

张柳明, 江才雨, 王旭洋, 等. 解冻温度和时间对湖羊细管冻精解冻效果的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (12): 10-15.

ZHANG L M, JIANG C Y, WANG X Y, et al. Effects of thawing temperatures and time on thawing of frozen semen straws of Hu ram [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (12): 10-15.

## 解冻温度和时间对湖羊细管冻精解冻效果的影响

张柳明, 江才雨, 王旭洋, 孙宇轩, 王健, 孙晓梅, 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:** 为提高解冻后的湖羊精液质量, 本研究探讨不同解冻温度和时间对湖羊精液冷冻保存效果的影响。细管冻精分别在 45、55、65、70 和 75 °C 条件下进行不同时间的解冻, 通过检测精子活率、活力和运动性能探讨各温度下不同解冻时间对细管冻精解冻效果的影响; 在上述试验的基础上通过检测上述指标和质膜完整性、顶体完整性以及活性氧 (ROS) 水平来探究各解冻温度在最适宜解冻时间下对精液冷冻保存效果的影响。结果: 在 45 °C 条件下, 解冻 20 s 和 30 s 后的精子活率、活力以及各项运动速率均显著高于 10 s 解冻组 ( $P < 0.05$ ); 在 55 °C 条件下, 解冻 8 s 后的精子活力显著高于 5 s 解冻组 ( $P < 0.05$ ); 在 65 °C 和 70 °C 条件下, 解冻 5 s 后的精子活率和活力均显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ ); 在 75 °C 条件下, 解冻 3 s 后的精子各项运动速率显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ ); 在 55 °C 条件下解冻 8 s 后的精子质膜完整率和顶体完整率均显著高于 37 °C 解冻 30 s、70 °C 解冻 5 s 和 75 °C 解冻 3 s 这 3 组 ( $P < 0.05$ ), 且 ROS 水平显著低于 37 °C 解冻 30 s、45 °C 解冻 20 s、65 °C 解冻 30 s 和 75 °C 解冻 3 s 这 4 组 ( $P < 0.05$ )。综上, 55 °C 条件下解冻 8 s 是最适合湖羊细管精液的解冻方式, 可以获得较好的精液冷冻保存效果。

**关键词:** 湖羊; 精液冷冻保存; 解冻温度; 解冻时间; 精液质量

中图分类号: S826 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)12-0010-06

## Effects of thawing temperatures and time on thawing of frozen semen straws of Hu ram

ZHANG Liuming, JIANG Caiyu, WANG Xuyang, SUN Yuxuan, WANG Jian, SUN Xiaomei, LI Yongjun\*

(Key Laboratory for Animal Genetics & Molecular Breeding of Jiangsu Province, College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** In order to improve the quality of post-thaw Hu ram semen, this study explored the effects of different thawing temperatures and time on the effectiveness of semen cryopreservation. The frozen semen straws were thawed at 45, 55, 65, 70 and 75 °C for varying durations. The effects of different thawing time and temperatures on the thawing process of frozen semen straws were examined by assessing total sperm motility, progressive motility and kinematic parameters. Based on the above experiments, the impact of different thawing temperatures on the cryopreservation of semen at the optimal thawing time was determined by assessing the parameters mentioned above, as well as the plasma membrane integrity, acrosome integrity, reactive oxygen species (ROS) levels. The results indicated that, under the condition of 45 °C, the total sperm motility, progressive motility and various kinematic parameters after thawing for 20 s and 30 s were significantly ( $P < 0.05$ ) higher than those in the 10 s thawing group. Under the condition of 55 °C, the sperm progressive motility after thawing for 8 s was significantly ( $P < 0.05$ ) higher than the 5 s thawing group. Under the conditions of 65 °C and 70 °C, the total sperm motility and progressive motility after thawing for 5 s were significantly ( $P < 0.05$ ) higher than in the other groups. Under the condition of 75 °C, the various kinematic parameters of sperm after thawing for 3 s were significantly ( $P < 0.05$ ) higher than in the other groups. After thawing for 8 s at 55 °C, the sperm plasma membrane integrity and the acrosome integrity were significantly ( $P < 0.05$ ) higher than in the 37 °C thawing for 30 s, 70 °C thawing for 5 s and 75 °C thawing for 3 s groups; and the ROS level was significantly ( $P < 0.05$ ) lower than in the 37 °C thawing for 30 s, 45 °C thawing for 20 s, 65 °C thawing for 30 s and 75 °C thawing for 3 s groups. In conclusion, thawing for 8 s at 55 °C was the most appropriate method for thawing the frozen semen of Hu ram, which would produce ideal results in semen cryopreservation.

**Keywords:** Hu ram; semen cryopreservation; thawing time; semen quality

收稿日期: 2024-01-29; 修回日期: 2024-09-11

基金项目: 江苏现代农业产业技术体系建设项目 (JATS [2023] 448)

第一作者: 张柳明, 男, 博士研究生

\* 通信作者: 李拥军, 博士, 教授, 主要从事动物繁育与养羊生产, E-mail: yzliyongjun@163.com。

湖羊是我国一级保护地方品种，是世界著名的多胎高繁殖绵羊品种，具有四季发情、性成熟早、生长周期短和适应性强等特点<sup>[1]</sup>。同时湖羊也是全舍饲规模化养殖的优良绵羊品种，其养殖规模正在快速发展。人工授精是家畜遗传改良的重要技术，能使优秀种公羊的资源得到充分利用，降低养殖成本并避免疾病的传播，在规模化养殖中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。精液保存是人工授精技术的关键环节之一，包括常温保存（15~25℃）、低温保存（0~5℃）和冷冻保存（-196℃），常温和低温保存的精液质量都会随着保存时间的延长逐渐降低，而冷冻保存可以长期保存，不受时间、季节和地域等的限制<sup>[3-4]</sup>。精液冷冻复温后又可以恢复精子活力并保持结构和功能的完整<sup>[5-6]</sup>，其对于濒危物种的保护、提高育种效率和繁殖效率等具有重要意义<sup>[7-8]</sup>。

精液冷冻保存效果与稀释液组成、稀释比例、降温处理、冷冻和解冻过程密切相关<sup>[9]</sup>。精液在冷冻和解冻过程中可能存在冰晶机械损伤，冰晶主要在危险温区形成（-60~0℃），该温度区间也被称为精子死亡温度区间<sup>[10-11]</sup>。如果在冷冻和解冻过程中，通过该温度区间的降温速率和升温速率过慢，便容易产生冰晶，对精子细胞产生不可逆的损伤<sup>[12-13]</sup>。目前，精液解冻主要包括以下4种，低温缓慢解冻（5℃）、室温中速解冻（15℃）、体温快速解冻（37~40℃）和高温超快速解冻（70~80℃）<sup>[14]</sup>。目前主要集中在精液冷冻过程开展一系列研究，关于绵羊精液解冻温度和时间的影响相对缺乏。因此，本研究旨在通过检测精子活率、活力、运动性能、功能完整性以及活性氧（ROS）含量探究解冻温度和时间对湖羊精液冷冻保存效果的影响，为湖羊精液冷冻保存技术提供一定的科学依据，为湖羊种质资源保护以及推广利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

果糖、葡萄糖、无水柠檬酸、柠檬酸钠、三（羟甲基）氨基甲烷均购自生工生物工程（上海）股份有限公司。甘油购自国药集团化学试剂有限公司。青霉素-链霉素双抗购自 ThermoFisher 公司。碘化丙啶（PI）溶液购自北京索莱宝科技有限公司生产。异硫氰酸酯-花生凝集素（FITC-PNA）购自 Sigma 公司。ROS 检测试剂盒购自上海碧云天生物技术由限公司。计算机辅助精子分析系统（CASA）购自松景天伦生物科技有限公司。CX31 生物显微镜购自日本奥林巴斯株式会社。EnSpire 酶标仪购自新加坡 PerkinElmer 公司。CytoFLEX 流式细胞仪购自贝克曼

库尔特商贸（中国）有限公司。

### 1.2 精液采集

公羊由扬州大学实验羊场提供，精液分别采集自体况良好、无生殖道疾病的3只2~3岁的健康湖羊。使用假阴道法采集精液，保存在37℃保温杯中并在30min内带回实验室进行质量检查。选择精子活率80%以上，畸形率20%以下的精液样本混匀用于试验。

### 1.3 精液冷冻

精液冷冻基础稀释液包括：5 mg/mL 葡萄糖、18.2 mg/mL 柠檬酸、36.4 mg/mL Tris 和 200 IU/mL 双抗。精液冷冻 I 液由 80% 基础稀释液和 20% 卵黄组成，精液冷冻 II 液由 94% 的冷冻 I 液和 6% 的甘油组成。将精液与冷冻 I 液按照 1 : 3 的比例等温稀释后置于 4℃ 保存 2.5 h；其次将稀释降温后的精液与提前放入 4℃ 预冷的冷冻 II 液按照 1 : 2 的比例稀释后再次置于 4℃ 平衡 2.5 h；最后在 4℃ 低温柜中，将精液灌装到 0.25 mL 的细管中，封口粉封口后置于细管托架上，并放在距离液氮表面 2 cm 处熏蒸 20 min，熏蒸结束后立即投入液氮中保存。

### 1.4 精液解冻

保存 1 周后，从液氮中取出精液细管，按照试验设计进行解冻，注意每次解冻一根细管精液并严格控制解冻时间。试验一：将冻精细管投入 45℃ 水浴锅中分别解冻 10、20 和 30 s 后立即进行后续检测；试验二：将冻精细管投入 55℃ 水浴锅中分别解冻 5、8 和 11 s 后立即进行后续检测；试验三：将冻精细管投入 65℃ 水浴锅中分别解冻 3、5、8 和 11 s 后立即进行后续检测；试验四：将冻精细管投入 70℃ 水浴锅中分别解冻 3、5、8 和 11 s 后立即进行后续检测；试验五：将冻精细管投入 75℃ 水浴锅中分别解冻 3、5 和 8 s 后立即进行后续检测；试验六：将冻精细管分别投入 37、45、55、65、70 和 75℃ 水浴锅中解冻 30、20、8、5、5 和 3 s 后立即进行后续检测。

### 1.5 精子活率、活力及运动性能检测

取 20 μL 解冻后的精液样本，立即使用 37℃ 预热的基础稀释液按照 1 : 4.5 进行稀释，将稀释后的精液在 37℃ 水浴锅中孵育 3 min 后，取 1.4 μL 精液滴在加热到 37℃ 的红宝石精子计数板上，利用 CASA（ML-608JZ II）系统检测解冻后的精子活率、活力、移动角度、侧摆幅度、直线速率、曲线速率和路径速率。

### 1.6 精子质膜完整性检测

采用低渗肿胀试验（HOST）检测质膜完整性<sup>[15]</sup>，取 20 μL 解冻后的精液样本立即与 200 μL 低渗溶液（包括 4.9 mg/mL 柠檬酸钠和 9 mg/mL 果糖）

混合,并在 37 ℃ 水浴锅孵育 30 min。取出 1.4 μL 滴在红宝石精子计数板上,于 400 倍的 CX31 生物显微镜下观察卷尾率,每次计数 200 个精子以上。

### 1.7 精子顶体完整性检测

顶体完整性采用 FITC-PNA 结合 PI 染色法进行测定,取 20 μL 解冻后的精液样本,立即使用 37 ℃ 预热的的基础稀释液按照 1:6 进行稀释,取 100 μL 稀释后的精液与 2 μL FITC-PNA 和 2 μL PI 混合,并在 37 ℃ 水浴锅中避光孵育 10 min,在用流式细胞仪检测之前加入 700 μL PBS 混匀。设置流式细胞仪检测 10 000 个细胞,统计 FITC 阴性为顶体完整。

### 1.8 精子 ROS 含量检测

取 20 μL 解冻后的精液样本,立即使用 37 ℃ 预热的的基础稀释液按照 1:6 进行稀释,取 50 μL 稀释后的精液与 2 μL DCFH-DA 探针混合,并在 37 ℃ 水浴锅中避光孵育 30 min。孵育结束后,使用 PBS 洗涤沉淀并加入 400 μL PBS 重悬,利用多功能酶标仪检测在 488 nm 的激发波和 525 nm 的发射波处的荧光强度。

### 1.9 数据统计与分析

使用 SPSS 25.0 软件按 LSD 对数据进行单因素方差分析 (One-way ANOVA),采用 Duncan 法对数据进行多重比较,数据表示为“平均值±标准误”, $P < 0.05$  表示差异显著, $P > 0.05$  表示差异不显著,每组重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 在各解冻温度下解冻时间对精子活率、活力及运动性能的影响

由表 1 可知,在 45 ℃ 条件下,解冻 20 和 30 s 后的精子活率、活力、直线速率、曲线速率、路径速率和侧摆幅度显著高于 10 s 解冻组 ( $P < 0.05$ ),但解冻 20 和 30 s 两组间差异不显著 ( $P > 0.05$ );解冻 20 s 后的精子移动角度显著高于 10 s 解冻组 ( $P < 0.05$ ),但与 30 s 解冻组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。在 55 ℃ 条件下,解冻 8 s 后的精子活力显著高于 5 s 解冻组 ( $P < 0.05$ ),但与 11 s 解冻组差异不显著 ( $P > 0.05$ );解冻 11 s 后的精子移动角度显著高于 5 s 解冻组 ( $P < 0.05$ ),但与 8 s 解冻组差异不显著 ( $P > 0.05$ );解冻后的精子活率、直线速率、曲线速率、路径速率和侧摆幅度在 3 组间均差异不显著 ( $P > 0.05$ )。在 65 ℃ 条件下,解冻 5 s 后的精子活率、活力和移动角度显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ );解冻 3、5 和 8 s 后的精子直线速率、曲线速率、路径速率和侧摆幅度均显著高于 11 s 解冻组 ( $P < 0.05$ ),但解冻 3、5 和 8 s 这 3 组间均差异不显著 ( $P > 0.05$ );

解冻 11 s 后的精子活率、活力及运动性能均显著低于其他各组 ( $P < 0.05$ )。在 70 ℃ 条件下,解冻 5 s 后的精子活率和活力显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ );解冻 3 和 5 s 组的精子直线速率、曲线速率、路径速率、侧摆幅度和移动角度均显著高于 8 和 11 s 解冻组 ( $P < 0.05$ ),但解冻 3 s 和 5 s 两组间差异不显著 ( $P > 0.05$ );解冻 8 s 和 11 s 后的精子活率和活力均显著低于其他各组 ( $P < 0.05$ ),且两组间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。在 75 ℃ 条件下,解冻 8 s 后的精子全部死亡;解冻 3 和 5 s 后的精子活率、活力和移动角度差异不显著 ( $P > 0.05$ );解冻 3 s 后的精子直线速率、曲线速率、路径速率和侧摆幅度显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ )。

由表 1 可知,在 45 ℃ 下,20 s 为最优解冻时间;在 55 ℃ 下,8 s 为最优解冻时间;在 65 ℃ 下,5 s 为最优解冻时间;在 70 ℃ 下,5 s 为最优解冻时间;在 75 ℃ 下,3 s 为最优解冻时间。55 ℃ 解冻 8 s 后的精子活率显著高于 37 ℃ 解冻 30 s 组和 65 ℃ 解冻 5 s 组 ( $P < 0.05$ ),但与其他各组差异不显著 ( $P > 0.05$ );55 ℃ 解冻 8 s 后的精子活力和移动角度显著高于 37 ℃ 解冻 30 s 组和 75 ℃ 解冻 3 s 组 ( $P < 0.05$ ),但与其他各组差异不显著 ( $P > 0.05$ );37 ℃ 解冻 30 s 组的精子直线速率显著低于其他各组 ( $P < 0.05$ );45 ℃ 解冻 20 s 和 55 ℃ 解冻 8 s 后的精子曲线速率、路径速率和侧摆幅度均显著高于 37 ℃ 解冻 30 s 组 ( $P < 0.05$ ),但与其他各组差异均不显著 ( $P > 0.05$ ),且 45 ℃ 解冻 20 s 和 55 ℃ 解冻 8 s 两组间差异也不显著 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 各最优解冻温度和时间对精子功能完整性和 ROS 水平的影响

由表 2 可知,55 ℃ 解冻 8 s 后的精子质膜完整率显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ );45 ℃ 解冻 20 s 和 65 ℃ 解冻 5 s 后的精子质膜完整率显著高于 37 ℃ 解冻 30 s 和 75 ℃ 解冻 3 s 组 ( $P < 0.05$ ),但与 70 ℃ 解冻 5 s 组差异不显著 ( $P > 0.05$ );37 ℃ 解冻 30 s 后的精子质膜完整率显著低于其他各组 ( $P < 0.05$ )。55 ℃ 解冻 8 s 组的精子顶体完整率显著高于 37 ℃ 解冻 30 s、70 ℃ 解冻 5 s 和 75 ℃ 解冻 3 s 组 ( $P < 0.05$ ),但与 45 ℃ 解冻 20 s 和 65 ℃ 解冻 5 s 组差异不显著 ( $P > 0.05$ );37 ℃ 解冻 30 s 后的精子顶体完整率显著低于其他各组 ( $P < 0.05$ )。55 ℃ 解冻 8 s 后的精子 ROS 水平显著低于 37 ℃ 解冻 30 s、45 ℃ 解冻 20 s、65 ℃ 解冻 5 s 和 75 ℃ 解冻 3 s 组 ( $P < 0.05$ );37 ℃ 解冻 30 s 后的精子 ROS 水平显著高于 55 ℃ 解冻 8 s 和 70 ℃ 解冻 5 s 组 ( $P < 0.05$ ),但与其他各组均差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

表1 在各解冻温度下解冻时间对精子活率、活力及运动性能的影响 ( $n=6$ )

温度/ ℃	时间/ s	活率/%	活力/%	直线速率/ ( $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ )	曲线速率/ ( $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ )	路径速率/ ( $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ )	侧摆幅度/ $\mu\text{m}$	移动角度/ ( $^{\circ} \cdot \text{s}^{-1}$ )
37	30	69.62±0.22 <sup>C</sup>	54.42±0.83 <sup>C</sup>	36.77±0.33 <sup>B</sup>	53.71±0.43 <sup>B</sup>	37.98±0.30 <sup>B</sup>	15.73±0.12 <sup>B</sup>	40.54±0.71 <sup>B</sup>
	10	57.07±1.16 <sup>b</sup>	41.91±0.23 <sup>b</sup>	35.56±0.75 <sup>b</sup>	51.84±1.63 <sup>b</sup>	36.66±1.15 <sup>b</sup>	15.18±0.48 <sup>b</sup>	33.24±1.19 <sup>b</sup>
45	20	75.09±1.20 <sup>ABa</sup>	59.74±1.97 <sup>ABa</sup>	41.45±0.88 <sup>Aa</sup>	59.78±1.06 <sup>Aa</sup>	42.27±0.75 <sup>Aa</sup>	17.51±0.31 <sup>Aa</sup>	43.87±4.09 <sup>ABa</sup>
	30	73.20±0.53 <sup>a</sup>	55.13±1.31 <sup>a</sup>	42.26±0.82 <sup>a</sup>	58.75±1.43 <sup>a</sup>	41.54±1.01 <sup>a</sup>	17.21±0.42 <sup>a</sup>	39.81±0.95 <sup>ab</sup>
55	5	75.82±0.55	58.26±0.61 <sup>b</sup>	40.65±0.72	58.60±1.15	41.44±0.81	17.17±0.34	44.19±1.18 <sup>b</sup>
	8	77.48±1.79 <sup>A</sup>	62.81±0.95 <sup>Aa</sup>	40.94±1.19 <sup>A</sup>	58.20±1.88 <sup>A</sup>	41.15±1.33 <sup>A</sup>	17.05±0.55 <sup>A</sup>	48.31±2.13 <sup>Aab</sup>
65	11	76.99±1.89	61.54±1.85 <sup>ab</sup>	39.83±1.32	55.37±1.01	39.15±0.72	16.22±0.30	51.80±0.89 <sup>a</sup>
	3	58.73±2.28 <sup>b</sup>	42.69±1.16 <sup>b</sup>	40.21±1.38 <sup>a</sup>	55.74±1.99 <sup>a</sup>	39.41±1.41 <sup>a</sup>	16.32±0.58 <sup>a</sup>	33.23±1.72 <sup>b</sup>
70	5	72.47±1.01 <sup>BCa</sup>	59.37±0.43 <sup>ABa</sup>	40.87±0.91 <sup>Aa</sup>	56.89±1.03 <sup>ABa</sup>	40.23±0.73 <sup>ABa</sup>	16.66±0.30 <sup>ABa</sup>	44.26±1.96 <sup>ABa</sup>
	8	55.85±1.86 <sup>b</sup>	42.45±0.43 <sup>b</sup>	40.92±0.89 <sup>a</sup>	53.09±2.42 <sup>a</sup>	37.55±1.71 <sup>a</sup>	15.55±0.71 <sup>a</sup>	29.25±0.67 <sup>b</sup>
75	11	0.92±0.51 <sup>c</sup>	0.62±0.31 <sup>c</sup>	7.14±3.65 <sup>b</sup>	20.69±15.09 <sup>b</sup>	14.63±10.67 <sup>b</sup>	6.06±4.42 <sup>b</sup>	6.44±4.08 <sup>c</sup>
	3	69.30±1.16 <sup>b</sup>	55.32±0.69 <sup>b</sup>	40.54±0.35 <sup>a</sup>	60.16±0.49 <sup>a</sup>	42.54±0.35 <sup>a</sup>	17.62±0.15 <sup>a</sup>	49.16±2.37 <sup>a</sup>
75	5	74.39±1.91 <sup>ABa</sup>	59.13±0.74 <sup>ABa</sup>	40.05±0.62 <sup>Aa</sup>	56.54±1.36 <sup>ABa</sup>	39.98±0.96 <sup>ABa</sup>	16.56±0.40 <sup>ABa</sup>	43.20±0.79 <sup>ABa</sup>
	8	1.57±0.68 <sup>c</sup>	0.93±0.57 <sup>c</sup>	9.46±5.39 <sup>b</sup>	14.70±9.43 <sup>b</sup>	10.39±6.67 <sup>b</sup>	4.30±2.76 <sup>b</sup>	12.49±10.8 <sup>b</sup>
75	11	0.31±0.31 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
	3	73.15±1.36 <sup>ABCa</sup>	57.87±1.76 <sup>BCa</sup>	41.62±0.23 <sup>Aa</sup>	56.45±0.41 <sup>ABa</sup>	39.92±0.29 <sup>ABa</sup>	16.54±0.12 <sup>ABa</sup>	39.89±1.97 <sup>Ba</sup>
75	5	71.99±0.55 <sup>a</sup>	56.58±0.48 <sup>a</sup>	39.58±0.40 <sup>b</sup>	55.44±0.23 <sup>b</sup>	39.20±0.16 <sup>b</sup>	16.24±0.07 <sup>b</sup>	41.30±0.59 <sup>a</sup>
	8	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>

注：在各解冻温度下，同列不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )；各最优解冻温度和时间 (37℃解冻30 s、45℃解冻20 s、55℃解冻8 s、65℃解冻5 s、70℃解冻5 s、75℃解冻3 s)，同列不同大写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

表2 各最优解冻温度和时间对精子质膜完整性、顶体完整性及 ROS 水平的影响 ( $n=6$ )

解冻温度/℃	时间/s	质膜完整性/%	顶体完整性/%	ROS 水平
37	30	44.06±0.48 <sup>d</sup>	72.95±0.57 <sup>c</sup>	930.00±6.66 <sup>a</sup>
45	20	47.75±0.75 <sup>b</sup>	78.60±1.28 <sup>ab</sup>	889.00±10.07 <sup>ab</sup>
55	8	50.98±1.55 <sup>a</sup>	80.29±0.60 <sup>a</sup>	755.33±41.28 <sup>c</sup>
65	5	48.44±1.10 <sup>b</sup>	78.12±0.73 <sup>ab</sup>	867.00±36.50 <sup>ab</sup>
70	5	47.16±0.84 <sup>bc</sup>	77.29±0.35 <sup>b</sup>	832.33±29.63 <sup>bc</sup>
75	3	45.73±0.30 <sup>c</sup>	77.15±0.38 <sup>b</sup>	907.67±19.94 <sup>ab</sup>

注：同列不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

精液的冷冻和解冻过程都能够决定解冻后的精子活力，直接影响解冻后的精液质量<sup>[16]</sup>。在-60~0℃的危险温度区间内，精子内外水分子会重新排列形成冰晶，并且体积不断变大<sup>[17]</sup>。冰晶的移动会刺破细胞膜，损伤细胞器以及染色体结构并导致细胞破裂，造成精子活力的降低<sup>[18-19]</sup>。研究表明，控制合适的降温速率和升温速率使其快速通过该危险温度区间，是能减少大冰晶形成的有效方式<sup>[20]</sup>。

精子活率、活力以及各项运动性能是直接反映精子质量和受精能力的最重要的基础指标。精子活力是

指直线前进运动精子占总精子数的比例，直线速率表示精子头部直线移动距离的速度，曲线速率表示精子头部实际移动距离的速度，路径速率表示精子头沿空间平均轨迹的运动速度，侧摆幅度是指精子头部实际运动轨迹相对平均路径的侧摆幅度，移动角度的含义是精子头沿运动轨迹瞬间转折角度的时间平均值<sup>[21]</sup>。研究表明，精子各项运动性能指标的数值越高表示精子的运动能力越好，受精能力越强<sup>[22]</sup>。本研究发现，45℃解冻10 s后的精子活率、活力以及各项运动速率显著低于20和30 s解冻组，65℃解冻3 s后的精子活率、活力和移动角度显著低于5 s解冻组。根据宋新华等<sup>[23]</sup>的研究表明，这可能是因为在该温度条

件下,解冻时间太短,不能完全穿过危险温度区间,产生冰晶损伤,造成了精液质量的显著降低。另一方面,可能是因为解冻时间太短,不足以将细胞内多余的抗冻保护剂排出,精子受到渗透压损伤<sup>[24]</sup>。在试验三、四和五的温度条件下,长时间解冻后的精子基本全部死亡。相关研究表明,这可能是因为在较高温度条件下,过长时间的解冻造成精子热损伤和高温变性,并引起精子活率的大幅度降低甚至全部死亡<sup>[25-27]</sup>。

本研究发现 37 °C 解冻 30 s 后的精子活力和直线速率均显著低于其他各解冻温度和时间组,这表明,37 °C 不适合湖羊精液的解冻。Sharafi 等<sup>[28]</sup>和 John Morris 等<sup>[29]</sup>的研究发现,低温缓慢解冻会促进细胞内冰的重结晶,从而加剧对精子细胞器和结构的损伤并造成精子质量的降低。这可能是 37 °C 较低温度不利于湖羊精液解冻的原因。精子的质膜和顶体是十分重要的结构,完整的质膜能够保持细胞渗透压平衡,同时还可以控制钙离子流入以及精卵结合过程中膜的融合<sup>[30]</sup>;而完整的顶体对于精子通过卵丘细胞层以及穿透透明带完成正常受精发挥着关键作用<sup>[31]</sup>。55 °C 解冻后的精子质膜完整性显著高于其他各组,其顶体完整率最高且显著高于 37、70 和 75 °C 这 3 组。这表明,55 °C 解冻 8 s 时的升温速率以及时间能够使精子顺利越过危险温度区间,得到较好的解冻效果。根据邓福金等<sup>[32]</sup>的研究结果,这可能是因为精子内的水分子从玻璃态快速跨过结晶态直接变为液态,减少了对精子结构的损伤。Kowalczyk 等<sup>[33]</sup>的研究同样表明,快速冷冻解冻能够减轻对精子结构的损伤。精子在代谢过程中产生的 ROS 是指带有未成对电子的基团,主要包括有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、-OH、O<sub>2</sub> 等<sup>[34]</sup>。相关研究表明,正常生理状态下,ROS 含量处于动态平衡的状态,但当精子受到外界刺激后,ROS 产生增加,造成氧化应激进而损伤精子结构并使精子质量降低<sup>[17]</sup>。试验六中,55 °C 解冻后的精子 ROS 水平最低,且显著低于 37、45、65 和 75 °C 组。这可能是由于,ROS 的主要来源是为精子提供能量的线粒体,并且在解冻温度和时间下,尽可能地降低了重结晶对精子线粒体鞘的损伤最小,线粒体呼吸链电子传递受到的影响最小,因此,产生较低水平的 ROS<sup>[35-36]</sup>。

冻融后的精液质量与解冻温度和时间紧密相关,合适的温度和时间能够降低细胞内冰晶的产生,提高精子活率。因此,在精液解冻过程中的关键是使温度迅速穿过产生冰晶的危险温区,尽可能地避免冰晶的产生,这是获得良好解冻效果的重要因素。胡娟等<sup>[37]</sup>在邓川牛精液冷冻的研究中发现,75 °C 解冻 3 s

或者 38 °C 解冻 20 s 可以达到较好的精液保存效果。Sellés 等<sup>[38]</sup>在猪精液冷冻的研究中发现,50 °C 解冻 12 s 的效果要优于 37 °C 解冻 30 s。徐日福等<sup>[39]</sup>研究表明,关于鸡精液冷冻保存,30~40 °C 的解冻条件可获得较高的精液质量。张华<sup>[40]</sup>在羊冷冻精液的研究中表明,45 °C 条件下解冻可获得较高的精液质量。上述研究与本研究结果并不完全一致,这可能是由于解冻温度和时间选择除了与畜禽品种有关外,还会受到稀释液成分、精液降温冷冻过程等的影响<sup>[41]</sup>。

## 4 结论

本研究结果表明,37 °C 不适合湖羊冷冻精液的解冻;若在 45 °C 条件下解冻,则应该选择 20 s 的解冻时间;若在 55 °C 条件下解冻,则应该选择 8 s 的解冻时间;若在 65 和 70 °C 条件下,则应该选择 5 s 的解冻时间;若在 75 °C 条件下解冻,则应该选择 3 s 的解冻时间。综合考虑并结合实际操作过程,55 °C 条件下解冻 8 s 可以获得较好的精液解冻效果,是最适合湖羊精液的解冻方式,同时,鉴于本研究每组样本数 3 个较少,处理时间以秒计算且操作过程和测定精液品质的过程也有时间的干扰,更多的是未来通过大量试验来验证最优解冻参数的准确性。

## 参考文献:

- [1] 杨帆,姚晓磊,李康,等.不同绵羊品种发情期卵巢组织 lncRNA 和 mRNA 的差异表达分析 [J].南京农业大学学报,2023,46(6):1142-1152.
- [2] 梁国荣,刘伯河,张明良,等.绵羊常温人工授精技术的应用及推广效果 [J].甘肃畜牧兽医,2022,52(10):38-40.
- [3] ZHANG L M, SOHAIL T, WANG Y H, et al. The effect of different storage temperature on Hu ram sperm parameters [J]. Kafkas Univ Vet Fak, 2022, 28: 201-209.
- [4] 马玉英,贺严峰.萨福克肉羊精液冷冻保存技术浅析 [J].中国畜禽种业,2017,13(1):66-67.
- [5] YÁÑEZ-ORTIZ I, CATALÁN J, RODRÍGUEZ-GIL J E, et al. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: cattle, horse, pig and sheep [J]. Anim Reprod Sci, 2022, 246: 106904.
- [6] YESTE M. Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs [J]. Theriogenology, 2016, 85(1):47-64.
- [7] SILVA H V R, SILVA A R, DA SILVADA L D M, et al. Semen cryopreservation and banking for the conservation of neotropical carnivores [J]. Biopreserv Biobank, 2019, 17(2):183-188.
- [8] 李梦奇,房晓欢,于洋,等.纳米颗粒对湖羊精液冷冻保存的影响 [J].中国兽医学报,2023,43(11):2368-2376.
- [9] MEDEIROS C M, FORELL F, OLIVEIRA A T, et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? [J]. Theriogenology, 2002, 57(1):327-344.
- [10] 郭堂玉,凌泽继,韦明宇,等.不同冷冻保护液和解冻温度对猪

- 精液冷冻效果的影响 [J]. 中国兽医学报, 2010, 30 (7): 1000-1004.
- [11] 李维杰, 李智新, 颜宏利, 等. 精子冷冻保存研究进展 [J]. 制冷技术, 2023, 43 (2): 78-85.
- [12] BILODEAU J F, CHATTERJEE S, SIRARD M A, et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing [J]. Mol Reprod Dev, 2000, 55 (3): 282-288.
- [13] FULLER B J. Cryoprotectants; the essential antifreezes to protect life in the frozen state [J]. Cryo Letters, 2004, 25 (6): 375-388.
- [14] 甘麦邻, 刘麟, 赵雪, 等. 不同解冻程序对荣昌猪冷冻精液解冻效果的影响 [J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57 (7): 140-146.
- [15] 吕春荣, ALLAI L, 李俊喜, 等. 白藜芦醇对山羊冷冻精子质膜、DNA 完整性和温度耐受性的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47 (1): 124-130.
- [16] 张永春, 张显华, 刘东升, 等. 解冻温度和保存时间对牛细管冻精精子活率的影响 [J]. 中国奶牛, 2013, (15): 60-62.
- [17] 吴梦, 刘雪芹, 刘子嘉, 等. 猪精液超低温冷冻保存研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2019, 55 (7): 35-40.
- [18] 任发. 鞣花酸对猪精液常温保存效果的研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [19] WATSON P F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen [J]. Anim Reprod Sci, 2000, 60/61: 481-492.
- [20] 贾兰萍, 徐相亭, 邓晓彬. 牛细管冻精解冻时间的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010 (24): 74-75.
- [21] 李宇. 淫羊藿多糖对山羊精液冷冻保存效果的研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [22] LARSEN L, SCHEIKE T, JENSEN T K, et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population [J]. Hum Reprod, 2000, 15 (7): 1562-1567.
- [23] 宋新华, 陈艳珍. 不同解冻温度和时间对肉牛细管冻精精子活力的影响 [J]. 安徽农业科学, 2007 (35): 11476-11477.
- [24] PENITENTE-FILHO J M, OLIVEIRA F A, JIMENEZ C R, et al. Association of vitamin E with rapid thawing on goat semen [J]. Scientific World Journal, 2014, 2014: 964172.
- [25] YILMAZ E, AK K, BARAN A. Effect of different thawing time and high temperature on frozen thawed bull semen traits [J]. J Anim Vet Adv, 2019, 18 (7): 239-245.
- [26] 王凤改, 王永生. 解冻温度对精子活力的影响 [J]. 中国牛业科学, 2011, 37 (1): 42-44.
- [27] DEJARNETTE J M, BARNES D A, MARSHALL C E. Effects of pre- and post-thaw thermal insults on viability characteristics of cryopreserved bovine semen [J]. Theriogenology, 2000, 53 (6): 1225-1238.
- [28] SHARAFI M, BORGHEI-RAD S M, HEZAVEHEI M, et al. Cryopreservation of semen in domestic animals; a review of current challenges, applications, and prospective strategies [J]. Animals (Basel), 2022, 12 (23): 3271.
- [29] JOHN MORRIS G, ACTON E, MURRAY B J, et al. Freezing injury: the special case of the sperm cell [J]. Cryobiology, 2012, 64 (2): 71-80.
- [30] FLESCHE F M, GADELLA B M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1469 (3): 197-235.
- [31] QAMAR A Y, FANG X, BANG S, et al. Effects of kinetin supplementation on the post-thaw motility, viability, and structural integrity of dog sperm [J]. Cryobiology, 2020, 95: 90-96.
- [32] 邓福金, 吴庆荣, 王化青. 冷冻温度对牛精子复苏率及降温速率变化规律的研究 [J]. 中国牛业科学, 2010, 36 (5): 27-29.
- [33] KOWALCZYK A. The effect of cryopreservation process on morphology and fertilising ability of Japanese quail (*Coturnix japonica*) spermatozoa [J]. Cryo Letters, 2008, 29 (3): 199-208.
- [34] 汪顺伟. 水飞蓟素对猪精液液态及冷冻保存的影响 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018.
- [35] AITKEN R J, JONES K T, ROBERTSON S A. Reactive oxygen species and sperm function: in sickness and in health [J]. J Androl, 2012, 33 (6): 1096-1106.
- [36] 白双勇, 王剑松, 赵庆华. 肥胖男性不育患者精子线粒体膜电位、游离脂肪酸、活性氧的关系 [J]. 中国医科大学学报, 2015, 44 (7): 653-656.
- [37] 胡娟, 王萍萍, 欧国雨, 等. 不同解冻方法对邓川牛细管冻精品质的影响 [J]. 中国奶牛, 2023 (12): 16-20.
- [38] SELLÉS E, GADEA J, ROMAR R, et al. Analysis of *in vitro* fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility [J]. Reprod Domest Anim, 2003, 38 (1): 66-72.
- [39] 徐日福, 王红军, 张忠诚. 鸡精液最佳冷冻时间和解冻温度的确定 [J]. 江西畜牧兽医杂志, 1997 (4): 13-14.
- [40] 张华. 羊冷冻精液人工授精技术的推广应用 [J]. 畜牧与饲料科学, 2012, 33 (3): 119.
- [41] 窦英杰. 奶绵羊精液冷冻稀释液优化研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2021.