

# 不同类型添加剂对猪精液冷冻保存的影响及研究进展

柴瑞兰<sup>1,2</sup>, 韩娇艳<sup>1,2</sup>, 韩雪峻<sup>1,2</sup>, 姜红菊<sup>1,2</sup>, 李步社<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>上海祥欣畜禽有限公司, 上海

<sup>2</sup>上海种猪工程技术研究中心, 上海

收稿日期: 2023年4月21日; 录用日期: 2023年6月9日; 发布日期: 2023年6月21日

## 摘要

冷冻保护剂是猪精液冷冻稀释液的关键组分, 也是影响猪冻精质量的重要因素。冷冻保护剂能够有效缓解冷冻及复苏过程中对精子造成的损伤, 对猪精液冷冻效果起到决定性的作用。因此, 研究新型冷冻保护剂, 可以提高猪精液冷冻保存效果。本文就几种冷冻保护剂的功能以及应用进行论述, 以进一步提高猪冷冻精液的质量, 发挥其价值, 为相关研究以及生产实际应用提供理论参考。

## 关键词

猪, 精液, 冷冻保存

# Effects of Different Types of Additives on Cryopreservation of Pig Semen and Research Progress

Ruilan Chai<sup>1,2</sup>, Jiaoyan Han<sup>1,2</sup>, Xuejun Han<sup>1,2</sup>, Hongju Jiang<sup>1,2</sup>, Bushe Li<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Shanghai Xiangxin Livestock and Poultry Co., Ltd., Shanghai

<sup>2</sup>Shanghai Breeding Pig Engineering Research Center, Shanghai

Received: Apr. 21<sup>st</sup>, 2023; accepted: Jun. 9<sup>th</sup>, 2023; published: Jun. 21<sup>st</sup>, 2023

## Abstract

The cryoprotectant is a key component of the frozen diluent of pig semen, and is also an important factor affecting the quality of frozen pig semen. Cryoprotectants can effectively alleviate the damage

文章引用: 柴瑞兰, 韩娇艳, 韩雪峻, 姜红菊, 李步社. 不同类型添加剂对猪精液冷冻保存的影响及研究进展[J]. 生物过程, 2023, 13(2): 98-104. DOI: 10.12677/bp.2023.132014

caused to sperm during freezing and resuscitation, and play a decisive role in the freezing effect of porcine semen. Therefore, studying new cryoprotectants can improve the cryopreservation effect of pig semen. This article discusses the functions and applications of several cryoprotectants in order to further improve the quality and value of pig frozen semen, and provide theoretical references for related research and practical production applications.

## Keywords

Pig, Semen, Cryopreservation

Copyright © 2023 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

精液冷冻保存技术是随着人工授精技术发展起来的,是动物繁殖生产领域的一个重要里程碑[1]。冷冻精液主要有以下几个方面的优点:一是可以减少公畜的饲养量,节约成本;二是有效提高种公畜的利用率,且不受时间、地点的限制;最重要的是可以防止疾病传播,尤其是生殖道疾病。这不仅可以改良家畜品种,也是育种和保护珍稀濒危物种的有效手段[2] [3]。牛的冷冻精液试验成功至今约有 40 多年,在实际生产应用中得到了大力推广。而大量研究发现,猪冻精技术还存在很多难题尚未解决,猪精子对低温刺激比较敏感,导致解冻后的猪精子质膜的完整性以及线粒体活性下降,冷冻效果较差,制约了这项技术的发展及推广应用,其原因主要是解冻后的猪精子活率低、运动能力差、形态异常,导致受胎率较低、产仔数较少,远不及鲜精的效果。制约猪冻精的关键影响因素的是对其抗冻能力以及解冻后受精能力的维持没有妥善解决[4]。这就使猪人工授精技术的发展受阻,同时也在一定程度上限制了冷冻精液的商业化生产与应用[5]。中国拥有品种丰富的种猪资源,优良种公猪精液冷冻保存的研究及应用对于充分发挥优良种畜的遗传品质和遗传资源的保护具有非常重要意义[6]。

直到 1949 年英国科学家 Polge、Parkes 等发现甘油(丙三醇)对牛精子具有抗冻保护作用,家畜精液长期保存才有了技术上的重大突破。1956 年,Polge 等首次报道进行猪精液冷冻保存,并进行了人工授精试验[7]。但是国内对冷冻精液的研究相对缓慢,一直没有取得突破性进展[5]。1990 年开始,研究人员在稀释液、冷冻保护剂、冻精剂型、解冻液等方面取得了一些成果,但精子损伤、冷冻-解冻机制等多方面尚不完全清楚,仍处于摸索阶段[8] [9]。

冷冻保护剂可以提供一个能防止形成脂类过氧化物的环境,可能是稀释液对维持精子在冷冻保存时影响精子活率的关键因素之一[10]。在精子冷冻过程中,冷冻保护剂的选择非常关键,已经有实验证明,使用冷冻保护剂可以提高解冻后精子的存活率[11]。一般冷冻保护剂根据其是否可穿透细胞膜分为渗透性和非渗透性两类[12]。渗透性冷冻保护剂相对分子量较小,容易透过细胞膜到达细胞内部,主要包括甘油、乙二醇、丙二醇、甲醇等,甘油是目前应用最广泛的冷冻保护剂之一[13]。非渗透性冷冻保护剂的相对分子量一般较大,主要以单糖、双糖为主,所以在冷冻保存过程中不能渗入细胞内,主要通过增加细胞外液渗透压,促使细胞在冷冻时脱水,减少胞内冰晶形成,从而保护精子免受机械损伤[14]。在稀释液中加入此类物质,可以有效降低精子在低温冷冻过程中受到的冷冻损伤,从而提高精子的生物活性。

## 2. 研究内容

冷冻保护剂是猪精液冷冻稀释液的关键组分,能有效缓解冷冻及复苏过程中对精子造成的损伤,是

决定猪精液冷冻效果的重要因素, 研发新型冷冻保护剂是提高猪精液冷冻保存效果的有效措施[9]。传统的冷冻保护剂为乙二醇(HDO)、卵黄、甘油、二甲基亚砜(DMSO)等。随着研究的不断深入, 抗氧化性物质、糖类等也作为冷冻保护剂添加应用并取得了一定的效果。

### 1) 糖类

近年来, 对非渗透性保护剂的研究越来越多, 其效果也比较明显。多糖类都有一定的粘性, 它能够黏附在精子外围, 形成一个小环境, 调节周围的渗透压, 由此引起细胞脱水, 并使得细胞内冰晶的形成更少[15]。通过查阅文献, 整理了一部分的糖类及其作用, 如下表所示:

名称	作用
葡萄糖	能够通过精子的质膜, 利用糖酵解或三羧酸循环而给精子提供一定的能量[15]。
海藻糖	具有独特的非特异性保护作用, 可以保护细胞磷脂的双分子层, 在冷冻过程中通过细胞膜外产生一种玻璃状的保护层, 提高细胞对胞外高渗溶液的耐受性, 从而保护精子活性[16]。
淫羊藿多糖	含有的各种化学成分能够在精子冷冻过程中起到抗氧化、保护精子质膜等作用[17]。
黄芪多糖	可作为免疫促进剂或调节剂, 同时具有抗病毒、抗肿瘤、抗衰老、抗辐射、抗应激、抗氧化等作用[18]。
茯苓多糖	具有免疫增强活性, 可用于抗病毒、抗肿瘤, 减轻放、化疗等[18]。
甘露醇 (又称 D-甘露糖醇)	一类应用较广的脱水剂, 依据其化学性质推断, 在冷冻解冻处理过程中, 甘露醇可能使精子快速失水, 阻止了冰晶的形成, 进而保护精子免受低温损伤[19]。
绞股蓝多糖	对机体的免疫机能有一定的增强作用, 且对抗化疗药物引起的骨髓抑制等不良反应, 保护细胞免受自由基的攻击, 具有抗氧化、抗衰老等功效[19]。
马齿苋多糖	具有抗氧化、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、降糖与调节免疫功能等药理作用[19]。
海带多糖	用途广泛, 主要用于免疫调节、抗肿瘤、抗凝血、降血脂和血糖、抗辐射、抗氧化、抗突变、耐缺氧及抗疲劳等[20] [21] [22]。虽未见在精液冷冻保存中应用的报道, 在冷冻稀释液中添加海带多糖取得了较好的冷冻保护效果, 尤其是顶体完整率[19]。

### 2) 抗氧化物质

猪精子的细胞膜结构较为特殊, 含有大量的不饱和脂肪酸, 磷脂酰胆碱含量低, 以及胆固醇的分布不均匀, 膜外的含量高于膜内等等, 使其更容易遭到有氧代谢过程产生的活性氧类(ROS)攻击而发生脂质过氧化反应, 进一步造成细胞膜损伤, 例如选择通透性降低、细胞内酶类发生泄漏、精子呼吸等生命活动受到抑制等, 因此猪精子较其他物种的精子来说, 对超低温冷冻更敏感[9]。基于以上原因推测得出, 在冷冻保护剂中添加抗氧化性物质可起到保护精子的作用。下表中列举了几种常见的抗氧化物质:

名称	作用
白藜芦醇 (Res)	是从毛叶藜芦的根部提取获得的多酚化合物, 因其具有抗氧化和抗凋亡特性, 能够清除精液体外保存过程中产生的多余活性氧自由基(ROS) [23], 减少 ROS 对精子的损伤如改变线粒体及顶体等超微结构[24]、精子膜脂质过氧化、DNA 损伤、蛋白质磷酸化以及精子膜功能丧失等, 从而使精子在体外保持良好的受精能力, 因此 Res 在精液保存中得到了广泛的应用。
番茄红素	抑制脂质过氧化和清除自由基等多种生理功能活性[25]。
芝麻酚	能够有效清除羟自由基(OH·)、NO 和超氧阴离子等活性氧自由基[26]。

## Continued

黄芩素	具有 5,6,7-邻羟基结构并表现出很高的清除自由基、螯合金属离子以及抑制黄嘌呤氧化酶活性[27]。
葡萄籽原花青素	有着特殊分子结构的生物类黄酮[28], 可有效消除超氧阴离子自由基和羟基自由基, 具有非常强的体内活性, 同时它还参与磷酸、花生四烯酸的代谢和蛋白质磷酸化, 保护脂质不发生过氧化损伤[29]。
生物类黄酮 (亦称维生素 P)	属于植物次级代谢产物, 具有消除氧自由基、抗氧化、抗肿瘤等功能。主要抗氧化机制之一是将活泼、有害的自由基还原为稳定、无害的产物, 其作用机理包括: 与氧自由基反应阻断自由基的引发连锁反应; 与金属离子螯合阻断自由基生产; 与脂质过氧基反应阻断脂质过氧化反应过程[30]。
维生素 C (又称为抗坏血酸 维生素 C)	一种有效的自由基清除剂, 添加于精液中可以有效维持精细胞基因的完整和防止精子磷脂发生过氧化, 使精子细胞中的遗传基因 DNA 能通过维生素 C 的抗氧化功能得到保护[31]。此外, 维生素 C 还可以降低解冻后精子的凝聚力, 有利于精液液化[32]。
多不饱和脂肪酸 (PUFA)	在猪冷冻稀释液中添加一定量的 PUFA 有利于冷冻精子的复苏, 防止顶体酶泄露, 对冻后精子具有明显的保护作用[30]。
维生素 E	其发挥生理作用的重要原因是它容易被氧化而保护其它的物质不被氧化; 可以防止细胞膜磷脂中多不饱和脂肪酸发生过氧化反应, 保护细胞膜的结构和功能; 能清除体内不断产生的自由基, 将其代谢成对机体无害的产物[33]。Cerolimi 等将维生素 E 或者衍生物加入到精液稀释液中, 明显提高了精液常温保存的效果[34]。Luo 等通过在绵羊精液冷冻稀释液中添加维生素 E 研究对冻后精子活率和顶体完整性的影响, 结果显示, 试验组明显高于对照组[35]。
丹参酮 IIA	具有多种生物活性, 包括抗免疫[36]、抗癌[37]和抗氧化[38]等作用, 可以增强抗氧化的作用以及提高抗氧化 SOD 酶的活性, 降低细胞内丙二醛(MDA)的含量。
芦丁	具有抗菌消炎[38]、抗癌[39]、调节毛细血管的透性[40]和抗氧化[41]的作用, 而且 Ghiasi 的研究表明, 芦丁具有清除自由基的功能[42]。

## 3) 其他物质

近年来, 研究人员不断尝试在稀释液中添加不同的物质, 改善精子外环境的理化性质, 提高冻精的品质。具体见下表:

名称	作用
透明质酸	能够发挥保水作用, 在精子膜外形成玻璃样保护层, 防止精子脱水, 保护精子免受物理损伤, 提高精子的活率, 同时具有抗氧化特性, 可减少精子氧化损伤[43]。
肝素	能促进精子代谢活动, 抑制精子顶体反应, 提高精子的受孕率[44]。
咖啡因	能够增强精子代谢, 提高精子活力与运动特性, 提高授配母猪受孕率[45]。曾维斌等[46]在猪冷冻稀释液中添加 2 mg/mL 咖啡因, 冻后精子活力和存活时间明显改善。
牛血清白蛋白 (BSA)	是一种重要的血清白蛋白, 在细胞培养上可发挥保护和稳定作用, 同样在精液保存上, 发现 BSA 能发挥抗氧化作用, 保护免精子质膜和 DNA 免受冷冻刺激的损伤[47]; 研究发现, 在猪精液常温保存时使用 BSA 同样可以发挥质膜保护作用和 ROS 清除能力[48] [49]。
安钠咖	是安息香酸钠与咖啡因合成的药物, 咖啡因可能作用于细胞上的特异受体, 激活和影响一些酶的活性, 参与细胞的多种生理生化过程。研究表明, 猪冷冻稀释液中添加安钠咖后精子的冻后活力可提高到 57% [50]。
低密度脂蛋白 (LDL)	低密度脂蛋白是卵黄的主要成分, 对精子有一定的保护作用, 可使其免受冷冻损伤。Hu 等 [51] 研究表明, 猪精液冷冻稀释液中添加 9% (v/v) 的低密度脂蛋白, 冻后精子活率和顶体完整率显著提高; Jiang 等 [52] 研究表明, 添加 8%~9% 的 LDL 能较好地保护冻后猪精子的 DNA 完整性。

## Continued

褪黑素 (MLT)	通过清除 ROS, 对精子线粒体具有重要的保护作用。李博玲等[53]试验证明, 添加 MLT 可以提高精子活率、活力、线粒体活性和顶体完整性, 且降低解冻后精子 ROS 含量。
谷胱甘肽 (GSH)	GSH 是一种重要的抗氧化剂, 其本身易受某些物质氧化, 所以它在体内能够保护许多蛋白质和酶等分子中的巯基不被自由基等有害物质氧化。有实验证明[53], 在猪精液冷冻稀释液中添加该物质可以提高冻后精子的活率、活力及线粒体活性。

## 3. 展望

猪精液的冷冻保存技术是推动联合育种、加速中国生猪产业转型的重要步骤, 也对保存优质遗传资源、提高种公猪利用率、防止疾病传播等有着重要意义。冻精的远距离运输和长效保存, 突破了时空的限制, 使养猪生产上可实现精准实时选配; 不仅降低了种群维持、引种等成本, 更为保护猪种质资源、建立针对人类健康与疾病的遗传改良动物模型基因库等提供了新的方法与思路。然而, 解冻后的精子活力、受胎率和窝产仔数方面与鲜精相比, 仍存在差距(窝产仔数大概相差 0.5 头左右)。该技术的关键在于减少精子在冷冻过程中的损伤、提高解冻后精子的活性和生殖能力以及对冷冻程序进行优化。随着未来在新的冷冻保护剂的研发和配方的优化上研究的逐步深入, 猪冷冻精液的推广和使用势必发展迅速。

## 参考文献

- [1] 张树山. 猪精液冷冻保存技术研究——维生素 E、大豆卵磷脂和海藻糖对猪精液冷冻保存影响[D]: [硕士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2006.
- [2] Barbás, J.P. and Mascarenhas, R.D. (2009) Cryopreservation of Domestic Animal Sperm Cells. *Cell and Tissue Banking*, **10**, 49-62. <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9081-4>
- [3] Mazur, P., Leibo, S.P. and Seidel Jr., G.E. (2008) Cryopreservation of the Germplasm of Animals Used in Biological and Medical Research: Importance, Impact, Status, and Future Directions. *Biology of Reproduction*, **78**, 2-12. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064113>
- [4] 邵秀林, 龙翔. 不同冷冻保护剂在猪精液冷冻中的作用效果[J]. 教师教育学报, 1998(2): 25-27.
- [5] 范文博, 刘娣. 猪的冷冻精液研究进展[J]. 黑龙江动物繁殖, 2020, 28(2): 39-41+49.
- [6] 吴俊波. 冷冻、获能及鸽蛋 LDL 对猪精子细胞骨架完整性的影响[D]: [硕士学位论文]. 延吉: 延边大学, 2013.
- [7] Polge, C., Day, B.N. and Groves, T.W. (1956) Artificial Insemination in Pigs. *The Veterinary Record*, **68**, 62-76.
- [8] 陈明明, 王开林, 杨林昆, 李林辉, 王宝英, 王福兄, 郝志明. -80℃超低温冰箱冷冻保存猪精液的初步研究[J]. 黑龙江动物繁殖, 2016, 24(5): 5-8.
- [9] 高秀丽, 党燕娜, 翟晓红, 胡建宏. 猪精液冷冻保护剂的研究进展[J]. 畜牧兽医杂志, 2016, 35(2): 62-63.
- [10] 胡建宏. 猪精液冷冻保存研究[D]: [博士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2006.
- [11] Karlsson, J.O. and Toner, M. (1996) Long-Term Storage of Tissues by Cryopreservation: Critical Issues. *Biomaterials*, **17**, 243-256. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85562-1](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85562-1)
- [12] 庞玉娟. 玻璃化冷冻对驴卵母细胞亚细胞结构及母源基因表达的影响[D]: [硕士学位论文]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- [13] 谢言射, 徐志谦, 蔡更元, 吴珍芳, 洪林君, 黄思秀. 猪精液冷冻保存技术研究进展[J]. 家畜生态学报, 2020, 41(10): 78-83.
- [14] 宋德荣, 王棋文, 刘光瑞, 张允嘉. 猪精液冷冻损伤机理研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(7): 44-47+63.
- [15] 王捷. 番茄红素、芝麻酚和黄芩素对猪精子冷冻保存效果的影响[D]: [硕士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2017.
- [16] 权国波. 海藻糖在哺乳动物细胞保存中的作用机制及应用现状[J]. 临床输血与检验, 2003, 5(1): 78-80.
- [17] 李军伟. 淫羊藿多糖对猪精液冷冻保存的影响[D]: [硕士学位论文]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [18] 刘颖. 茯苓多糖、黄芪多糖和银杏叶黄酮对猪精子冷冻保存效果的研究[D]: [硕士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2014.



- [19] 张婷. 四种糖类对猪精液冷冻保存效果的研究[D]: [硕士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2008.
- [20] 钱风云, 傅德贤, 欧阳藩. 海带多糖生物功能研究进展[J]. 中国海洋药物, 2003, 22(1): 55-59.
- [21] 阎俊, 罗琼, 杨明亮, 等. 海带多糖抗脂质过氧化作用的研究[J]. 武汉大学学报(医学版), 2003, 24(3): 219-221.
- [22] 许凤清, 吴皓. 海带多糖的研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(6): 106-108.
- [23] 范晓腾. 白藜芦醇对猪精子在常温保存和冷打击过程中的保护作用[D]: [硕士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2016.
- [24] 商学军, 黄宇烽, 熊承良, 印洪林, 王咏梅. 正常精子体外与活性氧作用后超微结构观察[J]. 中华男科学, 2002, 8(2): 106-108.
- [25] 高秀霞, 刘琨, 陈娟, 侯海燕. 苯并苊对孕早期小鼠胎盘绒毛组织的影响及芦丁的防护作用研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(2): 122-125, 134.
- [26] Kanimozhi, P. and Prasad, N.R. (2009) Antioxidant Potential of Sesamol and Its Role on Radiation-Induced DNA Damage in Whole-Body Irradiated Swiss Albino Mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **28**, 192-197. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.04.003>
- [27] Shieh, D.E., Liu, L.T. and Lin, C.C. (2000) Antioxidant and Free Radical Scavenging Effects of Baicalein, Baicalin and Wogonin. *Anticancer Research*, **20**, 2861-2865.
- [28] 吴英俊, 梁亿非, 董嘉楠. 葡萄籽原花青素的研究进展[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(8): 1025-1028.
- [29] 剧红梅, 曲梓怡, 王召令, 苏利强, 徐明. 原花青素的抗氧化作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(16): 3155-3157.
- [30] 李芳. 四种抗氧化剂对猪精液冷冻保存效果的研究[D]: [硕士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2012.
- [31] Jones, R. and Mann, T. (1977) Damage to Ram Spermatozoa by Peroxidation of Endogenous Phospholipids. *Journal of reproduction and fertility*, **50**, 261-268. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0500261>
- [32] Sönmez, M. and Demirci, E. (2004) The Effect of Ascorbic Acid on the Freezability of Ram Semen Diluted with Extenders Containing Different Proportions of Glycerol. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, **28**, 893-899.
- [33] Hu, J.H., Zhao, X.L., Tian, W.Q., Zan, L.S. and Li, Q.W. (2011) Effects of Vitamin E Supplementation in the Extender on Frozen-Thawed Bovine Semen Preservation. *Animal*, **5**, 107-112. <https://doi.org/10.1017/S1751731110001679>
- [34] Cerolini, S., Maldjian, A., Surai, P. and Noble, R. (2000) Viability, Susceptibility to Peroxidation and Fatty Acid Composition of Boar Semen during Liquid Storage. *Animal Reproduction Science*, **58**, 99-111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00035-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00035-4)
- [35] Luo, H.L., Jia, Z.H., Zhu, S.E., *et al.* (2004) Effect of Vitamin E on the Qualities of Fresh and Frozen-Thawed Ram Semen. *China Herbivores*, No. 5, 14-16.
- [36] Li, W., Zhang, Y., Xing, C.Y. and Zhang, M.Y. (2015) Tanshinone IIA Represses Inflammatory Response and Reduces Radiculopathic Pain by Inhibiting IRAK-1 and NF- $\kappa$ B/p38/JNK Signaling. *International Immunopharmacology*, **28**, 382-389. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.06.032>
- [37] Liu, F., Yu, G., Wang, G., *et al.* (2012) An NQO1-Initiated and p53-Independent Apoptotic Pathway Determines the Anti-Tumor Effect of Tanshinone IIA against Non-Small Cell Lung Cancer. *PLOS ONE*, **7**, e42138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042138>
- [38] Wang, P., Zhou, S., Xu, L., *et al.* (2013) Hydrogen Peroxide-Mediated Oxidative Stress and Collagen Synthesis in Cardiac Fibroblasts: Blockade by Tanshinone IIA. *Journal of Ethnopharmacology*, **145**, 152-161. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.044>
- [39] Liu, J., Wang, W., Liu, X., *et al.* (2018) Supplementation of Cryopreservation Medium with TAT-Peroxiredoxin 2 Fusion Protein Improves Human Sperm Quality and Function. *Fertility and Sterility*, **110**, 1058-1066. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.07.008>
- [40] Sheu, J.R., Hsiao, G., Chou, P.H., Shen, M.Y. and Chou, D.S. (2004) Mechanisms Involved in the Antiplatelet Activity of Rutin, a Glycoside of the Flavonol Quercetin, in Human Platelets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 4414-4418. <https://doi.org/10.1021/jf040059f>
- [41] Cândido, T.M., De Oliveira, C.A., Ariede, M.B., *et al.* (2018) Safety and Antioxidant Efficacy Profiles of Rutin-Loaded Ethosomes for Topical Application. *AAPS PharmSciTech*, **19**, 1773-1780. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-0994-3>
- [42] Ghiasi, M., Azadnia, A., Arabieh, M. and Zahedi, M. (2012) Protective Effect of Rutin (Vitamin p) against Heme Oxidation: A Quantum Mechanical Approach. *Computational and Theoretical Chemistry*, **996**, 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2012.07.009>
- [43] Qian, L., Yu, S. and Zhou, Y. (2016) Protective Effect of Hyaluronic Acid on Cryopreserved Boar Sperm. *International*

- al Journal of Biological Macromolecules*, **87**, 287-289. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.075>
- [44] Dapino, D.G., Marini, P.E. and Cabada, M.O. (2006) Effect of Heparin on *in vitro* Capacitation of Boar Sperm. *Biological Research*, **39**, 631-639. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602006000500006>
- [45] Yamaguchi, S., Suzuki, C., Noguchi, M., Kasa, S., Mori, M., Isozaki, Y., Ueda, S., Funahashi, H., Kikuchi, K., Nagai, T. and Yoshioka, K. (2013) Effects of Caffeine on Sperm Characteristics after Thawing and Inflammatory Response in the Uterus after Artificial Insemination with Frozen-Thawed Boar Semen. *Theriogenology*, **79**, 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.09.012>
- [46] 曾维斌, 王志刚, 刘丑生, 张兆旺, 赵俊金. 猪冷冻精液的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2005, 32(5): 36-38.
- [47] Sarıözkan, S., Türk, G., Cantürk, F., Yay, A., Eken, A. and Akçay, A. (2013) The Effect of Bovine Serum Albumin and Fetal Calf Serum on Sperm Quality, DNA Fragmentation and Lipid Peroxidation of the Liquid Stored Rabbit Semen. *Cryobiology*, **67**, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.04.002>
- [48] Lee, S.H. and Park, C.K. (2015) Antioxidative Effects of Magnetized Extender Containing Bovine Serum Albumin on Sperm Oxidative Stress during Long-Term Liquid Preservation of Boar Semen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **464**, 467-472. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.06.159>
- [49] Zhang, X., Yan, G., Hong, J., *et al.* (2015) Effects of Bovine Serum Albumin on Boar Sperm Quality during Liquid Storage at 17°C. *Reproduction in Domestic Animals*, **50**, 263-269. <https://doi.org/10.1111/rda.12481>
- [50] 李青旺, 王立强, 于永生, 胡建宏, 江中良, 夏凡. 猪精液冷冻技术研究[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(2): 150-153.
- [51] Hu, J., Li, Q.W., Chen, X.Y., *et al.* (2006) The Cryoprotective Effect on Frozen-Thawed Boar Semen of Egg Yolk Low Density Lipoproteins. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **19**, 486-494. <https://doi.org/10.5713/ajas.2006.486>
- [52] Jiang, Z.L., Li, Q.W., Li, W.Y., *et al.* (2007) Effect of Low Density Lipoprotein on DNA Integrity of Freezing—Thawing Boar Sperm by Neutral Comet Assay. *Animal Reproduction Science*, **99**, 401-407. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.08.022>
- [53] 李博玲, 马恒东, 王贞. 褪黑素、谷胱甘肽对猪精液冷冻保存效果的影响[J]. 四川畜牧兽医, 2011, 38(7): 26-28.