

江才雨, 康言, 王旭洋, 等. 大豆卵磷脂对湖羊精液 4 °C 保存效果的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (2): 1-6.

JIANG C Y, KANG Y, WANG X Y, et al. Effect of soybean lecithin on preservation of Hu sheep semen at 4 °C [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (2): 1-6.

大豆卵磷脂对湖羊精液 4 °C 保存效果的影响

江才雨, 康言, 王旭洋, 李拥军*

(扬州大学动物科学与技术学院/江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 江苏 扬州 225009)

摘要: 为探究大豆卵磷脂 (SL) 对湖羊精液 4 °C 保存效果的影响, 在湖羊精液基础稀释液中添加不同浓度 (0、0.1%、0.2%、0.3% 和 0.4%) 的 SL 进行 4 °C 低温保存试验, 通过在不同保存时间 (0~6 d) 对精子活率、活力、直线速率、曲线速率、路径速率、质膜完整率和顶体完整率进行测定, 确定湖羊精液低温保存稀释液中 SL 的最佳添加浓度。结果表明: 保存 2、5、6 d, 0.1% SL 组的精子活率、活力均显著高于其他组 ($P < 0.05$); 保存 3 d, 0.1% SL 组的精子直线速率显著高于其他组 ($P < 0.05$); 保存 4 d, SL 各组的精子曲线速率和路径速率显著高于对照组 ($P < 0.05$); 保存 1、5 d, 0.1% SL 组的精子质膜完整率显著高于其他组 ($P < 0.05$); 保存 2、6 d, 0.1% SL 组的精子顶体完整率显著高于其他组 ($P < 0.05$)。结论: 在低温保存条件下, 添加 0.1% SL 可以有效地延长湖羊精子的存活时间, 提高精液质量。

关键词: 湖羊; 精液; 大豆卵磷脂; 低温保存

中图分类号: S826 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)02-0001-06

Effect of soybean lecithin on preservation of Hu sheep semen at 4 °C

JIANG Caiyu, KANG Yan, WANG Xuyang, LI Yongjun*

(School of Animal Science and Technology, Yangzhou University/Jiangsu Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Molecular Design, Yangzhou 225009, China)

Abstract: In order to investigate the effect of soy lecithin (SL) on the preservation of Hu sheep semen at 4 °C, different concentrations (0, 0.1%, 0.2%, 0.3% and 0.4%) of SL were added to the base dilution of Hu sheep semen for 4 °C cryopreservation test. The optimum concentration of SL in the cryopreservation diluent of Hu sheep semen was determined by measuring sperm motility, viability, linear rate, curve rate, path rate, plasma membrane intactness and acrosome intactness at different points of the preservation time (0-6 days). The results showed that for 2, 5 and 6 d of preservation, the sperm motility and vitality of the 0.1% SL group were significantly higher than those of the other groups ($P < 0.05$); for 3 d of preservation, the linear rate of the 0.1% SL group was significantly higher than those of the other groups ($P < 0.05$); for 4 d of preservation, the curve rate and path rate of the SL groups were significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$); for 1 and 5 d of preservation, the sperm plasma membrane integrity rate was significantly higher in the 0.1% SL group than in the other groups ($P < 0.05$); and for 2 and 6 d of preservation, the sperm acrosome integrity rate was significantly higher in the 0.1% SL group than in the other four groups ($P < 0.05$). In conclusion, under cryopreservation conditions, the addition of 0.1% SL effectively prolonged the survival time of spermatozoa and improved the quality of semen in Hu sheep.

Keywords: Hu sheep; semen; soy lecithin; cryopreservation

人工授精技术可以提高优良公畜种质资源的利用率, 防止精液的浪费, 提高繁殖效率^[1]。精液保存则是人工授精技术中的重要环节, 精液保存方法分为液态保存与冷冻保存。冷冻保存技术可使优质公畜的精液得到长期保存, 但与猪和牛相比, 绵羊精液解

冻后的精子活力、活率分别下降到 30% 和 40%^[2]。这是由于绵羊精液对超低温耐受能力更差, 对温度变化更加敏感。相对于精液冷冻保存技术, 液态 (4 °C) 保存方法在温度上对精液造成的损害较小, 可逐渐减弱精子代谢机能和活动力, 从而延长精子存活时间^[3]。因此, 采用 4 °C 保存方法进行人工授精是一种较为直接、有效的方法。

为确保在低温环境下精子能够存活更久, 在稀释液中添加抗冻保护剂可以延长精子的存活时间并维持其较好的受精能力^[3]。大豆卵磷脂 (SL) 是磷脂酰胆碱 (PC) 和几种脂肪酸的天然混合物, 可以替代

收稿日期: 2023-05-18; 修回日期: 2023-11-27

基金项目: 江苏省现代农业产业技术体系建设项目 (JATS [2022] 491)

第一作者: 江才雨, 女, 硕士

* 通信作者: 李拥军, 博士, 教授, 研究方向为动物繁育与羊生产, E-mail: yzliyongjun@163.com。

卵黄中的高密度脂蛋白和磷脂，还可以预防或改善精液在冷藏和冷冻保存过程中精子质膜的损害^[4]。有研究表明，在常规精液稀释液中添加 SL 能够在 4 ℃ 有效提高猪精子的活力、有效存活时间、总存活时间和质膜完整性，其中 0.6 g/L SL 的添加效果最优^[5]。然而，目前有关 SL 在湖羊精液 4 ℃ 保存的研究鲜见报道。因此，本文通过研究在湖羊精液基础稀释液中添加不同浓度的 SL，检测精子活率、活力、质膜完整率和顶体完整率等指标，分析 SL 对湖羊精液 4 ℃ 保存效果的影响，以期筛选出适宜浓度的 SL，为今后湖羊精液低温保存技术在实际生产中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

本试验所选用的 3 只健康成年湖羊来源于扬州大学实验羊场，年龄为 2~3 岁，体格健壮，无任何疾病且繁殖性能优良。每日饲喂 2 次精饲料和草料。圈养，自由饮水。

1.2 主要试剂与仪器

柠檬酸钠（纯度≥99.5%，货号为 S11111），青霉素钠（货号为 S17030）和链霉素硫酸盐（货号为 S17085），均购自上海源叶生物科技有限公司；SL（纯度≥60%，货号为 A510030-0100），考马斯亮蓝 G-250（货号为 C8420），均购自生工生物工程（上海）股份有限公司；4%多聚甲醛（货号为 E672002），购自武汉赛维尔生物科技有限公司；85%磷酸（货号为 10015418），95%酒精（货号为 10009218），均购自国药集团化学试剂有限公司；迈郎精子全自动分析系统（CASA）（型号为 ML-608JZII），购自南宁松景天伦生物科技有限公司。

1.3 稀释液配制

使用电子天平准确称量果糖 0.5 g，柠檬酸钠 2.4 g，青霉素钠 0.031 2 g 和链霉素硫酸盐 0.069 4 g，充分溶于 100 mL 超纯水，用 0.22 μm 过滤器过滤除菌，配制成基础稀释液。在基础稀释液中添加不同浓度（0、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%）的 SL，然后放置 4 ℃ 冰箱保存备用，于采精前 1 h 放入恒温水浴锅中预热。

1.4 精液采集与稀释

采用假阴道法采集公羊精液，将精液置于 37 ℃ 保温杯中，并在 30 min 内带回实验室进行精液质量检查，要求气味略带腥味，颜色为乳白色，密度适中，且精子活率达到 80% 以上则可用于试验。将检测合格的精液混合并与不同浓度 SL 的稀释液按 1:9 的比例进行等温稀释，用多层脱脂棉包裹置于 4 ℃ 冰

箱。在精液保存期间每隔 24 h 检测精子活率、活力、运动性能、质膜完整率和顶体完整率等指标。

1.5 精液品质检测

1.5.1 精子活率、活力及运动性能测定

精液置 37 ℃ 水浴锅中孵育 3 min，缓慢混匀，抽取 1.8 μL 精液滴在精子计数板上，采用 CASA 随机采集 5 个视野，对精子活力、活率、直线速率、曲线速率和路径速率等运动参数进行检测。

1.5.2 质膜完整性检测

低渗肿胀试验（HOST 试验）用于评估精子膜的质膜完整性。当精子在低渗环境中，水分子会通过精子质膜进入膜内而导致精子尾部体积变大而膨胀弯曲，这是精子质膜完整的标志^[6]。低渗溶液的配制：称取 0.49 g 柠檬酸钠，0.9 g 果糖，用 100 mL 灭菌超纯水充分溶解。检测时，取 10 μL 精液与 100 μL 低渗透溶液在离心管中均匀混合，放置 37 ℃ 水浴锅中孵育 30 min 后，取 1 μL 处理过的精液滴于计数板上，在油镜下用 Smart 数字成像系统进行观察，采集 10 个不同视野下的图像，每个视野至少计数 200 个精子，计算弯尾精子百分率，即质膜完整率。

1.5.3 顶体完整性检测

使用考马斯亮蓝 G250 染色法评估精子顶体完整性。取 50 μL 精液置离心管中，加入 1 mL 4%多聚甲醛固定液吹打混匀，固定 10 min，在离心机中 2 000 r/min 离心 5 min，弃上清液，缓慢吹打剩余沉淀，取 10 μL 处理过的精液滴加到载玻片上制成抹片，晾干，用考马斯亮蓝染液染色 30 min，水洗，风干。在油镜下用 Smart 数字成像系统进行观察，采集 15 个不同视野下的图像，每个视野至少计数 200 个精子，统计顶体完整率。

1.6 数据统计与分析

采用 Excel 2021 软件整理试验数据，然后运用 SPSS 26.0 软件对所得试验数据进行单因素方差分析。结果均以“平均值±标准差”表示。每组数据设 3 次重复， $P < 0.05$ 表示差异显著， $P > 0.05$ 表示差异不显著。

2 结果与分析

2.1 低温保存下不同浓度 SL 对湖羊精子活率和活力的影响

由表 1 和表 2 可知，精子活率、活力随着精液保存时间的延长均呈缓慢下降的趋势。与其他 SL 处理组相比，0.1% SL 组的下降趋势最为缓慢。保存 1 d，0.1%、0.2% SL 组的精子活率、活力均显著高于其他组（ $P < 0.05$ ）；保存 2、5、6 d，0.1% SL 组的精子活率、活力均显著高于其他 4 组（ $P < 0.05$ ）；保存

4 d, 0.1%、0.2%和0.3% SL组的精子活率和活力 均显著高于其他2组 ($P<0.05$)。

表1 不同浓度SL对低温保存湖羊精子活率的影响

%

保存时间/d	SL浓度/%				
	0	0.1	0.2	0.3	0.4
0	95.89±0.11	96.00±0.45	96.16±0.21	96.05±0.26	95.87±0.29
1	87.35±0.25 ^c	95.18±0.05 ^a	95.69±0.09 ^a	91.37±0.30 ^b	91.12±0.51 ^b
2	83.92±0.41 ^c	95.09±0.13 ^a	93.52±0.16 ^b	91.82±0.20 ^c	89.00±0.15 ^d
3	65.44±0.72 ^d	93.32±0.14 ^a	91.88±0.28 ^{ab}	90.50±0.78 ^b	86.85±0.51 ^c
4	40.70±0.59 ^c	88.62±0.18 ^a	88.91±0.18 ^a	87.52±0.45 ^a	76.99±0.56 ^b
5	34.78±0.19 ^d	87.09±0.49 ^a	83.49±0.18 ^b	77.00±0.85 ^c	35.81±0.26 ^d
6	12.08±0.47 ^d	82.01±0.06 ^a	69.16±0.09 ^b	22.85±0.92 ^c	13.44±0.76 ^d

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

表2 不同浓度SL对低温保存湖羊精子活力的影响

%

保存时间/d	SL浓度/%				
	0	0.1	0.2	0.3	0.4
0	91.39±0.29	91.46±0.18	92.01±0.48	91.06±0.20	91.48±0.52
1	78.57±0.39 ^c	90.99±0.25 ^a	90.84±0.05 ^a	83.13±0.18 ^b	82.05±1.03 ^b
2	72.05±0.58 ^e	90.03±0.55 ^a	86.72±0.10 ^b	83.23±0.30 ^c	78.16±0.20 ^d
3	55.79±2.12 ^e	88.32±0.02 ^a	84.50±0.13 ^b	80.86±0.75 ^c	76.53±0.37 ^d
4	28.62±2.17 ^c	78.33±0.69 ^a	79.91±0.42 ^a	77.49±0.88 ^a	65.13±1.20 ^b
5	22.68±0.31 ^c	77.00±0.75 ^a	73.05±0.53 ^b	64.90±0.40 ^c	26.59±1.19 ^d
6	8.33±0.32 ^c	72.70±0.10 ^a	57.68±0.24 ^b	17.28±0.64 ^c	10.04±0.27 ^d

2.2 低温保存下不同浓度SL对湖羊精子运动性能的影响

由表3可知，在4℃时，随着保存时间的延长，精子的直线速率、曲线速率和路径速率均呈逐渐下降趋势，其中0.1% SL组下降较为平缓。保存1、2 d, 0.1%、0.2% SL组以及对照组的精子直线速率显著高于其他2组 ($P<0.05$)；保存3 d, 0.1% SL组的精子直线速率显著高于其他组 ($P<0.05$)；保存4 d,

0.4% SL组的精子直线速率显著低于其他4组 ($P<0.05$)；保存5 d, 0.4% SL组与对照组的精子直线速率显著低于其他3组 ($P<0.05$)。保存1 d, 0.3%、0.4% SL组的精子曲线速率显著低于其他组 ($P<0.05$)，0.4% SL组最低；保存4 d, SL各组的精子曲线速率和路径速率显著高于对照组 ($P<0.05$)；保存5、6 d, 对照组的精子曲线速率和路径速率显著低于其他组 ($P<0.05$)。

表3 不同浓度SL对低温保存湖羊精子运动性能的影响

μm/s

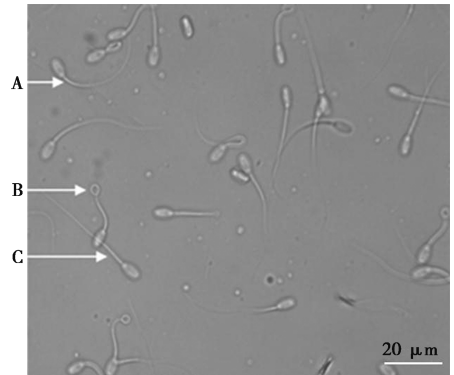
指标	保存时间/d	SL浓度/%				
		0	0.1	0.2	0.3	0.4
直线速率	0	39.59±0.39	40.07±0.50	39.53±0.37	39.64±0.23	39.81±0.23
	1	37.48±0.34 ^a	37.23±0.60 ^a	37.46±0.25 ^a	34.85±0.38 ^b	34.66±0.09 ^b
	2	36.06±0.29 ^a	36.85±0.06 ^a	36.13±0.12 ^a	33.85±0.38 ^b	33.63±0.21 ^b
	3	34.85±0.09 ^c	36.67±0.02 ^a	35.43±0.21 ^b	33.66±0.09 ^d	32.22±0.19 ^c
	4	33.25±0.81 ^b	35.68±0.30 ^a	34.54±0.33 ^{ab}	33.45±0.10 ^b	30.94±0.51 ^c
	5	27.10±0.81 ^b	34.60±0.36 ^a	34.08±0.32 ^a	32.94±0.30 ^a	28.86±0.80 ^b
	6	20.62±0.27 ^d	33.19±0.33 ^a	32.99±0.21 ^a	32.06±0.27 ^b	26.13±0.24 ^c

续表3

指标	保存时间/d	SL 浓度/%				
		0	0.1	0.2	0.3	0.4
曲线速率	0	75.61±0.21	75.87±0.80	76.07±0.34	74.36±0.46	74.82±0.54
	1	73.38±1.43 ^a	72.36±0.71 ^a	73.89±0.30 ^a	68.02±0.89 ^b	66.62±2.34 ^b
	2	68.21±2.64	71.31±1.51	71.60±0.53	66.18±1.08	66.02±1.95
	3	60.30±0.89 ^d	70.94±1.53 ^a	67.86±0.52 ^{ab}	65.26±0.16 ^{bc}	62.72±1.64 ^{cd}
	4	47.75±2.55 ^b	65.17±1.84 ^a	66.75±1.14 ^a	62.37±0.70 ^a	62.29±2.65 ^a
	5	44.68±2.07 ^c	64.64±0.09 ^a	63.88±1.44 ^a	61.87±0.60 ^{ab}	58.53±1.93 ^b
	6	34.07±0.19 ^d	64.27±0.44 ^a	64.10±0.93 ^{ab}	61.45±1.22 ^b	49.24±1.02 ^c
路径速率	0	51.42±0.89	53.65±0.57	53.46±0.46	51.66±0.60	51.33±0.63
	1	49.90±3.43	51.16±0.50	51.82±0.23	48.06±0.94	46.83±0.85
	2	48.23±1.87 ^{ab}	50.16±1.08 ^a	51.39±1.14 ^a	47.38±0.96 ^{ab}	45.58±0.70 ^b
	3	42.64±0.63 ^d	50.42±1.07 ^a	47.98±0.37 ^{ab}	46.79±0.77 ^{bc}	44.35±1.16 ^{cd}
	4	33.77±1.80 ^b	46.08±1.30 ^a	46.60±1.35 ^a	44.51±0.25 ^a	44.05±1.88 ^a
	5	31.59±1.46 ^c	45.71±0.06 ^a	45.94±0.59 ^a	43.98±0.63 ^{ab}	41.39±1.36 ^b
	6	24.09±0.14 ^d	45.44±0.31 ^a	45.62±1.18 ^a	42.81±0.22 ^b	34.82±0.72 ^c

2.3 低温保存下不同浓度 SL 对湖羊精子质膜完整率的影响

由图 1 和表 4 可知,随着精液低温保存时间的延长,每组精子质膜完整率呈不断下降的趋势,其中采用 0.1% SL 保存的精子质膜完整率下降较为平缓。保存 1、5 d, 0.1% SL 组的精子质膜完整率显著高于其他组 ($P<0.05$); 保存 2、3 d 时, 0.1%、0.2% SL 组的精子质膜完整率显著高于其他各组 ($P<0.05$); 保存 4、6 d, 0.3% SL 组的精子质膜完整率显著低于其他组 ($P<0.05$)。



A、B. 尾部发生弯曲、肿胀,为质膜完整的精子; C. 尾部呈直线状,为质膜不完整的精子。

图 1 湖羊精子在低渗溶液中的形态

表 4 不同浓度 SL 对低温保存湖羊精子质膜完整率的影响

%

保存时间/d	SL 浓度/%				
	0	0.1	0.2	0.3	0.4
0	82.39±1.03	83.94±0.72	82.04±0.07	83.19±0.73	82.02±0.58
1	78.14±0.71 ^b	82.81±0.51 ^a	78.39±0.33 ^b	75.58±1.22 ^c	78.17±0.59 ^b
2	70.31±0.35 ^b	80.25±0.76 ^a	79.23±0.38 ^a	71.68±0.50 ^b	70.66±0.22 ^b
3	64.72±2.20 ^b	75.46±2.03 ^a	74.75±1.16 ^a	67.72±0.03 ^b	64.17±0.38 ^b
4	65.03±0.89 ^b	71.54±0.52 ^a	70.62±0.26 ^a	53.27±1.67 ^d	60.55±0.18 ^c
5	57.96±0.71 ^c	66.94±0.45 ^a	63.51±0.28 ^b	56.19±1.09 ^c	57.50±0.27 ^c
6	49.35±0.29 ^b	61.13±2.38 ^a	59.08±0.35 ^a	38.74±0.18 ^d	43.91±1.61 ^c

2.4 低温保存下不同浓度 SL 对湖羊精子顶体完整率的影响

由图 2 和表 5 可知,随着精液低温保存时间的延长,每组精子顶体完整率呈不断下降的趋势,其中采用 0.1% SL 保存的精子顶体完整率下降最为缓慢。保存 1、2、5 和 6 d, SL 各处理组的精子顶体完整率显著高于对照组 ($P<0.05$), 0.1% SL 组最高;保存 2、6 d, 0.1% SL 组的精子顶体完整率显著高于其他组 ($P<0.05$);保存 3 d, 0.4% SL 组与对照组的精子顶体完整率显著低于其他组 ($P<0.05$), 对照组最低。

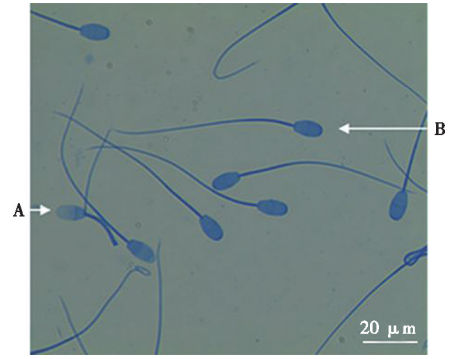


图 2 湖羊精子在考马斯亮蓝染色液中的形态
A. 头部顶体区未着色,为顶体受损的精子; B. 头部顶体区着色,为顶体完整的精子。

图 2 湖羊精子在考马斯亮蓝染色液中的形态

表 5 不同浓度 SL 对低温保存湖羊精子顶体完整率的影响

保存时间/d	SL 浓度/%					%
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	
0	89.97±0.45	92.04±1.17	90.40±1.02	90.24±0.60	89.99±0.14	
1	75.79±0.52 ^c	87.94±0.81 ^a	84.08±1.52 ^b	85.81±0.95 ^{ab}	85.07±0.79 ^{ab}	
2	62.13±0.91 ^e	83.02±0.44 ^a	78.09±0.85 ^b	75.89±0.29 ^c	68.21±0.56 ^d	
3	74.60±0.81 ^b	80.00±0.58 ^a	75.88±1.41 ^a	77.13±0.59 ^a	74.82±2.16 ^b	
4	69.12±1.68 ^b	79.30±0.28 ^a	73.04±3.50 ^b	74.87±0.78 ^{ab}	74.81±0.94 ^{ab}	
5	64.21±0.37 ^b	75.42±0.93 ^a	75.18±0.47 ^a	71.95±1.73 ^a	72.01±1.52 ^a	
6	45.54±0.70 ^e	69.04±1.46 ^a	64.85±1.13 ^b	61.12±0.55 ^c	57.76±1.14 ^d	

3 讨论

卵黄是精子低温保存过程中最常用的一种冷冻保护剂。研究表明,精子稀释液中添加卵黄主要是利用其磷脂成分尤其是卵磷脂为精子在保存期间提供能量,降低精子细胞在降温过程中受到的损伤^[7]。虽然卵黄有利于精液低温保存,但其含有动物源性成分,容易受到微生物污染(如沙门菌),增加病原传播的风险^[8]。除此之外,卵黄含有的颗粒成分也影响了精液品质。针对卵黄存在的多种缺点,需要开发一种既可以替代卵黄,又能在低温下保持理想精液质量的抗冻剂。SL 是从大豆中提取的产物,是一种植物原料,成分确定、效果稳定且易于标准化生产操作^[9]。此外,SL 还具有与卵黄相似的组成成分(低密度脂蛋白),可以保护精子免受低温打击。Sun 等^[10]应用含有 2% SL 稀释剂或含有 20% 卵黄稀释剂进行山羊精液冷冻保存,提高了超氧化物歧化酶(SOD)活性,抑制了活性氧(ROS)以及降低了丙二醛(MDA)含量,表明 SL 与卵黄能够起到相同的保护作用。Forouzanfar 等^[11]在冷冻保存绵羊精液试验中,发现向稀释液中添加 SL 比添加卵黄能够取得

更高的精子活力、活率。因此,SL 可作为卵黄的一种有效替代抗冻保护剂。

在本试验中,精液低温保存 6 d 效果最差,随着保存时间的延长湖羊精液检测的各项保存指标均呈下降趋势。这可能是因为精液保存时间越长,代谢产物就越多,稀释液就容易被污染,从而影响精液品质。精子活率、活力的高低直接影响了人工授精的成功率。SL 可以作为抗氧化剂消除自由基造成的损害,从而提高低温保存后的活率和活力^[12]。本试验结果显示,在低温保存精液 6 d 后,0.1% SL 组的精子活率、活力分别从 12.8% 和 8.33% 显著提高到 82.01% 和 72.7%,这可能由于 SL 含有的磷脂成分在细胞膜中起代谢与运输功能,支持细胞代谢,使卵磷脂在低温过程中进入精子细胞膜,补充受损的磷脂结构,降低细胞质溶液冰点,减少细胞中冰晶形成,降低冰晶对精子的损伤;而 0.4% SL 组的精子活率、活力却降低,这可能是由于加入的 SL 浓度达到一定程度时,精液稀释液的黏度增加,对精子运动产生较大阻力,消耗更多 ATP 能量,从而降低精液质量^[13]。关于 SL 保护精子的机理尚不清楚,还需进一步深入研究。汪俊跃等^[14]研究发现添加 5% SL 对猪精液保存效果最

优。此前也有报道,山羊精液稀释液中添加 SL 的最适添加量为 2%^[10]。这些研究结果与本研究 SL 最适添加量均有所不同,这可能由于使用的 SL 纯度、研究物种或保存方式不同所致。物种特异性差异可能与精子质膜和精浆组成的差异有关^[10]。此外,直线速率、曲线速率和路径速率与精子活率、活力呈正相关^[15]。本研究中,在稀释液中添加 0.1% SL 可以延缓直线速率、曲线速率和路径速率的下降速度。据报道,在山羊精液稀释液中添加 2% SL 具有更高的运动性能 (52.14%),而添加 3% SL 显著降低了精子运动性能 (38.61%)^[10];在犬精液稀释液中添加 2% SL 引起精子的运动性能降低^[16]。上述研究均与本试验结果相似。因此,推测较低浓度 SL 可能提高精子运动性能,从而也显著提高精液保存效果,而较高浓度的 SL 具有毒性,对 4℃ 保存的精液质量产生负面影响。

当温度降低产生冷应激时,会导致精子顶体和质膜破损以及出现解体的现象,而精子质膜以及顶体的完整性对精子的代谢、受精等活动都有十分重要的意义^[17]。SL 在低温保存过程中具有保护磷脂完整性的能力。本研究发现,0.1% SL 组在保存 1 d 时精子质膜完整率和顶体完整率分别在 82.81% 和 87.94%,优于 6 d 保存的质膜完整率 (61.13%) 和顶体完整率 (69.04%)。宋望成^[18]报道,1.0% SL 保存 24 h 精子的质膜完整率和顶体完整率分别为 46.8% 和 47.6%,而保存 144 h 又分别降低到 23.4% 和 27.6%,这与本研究的精子质膜完整率和顶体完整率的下降速度一致。另外,本试验 0.1% SL 对精子质膜和顶体的保护效果最好。刘文江等^[19]研究显示,山羊精液稀释液添加 1 g/L SL,精子质膜完整性显著提高,精液的保存时间也显著延长,但精子顶体完整率未发生显著变化,这与本研究结果不一致,这可能是由于 SL 对精子顶体保护作用因研究对象而异。

4 结论

本研究发现,在湖羊精液稀释液中添加 SL 能够提高低温保存后的精子活率、活力、曲线速率、直线速率、路径速率、质膜完整率和顶体完整率,其中添加 0.1% SL 的作用效果最佳。

参考文献:

[1] 蒋菱玉,杨燕,王振南,等.人工授精技术在羊繁育中的推广应

用[J].山东畜牧兽医,2022,43(9):32-38.

- [2] WILBER G, TABARE A, PALOMO M J. Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on ram sperm cryopreservation [J]. *Anim Reprod*, 2017, 14 (4): 1124-1132.
- [3] 郝冠英.甘油、DMA 及大豆卵磷脂对绵羊精液冷冻及低温保存效果的影响[D].石河子:石河子大学,2022.
- [4] LAYEK S S, MOHANTY T K, KUMARESAN A, et al. Cryopreservation of bull semen: evolution from egg yolk based to soybean based extenders [J]. *Anim Reprod Sci*, 2016, 172: 1-9.
- [5] 刘鑫,崔茂盛,刘朝阳,等.大豆卵磷脂对猪精液 4℃ 保存质量的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2018(22):68-69.
- [6] 王俊琴.奶绵羊精液冷冻程序的探索与研究[D].呼和浩特:内蒙古大学,2019.
- [7] 李梦杰,赵伟刚,郭肖兰,等.冷冻稀释液中添加大豆卵磷脂对梅花鹿冻融精子质量的影响[J].中国畜牧兽医,2022,49(11):4327-4334.
- [8] 王彦虎.绿原酸对湖羊精液低温保存效果的影响[D].扬州:扬州大学,2022.
- [9] 邹家浩.还原型谷胱甘肽对奶山羊精液冷冻保存效果的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2022.
- [10] SUN L, FAN W, WU C, et al. Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat semen cryopreservation [J]. *Cryobiology*, 2020, 92: 146-150.
- [11] FOROUZANFAR M, SHARAFI M, HOSSEINI S M, et al. *In vitro* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen [J]. *Theriogenology*, 2010, 73(4): 480-487.
- [12] SUN L, HE M, WU C, et al. Beneficial influence of soybean lecithin nanoparticles on rooster frozen-thawed semen quality and fertility [J]. *Animals*, 2021, 11(6): 1769.
- [13] 谢运法.五味子乙素对低温保存猪精子质量和获能状态的影响[D].南宁:广西大学,2022.
- [14] 汪俊跃,张树山,戴建军,等.高压均质(HPH)大豆卵磷脂替代卵黄在猪精液冷冻保存效果的研究[J].中国兽医科学,2020,50(11):1461-1468.
- [15] 王彦虎,张柳明,褚长江,等.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.
- [16] AXNER E, LAGERSON E. Cryopreservation of dog semen in a tris extender with 1% or 2% soya bean lecithin as a replacement of egg yolk [J]. *Reprod Domest Anim*, 2016, 51(2): 262-268.
- [17] BURGESS C M, CLUTTERBUCK A L, ENGLAND G. The effect of cryopreservation on the capacitation status and epithelial cell attachment capability of dog spermatozoa [J]. *Vet J*, 2012, 192(3): 398-402.
- [18] 宋望成.犬精液低温保存及人工授精技术研究与应用[D].杨凌:西北农林科技大学,2020.
- [19] 刘文江,何玉强,周多恩,等.牛血清白蛋白及大豆卵磷脂对山羊精子保存效果的影响[J].中国畜牧杂志,2020,56(5):100-105.