

巴马香猪精液冷冻过程中精子内抗氧化酶活性与精子质膜完整性关系研究^①

孔德营¹, 商海涛², 刘福慧³,
韩勇¹, 魏泓², 张家骅⁴

1. 遵义医学院 基础医学院, 贵州 遵义 563000; 2. 第三军医大学 基础部, 重庆 400038;

3. 遵义医学院 附属医院 输血科, 贵州 遵义 563000;

4. 西南大学 动物科技学院, 重庆市草食动物资源保护与利用工程技术研究中心, 重庆 400716

摘要:猪精液冷冻过程中, 精子质膜往往因受到活性氧(ROS)的氧化而发生损伤, 精子品质也随之下降。精子 ROS 水平受抗氧化酶活性的影响, 然而冷冻过程中精子细胞内抗氧化酶活性变化与细胞膜完整性的关系还缺乏报道。该试验将巴马香猪精液冷冻保存降温过程中的精子分为 4 种状态, 即鲜精、15℃精液、5℃精液和冷冻-解冻后精液, 检测了各种状态下精子的运动参数、质膜完整性(PMI)和顶体完整性(AI), 分析了超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(Gpx)活性和 ROS(丙二醛-MDA)水平。结果表明: 15℃精子各项指标和鲜精无显著差异($p>0.05$); 5℃精子运动能力、质膜完整性和抗氧化酶活性低于鲜精($p<0.05$), 而精子细胞内 MDA 水平与鲜精无显著差异($p>0.05$); 冷冻-解冻后精子的运动能力、质膜完整性和抗氧化酶活性均低于其他各组($p<0.05$), 精子 MDA 水平显著高于其他各组($p<0.05$)。同时, SOD 和 Gpx 活性与精子 PMI 和 AI 之间的相关性均达到了显著水平($p<0.05$)。可见, 当精子降温至 15℃以下直至冷冻时, SOD 和 GPX 活性逐渐降低, 精子细胞清除 ROS 的能力随之下降, 精子质膜脂质过氧化反应增强, 质膜受损, 内容物外渗是精液品质降低的重要原因。

关键词:巴马香猪; 精液冷冻; 活性氧; 抗氧化酶活性; 细胞膜完整性

中图分类号: S828

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)9-0023-06

精液冷冻保存对动物种质资源的保存具有重要意义, 然而与其他哺乳动物相比, 猪精子在冷冻过程中更易受到损伤, 其冷冻保存效果仍不理想^[1]。猪精子在温度低于 15℃时十分容易受到低温打击(cool shock), 表现为质膜完整性受损^[2]。质膜损伤往往导致细胞内容物的外泄而使精子死亡, 顶体膜损伤会引发顶体酶的泄漏(假顶体反应)而使精子失去受精能力^[3]。而冷冻过程中精子质膜的损伤可能与活性氧(Reactive oxygen species, ROS), 如过氧化氢(H_2O_2)、超氧阴离子($O_2^- \cdot$)、羟自由基($OH \cdot$)、一氧化氮(NO)以及丙二醛(MDA)等水平的上升有关^[4]。

猪精液冷冻保存的降温过程主要包括 3 个阶段, 即从体温(约 38.5℃)降温至 15℃进行预平衡(减少精子对低温打击的敏感性), 从 15℃降温至 5℃平衡(使冷冻液中甘油扩散均匀)以及从 5℃降温至液氮温

① 收稿日期: 2013-12-15

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)重大科学问题导向项目资助(2011CBA01006); 遵义医学院重点学科建设项目资助(XZXK-20120702); 2013 年重庆高校创新团队建设计划资助。

作者简介: 孔德营(1979-), 男, 河北遵化人, 博士, 讲师, 主要从事生殖生理学研究。

通信作者: 张家骅, 教授, 博士生导师。

度(−196 ℃). 在不同阶段, 精子所受到的损伤也有差异, 而这种差异主要与精子细胞内 ROS 的水平相关. Drobnis 等^[5]的研究表明, 从 15 ℃降温至 5 ℃的过程中, 随着胞内 ROS 水平的上升, 精子发生的损伤也逐渐上升, 他们认为该阶段也是精子受损的主要阶段. Kim 等^[6]和 Ball 等^[7]研究发现, 液氮冷冻过程会使精子中 ROS 水平大幅度升高, 大量的 ROS 会氧化细胞膜脂质中的不饱和脂肪酸, 使之发生脂质过氧化(Lipid peroxidation, LPO)而损伤精子细胞膜. 虽然很多研究结果都表明, 精子细胞膜损伤程度与 ROS 水平相关, 但是精子冷冻过程中 ROS 水平上升的原因仍不清楚.

目前的研究发现^[8], 哺乳动物精子中含有能够清除 ROS 的酶促防御系统, 可以保护精子免受氧化损伤, 如超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPX)等. 猪精子冷冻过程中 ROS 水平的升高是否与抗氧化酶活性的变化有关? 精子细胞膜是否因为抗氧化酶活性的变化而发生损伤? 针对上述问题, 本文主要分析了巴马香猪精液冷冻保存过程中不同降温阶段(鲜精、15 ℃精液、5 ℃精液、冷冻-解冻后精液)精子质膜和顶体完整性、抗氧化酶活性以及 ROS 水平的变化, 从而研究抗氧化酶活性变化对巴马香猪精子质膜完整性的影响.

1 材料和方法

1.1 主要仪器和设备

伟力彩色精子质量检测系统(WLJY-9000 型, 北京伟力新世纪发展有限公司)、超低温温度计(600-1010K 型, 美国 Barnant 公司)、自动高速离心机(Heraeus, 德国)、荧光显微镜(Nikon E600, 日本)、电热恒温水浴锅、pH 测试仪、液氮罐、冰箱、恒温培养箱等; 抗氧化酶活性和 MDA 检测试剂盒购自上海亚培生物科技有限公司; 各试剂除甘油(中国国药上海化学试剂有限公司)、OEP(NOVA Chemical sales 公司)外, 葡萄糖、海藻糖、Tris 及 TES 等均购自 SIGMA 公司.

1.2 精液冷冻与解冻

采用人工手握采精法, 精液样品来自 10 头成年巴马香猪, 采精频率为每周一次. 所采集的精液用 4 层灭菌纱布过滤, 去除其中的胶质, 将精液转移至贮精瓶中. 取富含精子部分的精液样品, 只有活力大于 70% 的精液可用于试验. 取 5 mL 精液于 15 mL 离心管内, 加入 10 mL 精液低温保存液(BTS 溶液), 用 12 层纱布包裹并置于 15 ℃恒温培养箱中预平衡 3 h; 于 15 ℃, 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入等温冷冻 I 液(每 100 mL 冷冻 I 液由 80 mL 基础液和 20 mL 卵黄组成; 精液冷冻基础液为每 100 mL 三蒸水溶解 Tris 2.42 g, 柠檬酸 1.48 g, 果糖 1.10 g, 5 万 IU 的青霉素以及 25 mg 庆大霉素), 调整精子密度为 1.5×10^9 spz/mL, 轻轻摇匀后, 将 12 层纱布包裹的离心管置于 5 ℃冰箱中降温平衡 2 h, 用等温 II 液(每 100 mL 冷冻 II 液由 96 mL 冷冻 I 液和 4 mL 甘油组成)按照 2:1 的体积比稀释, 调整精子密度为 1.0×10^9 spz/mL, 5 ℃的冰箱继续平衡 1 h; 在 5 ℃冰箱内, 用专用注射器将精液迅速吸入等温的 0.25 mL 细管, PVP 粉末快速封管. 将细管和已预冷至 −110 ℃的超低温温度计同时置于距离液氮面 3 cm 处的冷冻架上, 盖上盖子, 于液氮上方熏蒸 20 min 左右, 待温度将至 −120 ℃始冻温度时将细管迅速放入液氮中冷冻保存. 解冻时将冻精细管(0.25 mL)在 37 ℃水浴中解冻 45 s, 用 2.25 mL 等温解冻液(95% BTS+5% 冷冻 I 液, v/v)稀释, 37 ℃水浴孵育 10 min.

1.3 精子质量检测以及抗氧化酶(SOD, GPX)和丙二醛(MDA)的测定

本实验分别检测 4 种状态的精子质量和 ROS 水平. 取各阶段精液 15 μ L, 使用计算机辅助精子分析仪(CASA)分析精子的运动参数, 包括精子活率(TMS)、精子直线运动速率(VSL)、精子曲线运动速率(VCL); 精子头部侧向移动振幅(ALH), 实验重复 5 次, 计算平均值; 采用低渗肿胀(HOST)实验进行检测精子质膜完整性(PMI)^[9], 将解冻后的精液用等温低渗液(7.35 g 柠檬酸钠和 13.51 g 果糖溶于 1 L 蒸馏水中制成)调整密度至 1.0×10^6 个, 37 ℃培养 30 min, 取 10 μ L 精液在血小板计数板上, 400 $\times$ 倒置显微镜下观察不同部位的 5 个视野, 计算尾部弯曲精子的百分率, 质膜完整的精子因低渗导致膨胀表现为尾部弯曲^[1]; 采用考马斯亮蓝染色法检测精子顶体完整性(AI)^[10], 精子涂片用 0.05% 考马斯亮蓝(G250)染色,

于 1 000×普通光学显微镜观察, 顶体完整的精子顶体部分蓝染, 顶体不完整的精子顶体不染色, 每片计数 200 个以上的精子; 使用 SOD,GPX 和 MDA 检测试剂盒, 按照试剂盒说明书测定 1×10⁸ 个精子中相关物质活性及含量.

1.4 数据统计分析

通过 SPSS 18.0 统计软件, 方差分析采用 Duncan 法进行多重比较; 相关分析采用双尾法进行显著性检验.

2 结果与分析

2.1 巴马香猪精液冷冻降温过程中精子运动参数的变化

使用 CASA 系统分析巴马香猪精液冷冻降温过程中精子 TMS,VSL,VCL 和 ALH 等指标, 以分析其运动参数的变化(表 1). 15 ℃精子各运动参数和鲜精均无显著差异($p>0.05$); 5 ℃精子的 TMS 和 VSL 均显著低于鲜精($p<0.05$), ALH 与 15 ℃精子无显著差异($p>0.05$); 冷冻-解冻后精子的 TMS 和 VSL 显著低于其他各组($p<0.05$), VCL 显著高于其他各组($p<0.05$), ALH 与其他各组无显著差异($p>0.05$). 实验提示精子在降温至低于 15 ℃后直至冷冻时的运动能力逐步降低, 冷冻-解冻后的精子运动能力最低($p<0.05$).

表 1 巴马香猪精液冷冻降温过程中精子运动参数的变化($n=10$)

检测指标	精 子 状 态			
	鲜精	15 ℃精液	5 ℃精液	解冻后精液
TMS/%	73.67±4.43 ^a	71.51±3.65 ^a	53.19±1.98 ^b	43.64±3.64 ^c
VSL/(μm·s ⁻¹)	78.16±3.31 ^a	76.83±5.16 ^a	56.21±2.53 ^b	46.41±3.08 ^c
VCL/(μm·s ⁻¹)	48.39±2.65 ^a	49.56±3.89 ^{ab}	51.35±6.36 ^{bc}	58.22±5.05 ^d
ALH/μm	2.28±0.37 ^a	2.31±0.51 ^a	2.53±0.76 ^a	2.51±0.59 ^a

注: 表 1 中各行数据上所标字母不同表明组间差异显著($p<0.05$), 所有的数据均用 Mean±SD 表示.

2.2 巴马香猪精液冷冻降温过程中精子细胞膜完整性的变化

通过 HOST 测试和考马斯亮蓝染色实验分别检测各降温阶段巴马香猪精子的 PMI 和 AI, 结果如图 1 所示.

15 ℃精子的 PMI 和 AI 与鲜精无显著差异($p>0.05$); 5 ℃精子的 PMI 和 AI 均显著低于鲜精($p<0.05$); 解冻后精子的 PMI 和 AI 进一步降低, 均显著低于其他各组($p<0.05$). 实验提示随着温度的降低, 尤其是当精液温度低于 15 ℃后, 精子的质膜和顶体开始出现损伤, 冷冻过程对精子的细胞膜损伤最为严重.

2.3 巴马香猪精液冷冻降温过程中精子抗氧化酶活性的变化

分别检测精液冷冻降温各阶段巴马香猪精子内 SOD,GPX 的活性, 结果如图 2 所示.

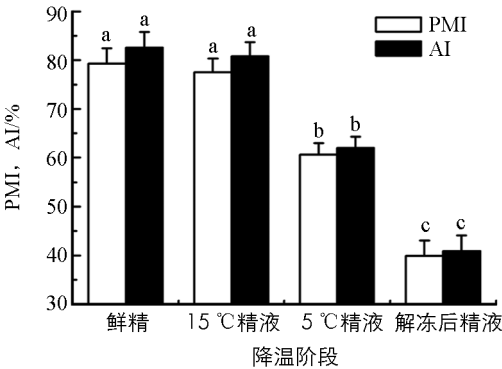


图 1 巴马香猪精液冷冻降温过程中精子 PMI 和 AI 的变化

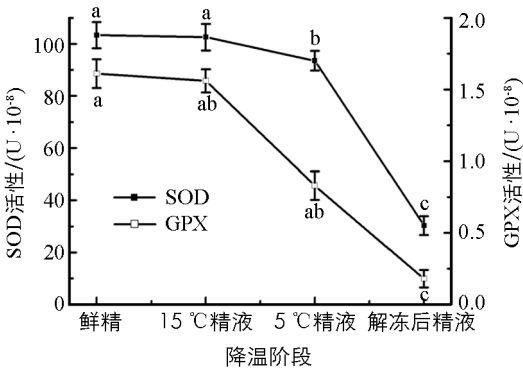


图 2 巴马香猪精液冷冻降温过程中精子抗氧化酶活性的变化

图 1 中所标字母不同表明组间差异显著($p<0.05$), 所有的数据均用 Mean±SD 表示.

图 2 中所标字母不同表明组间差异显著($p<0.05$), 所有的数据均用 Mean±SD 表示.

15 ℃精子 SOD 和 GPX 的活性与鲜精无显著差异($p>0.05$); 5 ℃精子的 SOD 活性低于鲜精($p<0.05$), GPX 活性与鲜精无显著差异($p>0.05$); 解冻后精子的 SOD 和 GPX 活性均低于其他各组($p<0.05$). 实验提示在精液冷冻降温过程中, 当精液温度低于 15 ℃后, GPX 活性受低温影响较小, SOD 对温度更为敏感, 而在冷冻阶段该两种抗氧化酶活性则均受到较大影响.

2.4 巴马香猪精液冷冻降温过程中精子活性氧水平的变化

通过 MDA 检测试剂盒检测精液冷冻降温各阶段巴马香猪精子内 MDA 水平, 结果见图 3.

15 ℃精子和 5 ℃精子的 MDA 含量与鲜精无显著差异($p>0.05$), 解冻后精子的 MDA 含量高于其他各组($p<0.05$); 各状态精子的 MDA 水平呈逐渐上升的趋势. 实验提示当温度低于 15 ℃后, 随着温度的降低, 精子内 ROS 水平逐渐上升, 尤其是精液冷冻阶段, 精子内的 ROS 水平达到最高.

2.5 巴马香猪精子抗氧化酶活性与细胞膜完整性的相关性分析

对巴马香猪各阶段精子中 SOD,Gpx 活性与 PMI,AI 的水平进行相关性分析, 结果如表 2 所示.

表 2 巴马香猪精子抗氧化酶活性与细胞膜完整性的相关性分析

检测指标	SOD 活性	Gpx 活性
PMI	0.939 **	0.690 *
AI	0.932 **	0.689 *

注: * 表示相关性显著($p<0.05$), ** 表示相关性极显著($p<0.01$).

SOD 活性与精子 PMI 和 AI 之间均具有极显著的相关性($p<0.01$), Gpx 活性与精子 PMI 和 AI 均具有显著的相关性($p<0.05$). 实验提示在巴马香猪精液冷冻的降温阶段, 随着精子内抗氧化酶活性的降低, 精子细胞膜受损程度也逐渐加大.

3 讨 论

线粒体呼吸链中的一系列氧化还原酶是机体自由基产生的主要场所之一^[11], 而精子富含线粒体, ROS 的产生也因此相当活跃^[12]. 精子膜上富含不饱和脂肪酸, ROS 能引发精子膜脂质的过氧化及其链式反应, 从而导致精子膜受损^[13]. 因此, 精液冷冻过程中 ROS 的增高, 是引起精子膜脂质过氧化, 从而造成精子损伤的一个重要原因. 机体存在抗氧化防御系统负责清除多余的 ROS, 通常情况下机体内 ROS 的产生和清除处于一种动态平衡. 然而, 当 ROS 过量产生, 超过抗氧化防御系统的清除能力时, 则会引起精子的应激损伤^[14]. 精液及精子中的酶促防御系统对清除自由基、保护细胞及机体起重要作用, 该系统中酶活性的降低将会直接影响精子的品质^[15].

本实验发现, 巴马香猪精液降温过程中, 15 ℃预平衡时, 精子内抗氧化酶活性与 MDA 水平均未发生变化, 精子没有出现明显的损伤($p>0.05$); 5 ℃平衡阶段, SOD 和 GPX 水平显著下降, 精子的运动能力和细胞膜完整性也显著降低($p<0.05$), 虽然该状态精子 MDA 水平与鲜精没有显著差异, 但由于抗氧化酶活性的降低, 可能导致了 MDA 以外的 ROS 成分的增加, 从而引发精子细胞膜的脂质过氧化反

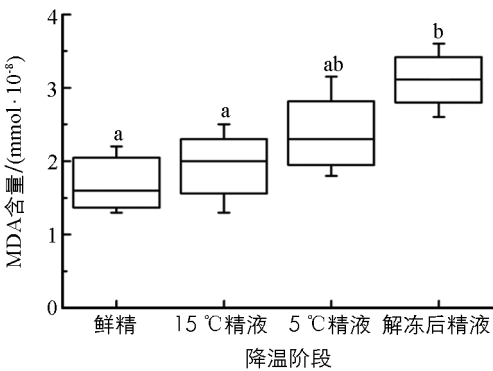


图 3 中所标字母不同表明组间差异显著($p<0.05$), 所有的数据均用 Mean±SD 表示.

图 3 巴马香猪精液冷冻降温过程中精子活性氧水平的变化

应,导致精子质膜和顶体受损,并最终表现为精子活力下降.与其他状态相比,冷冻-解冻后精子的运动能力和细胞膜完整性均显著降低($p<0.05$),SOD 和 GPX 水平最低,而 MDA 水平最高,可能是由于在冷冻过程中抗氧化酶活性过低,不能清除多余的 ROS,从而导致了精子质膜和顶体受损,并引起精子品质的降低.

巴马香猪精液冷冻过程中抗氧化酶活性与精子细胞膜完整性密切相关,其相关性分析结果也证实了这一观点.当精子降温至 15℃ 以下时,SOD 和 GPX 活性开始降低,精子细胞清除 ROS 的能力逐渐下降,精子细胞膜脂质过氧化反应增强,PMI 和 AI 也随之降低,细胞内容物外渗,精子受损;精子冷冻过程中,SOD 和 GPX 活性降至最低,细胞内 MDA 水平显著增高,细胞膜受损程度加重,精子品质进一步降低.因此,通过研究抗氧化酶活性与精子细胞膜完整性之间的关系,本实验发现精液冷冻过程中除添加非酶促抗氧化剂辅助精子细胞抵御 ROS 的损害外,保护抗氧化酶活性也可能有助于提高巴马香猪冷冻精液品质.

参考文献:

- [1] KONG De-ying, SHANG Hai-tao, GUO Ke-nan, et al. A Study on Optimizing the Cryopreservation Methods for Bama Miniature Pig Semen [J]. *Exp Anim*, 2012, 61(5): 533—542.
- [2] MALDJIAN A, PIZZI F, GLIOZZI T, et al. Changes in Sperm Quality and Lipid Composition During Cryopreservation of Boar Semen [J]. *Theriogenology*, 2005, 63(2): 411—421.
- [3] GUTHRIE H D, WELCH G R. Impact of Storage Prior to Cryopreservation on Plasma Membrane Function and Fertility of Boar Sperm [J]. *Theriogenology*, 2005, 63(2): 396—410.
- [4] MAZZILLI F, ROSSI T, SABATINI L, et al. Human Sperm Cryopreservation and Reactive Oxygen Species (ROS) Production [J]. *Acta Eur Fertil*, 1995, 26(4): 145—148.
- [5] DROBNIS E Z, CROWE L M, BERGER T, et al. Cold Shock Damage is Due to Lipid Phase Transitions in Cell Membranes: a Demonstration Using Sperm as a Model [J]. *J Exp Zool*, 1993, 265(4): 432—437.
- [6] KIM S H, YU D H, KIM Y J. Effects of Cryopreservation on Phosphatidylserine Translocation, Intracellular Hydrogen Peroxide, and DNA Integrity in Canine Sperm [J]. *Theriogenology*, 2010, 73(3): 282—292.
- [7] BALL B A, VO A T, BAUMBER J. Generation of Reactive Oxygen Species by Equine Spermatozoa [J]. *Am J Vet Res*, 2001, 62(4): 508—515.
- [8] BAUMBER J, BALL B A, LINFOR J J, et al. Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa [J]. *J Androl*, 2003, 24(4): 621—628.
- [9] JIANG Zhong-liang, LI Qing-wang, HU Jian-hong, et al. Improvement of the Quality of Boar Cryopreservation Semen by Supplementing with Low Density Lipoprotein in Diluents [J]. *Cryobiology*, 2007, 54(3): 301—304.
- [10] LARSON J L, MILLER D J. Simple Histochemical Stain for Acrosomes on Sperm from Several Species [J]. *Mol Reprod Dev*, 1999, 52(4): 445—449.
- [11] GAVELLA M, LIPOVAC V. NADH-Dependent Oxidoreductase (Diaphorase) Activity and Isozyme Pattern of Sperm in Infertile Men [J]. *Arch Androl*, 1992, 28(2): 135—141.
- [12] PLANTE M, DE LAMIRANDE E, GAGNON C. Reactive Oxygen Species Released by Activated Neutrophils, But Not by Deficient Spermatozoa, Are Sufficient to Affect Normal Sperm Motility [J]. *Fertil Steril*, 1994, 62(2): 387—393.
- [13] GALLARDO J M. Evaluation of Antioxidant System in Normal Semen [J]. *Rev Invest Clin*, 2007, 59(1): 42—47.
- [14] GRIVEAU J F, LE LANNOU D. Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa: Physiology and Pathology [J]. *Int J Androl*, 1997, 20(2): 61—69.
- [15] KHOSROWBEYGI A, ZARGHAMI N. Levels of Oxidative Stress Biomarkers in Seminal Plasma and Their Relationship with Seminal Parameters [J]. *BMC Clin Pathol*, 2007, 71(3): 363—371.

The Relationship Between Intracellular Antioxidant Enzyme Activity and Sperm Cell Membrane Integrity in Bama Miniature Pig Semen Cryopreservation

KONG De-ying¹, SHANG Hai-tao², LIU Fu-hui³,
HAN Yong¹, WEI Hong², ZHANG Jia-hua⁴

1. College of Basic Medical Science, Zunyi Medical College, Zunyi Guizhou 563000, China;

2. Department of Basic, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

3. Department of Blood Transfusion, the First Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi Guizhou 563000, China;

4. College of Animal Science and Technology, Southwest University / Chongqing Engineering Research Center for Herbivores Resource Protection and Utilization, Chongqing 400716, China

Abstract: During Bama miniature pig semen cryopreservation, Sperm cell membrane can be damaged due to the oxidation of ROS, and thus affect Sperm quality. The level of ROS in sperm cells affected by the activities of antioxidant enzymes, however, no data are available concerning the relationship between sperm intracellular antioxidant enzyme activity and cell membrane integrity during semen cryopreservation. In our experiment, we divided the sperm during cryopreservation process into four statuses, such as fresh sperm, sperm at 15 °C, sperm at 5 °C, and frozen-thawed sperm, and detected the motion parameters, plasma membrane integrity (PMI), acrosome integrity (AI) of sperm in these statuses, analysed the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (Gpx) and the level of ROS (malonaldehyde-MDA) in sperm cells. Results showed that, sperm at 15 °C and fresh sperm indexes had no significant difference ($p>0.05$). Motility, cell membrane integrity and antioxidant enzymes activity of sperm at 5 °C were lower than fresh sperm ($p<0.05$), however, sperm cells MDA levels had no significant differences ($p>0.05$). Motility, cell membrane integrity and antioxidant enzyme activities of frozen-thawed sperm were lower than those in other groups ($p<0.05$), and sperm MDA level is significantly higher than that of other groups ($p<0.05$). Meanwhile, the correlation between SOD, Gpx activity and sperm PMI, AI were significant ($p<0.05$). And we can conclude that, When the temperature was below 15 °C to freezing, SOD and GPX activity of sperm decreased gradually, cell membrane lipid peroxidation of sperm enhanced, cell membrane damaged, the contents of sperm exsposed, and this is an important reason leading to the reduction of semen quality.

Key words: Bama miniature pigs; semen cryopreservation; reactive oxygen species; antioxidant enzyme activity; cell membrane integrity

