姚博元，张雅茹，何雨彤，等. 线粒体靶向抗氧化剂 Mito-TEMPO 对鸡精液冷冻保存效果的影响［J］. 畜牧与兽医，2025，57（11）：1-7.
YAO B Y，ZHANG Y R，HE Y T，et al. The effect of mitochondrial-targeted antioxidant Mito-TEMPO on the cryopreservation of chicken semen［J］. Animal Husbandry & Veterinary Medicine，2025，57（11）：1-7.

线粒体靶向抗氧化剂 Mito-TEMPO 对鸡精液冷冻保存效果的影响

姚博元，张雅茹，何雨彤，尉斌艳，王欣荣*
（甘肃农业大学动物科学技术学院，甘肃 兰州　730070）

摘要：旨在探究线粒体靶向抗氧化剂 Mito-TEMPO 在鸡精液冷冻保存中的应用效果，为鸡精液解冻后的精子品质提高提供依据。在精液冷冻稀释液中添加不同浓度的 Mito-TEMPO（0、20、40、60 和 80 μmol/mL），检测解冻后鸡精子的质量指标、抗氧化性能和线粒体酶活性。结果：与对照组（0 μmol/mL Mito-TEMPO）相比，添加 40 μmol/mL Mito-TEMPO 时，解冻后鸡精子的活性、线粒体活性以及顶体、质膜和 DNA 完整率均显著提高（$P<0.05$）；线粒体超氧化物歧化酶（SOD）、总抗氧化能力（T-AOC）和过氧化氢酶（CAT）活性显著提高（$P<0.05$）；琥珀酸脱氢酶（SDH）、*L*-乳酸脱氢酶（*L*-LDH）和谷草转氨酶（GOT）活性及丙二醛（MDA）含量显著降低（$P<0.05$）。结论：在鸡精液冷冻稀释液中添加 40 μmol/mL 的 Mito-TEMPO 可显著改善解冻后精子的活率和活力，有效保护精子的质膜、顶体和 DNA 的完整性，提高精子的抗氧化能力和线粒体活性，并减少线粒体相关酶的活性，显著改善鸡精子解冻后的质量。

关键词：鸡；Mito-TEMPO；精液品质；冷冻保存
中图分类号：S831.3　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0529-5130(2025)11-0001-07

The effect of mitochondrial-targeted antioxidant Mito-TEMPO on the cryopreservation of chicken semen

YAO Boyuan，ZHANG Yaru，HE Yutong，YU Binyan，WANG Xinrong*
（College of Animal Science and Technology，Gansu Agricultural University，Lanzhou 730070，China）

Abstract：The aim of this study was to explore the application effect of mitochondrial-targeted antioxidant Mito-TEMPO in the cryopreservation of chicken semen，and to provide a basis for improving the sperm quality after chicken semen freezing and thawing. Different concentrations of Mito-TEMPO（0，20，40，60 and 80 μmol/mL）were added to the semen cryopreservation diluent，and the quality indicators，antioxidant performance and mitochondrial enzyme activity of thawed chicken sperm were detected. The results were that，compared with the control group（0 μmol/mL Mito-TEMPO），when 40 μmol/mL Mito-TEMPO was added，the activity of sperm after thawing，their mitochondrial activity，acrosome，plasma membrane and DNA integrity rate were significantly increased（$P<0.05$）；the activities of their mitochondrial superoxide dismutase（SOD），total antioxidant capacity（T-AOC）and catalase（CAT）were significantly increased（$P<0.05$）；the activities of their succinate dehydrogenase（SDH），*L*-lactic dehydrogenase（*L*-LDH）and glutamic oxalacetic transaminase（GOT）and the content of malondialdehyde（MDA）in them were significantly lower（$P<0.05$）. In conclusion，adding 40 μmol/mL Mito-TEMPO to the semen cryopreservation diluent significantly improved the viability and motility of the sperm after thawing，effectively protected the integrity of their plasma membrane，acrosome and DNA，improved their antioxidant capacity and mitochondrial activity，and reduced the activities of their mitochondrial-related enzymes；which resulted in significantly improving the quality of chicken sperm after thawing.

Keywords：chicken；Mito-TEMPO；semen quality；freezing preservation

精液冷冻技术是管理和存储雄性家畜生育力的重要手段，没有距离、时间和空间的影响，能够长期稳定保存遗传资源，确保优良种质资源得以传承[1]。然而，在精液冷冻降温过程中，因物理、化学及氧化应激等损伤，可破坏精细胞结构，影响精子活力和功能[2]，最终导致精子失去受精能力[3]。冷冻过程中急剧变化的低温使精子细胞的代谢活动和化学反应减缓，水分在细胞内的结晶会导致细胞破裂或损伤，是精子脂膜组分、顶体状态、活力和存活率产生不良影

收稿日期：2024-11-27；修回日期：2025-08-23
基金项目：国家自然科学基金项目（31560634）
第一作者：姚博元，男，硕士
*通信作者：王欣荣，教授，主要从事家畜性腺比较形态学、绵羊配子发生与环境适应性研究，E-mail：wangxr@ gsau. edu. cn。

响的主要原因，还会导致精子发生氧化应激、细胞凋亡和 DNA 损伤[4-5]。禽类精子头部较小且呈尖形，不具备哺乳动物传统的顶体结构，而是一个相对简单的形态，在冷冻和复苏过程中可能更容易受到膜破裂和损伤[6]。精清中的成分难以保持精子的完整以免受损伤，可能需要更为精细调整和更高浓度的保护剂[7]。公鸡的射精量较小，通常需要多次采精，但其精子细胞较多，冷冻前需要适当稀释[8]。使用合适的冷冻保护剂和精确控制冷冻解冻过程中的温度变化，是确保冷冻成功的关键[9]。研究人员会在精液冷冻稀释液中添加抗冻保护剂，如蛋黄、多糖类物质，而抗氧化剂作为一种高效且种类多样的保护剂，也不断应用于精子的冷冻保存领域中。

Mito-TEMPO 是一种专门针对线粒体的抗氧化剂，它由三苯基膦基团（TPP）和哌啶硝基氧（TEMPO）结合而成；能够高效清除线粒体内的活性氧（ROS），对线粒体氧自由基产生有明显的抑制效果[10-13]，改善线粒体功能并增强抗氧化能力，从而减轻氧化应激对细胞的损伤[14]。目前，关于 Mito-TEMPO 作为抗氧化剂应用于家畜精液冷冻保存的相关研究较多，例如在人的精液冷冻保存中，Mito-TEMPO 能够提高精子的活性、维持冷冻后生物膜的完整性并增强抗氧化性能，进而提高精液冷冻保存的品质[15]。刘娟等[16]发现在猪精液中添加不同浓度的 Mito-TEMPO 可有效提高猪精液的冷冻保存效果。不同浓度的 Mito-TEMPO 对水牛[17-18]和公羊[19-21]的精子质量和雄性生育力有保护作用。本文旨在比较不同浓度 Mito-TEMPO 对鸡精子冷冻保存的效果，并探究不同浓度 Mito-TEMPO 对冷冻解冻后鸡精子的质量和抗氧化及线粒体功能的影响，研究结果可为改良鸡精液冷冻保存方法、提高鸡精子品质提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物及主要试剂

5 只海兰褐公鸡采购于宁夏养殖基地，25 周龄左右，体况良好，健康无生殖系统疾病，预采精质量稳定良好。

Mito-TEMPO、谷氨酸钠、果糖、醋酸钠罗丹明（Rh123）、吖啶橙 AO，购自上海奥默生物技术有限公司；氯化镁、柠檬酸钠、柠檬酸钾，购自上海麦克林生化科技有限公司；双蒸水、卵黄上清液、甘油、吉姆萨，购自武汉塞维尔生物科技有限公司；红色荧光核酸染料以及丙二醛（MDA）、过氧化氢酶（CAT）、超氧化物歧化酶（SOD）、总抗氧能力（T-AOC）、*L*-乳酸脱氢酶（*L*-LDH）、琥珀酸脱氢酶（SDH）和谷草转氨酶（GOT）检测试剂盒，购自北京索莱宝生物公司。

基础稀释液[22]：柠檬酸钾 0.128 g、氯化镁 0.068 g、谷氨酸钠 1.92 g、果糖 1 g、醋酸钠 0.815 g、双蒸水定容至 100 mL，pH=7.0。

卵黄上清液：鸡蛋购自宁夏养殖基地，取卵黄 50 mL，生理盐水 50 mL，搅拌至两者完全混合均匀；上机离心 3 次，每次 10 min（4 ℃、14 000 r/min），吸取上清液，放于 4 ℃冰箱以备后续使用。

Mito-TEMPO 稀释液：将 5 mg Mito-TEMPO 溶于 980.33 μL 的蒸馏水中配制成 10 mmol/mL 的母液。

冷冻稀释液：在 Lake's 稀释液中添加 10%卵黄上清液，11%甘油[23-25]。

1.2 精液的采集与评定

采用腹背联合按摩法采精，每只鸡采精重复 3 次。采精后置于显微镜下观察精子活力，活力为 0.8 以上的精液为合格精液，将 5 只鸡的合格精液进行混池，用于后续的冷冻试验。

1.3 试验分组

将冷冻稀释液分为 5 等份，每 1 mL 冷冻稀释液中分别添加 0、2、4、6、8 μL Mito-TEMPO 母液（10 mmol/mL），充分溶解后冷冻稀释液中的 Mito-TEMPO 浓度分别为 0、20、40、60、80 μmol/mL，其中 0 μmol/mL 组作为对照组，现用现配。每次每组冷冻 10 管，每组试验重复 3 次。

1.4 精液的平衡与稀释

采精前将基础稀释液置于 37 ℃的水浴锅中保温。将镜检合格的精液混池，按照精液和基础稀释液 1∶2 进行稀释，用 10 层纱布包裹，避光放入 4 ℃冰箱中平衡 2.5 h。平衡结束后，分为 5 等份，与 4 ℃下预冷的 5 种浓度冷冻稀释液，分别按 1∶1 混合，再次平衡 30 min 后进行冷冻试验。

1.5 精液的冷冻与解冻

精液冷冻：平衡后的 5 组精液分装到冻精细管中，每组使用 10 个细管，每个细管装入 200 μL 精液。细管两端需留出一定的空气间隙，以防冷冻过程中棉塞被喷出。将细管置于液氮表面 10 cm 处进行 5 min 的熏蒸，接着转移至液氮表面 1 cm 处继续熏蒸 2 min，熏蒸结束将细管落入液氮中冷冻保存。

精液解冻：将冻精细管投入 37 ℃温水中解冻，30 s 后取出擦拭水分，迅速将精液转至预热好的离心管中，再加入预热的基础稀释液，孵育 10 min 后用于检测。

1.6 精子参数的测定

1.6.1 *活力和活率的测定*

5 组精液分别解冻 2 个冻精细管，每个冻精细管取出 20 μL 精液制成抹片，镜下随机选取 5 个视野观

察并统计精子的平均活力和活率，试验重复 3 次。

1.6.2　质膜完整率的测定

利用低渗肿胀法（HOST）测定精子的质膜完整率。取 10 μL 精液样品加入提前温育的离心管，添加 100 μL 提前预热的 HOST 低渗溶液，37 ℃水浴 10 min；再次取 10 μL 的精液混合液于载玻片上，涂片，重复 3 次，风干后置于镜下随机观察，随机选取 4 个视野，统计至少 400 个精子。质膜完整率为尾巴弯曲精子数与所有精子数的比例。

1.6.3　顶体完整率的测定

采用吉姆萨染色法测定精子的顶体完整率。取 10 μL 精液，滴在载玻片一端，涂片尽量保证厚薄均匀。待精液涂片晾干后及时用甲醇固定 15 min，去除固定液，不经水洗直接晾干。滴加瑞氏姬姆萨染液 A 液覆盖涂片区 30 s，继续滴加 2~3 倍体积瑞氏姬姆萨染液 B 液，用枪头轻轻吹吸使 A 液与 B 液混匀，染色 1~3 min，倾去染液，蒸馏水从玻片一端轻轻冲洗涂片，涂片置 60 ℃烘箱快速烘干后镜检。通过镜下观察精子顶体结构，顶体外形正常且完整的精子被判定为顶体正常精子；而顶体出现严重膨胀或脱落的精子被判定为顶体异常精子。在显微镜下随机选择至少 4 个视野，统计至少 400 个精子，计算其中顶体正常精子的比例，即为顶体完整率。

1.6.4　DNA 完整率的测定

采用红色荧光核酸染料和吖啶橙双荧光染色法测定精子的 DNA 完整率。取 50 μL 精液加入提前预热的离心管，加入染色工作液浸没精子，室温避光染色 15 min，加入 10 μL 的 Hancock's solution 溶液终止染色；取出 10 μL 的混合染色精液滴于载玻片上，盖片并置于正倒置一体荧光显微镜下 400 倍观察，精子头部呈绿色荧光为 DNA 双链精子。随机选取至少 4 个视野观察，统计至少 400 个精子，计算 DNA 双链精子数占精子总数的百分比，即精子 DNA 完整率。

1.6.5　线粒体活性的测定

罗丹明 123 荧光染色法测定精子线粒体活性。离心管中加入 100 μL 的精液，再加入 1 mL 的罗丹明 123 染色工作液，37 ℃混匀暗处理 30 min。取出 10 μL 的混合染色精液滴于载玻片上，在 400 倍正倒置一体荧光显微镜下观察，精子尾部呈绿色荧光为有线粒体活性。随机选取最少 4 个视野观察，统计至少 400 个精子。

1.6.6　抗氧化指标的测定

索莱宝试剂盒检测精子的抗氧化指标。根据试剂盒的说明书，处理各组精子样品，设定酶标仪的波长，读取吸光度值，按照试剂盒说明书公式计算精子 CAT、SOD、T-AOC 的活性及 MDA 的含量。

1.6.7　线粒体酶活性的测定

索莱宝试剂盒检测线粒体酶活性。根据试剂盒的说明书，处理各组精子样品，设定酶标仪的波长，读取吸光度值，按照试剂盒说明书公式计算精子的 SDH、GOT、*L*-LDH 的活性。

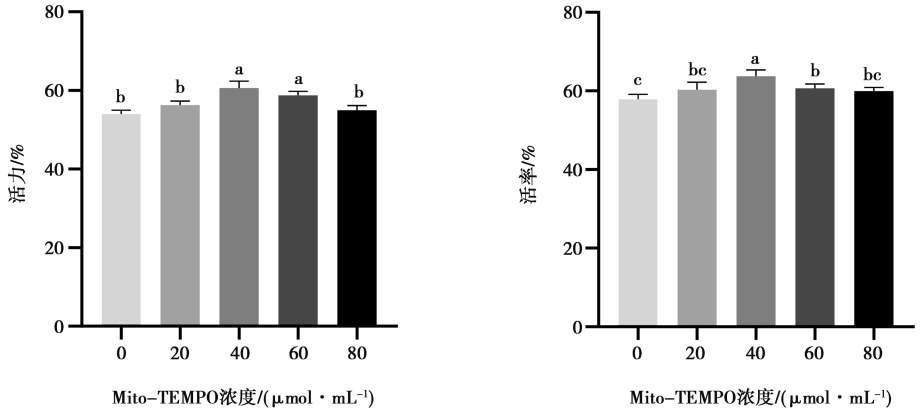
1.7　数据统计与分析

所有试验数据用 Excel 进行统计梳理，用 GraphPad Prism 8.0.2 软件作图，结果采用单因素方差分析（ANOVA），用 Tukey 法进行多重比较。结果均以“平均值±标准差”表示，$P<0.05$ 表示差异显著。

2　结果与分析

2.1　不同浓度 Mito-TEMPO 对解冻后鸡精子活性的影响

图 1 显示，鸡冷冻稀释液添加不同浓度的 Mito-TEMPO，相比对照组，浓度为 40 和 60 μmol/mL 组解冻后精子活力和活率显著提高（$P<0.05$）；浓度为 40 μmol/mL 组解冻后鸡精子活率显著高于其他各组（$P<0.05$）。



不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$），相同字母表示差异不显著（$P>0.05$）。下同。

图 1　Mito-TEMPO 对鸡精液解冻后精子活力和活率的影响

2.2 不同浓度 Mito-TEMPO 对解冻后鸡精子质膜和顶体完整率的影响

图 2 显示，与对照组相比，当 Mito-TEMPO 的浓度为 40 和 60 μmol/mL 时，解冻后精子的质膜完整率显著提高（$P<0.05$）；与对照组相比，当 Mito-TEMPO 的浓度为 20、40、60 和 80 μmol/mL 时，解冻后精子的顶体完整率均显著提高（$P<0.05$）。

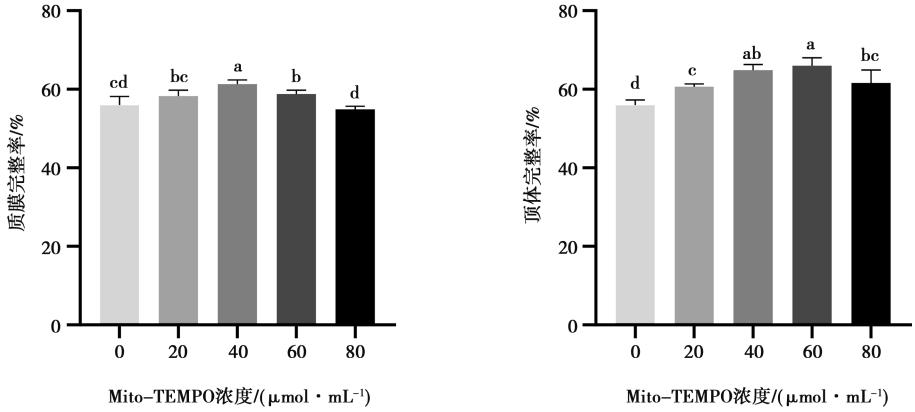


图 2 Mito-TEMPO 对鸡精液解冻后精子质膜和顶体完整率的影响

2.3 不同浓度 Mito-TEMPO 对解冻后鸡精子 DNA 完整率和线粒体活性的影响

图 3 显示，相比对照组，当 Mito-TEMPO 浓度为 20 和 40 μmol/mL 时，解冻后鸡精子的 DNA 完整率显著提高（$P<0.05$）；当 Mito-TEMPO 浓度为 40 和 60 μmol/mL 时，解冻后鸡精子的线粒体活性显著增强（$P<0.05$）。

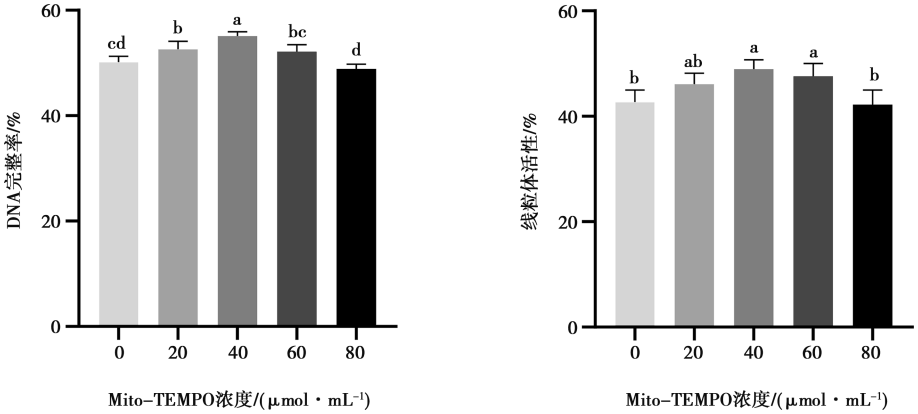


图 3 Mito-TEMPO 对鸡精液解冻后精子 DNA 完整率和线粒体活性的影响

2.4 不同浓度 Mito-TEMPO 对解冻后鸡精子抗氧化性的影响

由图 4 所示，相比对照组，当 Mito-TEMPO 的浓度为 20、40 和 60 μmol/mL 时，T-AOC 活性均显著增强（$P<0.05$）；当 Mito-TEMPO 浓度为 20 和 40 μmol/mL 时，SOD 活性均显著增强（$P<0.05$）；当 Mito-TEMPO 浓度为 20、40 和 60 μmol/mL 时，CAT 活性显著增强（$P<0.05$）；而各处理组解冻后 MDA 含量均显著降低（$P<0.05$）。

2.5 不同浓度 Mito-TEMPO 对解冻后鸡精子线粒体酶活性的影响

由图 5 所示，相比对照组，当 Mito-TEMPO 的浓度为 20、40 和 60 μmol/mL 时，解冻后精液中 GOT 活性均显著降低（$P<0.05$）；浓度为 20、40、60 和 80 μmol/mL 时，L-LDH 和 SDH 活性均显著降低（$P<0.05$）。

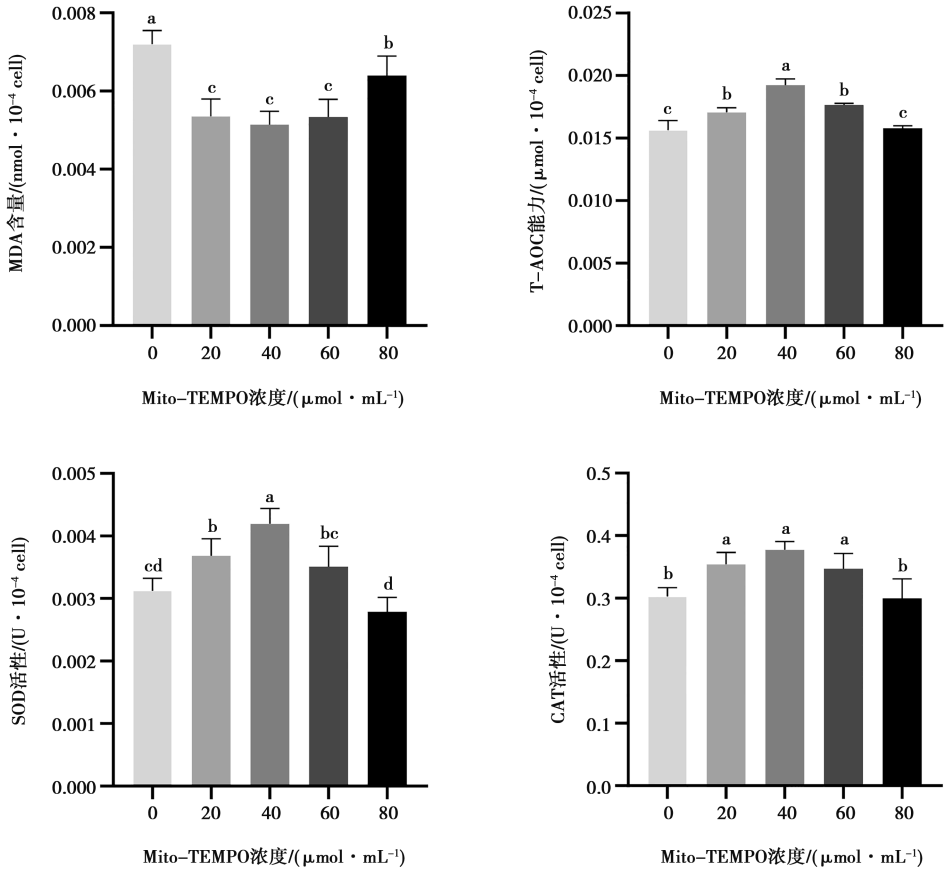


图 4　Mito-TEMPO 对鸡精液解冻后精子 MDA 含量及 T-AOC、SOD 和 CAT 活性的影响

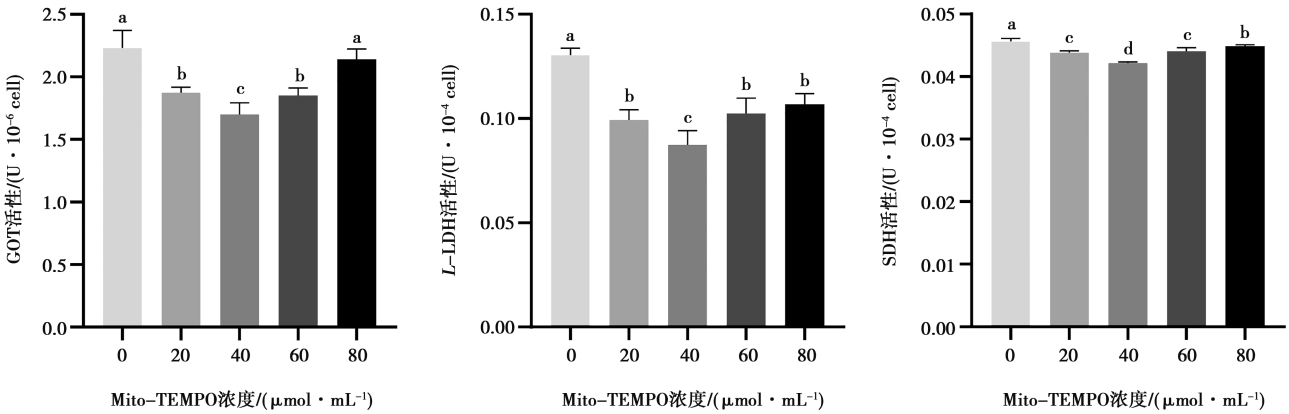


图 5　Mito-TEMPO 对鸡精液解冻后精子 GOT、*L*-LDH 和 SDH 活性的影响

3　讨论

在公鸡精液冷冻和解冻过程中，精子细胞内抗氧化酶系统的损伤和大量 ROS 的产生将会引起氧化应激，对精子细胞的结构和功能造成不可逆转的损伤[3]。ROS 水平过高会导致精子活力下降[26]，不饱和脂肪酸与精子膜发生氧化反应，导致精子膜发生氧化受损，进而损害精子线粒体和遗传物质，从而引起精液质量的下降[27]。因此，精液稀释液中加入外源性抗氧化剂，保护精子细胞免受冷冻时氧化应激的损伤[28]，成为当前精液保存的研究热点。研究证明，抗氧化剂在不同物种的精液保存中具有保护作用。例如，辅酶 Q10 已被证明对公羊和公鸡的稀释液具有保护作用[29-30]，而谷胱甘肽（GSH）在公鸡的稀释液中也表现出显著的保护效果[31]。此外，α-生育酚则在公牛的精液保存中发挥了重要的抗氧化作用[32]，还有研究益母草碱、纳米颗粒硒、原青花素和香菇多糖等辅助抗氧化剂对精液的冷冻影响。近年来，线粒体抗氧化剂因其在抵抗各种引发氧化应激的因素方面表现出显著的效果，受到广泛关注和高度评价[33]。

精液分析中，测评精液质量和预测受精率的重要指标主要是活力、活率、质膜完整率、顶体完整率、DNA 完整率和线粒体功能等。抗氧化剂的使用，可以有效改善冷冻精子的运动参数并保护精子结构的完整性，只有完整的精子才具有受精能力，它有助于增强体内抗氧化系统，清除过量的 ROS，减轻线粒体的氧化损伤，进而降低细胞凋亡的发生[34]。Mito-TEMPO 能够减轻氧化应激对细胞的损害，保护细胞免受各种病理状态（如脓毒症、肾损伤、肝损伤等）带来的氧化损伤[35-37]。此外，Mito-TEMPO 还在抑制 DNA 损伤和改善细胞健康方面具有一定的效果[38]。研究表明，稀释液中加入适当浓度的 Mito-TEMPO 可以改善冷冻精子的活性和完整性，保护精子的线粒体功能和活性，在稀释液中添加对猪[16]、人[39]和绵羊[20]的冷冻精子的作用均已被证明。在公牛冷冻稀释液中添加 Mito-TEMPO，显著改善了解冻后公牛精子质膜和顶体的完整性[17]。本研究结果表明，稀释液中添加 Mito-TEMPO 显著增加了解冻后鸡精子的活性以及 DNA、质膜和顶体的完整率，其中当 Mito-TEMPO 的浓度为 40 μmol/mL 时，解冻后鸡精子的活性、DNA 完整性和质膜完整性最好，浓度为 60 μmol/mL 时，解冻后鸡精子顶体完整性最好。以上结果说明，稀释液中的 Mito-TEMPO 可能调控精液中的过氧化氢含量，抑制精子过早进行顶体反应，清除过量的 ROS，保护精子的功能和完整性，改善冻精的线粒体活性，进而保证精液的冷冻质量[21]。当 Mito-TEMPO 的浓度为 40 μmol/mL 时对解冻后的鸡精子保护效果最明显。

冷冻过程中精子的氧化应激导致线粒体损伤进而引起精子的活力下降，对公鸡精子抗氧化酶活性和线粒体酶活性有一定的影响，Mito-TEMPO 广泛存在于线粒体内，能够有效清除超氧化物，减少氧化应激对细胞的影响，保护线粒体功能及相关酶活性[40]。在精子冷冻的研究中，发现 Mito-TEMPO 的添加不仅可提升解冻后精子质量、活性和抗氧化能力[17]，还通过调节弱精子症患者精子冻存后的氧化代谢，帮助减轻冷冻过程中产生的损伤[41]。猪精子冷冻稀释液中添加 0.5~500 μmol/L 的 Mito-TEMPO 可以显著改善冻后精子的动力参数和完整率，T-AOC 及 ATP 含量显著升高，通过提高抗氧化能力和线粒体功能来改善精子的质量[16]。与冷冻前相比，解冻后绵羊精液中总 LDH 活性和精子 LDH 活性显著降低[42]；在公牛精液研究中发现，GOT 酶活性越高，精子活率越低，与精子的质量呈负相关[43]。SDH 位于线粒体的内膜和嵴，SDH 活性反应精子能量代谢，对精子线粒体功能有重要意义[44]。当冷冻过程中线粒体受损时，LDH、GOT 和 SDH 会向精清中释放，Mito-TEMPO 会维持线粒体膜的稳定性，抑制线粒体产生过多的氧自由基，减少酶的逃逸，进而提高精液的品质。本试验结果说明，在公鸡精液冷冻保存稀释液中加入适当浓度的 Mito-TEMPO，可以改善冷冻保存后鸡精子的 T-AOC、CAT、SOD 活性，降低 LDH、GOT、SDH 和 MDA 的含量。因为 MDA 水平反映氧化应激的水平，含量下降意味着氧化应激损伤减少，从而使精子质量得以改善。本研究中鸡精液冷冻后精子动力学参数和完整性的改善可能与 Mito-TEMPO 改善线粒体相关酶的活性有关。本研究结果与其他物种上的研究结果相近。物种不同，精子的储存环境各有差异，导致稀释液的成分和浓度也会有所不同。这也表明线粒体抗氧化剂 Mito-TEMPO 在精液稀释液中应用时，添加浓度必须着重考虑物种的差异性。

4 结论

在鸡精液冷冻保存稀释液中添加 Mito-TEMPO，可以显著改善解冻后的精子活性，有效保护精子的质膜、顶体和 DNA 的完整性，提高精子的抗氧化能力和线粒体活性，并减少了与线粒体相关的酶活性。本试验条件下，冷冻稀释液中添加 40 μmol/mL 的Mito-TEMPO，改善冷冻保存后鸡精液品质效果最佳。

参考文献：

[1] YÁNEZ-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.

[2] BUFFONE M G, CALAMERA J C, BRUGO-OLMEDO S, et al. Superoxide dismutase content in sperm correlates with motility recovery after thawing of cryopreserved human spermatozoa [J]. Fertil Steril, 2012, 97 (2): 293-298.

[3] 郭良勇，曹访，李正秋，等. 香菇多糖对湖羊精液冷冻保存品质的影响 [J]. 畜牧与兽医，2022，54 (8)：9-13.

[4] STANIC P, TANDARA M, SONICKI Z, et al. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human *Semen* [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2000, 91 (1): 65-70.

[5] WATSON P F. The causes of reduced fertility with cryopreserved *Semen* [J]. Anim Reprod Sci, 2000, 60/61: 481-492.

[6] 采克俊，刘莉，张易祥，等. 种公鸡精液稀释液的研究 [J]. 安徽农业科学，2008，36 (26)：11336-11337，11339.

[7] OLFATI-KARAJI R. The improving of sperm biochemical parameters after frozen-thawed process with supplemented antioxidants in bull semen freezing medium [C]. Proc Natl Congr Infertil Reprod. Tehran, Iran, 2013.

[8] LONG J A. Avian *Semen* cryopreservation: what are the biological Challenges 1 [J]. Poult Sci, 2006, 85 (2): 232-236.

[9] 郑娇. 栝江珧精子的超低温冷冻保存及精子质量检测方法的研

究［D］. 湛江：广东海洋大学，2012.
[10] JIANG X P，WANG S Q，WANG W，et al. Enolase1（ENO1）and glucose-6-phosphate isomerase（GPI）are good markers to predict human sperm freezability［J］. Cryobiology，2015，71（1）：141-145.
[11] BANGHAM A D，HORNE R W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope［J］. J Mol Biol，1964，8（5）：660-668.
[12] ALIPOUR M，OMRI A，SMITH M G，et al. Prophylactic effect of liposomal N-acetylcysteine against LPS-induced liver injuries［J］. J Endotoxin Res，2007，13（5）：297-304.
[13] FAN J，SHEK P N，SUNTRES Z E，et al. Liposomal antioxidants provide prolonged protection against acute respiratory distress syndrome［J］. Surgery，2000，128（2）：332-338.
[14] WANG P F，XIE K，CAO Y X，et al. Hepatoprotective effect of mitochondria-targeted antioxidant mito-TEMPO against lipopolysaccharide-induced liver injury in mouse［J］. Mediat Inflamm，2022，2022（1）：6394199.
[15] 罗萌萌，张娜娜，赵铭佳，等. 精子冷冻添加抗氧化剂 Mito-TEMPO 效果的研究［J］. 中国煤炭工业医学杂志，2021，24（2）：184-187.
[16] 刘娟，许春荣，刘念，等. Mito-TEMPO 对猪精子冷冻保存效果的研究［J］. 西南农业学报，2024，37（6）：1370-1376.
[17] KUMAR A，GHOSH S K，KATIYAR R，et al. Effect of mito-TEMPO incorporated *Semen* extender on physico-morphological attributes and functional membrane integrity of frozen thawed buffalo spermatozoa［J］. Cryo Letters，2021，42（2）：111-119.
[18] KUMAR A，KUMAR GHOSH S，KATIYAR R，et al. Supplementation of Mito TEMPO and acetovanillone in *Semen* extender improves freezability of buffalo spermatozoa［J］. Andrology，2022，10（4）：775-788.
[19] ASADZADEH N，ABDOLLAHI Z，ESMAEILKHANIAN S，et al. Fertility and flow cytometry evaluations of ram frozen *Semen* in plant-based extender supplemented with Mito-TEMPO［J］. Anim Reprod Sci，2021，233：106836.
[20] 时娟娟. 稀释液中添加 Mito-TEMPO 对绵羊冻精质量的影响［D］. 太谷：山西农业大学，2021.
[21] 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.
[22] WATSON P F，MARTIN I. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5oC［J］. Aust Jnl Bio Sci，1975，28（2）：145.
[23] 汤梦漩. 两类不同方案对鸡精液冷冻保存的适用性研究［D］. 长沙：湖南农业大学，2020.
[24] 刘子秋. 以 DMA、DMF 与甘油为保护剂的鸡精液冷冻技术适用性研究［D］. 长沙：湖南农业大学，2021.
[25] 刘启红，肖广寮，刘子秋，等. 以 DMA、甘油与 DMF 为保护剂的鸡精液冷冻技术体系比较研究［J］. 中国家禽，2024，46（6）：1-7.
[26] STEFANOV R，ANGELOVA M，STEFANOVA T，et al. Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103 improves ram spermatozoa functions *in vitro*［J］. Andrologia，2004，36（2）：51-56.
[27] 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.
[28] SURAI P F，BLESBOIS E，GRASSEAU I，et al. Fatty acid composition，glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian *Semen*［J］. Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol，1998，120（3）：527-533.
[29] MASOUDI R，SHARAFI M，POURAZADI L. Improvement of rooster semen quality using coenzyme Q10 during cooling storage in the Lake extender［J］. Cryobiology，2019，88：87-91.
[30] MASOUDI R，SHARAFI M，SHAHNEH A Z. Effects of CoQ10 on the quality of ram sperm during cryopreservation in plant and animal based extenders［J］. Anim Reprod Sci，2019，208：106103.
[31] MASOUDI R，SHARAFI M，SHAHNEH A Z，et al. Effects of reduced glutathione on the quality of rooster sperm during cryopreservation［J］. Theriogenology，2019，128：149-155.
[32] MOTEMANI M，CHAMANI M，SHARAFI M，et al. Alpha-tocopherol improves frozen-thawed sperm quality by reducing hydrogen peroxide during cryopreservation of bull *Semen*［J］. Span J Agric Res，2017，15（1）：e0401.
[33] OYEWOLE A O，BIRCH-MACHIN M A. Mitochondria-targeted antioxidants［J］. FASEB J，2015，29（12）：4766-4771.
[34] 李智星，卿育洪，李志远，等. 益母草碱对绵羊精液冷冻保存的影响［J］. 农业生物技术学报，2023，31（10）：2115-2122.
[35] CHOUMAR A，TARHUNI A，LETTÉRON P，et al. Lipopolysaccharide-induced mitochondrial DNA depletion［J］. Antioxid Redox Signal，2011，15（11）：2837-2854.
[36] PATIL N K，PARAJULI N，MACMILLAN-CROW L A，et al. Inactivation of renal mitochondrial respiratory complexes and manganese superoxide dismutase during sepsis：mitochondria-targeted antioxidant mitigates injury［J］. Am J Physiol Renal Physiol，2014，306（7）：F734-F743.
[37] 谢珂，徐昉. 线粒体靶向抗氧化剂 Mito-Tempo 对脓毒症小鼠急性肝损伤的保护作用［J］. 重庆医科大学学报，2024，49（4）：428-435.
[38] TRNKA J，BLAIKIE F H，LOGAN A，et al. Antioxidant properties of Mito-TEMPO and its hydroxylamine［J］. Free Radic Res，2009，43（1）：4-12.
[39] LU X，ZHANG Y，BAI H，et al. Mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO improves the post-thaw sperm quality［J］. Cryobiology，2018，80：26-29.
[40] BARZEGARI A，NOURI M，GUEGUEN V，et al. Mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO alleviate oxidative stress induced by antimycin A in human mesenchymal stem cells［J］. J Cell Physiol，2020，235（7/8）：5628-5636.
[41] ZHANG X，LU X，LI J，et al. Mito-Tempo alleviates cryodamage by regulating intracellular oxidative metabolism in spermatozoa from asthenozoospermic patients［J］. Cryobiology，2019，91：18-22.
[42] 徐振军，邬欣芳，刘冰，等. 冷冻保存对绵羊精子乳酸脱氢酶活性的影响［J］. 黑龙江畜牧兽医，2015（19）：104-106.
[43] 李正春. 测定冻精酶活性预测精液品质试验［J］. 中国奶牛，2009（10）：33-34.
[44] PIASECKA M，WENDA-R L，OGOЙSKI T. Computerized analysis of cytochemical reactions for dehydrogenases and oxygraphic studies as methods to evaluate the function of the mitochondrial sheath in rat spermatozoa［J］. Andrologia，2001，33（1）：1-12.