

N,N-二甲基甲酰胺(DMF)对猪精液 冷冻效果的影响

张树山¹,李青旺^{1,2},胡建宏¹,江中良¹,刘宏¹,王立强¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100;2 燕山大学 环境与化学工程学院 生物工程系,河北 秦皇岛 066004)

[摘要] **【目的】**研究 N,N-二甲基甲酰胺(N,N-Dimethylformamide, DMF)与甘油配制的混合保护剂对猪冷冻精子的保护效果。**【方法】**以 DMF 和甘油配制成混合冷冻保护剂对猪精液进行冷冻,试验共设对照组(30 mL/L 甘油)、A 组(10 mL/L DMF+20 mL/L 甘油)、B 组(20 mL/L DMF+10 mL/L 甘油)、C 组(30 mL/L DMF)和 D 组(50 mL/L DMF) 5 个处理组,以活动精子百分率、精子活率、精子直线运动速率、精子顶体完整率以及精子质膜完整率为检测指标,对猪精子冷冻效果进行评价。**【结果】**20 mL/L DMF+10 mL/L 甘油混合冷冻保护剂对猪精子有较好的冷冻保护作用,与其他处理组相比,除精子直线运动速率和质膜完整率与 10 mL/L DMF+20 mL/L 甘油组无显著差异外,其他各项指标均优于其他组及甘油对照组。30 mL/L DMF 对猪精子的毒性强于同浓度甘油,但 20 mL/L DMF+10 mL/L 甘油混合冷冻保护剂的毒性与甘油对照组无显著差异($P>0.05$)。**【结论】**20 mL/L DMF+10 mL/L 甘油混合冷冻保护剂比单一使用甘油或 DMF 能起到更好的冷冻保护作用。

[关键词] 猪精液;冷冻保存;N,N-二甲基甲酰胺;精子品质

[中图分类号] S828.3⁺4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)11-0051-04

Effect of N,N-Dimethylformamide on cryopreservation of boar semen

ZHANG Shu-shan¹, LI Qing-wang^{1,2}, HU Jian-hong¹, JIANG Zhong-liang¹,
LIU Hong¹, WANG Li-qiang¹

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

2 College of Environment and Chemistry Engineering, Yanshan University, Qinhuangdao, Hebei 066004, China)

Abstract: **【Objective】**The effect of mixed cryoprotectants composed of different proportions of glycerol and N,N-Dimethylformamide (DMF) on freezing boar sperm was studied. **【Method】**The mixing cryoprotectant was composed of DMF and glycerol, and experiments were executed among five treatments: the control (30 mL/L glycerol), group A (10 mL/L DMF + 20 mL/L glycerol), group B (20 mL/L DMF + 10 mL/L glycerol), group C (30 mL/L DMF) and group D (50 mL/L DMF). In the present study, the effects of mixing cryoprotectant on frozen-thawed sperm were evaluated by five sperm parameters including the percentage of total motile sperm, motility, velocity of straight-line motion, plasma membrane integrity and acrosome integrity. **【Result】**20 mL/L DMF + 10 mL/L glycerol could protect boar sperm against cryodamage during cryopreservation. No difference on velocity of straight-line motion and membrane integrity of frozen-thawed sperm was found between group B and group A ($P>0.05$), and the parameters of frozen-thawed sperm of the group B were higher than those of other groups ($P<0.05$); The toxicity of DMF was stronger than that of glycerol at the same level of concentration (30 mL/L), and no difference

* [收稿日期] 2009-05-18

[基金项目] 国家“863”计划项目(2008AA101004)

[作者简介] 张树山(1976—),男,山西大同人,在读博士,主要从事动物生殖生理调控研究。

[通信作者] 李青旺(1956—),男,陕西西米脂人,教授,博士生导师,主要从事动物生殖生理调控研究及生物技术研究。

E-mail: ysulqw@126.com

existed between group B and the control in the present study ($P<0.05$).【Conclusion】20 mL/L DMF + 10 mL/L glycerol could provide better protective action for frozen boar sperm than that of DMF or glycerol alone.

Key words: boar semen; cryopreservation; N,N-Dimethylformamide; sperm quality

猪精液冷冻技术不仅使建立一个不受时间、地域限制的“精子库”成为可能,可为大量母猪提供携带优秀遗传资源的精子,而且还可为猪繁殖生产提供有效的生物安全保障。自 Polge^[1]利用猪冷冻精液人工授精获得仔猪至今,猪精液冷冻技术研究取得了较大进展。但由于猪精子对低温打击敏感,更容易在冷冻-解冻过程中遭受机械性损伤和溶液性损伤,导致猪冷冻精液的受胎率和窝产仔数均明显低于常温保存精液。此外,现有小剂量冷冻精液也限制了猪冷冻精液在生产中的应用,使其仅有少量用于猪的品种培育中。

冷冻保护剂是家畜精液冷冻能否成功的最重要因素之一。一般认为,冷冻保护剂的发展方向是用无毒性、高效的冷冻保护剂完全取代甘油。但近些年来,有关新冷冻保护剂的研究一直没有重大进展,甘油等有一定毒性作用的冷冻保护剂,在相当长的时间仍可能是精液冷冻中最常用的^[2-3]。研究证实,甘油在冷冻过程中对精子有良好的保护作用,但对精子细胞的毒性作用^[4-5]及对受孕的抑制作用^[6-7]也日益引起人们的关注。近些年来,关于冷冻保护剂的研究一直是精液冷冻领域中的一个热点^[8-10]。

N,N-二甲基甲酰胺(N,N-Dimethylformamide, DMF)属于低分子量酰胺类化合物。近年来,一些研究者认为,DMF也可以作为渗透性冷冻保护剂用于家畜精子冷冻,并在一些家畜精液冷冻中进行了尝试,取得了优于甘油的效果^[11-13]。然而,有关DMF在猪精液冷冻中的研究却鲜见报道,仅见 Bianchi 等^[14]报道用 50 mL/L 的 DMF 代替甘油取得了较好效果。DMF 比甘油更容易穿过细胞膜进入精子内部。但与甘油相比,其粘性较小,导致弱化水结晶能力较差,而且也有一定毒性。考虑到上述因素,本试验将 DMF 和甘油配制成混合冷冻保护剂用于猪精液冷冻保存,研究其对猪精子的冷冻保护作用,旨在为研究开发

高效的猪精液冷冻稀释液配方奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试剂及仪器 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、异硫氰荧光素标记的花生凝集素(FITC-PNA)和噻唑蓝(MTT),均为 Sigma 公司产品;甘油,购自天津巨星盛源公司。

程序冷冻仪,英国 BIOTRONICS LIMITED 公司生产;超低温温度计,美国 Barnant 公司产品;倒置荧光显微镜和数码相机,日本尼康公司产品;精子品质自动分析仪,购自北京中科恒业科技有限公司。

1.1.2 溶液配制 (1) TCG 冷冻稀释液^[15]。准确称取葡萄糖 1.1 g,柠檬酸 1.48 g, Tris 2.42 g,加蒸馏水至 100 mL,调 pH 至 6.21。

(2)BTS 液^[16]。葡萄糖 3.7 g,EDTA 8.125 g,二水柠檬酸三钠 0.5 g, NaHCO₃ 0.125 g, KCl 0.007 5 g,青霉素 0.06 g,硫酸链霉素 0.1 g,加蒸馏水至 100 mL,调 pH 至 7.25。

(3)FITC-PNA 染液。取 0.001 g FITC-PNA,溶于 10 mL PBS 中,用 0.45 μm 滤膜过滤后,避光贮存。

(4)精子低渗液。二水柠檬酸钠 0.735 g,果糖 1.351 g,加双蒸水至 100 mL。

(5)MTT 溶液。取 MTT 250 mg,充分溶解于 50 mL PBS 液,封严于 4 ℃避光保存。

(6)冷冻保存Ⅰ液。体积分数 80% TCG 冷冻稀释液添加体积分数 20%卵黄,磁力搅拌器充分搅拌,离心(5 000×g,30 min),取上清液过滤,收集滤液备用。

(7)冷冻保存Ⅱ液。冷冻保存Ⅰ液添加不同体积分数的冷冻保护剂,即得冷冻保存Ⅱ液。本试验共配制 5 种冷冻保存Ⅱ液,详见表 1。

表 1 猪精液冷冻保存Ⅱ液中冷冻保护剂的添加方案

Table 1 Addition proposal of Glycerol and DMF in freezing extender for boar semen during cryopreservation

组 别 Group	二甲基甲酰胺/ (mL·L ⁻¹) DMF	甘油/ (mL·L ⁻¹) Glycerol	组 别 Group	二甲基甲酰胺/ (mL·L ⁻¹) DMF	甘油/ (mL·L ⁻¹) Glycerol
对照 Control	0	30	C	30	0
A	10	20	D	50	0
B	20	10			

1.2 方 法

1.2.1 精液采集 精液采自河北省秦皇岛市抚宁县瘦肉型种猪场中 1.5~2 岁、体格健壮、繁殖性能良好的 8 头约克夏种公猪。精液采集采用手握法,收集中段精液浓厚部分精液,用专用滤纸除去胶状物,用 BTS 稀释液按 1:1 体积比稀释后,在显微镜下初检,合格精液用保温瓶运回实验室。

1.2.2 精液预处理及冷冻 精液运至实验室后,用离心管等量分装,离心(800×g,10 min)、弃上清液,加 BTS 液至原来体积,15 层纱布包裹在 17 ℃恒温箱平衡 1 h。将平衡处理过的精液用离心管分装,离心(800×g,10 min),弃上清液,加冷冻保存Ⅰ液;置于 5 ℃冰箱中缓慢降温 2 h。将降温平衡后的精液分为 5 组,分别加入上述 5 种冷冻保存Ⅱ液。5 ℃冰箱平衡 1 h,装管(细管体积 0.25 mL),置于程序冷冻仪中,以 1 ℃/min 的速率从 5 ℃缓慢降至 -5 ℃,迅速移至液氮上方 3 cm 熏蒸 15 min,将细管投入液氮。

1.3 猪精子质量的评定

1.3.1 精子运动参数的测定 取细管冷冻精液于 37 ℃水浴 20 s 解冻。取 10 μL 精液于精子品质分析仪专用计数池,压盖板排出计数池中多余精液,计数 5 个视野以上,对活动精子百分率(The percentage of total motile sperm,TMS)、精子活率(Motility)以及精子直线运动速率(Velocity of straight-line motion,VSL)进行测定。

1.3.2 精子质膜完整性的检测 采用果糖柠檬酸钠低渗液进行低渗肿胀检测(HOST)。精子解冻后,用等温的精子低渗液稀释调整精子密度至 1×10⁶~2×10⁶/mL,孵育 30 min 后,取 10 μL 精液样品于血细胞计数板上,400 倍倒置显微镜下观察,计算弯尾精子百分率,每次至少检测 200 个精子。

1.3.3 精子顶体完整性的检测 采用 FITC-PNA

荧光染色法^[12,17],对猪精子顶体完整性进行检测。精子经 FITC-PNA 染色后,因 FITC-PNA 可与精子顶体膜上的受体特异性结合,在激发波长 480 nm、发射波长 530 nm 紫外光激发下,可区分出 4 种不同类型的精子:1)顶体完整精子,顶体顶部发强光且边缘规则光滑;2)顶体部分破坏精子,顶体前区杂乱发光且边缘不规则;3)顶体前帽缺失的精子,仅在赤道区有荧光;4)顶体完全破坏精子,无荧光。每次至少检测 200 个精子。

1.3.4 冷冻保护剂对猪精子毒性的检测 采用 MTT 法检测冷冻保护剂对精子的毒性。检测方案参照文献[18]略加改进。猪精液加冷冻保存Ⅱ液后,分别取 100 μL 至 96 孔板(每个样重复 6 次),加入 MTT 液并吹打混匀。37 ℃培养箱黑暗条件下孵育 2 h 后,每孔加 100 μL 二甲基亚砷(DMSO),待结晶充分溶解后,置于酶联检测仪检测波长 570 nm 下的吸光度值(OD₅₇₀,630 nm 为参考波长),即可测出精液中活精子的相对浓度,其中活细胞浓度与吸光度值成反比。

1.4 数据处理

试验数据采用 SPSS 11.0 软件进行方差分析和 LSD 多重比较。

2 结果与分析

2.1 DMF 对猪冷冻精子运动参数的影响

由表 2 可知,B 组猪冷冻精子的运动参数明显提高,其活动精子百分率和精子活率均显著高于其他各组($P<0.05$);精子直线运动速率显著高于对照组及 30,50 mL/L DMF 组($P<0.05$),但与 A 组差异不显著($P>0.05$)。

30 mL/L DMF 组的各项精子运动参数均显著高于甘油对照组($P<0.05$)。

表 2 DMF 对猪冷冻精子品质的影响($n=10$)
Table 2 Effect of DMF on freezing boar semen($n=10$)

组 别 Group	精子运动参数 Sperm motion			质膜完整率/% Plasma membrane integrity	顶体完整率/% Acrosome integrity
	活动精子百分率/% TMS	活率/% Motility	精子直线运动速率/(μm·s ⁻¹) VSL		
对照 Control	38.50±1.29 a	32.70±0.95 a	39.50±1.29 a	39.50±1.29 a	45.25±1.70 a
A	42.75±0.96 b	32.75±0.94 a	43.50±1.28 bc	42.50±0.58 bc	49.00±2.16 b
B	45.25±1.71 c	44.00±0.41 c	45.25±0.25 c	43.50±1.29 b	52.75±1.26 c
C	43.00±0.82 b	42.50±1.29 b	42.50±1.29 bd	41.75±0.95 c	49.50±1.29 b
D	38.75±0.95 a	36.00±0.82 d	41.50±2.38 d	41.25±1.71 c	47.50±3.11 ab

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。下表同。
Note: Values with different small letters within the same column differ significantly ($P<0.05$). The next table is same.

2.2 DMF 对猪冷冻精子质膜完整率和顶体完整率的影响

由表 2 可知,B 组的精子质膜完整率显著高于对照组及 30,50 mL/L DMF 组($P<0.05$),但与 A 组差异不显著($P>0.05$);B 组的顶体完整率显著高于对照组($P<0.05$)。

2.3 DMF 对猪精子的毒性

采用 MTT 法检测不同冷冻保护剂对猪精子的毒性,光密度值(optical density value,OD)越大表

明活精子相对密度越大,即冷冻保护剂的毒性越小。由表 3 可知,30 mL/L DMF(C 组)对猪精子的毒性显著高于同浓度甘油对照组($P<0.05$),DMF 和甘油混合冷冻保护剂组(A 组和 B 组)对猪精子的毒性高于甘油对照组,但无显著差异($P>0.05$)。随着 DMF 浓度的增加,冷冻稀释液对猪精子的毒性也随之增强,30 和 50 mL/L DMF 的毒性显著强于其他处理组($P<0.05$)。

表 3 DMF 与甘油对猪精子毒性的检测结果($n=6$)

Table 3 Toxic effects of glycerol and different concentrations of DMF on freezing boar sperm($n=6$)

组 别 Group	OD ₅₇₀	组 别 Group	OD ₅₇₀
对照 Control	0.457±0.308 a	C	0.235±0.035 b
A	0.423±0.117 a	D	0.138±0.011 c
B	0.418±0.063 a		

3 讨 论

本研究中,30 mL/L DMF 对猪冷冻精子的保护效果显著优于 30 mL/L 甘油,表明 DMF 对精子具有较好的冷冻保护作用。此外,DMF 和甘油组成的混合冷冻保护剂较只添加甘油或 DMF 对猪精子的冷冻保护效果更佳。有报道指出,不同冷冻保护剂组成复合冷冻保护剂的效果优于单一冷冻保护剂^[19-20]。本试验中,50 mL/L DMF 对猪精子的冷冻保护效果略优于 30 mL/L 甘油,这与 Bianchi 等^[14]的研究结果一致;50 mL/L DMF 组冷冻猪精子的各项指标显著低于 30 mL/L DMF 组,可能是由于 DMF 浓度增加导致毒性作用增强的缘故。在家畜精液冷冻中,甘油等渗透性冷冻保护剂对精子的毒性不容忽视,DMF 的毒性略高于甘油^[5,21],本试验结果也证实了这一点。

甘油与 DMF 同属渗透性冷冻保护剂,其保护冷冻精子的作用均可能从抑制机械性损伤与溶液性损伤实现,但二者对冷冻精子的冷冻保护能力各有所长。甘油分子中羟基之间的结合会降低甘油结合水的能力,而 DMF 的含氮官能团($\text{NH}-\text{C}=\text{O}$)中—N 和—H 都可能与水分子的一H 结合,故 DMF 结合水分子的能力强于甘油。这可能是 DMF 精子冷冻保护剂的一个重要优点。与甘油相比,DMF 分子结构中的甲基(CH_3)使其具有较强的亲脂性及较低的分子质量,这些特性均能促进其更容易通过细胞膜进入精子内部发挥作用,降低冷冻瞬间渗透压的变化,增强猪精子抵抗溶液性损伤的能力^[5]。但甘油具有较高的相对分子质量,其通过精子内外渗透压差来造成精子脱水及抑制水分子结晶的能力强于

DMF^[22]。此外,甘油的毒性也略低于 DMF。本试验中,以适宜比例混合的 DMF 与甘油复合冷冻保护剂,对精子的冷冻保护作用更好。究其原因,可能是二者结合使用,使混合冷冻保护剂保持了与甘油相似的毒性水平,故其亲水性和穿过精子细胞膜的能力明显高于甘油。甘油与 DMF 组成的混合冷冻保护剂,能提供比其单一使用更好的冷冻保存效果,然而二者间的协同作用机制及冷冻保护剂对动物精子的冷冻保护机理,还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] Polge C. Artificial insemination in pigs [J]. Vet Rec,1956,68: 62.

[2] Johnson L A, Weitze K F, Fiser P, et al. Storage of boar semen [J]. Anim Reprod Sci, 2000, 62(1/3): 143-172.

[3] Roca J, Carvajal G, Lucas X, et al. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa [J]. Theriogenology, 2003, 60(1): 77-87.

[4] Almlid T, Johnson L A. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws [J]. Anim Sci, 1988, 66(11): 2899-2905.

[5] Watson P. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen [J]. Anim Reprod Sci, 2000, 60-61: 481-492.

[6] Vishwanath R, Nebel R L, McMillan W H, et al. Selected times of insemination with microencapsulated bovine spermatozoa affect pregnancy rates of synchronized heifers [J]. Theriogenology, 1997, 48(3): 369-376.

[7] Sexton T J. Relationship of the method of addition and temperature of cryoprotective agents to the fertilizing capacity of cooled chicken spermatozoa [J]. Poult Sci, 1975, 54(3): 845-848.

(下转第 61 页)