

卵黄和低密度脂蛋白对冷冻保存绵羊精子胆固醇、磷脂含量的影响

郑云胜, 宏伟, 倪利平, 田东海, 芦永跃, 邓常胜, 李金泉

(内蒙古农业大学, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 为了探索绵羊冷冻精液受精率低的原因, 在稀释液用低密度脂蛋白代替卵黄冷冻绵羊精液, 研究 LDL 对冷冻中精子脂类含量的影响。结果表明, 以卵黄稀释液冷冻精液, 精子胆固醇含量从鲜精的 $234.54 \text{ nmol}/10^9$ 降低到 $163.76 \text{ nmol}/10^9$ 精子, 胆固醇与磷脂的比值(c/p)从 0.54 下降到 0.36; 以 $9 \text{ g}/100\text{mL}$ LDL 代替卵黄, 冷冻后胆固醇含量为 $243.73 \text{ nmol}/10^9$ 精子, c/p 值保持在 0.50。研究得出在卵黄稀释液中冷冻绵羊精液, 精子胆固醇流失, c/p 值下降; 以 LDL 代替卵黄, 可有效保护精子胆固醇, 避免流失, 维持了精子 c/p 值。

关键词: 绵羊; 冷冻精液; 卵黄; 低密度脂蛋白; 磷脂; 胆固醇; 胆固醇和磷脂比例

中图分类号: S826 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)06-0112-04

Effects of Egg Yolk and LDL on Changes of Cholesterol and Phospholipids in Sheep Spermatozoa during Freezing

ZHENG Yun-sheng, HONG Wei, NI Li-ping, TIAN Dong-hai,

LU Yong-yue, DENG Chang-sheng, LI Jin-quan

(Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract: For search the reasons of low pregnant rate of sheep frozen semen, the paper studied on the changes of cholesterol and phospholipids in sheep spermatozoa during freezing, which was protected with egg yolk or low density lipoprotein (LDL) in diluents. The results indicated that the contents of cholesterol of sheep spermatozoa decreased from $234.54 \text{ nmol}/10^9$ sperm of fresh semen to $163.76 \text{ nmol}/10^9$ sperm of frozen semen and the ratio of cholesterol and phospholipids(c/p) decreased also from 0.54 to 0.36 when egg yolk was added in diluents. When egg yolk in diluents was instead with LDL $9 \text{ g}/100\text{mL}$, content of cholesterol in spermatozoa was $243.73 \text{ nmol}/10^9$ sperm after frozen and c/p was also maintained 0.50. In conclusion, the content of cholesterol and c/p in sheep spermatozoa decreased during freezing in egg yolk extender and LDL could prevent the content of cholesterol and c/p from decreases.

Key words: Sheep; Semen frozen; Egg yolk; Low density lipoprotein (LDL); Phospholipids; Cholesterol; Ratio of cholesterol and phospholipids(c/p)

我国对绵羊精液冷冻技术的研究开始于 20 世纪 70 年代。绵羊冷冻精液的研究和推广取得了较好效果, 有试验表明, 在情期受胎率可达 60%, 但仍低于自然交配的受胎率。根据 Davis 的报道^[1], 受胎率低的原因之一可能是稀释液中卵黄的磷脂进入精子质膜和顶体膜, 另外, 稀释液中缺少胆固醇, 精子中的胆固醇流失, 降低了精子胆固醇与磷脂的比

例使绵羊精子提前获能, 甚至顶体反应, 失去潜在的受精力, 造成了受精力低下, 影响了绵羊冷冻精液在生产中的应用。

Demianowicz 等^[2]和 Moussa 等^[3]研究证实, 卵黄中的低密度脂蛋白 (LDL) 具有冷冻保护作用, 冷冻-解冻后精子活力及运动特性均有所提高。Graham^[4]也曾指出, 在精子冷冻-解冻过程中, LDL 可以黏附在精子细胞膜上, 从而保护精子质膜的完整

收稿日期: 2008-04-15

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目 (200408020407)

作者简介: 郑云胜 (1958-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 教授, 博士, 主要从事家畜繁殖方面的研究。

性。LDL 在绵羊精液冷冻的研究中还未见报道。因此,本研究将分析绵羊精液在冷冻过程中精子磷脂和胆固醇含量的变化,在此基础上,在稀释液中添加低密度脂蛋白,避免冷冻过程中绵羊精子中胆固醇的降低,以提高绵羊精液冷冻保存效果。

1 材料和方法

1.1 材料

- 1.1.1 试验动物 内蒙古细毛羊公羊 3 只。
- 1.1.2 精液采集 采用假阴道法采精。
- 1.1.3 基础稀释液配制 Tris 2.42 g, 柠檬酸 1.34 g, 葡萄糖 1.00 g, 甘油 6 mL, 用蒸馏水定容至 100 mL。
- 1.1.4 LDL 的提取 采用 Moussa 等^[3]介绍的方法提取卵黄 LDL。

1.2 试验设计

- 1.2.1 试验一 取基础稀释液 88 mL, 添加 12 mL 卵黄, 制成卵黄稀释液, 设为 EY 组, 测定鲜精及稀释后、平衡后、冷冻-解冻后精子的胆固醇和磷脂含量及胆固醇与磷脂比例(c/p 值)。
- 1.2.2 试验二 取基础稀释液 88 mL, 分别加入 5, 8, 9, 10, 15 g/100mL 卵黄低密度脂蛋白(LDL) 替代卵黄, 用蒸馏水定容至 100 mL, 设为 LDL5、LDL8、LDL9、LDL10 和 LDL15 组, 以卵黄稀释液为对照(EY), 测定冷冻过程中精子胆固醇、磷脂含量和 c/p 值。

1.3 精液冷冻方法

- 1.3.1 稀释和平衡 将采得的精液用稀释液进行 1:4 稀释, 将稀释的精液分装于 0.5 mL 细管中, 用 10~20 层纱布包裹后放到 4℃ 冰箱中平衡 2.5 h。
- 1.3.2 冷冻 以液氮为冷源, 用自制的具有漂浮器

的液氮槽冷冻, 漂浮器自动保持细管距液氮面 4 cm, 将平衡后的精液放到漂浮器上液氮熏蒸 15 min, 然后投入液氮。

- 1.3.3 解冻 在 38℃ 水浴中解冻 45 s。

1.4 测定指标与方法

- 1.4.1 精子中脂质的提取 精子中脂质的提取采用 Kates M^[5]的方法。
- 1.4.2 精子中磷脂的测定 磷脂的测定采用 Duck-Chong^[6]的方法。
- 1.4.3 精子中胆固醇的测定 酶比色法。采用 CHO 总胆固醇试剂盒, 由中生北控生物科技股份有限公司生产。

1.5 数据统计与分析

试验数据用 SAS 软件处理并进行显著性检验, p<0.05 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 卵黄对绵羊精液冷冻过程中精子脂类的影响

以卵黄稀释液作为保护剂, 绵羊精液在冷冻过程中, 精子胆固醇、磷脂含量和胆固醇与磷脂的比例(c/p), 列于表 1。

由表 1 表明, 新鲜精液中精子的胆固醇含量为 234.54 nmol/10⁹ 精子, 稀释、平衡对精子胆固醇含量影响不大, 冷冻后下降为 163.76 nmol/10⁹ 精子。鲜精中磷脂含量为 431.61 nmol/10⁹ 精子, 平衡后显著增加, 为 542.62 nmol/10⁹ 精子, 冷冻后下降至 449.18 nmol/10⁹ 精子, 但与鲜精差异不显著。绵羊鲜精的 c/p 值为 0.54, 稀释和平衡对绵羊精子的 c/p 值影响不大, 但冷冻后, 绵羊精子的 c/p 值下降为 0.36, 显著低于鲜精液、稀释和平衡后。

表 1 卵黄稀释液对精液冷冻过程中精子脂类含量的影响

Tab.1 Effect of egg yolk on change of lipids in sheep spermatozoa during freezing				nmol/10 ⁹ 精子
处理 Treatment	n	胆固醇 Cholesterol	磷脂 Phospholipids	c/p
鲜精 Fresh semen	3	234.54±6.96a	431.61±8.12b	0.54a
稀释后 Post dilution	3	245.99±14.97a	454.62±24.22b	0.54a
平衡后 Post equilibration	3	248.68±12.04a	542.62±40.71a	0.46b
冷冻后 Post frozen-thawed	3	163.76±11.33b	449.18±14.81b	0.36c

注: 同一列字母不同者为差异显著(p<0.05)。
Note: Different letters indicate significant differences in a column(p<0.05).

2.2 LDL 对绵羊精液冷冻过程中精子脂类的影响

2.2.1 LDL 对精液冷冻过程中精子胆固醇含量的影响 在稀释液中以 LDL 代替卵黄, 精液在冷冻过程中, 绵羊精子的胆固醇含量列于表 2。由表 2 表明, 精液经稀释后, 各组间胆固醇含量差异不显著。

平衡后, LDL8、LDL9 和 LDL10 组的精子胆固醇含量高于 EY 和 LDL15 组; 冷冻之后, LDL9 组的精子胆固醇含量为 243.73 nmol/10⁹ 精子, 与 LDL10 组差异不显著, 但显著高于 EY, LDL5, LDL8 和 LDL15 组; LDL8 与 LDL10 组间差异不显著; LDL8, LDL9 和

LDL10组高于LDL5和LDL15组精子的胆固醇含量, LDL5和LDL15组高于EY组的精子胆固醇含量。在EY, LDL5和LDL15组, 鲜精液、稀释后和平衡后精子的胆固醇含量差异不显著, 冷冻后分别显著下降为163.76, 198.77和204.74 nmol/10⁹精子; 在LDL8, LDL9和LDL10组, 鲜精和稀释后的精子胆固醇含量差异不显著; 平衡后都显著提高, 分别为260.61,

260.65和257.43 nmol/10⁹精子, 精液冷冻后显著下降, 分别为226.86, 243.73和233.92 nmol/10⁹精子, 但与鲜精液和稀释后的精子胆固醇含量差异不显著。
2.2.2 LDL对精液冷冻过程中精子磷脂含量的影响 在稀释液中以LDL代替卵黄, 绵羊精液在冷冻过程中, 精子磷脂的含量列于表3。

表2 LDL对精液冷冻过程中绵羊精子胆固醇含量的变化

Tab.2 Effect of LDL on change of cholesterol in sheep spermatozoa during freezing							nmol/ 10 ⁹ 精子
处理 Treatment	n	EY	LDL	5LDL8	LDL9	LDL10	LDL15
鲜精 Fresh semen	3	234.54±6.96a	234.54±6.96a	234.54±6.96b	234.54±6.96b	234.54±6.96b	234.54±6.96a
稀释后 Post dilution	3	245.99±14.97aA	236.52±1.07aA	241.74±3.18bA	241.73±3.59bA	238.96±4.47bA	236.07±1.32aA
平衡后 Post equilibration	3	248.68±12.04aB	252.69±5.81aAB	260.61±2.15aA	260.65±5.82aA	257.43±2.64aA	248.51±3.18aB
冷冻后 Post frozen-thawed	3	163.76±11.33bD	198.77±4.49bC	226.86±3.01bB	243.73±2.73bA	233.92±6.67bAB	204.74±4.49bC

注: 同一行大写字母不同者为差异显著 (p<0.05); 同一列小写字母不同者为差异显著 (p<0.05)。
Note: Different capital letters indicate significant differences in a line (p<0.05); different letters indicate significant differences in a column (p<0.05).

表3 LDL对绵羊精液冷冻过程中精子磷脂含量的影响

Tab.3 Effect of LDL on change of phospholipids in sheep spermatozoa during freezing							nmol/ 10 ⁹ 精子
处理 Treatment	n	EY	LDL	5LDL8	LDL9	LDL10	LDL15
鲜精 Fresh semen	3	431.61±8.12b	431.61±8.12b	431.61±8.12c	431.61±8.12c	431.61±8.12c	431.61±8.12b
稀释后 Post dilution	3	454.62±24.22bA	452.66±8.11bA	453.49±5.88cA	456.22±10.42bA	458.43±15.95bA	444.29±10.67bA
平衡后 Post equilibration	3	542.62±40.71aA	511.35±10.15aA	528.14±15.76aA	530.58±9.78aA	533.86±9.57aA	522.87±12.89aA
冷冻后 Post frozen-thawed	3	449.18±14.81bB	460.41±9.84bB	484.31±9.35bA	486.67±22.41bA	482.24±7.22bA	451.75±7.76bB

注: 同一行大写字母不同者为差异显著 (p<0.05); 同一列小写字母不同者为差异显著 (p<0.05)。
Note: Different capital letters indicate differences in a line (p<0.05); different letters indicate significant differences in a column (p<0.05).

由表3显示, 用LDL代替卵黄, 从稀释到平衡后, 精子磷脂在各组均显著提高, 冷冻后精子磷脂含量较平衡后显著下降。在各组之间, 稀释后和平衡后, 绵羊精子磷脂含量差异不显著; 冷冻后, LDL8, LDL9, LDL10之间差异不显著, 高于EY, LDL5和

LDL15组。
2.2.3 LDL对精液冷冻过程中精子胆固醇与磷脂比例的影响 在稀释液中以LDL代替卵黄, 绵羊精液在冷冻过程中精子的c/p列于表4。

表4 LDL对冷冻过程中绵羊精子胆固醇和磷脂(c/p)比例的影响

Tab.4 Effect of LDL on change of c/p in sheep spermatozoa during freezing							
处理 Treatment	n	EY	LDL	5LDL8	LDL9	LDL10	LDL15
新鲜精液 Fresh semen	3	0.54A	0.54A	0.54A	0.54A	0.54A	0.54A
稀释后 Post dilution	3	0.54aA	0.52aA	0.53aA	0.53aA	0.52aA	0.53aA
平衡后 Post equilibration	3	0.46aB	0.49aA	0.49aAB	0.49aA	0.48aA	0.47aB
冷冻后 Post frozen-thawed	3	0.36cC	0.43bB	0.47abB	0.50aA	0.48aA	0.45bB

注: 同一行小写字母不同者为差异显著 (p<0.05); 同一列大写字母不同者为差异显著 (p<0.05)。
Note: Different letters indicate significant differences in a line (p<0.05); different capital letters indicate significant differences in a column (p<0.05).

表4说明, 鲜精液的胆固醇和磷脂比例为0.54。EY组鲜精和稀释后差异不显著, 平衡后较鲜精和稀释后显著下降, 冷冻后进一步下降为0.36; LDL5和LDL8组鲜精、稀释后和平衡后c/p差异不显著, LDL5组冷冻后c/p显著下降, LDL8组冷冻前后c/p差异不显著, 但低于鲜精和稀释后的精子胆固醇和磷脂比例; LDL9和LDL10组鲜精、稀释后、平衡后和冷冻后精子c/p值差异不显著; LDL15组鲜精和稀释后精子的c/p差异不显著, 平衡后和冷冻后c/p差异不显著, 但低于鲜精和稀释后的c/p。在各组

之间, 冷冻前精子中胆固醇与磷脂比值差异均不显著, 冷冻后LDL9(0.50)和LDL10组(0.48)显著高于其他各组, LDL5, LDL8和LDL15组间c/p差异不显著, 但这3组都显著高于EY组的精子胆固醇和磷脂比例(0.36)。

3 讨论

新鲜绵羊精液中精子的胆固醇和磷脂含量分别为234.54和443.33 nmol/10⁹精子, 胆固醇和磷脂的比值为0.54。在稀释液中添加卵黄, 精液经冷冻

后, 磷脂含量与鲜精无差异, 而胆固醇含量则显著下降为 $163.76 \text{ nmol}/10^9$ 精子, 比值降为 0.36。说明卵黄在绵羊精液冷冻过程中, 磷脂可能进入精子, 而不能防止胆固醇的流失。Davis^[1]报道, 精子获能所需的时间与精子的磷脂和胆固醇比例为强相关。因此, 我们推测绵羊精液冷冻后受精力的降低, 可能与精子在母羊生殖道内获能时间短于正常精子, 在到达受精地点时已失去受精潜力有关。

在稀释液中以 LDL 代替卵黄, 结果说明, 添加 $9 \text{ g}/100\text{mL}$ LDL 后, 精液经冷冻, 胆固醇含量仍可达到 $243.74 \text{ nmol}/10^9$ 精子, 胆固醇和磷脂的比值为 0.50, 可有效防止了精子胆固醇在冷冻过程中的流失, 维持了胆固醇与磷脂的比值。

参考文献:

- [1] Davis B K. Timing of fertilization in mammal sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval [J]. Cell Biology, 1981, 78(12): 7560–7564.
- [2] Demianowicz W, Strezek J. The effect of lipoprotein fraction of egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state [J]. Reprod Dom Anim, 1996, 31: 279–280.
- [3] Moussa M, Martinet 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.
- [4] Graham J K, Foote R H. Effects of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing [J]. Cryobiology, 1987, 24: 42–52.
- [5] Kates M. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology[M]//Technique of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids. 2nd edition, New York, Elsevier, 1986: 100.
- [6] Duck-Chong C G. A rapid sensitive method for determining phospholipid phosphorus involving digestion with magnesium nitrate [J]. Lipids, 1979, 14: 492.