

陈衍, 高江梅, 赵世坤, 等. 无卵黄冷冻液冷冻食蟹猴精液方法的优化 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 70-76.
Chen Y, Gao JM, Zhao SK, et al. Optimization of cryopreservation of cynomolgus monkey semen with yolk-free solution [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 70-76.
Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.009

无卵黄冷冻液冷冻食蟹猴精液方法的优化

陈衍^{1#}, 高江梅^{2#}, 赵世坤¹, 李比海², 饶军华^{2*}, 杨世华^{1*}

(1. 华南农业大学兽医学院, 岭南现代农业广东实验室, 广州 510260; 2. 广东省科学院动物研究所, 广东省动物保护与资源利用重点实验室, 广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广州 510260)

【摘要】 目的 由于传统的精子冷冻液存在卵黄等不确定成分, 具有生物污染的风险。因此, 本研究旨在利用 Origio 及 Quinn's 两种商品化无卵黄冻存液保存食蟹猴种质资源并确定食蟹猴精子最佳冻存条件。方法 利用阴茎电刺激收集雄猴精液, 使用两种冻存液按不同体积比与精液混合后悬挂于液氮表面不同高度冻存食蟹猴精子。复苏后, 统计精子存活率、复苏率及顶体完整率确定冻存液最佳条件, 并在最佳条件下使用 Quinn's 冻存液证实精浆对精子冷冻的影响。结果 使用 Origio 和 Quinn's 精子冻存液冻存食蟹猴精子的最优条件为: 悬挂高度距液氮面 5 cm, 精液冻存液体积比为 1:0.5, 在最优条件下, Quinn's 组精子复苏率为 38.02% ± 14.98%, 显著高于 Origio 组精子复苏率 15.11% ± 14.49%。顶体完整率无组间差异。保留精浆可提高无卵黄冻存液的冷冻效果。保留精浆后的精子复苏率、顶体完整率分别为 37.57% ± 13.22%、84.64% ± 8.82%; 不保留精浆的精子复苏率、顶体完整率分别为: 21.46% ± 7.25%、75.50% ± 9.62%。结论 无卵黄冻存液可成功保存食蟹猴精子, 为食蟹猴生育力的保护及种质资源保存提供了一种安全可靠的方式。

【关键词】 无卵黄冷冻液; 精子冻存; 食蟹猴

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0070-07

Optimization of cryopreservation of cynomolgus monkey semen with yolk-free solution

CHEN Yan^{1#}, GAO Jiangmei^{2#}, ZHAO Shikun¹, LI Bihai², RAO Junhua^{2*}, YANG Shihua^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangdong Laboratory of Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510260, China. 2. Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510260)

Corresponding author: RAO Junhua. E-mail: junhuar919@163.com; YANG Shihua. E-mail: yangsh@scau.edu.cn

【Abstract】 Objective There is a risk of biological contamination from egg yolk and unidentified components in traditional sperm cryopreservation solution. Therefore, this study aimed to use two commercial yolk-free cryopreservation

【基金项目】 国家自然科学基金 (81941006), 广东省特支计划本土创新创业团队 (2019BT02Y276), 科技部重点研发计划 (2018YFA0801404)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81941006), Guangdong Special Support Program (2019BT02Y276), the National Key R&D Program of China (2018YFA0801404).

【作者简介】 陈衍 (1996—), 男, 硕士, 研究方向: 灵长类辅助生殖技术。Email: 292800880@qq.com;

高江梅 (1985—), 女, 博士, 研究方向: 人类重大疾病灵长类动物模型研究。Email: gaojm@giz.gd.cn。

#共同第一作者

【通信作者】 饶军华 (1968—), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 人类疾病灵长类动物模型研究。Email: junhuar919@163.com;

杨世华 (1972—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 灵长类动物生殖工程与基因修饰疾病动物模型研究。Email: yangsh@scau.edu.cn。

* 共同通信作者

solutions, Origio and Quinn's, to preserve the semen of cynomolgus monkey and to determine the optimal cryopreservation conditions for this species. **Methods** Semen from male monkeys was collected by penile electrical stimulation. The two kinds of cryopreservation solution were used to freeze sperm under conditions of different freezing suspension heights above the surface of liquid nitrogen and different cryopreservation liquid volume ratios. The optimal conditions of cryopreservation solution were determined from sperm viability, recovery and acrosomal integrity rates after cryopreservation, and the effect of seminal plasma on sperm cryopreservation was confirmed using optimal conditions with Quinn's cryopreservation solution. **Results** The optimal conditions for cryopreservation of cynomolgus monkey sperm with Origio and Quinn's solution were suspended at 5 cm above liquid nitrogen, and a volume ratio of semen to cryopreservation solution of 1:0.5. Under these optimal conditions, the recovery rate using Quinn's solution $38.02\% \pm 14.98\%$ was significantly higher than that using Origio solution $15.11\% \pm 14.49\%$. There was no significant difference in acrosomal integrity between the two solutions. Preservation using seminal plasma can improve the freezing effect of yolk-free cryopreservation solution. The recovery and acrosomal integrity rates with seminal plasma were $37.57\% \pm 13.22\%$ and $84.64\% \pm 8.82\%$, respectively, compared with recovery and acrosomal integrity rates without seminal plasma of $21.46\% \pm 7.25\%$ and $75.50\% \pm 9.62\%$, respectively. **Conclusions** Yolk-free cryopreservation solution successfully preserved cynomolgus monkey sperm, and provides a safe and reliable way for conserving the fertility of male cynomolgus monkeys.

【Keywords】 yolk-free cryopreservation solution; sperm cryopreservation; cynomolgus monkey

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

超低温冷冻是一种较为有效的保存方式,被广泛应用于农业、医学等领域的种质资源保存^[1-3]。自 Bunge 等^[4]使用冷冻复苏后的精子获得成功妊娠以来,精子冷冻技术为雄性保留生殖能力做出了巨大贡献。由于精子冷冻保存过程中精子冷冻损伤、冷休克、氧化损伤等原因,冷冻保存的精子复苏率较低^[5-6]。由于鸡卵黄具有抗冷休克和冷冻保护作用,含有卵黄的精子冻存液使用极为广泛,但卵黄可能含有病原体,具有生物安全风险^[7]。Quinn's 和 Origio 两种无卵黄冻存液已被人类精子库和生殖医学中心所采用。前者产自美国 SAGE 公司,主要成分有 10 mg/mL HSA、甘油、庆大霉素和一些无机盐、氨基酸等。后者产自丹麦,其主要成分为 HSA、重组人胰岛素和 10 μ g/mL 的硫酸庆大霉素。这两种无卵黄冻存液,避免了动物性传染病以及不能被定量的标准成分所带来的固有变化^[8]。但是,这两种冻存液是否可用于非人灵长类精子保存仍待证实。

食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 是我国二级重点保护动物,常作为生殖研究和疾病模型研究的实验动物^[9-11]。利用食蟹猴研究并开发有效的精子冷冻方法,可为保存其他濒危或具有重要意义的非人灵长类物种精液提供参考^[12]。例如,本团队成功构建了 Shank3 基因突变的自闭症模型食蟹猴,有效的精子保存方法对于大量制备突变序列相同的突变猴群及疾病模型群至关重要^[10]。

因此,本实验利用两种不同的无卵黄冻存液冷

冻食蟹猴精子并优化关键冷冻步骤。通过精液冷冻后活率、精子复苏率和顶体完整率确定两种无卵黄冻存液的最佳使用条件,并进一步证实精浆对精子冷冻的保护作用,以期保护非人灵长类种质资源提供一种安全有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 只健康成年普通级雄性食蟹猴,体重 (7.57 ± 0.56) kg,购自广州相观生物科技有限公司【SCXK(粤)2018-0043】。以上动物均饲养于广东省科学院动物研究所【SYXK(粤)2018-0187】。本实验所有程序均由广东省科学院动物研究所伦理委员会批准(GIZ20210312)。饲养环境:温度 16 ~ 26 $^{\circ}$ C,湿度 40% ~ 70%,光照周期明暗均为 12 h。实验期间动物定时喂食和自由饮水。

1.1.2 主要试剂与仪器

若无特殊说明,所用试剂均来自 Sigma 公司。Origio 和 Quinn's 无卵黄精子冻存液(SAGE, Coopersurgical)于 4 $^{\circ}$ C 保存。以 Tris-卵黄为基础的精子冷冻稀释液 TTE 被用于对照组,此培养基每 10 mL 包括 Tris-HCl 0.02 g, TES 0.12 g, Glucose 0.2 g, Lactose 0.2 g, Raffinose 0.02 g, Streptomycin 0.0005 g, Penicillin-G 0.000063 g 和卵黄 2 mL^[13]。配制完成后-80 $^{\circ}$ C 保存,使用前,添加 10% 甘油。精子稀释液成分表见表 1。

表 1 精子稀释液

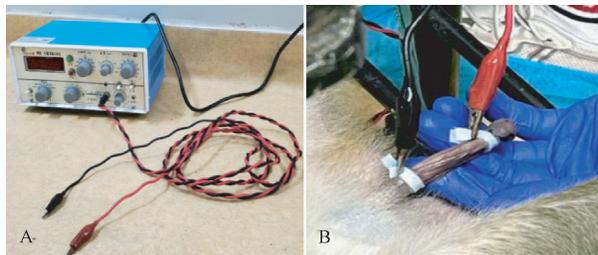
Table 1 Sperm diluent

成分 Component	浓度 Concentration
KCl	0.236 g/L
NaCl	7.422 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.294 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.102 g/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.048 g/L
NaHCO ₃	0.168 g/L
Glucose	0.901 g/L
HEPES (Na salt)	1.302 g/L
HEPES (acid form)	1.192 g/L
Na-Lactate (60% syrup)	1.852 mL
Phenol red	0.010 g/L
PVP	0.100 g/L

1.2 方法

1.2.1 精液收集和处理

本实验对食蟹猴进行阴茎电刺激采集精液(见图 1),在清醒的状态下将食蟹猴保定于猴椅。每只猴至少采集 3 次,每次间隔 3 d 以上,从 6 只猴采集 28 份精液样本。精液样本置于 37℃ 下保存 30 min,使其充分液化。将精子稀释液加入至精液中,直至每毫升精液混合物的精子密度为每毫升 2×10^6 条。3066 rpm 离心 5 min,洗涤 2 次。每次洗涤完成后,去掉上清,并吸取适量精子洗涤液小心重悬。洗涤结束后,进行常规分析及冷冻保存。在冻存前每份样本需取 20 μ L 分别用于精子活率及顶体完整率的检测。



注:A:电刺激仪;B:阴茎电刺激采精。

图 1 精液采集的设备与方法

Note. A. Electro-stimulator. B. Penile electroejaculation.

Figure 1 Equipment and method of semen collection

1.2.2 排精量及精液密度、运动度、畸形率及顶体完整率评估

吸取 1 μ L 新鲜液化精液,加入 99 μ L 等温精子稀释液稀释后滴加到预热的计数板上,加热致死并在光学显微镜下计数 25 个大方格中左上、右上、左下、右下及正中 5 个方格的精子数量,根据公式:精子密度 = 5 个方格精子总数 $\times 5 \times$ 原始精液倍数 $\times 10^4$,计算

出精子密度。另取 10 μ L 洗涤后的精子混合液滴加到预热的血球计数板上,在光学显微镜下计数向前运动和不运动的精子。每次至少计数 200 个,重复 2 次,计算运动精子百分比即为精子运动度^[14]。

另取 10 μ L 洗涤稀释后的精液滴加到载玻片上,滴加 4% 的甲醛溶液固定、风干后,观察精子的头部、颈部及尾部是否有畸形,如弯折、卷曲、带有原生质滴,计数后计算精子畸形率。另外用精子稀释液将精液样品洗涤、离心并稀释到适当浓度后取 20 μ L 滴在载玻片上,滴加 4% 的甲醛固定,风干后滴加 10 μ g/mL 的 Alexa Fluor 488 conjugate 覆盖,在湿盒中 37℃ 避光孵育 30 min。孵育完成后,用 PBS 洗去多余染料,在荧光显微镜下检查,其激发光波长和发射光波长分别为 488 nm 和 530 nm,顶体完整的精子被染成均匀的苹果绿色,而顶体不完整的精子部分着色或不着色。计数顶体完整的精子和顶体不完整的精子,计算顶体完整率。操作步骤参考相关文献报道^[15-16]。

1.2.3 精子冷冻及实验设计

Origio 和 Quinn's 为商品化冻存液,冻存步骤参考产品说明书。Origio:将精子冻存液于室温预温 2 h 后,用精子冻存液与洗涤稀释后的精液按 1:0.5、1:1 和 1:1.5 的比例进行稀释。将混合物在室温下保持 10 min,随后分装至冷冻麦管。在距离液氮表面 0.5、5 和 10 cm 3 个不同高度悬挂冷冻麦管 30 min。最后,将麦管移至液氮中保存。Quinn's:将精子冻存液提前置于室温下,用精子冻存液与精液按 1:0.5、1:1 和 1:1.5 的比例进行稀释后将混合物浸入装有水的烧杯中,置于 4℃ 冰箱缓慢降温 1.5 h,在距离液氮表面 0.5、5 和 10 cm 3 个不同高度悬挂冷冻麦管 30 min,最后投入液氮冷冻保存。TTE:冻存步骤参考文献报道^[17]。用预热至 37℃ 的 TTE 稀释液将样品稀释,并将混合物浸入装有水的烧杯中,置于 4℃ 冰箱缓慢降温 2 h。随后向稀释精液中加入等体积、预冷至 4℃、含有 10% 甘油的 TTE 冷冻液。TTE 冷冻液分 5 次加入,每次加入 1/5,加 1 次间隔 1 min。将稀释精液分装至 4℃ 的冷冻麦管中。在距液氮面上方 5 cm 处冷冻 10 min 后投入液氮保存。

精浆对精子冷冻保存的影响实验设计:将每个个体的精液样本分为 2 等份,3066 rpm 离心 5 min。随后,1 份保留精浆,1 份不保留精浆。按 1.2.3 中所述的 Quinn's 的实验方法,将精液与冻存液 1:1

混合。缓慢降温结束后,将保留精浆组与不保留组每组分别分装 3 管,在距液氮面 5 cm 高度处悬挂 30 min 后放入液氮保存。

1.2.4 冷冻精子复苏及复苏率的计算

将冷冻麦管从液氮取出后,立即放入 37℃ 水浴锅中 1 min,剪断麦管两端收集冷冻精液。经洗涤后,参照文献^[18]公式计算,即复苏率(%)=解冻后运动度/冷冻前运动度×100。

1.3 统计学分析

所有数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,精子活率、复苏率及顶体完整率等百分比数据在分析前均经过平方根的反正弦转换。探讨精浆对精子冻存影响的数据分析采用配对 *t* 检验,其余则经完全随机设计的单因素方差分析 (One way Anova) 及最小显著差法 (LSD) 检验数据间的差异显著性, $P < 0.05$ 则判定为差异显著。以上所有数据的处理均通过 Graphpad prism 6.0 软件完成。

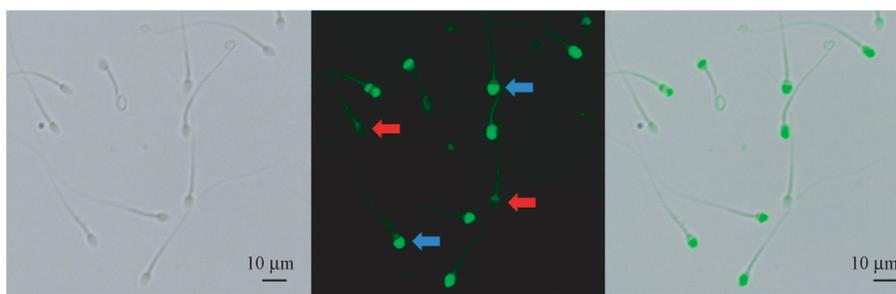
2 结果

2.1 食蟹猴精液基本情况

28 份精液样本被用于本实验。6 只成年食蟹猴精液量 (0.41 ± 0.39) g, 精子密度每毫升 ($4.53 \times 10^9 \pm 4.20 \times 10^9$), 精子活率 ($80.68\% \pm 8.15\%$)、畸形率 ($15.59\% \pm 12.03\%$) 及顶体完整率 ($82.46\% \pm 14.99\%$)。精子顶体染色及评价见图 2。

2.2 液氮面不同悬挂高度对食蟹猴精子冷冻复苏的影响

28 份精液样本被用于本实验,统计结果如表 2 所示。健康猴精液与两种冻存液按照说明书混合平衡后活率未表现出明显差异。当悬挂高度为 5 cm 时,两种冻存液均表现出相对较好的保护效果,并与 0.5、10 cm 高度相比差异显著。而同为 5 cm 的高度下,与 Origio 相比,Quinn's 复苏率较高且差异显著。顶体完整率各组之间无差异。



注:蓝色箭头指向顶体完整的精子;红色箭头指向顶体不完整的精子。

图 2 精子顶体荧光染色及评价

Note. The blue arrow points to the sperm with intact acrosome. The red arrows point to sperm with incomplete acrosome.

Figure 2 Spermatozoal acrosome staining

表 2 两种冻存液在不同悬挂高度下冷冻对精子冷冻复苏的影响

Table 2 Effects of two cryopreservation solutions on sperm cryosurvival at different suspension heights

冻存液 Solution	鲜精活率 (%) Fresh sperm motility (%)	平衡后活率 (%) Post-holding motility (%)	悬挂高度 (cm) Suspension height (cm)	复苏率 (%) Recovery rate (%)	顶体完整率 (%) Acrosomal integrity (%)
Origio	80.10 ± 3.24	64.30 ± 12.78 ^a	0.5	7.02 ± 5.23 ^{cd}	59.16 ± 22.84 ^a
			5.0	21.28 ± 15.72 ^b	58.13 ± 18.33 ^a
			10.0	3.19 ± 2.18 ^d	58.91 ± 26.00 ^a
Quinn's		68.08 ± 11.12 ^a	0.5	16.32 ± 9.29 ^{bc}	57.93 ± 23.23 ^a
			5.0	42.15 ± 21.77 ^a	55.67 ± 17.70 ^a
			10.0	16.35 ± 13.63 ^{bc}	52.52 ± 19.23 ^a

注:每一列数据上标字母不同即为差异显著 ($P < 0.05$)。

Note. Different superscripts within a column indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.3 不同冻存液稀释比对食蟹猴精子冷冻复苏效率的影响

28 份精液样本被用于本实验。使用 TTE 作为有卵黄冻存液的对照组。在使用不同比例的无卵

黄冻存液混合后,冻存液比例越少,平衡后精子活率越高,且稀释比为 1:0.5 时复苏率较高。但与 TTE 相比,冷冻复苏率较低 ($P < 0.05$)。顶体完整率各组之间无差异 (见表 3)。

表 3 3 种冻存液在不同稀释比例下对精子冷冻复苏的影响

Table 3 Effects of 3 cryopreservation solutions on sperm cryosurvival at different dilution ratios

冻存液 Solution	鲜精活率 (%) Fresh sperm motility (%)	稀释比例 (v/v) Dilution ratio (v/v)	平衡后活率 (%) Post-holding motility (%)	复苏率 (%) Recovery rate (%)	顶体完整率 (%) Acrosomal integrity (%)
Origio	80.43 ± 3.33	1:0.5	74.56 ± 12.15 ^a	15.11 ± 14.49 ^d	57.22 ± 23.55 ^b
		1:1	67.92 ± 13.27 ^{abc}	13.58 ± 10.55 ^d	62.87 ± 23.86 ^{ab}
		1:1.5	62.53 ± 16.68 ^c	12.99 ± 11.67 ^d	69.86 ± 24.69 ^a
Quinn's	80.43 ± 3.33	1:0.5	72.78 ± 7.77 ^{ab}	38.02 ± 14.98 ^b	66.50 ± 18.50 ^{ab}
		1:1	66.81 ± 14.52 ^{abc}	30.77 ± 11.91 ^{bc}	69.17 ± 16.46 ^{ab}
		1:1.5	64.42 ± 17.40 ^{bc}	24.66 ± 15.50 ^c	56.29 ± 22.03 ^b
TTE		/	74.53 ± 7.42 ^a	52.41 ± 20.32 ^a	59.75 ± 19.43 ^{ab}

2.4 精浆对冷冻复苏效率的影响

3 份精液样本被用于本实验。设保留和不保留精浆组。使用 Quinn's 冻存液,在液氮面悬挂高度为 5 cm,稀释比为 1:1 的条件下进行精子冻存。在

保留精浆的情况下,除了精子平衡后活率差异不显著外,保留精浆组的复苏率及顶体完整率显著高于不保留精浆组(见表 4)。

表 4 精浆对精子冷冻复苏的影响

Table 4 Effect of seminal plasma on sperm cryosurvival

精浆 Seminal plasma	鲜精活率 (%) Fresh sperm motility (%)	平衡后活率 (%) Post-holding motility (%)	复苏率 (%) Recovery rate (%)	顶体完整率 (%) Acrosomal integrity (%)
保留 With	72.86 ± 6.05	72.03 ± 7.10 ^a	37.57 ± 13.22 ^a	84.64 ± 8.82 ^a
不保留 Without		65.61 ± 5.26 ^a	21.46 ± 7.25 ^b	75.50 ± 9.62 ^b

3 讨论

1949 年甘油作为冷冻保护剂被成功应用于精子冷冻保存,启动了精液冷冻保存的研究和应用^[19]。因卵黄可维持精子膜脂质的稳定性并补充冷冻引起的卵磷脂、胆固醇丢失,故被用于精子的冷冻保存。Origio 和 Quinn's 为不同品牌精子冷冻保护剂,虽不含卵黄,但其他成分,如葡萄糖,甘油等,也能取得较好的精子冷冻效果,被广泛应用于人类精子库及生殖医学中心。抗冻保护剂主要分为渗透型和非渗透型,而冷冻保护液常包含其中一种或几种成分。不同保护液的冷冻效果也具有差异^[20]。例如甘油和乙二醇对猕猴精子保护效果相近,而二甲基亚砜保护效果较差^[21]。含有卵黄成分的 TTE 冻存液有效复苏率波动范围较大,这可能与操作者手法、精子计数经验、食蟹猴精子质量以及不同蛋黄批次有关^[6,17,22]。TTE 冻存液虽被广泛应用于灵长类精子冻存中,但配制要求较高,需使用当天产出的鸡蛋进行卵黄抽取。除此之外,卵黄成分复杂,且存在生物安全风险,这些因素使得这种冻存液的使用和相关研究具有较大局限性^[7]。在本次实验中,共使用 3 种不同的冷冻保护液,并采用液氮蒸汽法进行精子冷冻。其中 TTE 冷冻保护剂包含了渗透型的甘油、非渗透型的棉子糖、葡萄糖等物质^[23],而商品化人用冻存液除了甘油、糖类等

物质外还加入了人血清白蛋白等非渗透型高聚物。此外,Quinn's 冻存液首次被应用于食蟹猴。在参照文献报道及产品说明书操作后,TTE 冻存液冻存效率达到了文献报道水平,但另外两种无卵黄商品化冻存液冻存效果较差。因此,本实验采用了不同稀释比例及不同的降温速率对这两种冻存液冻存步骤进行了改良。结果显示,液氮面上悬挂高度为 5 cm,稀释比例为 1:0.5 时冷冻保护效果最好,且 Quinn's 表现出更好的复苏率。

在冷冻过程中,悬挂高度直接影响着细胞内外渗透压和 pH 的平衡。低高度下的快速降温和高高度下的慢速降温均不适用于食蟹猴的精子冷冻保存,但中高度(5 cm)可有效提高精子的冷冻活率,这可能是由于在距液氮液面较高的高度下,降温过慢导致细胞过度脱水,或者在低高度下冰晶快速形成而造成的细胞死亡。不同的稀释比则决定于精子细胞内脱水速度。实验表明在不同稀释比的条件下,冻存液比例越低,平衡时精子活率相对越高。这可能是随着冻存液用量的减少,降低了冻存液成分如甘油对细胞的毒性作用且降低了细胞渗透压的变化的程度。通过步骤优化发现,最适高度和稀释比均与冻存液说明书不一致。3 种冻存液都是以甘油作冷冻保护剂,食蟹猴最适甘油浓度为 5%,人的最适浓度为 7.5%^[24-25]。2 种商品化无卵黄冻存液甘油浓度为 7.5%,则若采用 1:0.5 的稀释比,最

终甘油浓度更接近食蟹猴最适甘油浓度,但是否还存在更加适合的降温速率及稀释比还需进一步细化分组。与人的精子冻存效果相比,在复苏率上存在较大差异,除了冷冻保护剂最适浓度不同以外,也可能与精子构成有关。据悉,人精子膜的固醇磷脂比例可达 0.88,具有较好的抗冷休克能力,而牛的固醇磷脂比较低,为 0.45,且牛精子冷冻复苏效果也较差^[23]。因此,这种物种差异引起固醇磷脂比也可能是影响冷冻效率的重要因素之一。为探究精浆对精子冷冻保护作用的影响,本实验比较了保留精浆和去除精浆的精子在冷冻前的平衡活率和经冻存后的复苏率及顶体率。结果显示:在保留精浆后,精子平衡后活率、复苏率及顶体完整率都有提升。这表明精浆对精子的冷冻保护存在一定的益处,且与前人研究一致^[22]。在其他动物方面,如猪、羊等保留精浆后冷冻可以增强精子的抗冻能力^[26-27]。其作用原理与卵黄类似,含有的脂质和胆固醇可以结合在精子膜上提供保护^[28]。与鲜精相比,冻精复苏后的顶体率均存在下降。这表明一部分精子在冷冻后会造成一定程度的顶体损伤。此外,也有一部分精子会自发顶体反应,但由于顶体反应级联信号通路涉及分子较多,机制复杂,如 Ca^{2+} 、G 蛋白等作用,导致本实验中不同条件下顶体完整率暂不具备一定规律^[29]。因此,顶体完整率在本实验中可能并不适合被用作评判冻存液效果的有效标准。

本实验仅采用了液氮蒸汽法,改变冷冻方法如定向冷冻、玻璃化冷冻有可能对复苏结果起到一定的改善作用^[30-31]。细胞内液渗透压的变化也与平衡时间的长短有关,时间过长引起细胞过度脱水,时间短细胞内残留水分过多,冷冻时会形成更多大冰晶损伤细胞。而平衡温度决定精子是否能提前适应温度的降低。不足的是,本实验未对平衡时间以及平衡温度进行探讨。最新研究报道,利用高压均质这一技术对卵黄进行处理后,使蛋黄中的微生物失去或钝化生物活性,规避了动物源性的污染风险^[32-33]。这一技术的改良已成功应用于猪精液的冻存但是否能有效应用于非人灵长类暂不清楚^[34]。Wang 等^[16]将抗冻蛋白 III 用于猕猴的精子冻存,发现抗冻蛋白的加入对精子冷冻复苏起一定的积极作用,但合适的蛋白浓度也需进一步被确认^[35]。

4 结论

本实验成功证实了 Origio 和 Quinn's 这两种冻

存液在食蟹猴上的适用性,在优化冷冻步骤后精子复苏后活率显著提升。最佳冻存条件为:冷冻高度距液氮面 5 cm、精液冻存液体积比为 1:0.5。与 Origio 冻存液相比,Quinn's 冻存液具有更好的保护作用。保存精浆可显著提高无卵黄冻存液的冷冻效果。

参 考 文 献(References)

- [1] 罗嘉慧, 卢秋翰, 李国萃, 等. 保存条件对恒河猴 CD8⁺T 细胞活性的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 33-37.
- [2] Luo JH, Lu QH, Li GC, et al. Effect of storage conditions on the activity of CD8⁺ T cells in rhesus monkeys [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 33-37.
- [3] Silva AMD, Pereira AF, Comizzoli P, et al. Cryopreservation and culture of testicular tissues: an essential tool for biodiversity preservation [J]. Biopreserv Biobank, 2020, 18(3): 235-243.
- [4] Bosch E, de Vos M, Humaidan P. The future of cryopreservation in assisted reproductive technologies [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11: 67.
- [5] Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa [J]. Nature, 1953, 172(4382): 767-768.
- [6] Grötter LG, Cattaneo L, Marini PE, et al. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization [J]. Reprod Domest Anim, 2019, 54(4): 655-665.
- [7] Yan Y, Ao L, Wang H, et al. Cryopreservation of cynomolgus macaque (macaca fascicularis) sperm by using a commercial egg-yolkfree freezing medium [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2016, 55(6): 744-748.
- [8] Si W, Wang H, Reid C, et al. Effect of sugar type on the survival of frozen-thawed rhesus monkey (Macaca mulatta) sperm [J]. Am J Primatol, 2006, 68(1): 103-108.
- [9] Tiwari A, Tekcan M, Sati L, et al. A new media without animal component for sperm cryopreservation: motility and various attributes affecting paternal contribution of sperm [J]. J Assist Reprod Genet, 2017, 34(5): 647-657.
- [10] Yang X, Shu L, Cai L, et al. Homozygous missense mutation Arg207Cys in the WEE2 gene causes female infertility and fertilization failure [J]. J Assist Reprod Genet, 2019, 36(5): 965-971.
- [11] Zhou Y, Sharma J, Ke Q, et al. Atypical behaviour and connectivity in SHANK3-mutant macaques [J]. Nature, 2019, 570(7761): 326-331.
- [12] Huang Y, Ding C, Liang P, et al. HBB-deficient Macaca fascicularis monkey presents with human β -thalassemia [J]. Protein Cell, 2019, 10(7): 538-542.
- [13] Zhang X, Meng Y, Houghton P, et al. Ancestry, Plasmodium cynomolgi prevalence and rhesus macaque admixture in cynomolgus macaques (Macaca fascicularis) bred for export in Chinese breeding farms [J]. J Med Primatol, 2017, 46(2): 31

- 41.
- [13] Sankai T, Terao K, Yanagimachi R, et al. Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [J]. *J Reprod Fertil*, 1994, 101(2): 273-278.
- [14] Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, et al. Protective effects of iodixanol during bovine sperm cryopreservation [J]. *Theriogenology*, 2009, 71(9): 1425-1432.
- [15] Chen B, Li S, Yan Y, et al. Cryopreservation of cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) sperm with glycerol and ethylene glycol, and its effect on sperm-specific ion channels-CatSper and Hv1 [J]. *Theriogenology*, 2017, 104: 37-42.
- [16] Wang S, Duan Y, Yan Y, et al. Improvement of sperm cryo-survival of cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) by commercial egg-yolk-free freezing medium with type III antifreeze protein [J]. *Anim Reprod Sci*, 2019, 210: 106177.
- [17] Si W, Zheng P, Li Y, et al. Effect of glycerol and dimethyl sulfoxide on cryopreservation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) sperm [J]. *Am J Primatol*, 2004, 62(4): 301-306.
- [18] Younis AI, Rooks B, Khan S, et al. The effects of antifreeze peptide III (AFP) and insulin transferrin selenium (ITS) on cryopreservation of chimpanzee (*Pan troglodytes*) spermatozoa [J]. *J Androl*, 1998, 19(2): 207-214.
- [19] Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures [J]. *Nature*, 1949, 164(4172): 666.
- [20] 李森, 郁丽丽, 张艺宝, 等. 三种不同冷冻保护剂对小鼠附睾冷冻效果的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(2): 62-65.
- Li M, Yu LL, Zhang YB, et al. Comparison of the effect of three cryoprotectants on vitrification cryopreservation of mouse epididymis [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2014, 22(2): 62-65.
- [21] Li YH, Cai KJ, Kovacs A, et al. Effects of various extenders and permeating cryoprotectants on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa [J]. *J Androl*, 2005, 26(3): 387-395.
- [22] 平述煌. 树鼩和猕猴精子冷冻保存工艺的创建和优化的研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学; 2011.
- Ping SH. Cryopreservation of spermatozoa in Tree Shrews and Rhesus monkeys [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology; 2011.
- [23] Hammadeh ME, Greiner S, Rosenbaum P, et al. Comparison between human sperm preservation medium and TEST-yolk buffer on protecting chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men after freeze-thawing procedure [J]. *J Androl*, 2001, 22(6): 1012-1018.
- [24] Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes [J]. *Cryobiology*, 1992, 29(2): 255-266.
- [25] Yan Y, Ao L, Wang H, et al. Cryopreservation of cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) sperm by using a commercial egg-yolkfree freezing medium [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2016, 55(6): 744-748.
- [26] Colás C, Junquera C, Pérez-Pé R, et al. Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock [J]. *Microsc Res Tech*, 2009, 72(8): 566-572.
- [27] Pursel VG, Johnson LA, Schulman LL. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa [J]. *J Anim Sci*, 1973, 37(2): 528-531.
- [28] Fernández-Juan M, Gallego M, Barrios B, et al. Immunohistochemical localization of sperm-preserving proteins in the ram reproductive tract [J]. *J Androl*, 2006, 27(4): 588-595.
- [29] 任枚琪, 杨瀚云, 史潇. 精子功能的生理机制及研究进展 [J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2020, 39(6): 519-523.
- Ren MQ, Yang HY, Shi X. Research progress in the physiological mechanism of sperm activation [J]. *J Int Reprod Health/Fam Plan*, 2020, 39(6): 519-523.
- [30] 唐丹, 司晨洋, 严亚萍, 等. 低温定向冷冻法冻存食蟹猴精液的研究 [J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(6): 1699-1701.
- Tang D, Si CY, Yan YP, et al. Study on the preservation of frozen sperm of *Macaca fascicularis* by directional freezing technique [J]. *J Anhui Agri Sci*, 2014, 42(6): 1699-1701.
- [31] 郑红, 李波, 杨世华, 等. 滇南小耳猪精液的直接冷冻保存 [J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(6): 61-65.
- Zheng H, Li B, Yang SH, et al. Cryopreservation of sperm with directional freezing method in Yunnan Diannan miniature pig [J]. *Chin J Comp Med*, 2010, 20(6): 61-65.
- [32] Li JH, Wei XY, Wang QH, et al. Homogeneous isolation of nanocellulose from sugarcane bagasse by high pressure homogenization [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90(4): 1609-1613.
- [33] 李杨, 李明达, 张毅方, 等. 低压均质处理对大豆分离蛋白溶解性及结构的影响 [J]. *农业机械学报*, 2019, 50(3): 345-351.
- Li Y, Li MD, Zhang YF, et al. Effect of low pressure homogenization on solubility and structure of soybean protein isolate [J]. *T Chin Soc Agric Mach*, 2019, 50(3): 345-351.
- [34] 汪俊跃, 何孟纤, 张树山, 等. 高压均质 (HPH) 处理鸡蛋卵黄对猪冻精质量的影响 [J]. *中国兽医科学*, 2021, 51(7): 932-938.
- Wang JY, He MX, Zhang SS, et al. Effect of high pressure homogenization (HPH) on quality of boar cryopreservation semen [J]. *Chin Veter Sci*, 2021, 51(7): 932-938.
- [35] Tomás RMF, Bailey TL, Hasan M, et al. Extracellular antifreeze protein significantly enhances the cryopreservation of cell monolayers [J]. *Biomacromolecules*, 2019, 20(10): 3864-3872.