

海藻糖和牛血清白蛋白对牛精液的冷冻效果

咎林森¹,张莺莺¹,耿繁军²,田万强³

(1 西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100;2 河南省纯种肉牛繁育中心,郑州 450046;
3 杨凌职业技术学院 动物工程系,陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】研究海藻糖(TH)和牛血清白蛋白(BSA)单独或配合使用对牛精液冷冻效果的影响。【方法】向种公牛精液商业稀释液中添加不同浓度的 TH(0,0.000 37,0.025 和 0.05 mol/L)和 BSA(0,1,2,3 g/L),TH 和 BSA 的 4 个添加水平分别两两组合,组成 16 个处理,以其中二者添加水平均为 0 作为对照,制作 0.25 mL 细管冻精,解冻(40 ℃,10 s)后比较分析精子活率、顶体完整率和质膜完整性 3 个指标。【结果】单独添加 TH、BSA 及其互作对牛精液的冷冻效果与对照组相比达到显著水平。与对照组相比,单独添加不同水平的 TH 或 BSA 对冻后牛精子活率和质膜完整率均有明显影响($P < 0.05$),但对顶体完整率均影响不大($P > 0.05$),TH 适宜的单独添加量为 0.025 mol/L,BSA 为 1 g/L;两者的交互作用对冻后牛精子活率、顶体完整率和质膜完整率均有明显影响($P < 0.05$),TH 0.000 37 mol/L×BSA 2 g/L 为较适宜的添加量。【结论】单独添加 TH 和 BSA,均能对冻后精子品质产生明显影响;各 TH×BSA 组表现出显著的互作效应,其中以 TH 0.000 37 mol/L×BSA 2 g/L 的添加效果最好。

【关键词】 牛冷冻精液;稀释液;海藻糖;牛血清白蛋白;交互作用

【中图分类号】 S823.3⁺4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)10-0053-06

Effects of trehalose and BSA on bull sperm cryopreservation

ZAN Lin-sen¹,ZHANG Ying-ying¹,GENG Fan-jun²,TIAN Wan-qiang³

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Henan Beef Cattles Genetics Center, Zhengzhou, Henan 450046, China;

3. Animal Engineering Department, Yangling Vocational College and Technical, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The research was to study effects of trehalose and BSA on bull sperm cryopreservation. 【Method】Trehalose and bovine serum albumin were added into commercial sperm extender according to TH (0,0.000 37,0.025,0.05 mol/L)×BSA(0,1,2,3 g/L) content respectively. Samples were frozen in 0.25 mL straws. The frozen straws were thawed by immersing the straws in a water bath at 40 ℃ for 10 s. Sperm mortality, acrosome integrity and membrane integrity were analyzed and compared. 【Result】The addition of trehalose or bovine serum albumin of different levels alone can offer better($P < 0.05$) cryopreservation effect on frozen-thawed bull sperm mortality and membrane integrity when there were no obvious improvement ($P > 0.05$) on sperm acrosome integrity and their best concentration was 0.025 mol/L and 1 g/L respectively. The treatment TH(0.000 37 mol/L)×BSA(2 g/L) is the best one in sixteen groups. 【Conclusion】Trehalose and bovine serum albumin can significantly improve($P < 0.05$) the quality of frozen-thawed bull semen. The interaction effects of trehalose and bovine serum albumin on cryopreserved bull sperm was observed. The treatment TH(0.000 37 mol/L)×BSA(2 g/L) is the best

* [收稿日期] 2007-10-29

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD01A10-3);农业科技跨越计划项目(2007-23);陕西省“13115”重大科技专项(2007ZDCY-01)

[作者简介] 咎林森(1963-),男,陕西扶风人,教授,博士,博士生导师,主要从事肉牛、奶牛遗传改良及产业化工程技术研究。
E-mail: Zanls@yahoo.com.cn

one.

Key words: bull sperm cryopreservation; dilution; trehalose; bovine serum albumin; interaction

牛精液冷冻保存技术在国内外作为一项成熟的技术,推动了牛人工授精技术地广泛应用。但牛冷冻精液解冻后的活力与鲜精相比有很大差异,所以研究开发更有效的牛精液冷冻保护系统很有必要。目前,牛精液稀释液中最常用的冷冻保护剂依然是甘油,但甘油保护精子的同时又对精子产生了一定的毒害作用,对牛精液冷冻后的授精效果产生一定影响。同时,在精液冷冻过程中,低温打击也会破坏精子膜的完整性,导致精子受精能力下降。所以,人们开始探索更有效的抗冻保护剂以取代甘油。大量研究表明,海藻糖(Trehalose, TH)是一种典型的应激代谢物,能在高温、高寒、高渗透压及干燥等恶劣环境下,于细胞表面形成独特的保护膜,有效地保护生物分子的结构不被破坏,从而维持生命体的生命过程和生物特征,且外源性海藻糖与内源性海藻糖一样,对生物体和生物大分子具有良好的非特异性保护作用,是一种有效的非渗透性抗冻保护剂,已被广泛应用于各种生物活性物质和细胞的低温和冷冻保存^[1-3]。

另外,牛血清白蛋白(BSA)作为一类蛋白质类膜稳定剂(Membrane-stabilizing Compounds),成为人类精液冷冻中常用的冷冻保护剂,国内外有关BSA应用于精子质膜保护的报道表明,BSA能显著提高精子的冻后质量^[4-6]。

尽管TH是一种有效的抗冻保护剂,但其抗冻效果却远不及含有TH的低等动植物所具有的抗冻性能。研究表明,十二烷基磺酸钠(SDS)与TH联合添加到卵黄稀释液中可取得较好效果^[1];BSA和透明质酸间存在互作效应^[7];在人精液冷冻保存过程中,BSA与卵黄的联合使用优于单独添加^[8]。但关于TH与BSA之间的互作效应还未见报道。因此,本试验在常用商用稀释液的基础上,将TH与BSA联合使用,探索TH和BSA充分发挥其有效作用的物质环境,研究二者及其交互作用对牛冻精的影响。

1 材料与方法

1.1 试验仪器与试剂

主要仪器:生物光学显微镜(重庆光学仪器厂, XSJ-2型),电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂, HH-B11·500型),电热鼓风干燥箱(南京试验仪器

厂, HG101-2型),电子分析天平(上海上平仪器公司, JA1003型),细管一体机(法国, DIGITCOOL 5300型),比色密度测定仪(法国, RS-232型),自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂, SZ-93型)。

主要试剂:Tris(上海山浦化工有限公司),果糖和葡萄糖(天津石科密欧化学试剂开发中心),柠檬酸(天津市化学试剂三厂),二水柠檬酸钠(天津市福晨化学试剂厂),甘油(天津市化学试剂三厂),姬姆萨染色剂(莱阳市双双化工有限公司),磷酸二氢钠和磷酸氢二钠(天津石科密欧化学试剂开发中心),海藻糖(Sigma分装产品),牛血清白蛋白(上海博奥生物科技有限公司)。

1.2 溶液配制

(1)牛精液稀释液(I液)。取Tris 2.42 g,柠檬酸(Citric acid)1.34 g,葡萄糖(Glucose)1 g,青霉素和链霉素各200 000 IU,卵黄20 mL,加蒸馏水100 mL。

(2)牛精液冷冻保存液(II液)。取Tris 2.42 g,柠檬酸1.34 g,葡萄糖1 g,青霉素和链霉素各200 000 IU,卵黄20 mL,甘油12.8 mL,加87.2 mL蒸馏水配成100 mL溶液。

(3)精子低渗液。将果糖0.675 6 g(75 mmol/L)和二水柠檬酸钠0.367 6 g(25 mmol/L)溶于50 mL双蒸水中。

1.3 牛精液的采集

本试验所用牛精液采自河南省纯种肉牛繁育中心种公牛站,选择年龄2~7岁、体质健壮、繁殖性能良好的4头夏洛来种公牛。假阴道法采精,采精频率每周2次;常规检测鲜精品质,包括射精量、色泽、云雾状和精子活率等。

1.4 牛精液的冷冻与解冻

采用两次稀释法调整精子密度为 120×10^6 mL⁻¹,0~5℃平衡2~4 h,装管(0.25 mL),冷冻后投入液氮保存。解冻方法为40℃温水中水浴10 s。

1.5 牛精液品质的检测

1.5.1 精子活率的直观检测 精液解冻后,于室温25℃在显微镜下观测精子活率。

1.5.2 精子顶体完整率的检测 细管冻精解冻后,将细管中间的一滴精液滴于载玻片的左端,用另一张边缘光滑的载玻片呈35°角自右面接触液滴,拉向另一侧,制成抹片。自然风干5~10 min后,用福尔

马林磷酸盐固定液固定 15 min,水洗干燥后,用姬姆萨染色 90 min,自来水冲洗,干燥,于显微镜下观察 300 个精子,统计顶体完整的精子数。

1.5.3 精子质膜完整率的检测 细管解冻后,用精子低渗液(37 ℃)调整精子密度至 $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,37 ℃ 孵育 30~60 min,混匀,取一滴约 10 μL 于血细胞计数板上,400 \times 显微镜下观察,计算弯尾精子的百分率。每次至少计算 200 个精子。

1.6 试验设计

将所采新鲜精液经外观检测合格后,分装在 16 个集精杯中。TH、BSA 添加量均设 4 个水平,其中 TH 为 0,0.000 37,0.025 和 0.05 mol/L,BSA 为 0,1,2,3 g/L,TH 和 BSA 的 4 个添加水平分别两两组合添加在稀释液中,组成 16 个处理,以其中的 TH 和 BSA 添加量均为 0 作为对照组。BSA 在牛精液 I 液和 II 液中都添加,TH 只在 II 液中添加。解冻后显微镜下主观评定精子活率,姬姆萨染色法检测精子顶体完整率,低渗膨胀法检测精子质膜完整性,评定和比较不同处理的冷冻效果。

1.7 数据统计分析

采用 SPSS 11.5 软件对数据进行方差分析和 LSD 多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 添加 TH 和 BSA 对冻后牛精子活率的影响

表 1 表明,添加不同水平的 TH 和 BSA 对冻后牛精子活率有明显影响($P < 0.01$),二者之间存在显著交互作用($P < 0.01$)。单独添加 TH,当添加量为 0.025 mol/L 时,冻后精子活率与对照组相比提

高了 5.16%,达到极显著水平($P < 0.01$);添加量为 0.000 37 mol/L 组冻后精子活率稍优于对照组,添加量为 0.05 mol/L 组冻后精子活率较对照组有所下降,但这两组与对照组间均无明显差异($P > 0.05$)。单独添加 BSA,当添加量为 1 g/L 时,冻后牛精子活率分别比对照组、2 和 3 g/L 添加量组提高 3.83%($P < 0.05$),5.33%和 7.00%($P < 0.01$);添加量为 2 和 3 g/L 时,随着添加量的增加,冻后精子活率开始下降,但与对照组差异不大($P > 0.05$)。与对照组相比,有 4 个 TH \times BSA 处理组的冻后精子活率优于对照组。1 g/L BSA 和 0.025 mol/L TH \times 1 g/L BSA 2 个处理组的冻后精子活率显著高于对照组($P < 0.05$),分别比对照组提高了 3.83%和 4.39%;0.000 37 mol/L TH \times 2 g/L BSA 和 0.025 mol/L TH 组的冻后精子活率分别比对照组提高了 5.83%和 5.16%,极显著高于对照组($P < 0.01$);在这 4 个处理组中,0.000 37 mol/L TH \times 2 g/L BSA 组的活率最好,但 4 组之间无明显差异($P > 0.05$)。在 16 个处理组中,0.000 37 mol/L TH \times 2 g/L BSA 组的冻后精子活率显著高于除了 1 g/L BSA、0.025 mol/L TH、0.025 mol/L TH \times 1 g/L BSA、0.025 mol/L TH \times 2 g/L BSA 之外的其他各组($P < 0.05$),其中极显著高于 2 g/L BSA、3 g/L BSA、0.000 37 mol/L TH \times 1 g/L BSA、0.000 37 mol/L TH \times 3 g/L BSA、0.025 mol/L TH \times 3 g/L BSA、0.05 mol/L TH、0.05 mol/L TH \times 1 g/L BSA、0.05 mol/L TH \times 2 g/L BSA 和 0.05 mol/L TH \times 3 g/L BSA 组($P < 0.01$)。

表 1 TH 和 BSA 处理对冻后牛精子活率的影响

Table 1 Effect of TH \times BSA on bull sperm mortality of frozen-thawed semen %

TH/(mol \cdot L $^{-1}$)	BSA/(g \cdot L $^{-1}$) Bovine Serum Albumin			
	0	1	2	3
0	39.67 \pm 0.21 cdeBCDE	43.50 \pm 1.91 abAB	38.17 \pm 0.30 deCDE	36.50 \pm 0.42 eE
0.000 37	41.25 \pm 0.85 bcdABCD	40.00 \pm 1.71 cdBCDE	45.50 \pm 1.41 aA	39.00 \pm 0.36 deCDE
0.025	44.83 \pm 1.62 aA	44.06 \pm 2.27 abAB	42.58 \pm 1.64 abcABC	37.94 \pm 0.74 deDE
0.05	38.33 \pm 0.84 deCDE	38.27 \pm 0.64 deCDE	39.67 \pm 1.11 cdeBCDE	37.94 \pm 0.57 deDE

注:表中数据后标不同小写字母者差异显著($P < 0.05$),标不同大写字母者差异极显著($P < 0.01$)。下表同。

Note: Different little letters mean significant difference($P < 0.05$), different capital letters mean super significant difference each other($P < 0.01$). The following tables are the same.

2.2 添加 TH 和 BSA 对冻后牛精子顶体完整率的影响

表 2 表明,单独添加不同水平的 TH 和 BSA 对冻后牛精子顶体完整率影响不大($P > 0.05$),但二者的交互作用对冻后牛顶体完整率有明显影响

($P < 0.05$)。

由表 2 可知,0.000 37 mol/L TH \times 2 g/L BSA 组的牛精子顶体完整率最好,比对照组提高了 6.09%,二者达到极显著差异($P < 0.01$)。0.000 37 mol/L TH \times 2 g/L BSA 组顶体完整率显著优于除

1g/L BSA 组之处的其他各组,其中极显著优于 2 g/L BSA、3 g/L BSA、0.000 37 mol/L TH×1 g/L BSA、0.000 37 mol/L TH×3 g/L BSA、0.025 mol/L TH、0.025 mol/L TH×3 g/L BSA、0.05

mol/L TH、0.05 mol/L TH×1 g/L BSA、0.05 mol/L TH×3 g/L BSA 组($P<0.01$),而0.000 37 mol/L TH×2 g/L BSA 组之外的其他 15 组之间无明显差异($P>0.05$)。

表 2 TH 和 BSA 处理对冻后牛精子顶体完整率的影响

Table 2 Effect of TH×BSA on bull sperm acrosome integrity of frozen-thawed semen

TH/(mol·L ⁻¹) Trehalose	BSA/(g·L ⁻¹)			
	0	1	2	3
0	40.20±1.30 bB	42.44±2.27 abAB	39.78±1.52 bB	38.00±1.28 bB
0.000 37	40.61±1.71 bAB	39.27±1.46 bB	46.29±2.64 aA	38.50±1.39 bB
0.025	40.00±1.24 bB	41.22±1.57 bAB	41.00±1.58 bAB	38.17±1.09 bB
0.05	39.28±0.84 bB	40.00±1.31 bB	40.90±1.48 bAB	39.44±1.67 bB

2.3 添加 TH 和 BSA 对冻后牛精子质膜完整率的影响

由表 3 可知,添加不同水平的 TH 和 BSA 对冻后牛精子质膜完整率有明显影响($P<0.05$),二者之间存在显著交互作用($P<0.05$)。单独添加 TH,当添加量为 0.000 37 和 0.025 mol/L 时,比对照组

冻后精子质膜完整率分别提高 4.92% 和 5.33% ($P<0.05$)。单独添加 BSA,当添加水平为 1 g/L 时,冻后牛精子质膜完整率分别比对照组、2 和 3 g/L 添加量组提高 5.30% ($P<0.05$),6.72% 和 10.60% ($P<0.01$);添加量为 3 g/L 时,冻后牛精子质膜完整率比对照组下降 5.30% ($P<0.01$)。

表 3 TH 和 BSA 处理对冻后牛精子质膜完整率的影响

Table 3 Effect of TH×BSA on bull sperm membrane integrity of frozen-thawed semen

TH/(mol·L ⁻¹) Trehalose	BSA/(g·L ⁻¹)			
	0	1	2	3
0	39.50±1.70 bBCD	44.80±4.07 aAB	38.08±3.04 bcD	34.20±3.09 cD
0.000 37	44.42±2.18 aABC	38.89±3.88 bD	45.56±0.87 aA	36.00±2.21 bcD
0.025	44.83±2.86 aAB	45.14±4.56 aA	39.36±4.98 bCD	37.05±3.54 bcD
0.05	36.17±5.38 bcD	35.92±4.01 bcD	39.33±4.57 bcD	35.86±2.31 bcD

对各处理组的冻后精子质膜完整率进行评定可知,1 g/L BSA、0.000 37 mol/L TH、0.000 37 mol/L TH×2 g/L BSA、0.025 mol/L TH、0.025 mol/L TH×1 g/L BSA 5 个处理组的冻后精子质膜完整率显著高于对照组 ($P<0.05$),其中 0.000 37 mol/L TH×2 g/L BSA 和 0.025 mol/L TH×1 g/L BSA 两组质膜完整率极显著高于对照组 ($P<0.01$),分别比对照组提高了 6.06% 和 5.64%。在 5 个质膜完整率高于对照组的处理组中,添加量 0.000 37 mol/L TH×2 g/L BSA 组的质膜完整率最高,显著优于除了 1 g/L BSA、0.000 37 mol/L TH、0.025 mol/L TH 和 0.025 mol/L TH×1 g/L BSA 组的其他各组 ($P<0.05$),其中极显著优于 2 g/L BSA、3 g/L BSA、0.000 37 mol/L TH×1 g/L BSA、0.000 37 mol/L TH×3 g/L BSA、0.025 mol/L TH×2 g/L BSA、0.025 mol/L TH×3 g/L BSA、0.05 mol/L TH、0.05 mol/L TH×1 g/L BSA、0.05 mol/L TH×2 g/L BSA、0.05 mol/L TH×3 g/L BSA 处理组 ($P<0.01$)。

对冻后精子活率、顶体完整率和质膜完整率进

行方差分析,结果表明,添加 TH、BSA 及其互作效应对牛精液的冷冻效果与对照相比达到显著水平。其中,0.000 37 mol/L TH×2 g/L BSA 处理组的冻后精子活率、顶体完整率和质膜完整率最高,与对照组相比达到极显著水平 ($P<0.01$),且该组顶体完整率还显著高于其他组 ($P<0.05$)。由本研究可知,0.000 37 mol/L TH 和 2 g/L BSA 为牛冷冻精液的较适宜添加量。

3 讨论

本研究结果显示,精子冻后活率和质膜完整率均随着 TH 和 BSA 添加量的增加而提高,但达到一定水平后反而降低,说明 TH 和 BSA 添加量过高会对精子产生不利影响,这与文献[3,9]的结果基本一致。TH×BSA 组表现出极显著的互作效应,在适宜添加量下,冻后精子活率、顶体完整率和质膜完整率均高于单独添加组和对照组。

在精液冻前预处理及冷冻-解冻过程中,均会不可避免地会对精子细胞造成一定的低温打击和机械性损伤。冷冻稀释液中添加有一定毒性的渗透性抗冻

保护剂,起保护作用的同时也会对精子产生化学性损伤。本研究结果表明,冷冻稀释液中单独添加 0.025 mol/L 的 TH,可以明显提高冷冻-解冻后精子的活率和精子质膜完整率,这与 Eiman 等^[1]和 Aboagla 等^[10]的研究结论一致。但关于 TH 在稀释液中的最佳添加量与 Aboagla 等^[10]在山羊和 Garcia 等^[9]在牛精子冷冻方面的研究结果不同,其原因一方面可能是由于不同品种家畜的精子细胞对不同稀释液渗透压的耐受能力不同,另一方面是所用的基础稀释液配方及其渗透压有差别所致。

TH 的保护机制与其晶体结构、溶液的物理构象和化学特性密切相关^[11]。Sussich 等^[12]认为,TH 通过两种途径来实现其对精子的保护功能。一方面,TH 的羟基可能与精子膜磷脂的磷酸根结合置换周围的水分子,从而防止冷冻时由于冰晶形成对精子所造成的损伤;另一方面,TH 作为一种稳定的非还原性双糖,对生物体或生物大分子具有独特的非特异性保护作用,在冷冻过程中可以在细胞膜外面产生一种玻璃状的防护层,提高细胞对高渗透压的耐受性。另一种观点认为,TH 作为一种水分替代分子,在冷冻过程中避免了细胞膜在固相-液相转变中受到伤害,在细胞内主要作为一种亲和性溶质来抗衡细胞外的渗透压变化^[13],这与 Crowe 等^[14]所报道的“水代替”假说一致。“水代替”假说认为,生物体中的大分子均被一层水膜包围保护着,这是维持其结构和功能必不可少的物质基础。干燥时水膜的除去,将导致这些大分子物质发生不可逆变化。干燥过程中若有 TH 存在,可在生物分子的失水部位与这些分子形成氢键,使其在缺水条件下仍能保持原有结构而不丧失活性。

合适的膜流动性是精子膜功能(如获能、顶体反应等)正常发挥的一个极为重要的条件。Waston^[5]认为,低密度蛋白质可使精子膜脂处于溶解状态,因而 BSA 的作用可能是通过溶解精子膜脂而使精子质膜具有一定的流动性,从而尽可能地保护膜脂的生理有效性。本试验结果表明,1 g/L BSA 添加量可以显著提高冻后牛精子的活率和质膜完整率,但对顶体完整率并未显著改善。李拥军等^[6]在海门山羊上的试验发现,添加 6% 的 BSA 对山羊精液冷冻具有一定的保护作用,可以提高冻精解冻后的活力及精子的穿卵能力。Holt 等^[15]的研究结果显示,在低温保存过程中,BSA 不能防止顶体损伤,但对精子游速有一定影响,这与本研究 BSA 在超低温冷冻精子中所发挥的作用是一致的。黄东晖等^[8]研究表

明,白蛋白和卵黄两种蛋白质联合应用于人类精子冷冻保存的效果优于单用卵黄蛋白质的效果,且白蛋白的作用与其使用浓度有关。本试验中,在含有卵黄的冷冻稀释液中添加 BSA,显著改善了冻融后精子的品质,其原因可能是因为两者含有一些不同的物质,具有互补和协作效应,如白蛋白缺乏卵黄富含的不饱和脂肪酸,但具有良好的调节胶体渗透压的作用,及携带激素、生长因子、脂肪性维生素、药物、微量元素等物质的功能。张万洲^[16]研究表明,白蛋白在人精液冷冻保存中起着稳定细胞膜、促进精子获能的作用。冻精除受冰晶所造成的损伤之外,还表现出膜结构方面的损坏。在精液冷冻-解冻过程中,精子膜通透性发生变化,细胞内物质外流,精子运动器受到损伤,都可能使其活力降低。因此,在精液冷冻过程中,通过防止冰晶形成来保护精子膜就显得很重要。本试验通过添加膜稳定剂 BSA,显著提高了冻后精子活率,进一步说明保护精子细胞膜对精液冷冻十分重要。

[参考文献]

- [1] Eiman MEA, Takato T. Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freeze ability of goat spermatozoa [J]. *Theriogenology*, 2004, 62: 809-818.
- [2] 胡建宏,李青旺,江中良,等.海藻糖对猪精液冷冻保存效果的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(12): 1297-1303.
Hu J H, Li Q W, Jiang Z L, et al. Effects of trehalose on cryopreservation of boar semen [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2006, 37(12): 1297-1303. (in Chinese)
- [3] 田亚丽,任有蛇,岳文斌.冷冻稀释液中添加海藻糖对山羊冻精结构和功能的影响及最佳剂量的筛选 [J]. *当代畜牧*, 2005(8): 32-34.
Tian Y L, Ren Y S, Yue W B. Effects of the supplementation of trehalose on the freezability of goat spermatozoa and selection of optimization dosage [J]. *Contemporary Animal Husbandry*, 2005(8): 32-34. (in Chinese)
- [4] Cabrita E, Anel L, Herraes M P. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm [J]. *Theriogenology*, 2001, 56(4): 623-635.
- [5] Waston P E. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg yolk lipoprotein [J]. *J Reprod Fertil*, 1981, 62: 483-492.
- [6] 李拥军,黄永宏,俞晓荣,等.牛血清白蛋白(BSA)对海门山羊精液冷冻效果影响的初步研究 [J]. *中国草食动物*, 2003(S1): 136.
- [7] Li Y J, Huang Y H, Yu X R, et al. Elementary study of effects of BSA on the freeze ability of Haimen goat spermatozoa [J]. *China Herbivores*, 2003(S1): 136. (in Chinese)
- [7] 刘颂东,王 前.透明质酸、BSA 和 SOD 在猪精液液态保存中

- 对精子活力和受胎力的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2003, 35(8): 16-18.
- Liu S D, Wang Q. Effects of Hyaloplasm, BSA and SOD on sperm motility and fertility in preservation of Boar Semen [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2003, 35(8): 16-18. (in Chinese)
- [8] 黄东晖, 赵虎, 熊承良, 等. 白蛋白与卵黄联合应用于人类精液冷冻保存的研究 [J]. 中华男科学杂志, 2006, 12(2): 115-119.
- Huang D H, Zhao H, Xiong C L, et al. Study on cryopreservation of human Semen using compound of albumin and egg yolk [J]. China Andrology Journal, 2006, 12(2): 115-119. (in Chinese)
- [9] Garcia de Castro A, Tunnacirfe A. Intracellular trehalose improves osmotolerance but not desiccationtolerance in mammalian cells [J]. FEBS Letters, 2000, 487: 199-202.
- [10] Aboagla E M, Terada T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing [J]. Biol Reprod, 2003, 69: 1245-1250.
- [11] Jelinkova L, Selman H A, Arav A, et al. Twin pregnancy after vitrification of 2-pronuclei human embryos [J]. Fertil Steril, 2002, 76(2): 412-414.
- [12] Sussich F, Urbani R, Princivalle F. Polymorphic amorphous and crystalline forms of trehalose [J]. Am Chem Soc, 1998, 120: 7893-7899.
- [13] Aisen E G, Medina V H, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility of in different trehalose concentrations [J]. Theriogenology, 2002, 57: 1801-1808.
- [14] Crowe J H, Crowe L M, Carpenter J F, et al. Interactions of sugars with membranes [J]. Biochim Biophys Acta, 1988, 947: 367-384.
- [15] Holt W V, North R D. The role of membrane-active lipids in the protection of ram spermatozoa during cooling and storage [J]. Gamete Res, 1988, 19: 77-89.
- [16] 张万洲. 超低温冷冻精子的实验研究 [J]. 九江医学, 2000, 15(1): 9-10.
- Zhang W Z. An experiment study of ultra low temperature frozen semen [J]. Jiujiang Medical Journal, 2000, 15(1): 9-10. (in Chinese)

(上接第 52 页)

- [13] 王志洁. 金银花、黄芪合用抗 I 型疱疹病毒药效分析 [J]. 浙江中医学院学报, 1999, 23(5): 37-40.
- Wang Z J. The analyses of honeysuckle and astragalus mongholicus combine to anti-I-herpesvirus pharmacodynamic action [J]. Journal of Zhejiang Traditional Chinese Medical College, 1999, 23(5): 37-40. (in Chinese)
- [14] 刘家国, 胡元亮, 陈玉库, 等. 几种天然药物成分在体外 CPF 中最大安全浓度的测定 [J]. 动物医学进展, 2002, 23(3): 88-91.
- Liu J G, Hu Y L, Chen Y K, et al. The safety concentration of several components in natural drugs on CEF [J]. Animal Progress Medical Science, 2002, 23(3): 88-91. (in Chinese)
- [15] 张素梅, 杨明凡, 王学斌, 等. 黄芪、金银花体外对伪狂犬病毒作用研究 [J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(2): 8-10.
- Zhang S M, Yang M F, Wang X B, et al. The reseac of astragalus mongholicus and honeysuckle to Pseudorabies *in vitro* [J]. China Magazine Veterinary, 2003, 39(2): 8-10. (in Chinese)
- [16] 高海, 李秀岚. 中草药多糖免疫调节剂研究进展 [J]. 动物医学进展, 2003, 24(5): 56.
- Gao H, Li X L. Progress in research of immunomodulator of Chinese herbal medicine polysaccharide [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2003, 24(5): 56. (in Chinese)
- [17] 王学林, 刘文森. 复方剂对鸡新城疫病毒作用的初步研究 [J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(1): 10-13.
- Wang X L, Liu W S. The initial research of action of complex prescription dose to newcastle disease virus [J]. China Magazine Veterinary, 2004, 40(1): 10-13. (in Chinese)