

武彩红,黄秀明,周春宝,等.超低温保存对猪精子膜完整性及氧化应激水平的影响[J].江苏农业科学,2013,41(11):221-222.

超低温保存对猪精子膜完整性及氧化应激水平的影响

武彩红¹,黄秀明¹,周春宝¹,李玲¹,姚静²,张斌¹

(1.江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300;2.江苏省无锡市农业委员会,江苏无锡 214023)

摘要:以姜曲海猪精液为研究对象,分析冷冻—解冻后猪精子膜完整性及氧化应激水平,结果表明,新鲜精子经冷冻—解冻后,形态正常率、头部质膜完整率、尾部质膜完整率及 SOD 活性均显著降低,MDA 含量显著升高。冷冻 I 组(未添加维生素 C)与冷冻 2 组(添加维生素 C)相比,前者精子形态正常率、头部质膜完整率、尾部质膜完整率及 SOD 活性分别为 71.2%、57.2%、49.2% 和 85.3 IU/10⁻⁸,均显著低于后者,MDA 含量则显著高于后者。冷冻—解冻造成了精子膜损伤,维生素 C 在一定程度上可有效提高精子的抗氧化能力,抵抗膜损伤。

关键词:超低温;猪;精子;膜完整性;氧化应激;冷冻;解冻

中图分类号:S828.3⁺4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)11-0221-02

精子的长期保存在畜牧业、低温生物学种质资源保存及动物基因实验研究等方面均具有重要的意义。精液的长期保存尽管具有潜在优势,但众所周知,猪精子对低温非常敏感,猪冷冻保存精液应用于人工授精的比例尚不足 1%^[1],存在冷冻保存精液活力差、受胎率低、产仔数少等诸多问题^[2-3]。

超低温保存技术是重要的辅助生殖技术。精子超低温保存时,冷冻损伤是难以避免的,其主要作用机制是在冷冻过程中,冰晶的形成和渗透压改变导致精子受损。另外,在生理状态下,作为有氧代谢的产物,适量的活性氧(ROS)可调节精子功能^[4],但过高的 ROS 水平则使精子膜发生脂质过氧化反应,引起精子损伤^[5]。本研究以猪新鲜和冷冻—解冻精液为研究对象,探讨超低温保存对精子膜完整性及氧化应激的影响。

1 材料与方法

1.1 精液采集

4 只成年、健康、性欲旺盛的姜曲海种公猪,由国家级姜曲海种猪场提供。利用手握法采集精液,立即置于保温桶中,1 h 内带回实验室;将精液用专用滤纸过滤至 37 ℃ 预热烧杯中,然后使用德国米尼图 MII 稀释剂,按照体积比 1:1.5 进行稀释。

1.2 稀释液和冷冻液的配制

1.2.1 冷冻基础液(稀释液)的配制 分别称取葡萄糖 1.1 g、Tris 2.42 g、柠檬酸钠 1.48 g、青霉素 0.06 g 和链霉素 0.1 g,溶解于双蒸水中,定容至 100 mL。

1.2.2 冷冻液的配制 冷冻 I 液(试验设计为 2 组):①冷

冻 I 组:在稀释液的基础上添加 375 mmol/L 海藻糖、0.1% 十二烷基磺酸钠(SDS)和 20% 卵黄;②冷冻 2 组:在冷冻 I 组基础上添加 0.05% 维生素 C。冷冻 II 液:在冷冻 I 组的基础上添加甘油,使其终浓度为 3%。

1.3 精液冷冻—解冻方法

将 1:1.5 稀释后的精液置于 17 ℃ 过夜,17 ℃ 800 g 离心 12 min,弃上清,然后加入冷冻 I 液于 4 ℃ 平衡 1.5 h;再加入等体积 4 ℃ 预冷的冷冻 II 液,使精液最终稀释比为 1:2,然后再于 4 ℃ 平衡、分装于 0.25 mL 细管中,4 ℃ 平衡、分装时间在 45 min 内完成,距液氮面 3 cm 熏蒸 10 min 后投入液氮保存 1 周。

解冻时,将细管从液氮中迅速取出,直接投入 37 ℃ 水浴中并迅速摇晃。将解冻后的精液收集于 10 mL 试管内,然后用 9 倍体积的 PBS 液清洗精子。

1.4 精子正常形态率的检测

于相差显微镜下直接观察活精子的正常形态率,至少计数 200 个精子。将巨型精子、短小精子、双头或双尾精子以及精子顶体膨胀或脱落、精子头部残缺或与尾部分离、尾部变曲等,均视为畸形精子。

1.5 精子膜完整性检测

1.5.1 头部质膜完整性评价方法(PI 染色) 100 μL HEPES/BSA(0.759 9 g NaCl、0.029 8 g KCl、0.238 3 g HEPES、0.1 g BSA、0.252 2 g 果糖、0.102 g MgCl₂·6H₂O、0.014 7 g CaCl₂·2H₂O,溶解于 100 mL 蒸馏水)中加入 2 μL 碘化丙啶(PI,0.025 g 溶于 10 mL PBS),再加入精液悬液 50 μL,37 ℃ 孵育 30 min;取 10 μL 精液悬液滴于载玻片中央,滴加少量抗荧光淬灭剂 DABCO(甘油:PBS 体积比为 9:1 的 10 mL 溶液中含 DABCO 0.024 68 g),盖片,用无色指甲油封片,在荧光显微镜(Nikon,T1-SM)下观察。PI 染色阳性者为头部精子质膜破损的死精子,其头部核区呈现红色荧光。

1.5.2 尾部质膜完整性评价方法(低渗肿胀试验) 100 μL 低渗液(准确称取二水柠檬酸钠 0.735 g、果糖 1.351 g,加双蒸水至 100 mL,渗透压为 150 mOsm/kg,0.22 μm 滤膜过滤,4 ℃ 保存备用)中加入 10 μL 精子,然后置于 37 ℃、5% CO₂

收稿日期:2013-04-11

项目基金:江苏省自然科学基金(编号:BK2008589);江苏省青蓝工程(编号:苏教师 2010[27]号);江苏省无锡市农业产学研合作项目。

作者简介:武彩红,博士,副教授,主要从事动物生殖、生物学研究。E-mail:caihongwu616@yahoo.com.cn。

通信作者:黄秀明(1966—),男,江苏兴化人,高级兽医师,主要从事动物医学教学及科研工作。

培养箱中孵育 30 min;取 10 μL 置于载玻片上,加盖盖玻片,于显微镜下计数 200 个精子,计算尾部肿胀(弯尾)精子(即尾部质膜完整率)的百分率。

1.6 超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量测定
SOD 活性及 MDA 含量采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定,操作方法按照说明书进行。

1.7 数据处理
每组重复 3 次,试验数据采用 SPSS 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 超低温保存对猪精子膜完整性的影响

由表 1 可见,经冷冻—解冻后,猪精子形态正常率、头部质膜完整率及尾部质膜完整率均显著降低;冷冻 1 组精子形态正常率、头部质膜完整率及尾部质膜完整率分别为 71.2%、57.2%、49.2%,均显著低于冷冻 2 组。

表 1 超低温保存对猪精子膜完整性的影响

精子保存方式	形态正常率 (%)	头部质膜完整率 (%)	尾部质膜完整率 (%)
新鲜(对照组)	93.7 ± 1.3a	86.3 ± 3.8a	84.7 ± 1.8a
冷冻 1 组	71.2 ± 0.6c	57.2 ± 1.2c	49.2 ± 1.8c
冷冻 2 组	75.1 ± 1.1b	65.9 ± 1.8b	67.2 ± 1.1b

注:同列不同小写字母表示处理间差异显著(P < 0.05)。

2.2 超低温保存对猪精子氧化应激水平的影响

由表 2 可见,经冷冻—解冻后,猪精子 SOD 活性显著低于新鲜对照组(114.7 IU/10⁻⁸),MDA 含量则显著高于对照组(22.7 nmol/g);冷冻 1 组和冷冻 2 组相比,前者 SOD 活性为 85.3 IU/10⁻⁸,显著低于后者(96.7 IU/10⁻⁸),前者 MDA 含量为 36.2 nmol/g,显著高于后者(31.2 nmol/g)。

表 2 超低温保存对猪精子氧化应激水平的影响

精子保存方式	SOD 活性 (IU/10 ⁻⁸)	MDA 含量 (nmol/g)
新鲜对照组	114.7 ± 1.4a	22.7 ± 1.3c
冷冻 1 组	85.3 ± 0.9c	36.2 ± 1.5a
冷冻 2 组	96.7 ± 1.3b	31.2 ± 2.4b

注同表 1。

3 小结与讨论

精子经历超低温保存,冷冻—解冻造成的损伤是难以避免的,其中精子质膜是最容易受损的部位,而精子受精能力与精子膜结构完整性密切相关^[6]。精子膜富含多聚不饱和脂肪酸,是维持膜流动性和精子完成活能、顶体反应及透明带反应的基础^[7]。SOD 作为精子主要的抗氧化酶之一,其作用是清除氧化分解过程中产生的自由基,从而起到保护作用。MDA 是精子膜脂质过氧化的终产物之一,一定程度上可反映精子膜脂质过氧化的损伤情况。

在本试验中,冷冻—解冻导致猪精子形态正常率、头部质膜完整率及尾部质膜完整率均显著低于对照组新鲜精子,SOD 活性显著降低,MDA 含量显著增加,冷冻—解冻造成了精子膜损伤,该结果与任俊玲等研究结果^[8-9]一致。精子经历超低温保存时,冰晶的形成和渗透压改变致使精子膜损伤,对 ROS 水平变化的敏感性增加,进而导致精子膜含有的不饱和脂肪酸发生过氧化反应,产生大量脂类过氧化物及新的氧自由基^[10],造成精子膜发生不可逆损伤^[9]。

维生素 C 具有较强的还原性,可有效清除氧自由基毒性。试验结果表明,冷冻 2 组(冷冻 1 组中添加 0.05% 维生素 C)各指标虽与对照组存在显著差异,但解冻后猪精子形态正常率、头部质膜完整率、尾部质膜完整率及 SOD 活性均显著高于冷冻 1 组,MDA 含量显著低于冷冻 1 组,这说明维生素 C 在一定程度上可有效提高精子的抗氧化能力,抵抗膜损伤,该结果与廖清华等研究结果^[11]一致。但也有研究表明,维生素 C 对精子冷冻效果并不明显^[12],推测可能和添加浓度有关,仍需进一步研究证实。

参考文献:

[1]Wagner H G,Tibier M. World statistics for artificial insemination in small ruminants and swine[C]. Stockholm: Proc 14th ICAR,2000.
[2]张树山,李青旺,胡建宏,等. 红景天多糖对猪精子冷冻保护效果的研究[J]. 农业生物技术学报,2010,18(3):519-525.
[3]Flores E,Cifuentes D,Fernández - Novell J M,et al. Freeze - thawing induces alterations in the protamine - 1/DNA overall structure in boar sperm[J]. Theriogenology,2008,69(9): 1083-1094.
[4]Mazzilli F,Rossi T,Sabatini L,et al. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production[J]. Acta Europaea Fertilitatis,1995,26(4): 145-148.
[5]Watson P F. The cause of reduced fertility with cryopreserved semen [J]. Animal Reproduction Science,2000,60/61: 481-492.
[6]杨麦贵,张竹映,郝晓柯,等. 白细胞精子症患者精液中 IL-2、8 及 NO 的变化[J]. 第四军医大学学报,2003,24(1):76-77.
[7]张旭刚,赵永聚,李周权. 双荧光探针检测冷冻对精子质膜完整性的影响[J]. 中华男科学杂志,2007,13(5):403-406.
[8]任俊玲,马恒东,李和平. 猪精液冷冻过程中的脂质过氧化损伤[J]. 中国畜牧杂志,2013,49(3):31-33.
[9]杨 欣,丁彩飞,张永华,等. 菟丝子水提取物对人精子膜结构和功能氧化损伤的干预作用[J]. 中华药学杂志,2006,41(7): 515-518.
[10]Chi H J,Kim J H,Ryu C S,et al. Protective effect of antioxidant supplementation in sperm - preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa[J]. Human Reproduction,2008,23(5): 1023-1028.
[11]廖清华,杨素芳,邓继贤. 海藻糖和维生素 C 对猪精液冷冻保存效果的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医,2009(7):51-52.
[12]Mustafa S,Esreif D. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol[J]. Turkish Journal of Veterinary & Animal Science,2004,28(5): 893-910.