

胡家达,吴海智,薛昌安,等. 胆固醇和磷脂酰胆碱对山羊精液冷冻保存效果的影响[J]. 江苏农业科学,2022,50(14):159-165.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.14.022

# 胆固醇和磷脂酰胆碱对山羊精液冷冻保存效果的影响

胡家达<sup>1</sup>,吴海智<sup>2</sup>,薛昌安<sup>1</sup>,顾紫薇<sup>1</sup>,王若茜<sup>1</sup>,潘江山<sup>1</sup>,高永恒<sup>1</sup>,刘亚<sup>1</sup>,  
方富贵<sup>1</sup>,张运海<sup>1</sup>,丁建平<sup>1</sup>,李运生<sup>1</sup>

(1. 安徽农业大学动物科技学院,安徽合肥 230036; 2. 安徽省畜牧技术推广总站,安徽合肥 230001)

**摘要:**为探究胆固醇(CHL)和磷脂酰胆碱(PC)对山羊精液冷冻保存效果,分别在精液冷冻稀释液中添加不同浓度的 CHL(1.0、2.5、5.0、10.0 g/L)、PC(10、15、20、25 g/L),以 15% 卵黄(EY)作为对照。通过测定冷冻解冻后精子的活力、顶体完整率、精子运动参数、质膜完整率、精子磷脂和胆固醇含量来判断保存效果。结果表明,精液冷冻显著降低山羊精子磷脂和胆固醇含量,分别添加 5 g/L CHL 和 10 g/L PC,精子冷冻解冻后,在活力、顶体完整率、质膜完整率和运动参数与对照组差异不显著。进一步将 CHL 和 PC 混合添加发现,4 g/L CHL + 16 g/L PC 解冻后精子活力、曲线速率、平均路径速度和顶体完整率均显著高于对照组( $P < 0.05$ ),且可以改善冷冻后精子磷脂和胆固醇含量。运用 4 g/L CHL + 16 g/L PC 冷冻保存精子进行山羊人工授精,其受胎率和产仔率与 EY 组差异不显著,冷冻稀释液中添加 4 g/L CHL + 16 g/L PC 显著提高山羊精液冷冻保存效果。

**关键词:**山羊;精液;冷冻保存;胆固醇;磷脂酰胆碱

**中图分类号:**S827.3<sup>+</sup>4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)14-0159-07

精液冷冻保存技术可提高优秀种公畜的利用效率,加快品种改良步伐,便于精液长途运输,降低疾病传播风险。但不同物种间精子的冷冻保存效

果仍有很大差异,这主要与精子的大小、性状、蛋白和脂质成分有关<sup>[1]</sup>。因此,冷冻保存技术和精液稀释液是影响精液冷冻保存的关键因素<sup>[2-3]</sup>。国外对山羊精液冷冻保存技术的研究始于 20 世纪<sup>[4]</sup>。我国开展山羊冷冻保存研究较晚,至目前为止山羊精液冷冻保存效率仍普遍偏低,不同冷冻方法之间冻存效果差异较大,这限制了我国山羊冻精人工授精的应用和推广。

卵黄是精液冷冻最常用的保护剂<sup>[5]</sup>,其广泛用于牛、羊等精子冷冻保护液<sup>[3,6]</sup>。然而,卵黄也存在较多缺陷,其中,卵黄中含有较多微生物,可产生内

收稿日期:2021-09-09

基金项目:安徽省中央引导地方科技发展专项(编号:202007d06020005);  
安徽省科技重大专项(编号:202103b06020003);临泉县 2021 年度  
“肉羊产业+金融+科技”发展试点科技项目(编号:LQRJK2021-02);亳州市科技重大专项(编号:BZSKXJSJ2020-62)。

作者简介:胡家达(1997—),男,河南信阳人,硕士研究生,主要从事动物生殖生理相关研究。E-mail:1778686466@qq.com。

通信作者:李运生,博士,副教授,主要从事动物生殖生理相关研究。  
E-mail:lys@ahau.edu.cn。

[15] 杜建芳,廖祥儒,叶步青,等. 光质对油菜幼苗生长及抗氧化酶活性的影响[J]. 植物学通报,2002,37(6):743-745.

[16] 周国泉,吴家森,汪小刚. 三色发光二极管组合灯补光对生菜生长及光合特性的影响[J]. 长江蔬菜,2010(4):30-33.

[17] 郑洁,胡美君,郭延平. 光质对植物光合作用的调控及其机理[J]. 应用生态学报,2008,19(7):1619-1624.

[18] 任桂萍,王小菁,朱根发. 不同光质的 LED 对蝴蝶兰组织培养增殖及生根的影响[J]. 植物学报,2016,51(1):81-88.

[19] 曲溪,叶方铭,宋杰琼,等. LED 灯在植物补光领域的效用探究[J]. 灯与照明,2008,32(2):41-45.

[20] Matsuda R, Ohashi - Kaneko K, Fujiwara K, et al. Photosynthetic characteristics of rice leaves grown under red light with or without supplemental blue light[J]. Plant and Cell Physiology, 2004, 45(12):1870-1874.

[21] 张丽红,宋阳,张之为,等. 长期增施 CO<sub>2</sub> 条件下黄瓜叶片淀粉积累对光合作用的影响[J]. 园艺学报,2015,42(7):1321-1328.

[22] 李清明,刘彬彬,艾希珍. CO<sub>2</sub> 浓度倍增对于旱胁迫下黄瓜幼苗膜脂过氧化及抗氧化系统的影响[J]. 生态学报,2010,30(22):6063-6071.

[23] 赵天宏,王美玉,张巍巍,等. 大气 CO<sub>2</sub> 浓度升高对植物光合作用的影响[J]. 生态环境,2006,15(5):1096-1100.

[24] 吴家森,胡君艳,周启忠,等. LED 灯补光对萝卜生长及光合特性的影响[J]. 北方园艺,2009(10):30-33.

[25] Wei Z H, Du T S, Li X N, et al. Interactive effects of elevated CO<sub>2</sub> and N fertilization on yield and quality of tomato grown under reduced irrigation regimes[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9:328.

毒素污染精液,降低精子的受精能力,增加疾病传播的风险<sup>[7]</sup>。同时,精液中含有副性腺分泌的卵黄凝固酶(EYCE),它与卵黄作用,对精子有毒性<sup>[8]</sup>。因此,利用化学限定性培养基替代卵黄是近年的研究热点。大豆卵磷脂(SL)含有丰富的低密度脂蛋白(LDL),可在精子冷冻过程中保护精子膜免受低温损伤<sup>[9]</sup>。目前,研究表明,SL可作为卵黄替代用于牛、绵羊和山羊精子冷冻保存<sup>[10-13]</sup>。磷脂酰胆碱属于卵磷脂的一种,是构成细胞膜的主要成分,其在生物膜之间通过磷脂酰胆碱转运蛋白(PTCP)转运<sup>[14]</sup>。因此,磷脂酰胆碱是一种潜在的精液冷冻保护剂。目前尚未见应用于磷脂酰胆碱作为保护剂冻存山羊精液的报道。

胆固醇影响脂质链的排列,通过磷脂碳氢链稳定膜结构,避免膜状态发生变化<sup>[15]</sup>。精子冷冻过程中胆固醇的大量丧失是膜状态转变的前提<sup>[16]</sup>。Purdy等向公牛的冻精稀释液添加含有胆固醇的环糊精,解冻后提高了精子活力<sup>[17]</sup>。研究表明,在兔和山羊精液稀释液中分别添加胆固醇均可显著提高精子活力<sup>[18-19]</sup>。在山羊精液冷冻稀释液中添加含有胆固醇的环糊精,解冻后的精子活力显著高于对照组<sup>[20-22]</sup>。

目前,仍需要优化在山羊精液冷冻保存中胆固醇和磷脂的添加浓度,且未见胆固醇和磷脂酰胆碱2种物质联合的报道。本试验通过对精子冻融前后膜质成分的检测,研究在稀释液中添加相应比例的胆固醇和磷脂酰胆碱,解冻后检测精子运动参数、质膜完整率和顶体完整率,评估其在山羊精液冷冻保存中的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

本试验选取228只无生殖器官疾病、健康的安徽白山羊。

### 1.2 主要试剂

胆固醇、Tris、果糖、柠檬酸和甘油,均购于北京索莱宝科技有限公司;磷脂酰胆碱,来自Sigma公司;鸡蛋,购自农贸市场。

### 1.3 精液采集和稀释

假阴道法采集精液,感观检查合格,活力大于0.9时用于后续试验。将采得所有合格精液进行混合,测定混精密度。采用37℃基础稀释液(Tris 3.07 g/100 mL、柠檬酸 1.64 g/100 mL、果糖

1.26 g/100 mL)将精液稀释至 $4.8 \times 10^8$ 个/mL,待精液在5℃冰箱中缓慢降温平衡后,再用含10%甘油的稀释液将精液再稀释1倍,使得精液的终浓度为 $2.4 \times 10^8$ 个/mL。

### 1.4 精液的冷冻与解冻

在距离液氮面上方4 cm处将稀释后的精液在氟板上进行滴冻,每粒约50 μL。预冷10 min后将冻精颗粒浸入液氮保存。从液氮中取1粒冻精颗粒迅速置于预热好的离心管中,在37℃水浴中快速解冻30 s,取出室温下轻轻摇晃至颗粒完全融化。

### 1.5 精子膜脂质成分检测

参照倪利平的方法<sup>[23]</sup>,采用甲醇-三氯甲烷混合液抽提精子脂质,4℃保存待测。采用总胆固醇试剂盒酶比色法,按试剂盒说明测定样品中总胆固醇含量。配制消化液、磷标准液和显色液等溶液,每个样品设1次重复,采用紫外-可见-近红外分光光度计测定各样品的浓度。

### 1.6 精子评估

1.6.1 精子运动参数 采用精子分析仪(SCA型,西班牙Microptic公司)测定精子活力(Motility)、曲线速率(VCL)、直线速率(VSL)、平均路径速度(VAP)、线性度(LIN)、摆动幅度(ALH)、摆动性(WOB)、笔直度(STR)和鞭打频率(BCF)等运动参数,随机选择3个视野,每个视野使用计算机软件分析5次,取15个结果的平均值作为样品最终结果。

1.6.2 质膜完整率检测 采用低渗透肿胀试验(HOST)检测质膜完整性<sup>[24]</sup>。取25 μL精液添加至200 μL低渗液中,混合均匀,38.5℃下孵育45 min,再添加300 μL 2%戊二醛。取10 μL混合液于载玻片上,并在400倍光学显微镜下进行检测,随机从几个不同视野中,计数200个精子,精子尾部不弯曲表明精子质膜不完整,计算精子质膜的完整率。

1.6.3 顶体完整率检测 采用姬姆萨染色法检测精子顶体完整率<sup>[2]</sup>。解冻后的精液抹片风干后,采用1 mL甲醛液固定15 min冲洗干净,采用2 mL姬姆萨染液染色90 min。水洗风干后,在1 000倍油镜下镜检。计数200个精子,顶体严重膨胀或顶体脱落为顶体异常精子,计算精子顶体的完整率。

### 1.7 人工授精

在1.5 mL离心管中加入0.2 mL 2.9%柠檬酸钠溶液,37℃水浴预热后,取4粒冻精投入离心管中,在37℃水浴30 s后取出,待室温完全融化后,将精液输入发情母羊子宫颈内。间隔12 h输精2次。

## 1.8 试验设计

1.8.1 冷冻对精子膜脂含量的影响 使用基础稀释液稀释精液,并检测精子冻融前后膜上胆固醇和磷脂含量变化。

1.8.2 不同浓度的胆固醇稀释液对冻精的影响 将混精分成 5 等份,分别用含 1.0、2.5、5.0、10.0 g/L 胆固醇或 15% 卵黄的基础稀释液稀释、冷冻,分别标为 C1、C2.5、C5、C10、EY 组。解冻后检测各组精子的运动参数、顶体完整率和质膜完整率。

1.8.3 磷脂酰胆碱稀释液对冻精的影响 将混精分成 5 等份,分别用含 10、15、20、25 g/L 的磷脂酰胆碱或 15% 卵黄的基础稀释液稀释、冷冻,标为 P10、P15、P20、P25、EY 组。解冻后检测各组精子的运动参数、顶体完整率和质膜完整率。

1.8.4 不同浓度的磷脂酰胆碱-胆固醇混合稀释液对冻精的影响 将混精分成 5 等份,分别用 P19 + C1(基础液 + 19 g/L 磷脂酰胆碱 + 1 g/L 胆固醇)、P18 + C2(基础液 + 18 g/L 磷脂酰胆碱 + 2 g/L 胆固醇)、P16 + C4 组(基础液 + 16 g/L 磷脂酰胆碱 + 4 g/L 胆固醇)、P14 + C6(基础液 + 14 g/L 磷脂酰胆碱 + 6 g/L 胆固醇)和卵黄稀释液稀释、冷冻。解冻后检测各组精子的运动参数、顶体完整率和质膜完整率。

1.8.5 磷脂酰胆碱-胆固醇稀释液对精子膜脂含量的影响 将混精分成 5 等份,分别使用 P19 + C1、P18 + C2、P16 + C4、P14 + C6 和 EY 这 5 种稀释液稀释,比较各组冻融前后精子膜上胆固醇、磷脂的含量变化。

1.8.6 人工授精 选取 224 只正常发情的母羊,分

别使用卵黄和 P16 + C4 稀释液制作的颗粒冻精用于山羊输精,于输精后 20 d,利用试情公羊连续试情 48 h,统计不返情率,进而统计产羔率等相关指标。

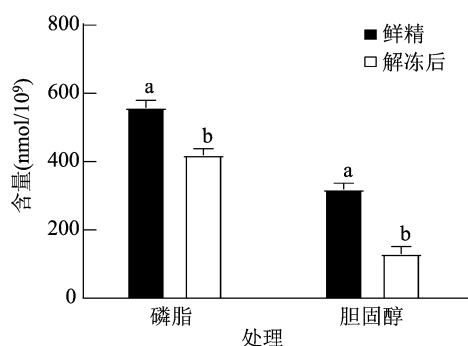
## 1.9 统计分析

试验重复 6 次,试验数据使用 SPSS 26.0 软件进行处理,所得的试验结果采用“平均值 ± 标准差”表示,使用 Graph Pad Prism 9.0 软件制图。

## 2 结果与分析

### 2.1 冷冻对精子膜卵磷脂和胆固醇含量的影响

由图 1 可知,经冻-融处理后,山羊精子磷脂和胆固醇含量均显著降低( $P < 0.05$ )。



同组中柱上不同小写字母表示组间差异显著( $P < 0.05$ )。下同

图1 冻精前后山羊精子胆固醇和卵磷脂含量

### 2.2 不同浓度的胆固醇稀释液对山羊精液冷冻保存的影响

由图 2 可知,C2.5 组、C5 组和 C10 组的质膜完整率与卵黄组无显著差异( $P > 0.05$ ),而 C1 组质膜完整率显著低于卵黄组( $P < 0.05$ )。C1 组的顶体完整率均显著低于其他各组( $P < 0.05$ )。

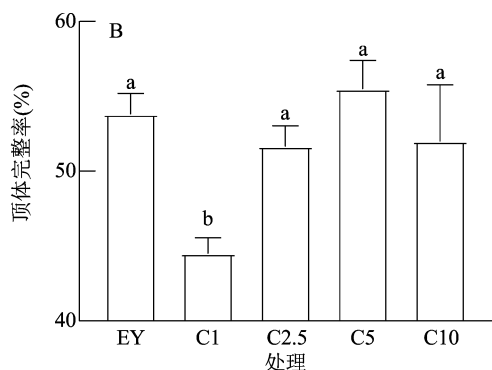
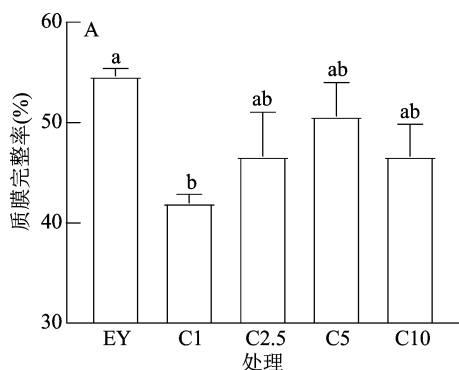


图2 胆固醇对山羊精子质膜完整率和顶体完整率的影响

由表 1 可知,胆固醇组解冻后的精子活力、VCL、VAP 显著低于 EY 组( $P < 0.05$ ),C1 组和 C2.5 组的 VSL 显著低于 EY 组( $P < 0.05$ )。胆固

醇组解冻后的精子、LIN、笔直度 (STR)、摆动性 (WOB)、摆动幅度 (ALH) 和鞭打频率 (BCF) 与卵黄组无显著差异( $P > 0.05$ )。

表 1 胆固醇对山羊冻精活力及运动参数的影响

指标	C1	C2.5	C5	C10	EY
精子活力(%)	21.2±2.2a	22.9±1.3ab	34.0±1.5c	28.4±2.0bc	40.9±3.1d
VCL(μm/s)	40.5±1.9a	41.5±6.8a	47.54±1.8a	51.6±6.0a	63.8±3.7b
VSL(μm/s)	17.5±0.9a	16.0±1.8a	20.2±0.7ab	21.0±6.4ab	28.8±3.0b
VAP(μm/s)	23.9±1.0a	24.0±1.0a	29.7±2.6a	30.3±7.1a	41.7±2.3b
LIN(%)	43.3±2.2a	39.8±6.7a	42.5±0.6a	39.1±7.1a	45.7±6.7a
STR(%)	73.3±1.4a	67.0±7.8a	68.6±3.9a	67.5±5.1a	68.7±4.0a
WOB(%)	59.2±3.7a	58.6±3.7a	62.3±3.3a	57.2±6.3a	65.9±5.7a
ALH(μm/s)	3.6±0.1a	3.3±0.3a	3.4±0.1a	3.6±0.3a	3.2±0.4a
BCF(Hz)	9.3±0.4a	9.8±1.2a	9.4±0.4a	9.8±1.2a	8.6±0.5a

注:VCL 表示曲线速率;VSL 表示直线速率;VAP 表示平均路径速度;LIN 表示线性度;STR 表示笔直度;WOB 表示摆动性;ALH 表示摆动幅度;BCF 表示鞭打频率。同行数据后标有不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下同。

2.3 不同浓度的磷脂酰胆碱稀释液对山羊精液冷冻保存的影响

由图 3 可知,P20 组质膜完整率与 EY 组差异不显著( $P>0.05$ ),P15 组和 P20 组的顶体完整率与 EY 组差异不显著( $P>0.05$ )。P25 组的质膜完整率和顶体完整率显著低于 EY 组( $P<0.05$ ),P15 组的质膜完整率显著高于 EY 组( $P<0.05$ ),P10 组的顶体完整率显著高于 EY 组( $P<0.05$ )。

由表 2 可知,P15 组解冻活力及其他运动参数

与 EY 组差异不显著( $P>0.05$ ),P10 组、P20 组和 P25 组的解冻活力均显著低于 EY 组( $P<0.05$ ),P25 组的 VCL 和 VAP 显著低于 EY 组( $P<0.05$ ),而 P25 组的 BCF 显著高于 EY 组( $P<0.05$ )。

2.4 不同浓度的磷脂酰胆碱、胆固醇混合稀释液对山羊精液冷冻保存的影响

由图 4 可知,P18 + C2 组、P16 + C4 组和 P14 + C6 组的质膜完整率与 EY 组无显著差异( $P>0.05$ ),P19 + C1 组的质膜完整率显著低于 EY 组

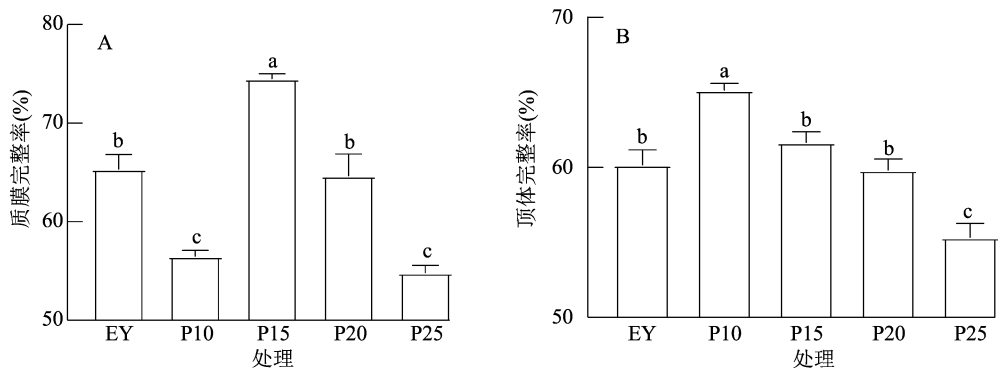


图3 磷脂酰胆碱稀释液对山羊精子质膜完整率和顶体完整率的影响

表 2 磷脂酰胆碱稀释液对山羊冻精活力及运动参数的影响

指标	P10	P15	P20	P25	EY
精子活力(%)	39.4±1.5a	48.1±2.1b	38.0±0.9a	35.1±1.2a	46.0±1.8b
VCL(μm/s)	60.2±3.1ab	68.2±3.4c	58.0±1.6a	54.1±0.4a	67.5±1.8bc
VSL(μm/s)	24.1±3.0a	23.8±3.6a	21.7±2.1a	23.2±3.3a	22.5±2.7a
VAP(μm/s)	38.1±1.5bc	40.1±3.1c	32.3±1.3ab	31.8±2.7a	38.5±1.4bc
LIN(%)	40.7±6.8a	35.2±5.7a	37.7±4.7a	43.0±6.3a	33.4±4.0a
STR(%)	62.7±5.7a	58.8±4.7a	66.9±3.9a	72.4±5.0a	58.0±4.9a
WOB(%)	63.9±5.5a	59.0±4.9a	55.9±3.8a	58.7±5.2a	57.2±2.1a
ALH(μm)	3.3±0.2a	3.4±0.0a	3.7±0.1a	3.6±0.2a	3.8±0.3a
BCF(Hz)	8.2±1.0ab	8.3±0.3ab	8.9±0.6ab	10.6±0.7b	7.3±1.2a

( $P<0.05$ )。P19 + C1 组、P18 + C2 组和 P14 + C6 组的顶体完整率与 EY 组无显著差异 ( $P>0.05$ )，P16 + C4 组的顶体完整率显著高于 EY 组 ( $P<0.05$ )。

由表 3 可知，P16 + C4 组的精子活力、VCL 和

VAP 显著高于卵黄组，VSL 与卵黄组无显著差异 ( $P>0.05$ )。P19 + C1 组和 P18 + C2 组的精子活力、VCL、VSL 和 VAP 均与卵黄对照组无显著差异 ( $P>0.05$ )。

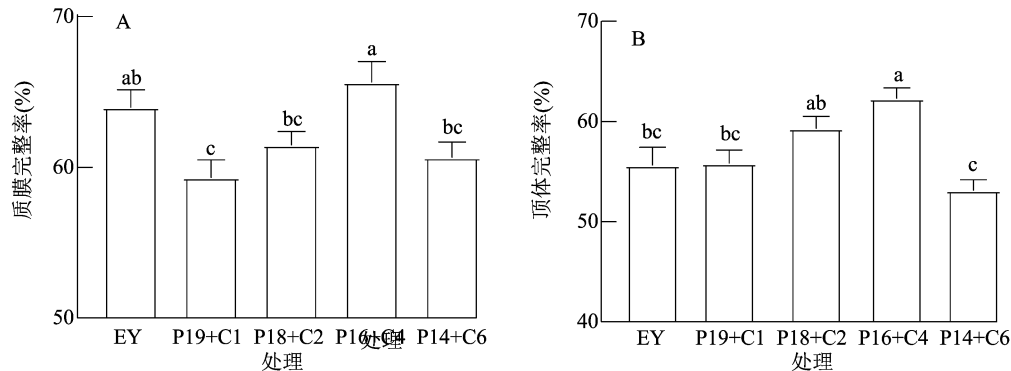


图4 磷脂酰胆碱和胆固醇混合稀释液对山羊精子质膜完整率和顶体完整率的影响

表 3 磷脂酰胆碱和胆固醇混合稀释液对冻精活力及运动参数的影响

指标	P19 + C1	P18 + C2	P16 + C4	P14 + C6	EY
精子活力(%)	41.6 ± 1.0ab	42.9 ± 1.5ab	56.2 ± 3.6c	38.3 ± 1.4a	47.0 ± 1.0b
VCL(μm/s)	59.8 ± 0.6a	63.9 ± 0.4a	74.6 ± 6.7b	55.6 ± 1.5a	57.8 ± 2.3a
VSL(μm/s)	27.5 ± 1.7ab	27.4 ± 2.1ab	29.5 ± 2.4b	22.5 ± 2.6a	23.4 ± 0.3ab
VAP(μm/s)	38.7 ± 2.5bc	38.4 ± 0.9bc	44.1 ± 2.4c	30.7 ± 2.4a	36.9 ± 2.1ab
LIN(%)	46.0 ± 2.4a	38.3 ± 3.3a	36.4 ± 5.8a	40.3 ± 3.8a	45.1 ± 2.1a
STR(%)	71.3 ± 2.0ab	63.6 ± 4.8ab	60.2 ± 4.3a	72.9 ± 2.7b	67.3 ± 4.3ab
WOB(%)	64.6 ± 3.6a	60.1 ± 1.1a	59.8 ± 5.5a	55.1 ± 3.1a	63.7 ± 1.4a
ALH(μm)	3.4 ± 0.1a	3.5 ± 0.0a	3.7 ± 0.3a	3.6 ± 0.1a	3.3 ± 0.1a
BCF(Hz)	9.5 ± 0.5a	8.0 ± 1.2a	8.2 ± 0.5a	10.0 ± 0.4a	9.2 ± 0.7a

注：P19 + C1 表示基础液 + 19 g/L 磷脂酰胆碱 + 1 g/L 胆固醇；P18 + C2 表示基础液 + 18 g/L 磷脂酰胆碱 + 2 g/L 胆固醇；P16 + C4 表示基础液 + 16 g/L 磷脂酰胆碱 + 4 g/L 胆固醇；P14 + C6 表示基础液 + 14 g/L 磷脂酰胆碱 + 6 g/L 胆固醇；EY 表示基础液 + 15% 卵黄。

2.5 不同浓度磷脂酰胆碱、胆固醇混合稀释液对精子膜上卵磷脂和胆固醇含量的影响

由图 5 可知，P16 + C4 组冻精后精子膜上的磷脂含量显著高于 P19 + C1 组、P18 + C2 组和 P14 + C6 组 ( $P<0.05$ )。P18 + C2 组、P16 + C4 组和 P14 + C6 组冻精后精子膜上的胆固醇含量与卵黄组

无显著差异 ( $P>0.05$ )，而 P19 + C1 组冻精后精子膜上的胆固醇含量显著低于卵黄组 ( $P<0.05$ )。

2.6 P16 + C4 组和卵黄组稀释液对人工授精效果的比较

由表 4 可知，由于 P16 + C4 添加组可显著改善精子冷冻前后胆固醇、磷脂浓度的损伤，同时提高

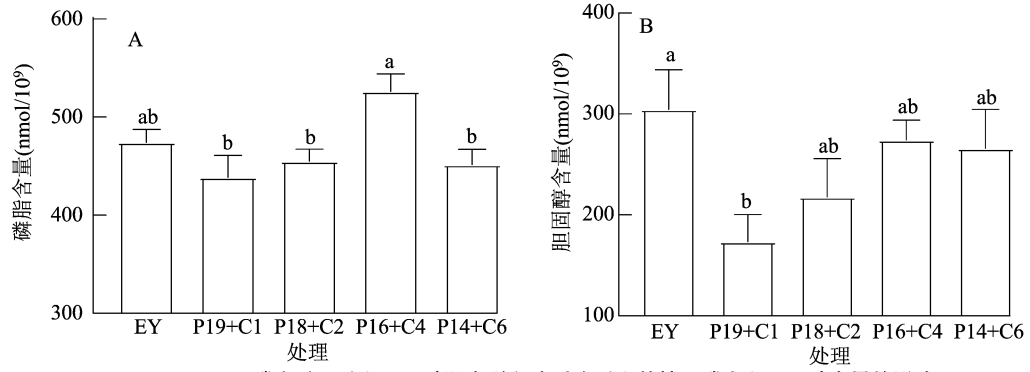


图5 磷脂酰胆碱和胆固醇混合稀释液对冻后山羊精子磷脂和胆固醇含量的影响

表 4 P16 + C4 组和卵黄组稀释液对山羊人工授精效果的比较

试验分组	试验羊数 (只)	不返情率 (%)	受胎率 (%)	产仔率 (%)	平均产羔数 (只)	出生均体质量 (kg)	公母比
P16 + C4 组	115	69.56	57.39	48.69	1.57	1.27	1 : 1.05
EY 组	109	55.05	49.54	40.37	1.50	1.30	1 : 1.48

精子顶体完整率和质膜完整率。本研究利用该方案获得的冻精进行人工授精配种试验,结果显示,P16 + C4 组的不返情率、受胎率、产仔率和公母比例均与 EY 组差异不显著( $P>0.05$ )。

3 讨论与结论

卵黄作为使用最广泛的精液冷冻保护剂,存在较多不利因素,影响冻精保存效果。本研究目的是寻找一种可替代卵黄的限定化学成分精液冷冻稀释液。胆固醇可以调节膜脂的流动性,温度较高时可以降低膜的流动性,在低温下能促进脂肽链的运动,温度的降低不会导致膜流动性的减弱,因此胆固醇可改善低温下精子膜的流动性,提高冷冻精子的活力<sup>[25]</sup>。本研究发现,适量浓度胆固醇添加到精液冷冻液中,解冻后精子的质膜完整率与卵黄组无显著差异,表明胆固醇对精子质膜具有较好地保护作用。这与前人在山羊精液冷冻保存的研究结论一致<sup>[26]</sup>。但单独以胆固醇取代卵黄冷冻后精子的活力、运动参数和顶体完整率均低于卵黄组,说明单独添加胆固醇不能达到替代卵黄的效果。Barenholz 研究表明,胆固醇抑制了膜上的  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP 泵,对精子的运动产生影响<sup>[27]</sup>。当胆固醇浓度过高时,膜的流动性反而会显著降低,精子更易受到机械损伤<sup>[28]</sup>。本试验发现当添加的胆固醇浓度由 5 g/L 增加至 10 g/L 时,解冻精子的活力反而下降。顶体损伤通常是由于形成了较大冰晶,损伤了精子的内在结构所导致<sup>[29]</sup>。胆固醇组的顶体完整率较低的原因可能是胆固醇不能阻止大量冰晶的形成对顶体造成的损伤。

磷脂酰胆碱补充了精子在降温过程中丢失的膜磷脂,而且可以替换一些精子膜上的磷脂酰胆碱,减少膜受到损伤<sup>[30]</sup>。高浓度的大豆卵磷脂会对精子产生毒性<sup>[31]</sup>,主要会对膜完整性产生不利的影响。本试验中当磷脂酰胆碱添加量大于 20 g/L 时,造成膜损伤可能是由于磷脂酰胆碱浓度过高引起毒性反应。而添加 10 g/L 磷脂酰胆碱,可能由于浓度过低不能有效地保护精子。

本试验中,当同时添加 16 g/L 磷脂酰胆碱和 4 g/L 胆固醇获得了比卵黄更好的保存效果,冻精后精子活力、精子 VCL、VSL 均显著提高。通过脂质含量检测发现,P16 + C4 稀释液冻后精子质膜上的磷脂含量较卵黄组高,表明采用胆固醇和磷脂酰胆碱代替卵黄,能更好地避免精子膜上胆固醇与磷脂的流失,提高冻精保存的效果。Mutalik 等在稀释液中按照一定比例(95 : 5、90 : 10、80 : 20、70 : 30)添加大豆卵磷脂和胆固醇,结果表明按照 80 : 20 比例添加两种物质替代卵黄用于人的精子冷冻得到了较好的保存效果<sup>[32]</sup>。另外精子膜完整性对精子在雌性的生殖道中行使功能也发挥着重要的作用<sup>[33]</sup>,这可能也是 P16 + C4 组的人工授精效果更好的原因。

本研究结果表明,单独用胆固醇或磷脂酰胆碱替代卵黄,冻精效果低于卵黄组,当添加 16 g/L 磷脂酰胆碱和 4 g/L 胆固醇替代卵黄时解冻效率高于卵黄组,达到了在山羊精液冷冻保存中替代卵黄效果。

参考文献:

[1] Purdy P H. A review on goat sperm cryopreservation [J]. Small Ruminant Research, 2006, 63 (3) : 215 - 225.

[2] Singh A K, Kumar A, Honparkhe M, et al. Comparison of *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of buffalo bull semen frozen in egg yolk - , soya bean lecithin - and liposome - based extenders [J]. Reproduction in Domestic Animals, 2018, 53 (1) : 195 - 202.

[3] Küçük N, Aksoy M, Uçan U, et al. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen [J]. Cryobiology, 2014, 68 (3) : 327 - 331.

[4] Chauhan M S, Kapila R, Gandhi K K, et al. Acrosome damage and enzyme leakage of goat spermatozoa during dilution, cooling and freezing [J]. Andrologia, 1994, 26 (1) : 21 - 26.

[5] Swelum A A A, Saadeldin I M, Alanazi M B, et al. Effects of adding egg yolks of different avian species to Tris glycerol extender on the post - thawing quality of buck semen [J]. Animal Reproduction Science, 2018, 195 : 345 - 354.

[6] Layek S S, Mohanty T K, Kumaresan A, et al. Cryopreservation of bull semen; evolution from egg yolk based to soybean based extenders [J]. Animal Reproduction Science, 2016, 172 : 1 - 9.

- [7] Lü C R, Wu G Q, Hong Q H, et al. Spermatozoa cryopreservation: state of art and future in small ruminants[J]. Biopreservation and Biobanking, 2019, 17(2): 171–182.
- [8] Roy A. Egg yolk – coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat[J]. Nature, 1957, 179(4554): 318–319.
- [9] Ondřej Š, Jiří Š, Jan B, et al. Low density lipoprotein – important player in increasing cryoprotective efficiency of soybean lecithin – based bull semen extenders[J]. Animal Reproduction, 2019, 16(2): 267–276.
- [10] Emamverdi M, Zhandi M, Zare Shahneh A, et al. Optimization of ram semen cryopreservation using a chemically defined soybean lecithin – based extender[J]. Reproduction in Domestic Animals, 2013, 48(6): 899–904.
- [11] Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini S M, et al. *In vitro* comparison of egg yolk – based and soybean lecithin – based extenders for cryopreservation of ram semen[J]. Theriogenology, 2010, 73(4): 480–487.
- [12] Sun L W, Fan W H, Wu C F, et al. Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris – based extender on goat semen cryopreservation[J]. Cryobiology, 2020, 92: 146–150.
- [13] Zakošek P M, Casal M L, Šterbenc N, et al. Vitrification using soy lecithin and sucrose: a new way to store the sperm for the preservation of canine reproductive function[J]. Animals, 2020, 10(4): 653.
- [14] Cockcroft S. Mammalian phosphatidylinositol transfer proteins: emerging roles in signal transduction and vesicular traffic[J]. Chemistry and Physics of Lipids, 1999, 98(1/2): 23–33.
- [15] Hazel J R, Williams E E. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment[J]. Progress in Lipid Research, 1990, 29(3): 167–227.
- [16] Drobnis E Z, Crowe L M, Berger T, et al. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model[J]. The Journal of Experimental Zoology, 1993, 265(4): 432–437.
- [17] Purdy P H, Graham J K. Effect of cholesterol – loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm[J]. Cryobiology, 2004, 48(1): 36–45.
- [18] Aksoy M, Akman O, Lehimcioğlu N C, et al. Cholesterol – loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa[J]. Animal Reproduction Science, 2010, 120(1/2/3/4): 166–172.
- [19] Amidi F, Farshad A, Khor A K. Effects of cholesterol – loaded cyclodextrin during freezing step of cryopreservation with TCGY extender containing bovine serum albumin on quality of goat spermatozoa[J]. Cryobiology, 2010, 61(1): 94–99.
- [20] Silva B G, Moraes E A, Oliveira C S, et al. 77 addition of cholesterol in fresh goat sperm improves cryosurvival rates[J]. Reproduction, Fertility and Development, 2013, 25(1): 186.
- [21] Batissaco L, de Arruda R P, Alves M B R, et al. Cholesterol – loaded cyclodextrin is efficient in preserving sperm quality of cryopreserved ram semen with low freezability[J]. Reproductive Biology, 2020, 20(1): 14–24.
- [22] Konyali C, Tomás C, Blanch E, et al. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol – loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival[J]. Cryobiology, 2013, 67(2): 124–131.
- [23] 倪利平. LDL 和 PCS 对山羊精子冷冻效果及脂类含量影响的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008.
- [24] Salmani H, Towhidi A, Zhandi M, et al. *In vitro* assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen[J]. Cryobiology, 2014, 68(2): 276–280.
- [25] Moore A I, Squires E L, Graham J K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival[J]. Cryobiology, 2005, 51(3): 241–249.
- [26] Anzar M, Rajapaksha K, Boswall L. Egg yolk – free cryopreservation of bull semen[J]. PLoS One, 2019, 14(10): e0223977.
- [27] Barenholz Y. Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to “rafts”[J]. Progress in Lipid Research, 2002, 41(1): 1–5.
- [28] Purdy P H, Fox M H, Graham J K. The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition[J]. Cryobiology, 2005, 51(1): 102–112.
- [29] Futino D O, Mendes M C B, Matos W N L, et al. Glycerol, methyl – formamide and dimethyl – formamide in canine semen cryopreservation[J]. Reproduction in Domestic Animals, 2010, 45(2): 214–220.
- [30] Graham J K, Foote R H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing[J]. Cryobiology, 1987, 24(1): 42–52.
- [31] Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini S M, et al. *In vitro* comparison of egg yolk – based and soybean lecithin – based extenders for cryopreservation of ram semen[J]. Theriogenology, 2010, 73(4): 480–487.
- [32] Mutalik S, Salian S R, Avadhani K, et al. Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium[J]. Systems Biology in Reproductive Medicine, 2014, 60(3): 183–188.
- [33] Holt W V, North R D. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa[J]. Biology of Reproduction, 1994, 51(3): 414–424.