

# 牛精液中中药复方稀释液配方筛选研究

张莺莺, 咎林森\*, 耿繁军, 魏金销, 杜道全

(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, 河南郑州 450046)

**摘要** 在种公牛精液商业稀释液的基础上, 按6%、12%、24%和48%的4个水平向稀释液中分别添加4种中药复方提取液, 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、质膜完整性3个指标, 以确定较优的中药稀释液配方。结果表明: 添加了中药复方提取液的稀释液能更有效的冷冻保存牛精子细胞。其中, 复方一和复方二的冷冻效果最佳。复方一在添加量为12%时精子活率、顶体完整率及质膜完整率分别为41.50%、40.14%和38.16% ( $P < 0.05$ ), 分别比对照组提高了10.67%、3.92%和5.50%; 复方二在添加量为6%时, 精子活率、顶体完整率、质膜完整率3项指标分别达到41.33%、41.59%和40.00% ( $P < 0.05$ ), 分别比对照组提高了10.50%、5.37%和7.34%。

**关键词** 牛精液; 中药复方稀释液; 活率; 顶体完整率; 质膜完整率

中图分类号 S813 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)10-02916-02

## Studies on Screening Compound Diluent Prescriptions with Traditional Chinese Medicine for Bull Semen

ZHANG Yingying et al (College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract** 4 prescriptions of compound extraction liquid of traditional Chinese medicine were added into bull commercial sperm diluents with 4 kinds of concentrations of 6%, 12%, 24% and 48% (V/V) resp. Samples were frozen in 0.25 ml tubes. The frozen tubes were thawed by immersing the tubes in a water bath at 40℃ for 10 s. Sperm motility, top integrity and membrane integrity were analyzed and compared. Results indicate that the diluents adding compound extraction liquid of traditional Chinese medicine could offer good cryopreservation effect for bull semen. Compared with control group, the quality of the frozen-thawed bull semen of the first prescription and the second prescription was the best. When first prescription was with 12% diluents, sperm motility, top integrity and membrane integrity were 41.50%, 40.14% and 38.16% ( $P < 0.05$ ) resp., being 10.67%, 3.92% and 5.50% higher than that of CK. When the second prescription was with 6% diluents, the above 3 indexes were 41.33%, 41.59% and 40.00% ( $P < 0.05$ ) resp., being 10.5%, 5.37% and 7.34% higher than CK.

**Key words** Bull semen; Compound diluents of traditional Chinese medicine; Motility rate; Top integrity; Membrane integrity

近年来, 受中医理论在人类生殖健康上应用的启发, 动物精液中中药稀释液应运而生。中药对精液品质的显著改善和提高作用, 使人们找到了一条开发新型冷冻保护剂的有效途径。研究表明, 中药提取液在冷冻和解冻过程中能有效保护精子, 提高冻后精子的质量和受精能力<sup>[1-3]</sup>。作为一种正在开发的新型冷冻保护剂, 中药冷冻稀释液在牛冷冻稀释液上的应用研究主要局限在解冻液和颗粒冻精方面, 而在牛细管冻精生产上的应用研究很少。笔者通过比较不同中药复方提取液的添加效果, 探索适于在牛细管冻精生产上应用的中药复方稀释液。

## 1 材料与方

**1.1 试验仪器与试剂** 试验仪器主要有旋转蒸发器、低温冷却循环泵、循环水式多用真空泵、离心机、生物光学显微镜、电热恒温培养箱、电子分析天平、细管一体机、磁力搅拌器等; 主要试剂有Tis、果糖、葡萄糖、柠檬酸、二水柠檬酸钠、青霉素、链霉素、甘油、姬姆萨染色剂、磷酸盐缓冲液、福尔马林磷酸盐固定液等。

**1.2 试验设计** 设4个配方: 复方一, 淫羊藿、巴戟天、菟丝子、黄芪、甘草; 复方二, 淫羊藿、益母草、鸡冠花; 复方三, 淫羊藿、菟丝子、黄精、山萸肉、甘草; 复方四, 淫羊藿、巴戟天、菟丝子、鱼腥草、甘草。复方四为胡建宏等<sup>[3]</sup>所筛选的中药专利配方。所有中药均购自河南省郑州市健康人大药房。

**1.3 复方中药液的制备** 准确称量各复方中药后, 用10倍量冷水浸泡1h左右移至不锈钢锅中, 在可控温电炉上煎煮, 先用武火煮沸后, 改用文火慢煎40 min至1h。滤出一煎液

后, 加6倍量冷水再煎煮30 min。然后将两煎药汁合并装于旋转蒸发瓶中, 75℃浓缩15 min。离心过滤后置冰箱中待用。

**1.4 稀释液及溶液的配制** TCG对照配方为每100 ml溶液中含Tis 2.42 g、柠檬酸 1.34 g、葡萄糖 1 g、青链霉素 20万IU、卵黄 20 ml、甘油 12.8 ml。在TCG的基础上, 按6%、12%、24%和48% (V/V) 4个水平在稀释液液中分别添加4种中药提取液, 比较不同配方、不同添加水平的中药提取液对牛冻精质量的影响。

**1.5 试验动物和精液的采集** 试验所用精液采自河南省纯种肉牛繁育中心种公牛站中的2~7岁、体质健壮、繁殖性能良好的4头夏洛来种公牛。采用假阴道法采精, 采精频率为每周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。

**1.6 精液的稀释冷冻和解冻** 采用2次稀释法。调整精子密度为 $1.2 \times 10^8$ 个精子/ml, 0~5 min平衡2~4 h, 装管(0.25 ml), 冷冻后投入液氮保存。解冻方法: 40℃温水中水浴10 s。

## 1.7 精液品质的检测

**1.7.1 精子活率的直观检测。** 经解冻后的精液, 于室温25℃以上的实验室, 在显微镜下观测精子活率。

**1.7.2 精子顶体完整率检测。** 解冻后, 取1滴细管中间的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, 水洗干燥后, 于显微镜下观察300个精子, 统计顶体完整精子数。

**1.7.3 精子质膜完整率检测。** 细管解冻后, 用精子低渗液(37℃)调整精子密度至 $2 \times 10^6$ 个精子/ml, 孵育30~60 min, 混匀, 取1滴约10 μl于载玻片上, 于400×显微镜下观察, 计算弯尾精子百分率。每次至少计算200个精子。

基金项目 陕西省重大科技专项计划(2006KZ07-G1)资助。

作者简介 张莺莺(1978-), 女, 河南信阳人, 硕士研究生, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。\* 通讯作者。

收稿日期 2006-12-31

**1.8 数据统计分析** 采用SPSS11.5 软件对数据进行方差分析和LSD 多重比较分析,结果以平均数和标准误表示。

## 2 结果与分析

**2.1 不同复方中药提取液对牛精子活率的影响** 表1 表明,添加12% 复方一及添加6% 复方二提取液处理的冻后精子活率显著高于其他浓度水平( $P < 0.05$ ),但两者间的差异不显著( $P > 0.05$ )。各复方中药提取液在24% 添加水平时冻后精子活率开始下降。复方一、三、四中药提取液在48% 添加水平时,精子活率均显著降低( $P < 0.05$ );但复方二中药提取液在48% 添加水平时,精子活率与对照组相比差异不显著( $P > 0.05$ )。

表1 添加不同中药提取液后牛冻后精子活率 %

浓度 %	复方一	复方二	复方三	复方四
0(CK)	30.83 ±2.38 a	30.83 ±2.38 a	30.83 ±2.38 a	30.83 ±2.38 a
6	35.16 ±0.16 bc	41.33 ±1.76 a	34.66 ±1.66 c	36.66 ±1.74 b
12	41.50 ±2.02 a	36.33 ±0.55 b	38.16 ±0.74 ab	38.00 ±1.00 ab
24	31.66 ±0.84 a	36.00 ±1.96 a	35.50 ±1.58 a	33.00 ±1.63 a
48	9.16 ±0.83 b	31.83 ±0.87 a	9.16 ±0.83 b	10.00 ±0.00 b

注:同一列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。下同。

**2.2 不同复方中药提取液对牛精子顶体完整率的影响** 表2 表明,添加12% 复方一处理及添加6% 复方二处理的冻后精子顶体完整率较好,分别达41.59% 和40.14%,明显高于其他水平( $P < 0.05$ ),但两者之间差异不显著( $P > 0.05$ )。各复方中药提取液在24% 添加水平时冻后精子顶体完整率呈现下降趋势,添加复方二处理下降趋势比其他复方组较为缓和。

表2 不同中药配方稀释液对牛冻精顶体完整率的影响 %

浓度 %	复方一	复方二	复方三	复方四
0(CK)	36.22 ±0.86 a	36.22 ±0.86 a	36.22 ±0.86 a	36.22 ±0.86 a
6	37.60 ±0.71 ab	41.59 ±1.29 a	34.82 ±1.31 b	35.99 ±1.52 b
12	40.14 ±2.01 a	37.56 ±2.00 a	39.63 ±0.98 a	37.16 ±1.65 a
24	34.66 ±1.60 a	35.19 ±1.06 a	29.15 ±1.17 b	30.35 ±1.07 b
48	32.33 ±1.35 a	31.88 ±1.54 a	28.94 ±0.89 ab	26.33 ±2.25 b

表3 不同中药配方稀释液对牛冻精质膜完整率的影响 %

浓度 %	复方一	复方二	复方三	复方四
0(CK)	32.66 ±2.26 a	32.66 ±2.26 a	32.66 ±2.26 a	32.66 ±2.26 a
6	35.25 ±1.78 a	40.00 ±1.73 a	27.66 ±2.21 b	28.58 ±1.07 b
12	38.16 ±1.52 a	36.75 ±0.99 a	39.50 ±1.83 a	34.58 ±1.15 b
24	26.00 ±1.73 b	36.16 ±0.98 a	28.33 ±1.36 b	29.75 ±0.60 b
48	14.83 ±1.33 b	25.08 ±1.06 a	17.41 ±0.72 b	15.66 ±1.55 b

**2.3 不同复方中药提取液对牛精子质膜完整率的影响** 表3 表明,复方二中药提取液在6% 添加水平时,冻后牛精子质膜完整率较好,显著高于其他浓度水平( $P < 0.05$ ),且其随着添加浓度的升高呈现缓慢下降趋势。复方一、三和四在24% 和48% 添加水平时,冻后精子质膜完整率均显著降低( $P < 0.05$ );复方二中药提取液在24% 添加水平时,冻后精子质膜完整率有所下降,但下降趋势比其他复方组缓和,与对照组相比差异不显著( $P > 0.05$ );复方二中药提取液在48% 添加水平时,冻后精子质膜完整率显著降低( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

试验表明,按中药配方理论将特定性味与功效的中药组

成复方,可以显著改善牛精子冻后的品质,提高精子细胞的耐冻性。在4 个复方中,以复方一和复方二的添加效果较好。其中复方一在12% 添加水平时及复方二在6% 添加水平时添加效果较佳。各复方中药提取液在添加量为24% 和48% 时,冻后精子品质呈不同程度的下降。但就同一配方不同添加水平而言,不同配方的最佳添加剂量存在差异。复方一在12% 的添加量时,精子冻后的品质较好,而复方二在6% 的添加量时精子冷冻效果较佳;这与胡建宏<sup>[3]</sup> 等的研究结果存在差异,这可能与配方的组成和用量及中药的提取方法有关。

冷冻过程伴随脂类过氧化反应,冷冻处理过程中发生的脂类物质氧化损伤程度与精子冷冻效果有密切关系<sup>[4-5]</sup>。精子在冷冻过程中产生大量活性氧(ROS),能破坏精子的细胞骨架,使细胞内DNA 流失,最终导致精子的受精能力降低。该研究发现,中药成分在抵御脂类物质氧化损伤和保护精子质膜完整性上起到了积极作用,这主要得益于其中药成分中含有丰富的天然抗氧化剂和其他对抑制脂类氧化反应具有增效作用的物质。

益母草含有硒和锰等多种微量元素。硒是一种强抗氧化剂,能抑制脂类的过氧化反应,延长细胞膜的生命,而锰能激活水解酶、脱羧酶、激酶、转移酶、肽酶等上百种酶,可增强硒对精子细胞的保护效果。郑鸿翱等研究发现,益母草能增强超氧化物歧化酶(SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX) 活性,可以保护抗氧自由基酶系统的活性,抑制脂质反应,减轻过多氧自由基对细胞的损害<sup>[6]</sup>。姜秀梅在小鼠上试验发现,鸡冠花能明显提高超氧化物歧化酶(SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX) 的活性及机体总抗氧化能力从而起到抗衰老作用。黄芪富含多种微量元素,其中包括能增强和激活超氧化物歧化酶(SOD) 活性的硒<sup>[8]</sup>。黄芪总黄酮(TFA) 可降解细胞脂质过氧化物生成,防止细胞损伤和致突变作用。刘玉萍的研究表明,给小鼠喂饮黄精的水煎液,能明显提高小鼠肝脏中的SOD 活性( $P < 0.05$ ),增强小鼠全血谷胱甘肽过氧化物酶的活性<sup>[9]</sup>。同时黄精还具有清除活性氧自由基的作用。淫羊藿甙具有抗氧化,延缓衰老的功能,淫羊藿多糖具有调节细胞免疫和抗细胞衰老的作用,淫羊藿黄酮具有抗氧化作用<sup>[10]</sup>。4 种复方的中药有效成分可能在对抗精子脂类物质氧化损伤上产生了一定的增效作用,为精子细胞提供了一种更为平衡的物质环境,使精子质膜受到了较好保护,因此一定程度上提高了精子细胞抵御低温冷冻伤害的能力。

Johrson 等认为,精子的冷休克可能与精子膜脂类双分子层的组成有关,磷脂的脂肪酸组成和含量决定精子质膜的稳定性,同时胆固醇含量也是影响膜流动性的重要因素<sup>[11]</sup>。大部分哺乳动物所含系列的长链多聚不饱和脂肪酸(LCPU-FA) 占全部脂肪酸的60% 以上,由于这种特有的脂质成分排列成双层结构,赋予脂膜更强的流动性,使精子质膜能更好的抵御冰晶化的伤害。精子质膜作为一种动态膜,在冷冻过程中亦要不断与胞外进行物质交换以维持精子细胞内外平衡。鸡冠花含有大量的蛋白质和不饱和脂肪酸,菟丝子、巴戟天等中药也含有多种氨基酸、蛋白质和脂类。再加上精子能聚集稀释液中的多种天然氧化剂参与脂类的代谢<sup>[12]</sup>。这在一定程度上可能增加了牛精子中多聚不饱和脂肪酸的含

(上接第2917页)

量,改变了精子细胞膜中磷脂和胆固醇的含量和比例,赋予脂膜更强的流动性。另外,复方稀释液中的糖类的羟基可能与精子膜磷脂的磷酸根结合,置换细胞膜周围的水分子,有效阻碍冷冻过程中大冰晶的形成,避免了冷冻冰晶的形成对精子的损伤。该研究表明,提高质膜中不饱和脂肪酸的含量将有助于提高精子的抗冻性。

由于各复方的配方和用药量不同,所构成的稀释液复杂体系也不同,对冻后精子品质产生的增效作用也有强弱。中草药成分对精子冷冻所起到的积极作用的具体机理和抑制其积极作用发挥的原因有待于进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 吴永孝,郝正理.中式解冻液解冻牛精液的受胎试验[J].黄牛杂志,1995,21(1):20-21.
- [2] 张兆旺,吴永孝.猪精液中中式稀释液筛选研究[J].中国农业科学,2000,33(2):104-106.
- [3] 胡建宏,李青旺,王立强,等.牛冷冻精液稀释液中草药配方的初步研

究[J].中国奶牛,2006(1):7-11.

- [4] ELIZABETH B, BEORLEGI N B, O'FLAHERTY C M. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen[J]. Theriogenology, 2005,63:2126-2135.
- [5] MALDIANA, PENNY P, NOBLE RC. Docosahexaenoic acid-rich naine oils and improved reproductive efficiency in pigs[M]//CHRISTOPHE A B. Male fertility and lipid metabolism. Champaign, Illinois: AOCs Press, 2003:60-72.
- [6] 郑鸿翔,陈少如,尹俊.益母草对兔心肌缺血再灌注损伤时氧自由基的影响[J].汕头大学医学院学报,1997,10(2):10-12.
- [7] 姜秀梅.鸡冠花对衰老动物模型作用的研究[J].云南中医中药杂志,2005,26(1):33-34.
- [8] 高观月,朱秀华.当归、黄芪对实体瘤鼠SOD活性的影响[J].湖北中医杂志,1996,18(6):50.
- [9] 刘玉萍,付桂芳,曹晖.黄精玉竹及其制剂的药理学研究进展[J].时珍国医国药,1998,9(4):371.
- [10] 侯集瑞,盛吉明,王秀全,等.淫羊藿研究进展[J].吉林农业大学学报,2004,26(1):59-65.
- [11] JOHNSON L A, WEITZE K F, FAISER P, et al. Storage of boar semen[J]. Animal Reproduction Science, 2000,62:143-172.
- [12] CERCIN S, MALDIANA, SURAI P, et al. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage[J]. Animal Reprod Sci, 2000,58:99-111.