

高温环境下日粮中添加锌、维生素 E 和 β -胡萝卜素对公牛精液品质和抗氧化指标的影响

李秋风^{1,2,3}, 李建国^{1,2,3*}, 吴云海⁴, 马亚斌⁴, 刘兴华⁴, 高艳霞^{1,2,3}, 曹玉凤^{1,2,3}, 刘廷玉⁴

(1. 河北农业大学动物科技学院, 保定 071001; 2. 河北省牛羊胚胎工程技术研究中心, 保定 071001;

3. 河北农业大学 养牛科学研究所, 保定 071001; 4. 河北省畜牧良种工作站, 石家庄 050061)

摘要: 旨在研究高温季节日粮中添加维生素(维生素 E 和 β -胡萝卜素)和锌对荷斯坦公牛精液品质、抗氧化指标的变化, 探讨高温季节公牛维生素和锌的适宜添加量。本试验采用随机区组设计, 选取体重相近($1\ 010 \pm 80$)kg、采精正常、健康的纯种荷斯坦成年种公牛 60 头, 随机分为 4 组, 每组 15 头。4 个处理组分别为 I 组: 对照组(基础日粮); II 组: 基础日粮 + $100\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DM Zn; III 组: 基础日粮 + 维生素($300\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DM 维生素 E 和 $60\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DM β -胡萝卜素); IV 组: 基础日粮 + $100\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DM Zn + 维生素($300\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DM 维生素 E 和 $60\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DM β -胡萝卜素), 试验期 120 d。结果表明: 添加维生素和锌可改善公牛的精液品质, 显著提高鲜精活力(IV 组 0.649 vs 对照组 0.575)、精子密度(IV 组 15.16×10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ vs 对照组 11.81×10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$)、冻精活力(IV 组 0.340 vs 对照组 0.283)、精子顶体完整率(IV 组 45.2% vs 对照组 41.8%), 显著降低精子畸形率(IV 组 13.47% vs 对照组 16.81%), 但对射精量无显著影响(IV 组 $11.56\ \text{mL}$ vs 对照组 $10.33\ \text{mL}$)。添加维生素可显著提高 Cu-Zn SOD 的活性($P < 0.01$); 添加锌可显著提高血清 T-AOC($P < 0.01$)和 GSH-Px 活性($P < 0.01$); 血清中 MDA($P = 0.053\ 5$)和羟自由基($P = 0.069\ 8$)可随着维生素和锌的添加而降低。在 4 个试验组中, 血清中 Cu-Zn SOD、T-AOC 和 GSH-Px 的活性 IV 组最高, 而 MDA 的浓度以 IV 组最低。添加维生素可显著增加精液中总 SOD($P < 0.01$)和 T-AOC($P < 0.01$), 日粮中添加锌可提高精液中 Cu-Zn SOD 的活力($P < 0.05$)。综上所述, 夏季高温季节添加 $300\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DM 维生素 E、 $60\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DM β -胡萝卜素和 $100\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DM Zn 可以改善精液品质。

关键词: 荷斯坦种公牛; 维生素; 锌; 精液品质; 抗氧化指标

中图分类号: S823.9⁺1; S816.71

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)04-0587-09

The Effects of Vitamin E, Beta-carotene and Zinc on Semen Quality, Antioxidant Indicators in Hot Weather

LI Qiu-feng^{1,2,3}, LI Jian-guo^{1,2,3*}, WU Yun-hai⁴, MA Ya-bin⁴,

LIU Xing-hua⁴, GAO Yan-xia^{1,2,3}, CAO Yu-feng^{1,2,3}, LIU Ting-yu⁴

(1. College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2. Embryo Engineering and Technological Center of Cattle and Sheep of Hebei, Baoding 071001, China;

3. Cattle Science Institute, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

4. Animal Husbandry Workstation of Hebei Province, Shijiazhuang 050061, China)

Abstract: The effects of dietary vitamins (vitamin E and beta-carotene) and zinc on semen quality, antioxidant indicators of Holstein bull in hot weather were analyzed. Sixty healthy and purebred Holstein bulls ($BW = 1\ 010 \pm 80\ \text{kg}$) were randomly classified into 4 groups ($n = 15$): group I: control group (basal diet); group II: basal diet + $100\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DM Zn; group III: basal diet + antioxidant ($300\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DM vitamin E and $60\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DM beta-carotene) and group IV: bas-

收稿日期: 2013-09-14

基金项目: 国家现代农业(奶牛)产业技术体系建设专项资金(CARS-37); 国家现代农业(肉牛)产业技术体系建设专项资金(CARS-38)

作者简介: 李秋风(1975-), 女, 河北乐亭人, 副教授, 博士, 主要从事反刍动物营养与饲料科学研究, E-mail: lqf582@126.com

* 通信作者: 李建国, 教授, 博导, E-mail: jgli@hebau.edu.cn

al diet +100 mg · kg⁻¹DM Zn + vitamins (300 mg · kg⁻¹DM vitamin E and 60 mg · kg⁻¹DM beta-carotene). The trial duration was 120 days. The results showed that vitamins and zinc could significantly increase the semen quality, vitality of fresh semen (group IV 0.649 vs group I 0.575), sperm density (group IV 15.16 × 10⁸ mL⁻¹ vs group I 11.81 × 10⁸ mL⁻¹), vitality of frozen semen (group IV 0.34 vs group I 0.283) and acrosome integrity rate (group IV 45.2% vs group I 41.8%) but decreased the sperm deformity rate significantly (group IV 13.47% vs group I 16.81%). However, there was no significant effect on ejaculate volume (group IV 11.56 mL vs group I 10.33 mL). In addition, the serum Cu-Zn SOD activity could be significantly increased by the supplemental vitamins or vitamins + zinc ($P < 0.01$); the individual or combination of supplemental vitamins and zinc significantly positively affected the serum T-AOC ($P < 0.01$); and GSH-P_x activity significantly ($P < 0.01$); the serum MDA ($P = 0.0535$) concentration and hydroxyl radicals ($P = 0.0698$) were markedly reduced as the result of adding vitamins and zinc. Supplemental vitamins significantly increased the total SOD ($P < 0.01$) and T-AOC ($P < 0.01$) activities in seminal plasma; the Cu-Zn SOD activity ($P < 0.05$) in seminal plasma was increased by the addition of zinc. In conclusion, a diet with 300 mg · kg⁻¹DM of vitamin E, 60 mg · kg⁻¹DM of beta-carotenoids and 100 mg · kg⁻¹DM Zn could improve the semen quality in hot weather.

Key words: Holstein bull; vitamins; zinc; semen quality; antioxidant indicators

高温季节机体产生的活性氧自由基增加, 活性氧自由基降低精子运动、损坏精子膜^[1], 降低卵融合能力^[2-4], 因此夏季高温季节, 种公牛的原精活力、冻精活力、原精密度、活精子百分数、顶体完整率显著下降, 精子畸形率明显提高^[5]。机体内的 SOD、维生素 E、微量元素 Zn 等是机体的抗氧化系统, 能即时清除机体产生的氧自由基, 保护精子免受损害, 提高精子融合后的质量。高温环境, 机体处于应激状态, 增加了机体中自由基的产量, 降低了血清中抗氧化维生素如 VA、VC、VE 和矿物元素 (如 Zn) 的浓度^[6-7]。因此高温季节, 种公牛对 VE、VA、VC、β-胡萝卜素以及锌、铜等微量元素的需要量增加。外加的一些抗氧化剂, 例如 VE、VC、过氧化氢酶、二甲亚砜和牛磺酸等证明影响人类、牛、马、兔子和猪的精液质量。Zn 和 VE 及 β-胡萝卜素之间存在相互作用, 锌可以有效改善体内非酶抗氧化剂 (如 VE、VC 和 β-胡萝卜素) 的含量, 共同参与维持细胞的抗氧化功能^[8]。因此, 研究日粮 VE、β-胡萝卜素和锌添加水平对种公牛精液品质、抗氧化性能影响以及其对公牛精液影响机制, 对种公牛科学饲养具有重要的指导意义。本试验利用成年荷斯坦种公牛为研究对象, 通过研究高温季节中 VE、β-胡萝卜素和锌添加水平对荷斯坦种公牛精液品质、抗氧化性能变化, 探讨高温季节荷斯坦种公牛精料补充料中适宜的 VE、β-胡萝卜素和锌添加水平, 为种公牛的

科学饲养和营养标准的制定提供可靠的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验设计

本试验于 2011 年 5 月 20 日-2011 年 9 月 27 日在河北省畜牧良种工作站进行。选取体重相近 (1 010 ± 80) kg、采精正常、健康无病的纯种荷斯坦成年种公牛 60 头。根据前期采精记录中采精量、精液密度、鲜精活力等指标, 采用随机区组设计将供试牛随机分为 4 个处理组, 每个处理组 15 个重复, 每个重复 1 头牛, 4 个处理组分别为 I 组为对照组 (基础日粮), II 组为基础日粮 + 100 mg · kg⁻¹DM Zn, III 组为基础日粮 + 维生素 (300 mg · kg⁻¹DM VE 和 60 mg · kg⁻¹DM β-胡萝卜素), IV 组为基础日粮 + 100 mg · kg⁻¹DM Zn + 维生素 (300 mg · kg⁻¹DM VE 和 60 mg · kg⁻¹DM β-胡萝卜素)。

1.2 试验日粮

各处理试验日粮完全一致, 均由精料补充料、羊草、苜蓿等, 参照中国奶牛饲养标准 (NY/T 34—2004) 中种公牛营养需要配制而成。公牛的基础日粮组成见表 1。根据公牛的生殖生理特点, 设计试验的预试期为 1 个月, 试验期为 4 个月。按照种公牛站的饲养管理制度进行饲养, 各处理组管理条件完全一致。

表 1 基础日粮组成及营养成分(风干基础)

Table 1 Ingredients and composition of diets(air-dried basis)

项目 Item	含量 Content	营养成分 Composition	含量 Content
玉米 Corn	54.5	干物质 DM	86.5
麸皮 Wheat bran	15	泌乳净能/(MJ·kg ⁻¹)	7.05
豆粕 Soybean meal	24.7	粗蛋白 CP	14.01
食盐 Salt	1	总钙 Ca	1.50
骨粉 Bone meal	2.4	总磷 TP	0.41
鱼粉 Fish meal	2	锌/(mg·kg ⁻¹ DM) Zn	30
微量元素预混料 Trace elements premix	0.4	维生素 E/(mg·kg ⁻¹ DM) Vitamin E	50

每千克微量元素预混料组成:铜 1 500 mg,铁 6 000 mg,锰 10 000 mg,锌 7 500 mg,镁 900 mg,钴 100 mg,碘 300 mg,硒 14 mg,维生素 A 1 000 万 IU,维生素 D₃200 万 IU

Premix per kilogram contain:Cu 1 500 mg,Fe 6 000 mg,Mn 10 000 mg,Zn 7 500 mg,Mg 900 mg,Co 100 mg,I 300 mg,Se 14 mg,VA 10⁷ IU,VD₃ 2×10⁶ IU

1.3 样品的采集与处理

试验期公牛每周采精 2 次,采精时按检测要求采集等量精液样品,立即检测相关精液品质指标。试验期末期采集种公牛血液 20 mL(颈静脉无菌采血),采集的血液在 4 °C 4 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,分离血清,-20 °C 保存,以备检测相关血液生化指标。采血前采集种公牛的精液(假阴道采精法),一部分立即检测其精液品质,一部分低温离心分离精清,所得精清-20 °C 保存,检测相关生化指标。

1.4 测定项目与方法

1.4.1 精液品质各项指标的检测 种公牛的正常精液通常呈乳白色或淡灰色。其他色泽即可视为不正常现象,会危害受精力,则应将种公牛交兽医诊断并治疗,停止使用。

射精量、精子活力、精子密度、顶体完整率和精子畸形率等指标的操作方法和评定标准参照 GB/T4143-1984《牛冷冻精液国家标准》进行。

1.4.2 睾酮含量的测定 血清和精液中睾酮含量的测定采用放射免疫分析法。由北京迪安生物技术开发有限责任公司测定。

1.4.3 酶活性的测定 GPT 和 GOT 测定采用北京中生北控试剂盒测定。

1.4.4 抗氧化指标测定 T-SOD、GSH-Px、T-AOC、MDA、羟自由基等测定采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒,按照试剂盒的说明书操作测定。

1.5 数据统计

数据统计和分析 SAS9.0 统计软件包中进行。多重比较采用 Duncan 的 Q 检验,显著水平采用 P

<0.01 和 P <0.05。

2 结果与分析

2.1 VE、 β -胡萝卜素和锌对荷斯坦公牛鲜精活力的影响

由表 2 可知,日粮中 VE、 β -胡萝卜素和锌可显著提高荷斯坦公牛的鲜精活力,从补饲 60 d 开始,精液的品质显著提高,与对照组相比,IV 组的鲜精活力显著提高(P <0.05),到了第 90 天以后,可达到极显著水平(P <0.01)。试验 120 d 各试验组之间虽然没有达到统计学上的显著水平,但可以看出同时添加维生素和锌的 IV 组的鲜精活力高于单独添加维生素的 III 组和锌的 II 组(P >0.05)。通过 120 d 的试验,荷斯坦公牛的鲜精活力从 0.623 提高到 0.672,提高了 7.81%。添加 60 d 以后,荷斯坦公牛的精液品质显著提高,其中 II 组、III 组和 IV 组的公牛的精液品质分别比对照组提高了 10.15%、10.32% 和 12.92%。

2.2 VE、 β -胡萝卜素和锌对荷斯坦公牛采精量的影响

日粮中 VE、 β -胡萝卜素和锌对荷斯坦公牛采精量的影响见表 3。由表 3 可知,日粮中添加维生素和锌对公牛的采精量并无显著影响(P >0.05)。在补饲的 120 d,除了 90 d III 组和 IV 组显著高于对照组和 II 组外,其他的时间各组间射精量并无显著差异。出现这些结果的原因实际是供试牛个体间的差异所致,并非完全是日粮中添加维生素和锌的效应。从表中可以看出,日粮中添加维生素和锌对 60 d 之后公牛采精量无显著影响。

表 2 VE、 β -胡萝卜素和锌对荷斯坦公牛鲜精活力的影响

Table 2 Effects of vitamin E, beta-carotene and zinc on sperm vitality in Holstein bulls

%

时间/d Time	I 组 Group I	II 组 Group II	III 组 Group III	IV 组 Group IV	SEM	P
0	0.675±0.039 ^a	0.675±0.024 ^a	0.671±0.029 ^a	0.680±0.027 ^a	0.012 3	0.967 9
15	0.658±0.038 ^a	0.667±0.020 ^a	0.667±0.020 ^a	0.691±0.022 ^a	0.010 8	0.271 3
30	0.671±0.049 ^a	0.683±0.026 ^a	0.692±0.013 ^a	0.692±0.023 ^a	0.012 5	0.650 7
45	0.643±0.055 ^b	0.692±0.020 ^a	0.688±0.021 ^a	0.693±0.022 ^a	0.013 7	0.065 1
60	0.616±0.067 ^b	0.658±0.013 ^{ab}	0.663±0.031 ^{ab}	0.68±0.045 ^a	0.017 8	0.118 8
75	0.599±0.066 ^a	0.638±0.031 ^a	0.661±0.022 ^a	0.66±0.042 ^a	0.019 9	0.108 4
90	0.581±0.039 ^B	0.650±0.035 ^A	0.650±0.016 ^A	0.64±0.022 ^A	0.015 1	0.003 7
120	0.544±0.096 ^b	0.611±0.094 ^{ab}	0.591±0.11 ^{ab}	0.647±0.082 ^a	0.027 0	0.029 3
0~120 d 平均 The average of 0-120 day	0.623	0.659	0.660	0.672		
60~120 d 平均 The average of 60-120 day	0.575	0.633	0.634	0.649		

同行上标不同小写英文字母表示差异显著($P<0.05$),相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不同大写英文字母表示差异极显著($P<0.01$)。下同

Means in the same row with different small letter superscript differ significantly($P<0.05$), with same small letter superscript show no significantly ($P>0.05$), with different capital letter superscript means very differ significantly ($P<0.01$). The same as below

表 3 VE、 β -胡萝卜素和锌对荷斯坦公牛采精量的影响

Table 3 Effects of vitamin E, beta-carotene and zinc on semen volume in Holstein bulls

mL

时间/d Time	I 组 Group I	II 组 Group II	III 组 Group III	IV 组 Group IV	SEM	P
0	10.5±2.35 ^a	10.83±2.77 ^a	11.67±1.63 ^a	10.68±2.33 ^a	0.940	0.826 8
15	9.5±2.26 ^a	11.00±2.45 ^a	11.83±2.88 ^a	10.20±1.48 ^a	0.963	0.379 6
30	10.33±1.75 ^a	9.75±2.44 ^a	12.42±3.63 ^a	11.40±3.13 ^a	1.148	0.394 2
45	10.17±1.51 ^a	10.08±1.36 ^a	10.83±2.91 ^a	10.80±4.32 ^a	1.099	0.942 3
60	8.00±3.29 ^a	9.08±1.56 ^a	11.83±4.71 ^a	12.40±2.70 ^a	1.345	0.104 2
75	11.00±1.79 ^a	8.67±1.72 ^a	9.80±4.07 ^a	11.00±2.55 ^a	1.170	0.391 9
90	9.92±1.02 ^{ABb}	9.10±3.85 ^{Bb}	13.00±1.15 ^{ABa}	13.40±1.14 ^{Aa}	1.072	0.012 3
120	10.08±3.41 ^a	11.00±3.21 ^a	10.15±1.46 ^a	10.27±4.59 ^a	0.880	0.871 3
0~120 d 平均 The average of 0-120 day	9.94	9.94	11.44	11.27		
60~120 d 平均 The average of 60-120 day	10.33	9.59	10.98	11.56		

2.3 VE、 β -胡萝卜素和锌对荷斯坦公牛精子密度的影响

日粮添加维生素和锌对精子密度有显著影响(表 4),日粮中补充 2 个月之后出现显著变化,其中

75 d($P<0.01$)和 90 d($P<0.05$) II 组的精子密度显著高于对照组,4 个月的平均值 II 组、III 组、IV 组比对照组提高了 14.26%、12.04%和 17.18%,添加 60 d 后各组的精子密度平均值分别比对照组高

22.61%、20.32%和28.37%。

2.4 VE、β-胡萝卜素和锌对荷斯坦公牛精子冻后活力的影响

由表5可知,随着气温的增加精子活力呈现明显下降的趋势,日粮中添加维生素和锌可提高公牛

冻精的精子活力,从60 d开始,公牛冻后精子活力显著提高,其中当维生素和锌共同添加的时候精子的活力最高($P<0.05$),4个月的平均值Ⅱ组、Ⅲ组、Ⅳ组比对照组提高了10.36%、6.08%和9.21%,添加60 d后各组的精子密度平均值分别比对照组高17.51%、10.28%和20.06%。

表4 VE、β-胡萝卜素和锌对荷斯坦公牛精子密度的影响

Table 4 Effects of vitamin E, beta-carotene and zinc on sperm count in Holstein bulls

10^8 mL^{-1}

时间/d Time	I组 Group I	II组 Group II	III组 Group III	IV组 Group IV	SEM	P
0	13.95±2.69 ^a	14.60±0.96 ^a	13.96±2.76 ^a	14.88±1.39 ^a	0.872	0.849 6
15	12.76±3.19 ^b	16.45±3.51 ^{ab}	14.71±2.73 ^{ab}	17.00±2.58 ^a	1.243	0.115 3
30	12.87±4.17 ^a	13.93±4.25 ^a	15.04±2.10 ^a	15.22±2.81 ^a	1.423	0.645 7
45	14.30±3.58 ^a	16.50±3.22 ^a	14.88±4.12 ^a	14.35±2.100 ^a	1.385	0.661 6
60	15.03±1.94 ^a	14.27±2.02 ^a	15.66±4.12 ^a	15.26±3.18 ^a	1.205	0.872 9
75	11.33±2.74 ^{bc}	15.28±1.82 ^{Ab}	15.38±2.20 ^{Ab}	18.65±1.93 ^{Aa}	0.990	0.000 4
90	13.07±1.87 ^b	17.66±3.07 ^a	16.06±2.75 ^{ab}	15.54±3.01 ^{ab}	1.194	0.073 0
120	11.04±3.25 ^a	10.51±2.49 ^a	11.20±3.60 ^a	11.30±3.72 ^a	0.849	0.916 2
0~120 d 平均 The average of 0-120 day	13.04	14.9	14.61	15.28		
60~120 d 平均 The average of 60-120 day	11.81	14.48	14.21	15.16		

表5 VE、β-胡萝卜素和锌对荷斯坦公牛精子冻后活力的影响

Table 5 Effects of vitamin E, beta-carotene and zinc on freeze-thawed motility in Holstein bulls

%

时间/d Time	I组 Group I	II组 Group II	III组 Group III	IV组 Group IV	SEM	P
0	0.375±0.022 ^a	0.379±0.025 ^a	0.375±0.027 ^a	0.370±0.045 ^a	0.012 3	0.967 9
15	0.350±0.010 ^b	0.353±0.025 ^b	0.375±0.027 ^a	0.360±0.022 ^{ab}	0.007 1	0.070 1
30	0.333±0.021 ^a	0.345±0.012 ^a	0.338±0.037 ^a	0.332±0.025 ^a	0.010 3	0.800 0
45	0.292±0.038 ^b	0.338±0.033 ^a	0.320±0.034 ^{ab}	0.336±0.019 ^a	0.013 1	0.081 8
60	0.305±0.029 ^b	0.347±0.014 ^a	0.308±0.033 ^b	0.314±0.023 ^b	0.010 6	0.036 8
75	0.278±0.021 ^B	0.338±0.018 ^A	0.320±0.035 ^A	0.340±0.014 ^A	0.010 4	0.000 7
90	0.297±0.044 ^a	0.322±0.026 ^a	0.310±0.047 ^a	0.326±0.023 ^a	0.016 2	0.546 0
120	0.276±0.077 ^b	0.338±0.010 ^{ab}	0.307±0.096 ^{ab}	0.354±0.069 ^a	0.022 1	0.054 2
0~120 d 平均 The average of 0-120 day	0.313	0.345	0.332	0.342		
60~120 d 平均 The average of 60-120 day	0.283	0.333	0.312	0.340		

2.5 VE、β-胡萝卜素和锌对荷斯坦公牛精子畸形率和顶体完整率的影响

由表6可知,与对照组相比,Ⅲ组($P<0.05$)或者Ⅳ组($P<0.01$)精子畸形率显著的降低。Ⅱ组、

Ⅲ组和Ⅳ组精子的顶替完整率可显著高于对照组,分别比对照组提高了3.18%($P<0.05$)、3.06%($P<0.05$)和8.13%($P<0.01$)。

表 6 VE、 β -胡萝卜素和锌对荷斯坦公牛精子畸形率和顶体完整率的影响

Table 6 Effects of vitamin E, beta-carotene and zinc on abnormality rate and acrosomal integrity in Holstein bulls

%

项目 Item	I 组 Group I	II 组 Group II	III 组 Group III	IV 组 Group IV	SEM	P
畸形率 Abnormality rate	16.81 \pm 3.50 ^{Aa}	14.97 \pm 2.73 ^{ABab}	14.60 \pm 2.31 ^{ABb}	13.47 \pm 2.60 ^{Bb}	0.742	0.013 8
顶体完整率 Acrosomal integrity	41.80 \pm 3.05 ^{Bb}	43.13 \pm 2.72 ^{ABa}	43.08 \pm 2.50 ^{ABa}	45.2 \pm 2.70 ^{Aa}	0.705	0.014 4

2.6 VE、 β -胡萝卜素和锌对荷斯坦公牛血清中抗氧化指标的影响

表 7 结果显示,日粮中添加锌、VE 和 β -胡萝卜素,能显著提高血清中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)($P<0.01$)、铜锌超氧化物歧化酶(Cu-Zn SOD)($P<0.01$)、总超氧化物歧化酶(SOD)($P<0.05$)和总 SOD 的活力($P<0.01$)以及机体的总的抗氧化能力($P<0.01$),降低机体血清中氢自由基($P<0.05$)、MDA 的浓度($P<0.05$)。其中对于 GSH-Px、Cu-Zn SOD、总抗氧化能力,共同添加锌、VE 和

β -胡萝卜素 VI 组最高。羟自由基以 III 组最低,显著低于对照组,MDA 的浓度 VI 组最低,显著低于对照组,说明锌与 VE 和 β -胡萝卜素之间存在组合效应。综合分析结果,公牛日粮中添加锌、VE 和 β -胡萝卜素能不同程度提高血清中 GSH-Px、Cu-Zn SOD、总 SOD、总抗氧化力,降低血清中 MDA、氢自由基浓度,并且锌与维生素(VE 和 β -胡萝卜素)之间存在组合效应,其中 GSH-Px、Cu-Zn SOD 试验、总抗氧化能力和 MDA 浓度等方面 VI 组效果最显著。

表 7 VE、 β -胡萝卜素和锌对荷斯坦公牛血清中抗氧化指标的影响

Table 7 Effects of vitamin E, beta-carotene and zinc on serum antioxidant indicators in Holstein bulls

项目 Item	I 组 Group I	II 组 Group II	III 组 Group III	IV 组 Group IV	SEM	P
Cu-Zn SOD /(U · mL ⁻¹)	47.00 \pm 8.87 ^{Bc}	53.96 \pm 6.84 ^{ABbc}	60.73 \pm 9.37 ^{Aab}	61.82 \pm 13.25 ^{Aa}	2.801	0.000 8
总 SOD/(U · mL ⁻¹) T-SOD	91.92 \pm 5.32 ^b	93.64 \pm 3.33 ^b	96.63 \pm 4.06 ^a	95.77 \pm 4.65 ^b	1.474	0.148 9
总抗氧化力/(U · mL ⁻¹) T-AOC	3.87 \pm 0.76 ^B	5.61 \pm 1.39 ^A	4.48 \pm 1.31 ^B	6.41 \pm 1.04 ^A	0.426	<0.000 1
谷胱甘肽过氧化物酶/ (U · mL ⁻¹)GSH-Px	37.61 \pm 5.44 ^B	43.50 \pm 7.75 ^A	36.37 \pm 6.16 ^B	48.77 \pm 6.34 ^A	2.241	0.004 1
羟自由基/(U · mL ⁻¹) Hydroxyl radical	572.25 \pm 133.97 ^b	509.21 \pm 75.11 ^b	454.26 \pm 77.02 ^a	469.43 \pm 94.97 ^a	32.719	0.069 8
丙二醛/(nmol · mL ⁻¹) MDA	8.80 \pm 1.55 ^a	7.93 \pm 1.08 ^{ab}	7.04 \pm 1.53 ^b	6.64 \pm 1.21 ^b	0.554	0.053 5

2.7 VE、 β -胡萝卜素和锌对荷斯坦公牛精液中抗氧化指标的影响

表 8 结果显示,日粮中添加锌和维生素(VE 和 β -胡萝卜素)可显著提高精液中总 SOD($P<0.01$)、Cu-Zn SOD($P<0.01$)、总抗氧化能力($P<0.01$),而精液中羟自由基的浓度不受影响。其中精液中总 SOD 以 IV 组最高,显著高于对照组和 II 组,说明影

响总 SOD 的是维生素,而添加锌对精液中总的 SOD 无显著影响。精液中 Cu-Zn SOD 活力 III 组显著高于对照组。日粮中添加锌对精液中总的 SOD 无显著影响,但可以增加 Cu-Zn SOD 的活力。精液中抗氧化能力以 III 组最高,说明添加维生素 VE 和 β -胡萝卜素可提高精液防御高温引起氧化应激的能力。

表 8 VE、 β -胡萝卜素和锌对荷斯坦公牛精液中抗氧化指标的影响

Table 8 Effects of vitamin E, beta-carotene and zinc on seminal antioxidant indicators in Holstein bulls

U · mL⁻¹

项目 Item	I 组 Group I	II 组 Group II	III 组 Group III	IV 组 Group IV	SEM	P
总 SOD T-SOD	107.29 ± 5.30 ^{Bb}	107.65 ± 6.62 ^{ABb}	112.27 ± 7.12 ^{ABa}	113.71 ± 4.46 ^{Aa}	1.716	0.008 7
铜锌 SOD Cu-Zn SOD	100.79 ± 6.18 ^{Bb}	102.65 ± 4.58 ^{ABb}	107.76 ± 2.29 ^{Aa}	103.17 ± 8.13 ^{ABb}	1.519	0.018 1
总抗氧化力 T-AOC	13.24 ± 3.01 ^{Bc}	18.81 ± 2.72 ^{Aa}	19.05 ± 4.97 ^{Aa}	16.00 ± 3.01 ^{ABb}	0.949	0.000 1
羟自由基 Hydroxyl radical	1 755.39 ± 57.70 ^a	1 731.09 ± 35.26 ^a	1 746.76 ± 35.06 ^a	1 746.44 ± 43.63 ^a	11.785	0.638 4

3 讨论

3.1 VE、 β -胡萝卜素和锌对荷斯坦公牛精液品质的影响

高温对精子畸形率影响最大,其次为对射精量、鲜精活力、精子密度和总精子数的影响。VE 可通过垂体前叶分泌促性腺激素,调节性机能,从而促进精子的形成与活动;另一方面,VE 的抗氧化作用,间接地清除机体内自由基对精子生成的不利影响,从而保护精子。春季、早夏、秋季公牛日粮中添加 VE 对精液品质改善效果较为显著,而冬季效果较差^[9]。 β -胡萝卜素能清除氧自由基、单线态氧和降低脂质过氧化物的产生,提高种公牛的射精量、鲜精活力、精子密度和冻后活力^[10-11],但日粮中 β -胡萝卜素添加水平 100 mg · kg⁻¹时,精液品质没有明显改善^[11]。本试验在前人的研究成果的基础上,VE 的添加量增加到 300 mg · kg⁻¹DM, β -胡萝卜素添加到 60 mg · kg⁻¹DM,通过 120 d 的试验结果表明,日粮中添加 VE 和 β -胡萝卜素可显著的增加牛的鲜精活力、精子密度、精子活力、顶体完整率,降低精子的畸形率,与上述报道结果基本一致。

锌直接参与精子的生成、成熟、贮存、获能等过程,可延缓细胞膜的脂质氧化,以维护细胞膜结构的稳定和生理通透性,从而使精子有良好的活力,对公畜的繁殖性能有很大的影响^[12]。近年来研究证实,饲料含锌量不足会严重影响种公牛的生长发育和繁殖性能,可引起性成熟推迟,性机能障碍,睾丸发育不良,第二性征不明显,曲细精管上皮细胞结构发生异常,导致生殖腺的发育和功能受损,精子生成受阻,精量减少,精子密度低,性欲下降,甚至缺乏配种

能力^[6,9]。多数研究表明日粮中添加锌可改善公牛的精液品质,提高公牛的射精量、降低精子畸形率。信富钰等^[12]研究了添加锌 110 mg · kg⁻¹可极显著的提高日粮的精子活力、精子密度和射精量,同样 N. Kumar 等^[13]和 P. Massanyi 等^[14]以及本研究结果与之相似。日粮中添加锌可显著提高公牛的鲜精活力、精子密度、冷冻精子活力、精子顶体完整率,降低精子畸形率,而对精子的射精量无显著影响。

3.2 VE、 β -胡萝卜素和锌对公牛抗氧化指标的影响

3.2.1 VE、 β -胡萝卜素和锌对公牛血清抗氧化能力的影响

3.2.1.1 VE、 β -胡萝卜素和锌对谷胱甘肽过氧化物酶和总抗氧化能力的影响:

夏季高温季节机体内氧自由基大量积累,降低 GSH-Px 的数量和活力。VE 减少自由基在体内的过量蓄积,提高睾丸组织活性氧清除酶系的活性,调节机体维生素 C 和谷胱甘肽水平,GSH-Px 保护精子膜和精子细胞器膜免遭氧化损害^[15]。本试验中,添加硫酸锌可显著增强谷胱甘肽过氧化物酶的活性。日粮中添加 VE 和 β -胡萝卜素对 GSH-Px 活力的影响未达到统计学上的显著水平,但也有提高的趋势,并且当锌和维生素(VE 和 β -胡萝卜素)共同添加的时候可显著地提高血清中 GSH-Px 的活力,说明二者之间存在互作。其主要是因为日粮中添加锌可提高谷胱甘肽过氧化物酶的活性并增强其清除体内自由基的能力,直接影响有活性的谷胱甘肽过氧化物酶数量,增强机体抗氧化系统的功能,减弱组织器官的老化^[16]。同时 VE 也有调节谷胱甘肽过氧化物酶活性的作用,因此二者共同添加效果更为显著。

机体的防御体系包括酶促(SOD、GSH-Px、

CAT)和非酶促(维生素、AA 和金属蛋白质)2 个体系。总抗氧化能力(T-AOC)的强弱反映的是机体防御体系抗氧化的能力,与机体的健康程度密切相关。日粮中添加锌和维生素可显著提高公牛血清中 T-AOC,然而当锌和维生素共同添加的时候 T-AOC 并不是最高的,而是呈现下降趋势,这与 SOD 和 GSH-Px 的变化趋势有差异,其中的原因有待于进一步研究。

3.2.1.2 VE、 β -胡萝卜素和锌对血清总 SOD 和 Cu-Zn SOD 活力的影响:研究表明,锌与机体 Cu-Zn SOD 的活性显著正相关^[17]。本试验中,添加维生素(VE 和 β -胡萝卜素)和锌可显著提高血清中总 SOD 和 Cu-Zn SOD 的活性,其中二者共同添加效果最为显著。说明锌和维生素(VE 和 β -胡萝卜素)之间存在协同作用,更进一步促进 SOD 数量和活力的增强。其重要原因:一方面 β -胡萝卜素分子结构中含有多个共轭双键,具有捕获、淬灭单线态氧和自由基的能力,通过与自由基反应生成无毒产物或者中断自由基的连锁反应来清除体内自由基;另一方面 VE 能够清除脂质过氧化氢等自由基,并终止链式氧化反应来发挥它的抗氧化作用;微量元素 Zn 参与 SOD 酶结构或活性中心,能够抑制还原型辅酶 II (NADPH)依赖型的脂质过氧化,同时,Zn 还能通过抑制谷胱甘肽的消耗而防止脂质过氧化,提高机体内的 SOD 和 Cu-Zn SOD 的活性,因此三者共同添加效果最佳。

3.2.1.3 VE、 β -胡萝卜素和锌对 MDA 浓度和羟自由基浓度的影响:夏季高温季节,公牛体内脂质过氧化活动增强,MDA (Alondialdehyde,MDA)含量升高。因此 MDA 是重要的脂质过氧化反应产物之一,测定 MDA 的含量常能反映机体内脂质过氧化反应的程度,间接反映细胞损伤的程度^[18],另外 MDA 影响精子的运动功能。本试验中添加硫酸锌、维生素(VE 和 β -胡萝卜素)均能降低血清中 MDA 的浓度,特别是当二者共同添加的时候 MDA 的水平最低。其主要原因就是随着锌和维生素的添加,SOD 活性升高,进而使超氧阴离子自由基的清除能力加强,从而阻止了组织的脂质过氧化,导致脂质过氧化产物 MDA 含量降低。表明 VE 和锌可预防和阻止脂质过氧化损伤。

活性氧(ROS)可破坏精子的细胞膜脂质双分子结构,精子在受到过量氧自由基的过氧化作用后可导致功能丧失,ROS 水平与精子数量、密度、活率和

直线运动率呈负相关。羟自由基(OH)是活性氧自由基的一种,在低浓度时,对生物体有积极作用,如参与能量合成、吞噬细菌、调节细胞生长以及细胞信号转导等。但高浓度自由基可引起机体细胞脂质过氧化反应,使膜上不饱和脂肪酸量减少,损害机体健康。本试验中,随着锌和维生素(VE 和 β -胡萝卜素)的添加可显著的降低血清中羟自由基的含量。说明日粮中添加锌和维生素可明显的降低高温季节产生的活性氧自由基对机体的损害。

3.2.2 VE、 β -胡萝卜素和锌对公牛精清抗氧化指标的影响 精液中 SOD 含量明显高于其他的体液,精液中的 SOD 最初均来源于前列腺,主要为 Cu-Zn SOD 和 Mn-SOD。精液中的 SOD 保护精子免受氧自由基的损害,保护精液正常功能的主要防御卫士^[19]。有研究表明,添加 VE 提高内源 SOD 活性,可提高动物精液应对氧化应激影响能力^[20-21]。在日粮中抗氧化剂可提高精液品质^[22],其中过氧化氢酶能最有效的改善精液的品质,可促进 H_2O_2 降解为氧气和水。本试验在日粮中添加锌和维生素(VE 和 β -胡萝卜素)可显著提高精清中总 SOD、Cu-Zn SOD、总抗氧化能力,特别是当锌和维生素共同添加的时候更能提高公牛精清中的总 SOD 和总抗氧化能力。

4 结 论

4.1 日粮中添加维生素(VE 和 β -胡萝卜素)和锌可显著提高中公牛的精液品质,提高鲜精活力、精子密度、冻精活力、精子顶体完整率,降低精子畸形率,但对射精量无显著影响,且当维生素和锌共同添加时,效果最佳。

4.2 日粮中添加维生素(VE 和 β -胡萝卜素)和锌对血清和精清中抗氧化指标具有显著影响。日粮中添加维生素可显著提高血清中总 SOD,添加维生素或者维生素和锌同时添加可显著提高 Cu-Zn SOD 的活性;日粮中单独或者共同添加维生素和锌可显著提高血清 T-AOC;日粮中添加锌或者维生素和锌共同体添加可显著提高血清中 GSH-Px 活性;血清中 MDA 和羟自由基可随着维生素和锌的添加显著降低。添加维生素可显著降低精清中总 SOD 和 Cu-Zn SOD;添加维生素和锌显著增加血清中 T-AOC。

4.3 在夏季高温季节日粮中维生素和锌适宜的添加量为 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$ VE、 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$ β -

胡萝卜素和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM Zn}$ 。

参考文献:

- [1] STOREY B T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa [J]. *Mol Hum Reprod*, 1997, 3(3): 203-205.
- [2] GRIVEAU J F, LE LANNOU D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology [J]. *Int J Androl*, 1997, 20: 61-69.
- [3] CALAMERA J C, FERNANDEA P J, BUFFONE M G, et al. Effects of long-term *in vitro* incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect [J]. *Andrologia*, 2001, 33: 79-86.
- [4] NEILD D M, GABELLA B M, CHAVES M G, et al. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation [J]. *Theriogenology*, 2003, 59: 1693-1705.
- [5] 李俊杰. 热应激对种公牛精液品质的影响及机理研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2001.
- [6] SAHIN K, SMITH M O, ONDERCI M, et al. Supplementation of zinc from organic or inorganic source improves performance and antioxidant status of heat-distressed quail [J]. *Poult Sci*, 2005, 84: 882-887.
- [7] SAHIN K, KUCUK O. Zinc supplementation alleviates heat stress in laying Japanese quail [J]. *J Nutr*, 2003, 33: 2808-2811.
- [8] SAHIN K, ONDERCI M, SAHIN N, et al. Responses of quail to dietary vitamin E and zinc picolinate at different environmental temperatures [J]. *Anim Feed Sci Technol*, 2006, 129(1-2): 39-48.
- [9] 郎海芳. VE 添加水平对荷斯坦种公牛精液品质、血清抗氧化性能及 SOD 基因 mRNA 丰度的影响[D]. 青岛: 青岛农业大学, 2010.
- [10] 李建国, 陆治年, 金穗华, 等. 维生素 A 对乳用种公牛精液品质和某些生化指标的影响 [J]. 南京农业大学学报, 1990, 13(2): 100-105.
- [11] 刘汝祥, 李文立, 李彦芹, 等. 不同 β -胡萝卜素添加水平对荷斯坦种公牛精液品质和血清指标的影响 [J]. 江苏农业学报, 2008, 24(6): 862-866.
- [12] 信富钰, 李文立, 侯明海, 等. 不同锌水平对荷斯坦种公牛精液品质及血液理化指标的影响 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(6): 47-51.
- [13] KUMAR N, VERMA R P, SINGH L P. Effect of different levels and sources of zinc supplementation on quantitative and qualitative semen attributes and serum testosterone level in crossbred cattle bulls [J]. *Reprod Nutr Dev*, 2006, 46(6): 663-675.
- [14] MASSANYI P, TRANDZIK J, NAD P, et al. Concentration of copper, iron, zinc, cadmium, lead, and nickel in boar semen and relation to the spermatozoa quality [J]. *Environ Sci Health*, 2004, 39(11-12): 305-314.
- [15] 肖雪梅, 任冬仁, 李琳. 营养供给对种公猪精液品质的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(16): 24-26.
- [16] 胡亮, 乐国伟, 王立宽, 等. 不同氨基酸螯合锌对小鼠抗氧化能力的影响 [J]. 食品科学, 2007, 28(11): 541-544.
- [17] 曹国弟, 赵恒寿. 氨基酸螯合锌在动物免疫和抗氧化功能上的研究进展 [J]. 饲料工业, 2006, 27(14): 49-52.
- [18] BARTSCH H, NAIR J. Ultrasensitive and specific detection methods for exocyclic DNA adducts: markers for lipid peroxidation and oxidative stress [J]. *Toxicology*, 2000, 153: 105-114.
- [19] 刘文, 商学军, 万长春, 等. 精浆超氧化物歧化酶与解脲支原体感染的关系 [J]. 男科学报, 1999, 5(4): 213-215.
- [20] 谷朝勇. 不同维生素 E 水平对鲁西黄牛精液品质的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2005.
- [21] CASSANI P, BECONI M T, O'FLAHERTY C. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen [J]. *Anim Reprod Sci*, 2005, 86: 163-173.
- [22] MICHAEL A, ALEXOPOULOS C, PONTIKI E, et al. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa [J]. *Theriogenology*, 2007, 68: 204-212.

(编辑 程金华)