

# 不同抗氧化剂对牦牛冷冻精液精子活力的影响

曹涵文<sup>1</sup>,陈晓英<sup>2</sup>,朱 勇<sup>2</sup>,信金伟<sup>2</sup>,姜 辉<sup>2</sup>,陆东祥<sup>2</sup>,张成福<sup>2\*</sup>

(1.西藏自治区农牧科学院农产品开发与食品科学研究所,西藏 拉萨 850000;2.西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所,西藏 拉萨 850009)

**摘要:**为研究维生素C(VC)、维生素E(VE)、维生素B<sub>12</sub>(VB<sub>12</sub>)及白藜芦醇(Res)抗氧化剂对牦牛冷冻精液精子活力的影响,在卡苏稀释液中分别添加浓度为0、200、400、600、800、1 000、1 200  $\mu\text{g/mL}$ 抗氧化剂,确定抗氧化剂的单因素适宜添加量。根据单因素试验结果进行4因素3水平的响应面优化试验,确定冷冻精液中复合抗氧化剂的适宜添加量。结果表明:VC、VE、VB<sub>12</sub>及Res的单因素适宜添加量分别为200、400、400、400  $\mu\text{g/mL}$ ,精子活力最大值分别为83.28%、79.72%、78.18%、69.38%。通过响应面优化VC、VE、VB<sub>12</sub>及Res的添加量分别为228.80、447.00、394.05、400.69  $\mu\text{g/mL}$ ,精子活力理论值为82.44%。通过3次验证试验,VC、VE、VB<sub>12</sub>及Res的添加量分别在230.00、450.00、400.00、400.00  $\mu\text{g/mL}$ 时,牦牛冷冻精液精子活力平均值为83.66%,超过理论值,较好地预测实验结果。

**关键词:**牦牛;冷冻精液;抗氧化剂;添加量

中图分类号:S823

文献标志码:A

## Effects of Different Antioxidants on Sperm Motility of Frozen Semen in Yak

CAO Hanwen<sup>1</sup>, CHEN Xiaoying<sup>2</sup>, ZHU Yong<sup>2</sup>, XIN Jinwei<sup>2</sup>, JIANG Hui<sup>2</sup>, LU Dongxiang<sup>2</sup>, ZHANG Chengfu<sup>2\*</sup>

(1.Institute of Agricultural Products Development and Food Science, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Tibet Lhasa 850000, China; 2.Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Tibet Lhasa 850009, China)

**Abstract:**To investigate the effects of vitamin C (VC), vitamin E (VE), vitamin B<sub>12</sub> (VB<sub>12</sub>) and resveratrol (Res) on sperm motility of frozen semen in yak, antioxidants with concentration 0, 200, 400, 600, 800, 1 000, 1 200  $\mu\text{g/mL}$  were added into Casu diluents to determine the appropriate single-factor addition amount of antioxidant, respectively. According to the results of single factor test, response surface optimization test with 4 factors and 3 levels was conducted to determine the appropriate amount of complex antioxidants in frozen semen. The results showed that the appropriate single-factor supplemental amount of VC, VE, VB<sub>12</sub> and resveratrol was 200, 400, 400, 400  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, and the maximum sperm motivity of VC, VE, VB<sub>12</sub> and resveratrol was 83.28%, 79.72%, 78.18% and 69.38%, respectively. According to response surface optimization, the addition amount of VC, VE, VB<sub>12</sub> and resveratrol was 228.80, 447.00, 394.05 and 400.69  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, and the theoretical value of sperm motility was 82.44%. After 3 verification tests, the supplementation of VC, VE, VB<sub>12</sub> and resveratrol was 230.00, 450.00, 400.00 and 400.00  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The average sperm motility of frozen semen in yak was 83.66%, which was more than the theoretical value, and could predict the experimental results well.

**Key Words:**yak; frozen semen; antioxidants; addition amount

牦牛细管冷冻精液的生产和保存技术极大地提高了牦牛人工授精技术的应用与推广,能够有效发挥优良种公牛的繁殖潜能,在牦牛种质资源保护、遗传育种、良种扩繁与推广等方面发挥着重要

作用。在冷冻过程中,由于冰晶形成引起的物理性损伤、化学毒性以及氧化损伤等直接破坏精子的结构功能,并最终导致精子受精能力下降<sup>[1]</sup>。在牦牛冷冻精液的生产过程中,由于采精、鲜精稀释等操作流程无法有效避免精液与环境中的氧气接触,从而导致精液的氧化损伤。在通常情况下,精液自身具备一定的抗氧化能力,能够避免被外源物质氧化而导致的精液品质下降。但在冷冻过程中,由于稀释液的添加导致精液抗氧化成分浓度降低,直接导致精液自身抗氧化能力不足<sup>[2]</sup>。因此,通过补充抗

收稿日期:2024-02-28

基金项目:西藏自治区重大科技专项(XZ202101ZD0002N-02)。

作者简介:曹涵文(1989-),男,助理研究员,研究方向为畜产品加工,E-mail:751261399@qq.com;\*为通信作者:张成福(1975-),男,副研究员,研究方向为牦牛遗传育种,E-mail:605211255@qq.com。

氧化物质能够有效避免外源物质对精液的氧化损伤,是提高精液品质的重要手段。

维生素C(VC)是一种水溶性维生素,作为一种有效的自由基清除剂,添加在精液中可以有效维持精子细胞基因的完整和保护精子质膜免受氧化,使精子细胞中的DNA能通过VC的抗氧化功能得到保护<sup>[3]</sup>。维生素E(VE)能够明显降低自由基诱导的染色体损伤,研究证实,VE可以通过阻止DNA链的断裂来抑制NO对大鼠胰岛细胞核的损伤,对其他环境诱变剂引起的氧化反应也有保护作用,同时VE与畜禽的繁殖性能有密切关系<sup>[4]</sup>。Bauer M和Breed W G研究表明,在山羊的精液中添加维生素B<sub>12</sub>(VB<sub>12</sub>)可以改善精子外在环境的理化特性,提高人工授精时精子的受精能力。在奶牛冷冻精液的生产中添加VB<sub>12</sub>,奶牛发情期受胎率有明显提高<sup>[5]</sup>。白藜芦醇(Res)是研究最多的天然多酚之一,是一种自然产生的植物抗毒素,广泛存在于葡萄、桑葚和花生等70多种植物中<sup>[6]</sup>。目前,Res因其优秀的抗氧化特性逐渐在牛、羊、猪等家畜精液保存中广泛应用。黄酮类多酚化合物可通过酚羟基电子反应清除活性氧<sup>[7]</sup>,抑制线粒体呼吸链复合酶Ⅲ活动,最终通过减少自由基产生和脂质过氧化、调节抗氧化相关酶活性等发挥其生理作用。大量研究表明,Res可显著提高家畜冻精品质。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

种公牛来自当雄县牦牛冻精站,采精时间在种公牛繁殖季节,每周采精2~3次。

VC、VE、VB<sub>12</sub>、Res均购于成都市科隆化学品有限公司;浓缩型牛用精液稀释液(法国卡苏公司)。

试验设备有电子天平、倒置显微镜(DMI8 Leica,德国)、显示屏、恒温加热板、精子密度仪(法国卡苏公司)、程控低温冷冻仪(法国卡苏公司)、细管冷冻支架、恒温水浴锅(PK-80,上海精宏试验设备有限公司)、恒温干燥箱(101-2,上海荆和)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 精液采集

参照农业行业标准NY/T 3444—2019《牦牛冷冻精液生产技术规程》的方法采集精液。

#### 1.2.2 抗氧化剂对牦牛冷冻精液的影响单因素试验

为探究抗氧化剂VC、VE、VB<sub>12</sub>、Res对牦牛冷冻精液精子活力的影响,向稀释10倍的卡苏稀释

液中分别添加0(对照,CK)、200、400、600、800、1 000、1 200  $\mu\text{g/mL}$  VC、VE、VB<sub>12</sub>及Res,每组至少保证10支细管冻精。通过降温 and 平衡、封装、标记及冷冻程序,将细管冻精保存在液氮中。间隔24 h后,将细管冻精取出,直接置于(38+1) $^{\circ}\text{C}$ 水浴解冻,解冻时间10~15 s,显微镜镜检精子活力。通过SPSS 27软件进行单因素ANOVA检验,确定单一抗氧化剂的适宜添加量。

#### 1.2.3 响应面优化复合抗氧化剂的适宜添加量

根据单因素实验结果,选择VC浓度(A)、VE浓度(B)、VB<sub>12</sub>浓度(C)、Res浓度(D)为相应变量,以牦牛冷冻精液精子活力为响应值,利用Design-Expert 10.0软件进行4因素3水平响应面Box-Behnken实验设计<sup>[8]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗氧化剂对牦牛冷冻精液的影响单因素试验结果

抗氧化剂对牦牛冷冻精液的影响单因素试验结果见表1。由表1可知,在牦牛冻精稀释液中添加200  $\mu\text{g/mL}$ 的VC,其精子活力均值达到最大83.28%,显著高于对照组( $p<0.05$ ),与400  $\mu\text{g/mL}$ 添加组差异不显著( $p>0.05$ ),因此,冷冻精液中VC的适宜添加量为200  $\mu\text{g/mL}$ 。

在牦牛冻精稀释液中添加400  $\mu\text{g/mL}$ 的VE,其精子活力均值达到最大79.72%,显著高于对照组及其他添加量组( $p<0.05$ )。因此,冷冻精液中VE的适宜添加量为400  $\mu\text{g/mL}$ 。

在牦牛冻精稀释液中添加400  $\mu\text{g/mL}$ 的VB<sub>12</sub>,精子活力均值达到最大78.18%,显著高于对照组及其他添加量组( $p<0.05$ )。因此,冷冻精液中VB<sub>12</sub>的适宜添加量为400  $\mu\text{g/mL}$ 。

在牦牛冻精稀释液中添加400  $\mu\text{g/mL}$ 的Res,精子活力均值达到最大69.38%,显著高于对照组及其他添加量组( $p<0.05$ )。因此,冷冻精液中Res的适宜添加量为400  $\mu\text{g/mL}$ 。

综上所述,在牦牛冷冻精液中添加抗氧化剂以增强其耐冻性,VC的适宜添加量为200  $\mu\text{g/mL}$ ,VB<sub>12</sub>的适宜添加量为400  $\mu\text{g/mL}$ ,VE的适宜添加量为400  $\mu\text{g/mL}$ ,Res的适宜添加量为400  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 2.2 响应面优化抗氧化剂的适宜添加量结果

响应面优化试验水平设计<sup>[9-10]</sup>见表2。模型建立与显著性检验采用Design-Expert 10.0软件,对

表1不同抗氧化剂对牦牛冷冻精液精子活力的影响

%

添加量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	VC	VE	VB <sub>12</sub>	Res
0(CK)	76.96±1.46c	61.5±7.20c	55.54±7.85b	55.14±2.49c
200	83.28±3.11a	67.46±4.58b	62.00±6.24b	60.22±4.21b
400	76.53±1.86ab	79.72±5.15a	78.18±11.65a	69.38±2.65a
600	68.63±9.72bc	59.02±2.58c	61.38±11.36b	47.94±3.17d
800	67.30±10.75bc	51.4±4.04d	62.72±5.56b	36.88±1.72e
1 000	65.08±4.57c	45.98±3.73d	62.18±10.43b	30.64±4.24f
1 200	40.98±8.58d	33.86±3.35e	57.7±5.16b	17.62±4.06g

注:表中同列不同小写字母表示差异显著( $p<0.05$ )。

实验数据进行多元回归拟合分析<sup>[11-14]</sup>,因素编码及结果见表3,方差分析及结果见表4。各因素对响应值的二次多项回归方程为:精子活力=82.08+0.62A+1.09B-0.59C+0.44D+1.78AB+0.35AC-0.84AD+0.18BC-0.37BD-0.09CD-2.47A<sup>2</sup>-1.69B<sup>2</sup>-3.38C<sup>2</sup>-2.29D<sup>2</sup>

表2响应面优化试验水平

$\mu\text{g/mL}$

因素	水平		
	-1	0	1
VC	100	200	300
VE	300	400	500
VB <sub>12</sub>	300	400	500
Res	300	400	500

表3响应面实验设计方案及结果分析

序列	因素1	因素2	因素3	因素4	响应值
	VC	VE	VB <sub>12</sub>	Res	精子活力/%
1	-1	-1	0	0	78.23
2	1	-1	0	0	75.46
3	-1	1	0	0	77.32
4	1	1	0	0	81.66
5	0	0	-1	-1	76.23
6	0	0	1	-1	75.66
7	0	0	-1	1	77.82
8	0	0	1	1	76.88

续表

序列	因素1	因素2	因素3	因素4	响应值
	VC	VE	VB <sub>12</sub>	Res	精子活力/%
9	-1	0	0	-1	75.33
10	1	0	0	-1	78.65
11	-1	0	0	1	77.63
12	1	0	0	1	77.61
13	0	-1	-1	0	76.81
14	0	1	-1	0	78.32
15	0	-1	1	0	75.32
16	0	1	1	0	77.53
17	-1	0	-1	0	76.52
18	1	0	-1	0	77.08
19	-1	0	1	0	74.2
20	1	0	1	0	76.15
21	0	-1	0	-1	76.16
22	0	1	0	-1	78.93
23	0	-1	0	1	77.53
24	0	1	0	1	78.81
25	0	0	0	0	83.45
26	0	0	0	0	82.1
27	0	0	0	0	81.66
28	0	0	0	0	81.96
29	0	0	0	0	81.22

注:表中维生素C、维生素E、维生素B及白藜芦醇的添加水平-1、0、1参考表2中4种抗氧化剂添加量。

由表4的方差分析结果可知,模型 $p<0.000\ 1$ ,表明模型达到了极显著水平,而失拟项的 $p$ 为 $0.919\ 9$ ,表明未知因素对实验结果的干扰较小,拟合方程可信,且此模型 $R^2=0.967\ 0$ ,说明实验正确率达 $96.70\%$ ,具有统计学意义;各单因素对牦牛冷冻精液精子活力的影响极显著( $p<0.01$ )。由表4可知,VC(A)和VE(B)存在交互作用,VC(A)和Res(D)存在交互作用,对牦牛冷冻精液的精子活力影响显著( $p<0.05$ ); $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$ 均表现为极显著( $p<0.000\ 1$ ),表明各因素之间不是简单的线性关系,而是具有交互作用。

由图1可知,响应曲面的倾斜度较陡,且等高线图的颜色变化较快,说明VC(A)和VE(B)对冷冻精液精子活力影响显著,且VE(B)的曲面大于VC(A)的曲面,表明VE(B)浓度对牦牛冷冻精液精子活力的影响略显著于VC(A)的浓度。由图3可知,响应面形状趋于椭圆,且等高线的颜色变化较快,表明VC(A)与Res(D)的交互作用对牦牛冷冻精液精子活力的影响较显著( $p<0.05$ )。由图2、4、5、6可知,响应曲面的形状呈圆形,倾斜度较小,且等高线图的颜色变化较慢,表明其他抗氧化剂的交互作用对牦牛冷冻精液精子活力的影响不显著( $p>0.05$ ),这与表4的方差与显著性分析结果完全符合。

表4 响应面设计方差与显著性分析

方差来源	平方和	自由度	均方	$F$	$P$	显著性
模型	153.75	14	10.98	29.28	<0.000 1	**
A-VC	4.54	1	4.54	12.1	0.003 7	**
B-VE	14.21	1	14.21	37.9	<0.000 1	**
C-VB <sub>12</sub>	4.13	1	4.13	11.01	0.005 1	**
D-Res	2.36	1	2.36	6.29	0.025 1	*
AB	12.64	1	12.64	33.7	<0.000 1	**
AC	0.48	1	0.48	1.29	0.275 5	不显著
AD	2.79	1	2.79	7.44	0.016 4	*
BC	0.12	1	0.12	0.33	0.576 7	不显著
BD	0.56	1	0.56	1.48	0.243 9	不显著
CD	0.034	1	0.034	0.091	0.767 0	不显著
$A^2$	39.54	1	39.54	105.43	<0.000 1	**

续表

方差来源	平方和	自由度	均方	$F$	$P$	显著性
$B^2$	18.5	1	18.5	49.34	<0.000 1	**
$C^2$	74.28	1	74.28	198.06	<0.000 1	**
$D^2$	34.13	1	34.13	91.02	<0.000 1	**
残差	5.25	14	0.38			
失拟	2.44	10	0.24	0.35	0.919 9	不显著
误差	2.81	4	0.7			
总和	159	28				

注:\*\*表示差异极显著( $p<0.01$ );\*表示差异显著( $p<0.05$ )。

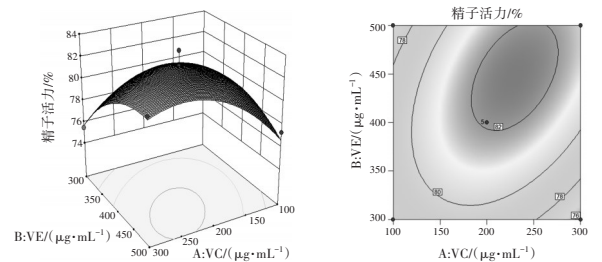


图1 VC和VE浓度交互作用的响应面和等高线

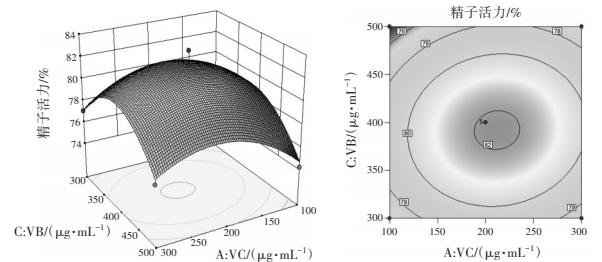


图2 VC和VB浓度交互作用的响应面和等高线

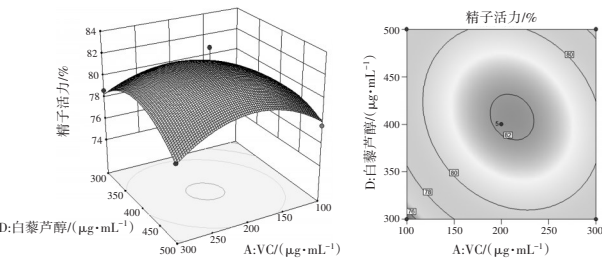


图3 VC和Res浓度交互作用的响应面和等高线

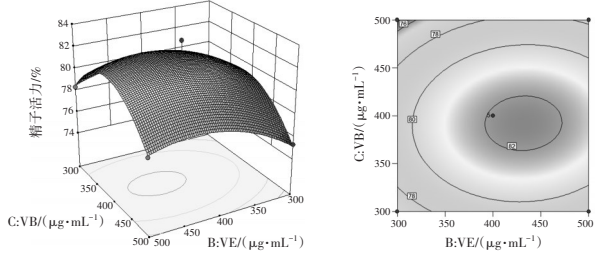


图4 VE和VB浓度交互作用的响应面和等高线



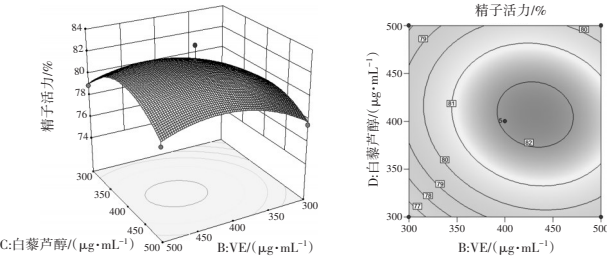


图5 VE和Res浓度交互作用的响应面和等高线

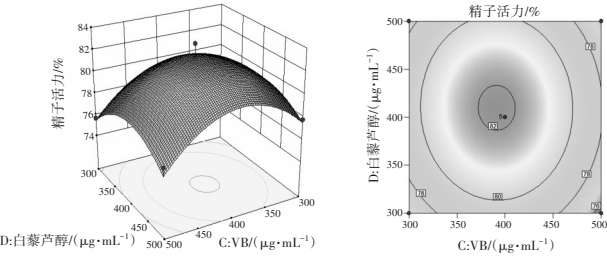


图6 VB和Res浓度交互作用的响应面和等高线

通过响应面优化实验得出牦牛冷冻精液抗氧化剂适宜添加量为: VC浓度为228.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、VE浓度为447.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、VB<sub>12</sub>浓度为394.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Res浓度为400.69  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,此时的精子活力理论值为82.44%。为便于验证,将参数修正为VC浓度230.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、VE浓度450.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、VB<sub>12</sub>浓度400.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Res浓度400.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,经3次重复实验,测得牦牛冷冻精液精子活力平均值为83.66%,超过理论值。由此可以判断,该模型可较好地预测实验结果,具有较好的实际应用价值。

3 结论

在牦牛精液稀释液中添加抗氧化剂VC 230.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、VE 450.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、VB<sub>12</sub> 400.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Res 400.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,测得牦牛冷冻精液精子活力值为83.66%,表明各抗氧化剂之间存在明显的交互作用,能够提高牦牛冷冻精液的冻存效果。

参考文献:

[1] 吕春荣,权国波.白藜芦醇对绵羊冷冻精液质量的影响[J].中国畜牧兽医,2020,47(11):3611-3617.

[2] 戴璿,梁荣蓉,罗欣,等.不同包装方式对冷鲜猪肉的保鲜效果[J].食品与发酵工业,2014,40(6):171-178.

[3] 孙敏,郑月月,孙婷婷,等.天然抗氧化剂茶多酚与维生素C抗氧化活性分析[J].安康学院学报,2015,27(6):74-76,80.

[4] 赵宪林.多种抗氧化剂对动物精子品质影响的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2015.

[5] BAUER M, BREED W G. Variation of Sperm Head Shape and Tail Length in a Species of Australian Hydromyine Rodent: the Spini-fex Hopping Mouse, *Notomys alexis* [J]. Reprod Fertil Dev, 2006, 18(7):797-805.

[6] 陈小辛,哈斯高娃,王学峰,等.不同抗氧化剂对驴冷冻精液质量的影响[J].吉林畜牧兽医,2021,42(12):1-3.

[7] MOJICA-VILLEGAS MA, IZQUIERDO-VEGA JA, CHAMORRO-CEVALLOS G, et al. Protective Effect of Resveratrol on Biomarkers of Oxidative Stress Induced by Iron/Ascorbate in Mouse Spermatozoa [J]. Nutrients, 2014, 6(2):489-503.

[8] 陈卓尔,陈美安,黄燕琼,等.响应面法优化三味山姜属中药挥发油提取工艺及总抗氧化能力研究[J/OL]. 辽宁中医药大学学报, 2024,(2024-04-29)[2024-5-20]<https://link.cnki.net/urlid/21.1543.R.20240429.1142.013>.

[9] 黄梦,刘宏炳,杨珍,等.响应面法优化肉桂子总有机酸提取工艺及其抗氧化活性研究[J/OL]. 饲料工业, 2024, (2024-04-30)[2024-5-20]<https://link.cnki.net/urlid/21.1169.S.20240429.1711.014>.

[10] 黄雅瑜,林米妮,蔡树芸,等.响应面法优化天仙果总黄酮提取工艺及抗氧化活性研究[J/OL]. 中国现代中药, 2024, (2024-04-30)[2024-5-20]. <https://link.cnki.net/doi/10.13313/j.issn.1673-4890.20231130002>.

[11] 杨凡,吴静,刘厚权,等.响应面法优化千里光中原酸提取工艺[J]. 饲料研究, 2024(8):103-107.

[12] 麻玉清,柳海云,郭伟,等.基于响应面法优化脂质纳米颗粒的配方及表征[J/OL]. 中国兽医科学, 2024, (2024-04-28)[2024-5-20]. <https://link.cnki.net/doi/10.16656/j.issn.1673-4696.2024.0161>.

[13] 金杰,张锋,孙蓓,等.响应面法优化南瓜风味发酵乳酸菌饮料的研制[J]. 饮料工业, 2024, 27(2):240-245.

[14] 刘静,金娜,石春芹,等.响应面法优化豌豆蛋白植物肉配方及其体外消化分析[J/OL]. 食品工业科技, 2024, (2024-04-26)[2024-5-20]<https://link.nki.net/doi/10.13386/j.issn1002-0306.2023050338>.