



郭艳昭, 帕热哈·帕尔哈提, 李栩, 洪道辉, 石荣华, 曾维斌. 表儿茶素对绵羊精液低温保存效果的影响[J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(07): 131-138.
GUO Yanzhao, PARHAT Parh, LI Xu, HONG Daohui, SHI Ronghua, ZENG Weibin. Study on the effect of epicatechin on the low temperature storage of sheep sperm[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(07): 131-138.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.07.11

表儿茶素对绵羊精液低温保存效果的影响

郭艳昭¹ 帕热哈·帕尔哈提² 李栩¹ 洪道辉¹ 石荣华¹ 曾维斌^{1*}

(1. 石河子大学 动物科技学院, 新疆 石河子 843203;

2. 阿克苏地区畜牧技术推广中心, 新疆 阿克苏 843199)

摘 要 为探究表儿茶素(EC)对新疆地方绵羊品种多浪羊精液在 5℃低温保存效果的影响,本研究将不同浓度的 EC(0、250、300、375、450 和 600 μmol/L)添加到绵羊精液稀释液中,于低温环境下保存 0~168 h,对精子活力、成活率、质膜完整性、顶体完整性以及超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性进行检测。结果表明:1)在保存过程中发现,保存 168 h 后,375 μmol/L 试验组精子活力显著高于 250 μmol/L 试验组($P<0.05$);精子成活率和质膜完整率显著高于 250、450 和 600 μmol/L 试验组($P<0.05$);精子顶体完整率显著高于 250 和 600 μmol/L 试验组($P<0.05$);保存 24、72、120 和 168 h(除 450 μmol/L)后,375 μmol/L 试验组 CAT 活性显著高于对照组和其他试验组($P<0.05$);保存 24、120(除 600 μmol/L)和 168 h 后,375 μmol/L 试验组 SOD 活性显著高于对照组和其他试验组($P<0.05$)。2)随着保存时间的延长,精子活力、成活率、质膜完整性和顶体完整率及酶活性均呈下降趋势;在保存过程中,各试验组精子活力、成活率、质膜完整性和顶体完整率显著高于对照组($P<0.05$),其中 375 μmol/L 试验组在精子活力、成活率、质膜完整性和顶体完整率上表现最优。综上,在绵羊低温稀释液中添加 375 μmol/L 表儿茶素可提高精液低温保存效果为优化良种公羊精液保存技术提供参考。

关键词 绵羊; 精液; 表儿茶素; 低温保存

中图分类号 S286.8

文章编号 1007-4333(2025)07-0131-08

文献标志码 A

Study on the effect of epicatechin on the low temperature storage of sheep sperm

GUO Yanzhao¹, PARHAT Parh², LI Xu¹, HONG Daohui¹, SHI Ronghua¹, ZENG Weibin^{1*}

(1. Animal Science and Technology, Shihezi University College, Shihezi 843203, China;

2. Aksu District Animal Husbandry Technology Extension Center, Akesu 843199, China)

Abstract This research focused on exploring the impact of epicatechin (EC) on the low-temperature preservation of semen from Duolang sheep in Xinjiang at 5℃. In the experiment, EC at different concentrations (0, 250, 300, 375, 450 and 600 μmol/L) was added to the sheep semen diluent. The semen was then stored in a low-temperature environment for 0 to 168 hours. During this period, sperm motility, survival rate, plasma membrane integrity, acrosome integrity, and the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured. The results were as follows: 1) During the storage process, it was found that after 168 hours of storage, the sperm motility of the 375 μmol/L experimental group was significantly higher than that of the 250 μmol/L experimental group ($P<0.05$). The sperm survival rate and plasma membrane integrity rate of the 375 μmol/L group were significantly higher than those of the 250, 450, and 600 μmol/L experimental groups ($P<$

收稿日期: 2024-03-01

基金项目: 新疆生产建设兵团重点领域科技攻关计划项目(2021AB014)

第一作者: 郭艳昭(ORCID:0009-0005-0339-5997),硕士研究生, E-mail:374240555@qq.com

通讯作者: 曾维斌(ORCID:0000-0003-0850-2817),教授,主要从事动物繁殖与生物技术研究, E-mail:zwbdky@126.com

0.05)。The sperm acrosome integrity rate of the 375 $\mu\text{mol/L}$ group was significantly higher than that of the 250 and 600 $\mu\text{mol/L}$ experimental groups ($P<0.05$)。After 24, 72, 120, and 168 hours of storage (except for the 450 $\mu\text{mol/L}$ group), the CAT activity of the 375 $\mu\text{mol/L}$ experimental group was significantly higher than that of the control group and other experimental groups ($P<0.05$)。After 24, 120 (except for the 600 $\mu\text{mol/L}$ group), and 168 hours of storage, the SOD activity of the 375 $\mu\text{mol/L}$ experimental group was significantly higher than that of the control group and other experimental groups ($P<0.05$)。2) With the extension of storage time, sperm motility, survival rate, membrane integrity, acrosome integrity rate, and enzyme activity all showed a downward trend. In the storage process, the sperm motility, survival rate, plasma membrane integrity, and acrosome integrity of each experimental group were significantly higher than those of the control group ($P<0.05$)。Among them, the 375 $\mu\text{mol/L}$ experimental group performed the best in terms of sperm motility, survival rate, plasma membrane integrity, and acrosome integrity. In conclusion, adding 375 $\mu\text{mol/L}$ epicatechin to the sheep semen diluent under low-temperature conditions can enhance the preservation effect of semen, providing a reference for optimizing the preservation technology of high-quality ram semen.

Keywords sheep; sperm; epicatechin; low temperature storage

人工授精技术在畜禽繁殖领域的广泛应用,为提升繁殖效率提供了关键技术支撑^[1],精液保存作为该技术的核心环节,其效果直接影响人工授精的成功率。相较于其他保存方式,低温保存精液具备运输便捷、精子活力维持时间长等优势,且能显著提高受胎率,在实际生产中具有重要应用价值^[2]。已有研究表明,公羊精液在 5℃保存时,其活力可维持 72 h,明显长于 15℃保存时间^[3]。Abadjieva 等^[4]研究表明,绵羊精液在 5℃保存 48 h 后,精子形态与运动能力未受明显影响,且能达到较为理想的体外受精率。然而,随着低温保存时间的延长,精液中活性氧(Reactive oxygen species, ROS)含量逐渐升高,引发精子脂质过氧化(Lipid peroxide, LPO)反应加剧,进而对精液保存效果产生负面影响^[5]。因此,在精液低温保存过程中,添加适量抗氧化物质以清除 ROS、抑制 LPO 反应、减轻氧化损伤,对于延长精液保存时间、提升保存效果具有重要意义^[6-7]。

表儿茶素(Epicatechin, EC)属于黄烷醇类化合物,呈白色晶体状,易溶于水,在茶叶、浆果等植物中含量丰富。其抗氧化作用主要通过两种机制实现:一是直接与金属离子发生反应;二是通过增强抗氧化酶活性,间接提升自由基清除能力^[8]。已有研究证实,在牛^[9]、猪^[10]、鼠^[11]等精液保存稀释液中添加 EC,能够有效改善精子品质。近期文献报道,将表儿茶素及其衍生物添加在牛^[12]、山羊^[13]、兔^[14]等动物的精液稀释液中,可显著提高精液的抗氧化能力以及融冻后质量,为 EC 在精液保存中的应用提供理论支持。但目前关于 EC 在绵羊精液低温保

存方面的研究尚未见报道,本研究以多浪羊精液为对象,探讨低温保存条件下添加不同浓度 EC 对精液保存效果的影响,旨在为优化良种公羊精液保存技术提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物及精液采集

本试验于新疆芳草湖万只肉羊繁育场开展,选取 3 只年龄为 3 岁、体况中等、性欲旺盛且无生殖疾病的公羊作为试验动物,假阴道法采集精液,收集精子活力在 75% 以上,精子密度达到 $1\times 10^9/\text{mL}$ 以上的精液,混合后共 3 mL,置于 5℃低温环境保存。分别在保存 72、96、120、144 和 168 h 后,对绵羊精液品质进行检测;同时在保存 24、72、120 和 168 h 后,测定精子超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性,以评估精液品质。

1.2 试剂及设备

表儿茶素购自源叶生物公司;4%多聚甲醛、吉姆萨原液、柠檬酸三钠、乳糖、三羟甲基氨基甲烷(Tris)均购自北京索莱宝生物科技有限公司;CAT 与 SOD 试剂盒购自深圳市盒子生物有限公司;迈朗精子全自动分析系统 CASA(型号为 ML-210LZ)购自松景天伦有限公司。

1.3 稀释液的配制及精液的稀释和保存

在 15~25℃室温环境下,准确称取 Tris 3.07 g,柠檬酸 1.63 g,葡萄糖 1.00 g,乳糖 1.00 g 溶解于 100 mL 灭菌超纯水中。新鲜鸡蛋剥开外壳,去除卵黄表面的蛋清,注射器针头挑破卵黄,用无针头注射器吸取卵黄液,按照 10% 的比例注入溶液

中,再加入青链霉素各 100 000 IU,最后使用搅拌机搅拌 30 min 充分混匀,配制成稀释液,然后在稀释液的基础上每组分别添加不同浓度 EC,配置成 0、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550 和 600 $\mu\text{mol/L}$ 的稀释液,混匀后密封冷藏,保存至 5 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中,经过预试验选择其中较为代表的几个浓度进行预试验,最终确定试验浓度为 0、250、300、375、450 和 600 $\mu\text{mol/L}$ 的 EC 抗氧化剂作为低温保存稀释液。

将已配置好的低温稀释液水浴升温至 37 $^{\circ}\text{C}$ 。采用 9:1 的比例,缓慢地将稀释液加入等温的精液中,并边加入边搅拌均匀,稀释后总体积为 30 mL。然后迅速将混合物分装至 1.5 mL 的离心管中,并使其冷却至室温。试验分为 6 组,每组使用 5 份样品,每份样品体积为 0.5 mL。检测精液品质和抗氧化指标分别使用 15 mL。随后,将离心管用多层棉花包裹,放置于 5 $^{\circ}\text{C}$ 中低温保存。为避免精子的聚沉,每隔 12 h 需缓慢地摇动离心管。

1.4 精液品质检测指标及方法

精子成活率、活力使用 CASA 检测:取适量稀释后的精液于 1.5 mL 离心管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min,在显微镜下随机观察 5 个视野,且每次计数不少于 200 个精子,重复 3 次。精子成活率/ $\%$ =(存活精子数/总精子数) $\times 100$;精子活力/ $\%$ =(向前直线运动的精子数/总精子数) $\times 100$ 。

精子质膜完整率采用低渗肿胀试验^[15]进行测试,1)首先取 1 mL HOST 液和离心管,37 $^{\circ}\text{C}$ 预热 5 min,预热好的精液 10 μL 放入离心管,再加入 100 μL HOST 液混匀。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅孵育 45 min。2)倒置荧光显微镜下随机观察 5 个视野,计数

200 个以上,记录弯尾精子数,计算质膜完整率。质膜完整率=(弯尾精子数/总精子数) $\times 100\%$ 。

精子顶体完整率使用多聚甲醛固定后,吉姆萨染液染色 80 min,洗去浮色,干燥后镜检至少 200 个精子进行随机计数,以确定精子顶体的完整率。顶体完整率=(顶体完整的精子数/总精子数) $\times 100\%$ 。

测定抗氧化能力,本研究采用相应的试剂盒分别在保存 24、72、120 和 168 h 后对精液中 SOD 和 CAT 活性进行检测。

1.5 数据统计及分析

使用 Excel2021 对数据统计整理,使用 SPSS 19.0 软件对精子品质各指标数据进行双因素方差分析和 Duncan 多重检验。结果以“平均值 $\pm$ 标准差”表示, $P<0.05$ 代表差异显著, $P>0.05$ 代表差异不显著。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的 EC 对低温保存的精子活力的影响

由表 1 所示,保存时间越长,精子活力显著降低($P<0.05$)。精子保存 72 h 时,含有 375 $\mu\text{mol/L}$ EC 的试验组精子活力显著高于对照组和 250、300 $\mu\text{mol/L}$ 试验组;96 h 时,375 和 450 $\mu\text{mol/L}$ 试验组精子活力显著高于其他各组;120 h 时,对照组显著低于试验组;144 h 时,375 $\mu\text{mol/L}$ 试验组显著高于对照组和 250、300 $\mu\text{mol/L}$ 试验组;168 h 时,375 $\mu\text{mol/L}$ 试验组精子活力显著高于对照组和 250 $\mu\text{mol/L}$ 试验组($P<0.05$)。结果表明,375 $\mu\text{mol/L}$ 试验组可显著提高精子活力。

表 1 不同浓度 EC 对绵羊精子活力的影响
Table 1 Effect of different concentrations of epicatechin on the viability of sheep sperm

时间/h Time	表儿茶素浓度/($\mu\text{mol/L}$) Epicatechin concentration					
	0	250	300	375	450	600
72	71.71 $\pm$ 2.15c	74.75 $\pm$ 0.78b	77.15 $\pm$ 1.12b	80.45 $\pm$ 1.63a	78.88 $\pm$ 2.08ab	77.71 $\pm$ 0.56ab
96	67.15 $\pm$ 2.05c	69.49 $\pm$ 1.80bc	70.57 $\pm$ 1.51bc	76.54 $\pm$ 1.87a	75.94 $\pm$ 0.95a	72.34 $\pm$ 2.52b
120	57.80 $\pm$ 0.48b	67.44 $\pm$ 1.68a	67.32 $\pm$ 2.40a	69.73 $\pm$ 1.50a	68.83 $\pm$ 2.23a	68.19 $\pm$ 3.19a
144	44.81 $\pm$ 0.78c	62.28 $\pm$ 2.70b	63.01 $\pm$ 2.54b	67.85 $\pm$ 0.62a	66.53 $\pm$ 1.74ab	66.53 $\pm$ 1.74ab
168	38.67 $\pm$ 3.09c	51.49 $\pm$ 1.28b	54.63 $\pm$ 1.72ab	58.13 $\pm$ 1.45a	55.12 $\pm$ 1.73ab	54.45 $\pm$ 1.06ab

注:同行肩标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。
Note: The lowercase letters with different alphabets on the same row represent significant differences ($P<0.05$). The same below.

2.2 不同浓度的EC对低温保存的精子成活率的影响

由表2所示,精子保存72 h时,含有375和450 μmol/L EC的试验组精子成活率显著高于对照组和250 μmol/L试验组;96、120 h时,375、450和600 μmol/L试验组精子成活率显著均高于对照组

和250 μmol/L试验组;144 h时,375和600 μmol/L试验组精子成活率显著高于对照组和250 μmol/L试验组;168 h时,300和375 μmol/L试验组显著高于其他各组($P<0.05$)。结果表明,375 μmol/L试验组在精液低温保存过程中对精子成活率有显著提升。

表2 不同浓度EC对绵羊精子成活率的影响

Table 2 Effect of different concentrations of epicatechin on the motility of sheep sperm

时间/h Time	表儿茶素浓度/(μmol/L) Epicatechin concentration					
	0	250	300	375	450	600
72	76.15±3.09c	82.81±2.27b	85.26±4.21ab	90.27±1.63a	89.91±2.04a	86.08±1.67ab
96	72.55±1.77c	77.63±1.52b	82.91±2.10a	87.90±1.09a	85.19±0.91a	84.85±1.52a
120	68.00±1.80c	74.56±1.69b	75.48±0.99b	82.04±2.96a	80.15±1.45a	80.87±1.02a
144	56.21±2.13c	72.15±1.40b	72.89±2.31ab	76.50±2.21ab	73.93±1.60ab	72.97±1.46a
168	53.08±1.44c	62.79±2.77b	66.20±2.59a	67.72±2.05a	64.05±1.34b	62.24±0.99b

2.3 不同浓度的EC对低温保存的精子质膜完整性的影响

由表3所示,精子保存72和96 h时,含有375 μmol/L EC的试验组精子质膜完整性显著高于对照组和含有250和300 μmol/L EC的试验组;120 h时,375、450和600 μmol/L试验组精子

质膜完整性显著高于对照组和250、300 μmol/L试验组;144 h时,试验组精子质膜完整性显著高于试验组;168 h时,300和375 μmol/L试验组精子质膜完整性显著高于其他各组($P<0.05$)。结果表明,375 μmol/L EC对精子质膜完整性有显著提升。

表3 不同浓度EC对绵羊精子质膜完整性的影响

Table 3 The effect of different concentrations of epicatechin on the membrane integrity of sheep sperm

时间/h Time	表儿茶素浓度/(μmol/L) Epicatechin concentration					
	0	250	300	375	450	600
72	78.8±3.52c	86.98±1.12b	88.09±4.30b	93.52±1.02a	91.75±2.45ab	91.17±1.94ab
96	77.29±2.95c	79.75±1.69c	85.75±1.95b	90.75±1.30a	87.93±1.47ab	87.63±1.78ab
120	72.44±2.80c	77.18±2.22b	77.93±0.81b	83.34±4.60a	83.73±1.56a	82.68±1.06a
144	66.05±4.24b	76.65±1.53a	76.57±2.18a	78.59±2.52a	78.18±1.11a	75.29±1.52a
168	54.88±2.02d	63.34±2.82c	70.33±1.20a	67.09±0.95a	67.09±0.51b	67.09±3.24bc

2.4 不同浓度的EC对低温保存的精子顶体完整性的影响

由表4所示,在精子保存72和96 h时,含有375 μmol/L表儿茶素的试验组精子顶体完整性显著高于对照组和含有250、300 μmol/L表儿茶素的试验组($P<0.05$);120 h时,375 μmol/L试验组精子顶体完整性显著高于对照组和250 μmol/L试验组($P<0.05$);144 h时,试验组精子顶体完整性显著高于对照组($P<0.05$);168 h时,300和

375 μmol/L试验组显著高于对照组和250、600 μmol/L试验组($P<0.05$)。结果表明,375 μmol/L EC对精子顶体完整性有显著提升。

2.5 不同浓度的EC对低温保存的绵羊精液CAT活性的影响

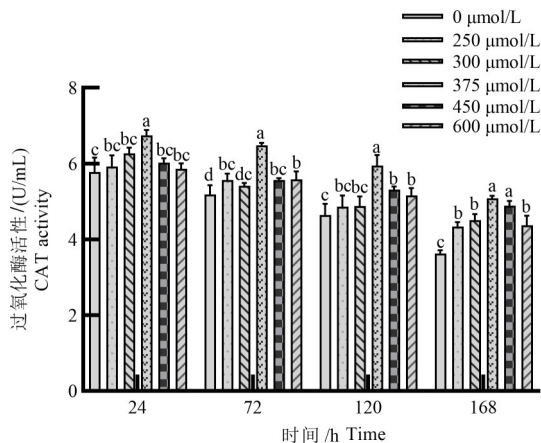
由图1所示,精子保存24 h时,含有375 μmol/L EC的试验组CAT活性显著高于其他各组($P<0.05$);72 h时,375 μmol/L试验组CAT活性显著高于其他各组($P<0.05$),600 μmol/L试

表 4 不同浓度 EC 对绵羊精子顶体完整性的影响

Table 4 The effect of different concentrations of epicatechin on the acrosome integrity of sheep sperm

时间/h Time	表儿茶素浓度/($\mu\text{mol/L}$) Epicatechin concentration					
	0	250	300	375	450	600
72	88.49 $\pm$ 3.63c	86.88 $\pm$ 1.83c	88.84 $\pm$ 3.35c	94.59 $\pm$ 1.31a	92.25 $\pm$ 2.16b	91.80 $\pm$ 0.59bc
96	81.46 $\pm$ 2.43c	82.65 $\pm$ 1.22c	86.64 $\pm$ 1.05b	90.36 $\pm$ 1.04a	88.97 $\pm$ 1.32ab	88.48 $\pm$ 1.73a
120	71.60 $\pm$ 4.87c	76.90 $\pm$ 1.44b	79.38 $\pm$ 0.79ab	84.25 $\pm$ 3.37a	83.21 $\pm$ 2.36a	81.46 $\pm$ 1.14ab
144	62.68 $\pm$ 2.29b	74.67 $\pm$ 1.53a	75.62 $\pm$ 2.11a	79.04 $\pm$ 4.18a	76.74 $\pm$ 1.17a	76.59 $\pm$ 1.52a
168	50.13 $\pm$ 1.80c	65.57 $\pm$ 3.03b	71.81 $\pm$ 2.62a	71.36 $\pm$ 2.09a	68.29 $\pm$ 1.24ab	66.51 $\pm$ 0.87b

验组 CAT 活性显著高于对照组和 300 $\mu\text{mol/L}$ 试验组 ($P<0.05$); 120 h 时, 375 $\mu\text{mol/L}$ 试验组 CAT 活性显著高于其他各组 ($P<0.05$); 168 h 时, 375 和 450 $\mu\text{mol/L}$ 试验组显著高于其他各组 ($P<0.05$)。结果表明, 375 $\mu\text{mol/L}$ EC 对绵羊精液 CAT 活性有显著提升。



同时间柱状图上不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同。

Different letters on the bar chart at the same time indicate significant differences ($P<0.05$). The same below.

图 1 不同浓度表儿茶素对绵羊精子低温保存 CAT 活性的影响

Fig. 1 The effect of different concentrations of epicatechin on the activity of CAT in cryopreserved sheep sperm

2.6 不同浓度的 EC 对低温保存的绵羊精液 SOD 活性的影响

由图 2 所示, 精子保存 24 h 时, 含有 375 $\mu\text{mol/L}$ EC 的试验组 SOD 活性显著高于其他各组 ($P<0.05$); 72 h 时, 250、375、450 $\mu\text{mol/L}$ 试验组 SOD 活性显著高于对照组以及 300 $\mu\text{mol/L}$ 试验组 ($P<0.05$); 120 h 时, 375 $\mu\text{mol/L}$ 试验组 SOD 活性显著高于含有 250、300、450 $\mu\text{mol/L}$ 试验组和对照组 ($P<0.05$); 168 h 时, 375 $\mu\text{mol/L}$ 试验组 SOD 活性显著高于其他试验组和

对照组 ($P<0.05$)。结果表明, 375 $\mu\text{mol/L}$ EC 对绵羊精液 SOD 活性有显著提升。

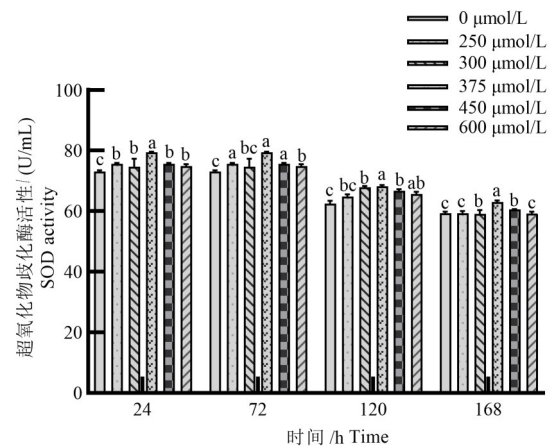


图 2 不同浓度表儿茶素对绵羊精子低温保存 SOD 活性的影响

Fig. 2 The effect of different concentrations of epicatechin on the activity of SOD in cryopreserved sheep sperm

3 讨论

3.1 EC 对绵羊低温保存精子活力和成活率的影响

精子活力与活率是评估精液质量的重要指标, 同时也是预测精子受精能力的关键参数。精子的良好运动性能是其成功穿透卵子并完成受精过程的先决条件^[16]。近年来, 研究表明, 在精液冷冻保存过程中添加某些活性物质能够显著改善精子质量。例如, 在牛^[17]和猪^[18-19]的精液冷冻稀释液中添加一定浓度的 EC 及其衍生物, 可有效提高精子活力与成活率。基于这些研究, 本研究探讨了在绵羊精液低温保存稀释液中添加 EC 的效果, 并对其作用机制进行了初步分析。

本研究结果显示, 在绵羊精液低温保存稀释液中添加 EC 后, 120 h 后各试验组的精子活力和成活率均显著提升。其中, 375 $\mu\text{mol/L}$ EC 效果最为显著, 保存

120 h时精子活率达到82.04%。这一结果与刘锦钰等^[20]在稀释液中添加谷胱甘肽(GSH)的研究结果(82.57%)相近,表明EC与GSH在改善精子保存效果方面具有相似的作用潜力。此外,与在绵羊精液稀释液中添加益母草碱的研究相比,本研究在保存168 h时的精子成活率为67.72%,显著高于益母草碱组的51.38%^[21]。同样,与在吐鲁番黑羊精液稀释液中添加原花青素的研究相比,本研究在保存120 h时的精子活力为69.73%,高于原花青素组的62.66%^[22]。这些数据进一步表明,EC在精液低温保存中具有显著优势,能够更有效地维持精子活力与成活率。此外,本研究还发现,在精液低温保存期间,除96 h外,各试验组的精子活力和成活率始终高于对照组。其中,375 $\mu\text{mol/L}$ 试验组对精子活力和成活率的提升效果最为显著,表明EC的添加浓度与精子保存效果之间存在一定的剂量依赖性,这一结果可能与EC的抗氧化特性有关,其分子结构中的-OH的H可与自由基形成氢键,抑制自由基连锁反应,能够有效清除精液保存过程中产生的活性氧(ROS),从而减少氧化应激对精子膜结构和功能的损伤。此外,EC还可能通过调节精子能量代谢相关酶的活性,维持精子的运动能力。

综上所述,本研究结果表明,在绵羊精液低温保存稀释液中添加EC能够显著提高精子活力与成活率,其中375 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的效果最佳。

3.2 EC对精液低温保存精子结构完整性的影响

精子质膜在受精过程中发挥着至关重要的作用,其结构完整性和功能状态直接影响精子的受精能力。然而,随着精液保存时间的延长ROS的累积会引发精子磷脂膜中多不饱和脂肪酸(PUFAs)的氧化损伤,导致脂质过氧化(LPO)的发生^[23]。LPO不仅破坏质膜的完整性,还会改变其渗透性和流动性,进而对精子功能造成不可逆的损伤^[24]。研究表明,表儿茶素(EC)具有间接预防LPO的功能,并能有效保护精子膜的完整性^[25]。Ahmed等^[26]研究进一步证实,在水牛精液低温稀释液中添加EC的衍生物可显著提高精子活力及质膜完整率,这为EC在精液保存中的应用提供了重要依据。

本试验结果显示,在绵羊精液低温保存过程中,添加不同浓度EC(300、375、450和600 $\mu\text{mol/L}$)的各试验组,其精子质膜完整率均显著高于对照组。其中,300 $\mu\text{mol/L}$ 试验组在保存168 h时的质膜完整率达到70.33%。尽管这一结果略低于王璐等^[27]在新疆驴精

液稀释液中添加白藜芦醇的研究结果(75%),但显著高于王彦虎等^[28](33.68%)与周千等^[29](59.55%)在其他物种精液保存中的研究结果。这种差异可能与试验动物的种类、保存条件及添加剂的特性有关,但总体表明EC在保护精子质膜完整性方面具有显著优势。

顶体作为成熟精子头部顶端的重要结构,其完整性对受精过程中的顶体反应至关重要。顶体反应是精子与卵子结合的关键步骤,其功能异常会直接影响受精成功率。本研究中,375 $\mu\text{mol/L}$ 试验组的顶体完整性显著高于对照组及其他试验组,与孟娜娜^[30]在稀释液中添加10%脱脂奶粉的研究结果(84.93%)相近。这一发现进一步证实,EC不仅能够保护精子质膜,还能有效维持顶体结构完整性,从而提高精子的受精潜力。

综上,本研究表明,在绵羊精液低温保存稀释液中添加EC能够显著提升精子质膜和顶体的完整性,其中375 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的效果最佳。EC的保护作用可能与其抗氧化特性密切相关,其能够清除ROS,减少LPO的发生,从而维持精子膜结构的稳定性。

3.3 EC对精液低温保存精子抗氧化能力的影响

在精液低温保存过程中,ROS的累积是导致精子质量下降的关键因素。其作用机制主要是ROS通过攻击精子膜中的多不饱和脂肪酸(PUFAs),进而改变细胞膜的通透性和流动性,并对精子结构和功能产生损伤^[31]。在机体抗氧化防御体系中,SOD和CAT作为细胞内重要的抗氧化酶,在清除ROS过程中发挥核心作用:SOD能够将超氧阴离子(O_2^-)转化为过氧化氢(H_2O_2),而CAT则进一步将 H_2O_2 分解为水和氧气,从而有效降低ROS水平^[32],两者的协同作用可系统反映精子的抗氧化能力。研究表明,在绵羊精液稀释液中添加SOD(800 U/mL)和CAT(200 U/mL)可以显著增强精子的抗氧化能力,使体外受精率提高15%,精液储存率提高25%,并有效减缓ROS生成以及降低对精子结构的氧化损伤^[33-34]。本研究通过动态监测不同保存时间点(24、72、120和168 h)的酶活性变化,发现添加EC可显著增强SOD和CAT活性。在24 h时,SOD活性较对照组提升了近14 U/mg,与孙迎迎^[35]在稀释液中添加100 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇的研究结果(13.23 U/mg)相近。值得注意的是,375 $\mu\text{mol/L}$ EC试验组展现出最佳的抗氧化增强效果,其作用机制可能涉及:1)EC通过直接清除ROS(如超氧阴离子和羟基自由基);2)上调抗氧化酶活性,增强精子的抗氧化防御能力;3)通过其抗氧化活性以及维持跨膜离子通

道的稳定性来改善精子能量代谢,进一步保护精子膜结构的完整性和功能^[36]。在试验中观察到抗氧化酶活性呈现浓度依赖性变化,在达到 375 $\mu\text{mol/L}$ 阈值后活性转为下降,这种现象可能与 ROS 的双向调节作用有关:适度的 ROS 水平对维持精子代谢活性和膜流动性具有生理意义,过量清除反而可能打破氧化还原平衡,抑制正常的代谢过程。本研究结果表明,EC 在绵羊精液低温保存中表现出显著的抗氧化作用,其中 375 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的效果最佳,为精液保存技术的优化提供了新的理论依据。未来研究可进一步探讨 EC 在其他物种中的应用潜力及其作用机制,以推动精液保存技术的创新与发展。

4 结 论

在本研究条件下,低温保存下在羊的精液中加入 375 $\mu\text{mol/L}$ 表儿茶素可以更好地改善其精子的活力、成活率、精子质膜和顶体完整性,同时还提高了 SOD 和 CAT 的活性。

参考文献 References

- [1] Prado V, Orihuela A, Lozano S, Pérez-León I. Management of the female stimulus during semen collection and its association with libido re-establishment and semen characteristics of goats[J]. *Journal of Animal Science*, 2002, 80(6): 1520-1523
- [2] Wen F, Li Y, Feng T Y, Du Y Q, Ren F, Zhang L K, Han N, Ma S L, Li F Z, Wang P, Hu J H. Grape seed procyanidin extract (GSPE) improves goat sperm quality when preserved at 4°C[J]. *Animals*, 2019, 9(10): 810
- [3] O'Hara L, Hanrahan J P, Richardson L, Donovan A, Fair S, Evans A C O, Lonergan P. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm [J]. *Theriogenology*, 2010, 73(4): 541-549
- [4] Abadjieva D, Yotov S, Mladenova V, Lauberte L, Kalvanov I, Krasilnikova J, Telesheva G, Kistanova E. Positive effect of natural antioxidant oregonin from *Alnus incana* bark on ram semen quality stored at 5 °C for 48 h [J]. *Research in Veterinary Science*, 2020, 6(131): 153-158
- [5] O W S, Chen H, Chow P H. Male genital tract antioxidant enzymes: Their ability to preserve sperm DNA integrity [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006, 250(1/2): 80-83
- [6] Li R, Jia Z Q, Trush M A. Defining ROS in biology and medicine[J]. *Reactive Oxygen Species (Apex, N. C.)*, 2016, 1(1): 9-21
- [7] 高飞, 岳奎忠, 杨增明. 猪精液液态保存的研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2004, 40(6): 46-49
- [8] Bernatoniene J, Kopustinskiene D M. The role of catechins in cellular responses to oxidative stress[J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 965
- [9] Tvrdá E, Straka P, Galbavy D, Ivanic P. Epicatechin provides antioxidant protection to bovine spermatozoa subjected to induced oxidative stress[J]. *Molecules*, 2019, 24: 3226
- [10] Boonsorn T, Kongbuntad W, Narkkong N A, Aengwanich W. Effects of catechin addition to extender on sperm quality and lipid peroxidation in boar semen [J]. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 2010, 7: 283-288
- [11] Awonyiy D O, Aboua Y G, Marnewick J, Brooks N. The effects of rooibos (*Aspalathus linearis*), green tea (*Camellia sinensis*) and commercial rooibos and green tea supplements on epididymal sperm in oxidative stress-induced rats [J]. *Phytotherapy Research*, 2012, 26: 1231-1239
- [12] Paarvizi Alan A, Ayen, E, Khaki A, Soleimanzadeh A. Epigallocatechin-3-gallate affects the quality of fresh and frozen-thawed semen of Simmental bull by two different cryopreservation methods. [J]. *In Veterinary Research Forum*, 2024, 15(7): 369-377
- [13] Mustofa I, Susilowati S, Suprayogi T W, Akintunde A O, Oktanella Y, Purwanto D A. Epigallocatechin-3-gallate chitosan nanoparticles in an extender improve the antioxidant capacity and post-thawed quality of Kacang goat semen[J]. *F1000Research*, 2023, 12: 32
- [14] Ali Akarsu S, Koca R H, Çakır A C, Acısu T C, Güngör İ H, Sönmez M, Türk G, Gür S, Esmer Duruel H E, Ömür A D. Determination of the effect of epigallocatechin gallate on oxidative stress, apoptosis and sperm quality in rabbit semen extender[J]. *Cryobiology*, 2023, 113: 104698
- [15] 王俊琴. 奶绵羊精液冷冻程序的探索与研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019
- [16] Wang J Q. Exploration and study on semen freezing procedure of semen of dairy sheep [D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2019 (in Chinese)
- [17] Ahmed H, Murtaza Hassan Andrabi S, Jahan S. Semen quality parameters as fertility predictors of water buffalo bull spermatozoa during low-breeding season[J]. *Theriogenology*, 2016, 86: 1516-1522
- [18] Li Z Q, Wang H T, Yuan C S, Lu P, Zhou Y, Lu W F, Zhao J, Liu H Y, Wang J. Epigallocatechin 3-gallate improves the quality of bull semen cryopreservation[J]. *Andrologia*, 2022, 54(1): e14310
- [19] Bucci D, Spinaci M, Yeste M, Yeste M, Mislei B, Gadani B, Prieto Martinez N P, Love C, Mari G, Tamanini C, Galeati G. Combined effects of resveratrol and epigallocatechin-3-gallate on post thaw boar sperm and IVF parameters[J]. *Theriogenology*, 2018, 117: 16-25
- [20] Gadani B, Bucci D, Spinaci M, Tamanini C, Galeati G. Resveratrol and Epigallocatechin-3-gallate addition to thawed boar sperm improves in vitro fertilization[J]. *Theriogenology*, 2017, 90: 88-93
- [21] 刘锦钰, 张杨, 马旭梅, 周千, 周扬, 张春香, 石磊, 任有蛇. 谷胱甘肽对绵羊精液低温保存效果的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2023, 50(6): 2388-2394
- [22] Liu J Y, Zhang Y, Ma X M, Zhou Q, Zhou Y, Zhang C X, Shi L, Ren Y S. Effects of glutathione on cryopreservation of sheep semen [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 50(6): 2388-2394 (in Chinese)
- [23] 李智星, 卿育洪, 李志远, 曹少奇, 高新梅, 曾维斌, 王静, 胡广东. 益母草碱对绵羊精液低温保存效果的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2023, 50(7): 2801-2810
- [24] Li Z X, Qing Y H, Li Z Y, Cao S Q, Gao X M, Zeng W B, Wang J, Hu G D. Effects of leonurine on cryopreservation of sheep semen [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 50(7): 2801-2810 (in Chinese)
- [25] 艾克拜尔·艾合麦提. 原花青素对吐鲁番黑羊精液冷冻保存效果的研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2022
- [26] Aihemaiti A. Study of effect of procyanidins on the cryopreservation of turpan black sheep seme [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2022 (in Chinese)
- [27] Aitken R J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage[J]. *Molecular Reproduction and Development*,

- 2017, 84(10): 1039-1052
- [24] Nagasaka R, Okamoto N, Ushio H. Partial oxidative-stress perturbs membrane permeability and fluidity of fish nucleated red blood cells [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2004, 139(4): 259-266
- [25] Jamal M, Ghaffari M A, Hoseinzaneh P, Hashemitabar M, Zeinali M. Human sperm quality and metal toxicants: protective effects of some flavonoids on male reproductive function [J]. *International journal of fertility & sterility*, 2016, 10(2): 215-223
- [26] Ahmed H, Jahan S, Riaz M, Khan B T, Ijaz M U. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) addition as an antioxidant in a cryo-diluent media improves microscopic parameters, and fertility potential, and alleviates oxidative stress parameters of buffalo spermatozoa [J]. *Cryobiology*, 2020, 97: 101-109
- [27] 王璐, 张强, 王艳萍, 郭旭川, 张文倩, 朱春源, 曾维斌. 白藜芦醇、绿原酸对新疆驴精液低温保存效果的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2022, 58(5): 153-157
- Wang L, Zhang Q, Wang Y P, Guo X C, Zhang W Q, Zhu C H, Zeng W B. Effect of resveratrol and chlorogenic acid on the cryopreservation effect of Xinjiang donkey semen [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2022, 58(5): 153-157 (in Chinese)
- [28] 王彦虎, 张柳明, 褚长江, 马金亮, 冯云奎, 郭裕娟, 龚常亮, 李拥军. 牛血清白蛋白对湖羊精液低温保存效果的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(8): 165-169
- Wang Y H, Zhang L M, Chu C J, Ma J L, Feng Y K, Guo Y J, Gong C L, Li Y J. Effect of bovine serum albumin on the effect of low-temperature preservation of hu ram semen [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2021, 57(8): 165-169 (in Chinese)
- [29] 周千, 张扬, 石磊, 任有蛇. Mito-tempo对绵羊精液低温保存效果的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2023, 59(11): 219-223
- Zhou Q, Zhang Y, Shi L, Ren Y S. Effects of Mito-tempo on cryopreservation of sheep semen [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2023, 59(11): 219-223 (in Chinese)
- [30] 孟娜. 脱脂奶粉和大豆卵磷脂对绵羊精液低温保存效果的影响[D]. 保定: 河北农业大学, 2015
- Meng N N. Effects of skimmed-milk powder and soybean lecithin on cryopreservation of sheep semen [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [31] Reddy V S, Yadav B, Yadav C L, Anand M, Swain D K, Kumar D, Kritania D, Madan A K, Kumar J, Yadav S. Effect of sericin supplementation on heat shock protein 70 (HSP70) expression, redox status and post thaw semen quality in goat [J]. *Cryobiology*, 2018, 84: 33-39
- [32] Jomova K, Alomar S Y, Alwasel S H, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants [J]. *Archives of Toxicology*, 2024, 98(5): 1323-1367
- [33] Maxwell W M, Stojanov T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants [J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 1996, 8(6): 1013-1020
- [34] Ahmadi S, Bashiri R, Ghadiri-Anari A, Nadjarzadeh A. Antioxidant supplements and semen parameters: an evidence based review [J]. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 2016, 14(12): 729-736
- [35] 孙迎迎. 稀释液中添加槲皮素和白藜芦醇对绵羊精液低温保存效果的影响[D]. 太谷: 山西农业大学, 2020
- Sun Y Y. Effect of quercetin and resveratrol in diluent on low-temperature preservation of sheep semen [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [36] Bañas Š, Benko F, Ďuračka M, Lukáč N, Tvrdá E. Epicatechin prevents cryocapacitation of bovine spermatozoa through antioxidant activity and stabilization of transmembrane ion channels [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(3): 2510

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 郭艳昭, 硕士研究生, 石河子大学动物科技学院 2021 级硕士研究生, 专业为遗传与育种。



通讯作者简介: 曾维斌, 主要从事动物繁殖与生物技术研究, 博士, 石河子大学动物科技学院教授, 动物遗传育种与繁殖学科硕士研究生导师。主要研究领域为: 主要研究领域为动物繁殖与生物技术。国家自然科学基金项目一审专家组成员。完成兵团、校内课题 3 项, 参与完成国家、自治区、兵团、学校各类科研多项。发表文章 20 余篇, 申请国内、外专利 3 项。主编和参编校内教材 4 部, 以副主编公开出版著作 3 部、参编出版 4 部。