中国农业大学学报 2026,31(11):257-266
Journal of China Agricultural University http://zgnydxxb.ijournals.cn

朱玉博,王临兵,刘佳晖,刘波含,宋章宁,姜午旗,邓亮. 稀释液中添加绿原酸对驴精液冷冻保存效果的影响[J]. 中国农业大学学报,2026,31(11):257-266.
ZHU Yubo, WANG Linbing, LIU Jiahui, LIU Bohan, SONG Zhangning, JIANG Wuqi, DENG Liang. Effects of chlorogenic acid addition to extender on the cryopreservation efficiency of donkey semen[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2026, 31(11): 257-266.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2026.11.19

# 稀释液中添加绿原酸对驴精液冷冻保存效果的影响

朱玉博 王临兵 刘佳晖 刘波含 宋章宁 姜午旗 邓 亮*
(沈阳农业大学 动物科学与医学学院,沈阳 110866)

**摘 要** 为优化驴精液冷冻保存技术体系、阐明绿原酸(Chlorogenic acid,CGA)对驴精子的冷冻保护作用以及对受精蛋白IZUMO1分布和表达的影响,本研究在驴精液冷冻稀释液中分别添加0(对照组)、0.1、0.5、1、2和3 mmol/L的CGA,检测冻融后精子运动参数、精子形态及抗氧化指标,以筛选CGA的最适浓度,线粒体膜电位(Mitochondrial membrane potential,MMP)、精子DNA碎片化比率等指标,对受精蛋白IZUMO1的表达量与定位进行分析。结果表明:1)1 mmol/L CGA处理组的前向运动精子率、活精子百分率、顶体完整率及精子弯尾率均显著高于其他各组($P<0.05$),畸形率显著低于其他各组($P<0.05$)。2)1 mmol/L CGA处理组的丙二醛(Malondialdehyde,MDA)水平最低($P<0.05$),同时超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase,GPx)活性最高($P<0.05$),并提升总抗氧化能力(Total antioxidant capacity,TAC)($P<0.05$)。3)1 mmol/L CGA极显著提高了精子MMP水平($P<0.01$),极显著降低了DNA碎片化比率($P<0.01$)。4)1 mmol/L CGA虽未显著改变IZUMO1蛋白的表达量($P>0.05$),但显著降低了IZUMO1蛋白的异常定位率($P<0.05$)。综上,在精液冷冻稀释液中添加1 mmol/L CGA可有效提升驴冻融后精液品质和抗氧化能力,增强线粒体功能,保护DNA完整性,并对IZUMO1蛋白的正常定位发挥积极作用。

**关键词** 绿原酸;驴;精液;冷冻
**中图分类号** S286.8 **文章编号** 1007-4333(2026)11-0257-10 **文献标志码** A

# Effects of chlorogenic acid addition to extender on the cryopreservation efficiency of donkey semen

ZHU Yubo, WANG Linbing, LIU Jiahui, LIU Bohan, SONG Zhangning, JIANG Wuqi, DENG Liang*
(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

**Abstract** To optimize the cryopreservation system for donkey semen and elucidate the protective effects of chlorogenic acid (CGA) on spermatozoa during cryopreservation, particularly regarding the distribution and expression of the fertilization protein IZUMO1, this study supplemented donkey semen freezing extenders with varying concentrations of CGA: 0 (control), 0.1, 0.5, 1, 2, and 3 mmol/L. Post-thaw sperm motility parameters, morphological characteristics, and antioxidative indices were assessed to determine the optimal CGA concentration. Additionally, mitochondrial membrane potential (MMP), DNA integrity, and the expression level and localization of IZUMO1 were examined. The results indicated that: 1) The group supplemented with 1 mmol/L CGA exhibited significantly higher progressive motility, sperm viability, acrosome integrity, and bent-tail rate compared to other groups ($P<0.05$), alongside a significantly lower malformation rate ($P<0.05$). 2) The

收稿日期:2026-06-19;接受日期:2026-07-31
基金项目:国家重点研发计划项目(2024YFD1300500)
第一作者:朱玉博(ORCID:0000-0002-5435-4790),讲师,主要从事动物繁殖与生物技术研究,E-mail:2012500032zyb@syau.edu.cn
通讯作者:邓亮(ORCID:0000-0003-1612-6911),副教授,主要从事马属动物遗传育种和繁殖学研究,E-mail:ldeng@syau.edu.cn

1 mmol/L CGA group showed the lowest malondialdehyde (MDA) level ($P<0.05$), while superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities were markedly elevated ($P<0.05$). 3) Supplementation with 1 mmol/L CGA significantly enhanced MMP ($P<0.01$) and markedly reduced the DNA fragmentation index ($P<0.01$). 4) Although 1 mmol/L CGA did not significantly alter the overall expression of IZUMO1 protein ($P>0.05$), it notably decreased the rate of abnormal IZUMO1 localization ($P<0.05$). Collectively, these findings demonstrate that the inclusion of 1 mmol/L CGA in the semen freezing extender effectively improves post-thaw semen quality and antioxidant capacity in donkeys, enhances mitochondrial function, preserves DNA integrity, and contributes positively to the proper localization of IZUMO1 protein.

**Keywords** chlorogenic acid; donkey; semen; cryopreservation

近年来,驴的种群规模显著下降[1],直接影响了现有品种的遗传多样性[2]。然而,冻精受孕率低是限制驴人工授精应用的主要因素[3]。因此,改进驴精液冷冻保存方法,不仅有利于建立濒危驴品种的精子库,也能够更有效地利用冷冻精液进行人工授精,从而扩大种群规模。

目前,利用驴冻精开展人工授精受孕率仅为11%~13%[3]。尽管其原因尚不完全明确,但冷冻-解冻过程对精子造成的损伤被认为是重要影响因素之一[4]。其主要原因一方面冻融过程冰晶对精子质膜完整性造成不可逆的物理损伤,损害精子运动功能,并诱发形态异常[4]。另一方面在冷冻保存过程中,精子暴露于应激环境可导致活性氧的过度生成,打破机体抗氧化防御平衡并引发氧化应激,诱发质膜脂质过氧化损伤,造成细胞膜结构进一步破坏[5]。驴精子质膜富含多不饱和脂肪酸,并且精子能量代谢高度依赖于氧化磷酸化,因而对氧化应激更为敏感[6]。此外,精子细胞内抗氧化酶含量较低,且线粒体数量丰富,因此精清中所含的酶类与非酶类抗氧化剂构成了抵御氧化应激损伤的主要防线[7]。然而,目前驴精液冷冻保存方案普遍采用离心法将精清去除[8],缺乏精清保护使驴精子更易在冷冻中遭受氧化损伤。为补偿精清去除所造成的保护功能缺失,在冷冻稀释液中添加外源性抗氧化剂成为当前研究的方向之一。维生素C[9]和谷胱甘肽[10]在驴精液冷冻中均被报道具有较好的抗氧化作用。然而有研究表明,天然酚类化合物的抗氧化活性强于维生素C[11-12],且毒性更低[13-14],与传统抗氧化剂不同,酚类化合物既能充当自由基清除剂,也能作为金属螯合剂,在氧化反应的起始和扩增阶段均能发挥作用[12,15]。

CGA是一种主要的多酚类化合物,天然存在于咖啡、豆子、马铃薯和苹果等多种农产品中[16-17]。CGA是由咖啡酸与奎尼酸缩合而成的酚酸酯,含有多个羟基(包含邻二酚羟基),其酚羟基可与自由基反应,从而发挥强效抗氧化活性[18]。在公猪精液冷冻过程中添加100 μmol/L CGA可显著改善精子活率、提高质膜完整性[19]。在水牛的研究中显示,150 μmol/L CGA可通过降低氧化应激、提升抗氧化能力,改善解冻后精子活率和DNA完整性,人工授精后提高受胎率[20]。在人精液冷冻稀释液中添加100 μmol/L CGA,可以降低活性氧(Reactive oxygen species,ROS),并改善解冻后精子线粒体膜电位水平[21]。

IZUMO1蛋白是定位于哺乳动物精子质膜下的一种I型跨膜蛋白,是启动精卵融合的关键分子[22]。在大多数来源于附睾及新鲜射出的具有正常顶体结构的精子中,IZUMO1定位于顶体区的主段与赤道段交界处[23]。在小鼠精子中,IZUMO1在顶体反应期间从主段易位至赤道段;该精子蛋白可参与精子与卵母细胞之间的相互作用及融合[24]。顶体受损的公牛冷冻保存精子的受精能力下降部分归因于IZUMO1的异常易位[23]。尽管IZUMO1在哺乳动物受精中的重要作用已被广泛认可,但其在精子冷冻损伤背景下的研究仍非常有限,尤其在驴上,冷冻后IZUMO1是否发生异常定位尚不明确。

已有研究证实,CGA可改善猪[19]、水牛[20]、人[21]解冻后精液品质,但该抗氧化剂在驴精液冷冻方面的相关研究较为匮乏。本研究拟在驴精液冷冻稀释液中添加不同浓度CGA,探究其对驴冻融精子运动能力、质膜和顶体完整率、精子畸形率、抗氧化能力、线粒体膜电位(Mitochondrial membranepotential,MMP)、精子DNA完整性及精子受精蛋白IZUMO1表达及分布的影响,筛选出CGA在驴精液冷冻保存中的最适添加浓度,旨在

为CGA在驴精液冷冻保存及人工授精生产中的推广应用提供理论依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　试验动物及精液采集

试验选用辽宁省某种驴场饲养的6头成年辽西驴种公驴（5.4±1.2）岁，所选公驴体格健壮、繁殖性能良好，采精时间为繁殖旺季（4—6月）。通过假阴道法对公驴进行精液采集。种公驴每间隔48 h采集一次精液，期间实施标准化饲养管理以保障精液质量，每头公驴各采集精液3～4次。每份精液平均分成6份分别设置6个浓度梯度，分别使用含不同浓度CGA（0、0.1、0.5、1、2和3 mmol/L）的稀释液进行稀释（每组$n$=6，来源于不同个体）。采集到精液用滤纸过滤，精液无异物及异常气味，颜色乳白，精子形态正常，精液体积≥50 mL，精子密度≥$1\times10^8$个/mL，同时精子活率应保持在70%以上备用。

### 1.2　主要试剂

葡萄糖、乳糖、柠檬酸钠、柠檬酸钾、棉子糖、HEPES、甘油、蛋白质免疫印迹IZUMO1抗体（HPA038104）、α-TUBULIN（T6199）抗体均购自Sigma公司。HRP标记的驴抗兔IgG二抗（D110056）购自上海生工生物工程股份有限公司。HRP标记的兔抗小鼠IgG二抗（RS030213）购自Immunoway公司。CGA（C8960）、精子裂解液、精子活体染色试剂盒均来自北京索来宝科技有限公司。MMP、SOD（Superoxide dismutase，SOD）、TAC（Total antioxidant capacity，TAC）检测试剂盒均购自南京建成科技有限公司。MDA、GPx、过氧化氢酶（Catalase，CAT）检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术股份有限公司。TUNEL检测试剂盒购自Elabscience公司。免疫荧光IZUMO1抗体（ab211623）购自Abcam公司。Alexa Fluor 594标记的山羊抗兔IgG二抗（A-21207）购自Thermo Fisher Scientific公司。

### 1.3　驴冷冻精液的制作

#### 1.3.1　稀释液配制

称取葡萄糖12.5 g、乳糖0.75 g、棉子糖0.75 g、柠檬酸钾0.15 g、柠檬酸钠0.205 g、HEPES 2.38 g、青-链霉素250 μL，加超纯水至250 mL，调pH 6.2～6.4，过滤后加等体积脱脂奶粉混匀，为基础稀释液。在基础稀释液中按体积比分别加入5%卵黄和5%甘油。磁力搅拌20 min后，4 ℃，12 000 g离心30 min取上清，为冷冻稀释液。在基础稀释液和冷冻稀释液中分别加入不同浓度CGA（0、0.1、0.5、1、2和3 mmol/L），4 ℃备用。

#### 1.3.2　精液冷冻及解冻

基础稀释液与精液比例1∶1稀释，在22 ℃下，600 $g$离心10 min，弃上清，加入冷冻稀释液混匀。将其置于22 ℃水浴，再放入4 ℃冰箱缓慢降温，期间30 min混匀一次。精液降温到4 ℃后，分装至0.25 mL冻精细管。细管距液氮面3～5 cm，－120 ℃熏蒸15 min后投入液氮保存。冷冻10 min后取出，37 ℃水浴解冻15 s，用于后续检测。

### 1.4　精液质量检测

#### 1.4.1　精子运动参数及形态学指标检测

1）精子运动参数采用计算机辅助精液分析仪（SCA® CASA System，西班牙MICROPTIC）检测精子运动参数，检测指标有：

直线前进运动精子比例（Progressive motility，PM）、运动精子比例（Total motility，TM）。检测前确保每个视野里精子数不低于200个，每次测定随机选取5个视野，结果取平均值。

2）活精子百分率采用伊红-苯胺黑染色法，具体步骤参考精子活体染色试剂盒。

3）精子畸形率与顶体完整率采用苯胺蓝-龙胆紫染色，制作精液抹片，自然风干后，浸泡在10%福尔马林溶液中固定15 s，经清水冲洗后自然风干，依次用5%苯胺蓝浸泡30 s、0.5%龙胆紫浸泡5 s，400倍镜下统计畸形数量，并计算畸形精子占总精子数百分比。1 000倍油镜观察顶体，并计算顶体完整精子数占总精子数百分比。

4）弯尾精子百分率采用低渗肿胀法，将精子与低渗液（低渗液配方为果糖1.0 g/L＋柠檬酸钠1.5 g/L），精子悬液与低渗液按1∶10体积比混合，在37 ℃孵育30 min后制成抹片，400倍镜下计数，并计算尾部卷曲精子占总精子数百分比。

#### 1.4.2　精子抗氧化能力、MMP及DNA完整性检测

将冷冻解冻后精子裂解后以BCA法测定总蛋白浓度，并分别根据相应试剂盒说明书及全波长酶标仪（Infinite 200Pro，TECAN）进行检测，以每毫克蛋白所含检测TAC和MDA含量以及SOD、CAT、GPx活性为最终结果。通过JC-1荧光探针

检测精子线粒体MMP水平。MMP较高时，JC-1聚集在线粒体内形成聚集体，发红色荧光；MMP低时，JC-1分散为单体，发绿色荧光。通过红/绿荧光比值，判断线粒体去极化的程度。DNA完整性检测根据试剂盒说明采用TUNEL一步法，通过TUNEL阳性精子数占精子总数的百分比评定。

#### 1.4.3 免疫荧光

将解冻后的精液制成抹片，在室温下，分别经过4% 多聚甲醛固定15 min，0.2% TritonX-100通透10 min，5% BSA封闭90 min。使用IZUMO1兔源抗体（1∶250）4 ℃孵育过夜，加入Alexa Fluor 594标记的山羊抗兔IgG二抗（1∶1 000）室温孵育45 min，PBST洗涤3次，每次5 min，DAPI孵育5 min，使用倒置荧光显微镜（Leica，DMi8）观察结果。

#### 1.4.4 蛋白质免疫印迹

将样品加入上样缓冲液煮沸变性5 min，每孔上样30 μg蛋白，采用8%～16%的梯度预制胶，用电泳仪（Bio-Rad Laboratories，165-8004）130 V恒压电泳50 min，然后用快速多通道半干转印仪（ACE，FW606）以20 V限流1.0 A半干转转膜15～18 min，5% 脱脂奶粉-TBST封闭12 min。根据Maker条带将膜剪为IZUMO1（约39 ku）和α-TUBULIN（约52 ku）两部分。分别加入相应一抗（IZUMO1兔源，1∶2 000；α-TUBULIN小鼠源，1∶2 000）4 ℃过夜孵育，TBST洗涤3次，每次10 min。分别加入对应二抗（HRP标记驴抗兔IgG，1∶2 000；HRP标记驴抗鼠IgG，1∶10 000）室温孵育2 h，TBST再次洗涤3次，每次10 min，再用荧光化学发光凝胶成像仪（嘉鹏，JP-K600）化学发光显影，Image J分析灰度值。

### 1.5 统计分析

采用Microsoft Excel 2021软件对试验数据进行初步整理和统计。百分率数据中，若观测值大于70% 或小于30%，则先进行平方根反正弦转换，以满足方差齐性要求。采用SPSS 27.0.1软件进行统计分析。

不同浓度CGA对精液品质和抗氧化能力的影响结果采用单因素方差分析，邓肯法进行事后多重比较；CGA对MMP、DNA完整性以及IZUMO1蛋白的影响则采用独立样本$t$检验进行比较。结果以平均值±标准误（Mean ± SEM）表示，以$0.01<P<0.05$为差异显著，$P<0.01$为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度CGA对驴冷冻精液品质的影响

由表1可知，在稀释液中添加1、2和3 mmol/L CGA，TM均显著高于对照组（$P<0.05$），三者差异不显著（$P>0.05$）。1 mmol/L CGA处理组的PM、活精子百分率、顶体完整率和弯尾精子率均显著高于其他各处理组（$P<0.05$），而畸形率显著低于其他各组（$P<0.05$）。结果表明，1 mmol/L CGA对精子TM、PM、质膜完整性和顶体完整率均有显著

**表1 不同浓度CGA对驴冷冻精液品质的影响**

Table 1 Effects of different concentrations of CGA on the quality of frozen semen in donkeys

| 检测指标 Indicators | 绿原酸浓度/（mmol/L）Chlorogenic acid concentration | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 0.1 | 0.5 | 1 | 2 | 3 |
| TM/% | 80.87±1.97$^{c}$ | 81.35±0.34$^{c}$ | 84.10±1.12$^{bc}$ | 88.38±0.58$^{a}$ | 86.23±1.69$^{ab}$ | 85.99±0.14$^{ab}$ |
| PM/% | 32.36±0.25$^{c}$ | 34.25±0.61$^{bc}$ | 37.03±1.31$^{b}$ | 41.15±0.83$^{a}$ | 37.27±0.84$^{b}$ | 36.07±1.83$^{b}$ |
| 活精子百分率/% Sperm viability | 64.49±0.76$^{c}$ | 67.37±0.84$^{b}$ | 67.74±0.77$^{b}$ | 73.87±1.72$^{a}$ | 65.64±1.15$^{b}$ | 65.57±0.63$^{b}$ |
| 顶体完整率% Acrosome integrity | 66.23±1.84$^{c}$ | 71.08±0.64$^{b}$ | 73.97±1.04$^{b}$ | 80.62±0.24$^{a}$ | 73.71±1.63$^{b}$ | 71.60±1.23$^{b}$ |
| 精子畸形率% Abnormal morphology | 20.65±0.95$^{a}$ | 17.26±0.74$^{b}$ | 14.95±1.00$^{b}$ | 11.69±0.33$^{c}$ | 15.10±0.83$^{b}$ | 16.71±0.98$^{b}$ |
| 弯尾精子率% Curved tail sperm percentage | 34.11±0.79$^{c}$ | 37.32±0.78$^{b}$ | 38.39±0.21$^{b}$ | 43.33±0.53$^{a}$ | 37.14±0.81$^{b}$ | 37.56±0.39$^{b}$ |

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

Note: Values within the same row with different superscript letters differ significantly ($P<0.05$), while those sharing identical superscript letters show no significant difference ($P>0.05$). The same below.

提升作用，可显著降低畸形率。

### 2.2　不同浓度CGA对驴冷冻精液抗氧化能力的影响

由表2可以看出，与对照组相比，添加0.5、1和2 mmol/L的CGA均显著提高了TAC、SOD和GPx水平（$P<0.05$），显著降低了精子的MDA水平（$P<0.05$）。其中，与各处理组相比，1 mmol/L处理组呈现最高的SOD（$P<0.05$）和GPx活性水平（$P<0.05$），及最低的MDA水平（$P<0.05$）。与对照组相比，添加1 mmol/L CGA还可显著提高精子的CAT水平（$P<0.05$）。结果表明，1 mmol/L CGA对精子的总抗氧化能力和抗氧化酶活性均有提升作用，对精子MDA有显著降低作用。

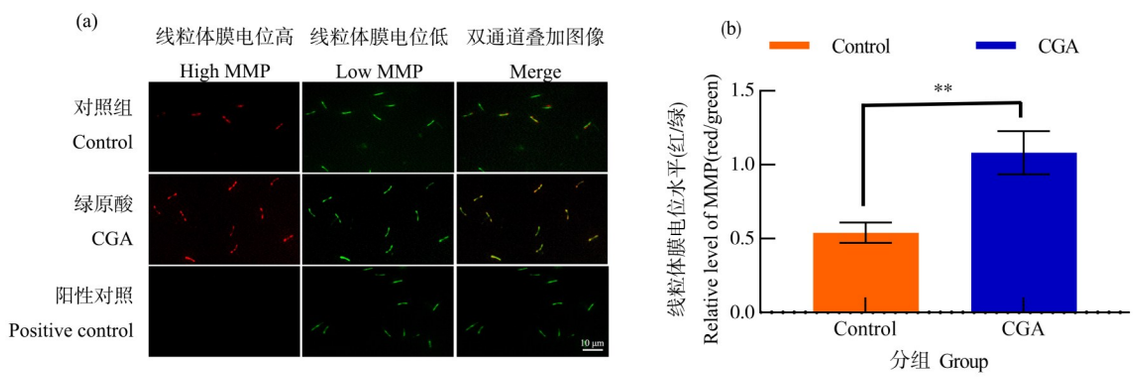
**表2　不同浓度CGA对驴冷冻精液抗氧化指标的影响**

Table 2　Effects of different concentrations of CGA on antioxidant indicators of frozen semen in donkeys

| 检测指标 Indicator | 绿原酸浓度/（mmol/L）　Chlorogenic acid concentration | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 0.1 | 0.5 | 1 | 2 | 3 |
| TAC（μmol/mg） | 0.69±0.01$^{c}$ | 0.74±0.01$^{bc}$ | 0.80±0.03$^{ab}$ | 0.83±0.03$^{a}$ | 0.76±0.01$^{b}$ | 0.76±0.02$^{b}$ |
| MDA（μmol/mg） | 11.52±0.42$^{a}$ | 9.78±0.44$^{b}$ | 9.28±0.24$^{b}$ | 7.55±0.08$^{c}$ | 9.36±0.31$^{b}$ | 10.47±0.60$^{ab}$ |
| SOD（U/mg） | 17.63±0.78$^{c}$ | 18.71±0.77$^{b}$ | 19.07±0.74$^{b}$ | 21.42±0.57$^{a}$ | 18.89±0.80$^{b}$ | 18.63±0.80$^{b}$ |
| CAT（U/mg） | 2.45±0.19$^{b}$ | 3.45±0.23$^{ab}$ | 3.21±0.47$^{ab}$ | 3.73±0.29$^{a}$ | 3.26±0.44$^{ab}$ | 3.13±0.45$^{ab}$ |
| GPx（mU/mg） | 255.09±15.43$^{c}$ | 295.10±17.51$^{bc}$ | 317.16±17.89$^{b}$ | 404.45±8.58$^{a}$ | 296.58±9.17$^{b}$ | 293.18±8.69$^{bc}$ |

### 2.3　CGA对驴冷冻精子MMP的影响

通过前期结果显示稀释液中添加1 mmol/L的CGA，驴精液解冻后呈现较好的精液品质和较高的抗氧化能力，因此选择该浓度做深入研究。MMP是衡量线粒体正常功能的重要指标之一，红色荧光代表MMP较高，绿色荧光代表MMP较低。由图1（a）可以看出，添加1 mmol/L CGA组中MMP的高电位水平高于对照组，如图1（b）显示，与对照组相比，添加1 mmol/L CGA极显著提高了精子的MMP水平（$P<0.01$）。结果表明，1 mmol/L CGA可显著提升冻融精子的线粒体膜电位水平，保护线粒体功能。




（a）MMP荧光检测；（b）MMP相对荧光强度。High MMP：线粒体膜电位高；Low MMP：线粒体膜电位低。阳性对照：CCCP处理诱导线粒体完全去极化，作为低膜电位荧光参照。* 表示与对照组相比差异显著（$0.01<P<0.05$），** 表示差异极显著（$P<0.01$）。放大倍数400×。下同。

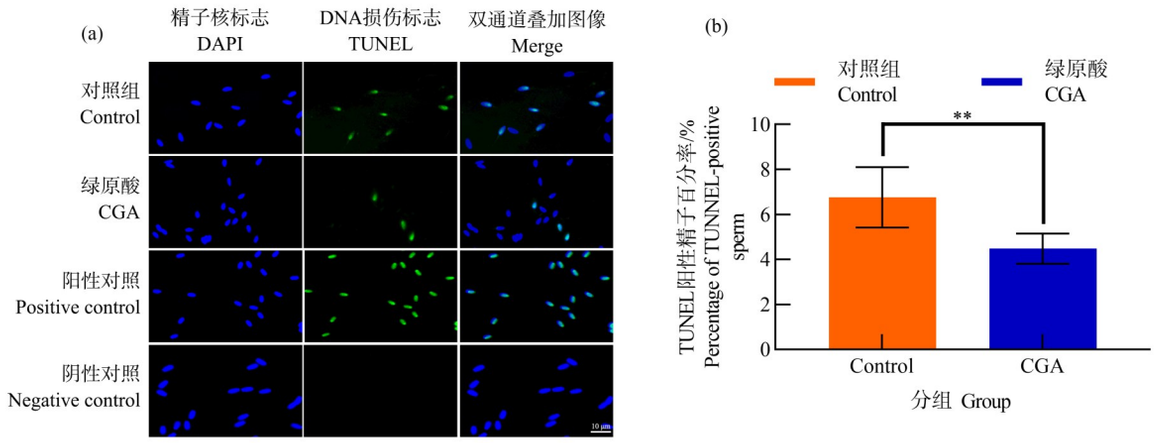
（a）MMP fluorescence；（b）MMP relative fluorescence intensityHigh MMP：High mitochondrial membrane potential；Low MMP：low mitochondrial membrane potential. Positive control：Sperm were treated with CCCP to induce complete mitochondrial depolarization，serving as a fluorescence reference for low membrane potential. * Indicates a significant difference compared with the control group（$0.01<P<0.05$），and ** indicates an extremely significant difference（$P<0.01$）. Magnification：400×. The same below.

**图1　CGA对驴冷冻精子MMP的影响**

Fig. 1　Effects of CGA on mitochondrial membrane potential of frozen donkey sperm

### 2.4　CGA对驴冷冻精子DNA损伤的影响

精子DNA损伤检测基于标记游离3′-OH末端酶促反应的TUNEL试剂盒来评定。其中DNA受损的精子呈TUNEL阳性即绿色荧光图2（a）。由图2（a）所示，阳性、阴性对照验证了染色方法的有效性。由图2（b）结果显示，在稀释液中添加




TUNEL:DNA 损伤标志;DAPI:精子核标志。放大倍数 400×。(a) TUNEL 染色 ;(b) TUNEL 阳性精子率。
TUNEL: marker for DNA damage; DAPI:marker for sperm nucleus. Magnification: 400×. (a) TUNEL staining;(b) TUNEL-positive sperm rate

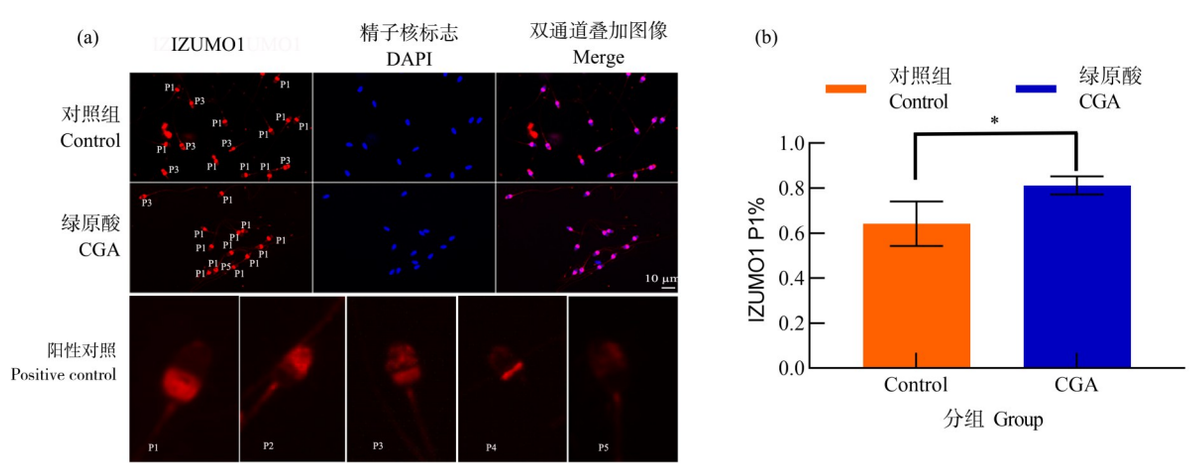
**图 2 CGA 对驴冷冻精子 DNA 损伤的影响**

Fig. 2 Effects of CGA on DNA damage in frozen donkey sperm

1 mmol/L CGA,TUNEL 阳性精子百分率极显著低于对照组($P<0.01$)。结果表明,1 mmol/L CGA 能极显著降低精子的 DNA 损伤。

### 2.5 CGA 对驴冷冻精子 IZUMO1 蛋白分布的影响

IZUMO1 是哺乳动物精子表面的一种关键跨膜蛋白,其与卵子膜上的受体 JUNO 的相互作用是精卵识别与融合的必需条件[22]。如图 3(a)所示,驴精子 IZUMO1 蛋白分布分为 5 种荧光形式,分别为顶体边缘和赤道段后区强荧光($P_1$)、顶体主区强荧光($P_2$)、顶体主区和赤道段强荧光($P_3$)、赤道段强荧光($P_4$)和无强荧光($P_5$)。其中驴 IZUMO1 的 $P_1$ 分布为其正常定位组,其余分布方式($P_2$~$P_5$)为其异常定位组。从图 3(b)可见,1 mmol/L CGA 处理组中,IZUMO1 的 $P_1$ 定位比例显著高于对照组($0.01<P<0.05$)。结果表明,1 mmol/L CGA 能显著提升驴冻融精子 IZUMO1 的正确定位比例。




(a) IZUMO1 免疫荧光染色;(b) IZUMO1 蛋白 P1 定位比率。IZUMO1 的免疫染色分为五种模式:$P_1$(顶体边缘和赤道段后区强荧光)、$P_2$(顶体主区强荧光)、$P_3$(顶体主区和赤道段边缘强荧光)、$P_4$(赤道段强荧光)和 $P_5$(无强荧光)。放大倍数 400×。

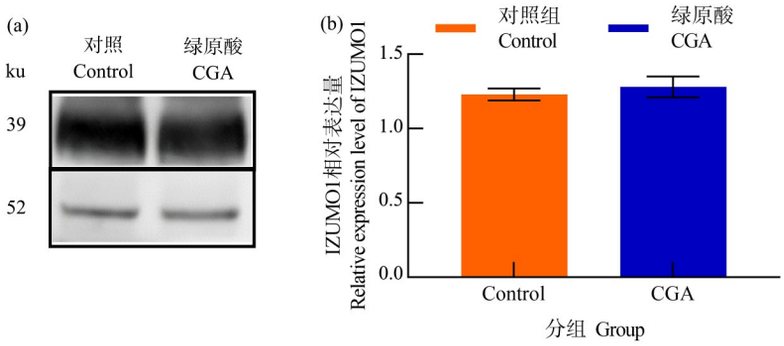
(a) Immunofluorescence staining of IZUMO1;(b)Ratio of IZUMO1 localization in the $P_1$ region Immunofluorescent staining of IZUMO1 was categorized into five patterns: $P_1$ (intense fluorescence at the acrosomal margin andpost-equatorial region), $P_2$ (intense fluorescence in the main acrosomal region), $P_3$ (intense fluorescence at both the main acrosomal region and equatorial margin), $P_4$ (intense fluorescence at the equatorial segment), and $P_5$ (no intense fluorescence). Magnification: 400×.

**图 3 CGA 对驴冷冻精子 IZUMO1 蛋白定位的影响**

Fig. 3 Effects of CGA on the localization of IZUMO1 protein in frozen donkey sperm

### 2.6　添加 1 mmol/LCGA 对驴冷冻精子 IZUMO1 蛋白含量的影响

如图 4(a)所示，驴精子 IZUMO1 蛋白条带在 39 ku。如图 4(b)所示，在稀释液中添加 1 mmol/L CGA 精子解冻后 IZUMO1 蛋白的相对表达水平与对照组无显著差异($P>0.05$)，表明 CGA 处理未影响精子受精蛋白 IZUMO1 的相对表达量。结果表明，1 mmol/L CGA 不会改变冻融驴精子 IZUMO1 蛋白的总表达水平，该蛋白定位的改善并非源于蛋白总表达量的上调。




(a) IZUMO1 蛋白 Western blot 电泳条带；(b) IZUMO1 蛋白相对表达定量。
(a) Western blot bands of IZUMO1 protein; (b) Relative expression level of IZUMO1.

**图 4　CGA 对驴冷冻精子 IZUMO1 蛋白表达水平**

Fig. 4　Effects of CGA on the expression level of IZUMO1 protein in frozen donkey sperm

## 3　讨　论

马属动物精子能量代谢主要依赖氧化磷酸化，而非糖酵解[25]。其精子线粒体生理活性更强，代谢过程更易大量生成 ROS，进而更易诱发精子氧化应激损伤。已有研究表明，稀释液中添加 CGA 可改善多种哺乳动物冻融后精液品质，缓解冷冻氧化应激造成的不可逆结构与功能损伤[19-21, 26-27]。而在驴精子冷冻中相关研究仍较匮乏。本研究首先通过在冷冻稀释液中添加不同浓度 CGA，筛选出 1 mmol/L CGA 对驴冻融精子运动能力、质膜完整性及抗氧化能力都有显著的提升作用；并通过进一步研究在该浓度下 CGA 对线粒体膜电位、精子凋亡及精子受精蛋白 IZUMO1 定位的影响，发现 1 mmol/L CGA 的添加能提高线粒体膜电位水平，降低 DNA 损伤比率，同时对解冻后精子 IZUMO1 蛋白的正确定位均具有积极作用。

本研究发现在驴冷冻稀释液中添加 1 mmol/L CGA 可显著提升冻融后精子的运动能力和形态完整性。其中，0.1 和 0.5 mmol/L CGA 对解冻后精液品质改善作用微弱，精子活率及质膜完整性等指标均低于 1、2 和 3 mmol/L CGA 组。相较于对照组，1、2 和 3 mmol/L 浓度 CGA 均可有效提高精子活率、活精子百分率、弯尾精子率及顶体完整率，降低精子畸形率，其中以 1 mmol/L CGA 的保护效果最佳。CGA 的冷冻保护效应存在严格最适浓度区间；浓度过高(≥2 mmol/L)时反而表现出抑制作用，在水牛、猪精液相关研究中有类似报道[19-20]。在人、猪和水牛的研究中都曾发现稀释液中添加 CGA 能改善精子运动能力、质膜及顶体完整率，但主要区别在于 CGA 在冷冻稀释液中添加的最适浓度各不相同[19-21, 26-27]，这可能取决于多种因素，例如物种、稀释液成分差异等。

在冷冻保存过程中，通过氧的单电子还原形成的 ROS 会攻击精子膜，发生质膜脂质过氧化，从而破坏脂质基质的结构。这种损伤最终通过氧化应激和细胞毒性醛类物质 MDA 等的产生，导致膜完整性丧失、精子活率下降，细胞内酶泄漏以及精子 DNA 损伤[28-29]。本研究中与对照组相比，0.1、0.5、1 和 2 mmol/L CGA 均可显著降低精子 MDA 的含量，并且 1 mmol/L CGA 组精子呈现最低的 MDA，最高的 TAC、SOD 和 GPx 活性。研究表明，经过上游法筛选的人精子在经过氧化应激诱导后($H_2O_2$处理)，检测到稀释液内释放出大量 MDA 而添加 CGA 后几乎完全逆转这种 $H_2O_2$ 造成的氧化反应(消除超过 86% 的 MDA)[26]。在水牛精液中添加 CGA，冷冻保存后也同样得到了降低 MDA、提升 TAC 及抗氧化酶活性的相似结果[20]。因此，驴精液

冷冻过程中,CGA很可能通过分子中含有的邻二酚羟基,直接清除冷冻应激产生的过量ROS,减少自由基对驴精子质膜不饱和脂肪酸的攻击,从而抑制脂质过氧化进程。

通过精子运动、形态和抗氧化能力的筛选,初步确定1 mmol/L是CGA的最优添加浓度,因此进一步研究在该浓度下对线粒体膜电位及DNA完整性的影响。不同于其他物种,马属动物精子运动需要的能量几乎全部依赖于线粒体的氧化磷酸化产生[25],因此线粒体功能对其尤为重要。本研究发现CGA可有效保护驴解冻后精子的MMP,提高双链DNA完整性。这与CGA在人冻精研究中的结果一致,即添加CGA同样可有效提高人精子维持高MMP水平的比例,降低了DNA断裂精子比例[21, 26]。精子MMP水平下降,会启动凋亡信号级联反应[25]。CGA一方面通过保护驴精子维持高MMP水平,阻断线粒体凋亡通路激活,减少冻融应激引发的精子凋亡。另一方面,由于超氧阴离子自由基($O_2^-$)和过氧化氢($H_2O_2$)这类ROS不与DNA碱基发生反应,而羟基自由基(·OH)是造成DNA损伤的主要ROS[30]。而CGA是一类可以直接清除羟基自由基的抗氧化剂[31],这很可能也是其保护驴解冻后精子DNA完整性的重要原因之一。有研究表明,猪精液冷冻体系中添加白藜芦醇会上调Bcl-2,下调Bax、Caspase-3、Caspase-9[32]。而CGA是否通过调控上述关键凋亡相关基因,进而调节线粒体介导的内源性凋亡通路,还有待后续深入研究。

精子的IZUMO1蛋白是精卵融合的关键受精蛋白[22]。伴随着获能和顶体反应,IZUMO1会发生重新定位,这是精卵融合的前提条件[33]。研究表明冷冻造成的损伤会导致IZUMO1的异常定位,并推测这很可能是造成冻精受精率低的原因之一[23]。本研究首次确定了IZUMO1蛋白在驴精子上的定位,位于顶体边缘和赤道后区,与绵羊精子上的定位相似[34]。添加1 mmol/L CGA显著降低驴冻融精子IZUMO1的异常定位,而且这种保护作用并没有改变IZUMO1蛋白的表达量。说明CGA并非通过上调IZUMO1蛋白表达发挥保护效果,更多依靠维持精子膜结构稳定来保障蛋白空间分布。冷冻精子质膜易发生轻微损伤,可促使稀释液中$Ca^{2+}$内流入精子,诱导精子顶体发生类似获能的变化,即“冷冻获能”[35]。这种异常顶体率的增加会导致IZUMO1异常定位比例的增加[23]。因此,本研究推测添加CGA可能通过提高驴冻精质膜完整性及顶体完整率,减少“冷冻获能”的发生,从而间接降低了IZUMO1的异常定位。另外,有研究揭示了F-肌动蛋白细胞骨架对于维持IZUMO1在顶体反应前的正确位置至关重要[36]。因此,冷冻造成的损伤是否因为破坏了驴精子头部的F-肌动蛋白网络,而导致IZUMO1蛋白失去锚定,仍需进一步通过荧光探针动态监测加以验证和完善。后续可进一步验证1 mmol/L CGA冷冻保护处理后精子的体内受精能力与胚胎发育潜能,为CGA在驴精液冷冻保存中的实际生产应用提供理论依据。

## 4 结 论

在驴冷冻稀释液中添加1 mmol/L绿原酸可提高冷冻-解冻后精子活率、质膜和顶体完整率,降低畸形率,提高精子的抗氧化能力,同时改善线粒体功能,保护DNA完整性,并对IZUMO1蛋白的正常定位发挥积极作用。

## 参考文献 References


[1] Camillo F, Rota A, Biagini L, Tesi M, Fanelli D, Panzani D. The current situation and trend of donkey industry in Europe[J]. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2018,65: 44-49

[2] Aranguren-Méndez J, Jordana J, Gomez M. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers[J]. *Genetics Selection Evolution*, 2001, 33(4): 433

[3] Vidament M, Vincent P, Martin F X, Magistrini M, Blesbois E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not[J]. *Animal Reproduction Science*, 2009, 112(1/2):22-35

[4] Watson P F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen[J]. *Animal Reproduction Science*, 2000, 60: 481-492

[5] Yeste M, Estrada E, Rocha L G, Marín H, Rodriguez-Gil J E, Miró J. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus[J]. *Andrology*, 2015, 3(2): 395-407

[6] Prasinou P, De Amicis I, Fusaro I, Bucci R, Cavallini D, Parrillo S, Caputo M, Gramenzi A, Carluccio A. The lipidomics of spermatozoa and red blood cells membrane profile of martina franca donkey: Preliminary evaluation[J]. *Animals (Basel)*,2022,13(1):8

[7] Papas M, Catalan J, Barranco I, Arroyo L, Bassols A, Yeste M, Miró J. Total and specific activities of superoxide dismutase (SOD) in seminal plasma

are related with the cryotolerance of jackass spermatozoa[J]. *Cryobiology*, 2020, 92: 109-116

[8] Monteiro R A, Cunha R M, Guerra M M P, De Almeida V M, Peña-Alfaro C E, Silva S V. Use of equine sperm cryopreservation techniques as a conservation method of donkey germplasm [J]. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2022, 111:103888

[9] Kumar P, Kumar R, Mehta J S, Chaudhary A K, Ravi S K, Chandra Mehta S, Ansari M M, Legha R A, Tripathi B N, Talluri T R. Ameliorative effect of ascorbic acid and glutathione in combating the cryoinjuries during cryopreservation of exotic jack semen[J]. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2019, 81: 102796

[10] Yánez-Ortiz I, Catalán J, Delgado-Bermúdez A, Carluccio A, Mirò J, Yeste M. Addition of reduced glutathione (GSH) to freezing medium reduces intracellular ROS levels in donkey sperm[J]. *Veterinary Sciences*, 2021, 8(12): 302

[11] Stojanovic′S, Sprinz H, Brede O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, 391: 79-89

[12] Soares S E. Ácidos fenólicos Como antioxidantes [phenolic acids as antioxidants][J]. *Revista de Nutrição*, 2002, 15:71 - 81

[13] Kyselova V, Peknicova J, Buckiova D, Boubelik M. Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and *in vivo* fertility of outbred CD-1 mice[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003, 1:30

[14] Juan M E, Gonzáles-Pons E, Munuera T, Ballester J, RodríguezGil JE, Planas JM. Trans-resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in health rats[J]. The *Journal of Nutrition*, 2005, 135(4): 757-760

[15] Degáspari C H, Waszczynskyj N. Propriedades antioxidantes decompostos fenólicos [antioxidant properties of phenolic compounds] [J]. *Visão Acadêmica*, 2004, 5:33-40

[16] Escarpa A, González M C. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties [J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 823(1/2): 331-337

[17] Kiehne A, Engelhardt U H. Thermospray-LC-MS analysis of various groups of polyphenols in tea [J]. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 1996, 202(4): 299-302

[18] Miao M, Xiang L. Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid[J]. *Advances in Pharmacology*, 2020, 87: 71-88

[19] Namula Z, Hirata M, Wittayarat M, Tanihara F, Thi Nguyen N, Hirano T, Nii M, Otoi T. Effects of chlorogenic acid and caffeic acid on the quality of frozen-thawed boar sperm[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2018, 53(6): 1600-1604

[20] Mohammadi T, Hosseinchi Gharehaghaji M. The influence of rutin and chlorogenic acid on oxidative stress and in vivo fertility: Evaluation of the quality and antioxidant status of post-thaw semen from Azari water buffalo bulls[J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2024, 10(5): e31548

[21] Moretti E, Bonechi C, Signorini C, Corsaro R, Micheli L, Liguori L, Centini G, Collodel G. In vitro effects of charged and zwitterionic liposomes on human spermatozoa and supplementation with liposomes and chlorogenic acid during sperm freezing[J]. *Cells*, 2024, 13(6): 542

[22] Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs[J]. *Nature*, 2005, 434(7030): 234-238

[23] Fukuda M, Sakase M, Fukushima M, Harayama H. Changes of IZUMO1 in bull spermatozoa during the maturation, acrosome reaction, and cryopreservation[J]. *Theriogenology*, 2016, 86(9): 2179-2188. e3

[24] Okabe M. The cell biology of mammalian fertilization[J]. *Development*, 2013, 140(22):4471-4479

[25] Swegen A, Lambourne S R, Aitken R J, Gibb Z. Rosiglitazone improves stallion sperm motility, ATP content, and mitochondrial function [J]. *Biology of Reproduction*, 2016, 95(5):107

[26] Noto D, Collodel G, Cerretani D, Signorini C, Gambera L, Menchiari A, Moretti E. Protective effect of chlorogenic acid on human sperm: in vitro studies and frozen - thawed protocol[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(5): 744

[27] Rabelo S S, Resende C O, Pontelo T P, Chaves B R, Pereira B A, da Silva W E, Peixoto J V, Pereira L J, Zangeronimo M G. Chlorogenic acid improves the quality of boar semen processed in Percoll [J]. *Animal Reproduction*, 2020, 17: e20190021

[28] Aitken R J, Buckingham D, Harkiss D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993, 97(2): 441-450

[29] Alvarez J G, Storey B T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation[J]. *Gamete Research*, 1989, 23(1): 77-90

[30] Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer[J]. *The Biochemical Journal*, 1996, 313 ( Pt 1)(Pt 1): 17-29

[31] Zhang L Y, Cosma G, Gardner H, Vallyathan V, Castranova V. Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2003, 247(1): 205-210

[32] He W H, Zhai X H, Duan X J, Di H S. Effect of resveratrol treatment on apoptosis and apoptotic pathways during boar semen freezing[J]. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2020, 21(6):485-494

[33] Sebkova N, Ded L, Vesela K, Dvorakova-Hortova K. Progress of sperm IZUMO1 relocation during spontaneous acrosome reaction[J]. *Reproduction*, 2013, 147(2):231-240

[34] Gundogan G I, Aktas A. Immunolocalization of fertilin β, IZUMO1, and P34H in ram spermatozoa[J]. *Biopreservation and Biobanking*, 2022, 19(6): 470-482

[35] Kuroda K, Fukushima M, Harayama H. Premature capacitation of frozen-thawed spermatozoa from subfertile Japanese black cattle[J]. *The Journal*

*of Reproduction and Development*, 2007, 53(5): 1079-1086

[36] Martinez G, Cappetta D, Telesca M, Urbanek K, Castaldo G, Dhellemmes M, Mele V G, Chioccarelli T, Porreca V, Barbotin A L, Boursier A, Guillou F, Coutton C, Brouillet S, De Angelis A, Berrino L, Pierantoni R, Cobellis G, Chianese R, Manfrevola F. Cytochalasin D restores nuclear size acting on F-actin and IZUMO1 localization in low-quality spermatozoa [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2023, 19(7): 2234-2255

责任编辑: 秦梅



**第一作者简介:** 朱玉博,博士,讲师,硕士生导师。主要研究方向:家畜精液冷冻保存技术及相关机制研究。主持国家自然科学基金青年项目1项、主持辽宁省博士启动基金1项、辽宁省科技厅面上项目1项、辽宁省教育厅项目1项,参加国家自然基金多项。



**通讯作者简介:** 邓亮,博士,副教授,博士生导师。中国畜牧兽医学会马学分会副秘书长、辽宁省畜牧兽医学会副秘书长,主要从事马属动物遗传育种和繁殖学研究。主持“十四五”国家重点研发计划课题、国家自然科学基金青年项目、农业农村部、辽宁省与沈阳市等各级科研项目15项。以第一或通讯作者发表学术论文30多篇,以第一完成人授权专利3件、软件著作权1件,主编和副主编专著2部。