

不同浓度大豆卵磷脂替代蛋黄对东佛里生奶绵羊精液冷冻保存效果的影响

赵霞¹, 爱伦高娃², 马跃军¹, 樊东¹, 乌仁图亚³, 娜仁花⁴, 吉林台^{4,*}

(1. 内蒙古自治区农牧业科学院, 内蒙古呼和浩特 010031; 2. 内蒙古医科大学附属医院;
3. 赤峰市巴林左旗畜牧工作站; 4. 内蒙古农业大学)

摘要: 本试验旨在研究添加不同浓度大豆卵磷脂(SL)冷冻保存东佛里生奶绵羊精液的效果。我们在 Tris 基础稀释液中, 添加 18% 蛋黄为对照组, 添加 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5% SL 设为试验组, 检测冷冻精液解冻后的精子活率和顶体完整率。结果显示, 添加 0.5%、2.5% SL 冷冻稀释液稀释的精液, 解冻后精子活率和顶体完整率与其他组之间存在显著差异($P < 0.05$); 添加 18% 蛋黄和 1%~2% SL 冷冻稀释液稀释的精液, 冷冻解冻后精子活率和顶体完整率之间无显著差异($P > 0.05$); 添加 18% 蛋黄和 1.0%~1.5% SL 冷冻稀释液稀释后的精液, 进行人工授精后母羊的妊娠率与对照组无显著差异($P > 0.05$)。因此, 大豆卵磷脂可以作为冷冻保护剂用于东佛里生奶绵羊精液的冷冻保存, 其最佳添加浓度为 1~2% (g/L)。

关键词: 东佛里生奶绵羊; 冷冻精液; 大豆卵磷脂; 精子活率; 顶体完整率

[中图分类号] S814.3 [文献标识码] A [文章编号] 1004-6704(2023)03-0095-04

Effects of Different Concentrations of Soybean Lecithin Instead of Egg Yolk on Cryopreservation of Semen in East Friensian Milk Sheep

ZHAO Xia¹, AILUN Gao-wa², MA Yue-jun¹, FAN Dong¹, WUREN Tu-ya³,
NA Ren-hua⁴, JI Lin-tai^{4,*}

(1. Inner Mongolia Academy of Agricultural & Animal Husbandry Sciences, Huhehaote Inner Mongolia 010031, China;
2. Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University; 3. Chifeng Balin Zuoqi Animal Husbandry Workstation;
4. Inner Mongolia Agricultural University)

Abstract: The purpose of this experiment was to study the effect of adding different concentrations of soybean lecithin (SL) on the cryopreservation of semen in East Friensian milk sheep. We added 18% egg yolk to the basic dilution of Tris as the control group, and added 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, and 2.5% SL as the test group. We measured sperm motility and acrosome integrity after thawing frozen semen. The results showed that there were significant differences ($P < 0.05$) in the sperm viability and acrosome integrity rate between the thawed semen diluted with 0.5% and 2.5% SL freezing diluent and other groups ($P < 0.05$); adding 18% egg yolk and 1%~2% There was no significant difference between the sperm motility rate and acrosome integrity rate in semen diluted with SL frozen diluent after thawing ($P > 0.05$); the semen diluted with 18% egg yolk and 1.0%~1.5% SL frozen diluent, after artificial insemination The pregnancy rate of ewes was not significantly different from that of the control group ($P > 0.05$). Therefore, soybean lecithin can be used as a cryoprotectant for the cryopreservation of semen in East Friensian milk sheep, and the optimum concentration is 1%~2% (g/L).

Key words: East Friensian milk sheep; frozen semen; soybean lecithin; sperm motility rate; acrosome integrity rate

提高精液冷冻保存效果是实现高质量发展人工

工作, E-mail: jirintais@imau.edu.cn

[收稿日期] 2022-06-27

[基金项目] 内蒙古自治区科学技术厅内蒙古自治区科技计划项目(项目编号: 2021GG0067); 内蒙古自治区农牧业创新基金(项目编号: 2020CXJJM05)

[作者简介] 赵霞(1968-), 女, 内蒙古赤峰人, 硕士, 研究员, 主要从事家畜繁殖技术与推广工作。E-mail: zxgege@163.com

*[通讯作者] 吉林台(1968-), 男, 内蒙古赤峰市人, 博士, 副教授, 主要从事兽医病理学与临床繁殖学教学研究

授精技术的关键环节, 也是建立现代畜牧业遗传资源库的重要策略之一。选取优质冻精资源进行人工授精不仅可以从源头上减少生殖疾病的传播, 还可以提高优秀种质资源的改良速度, 增加对遗传特性和生产性能的高效选择。目前, 因绵羊精子易受低温环境的影响发生冷休克现象, 我国绵羊精液的冷

冻保存技术尚未取得实质性的进展;羊精液的冷冻保存过程中,温度和渗透压的改变会严重降低精子活力,产生精子膜功能受损、脂质过氧化和冷冻保护剂的毒害等现象,降低精子与卵母细胞的结合能力,因此,优化冷冻精液生产工艺对于绵羊精液的长期高效保存具有重要意义。

蛋黄作为冷冻保护剂广泛用于精液的冷冻保存,可以稳定精子顶体膜并在解冻时降低耗氧量。但是,配制冷冻稀释液时,蛋黄质量难以控制,存在病毒感染源和过敏原的风险,并且蛋黄中特殊成分能与精液中酶类物质相互作用,所产生的物质对精子具有毒害作用。通常在稀释前通过去除部分精清,降低蛋黄的毒害作用,从而提高解冻后的精子质量。此外,蛋黄内微生物所释放的内毒素会降低精子的受精潜力。

因此,蛋黄作为冷冻保护剂具有潜在的风险,从生物安全方面考虑,选择不含动物源性的冷冻保护剂十分必要。相关研究表明,大豆卵磷脂(Soybean lecithin, SL)可以替代动物源性冷冻保护剂保存人类、牛和山羊的精液。但截至目前,未见 SL 在东佛里生奶绵羊精液冷冻保存中使用的报道。本研究旨在评价不同浓度 SL 在奶绵羊精液冷冻保存中的效果,以添加蛋黄的冷冻精液稀释液作为对照组,评价不同处理组对精子活率、顶体完整率和妊娠率的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物和精液采集 本研究选用来自同一饲养管理条件下的 5 只优秀东佛里生奶种公羊;实验前 40 d,对每只种公羊的日粮添加胡萝卜和鸡蛋,并自由取水;保持每天 3~5 km 早晚各一次的定时定量运动并使用假阴道法从公羊体内收集精液。

1.1.2 试验药品 Tris(三羟甲基氨基甲烷)、果糖、柠檬酸、甘油和大豆卵磷脂(SL)购自 Sigma-Aldrich (USA) 公司;伊红、青霉素、链霉素购自国内。

1.1.3 仪器设备 电子天平(日本)、生物相差显微镜(尼康)、全自动精子分析仪(美国 Hamilton Thome Ivos II)、0.25 mL 麦管(法国)、封口粉(日本);血细胞计、超声波细胞粉碎仪、pH 测试仪、恒温瓶、恒温水浴锅、细管架、冰箱、剪刀和自制泡沫冷冻箱,以上设备均来自国内。

1.2 试验方法

1.2.1 稀释液的配制 Tris 基础稀释液的配置:

所需化学药品 Tris、果糖、柠檬酸用万分之一分析天平精准称量(表 1),放入 100 mL 的烧杯内,加入 50 mL 双蒸水后用玻璃棒进行搅匀,定容至 100 mL 后倒入三角瓶封口高压灭菌;冷却后分别加入青霉素、链霉素配制成 pH 为 6.8 的基础稀释液。

表 1 Tris 基础稀释液配方

配方	双蒸水 (mL)	Tris (g)	果糖 (g)	柠檬酸 (g)	甘油 (%)
基础稀释液	100	2.71	1.00	1.42	7

I 号稀释液的配制(对照组):在 Tris 基础液中分别加入 18% 蛋黄和 7% 灭菌的甘油,用超声波仪进行加速溶解和离心,使用细菌过滤器过滤后备用。

II-VI 稀释液的配制(试验组):在 Tris 基础稀释液中分别加入不同浓度的大豆卵磷脂(0.5%、1.0%、1.5%、2%、2.5%)和 7% 灭菌的甘油(表 2),用超声波仪进行加速溶解和离心,使用细菌过滤器过滤后备用。

表 2 不同添加剂稀释液的配方

配方	大豆卵磷脂	蛋黄	甘油	%
I	—	18.0	7.0	
II	0.5	—	7.0	
III	1.0	—	7.0	
IV	1.5	—	7.0	
V	2.0	—	7.0	
VI	2.5	—	7.0	

1.2.2 精液采集和质量检测 使用假阴道法采集精液后,立即将精液放置于 34℃ 恒温水浴锅中的试管,静置 10~15 min 后观察精液颜色,检测精子活率、精子密度和射精量。选择射精量在 0.5~2 mL、精子浓度为 $1.5\sim 2\times 10^9$ 精子/mL、精子活率大于 85%、异常精子率小于 10% 的精液备用。

1.2.3 精液冷冻处理 为消除个体间差异,将采集的不同公羊的精液混合,分成六等份,分别用 I-VI 号稀释液进行等温稀释,稀释至最终浓度为 4.0×10^7 个精子/mL,并置于 37℃ 水浴锅中平衡 10 min,平衡后的精液装入 0.25 mL 麦管中,并用聚乙烯醇密封。将所有麦管用纯棉毛巾或纱布包裹放入 4℃ 冰箱中平衡 3 h,再将麦管放置在距离液氮表面 3 cm 处熏蒸 10~12 min,然后收集麦管投入液氮中保存备用。

1.2.4 冻精细管解冻后的质量评定 冻精细管在 37℃ 水浴锅中解冻 30s,依照常规方法检测解冻后的精子活率、存活时间、死精子率和顶体完整率。根据 Mortimer 标准,精子颈部区域呈现轻微粉红色

或红色的归类为活精子。

1.2.5 腹腔镜输精 腹腔镜输精技术与同期发情技术相结合进行输精。上述方法冷冻的精液解冻后借助腹腔镜内窥镜,采用套管针穿刺方法,将精液直接输入到发情后 30~36 h 母羊的(术前空腹 12 h 以上)子宫角,做到“精准输精”。

1.2.6 母羊管理及妊娠诊断 输精后的母羊每天补饲优质干草、青干草、青贮饲料,妊娠后期适量补充精料、微量元素等。输精后 35~40 d 使用羊用 B 超仪检测妊娠情况,统计妊娠母羊数。

1.3 统计分析

采用 SPSS 统计软件对随机区组设计得到的试

表 3 不同稀释液对精子活率、顶体完整率的影响

项目	18%蛋黄	0.5%大豆卵磷脂	1%大豆卵磷脂	1.5%大豆卵磷脂	2%大豆卵磷脂	2.5%大豆卵磷脂	%
鲜精活率	0.85±2.45 ^a	0.85±2.45 ^a	0.85±2.45 ^a	0.85±2.45 ^a	0.85±2.45 ^a	0.85±2.45 ^a	
解冻后活率	66.7±4.02 ^a	51.5±2.08 ^c	61.3±1.68 ^{ab}	64.7±2.83 ^a	60.3±1.48 ^{ab}	55.6±3.09 ^{bc}	
顶体完整率	66.2±1.68 ^a	49.12±2.6 ^{bc}	69.35±3.27 ^a	70.20±2.42 ^a	67.12±1.7 ^a	54.4±2.11 ^c	

注:同行数据不同字母表示差异显著($P<0.05$),相同字母表示差异不显著($P>0.05$)。

表 3 显示,0.5%、2.5%SL 组精子解冻后活率和顶体完整率低于其他组($P<0.05$);18%蛋黄和 1%、1.5%、2%SL 组精子解冻后活率和顶体完整率显著高于其他各组,且显著高于 0.5%和 2.5%组($P<0.05$)。

2.2 不同稀释液对冷冻精液受胎率的影响

表 4 显示,添加 18%蛋黄和 1.0%~1.5%SL 冷冻稀释液稀释的精液,人工授精后母羊的妊娠率之间无显著差异($P>0.05$)。

表 4 不同稀释液对冷冻精液受胎率的影响 只,%

项目	1.0%~1.5% 大豆卵磷脂	18%蛋黄	总数 (只)
输精母羊数	50	60	110
妊娠母羊数	29	35	64
妊娠率	58a(29/59)	58.3a(35/60)	58.18(64/110)

注:同行数据不同字母表示差异显著($P<0.05$),相同字母表示差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

在大多数动物精液冷冻过程中,蛋黄作为高效的冷冻保护剂而广泛应用。但是,禽类的蛋黄作为精液冷冻保护剂容易受到病原体和细菌的污染,并有可能导致疾病的传播,而面临卫生安全问题,直接影响精液品质。此外,因蛋源不同或蛋源不明会导致无法控制其质量。因此,世界各地实验室在不断研究可以替代动物源性蛋黄的新型精液冷冻保护剂。而大豆卵磷脂是一种植物源性冷冻保护剂,是高分子量脂蛋白和磷脂的替代品,即可降低动物源

验数据进行单因素方差分析(ANOVA),进一步用 Etukey-Kramer 检验评估统计学上的差异,当 $P<0.05$ 时,差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同冷冻稀释液对精子活率、顶体完整率的影响

精液分别用冷冻稀释液 I (对照组)和冷冻稀释液 II—VI (试验组)稀释,在 4℃ 冰箱中降温平衡 3 h,用液氮熏蒸冷冻后投入液氮中保存。解冻后检查其活率和顶体完整率,结果见表 3。

性冷冻保护剂的卫生风险,又能防止稀释、冷却和超低温保存过程中对精子质膜的损伤。研究表明,SL 用于冷冻牛精液、公羊精液和山羊精液效果显著。所以,精液冷冻保存过程中,使用非动物源性的冷冻保护剂代替蛋黄是提高羊冷冻精液安全生产效率和冷冻精液受精率的关键所在。

Waterhouse 等研究报道表示,大豆卵磷脂在冷冻过程中的保护作用是通过磷脂在降低至冰点过程中减少冰晶的形成而实现。磷脂是蛋黄和大豆卵磷脂磷酸盐的主要成分,外源磷脂可以取代精子质膜的磷脂,维持精子质膜结构和功能的正常运行。因此在精子冷冻过程中,这种植物性磷脂能够有效降低精子质膜的氧化受损。本研究结果显示,在奶绵羊精液冷冻保存液中添加浓度为 1%~2%的大豆卵磷脂,能使精子解冻后的活率、顶体完整率和妊娠率均与蛋黄作为保护剂所得效果无显著差异,表明 SL 在奶绵羊精液冷冻过程中对精子起到了保护作用。

另外,本试验在添加 1%、1.5%SL 稀释液稀释奶绵羊精液时发现,SL 对精子的运动速度有明显的促进作用,这可能与蛋黄稀释液黏度高于 SL 稀释液有关,高黏度环境会阻碍精子的运动速度。但是,高浓度的 SL 对精子活力和存活能力有一定的毒性作用。稀释液中加入高浓度的 SL 会增加稀释液的黏度,而稀释液中的杂物也会降低精子的受精能力,这可能与稀释液的渗透压有关。稀释液中渗透压随着 SL 浓度的增加而降低,导致精子发生损伤现象。

由于较高浓度的 SL 可能存在对精子的毒害作

用,而较低浓度可能不足以保护精子,所以稀释液中的大豆卵磷脂含量存在一个临界值。这与本试验结果相一致,当 SL 添加浓度为 1%~2%时,公羊精液解冻后精子活率和顶体完整率较高,而 SL 添加浓度为 0.5%和 2.5%时,精子活率和顶体完整率下降。所以,在东佛里生奶绵羊精液冷冻保存稀释液中大豆卵磷脂最佳浓度为 1%~2%。且 Khalifa 等报道,添加大豆卵磷脂的冷冻精液在输精后获得了较理想的受胎率,与蛋黄冻精受胎率无显著差异。

综上所述,大豆卵磷脂可以取代蛋黄作为精液冷冻保护剂,并在精液冷冻—解冻过程中对精子发挥保护作用,其最佳添加浓度为 1%~2%。这为商业化、标准化地生产绵羊冷冻精液奠定基础,提高绵羊冻精的冷冻效果,促进羊冻精供种的进程。

参考文献:

- [1] WOODS E J, BENSON J D, AGCA Y, et al. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues [J]. *Cryobiology*, 2004, 48(2):146-156.
- [2] BARBAS J P, MASCARENHAS R D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells[J]. *Cell&Tissue Banking*, 2009, 10(1):49-62.
- [3] FUTINO D O, MENDES M, MATOS W, et al. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2010, 45(2):214-220.
- [4] TUE, NEL, SULE, et al. Leptin in sperm analysis can be a new indicator[J]. *Acta histochemica*, 2019, 121(1):43-49.
- [5] ABOUELEZZ F M K, SAYED M A M, J S J. Fertility disturbances of dimethylacetamide and glycerol in rooster sperm diluents: Discrimination among effects produced pre and post freezing-thawing process[J]. *Animal Reproduction Science*, 2017, 234.
- [6] SELVAKUMAR, NARASIMMAN, DHANASEKAR, et al. Retrieval and cryopreservation of sperm in spermatophores from cadaveric Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus* (H. Milne Edwards, 1837) [J]*Animal Reproduction Science*, 2018, 192:185-192.
- [7] BOUSSEAU S, BRILLARD J P, GUIENNE M L, et al. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents [J]. *Theriogenology*, 1998, 50(5):699-706.
- [8] SALMANI H, TOWHIDI A, ZHANDI M, et al. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk base diluents for cryopreservation of goat semen[J]. *Cryobiology*, 2014, 68(2):276-280.
- [9] AIRES V A, HINSCH K D, MULLER-SCHLOSSER F, et al. In vitro and in vivo comparison of egg yolk based and Soya bean base extenders for cryopreservation of bovine semen [J]. *Theriogenology*, 2003, 60(2):269-279.
- [10] EL-SISY G A, EL-NATTAT W S, EL-SHESH-TAWY R I, et al. Substitution of egg yolk with different concentrations of soybean lecithin in tris-based extender during bulls' semen preservability[J]. *Animal Reproduction and AI Dept. National Research Center*, 2016, 005(006):492-495.
- [11] FUKUI Y, KOHNO H, TOGARI T, et al. Fertility after artificial insemination using a synthetic semen extender in sheep[J]. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 2008, 54(4):286-289.
- [12] ANSARI M S, RAKHA B A, ANDRABI S, et al. Usefulness of powdered and fresh egg yolk for cryopreservation of Zebu bull spermatozoa [J]. *Reproductive Biology*, 2010, 10:235-240.
- [13] ANDRABI S M H. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa [J]. *Reproduction in Domestic Animal*, 2010, 44(3):552-569.
- [14] AKHTER S, ANSARI M S, ANDRABI S M H, et al. Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa[J]. *Reproduction Domestic Animals*, 2012, 7(5):815-819.
- [15] 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, 73:480-487.
- [16] ROOF D J, BOWLEY S, PRICE L L, et al. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing [J]. *Theriogenology*, 2012, 77:412-420.
- [17] WATERHOUSE K E, HOFMO P O, TVERDAL A, et al. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm[J]. *Reproduction*, 2006, 131(5):887-894.
- [18] VIDAL A H, BATISTA A M, SILVA E, et al. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation [J]. *Small Ruminant Research*, 2013, 109(1):47-51.
- [19] LEEUW A, HARING R, KAALLANSBERGEN L, et al. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract[J]. *Theriogenology*, 2000, 54:57-67.
- [20] MOUSSA M, MARINET V, TRIMECHE A, et al. Low-density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen[J]. *Theriogenology*, 2002, 57:1695-1706.
- [21] BALAMURUGAN R, MUNUSWAMY N. Cryopreservation of sperm in Grey mullet *Mugil cephalus*