone production by bovine granulosa cells via its receptors (MT1 and MT2) [J]. Theriogenology, 2012, 78(7): 1517-1526.
- [23] SHI J M, TIAN X Z, ZHOU G B, et al. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves *in vitro* maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes [J]. J Pineal Res, 2009, 47(4): 318-323.
- [24] VAZQUEZ M I, ABECIA J A, FORCADA F, et al. Effects of exogenous melatonin on *in vivo* embryo viability and oocyte competence of undernourished ewes after weaning during the seasonal anestrous [J]. Theriogenology, 2010, 74(4): 618-626.
- [25] CHOI J, PARK S M, LEE E, et al. Anti-apoptotic effect of melatonin on preimplantation development of porcine parthenogenetic embryos [J]. Mol Reprod Dev, 2008, 75(7): 1127-1135.

(责任编辑:陈海霞)