

王琳琳, 李乐康, 戴乾, 等. 稀释液添加不同抗氧化剂对冷冻姜曲海猪精子质量的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (11): 10-15.

WANG L L, LI L K, DAI Q, et al. Protective effects of three different antioxidants on frozen sperm in Jiangquhai boar [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (11): 10-15.

## 稀释液添加不同抗氧化剂对冷冻姜曲海猪精子质量的影响

王琳琳<sup>#</sup>, 李乐康<sup>#</sup>, 戴乾, 魏春来, 孙雨迪, 张婉蓉, 谭菊, 武彩虹<sup>\*</sup>

(江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300)

**摘要:** 旨在探究稀释液中添加不同抗氧化剂对冷冻姜曲海猪精子的保护作用。采用精子直线运动检测精子活力, 异硫氰荧光素标记的花生凝集素 (FITC-PNA) 染色检测精子顶体完整性, 碘化丙啶 (PI) 染色检测精子质膜完整性, 体外受精和培养检测受精卵的卵裂情况, 透射电镜观察精子超微结构, 评价冷冻保存对精子质量的影响; 对姜曲海猪精液分别冷冻保存 1 周、1 个月、3 个月、6 个月、9 个月和 12 个月, 观察冷冻保存时间对精子质量的影响; 在稀释液中分别添加抗氧化剂甲磺酸米托醌 (MitoQ), 2, 4-二硝基酚 (DNP) 和 4-羟基-2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-1-氧基 (Tempol), 每种抗氧化剂均添加 25、50 和 100  $\mu\text{mol/L}$  3 种浓度, 以筛选出冷冻保存效果最优的抗氧化剂; 对添加 50  $\mu\text{mol/L}$  MitoQ 的解冻精子进行透射电镜观察。结果显示: 精子冷冻保存不同时间后, 各指标均无显著差异 ( $P>0.05$ ); 添加不同浓度的 MitoQ、DNP 和 Tempol 均对冷冻保存 1 周精子的活力、顶体完整率、质膜完整率和体外受精卵裂率有一定的改善作用, 但以添加 50  $\mu\text{mol/L}$  MitoQ 效果最好; 添加 50  $\mu\text{mol/L}$  MitoQ 对精子质膜、线粒体和微管等结构均具有一定的冷冻保护作用。综上, 稀释液中添加 50  $\mu\text{mol/L}$  MitoQ 对于超低温保存姜曲海猪精液具有潜在的保护优势, 具有一定的开发价值。

**关键词:** 姜曲海猪; 超低温冷冻; 抗氧化剂; 精子品质; 超微结构

中图分类号: S813.9 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)11-0010-06

## Protective effects of three different antioxidants on frozen sperm in Jiangquhai boar

WANG Linlin<sup>#</sup>, LI Lekang<sup>#</sup>, DAI Qian, WEI Chunlai, SUN Yudi, ZHANG Wanrong, TAN Ju, WU Caihong<sup>\*</sup>

(Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China)

**Abstract:** The aim of the study was to investigate the protective effects of different antioxidants on frozen sperm in Jiangquhai boar. To evaluate the effect of cryopreservation on sperm quality, the sperm motility was detected by sperm linear movement, the acrosome integrity was detected by fluorescein isothiocyanin-labeled peanut agglutinin (FITC-PNA) staining, the plasma membrane integrity was detected by propidium iodide (PI) staining, the cleavage of fertilized eggs was detected by in vitro fertilization, and the sperm ultrastructure was observed by transmission electron microscopy (TEM). The semen was cryopreserved for 1 week, 1 month, 3 months, 6 months, 9 months and 12 months, respectively, to observe the effects of different storage time lengths on sperm quality. In order to screen out the antioxidants with the best cryopreservation effect, mitoquinone mesylate (MitoQ), 2, 4-dinitrophenol (DNP) and 4-hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempol) was supplemented in the diluent at concentrations of 25, 50 and 100  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. The thawed sperm with 50  $\mu\text{mol/L}$  MitoQ were observed by TEM. The results showed that there was no significant difference in all parameters after sperm cryopreservation for different time periods ( $P>0.05$ ). The addition of MitoQ, DNP and Tempol at different concentrations improved sperm motility, acrosome integrity, plasma membrane integrity and in vitro fertilization cleavage rate after 1-week cryopreservation. However, the addition of 50  $\mu\text{mol/L}$  MitoQ had the best effect. In addition, TEM showed that the addition of 50  $\mu\text{mol/L}$  MitoQ protected the plasma membrane, mitochondria and microtubules of the sperm. In conclusion, the addition of 50  $\mu\text{mol/L}$  MitoQ to the diluent presented potential protective advantages in cryopreservation of sperm in Jiangquhai boars, and MitoQ had certain development value.

**Keywords:** Jiangquhai boar; cryopreservation; antioxidant; sperm quality; ultrastructure

收稿日期: 2024-04-23; 修回日期: 2024-09-22

基金项目: 2023 年江苏省职业院校学生创新创业培育计划项目 (G-2023-0727); 江苏农牧科技职业学院动物疫病科技创新团队项目 (NSF2021TC03); 泰州市科技支撑计划 (农业) 项目 (TN201615)

第一作者: 王琳琳, 女, 硕士, 实验师; 李乐康, 男, 专科在读。<sup>#</sup>共同第一作者

<sup>\*</sup> 通信作者: 武彩虹, 教授, 研究方向为动物生殖生物学和中草药免疫, E-mail: caihongwu616@aliyun.com.

我国猪种资源丰富, 约占世界猪种的三分之一<sup>[1]</sup>, 而且许多地方猪种具有繁殖性能高、耐粗饲和适应性强等优良特性<sup>[2]</sup>。随着外来猪种的不断引入, 我国部分地方猪种面临灭绝或濒临灭绝, 特别是2018年暴发的非洲猪瘟疫情, 对地方猪种资源安全造成重大威胁。因此, 加强地方猪种资源有效保护和开发利用, 受到广泛关注。2019年农业农村部管理司印发《国家级地方猪遗传材料采集保存工作实施方案》(农种畜函〔2019〕14号), 委托科研院所采集地方猪种精液、体细胞等遗传材料进行冷冻技术处理, 并纳入国家家畜基因库长期保存。

猪精液冷冻保存不仅是猪种资源保护的有效手段之一, 而且在延长种公猪利用率、节约生产成本、降低猪场疫病生物安全风险、加快猪场疫病净化等方面均具有积极作用<sup>[3]</sup>。然而, 猪精子对低温尤其敏感<sup>[4]</sup>, 导致了猪精液冷冻保存效果与生产应用推广还存在一定差距<sup>[5]</sup>。研究表明, 精子在冷冻-解冻时会产生大量活性氧(ROS), 是造成精子损伤的主要原因之一<sup>[6-7]</sup>。Garcez等<sup>[8]</sup>研究表明, 冷冻时添加抗氧化剂能有效改善精子冷冻效果。

姜曲海猪具有高繁殖力、成熟早和耐粗饲等特性, 是我国地方优良猪种之一, 已被列入国家保护计划<sup>[9]</sup>。本研究以姜曲海猪精液为研究对象, 在稀释液中添加甲磺酸米托醌(MitoQ), 2, 4-二硝基酚(DNP)和4-羟基-2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-1-羟氧基(Tempol)3种不同抗氧化剂, 以精子冷冻后的精子活力、顶体完整率、质膜完整率和体外受精卵裂率为指标筛选适合的抗氧化剂种类和添加浓度, 同时观察筛选出的抗氧化剂对冷冻后精子超微结构变化的影响, 为提高公猪精液超低温保存效果提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物来源

健康、性成熟的姜曲海公猪由江苏姜曲海猪种业有限公司提供。

### 1.2 主要试剂

精液稀释液购于德国米尼图公司; 异硫氰荧光素标记的花生凝集素(FITC-PNA)、碘化丙啶(PI), 购于Sigma-Aldrich公司; 2.5%戊二醛购于北京雷根生物技术有限公司; 无特殊说明的所用试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

### 1.3 精液采集

借助于假阴道法采集公猪精液, 颜色呈乳白色、无特殊气味、活力大于70%的精液符合试验要求。

### 1.4 溶液配制

稀释液: 参考文献[10]方法配制基础稀释液,

4℃保存不超过1周。

冷冻液和解冻液: 参考文献[11]方法配制冷冻液I液、冷冻II液和解冻液, 4℃保存不超过1周。

HEPES/BSA溶液: 准确称量0.2522g果糖, 0.7599g NaCl, 0.0298g KCl, 0.0147g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.102g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.1g BSA, 0.2383g HEPES, 置于100mL蒸馏水中搅拌均匀, 0.22μm滤膜过滤, 4℃保存, 备用。

### 1.5 试验设计与精液处理

空白对照组为基础稀释液, 3个试验组在基础稀释液中分别添加MitoQ、DNP或Tempol, 每种抗氧化剂均添加25、50和100μmol/L3种浓度。

参考文献[11]方法。合格精液与稀释液1:1.5混合, 17℃冰箱过夜、离心; 弃上清液, 加入冷冻I液(4℃, 1.5h); 再加入等体积冷冻II液(精液最终稀释比为1:2), 于4℃平衡后装入0.25mL麦管(平衡及灌冲在45min内完成); 麦管于液氮面上3cm处熏蒸10min, 然后投入液氮罐提桶的纱布袋内保存。

解冻时, 从液氮中迅速取出麦管后直接投入37℃水浴30s, 再将其稀释于2mL PBS, 待检。

### 1.6 精子质量检测

#### 1.6.1 精子活力

采用显微镜计数法评价精子活力<sup>[11]</sup>。精液样本稀释至1×10<sup>7</sup>个/mL, 取5μL置于载玻片上, 加盖玻片, 相差显微镜下至少计200个精子。精子活力为直线运动精子所占百分率。

#### 1.6.2 精子顶体完整率

采用FITC-PNA染色法评价精子顶体完整性<sup>[11]</sup>。精液经4℃预冷的丙酮固定5min, HEPES/BSA封闭30min, FITC-PNA孵育30min, 离心弃去上清液, PBS洗涤沉淀后, 取10μL置于载玻片上, 加盖玻片、封片, 荧光显微镜下镜检。将精子顶体区发强绿色荧光者判定为顶体完整精子, 计数完整精子顶体所占百分率。

#### 1.6.3 精子质膜完整率

采用PI染色法评价精子质膜完整性<sup>[11]</sup>。将PI、HEPES/BSA和精液悬液以1:50:25混匀, 37℃孵育30min, 取10μL置于载玻片上, 加盖玻片、封片, 荧光显微镜下镜检。将精子头部核区呈现红色荧光者判定为质膜损伤的精子, 计数完整精子质膜的精子所占百分率。

#### 1.6.4 精子体外受精卵裂率

参考文献[12]方法。抽吸法采集卵丘-卵母细胞复合体培养44h, 获得成熟卵母细胞, 经透明质酸

酶部分脱卵丘细胞处理,以15枚为1组,置于改良Tris缓冲液(mTBM)中,再向其中加入50  $\mu\text{L}$  获能处理后的精液,精卵共同孵育6~8 h后转入100  $\mu\text{L}$  胚胎培养液中培养,于显微镜下观察卵裂情况,计数卵裂胚胎所占百分率。

### 1.6.5 透射电镜观察精子结构

精子样本置于2.5%戊二醛,4  $^{\circ}\text{C}$  条件下固定6 h;4%琼脂包埋;再置于1%四氧化钨( $\text{OsO}_4$ )中二次固定1.5 h;乙醇脱水后用环氧丙烷进行置换;环氧树脂812包埋、聚合、修块,半薄切片定位;然后重新包埋,超薄切片用醋酸双氧铀-柠檬酸铅进行染色,透射电子显微镜(TEM)下观察精子结构<sup>[11]</sup>。

## 1.7 数据统计与分析

采用SPSS统计软件的One-way ANOVA进行方差分析,Duncan's分析显著性水平。采用GraphPad Prism 8.0软件作图。试验数据以“平均值 $\pm$ 标准误”表示, $P<0.05$ 表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 冷冻保存时间对精子冷冻质量的影响

未添加抗氧化剂处理的猪精液,超低温保存不同时间后进行解冻,精子的活力、顶体完整率、质膜完整率和体外受精卵裂率结果如图1所示。精子保存1周、1个月、3个月、6个月、9个月和12个月,各指标在不同时间之间无显著差异( $P>0.05$ )。

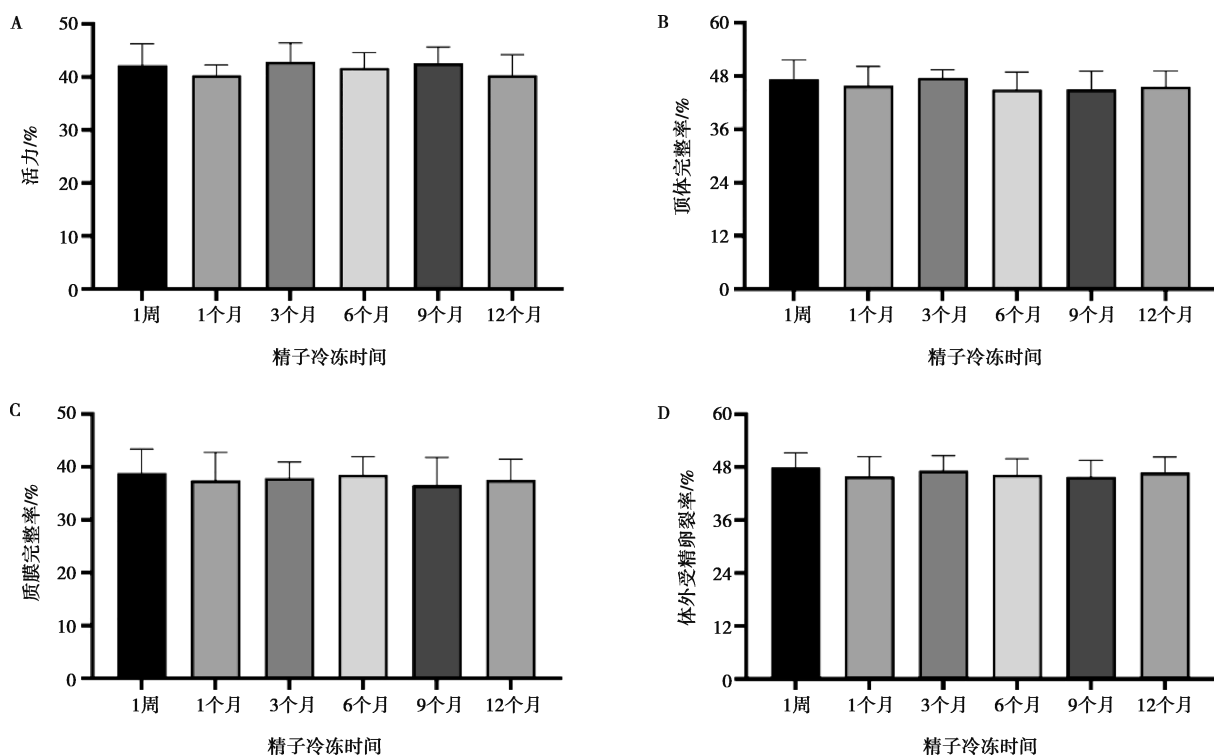


图1 冷冻保存时间对冷冻猪精子质量的影响

### 2.2 稀释液添加不同抗氧化剂对精子冷冻保存效果的影响

稀释液中添加3种不同浓度抗氧化剂,冷冻保存1周后对精子活力、顶体完整率、质膜完整率和体外受精卵裂率的影响见图2。

图2A显示,添加50  $\mu\text{mol/L}$  MitoQ组精子的活力、顶体完整率和质膜完整率显著或极显著高于其他各组( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );图2B显示,添加50  $\mu\text{mol/L}$  DNP组的精子质膜完整率极显著高于对照组

( $P<0.01$ ),显著高于添加100  $\mu\text{mol/L}$  DNP组( $P<0.05$ );图2C显示,50  $\mu\text{mol/L}$  Tempol组精子活力显著高于对照组和25  $\mu\text{mol/L}$  Tempol组( $P<0.05$ );50  $\mu\text{mol/L}$  Tempol组的精子质膜完整率均显著高于对照组和100  $\mu\text{mol/L}$  Tempol组( $P<0.05$ )。综上,各抗氧化剂均以添加浓度50  $\mu\text{mol/L}$ 对精子冷冻具有较好保护效果,但体外受精卵裂率指标并未显示显著性优势。

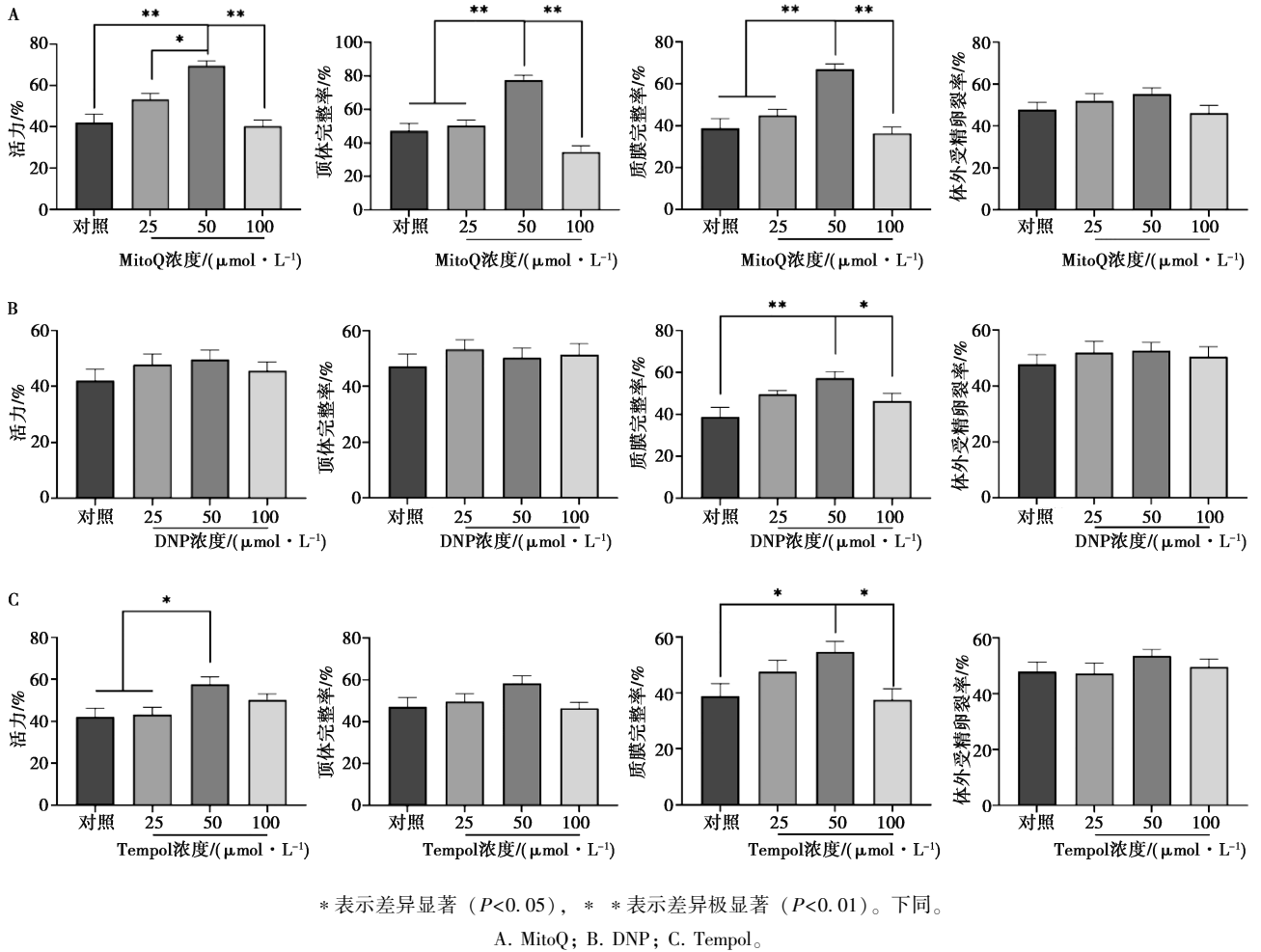


图 2 3种抗氧化剂不同浓度条件下保存1周对冷冻猪精子质量的影响

添加 50  $\mu\text{mol/L}$  3种不同氧化剂对冷冻猪精子质量的影响见图 3, MitoQ 组精子的活力、顶体完整率

和质膜完整率 (除 DNP 组) 均显著或极显著高于其他各组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

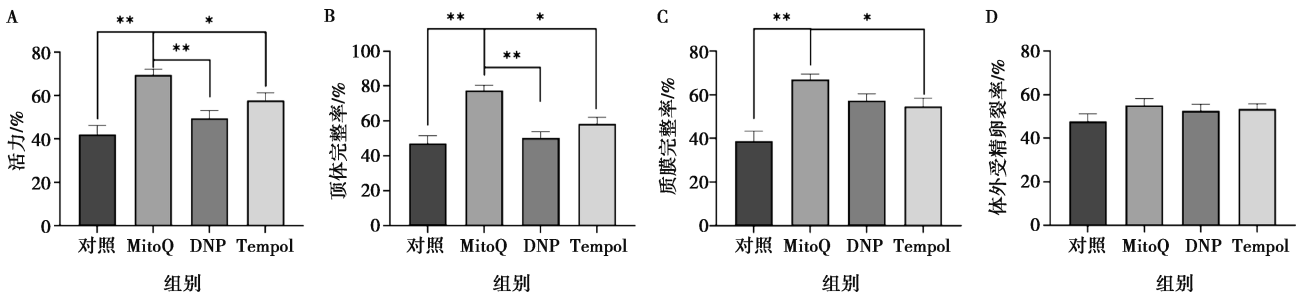


图 3 3种不同氧化剂在 50  $\mu\text{mol/L}$  浓度条件下对冷冻猪精子质量的影响

综合图 2 和图 3 可见, 稀释液中添加 50  $\mu\text{mol/L}$  MitoQ 时, 冷冻后精子的活力、顶体完整率、质膜完整率均显著优于 DNP 和 Tempol 各浓度。

### 2.3 稀释液添加 MitoQ 对冷冻精子超微结构的影响

对照组精子和稀释液中添加 50  $\mu\text{mol/L}$  MitoQ 组精子冷冻 1 周后解冻, 于 TEM 下观察超微结构 (见图 4)。

对照组精子冷冻后, 细胞核染色质均匀, 质膜膨胀, 与顶体外膜间局部存在明显分离 (图 4A); 尾部中段 (横切面观) 可见线粒体鞘、外周致密纤维、周围微管和中央微管, 但线粒体较为模糊 (图 4B); 尾部主段 (纵切面观) 可见外周致密纤维、周围微管和中央微管, 但中央微管不清晰 (图 4C)。50  $\mu\text{mol/L}$  MitoQ 组冷冻精子细胞核染色质均匀, 质膜

与顶体间结合紧密, 仅见局部质膜轻微膨胀 (图 4D); 尾部中段 (纵切面观) 可见外周致密纤维、周围微管和中央微管排列整齐, 线粒体呈串珠样紧密排

列 (图 4E); 尾部主段 (横切面观) 可见外周致密纤维、周围微管, 中央微管清晰可见 (图 4F)。

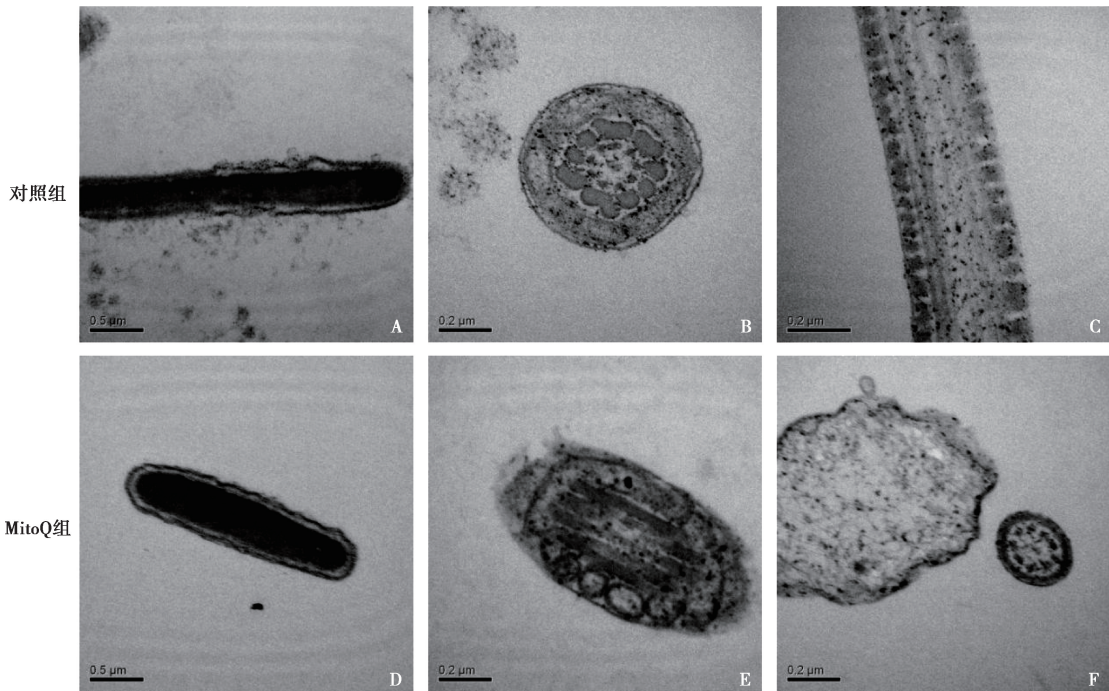


图 4 50  $\mu\text{mol/L}$  MitoQ 对冷冻-解冻精子超微结构的影响  
A. 精子质膜膨胀; B. 精子尾部中段横切面, 线粒体模糊; C. 精子尾部主段纵切面, 外周致密纤维和微管部分损伤; D. 精子质膜轻微损伤; E. 精子尾部中段纵切面, 线粒体排列整齐, 结构清晰; F. 精子尾部主段横切面, 外周致密纤维和微管结构完整、清晰。

图 4 50  $\mu\text{mol/L}$  MitoQ 对冷冻-解冻精子超微结构的影响

### 3 讨论

精子活力是影响受精的主要因素, 精子活力越高, 受精过程越顺利, 因此, 精子活力是精液质量评价的重要指标之一<sup>[13]</sup>。精子顶体完整率、质膜完整率和体外受精卵裂率也与受精密切相关<sup>[14]</sup>。本研究结果表明, 冷冻不同时间, 各组间精子活力、顶体完整率、质膜完整率和体外受精卵裂率并无显著差异, 冷冻精子的活力、顶体完整率、质膜完整率和体外受精卵裂率在 12 个月内不受冷冻保存时间的影响。说明, 冷冻保存时间并不影响精子品质, 可以达到长期冷冻保存目的。因此, 本研究后续试验的精液样本冷冻保存时间为 1 周。

动物精子长期保存, 可通过人工授精途径传播其优质的繁殖性能。许多研究表明, 精子在冷冻过程中不可避免的会遭受物理损伤和化学损伤, 影响精子的生育能力。与其他动物相比, 猪精子质膜内胆固醇和磷脂的比值更低, 更容易遭受低温损伤<sup>[14]</sup>。猪精子质膜中不饱和脂肪酸含量也较其他动物高, 有氧代谢过程中更易被 ROS 攻击而发生脂质过氧化反应, 这被认为是影响冷冻精子品质的重要原因之一, 使用抗

氧化剂和线粒体解偶联剂可有效降低冷冻过程中氧化应激对精子的损伤<sup>[15-16]</sup>。本试验选择 3 种抗氧化物质 MitoQ、DNP 和 Tempol 添加于精液稀释液, 探究其对冷冻姜曲海猪精子的保护作用。

MitoQ 是辅酶 Q 衍生物, 由内源性抗氧化剂辅酶 Q10 (CoQ10) 和三苯基磷 (TPP+) 结合而成的化合物。作为线粒体靶向抗氧化剂, MitoQ 在糖尿病、急性淋巴细胞白血病、肝损伤和中毒等氧化还原失调所致疾病中的积极调节作用已被证实<sup>[17]</sup>, 在对抗精液冷冻氧化损伤方面也具有积极作用<sup>[14, 18]</sup>。本研究添加 MitoQ 对冻后猪精子品质的明显改善, 可能是因为 MitoQ 兼具良好的亲脂性和亲水性, 能穿过精子质膜并在线粒体中高浓度集聚, 进而在线粒体局部发挥高效的抗氧化作用<sup>[19]</sup>, 降低氧化应激 ROS 造成的损伤。

DNP 是一种化学弱酸质子解偶联剂, 可诱导线粒体解偶联<sup>[20]</sup>。Fang 等<sup>[18]</sup>发现, 在冷冻介质中添加 DNP, 可降低猕猴和黄颡鱼解冻后精子的 ROS 水平和脂质过氧化反应, 同时提高了冻后精子存活率。Don 等<sup>[16]</sup>研究也表明, DNP 有益于改善恒河猴精子冻后活力, 虽所需的添加剂量在精液样本之间存在很

大差异,但在无卵黄冷冻液中添加 50  $\mu\text{mol/L}$  DNP 是必需的。本研究中,添加 DNP 有效改善了猪精子活力和质膜完整性,但对顶体完整率和体外受精卵裂率作用不显著,也可能与添加浓度的选择有关。DNP 作为解偶联剂是否可阻止线粒体产生 ROS 进而有益于猪精液冷冻保存效果,还需进一步探索。

Tempol 是一种超氧化物歧化酶类似物,具有膜穿透能力,可有效中和 ROS。研究表明,冷冻液中添加 5  $\mu\text{mol/L}$  Tempol 可保护精子免受氧化应激,提高解冻精子的活率、活力和 DNA 完整性<sup>[21]</sup>。10  $^{\circ}\text{C}$  条件下保存羊驼精子时,添加 1  $\mu\text{mol/L}$  Tempol 可增加其保存活力,减少 DNA 碎片<sup>[22]</sup>。在冷冻液中添加 10  $\mu\text{mol/L}$  Tempol,可提高公鸡精子冻后存活率,并能维持精子的活力、膜功能、线粒体活性和繁殖能力,降低公鸡精子细胞凋亡和脂质过氧化<sup>[23]</sup>。本研究中,添加 50  $\mu\text{mol/L}$  Tempol 也可提高冻后姜曲海猪精子活力和质膜完整性。Tempol 的这些作用可能是由于其具有细胞穿透性作用,可降低精子细胞内外超氧化物的生成能力。

虽然许多研究表明,添加抗氧化剂可提高精子冷冻保存效果,但也有研究报道,通过抗氧化剂将 ROS 水平过度降低到生理水平以下,可能会抑制精子活力<sup>[24]</sup>。本结果表明,在稀释液中添加不同浓度的 MitoQ、DNP 和 Tempol,对解冻猪精子的活力、顶体完整率和质膜完整率均有一定的改善作用,但以添加 50  $\mu\text{mol/L}$  MitoQ 效果最好。另外,对添加 50  $\mu\text{mol/L}$  MitoQ 解冻后精子进行超微结果观察,发现 50  $\mu\text{mol/L}$  MitoQ 对精子质膜、线粒体结构和微管等均具有一定保护作用。本研究结果提示, MitoQ 对猪精液超低温保存可能具有潜在优势,具有一定的开发应用价值。

## 参考文献:

- [1] 张树山,韩雪峻,姜红菊,等.“静态保种”在中国地方猪种遗传资源保护中的应用进展 [J]. 上海农业学报, 2020, 36 (5): 148-152.
- [2] 魏菁,张子群,王琦,等. 中国地方猪种种质资源的保护与利用探讨 [J]. 畜禽业, 2021, 32 (3): 43-44.
- [3] 张海龙. 基于畜禽遗传资源保护视角下地方品种猪资源的保护与利用研究 [J]. 中国猪业, 2022, 17 (4): 106-108.
- [4] ERDENEBAYAR O, 刘定邦,杨丽,等. 熊果酸对猪精液冷冻保存效果的影响 [J]. 家畜生态学报, 2022, 43 (10): 49-53.
- [5] 苟春阳,商昊,窦浩荡,等. 黄芩多糖对长白猪精液冷冻保存效果的研究 [J]. 中国畜牧杂志, 2024, 60 (1): 274-278.
- [6] RANI V, DEEP G, SINGH R K, et al. Oxidative stress and metabolic disorders: pathogenesis and therapeutic strategies [J]. Life Sci, 2016, 148: 183-193.
- [7] 周晶,方南洙,李钟淑,等. 抗氧化剂对精子质量影响的研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2017, 53 (7): 13-17.
- [8] GARCEZ M E, BRANCO C D S, LARA L V, et al. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen [J]. Fertil Steril, 2010, 94 (6): 2118-2121.
- [9] 徐盼,赵为民,倪黎纲,等. 姜曲海猪 ATP2B1 基因克隆、生物信息学及组织表达分析 [J]. 江苏农业科学, 2023, 51 (8): 150-156.
- [10] 刘运镇,杨康林,吕娜,等. 菟丝子水提取物对 17  $^{\circ}\text{C}$  保存猪精子品质的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2014, 46 (12): 29-33.
- [11] 张斌,武彩红,邱树磊,等. 超低温保存对姜曲海公猪精子超微结构损伤的研究 [J]. 中国兽医科学, 2018, 48 (10): 1325-91331.
- [12] 张斌,纪康,武彩红,等. 稀释液中添加谷胱甘肽和透明质酸对猪精液超低温保存效果的影响 [J]. 2014, 46 (12): 29-33.
- [13] QIN L L, WU J X, CHEN J, et al. Selection of fertilization strategies for different sperm parameters *in vitro* fertilization [J]. Ann Transl Med, 2022, 10 (18): 996.
- [14] 曾耀,孙琳琳,吴德,等. 猪精液常温保存抗氧化剂研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2020, 56 (3): 12-18.
- [15] 周千,张扬,石磊,等. 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.
- [16] DON Q X, THEODORE L T, SARAH E R, et al. Antioxidants, oxyrase, and mitochondrial uncoupler 2, 4-dinitrophenol improved postthaw survival of rhesus monkey sperm from ejaculates with low cryosurvival [J]. Fertil Steril, 2010, 94 (6): 2359-2361.
- [17] 姚金余,王涛,邹远康,等. 铅诱导离体神经干细胞氧化应激和铜蓄积及 MitoQ 的保护作用 [J]. 空军军医大学学报, 2023, 44 (3): 216-221.
- [18] FANG L, BAI C L, CHEN Y H, et al. Inhibition of ROS production through mitochondria-targeted antioxidant and mitochondrial uncoupling increases post-thaw sperm viability in yellow catfish [J]. Cryobiology, 2014, 69: 386-393.
- [19] HU K, XIAO L D, LI L J, et al. The mitochondria-targeting antioxidant MitoQ alleviated lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver injury in mice [J]. Immunol Lett, 2021, 240: 24-30.
- [20] 金甲,张凤,杨玲玲,等. 线粒体解偶联剂的研究进展 [J]. 生命科学, 2013, 25 (7): 707-715.
- [21] BATENI Z, AZADI L, TAVALAEE M, et al. Addition of Tempol in semen cryopreservation medium improves the post-thaw sperm function [J]. Syst Biol Reprod Med, 2014, 60 (4): 245-250.
- [22] SANTIANI A, EVANGELISTA S, VALDIVIA M, et al. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation [J]. Teriogenology, 2013, 79: 842-846.
- [23] NAJAF A, MEHDIPOUR M, MOHAMMADI H, et al. Effect of tempol and straw size on rooster sperm quality and fertility after postthawing [J]. Sci Rep, 2022, 12 (1): 12192.
- [24] MATA-CAMPUZANO M, ALVAREZ - RODRIGUEN M, ALVAREZ M, et al. Effect of several antioxidants on thawed ram spermatozoa submitted to 37  $^{\circ}\text{C}$  up to four hours [J]. Reprod Domest Anim, 2012, 47 (6): 907-914.