

# $\beta$ -巯基乙醇对牛孤雌胚胎发育的影响

舒建洪<sup>1,2</sup>, 张志鹏<sup>2</sup>, 李向臣<sup>2,3</sup>, 华松<sup>2</sup>, 曹俊伟<sup>2,4</sup>, 张涌<sup>2</sup>

(1 浙江理工大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310018; 2 西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100;

3 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100094; 4 内蒙古农业大学 生物工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

**【摘要】**【目的】研究 $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -ME)对牛卵母细胞核成熟和孤雌胚胎发育的影响。【方法】向 OMM 和 SOF 中添加 0, 0.05, 0.10 和 0.15 mmol/L  $\beta$ -ME, 并在牛卵母细胞激活后, 分别于 1-细胞期、8~16 细胞期、桑葚胚期向 SOF 中添加 0.1 mmol/L  $\beta$ -ME, 通过比较胚胎体外发育水平确定添加  $\beta$ -ME 的最佳时期。【结果】 $\beta$ -ME 对牛卵母细胞核成熟无显著影响( $P>0.05$ ); 0.05 和 0.10 mmol/L  $\beta$ -ME 均可显著提高牛孤雌胚胎的卵裂率及囊胚发育水平, 但以 0.10 mmol/L  $\beta$ -ME 添加组的效果较佳; 牛孤雌胚胎发育到 1-细胞期和 8~16 细胞期前, 添加 0.10 mmol/L 的  $\beta$ -ME, 均可显著提高囊胚的发育水平( $P<0.05$ ), 但 1-细胞期添加  $\beta$ -ME 时的囊胚率、囊胚细胞数显著高于 8~16 细胞期组( $P<0.05$ ), 故 1-细胞期是添加  $\beta$ -ME 的最佳时机。【结论】 $\beta$ -ME 对牛卵母细胞核成熟无促进作用, 但可提高牛孤雌胚胎的卵裂率并促使囊胚发育, 且在 8~16 细胞期前添加  $\beta$ -ME 均可提高囊胚发育水平, 但以 1-细胞添加 0.10 mmol/L  $\beta$ -ME 的促进效果最佳。

**【关键词】**  $\beta$ -巯基乙醇; 孤雌激活; 卵母细胞; 胚胎培养; 牛

**【中图分类号】** Q813.7; S823.3<sup>+</sup>6

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2008)12-0024-05

## Effect of $\beta$ -mercaptoethanol on the development of the bovine parthenogenetic embryos

SHU Jian-hong<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhi-peng<sup>2</sup>, LI Xiang-chen<sup>2,3</sup>,  
HUA Song<sup>2</sup>, CAO Jun-wei<sup>2,4</sup>, ZHANG Yong<sup>2</sup>

(1 College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China; 2 Institution of Bio-Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 3 Institute of Animal Science, Chinese Academy

of Agricultural Science, Beijing 100094, China;

4 College of Biotechnology, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018, China)

**Abstract:** 【Objective】The study investigated the effects of  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) on bovine oocytes nuclear maturation and the development of parthenogenetic embryo. 【Method】 $\beta$ -ME (0, 0.05, 0.10 and 0.15 mmol/L, treatments) was added in the media OMM and SOF respectively. Simultaneously, just as the matured oocytes were activated,  $\beta$ -ME was added in to SOF at the 1 cell-stage, 8-16 cell-stage and morula stage so that the rate of embryo development was compared. 【Result】The results indicated that nuclear maturation was not affected significantly by the absence or presence of  $\beta$ -ME ( $P>0.05$ ); 0.05 and 0.10 mmol/L  $\beta$ -ME improved cleaved rates and development of blastocytes significantly, but the latter group was better. Before bovine parthenogenetic embryo progressed to 8-16 cell-stage,  $\beta$ -ME could significantly improve blastocyte development ( $P<0.05$ ), but the rate and the number of blastocytes were significantly different between 1-cell stage group and 8-16 cell-stage group, therefore, it was the best time for

\* [收稿日期] 2007-12-10

[基金项目] 国家“863”高技术研究计划项目(2004AA213072); 浙江理工大学科研启动基金项目(0716685-Y)

[作者简介] 舒建洪(1978-), 男, 浙江金华人, 博士, 主要从事胚胎工程和分子生物学研究。E-mail: shujhzj@163.com

addition of  $\beta$ -ME to embryo culture medium at 1-cell stage. 【Conclusion】 The results indicated that the addition of  $\beta$ -ME in the media OMM and SOF had no effect on the nuclear maturation, but  $\beta$ -ME improved cleaved rates and development of blastocytes significantly. Before bovine parthenogenetic embryo progressed to 8–16 cell-stage,  $\beta$ -ME could significantly improve the development of blastocyte.

**Key words:**  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME); parthenogenetic activation; oocyte; embryo culture; bovine

体外受精或核移植胚胎的体外发育水平,直接受卵母细胞成熟与胚胎培养条件的影响,卵母细胞成熟不良或胚胎体外培养条件差,将可能导致体外受精胚胎的囊胚发育率显著下降。因此,提高体外成熟系统效率使卵母细胞充分成熟,并寻找有效的体外胚胎培养方法,是提高胚胎体外发育水平的关键。

在胚胎体外培养中,研究者们逐渐意识到了卵母细胞成熟状况及胚胎发育过程中的氧化还原状态在胚胎体外发育中的重要性。Voelkel等<sup>[1]</sup>发现,卵母细胞或胚胎在低氧条件下的发育水平要优于高氧条件;而Noda等<sup>[2]</sup>研究发现,在高氧条件下加入自由基清除剂或还原剂,可提高囊胚的发育率。由此可见,保护体外培养的卵母细胞和胚胎免受氧化损伤,成为提高其体外发育水平的关键技术措施之一。还原型谷胱甘肽(GSH)是哺乳动物细胞内存在的主要无蛋白巯基复合物,在细胞或胚胎发育中发挥着多种重要功能,如可维持卵母细胞和胚胎内的氧化还原状态,使卵母细胞、胚胎免受氧化损伤<sup>[3]</sup>等。有研究发现, $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -ME)、 $\beta$ -巯基乙胺等硫氢基化合物可促进胞内GSH的合成<sup>[4-5]</sup>,为胚胎提供良好的胞内环境,从而提高胚胎发育水平。Caamaño等<sup>[6]</sup>与Takahashi等<sup>[7]</sup>研究发现, $\beta$ -ME可提高牛IVF胚胎的囊胚形成,亦可促进猪精子胞浆内注射(ICSI)胚胎的发育<sup>[8]</sup>。国内也有关于 $\beta$ -ME可促进水牛<sup>[9-10]</sup>、小鼠<sup>[11]</sup>体外受精水平及囊胚发育率的报道,但至今尚未见有关 $\beta$ -ME对牛孤雌胚胎发育影响的研究报道。为此,本试验在牛卵母细胞成熟液和胚胎培养液中添加 $\beta$ -ME,探讨 $\beta$ -ME对牛卵母细胞核成熟及孤雌胚胎发育的影响,以优化牛胚胎体外培养体系,为体外受精或核移植胚的培养奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 牛卵巢的采集 从屠宰场采集牛卵巢置于25~35℃生理盐水中,于3~5 h内运回实验室。

1.1.2 主要试剂 M199, Gibco产品; $\beta$ -ME, Gen-

view产品;胎牛血清FBS, Hyclone产品;HMG, Serono产品。其余未特别说明的试剂均为Sigma产品。

### 1.2 牛卵母细胞的体外成熟与孤雌激活

牛卵母细胞的体外成熟与孤雌激活参照文献[12]的方法进行。

### 1.3 牛孤雌激活胚胎的培养

用SOF培养液将激活的牛孤雌胚胎洗3次后,在无血清SOF中于38.5℃、体积分数5% CO<sub>2</sub>和饱和湿度条件下培养,36~48 h时统计卵裂率,将未卵裂和卵裂但形态不正常的卵母细胞弃去,在96 h时添加体积分数10%的FBS,在168~192 h时统计囊胚发育率。

### 1.4 囊胚细胞计数

参照Kobayashi等<sup>[8]</sup>的方法进行固定,室温自然干燥后用4 g/L Giemsa染色15 min,冲洗干燥后在相差显微镜下计数。

### 1.5 试验设计与数据分析

试验包括3部分内容:(1)在OMM中分别添加0, 0.05, 0.10和0.15 mmol/L的 $\beta$ -ME,研究 $\beta$ -ME对牛卵母细胞核成熟的影响;(2)在SOF中添加0, 0.05, 0.10和0.15 mmol/L的 $\beta$ -ME,研究 $\beta$ -ME对牛孤雌胚胎发育的影响;(3)牛卵母细胞激活后,分别在1-细胞期、8~16细胞期、桑葚胚期,向SOF中添加0.10 mmol/L  $\beta$ -ME,并设对照组,比较胚胎发育情况,确定 $\beta$ -ME的最佳添加时期。所有试验均重复3次以上,用DPS3.0软件采用新复级差法进行统计与分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\beta$ -ME对牛卵母细胞核成熟的影响

各试验组与对照组的核成熟率见表1。由表1可见,各试验组与对照组的核成熟率均无显著差异( $P < 0.05$ ),表明 $\beta$ -ME对牛卵母细胞的核成熟无促进作用。

### 2.2 $\beta$ -ME对牛孤雌胚胎发育的影响

添加不同浓度 $\beta$ -ME时,牛孤雌激活胚胎的发育情况如表2所示。由表2可以看出,0.05和0.10

mmol/L  $\beta$ -ME 添加组的卵裂率、囊胚率和囊胚细胞数均较对照组显著提高 ( $P < 0.05$ ), 且这 2 组间的囊胚细胞数亦有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 表明 0.05 和

0.10 mmol/L  $\beta$ -ME 对牛孤雌胚胎的卵裂和囊胚的发育均有促进作用, 且以 0.10 mmol/L  $\beta$ -ME 添加组的效果更佳。

表 1 不同浓度  $\beta$ -ME 对牛卵母细胞核成熟的影响

Table 1 Effect of  $\beta$ -ME on nuclear maturation of bovine oocytes cultured in vitro

$\beta$ -ME 浓度/ (mmol · L <sup>-1</sup> ) $\beta$ -ME concentration	卵母细胞数 No. of oocytes	核成熟率/% Rate of nuclear maturation	$\beta$ -ME 浓度/ (mmol · L <sup>-1</sup> ) $\beta$ -ME concentration	卵母细胞数 No. of oocytes	核成熟率/% Rate of nuclear maturation
0	227	82.82 ± 2.68 a	0.10	232	81.53 ± 3.41 a
0.05	224	80.41 ± 3.00 a	0.15	237	79.32 ± 1.90 a

注: 同列数据后标不同字母者表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下表同。

Note: Figures with different letters in the same column show significant difference ( $P < 0.05$ ). The followings are the same.

表 2 不同浓度  $\beta$ -ME 对牛孤雌胚胎发育的影响

Table 2 Effect of different concentrations of  $\beta$ -ME on bovine parthenogenetic embryo development

$\beta$ -ME 浓度/(mmol · L <sup>-1</sup> ) $\beta$ -ME concentration	激活卵数 No. of activated oocytes	卵裂率/% Cleavage	囊胚率/% Blastocyte rate	囊胚细胞数 Cell number of blastocyte
0	229	82.86 ± 1.74 a	6.02 ± 1.48 a	84.0 ± 2.9 a
0.05	229	87.36 ± 1.44 b	9.66 ± 1.07 b	89.2 ± 2.9 b
0.10	218	88.03 ± 0.65 b	11.35 ± 1.72 b	94.4 ± 3.2 c
0.15	225	82.18 ± 1.51 a	7.10 ± 0.44 a	83.9 ± 2.5 a

## 2.3 $\beta$ -ME 不同添加时期对牛孤雌胚胎发育的影响

中添加 0.10 mmol/L  $\beta$ -ME 时, 孤雌激活胚的发育情况如表 3 所示。

在牛孤雌激活胚胎发育的不同时期, 在培养液

表 3 不同时期添加 0.10 mmol/L  $\beta$ -ME 对牛孤雌胚胎发育的影响

Table 3 Effect of addition of 0.10 mmol/L  $\beta$ -ME to SOF at different stages on embryonic development

组别 Treatment	激活卵数 No. of activated oocytes	卵裂率/% Cleavage	囊胚率/% Blastocyte rate	囊胚细胞数 Cell number of blastocyte
空白 Blank	244	82.43 ± 2.46 a	6.14 ± 1.16 a	84.2 ± 2.7 a
1-细胞期 1-cell stage	253	88.25 ± 2.86 b	11.45 ± 1.65 b	94.7 ± 3.7 b
8~16 细胞期 8-16 cell stage	261	83.98 ± 3.44 ab	8.83 ± 0.91 c	89.1 ± 2.9 c
桑葚胚期 Morula stage	252	82.18 ± 2.58 a	6.31 ± 1.09 a	84.1 ± 2.6 a

由表 3 可知, 在 1-细胞期添加 0.10 mmol/L  $\beta$ -ME 时, 其卵裂率较对照组及桑葚胚期添加组均有显著提高, 而 8~16 细胞期添加组的卵裂率与对照组无显著差异; 1-细胞期与 8~16 细胞期添加组的囊胚率、囊胚细胞数均显著高于对照组和桑葚胚期添加组 ( $P < 0.05$ ), 且 1-细胞期添加组的囊胚率、囊胚细胞数显著高于 8~16 细胞期添加组 ( $P < 0.05$ )。表明牛孤雌胚胎发育到 8~16 细胞期前, 添加  $\beta$ -ME 均可提高囊胚发育水平, 但 1-细胞期是添加  $\beta$ -ME 的最佳时期。

体外培养在早期胚胎时往往表现出“体外发育阻断”现象, 说明体外培养液缺少象体内那样对胚胎发育有利的环境和物质。卵母细胞与胚胎的氧化损伤, 是近年来发现的对体外培养系统有影响的一个不利因素, 在鼠<sup>[2]</sup>、猪<sup>[8]</sup>、牛<sup>[14-15]</sup>、犬<sup>[16]</sup>的胚胎体外研究中均有氧化损伤的报道, 这大大降低了胚胎发育水平。 $\beta$ -ME 是一种低分子量的巯基还原剂, 可以保护胚胎免受氧化损伤, 因此被广泛应用于各种动物的体外胚胎培养中<sup>[8, 15-16]</sup>。本试验在牛卵母细胞成熟液中添加 0.05, 0.10, 0.15 mmol/L  $\beta$ -ME, 成熟 22~24 h 后试验组的成熟率与对照组无显著差异。Oyamada 等<sup>[15]</sup>在牛成熟培养液中添加 0.10 mmol/L 巯基乙胺, 结果也未见其对成熟率有显著影响, 而 Kim 等<sup>[16]</sup>在狗卵母细胞成熟过程中添加 0.05 和 0.10 mmol/L  $\beta$ -ME 却得到相反的结果。比较分析其原因认为, 本试验成熟液中添加了激素、EGF, 这些物质都可以增加胞内的 GSH 含量<sup>[17-18]</sup>,

## 3 讨论

### 3.1 $\beta$ -ME 对牛卵母细胞核成熟的影响

1957 年, Whitten<sup>[13]</sup>将小鼠胚胎从 8-细胞体外培养到囊胚, 从而开辟了哺乳动物胚胎体外培养的研究领域, 随着体外受精、胚胎分割、核移植等技术的发展, 大大促进了胚胎体外培养方法的研究, 然而

从而促进哺乳动物卵母细胞的成熟,而 Kim 等<sup>[16]</sup>在试验中未添加任何激素或 EGF,所以有可能是这些物质掩盖了  $\beta$ -ME 对卵母细胞成熟的有效作用,而物种差异也可能是另一诱因。

### 3.2 $\beta$ -ME 对牛孤雌胚胎发育的影响

本试验对  $\beta$ -ME 在胚胎发育过程中抗氧化作用的研究结果显示,将成熟培养 22~24 h 的牛 M II 卵母细胞激活后,在 SOF 中添加 0.10 mmol/L  $\beta$ -ME 的成熟效果最好。 $\beta$ -ME 对胚胎的保护作用与胞质内的 GSH 含量有关,Takahashi 等<sup>[7]</sup>研究证明,培养液中添加  $\beta$ -ME 会增加牛胚胎 GSH 的合成,进而增强其对胚胎的保护作用。本试验结果显示,在 SOF 中添加  $\beta$ -ME 可使囊胚率显著提高,且较 Oyamada 等<sup>[15]</sup>在同等  $O_2$  浓度下得到的囊胚率高,囊胚细胞数也显著增多,这可能是由于 GSH 含量增加的缘故。此外,预试验时设置了 0.50 mmol/L  $\beta$ -ME 添加组,但无一细胞卵裂,其中机制尚不太清楚,还有待于进一步研究。

### 3.3 $\beta$ -ME 不同添加时期对牛孤雌胚胎发育的影响

在牛孤雌胚胎的不同发育阶段添加  $\beta$ -ME,对早期胚胎后期发育的影响也不尽相同。本试验结果表明,在 1-细胞期(即未卵裂前)和 8~16 细胞期添加  $\beta$ -ME,胚胎发育水平均较对照组显著提高(囊胚率高,囊胚细胞数多),且以 1-细胞期效果最好。牛卵母细胞体外成熟后,由硫氢基复合物诱导合成的 GSH 在细胞内部一直维持着较高水平,甚至在体外培养初期仍然存在,故可提高胚胎发育水平,并影响到随后的体外胚胎发育<sup>[5]</sup>。作者认为,虽在 8~16 细胞之前有足够的 GSH 保护胚胎,但若后续的 GSH 合成逐渐减少,且如果没有外源 GSH 加以补充,可能还会发生氧化损伤。本试验虽然在桑葚胚期加入  $\beta$ -ME,但各项指标与对照组均无显著差异,可能是由于氧化损伤已经不可修复所致。

本研究仅分析探讨了  $\beta$ -ME 对牛卵母细胞核成熟及牛孤雌胚胎发育的影响,对  $\beta$ -ME 的作用机理以及牛胚胎 GSH 利用与合成的动力学机制,还有待于进一步研究,此外,研究哺乳动物胚胎抵御自由基的分子机制有助于了解有关的生理过程,从而设计出可激发分子防御内源系统的培养条件,以提高胚胎的发育水平。

### [参考文献]

[1] Voelkel S A, Hu Y X. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems [J].

Theriogenology, 1992, 37: 1117-1131.

[2] Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, et al. Improvement of superoxide radicals in mouse two-cell block phenomenon [J]. Mol Reprod Dev, 1991, 28: 356-360.

[3] Hashimoto S, Minami N, Takakura R, et al. Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes [J]. Mol Reprod Dev, 2000, 57: 353-360.

[4] Mizushima S, Fukui Y. Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined maturation medium [J]. Theriogenology, 2001, 55: 1431-1445.

[5] de Matos D G, Furnus C C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine [J]. Theriogenology, 2000, 53: 761-771.

[6] Caamaño J N, Ryoo Z Y, Thomas J A, et al.  $\beta$ -Mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos [J]. Biol Reprod, 1996, 55: 1179-1184.

[7] Takahashi M, Nagai T, Okamura N, et al. Promoting effect of  $\beta$ -mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos [J]. Biol Reprod, 2002, 6: 562-567.

[8] Kobayashi M, Lee E S, Fukui Y. Cysteamine or  $\beta$ -mercaptoethanol added to a defined maturation medium improves blastocyst formation of porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection [J]. Theriogenology, 2006, 65: 1191-1199.

[9] 尚江华, 张秀芳, 黄右军, 等. 添加  $\beta$ -巯基乙醇对水牛胚胎体外发育的影响 [J]. 草食家畜, 2001(3): 28-31.

Shang J H, Zhang X F, Huang Y J, et al. Effect of  $\beta$ -mercaptoethanol on water Buffalo embryo development *in vitro* [J]. Grass-Feeding Livestock, 2001(3): 28-31. (in Chinese)

[10] 黄右军, 黄芬香, 张秀芳, 等. 水牛卵母细胞体外受精与早期胚胎发育的研究 [J]. 中国畜牧杂志, 2002, 38(4): 10-12.

Huang Y J, Huang F X, Zhang X F, et al. Studies on *in vitro* fertilization and early embryonic development in Buffalo oocytes [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2002, 38(4): 10-12. (in Chinese)

[11] 安铁涿, 谭建华, 岳占碰, 等. 小鼠体外受精及胚胎发育的影响因素 [J]. 中国兽医学报, 2002, 22(2): 191-193.

An T Z, Tan J H, Yue Z P, et al. Some factors affecting mouse *in vitro* fertilization and embryonic development [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2002, 22(2): 191-193. (in Chinese)

[12] 李向臣, 丛日华, 安志兴, 等. EGF 和 FBS 对牛孤雌胚胎发育的影响 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(4): 51-54.

Li X C, Cong R H, An Z X, et al. The influence of EGF and FBS on parthenogenetic embryo proliferation of bovine [J]. Journal of Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition, 2004, 32(4): 51-54. (in

Chinese)

- [13] Whitten W K. Culture of tubal ova [J]. Nature, 1957, 179: 1081-1082.
- [14] de Matos D G, Gasparrini B, Pasqualini S R, et al. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of bovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content [J]. Theriogenology, 2002, 57(5): 1443-1451.
- [15] Oyamada T, Fukui Y. Oxygen tension and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium [J]. J Reprod Dev, 2004, 50: 107-117.
- [16] Kim M K, Fibrianto Y H, Oh H J, et al. Effect of  $\beta$ -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in*

*vitro* maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle [J]. J Vet Sci, 2004, 5(3): 253-258.

- [17] Kishida R, Lee E S, Fukui Y. *In vitro* maturation of porcine oocytes using a defined medium and developmental capacity after intracytoplasmic sperm injection [J]. Theriogenology, 2004, 62: 1663-1676.
- [18] Gasparrini B, Boccia L, Marchandise J, et al. Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development [J]. Theriogenology, 2006, 65: 275-287.

---

(上接第 23 页)

- [13] 于力, 张钧寿, 周建平. 纳米乳的研究及其在制剂学领域的应用 [J]. 药学进展, 2006, 30(11): 491-497.  
Yu L, Zhang J S, Zhou J P. Research of nano-emulsions and their application in pharmaceuticals [J]. Progress in Pharmaceutical Science, 2006, 30(11): 491-497. (in Chinese)
- [14] 杨惊宇, 严冬. 新型药物剂型——微乳 [J]. 中国医学工程, 2005, 13(4): 378-381.  
Yang J Y, Yan D. Drug delivery system——Microemulsion [J]. China Medical Engineering, 2005, 13(4): 378-381. (in

Chinese)

- [15] 宋明娜. 乳化溶剂挥发法制备阿莫西林缓释微囊的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2000.  
Song M N. Preparation of amoxicillin sustained release microcapsules by emulsion solvent evaporation process [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2000. (in Chinese)
- [16] Sarciaux J M, Acar L, Sado P A. Using microemulsion formulations for drug delivery of therapeutic peptides [J]. Int J Pharm, 1995, 120: 127-136.