

骆驼低温保存胚胎种间移植技术的应用

刘鹤洁¹, 娜哈雅¹, 谢望为¹, 吉木斯¹, 哈斯高娃¹, SODNOMPIL Tserennadmid¹,
莫丽梅², 娜仁花^{1*}, HERRID Muren³, ELSHAZLY Mohamed⁴,
NIASARI-NASLAJI Amir⁵, 吉日木图⁶, 满都呼⁷, 孟克巴依尔⁸

(1. 内蒙古农业大学 动物科学学院, 中国内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 华南农业大学 人文与法学学院, 中国广东 广州 510642; 3. 国际家畜研究中心, 澳大利亚昆士兰州 黄金海岸 4217; 4. Aljazeera 兽医研究中心, 阿联酋 阿莱茵 999041; 5. 德黑兰大学 兽医学院 临床科学系, 伊朗 德黑兰 14155-6453; 6. 内蒙古骆驼研究院, 中国内蒙古 巴丹吉林 737300; 7. 内蒙古农业大学 科技园区管理办公室, 中国内蒙古 呼和浩特 010018; 8. 内蒙古阿拉善盟畜牧兽医技术推广中心, 中国内蒙古 巴彦浩特 737306)

摘要: 通过低温保存的方式, 将保存 35 h 的高产奶量单峰驼胚胎进行种间移植, 使高寒地区低产奶量的双峰母驼生产单峰驼羔。选取 15 头单峰驼供体, 在其交配后 8 d 共收集 114 枚胚胎, 其中 83 枚用于检测低温保存液对胚胎的影响, 31 枚经 35 h 运输抵达受体双峰驼所在的驼场, 进行种间移植。结果显示, 低温保存 24 h 组的胚胎在体外培养 24 h、48 h 和 72 h 后, 其存活率(依次为 75%、68%和 64%)与对照组(依次为 88%、80%和 80%)相比均无显著差异($P>0.05$); 低温保存 48 h 组的胚胎在体外培养 24 h、48 h 和 72 h 后, 其存活率(依次为 67%、60%和 57%)均显著低于对照组($P<0.05$), 但与低温保存 24 h 组相比均无显著差异($P>0.05$); 胚胎移植后的第 1 个月, 4 头受体怀孕(4/9, 44%), 其中 2 头受体分别在妊娠第 382 天和第 389 天顺利产下 1 头健康的公驼羔(2/9, 22%)。以上结果表明, 低温保存 35 h 的单峰驼胚胎可以移植到双峰驼体内并进行孕育生产。本次骆驼种间胚胎移植的成功为将高产奶单峰驼从原本干燥炎热的栖息地引入世界其他不同气候地区提供了参考。

关键词: 单峰驼; 双峰驼; 低温保存; 种间胚胎移植

中图分类号: Q953

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)04-0324-06

Application of Interspecific Transfer Technique for Cryopreserved Camel Embryos

LIU Hejie¹, Nahaya¹, XIE Wangwei¹, Jimusi¹, Hasigaowa¹, SODNOMPIL Tserennadmid¹, Molimei², Narenhua^{1*}, HERRID Muren³, ELSHAZLY Mohamed⁴,
NIASARI-NASLAJI Amir⁵, Jirimutu⁶, Manduhu⁷, Mengkebayier⁸

(1. College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China; 2. College of Humanities and Law, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China; 3. International Livestock Research Centre, Gold Coast 4217, Queensland, Australia; 4. Aljazeera Veterinary Research Center, Al Alin 999041, United Arab Emirates; 5. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran 14155-6453, Iran; 6. Inner Mongolia Camel Research Institute, Badanjilin 737300, Inner Mongolia, China; 7. Management Office of Science and Technology Park, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China; 8. Inner Mongolia Alashan League Animal Husbandry and Veterinary Technology Promotion Center, Bayanhot 737306, Inner Mongolia, China)

Abstract: Through cryopreservation, 35 h-stored embryos of high-milk yield dromedary camels, were transplanted into bactrian camels, which have lower milk yield and are adapted to cold areas, to breed dromedary lambs. A group of 15 dromedary camels were selected as embryo donors, and within 8 days after mating, a

收稿日期: 2022-08-05; 修回日期: 2023-02-25; 网络首发日期: 2023-07-19

作者简介: 刘鹤洁(1999—), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: liuhejie0510@163.com; *通信作者: 娜仁花(1968—), 女, 内蒙古巴彦淖尔人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事动物繁殖生理与生物技术研究, E-mail: narenhua68@163.com。

total of 114 embryos were collected. Of these embryos, 83 were subjected to testing the efficacy of low-temperature preservation, while the rest 31 were transported for 35 hours to a camel field for subsequent transplantation with recipient bactrian camels. The results showed that, after cultured *in vitro* for 24 h, 48 h, and 72 h, there was no statistically significant difference ($P>0.05$) in survival rates between the 24 h-cryopreserved embryos (75%, 68%, and 64%, respectively) and the control embryos (88%, 80%, and 80%, respectively). However, survival rates of 48 h-cryopreserved embryos (67%, 60%, and 57%, respectively) were significantly lower ($P<0.05$) than those of the control embryos after cultured *in vitro* for 24 h, 48 h, and 72 h, but had no significant difference ($P>0.05$) compared with those of 24 h-cryopreserved embryos. Within the first month after embryo transplantation, 4 recipient bactrian camels became pregnant (4/9, 44%), and 2 of them successfully gave birth to healthy male camel offspring on days 382 and 389, respectively, after pregnancy (2/9, 22%). The results demonstrated that 35 h-cryopreserved embryos of dromedary camels can be transplanted into bactrian camels for breeding and production. The successful interspecies embryo transplantation offers references to introduce highly productive dromedary camels from their arid and hot native habitats to other parts of the world with different climates.

Key words: dromedary camel; bactrian camel; low-temperature preservation; interspecies embryo transfer
(*Life Science Research*, 2023, 27(4): 324-329)

家养骆驼分为单峰驼(dromedary camel)和双峰驼(bactrian camel)两个种类。单峰驼主要分布在北非、西亚和澳大利亚等地,而双峰驼则生活在亚洲中部和东北部的寒冷沙漠地带^[1]。虽然以上两个物种在400万年至500万年前的进化路径上产生了分支,但并未形成生殖隔离,在交配或胚胎移植后仍能产生可育后代^[2-3]。

近些年来,骆驼奶成为了一种新型健康奶种类,具有诸多的保健和药用功效,其需求呈持续增长态势,2014年骆驼奶需求量为1.40万吨,2019年同比增长1.66万吨,预计未来市场可能会形成供不应求的局面^[4]。目前,如何提高我国双峰驼产奶量,满足大众对骆驼奶制品日益增长的需求,是中国骆驼产业有待解决的重要问题。单峰驼和双峰驼的产奶量差异显著,相关数据表明,单峰驼的产奶量(约20 kg/d)大约是双峰驼(约1.5 kg/d)的10倍^[5-6]。根据杂交优势原理推测,引入高产奶量单峰驼并通过杂交育种等方式利用其高产优势基因将会改良中国双峰驼后代产奶性能,这可能是提高我国骆驼奶产量的有效途径。

2009年,有研究首次报道,在共存生态区将双峰驼胚胎移植到单峰驼受体的种间移植获得成功,并且单峰驼受体产下健康骆驼羔^[7]。但截至目前,还未见有将单峰驼胚胎移入在高寒沙漠地区生存的双峰驼受体的研究报道。活体单峰驼因运输距离长、耗时久、运输和交易的费用高昂等问题,不能够大批量引入。不过,通过运输其胚胎,同时借

助胚胎移植这一辅助生殖技术,能够有效解决上述多种问题,从而纯种或杂交繁育出高产奶量的单峰驼或杂交骆驼^[8]。胚胎的冷冻或低温(4℃)保存能够保证在适宜时间内将供体胚胎运输并移植到受体体内,是胚胎运输及移植过程中的关键环节^[9]。目前,较成熟的冷冻保存技术保存的胚胎在解冻后妊娠率有望达到50%,但冷冻保存过程中冷冻保护剂的毒性作用、冰晶形成造成的损伤作用以及胚胎在长途运输中液氮的使用等相关问题还有待解决^[10]。与冷冻保存不同,低温保存胚胎涉及的实验操作难度低,该技术耗时短、对胚胎的损伤作用小,且移植后胚胎的成活率高^[11]。

因此,本试验选择低温保存的方式运输高产奶单峰驼胚胎,利用胚胎移植技术,研究将单峰驼胚胎移植到双峰驼体内的可行性,以促进中国高产奶量骆驼群体的构建。

1 材料与方法

1.1 供体的选择

该部分工作在阿联酋 Aljazeera 兽医研究中心进行。挑选15头体况良好,年龄6~10岁,没有布鲁氏菌病、锥虫病和生殖问题的高产奶单峰驼(产1胎或2胎)作为供体。

1.2 主要材料

促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)、促卵泡素(follicle-stimulating hormone, FSH)购自阿根廷 Gestar 公司;氯前列烯醇、

胎牛血清(fetal calf serum, FCS)、牛血清白蛋白、TCM 199 培养液、杜氏磷酸缓冲盐溶液(Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS)购自美国 Sigma 公司;人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)购自西班牙 Veterin Corion 公司;冲胚液、20# Y 型冲胚管、集卵杯等购自法国 I.M.V.技术公司;超声波仪(ALOKA ARIETTA 850)、体视显微镜(SZX10)购自日本日立阿洛卡医疗有限公司。

1.3 试验设计

1.3.1 供体超排处理

供体单峰驼的处理方法参考 Skidmore 等^[12]的方案并略作改进。在最后 1 d 注射 FSH 的同时,肌肉注射 500 μg 氯前列烯醇,并通过直肠超声仪监测卵巢、卵泡发育动态。当卵巢对超数排卵反应较差或卵泡直径小于 0.5 cm 时,每隔 12 h 额外给予 20 mg FSH,共给予两次。当卵泡直径达到 1.3~1.7 cm 时,与良种公驼交配 1 次,间隔 24 h 再交配 1 次。第 1 次交配后,供体注射 2 000~3 000 IU hCG 以诱导排卵。交配当日记为第 0 天,用于估算收集胚胎的时间和胚龄。所有供体都可以自由饮水,每天饲喂 1 次精料和苜蓿干草的混合饲料。

1.3.2 胚胎的收集和评估

在供体交配后第 8 天采用非手术法收集胚胎^[13-14]。用 20# Y 型冲胚管进行胚胎冲洗并将其收集到无菌集胚皿内,使用体视显微镜检测胚胎形态。根据胚胎形态(球形或折叠状),将其分为 5 个不同等级。A 级:优质胚胎,呈完美球形,胚胎表面光滑;B 级:一般胚胎,呈球形轮廓,但表面存在一些不规则变化;C 级:次级胚胎,膨胀且轮廓不规则;D 级:较差胚胎,胚胎塌陷,存在变性区域明显和大量细胞突起现象;E 级:死亡胚胎,胚胎破裂,不可移植^[12]。

1.3.3 胚胎低温保存试验

使用以 DPBS (不含钙离子和镁离子的平衡盐溶液)为基础液的保存液(选自骆驼胚胎玻璃化冷冻试剂盒,尚未申请专利),按体积分数添加 20% FCS 和 0.3%牛血清白蛋白,制成骆驼胚胎的低温保存液。每个试验组的胚胎分别用 3 滴该保存液洗涤后转入含 1.8 mL 该低温保存液的 2.0 mL 冷冻管,将每个试验组的胚胎放置在 4 $^{\circ}\text{C}$ 绝缘容器内,保存 24~48 h。由于胚胎从生产地(阿联酋)运输到移植地(中国内蒙古)需要约 35 h,试验组分为低温保存 24 h 组和 48 h 组,以观察胚胎在运输过程中产生的变化。在保存期结束后,分批从

绝缘容器中取出胚胎,在室温下使用 3 滴含 5% FCS 的 TCM 199 培养液进行洗涤。然后,将胚胎移入 50 μL 的 TCM 199 培养液中,在 38.8 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 3 d。体外分别培养 24 h、48 h 和 72 h 时,在显微镜下对胚胎质量进行形态学评估,依据上述胚胎评级标准检测胚胎存活率。对照组为新鲜收集的胚胎,采用 3 滴含 5% FCS 的 TCM 199 培养液洗涤后,将其移入 50 μL 的 TCM 199 培养液中,采用与试验组相同的培养箱条件培养 3 d,并分别在 24 h、48 h 和 72 h 时对胚胎质量进行形态学评估。

从 12 头供体收集了 83 枚胚胎。当胚胎来自同一供体时,将胚胎平分为两组,分别低温保存 24 h 或 48 h。当胚胎来自两头或两头以上供体时,将胚胎分成 3 组(包括对照组和两个试验组),让每组胚胎的平均大小保持一致,避免胚胎大小不均匀对保存效果产生影响。

1.3.4 受体同期发情处理和胚胎移植

选取 30 头中国内蒙古阿拉善双峰驼(5~10岁)作为待选受体,并对每头受体进行直肠触诊和超声检查,以确保受体的子宫和卵巢没有异常。试验期间,所有的受体都自由饮水和采食。

对每头待选的受体进行直肠超声检查,并对卵巢上有 1.2~1.7 cm 大小卵泡的受体进行两剂 hCG 处理。在供体注射后 1 d 的同一时间,对受体进行第 1 剂 hCG 处理,第 1 剂 hCG 注射后 14 d 对受体进行第 2 剂 hCG 注射。第 2 剂 hCG 注射后 6.5 d 进行直肠超声检查,7.5 d 后选择卵巢上具有黄体的受体进行胚胎移植。

利用上述胚胎低温保存方法,将从 3 头供体收集的 31 枚可用胚胎在 35 h 内从阿联酋空运至中国内蒙古阿拉善。移植前先用低温保存液洗涤胚胎,再对其进行镜检,仅移植 A 级胚胎。胚胎移植时,吸取 2 枚胚胎至 0.25 mL 细管,并装入移植枪中。然后,将移植枪经子宫颈插入子宫,并通过直肠引导在左侧子宫角的尖端注入胚胎。虽然骆驼的左右侧卵巢功能似乎相同,但几乎 99% 的妊娠都发生在左侧子宫角^[15]。

采用视觉诊断方法,通过观察是否翘尾来对受体进行妊娠诊断。

1.4 统计分析

使用 SAS 统计软件(SAS Institute Inc, USA)进行 Student-Newman-Keuls 多重比较, $P < 0.05$ 时,数据差异显著。

2 结果与分析

2.1 胚胎低温保存效果

由表1可知,低温保存48 h组的胚胎在体外培养24 h后存活率(67%)显著低于对照组(88%) ($P<0.05$),但与低温保存24 h组(75%)相比无显著差异($P>0.05$);体外培养48 h和72 h后,两个试验组的存活率同样无显著差异($P>0.05$);试验组胚胎的存活率在体外培养的前24 h表现良好,之后随着保存时间的延长,存活率下降,低温保存48 h组的存活率最低。

2.2 低温保存的单峰驼胚胎移植到受体双峰驼的结果

在3头供体单峰驼交配后的第8天共收集到31枚可用胚胎,直径为150~680 μm ,其中26枚胚胎为A级,5枚为B级。胚胎在4 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存液中运输35 h后,再次进行胚胎评级,结果显示:运输前的26枚A级胚胎在运输后,23枚仍为A级(A级胚率为88.5%),3枚胚胎因发生折叠降为B级;运输前的5枚B级胚胎,运输后仍为B级(B级胚率为100.0%)。

尽管选取了30头双峰母驼作为受体进行同期发情处理,但只有9头受体双峰驼符合移植条件,占总受体30%。将18枚A级胚胎成对移植到9头卵巢上有黄体的双峰驼受体。移植后1个月左右,观察到4头受体骆驼有翘尾行为,这表明此4头受体骆驼已经怀孕。

翌年春季,2头受孕驼分别历经382 d和389 d的妊娠期后,各自产下1头健康的单峰公驼羔。产后第1个月驼羔生长发育情况良好,第1头驼羔“阿丹”体重由35.0 kg增长到59.0 kg,背部皮毛长度从4 cm生长到7 cm,腹部皮毛长度由1 cm生长到4 cm;第2头驼羔“巴丹”体重由34.5 kg增长到49.0 kg,背部皮毛长度从1 cm生长到4 cm,腹部皮毛长度由1 cm生长到3 cm。此外,在驼羔

出生后的3个月内,体重增长均在正常生长范围内(14.75 kg \pm 0.59 kg)。

3 讨论

因自身的繁殖难度及生存环境等因素的限制,辅助生殖技术在骆驼的应用程度远不及牛羊等家畜,而且在双峰驼上的研究远落后于中东地区单峰驼。胚胎低温保存和移植技术为世界各地骆驼的遗传改良种业工程提供了简便有效的途径,例如:有科研团队利用胚胎移植技术培育了竞赛型、选美型和高产奶型骆驼等^[11, 16]。单峰驼和双峰驼都存在37对染色体,胎盘均属弥散型,且妊娠期相近,这为骆驼种间胚胎移植的实施提供了生理基础。目前,已有将共存生态区双峰驼胚胎移植至单峰驼受体并顺利产下双峰驼羔的成功案例^[7],但还未见将单峰驼胚胎成功移入在高寒沙漠地区生存的双峰驼受体的研究报道。国际上活体骆驼运输和交易受多种因素的限制,且单峰驼适应雨季短、干旱沙漠气候的中东及非洲地区,对寒冷和湿润气候具有较高的敏感性,当前已有将单峰驼活体引入其他气候条件地区却遭遇失败的案例^[7]。本研究通过低温保存的方式将单峰驼胚胎移入寒冷地区双峰驼受体并生产了健康单峰驼羔,且单峰驼羔生长发育良好,这为将高产奶单峰驼从原本干燥炎热的栖息地引入世界其他不同气候地区提供了参考依据。

钙离子依赖的细胞黏附分子有助于启动和维持胚胎致密化,镁离子会对胚胎发育过程中卵裂球间的致密化程度产生重要影响^[18]。适当降低钙镁离子含量,能有效减少胚胎卵裂球之间过于紧密的连接,这不仅能协助研究人员在限定时间内尽快完成胚胎分割,降低实验操作难度,还能避免钙镁离子对胚胎活力产生影响。因此,本研究选取以DPBS为基础液的保存液,通过添加20%的胎牛血清和0.3%的牛血清白蛋白(营养和保护

表1 胚胎低温(4 $^{\circ}\text{C}$)保存24 h和48 h的存活率比较

Table 1 Comparison of survival rate of embryos stored at low temperature (4 $^{\circ}\text{C}$) for 24 h and 48 h

Method	Embryo number	<i>In vitro</i> culture time/h			
		0	24	48	72
Control group	25	25 (100%) ^a	22 (88%) ^a	20 (80%) ^a	20 (80%) ^a
4 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h	28	28 (100%) ^a	21 (75%) ^{ab}	19 (68%) ^{ab}	18 (64%) ^{ab}
4 $^{\circ}\text{C}$ for 48 h	30	30 (100%) ^a	20 (67%) ^b	18 (60%) ^b	17 (57%) ^b

注:不同肩标字母的数据在列内差异显著($P<0.05$)。

Note: The data marked with different letters are significantly different in the column ($P<0.05$).

胚胎), 改良制成骆驼胚胎的低温保存液。试验结果显示, 使用该低温保存液在 4 ℃下保存胚胎 35 h, A 级胚胎率仍高达 88.5%。这充分验证改良后的低温保存液可推广应用于骆驼胚胎的低温保存研究和实践, 为骆驼胚胎的运输及保存优质种质资源提供了更优方案。

本研究选择健康的 30 头阿拉善双峰母驼作为受体进行同期发情处理, 其中 9 头母驼的卵巢上有发育黄体, 符合移植条件。将 18 枚低温保存的高产奶单峰驼 A 级胚胎移植后, 2 头受体双峰驼成功生产 2 头健康公驼羔, 其受胎率和产活羔率分别为 44% (4/9, 以翘尾行为作为妊娠诊断) 和 22% (2/9)。这是世界首例种间胚胎移植技术在双峰驼上的成功应用, 也是中国首次骆驼的胚胎移植获得成功。母驼早期妊娠率 44% 在正常范围内, 但仅生产 2 头驼羔, 表明存在 50% (2/4) 的流产率, 高于正常情况下单峰驼低温保存胚胎种内移植后的流产率 0~31%^[15, 19]。胚胎低温保存结果显示, 4 ℃保存 48 h, 再培养 72 h 后, 其存活率为 57% (表 1), 说明胚胎质量较高, 上述偏高的流产率问题可能与受体的黄体质量有关。单峰驼受体发情晚于供体 1~2 d 时, 其妊娠率更高, 黄体寿命相对较短, 通常注射 GnRH 9~10 d 后黄体就发生溶解^[7]。因此, 双峰驼胚胎移植方案仍有待优化。低温保存胚胎移植时, 需要进一步研究受体双峰驼和供体骆驼的发情同步程度, 尤其对于种间胚胎移植, 以提高移植妊娠率和产羔率。

骆驼很少产双胞胎, 且有独特的双胞胎减少机制^[12]。因此, 计算胚胎移植率时是基于受体头数而不是胚胎枚数, 本研究中每头受体移植 2 枚胚胎, 是为增强母体妊娠识别。此外, 将单峰驼胚胎移植到双峰驼的产活羔率为 22%, 低于将双峰驼胚胎移植到单峰驼的产活羔率 50% (4/8)^[7]。与此前报道的单峰驼胚胎随着低温保存时间由 1 d 延长到 5 d, 其移植妊娠率会逐渐下降的结果^[20]一致。该试验结果可能与胚胎在 4 ℃下保存 35 h 有一定关系。Mehta 等^[14]研究发现, 在 4 ℃下, 使用胚胎低温保存液(含 10% FCS 的基础培养液)保存单峰驼胚胎 24 h, 再进行种内移植, 妊娠率可达 62% (20/32)。不过, Abd-Elfattah 等^[21]采用相同低温保存液, 在 4 ℃下保存胚胎 1~5 d, 并对不同保存时间的胚胎进行种内移植, 结果显示移植后 60 d 妊娠率无显著差异, 即保存 1~5 d 的胚胎在移植后 60 d 的妊娠率约为 17% (4/23)。由此可见, 本

研究获得的早期妊娠率 44% 在正常范围内, 且与单峰驼新鲜胚胎种内移植的妊娠率^[14, 21]相近。

总的来讲, 本试验利用种间胚胎移植技术将低温保存 35 h 的单峰驼胚胎成功移植到了双峰驼体内并进行了孕育生产。种间胚胎移植技术对发展双峰驼种业工程具有重要作用, 后续可以利用移植后产下的单峰驼后代与双峰驼进行杂交育种, 改良中国双峰驼后代的产奶性能。

参考文献(References):

- [1] WILSON R T. The Camel[M]. Netherlands: Topical Animal Health and Production, 1984: 223.
- [2] MING L, YUAN L Y, YI L, *et al.* Whole-genome sequencing of 128 camels across Asia reveals origin and migration of domestic Bactrian camels[J]. Communications Biology, 2020, 3(1): 1.
- [3] The Bactrian Camels Genome Sequencing and Analysis Consortium. Genome sequences of wild and domestic bactrian camels[J]. Nature Communications, 2012, 3: 1202.
- [4] MIRMIRAN P, EJTAHED H S, ANGOORANI P, *et al.* Camel milk has beneficial effects on diabetes mellitus: a systematic review[J]. International Journal of Endocrinology and Metabolism, 2017, 15(2): e42150.
- [5] NAGY P, JUHASZ J. Review of present knowledge on machine milking and intensive milk production in dromedary camels and future challenges[J]. Tropical Animal Health and Production, 2016, 48(5): 915-926.
- [6] ZHANG H, YAO J, ZHAO D, *et al.* Changes in chemical composition of Alxa bactrian camel milk during lactation[J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88(10): 3402-3410.
- [7] NIASARI-NASLAJI A, NIKJOU D, SKIDMORE J A, *et al.* Interspecies embryo transfer in camelids: the birth of the first bactrian camel calves (*Camelus bactrianus*) from dromedary camels (*Camelus dromedarius*)[J]. Reproduction, Fertility and Development, 2009, 21(2): 333-337.
- [8] LOI P, PTAK G, BARBONI B, *et al.* Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(10): 962-964.
- [9] POWER M L, SCHULKIN J. Maternal regulation of offspring development in mammals is an ancient adaptation tied to lactation[J]. Applied & Translational Genomics, 2013, 2: 55-63.
- [10] HERRID M, VAJTA G, SKIDMORE J A. Current status and future direction of cryopreservation of camelid embryos[J]. Theriogenology, 2017, 89: 20-25.
- [11] NAGY P, SKIDMORE J A, JUHASZ J. Use of assisted reproduction for the improvement of milk production in dairy camels (*Camelus dromedarius*)[J]. Animal Reproduction Science, 2013, 136(3): 205-210.
- [12] SKIDMORE J A, VAUGHAN J L, HERRID M. Successful vitrification of dromedary camel embryos using a novel embryo vitrification kit[J]. Animal Reproduction Science, 2020, 218: 106483.
- [13] AGARWAL S P, RAI A K, VYAS S, *et al.* Augmentation of early reproduction through hormonal therapy in camel heifers[J]. International Research Centre on Camel, 1996, 11: 361-363.
- [14] MEHTA S C. Mathematical functions for the prediction of body weight gain in dromedary[J]. Journal of Camel Practice and Research, 2008, 15(2): 239-244.

- [15] SKIDMORE J A, BILLAH M, ALLEN W R. Investigation of factors affecting pregnancy rate after embryo transfer in the dromedary camel[J]. *Reproduction, Fertility, and Development*, 2002, 14(1/2): 109–116.
- [16] TIBARY A, ANOUASSI A, SGHIRI A, *et al.* Current knowledge and future challenges in camelid reproduction[J]. *Society of Reproduction & Fertility Supplement*, 2007, 64: 297–313.
- [17] NOWAK R M. *Walker's Mammals of the World. Vol. II*[M]. Baltimore: John Hopkins University Press, 1993: 236–238.
- [18] STEIN G, SRIVASTAVA M K, MERKER H J, *et al.* Effects of calcium channel blockers on the development of early rat postimplantation embryos in culture[J]. *Archives of Toxicology*, 1990, 64(8): 623–638.
- [19] NIKJOU D, NIASARI-NASLAJI A, SKIDMORE J A, *et al.* Synchronization of follicular wave emergence prior to superovulation in bactrian camel (*Camelus bactrianus*)[J]. *Theriogenology*, 2008, 69(4): 491–500.
- [20] SKIDMORE J A. The use of some assisted reproductive technologies in old world camelids[J]. *Animal Reproduction Science*, 2019, 207: 138–145.
- [21] ABD-ELFATTAH A, AGAG M, NASEF M, *et al.* Preservation of dromedary camel embryos at 4 °C for up to 5 days: factors affecting the pregnancy and pregnancy loss rates[J]. *Theriogenology*, 2020, 143: 44–49.

(上接第 297 页)

- [60] PAN J A, TANG Y, YU J Y, *et al.* miR-146a attenuates apoptosis and modulates autophagy by targeting TAF9b/p53 pathway in doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(9): 668.
- [61] FRONTINI M, SOUTOGLOU E, ARGENTINI M, *et al.* TAF9b (formerly TAF9L) is a bona fide TAF that has unique and overlapping roles with TAF9[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(11): 4638–4649.
- [62] HORIE T, ONO K, NISHI H, *et al.* Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with miR-146a-induced inhibition of the neuregulin-ErbB pathway[J]. *Cardiovascular Research*, 2010, 87(4): 656–664.
- [63] ZHANG D X, MA D Y, YAO Z Q, *et al.* ERK1/2/p53 and NF- κ B dependent-PUMA activation involves in doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2016, 20(11): 2435–2442.
- [64] KITAKATA H, ENDO J, IKURA H, *et al.* Therapeutic targets for DOX-induced cardiomyopathy: role of apoptosis vs. ferroptosis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1414.
- [65] WENNINGMANN N, KNAPP M, ANDE A, *et al.* Insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: molecular mechanisms, preventive strategies, and early monitoring[J]. *Molecular Pharmacology*, 2019, 96(2): 219–232.
- [66] LI J Z, TANG X N, LI T T, *et al.* Paeoniflorin inhibits doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis by downregulating miR-1 expression[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2016, 11(6): 2407–2412.
- [67] XIONG X J, HE Q, LIU J H, *et al.* MicroRNA miR-215-5p regulates doxorubicin-induced cardiomyocyte injury by targeting ZEB2[J]. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2021, 78(4): 622–629.
- [68] LI B, CAI X Y, WANG Y X, *et al.* circ-SKA3 enhances doxorubicin toxicity in AC16 cells through miR-1303/TLR4 axis[J]. *International Heart Journal*, 2021, 62(5): 1112–1123.
- [69] ZHOU Z X, ZHANG Y F, GAO J N, *et al.* Circular RNAs act as regulators of autophagy in cancer[J]. *Molecular Therapy Oncolytics*, 2021, 21: 242–254.
- [70] LIU Y Z, DUAN C F, LIU W, *et al.* Upregulation of let-7f-2-3p by long noncoding RNA NEAT1 inhibits XPO1-mediated HAX-1 nuclear export in both *in vitro* and *in vivo* rodent models of doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Archives of Toxicology*, 2019, 93(11): 3261–3276.
- [71] PULAKAT L, CHEN H H. Pro-senescence and anti-senescence mechanisms of cardiovascular aging: cardiac microRNA regulation of longevity drug-induced autophagy[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 774.
- [72] RUSSO M, BONO E, GHIGO A. The interplay between autophagy and senescence in anthracycline cardiotoxicity[J]. *Current Heart Failure Reports*, 2021, 18(4): 180–190.
- [73] DEMARIA M, O'LEARY M N, CHANG J H, *et al.* Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse[J]. *Cancer Discovery*, 2017, 7(2): 165–176.
- [74] XIA W Z, CHANG B W, LI L Q, *et al.* MicroRNA therapy confers anti-senescent effects on doxorubicin-related cardiotoxicity by intracellular and paracrine signaling[J]. *Aging*, 2021, 13(23): 25256–25270.
- [75] WANG K, SUN T, LI N, *et al.* MDRL lncRNA regulates the processing of miR-484 primary transcript by targeting miR-361[J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10(7): e1004467.
- [76] ZHUANG L, XIA W Z, CHEN D D, *et al.* Exosomal lncRNA-NEAT1 derived from MIF-treated mesenchymal stem cells protected against doxorubicin-induced cardiac senescence through sponging miR-221-3p[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2020, 18(1): 157.
- [77] VAN NIEL G, CARTER D R F, CLAYTON A, *et al.* Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23(5): 369–382.
- [78] BEAUMIER A, ROBINSON S R, ROBINSON N, *et al.* Extracellular vesicular microRNAs as potential biomarker for early detection of doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2020, 34(3): 1260–1271.
- [79] SUN W Q, ZHAO P, ZHOU Y G, *et al.* Ultrasound targeted microbubble destruction assisted exosomal delivery of miR-21 protects the heart from chemotherapy associated cardiotoxicity[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 532(1): 60–67.
- [80] ZHANG H, TIAN Y K, LIANG D G, *et al.* The effects of inhibition of microRNA-375 in a mouse model of doxorubicin-induced cardiac toxicity[J]. *Medical Science Monitor*, 2020, 26: e920557.
- [81] MILANO G, BIEMMI V, LAZZARINI E, *et al.* Intravenous administration of cardiac progenitor cell-derived exosomes protects against doxorubicin/trastuzumab-induced cardiac toxicity[J]. *Cardiovascular Research*, 2020, 116(2): 383–392.
- [82] GUO L T, ZHENG X P, WANG E W, *et al.* Iridogenin treatment alleviates doxorubicin (DOX)-induced cardiotoxicity by suppressing apoptosis, inflammation and oxidative stress via the increase of miR-425[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 125: 109784.
- [83] NEMADE H, CHAUDHARI U, ACHARYA A, *et al.* Cell death mechanisms of the anti-cancer drug etoposide on human cardiomyocytes isolated from pluripotent stem cells[J]. *Archives of Toxicology*, 2018, 92(4): 1507–1524.
- [84] LEI B, WU X H, XIA K X, *et al.* Exosomal micro-RNA-96 derived from bone marrow mesenchymal stem cells inhibits doxorubicin-induced myocardial toxicity by inhibiting the Rac1/nuclear factor- κ B signaling pathway[J]. *Journal of the American Heart Association*, 2021, 10(17): e020589.