

不同浓度二甲双胍对猪精液液态保存效果的影响

周佳勃, 马思楠, 王娜, 李文倩, 聂云, 邵千朔, 王启蒙, 岳顺利*

(东北农业大学/黑龙江省动物细胞与遗传工程重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要 [目的]研究不同浓度二甲双胍对猪精液液态保存效果的影响。[方法]在猪精液液态保存液中分别添加不同浓度(0.5、1.0、2.0、4.0 mmol/L)的二甲双胍,测定不同保存时间精子的活力、活率、质膜完整率、顶体完整率等指标。[结果]猪精液液态保存第3天,在不同浓度二甲双胍作用下各组间精子活力出现差异。第5天,添加1.0 mmol/L二甲双胍的保存液保存的精子活力达到38.03%,精子活率为49.03%,质膜完整率为43.91%,顶体完整率为50.88%,均高于对照组。[结论]添加二甲双胍有助于提高液态保存猪精液的质量,延长保存时间。

关键词 猪精液;液态保存;二甲双胍;活力

中图分类号 S852.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)20-0077-03

Effects of Different Concentrations of Metformin on the Liquid Storage of Boar Sperm

ZHOU Jia-bo, MA Si-nan, WANG Na et al (Key Laboratory of Animal Cellular and Genetic Engineering of Heilongjiang Province, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract [Objective] To study the influences of different concentrations of metformin on the liquid storage effect of boar sperm. [Method] Different concentrations (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mmol/L) of metformin was added in the liquid storage liquid of boar sperm to detect the sperm motility, viability, plasma membrane integrity rate and acrosome integrity rate and other indices. [Result] On the third day, there was difference of sperm motility among different groups with different concentrations of metformin. On the 5th day, the sperm motility stored in the preservation liquid with adding 1.0 mmol/L metformin reached 38.03%, and the sperm viability was 49.03%, and plasma membrane integrity and acrosome integrity were 43.91% and 50.88% respectively, which were all higher than those of control group. [Conclusion] Metformin was beneficial to improve the quality of boar semen in liquid storage and prolong the preservation time.

Key words Boar sperm; Liquid storage; Metformin; Motility

猪人工授精技术已经广泛应用于畜牧业生产,由于猪精子对低温特别敏感,目前所用精液大多为新鲜精液或液态保存的精液。随着保存时间的延长,猪精子质量显著下降,受精能力降低,从而造成母猪的受胎率低、窝产仔数少,严重制约猪液态保存精液的应用。因此,深入研究猪精液液态保存的关键技术,延长精子的保存时间,探讨影响猪液态保存精子活率及受精能力的因素,进一步提高受胎率和产仔数,已成为国内外养猪生产中亟待解决的问题^[1]。

精子液态保存过程中存在低水平的代谢活动,这对于保障精子能量供给,特别是对精液的长期保存十分重要。在生产实践中,为了降低精子对“冷打击”的应激,精液稀释液中的葡萄糖浓度常常高于输卵管液中的浓度,例如常用的 BTS 稀释液含有 205 mmol/L 葡萄糖^[2]。改善保存过程中猪精子对葡萄糖的利用,减轻降温 and 稀释产生的应激对精子能量代谢的影响,延长精子寿命,对于提高精液质量十分重要。

二甲双胍是一种胰岛素增敏剂,是目前临床上治疗二型糖尿病的重要药物,可通过多种途径起到降糖、降脂的作用,能提高细胞对葡萄糖的利用效率,改变细胞的能量代谢状态,提高细胞糖酵解能力^[3]。大量研究表明,糖尿病及肥胖导致男性生殖能力衰退,精子的质量及数量出现下降。二甲双胍可以有效缓解糖代谢紊乱造成的大鼠睾丸生精功能异

常^[4]。然而,关于二甲双胍对公猪生殖能力,特别是体外精子液态保存的影响鲜见报道。笔者在猪精液保存液中添加不同浓度的二甲双胍,对精子活力、活率、质膜完整率以及顶体完整率等指标进行检测,分析不同浓度二甲双胍对猪精液液态保存的影响,旨在为研制猪精液液态保存液及提高种公猪的利用效率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物。试验动物为哈尔滨市阿城区实验基地猪场的健康可育长白种公猪。

1.1.2 主要试剂。为了便于后续能量代谢研究,采用含有 3 mmol/L 葡萄糖、成分简单的 PBS 为基础保存液,配制基础保存液:136 mmol/L 氯化钠 (NaCl)、2.68 mmol/L 氯化钾 (KCl)、8.1 mmol/L 磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄)、1.47 mmol/L 磷酸二氢钾 (KH₂PO₄)、0.1 mmol/L 聚乙烯醇 (PVA)、3 mmol/L 葡萄糖、50 IU/mL 青霉素钠、1.0 g/L 链霉素 (Streptomycin); pH 7.4、渗透压 280 mOsm。低渗液:4.9 g 柠檬酸钠、9.0 g 果糖,溶于 1 000 mL 三蒸水中(100 mOsm)。分装后在 4 ℃ 冰箱中保存备用。试验所用药品购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 精液采集与保存。采用手握法采集浓厚部精液,温度保持在 32~35 ℃,1 h 内运至实验室。选取精子的活力 ≥ 80% 以上用于试验。在 30 min 内降至室温,离心去除精浆;然后分别用含有不同浓度(0.5、1.0、2.0、4.0 mmol/L)二甲双胍的保存液稀释,不含二甲双胍的处理为对照组,分装到 1.8 mL 冻存管中,精子的最终浓度为 3×10⁷~5×10⁷ ind./mL。将冻存管置于 17 ℃ 恒温保存箱中保存,每隔 24 h 取样并进

基金项目 国家自然科学基金面上项目(31372311);黑龙江省动物细胞与遗传工程重点实验室年度开放课题(KF201701);东北农业大学 2018 年大学生创新训练(SIPT)项目(201810224072)。

作者简介 周佳勃(1974—),男,吉林榆树人,副教授,博士,从事动物生殖细胞的生物学研究。* 通讯作者,副教授,博士,从事动物生殖细胞的生物学研究。

收稿日期 2018-03-17; **修回日期** 2018-03-28

行检测。

1.2.2 精子的活力及活率。在检测前将样本混匀,并置于37℃温箱中预热20 min。使用清华同方精子活力检测系统(MX7.5)检测精子的各项参数。取样10 μL涂在计数池上,使用相差显微镜(200×)检测精子的活力,每次检测6个视野,精子计数数量不少于200个。在计算机辅助分析系统中记录精子的其他参数,包括平均曲线运动速度参数(VCL)、平均直线运动速度参数(VSL)、直线运动比率参数(LIN)、平均运动速率参数(VAP)。

1.2.3 质膜完整率检测。通过低渗试验进行质膜完整率检测^[5]。取10 μL精子样本加入到100 μL低渗液(150 mOsm/L)中并混匀,在37℃恒温箱中孵育45 min,在孵育后的混合液中加入200 μL 4%戊二醇。取适量的混合液涂片,在相差显微镜(400×)下检测肿胀和弯尾精子的百分率,每次计数不应少于200个精子。

1.2.4 顶体完整率检测。通过FITC-PNA染色试验对精子进行顶体完整率检测^[6]。取200 μL精液样本,2 000 r/min离心4 min,去除上清液并用0.5 mL PBS缓冲液对其进行重

悬,重复2~3次。用0.5 mL PBS重悬后,在重悬液中取出10 μL进行涂片。室温晾干后,用4%多聚甲醛固定20 min,用PBS缓冲液洗涤2次,每次5 min。然后,用FITC-PNA染料进行避光染色30 min,用PBS缓冲液将其冲洗并室温晾干,在倒置荧光显微镜(400×)下进行检测,每次镜检精子数不应少于200个。

1.2.5 数据统计与分析。试验数据均使用SPSS 20.0统计软件进行统计与分析。精子活力、活率、运动参数、质膜完整率、顶体完整率均进行单因素方差分析,每个处理重复3次。 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同浓度二甲双胍对精子活力的影响由表1可知,猪精液保存过程中各组精子的活力均随保存时间的延长而逐渐下降。在保存第3天,各组间精子活力出现差异。保存第5天,添加1.0 mmol/L二甲双胍的处理精子活力(38.03%)高于其他浓度处理($P < 0.05$),显著高于对照组(CK)(32.46%),而添加4.0 mmol/L二甲双胍的处理精子活力低于其他浓度处理(29.61%)。

表1 不同浓度二甲双胍对精子活力的影响

Table 1 The influences of different concentrations of metformin on the sperm motility

%

二甲双胍浓度 Metformin concentration mmol/L	保存时间 Preservation time//d				
	0	1	3	5	7
0(CK)	92.15±0.71 a	88.34±0.21 a	61.38±1.04 c	32.46±1.25 b	9.74±0.49 b
0.5	93.22±0.35 a	88.79±0.55 a	64.88±0.34 b	34.76±0.52 bc	11.17±0.40 ab
1.0	93.13±0.12 a	90.13±0.06 a	70.71±0.19 a	38.03±0.21 a	13.05±0.69 a
2.0	93.03±0.02 a	89.02±1.00 a	66.22±0.30 b	33.90±0.63 b	9.26±0.38 b
4.0	92.25±0.61 a	88.53±0.03 a	60.75±0.41 c	29.61±0.60 c	7.47±0.69 c

注:同列不同小写字母表示显著差异($P < 0.05$)

Note: Different small letters in the same column indicated significant differences($P < 0.05$)

2.2 不同浓度二甲双胍对精子活率的影响由表2可知,随着保存时间的延长,添加不同浓度的二甲双胍均能提高精子活率。保存第5天,添加1.0 mmol/L二甲双胍处理的精子活

率为49.03%,显著高于其他浓度处理($P < 0.05$);当二甲双胍浓度为4.0 mmol/L时精子活率低于其他浓度处理。

表2 不同浓度二甲双胍对精子活率的影响

Table 2 The influences of different concentrations of metformin on the sperm viability

%

二甲双胍浓度 Metformin concentration mmol/L	保存时间 Preservation time//d				
	0	1	3	5	7
0(CK)	93.43±0.05 a	90.81±0.14 b	71.73±0.50 b	41.66±1.12 c	14.90±0.17 c
0.5	93.47±0.10 a	90.89±0.09 b	73.03±0.51 ab	44.43±0.52 b	16.77±0.24 b
1.0	94.20±0.48 a	92.20±0.19 a	75.38±0.55 a	49.03±0.78 a	21.05±0.69 a
2.0	93.69±0.04 a	91.42±0.45 ab	73.37±0.45 ab	43.90±0.63 b	19.28±0.36 ab
4.0	94.01±0.06 a	90.18±0.60 b	70.68±0.19 c	41.58±0.50 c	13.90±0.26 c

注:同列不同小写字母表示显著差异($P < 0.05$)

Note: Different small letters in the same column indicated significant differences($P < 0.05$)

2.3 不同浓度二甲双胍对精子质膜完整率的影响顶体完整是精子完成受精的前提基础。由表3可知,添加不同浓度的二甲双胍均能提高精子的质膜完整率,特别是添加

1.0 mmol/L二甲双胍处理的精子质膜完整率(43.91%)显著高于其他浓度处理($P < 0.05$);当二甲双胍浓度为4.0 mmol/L时,精子质膜完整率低于其他浓度处理。

表 3 不同浓度二甲双胍对精子质膜完整率的影响

Table 3 The influences of different concentrations of metformin on the plasma membrane integrity of sperm

二甲双胍浓度 Metformin concentration mmol/L	保存时间 Preservation time//d				
	0	1	3	5	7
0 (CK)	75.69±0.36 a	70.26±0.22 c	57.85±0.80 c	39.85±0.05 c	18.33±0.50 c
0.5	76.63±0.01 a	72.69±0.10 b	60.29±0.20 b	41.03±0.51 bc	21.02±0.57 b
1.0	77.55±0.12 a	73.90±0.05 a	62.53±0.25 a	43.91±0.52 a	23.49±0.94 a
2.0	77.50±0.01 a	72.76±0.10 b	60.51±0.00 b	42.14±0.38 b	21.08±0.15 b
4.0	76.80±0.62 a	72.06±0.92 b	57.18±0.27 c	38.47±0.50 c	17.18±0.23 c

注:同列不同小写字母表示显著差异 ($P<0.05$)

Note: Different small letters in the same column indicated significant differences ($P<0.05$)

2.4 在 17 °C 液态保存下不同浓度二甲双胍对精子顶体完整率的影响

由表 4 可知,精子液态保存过程中添加不同浓度的二甲双胍均有助于提高精子的顶体完整率。第 5 天,添加

1.0 mmol/L 二甲双胍处理的精子顶体完整率为 50.88%,显著高于其他浓度处理 ($P<0.05$); 添加 4.0 mmol/L 二甲双胍处理的精子顶体完整率显著低于其他浓度处理 ($P<0.05$)。

表 4 不同浓度二甲双胍对精子顶体完整率的影响

Table 4 The influences of different concentrations of metformin on the acrosome integrity of sperm

二甲双胍浓度 Metformin concentration mmol/L	保存时间 Preservation time//d				
	0	1	3	5	7
0 (CK)	93.30±0.72 a	86.93±0.58 b	72.22±0.30 c	46.00±0.51 b	17.12±0.44 c
0.5	93.65±0.63 a	88.71±0.26 ab	76.30±0.44 b	47.88±0.15 ab	21.47±1.04 ab
1.0	94.94±0.16 a	89.43±0.03 a	78.88±0.53 a	50.88±0.65 a	23.77±0.76 a
2.0	93.83±0.66 a	88.90±0.40 ab	75.49±0.61 b	46.04±1.02 b	19.88±0.85 b
4.0	93.67±0.22 a	87.35±0.77 b	71.83±0.35 c	44.17±0.02 c	15.34±0.45 d

注:同列不同小写字母表示显著差异 ($P<0.05$)

Note: Different small letters in the same column indicated significant differences ($P<0.05$)

3 讨论与结论

延长猪精液保存时间,提高种公猪的利用率,可以有效降低猪畜牧生产成本。因此,研究精子的能量代谢特点,提高精液保存质量十分必要。大部分市售精液保存液中葡萄糖和果糖等能量物质都是过量的,而且冷打击和高倍稀释情况下精子对能量物质的利用能力也会下降。适时调整细胞的能量代谢模式对于精子存活十分重要。

二甲双胍是一种治疗二型糖尿病的重要药物^[3],可促进体内细胞对葡萄糖的利用能力,改善细胞供能状态。研究表明,二甲双胍调解糖代谢作用主要体现在以下方面:增加葡萄糖的无氧酵解和利用,增加骨骼肌和脂肪组织的葡萄糖氧化和代谢;抑制肝糖的产生和输出;改善外周组织胰岛素与其受体的结合和受体后作用^[7-8]。葡萄糖是精子液态保存过程中的重要供能物质。张利^[1]研究表明猪精子可通过葡萄糖酵解和有氧氧化代谢供能。Qiu 等^[9]在羊精子保存过程中也有类似的报道。该研究采用含有 3 mmol/L 葡萄糖的 PBS 缓冲液作为基础保存液,分别添加不同浓度的二甲双胍,研究不同浓度二甲双胍对体外猪精液液态保存效果的影响,结果表明二甲双胍可显著提高精子活力,在保存第 5 天,添加 1.0 mmol/L 二甲双胍处理的精子活力仍维持在 38.03%,显著高于其他浓度处理。这表明在二甲双胍的作用下精子运动能力增强,能量代谢得到改善,有利于延长精子寿命。精子活率检测结果表明,二甲双胍有利于精子的存活。保存

第 5 天,添加 1.0 mmol/L 二甲双胍处理的精子活率为 49.03%,显著高于对照组。该研究还发现,含有 4.0 mmol/L 的二甲双胍保存液中精子运动参数下降,精子活力低于其他浓度处理。这可能是由于过量的二甲双胍诱导精子对葡萄糖过度利用,产生了大量的乳酸等物质,造成 pH 下降,影响精子活力,缩短了精子寿命。邢月超^[10]报道降低保存液的 pH 会导致精子活力下降。

精子质膜和顶体完整是精子存活、完成受精及后续发育的重要条件。笔者研究了不同浓度二甲双胍对精子质膜和顶体完整率的影响。结果表明,不同浓度的二甲双胍能够提高保存精液中精子质膜完整率和顶体完整率。Luo 等^[11]研究表明二甲双胍可通过激活 AMPK 通路调解脂肪细胞的有氧氧化和糖酵解能量代谢方式,减少 ROS 产生。过量的 ROS 会破坏精子膜上的多不饱和脂肪酸与磷脂,造成精子的质膜损伤,会破坏顶体的完整性^[12]。张利^[1]研究表明在猪精子保存过程中,葡萄糖有氧氧化和酵解同时存在。据此推测,二甲双胍很可能通过调解葡萄糖代谢方式,抑制了一些对精液保存不利的物质(如 ROS)的产生,从而保障精子质膜和顶体的完整性。

综上所述,二甲双胍有利于提高猪精液的液态保存效果。在保存第 5 天,添加 1.0 mmol/L 二甲双胍的保存液保存的精子活力、活率、质膜完整率和顶体完整率等指标均高于 (下转第 82 页)

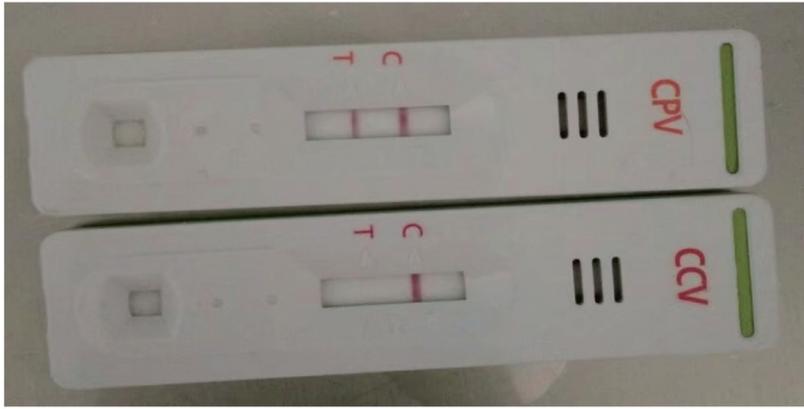


图2 测试板检查结果

Fig.2 Test board results

属于病毒性传染病,无论是肠炎型还是心肌炎型,均应早发现、早诊断,尽早使用特效药结合强心补液、补充能量、纠正酸碱电解平衡、脱水、止泻、止吐止血等对症疗法和防继发感染能够有效提高该病治愈率,降低死亡率^[7]。治疗过程中,还应禁饮禁食,待病犬食欲恢复后再给其服用易消化的犬肠道处方罐头以减轻胃肠道负担,加强护理及饲养管理也尤为重要^[8]。

参考文献

[1] EUGSTER A K, NAIRN C. Diarrhea in puppies; Parvovirus-like particles demonstrated in their feces[J]. *Southwestern veterinarian*, 1977, 30(1): 59-60.

- [2] OHSHIMA T, MOCHIZUKI M. Evidence for recombination between feline panleukopenia virus and canine parvovirus type 2 [J]. *Journal of veterinary medical science*, 2009, 71(4): 403-408.
- [3] 杨琦, 罗晓新, 李玲彬. 犬细小病毒病的诊断及防治措施[J]. *中国动物保健*, 2017, 19(1): 60-61.
- [4] 展恩松. 浅谈犬细小病毒病的临床症状及防治[J]. *现代畜牧科技*, 2017(12): 116.
- [5] 胡元龙, 魏三贵, 李春生, 等. 疑似犬细小病毒病诊治报告[J]. *江西畜牧兽医杂志*, 2017(1): 53.
- [6] 李学琴. 犬细小病毒病几种不同治疗方案的比较[J]. *当代畜牧*, 2014(17): 37-39.
- [7] 何荣惠, 杨正兰. 犬细小病毒的治疗原则和方法[J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2017, 33(6): 198.
- [8] 孟可新. 犬细小病毒病的综合防治措施[J]. *现代畜牧科技*, 2017, 25(1): 107.

(上接第 79 页)

对照组。二甲双胍可改变精子的能量供应状态,提高精子受精能力,延长保存时间。

参考文献

- [1] 张利. 猪精子在液态保存过程中葡萄糖代谢的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014: 1.
- [2] JOHNSON L A, WEITZE K F, FISER P, et al. Storage of boar semen[J]. *Anim Reprod Sci*, 2000, 62(1/2/3): 143-172.
- [3] 孙科. 盐酸二甲双胍普通片和盐酸二甲双胍缓释片治疗 2 型糖尿病的成本-效果探析[J]. *中国医药指南*, 2016, 14(30): 106.
- [4] 闫文杰, 穆杨, 杨菁. 二甲双胍对肥胖大鼠睾丸生精功能的影响[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2018, 39(1): 95-98.
- [5] JEYENDRAN R S, VAN DER VEN H H, PEREZ-PELAEZ M, et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics[J]. *J Reprod Fertil*, 1984, 70(1): 219-228.

- [6] LEMOINE M, DUPONT J, GUILLORY V, et al. Potential involvement of several signaling pathways in initiation of the chicken acrosome reaction [J]. *Biol Reprod*, 2001, 81(4): 657-665.
- [7] 陈兆煜, 王连唐, 陈雁扬. 二甲双胍通过激活腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 的抗肿瘤机制[J]. *中国肺癌杂志*, 2013, 16(8): 427-432.
- [8] WIERNSPERGER N F, BAILEY C J. The antihyperglycaemic effect of metformin: Therapeutic and cellular mechanisms[J]. *Drugs*, 1999, 58(S1): 31-39.
- [9] QIU J H, LI Y W, XIE H L, et al. Effects of glucose metabolism pathways on sperm motility and oxidative status during long-term liquid storage of goat semen[J]. *Theriogenology*, 2016, 86(3): 839-849.
- [10] 邢月超. 稳定 pH 值有助于延长猪精液保存时间[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017: 33.
- [11] LUO T, NOCON A, FRY J, et al. AMPK activation by metformin suppresses abnormal extracellular matrix remodeling in adipose tissue and ameliorates insulin resistance in obesity[J]. *Diabetes*, 2016, 65(8): 2295-2310.
- [12] 杨升, 贾东平, 刘家慧. 抗氧化剂对猪精液冷冻保存效果的影响[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2012, 17(9): 50-53.

名词解释

扩展学科扩散指标: 指在统计源期刊范围内, 引用该刊的期刊数量与其所在学科全部期刊数量之比。

$$\text{扩展学科扩散指标} = \frac{\text{引用刊数}}{\text{所在学科期刊数}}$$

扩展学科扩散指标: 指期刊所在学科内, 引用该刊的期刊数占全部期刊数量的比例。

$$\text{扩展学科扩散指标} = \frac{\text{所在学科内引用被评价期刊的数量}}{\text{所在学科期刊数}}$$

扩展被引半衰期: 指该期刊在统计当年被引用的全部次数中, 较新一半是在多长一段时间内发表的。被引半衰期是测度期刊老化速度的一种指标, 通常不是针对个别文献或某一组文献, 而是对某一学科或专业领域的文献的总和而言的。

扩展 H 指数: 指该期刊在统计当年被引的论文中, 至少有 h 篇论文的被引频次不低于 h 次。