

低温冷冻保存对猪精子的影响

柴瑞兰^{1,2}, 黄清松^{1,2}, 徐晶^{1,2}, 武艺^{1,2}, 刘春霞^{1,2}, 李璐^{1,2}, 王申元^{1,2}, 凌宇^{1,2},
张焱如^{1,2}, 周欢敏^{1,2}, 韩雪峻^{3*}, 曹俊伟^{1,2*}

¹内蒙古农业大学生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特

²内蒙古自治区生物制造重点实验室, 内蒙古 呼和浩特

³上海祥欣畜禽有限公司, 上海

Email: 1943343773@qq.com, *710513544@qq.com, *caojunwei1970@163.com

收稿日期: 2021年7月2日; 录用日期: 2021年7月28日; 发布日期: 2021年8月5日

摘要

精子长期保存的最佳方法是低温冷冻保存, 该方法具有保存时间长、生产成本低等优点。在养猪生产中广泛使用此项技术对精子进行长期保存, 但由于猪精子质膜上的胆固醇/磷脂较低, 所以较其他物种更容易受到低温的损伤, 从而导致冷冻后的猪精子活力降低、受精率降低。本文就低温冷冻保存对猪精子超微结构、能量代谢等方面的影响进行了综述, 阐明冻融精子的损伤机理, 为提高冻精的活力奠定基础。

关键词

猪精子, 低温冷冻保存

Effect of Cryopreservation on Pig Sperm

Ruilan Chai^{1,2}, Qingsong Huang^{1,2}, Jing Xu^{1,2}, Yi Wu^{1,2}, Chunxia Liu^{1,2}, Lu Li^{1,2},
Shenyuan Wang^{1,2}, Yu Ling^{1,2}, Yanru Zhang^{1,2}, Huanmin Zhou^{1,2}, Xuejun Han^{3*},
Junwei Cao^{1,2*}

¹College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot Inner Mongolia

²Key Laboratory of Biological Manufacturing in Inner Mongolia, Hohhot Inner Mongolia

³Shanghai Xiangxin Livestock and Poultry Co., Ltd., Shanghai

Email: 1943343773@qq.com, *710513544@qq.com, *caojunwei1970@163.com

Received: Jul. 2nd, 2021; accepted: Jul. 28th, 2021; published: Aug. 5th, 2021

Abstract

The best method for long-term storage of semen is cryopreservation, which has the advantages of

*通讯作者。

文章引用: 柴瑞兰, 黄清松, 徐晶, 武艺, 刘春霞, 李璐, 王申元, 凌宇, 张焱如, 周欢敏, 韩雪峻, 曹俊伟. 低温冷冻保存对猪精子的影响[J]. 生物过程, 2021, 11(3): 38-45. DOI: 10.12677/bp.2021.113005

long storage time and low production cost. This technology is widely used in pig production for long-term preservation of sperm. But due to the low cholesterol/phospholipid on the plasma membrane of pig sperm, therefore, compared with other species, they are more vulnerable to low temperature damage, resulting in decreased sperm motility and fertilization rate. In this paper, the effects of cryopreservation on the ultrastructure and energy metabolism of porcine sperm were reviewed, and the damage mechanism of frozen thawed sperm was elucidated, so as to lay a foundation for improving the vitality of frozen sperm.

Keywords

Pig Sperm, Cryopreservation

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 研究背景

精子低温冷冻保存,是指将采精后的精液经检查、稀释后分装于冷冻细管中,再进行降温,后使用干冰或液氮冷冻,冷冻后再贮于 -196°C 的液氮罐中,进行长期保存。在进行人工授精(Artificial insemination, AI)或体外授精(*In vitro* fertilization, IVF)时,采用 37°C , 30 s 进行解冻[1]。家畜动物精子冷冻保存可以有效地提高优质品种公畜的资源利用率并且可以加速其育种过程,节约成本且不受地域、时间的限制,可以很好地发挥各个品种公畜的遗传潜力[2]。

目前,人[3]、小鼠[4]、牛[5]等精子超低温冷冻保存技术已得到迅速发展,并建立起了商业冷冻精子库,但猪的冻精技术还未得到广泛应用。猪精子中脂质含量相对较高,且质膜上的胆固醇/磷脂比例较低,致使精子抗低温损伤能力减弱,冻融后精子活力、质膜及顶体完整率显著降低[6]。有效冷冻保存的精液可以保存优良种质资源,改良品种,但是猪精子对低温异常敏感,导致在冷冻过程中会受到一定程度的损伤,这给猪精子的冷冻保存带来很大的困扰。

猪精子通常分为头部、颈部和尾部三个部分(如图 1 所示),长度约 50~60 μm 。精子是含有遗传物质、表面由质膜覆盖、具有活动能力的雄配子。1) 头部长约 8.5 μm ; 形状为扁卵圆形,由细胞核、顶体和质膜构成。细胞核内含遗传物质 DNA; 顶体呈帽状双层结构,位于质膜下,内含多种与受精有关的酶; 质膜是位于精子头部最外层的膜结构。2) 颈部位于头部的基部,是头尾相接的部分。3) 精子尾部是代谢和运动器官,是精子最长的部分。根据其结构不同又分为中段(约 10 μm)、主段(约 30 μm)和尾段(2~5 μm),有一条贯穿全尾的轴丝[7]。轴丝是由 9 个双连微管和 2 个单连微管组成的中心复合体,在横截面上呈保守的“9+2”结构排列[8](如图 2 所示)。中段内含线粒体,是精子分解营养物质,产生能量的主要部分,由颈部延伸而来。

2. 低温冷冻保存对精子超微结构的影响

2.1. 对顶体的影响

顶体是由高尔基体小泡发育而来的特化溶酶体,位于精子头部最前端。精子受精能力的前提条件是顶体的完整性。羊建平[9]实验证明,在扫描电镜下,新鲜的猪精子(图 3(a)、图 3(b))头、颈、尾结构完整; 顶体结构完整,边界清晰,边缘整齐,局部无隆起,表面无空洞。冻融后,猪精子头部和颈部发生

全部或部分断裂(图 3(c)~(e)), 颈部肿胀(图 3(e)); 顶体结构损伤或消失(图 3(f))。

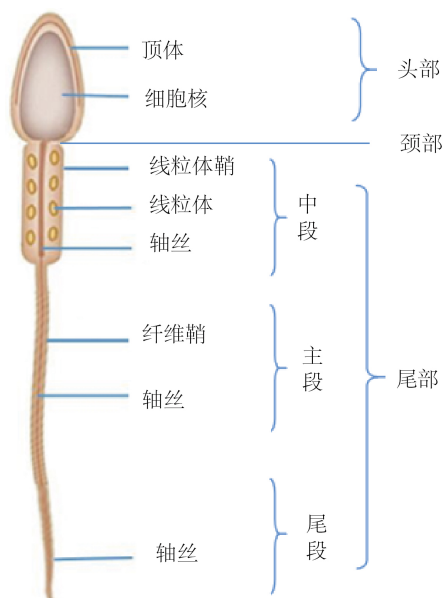
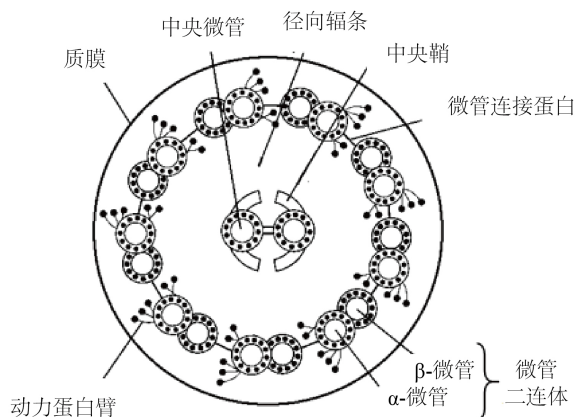


Figure 1. Structure of pig sperm

图 1. 猪精子结构



注: 图片引自网络。

Figure 2. "9 + 2" structure of axial wire cross section

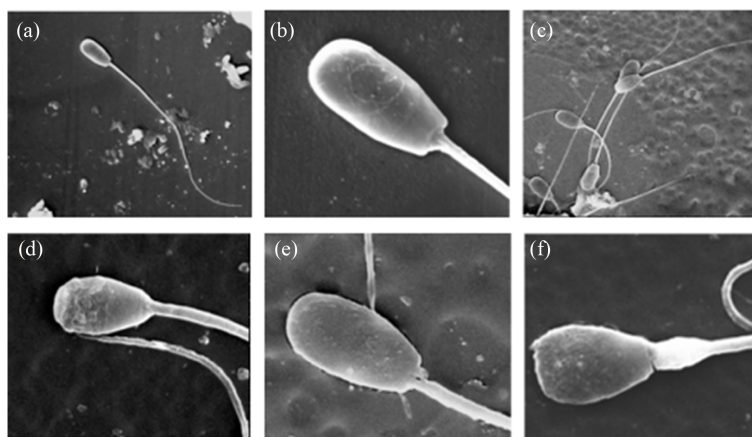
图 2. 轴丝横截面 "9 + 2" 结构

精子的受精能力与精子的形态结构密切相关[10]。顶体内含有透明质酸酶、酸性磷酸酶、顶体酶、ATP 酶和等多种与受精相关的酶[11]。精卵融合前精子必须发生顶体反应, 顶体酶才能发挥作用[12]。可见, 完整的顶体结构是正常顶体反应的基础。

2.2. 对鞭毛的影响

鞭毛, 也就是精子的尾部, 是精原干细胞经过有丝分裂、减数分裂之后, 在精子变态发育过程中形成的[7]。鞭毛是精子的代谢与运动器官[13], 与精子的运动能力有密切关系, 而精子的运动能力是完成受精的重要前提条件。精子进入阴道后, 需要很长时间才能与卵子结合形成受精卵。精子运动功能与精

子结构紧密相关，只有结构正常的精子才具有良好的运动功能和受精能力。当精子的活力低下、尾部形态异常或行动方向不规律都会导致雄性不育。全球约有 15% 的育龄夫妇无法正常生育，一半原因是男方精子形态异常导致的[14]。研究表明，原发性纤毛运动障碍或称原发性纤毛不动综合征(primary ciliary dyskinesia, PCD)是由精子鞭毛的超微结构缺陷，从而引起精子活力异常，导致精子失活[15]。

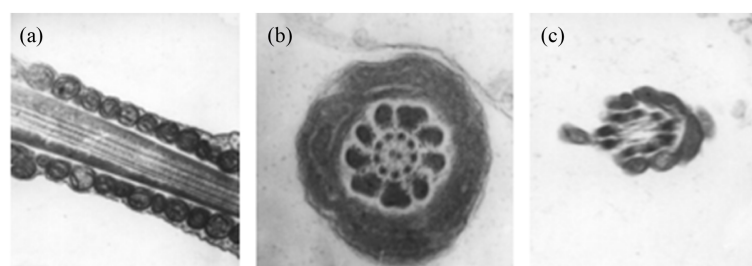


(a) (b) 新鲜精子; (c)~(f) 冷冻 - 解冻后精子

Figure 3. The ultrastructure of porcine sperm before and after cryopreservation was observed under scanning electron microscope [9]

图 3. 扫描电镜下，冷冻保存前后猪精子的超微结构[9]

冷冻会使鞭毛的超微结构造成一定程度的损伤，从而会使精子的活率降低。王亮等[16]通过实验证明，东北虎精液冷冻后造成会精子鞭毛损伤，电镜下，可以清楚地看到新鲜精子中段纵截面：线粒体呈念珠状般整齐而有序的排列在轴丝的两侧(图 4(a))；横截面：线粒体鞘的内侧包裹着“9+2”结构(见图 4(b))。冻融精子尾部出现质膜膨胀，破损及线粒体裸露在外等现象。在中段，质膜肿胀，横截面的线粒体相互嵌合式结构出现断裂倾向，有的甚至出现线粒体缺失(见图 4(c))。



注：(a) (b) 新鲜精子；(c) 冻融后精子；(a) 尾部中段纵切 30 K \times ；(b) 尾部中段横切 40 K \times ；(c) 中段横切，线粒体损伤 20 K \times 。

Figure 4. Under transmission electron microscope, the sperm tail of Siberian tiger changed before and after freezing and thawing [16]

图 4. 透射电镜下，东北虎精子尾部冻融前后的变化[16]

Ni-Hao Gu [8]等人使用透射电镜观察猪精子中段(图 5(a))、主段(图 5(b))和尾段(图 5(c))的横截面。徐慧明等[17]研究也证明，冷冻前人精子形态正常，细胞膜完整，顶体内、外膜结构清晰，鞭毛结构正常。冷冻后精子的损伤主要在顶体，电镜下可见顶体内、外膜间出现空隙，内膜与质膜相贴，鞭毛外膜不紧

密与鞭毛脱离。根据比较发现猪精子正常的鞭毛结构与东北虎、人一致，故推测冷冻损伤也会导致猪精子出现类似的情况。

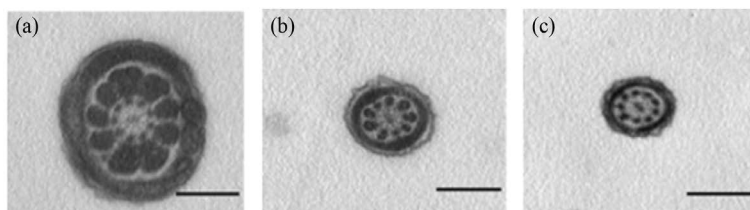


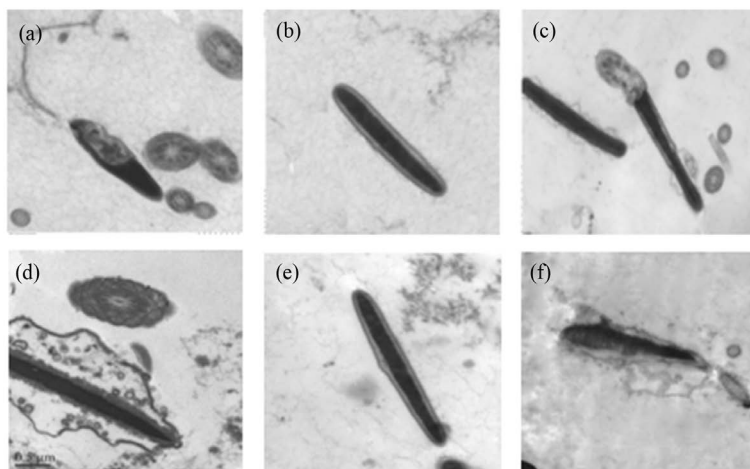
Figure 5. Cross section of fresh pig sperm flagella [8]

图 5. 新鲜猪精子鞭毛的横截面[8]

鞭毛是精子的运动器官，其摆动是精子向前活动的动力。鞭毛外周致密纤维和纤维鞘是保障精子可以向前运动的主要结构[18]，正常形态的鞭毛对精子运动和受精都十分重要，鞭毛异常可导致精子运动障碍，受精率低[19]。

2.3. 对质膜的影响

精子质膜不仅是精子头部的重要组成部分，也是最易损伤的部位，它可以保护精子头部内细胞器和细胞结构[11]。质膜的破裂会导致其内三磷酸腺苷(ATP)、代谢酶等相关组分流失，直至精子死亡[19]。精子质膜的结构完整，对于受精过程中获能、顶体反应、新陈代谢等都至关重要[20]。张斌[21]等人的实验结果表明，新鲜猪精子质膜、顶体外膜和核膜均完整(见图 6(a))；头部质膜和顶体外膜结合紧密(见图 6(b))。冻融后精子超微结构变化表现出：质膜轻度或极度膨胀(见图 6(c))，与顶体外膜分离(见图 6(d)、图 6(e))；有的甚至出现质膜缺失，发生内容物外露(见图 6(f))。



注：(a) (b) 新鲜精子；(c)~(f) 冻融后精子。(a) 精子结构完整(4 K \times)；(b) 头部质膜和顶体膜完整，核质均一(4 K \times)；(c) 质膜膨胀，顶体完好(25 K \times)；(d) 质膜膨胀，呈大泡状(40 K \times)；(e) 质膜与顶体外膜间隙增大(4 K \times)；(f) 质膜一侧缺失，内容物外露(2.5 K \times)。

Figure 6. The changes of plasma membrane structure of porcine sperm before and after cryopreservation were observed under transmission electron microscope [21]

图 6. 透射电镜下，猪精子冷冻前后的质膜结构变化[21]

有研究提出冷冻保存处理主要损伤精子头部的质膜与顶体[21]。质膜与顶体在顶体反应中的获能、释放顶体酶、溶蚀放射冠和透明带等的过程中扮演首要角色。

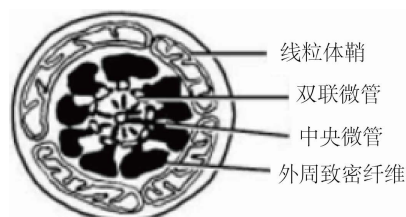
对精子超微结构的研究有助于进一步检测冷冻对精子的影响，为解决冷冻精子受精率低的原因提供理论依据。

3. 低温冷冻保存对能量代谢的影响

所有活细胞发育和发挥功能都需要能量，精子也不例外[22]。哺乳动物精子的代谢活动是维持其生命和运动的重要基础活动[23]。精子射入阴道内，在经宫颈管进入输卵管腔的过程中，生殖道分泌物中的 α 、 β 淀粉酶将精子顶体表面的糖蛋白降解，同时顶体膜结构中胆固醇与卵磷脂比率及膜电位发生变化，各种离子内流，精子变得极度活跃，这种现象称为获能(Capacitation)。因此，精子的获能是最终受精的先决条件。精子从能量代谢中获得大量ATP，变成极度活跃的状态[24]，来维持自身运动[25]。因此，精子能量代谢情况和运动能力可作为衡量精子质量的指标[26]。

在精子形成并最终成熟的过程中，丢弃大部分的细胞质，只保留了与部分代谢相关的细胞器与蛋白酶[27]。成熟的精子能够利用能量代谢底物比如果糖、甘露糖、葡萄糖、丙酮酸、乳酸和乙酸等进行代谢供能[28]，使用三磷酸腺苷(ATP)来维持细胞内环境，并用于成功受精所必需的细胞过程，如运动、获能、过度激活和顶体反应[29] [30]。一般来说，精子可以通两条代谢途径产生能量，即糖酵解和氧化磷酸化(也称线粒体呼吸)，前者发生在精子的头部和鞭毛的主段部分；后者发生在线粒体。许多精子的细胞质富含大量的乳酸，而且大多数哺乳动物的生殖道内也含有乳酸，因此科学家们推测，乳酸脱氢酶会催化乳酸转化成丙酮酸，之后丙酮酸进入线粒体，进行三羧酸循环(TCA)产能。也有实验证明，乳酸比葡萄糖更容易诱导哺乳动物精子获能[31]。因此，有学者认为，精子能量代谢的主要来源是氧化磷酸化。

如图7所示，位于精子尾部中段的线粒体鞘呈紧密螺旋状排列，包裹外周致密纤维，周边无多余胞质和其他细胞器。当受到外界损伤(理化损伤、冷热应激、冷冻损伤等)，线粒体极易受到损伤，导致线粒体功能受损[32]。同时，氧化磷酸化也是在线粒体上进行，当线粒体功能受损时，线粒体膜上电子传递链断裂，致使TCA停滞、ATP减少，造成精子出现能量匮乏与氧化受损[33]。



注：图片引自网络。

Figure 7. The cross section of the middle part of sperm tail

图7. 精子尾部中段的横截面

有研究表明，冻融后的精子因线粒体受到损伤，所以活力比新鲜精子低。傅龙龙[32]通过透射电镜观察到人的精子冷冻后，精子线粒体结构疏松，线粒体嵴增宽，空泡样改变增多。可以说明线粒体形态改变会造成其功能的改变。ATP和线粒体膜电位(Mitochondrial membrane potential, MMP)也是衡量线粒体功能的重要指标，与精子存活率、活力和受精率成线性相关[34]。MMP是线粒体在呼吸氧化过程中，在内膜中所产生的能量以电化学势能储存，导致膜两侧质子及其他离子浓度的不对称分布。MMP的稳定有利

于维持细胞的正常生理功能, 在进行氧化磷酸化、产生 ATP 的过程中其重要作用。MMP 降低说明线粒体的供能出现了障碍, ATP 就会减少。线粒体活性的改变会影响精子的受精能力[35] [36]。所以, 由于线粒体损伤造成的能量减少, 为精子冷冻损伤提供了一定的理论支持。

4. 小结与展望

冷冻后的猪精子容易出现顶体损伤、尾部结构异常、质膜膨胀或缺失、能量代谢障碍等一系列问题, 所以优化猪精子冻存方案和技术对于提高猪精子的活力是非常重要的[37] [38]。精子顶体结构的完整性是正常顶替反应的基础以及成功受精的关键; 正常形态的鞭毛是精子运动以及获能的关键; 精子是否存活的重要指标是质膜完整性[38]。精子的超微结构与受精能力密切相关[39]。精子代谢所需的能量主要由线粒体提供。

哺乳动物精子与畜牧业以及医药行业都息息相关, 是一直以来的研究热点。因此低温冷冻保存精子过程中减少精子冷冻损伤、提高精子冷冻复苏活率是目前需要解决的重要问题, 需从多层次、多角度了解低温冷冻保存对猪精子功能损害的机理, 提高冷冻精子质量, 使冻融后的精子得到广泛应用。

基金项目

资助项目: 校企合作项目(编号 2020XQ011)。

参考文献

- [1] 张树山. 猪精液冷冻保存技术研究[D]: [硕士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2006.
- [2] 赵娜, 甄林青, 胡启蒙, 王亮亮, 李新红. 超低温冷冻过程引起猪精子产生“似凋亡”变化[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(11): 1766-1774.
- [3] Hasegawa, A., Yonezawa, K., Ohta, A., *et al.* (2011) Optimization of a Protocol for Cryopreservation of Mouse Spermatozoa Using Cryotubes. *Journal of Reproduction and Development*, **58**, 156-161.
- [4] Anzar, M., *et al.* (2011) Cryopreservation of Bull Semen Shipped Overnight and Its Effect on Post-Thaw Sperm Motility, Plasma Membrane Integrity, Mitochondrial Membrane Potential and Normal Acrosomes. *Animal Reproduction Science*, **126**, 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.04.018>
- [5] Benson, J.D., Woods, E.J., Walters, E.M., *et al.* (2012) The Cryobiology of Spermatozoa. *Theriogenology*, **78**, 1682-1699. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.007>
- [6] Johnson, L.A., Weize, K.F., Fiser, P., *et al.* (2000) Storage of Boar Semen. *Animal Reproduction Science*, **62**, 143-172. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00157-3)
- [7] 王宵燕. 猪精子尾部发生相关基因的研究[D]: [博士学位论文]. 扬州: 扬州大学, 2013.
- [8] Gu, N.H., Zhao, W.L., Wang, G.S. and Sun, F. (2019) Comparative Analysis of Mammalian Sperm Ultrastructure Reveals Relationships between Sperm Morphology, Mitochondrial Functions and Motility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **17**, Article No. 66. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0510-y>
- [9] 羊建平, 武彩红, 赵旭庭, 周春宝, 姚静, 张斌, 郑筱峰. 冷冻保存对猪精子 DNA 完整性及形态结构的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 151-153.
- [10] Pesch, S. and Bergmann, M. (2006) Structure of Mammalian Spermatozoa in Respect to Viability, Fertility and Cryopreservation. *Micron*, **37**, 597-612. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.02.006>
- [11] 周佳勃, 岳顺利, 岳奎忠. 猪精子体外获能后其质膜完整性的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005(11): 32-33.
- [12] O'Flaherty, C., Rodriguez, P. and Srivastava, S. (2004) L-Arginine Promotes Capacitation and Acrosome Reaction in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta*, **24**, 215-221. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.06.020>
- [13] 王宵燕, 陈子璇, 张亚妮, 宋成义, 李碧春. Tektin3 基因在猪生殖系统发育中的表达规律研究[J]. 家畜生态学报, 2017, 38(12): 11-17.
- [14] Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G. and Krausz, C. (2012) European Association of Urology Working Group on Male Infertility. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. *European Urology*, **62**, 324-332. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.04.048>

- [15] Lobo, J., Zariwala, M.A. and Noone, P.G. (2015) Primary Ciliary Dyskinesia. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, **36**, 169-179. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546748>
- [16] 王亮, 刘洋, 刘丹, 马国庆, 刘玉堂. 东北虎精液冷冻及精子超微结构损伤的初步研究[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(3): 386-392.
- [17] 徐惠明, 张军荣, 富炜, 伏晓敏, 金爱华. 人精子冷冻前后超微结构及受精能力的变化[J]. 浙江预防医学, 2006, 18(3): 4-5.
- [18] 焦瑞宝, 唐吉斌, 姚余有. 弱精症相关基因、蛋白及酶学研究进展[J]. 实验与检验医学, 2016, 34(4): 473-476.
- [19] Krogenes, A., Andersen, B.K., Hafne, A.L., et al. (1994) Membrane Alterations in Bull Spermatozoa after Freezing and Thawing and after *in Vitro* Fertilization. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **35**, 17-26. <https://doi.org/10.1186/BF03548352>
- [20] 商学军, 王修来, 黄宇烽. 肉碱与男性生殖[J]. 中华男科学杂志, 2006, 12(8): 726-729.
- [21] 姜珊. 冷冻处理对牛、绵羊、山羊精子形态及受精能力的影响[D]: [硕士学位论文]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2019.
- [22] Du Plessis, S.S., Agarwal, A., Mohanty, G. and van der Linde, M. (2015) Oxidative Phosphorylation Versus Glycolysis: What Fuel do Spermatozoa Use? *Asian Journal of Andrology*, **17**, 230-235. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.135123>
- [23] 任康, 史文清, 路永强, 等. 不同保存条件对猪精子质膜、顶体及线粒体损伤的研究[J]. 猪业科学, 2014(4): 102-105.
- [24] 贺庆华, 林亚秋. 乳酸脱氢酶 C 与哺乳动物精子能量代谢[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(3): 1076-1077.
- [25] Cosson, J., Groison, A.L., Suquet, M., et al. (2008) Marine Fish Spermatozoa: Racing Ephemeral Swimmers. *Reproduction*, **136**, 277-294. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0522>
- [26] Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., et al. (1998) Determination of Semen Quality of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) by Sperm Motility, Seminal Plasma Parameters, and Spermatozoal Metabolism. *Aquaculture*, **163**, 163-181. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00243-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00243-9)
- [27] 朱振东. 猪精子能量代谢的调控机理研究[D]: [博士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2020.
- [28] Storey, B.T. (2008) Mammalian Sperm Metabolism: Oxygen and Sugar, Friend and Foe. *The International Journal of Developmental Biology*, **52**, 427-437. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072522bs>
- [29] Mannowetz, N., Wandernoth, P.M. and Wennemuth, G. (2012) Glucose Is a pH-Dependent Motor for Sperm Beat Frequency during Early Activation. *PLoS ONE*, **7**, e41030. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041030>
- [30] Mukai, C. and Travis, A.J. (2012) What Sperm Can Teach us about Energy Production. *Reproduction in Domestic Animals*, **47**, 164-169. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02071.x>
- [31] Rogers, B.J. and Yanagimachi, R. (1975) Retardation of Guinea Pig Sperm Acrosome Reaction by Glucose: The Possible Importance of Pyruvate and Lactate Metabolism in Capacitation and the Acrosome Reaction. *Biology of Reproduction*, **13**, 568-575. <https://doi.org/10.1095/biolreprod13.5.568>
- [32] 傅龙龙. 人精子冷冻复苏过程中能量代谢功能紊乱的相关机制研究[D]: [博士学位论文]. 北京: 中国医学科学院北京协和医学院, 2019.
- [33] Ruiz-Pesini, E., Díez-Sánchez, C., López-Pérez, M.J. and Enríquez, J.A. (2007) The Role of the Mitochondrion in Sperm Function: Is There a Place for Oxidative Phosphorylation or Is This a Purely Glycolytic Process? *Current Topics in Developmental Biology*, **77**, 3-19. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(06\)77001-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)77001-6)
- [34] Amaral, S., Tavares, R.S., Baptista, M., Sousa, M.I., Silva, A., Escada-Rebelo, S., Paiva, C.P. and Ramalho-Santos, J. (2016) Mitochondrial Functionality and Chemical Compound Action on Sperm Function. *Current Medicinal Chemistry*, **23**, 3575-3606. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160425113518>
- [35] Ericsson, S.A., Garner, D.L., Thomas, C.A., et al. (1993) Interrelationships among Fluorometric Analyses of Sperm Function, Classical Sperm Quality Parameters and the Fertility of Frozen-Thawed Bovine Sperm. *Theriogenology*, **39**, 1009-1024. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90002-M](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90002-M)
- [36] Gravance, C.G., Garner, D.L., Bamber, J., et al. (2000) Assessment of Equine Sperm Mitochondrial Function Using JC-1. *Theriogenology*, **53**, 1691-1703. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00308-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00308-3)
- [37] 马丽, 李青旺, 吴民耀. 二甲基亚砷对猪精液冷冻保存效果研究[J]. 动物医学进展, 2014, 35(5): 56-61.
- [38] 刘莉, 赵倩, 邱树磊, 郝福星, 吴植, 张斌, 武彩红, 郑筱峰. 冷冻保存前平衡温度对猪精子结构的影响[J]. 动物医学进展, 2017, 38(6): 38-42.
- [39] Pesch, S. and Bergmann, M. (2006) Structure of Mammalian Spermatozoa in Respect to Viability, Fertility and Cryopreservation. *Micron*, **37**, 597-612. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.02.006>