

技术与方法

海藻糖和果糖联合应用提高了乌骨羊冷冻精子质量

郭志林^{1*} 杨永梅¹ 于富丽² 武迪³ 任俊光³¹呼和浩特职业学院, 呼和浩特 010010; ²内蒙古动物疫病预防控制中心, 呼和浩特 010010;³内蒙古草原乌骨羊生物科技有限公司, 呼和浩特 010010)

摘要 该文探讨了海藻糖和果糖联合应用对乌骨羊精子冷冻保存的影响。在含有82.65 mmol/L果糖的Tris-柠檬酸-卵黄稀释液中分别添加0、5、10、15、25、50和100 mmol/L海藻糖, 并将其分别命名为T0、T5、T10、T15、T25、T50和T100, 采用两步稀释法对来自12只乌骨羊的27份精液进行冷冻保存。在精子冷冻前和解冻后, 利用精子质量分析仪评估精子运动情况, 采用伊红-苯胺黑染色法评估精子存活百分率, 采用羧基荧光素二乙酸酯-碘化丙啶双重染色评估精子质膜状况, 利用络合异硫氰酸荧光素的碗豆凝集素染色对精子顶体状况进行评估。采用过氧化氢含量测定试剂盒和丙二醛含量测定试剂盒检测各实验组解冻后精子的过氧化氢含量和丙二醛含量, 以评估精子脂质过氧化状况。结果显示, T5、T10和T15组解冻后的精子运动和存活率有显著提高; T5组精子质膜状况有显著改善; 和T0组相比, 添加海藻糖并不能改善精子顶体状况; 添加海藻糖不能降低解冻后精子的过氧化氢含量, 但是可以显著降低精子的丙二醛含量。该研究的结果说明: 在Tris-柠檬酸-卵黄稀释液中添加5 mmol/L海藻糖和82.65 mmol/L果糖能提高乌骨羊冷冻精子质量, 能够改善解冻后精子的运动、存活和质膜完整性, 减少解冻后精子膜的脂质过氧化。

关键词 果糖; 海藻糖; Tris稀释液; 乌骨羊; 冷冻精子

Quality Improvement of Frozen Sperm by Combined Usage of Trehalose and Fructose in Black-Bone Sheep

GUO Zhilin^{1*}, YANG Yongmei¹, YU Fuli², WU Di³, REN Junguang³¹Hohhot Vocational College, Hohhot 010010, China; ²Inner Mongolia Animal Disease Prevention and Control Center, Hohhot 010010, China; ³Inner Mongolia Grassland Black-Bone Sheep Biological Technology Co., Ltd., Hohhot 010010, China)

Abstract The impact of trehalose and fructose on cryopreservation of Black-bone sheep sperm was researched. Tris-citric acid-egg yolk diluent containing 82.65 mmol/L fructose was supplemented with 0, 5, 10, 15, 25, 50 and 100 mmol/L trehalose, respectively. The assay was divided into T0, T5, T10, T15, T25, T50 and T100 groups. Twenty-seven semen samples from 12 Black-bone sheeps were cryopreserved by two-step dilution method. Before and after thawing, sperm motility was evaluated by sperm quality analyzer. The percentage of survival sperm was evaluated by eosin aniline black staining. Sperm plasma membrane status was evaluated by carboxyl

收稿日期: 2021-08-31 接受日期: 2021-11-08

内蒙古自治区自然科学基金(批准号: 2019MS03091)和内蒙古自治区高等学校科学研究项目(批准号: NJZY19291)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15754931175, E-mail: gzl7511@aliyun.com

Received: August 31, 2021 Accepted: November 8, 2021

This work was supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (Grant No.2019MS03091) and the Inner Mongolia Autonomous Region Higher Education Scientific Research Project (Grant No.NJZY19291)

*Corresponding author. Tel: +86-15754931175, E-mail: gzl7511@aliyun.com

fluorescein diacetate/propidium iodide double staining. Sperm acrosome status was evaluated by pea agglutinin staining complexed with fluorescein isothiocyanate. The hydrogen peroxide content and malondialdehyde content of thawed sperm in each experimental group were detected by hydrogen peroxide content determination kit and malondialdehyde content determination kit to evaluate the lipid peroxidation of sperm. The results showed that the sperm movement and survival rate of T5, T10 and T15 groups were significantly improved after freezing. The status of sperm plasma membrane of T5 group was significantly improved. Compared with the T0 group, adding trehalose could not improve sperm acrosome status. The addition of trehalose could not reduce the hydrogen peroxide content of thawed sperm, but could significantly reduce the malondialdehyde content of sperm. The results suggest that adding 5 mmol/L trehalose and 82.65 mmol/L fructose to Tris-citric acid-yolk dilution can improve the quality of frozen sperm of Black-bone sheep, increase the sperm movement, survival and plasma membrane integrity after thawing, and reduce the lipid peroxidation of sperm membrane after thawing.

Keywords fructose; trehalose; Tris dilution; Black-bone sheep; frozen sperm

在冷冻保存过程中,冷休克打击、渗透压失衡、胞内冰晶形成和脂质过氧化破坏等因素均会造成精子细胞损伤,导致冷冻精子质量和生育力明显下降^[1-2]。果糖是射出精液的主要能量来源,精液中也含有少量的葡萄糖,这些单糖在调节渗透压的同时也可以渗入精子细胞内,作为能量底物通过糖酵解或三羧酸循环产生ATP为精子提供能量^[3]。一些研究证实了在稀释液中添加果糖对公羊冷冻精子具有保护作用^[4-5]。海藻糖属于非还原性二糖,分子结构中含有两个葡萄糖分子,不同于低分子量的果糖和葡萄糖,它不能通过细胞膜扩散到精子细胞内参与能量代谢,但是可以作为冷冻保护剂在细胞外通过提高渗透压诱导细胞脱水,减少冷冻过程中胞内冰晶的形成,从而保护精子免受冷冻损伤^[6]。已有一些研究报道了海藻糖对海蟾蜍^[7]、兔^[8]、猪^[9]、犬^[10]、牛^[11]、羊^[12]等动物精子冷冻保存的效果。就海藻糖对绵羊冷冻精子的保护作用而言,不同研究人员报道的海藻糖工作浓度有明显的差异^[12-14]。海藻糖比其他二糖具有更高的玻璃化相变温度,可以与膜磷脂作用来稳定脂质双分子层^[10]。海藻糖能够重新排列细胞膜上糖羟基和磷脂极性头部之间的氢键,从而增强膜流动性,在冷冻-解冻条件下便于水分子穿越细胞膜,提高精子对渗透压失衡的耐受性^[15-16]。海藻糖能减少冷冻精子DNA片段化^[17],提高酶的抗氧化活性,避免精子膜脂质过氧化^[18]。

研究人员认为不同糖类联合使用相比于单用一种糖能显著提高冷冻精子质量^[19]。我们的前期研究证实了果糖对乌骨羊精子的冷冻保护作用,因此本研究将验证这样一个假设:在Tris-柠檬酸-卵黄稀

释液中添加海藻糖和果糖有利于乌骨羊精子的冷冻保存。我们检测了各实验组冷冻-解冻精子的运动、存活、质膜和顶体情况,分析了海藻糖和果糖联合应用对冷冻精子质量的影响,测试了解冻后精子中的过氧化氢和丙二醛含量,研究了果糖和海藻糖联合应用对精子脂质过氧化的保护效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 采样对象 2020年9月至2021年2月在位于呼和浩特市武川县的内蒙古草原乌骨羊科技有限公司种羊场开展本实验研究。选取有过配种及后代生产记录的健康成年乌骨羊公羊(体质量36~44 kg,年龄2~4岁)12只,放入专用圈舍由专人饲喂。饲喂公羊专用颗粒饲料、优质燕麦草,每只羊每天补饲1枚鸡蛋、500 g胡萝卜,保证充足饮水、每天2 h以上室外运动。适应性饲养1周以上,之后开始采集精液,每周采精2次。

1.1.2 主要试剂及仪器 Tris、柠檬酸、果糖、海藻糖、青霉素钠、链霉素等试剂均购自范德生物科技有限公司。丙二醛含量测定试剂盒、过氧化氢含量测定试剂盒均购自齐一生物科技(上海)有限公司。伊红-苯胺黑染色试剂盒购自浙江中益生物科技有限公司。0.25 mL细管购自上海卡苏生物科技有限公司。生物显微镜(型号:UB103i)购自重庆澳浦光电技术有限公司。动物精子质量分析仪(型号:SQA-6100vet)购自深圳创怀医疗科技有限公司。动物电子采精器(型号:Dtc9-2017)购自安徽精东生物科技有限公司。多功能酶标仪(型号:Thermo MULTI-

SKAN GO)购自Thermo Fisher公司。荧光显微镜购自北京新卓仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 精液采集与评价 将公羊放于羊专用保定架上,剪掉尿道口周围羊毛,清洗包皮囊,用纱布擦干。将动物电子采精器探头插入羊直肠15 cm,将频率调到最大档,电压先调到中档,按下开关,根据动物反应可逐渐增加电压档位,重复电刺激直至公羊射精。用50 mL带盖塑料离心管收集精液,正常精液外观为乳白色、黏稠,呈云雾状。取10 μ L精液,用精子稀释液对其进行40倍稀释,取5 μ L稀释精液放入动物精子质量分析仪精子计数板计数室内,测试精子运动状态、浓度等参数,选取精子活力在0.75以上、浓度在 1.5×10^9 个/mL以上的精液样本用于后续实验。为了消除个体差异,每次选取3~5个精液样本,混合后,再进行下一步操作。

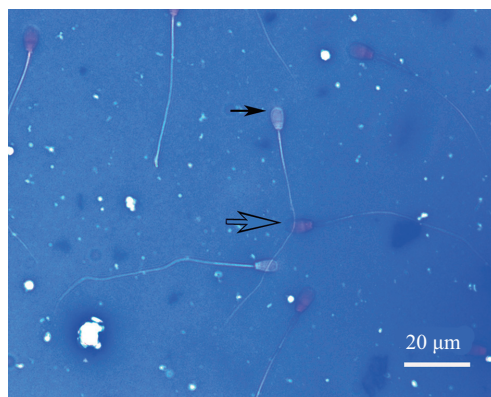
1.2.2 精液稀释液配制与精液稀释 按照以下配方配制Tris果糖稀释液:297.60 mmol/L Tris、96.32 mmol/L一水柠檬酸、82.65 mmol/L果糖、15%卵黄(V/V; Tris稀释液配制后,加入15%体积百分比的卵黄)、100 IU/mL青霉素钠、100 mg/mL链霉素, pH6.8。在Tris果糖稀释液中分别加入0、5、10、15、25、50和100 mmol/L海藻糖,并将其分别命名为T0、T5、T10、T15、T25、T50和T100组。将混合精液分成7份,分别用T0、T5、T10、T15、T25、T50和T100组稀释液进行两步稀释。按所测得的浓度数值对精液进行第一步稀释,使各实验组精子终浓度为 2×10^8 个/mL。将各组稀释精液

放入预先装有200 mL、35 $^{\circ}$ C温水的烧杯中,将烧杯放入5 $^{\circ}$ C冷藏箱进行降温,使其在2 h内降温至5 $^{\circ}$ C。预先在T0、T5、T10、T15、T25、T50和T100组稀释液中分别加入10%甘油(V/V,在已加入卵黄的稀释液中再加入10%体积百分比的甘油),并将其放入冷藏箱中预冷至5 $^{\circ}$ C。将预冷的含甘油的稀释液按1:1(V/V)的比例分别缓慢加入到各组降温至5 $^{\circ}$ C的精液中,混匀,完成第二步稀释。于5 $^{\circ}$ C冷藏箱内,平衡2~3 h。

1.2.3 精液包装、冷冻和解冻 将平衡后的精液混匀,灌装于0.25 mL细管中,用聚乙烯醇粉封口。将细管置于液氮蒸汽中,使细管距离液氮面4 cm,熏蒸10 min,然后将细管投入液氮中。将细管分装于拇指筒,再装入纱布袋,保存于液氮中。解冻时,从液氮中取出细管快速投入37 $^{\circ}$ C水浴中,快速振荡解冻30 s,将精液转入1.5 mL塑料离心管,置于37 $^{\circ}$ C水浴保温,以用于精子质量分析。

1.2.4 精子运动和存活分析 取出5 μ L解冻后的精液,将其加入精子计数室,用动物精子质量分析仪进行运动精子分析,每个样本重复检测3次。利用伊红-苯胺黑染色试剂盒评估精子的存活率。取20 μ L精液样本放入1.5 mL塑料离心管中,加入20 μ L染色剂,在室温下混合。染色30 s后,取20 μ L精液滴在载玻片上,涂成一薄层,在空气中快速干燥。通过在1 000倍油镜下计数200个精子来检测精子的存活率。如图1所示,头部未染色的精子被记录为活精子,而头部染红的精子被记录为死精子。

1.2.5 评估精子质膜完整性 精子质膜完整性评估



经伊红-苯胺黑染色的乌骨羊精子,实心箭头指示存活精子,空心箭头指示死精子。

The Black-bone sheep sperm is stained with eosin-aniline black. The solid arrow indicates the survival sperm, and the open arrow indicates the dead sperm.

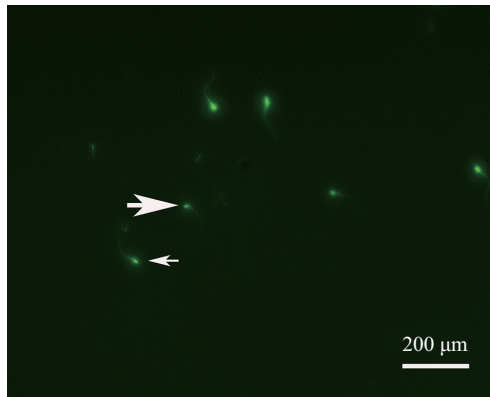
图1 乌骨羊精子的伊红-苯胺黑染色

Fig.1 Eosin-aniline black staining for Black-bone sheep sperm

方法由HARRISON和VICKERS^[20]报道, 其后由ROTA和STRORM^[21]进行了改进。该方法是利用碘化丙啶(PI)和羧基荧光素二乙酸酯(CFDA)进行双重荧光染色来确定精子质膜完整情况。简而言之, 用于精子质膜评估的染色液其配制方法如下: 1 mL基础盐溶液(140 mmol/L NaCl、10 mmol/L葡萄糖、2.5 mmol/L KCl、0.5 mg/mL聚乙烯醇、0.5 mg/mL聚乙烯吡咯烷酮和20 mmol/L HEPES), 另外加20 μ L甲醛溶液、20 μ L CFDA溶液和10 μ L PI。精子终浓度调为 1×10^7 个/mL。染色液和精液样品以2:1的比例混合, 37 $^{\circ}$ C孵育8 min。随后, 将5 μ L染色悬浮液滴到载玻片上, 盖上盖玻片。在荧光显微镜下观察至少200个细胞。如图2所示, 整个鞭毛区带有绿色荧光的精子被归类为具有完整质

膜的精子, 而所有仅在部分区段带有绿色荧光的精子被归类为质膜受损的精子, 头部有红色荧光的精子也被归类为质膜受损的精子。

1.2.6 评估精子顶体状况 如CARRERAS等^[22]所描述的方法, 采用络合异硫氰酸荧光素的碗豆凝集素(FITC-PSA)进行精子顶体荧光标记实验。取5 μ L精液样本涂布于载玻片上, 空气中干燥, 甲醇中固定15 min。快速干燥后, 精子涂片滴加200 μ L FITC-PSA溶液(用磷酸盐缓冲液配制50 μ g/mL FITC-PSA溶液), 放入湿盒中, 室温下避光孵育30 min。用蒸馏水冲洗载玻片, 在水中浸泡15 min去除未结合的染料。干燥后, 在荧光显微镜下观察至少200个精子。如图3所示, 顶体区有特异染色的精子被记录为完整

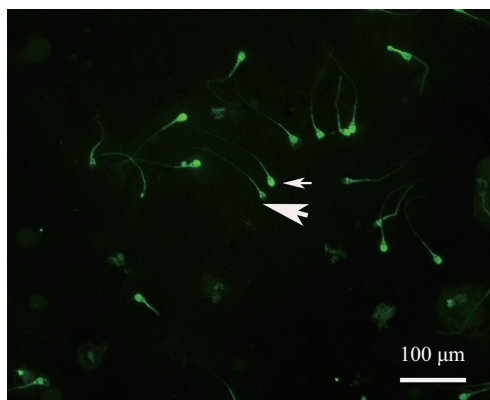


羧基荧光素二乙酸酯荧光染色的乌骨羊精子, 细箭头指示质膜完整的精子, 粗箭头指示质膜破裂的精子。

Black-bone sheep sperm is stained with carboxyfluorescein diacetate. The thin arrow indicates intact plasma membrane sperm, and the thick arrow indicates sperm with ruptured plasma membrane.

图2 乌骨羊精子的羧基荧光素二乙酸酯荧光染色

Fig.2 Fluorescence staining of Black-bone sheep sperm with carboxyfluorescein diacetate



乌骨羊精子的络合异硫氰酸荧光素的碗豆凝集素荧光染色, 细箭头指示顶体完整精子, 粗箭头指示顶体异常精子。

Black-bone sheep sperm is stained with fluorescein isothiocyanate-peas agglutinin. The thin arrow indicates intact acrosome sperm, and the thick arrow indicates abnormal acrosome sperm.

图3 乌骨羊精子的络合异硫氰酸荧光素的碗豆凝集素荧光染色

Fig.3 Fluorescence staining of Black-bone sheep sperm with bowl bean lectin complexed with fluorescein isothiocyanate

顶体精子, 而顶体区无染色的精子被记录为顶体损伤精子。

1.2.7 精子过氧化氢和丙二醛含量测定 过氧化氢含量测定: 用精子分析仪测定解冻后精液的精子浓度, 通过计算体积从每份样本中取 2.5×10^7 个精子, 用PBS洗涤后, $1\ 000 \times g$ 离心5 min, 去掉上清, 加5 mL预冷的丙酮, 冰浴下超声破碎后, $8\ 000 \times g$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$ 离心10 min, 取上清。按照过氧化氢含量测定试剂盒说明书对解冻精子细胞中的过氧化氢含量进行测定, 将待测样品与过氧化氢检测工作液混匀, 再按照要求配制标准管和对照管溶液, $4\ 000 \times g$ 离心10 min, 弃上清, 加入试剂四溶解沉淀, 将样品、标准液和对照液加入到96孔板中, 用酶标仪在415 nm波长处检测吸光度(D)值, 利用过氧化氢含量公式进行计算: 样品过氧化氢含量 $=0.002 \times (D_{\text{测定}} - D_{\text{对照}}) \div (D_{\text{标准}} - D_{\text{对照}})$ 。

丙二醛含量测定: 用精子分析仪测定解冻后精液的精子浓度, 通过计算体积从每份样本中取 2.5×10^7 个精子, 用PBS洗涤后, $1\ 000 \times g$ 离心5 min, 去掉上清, 加入5 mL提取液, 在冰浴下超声破碎后, $8\ 000 \times g$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$ 离心10 min, 取上清。按照丙二醛含量测定试剂盒说明书对丙二醛含量进行测定, 将待测样品与丙二醛检测工作液混匀, $95\ ^\circ\text{C}$ 水浴中保温30 min, 冰浴中冷却, $10\ 000 \times g$ 离心10 min。吸取上清加入96孔板中, 用酶标仪在532 nm和600 nm波长处检测吸光度值, 利用丙二醛含量公式进行计算: 样品丙二醛含量 $=0.103\ 2 \times (D_{532} - D_{600})$ 。

1.2.8 实验设计与统计分析 将符合要求的乌骨羊精液样本混合后分为7份, 分别用T0、T5、T10、T15、T25、T50和T100组稀释液稀释, 按前述方法进行冷冻、解冻, 对解冻后的各组精子进行运动、存活、质膜完整、顶体完整情况评估。本实验重复5次, 解冻后精子的质量评估重复3次。

利用SPSS 21.0统计分析软件对所有数据进行单因素方差分析。定量资料结果数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 依据LSD值进行组间均值多重比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 添加不同浓度海藻糖对乌骨羊冷冻精子运动的影响

将来自12只乌骨羊的共27份精液样本用于本实验研究。5次重复实验所用混合精液的体积为

(5.56 ± 1.32) mL, 精子浓度为(25.69 ± 4.32) $\times 10^8$ 个/mL, 运动精子百分率为(88.78 ± 3.67)%, 存活精子百分率为(66.45 ± 5.12)%, 质膜完整精子百分率为(77.27 ± 8.47)%, 顶体完整精子百分率为(85.34 ± 6.91)%。冷冻-解冻后, T0、T5、T10、T15、T25、T50和T100组的精子运动、存活、质膜完整和顶体完整情况见图4。经过稀释、降温、冷冻和解冻等操作环节后, 相比于新鲜精液, 各个实验组运动精子百分率、存活率、质膜完整精子百分率和顶体完整精子百分率均呈现大幅度下降, 其中运动精子百分率、质膜完整精子百分率和顶体完整精子百分率下降较明显, 各组运动精子百分率、质膜完整精子百分率和顶体完整精子百分率相比于新鲜精液平均下降了53.03%、45.94%和51.39%, 而各组存活精子百分率平均下降了43.40%。

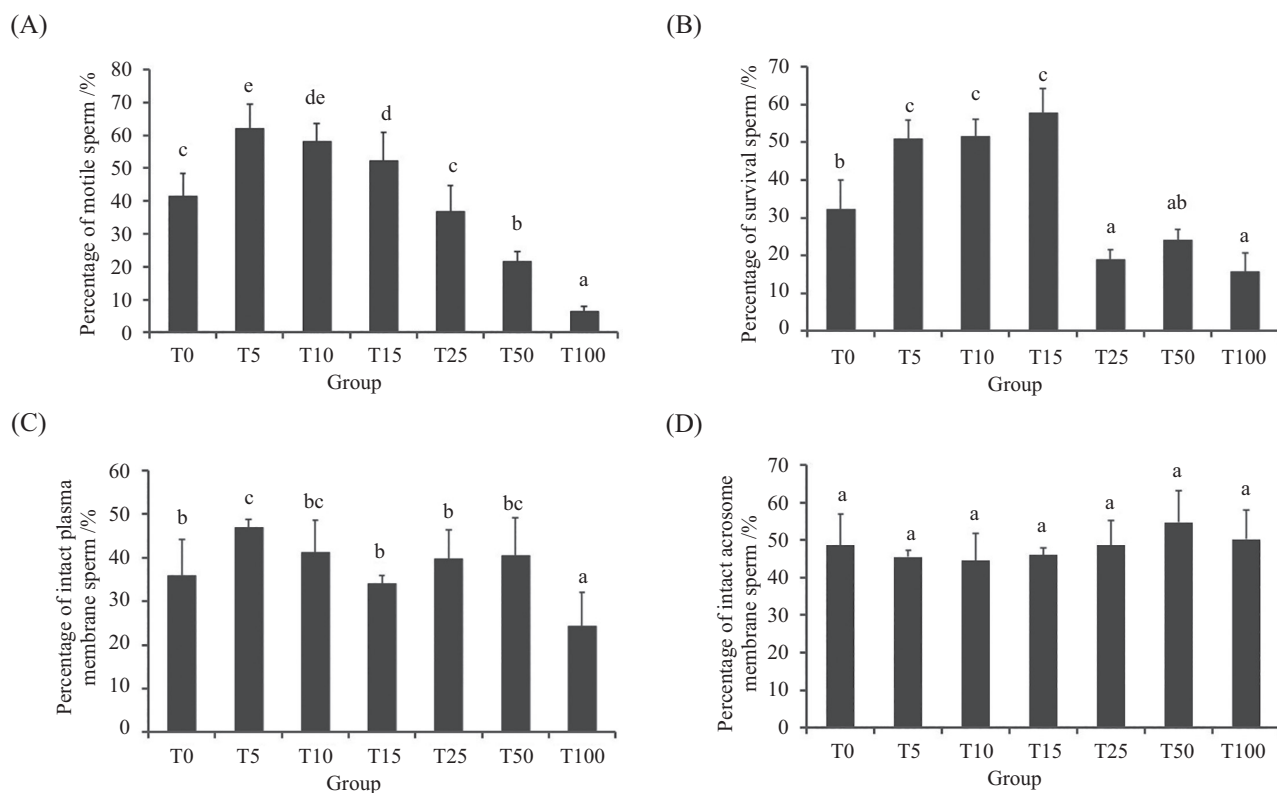
由图4A可见, 7个实验组的冷冻-解冻精子运动情况明显不同, 其中T5[(62.18 ± 7.42)%]、T10[(58.16 ± 5.52)%]和T15[(52.36 ± 8.62)%]组解冻后的运动精子百分率显著高于T0[(41.56 ± 6.90)%]组($P < 0.05$), T25[(36.94 ± 7.81)%]组在运动精子百分率上与T0[(41.56 ± 6.90)%]组无显著差异, 而T50[(21.73 ± 2.82)%]和T100[(6.48 ± 1.56)%]组在运动精子百分率上显著低于T0[(41.56 ± 6.90)%]组($P < 0.05$)。

2.2 添加不同浓度海藻糖对乌骨羊冷冻-解冻后精子存活的影响

应用伊红-苯胺黑染色检测各组冷冻-解冻后精子存活情况, 如图4B所示, T5[(50.90 ± 4.98)%]、T10[(51.61 ± 4.38)%]和T15[(57.82 ± 6.37)%]组冷冻的乌骨羊精子其存活精子百分率显著高于T0[(32.37 ± 7.63)%]组($P < 0.05$), T50[(24.04 ± 2.93)%]组存活精子百分率与T0[(32.37 ± 7.63)%]组无显著差异, 然而T25[(19.04 ± 2.58)%]和T100[(15.66 ± 5.10)%]组存活精子百分率显著低于T0[(32.37 ± 7.63)%]组。

2.3 添加不同浓度海藻糖对乌骨羊冷冻精子质膜完整性的影响

利用PI-CFDA双重荧光染色检测各组冷冻-解冻后精子质膜情况, 如图4C所示, T5[(46.97 ± 1.84)%]组冷冻的乌骨羊精子其质膜完整精子百分率显著高于T0[(35.84 ± 8.42)%]组($P < 0.05$), T10[(41.32 ± 7.25)%]、T15[(34.09 ± 1.82)%]、T25[(39.83 ± 6.65)%]和T50[(40.59 ± 8.48)%]组与T0[(35.84 ± 8.42)%]组在质膜完整精子百分率上无显著差异, 然而



A: 不同浓度海藻糖实验组解冻后的运动精子百分率对比情况表明, T5、T10和T15组解冻后的运动精子百分率有显著提高; B: 不同浓度海藻糖实验组解冻后的存活精子百分率对比情况表明, T5、T10和T15组解冻后的存活精子百分率有显著提高; C: 不同浓度海藻糖实验组解冻后的质膜完整精子百分率对比情况表明, T5组解冻后的质膜完整精子百分率有显著提高; D: 不同浓度海藻糖实验组解冻后的顶体完整精子百分率对比情况表明, 各组解冻后顶体完整精子百分率差异不显著。与其他组相比, 标识相同字母表示差异不显著, 标识不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

A: comparison of motile sperm in different concentrations of trehalose test group after thawing shows that the percentage of motile sperm of T5, T10 and T15 groups is significantly increased; B: comparison of survival sperm of different concentrations of trehalose test group after thawing shows that the percentage of survival sperm of T5, T10 and T15 groups is significantly increased; C: comparison of plasma membrane intact sperm in different concentrations of trehalose test group after thawing shows that the percentage of plasma membrane intact sperm of T5 group is significantly increased; D: comparison of intact acrosome sperm in different concentrations of trehalose test groups after thawing shows that there is no significant difference in the percentage of intact acrosome sperm in each group. Compared with other groups, marking the same letter means that the difference is not significant, while marking different letters means significant difference ($P<0.05$).

图4 不同稀释液冷冻保存的乌骨羊精子运动、存活、质膜完整和顶体完整情况对比图

Fig.4 Comparison on motility, survival, intact plasma membrane and intact acrosome of Black-bone sheep sperm cryopreserved in different dilutions

T100[(24.26±7.86)%]组冷冻精子的质膜完整精子百分率显著低于T0[(35.84±8.42)%]组。

2.4 添加不同浓度海藻糖对乌骨羊冷冻精子顶体完整性的影响

利用 FITC-PSA 荧光染色检测各组冷冻-解冻后精子顶体完整情况, 如图 4D 所示, 在 T50[(54.74±5.76)%]组冷冻的乌骨羊精子获得了最高的顶体完整精子百分率, 然而和 T0[(48.57±7.33)%]、T5[(45.44±9.35)%]、T10[(44.51±6.23)%]、T15[(46.03±7.17)%]、T25[(48.61±9.59)%]、T100[(50.22±9.12)%]组相比无显著差异。

2.5 添加不同浓度海藻糖对乌骨羊冷冻精子中过氧化氢和丙二醛含量的影响

如表 1 所示, 除 T10[(0.380 1±0.014 4) $\mu\text{mol}/10^4$ 细胞]和 T100[(0.388 1±0.014 7) $\mu\text{mol}/10^4$ 细胞]组冷冻乌骨羊精子过氧化氢含量显著高于 T0[(0.283 9±0.012 7) $\mu\text{mol}/10^4$ 细胞]组外, T5[(0.299 9±0.501 0) $\mu\text{mol}/10^4$ 细胞]、T15[(0.319 1±0.021 7) $\mu\text{mol}/10^4$ 细胞]、T25[(0.303 1±0.030 0) $\mu\text{mol}/10^4$ 细胞]、T50[(0.283 9±0.009 6) $\mu\text{mol}/10^4$ 细胞]组过氧化氢含量与 T0[(0.283 9±0.012 7) $\mu\text{mol}/10^4$ 细胞]组无显著差异, 而 T5[(0.481 6±0.157 6) $\mu\text{mol}/10^4$ 细胞]、

表1 不同稀释液冷冻保存的乌骨羊精子解冻后的过氧化氢和丙二醛含量
Table 1 Contents of hydrogen peroxide and malondialdehyde of thawed
Black-bone sheep sperm cryopreserved in different dilutions

组别 Group	过氧化氢含量($\mu\text{mol}/10^4$ 细胞) Contents of hydrogen peroxide ($\mu\text{mol}/10^4$ cells)	丙二醛含量($\text{pmol}/10^4$ 细胞) Contents of and malondialdehyde ($\text{pmol}/10^4$ cells)
T0	0.283 9 \pm 0.012 7 ^a	0.791 2 \pm 0.119 2 ^b
T5	0.299 9 \pm 0.501 0 ^a	0.481 6 \pm 0.157 6 ^a
T10	0.380 1 \pm 0.014 4 ^b	0.378 4 \pm 0.043 6 ^a
T15	0.319 1 \pm 0.021 7 ^a	0.481 6 \pm 0.119 2 ^a
T25	0.303 1 \pm 0.030 0 ^a	0.447 2 \pm 0.059 6 ^a
T50	0.283 9 \pm 0.009 6 ^a	0.378 4 \pm 0.057 4 ^a
T100	0.388 1 \pm 0.014 7 ^b	0.344 0 \pm 0.119 0 ^a

同一列标注相同字母表示差异不显著,同一列标注不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

There was no significant difference in the same column with the same letter, but there was significant difference in the same column with different letters ($P<0.05$).

T10[(0.378 4 \pm 0.043 6) $\text{pmol}/10^4$ 细胞]、T15[(0.481 6 \pm 0.119 2) $\text{pmol}/10^4$ 细胞]、T25[(0.447 2 \pm 0.059 6) $\text{pmol}/10^4$ 细胞]、T50[(0.378 4 \pm 0.057 4) $\text{pmol}/10^4$ 细胞]、T100[(0.344 0 \pm 0.119 0) $\text{pmol}/10^4$ 细胞]组冷冻的乌骨羊精子丙二醛含量显著低于T0[(0.791 2 \pm 0.119 2) $\text{pmol}/10^4$ 细胞]组。

3 讨论

可酵解糖类(葡萄糖、果糖等)可以为精子运动提供能量,还能够渗入到精子细胞内部起到冷冻保护剂的作用,也可以通过在细胞外部提高渗透压导致冷冻前细胞脱水来减少冷冻过程中胞内冰晶形成,从而发挥冷冻保护作用^[3]。研究证实稀释液中添加果糖对解冻后精子运动的保护效果优于添加乳糖或棉子糖^[4]。报道表明Tris-果糖-卵黄稀释液对解冻后绵羊精子运动保护效果最佳^[5]。本研究中,Tris-果糖稀释液也能较好地保护乌骨羊冷冻精子。关于海藻糖对精子的冷冻保护作用已有大量的报道,然而在海藻糖的工作浓度上因实验物种和研究人员不同而存在着明显的差异。韩明铭等^[23]报道,在Tris-柠檬酸-葡萄糖稀释液中添加100 mmol/L海藻糖和蔗糖能显著提高猪冷冻精液体外受精能力。咎林森等^[24]报道在Tris-柠檬酸-葡萄糖稀释液中添加0.37 mmol/L海藻糖和2 g/L牛血清白蛋白提高了牛冷冻精子质量。宋国欣等^[25]报道,在Tris-柠檬酸-葡萄糖基础稀释液中添加50 mmol/L海藻糖和1%甘油提高了绒山羊精子冷冻保存效果。JAFAROGHLI等^[13]报道,添加70和100 mmol/L海藻糖或棉子糖提高了冷冻-解冻后

绵羊精子质量。MATSUOKA等^[12]报道,在Tris基础液中添加435 mmol/L海藻糖可以有效地保护绵羊冷冻精子,使得冷冻精子质量显著高于果糖组和牛血清白蛋白组。与上述研究不同,我们的前期工作证实Tris-果糖稀释液优于Tris-葡萄糖、乳糖-卵黄稀释液,因此在Tris-柠檬酸-卵黄基础液中添加5 mmol/L海藻糖联合82.65 mmol/L果糖提高了冷冻保存的乌骨羊精子的运动、存活和质膜完整精子百分率,证实了海藻糖与果糖联合应用对绵羊精子的冷冻保护效果。因为其他研究者大多在Tris稀释液中添加了葡萄糖,或者是单独添加了海藻糖,而本研究证实了果糖与海藻糖的联合效果,本研究选出的海藻糖最佳工作浓度是5 mmol/L,明显低于其他研究者报道的海藻糖工作浓度。本研究也发现25 mmol/L或更高浓度的海藻糖(50或100 mmol/L)与果糖联合应用时对乌骨羊精子冷冻产生了有害作用,可能是由于添加了82.65 mmol/L果糖后稀释液本身具有了一定的渗透压,再添加高浓度海藻糖使得稀释液渗透压过高而导致了精子损伤。

在酵母、真菌孢子等多种组织中都存在高浓度的海藻糖,它可帮助这些生命体在完全脱水的环境中存活^[26]。海藻糖不同于果糖,它不能渗入精子细胞内,主要作为冷冻保护剂起作用。有研究报道,在Tris-柠檬酸-葡萄糖稀释液中加入375 mmol/L海藻糖后冷冻山羊精子,解冻后其总运动精子数、直线运动精子数和运动速度显著高于对照组,同时用流式细胞仪评估解冻精子质膜状况,结果显示海藻糖处理组精子膜更具流动性^[27]。研究者认为,海藻

糖引起了精子膜蛋白和磷脂重排,增加了细胞膜流动性,海藻糖可以与甘油协同作用抑制低温下细胞脱水造成的损伤^[28]。除了为精子提供能量和渗透压保护之外,这些糖类还可以与精子膜磷脂极性头部群发生相互作用来稳定精子膜,从而保持脂双层的完整结构和渗透特性^[14,29]。因为精子质膜的成分因种属不同而变化^[30],可能一种糖比其他糖更适合于某一特定物种的精子质膜,因而能产生更好的冷冻保护作用。所以,糖类与质膜之间的相互作用可以用来解释糖类在不同物种精子冷冻保护效果上的差别^[31-32]。也有一些研究者证实,添加海藻糖增强了过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽酶的抗氧化活性以对抗自由基和膜脂过氧化,从而保护精子细胞免受氧化胁迫^[33,18]。本研究中,添加海藻糖和果糖虽然不能降低解冻精子的过氧化氢含量,但是显著降低了解冻后精子的丙二醛含量,有效地防止了细胞膜脂质过氧化,提高了冷冻精子的质膜完整精子百分率和存活率,说明海藻糖和果糖联合应用能增强精子质膜稳定性,提高精子对冷冻-解冻损伤的耐受性。

本研究通过海藻糖和果糖的联合应用得到了较高的运动、质膜完整和存活精子百分率,与以前的研究结果相似^[12-14]。质膜完整和运动是精子维持功能和代谢的基础,也是精子完成生育的关键。精子顶体包含了大量酶,参与了精-卵识别过程,顶体完整与否也是关系到精子能否完成受精的重要因素。值得注意的是,本研究中,相比于Tris-果糖稀释液,海藻糖和果糖联合应用并不能改善冷冻精子的顶体状况,这与以前的报道不同^[14,27,34]。甘油属于渗透性冷冻保护剂,能阻止胞内冰晶形成,其最适工作浓度为4%~6%。宋国欣等^[25]报道,海藻糖和甘油通过协同作用提高精子冷冻保存效果,50 mmol/L海藻糖和1%甘油能改善精子冷冻保存效果。本研究中5 mmol/L海藻糖与5%甘油配合能有效地保护冷冻精子。

4 结论与建议

本研究证实了添加海藻糖和果糖的Tris稀释液能有效地保护乌骨羊冷冻精子,当海藻糖浓度为5 mmol/L、果糖浓度为82.65 mmol/L时,可取得最佳的精子冷冻保存效果。在今后的研究工作中,可以进一步探讨海藻糖与不同糖类的协同作用,优化其工作浓度,提高精子的冷冻保存效率。

参考文献 (References)

- [1] FULLER B J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state [J]. *Cryo Letters*, 2004, 25(6): 375-88.
- [2] MORRIS G J, ACTON E, MURRAY B J, et al. Freezing injury: the special case of the sperm cell [J]. *Cryobiology*, 2012, 64: 71-80.
- [3] PURDY P H. A review on goat sperm cryopreservation [J]. *Small Rumin Res*, 2006, 63(3): 215-25.
- [4] SALAMON S, RITAR A J. Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa [J]. *Aust J Biol Sci*, 1982, 35: 295-303.
- [5] NEMA S P, SUTHAR B N, KAVANI F S, et al. Effect of dilutors on motility, morphology and acrosome integrity of ram spermatozoa during freezing [J]. *Indian J Anim Reprod*, 2010, 31(2): 54-8.
- [6] FULLER B, PAYNTER S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine [J]. *Reprod BioMed Online*, 2004, 9(6):680-91.
- [7] BROWNE R K, CLULOW J, MAHONY M. The effect on saccharides on the post-thaw recovery of Cane Toad (*Bufo marinus*) spermatozoa [J]. *Cryo Letters*, 2002, 23: 121-8.
- [8] ZHU Z D, FAN X T, PAN Y, et al. Trehalose improves rabbit sperm quality during cryopreservation [J]. *Cryobiology*, 2017, 75: 45-51.
- [9] 孟祥黔, 顾晓龙, 吴彩凤, 等. 海藻糖对猪精子冷冻真空干燥保存效果的影响[J]. *生物工程学报*(MENG X Q, GU X L, WU C F, et al. Effect of trehalose on the freeze-dried boar spermatozoa [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*), 2010, 26(8): 1143-9.
- [10] PARK K S, CHUN J L, KIM E Y, et al. Protective effect of trehalose on canine spermatozoa in cryopreservation [J]. *J Fac Agr Kyushu Univ*, 2018, 63(1): 53-60.
- [11] PIRI K, GHALEHKANDI J G, BEHESHTI R. Effect of addition of raffinose and trehalose at andromed on post thawed semen characteristics of buffalo spermatozoa [J]. *Int J Biosci*, 2014, 4(1): 393-8.
- [12] MATSUOKA T, IMAI H, KOHNO H, et al. Effect of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa [J]. *J Reprod Dev*, 2006, 52(5): 675-83.
- [13] JAFAROGHLI M, KHALILI B, FARSHAD A, et al. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen [J]. *Small Rumin Res*, 2011, 96: 58-63.
- [14] AISEN E G, MEDINA V H, VENTURINO A. Cryopreservation and post thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations [J]. *Theriogenology*, 2002, 57: 1801-8.
- [15] IWAHASHI H, OBUCHI K, FUJII S, et al. The correlative evidence suggesting that trehalose stabilizes membrane-structure in the yeast *saccharomyces-cerevisiae* [J]. *Cell Mol Biol*, 1995, 41(6): 763-9.
- [16] GIRAUD M N, MOTTA C, BOUCHER D, et al. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(10): 2160-4.
- [17] HU J H, LI Q W, JIANG Z L, et al. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing [J]. *Cryobiology*, 2008, 57(3): 257-62.
- [18] IQBAL S, MURTAZA S, ANDRABI H, et al. Trehalose im-

- proves semen antioxidant enzymes activity, post-thaw quality, and fertility in Nili Ravi buffaloes (*Bubalus bubalis*) [J]. *Theriogenology*, 2015, 85: 954-9.
- [19] KHALILI B, FARSHAD A, ZAMIRI M J, et al. Effects of sucrose and trehalose on the freezability of Markhoz Goat spermatozoa [J]. *Asian Australas J Anim sci*, 2009, 22(12): 1614-9.
- [20] HARRISON R A P, VICKERS S E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa [J]. *J Reprod Fertil*, 1990, 88: 343-52.
- [21] ROTA A, STORM B. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4-degrees-C [J]. *Theriogenology*, 1995, 44(6): 885-900.
- [22] CARRERAS A, MENDOZA C, TESARIK J, et al. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin [J]. *J Reprod Fertil*, 1992, 95(3): 755-63.
- [23] 韩明铭, 金一, 方南洙, 等. 双糖对冻融后猪精子质量的影响 [J]. *吉林农业大学学报* (HAN M M, JIN Y, FANG N Z, et al. Effect of disaccharide on cryopreservation of quality parameters in boar sperm [J]. *Journal of Jilin Agricultural University*), 2010, 32(1): 86-8,94.
- [24] 咎林森, 张莺莺, 耿繁军, 等. 海藻糖和牛血清白蛋白对牛精液的冷冻效果 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)* (ZAN L S, ZHANG Y Y, GENG F J, et al. Effects of trehalose and BSA on bull sperm cryopreservation [J]. *Journal of Northwest A & F University, Nat Sci Ed*), 2008, 36(10): 53-8.
- [25] 宋国欣, 张家新, 王瑞军, 等. 海藻糖和甘油相互协同提高绒山羊精液冷冻保存品质 [J]. *中国畜牧杂志* (SONG G X, ZHANG J X, WANG R J, et al. Trehalose and glycerol synergistically improve the cryopreservation of cashmere goat semen [J]. *Chinese Journal of Animal Science*), 2021, 57(1): 114-9,191.
- [26] REDDY N S S, MOHANARAO G J, ATREJA S K. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation [J]. *Anim Reprod Sci*, 2010, 119(3/4): 183-90.
- [27] ABOAGLA E M E, TERADA T. Trehalose enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69: 1245-50.
- [28] UYSAL O, BUCAK M N. The role of different trehalose concentrations and cooling rates in freezing of ram semen [J]. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 2009, 56(2): 99-103.
- [29] STRAUSS G, SCHURTENBERGER P, HAUSER H. The interaction of saccharides with lipid bilayer vesicles: stabilization during freeze-thawing and freeze-drying [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1986, 858(1): 169-80.
- [30] GADELLA B M, HARRISON R A. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipids trans-bilayer behaviour in the sperm plasma membrane [J]. *Development*, 2000, 127(11): 2407-20.
- [31] GARDE J J, DEL OLMO A, SOLER A J, et al. Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*) [J]. *Anim Reprod Sci*, 2008, 108(3/4): 384-401.
- [32] MALO C, GIL L, GONZALEZ N, et al. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender [J]. *Cryobiology*, 2010, 61(1): 17-21.
- [33] PEZO F, ZAMBRANO F, URIBE P, et al. Oxidative and nitrosative stress in frozen-thawed pig spermatozoa. II: effect of the addition of saccharides to freezing medium on sperm function [J]. *Cryobiology*, 2020, 97: 5-11.
- [34] HU J H, LI Q W, LI G, et al. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality [J]. *Anim Reprod Sci*, 2009, 112(1/2): 107-18.