

# 不同甘油浓度与平衡时间对食蟹猴精液冷冻效果的影响

卢晟盛<sup>①</sup> 李林<sup>①②</sup> 胡传活<sup>①</sup> 谢莉萍<sup>②</sup> 卢克焕<sup>①\*</sup>

(<sup>①</sup> 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室 广西大学 南宁 530004;

<sup>②</sup> 广西玮美生物科技有限公司 南宁 530021)

**摘要:** 探讨了不同甘油浓度(3%、5%、7%、11%)和不同平衡时间(30、60、90、120 min)对食蟹猴(*Macaca fascicularis*)精液冷冻效果的影响,以建立和优化食蟹猴精液冷冻的程序。参照TTE稀释液成分组成改良型TTE,冷冻前和解冻后均检测精子的活力、畸形率、质膜完整性、顶体完整率。结果显示,平衡时间为30 min时精子的冷冻解冻后活力、复苏率均高于平衡时间90 min和120 min组,差异显著( $P < 0.05$ ),比60 min组稍好;甘油浓度为3%、5%组的精子冷冻解冻后活力及复苏率均高于甘油浓度11%组,差异显著( $P < 0.05$ ),比7%组好;不同甘油浓度各组间以及不同平衡时间各组间畸形率、质膜完整性、顶体完整率差异不显著( $P < 0.05$ )。由此得出如下结论,在食蟹猴精液冷冻中,在改良TTE中加入3%~5%的甘油且平衡30 min可以获得较好效果,精子冻后活率和复苏率达到45%和62%。

**关键词:** 食蟹猴; 精液冷冻; 甘油; 平衡时间

中图分类号: Q492 文献标识码: A 文章编号: 0250 3263(2008)01- 50 06

## Effects of Glycerol Concentration and Equilibration Time on Cryopreservation of Cynomolgus Monkey Spermatozoa

LU Sheng-Sheng<sup>①</sup> LI Lin<sup>①②</sup> HU Chuang Huo<sup>①</sup> XIE Li-Ping<sup>②</sup> LU Ke-Huan<sup>①\*</sup>

(<sup>①</sup> Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bio-Resource Conservation and Utilization, Guangxi University, Nanning 530004;

<sup>②</sup> Guangxi Weimei Bio-tech Co. Ltd., Nanning 530021, China)

**Abstract:** In order to optimize the protocols for Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) sperm cryopreservation, the effects of glycerol concentration [3%, 5%, 7% and 11% (v/v)] and equilibration time (10, 30, 60 and 90 min) on cryopreservation of spermatozoa of Cynomolgus Monkey were studied. A modified TTE (mTTE) dilution solution was used and the sperm motility, morphology, membrane integrity and acrosome integrity were examined before freezing and post thawing. When 30 min equilibration was applied, the post thawing motility and recovery rates was significantly higher than those when 90 min or 120 min equilibration ( $P < 0.05$ ). The effect of 30 min equilibration was also better than that of 60 min equilibration. The post thawing motility and recovery rate of spermatozoa was significantly higher ( $P < 0.05$ ) for 3% and 5% glycerol groups than those for 11% glycerol group, and the effect of 3% and 5% glycerol was also better than 7% glycerol. The different glycerol concentrations and equilibration time showed similar effects on the membrane integrity, acrosomal integrity and malformation rate ( $P < 0.05$ ). The results

基金项目 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科能0637008 6A);

\* 通讯作者, E-mail: khlu@gxu.edu.cn;

第一作者介绍 卢晟盛,男,博士,副研究员;研究方向:动物繁殖生物学; E-mail: sslu@gxu.edu.cn.

收稿日期: 2007-06-17, 修回日期: 2007-11-30

suggest that addition of 3% or 5% glycerol and 30 min equilibration are beneficial for freezing *Cynomolgus* Monkey spermatozoa.

**Key words:** *Macaca fascicularis*; Semen cryopreservation; Glycerol; Equilibration time

恒河猴(*Macaca mulatta*)是目前生物学和医学研究中使用最为广泛的实验动物之一。猕猴属的食蟹猴(*M. fascicularis*),属于《濒危野生动植物物种国际贸易公约》(2003年修订版)的二级保护动物,主要分布于泰国、越南、马来西亚、苏门答腊、爪哇、帝汶、婆罗洲、菲律宾、缅甸等地的海河沿岸热带雨林中<sup>[1]</sup>。在中国仅有几个养殖食蟹猴基地。食蟹猴,由于比恒河猴人工饲养简单,性情温顺,体形相对较小,生长周期快,可大大降低实验用猴的成本,有可能取代恒河猴成为最常用的实验猴。目前,大多数食蟹猴养殖基地都进行食蟹猴的自然繁殖,为充分发挥优良雄性食蟹猴的繁殖效率,也为保存优良食蟹猴的遗传基因,本研究组进行了食蟹猴精液冷冻保存研究,同时为其他珍稀濒危灵长类动物精子冷冻保存研究提供经验借鉴。

自1949年甘油的冷冻保护作用被发现以来,许多哺乳动物的精液已被成功地冷冻保存。国内灵长类动物精子成功冷冻保存的报道不多,有关食蟹猴精液冷冻的文献国内报道也不多<sup>[2-6]</sup>,因此,建立和优化一个系统的食蟹猴精液冷冻程序十分必要。影响精液冷冻效果的因素很多,包括鲜精质量、冷冻保护剂、冷冻程序、平衡时间、操作等,本实验探讨了不同的甘油浓度和平衡时间对食蟹猴精液冷冻效果的影响,以建立和优化食蟹猴精液冷冻程序。

## 1 材料与方法

**1.1 主要器材** 采精电刺激发生器(YLS-9A生理药理刺激仪,淮北正华生物仪器设备有限公司)、阴茎电极器(自制)、精子图像辅助分析仪(CEROS SPERM ANALYZER, Hamilton Thorne Research, USA)、Fiske 210微型渗透压仪(USA)、PH测试仪[Delta Mettler 320-Toledo instruments (Shanghai) Ltd]、程序降温仪(FREEZE CONTROL CL-8000, Made in Australia by Cryologic)等。

**1.2 主要药品** 葡萄糖、蔗糖、甘油(均来自中国国药上海化学试剂有限公司)、乳糖(天津市大茂化学试剂厂)、Tris (Genebase GeneTech Co. Ltd)、Tes (SIGMA)、卵黄等。

**1.3 精液采集** 精液采自5~8只成年健康雄性食蟹猴。用YLS-9A生理药理刺激仪进行阴茎电刺激法采精,仪器采精参数参照文献<sup>[7,8]</sup>并进行改进,参数为正弦单波断续输出,波宽10 ms,间断20 ms,电压20 V,频率30 Hz。将所得精液收集在50 ml的离心管中,用不含甘油的稀释液作20倍的稀释,放置37℃保温瓶中1 h内送到实验室进行精液常规检查。

**1.4 防冻液的配制** 稀释液参照TTE<sup>[2,3]</sup>,并用蔗糖取代棉籽糖而组成改良型TTE(Tes 1.2 g/100 ml, Tris 0.2 g/100 ml, 葡萄糖 2 g/100 ml, 乳糖 2 g/100 ml, 蔗糖 0.2 g/100 ml, 卵黄 20 ml/100 ml)。将称量好的药品与新鲜卵黄溶于Milli-Q水中混匀,于3 000 r/min离心30 min去除卵黄颗粒。上清液用1 mmol/L NaOH或HCl调节pH至7.0~7.2。精液稀释液在冷冻前一天配制并置于4℃冰箱中保存,冷冻前以一次稀释法按比例加入不同浓度甘油。所需器械均经高温鼓风干燥箱或蒸汽消毒柜严格消毒灭菌。

**1.5 精子冷冻保存与解冻复苏** 稀释后的新鲜精液经过精子图像分析仪分析,检出精子活力 $\geq 70\%$ 的新鲜精液用于本研究。合格的新鲜精液用0.25 ml麦管分装后放入4℃冰箱中平衡不同时间。用程序降温仪降温,参照许观照等<sup>[9]</sup>的降温程序并进行改进,具体如下:4~2℃, -1℃/min; 2~2℃, 5 min; 2~-90℃, -8℃/min。结束后马上投入液氮中(-196℃)贮存。解冻时将麦管从液氮中迅速取出,直接投入37℃水浴中迅速搅动使精子解冻复苏。

**1.6 精子功能的检测**

**1.6.1 精子运动度的检测** 新鲜精液稀释后

以及解冻复苏后, 取 5  $\mu$ l 精液置于 37  $^{\circ}$ C 预热的 Makler 精子计数板上, 利用精子图像分析仪 (CASA) 检查精子的活力, 重复检查 2 次, 结果取平均值。

**1.6.2 精子质膜完整性的检测** 精子质膜完整性的检测参照查树伟等<sup>[10]</sup>伊红 Y 水实验法: 10  $\mu$ l 精液与 40  $\mu$ l 1 g/L 伊红 Y 水溶液于载玻片上混匀, 覆以盖玻片, 静置 1~ 2 min, 显微镜下 ( $\times$  400) 观察精子肿胀弯曲情况, 计数 200 个精子, 算出肿胀弯曲率。计算公式: 肿胀弯曲率 (%) = ( 弯曲肿胀精子数/ 总精子)  $\times$  100%。

**1.6.3 精子顶体完整率检查** 参照江一平等<sup>[11]</sup>报道的方法, 用考马斯亮蓝 R250 染色液对精子进行染色。精子悬液离心(1 500 r/min 5 min), 沉淀以 4% 甲醛 PBS 溶液悬浮固定 10 min, 离心去上清, PBS 洗涤 2 次; 适量 PBS 悬浮沉淀, 吸取 20  $\mu$ l 精子悬液涂片、晾干 (或电吹风吹干), 精子涂片用 0.05% 考马斯亮蓝 (CBB) 染色液滴玻片或入染色缸中浸染 30 min, 三蒸水冲洗玻片, 晾干, 中性树脂封片。将制备好的涂片在显微镜(1 000 倍油镜)下观察。每份样品制作 2 个涂片, 每个涂片观察 200 个以上的精子(分左、右二个区), 取 2 片的平均值, 2 片的变异系数不得大于 20%, 若超过应重新制片。

**1.6.4 畸形精子检查** 畸形率是指异常精子的百分率, 固定及染色方法同(1.6.3)。精子畸形率 (%) = ( 畸形精子数/ 精子总数)  $\times$  100%。

其中畸形精子种类有: 巨型精子、短小精子、双头或双尾精子、精子头部残缺或与尾部分离、尾部变曲等。

**1.7 实验设计** 实验一: 在改良 TTE 中加入 5% 甘油, 冷冻前平衡不同时间(30、60、90、120 min)。实验二: 根据实验一的结果, 在改良 TTE 中加入不同浓度(3%、5%、7%、11%) 甘油, 冷冻前平衡 30 min。

**1.8 统计分析** 所得数据进行反正弦转换, 利用 SAS 6.12 版的一般线性模型 Duncan's 多重比较进行分析。

## 2 结果与分析

**2.1 不同平衡时间对食蟹猴精液冷冻效果的影响** 实验重复 10 次, 结果见表 1, 可以看出, 平衡时间为 30 min 组的精子解冻后活力(42.10%  $\pm$  8.46%) 明显高于 90 min、120 min 组(30.60%  $\pm$  14.07%、27.89%  $\pm$  8.39%), 差异显著 ( $P < 0.05$ )。平衡 30 min 的精子复苏率(57.97%  $\pm$  9.96%) 也显著高于 ( $P < 0.05$ ) 90 min、120 min 组的精子复苏率(42.13%  $\pm$  18.84%、38.54%  $\pm$  13.65%)。平衡 30 min 组的精子解冻后活力、复苏率均比平衡 60 min 组的(33.60%  $\pm$  11.04%、36.35%  $\pm$  14.39%) 好。各平衡时间组精子的膜完整率(图 1: A、B)、顶体完整率(图 1: C)、畸形率(图 1: D) 差异不显著。结果显示, 食蟹猴精液平衡 30 min 后进行冷冻, 冻后效果最好。

表 1 不同平衡时间对食蟹猴精液冷冻效果的影响

Table 1 Effects of different equilibration time on cryopreservation of *Cynomolgus* Monkey spermatozoa

平衡时间(min)	冻后活力 (%)	复苏率 (%)	畸形率 (%)	顶体完整率 (%)	膜完整率 (%)
Equilibration time	Post thawing motility	Recovery rate	Malformation rate	Integral acrosomal rate	Integral membrane rate
30	42.10 $\pm$ 8.46 <sup>a</sup>	57.97 $\pm$ 9.96 <sup>a</sup>	47.81 $\pm$ 12.83 <sup>a</sup>	57.68 $\pm$ 10.07 <sup>a</sup>	43.91 $\pm$ 17.62 <sup>a</sup>
60	33.60 $\pm$ 11.04 <sup>ab</sup>	46.35 $\pm$ 14.39 <sup>ab</sup>	44.64 $\pm$ 13.68 <sup>a</sup>	52.38 $\pm$ 8.71 <sup>a</sup>	44.41 $\pm$ 14.37 <sup>a</sup>
90	30.60 $\pm$ 14.07 <sup>b</sup>	42.13 $\pm$ 18.84 <sup>b</sup>	51.09 $\pm$ 14.94 <sup>a</sup>	50.57 $\pm$ 8.28 <sup>a</sup>	37.64 $\pm$ 13.94 <sup>a</sup>
120	27.89 $\pm$ 8.39 <sup>b</sup>	38.54 $\pm$ 11.06 <sup>b</sup>	47.37 $\pm$ 13.30 <sup>a</sup>	54.76 $\pm$ 13.56 <sup>a</sup>	38.22 $\pm$ 16.24 <sup>a</sup>

同一列数据上标不同字母表示差异显著 (a, b:  $P < 0.05$ )。

Values with different superscripts within columns differ significantly (a, b:  $P < 0.05$ ).

**2.2 不同甘油浓度对食蟹猴精液冷冻效果的影响** 实验重复 10 次, 结果如表 2 所示, 甘油

浓度为 3%、5% 时, 解冻后精子活力(45.47%  $\pm$  15.47%、45.97%  $\pm$  10.54%) 显著高于 11% 组

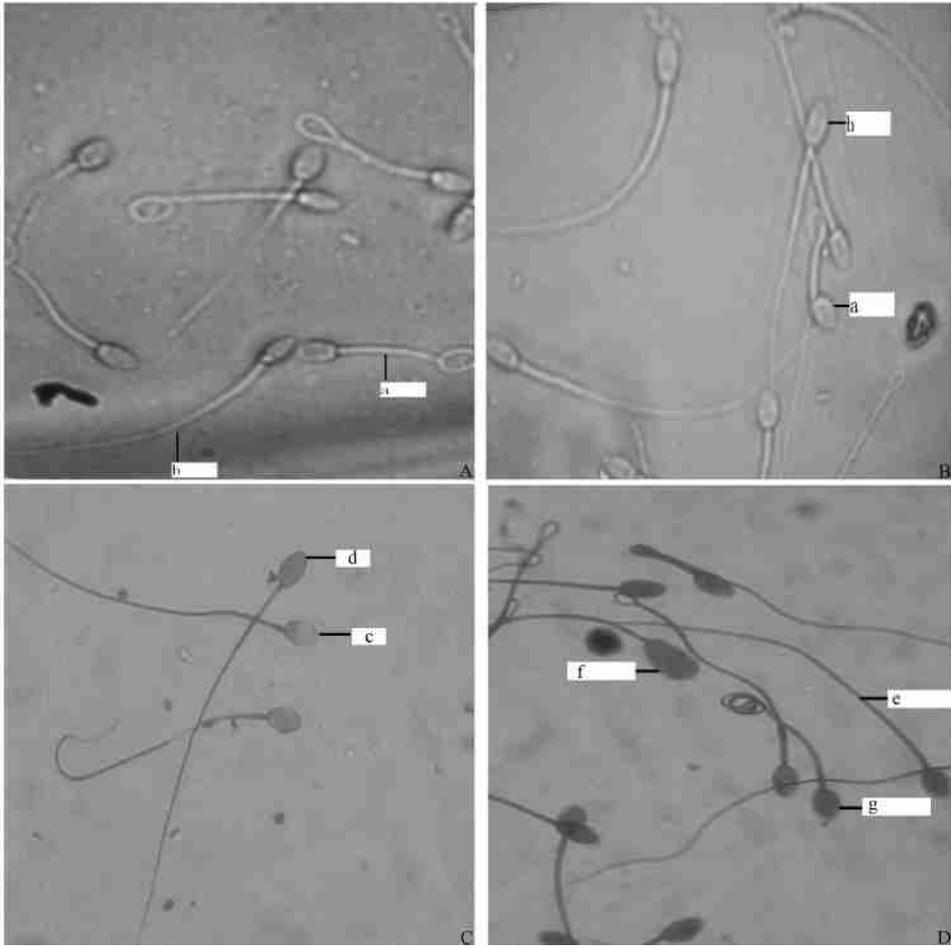


图 1 平衡时间对食蟹猴精液冷冻效果的影响

**Fig. 1 Effects of equilibration time on cryopreservation of Cynomolgus Monkey spermatozoa**

A. 平衡时间 30 min 组的精子解冻后膜完整率; B. 平衡时间 120 min 组的精子解冻后膜完整率;  
C. 顶体完整率检查; D. 精子畸形率的检测。(× 1 000)

a. 膜完整; b. 膜不完整; c. 顶体脱落; d. 顶体完整; e. 正常精子; f. 巨型精子; g. 尾部弯曲。

A. Integral membrane rate of post thawing spermatozoa in the group equilibrated for 30 min; B. Integral membrane rate of post thawing spermatozoa in the group equilibrated for 120 min; C. Test for the integrity of sperm acrosome; D. Test for the malformation rate of spermatozoa. (× 1 000)

a. Membrane integrity; b. Membrane disintegrated; c. Acrosomal desquamate; d. Acrosomal integrity; e. Normal sperm; f. Tremendous sperm; g. Bent tail sperm.

表 2 不同甘油浓度对食蟹猴精液冷冻效果的影响

**Table 2 Effects of different glycerol concentrations on cryopreservation of Cynomolgus Monkey spermatozoa**

甘油浓度(%)	冻后活力(%)	复苏率(%)	畸形率(%)	顶体完整率(%)	膜完整率(%)
Glycerol concentrations	Post thawing motility	Recovery rate	Malformation rate	Integral acrosomal rate	Integral membrane rate
3	45.47 ± 15.47 <sup>a</sup>	61.91 ± 20.15 <sup>a</sup>	48.27 ± 9.16 <sup>a</sup>	45.02 ± 13.68 <sup>a</sup>	46.35 ± 7.34 <sup>a</sup>
5	45.97 ± 10.54 <sup>a</sup>	62.50 ± 13.93 <sup>a</sup>	53.17 ± 11.02 <sup>a</sup>	49.22 ± 15.60 <sup>a</sup>	45.78 ± 4.77 <sup>a</sup>
7	41.13 ± 13.82 <sup>ab</sup>	56.14 ± 18.70 <sup>ab</sup>	49.77 ± 18.14 <sup>a</sup>	35.31 ± 23.06 <sup>a</sup>	45.47 ± 8.33 <sup>a</sup>
11	31.40 ± 16.58 <sup>b</sup>	42.53 ± 22.39 <sup>b</sup>	58.83 ± 14.05 <sup>a</sup>	41.52 ± 18.57 <sup>a</sup>	39.33 ± 13.24 <sup>a</sup>

同一列数据上标不同字母表示差异显著 (a, b:  $P < 0.05$ )。

Values with different superscripts within columns differ significantly (a, b:  $P < 0.05$ ).

(31.40% ± 16.58%), 差异显著 ( $P < 0.05$ )。甘油浓度为 3%、5% 时的精子复苏率 (61.91% ± 20.15%、62.50% ± 13.93%) 也显著高于 ( $P < 0.05$ ) 11% 组的精子复苏率 (42.53% ± 22.39%)。3%、5% 组的精子冷冻后活力、复苏率均比 7% 组的 (41.13% ± 13.82%、56.14% ± 18.70%) 要好, 但差异并不显著 ( $P > 0.05$ )。各甘油浓度组间的畸形率、顶体完整率、精子膜完整率差异不显著, 实验结果显示, 甘油浓度为 3%、5% 时对食蟹猴精液冷冻效果最好。

### 3 讨论与结论

自 1949 年甘油的冷冻保护作用被发现以来, 各种家畜精液的冷冻保护剂中多数加入了甘油。甘油具有膜渗透性, 精液加入甘油后, 能很快进入精子, 使其脱水, 减少或防止精子内冰晶形成, 减低细胞内外溶液电解质, 从而减轻对细胞的损伤。龙翔等<sup>[12]</sup>探讨了不同冷冻保护剂对猪 (*Sus scrofa domestica*) 精液冷冻保存的作用, 发现含有甘油的冷冻保护剂对精子有一定的毒副作用, 但精子解冻后也取得了较好的活率。Li 等<sup>[5]</sup>报道, 改良 TTE 中添加 5% 甘油浓度、平衡时间为 30 min 时食蟹猴精子解冻后活力达 43%, 与本实验结果 (46%) 差异不大, 但其甘油浓度为 3% 时, 精子解冻后活力 (34%) 与本实验 3% 甘油浓度结果 (45%) 有明显差别, 这可能是由于实验所用器材、降温程序不同或者稀释液中有无卵黄的原因造成。另外, 本研究结果与 Li 等<sup>[5]</sup>相同的是, 复苏后精子的活力比新鲜精子活力均有下降, 特别是随着甘油的浓度升高或平衡时间延长活力下降越明显, 变化幅度越大。可见甘油加入的量以及甘油作用时间对精子有一定的影响。

对于精液冷冻前要进行平衡预冷, 目的是使精子有一段适应低温的过程, 同时使甘油充分渗透进精子体内, 达到抗冻保护作用。虽然目前各种家畜精液的冷冻稀释液的成分不相同, 但加入一定浓度的甘油和经过一段时间的平衡后, 都取得了一定的效果。Almlid 等<sup>[13]</sup>报道在加入了甘油的稀释剂中, 平衡时间从 0.5

min 到 75 min 对猪精子冻后活率没有明显的影响。本实验结果表明, 甘油浓度以及甘油作用时间对食蟹猴精子冷冻效果影响很大, 当甘油浓度为 3% ~ 5% 时, 在 4℃ 冰箱中平衡时间为 30 min 时精子冻后效果比其他各组都好。本研究的结果与 Almlid 等<sup>[13]</sup>的差异, 可能是物种或冷冻方法不同造成。

不少学者在研究精液冷冻时都探讨冷冻对精子超微结构的影响, 例如, 在张巧玉等<sup>[14]</sup>的研究中, 人精子冷冻后超微结构明显受损, 表现为精子质膜破裂、部分缺失或完全缺失, 顶体肿胀、外膜破裂、内容物流失, 甚至顶体内膜缺失, 核膜破损, 形成裸核, 精子尾部中段质膜与线粒体明显分离, 线粒体基质透明度增加、嵴间增宽, 严重者线粒体外形变圆, 呈圆盘状改变; 李喜龙等<sup>[3]</sup>也探讨了不同防冻液对猕猴精子冷冻后超微结构的影响。本研究未对食蟹猴精子冷冻后的超微结构进行进一步研究。

本实验所用的采精仪器 (YLS-9A 生理药理刺激仪), 在非麻醉动物状态下成功地采集到精液, 所得精液质量与黎宗强<sup>[8]</sup>报道所采集到的食蟹猴精液质量差异不大, 但本实验所用采精电压低于 30 V, 采出率高, 电压低, 比较安全, 从而避免了因为过高电压所造成的阴茎灼伤, 为实验所需的优质精液提供保障。

我们的结论是, 在食蟹猴精液冷冻中, 在改良 TTE 中加入 3% ~ 5% 的甘油、平衡 30 min 可以获得较好效果, 精子冻后活率和复苏率达到 45% 和 62%。

### 参 考 文 献

- [1] 陈乾生, 欧阳子焯. 食蟹猴. 北京实验动物科学与管理, 1994, 11(1): 63~68.
- [2] 李喜龙, 司维, 季维智. 一种适合于熊猴、猕猴和食蟹猴精子的低温防冻液. 发育与生殖生物学报, 2001, 10(10): 100.
- [3] 李喜龙, 司维, 王红等. 糖在猕猴精子低温冷冻保存过程中的作用. 动物学研究, 2002, 23(1): 205~209.
- [4] Li Y H, Si W, Zhang X Z, et al. Effect of Amino Acids on cryopreservation of Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Sperm. *American Journal of Primatology*, 2003, 59: 159~165.

- [ 5 ] Li Y H, Cai K J, Su L, *et al.* Cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa in a chemically defined extender. *Asian Journal of Andrology*, 2005, 7(2): 139~ 144.
- [ 6 ] Li Y H, Cai K J, Kovacs A, *et al.* Effects of various extenders and permeating cryoprotectants on Cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 2005, 3(26): 387~ 395.
- [ 7 ] 杨上川, 季维智, 陈建春等. 一种改进的阴茎电刺激采精法和藏酋猴及熊猴的采精及其精液特征的初步研究. *动物学研究*, 1994, 15(1): 77~ 83.
- [ 8 ] 黎宗强, 卢克焕, 谢莉萍等. 食蟹猴阴茎电刺激采精及精液特征的初步研究. *广西农业生物科学*, 2004, 23(3): 217~ 221.
- [ 9 ] 许观照, 王磊光, 于小洁等. 三种人类精液冷冻程序的比较性研究. *生殖医学杂志*, 2005, 14(6): 365~ 366.
- [ 10 ] 查树伟, 张建伟, 王信心. 伊红 Y 水实验法检测精子膜功能. *中华医学检验杂志*, 1995, (3): 174~ 176.
- [ 11 ] 江一平, 卓丹心, 陈勇等. 考马斯亮蓝染色法检测人精子顶体反应的评价. *解剖学报*, 1998, 29(3): 332~ 336.
- [ 12 ] 龙翔, 邵秀林. 不同冷冻保护剂在猪精液冷冻中的作用分析. *畜牧业*, 1999, (9): 18~ 19.
- [ 13 ] 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. *Journal of Animal Science*, 1988, 66(11): 2 899~ 2 905.
- [ 14 ] 张巧玉, 常青, 史常旭等. 不同冷冻保护剂对人精子染色体及超微结构影响的研究. *重庆医学*, 2002, 31(7): 550~ 552.