

外源性物质提高精子受精能力研究进展

张明^{①②} 鲜红^③ 朱庆^{①*} 侯蓉^② 郑鸿培^①

(^①四川农业大学动物科技学院胚胎工程实验室 雅安 625014;

^②成都大熊猫繁育基地濒危野生动物繁殖与保护遗传四川省重点实验室 成都 610081;

^③成都市妇产科医院生殖不孕研究所 成都 610015)

摘要:受精是一个复杂的生物学过程,精子必须具备良好的运动功能,同时需经获能和顶体反应才能实现受精。通过添加外源性物质,来改善精子体外存活时间,提高精子的运动能力,尤其是冷冻保存精子解冻后的受精能力,被认为是借助实验手段在体外改善精子功能,从而提高受精率的一个有效途径。可添加的外源性生物活性物质种类很多,通常有咖啡因、氨基多糖类物质、己酮可碱、生殖激素类物质、细胞因子、维生素、抗氧化剂、牛黄酸和一些酶类物质等。本文对精子常用的外源性添加物质的研究进展进行了总结,在此基础上提出了寻找新的外源添加物质的思路和途径。

关键词:受精能力;生物活性物质;冷冻精液;精子

中图分类号:Q492 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2006)04-122-06

Improving Sperm Fertilizing Capacity by Exogenous Substances

ZHANG Ming^{①②} XIAN Hong^③ ZHU Qing^① HOU Rong^② ZHENG Hong-Pei^①

(^① *The Laboratory of Reproductive Biology and Technology, College of Animal Science & Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an Sichuan 625014;*

^② *Key Laboratory of Reproduction and Conservation Genetics of Endangered Wildlife of Sichuan Province, Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding, Chengdu 610081;*

^③ *The Department of Human Reproduction and Sterility, Chengdu Maternity Hospital, Chengdu 610015, China)*

Abstract: Fertilization is a complex biological process. Motile spermatozoa can fertilize only after they undergo capacitation and acrosomal reaction. Exogenous substances are used to extend sperm survival time, increase sperm motility and improve frozen sperm fertilizing capacity, which is an effective method for improving sperm function under lab condition. At present, various exogenous substances such as caffeine, amido amylose, pentoxifylline, reproductive hormones, cytokines, vitamins, antioxidants, taurine and some enzymes are added to improve fertilization rate. This paper summarizes the advance of exogenous substances that improve sperm fertility and put forward some new ideas and approaches for searching new exogenous substances.

Key words: Fertilizing capacity; Bioactivity substance; Frozen semen; Spermatozoa

受精是一个复杂的生物学过程,精子必须具备良好的运动能力,同时需经历获能和顶体反应才能实现受精。随着精液冷冻保存技术的进步,在生产实践和实际研究应用时,除特殊目的的需要,几乎都采用冷冻保存精液,但经冷冻-解冻过程后的精液,其精子活力远不及新鲜精液,其受胎率往往低于自然交配时的受胎率。

因此,如何改善冷冻保存精子的受精能力,来提

基金项目:中国大熊猫繁育研究基金“提高大熊猫冷冻精子受精能力研究”项目资助(No.2003010);

* 通讯作者;

第一作者介绍:张明,讲师,博士研究生;主要从事动物繁殖生物技术相关研究,E-mail:zhm3000@163.com。

收稿日期:2006-02-15,修回日期:2006-05-08

高应用冷冻精子进行的生殖技术的效率具有重要意义。特别对于野生濒危动物的繁殖而言,由于其精液来源有限,冷冻精液极其珍贵,使得提高该类精液的使用效率意义更加重大。

对如何改善冷冻保存精子解冻后的受精能力,人们作了大量相关研究。实验证明,冷冻精液妊娠率低的主要原因是精子运动能力下降,精子体外存活时间短。在人类生殖中,精子体外生存时间用来判断宫腔内人工授精妊娠率具有重要的临床价值^[1]。因此,只要能提高冷冻精子的运动能力,延长其冷冻解冻后的生存时间,就会增加其受精率。研究者在精液中添加一些有利于延缓精子衰老和提高精子活力的成分,来改善精子的运动能力,延长体外存活时间,这是目前借助实验室手段在体外提高精子功能,从而提高受精率的一个有效途径。用来提高精子受精能力的外源性物质主要有咖啡因、氨基多糖类物质、己酮可可碱、生殖激素、血小板活化因子、维生素和其他一些物质等。不同物质的应用效果差异较大。到目前为止,高效低成本物质还没有找到,更深入的研究还在继续。本文描述了应用在提高精子受精能力上较为成功的物质的研究进展,并对今后研究方向提出了一些见解。

1 咖啡因

许多研究报道表明,在体外预处理精子时加入咖啡因能显著提高精子活力和体外受精率,特别是当精子活力较差时,咖啡因的效果尤为显著。咖啡因刺激精子受精能力的机理在于其抑制磷酸二酯酶的活性,引起精子内 cAMP 浓度升高,从而刺激精子活力并有利于顶体反应,促进获能效果^[2],但咖啡因对受精卵的早期胚胎发育不利,故使用咖啡因时应严格控制其浓度和作用时间。文国艺为了避免咖啡因对胚胎的不利影响,将咖啡因加到获能液中,然后通过离心方式去掉咖啡因,达到了既可以增强精子受精能力,又可以避免咖啡因对胚胎不利影响^[3]。

2 氨基多糖类物质

肝素是一种高度硫酸化的氨基多糖类化合物,是一种常用的诱导动物精子体外获能的物质,当它与精子结合后,能引起钙离子进入细胞内部而导致精子获能和顶体反应的发生^[4],进而提高受精率,并促进原核的发育^[2]。

透明质酸(hyaluronic acid)也是一种线性的大分子氨基多糖类物质。透明质酸广泛存在于雌性动物的生殖道,在精子的体内受精过程中可能具有多方面的作用,包括影响精子的运动能力、获能、顶体反应、精卵结合等。在体外处理精子过程中,透明质酸对精子功能也有影响。韩毅冰探讨了透明质酸对新鲜和冷冻解冻猪精子活率、获能、顶体反应及体外受精率的影响,并与咖啡因作了对比。结果表明,透明质酸能够显著增加精子体外培养 180 min 之后的精子活率,并保证精子活率在体外培养 360 min 之后仍维持在体外培养 60 min 的水平,而咖啡因处理组和对照组的精子活率,在培养 180 min 之后即显著下降^[5]。

3 己酮可可碱

在众多用于精子体外处理以增强精子功能的化学物质中,己酮可可碱(pentoxifylline, PF)是目前受到重视的一种精子体外处理剂,属于近年来用于体外刺激精子以增加精子活力实验当中研究较多的甲基黄嘌呤衍生物中的一种,并在体外提高精子活力等功能的应用中表现出比甲基黄嘌呤族内其他物质更有效,加之其对精子的作用时间长,可明显改善质量较差的精液和冷冻解冻精液精子的活力,使得 PF 在提高精子活力、增加精子受精能力的研究中得到越来越多的应用,并表现出较好的效果^[6]。分析 PF 对精子的作用,主要在于能够增加精子的前向运动,并对增加精子的受精能力有益^[6,7]。研究 PF 对人的精子运动和顶体反应的影响时发现,PF 作用不但能刺激精子的运动,而且在一定时间后还能较好的保持这种被刺激的直线运动^[8]。这对人工授精和精子体外处理工作具有

极大的益处。为了进一步证明 PF 对精子受精能力的影响,采用人精子穿透去透明带金黄地鼠卵异种体外受精技术(SPA)检测 PF 对人精子受精能力的影响,结果发现,PF 对精液品质常规检查正常但受精能力低下的精液标本有明显的增强精子受精能力的作用^[9],由此表明,通过 PF 体外刺激精子可以提高不育症患者人工助孕技术的成功率。我们曾在大熊猫冷冻保存精液中分别添加 1 mg/ml、2 mg/ml 的 PF,其中 1 mg/ml 组中精子的存活时间和体外异种穿卵率显著高于未添加组,表明适量的 PF 对提高冷冻保存的大熊猫精子受精能力具有积极意义(尚未公开发表)。

4 生殖激素

精浆中含有 $PGF_{2\alpha}$,子宫颈及输卵管肌肉的收缩能够促进精子和卵子的运动,其收缩受 $PGF_{2\alpha}$ 的调节。精液稀释后, $PGF_{2\alpha}$ 的浓度相应变低,这可能是人工授精受孕率较低的原因之一。已有若干实验指出,人工授精时,在其稀释液中加入 $PGF_{2\alpha}$ 能提高精子的受精力,但我们在大熊猫冷冻精液中分别添加了 50、100 和 200 ng/ml $PGF_{2\alpha}$,结果表明:50 ng/ml 的 $PGF_{2\alpha}$ 对大熊猫冷冻精子体外功能没有较大影响,较高浓度的 $PGF_{2\alpha}$ 则会造成精子活力的损伤和精子顶体反应率降低,导致精子受精能力下降,因此, $PGF_{2\alpha}$ 在实际应用中对量的控制要严格把握(尚未公开发表)。

1989 年,Osman 等证实孕酮可以诱导精子发生顶体反应^[10]。同年,Thomas 发现孕酮是通过使环境中钙离子迅速内流引起精子发生顶体反应的^[11]。随后,许多学者用不同浓度的孕酮处理精子,对其促进精子获能和发生顶体反应的能力做出了不同的评价。适当浓度的孕酮对人精子穿卵能力有显著的促进作用,因而孕酮可用于提高人工授精精子的穿卵能力,并增加人工授精的成功率^[12]。

雌激素对精子的运行起重要作用,精浆中起作用的成分可能有雌激素。公猪的精液中含

有大量雌激素,它刺激子宫内膜合成和释放 $PGF_{2\alpha}$,进而使子宫平滑肌收缩增强,有利于精子运动,提高受精力^[13]。雌激素是否还有其他机制促进精子受精能力或有利于受精过程还需要进一步研究。

5 血小板活化因子

血小板活化因子(platelet-activating factor, PAF)是一种具有广泛生物学活性的乙酰化的甘油磷脂,1972 年由 Benveniste 等发现并命名,其化学结构为 1-O-烷基-2-乙酰基-Sn-甘油-3-磷酸胆碱,(1-O-alkyl-2-acetyl-Sn-glycero-3-phosphocholine)。因其能引起不依赖于 ADP 释放和花生四烯酸代谢的血小板凝集,故称其为血小板活化因子。不同种属的多种细胞在一定条件刺激下均可产生 PAF,而 PAF 作为一种异常活跃的内源性介质参与了多种生理和病理过程^[14]。PAF 作为一种独特的乙酰化的磷脂,自 20 世纪 70 年代早期被发现以来,已被证明与哺乳动物的多种生殖过程有关:其中包括排卵、受精、附植前胚胎的发育、胚胎的附植、妊娠乃至分娩。

1987 年,Kumar 等人发现兔的精子可以产生 PAF,并证实外源性 PAF 可以提高人精子的活力^[15],从而使得人们对 PAF 与雄性生殖的关系产生了浓厚兴趣。此后,人们又相继在多种动物的精子中检测到了 PAF 的存在^[16],并发现 PAF 作为一类乙酰化的甘油磷脂,是精子原生质膜的脂质类成分之一^[17],其含量水平的高低与精子受精能力的高低存在显著相关^[16]。PAF 具有诱发质膜囊泡化的特性,是人精子顶体反应的内源诱导物质,能提高小鼠和兔卵母细胞的体外受精率。同时,人们又对 PAF 在精子活力、顶体反应、获能和受精能力方面的影响作了广泛而深入的研究^[18~21],以期使得 PAF 在提高精子功能、进而提高雄性生殖能力方面发挥有益的作用。2004 年,我们在冷冻保存解冻后的大熊猫精液中分别添加 50、100 ng/ml 的 PAF,实验表明:添加低浓度的 PAF 组(50 ng/ml)比不添加 PAF 的对照组精子活力有所提高,体外穿卵率、顶体反应率也显著高于未添加组,但 100

ng/ml 的 PAF 处理下精子的活力、存活时间、顶体反应率和体外异种穿卵率低于 50 ng/ml 处理,而且用 PAF 处理精液的时间超过 2 h 后即引起精子质量的显著下降(尚未公开发表)。大量结果证实,PAF 可以提高精子的活力,增加低活力精子的运动速度,并且用 PAF 体外预处理精子后再做人工授精或体外受精,也有助于提高人工授精和体外受精技术的效率^[22],但对于 PAF 的浓度和处理时间要求比较严格。

6 维生素

Singh 在冻精的稀释液中加入 25 mmol/L 的抗坏血酸(V_C)后,可以显著提高解冻后精子的活力,由原来的 37.5% 提高到添加后的 46.25%,存活精子数由原来的 58.12% 提高到添加后的 67.58%^[23]。赵晓娥等(1999)在波尔山羊冻精稀释液中添加 V_C 进行精液细管冷冻,解冻后的精子活力由原来的 34% 提高到添加后的 47%^[24]。研究表明 V_C 确能提高冷冻精子的活力。B 族维生素也能提高精子的受精力,用维生素 B_{12} 注射液稀释的精子能长时间保持旺盛的活力和前进速度^[25]。维生素 B_{12} 这一特性可能与其辅酶活性有关。用 0.5 mg 维生素 B_{12} 作奶牛冻精解冻液,母牛总受胎率达 91.9%,比对照组高 11.6%^[26]。添加维生素是一种方便实用的提高精子受精能力的技术措施。

7 抗氧化剂

精子自身、精子的体外处理、雄性生殖道炎症病变^[27]、和心理精神方面的应急^[28],均会导致精液氧自由基(ROS)的增加,男性的先天性不育,一部分就是因为精液中氧化作用和抗氧化作用的平衡系统紊乱导致。近年来,对精液中 ROS 和抗氧化剂研究较多。精浆中少量 ROS 对于人精子的获能和顶体反应^[29]是必须的,但过多的 ROS 可导致精子质膜过氧化^[30]和 DNA 的完整性损伤^[31]。在生产上,通常通过添加抗氧化剂来减少和消除 ROS 对精子的不良

作用。目前,在精液中添加过的具有抗氧化作用的抗氧化剂有:谷胱甘肽还原酶、超氧化物歧化酶(SOD)^[32]、牛磺酸、亚牛磺酸、肾上腺素、乳酸盐、丙酮酸盐^[33]、卵磷脂^[34]、谷胱甘肽(GSH)^[35]、 β -巯基乙醇^[36]、维生素 E^[37]等。2005 年,Funahashi 证明,在猪精液中添加 50 ~ 250 mmol/L 的 β -巯基乙醇,能显著提高其穿卵率^[36]。Nair 证明,在冷冻保存的水牛精子中添加 SOD,精子膜磷脂的过氧化程度降低,精子的活力和活率得到显著改善^[32]。Gadea 在猪冷冻精液的解冻液中添加 GSH,显著地提高了精子的受精能力^[35]。目前在精液中添加维生素 E、GSH 和 SOD 是可靠的抗氧化剂物质。

8 其他相关物质

肌酸磷酸(CP)和肌酸磷酸激酶被认为在精子的能量再生和转移中发挥重要作用。在肌酸磷酸对冷冻复苏后人精子的活率和存活率影响的研究中发现,CP 具有延长精子的活动时间及存活时间的作用,为维持精子在雌性生殖道内的运行能力也具有一定意义,并有可能提高冷冻精子进行人工授精的效率^[38]。亚牛磺酸和肾上腺素是具有广泛生理活性的物质,有人发现,金黄地鼠(*Mesocricetus auratus*)精子在体外培养基中会很快死亡,但加入肾上腺素或亚牛磺酸后情况得到改善,其生存时间显著延长,为精子的体外获能与受精创造了条件。诱导牛精子体外获能时也发现,使用亚牛磺酸后不但能使牛精子的存活时间明显延长,而且极大的提高了牛精子对 IA 处理的耐受能力^[39]。卵泡液中含有多种生物活性物质。研究发现,在冷冻保存猪精液前,用牛卵泡液处理,可明显增加精子解冻后的活力、顶体正常率和精子质膜完整率^[40],但卵泡液能否提高冷冻保存后精子的受精能力还需要进一步的研究。

9 结语

能够提高精子活力并进一步提高其受精能力的物质种类很多。目前,在人工授精技术的应用上,通过添加这些物质,来改善人工授精效

果的应用还较少。主要原因在于大多数研究者认为,人工授精技术已经非常成熟,因此对人工授精技术缺乏进一步的研究;另一方面,通过添加一些物质会使人工授精技术的成本增加。目前,除牛以外,其他常见家畜的冷冻精液人工授精技术的产业化应用并不成功,而且牛冷冻精液应用的效果也有待提高,因此在精液中添加物质来提高精子的受精能力将会是进一步提高人工授精技术效果的有效措施。提高精子活力、存活时间、促进其获能及增强其对卵母细胞的穿透能力是非常复杂的生物学过程,与许多激素、细胞因子有关。研究精子运动及存活能力维持的分子机制,是寻找外源性物质来提高精子受精能力的科学基础,同时应该更加系统地研究不同添加物质对精子受精能力和受精效果的影响,同时要考虑添加后对人工授精技术应用效益的影响;应该进一步研究在精液中添加这些物质对早期胚胎发育、胚胎附植等后续繁殖过程的影响,甚至是否会造成后代遗传结构、生存能力的改变,为这些添加物安全、高效的使用奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Polge C, Salamon S, Wilmut I. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet Record*, 1970, **87**(15): 424 ~ 430.
- [2] 张嘉宝, 董伟. 咖啡因和肝素、钙离子载体对家畜冷冻精子体外获能的协同作用. *中国兽医学报*, 1991, **11**(1): 72 ~ 75.
- [3] 文国艺. 咖啡因预处理解冻精液对牛体外受精的影响. *西南农业学报*, 2000, **13**(2): 95 ~ 98.
- [4] Parrish J J, Susko-Parrish J, Winer M A, *et al.* Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reprod*, 1988, **38**(5): 1171 ~ 1180.
- [5] 韩毅冰, 邹纯霞, 秦鹏春等. 透明质酸对猪精子活率、获能、顶体反应及体外受精穿透率的影响. *中国兽医学报*, 1997, **17**(6): 600 ~ 605.
- [6] Yovich J M, Edirisinghe W R, Cummins J M, *et al.* Influence of pentoxifylline in severe male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 1990, **53**(4): 715 ~ 722.
- [7] Tesarik J, Thebault A, Testart J. Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens. *Human Reproduction*, 1992, **7**(9): 1257 ~ 1263.
- [8] 吴立君, 张君慧, 吴竞酶等. 己酮可可碱对人射出精子运动和顶体反应的影响. *生殖医学杂志*, 1997, **4**(4): 239 ~ 241.
- [9] 岳利民, 何亚平, 张金虎. 磷酸二酯酶抑制剂己酮可可碱对人精子受精力的影响. *华西医科大学学报*, 2000, **31**(4): 473 ~ 474.
- [10] Osman R A, Andria M L, Jones A D, *et al.* Steroid induced exocytosis the human sperm acrosome reaction. *Biochem Res Commun*, 1989, **160**(2): 828 ~ 833.
- [11] Thomas P, Meizel S. Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca^{2+} influx. *Biochemistry J*, 1989, **264**(2): 539 ~ 546.
- [12] 吴无畏, 高晓平. 孕酮对人精子受精能力的影响. *中国男性学杂志*, 1996, **10**(2): 71 ~ 74.
- [13] Claus R, Schams D. Influence of mating and intra-uterine oestradiol infusion on peripheral oxytocin concentration in the sow. *J Endocrinology*, 1990, **126**(3): 361 ~ 365.
- [14] Adam S. Human spermatozoa platelet-activating factor content is related to motility and morphology. *Fertility and Sterility*, 2002, **78**(3): 212 ~ 213.
- [15] Rucher D D, Minhas B S, Kumar R, *et al.* The effects of platelet-activating factor on the motility of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 1989, **52**(4): 655 ~ 663.
- [16] Roudebush W E. Role of platelet-activating factor in reproduction sperm function. *Asian J Androl*, 2001, **3**(2): 81 ~ 86.
- [17] John E P, Shelley H, Charles E. Platelet-activating factor activity in the phospholipids of Bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 1990, **43**: 806 ~ 811.
- [18] Roudebush W E, Fukuda A I, Minhas B S. Enhanced embryo development of rabbit oocytes fertilized in vitro with platelet activating factor (PAF) treated spermatozoa. *J Assisted Reproductive Genetic*, 1993, **10**(1): 91 ~ 94.
- [19] Huo L J, Yang Z M. Effects of platelet activating factor on capacitation and acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 2000, **56**(3): 436 ~ 440.
- [20] Wu C, Stojanov T, Chami O, *et al.* Evidence for the autocrine induction of capacitation of mammalian spermatozoa. *J Biol Chem*, 2001, **276**(29): 26962 ~ 26968.
- [21] Kordan W, Strzerek J. Effect of platelet-activating factor (PAF) on motility parameters and plasmalemma integrity of boar spermatozoa. *Animal Science Papers and Reports*, 2002, **20**(1): 37 ~ 45.
- [22] Wild M D, Roudebush W E. Platelet activating factor improves

- intrauterine insemination outcome. *America J Obstet Gynecol* , 2001 ,**184**(6):1 064 ~ 1 069.
- [23] Singh B ,Chand D. Quality of deep frozen murrh buffalo bull (*Bubalus bubalis*) semen. *Journal of Pairing Food & Home Sciences* ,1997 ,**14**(4) 253 ~ 259.
- [24] 赵晓娥 ,王光亚 ,王希朝. 布尔山羊精液保存条件的研究. *动物医学进展* ,1999 ,**20**(3) 31 ~ 33.
- [25] 周占琴 ,武和平 ,陈小强. 布尔山羊精液保存技术研究. *西北农业学报* ,1998 ,**7**(2):15 ~ 19.
- [26] 马堆喜. 牛冻精不同解冻液的受胎效果. *中国奶牛* , 1998 ,**80**(1) 37.
- [27] Fabio F ,Pasqualotto M D ,Rakesh K , *et al.* Relationship between oxidative stress ,semen characteristics ,and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertility and Sterility* ,2000 ,**73**(3) 459 ~ 464.
- [28] Eskiocak S ,Gozen A S ,Kilic A S , *et al.* Association between mental stress & some antioxidant enzymes of seminal plasma. *Indian J Medicine Research* ,2005 ,**122**(8) 491 ~ 496.
- [29] O 'flaherty C ,De Lamirande E ,Gagnon C. Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Medicine* ,2006 ,**40**(6):1 045 ~ 1 055.
- [30] Williams A C ,Ford W C. Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with spermfunction. *Fertility and Sterility* ,2005 ,**83**(4) 929 ~ 936.
- [31] Benneths L E ,Aitken R J. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol Reproduction and Development* ,2005 ,**71**(1) 77 ~ 87.
- [32] Drevet J R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa :a complex story. *Mol Cell Endocrinology* ,2006 ,**250**(1-2) 70 ~ 79.
- [33] Junichi Fujii ,Yoshihito Iuchi ,Shingo Matsuki , *et al.* Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J Andrology* ,2003 ,**5** 231 ~ 242.
- [34] Ambrosini A ,Zolse G ,Ambrosi S , *et al.* Oleoylethanolamide protects human sperm cells from oxidation stress :studies on cases of idiopathic infertility. *Biology of Reproduction* ,2006 ,**74**(4) 659 ~ 665.
- [35] Gadea J ,Gumbao D ,Matas C , *et al.* Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improve function and the *in vitro* fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *J Andrology* ,2005 ,**26**(6) 749 ~ 756.
- [36] Funahashi H. Effect of beta-mercaptoethanol during *in vitro* fertilization procedures on sperm penetration into porcine oocyte and the early development *in vitro*. *Reproduction* , 2005 ,**130**(6) 889 ~ 898.
- [37] Yenilmez E ,Yildirmis S ,Yulug E , *et al.* Ham 's F-10 medium and Ham 's F-10 medium plus vitamin E have protective effect against oxidative stress in human semen. *Urology* ,2006 ,**67**(2) 384 ~ 387.
- [38] 熊承良 ,董令胎. 肌酸磷酸对冷冻复苏后精子的活率和存活率的影响. *中国男性学杂志* ,1998 ,**12**(3):147 ~ 149.
- [39] Purdy P H ,Graham J K. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation , the acrosome reaction and fertility. *Biol Reprod* ,2004 ,**71**(2) 522 ~ 529.
- [40] Zeng W X ,Isobe Naoki ,Terada Takato. Effects of exposure bovine follicular fluid freezing on cryoresistance of boar spermatozoa. *Anim Sci J* ,2001 ,**72**(4) 291 ~ 298.