

# 葡萄籽原花青素对公羔羊生长性能、精液品质及睾丸和附睾抗氧化指标的影响

牟春堂 杨文军 王鹏举 任国栋 剧浩 任有蛇 郝小燕\* 张建新\*

(山西农业大学动物科技学院,太谷 030801)

**摘要:** 本试验旨在研究饲喂葡萄籽原花青素(GSPs)对公羔羊生长性能、精液品质及睾丸和附睾抗氧化指标的影响。试验选取4月龄、体重 $[22.75\pm 1.20]$  kg相近的杜泊×小尾寒羊杂交一代公羔48只,随机分为4组,每组12只羊,在基础饲料基础上分别补饲0(对照组)、10(10GSPs组)、20(20GSPs组)、40 mg/kg BW(40GSPs组)的GSPs。试验期共60 d,其中预试期15 d,正试期45 d。结果表明:1)10GSPs和20GSPs组平均日增重和平均日采食量显著高于对照组和40GSPs组( $P<0.05$ ),40GSPs组与对照组差异不显著( $P>0.05$ )。补饲GSPs对料重比影响不显著( $P>0.05$ )。2)GSPs补饲组的附睾重量均显著高于对照组( $P<0.05$ ),睾丸、附睾指数在4组间无显著差异( $P>0.05$ )。20GSPs和40GSPs组的顶体完整率显著高于10GSPs组和对照组( $P<0.05$ ),精子畸形率显著低于对照组( $P<0.05$ )。3)20GSPs和40GSPs组睾丸、附睾组织中的总抗氧化能力(T-AOC)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性显著高于对照组( $P<0.05$ ),GSPs补饲组附睾超氧化物歧化酶(SOD)活性均显著高于对照组( $P<0.05$ ),20GSPs和40GSPs组睾丸、附睾组织中丙二醛(MDA)含量显著低于10GSPs和对照组( $P<0.05$ )。4)睾丸组织中,20GSPs组的SOD mRNA相对表达量显著高于10GSPs组和对照组( $P<0.05$ ),40GSPs组的谷胱甘肽过氧化物酶4(GPx4) mRNA相对表达量显著高于10GSPs组和对照组( $P<0.05$ ),4组间的过氧化氢酶(CAT)和核因子E2相关因子2(Nrf2) mRNA相对表达量差异不显著( $P>0.05$ );附睾组织中,20GSPs和40GSPs组SOD mRNA相对表达量显著高于对照组( $P<0.05$ ),与10GSPs组差异不显著( $P>0.05$ );GSPs补饲组GPx4 mRNA相对表达量均显著高于对照组( $P<0.05$ );20GSPs和40GSPs组Nrf2 mRNA相对表达量显著高于对照组( $P<0.05$ )。综上,补饲适量GSPs可以促进绵羊公羔生长,提高睾丸和附睾组织抗氧化能力,进而改善精液品质;在本试验条件下GSPs最适补饲量为20 mg/kg BW。

**关键词:** 葡萄籽原花青素;睾丸;附睾;精液品质;抗氧化功能

中图分类号:S826

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2020)05-2241-10

睾丸和附睾是雄性动物重要的生殖器官,睾丸是精子发生的重要场所,而附睾是精子发育和成熟的重要场所。睾丸因富含高不饱和脂肪酸和精子发生过程中产生大量的活性氧,使其对氧化

应激更为敏感,睾丸组织的氧化损伤会严重影响精液品质。研究发现,畜舍环境温度高、活动空间受限、饲料精粗比高等诸多因素均会引起公畜生殖器官的氧化应激,进而导致精液品质和繁殖性

收稿日期:2019-11-19

基金项目:国家重点研发项目(2018YFD0502104);国家肉羊产业技术体系项目(CARS-38);山西省基础研究计划项目(201801D221291);“1331工程”畜牧学重点学科建设项目(J201911301)

作者简介:牟春堂(1989—),男,内蒙古呼伦贝尔人,博士,从事反刍动物营养与饲料科学研究。E-mail: sxndmct@sina.com

\*通信作者:郝小燕,副教授,E-mail: haoxiaoyan1990@sina.com;张建新,教授,博士生导师,E-mail: ypzjx@126.com

能下降<sup>[1-3]</sup>。因此,在集约化养殖模式下,研究如何缓解公畜生殖器官氧化应激、改善精液品质具有重要意义。

葡萄籽原花青素(GSPs)是葡萄多酚类化合物的重要组成部分,在葡萄枝叶、果皮、果肉以及葡萄籽中都有存在。现有研究发现,GSPs可以通过清除自由基、螯合金属离子、抑制氧化酶活性等途径增强动物机体抗氧化能力,调节机体免疫反应,进而改善动物健康状况,促进动物生长,提高繁殖能力<sup>[4]</sup>。因此,GSPs在动物健康、高效生产中具有潜在的应用价值。研究表明,酿酒葡萄皮渣可以有效缓解单栏饲养引起的公绵羊睾丸氧化应激,提高精液品质<sup>[2]</sup>;原花青素可以通过激活核因子E2相关因子2(Nrf2)-抗氧化反应元件(ARE)信号通路缓解玉米赤霉烯酮诱导的鼠睾丸支持细胞氧化损伤<sup>[5]</sup>。

因此,本研究以杜泊×小尾寒羊杂一代公羔为研究对象,旨在研究GSPs对舍饲公羔羊睾丸和附睾发育、精液品质及睾丸和附睾抗氧化性能的影响,以期开发绵羊功能性饲料添加剂提供理论指导,为舍饲绵羊健康、高效养殖提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计及动物管理

GSPs购自南京某生物科技有限公司,其主要成分有原花青素(96.400%)、儿茶素(0.533%)、表儿茶素(0.239%)、表没食子儿茶素没食子酸酯(0.225%)、表儿茶素没食子酸酯(0.171%)。

试验于2019年6—8月在国家肉羊产业技术体系饲料资源岗位(山西)试验基地进行。试验采用单因素完全随机试验设计,选取4月龄、体重 $[(22.75\pm 1.20)\text{ kg}]$ 相近的杜泊×小尾寒羊杂交一代公羔48只,严格检疫,随机分为4组,每组12只羊,在基础饲料饲喂基础上分别补饲0(对照组)、10(10GSPs组)、20(20GSPs组)、40 mg/kg BW(40GSPs组)的GSPs。试验期60 d,其中预试期15 d,正试期45 d。

试验开始前对羊舍进行全面的清洗、消毒,对试验羊进行羊痘、口蹄疫和小反刍兽疫疫苗免疫。在正试期,试验羊每日07:00、18:00分别饲喂1次,基础饲料组成及营养水平见表1,自由采食、饮水,每日记录采食量。

表1 基础饲料组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis)

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米秸秆 Corn straw	20.0
谷秸 Millet straw	10.0
玉米 Corn	46.0
豆粕 Soybean meal	7.0
棉籽粕 Cottonseed meal	5.0
麦麸 Wheat bran	5.0
石粉 Limestone	0.3
碳酸氢钠 NaHCO <sub>3</sub>	1.0
食盐 NaCl	0.7
预混料 Premix <sup>1)</sup>	5.0
合计 Total	100.0
营养水平 Nutrient levels <sup>2)</sup>	
干物质 DM	90.3
粗蛋白质 CP	14.5
粗脂肪 EE	3.2
中性洗涤纤维 NDF	29.5
酸性洗涤纤维 ADF	15.3
粗灰分 Ash	8.3
总能 GE/(MJ/kg DM)	18.8

1) 每千克预混料含有 Contained the following per kg of the premix: Cu 15 mg, Fe 55 mg, Zn 25 mg, Mn 40 mg, Se 0.3 mg, I 0.5 mg, Co 0.2 mg, VA 20 000 IU, VD 4 000 IU, VE 40 IU。

2) 实测值 Measured values。

### 1.2 样品采集

正试期第1天08:00对所有试验羊空腹称重,作为初始体重,之后每隔半个月称重,记录羊只体重数据。正试期结束当天08:00空腹称重,作为终末体重。饲喂期间记录每只羊的日采食量、剩料量,计算平均日增重(ADG)、平均日采食量(AFDI)及料重比(F/G)。

正试期结束当天18:00,每组随机选取6只羊禁食、禁水12 h,次日06:00进行屠宰。屠宰后,将左侧附睾尾组织放入35 mL附睾稀释液中,迅速用手术剪剪碎,使精子充分溢出,再用滤网滤去组织残渣,制成精子悬浮液用于精子指标分析;分别剪取右侧睾丸和附睾组织块,液氮速冻,-80℃保存,用于组织抗氧化指标测定和总RNA提取。

### 1.3 测定指标与方法

#### 1.3.1 睾丸、附睾重量测定及指数计算

试验羊屠宰后迅速取下两侧睾丸和附睾,去除周围结缔组织,分别称取睾丸和附睾重量,计算器官指数。

$$\text{睾丸或附睾指数 (g/kg)} = \frac{\text{睾丸或附睾重量 (g)}}{\text{宰前活重 (kg)}}$$

#### 1.3.2 精子品质分析

精子密度:用移液枪将精子悬液分出 100  $\mu\text{L}$ ,再用睾丸稀释液稀释 20 倍,然后取 15  $\mu\text{L}$  精子稀释液,利用精子质量分析仪 (Olympus BX53F, 日本) 检测,记录数据。

精子活率:移液枪取 10  $\mu\text{L}$  精子悬液滴于载玻片上,利用精子质量分析仪检测,记录 5 个视野下的精子活率。

精子畸形率和顶体完整率:制作精子抹片,以中性福尔马林固定,风干后姬姆萨染液染色,1 h 后冲洗,显微镜下观察,记录 300 个精子形态。

$$\text{精子畸形率 (\%)} = \frac{\text{畸形精子数}}{\text{精子总数}} \times 100;$$

$$\text{顶体完整率 (\%)} = \frac{\text{顶体完整精子数}}{\text{精子总数}} \times 100。$$

质膜完整性:采用低渗膨胀法,提前预热低渗溶液和离心管,取精子悬液 10  $\mu\text{L}$  于离心管中,再添加 100  $\mu\text{L}$  的低渗溶液,37.5  $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 30 min。取 10  $\mu\text{L}$  的精液混合液抹片,自然风干后,置于荧光正置显微镜 (400 倍) 下拍照,随机选取四角及中部视野,计数 300 个精子。

$$\text{质膜完整率 (\%)} = \frac{\text{质膜完整精子数}}{\text{精子总数}} \times 100。$$

精子总数)  $\times 100$ 。

#### 1.3.3 睾丸、附睾组织抗氧化性测定

取 200 mg 左右大小的睾丸、附睾组织,匀浆,分离上清。测定组织上清总抗氧化能力 (T-AOC)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性及丙二醛 (MDA) 含量,测定方法参考南京建成生物工程研究所试剂盒说明书。附睾稀释液参照金亚倩等<sup>[2]</sup>的方法配制,附睾稀释液参照金亚倩等<sup>[2]</sup>的方法配制,具体方法如下:称取 1 g 葡萄糖、8 g NaCl、1 g  $\text{NaHCO}_3$ 、200 mg KCl、265 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、533 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  和 65 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  溶于 500 mL 蒸馏水,定容至 1 000 mL,备用;TB Green<sup>TM</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 试剂盒、PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒购自 TaKaRa 公司。

#### 1.3.4 mRNA 表达量检测

采用 Trizol 法提取睾丸、附睾组织总 RNA,并检测 RNA 质量和完整性,再以 RNA 单链为模板,用 PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒合成 cDNA。SOD、CAT、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (*GPx4*)、*Nrf2*、核糖体蛋白 L13 (*RPL13*) (内参) 基因引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成,引物序列见表 2。以反转录产物 cDNA 为模板,用实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad CFX Connet<sup>TM</sup>, 788BR07190) 和 TB Green<sup>TM</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 试剂盒进行实时荧光定量 PCR,结果根据  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算。

表 2 基因引物序列  
Table 2 Primer sequences of genes

基因名称 Gene names	引物序列 Primer sequences (5'—3')	长度 Length/bp
超氧化物歧化酶 <i>SOD</i>	F: GGAGACCTGGGCAATGTGAA R: CCTCCAGCGTTTCCAGTCTT	182
谷胱甘肽过氧化物酶 4 <i>GPx4</i>	F: TCGCTGCTGGCTATAACGTC R: GACCATACCGCTATAACGTC	189
过氧化氢酶 <i>CAT</i>	F: GAGCCCACCTGCAAAGTTCT R: CTCCTACTGGATTACCGGCG	148
核因子 E2 相关因子 2 <i>Nrf2</i>	F: TGTGGAGGAGTTCAACGAGC R: CGCCGCCATCTTGTTCTTG	88
核糖体蛋白 L13 <i>RPL13</i>	F: GCAAAAAGGGCCAAGGAAGC R: CAAAGGTCAGACACACCCCA	155

## 1.4 数据分析

利用 Excel 2013 进行试验数据初步整理,采用 SAS 9.2 软件中 one-way ANOVA 进行方差分析,采用 Duncan 氏法进行多重比较, $P<0.05$  定义为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 GSPs 对公羔羊生长性能的影响

由表 3 可知,试验羊的初始体重相近,但 10GSPs 和 20GSPs 组的终末体重显著高于对照组 ( $P<0.05$ ),与 40GSPs 组差异不显著 ( $P>0.05$ )。10GSPs 和 20GSPs 组平均日增重和平均日采食量显著高于对照组和 40GSPs 组 ( $P<0.05$ ),40GSPs 组与对照组差异不显著 ( $P>0.05$ )。补饲 GSPs 对

料重比影响不显著 ( $P>0.05$ )。

### 2.2 GSPs 对公羔羊睾丸、附睾发育及精子指标的影响

由表 4 可知,GSPs 补饲组的附睾重均高于对照组 ( $P<0.05$ ),但睾丸重、睾丸指数及附睾指数在 4 组间无显著差异 ( $P>0.05$ );精子指标中,20GSPs 和 40GSPs 组的顶体完整率显著高于对照组和 10GSPs 组 ( $P<0.05$ ),质膜完整率有升高的趋势 ( $P=0.084$ ),20GSPs 和 40GSPs 组的精子畸形率显著低于对照组 ( $P<0.05$ ),但 10GSPs 组与对照组间差异不显著 ( $P>0.05$ )。同时,GSPs 补饲组精子活率和精子密度数值上有所升高,但组间差异不显著 ( $P>0.05$ )。

表 3 GSPs 对公羔羊生长性能的影响

Table 3 Effects of GSPs on growth performance of ram

项目 Items	组别 Groups				SEM	P 值 P-value
	对照 Control	10GSPs	20GSPs	40GSPs		
初始体重 IBW/kg	28.4	29.1	28.6	29.3	0.82	0.846
终末体重 FBW/kg	41.6 <sup>b</sup>	43.9 <sup>a</sup>	43.5 <sup>a</sup>	42.6 <sup>ab</sup>	0.70	0.049
平均日增重 ADG/(g/d)	280.4 <sup>b</sup>	314.1 <sup>a</sup>	315.9 <sup>a</sup>	283.6 <sup>b</sup>	10.21	0.040
平均日采食量 ADFI/(g/d)	1 885.1 <sup>b</sup>	2 010.6 <sup>a</sup>	1 994.0 <sup>a</sup>	1 874.6 <sup>b</sup>	31.74	0.012
料重比 F/G	6.76	6.42	6.31	6.65	0.210	0.430

同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著 ( $P>0.05$ ),不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。下表同。

In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ( $P>0.05$ ), while with different small letter superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ). The same as below.

表 4 GSPs 对公羔羊繁殖性能的影响

Table 4 Effects of GSPs on reproductive performance of ram

项目 Items	组别 Groups				SEM	P 值 P-value
	对照 Control	10GSPs	20GSPs	40GSPs		
睾丸重 Weight of testes/g	278.01	281.62	299.20	293.82	17.59	0.809
附睾重 Weight of epididymis/g	24.03 <sup>b</sup>	29.21 <sup>a</sup>	28.64 <sup>a</sup>	27.84 <sup>a</sup>	1.18	0.028
睾丸指数 Index of testes/(g/kg)	7.34	6.90	7.39	7.30	0.44	0.845
附睾指数 Index of pididymis/(g/kg)	0.63	0.74	0.71	0.69	0.03	0.205
顶体完整率 Acrosomal integrity/%	61.28 <sup>b</sup>	66.48 <sup>b</sup>	76.76 <sup>a</sup>	75.69 <sup>a</sup>	2.68	0.002
精子畸形率 Sperm deformity/%	27.58 <sup>a</sup>	24.75 <sup>ab</sup>	20.03 <sup>b</sup>	19.89 <sup>b</sup>	1.85	0.015
精子活率 Sperm motility/%	50.12	55.41	54.54	55.79	2.09	0.237
质膜完整率 Membrane integrity/%	0.44	0.42	0.50	0.50	0.03	0.084
精子密度 Sperm concentration/( $\times 10^5$ 个/mL)	89.89	88.91	105.57	101.50	5.93	0.108

### 2.3 GSPs 对公羔羊睾丸、附睾组织抗氧化性的影响

由表 5 可知,补饲 GSPs 后睾丸、附睾组织抗

氧化性均得到了不同程度的提升。睾丸组织中,20GSPs 和 40GSPs 组的 T-AOC 显著高于对照组和 10GSPs 组 ( $P<0.05$ ),10GSPs 组与对照组差异

不显著 ( $P>0.05$ ); 20GSPs 和 40GSPs 组的 CAT、GSH-Px 活性均显著高于对照组和 10GSPs 组, MDA 含量显著低于对照组和 10GSPs 组 ( $P<0.05$ ), 各组间 SOD 活性无显著差异 ( $P>0.05$ )。附睾组织中, 20GSPs 和 40GSPs 组的 T-AOC、GSH-Px 活性显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), 与

10GSPs 组差异不显著 ( $P>0.05$ )。GSPs 补饲组的 SOD 活性均显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), 而 20GSPs 和 40GSPs 组的 MDA 含量显著低于对照组和 10GSPs 组 ( $P<0.05$ ), CAT 活性在 4 组间无显著差异 ( $P>0.05$ )。

表 5 GSPs 对公羔羊睾丸、附睾组织抗氧化功能的影响

Table 5 Effects of GSPs on testicular and epididymis antioxidative function of ram

项目 Items	组别 Groups				SEM	P 值 P-value	
	对照 Control	10GSPs	20GSPs	40GSPs			
睾丸 Testis	总抗氧化能力 T-AOC/(U/mg)	1.21 <sup>b</sup>	1.34 <sup>b</sup>	1.91 <sup>a</sup>	1.81 <sup>a</sup>	0.09	<0.001
	过氧化氢酶 CAT/(U/mg)	3.37 <sup>b</sup>	3.60 <sup>b</sup>	4.38 <sup>a</sup>	3.92 <sup>ab</sup>	0.17	0.003
	超氧化物歧化酶 SOD/(U/mg)	4.91	5.27	6.01	5.90	0.32	0.072
	谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/(U/mg)	39.82 <sup>c</sup>	45.13 <sup>c</sup>	66.69 <sup>a</sup>	55.75 <sup>b</sup>	2.73	<0.001
	丙二醛 MDA/(nmol/mg)	0.84 <sup>a</sup>	0.60 <sup>b</sup>	0.42 <sup>c</sup>	0.47 <sup>c</sup>	0.03	<0.001
附睾 Epididymis	总抗氧化能力 T-AOC/(U/mg)	1.07 <sup>b</sup>	1.23 <sup>ab</sup>	1.41 <sup>a</sup>	1.38 <sup>a</sup>	0.07	0.009
	过氧化氢酶 CAT/(U/mg)	3.94	3.92	4.68	4.76	0.29	0.088
	超氧化物歧化酶 SOD/(U/mg)	5.91 <sup>b</sup>	7.51 <sup>a</sup>	8.46 <sup>a</sup>	8.28 <sup>a</sup>	0.45	0.004
	谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/(U/mg)	82.44 <sup>b</sup>	90.75 <sup>ab</sup>	108.02 <sup>a</sup>	105.32 <sup>a</sup>	5.81	0.020
	丙二醛 MDA/(nmol/mg)	0.86 <sup>a</sup>	0.73 <sup>a</sup>	0.40 <sup>b</sup>	0.42 <sup>b</sup>	0.06	<0.001

## 2.4 GSPs 对公羔羊睾丸、附睾 CAT、SOD、GPx4 和 Nrf2 mRNA 相对表达量的影响

由图 1-A 和图 1-B 可以看出, 补饲 GSPs 对睾丸组织中 CAT mRNA 相对表达量没有显著影响 ( $P>0.05$ ), 而 20GSPs 组的 SOD mRNA 相对表达量显著高于对照组和 10GSPs 组 ( $P<0.05$ ), 与 40GSPs 组差异不显著 ( $P>0.05$ )。由图 1-C 和图 1-D 可以看出, 40GSPs 组睾丸组织中 GPx4 mRNA 相对表达量显著高于对照组和 10GSPs 组 ( $P<0.05$ ), 与 20GSPs 组差异不显著 ( $P>0.05$ ); 而 Nrf2 mRNA 相对表达量在 4 组间无显著性差异 ( $P>0.05$ )。

在附睾组织中, 由图 2-A 可知, 补饲 GSPs 对附睾组织中 CAT mRNA 相对表达量的影响不显著 ( $P>0.05$ )。从图 2-B 至图 2-D 可知, 补饲 GSPs 可以不同程度地提高附睾组织中 SOD、GPx4 和 Nrf2 mRNA 相对表达量。其中, 20GSPs 和 40GSPs 组 SOD mRNA 相对表达量显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), 与 10GSPs 组差异不显著 ( $P>0.05$ ); 3 个 GSPs 补饲组附睾组织中 GPx4 mRNA 相对表达量均显著高于对照组 ( $P<0.05$ ); 20GSPs 和

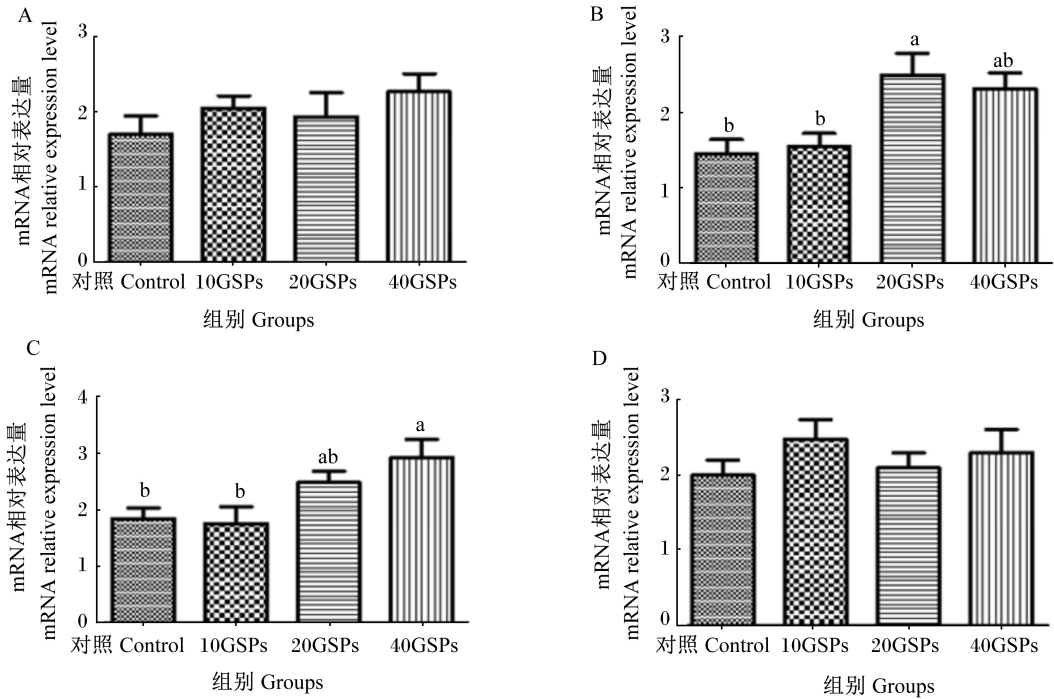
40GSPs 组 Nrf2 mRNA 的相对表达量显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), 且 20GSPs 与 10GSPs 组差异不显著 ( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

在集约化饲养模式下, 畜禽生产效率大幅度提高, 但同时出现了种畜繁殖障碍、发病率高、畜产品品质下降等系列问题, 这可能与动物机体氧化应激有关。畜禽机体氧化应激的产生可能源于饲养环境、饲料结构、运输等因素。研究表明, 高密度饲养条件会导致肉鸡采食量和生长速度显著下降<sup>[6]</sup>; 公羊限位饲养会引起精液品质下降, 睾丸组织中 MDA 和活性氧 (ROS) 含量显著升高<sup>[2]</sup>。反刍动物生产中常利用高精料饲料维持高生长性能, 但高精料也会造成动物机体氧化应激。侯志高等<sup>[7]</sup>研究发现, 反刍动物饲料中精料比例超过 55%, 机体的抗氧化能力开始下降, 且精料水平越高, 机体清除自由基能力越弱。因为采食过高比例精料饲料引发亚急性瘤胃酸中毒时会降低公牛血清睾酮含量, 影响精子发生和发育, 降低公牛繁殖能力和使用年限<sup>[8]</sup>。公畜睾丸组织极易受到氧

化损伤,引发生精障碍,导致睾丸指数和精子密度降低,畸形率升高<sup>[1]</sup>。前人研究表明,白藜芦醇<sup>[9]</sup>、原花青素<sup>[10-11]</sup>、茶多酚<sup>[12]</sup>等天然抗氧化剂不仅可以促进动物生长,而且可以缓解大鼠和猪睾丸组织的氧化损伤,提高组织抗氧化能力,改善

繁殖性能。本研究中,以精粗比 7:3 的高精料饲料诱发试验羊机体氧化应激,饲喂适量 GSPs 后生长性能显著提升,睾丸和附睾抗氧化性能显著提高,表明 GSPs 可以提高绵羊机体抗氧化能力。



数据柱标注无字母或相同小写字母表示差异不显著 ( $P>0.05$ ),不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。下图同。

Value columns with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ( $P>0.05$ ), while with different small letter superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ). The same as below.

图1 GSPs对公羔羊睾丸组织中CAT(A)、SOD(B)、GPx4(C)和Nrf2(D)mRNA相对表达量的影响

Fig.1 Effects of GSPs on mRNA relative expression levels of CAT (A), SOD (B), GPx4 (C) and Nrf2 (D) in testis of ram

研究发现,饲喂适量的多酚类植物提取物益于动物生长和健康<sup>[13-14]</sup>,但饲喂量过高则会抑制动物采食量,扰乱消化生理,抑制营养消化和生长<sup>[15]</sup>。研究发现,在育肥肉羊饲料中分别添加10%和20%葡萄渣,10%组试验羊的日增重较对照组提高38%,20%组与对照组差异不显著<sup>[16-17]</sup>,说明饲料中添加适量的多酚类物质可以提高动物生长性能,但高剂量多酚效果不佳。本试验中,10GSPs和20GSPs组平均日增重和平均日采食量均显著高于对照组,一方面原因可能是GSPs作为天然的抗氧化物质能够有效清除体内自由基,降低绵羊饲养过程中受到的各种氧化应激,改善机体健康状况;另一方面可能是因为酚类物质降低了饲料蛋白质在瘤胃中的降解率,进而增加了小

肠中可消化饲料蛋白质的比例<sup>[18]</sup>,从而为机体提供了更多的代谢蛋白。反刍动物摄入过多的酚类物质会抑制瘤胃微生物生长和繁殖,降低饲料消化率,不利于动物生长<sup>[15,19]</sup>。因此,本试验中40GSPs组试验羊的平均日增重显著低于10GSPs和20GSPs组可能是该组绵羊瘤胃微生物受到抑制,饲料消化率降低所致。

器官重量和器官指数一定程度上反映了器官的发育和功能状况,对理论研究和指导生产实践均有重要的意义。附睾是精子发育和成熟的重要场所,附睾中精子的密度、活力反映了动物精液品质,本研究结果表明各组试验羊睾丸重量和指数差异不显著,但补饲GSPs显著提高了附睾重量,20GSPs和40GSPs组试验羊的精子顶体完整率显

显著高于对照组,畸形率显著低于对照组,质膜完整率也有升高的趋势,说明补饲 GSPs 有利于提高绵羊精液品质。金亚倩等<sup>[2]</sup>研究表明,饲料中添加酿酒葡萄皮渣可以显著提高绵羊精子密度和活力,且精子密度和活力均高于本试验结果,可能是本试验中绵羊月龄相对偏小、器官发育程度较低所致。关于多酚对小鼠生殖功能影响方面的研究也表明植物多酚在调节雄性动物生殖器官发育和

功能、改善繁殖性能方面有重要作用,如白藜芦醇可以缓解睾丸扭转导致的生殖细胞凋亡<sup>[20]</sup>;原花青素可以提高小鼠精子活力,降低畸形率,能够改善反式脂肪酸所致的小鼠生殖细胞损伤<sup>[10]</sup>;茶多酚可以缓解丙烯酰胺对雄性小鼠的生殖损伤<sup>[21]</sup>。然而,目前关于多酚类植物提取物缓解雄性动物生殖器官氧化应激和改善精液品质的机理并不十分清楚。

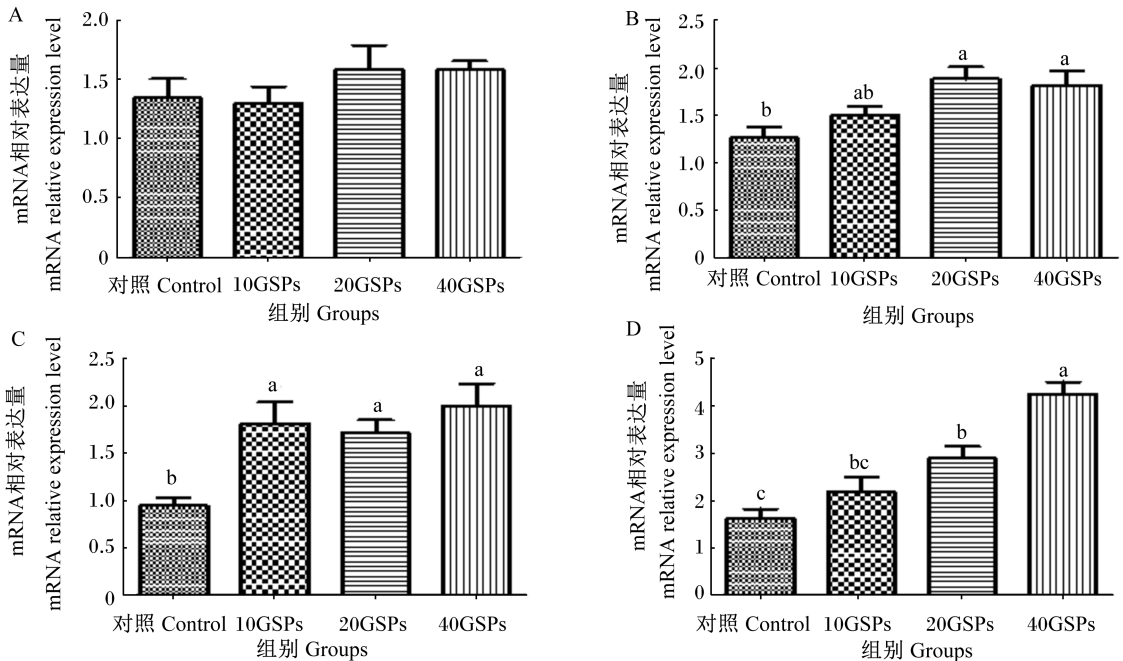


图2 GSPs对公羔羊附睾组织中CAT(A)、SOD(B)、GPx4(C)和Nrf2(D)mRNA相对表达量的影响

Fig.2 Effects of GSPs on mRNA relative expression levels of CAT (A), SOD (B), GPx4 (C) and Nrf2 (D) in epididymis of ram

动物机体发挥抗氧化功能主要依赖于机体抗氧化体系,包括非酶抗氧化物体系和抗氧化酶体系,CAT、SOD和GSH-Px是机体主要的抗氧化酶。SOD是体内唯一以 $O_2^-$ 为反应底物的酶,能够专一性地将 $O_2^-$ 歧化为 $H_2O_2$ 和 $H_2O$ ,从而在机体抗氧化和抗衰老方面发挥重要作用<sup>[22]</sup>;CAT是一种由4个相同亚基组成的高铁血晶素酶,在体内可以将 $H_2O_2$ 分解为 $O_2$ 和 $H_2O$ ,保护细胞免受过氧化物的损害;GSH-Px是机体内广泛存在的一类重要的含硒抗氧化酶,可以将过氧化物还原成无毒的羟基化合物或水,从而发挥保护细胞膜结构和功能的作用。GPx4是磷脂型GSH-Px,在大多数组织中表达,且主要存在于睾丸中<sup>[23]</sup>,是目前已知的唯一能够直接减少细胞膜内磷脂过氧化氢并

抑制脂质过氧化的一种抗氧化酶<sup>[24]</sup>。脂质过氧化可以严重影响精液品质<sup>[25]</sup>,抗氧化酶对清除体内代谢产生的自由基、减轻氧化损伤、抵抗脂质过氧化具有重要作用。研究发现,在绵羊饲料中添加葡萄皮渣可以提高肌肉<sup>[26]</sup>和睾丸<sup>[2]</sup>组织中SOD和GPx4活性,同时上调SOD、GPx4、Nrf2基因和蛋白的表达量。组织中MDA的含量可以有效地反映组织遭受氧化应激的程度,本试验中睾丸和附睾组织中MDA含量随着GSPs补饲量的增加显著降低,CAT、SOD和GSH-Px活性则显著升高或有升高的趋势,说明GSPs可以通过提高组织的抗氧化酶活性而提升机体自由基的清除效率,缓解机体脂质过氧化反应。此外,睾丸和附睾组织中SOD和GPx4 mRNA相对表达量较对照组显著升

高,说明 GSPs 可能从转录水平调控抗氧化酶的表达,这与 Zhao 等<sup>[27]</sup>研究结果较为一致。王友良等<sup>[11]</sup>研究原花青素对反式脂肪酸致雄性小鼠生殖损伤的保护作用,结果表明 GSPs 可以显著增加染毒后小鼠睾丸组织 SOD 活性,降低损伤后小鼠睾丸组织 MDA 含量,与本试验结果相类似。已有研究表明,精浆铜锌超氧化物酶(CuZn-SOD)的活性与精液品质呈正相关关系<sup>[28]</sup>,与本试验所得结果一致,说明睾丸和附睾组织抗氧化能力的提高可能是改善其精液品质的关键因素。

Nrf2 是启动抗氧化反应元件的转录因子,可以促进抗氧化酶和 II 相解毒酶的表达<sup>[29]</sup>。Zhong 等<sup>[30]</sup>在山羊饲料中添加茶多酚,结果表明茶多酚直接作用于 Keap1 (Nrf2 在细胞质中的结合蛋白),促进抗氧化酶表达,缓解了山羊骨骼肌的氧化损伤。GSPs 可以显著提高由高糖诱导氧化损伤的 HUVEC-12 细胞 *Nrf2* 和下游区 *GSH-Px*、血红素氧合酶-1 和醌氧化还原酶 1 基因的表达量,表明 GSPs 可以通过激活 Nrf2-ARE 通路缓解高糖诱导的氧化应激损伤<sup>[31]</sup>。本试验中,饲料中添加 GSPs 没有影响睾丸组织 *Nrf2* mRNA 的相对表达量,与 Zhao 等<sup>[27]</sup>研究结果一致,但 GSPs 显著提高附睾组织 *Nrf2* mRNA 表达量,与金亚倩<sup>[32]</sup>研究结果一致,表明 GSPs 可能是通过 Nrf2 转录因子调控和缓解附睾氧化应激而改善精液品质。此外,睾丸和附睾组织中基因的差异性表达可能由基因本身表达部位特异性决定,这需要进一步深入研究。

## 4 结论

补饲 GSPs 后,绵羊生长性能提高,附睾显著增加,精液品质提升,睾丸和附睾组织中 MDA 含量显著降低,CAT、SOD 和 GSH-Px 活性升高,睾丸组织中 SOD 和 GPx4 及附睾组织中 SOD、GPx4、*Nrf2* mRNA 相对表达量显著提高。综上所述, GSPs 可以促进绵羊生长,提高睾丸和附睾组织抗氧化能力,进而改善精液品质,提高繁殖性能。在本试验条件下, GSPs 最适补饲量为 20 mg/kg BW。

## 参考文献:

[1] RASOOLI A, JALALI M T, NOURI M, et al. Effects of chronic heat stress on testicular structures, serum testosterone and cortisol concentrations in developing

lambs [J]. *Animal Reproduction Science*, 2010, 117 (1/2): 55-59.

[2] 金亚倩,刘文忠,赵俊星,等.酿酒葡萄皮渣对单栏饲养方式下公绵羊繁殖性能及睾丸抗氧化性的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(11): 2228-2239.

[3] 施力光,赵春萍,曹婷,等.不同日粮精粗比对海南黑山羊抗氧化性能的影响[J]. *中国草食动物科学*, 2015, 35(1): 29-31.

[4] KIM H S, QUON M J, KIM J A. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate [J]. *Redox Biology*, 2014, 2: 187-195.

[5] 师维.原花青素对玉米赤霉烯酮诱导小鼠睾丸支持细胞氧化损伤的保护作用[D].硕士学位论文.沈阳:沈阳农业大学,2017.

[6] 厉秀梅.饲养密度与偏热环境对肉鸡骨骼和肌肉生长、氧化及肠道形态的影响[D].硕士学位论文.北京:中国农业科学院,2018.

[7] 侯志高,王振勇,柴同杰,等.不同精粗比日粮对奶牛机体氧化应激和瘤胃内环境稳定性的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(4): 455-459.

[8] CALLAGHAN M J, MCAULIFFE P, RODGERS R J, et al. Subacute ruminal acidosis reduces sperm quality in beef bulls [J]. *Journal of Animal Science*, 2016, 94(8): 3215-3228.

[9] 张晓春,陈指龙,方娟,等.白藜芦醇通过沉默调节蛋白 1-解偶联蛋白 2 信号通路降低小鼠睾丸间质细胞 TM3 的氧化损伤[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(7): 2632-2640.

[10] 常旭红,田敏敏,张琼,等.葡萄籽原花青素对顺铂引起大鼠睾丸损伤的保护机制[C]//中国毒理学会第七次全国会员代表大会暨中国毒理学会第六次中青年学者科技论坛论文摘要.重庆:中国毒理学会,2018.

[11] 王友良,甘功友,张冬初,等.原花青素对反式脂肪酸致雄性小鼠生殖损伤的保护作用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(20): 5365-5369.

[12] 郑燕,杨明建,申海玉,等.茶多酚对 UVB 照射雄性小鼠生殖系统的保护作用[J]. *河北工业大学学报*, 2012, 41(3): 19-23.

[13] 李永义,段绪东,赵娇,等.茶多酚对氧化应激仔猪生长性能和免疫功能的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2011, 47(15): 53-57.

[14] 王凯,王洋,孙娟娟,等.苜蓿和红车轴草黄酮提取物对绵羊生长性能和血液相关指标的影响[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(4): 704-709.



- [15] 潘发明,李发弟,郝正里,等.茶渣单宁含量对绵羊养分消化利用与氮代谢参数的影响[J].畜牧兽医学报,2012(1):75-85.
- [16] ZHAO J X, LI Q, ZHANG R X, et al. Effect of dietary grape pomace on growth performance, meat quality and antioxidant activity in ram lambs[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2018, 236: 76-85.
- [17] 金亚倩,郝松华,赵俊星,等.日粮中添加葡萄皮渣对绵羊生长性能、器官指数及血液生化指标的影响[J].中国畜牧兽医,2016,43(9):2326-2332.
- [18] 潘发明,李发弟,郝正里,等.茶渣单宁含量对绵羊养分消化利用与氮代谢参数的影响[J].畜牧兽医学报,2012,43(1):71-81.
- [19] 赵梦迪,邸凌峰,唐泽宇,等.单宁与饲用纤维素酶对湖羊瘤胃微生物菌群的影响[J].中国畜牧兽医,2019,46(1):112-122.
- [20] BITGUL G, TEKMEK I, KELES D, et al. Protective effects of resveratrol against chronic immobilization stress on testis [J]. *ISRN Urology*, 2013, 2013: 278720.
- [21] YASSA H A, GEORGE S M, REFAIY A E R M, et al. *Camellia sinensis* (green tea) extract attenuate acrylamide induced testicular damage in albino rats[J]. *Environmental Toxicology*, 2014, 29(10): 1155-1161.
- [22] 王秋林.机体氧化还原状态的研究[D].博士学位论文.成都:四川大学,2005.
- [23] 张建新,王茜,荀文娟,等.*GPxs* 家族基因在山羊不同组织和睾丸不同发育时期的表达特性研究[J].畜牧兽医学报,2011,42(5):650-657.
- [24] SNEDDON A A, WU H C, FARQUHARSON A, et al. Regulation of selenoprotein *GPx4* expression and activity in human endothelial cells by fatty acids, cytokines and antioxidants [J]. *Atherosclerosis*, 2003, 171(1):57-65.
- [25] ALVAREZ J G, STOREY B T. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility[J]. *Biology of Reproduction*, 1982, 27(5):1102-1108.
- [26] 赵俊星,刘向东,金亚倩,等.日粮中添加酿酒葡萄渣对绵羊肉质及肌肉抗氧化性的影响[J].畜牧兽医学报,2017,48(8):1481-1490.
- [27] ZHAO J X, JIN Y Q, DU M, et al. The effect of dietary grape pomace supplementation on epididymal sperm quality and testicular antioxidant ability in ram lambs[J]. *Theriogenology*, 2017, 97:50-56.
- [28] 任有蛇,秦小伟,郭丽娜,等.日粮纳米锌水平对公羊睾丸和附睾 *Cu-ZnSOD* 表达的影响[J].畜牧兽医学报,2014,45(10):1622-1630.
- [29] MCMAHON M, ITOH K, YAMAMOTO M, et al. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(24):21592-21600.
- [30] ZHONG R Z, XIAO W J, ZHOU D W, et al. Effect of tea catechins on regulation of cell proliferation and antioxidant enzyme expression in  $H_2O_2$ -induced primary hepatocytes of goat *in vitro* [J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2013, 97(3):475-484.
- [31] 张婷,刘瑞,宋小锋,等.葡萄籽原花青素通过 Nrf2/ARE 信号通路抗高糖诱导的 HUVEC-12 细胞氧化损伤[J].天然产物研究与开发,2017,29(8):1265-1269.
- [32] 金亚倩.日粮中添加酿酒葡萄皮渣对公绵羊繁殖性能及睾丸、附睾抗氧化性的影响[D].硕士学位论文.晋中:山西农业大学,2016.

## Effects of Grape Seed Procyanidins on Growth Performance, Semen Quality, Antioxidant Indexes in Testis and Epididymis of Ram

MU Chuntang YANG Wenjun WANG Pengju REN Guodong JU Hao REN Youshe  
HAO Xiaoyan\* ZHANG Jianxin\*

(College of Animal Science and Technology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

**Abstract:** The aim of this experiment was to investigate the effects of feeding grape seed procyanidins (GSPs) on growth performance, semen quality, testis and epididymis antioxidant indexes of male lambs. A total of forty-eight 4-month-old Dorper (♂) × small Tail Han sheep (♀) F1 male lambs with similarly weight of (22.75 ± 1.2) kg were randomly selected and divided into 4 groups equally. All the lambs fed a basal diet and supplemented with 0 (control group), 10 (10GSPs group), 20 (20GSPs group) and 40 mg/kg BW (40GSPs group) GSPs, respectively. The experiment was conducted over 60 d, with the first 15 d for adaptation and 45 d for test. The results showed as follows: 1) average daily gain (ADG) and average daily feed intake (ADFI) in 10GSPs and 20GSPs groups were significantly higher than those in the control group and 40GSPs group ( $P < 0.05$ ), with no significant difference between 40GSPs group and control group ( $P > 0.05$ ). No significant difference was observed in feed conversion ratio among GSPs groups ( $P > 0.05$ ). 2) The weight of epididymis in the GSPs groups was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ), and the indexes of testis and epididymis had no significant difference among the four groups ( $P > 0.05$ ). The acrosome integrity in 20GSPs and 40GSPs groups was significantly higher than that in 10GSPs and control groups ( $P < 0.05$ ), and the rate of sperm malformation in 20GSPs and 40GSPs groups was significantly lower than that in control group ( $P < 0.05$ ). 3) The activity of total antioxidant capacity (T-AOC) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in testis and epididymis in 20GSPs and 40GSPs groups were significantly higher than those in control group ( $P < 0.05$ ). The superoxide dismutase (SOD) activity in epididymis in three GSPs groups was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ), and the malonaldehyde (MDA) content in the testis and epididymis in 20GSPs and 40GSPs groups was significantly lower than that in 10GSPs group and control group ( $P < 0.05$ ). 4) In testis, the relative expression levels of *SOD* mRNA in 20GSPs group and glutathione peroxidase 4 (*GPx4*) mRNA in 40GSPs group were significantly higher than those in 10GSPs group and control group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference among four groups in the relative expression levels of catalase (*CAT*) and nuclear factor E2 correlation factor 2 (*Nrf2*) mRNA ( $P > 0.05$ ). In epididymis, the relative expression levels of *SOD* mRNA in 20GSPs and 40GSPs groups was significantly higher than that in control group ( $P < 0.05$ ), but had no significant difference compared with 10GSPs group ( $P > 0.05$ ). The relative expression level of *GPx4* mRNA in three GSPs groups was significantly higher than that in control group ( $P < 0.05$ ). Additionally, the relative expression level of *Nrf2* mRNA in 20GSPs and 40GSPs groups was significantly higher than that in control group ( $P < 0.05$ ). In summary, dietary supplementation of GSPs can promote the growth and improve the antioxidant status of testis and epididymis of ram, thereby improving semen quality. The optimal GSPs supplemental level is 20 mg/kg BW under the condition of this experiment. [ *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(5):2241-2250 ]

**Key words:** grape seed procyanidins; testis; epididymis; semen quality; antioxidant function

\* Corresponding authors: HAO Xiaoyan, associate professor, E-mail: haoxiaoyan1990@sina.com; ZHANG Jianxin, professor, E-mail: ypzjx@