DOI:10.15933/j.cnki.1004-3268.2006.07.036
河南农业科学

丙酮酸盐对牛精液冷冻效果的影响

胡传活[1,2], 杨俊涛[1,2], 梁琪妹[1,2], 卢晟盛[1,2], 韦英明[1,2], 张 明[1,2], 李广雪[2], 隆有前[2], 卢克焕[1,2*]
(1. 广西大学动物繁殖研究所, 广西 南宁 530005; 2. 广西大学动物科技学院, 广西 南宁 530005)

摘要: 在常用的果糖—柠檬酸钠—卵黄—甘油液的基础上, 分别添加 1.25 mmol/L 或 2.00 mmol/L 的丙酮酸钾、丙酮酸钠或丙酮酸钙, 以观察丙酮酸盐在牛精液冷冻中的应用效果。冷冻前各组稀释液隔 15min 分 2 次加入, 之后平衡 4h。结果表明, 各组精子的冻后活力、复苏率、畸形率和顶体完整率之间没有显著差异, 但 6 个试验组的冻后活力、复苏率和对照组相比有提高趋势。
关键词: 丙酮酸盐; 牛; 精液冷冻
中图分类号: S823　　文献标识码: A　　文章编号: 1004—3268(2006)07—0105—04

Effect of Pyruvate on Cryopreservation of Bull Semen

HU Chuan-huo[1,2], YANG Jun-tao[1,2], LIANG Qi-mei[1,2], LU Sheng-sheng[1,2], WEI Ying-ming[1,2], ZHANG Ming[1,2], LI Guang-xue[2], LONG You-qian[2], LU Ke-huan[1,2*]
(1. Animal Reproduction Institute of Guangxi University, Nanning 530005, China; 2. College of Animal Science and Technology of Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: Potassium pyruvate, sodium pyruvate and calcium pyruvate (1.25, 2.00mmol/L respectively) were added to the conventional diluents (the medium containing fructose, sodium citric, egg yolk and glycerol) to test the effects of pyruvates on cryopreservation of bull semen. The extenders were added 2 times in 15minitues interval. Then the diluted semen samples were equilibrated for 4h before frozen. The results showed that there weren't significant differences among all the tested samples on progressive motility, recovery rate, deformity and acrosomal integrity, the 6 treated groups tended to demonstrate better progressive motility and recovery rate compared to the control.
Key words: Pyruvate; Bull; Semen cryopreservation

丙酮酸盐是柠檬酸循环和合成氨基酸及糖类过程中常见的中间产物, 可通过乙酰 CoA 和三羧酸循环实现体内糖、脂肪和氨基酸间的互相转化。可见, 丙酮酸盐是营养物质代谢的枢纽, 是细胞的能源物质; 同时, 其还有极好的抗氧化作用及抗菌、抗病毒功能[1~5]。丙酮酸盐已经广泛地应用于细胞、组织和胚胎的培养, 而且取得了很好的效果[3~6]。国内外不少学者将丙酮酸盐应用于人和动物精液的低温[7~11]或冷冻保存[12~15], 但在国内尚缺乏将丙酮酸盐应用于家畜尤其是牛精液冷冻的报道。

1 材料与方法

1.1 主要仪器设备

精子图像分析仪(CEROS SPERM ANALYZER, Hamilton Thorne Research, USA)、78—1 型磁力加热搅拌器[IKA(r) RET basis]、LDZ5—2 低速自动平衡离心机(北京医用离心机厂)、Fiske210 微型渗透压仪(USA)、pH 测试仪〔Delta 320, Mettler—Toledo instruments (Shanghai) Ltd〕、电脑温控西门子冰箱(安徽博西华家用电器有限公司)、程序降温

收稿日期: 2006—03—14
基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0235016—4); 广西教育厅科研项目(桂教科研〔2002〕136)
作者简介: 胡传活(1964—), 男, 广西平南人, 副教授, 博士, 主要从事动物繁殖技术的研究与推广。
通讯作者: 卢克焕(1945—), 男, 广西南宁人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事动物胚胎工程、动物性别控制方面的研究。

仪(FREEZE CONTROL CL－8000, Made in Australia by Cryologic)、电子恒温水浴锅及可调恒温试管架(广州市富家电器厂)。

1.2　主要试剂

丙酮酸钾及丙酮酸钙(台州市兴业化工有限公司)、丙酮酸钠〔中国医药(集团)上海化学试剂公司〕, 均为 AR 级试剂。

1.3　试验动物

为广西大学奶牛场 2 头健康正常采精的黑白花种公牛。1 头(A)约 3.5 岁, 另 1 头(B)约 2.5 岁, 饲养管理条件一致。

1.4　试验方法

1.4.1　采精　采用假阴道法(内胎温度 43～45 ℃)对奶公牛进行采精, 每周 2 次。采集精液后, 马上移到保温瓶(水温 22～28 ℃)中, 在 20 min 内送回实验室;20 倍或 100 倍稀释后, 用精子图像分析仪、血球记数仪分别检查活力(直线运动精子百分数, 下同)和密度(记数 2 次并求其平均值)。

1.4.2　稀释与平衡　在保证解冻后每个输精剂量的有效精子数不少于 1 000 万的前提下, 对精液进行两步稀释。在室温下每次各加入每组稀释液的一半, 15 min 后再加入另一半。然后用吸卵管分装于 0.25 ml 细管中, 置 5 ℃冰箱中平衡 4 h。

1.4.3　冷冻与解冻　将细管取出, 放入程序降温仪(开始温度为 5 ℃)的冷冻槽内; 运行程序降温仪, 当温度下降至终止温度－80 ℃时, 将细管投入液氮。至少 5 min 之后, 将细管放入 37 ℃电子恒温水浴锅内解冻 30～40 s, 用精子图像分析仪检查冻后活力。

1.4.4　精子的染色及畸形率、顶体完整率检查　参照江一平等[16]报道的方法, 用考马斯亮蓝 R250 染色液对精子进行染色, 然后在 1 000× 显微镜下检查精子畸形率和顶体完整率。每个处理抹片 2 张, 每片记数 200 个以上的精子。

1.5　试验设计及数据处理

试验共分 7 个组(表 1), 对照组的稀释液为常用的果糖－柠檬酸钠－卵黄－甘油液。试验组Ⅰ～Ⅵ的稀释液在对照组的基础上添加不同浓度的丙酮酸盐。对所得的各组数据采用SAS统计软件进行多重比较, 检验差异的显著性。

表 1　冻精稀释液配方

项目	对照组	试验组Ⅰ	试验组Ⅱ	试验组Ⅲ	试验组Ⅳ	试验组Ⅴ	试验组Ⅵ
果糖(w/v, %)	2.78	2.78	2.78	2.78	2.78	2.78	2.78
柠檬酸钠(w/v, %)	2.16	2.16	2.16	2.16	2.16	2.16	2.16
卵黄(v/v, %)	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
甘油(v/v, %)	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
青霉素钠(IU/ml)	1 000.00	1 000.00	1 000.00	1 000.00	1 000.00	1 000.00	1 000.00
硫酸链霉素(IU/ml)	1 000.00	1 000.00	1 000.00	1 000.00	1 000.00	1 000.00	1 000.00
丙酮酸钾(mmol/L)	—	1.25	2.00	—	—	—	—
丙酮酸钠(mmol/L)	—	—	—	1.25	2.00	—	—
丙酮酸钙(mmol/L)	—	—	—	—	—	1.25	2.00

注: 各组稀释液均为现用现配, 并经离心去除卵黄颗粒。所需器械均经鼓风干燥箱或蒸汽消毒柜严格消毒灭菌, 超纯水来自超纯水系统。经测定各组稀释液的渗透压在 1 500～1 800mOsm/kg, pH 值为 7.25～7.40

2　结果

2.1　丙酮酸盐对牛精液冻后主要质量指标的影响

从表 2 可以看出, 各试验组的冻后活力和复苏率都比对照组有所提高, 但各组间比较差异都不显著。而畸形率和顶体完整率和对照组相比有升有降, 但各组间相比差异也不显著。说明在本试验条件下, 添加 3 种丙酮酸盐对公牛精液冻后 4 个质量指标没有显著影响。

表 2　丙酮酸盐在牛精液冷冻中的应用效果

组别	冻后活力	精子复苏率(%)	精子畸形率(%)	顶体完整率(%)
对照组	0.46 ± 0.12^a	55.87 ± 15.33^a	14.99 ± 2.52^a	77.99 ± 7.46^a
试验组Ⅰ	0.51 ± 0.12^a	61.99 ± 14.45^a	13.87 ± 3.84^a	76.65 ± 10.64^a
试验组Ⅱ	0.49 ± 0.10^a	59.84 ± 12.28^a	15.54 ± 2.48^a	77.43 ± 10.10^a
试验组Ⅲ	0.51 ± 0.10^a	62.94 ± 12.53^a	14.01 ± 2.75^a	80.39 ± 9.27^a
试验组Ⅳ	0.48 ± 0.12^a	59.34 ± 15.46^a	15.23 ± 2.51^a	76.29 ± 11.92^a
试验组Ⅴ	0.49 ± 0.11^a	60.47 ± 13.65^a	15.32 ± 2.69^a	76.09 ± 9.56^a
试验组Ⅵ	0.50 ± 0.11^a	61.38 ± 13.72^a	14.76 ± 2.76^a	77.36 ± 9.22^a

注: 同一列肩标相同表示差异不显著($P>0.05$)

2.2　丙酮酸盐对不同公牛精液冻后质量指标的影响

丙酮酸盐对不同公牛精液冻后质量指标的影响见表3、表4、表5、表6。

从表3、表4、表5、表6可以看出，对于4个质量指标，无论同一公牛不同处理之间或者同一处理不同公牛之间，结果都没有显著性的差异。说明在本试验条件下，添加3种丙酮酸盐对不同公牛精液冻后4个质量指标既没有处理效应，也没有公牛效应。

表3　丙酮酸盐对不同公牛精子冻后活力的影响

牛别	对照组	试验组Ⅰ	试验组Ⅱ	试验组Ⅲ	试验组Ⅳ	试验组Ⅴ	试验组Ⅵ
A	0.43±0.13[a]	0.47±0.11[a]	0.44±0.09[a]	0.50±0.09[a]	0.49±0.15[a]	0.49±0.07[a]	0.50±0.04[a]
B	0.48±0.13[a]	0.51±0.12[a]	0.49±0.10[a]	0.51±0.10[a]	0.48±0.12[a]	0.49±0.11[a]	0.50±0.11[a]

注：同一行(列)肩标相同表示差异不显著($P>0.05$)，下同

表4　丙酮酸盐对不同公牛精子复苏率的影响　(%)

牛别	对照组	试验组Ⅰ	试验组Ⅱ	试验组Ⅲ	试验组Ⅳ	试验组Ⅴ	试验组Ⅵ
A	52.35±16.31[a]	58.03±15.31[a]	53.62±10.74[a]	61.51±11.23[a]	60.10±20.36[a]	60.54±9.37[a]	61.70±6.02[a]
B	59.39±15.22[a]	65.96±14.01[a]	66.06±11.28[a]	64.38±14.88[a]	58.57±11.05[a]	60.41±18.21[a]	61.05±19.68[a]

表5　丙酮酸盐对不同公牛精子畸形率的影响　(%)

牛别	对照组	试验组Ⅰ	试验组Ⅱ	试验组Ⅲ	试验组Ⅳ	试验组Ⅴ	试验组Ⅵ
A	13.60±2.64[a]	13.83±4.98[a]	15.32±2.97[a]	14.11±2.85[a]	14.80±3.05[a]	16.64±1.74[a]	14.61±2.81[a]
B	16.37±1.59[a]	13.91±2.90[a]	15.76±2.21[a]	13.90±2.98[a]	15.66±2.10[a]	14.00±2.98[a]	14.91±3.04[a]

表6　丙酮酸盐对不同公牛精子顶体完整率的影响　(%)

牛别	对照组	试验组Ⅰ	试验组Ⅱ	试验组Ⅲ	试验组Ⅳ	试验组Ⅴ	试验组Ⅵ
A	81.85±5.09[a]	80.39±10.10[a]	75.15±13.10[a]	80.73±7.49[a]	72.13±11.60[a]	77.74±7.61[a]	77.28±9.98[a]
B	74.14±7.90[a]	72.90±10.85[a]	79.70±6.73[a]	80.04±11.70[a]	80.45±11.93[a]	74.44±11.87[a]	77.44±9.57[a]

3　讨论

3.1　丙酮酸盐对公牛精液冻后活力及复苏率影响

丙酮酸盐是细胞的重要能源物质，具有消除或抑制自由基[6]、抗氧化、抗菌及抗病毒等功能，已经在组织培养方面被广泛应用并取得了良好效果。各试验组的冻后活力和复苏率比对照组有所提高，但差异不显著，这和Fabbrocini等人[14]在水牛所得到的结果略有不同。其在平衡(5h)结束前1h加入丙酮酸钠(最终浓度为1.25mmol/L)，直线运动精子百分数显著高于对照组；而其他平衡时间(1h、3h、5h)和添加程序(先添加后平衡或平衡结束前1h添加)的组合，均不能显著提高精子的直线运动百分数。因此，平衡时间丙酮酸盐添加程序的组合是影响精子冻后活力及复苏率的重要因素。

各试验组分别加入了一定浓度的K^+、Na^+、Ca^{2+}，可以使精子细胞外液3种离子的浓度处于较高水平，减少这些离子在平衡和冷冻过程中从精子内渗出。而有试验表明，K^+、Na^+、Ca^{2+}从细胞中渗出量越小，精子受到损伤的可能性越小；冻后活力和顶体完整率就可能越高[11,17~19]。另外，3种离子特别是Ca^{2+}可以促进精子的获能，从而进一步引起精子发生超激活运动，使精子活力提高[18]。但各试验组的冻后活力和复苏率和对照组相比差异不显著，其中另一个原因可能是所加入的丙酮酸盐没有达到最佳浓度。

3.2　丙酮酸盐对公牛精子冻后形态的影响

3种丙酮酸盐对不同公牛精子畸形率和顶体完整率既没有处理效应，也没有公牛效应，即丙酮酸盐对公牛精子冻后形态没有显著影响。说明所加入的阴离子(丙酮酸根)尽管对精子没有起到显著的保护作用，但也没有加重精子的代谢负担，增加细胞内外的CO_2产量和酸度而对精子产生任何不利影响。另一方面，还说明所加入的3种阳离子(K^+、Na^+、

Ca^{2+})也不会显著地改变精子的形态。如前所述, 3 种离子特别是 Ca^{2+} 可以促进精子的获能及顶体反应的发生,使精子的形态发生改变,具体表现是畸形率升高和顶体完整率降低[18]。而在本试验条件下, 6 个试验组的畸形率和顶体完整率与对照组相比没有显著不同,其中重要的影响因素可能同样是离子浓度和平衡时间—丙酮酸盐添加程序的组合。目前采用的各种离子浓度和唯一的平衡时间—添加程序的组合,可能都在精子可以承受的范围以内,从而没有引起大量精子发生形态改变。至于其他浓度或平衡时间—添加程序的组合是否会明显影响精子的形态,有待进一步研究证实。

4 结论

在常用的果糖—柠檬酸钠—卵黄—甘油液的基础上,分别添加 1.25 mmol/L 或 2.00 mmol/L 的丙酮酸钾、丙酮酸钠及丙酮酸钙(分 2 次添加, 2 次之间相隔 15min,平衡 4h),对精子的冻后活力、复苏率、畸形率和顶体完整率没有显著影响,但可以使前 2 个指标有提高的趋势。

参考文献:

[1] 吕咏梅. 丙酮酸钙及原料丙酮酸发展前景广阔[J]. 中国医药情报, 2002, 8(3): 52—53.

[2] 邵泽川, 贾伟, 田耕, 等. 丙酮酸钙的应用与生产[J]. 食品科学, 2000, 21(3): 9—10.

[3] 王淑婷, 王松华, 董翔, 等. 提高体外细胞培养的成功率[J]. 大连大学学报, 2000, 21(6): 93—94.

[4] M S GOKHALE, J R LIN, J D YAGER, *et al*. A Mixture of antioxidants and fatty acids improves the viability of cultured rat hepatocytes untreated or treated with Doxorubicin[J]. Toxicology in vitro, 1997(11): 753—759.

[5] Jayashree C Jagtap, Anmol Chandele, B A Chopde, *et al*. Sodium pyruvate protects against H_2O_2 mediated apoptosis in human neuroblastoma cell line—SK—N—MC[J]. Journal of Chemical Neuroanatomy, 2003, 26: 109—118.

[6] David Clough, Rolf Bunger. Protection by pyruvate against inhibition of Na^+, K^+—ATPase by a free radical generating system containing t—butylhdroperoxide[J]. Life Science, 1995, 57(10): 931—943.

[7] V. Douarda, D Hermierb, M Magistrinic, *et al*. Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa[J]. Theriogenology, 2004, 61: 1—13.

[8] G C Upreti, K Jensen, J E Oliver, *et al*. Motility of ram spermatozoa during storage in chemically—defined diluent containing antioxidants[J]. Animal Reproduction Science, 1997, 48: 269—278.

[9] Angela C Pommer, Jennifer J Linfor, Stuart A Meyers. Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender[J]. Theriogenology, 2002, 57: 1493—1501.

[10] J E Bruemmer, R C Coy, E L Squires, *et al*. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours[J]. Journal of Animal Science, 2002, 80(1): 12—18.

[11] G W Webb, M J Arns. Influence of Na^+/K^+ Ratios on Cold—stored Equine Spermatozoa[J]. Theriogenology, 1996, 45(1): 312.

[12] 柯文鸿, 姜宏, 倪丰, 等. 4 种精子冷冻液的比较[J]. 中国男科学杂志, 2003, 17(3): 182, 183, 187.

[13] Giovanni Sansone, Adele Fabbrocini, Stefania Ieropoli, *et al*. Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) spermatozoa after thawing[J]. Cryobiology, 2002, 44: 229—239.

[14] A Fabbrocini, C Del Sorbo, G Fasano, *et al*. Effect of differential addition of glycerol and pyruvate to extender on cryopreservation of Mediterranean Buffalo (*B. bubalis*) spermatozoa[J]. Theriogenology, 2000, 54: 193—207.

[15] Jean—Francois Bilodeau, Sophie Blanchette, Nathaly Cormier, *et al*. Reactive oxygen species—mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase[J]. Theriogenology, 2002, 57: 1105—1122.

[16] 江一平, 卓丹心, 陈勇, 等. 考马斯亮蓝染色法检测人精子顶体反应的评价[J]. 解剖学报, 1998, 29(3): 332—336.

[17] 金穗华, 刘桂霞. 稀释液中不同甘油浓度对精子钾钠离子平衡的影响[J]. 上海畜牧兽医通讯, 1991(2): 15—16.

[18] P E Visconti, V A Westbrook, O Chertihin, *et al*. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity[J]. Journal of Reproductive Immunology, 2002, 53: 133—150.

[19] Laura Linares—Hernandez, Alberto Mart in Guzman—Grenfell, Juan Jose Hicks—Gomez, *et al*. Voltage—dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrane potential[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1372: 1—12.