

Vc 对猪体细胞克隆胚胎体外及体内发育的影响

周荣¹, 罗绿花¹, 麦然标¹, 余婉娴¹, 贺晓燕¹, 纪红美¹, 石俊松¹, 王青来¹, 蔡更元^{1,2}, 吴珍芳^{1,2*}

(1. 广东温氏食品集团股份有限公司国家生猪种业工程技术研究中心, 广东新兴 527439; 2. 华南农业大学动物科学学院, 广东广州 510642)

摘要 [目的] 提高克隆猪的大批量生产效率, 优化体外与体内培养体系。[方法] 将所获得的猪体细胞克隆胚胎用含不同 Vc 浓度的培养液培养, 比较体外囊胚发育力和囊胚细胞数, 筛选出合适的培养浓度, 然后用此浓度培养后的胚胎进行体内手术移植, 统计克隆猪的分娩率和产仔情况。[结果] 克隆胚胎在激活后用 40 μg/mL Vc 处理 22 h, 体外培养未显著增加囊胚率, 但显著提高了囊胚细胞数。体内移植结果显示, 添加 Vc 未提高妊娠率, 但增加了窝均总仔数, 克隆效率差异显著。[结论] Vc 处理有利于增强体细胞克隆胚的体内和体外发育能力。

关键词 Vc; 猪; 克隆胚胎; 发育

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)23-090-03

Effects of Vitamin C on the Development of Porcine Somatic Cloned Embryos *in vitro* and *in vivo*

ZHOU Rong¹, LUO Lu-hua¹, MAI Ran-biao¹, WU Zhen-fang^{1,2*} (1. Guangdong Wen's Food Group Co., Ltd., National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, Xinxing, Guangdong 527439; 2. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract [Objective] To improve the ability to generate cloned pigs and to optimize the culture system *in vitro* and *in vivo*. [Method] The porcine SCNT embryos were cultured in the medium with different vitamin C concentrations. Then the blastocyst formation rate and cell number per blastocyst were compared. Proper concentration was screened, which was used to treat cloned embryos. After surgery transfer, farrowing rate and litter size were calculated. [Result] After stimulation, cloned embryos were treated by 40 μg/mL Vc for 22 h; culture *in vitro* did not significantly enhance the blastocyst rate, but the blastocyst cell number was significantly increased. Results of *in vivo* test showed that adding Vc did not significantly enhance the pregnancy rate, but increased the average litter size. There were significant differences in the cloning efficiency. [Conclusion] Vc treatment is beneficial to the development of porcine SCNT embryos both *in vivo* and *in vitro*.

Key words Vitamin C; Porcine; Cloned embryos; Development

克隆胚胎必须在体外培养一段时间后, 选择在合适的发展阶段移植到受体母猪体内。虽然体外培养取得了一些成果, 但体外培养条件仍不能与体内相比^[1]。目前关于改善体外培养条件的研究很多, 如气象环境^[2]、培养液成分^[3]等。ROS 是需氧细胞在代谢过程中产生的一系列活性氧族, 对于体内正常卵母细胞的成熟和胚胎的发育是必需的, 它对胚胎的氧化损伤决定于其生产和清除之间的平衡^[4]。近年来, 已有研究在胚胎体外培养过程中添加小分子抗氧化物质, 以降低因过氧化反应应激造成的早期胚胎损伤, 有一些抗氧化剂已被用于胚胎的体外培养, 包括维生素 E^[5-6]、谷胱甘肽 (GSH)^[7]、L-肉碱^[8]、和维生素 C^[9-10]等。Vc 又称抗坏血酸, 在清除细胞内自由基和调节细胞内氧化还原平衡方面具有重要作用^[11], 在 ROS 对胚胎的保护方面, 可以通过减少氧化应激和表观遗传修饰调控, 促进小鼠和猪早期胚胎体外发育效率^[9-10, 12]。笔者在胚胎培养液中添加不同浓度 Vc, 比较不同浓度 Vc 对克隆胚胎体外发育和体内移植效果的影响, 旨在为提高克隆猪的实际生产效率提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料 猪卵巢采自广州某屠宰场, 猪成体成纤维细胞分离自新兴县水台原种场优秀种公猪。细胞培养相关耗材为 Corning 公司产品; 卵母细胞成熟及胚胎培养耗材为

NUNC 公司产品。

1.2 主要试剂 卵母细胞培养用试剂均购自 Sigma (美国) 公司, 供体成纤维细胞培养用试剂购自 life (美国) 公司, 胎牛血清 (GIBCO, 美国), 生理盐水 (紫光古汉集团衡阳制药有限公司)。

洗卵液: DPBS + 1% PVA 液。卵母细胞成熟培养液: TCM-199 + 10% 猪卵泡液 (PFF) + 10% FBS + 10 IU/mL PMSG + 10 IU/mL HCG + 0.1 μg/mL 半胱氨酸 + 10 ng/mL 表皮生长因子 (EGF)。体外操作液 HN: 无钙的 H-NCSU-23。融合激活液 F: 0.25 mol/L Mannitol, 0.1 mmol/L CaCl₂·2H₂O, 0.1 mmol/L MgCl₂·6H₂O, 0.5 mmol/L HEPES, 0.01% PVA (W/V)。胚胎培养液: PZM-3 猪合子培养液。囊胚染色液: 含 5 μg/mL Hoechst33342 的 DPBS 液。供体成纤维细胞培养液: DMEM + 10% FBS。

1.3 方 法

1.3.1 卵母细胞收集及体外成熟培养 猪卵巢采自广州某屠宰场, 用剪刀去除输卵管等组织后, 将卵巢置于含抗生素的 37℃ 生理盐水中, 保温 3 h 运回实验室。用含抗生素的生理盐水冲洗 3~5 次后, 用配有 18 G 针头的 10 mL 注射器抽取直径 2~6 mm 的卵泡, 卵泡液置于 37℃ 水浴保温的 50 mL 离心管中。静置 15~20 min 后去上清, 洗卵液稀释后在体视显微镜下用自制捡卵针捡取胞质完整及包裹 3 层以上卵丘细胞的卵丘-卵母细胞复合体 (Cumulus oocyte complexes, COCs)。用洗卵液冲洗 3 次, 再用成熟培养液冲洗 2 次, 然后放入已在二氧化碳培养箱内平衡 4 h 以上的成熟培养液中。在 39℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中成熟培养 42~44 h。

基金项目 国家转基因生物新品种培育项目 (2016ZX08006002; 2016ZX08006003)。

作者简介 周荣 (1983-), 女, 湖北荆门人, 硕士, 从事体细胞克隆技术研究。* 通讯作者, 教授, 从事猪的分子遗传与动物育种研究。

收稿日期 2016-05-31

1.3.2 供体细胞培养。在新兴县水台原种场采集优秀种公猪耳样,经含有双抗的生理盐水冲洗,保存到含双抗的 DMEM 培养液中,用冰盒带回实验室。耳样在实验室制成细胞悬液,培养细胞,冷冻保存。进行核移植操作前 7~14 d,用 DMEM + 10% FBS 将供体细胞复苏培养。将传代至 5~6 代的成纤维细胞培养至 100% 汇合,再接触抑制 2 d 后,常规消化,离心洗涤,最后用操作液将细胞沉淀重悬,用做核供体。

1.3.3 克隆胚胎的生产。将成熟培养 42~44 h 后的卵母细胞与 1 mg/mL 透明质酸酶混合,用移液枪反复吹打除去卵丘细胞,以胞质均匀、第一极体排出为成熟标志挑选出成熟的卵母细胞,放至操作液滴中备用。采用盲吸去核法构建体细胞克隆胚胎:在显微操作仪上用固定针将卵母细胞固定,去核针拨动使极体处于 5:00 位置,用去核针将卵母细胞内的极体及附近 1/3 胞质去除并将体细胞注进透明带内,使其与胞质紧密贴近。将构建好的重构胚恢复 30 min 后做融合激活:先用融合激活液 F 洗涤 3~5 次,再移至已铺满融合激活液的融合槽中,调整重构胚的位置使供体细胞与卵母细胞膜的接触面与电场方向垂直,进行电融合激活。电融合仪型号为 BLS-150B,设置参数:场强为 80 V,脉冲时间 80 μ s,脉冲次数 2 DC,一次可同时操作 15 个左右卵母细胞。经过胚胎培养液 PZM 洗涤 3 遍后转移至添加 5 μ g/mL CB + 10 μ g/mL CHX 的胚胎培养液中辅助激活处理 4 h,再在体视镜下判定融合。

1.3.4 克隆胚胎的体外培养。将融合后的克隆胚置于不同 Vc 浓度(0、20、40 μ g/mL)的胚胎培养液中,在 39 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养 22 h。22 h 时换成不含 Vc 的胚胎培养液继续培养,分别在 48 和 168 h 时观察记录卵裂率和囊胚形成率。

1.3.5 囊胚细胞染色计数。取出培养 168 h 的囊胚,在含有 3.7% 多聚甲醛的 DPBS 中洗涤 2 遍后固定 10 min,将固定好的囊胚转移至含 10 μ g/mL Hoechst33342 的 DPBS 中避光染色 5 min,将染好的囊胚用操作液洗 3 遍,转移至载玻片上,尽量少带液体,用矿物油在载玻片的四角点四个柱,再轻压盖玻片(图 1)。然后在 Olympus 荧光显微镜下紫外光激发下观察拍照,细胞计数(图 2)。

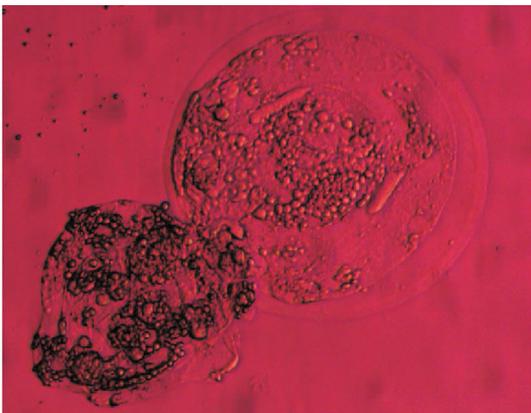


图 1 囊胚白光

Fig. 1 Blastocyst white light

1.3.6 手术移植。以体外培养效果较好的 Vc 浓度培养克

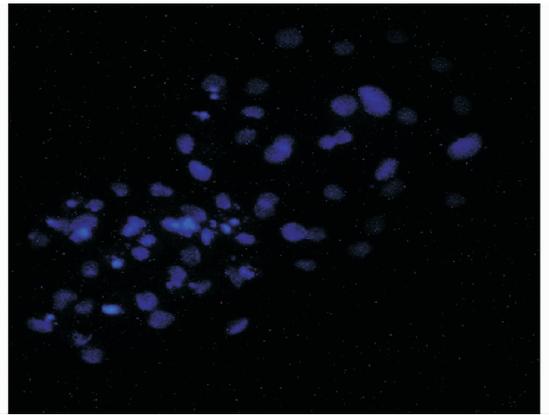


图 2 囊胚荧光

Fig. 2 Blastocyst fluorescence

隆胚胎 22 h 后直接进行手术移植。即将融合后的克隆胚置于含 40 μ g/mL Vc 的胚胎培养液中,在 39 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养 22 h,22 h 后直接将克隆胚移植至同期发情的受体母猪子宫内,妊娠到期后统计分娩率、窝均总仔数及克隆效率(出生总仔数/移植胚胎数)。手术具体操作方法:手术当天对母猪禁食,手术前简单保定母猪,对猪进行全身静脉麻醉。手术部位选择在倒数第二对乳头中间部位,先用清水清洗手术部位及四周,擦干后先用碘酒大范围消毒,再用 75% 乙醇脱碘。盖上手术布同时暴露手术部位,沿腹中线切开皮肤、皮下肌肉,然后分离皮下脂肪和腹膜,手探入腹腔,慢慢牵引出子宫和输卵管,检查排卵情况。将装有胚胎的吸尿管从输卵管伞口插入,小心将胚胎吹入。然后恢复子宫和输卵管到腹腔内。常规手术缝合,术后连续 4 d 抗生素消炎。术后记录受体猪的生理情况,并做好 B 超妊娠检测和受体猪饲养管理工作。

1.4 统计分析 表 1 的数据用平均数 \pm SD 表示,采用 SPSS 的卡方进行分析。表 2 的数据用平均数表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果与分析

2.1 胚胎培养中添加 Vc 对克隆胚胎体外发育的影响 利用含有不同 Vc 浓度(0、20、40 μ g/mL)的胚胎培养液培养克隆胚胎 22 h 后换成不含 Vc 的胚胎培养液,继续培养至 168 h。结果见表 1。由表 1 可知,克隆胚的卵裂率和体外囊胚发育之间差异不显著,但 Vc 添加组的囊胚率比对照组高。Vc 添加组的囊胚细胞数明显高于对照组,差异显著;而 40 μ g/mL 浓度组高于 20 μ g/mL 浓度组,但差异不显著。说明添加 Vc 有利于克隆胚胎的体外发育。

2.2 胚胎培养中添加 Vc 对克隆胚体内发育的影响 从手术移植效果看,Vc 添加组与对照组分娩率相同,均为 57.14%。Vc 添加组的窝均总仔与对照组相比差异不显著,但明显高于对照组,特别 Vc 添加组的克隆效率显著高于对照组。说明添加 Vc 对于克隆胚胎在体内发育是有利的。

3 结论与讨论

该研究比较了在克隆胚胎的体外培养体系中添加 Vc 对克隆胚胎的体外发育和体内发育潜能的影响,结果表明,

体外培养 168 h 未显著增加囊胚发育率,但显著提高了囊胚细胞数和克隆胚的体外发育能力。体内移植结果显示,添

加 Vc 也有利于克隆胚胎的体内发育,虽然未提高分娩率,但增加了窝均总仔数和显著提高了克隆效率。

表 1 胚胎培养中添加 Vc 对克隆胚胎体外发育的影响

Table 1 The effects of adding Vc in culture medium on the development of the cloned embryos in vitro

Vc 浓度 Vc concentration μg/mL	培养胚胎数 Number of cultured embryos	卵裂率 Number of cleaved embryos // %	囊胚率 Number of blastocysts // %	囊胚总细胞数 Total cells per blastocyst
0	120	79.19 ± 3.82a	18.95 ± 2.28a	24.94 ± 3.08a
20	120	76.67 ± 1.44b	20.65 ± 1.71a	34.09 ± 3.02b
40	120	77.50 ± 4.33a	22.58 ± 2.23a	35.18 ± 3.65b

注:同列数据后不同小写字母表示不同浓度间差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different lowercases in the same column indicated significant difference between the treatments ($P < 0.05$).

表 2 胚胎培养中添加 Vc 对克隆胚胎移植效果的影响

Table 2 The effect of adding Vc in culture medium on the development of the cloned embryos in vivo

Vc 浓度 Vc concentration μg/mL	移植受体头数 Number of used recipient sows	分娩率 Farrowing rate // %	窝均总仔数 Average number of litter size	移植胚胎数 Number of cloned embryos	克隆效率 Cloning efficiency // %
40	14	57.14% a	3.25a	3 156	0.19a
0	14	57.14% a	2.75a	3 026	0.07b

注:克隆效率 = 出生的克隆仔猪数/每头受体的移植,同列不同小写字母表示不同浓度间差异显著($P < 0.05$)。

Note: Cloning efficiency = Number of born cloned piglets/Number of cloned embryos received by all used recipient sows. Different lowercases in the same column indicated significant difference between the treatments ($P < 0.05$).

提高克隆胚胎质量、改善体外培养体系对于体外胚胎的生产至关重要。体外培养体系面临的一个重要问题是氧分压对卵母细胞和胚胎的影响。为了改善这种情况,可以采用 5% O₂ 低氧培养^[13] 或者添加抗氧化剂^[5,7-10]。其中,Vc 对于猪而言是一种重要的营养物质,也是一种有效的抗氧化剂,添加到培养液中可以保证适当的 ROS 水平,同时保护细胞免受氧化性损伤和细胞凋亡。Jeong 等^[4] 在猪核移植胚胎和体外受精胚胎培养液中添加 Vc,降低了体外培养胚胎的凋亡指数,提高了囊胚细胞总数。Huang 等^[9] 在培养液中添加适量的 Vc,降低了胚胎内的氧自由基,增加了囊胚形成率和囊胚细胞数,降低了细胞凋亡数。Michel 等^[14] 也证实 Vc 可以提高细胞内谷氨酰胺水平和降低氧自由基浓度,从而提高猪孤雌胚和核移植胚的发育能力,结果差异显著。而在 Li 等^[15] 对牛的研究中,得到了不同结果,即添加 Vc 后可以增加桑葚胚率但降低了囊胚孵化率。

该研究选用的浓度显著提高了体外培养的囊胚细胞数,由于体内培养环境更好,体内移植的克隆胚胎囊胚细胞总数可能也有一个大的提高,表现在克隆动物出生后窝均总仔也有明显提高。但也不可添加过量,Jeong 等^[4] 证实了抗氧化剂 Vc 和 Ve 添加于体外培养液中,存在剂量依赖性,且不能同时添加。因为 ROS 是需氧细胞在代谢过程中产生的一系列活性氧族,对于体内正常卵母细胞的成熟和胚胎的发育都是必需的,它对胚胎的氧化损伤决定于其生产和清除之间的平衡,若超过临界值,抗氧化剂也会有负面影响。具体的分子机制也有一些相关的报道,Huang 等^[9] 用 Vc 处理可以显著提高体外囊胚发育率,处理胚胎中的组蛋白 H4 赖氨酸 5 的乙酰化水平升高,囊胚中的 Oct4、Sox2 和 Klf4 的表达量升高。也有可能是通过 H3K36me2/3 来建立组蛋白去甲基酶与 Vc 介导的重编程之间的联系^[16]。Es-

teban 等^[17] 研究表明,Vc 可以提高小鼠和人诱导多能干细胞 iPS 产生效率,促进部分重新编程 iPS 细胞过度至完全重编程状态,且可能是通过减少细胞内抑癌基因 p53 的完全表达来提高细胞重编程效率。Vc 作为一种抗氧化剂用于改善猪克隆胚胎的体外和体内发育质量均是可行的,但具体机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] VAJTA G,ZHANG Y,MACHATY Z,et al. Somatic cell nuclear transfer in pig:Recent achievements and further possibilities[J]. Reprod Fertil Dev,2007,19:403-423.
- [2] PARK J I,HONG J Y,YONG H Y,et al. High oxygen tension during in vitro oocyte maturation improves in vitro development of porcine oocytes after fertilization[J]. Anim Reprod Sci,2005,87(1/2):133-141.
- [3] MIHIRO S,JIBAK L,TAKASHI M,et al. Demands for carbohydrates as major energy substrates depend on the preimplantation developmental stage in pig embryos:Differential use of fructose by parthenogenetic diploids before and after the 4-cell stage in the pig[J]. J Reprod Dev,2015,61:1106-1115.
- [4] JEONG Y W,PARK S W,HOSSEIN M S,et al. Antiapoptotic and embryotropic effects of α -tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer[J]. Theriogenology,2006,66:1186-1197.
- [5] OLSON S,SEIDEL G. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients[J]. Biol Reprod,2000,62(2):248-252.
- [6] WANG X,FALCONE T,ATTARAN M,et al. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate[J]. Fertil Steril,2002,8:1272-1277.
- [7] DE MATOS D,FURNUS C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine [J]. Theriogenology,2005,53(3):761-771.
- [8] WU G Q,JIA B Y,LI J J,et al. L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs[J]. Theriogenology,2011,76:785-793.
- [9] HUANG Y Y,TANG X C,XIE W H,et al. Vitamin C enhances in vitro and in vivo development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos[J]. Biochem Biophys Research Commu,2011,411(2):397-401.

死亡率进行统计,结果见图 3。由图 3 可知,外源添加 30 mmol/L 葡萄糖和果糖的培养基上, *sacd1* 突变体的细胞死亡率约为 91%,与无糖对照相比无明显差别;外源添加 30 mmol/L 的蔗糖和麦芽糖的培养基上, *sacd1* 突变体细胞死亡率约为 83%,与葡萄糖和果糖相比有一定程度的降低,但不显著。在外源添加 120 mmol/L 糖的培养基上,相对于无糖以及添加 30 mmol/L 糖的培养基, *sacd1* 突变体的细胞死亡率均显著降低,且不同糖对 *sacd1* 突变体细胞死亡的抑制效果有明显差异,其中,麦芽糖的抑制效果最好,其次是蔗糖、葡萄糖和果糖。这表明 30 mmol/L 不同糖对 *sacd1* 突变体的细胞死亡有一定程度的抑制,但抑制效果无明显差别。120 mmol/L 糖对拟南芥 *sacd1* 突变体细胞死亡的抑制效果显著,且不同糖对 *sacd1* 突变体细胞死亡的抑制效果有明显差异,抑制效果由高到低依次为麦芽糖、蔗糖、葡萄糖和果糖。

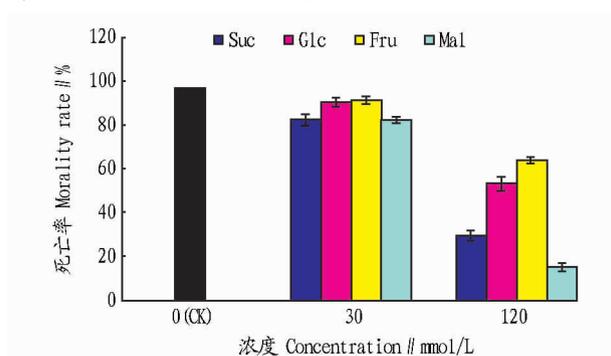


图 3 外源添加不同糖的拟南芥 *sacd1* 突变体细胞死亡率

Fig. 3 Mortality rate of *Arabidopsis sacd1* mutant cells with adding different sugars

3 结论与讨论

该试验通过观察外源添加不同糖的培养基中拟南芥 Col-0 野生型和 *sacd1* 突变体的萌发和 *sacd1* 突变体细胞死亡情况,比较不同糖对拟南芥种子萌发以及 *sacd1* 突变体细胞死亡的影响。结果表明,在 120 mmol/L 浓度范围内,蔗糖、葡萄糖和果糖对拟南芥种子萌发无显著影响,而麦芽糖对 Col-0 野生型以及 *sacd1* 突变体种子的萌发均有延迟作用,且糖

浓度越高,延迟作用越显著。其次,在培养基中外源添加 120 mmol/L 糖时,不同糖对拟南芥 *sacd1* 突变体细胞死亡的抑制效果有显著差异,其中,麦芽糖的抑制效果最好,其次是蔗糖、葡萄糖和果糖。

前期研究中通过浓度梯度设计确定了 1% 和 4% 作为低浓度和高浓度的代表,该试验通过换算选取 30 和 120 mmol/L 作为试验浓度。该试验中麦芽糖对拟南芥种子萌发具有延迟作用,但生长一定时间后,大部分种子仍能萌发,但其对萌发后幼苗生长的影响还有待进一步研究。不同糖对拟南芥 *sacd1* 突变体细胞死亡的抑制效果有所不同,可能是与不同糖类作为信号分子参与调控植物体内不同的生理过程有关,而麦芽糖与蔗糖的抑制效果明显优于葡萄糖和果糖,推测可能是由于麦芽糖和蔗糖是二糖,其要水解成单糖才能参与调控植物的生长和发育,具体机制尚不明确。目前对于糖类的研究已取得了一定进展,而关于糖抑制拟南芥 *sacd1* 突变体细胞死亡的分子机制以及糖代谢途径与酪氨酸降解途径的关系还有待于进一步探讨。

参考文献

- [1] 韩成云. 拟南芥短日照依赖型模拟病斑 *SDL1* 基因的分离和功能分析 [D]. 长沙:湖南农业大学,2012.
- [2] 支添添,周舟,韩成云,等. 台盼蓝染色鉴定拟南芥 *sacd1* 突变体的细胞死亡 [J]. 作物研究,2013,27(3):217-218.
- [3] APONTE J L, SEGA G A, HAUSER L J, et al. Point mutations in the murine fumarylacetoacetate hydrolase gene: Animal models for the human genetic disorder hereditary tyrosinemia type I [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98:641-645.
- [4] DIXON D P, EDWARDS R. Enzymes of tyrosine catabolism in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Sci, 2006, 171:360-366.
- [5] GROMPE M, AL-DHALIMY M, FINEGOLD M, et al. Loss of fumarylacetoacetate hydrolase is responsible for the neonatal hepatic dysfunction phenotype of lethal albino mice [J]. Genes Dev, 1993, 7:2298-2307.
- [6] HAN C Y, REN C M, ZHI T T, et al. Disruption of fumarylacetoacetate hydrolase causes spontaneous cell death under short-day conditions in *Arabidopsis* [J]. Plant physiology, 2013, 162(4):1956-1964.
- [7] 支添添. 拟南芥 *sacd1* 突变体细胞死亡机理的研究 [D]. 长沙:湖南农业大学,2014.
- [8] LEON P, SHEEN J. Sugar hormone connection [J]. Plant Sci, 2003, 8(3):110-116.
- [9] ROLLAND F, BAENA-GONZALEZ E J, SHEEN J. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms [J]. Plant Biol, 2006, 57:675-709.
- [10] HU J, CHENG D, GAO X, et al. Vitamin C enhances the in vitro development of porcine pre-implantation embryos by reducing Oxidative Stress [J]. Reprod Domest Anim, 2012, 47(6):873-879.
- [11] KITAGAWA Y, SUZUKI K, YONEDA A, et al. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos [J]. Theriogenology, 2004, 62(7):1186-1197.
- [12] GAO Y, YANG L, CHEN L, et al. Vitamin C facilitates pluripotent stem cell maintenance by promoting pluripotency gene transcription [J]. Biochimie, 2013, 95:2107-2113.
- [13] BOOTH P J, HOLM P, CALLESEN H. The effect of oxygen tension on porcine embryonic development is dependent on embryo type [J]. Theriogenology, 2005, 63(7):2040-2052.
- [14] MICHEL K, CHAWALIT S, NENG W L, et al. Ascorbic acid improves the developmental competence of porcine oocytes after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transplantation [J]. J Reprod Dev, 2013, 59(1):78-83.
- [15] LI Q, WANG Y S, WANG L J, et al. Vitamin C supplementation enhances compact morulae formation but reduces the hatching blastocyst rate of bovine somatic cell nuclear transfer embryos [J]. Cell reprogram, 2014, 16(4):290-297.
- [16] WANG T, CHEN K S, ZENG X M, et al. The histone demethylases Jhdmla/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner [J]. Cell Stem Cell, 2011, 9:575-587.
- [17] ESTEBAN M A, WANG T, QIN B, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells [J]. Cell Stem Cell, 2010, 6:71-79.

(上接第 92 页)