

hepatocytes were isolated by a modified two-step in situ collagenase perfusion method. Hepatocytes were inoculated into RPMI 1640 medium supplemented with 10% DMSO, hydrocortisone, growth factors and 10% newborn bovine serum and cryopreserved by the step-wise method. Viability and functions of hepatocytes cryopreserved by the two protocols for 10 days and 20 days respectively and then cultured after thawing were dynamically observed. The results showed that high viability was maintained in each subgroup. Viability, G-6-Pase activity, syntheses of albumin and glucose, and diazepam transformation were higher in short-term culture group than those in direct cryopreservation group. Albumin, urea and glucose syntheses of hepatocytes were influenced by the duration of cryopreservation. Therefore, the cryopreservation after short-term culture protocol seems better than the direct cryopreservation protocol.

Key words: Hepatocyte Cryopreservation Culture Bioartificial liver Transplantation

低频脉冲电场对胰岛素介导的细胞增殖影响及其作用机理研究*

丁荔萍 张红锋** 陈树德*** 张利华****

(华东师范大学生命科学学院 ***华东师范大学物理系光谱学与波谱学教育部重点实验室

****华东师范大学河口海岸国家重点实验室 上海 200062)

极低频电磁场(ELF-EMF:0-100Hz)与人类密切相关,我们的日常用电和脑电图波形等都位于这个频率范围内。这些极低频电磁场是否对人类具有不良影响?极低频电磁场对细胞增殖的影响是当前国际上颇有争论的问题。丁翠兰等^[1]发现不同强度的极低频正弦交变磁场对 K562(人白血病肿瘤细胞)和 WZDS(分泌树突状细胞单克隆抗体的杂交瘤细胞)细胞生长有不同程度的抑制作用,另外一些科学家却发现低频电磁场具有促进细胞增殖的作用^[2,3]。一些研究指出,极低频磁场可能具有促癌效应。目前趋向认为,电磁场与细胞作用的初始位点是细胞膜,随后触发的一切反应都是由细胞膜介导的^[4]。细胞膜上的细胞信号系统很可能是与外界电磁场相互作用的关键性靶体之一。Binderman^[5]等发现成骨细胞暴露于 13v/cm 电场中,细胞 DNA 和 cAMP 合成呈同步升高;沈海红等^[6]的研究认为脉冲电场影响鸡胚脑细胞 cAMP 含量和 Ca²⁺通道的活动;Karabakhtsian^[7]等发现低频电磁场作用于人 HL-60 细胞,细胞的重要信使钙离子明显下降;Pessina^[8]等用 50 Hz 3mT 脉冲电磁场处理人星形细胞瘤 U-373MG 细胞,发现钙离子浓度显著上升;Eichwald^[9]等认为极低频电磁场干扰细胞内信号转导并直接与细胞的钙离子转导过程相关联,提出存在受体控制胞浆钙振荡的理论。

胰岛素是一种肽类激素,它是几乎所有细胞株在无血清培养基中生长时必需添加的生长因子^[10]。有报道表明,胰岛素抑制腺苷酸环化酶的活性,使细胞内 cAMP 浓度下降^[11],而 cAMP 浓度的下降,具有促进有丝分裂的作用。作者在研究脉冲电场影响人皮肤细胞生长的实验中发现,培养基中添加生长因子胰岛素是电场产生效应的重要因素之一。在细

胞未受电场处理,仅将电场处理的胰岛素加入培养基后,细胞的增殖活动发生明显变化。由于胰岛素是人肝细胞培养时需要添加的生长因子,胰岛素与其受体结合,发挥受体的酪氨酸激酶活性,启动细胞内的一系列生化反应,引起细胞分化、分裂等生物效应。因此本实验选择胰岛素——胰岛素受体这一信号转换系统,从脉冲电场改变胰岛素与其受体的专一结合特性方面,研究脉冲电场的细胞生物效应机理问题。

材料和方法

1. 材料

(1) 正常人肝细胞 L-02 细胞株 中科院上海生化细胞所。

(2) 试剂和药品 小牛血清(FCS):中科院实生公司;1640 培养基:GIBCOBRL 公司;胰蛋白酶:SIGMA 公司;MTT:SERVA 进口分装;DMSO:SIGMA 公司;胰岛素注射液:上海生物化学制药厂;胰岛素抗体:DAKO 公司;荧光标记二抗(FITC):DAKO 公司;其他试剂均为分析纯。

(3) 培养器皿 96 孔细胞培养板为 Corning 公司产品。

(4) 主要仪器 FAC Scan 流式细胞仪:BECTON DICKSON 公司;荧光分光光度计:HITACHI 850 型;脉冲电场发生系统:由华东师范大学物理教研室自行设计的,可使细胞培养板或培养瓶受均匀辐照的脉冲电场装置(电场频率 $f=50\text{Hz}$,脉宽 $\tau=20\mu\text{s}$,溶液中场强峰值 $E_{pp}=1\text{V/m}$),脉冲电场存在于两圆形平板电极板之间。

本文 2001 年 12 月 7 日收到,2002 年 5 月 20 日接受。

*国家自然科学基金面上和重点资助课题(NO 39870193 和 NO 50137030)。

上海市重点学科资助课题。

**通讯作者。

2. 方法

(1) 细胞培养 L-02 细胞株经传代培养,用含 10% 小牛血清和 4 μ l/ml 胰岛素的 1640 培养基制成 5×10^5 cell/ml 的细胞悬液,接种于 96 孔细胞培养板,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养。

(2) 细胞和胰岛素的脉冲电场处理 在检测脉冲电场影响细胞增殖的实验中,分为两组进行,第一组将接种培养于 96 孔细胞板的细胞(其培养液含 4 μ l/ml 胰岛素),直接置于电场发生装置的两平行电极板之间,分别处理 2、5、10、20、40 分钟,之后继续培养 5 天,用 MTT 比色法^[12]分析细胞增殖情况。第二组将胰岛素经电场处理 10、20、30 分钟,把处理过的胰岛素分别加入培养于 96 孔板的细胞培养液中(终浓度均为 4 μ l/ml),继续培养 5 天,用 MTT 比色法测定脉冲电场对细胞增殖的间接作用。每组测定 40 孔的 O.D 值,对数据进行统计和差异显著性分析,本实验重复 3 次。

(3) 胰岛素的荧光光谱实验 因胰岛素分子中存在多个酪氨酸残基,故在 276nm 激发光作用下,产生 297nm 的发射荧光。根据胰岛素分子的酪氨酸荧光光谱的变化,可检测脉冲电场对胰岛素分子构像的影响。将电场处理 0、10、20、30 分钟的胰岛素各取样 3 ml,分别在处理当天和处理后第 20 天用荧光分光光度计检测其荧光强度的变化(激发光波长 276nm, 荧光波长 297nm)。本实验重复 3 次。

(4) 间接免疫荧光技术^[13] 胰蛋白酶消化制备肝细胞悬液(无血清 1640 稀释),调整细胞密度为 1×10^6 cell/ml,对照组加入未经电场处理的胰岛素,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟,离心弃上清,加 100 μ l 胰岛素抗体,37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟,2000 r/min 离心 2 分钟,D-Hanks 溶液洗一次,加荧光标记二抗 50 μ l,37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟,离心弃上清,D-Hanks 溶液洗一次,用 D-Hanks 制成细胞悬液,用流式细胞仪进行细胞表面荧光强度的检测分析;实验组 1,其中胰岛素经脉冲电场处理 20 分钟,加入到细胞悬液中,其余处理同对照组;实验组 2,细胞悬液经脉冲电场处理 20 分钟,加入未经电场处理的胰岛素,其余处理同对照组;实验组 3,细胞悬液与胰岛素共同经电场处理 20 分钟,其余处理同对照组。本实验重复 3 次。

结 果

1. 脉冲电场对细胞增殖的直接作用

培养于 96 孔板的肝细胞(培养液中含胰岛素),经脉冲电场处理不同时间后 MTT 检测结果显示,电场处理 5、10、20 分钟对细胞增殖起极显著的抑制作用,抑制细胞分裂能力达 10-20% ($P < 0.001$),其中处理 10 分钟时抑制作用表现为最强;电场处理 2、40 分钟对细胞增殖的影响不显著(见表 1)。

表 1 脉冲电场对细胞增殖的直接作用(n=40)

电场处理时间(min)	0	2	5	10	20	40
光密度平均值(OD 值)	0.928 \pm 0.056	0.902 \pm 0.071	0.834 \pm 0.070	0.760 \pm 0.075	0.818 \pm 0.057	0.934 \pm 0.057
变化百分率(%)		-2.80	-10.13	-18.10	-11.85	+0.65
P 值		>0.05	<0.001*	<0.001*	<0.001*	>0.05

注:*与电场处理 0 min 组相比,差异极显著。

表 2 脉冲电场对细胞增殖的间接作用(n=40)

电场处理时间(min)	0	10	20	40
光密度平均值(OD 值)	0.921 \pm 0.065	0.900 \pm 0.061	0.826 \pm 0.064	0.791 \pm 0.070
变化百分率(%)		-2.28	-10.31	-14.12
P 值		>0.05	<0.001*	<0.001*

注:*与电场处理 0 min 组相比,差异极显著。

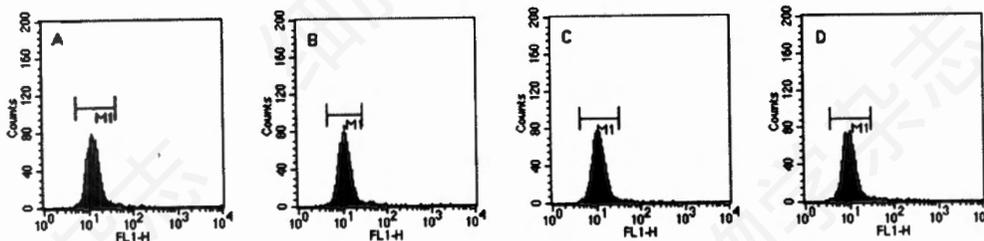


图 1 脉冲电场对胰岛素与其受体结合能力的影响(分组条件同表 4)

A. 对照组细胞荧光标记强度 B. 实验组 1 细胞荧光标记强度 C. 实验组 2 细胞荧光标记强度 D. 实验组 3 细胞荧光标记强度 (counts: 细胞数 FL1-H: FITC 荧光强度 M1: 分析荧光强度的峰的范围)。

2. 脉冲电场对细胞增殖的间接作用

胰岛素经脉冲电场处理 20、40 分钟后,分别加入到细胞培养液中,MTT 检测结果表明对细胞增殖均具有极显著抑制作用($P < 0.001$)。对照组的光密度平均值(O.D. 值)为 0.921 ± 0.065 , 电场处理 20 分钟后,光密度平均值为 0.826 ± 0.064 , 降低 10.31%; 电场处理 40 分钟后,光密度平均值为 0.791 ± 0.070 , 降低 14.12%; 而胰岛素经脉冲电场处理 10 分钟,加入到细胞培养液中,对细胞增殖的抑制作用不显著(见表 2)。

3. 脉冲电场对胰岛素荧光光谱的影响

胰岛素溶液经脉冲电场处理 10、20、30 分钟后测定其酪氨酸特征荧光峰值,发现随电场作用时间延长,其荧光强度逐渐降低,证明其构象发生变化。而且将处理后的样品放置 20 天后,荧光强度下降趋势仍然保持(见表 3)。

表 3 脉冲电场处理胰岛素后其荧光强度的变化

胰岛素电场处理时间(分钟)	0	10	20	40
荧光值(电场处理后当天检测)	97.8	85.2	70.7	58.6
荧光值(电场处理后第 20 天检测)	93.1	67.8	49.5	43.1

4. 脉冲电场对胰岛素与其受体结合能力的影响

实验发现各实验组胰岛素与其受体的结合能力均明显降低($P < 0.001$)。对照组的平均荧光强度为 12.27 ± 3.82 , 细胞悬液和胰岛素共同经脉冲电场处理 20 分钟组的平均荧光强度为 9.48 ± 3.04 , 比对照组降低 22.74%, 降低程度最大, 仅胰岛素受电场处理组和仅细胞受电场处理组的平均荧光强度分别下降 12.96% 和 10.51% (见表 4, 图 1)。

表 4 脉冲电场对胰岛素与其受体结合能力的影响

组号	n	平均荧光强度与方差	变化百分率 (%)	P 值
对照组	4944	12.27 ± 3.82		
实验组 1	4902	10.68 ± 3.09	-12.96	$< 0.001^*$
实验组 2	4944	10.98 ± 3.32	-10.51	$< 0.001^*$
实验组 3	4890	9.48 ± 3.04	-22.74	$< 0.001^*$

注: * 与对照组相比, 差异极显著。

对照组: 细胞悬液中加入未经电场处理的胰岛素。

实验组 1: 胰岛素经脉冲电场处理 20 分钟, 加入到细胞悬液中。

实验组 2: 细胞悬液经脉冲电场处理 20 分钟, 加入未经电场处理的胰岛素。

实验组 3: 细胞悬液与胰岛素共同经电场处理 20 分钟。

讨 论

本实验设计了两种电场处理方法, 一种是将传

代培养的肝细胞和培养液(含胰岛素)一起经电场处理, 其中电场既作用了细胞膜和各种细胞内部结构与生化反应, 同时也作用了培养液中的生长因子和其他介质成分。所以实验结果是各种作用效果的综合反映。另一种是将胰岛素经电场处理后加入肝细胞培养液, 所以电场未对细胞产生直接作用, 仅改变胰岛素的作用性质, 影响因素比较单一。两方面的实验均表明, 此脉冲电场影响着细胞增殖活动, 也影响着胰岛素与其受体的结合能力。

实验发现, 肝细胞和培养液中的胰岛素共同经脉冲电场处理, 只需处理 5 分钟即出现抑制细胞增殖的生物效应, 处理 10 分钟时生长抑制率最大, 处理 40 分钟时生物效应消失。而经脉冲电场处理 20 分钟以上的胰岛素加入正常肝细胞的培养液中, 才能产生抑制肝细胞增殖的效果, 说明通过改变配体产生电磁场生物效应的间接作用, 比同时改变配体和受体而产生直接的生物效应, 需要更长的作用时间或作用强度。而且也说明电场的作用是一种综合效应。我们曾在研究不同作用时间的脉冲电场对皮肤成纤维细胞增殖影响的实验中发现, 短时间电场作用($t \leq 5\text{min}$)促进细胞分裂, 长时间电场作用($t \geq 10\text{min}$)抑制细胞分裂^[14]。我们认为电场作用可以产生促进细胞增殖和抑制细胞增殖的双重效果, 在不同频率和场强下, 在不同的细胞类型上, 这两种效果的综合表现是不同的, 有时以抑制作用占主导, 有时以促进作用占主导, 有时不产生作用。所以, 目前认为电磁场的生物效应是一种非线性关系。之所以会在 40 分钟脉冲电场处理后, 在直接作用和间接作用实验中产生不同效应, 前者无效, 后者明显抑制细胞增殖, 正是因为综合效果的具体表现造成的。

本实验还发现, 脉冲电场处理胰岛素溶液后, 随处理时间的延长, 胰岛素溶液的酪氨酸特征性荧光发射光谱的荧光强度逐渐降低。从而进一步证实了脉冲电场可以改变介质分子的性质, 对细胞的生理生化反应产生间接的生物学作用。而且胰岛素溶液荧光值下降的趋势, 可以保持相当长时间(20 天以上)。说明即使撤除电场以后, 其作用仍然存在, 这是短时间电场作用, 可产生长久生物效应的根本原因之一。

间接免疫荧光技术揭示出电场对胰岛素与其受体的结合能力有明显影响。不论是电场单独处理细胞或胰岛素, 还是共同处理细胞和胰岛素, 均能抑制胰岛素与其受体的结合。但共处理条件下, 抑制率是前两者的 2 倍左右, 抑制效果最显著。本实验证

明了电场对膜受体和配体均产生影响,不同实验条件下的生物效应应该是双重作用的整体表现。Chiabrera^[15]提出电磁场可使细胞膜表面蛋白质分子产生电泳作用,从而引起膜蛋白重新分布和密度变化,影响受配体结合。刘义保^[16]发现电场引起胰岛素溶液荧光光谱强度的变化,与温度引起的变化的机理有所不同,前者是可逆的,后者是不可逆的。总之,电磁场对细胞生命活动的影响是一种相当复杂的过程,不仅涉及到电磁场对细胞结构的作用,而且也涉及到电磁场对细胞周围环境中介质因素的影响,是一种综合效应。

摘 要

本文以胞外信号分子胰岛素为研究对象,从细胞信号系统与电磁场相互耦合角度,通过 MTT 比色法和间接免疫荧光技术研究脉冲电场($f = 50\text{Hz}$, $\tau = 20\mu\text{S}$, $E_{pp} = 1\text{V/m}$)对人肝细胞(L-02 细胞株)的增殖能力以及胰岛素与细胞表面受体的专一结合特性的影响。MTT 比色分析结果发现在脉冲电场对细胞增殖的直接作用中,处理 5、10、20 分钟对细胞增殖的抑制百分率分别为 10.13%、18.10% 和 11.85%;脉冲电场对细胞增殖的间接作用中,胰岛素经脉冲电场处理 20、40 分钟,对细胞增殖的抑制百分率分别为 10.31% 和 14.12%;流式细胞术检测结果表明细胞悬液和胰岛素共同经脉冲电场处理 20 分钟组其平均荧光强度降低 22.74%,仅胰岛素受电场处理组和仅细胞受电场处理组的平均荧光强度分别下降 12.96% 和 10.51%。本实验结果显示

脉冲电场对人肝细胞的作用体现在两个方面:一是电场直接作用于细胞膜上的胰岛素受体及其他膜成分;二是脉冲电场还可通过改变培养基中的胰岛素分子的构像,影响胰岛素与受体的结合能力,进而影响细胞的增殖等活动。

关键词:低频脉冲电场 胰岛素及其受体 细胞增殖 流式细胞术

参 考 文 献

- [1] 丁翠兰等, 1996, 中国医学物理学杂志, 13(4):223-225.
- [2] Katsir G., et al., 1998, *Bioelectromagnetics*, 19: 46-52.
- [3] Sollazzo V., et al., 1997, *Bioelectromagnetics*, 18: 541-547.
- [4] Luben RA., et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:4180-4192.
- [5] Binderman I., et al., 1985, *Biochim Biophys Acta*, 844:273-279.
- [6] 沈海红等, 1996, 生物物理学报, 12(3):545-546.
- [7] Karabakhtsian R., et al., 1994, *FEBS Lett.*, 349(1): 1-8.
- [8] Pessina G. P., et al., 2001, *Bioelectromagnetics*, 22: 503-510.
- [9] Eichwald C., et al., 1995, *Bioelectromagnetics*, 16(2): 75-85.
- [10] 顾涵英等, 1990, 生物化学与生物物理进展, 17(4): 255-259.
- [11] 冯佑民等, 1975, 生物化学与生物物理进展, 4: 35-40.
- [12] 司徒镇强等, 2000, 《细胞培养》, 世界图书出版公司.
- [13] 温厚津等, 1995, 生物化学与生物物理进展, 22(2): 159-161.
- [14] 张红锋等, 1998, 细胞生物学杂志, 20(2):82-85.
- [15] Chiabrera A. M., 1984, *Bioelectromagnetics*, 5: 173-191.
- [16] 刘义保等, 1999, 光谱学与光谱分析, 19(3):481-483.

THE EFFECTS OF EXTREMELY LOW FREQUENCY PULSED ELECTRICAL FIELD ON PROLIFERATION OF HUMAN LIVER CELL MEDIATED BY INSULIN*

DING Li Ping ZHANG Hong Feng** CHEN Shu De*** ZHANG Li Hua****

(Life Science College of East China Normal University, ** Key Laboratory for Optical and Magnetic Resonance Spectroscopy of Physics Department, East China Normal University, *** State Key Laboratory of Estuarine and Coastal Research, East China Normal University, Shanghai 200062)

ABSTRACT

The effects of extremely low frequency pulsed electrical field ($f = 50\text{Hz}$, $\tau = 20\mu\text{S}$, $E_{pp} = 1\text{V/m}$) on liver cells mediated by insulin were examined by two independent methods: 1) measurement of cell proliferation using MTT colorimetric assay; 2) monitoring of insulin-insulin receptor binding properties by flow cytometry. The MTT test showed that an inhibition in cell proliferation to 10.13%, 18.10% and 11.85% when both cell and insulin were exposed to electrical field for 5 min, 10 min and 20min in direct effects, respectively; In indirect effects, cell proliferation inhibited by 10.31% and 14.12% when only insulin was exposed to electrical field for 20 min and 40min, respectively; Flow Cytometry analysis of FITC staining demonstrated that the binding capacity of live cells decreased by 22.74% when both cells and insulin were exposed to electrical field for 20min, the binding capacity decreased by 12.96% when only insulin was exposed to electrical field for 20min and the binding capacity decreased by 10.51% when only cells were exposed to electrical fields for

20min. These results indicated that the effects of extremely low frequency pulsed electrical field on liver cells have two aspects: 1). The extremely low frequency pulsed electrical field could affect insulin receptor and other membrane components; 2). The extremely low frequency pulsed electrical field could change the conformation of insulin which added to culture medium, and influence the binding capacity of insulin-insulin receptor, so as to influence cell proliferation and other metabolic activities.

Key words: Low frequency pulsed electrical field Insulin and insulin receptor Cell proliferation Flow cytometry

乙醇及 6-DMAP 对小鼠卵母细胞孤雌激活的研究*

兰国成 王子玉 马所峰 苗义良 谭景和**

(山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

研究动物孤雌生殖现象对于了解精子在受精和胚胎发育中的作用、染色体的倍数、纯合与杂合及整倍体对胚胎发育的影响等发育生物学问题以及生产纯系动物都具有重要的意义。此外,研究化学介质对卵母细胞的激活也是了解细胞信号系统及激活动力学的重要途径。

卵母细胞人工激活方法可分为物理性刺激和化学性刺激两类。前者包括机械刺激、温度刺激以及电刺激等,后者包括酶刺激、渗透压刺激、离子刺激(如钙离子载体处理)、麻醉剂处理、放线菌酮(CHX)处理以及蛋白激酶抑制剂 6-DMAP 处理等。乙醇能使小鼠卵激活^[1],但它的激活作用与卵龄有关。新排卵子对乙醇激活处理不敏感,其激活能力随卵龄增加而提高。排卵后 3h 的卵母细胞激活率仅为 47%,而排卵后 6h 的激活率达到 90%^[2-4]。在牛和山羊的细胞核移植克隆中,人们利用 6-DMAP 激活重构卵,并得到体细胞克隆动物。

许多研究都证明,乙醇浓度过高或作用时间过长都会造成卵母细胞大量死亡。由于 6-DMAP 是一种蛋白激酶抑制剂,作用时间过长也无疑会影响卵母细胞的发育能力。因此,我们实验的主要目标是探索通过乙醇和 6-DMAP 结合使用来降低二者的作用强度和作用时间,达到既保证小鼠卵母细胞的孤雌激活率,又减少对卵母细胞损伤的目的。

材料与方 法

1. 卵母细胞的获得

在泰安市生物制品研究所购买小鼠,控光一周,暗光时间 20:00-6:00;光照时间 6:00-20:00。超排处理方法是 15:00 腹腔注射 PMSG(天津华孚高生物技术公司)10IU/只小鼠,48 小时后腹腔注射 hCG(宁波激素制品厂)10IU/只。注射 hCG18 小时,利用颈椎脱臼法处死小鼠,打开腹腔取输卵管于 M2 操作液中,用眼科镊子撕开输卵管壶腹部释

放出卵丘-卵母细胞复合体(COC)团,并使其分散开。

2. 实验方法

(1) 乙醇激活:将获得的 COC 放含 5% 和 10% 乙醇的 M2 液中分别作用 5 或 10 分钟后,置于 CZB 中培养 6 小时。

(2) 6-DMAP 激活:将 COC 用含 2mmol/L 6-DMAP 的 CZB 分别培养 2、4 和 6 小时。其中,培养 2 和 4 小时的卵母细胞取出后用不含有 6-DMAP 的 CZB 再培养 4 和 2 小时。

(3) 乙醇结合 6-DMAP 激活:将 COC 放在含 5% 或 10% 乙醇的 M2 液中处理 5 分钟后,分别分两组置于含或不含 2mmol/L 6-DMAP 的 CZB 培养液中培养 6 小时。

(4) 实验结果观察:用浓度为 0.1% 的透明质酸酶作用 2-3 分钟,用直径略大于卵母细胞直径的口吸管反复吹打,脱去卵丘细胞,在相差显微镜下检查卵母细胞激活情况。只有出现 1 原核 1 极体(1PN, 1Pb)、1 原核 2 极体(1PN, 2Pb)、2 原核 1 极体(2PN, 1Pb)或 2-细胞各具一原核的卵母细胞才判断为激活。

每组实验均重复三次,每次实验均设对照组。只有在对照组卵母细胞无一激活时,实验组数据才有效。

3. 数据处理

实验数据用百分数 t 检验进行统计学处理。

结 果

1. 乙醇浓度和处理时间对小鼠母细胞孤雌激活的影响

实验中,10% 的乙醇作用 10 分钟,卵母细胞激活率最高,达到 85.6%。而 5% 的乙醇作用 10 分钟和 10% 的乙醇作用 5 分钟,结果在统计学上差异不显著,但 5% 乙醇作用 10 分钟的激活率要高一些。5% 的乙醇作用 5 分钟的激活率最低(表 1)。在激活卵的原核类型上,2-细胞的比率随着乙醇刺激强

本文 2002 年 1 月 18 日收到,5 月 28 日接受。

* 国家科技部“973”项目(编号 G200016107)资助。

** 通讯作者。

兰国成和马所峰为东北农业大学硕士研究生。