

# 双糖对猪精子冷冻保存效果的影响

潘红梅<sup>1,2</sup> 麻常胜<sup>3</sup> 陈主平<sup>1,2</sup> 郭宗义<sup>1,2\*</sup>

(1.重庆市畜牧科学院, 重庆荣昌, 402460; 2.重庆市养猪工程技术中心, 重庆荣昌, 402460;

3.康地恩生物科技有限公司, 山东青岛, 266061)

**摘要:** 本研究以不同比例的蔗糖和海藻糖替代乳糖, 添加于猪精液稀释液中, 比较不同双糖或双糖组合在冷冻条件下对猪精子的保护效果。结果表明, 蔗糖和海藻糖部分或全部取代稀释液中的乳糖成分, 对猪精子冷冻后质量均有一定程度的提高。当稀释液中添加 66.7%的蔗糖代替乳糖 (F 组, 33.3%乳糖+66.7%蔗糖) 时, 猪精子冻后活率达  $37.0 \pm 2.6$ , 显著优于其它各组 ( $P < 0.05$ ), 其它各项指标也显著高于单一乳糖组 (A 组)。本研究证明, 在含有乳糖的猪精液冷冻保护液中以 66.7%的蔗糖代替原配方中的乳糖量对猪精液冷冻保护的效果最好。

**关键词:** 猪精子, 精液冷冻, 海藻糖, 蔗糖, 乳糖

早在1776年就有报道表明, 冷冻于雪中的精子可以存活, 自此, 研究者们开始试图建立低温保存精子的技术, 但这个过程长达200年之久。直到20世纪中叶, Polge等<sup>[1]</sup>发现甘油对精子具有冷冻保护作用后, 人类才真正实现了精子的冷冻保存。甘油具有渗透性, 它不但能渗入精子内部, 使精子免受电解质浓度增加对精子产生的影响, 它还是很好的溶剂, 具有杀菌作用。但甘油的分子量较大, 渗入或渗出细胞的速度较水分子慢, 而且在常温下对精子的活力和受精力毒害作用较大。Ollero<sup>[2]</sup>报道证实猪精子对甘油的耐受程度比其它家畜更弱, 在冷冻液中加入较多的甘油会导致精子顶体膜的损伤和改变顶体膜的穿透能力。人们开始寻找其它的冷冻保护材料, 以替代或降低甘油在猪精液冷冻保护液中的添加量。

近年来, 非渗透性冷冻保护剂成为研究的热点。非渗透性冷冻保护剂又称作细胞外冷冻保护剂, 能溶于水, 但不能进入细胞, 这类冷冻保护剂主要是由葡萄糖为代表的单糖和以海藻糖、乳糖和蔗糖为代表的双糖类组成。这些糖类物质除了能为精子提供能量底物, 维持溶液渗透压外, 它们还能诱导胞外冰晶网格以及水分子笼型结构的形成, 在冷冻过程中稳定细胞膜, 保护细胞免受机械损伤, 防止因极度脱水引起膜的损伤。海藻糖、乳糖和蔗糖作为非渗透性冷冻保护剂的双糖代表, 能够提高细胞外渗透压, 在冷冻过程中使细胞内的水分向细胞外渗出, 引起细胞脱水而皱缩, 减少细胞内冰晶形成, 从而保护细胞免受破坏。C.Yıldız<sup>[3]</sup>等人研究证明, 糖的类型能够明显影响精子冻后结果, 稀释液中添加同一类型的多种双糖能够提高精子冻后顶体完整率。本研究拟以前期实验<sup>[4]</sup>中筛选出的猪精液冷冻保护剂配方为基础, 用不同浓度的蔗糖和海藻糖替代稀释液中原有的乳糖量, 比较不同双糖或双糖组合对猪精子的保护效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 精液采集

精液来源于重庆市畜牧科学院育成的渝荣 I 号配套系公猪。手握法收集 5 头繁殖历史清

---

项目基金: 重庆市畜牧科学院基本科研业务费重庆市科委专项资金项目 10608。

作者简介: 潘红梅 (1979-), 女, 副研究员, 主要从事动物繁殖研究。Email:panhm\_2118@163.com。

\*通讯作者: 郭宗义 (1965-), 男, 研究员, 主要从事动物繁殖育种研究。Email:guozongyi@sina.com。

楚，健康无病成年公猪的精液。收集浓份精液，8层纱布过滤除去胶体和杂质，半小时内送达实验室。

## 1.2 精液冷冻

### 1.2.1 稀释液

本次实验采用的猪精液冷冻保护基础液是本实验室前期实验中筛选出的配方<sup>[4]</sup>，其配方组成为：葡萄糖 2.1 g、乳糖 3.0 g、甘氨酸 0.8 g、柠檬酸三钠 0.3 g、青霉素 10 万 IU、链霉素 10 万 IU、蒸馏水 100 mL 配成基础液，在基础液中加入 20%的卵黄，配成冷冻稀释液 I 液；向冷冻稀释液 I 液中添加 3%的甘油，即为冷冻稀释液 II 液。

向 I 液中添加不同比例的海藻糖和蔗糖替代乳糖的添加量，组成七组不同的冷冻基础液，即 A 组（乳糖 100%，即 3.0g/100mL），B 组（乳糖 66.7%+海藻糖 33.3%），C 组（乳糖 33.3%+海藻糖 66.7%），D 组（海藻糖 100%），E 组（乳糖 66.7%+蔗糖 33.3%），F 组（乳糖 33.3%+蔗糖 66.7%），G 组（蔗糖 100%）。

### 1.2.2 冷冻

精液送回实验室后立即对精液的容积、密度和活率进行检测，活率达 0.7 以上的精液可用于冷冻。实验采用两步稀释法稀释精液，具体操作如下：精液在 34 °C 下静置 1 h 左右，使精子与精清充分接触后，以 1000×g 离心 10 min，除去上清液。等比例加入冷冻稀释液 I 液，充分混匀后用 8 层纱布包裹，置于 4°C 冰箱中平衡 2h，使之缓慢降温至 2~5°C，同时将配制好的冷冻稀释液 II 液放入冰箱与精液一起平衡。第一次平衡后，再加入等比例的冷冻稀释液 II 液，使精液最终稀释比例为 1:3，继续平衡 1~2 h 后，然后开始滴冻。

用液氮熏蒸法制作颗粒冻精。在大小适中的泡沫盒中注入 2/3 液氮，液氮上方悬一块聚四氟乙烯板，将温度控制在 -150~-130°C（离液氮面约 2~3 cm）。从冰箱中取出经两次平衡的精液，以 0.1~0.2 mL/粒在氟板上迅速滴冻，滴完后，加盖熏蒸 8 min，再浸入液氮。

## 1.3 精液解冻

将冻精颗粒从液氮中取出，在空气中晃动 20 s，使冻精颗粒表面的液氮霜充分挥发后，投入在 42 °C 水浴中预热的解冻液<sup>[5]</sup>（葡萄糖 5.0 g+柠檬酸钠 0.5 g+安钠咖 5 mL+蒸馏水 100 mL）中并快速振荡，使之融化。解冻后的精液置于 37 °C 水浴中待测。

## 1.4 冻精品质检查

### 1.4.1 精子活率测定

取一滴精液于载玻片，400 倍显微镜下观察直线前进运动精子，采用 10 级评分法评定。

### 1.4.2 精子畸形率和顶体完整率测定

将考马斯亮蓝 R250 50 mg 溶于 100 mL 蒸馏水，煮沸溶解，待溶液冷却后，用 0.45μm 滤膜过滤。再加入 3.5 mL 高氯酸，将其配成 CBB 高氯酸染色液染色。染色前，将染色液置于 37°C 水浴锅中预热 10 min，将精子涂片置于 CBB 高氯酸染色液中浸染 5~7 min；水洗，风干。400 倍显微镜下分三个区域计数 300 个精子，计算精子畸形率；1000 倍油镜下分三个区域计数 300 个精子，计算精子顶体完整率。

### 1.4.3 精子质膜完整性检查

采用 Jeyendran 等的精子低渗肿胀试验法（Hypoosmotic sperm swelling test, HOST）<sup>[6]</sup>。取 50 uL 精液，放入 0.95 mL 低渗果糖液中，置于 37 °C 水浴锅中孵育 30 min，并取一滴于

血细胞计数板上，显微镜下计数 5 个视野中的至少数 200 个精子，并计算弯尾精子的百分率。

#### 1.4.4 精子存活时间检测

将解冻后的精液置于 37℃ 水浴中，每隔 1 h 检查一次活率，当活率下降到一半时，每隔 0.5 h 检查一次，直至活率为零。

#### 1.5 数据处理

采用 SPSS 13.0 软件 one-wayANOVA 进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 精子冻后活率

从表 1 可以看出，仅在冷冻保护基础液中添加乳糖（A 组）、海藻糖（D 组）或蔗糖（G 组）三种双糖中的一种，对猪精子冻后活率的保护作用没有显著差异（ $P>0.05$ ）。当基础液中添加两种不同的双糖（乳糖+海藻糖或乳糖+蔗糖）后，精子的冻后活率有所变化，其中，乳糖 33.3%+蔗糖 66.7%（F 组）组对猪精子冻后活率的保护为最佳，达  $37.0\pm 2.6$ ，显著优于其它各组（ $P<0.05$ ）。

表 1 用不同比例的海藻糖和蔗糖代替乳糖对冷冻-解冻后精子的影响

| 组别                    | 冻后活率               | 冻后质膜完整率             | 冻后顶体完整率             |
|-----------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| A（乳糖 100%）            | $27.0\pm 1.2^{Aa}$ | $36.6\pm 0.78^{Aa}$ | $40.2\pm 0.90^{Aa}$ |
| B（乳糖 66.7%+海藻糖 33.3%） | $29.0\pm 1.0^{Aa}$ | $41.3\pm 0.78^{Aa}$ | $56.1\pm 3.99^{Bb}$ |
| C（乳糖 33.3%+海藻糖 66.7%） | $32.0\pm 2.0^{Aa}$ | $48.1\pm 2.57^{Bb}$ | $60.1\pm 3.88^{Bb}$ |
| D（海藻糖 100%）           | $26.0\pm 2.9^{Aa}$ | $51.1\pm 4.72^{Bb}$ | $60.7\pm 3.35^{Bb}$ |
| E（乳糖 66.7%+蔗糖 33.3%）  | $27.0\pm 2.0^{Aa}$ | $41.1\pm 0.58^{Aa}$ | $51.5\pm 1.67^{Bb}$ |
| F（乳糖 33.3%+蔗糖 66.7%）  | $37.0\pm 2.6^{Bb}$ | $46.7\pm 2.18^{Bb}$ | $53.3\pm 3.94^{Bb}$ |
| G（蔗糖 100%）            | $27.0\pm 2.0^{Aa}$ | $40.4\pm 1.53^{Aa}$ | $42.0\pm 0.88^{Aa}$ |

注：各行用不同小写字母表示表示差异显著（ $P<0.05$ ）；每列用不同大写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。

### 2.2 精子冻后质膜完整率

将海藻糖按不同比例添加入冷冻保护基础液中，以替代或部分替代乳糖后，由表 1 可知，随海藻糖添加比例的增大，33.3%（B 组）、66.7%（C 组）与 100%（D 组），精子冻后质膜完整率也随之升高（ $P<0.05$ ），分别为  $41.3\pm 0.78$ 、 $48.1\pm 2.57$  和  $51.1\pm 4.72$ ，其中 C 组和 D 组的精子冻后质膜完整率显著高于 B 组（ $P<0.05$ ）。C 组和 D 组间差异不显著（ $P>0.05$ ）。在基础液中添加不同比例的蔗糖代替乳糖，以 66.7% 的蔗糖（F 组）对精子冻后质膜完整率保护较好，明显优于 33.3%（E 组）和 100%（G 组）的蔗糖添加量组（ $P<0.05$ ）。

当基础液中海藻糖和蔗糖替代乳糖的量均为 33.3% 时，其精子冻后质膜完整率分别为  $41.3\pm 0.78$  和  $41.1\pm 0.58$ （ $P>0.05$ ）；均为 66.6% 时，分别为  $48.1\pm 2.57$  和  $46.7\pm 2.18$ （ $P>0.05$ ）（见表 1），说明，在基础液中添加相同比例的海藻糖和蔗糖时，它们对精子冻后质膜完整率的影响差异不大。

### 2.3 精子冻后顶体完整率

由实验结果可知，加入海藻糖或蔗糖后，精子冻后顶体完整率均高于仅有乳糖时的保护效果（见表 1）。在冷冻保护基础液中添加海藻糖后，精子冻后顶体完整率显著高于单一乳

糖组 (A 组) ( $P < 0.05$ )。但由表 1 可知, 精子的冻后顶体完整率并未随海藻糖添加量的增加而增加, 添加 33.3% (B 组)、66.7% (C 组) 及 100% (D 组) 的海藻糖后, 冻后精子分别获得  $56.1 \pm 3.99$ 、 $60.1 \pm 3.88$  和  $60.7 \pm 3.35$  的冻后顶体完整率, 各组间无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 说明添加过量的海藻糖并不能进一步提高其对精子顶体的保护作用。

在冷冻保护基础液中添加 33.3% (E 组) 和 66.7% (F 组) 的蔗糖代替乳糖, 精子冻后顶体完整率显著高于仅有乳糖组 (A 组) ( $P < 0.05$ )。但进一步提高蔗糖在基础液中的比例, 当蔗糖完全取代乳糖时 (G 组), 精子的冻后顶体完整率显著降低 ( $42.0 \pm 0.88$ ,  $P < 0.05$ ), 与 A 组 ( $40.2 \pm 0.90$ ) 接近。充分证明单一的蔗糖对精子顶体完整率的保护作用相对于单一的海藻糖和单一的乳糖没有优势。就单一双糖的添加而言, 海藻糖 ( $60.7 \pm 3.35$ ) 对精子顶体的冷冻保护作用显著优于乳糖和蔗糖 ( $40.2 \pm 0.90$  和  $42.0 \pm 0.88$ ) ( $P < 0.05$ )。

#### 2.4 精子冻后畸形率和存活时间

从图 1 可以得出, 在猪精液冷冻保存稀释液中添加不同比例的海藻糖和蔗糖以替代乳糖, 它们对猪精子冻后畸形率和存活时间均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。其中, 以 33.3% 的蔗糖量替代乳糖 (E 组), 导致精子冻后有较高的畸形率; 而以 66.7% 的蔗糖替代乳糖 (G 组), 则对精子冻后形态保护最好, 解冻后的存活时间也为全组最高。因此, 在本次试验中, 以添加 66.7% 的蔗糖 (F 组) 替代乳糖为最佳。

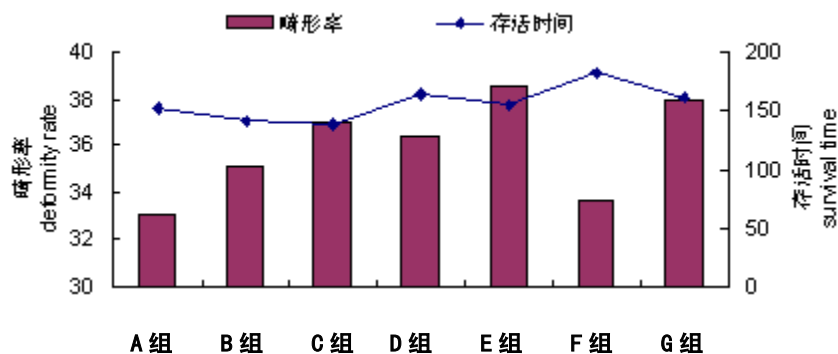


图 1 不同浓度海藻糖和蔗糖对精子冻后畸形率和存活时间的影响

### 3 结论与讨论

#### 3.1 不同浓度的海藻糖和蔗糖对精子冻后活率的影响

Labrude P<sup>[7]</sup>等研究发现, 稀释液中添加多种类型的糖, 细胞冻后质量优于 ( $P < 0.05$ ) 单一类型的糖; Franks F<sup>[8]</sup>等人的研究结果表明, 稀释液中添加多种同一类型的糖, 不能提高细胞冻后质量 ( $P < 0.05$ )。Molinia 等<sup>[9]</sup>对鼠精液进行冷冻保存研究时发现, 单糖对精子活力的保护作用比双糖好。与 Molinia 的研究结果不同, 本试验结果表明, 在含有葡萄糖 (单糖) 的猪精液冷冻保护稀释液中另添加两种双糖能提高精子冻后活率, 尤其是当用 66.7% 的蔗糖代替乳糖时, 精液解冻后活率达  $37.0 \pm 2.6\%$ , 显著高于其它各组 ( $P < 0.05$ )。

#### 3.2 不同浓度的海藻糖和蔗糖对精子冻后质膜完整率的影响

甘油在保护细胞的同时, 因细胞渗透能力的改变而对细胞膜具有一定的毒害作用, 可使细胞膜处于低渗环境而膨胀破损。糖类则通过稳定精子质膜而发挥保护作用<sup>[10]</sup>。温朗聪综述<sup>[11]</sup>表明还原性糖的醛基能与蛋白质的  $\alpha$ -氨基发生非酶性棕色反应, 从而影响蛋白质的功能, 因此还原性越弱的糖, 对冻存物质分子的贮存稳定性越强。乳糖属还原性糖, 而海藻

糖和蔗糖是葡萄糖的二聚体，二者为非还原性的同分异构体，对生物体或生物大分子具有独特的非特异性保护作用，在冷冻过程中可以在细胞膜外面产生一种玻璃状的防护层，提高细胞对高渗透压的耐受性。本实验结果也证明，当海藻糖或蔗糖部分或完全取代稀释液中的乳糖成分后，精子的冻后质膜完整率均高于乳糖组（A组）。在精子冷冻时，海藻糖可以强有力的束缚水分子，与膜脂质共同拥有结合水或者本身起到代替膜结合水的功用，保持细胞内湿润，防止细胞因失水而造成养分的损失和细胞的损伤，具有稳定细胞膜和蛋白质结构的特性。从实验结果也表明，在一定的范围内，随海藻糖在稀释液中添加量的增加，精子质膜完整性越高，与Aisen<sup>[12]</sup>、胡建宏<sup>[13]</sup>等的研究结果相一致。

### 3.3 不同浓度海藻糖和蔗糖对精子冻后顶体完整率的影响

Deleeuw等<sup>[14]</sup>报道，在牛精液冷冻保存稀释液中添加62.5mM的蔗糖能显著提高牛精液的冻后顶体完整率，效果明显好于同剂量的海藻糖。从本试验结果，无论海藻糖与蔗糖添加量在何种添加水平下，海藻糖添加组的精子冻后顶体完整率均高于蔗糖组，但差异不显著，与Deleeuw的研究结论不一致，分析原因，可能是牛与猪的精子在理化结构上的差异造成的。

胡建宏等<sup>[13]</sup>在猪，Bayarad等<sup>[15]</sup> 在 小鼠和Aboagla等<sup>[16]</sup> 在 山羊精子冷冻保存的研究均发现，随着海藻糖添加比例的增加，精子的顶体完整率越高，本研究与上述研究结果一致。说明海藻糖可以有效保护冷冻—解冻过程中精子顶体的完整性，

### 3.4 不同浓度的海藻糖和蔗糖对精子冻后畸形率和存活时间的影响

双糖是否能够改善精子形态，前人研究较少，从本试验结果看，乳糖、海藻糖和蔗糖对精子解冻后形态的影响无显著差异。糖作为营养物质，能直接被精子分解产生能量，在稀释液中添加一定量的糖，会延长精子体外存活时间。本试验表明，添加多种双糖或改变双糖的添加量，对猪精子解冻后存活时间的延长没有明显的作用。这可能是因为，精子对乳糖、海藻糖和蔗糖等双糖的直接利用率不及单糖。

## 参考文献

- [1] Polge,C.,A.V. Smith, A.S. Parkes,et al.Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures[J]. Nature,1949.**164**: 666.
- [2]Ollero, M., P. Perez, M. Blanco, et al. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis[J]. Cryobiology,1998.**37**(1):1-12.
- [3]Ytldtz,C.Influence of suger supplementation of the extender on motility,vlability and acrosomal of dog spermatation during freezing[J].Theriogenologie,2002. **54**: 579~585.
- [4]麻常胜,张兆旺,,王金勇,,等.猪精液冷冻技术的研究[J].青海畜牧兽医杂志,2008(5): 9-11.
- [5]潘红梅, 麻常胜,刘文,,等.不同精液解冻液和解冻速率对猪颗粒冻精品质的影响[J].畜牧与兽医,2010.**42**(9): 49-52.
- [6]Jeyendran,R.S., Van der Ven,H.H., Perez-Pelaez, M.,et al.Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to order semen characteristics[J].J Reprod Fertil,1984.**70**: 219-225.
- [7]Labrude,P.,Chaillot,B.,Vigneron,C.,et al.Problems of haemoglobin freeze-drying:evidence that water removal is the key to Iron oxidation[J]. J Pharm Pharmacology,1987.**39**:344.
- [8]Franks,F.Freeze-drying of bioproducts:putting principle intrpractice[J]. European Journal Pharmaceutics and

Biopharmaceutics, 1998. **45**: 221.

[9]Molinia,F., Evans, G., Maxwell, W.,et al. In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa[J]. *Reprod Nutr Dev* 1994. **34**::491-500.

[10]Fernando, Margareta, Szabolcs,et al. Deep freezing of concentrated boar sperm for intrauterine insemination: effects on sperm viability[J]. *Theriogenology*, 2005. **63**:1320~1333.

[11]温朗聪,袁杰利,卢行安,等.冻干微生物与保护剂[J].*中国微生态学杂志*,1997.**9**(1): 56.

[12]Aisen,E.G.,Medina,V.H., Venturino,A.et al.Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations[J]. *Theriogenology*, 2002.**57**: 801~1808.

[13]胡建宏,李青旺,江中良,等,海藻糖对猪精液冷冻保存效果的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2006. **37**(12):1297~1303.

[14]Deleeuw,F.W., Deleeuw,A.M.,et al, Effect of various Cryoprotective agents and membrane stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing[J]. *Cryobiology*,1993.**30**:32~44.

[15]Bayarad,T.S.,Esther,E.N.,Kathleen,A.T.et al.Comparison of glycerol,other polyols,trehalose,and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation[J]. *Cryobiology*, 1998. **37**: 46~ 58.

[16]Aboagla,E.M., Terada, T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing[J]. *Biol Reprod*, 2003. **69**:1245~1250.