

闫嘉欣, 刘炳男, 高子浩, 等. 褪黑素改善绵羊冷冻卵母细胞损伤与发育潜能的研究 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (4): 8-13.

YAN J X, LIU B N, GAO Z H, et al. Melatonin alleviates the damage and improves the developmental potential of frozen ovine oocytes [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (4): 8-13.

## 褪黑素改善绵羊冷冻卵母细胞损伤与发育潜能的研究

闫嘉欣<sup>1</sup>, 刘炳男<sup>1</sup>, 高子浩<sup>1</sup>, 张琳惠<sup>1</sup>, 李嘉<sup>1</sup>, 张慈<sup>1</sup>,  
陶晨雨<sup>1,2</sup>, 李俊杰<sup>1,2</sup>, 夏威<sup>1,2\*</sup>

(1. 河北农业大学动物科技学院, 河北 保定 071000;

2. 河北省牛羊胚胎技术创新中心, 河北 保定 071000)

**摘要:** 为研究褪黑素 (MLT) 对绵羊 GV 期卵母细胞玻璃化冷冻效果的影响, 选取具有 3 层以上致密完整卵丘细胞且胞质均匀的卵丘-卵母细胞复合体, 在玻璃化冷冻解冻液中添加不同浓度 (0、 $10^{-11}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-5}$  mol/L) MLT, 解冻后检测体外成熟液培养 24 h 后卵母细胞以及新鲜组卵母细胞活性氧 (ROS)、 $Ca^{2+}$ 、线粒体膜电位 (MMP) 水平。结果: 与新鲜组相比, 0 mol/L MLT 组 ROS、 $Ca^{2+}$  水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), MMP 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); 相较于 0 mol/L MLT 组, 在玻璃化冷冻解冻液中添加 MLT 可显著降低绵羊玻璃化卵母细胞 ROS 和  $Ca^{2+}$  水平 ( $P < 0.05$ ), 并显著提升卵母细胞 MMP 水平 ( $P < 0.05$ ), 其中绵羊 GV 期卵母细胞玻璃化冷冻过程中 MLT 的最适添加浓度为  $10^{-9}$  mol/L; 与 0 mol/L MLT 组相比,  $10^{-9}$  mol/L 组可显著提高卵母细胞体外受精后卵裂率 (68.64% vs 58.03%,  $P < 0.05$ ) 与囊胚率 (18.97% vs 5.96%,  $P < 0.05$ )。本研究证实玻璃化冷冻解冻液中补充 MLT 可缓解绵羊 GV 期卵母细胞冷冻损伤并提高其发育潜能。

**关键词:** 绵羊; 卵母细胞; 褪黑素; 玻璃化

中图分类号: S814.8 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)04-0008-06

## Melatonin alleviates the damage and improves the developmental potential of frozen ovine oocytes

YAN Jiixin<sup>1</sup>, LIU Bingnan<sup>1</sup>, GAO Zihao<sup>1</sup>, ZHANG Linhui<sup>1</sup>, LI Jia<sup>1</sup>, ZHANG Ci<sup>1</sup>,  
TAO Chenyu<sup>1,2</sup>, LI Junjie<sup>1,2</sup>, XIA Wei<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China;

2. Hebei Province Technology Innovation Center of Cattle and Sheep Embryo, Baoding 071000, China)

**Abstract:** In order to determine the effect of melatonin (MLT) on the vitrification freezing of GV ovine oocytes, we selected the cumulus oocyte complex with more than three layers of dense intact cumulus cells and uniform cytoplasm, and added different concentrations (0,  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$  mol/L) of melatonin to the vitrification freezing and thawing solution. After thawing, the levels of reactive oxygen species (ROS),  $Ca^{2+}$  and mitochondrial membrane potential (MMP) of oocytes cultured *in vitro* maturation medium for 24 hours were detected. The results showed that, compared with the fresh group, the levels of ROS and  $Ca^{2+}$  in the 0 mol/L MLT group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the level of MMP was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the 0 mol/L MLT group, the addition of melatonin in vitrification freezing and thawing solution significantly reduced the ROS level and  $Ca^{2+}$  concentration ( $P < 0.05$ ), and significantly increased the MMP level of the oocytes ( $P < 0.05$ ). The optimal melatonin concentration was  $10^{-9}$  mol/L during vitrification of the GV stage oocytes. Compared with the 0 mol/L MLT group, the  $10^{-9}$  mol/L group significantly increased the cleavage rate of oocytes (68.64% vs 58.03%,  $P < 0.05$ ) and the blastocyst rate (18.97% vs 5.96%,  $P < 0.05$ ). This study confirmed that melatonin supplementation in vitrification freezing and thawing solution alleviated GV stage ovine oocytes cryoinjury and improved their developmental potential.

**Keywords:** sheep; oocytes; melatonin; vitrification

收稿日期: 2024-04-26; 修回日期: 2025-02-12

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1200401); 河北省自然科学基金联合基金项目 (C2023204007); 河北省教育厅重点项目 (ZD2022005); 河北省留学回国人才项目 (ZD20220513); 河北农业大学人才引进专项项目 (YJ2021013)

第一作者: 闫嘉欣, 女, 硕士研究生

\* 通信作者: 夏威, 博士, 副教授, 主要从事畜禽繁殖方面的研究, E-mail: xiaweihawaii@163.com。

在家畜育种中，卵母细胞冷冻保存对家畜遗传资源的保护与利用至关重要<sup>[1]</sup>。卵母细胞冷冻保存技术一般分为控制速率的慢速冷冻技术和玻璃化冷冻技术。卵母细胞是哺乳动物体内最大的细胞，其膜对冷冻保护剂渗透性低，因此其冷冻保存需要足够慢的冷冻速率来获得足够的冷冻保护剂渗透性<sup>[2]</sup>。相较于传统慢速冷冻，玻璃化是一种超快速的手动冷却过程，即使液体快速过渡到玻璃状阶段，产生玻璃状（无冰晶）凝固。玻璃化冷冻程序因使用高浓度冷冻保护剂使卵母细胞脱水，水在冷却过程中无法形成细胞间和细胞内冰晶，有效避免了卵母细胞在冷冻过程中因出现冰晶而损伤，能大大提高卵母细胞冷冻效率。虽然卵母细胞可以通过玻璃化冷冻保存而不会形成冰晶，但高浓度冷冻保护剂仍会引起极端的渗透应激和化学毒性<sup>[3-4]</sup>，产生大量活性氧（ROS），造成卵母细胞氧化应激，阻碍卵母细胞体外成熟，导致胚胎发育潜力降低<sup>[5]</sup>。

褪黑素（melatonin, MLT）是一种强抗氧化剂，直接负责清除自由基，其代谢物也具有同样功能<sup>[6-7]</sup>。同时，MLT还可激活一些自由基清除途径并参与抗氧化系统，增强超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶等抗氧化酶活性，保护细胞免受氧化损伤<sup>[8-10]</sup>。此外，大量研究已证实，在冷冻保存培养基中添加外源性MLT，可改善冷冻保存对生殖细胞和组织的一些负面影响<sup>[11-14]</sup>，但是在绵羊GV期卵母细胞的玻璃化冷冻过程中使用MLT还未见报道。本试验旨在探讨MLT对绵羊GV期卵母细胞玻璃化冷冻效果的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和MLT的配制

所有化学药品和试剂除另做说明外均购自Sigma-Aldrich公司；培养基199（TCM-199）、磷酸盐缓冲盐水（PBS）、胎牛血清（FBS）购自Gibco公司。

MLT的配制：先用少量无水乙醇预溶为 $10^{-1}$  mol/L的浓储液，再用DMSO将其稀释至 $10^{-3}$  mol/L，在 $-20$  °C的冰箱中避光保存，最后根据需要添加到玻璃化冷冻预处理液、玻璃化冷冻液以及玻璃化解冻液中，配制终浓度分别为 $10^{-5}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-11}$  mol/L的溶液。用 $0.22$  μm的微孔滤膜过滤后分装，再放入 $-20$  °C冰箱保存。

### 1.2 绵羊卵巢采集与处理

在保定市唐县指定屠宰场采集绵羊卵巢，剪下的卵巢立即放入含有灭菌盐水（含青霉素、链霉素）的保温瓶中，温度维持在 $38$  °C左右，4 h内带回实验室。随后将卵巢转运至实验室进行分析。先将卵巢用

$38$  °C预热的生理盐水清洗3~5遍，经灭菌剪刀剪去卵巢上附着的系膜等多余组织后，用75%酒精快速洗涤1遍，立即放入生理盐水反复清洗至水体澄清。

### 1.3 绵羊卵母细胞获取

将卵巢清洗干净后，用刀片划破卵巢表面直径为2~6 mm的卵泡，在体视显微镜下筛选出具有3层以上完整致密卵丘细胞且胞质均匀的卵丘-卵母细胞复合体（COCs）进行后续试验。

### 1.4 试验设计

GV期卵母细胞随机分为新鲜组（Fresh组），玻璃化冷冻组（Vit组，不添加MLT）和玻璃化添加不同浓度MLT组（ $10^{-11}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-5}$  mol/L MLT组）。根据各组卵母细胞冷冻复苏后胞内活性氧（ROS）、 $Ca^{2+}$ 和线粒体膜电位（MMP）水平确定最佳MLT浓度。再对新鲜组、Vit组和玻璃化MLT最佳处理浓度组进行体外受精、早期胚胎培养，统计卵裂率、桑葚胚率和囊胚率。

### 1.5 卵母细胞冷冻复苏

将挑选出的COCs先于预处理溶液中处理30 s，再移至玻璃化冷冻液孵育，25 s内将COCs吸入开放式拉长塑料细管（OPS）中，随即浸入液氮保存。

从液氮中取出OPS后，浸入含 $0.5$  mol/L蔗糖的 $38.5$  °C解冻液中，并利用口吸管将COCs从OPS中吹至 $0.5$  mol/L蔗糖解冻液中，再将COCs依次转移到 $0.25$ 和 $0.125$  mol/L蔗糖解冻液，3种梯度浓度溶液分别孵育2、2和1 min，缓慢脱毒，最后将已解冻的COCs在成熟液中洗涤3次，然后转移至 $38.5$  °C、5%  $CO_2$ 培养箱中培养。

### 1.6 细胞内ROS水平检测

收集各组体外成熟（IVM）后的卵母细胞，用透明质酸酶溶液脱去卵丘细胞，染色缓冲液洗3次后，挑选胞质均匀、透明带完整圆滑的卵母细胞放入含有 $10$  μmol/L H2DCFDA（ROS）染色液中，移入 $38.5$  °C，5%  $CO_2$ 的培养箱孵育20 min。缓冲液洗3次后将各组细胞置于 $100$  μL缓冲液中，在荧光显微镜下观察并拍照，用ImageJ软件统计各组细胞染色情况。

### 1.7 细胞内 $Ca^{2+}$ 水平检测

将钙离子荧光探针（Fluo-4AM）原液用PBS稀释为 $5$  μmol/L工作液，现用现配，避光 $37$  °C预热。用透明质酸酶脱去各组IVM后卵母细胞，PBS洗3遍后挑选形态正常的卵母细胞置于 $5$  μmol/L工作液 $37$  °C避光孵育30 min，再用PBS洗3次后 $37$  °C继续避光孵育30 min，以确保细胞内Fluo-4AM完全转变为Fluo-4，Fluo-4可与 $Ca^{2+}$ 结合并产生较强荧光。利用荧光显微镜拍摄各组染色情况，并用ImageJ检

测 Fluo-4 荧光强度, 以比较各组细胞  $\text{Ca}^{2+}$  水平差异。

### 1.8 MMP 水平检测

用 JC-1 染色缓冲液 200 倍稀释 JC-1 (200 $\times$ ) 染色液为 JC-1 染色工作液, 再按 1:1 比例将 JC-1 染色工作液加入 IVM 液中, 配制所需用量后避光预热备用。收集各组已脱卵丘卵母细胞后, IVM 液清洗 3 次, 放入含有 1/2 JC-1 染色工作液的 IVM 液滴中, 培养箱避光孵育 30 min, JC-1 染色缓冲液洗 3 次, 置于荧光显微镜下观察并拍摄红色与绿色荧光, 再利用 ImageJ 分析两种荧光强度, 两者的比值即为相对荧光强度。

### 1.9 卵母细胞体外受精

**精子获能:** 取 2 mL 冻精获能液于 4 mL 离心管中, 体外受精液 1~1.5 mL 于 1.5 mL 离心管, 同时做 30  $\mu\text{L}$  受精液滴用石蜡油覆盖。将三者放入培养箱预平衡 2~4 h。每根冻存细管中的精液约可处理 3 滴受精液滴, 根据受精液滴数量选取合适数量的绵羊冷冻精液, 手持棉花端将细管浸入 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴解冻, 棉花端不能浸水。剪开已解冻精液两端使其流入准备好的离心管内, 再用 1 mL 移液枪将精液缓慢打入预平衡的 2 mL 冻精获能液底部。将含有精液 4 mL 离心管开口倾斜 30 $^{\circ}$  置于培养箱上浮 40 min, 使其充分获能。

**体外受精:** 将各组成熟后卵母细胞用透明质酸酶溶液洗脱卵丘细胞至 2~3 层, 用预平衡的受精液清洗 3 次后, 放入受精液滴, 每滴 15~20 个卵母细胞, 放回培养箱等待后续处理。取出已获能精液, 吸取上层液体于 1.5 mL 离心管 1 000 r/min 离心 8 min 后, 弃清液, 留 200  $\mu\text{L}$  左右即可, 再加入适量受精液, 吹打混匀。每个含有卵母细胞的受精液滴打入 20  $\mu\text{L}$  处理好的精子, 显微镜下观察精子推着卵母细胞逆时针旋转并向前运动, 精卵共同置于 38.5  $^{\circ}\text{C}$ 、5%

$\text{CO}_2$ 、100% 湿度培养箱培养 20 h。

### 1.10 早期胚胎体外培养和相关指标测定

将 50  $\mu\text{L}$  早期胚胎发育液滴于 35 mm 培养皿用石蜡油膜覆盖, 并取 1 mL 早期胚胎发育液于 1.5 mL 离心管, 将离心管开盖和培养皿一同置于 38.5  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱预平衡 2~4 h。将各组完成体外受精培养的受精卵用预平衡的早期胚胎发育液洗涤干净, 反复吹打洗涤液滴以去除死去的精子与卵丘细胞, 再清洗 3 至 4 次后, 放入已备好的早期胚胎发育液滴, 每滴可放 10~20 枚受精卵。移入培养箱在 38.5  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度条件下培养。

早期胚胎培育 48 h 后统计卵裂数。半换液, 即弃一半原液体, 再加一半新的预平衡 2 h 的早期胚胎发育液 (注意换液时切勿吸到胚胎), 继续放入培养箱培育 48 h 后, 即早期胚胎培育第 5 天统计桑葚胚数。半换液 (步骤同上) 后, 继续培育 72~96 h, 第 7~8 天统计囊胚数。根据卵裂胚胎数计算桑葚胚率与囊胚率。每项试验至少重复 3 次。

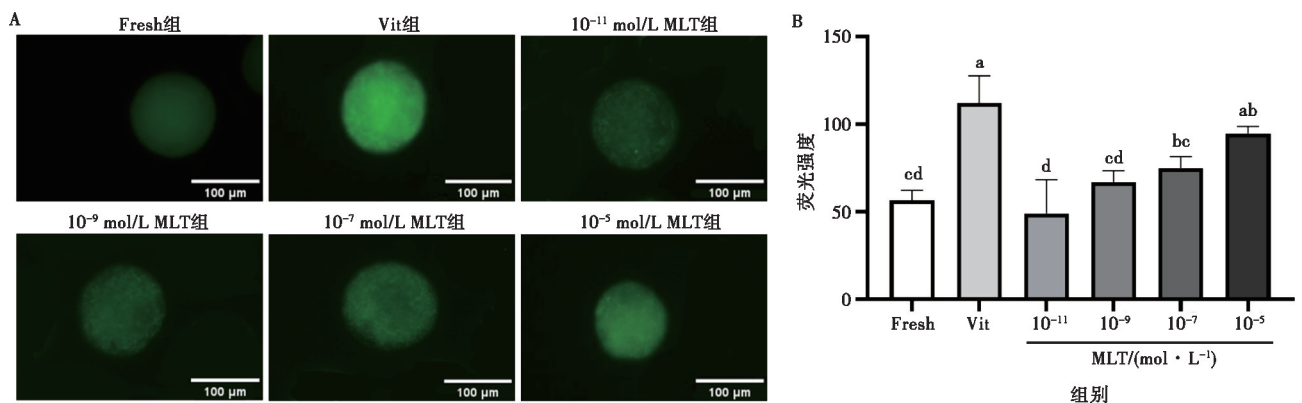
### 1.11 数据统计和分析

采用 SPSS 21.0 统计软件, 对试验结果进行独立样本  $t$  检验, 数据以“平均值 $\pm$ 标准差”表示。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度 MLT 对解冻后绵羊卵母细胞 ROS 水平的影响

ROS 过量会导致卵母细胞质量下降和玻璃化后的存活率降低, 图 1 结果表明, 新鲜组与  $10^{-11}$ 、 $10^{-9}$  mol/L MLT 组 ROS 水平较冷冻对照组、 $10^{-5}$  mol/L MLT 组显著降低 ( $P<0.05$ ), 荧光染色结果说明冷冻造成了卵母细胞内 ROS 的累积, 而  $10^{-11}$ 、 $10^{-9}$  mol/L MLT 组可显著降低细胞内 ROS 水平, 减少细胞氧化应激 (图 1)。



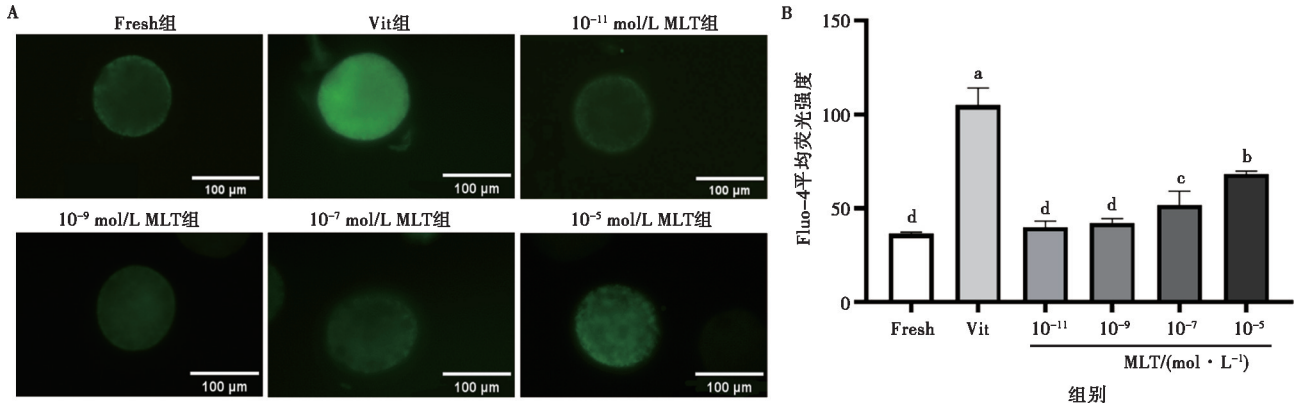
注: A 为染色荧光图; B 为荧光强度统计分析, 不同小写字母代表差异显著 ( $P<0.05$ ), 下同。

图 1 不同浓度褪黑素对解冻后绵羊卵母细胞 ROS 水平的影响

## 2.2 不同浓度 MLT 对解冻后绵羊卵母细胞 $Ca^{2+}$ 水平的影响

由图 2 可知, 与 Vit 组和  $10^{-5}$  mol/L MLT 组相比, 新鲜组与  $10^{-11}$ 、 $10^{-9}$  mol/L MLT 组  $Ca^{2+}$  水平均显

著降低 ( $P < 0.05$ ), 且  $10^{-11}$ 、 $10^{-9}$  mol/L MLT 组与新鲜组  $Ca^{2+}$  水平相当, 表明冷冻增加了卵母细胞的  $Ca^{2+}$  浓度, 而补充  $10^{-11}$ 、 $10^{-9}$  mol/L MLT 可阻止细胞内  $Ca^{2+}$  浓度的增加。



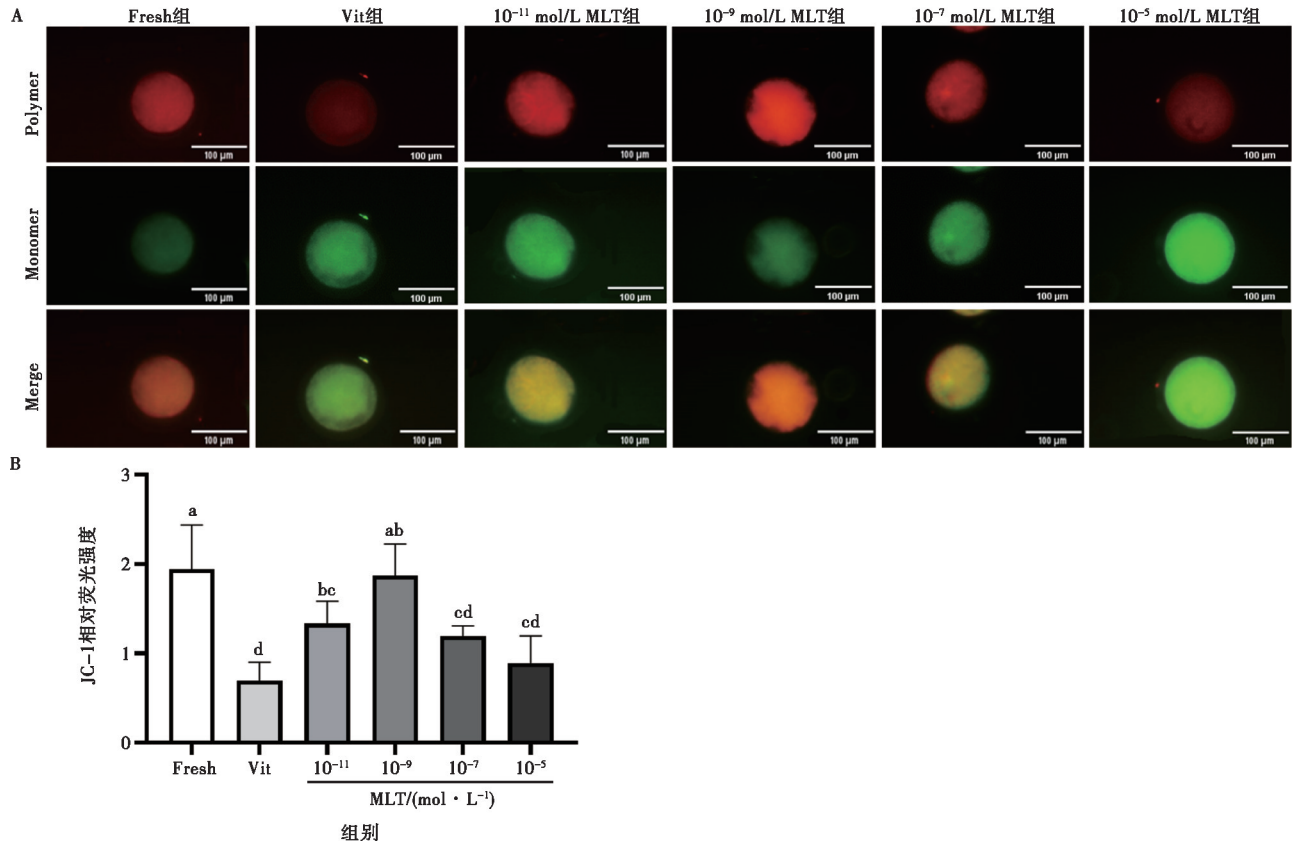
A. 染色荧光图; B. 荧光强度统计。

图 2 不同浓度褪黑素对解冻后绵羊卵母细胞  $Ca^{2+}$  水平的影响

## 2.3 不同浓度 MLT 对解冻后绵羊卵母细胞 MMP 水平的影响

由图 3 可知, Vit 组的 MMP 水平相较于新鲜组和  $10^{-9}$  mol/L MLT 组显著降低 ( $P < 0.05$ ); Vit 组以及添加不同浓度 MLT 组间比较, 以  $10^{-9}$  mol/L MLT 组

的 MMP 水平最高, 且该组与新鲜组 MMP 水平相当。染色结果表明, 玻璃化冷冻导致胞内 MMP 水平显著降低, 而补充  $10^{-9}$  mol/L MLT 可显著提高并维持其 MMP 水平, 结合上述染色结果, 确定  $10^{-9}$  mol/L MLT 为玻璃化冷冻解冻液最适添加浓度并进行后续试验。



A. JC-1 染色荧光图; B. JC-1 相对荧光强度 (染色红色和绿色荧光强度的比值)。

图 3 不同浓度褪黑素对解冻后绵羊卵母细胞 MMP 水平的影响

## 2.4 MLT 处理对冻融后卵母细胞早期胚胎发育的影响

如表 1 所示, 与 Vit 组相比, 在玻璃化冷冻过程

中添加  $10^{-9}$  mol/L MLT 能显著提高卵母细胞卵裂率与囊胚率 ( $P < 0.05$ )。

表 1 MLT 处理对冻融绵羊卵母细胞早期胚胎发育的影响

组别	卵母细胞数/枚	卵裂率/%	桑葚胚率/%	囊胚率/%
Fresh	105	82.01±2.35 <sup>a</sup>	72.19±1.65 <sup>a</sup>	32.39±2.43 <sup>a</sup>
Vit	88	58.03±0.69 <sup>c</sup>	63.27±3.33 <sup>b</sup>	5.96±0.70 <sup>c</sup>
$10^{-9}$ mol/L MLT	93	68.64±1.20 <sup>b</sup>	68.65±2.48 <sup>ab</sup>	18.97±1.07 <sup>b</sup>

注: 同列比较, 小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

本试验探讨了在玻璃化冷冻解冻液中添加 MLT 对绵羊卵母细胞 ROS、 $Ca^{2+}$ 、MMP 水平的影响, 并以此筛选出绵羊 GV 期卵母细胞玻璃化冷冻过程中添加 MLT 的最适浓度为  $10^{-9}$  mol/L, 并证实  $10^{-9}$  mol/L MLT 能显著冷冻绵羊卵母细胞后期发育能力。

玻璃化冷冻技术的优化对于提高冷冻保存卵母细胞的存活率和增强细胞质量意义重大, 有利于保护动物种质资源<sup>[15]</sup>。然而玻璃化冷冻会导致卵母细胞产生大量的 ROS, 过量的 ROS 会影响卵母细胞的发育并加速其凋亡<sup>[16]</sup>。已有研究证明, 除促进卵母细胞体外成熟外, 在培养基中添加适量的 MLT 也有促进孤雌激活, 刺激卵母细胞和胚胎发育的作用<sup>[17]</sup>。同时有研究指出, 补充  $10^{-9}$  mol/L MLT 可显著降低牛卵母细胞的 ROS 水平, 抑制玻璃化牛卵母细胞凋亡, 增强其发育潜力<sup>[18]</sup>。此外, Zhang 等<sup>[19]</sup>发现, 添加  $10^{-9}$  mol/L MLT 可以清除过量的 ROS, 增加了冷冻复苏后小鼠 MII 期卵母细胞发育潜力。本研究发现, 相较于 0 mol/L 组, 在玻璃化冷冻解冻液中添加 MLT 可显著降低绵羊玻璃化卵母细胞 ROS 水平, 表明 MLT 可保护绵羊 GV 期卵母细胞免受冷冻造成的氧化应激损伤。

MMP 和  $Ca^{2+}$  水平的稳定性对保障卵母细胞的质量尤为重要。高水平的 ROS 会改变 MMP, 并触发  $Ca^{2+}$  稳态失调, 从而导致更大的钙负荷<sup>[20]</sup>。同样, 也有研究表明, 人卵母细胞在解冻后 MMP 显著降低<sup>[21]</sup>。同时, MMP 的改变可诱导细胞色素 C 的释放, 导致 caspase 级联反应和细胞凋亡<sup>[22]</sup>。本试验发现, 在玻璃化冷冻过程中添加 MLT 可显著降低绵羊 GV 期卵母细胞内  $Ca^{2+}$  水平, 并提升卵母细胞 MMP 水平, 其中以在绵羊 GV 期卵母细胞玻璃化冷冻过程中添加浓度为  $10^{-9}$  mol/L 的 MLT 效果最好。综合上述结果, 推测在玻璃化冷冻解冻液中添加 MLT 可通过降低卵母细胞氧化应激与钙负荷, 维持胞内正常线

粒体膜电位水平, 改善卵母细胞质量。

体内胚胎在附植前阶段可用生殖道中存在的除氧剂 (如维生素、丙酮酸、谷胱甘肽、超氧化物歧化酶和半胱胺) 保护自己。然而, 体外培养的胚胎没有母体环境的支持, 完全依靠其内在的抗氧化途径来清除 ROS。有报道显示, 在玻璃化过程中补充 MLT 可提高水牛卵母细胞的形态正常率、卵裂率和囊胚率<sup>[23]</sup>。本试验中, 在玻璃化过程添加  $10^{-9}$  mol/L MLT 可显著提高绵羊卵母细胞复苏后卵裂率和囊胚率, 表明在玻璃化冷冻解冻液中添加  $10^{-9}$  mol/L MLT 可提高冷冻绵羊卵母细胞后期发育能力。

GV 期卵母细胞纺锤体还未形成, 相比于 MII 期卵母细胞, 有效降低了冷冻对其造成的损伤<sup>[24]</sup>。GV 期卵母细胞采集后可直接进行玻璃化冷冻, 可充分利用卵巢资源, 避免了冷冻 MII 期卵母细胞因体外成熟率低导致卵母细胞数量大幅减少的困扰。本试验采用 GV 期卵母细胞作为试验材料, 发现在玻璃化冷冻解冻液中添加  $10^{-9}$  mol/L MLT 可有效提高冷冻绵羊 GV 期卵母细胞冷冻效率, 为优化绵羊 GV 期卵母细胞玻璃化冷冻程序提供参考。本试验虽已证实补充 MLT 可有效提高冷冻绵羊卵母细胞囊胚率, 但并未对体外受精、胚胎发育情况进行检测, 后续可进一步检测 MLT 对精卵融合、囊胚质量的影响。

## 4 结论

在玻璃化冷冻解冻液中添加  $10^{-9}$  mol/L MLT 可有效降低绵羊 GV 期卵母细胞氧化应激与钙负荷, 维持胞内正常 MMP 水平, 改善绵羊 GV 期卵母细胞质量, 提高卵母细胞发育潜力。

## 参考文献:

- [1] RIBEIRO J C, CARRAGETA D F, BERNARDINO R L, et al. Aquaporins and animal gamete cryopreservation: advances and future challenges [J]. *Animals (Basel)*, 2022, 12 (3): 359.

- [2] THARASANIT T, THUWANUT P. Oocyte cryopreservation in domestic animals and humans: principles, techniques and updated outcomes [J]. *Animals (Basel)*, 2021, 11 (10): 2949.
- [3] KOUTLAKI N, SCHOEPFER B, MAROULIS G, et al. Human oocyte cryopreservation: past, present and future [J]. *Reprod Biomed Online*, 2006, 13 (3): 427-436.
- [4] WOODS E J, BENSON J D, AGCA Y, et al. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues [J]. *Cryobiology*, 2004, 48 (2): 146-156.
- [5] CHANG C C, SHAPIRO D B, NAGY Z P. The effects of vitrification on oocyte quality [J]. *Biol Reprod*, 2022, 106 (2): 316-327.
- [6] GALANO A, TAN D X, REITER R J. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK [J]. *J Pineal Res*, 2013, 54 (3): 245-257.
- [7] TORDJMAN S, CHOKRON S, DELORME R, et al. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2017, 15 (3): 434-443.
- [8] BARLOW-WALDEN L R, REITER R J, ABE M, et al. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity [J]. *Neurochem Int*, 1995, 26 (5): 497-502.
- [9] RODRIGUEZ C, MAYO J C, SAINZ R M, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin [J]. *J Pineal Res*, 2004, 36 (1): 1-9.
- [10] GILGUN-SHERKI Y, ROSENBAUM Z, MELAMED E, et al. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state [J]. *Pharmacol Rev*, 2002, 54 (2): 271-284.
- [11] IVANOV D, MAZZOCOLI G, ANDERSON G, et al. Melatonin, its beneficial effects on embryogenesis from mitigating oxidative stress to regulating gene expression [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (11): 5885.
- [12] SANCHEZ-AJOFRIN I, MARTIN - MAESTRO A, MEDINA - CHAVEZ D A, et al. Melatonin rescues the development and quality of oocytes and cumulus cells after prolonged ovary preservation: an ovine *in vitro* model [J]. *Theriogenology*, 2022, 186: 1-11.
- [13] POOL K R, RICKARD J P, DE GRAAF S P. Melatonin improves the motility and DNA integrity of frozen-thawed ram spermatozoa likely via suppression of mitochondrial superoxide production [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2021, 74: 106516.
- [14] CRUZ M H C, LEAL C L V, CRUZ J F, et al. Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage [J]. *Theriogenology*, 2014, 82 (7): 925-932.
- [15] ZHUAN Q, LI J, DU X, et al. Antioxidant procyanidin B2 protects oocytes against cryoinjuries via mitochondria regulated cortical tension [J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2022, 13 (1): 95.
- [16] SASAKI H, HAMATANI T, KAMIJO S, et al. Impact of oxidative stress on age-associated decline in oocyte developmental competence [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 811.
- [17] SOTO-HERAS S, ROURA M, CATALA M G, et al. Beneficial effects of melatonin on *in vitro* embryo production from juvenile goat oocytes [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2018, 30 (2): 253-261.
- [18] 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.
- [19] ZHANG Y, LI W, MA Y, et al. Improved development by melatonin treatment after vitrification of mouse metaphase II oocytes [J]. *Cryobiology*, 2016, 73 (3): 335-342.
- [20] TRIPATHI A, SHRIVASTAV T G, CHAUBE S K. Aqueous extract of *Azadirachta indica* (neem) leaf induces generation of reactive oxygen species and mitochondria-mediated apoptosis in rat oocytes [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29 (1): 15-23.
- [21] CAMARGOS M, RODRIGUES J K, LOBACH V N, et al. Human oocyte morphometry before and after cryopreservation: a prospective cohort study [J]. *Cryobiology*, 2019, 88: 81-86.
- [22] GHANBARI F, NASARZADEH P, SEYDI E, et al. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction induced by single- and multiwall carbon nanotubes: a comparative study [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2017, 105 (7): 2047-2055.
- [23] KANDIL O M, RAHMAN S, ALI R S, et al. Effect of melatonin on developmental competence, mitochondrial distribution, and intensity of fresh and vitrified/thawed *in vitro* matured buffalo oocytes [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2024, 22 (1): 39.
- [24] GUO S, YANG J, QIN J, et al. Melatonin promotes *in vitro* maturation of vitrified-warmed mouse germinal vesicle oocytes, potentially by reducing oxidative stress through the Nrf2 pathway [J]. *Animals (Basel)*, 2021, 11 (8): 2324.