

文章编号: 1004-0374(2010)09-0901-05

哺乳动物精子冷冻的抗氧化研究进展

师红¹, 文瑞丽¹, 马清义², 金学林², 吴民耀^{1*}

(1 陕西师范大学生命科学院, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 西安 710062;

2 陕西省珍稀野生动物抢救饲养研究中心, 西安 710062)

摘要: 人工授精是迄今为止应用最广泛并最有成效的辅助生殖技术, 而高品质的精液是提高人工授精受胎率的关键。近年来在家畜精液冷冻保存技术中应用抗氧化剂的研究受到广泛关注, 通过添加抗氧化剂降低了精子在冷冻保存过程中所遭受的氧化损伤, 提高了冷冻精液质量和母畜的受胎率。可添加的抗氧化剂种类很多, 通常有维生素类和酶类抗氧化剂等。针对目前抗氧化剂在大熊猫精液上应用研究甚少的现状, 该文对哺乳动物精子的氧化损伤机制和常用的抗氧化剂进行综述, 期望对大熊猫的相关研究提供理论依据和参考。

关键词: 冷冻精子; 抗氧化剂; 大熊猫

中图分类号: S864.3; Q959.838 **文献标识码:** A

Recent research on antioxidation of mammal frozen sperm

SHI Hong¹, WEN Rui-li¹, MA Qing-yi², JIN Xue-lin², WU Min-yao^{1*}

(1 National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest of China,

College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;

2 Shaanxi Province Rare Wildlife Rescue Center, Xi'an 710062, China)

Abstract: So far, artificial insemination is the most widely used and effective assisted-reproductive technology, and it is crucial for improving the rate of artificial insemination pregnancy to acquire the high-quality semen. Recently, the research on the application of antioxidants to livestock semen cryopreservation is widely concerned. By adding antioxidants to the semen, it can reduce oxidative damage of sperm during cryopreservation process, improve the quality of frozen semen and the pregnancy rate of female livestock. There are many kinds of antioxidants can be used, such as vitamins, enzymes, and so on. Since the application of antioxidants to giant panda semen is seldomly reported, in order to provide a theoretical basis to related research of giant panda, we make a review on the mechanism of oxidative damage of mammalian sperm and the antioxidants used frequently.

Key words: frozen sperm; antioxidants; giant panda

人工授精作为一种应用最广泛并最有成效的辅助生殖技术在改良家畜品种、挽救大熊猫等濒危物种上具有十分重要的意义, 其中精子质量的好坏是影响受胎率的关键因素^[1, 2]。目前人工授精多采用冷冻精液, 因其具有不受时间、地域的限制以及可以广泛利用优良雄兽的遗传资源等优点, 因此如何提高冷冻精液的质量就成为研究重点。科研人员从冷冻稀释液的配方、冷冻方法和解冻液等多方面进行研究^[3-5], 对精液冷冻技术做出了很大改进和完善。

大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)的冷冻精液受胎率目前仍然很低, 不及新鲜精液和自然交配的受胎率, 作为国家一级保护动物、世界级珍贵物种——大熊猫始终面临着种群数量持续下降, 无法摆脱濒危的困境。本文就哺乳动物精液冷冻保存技术中的抗氧

收稿日期: 2010-04-01; 修回日期: 2010-05-06

基金项目: 大熊猫精液生化研究项目(771729)

*通讯作者: E-mail: minyaowu@snnu.edu.cn

化研究从以下几个方面进行综述,为从事大熊猫精液冷冻研究和繁殖保护工作提供理论参考。

1 哺乳动物精子在冷冻保存过程中的氧化损伤

哺乳动物精液经冷冻-解冻后,其精子活力和受胎率不及新鲜精液,原因在于精子在冷冻过程中受到冷冻损伤,而氧化损伤是其中一个重要方面^[6]。冷冻-解冻过程增加了精子的脂质过氧化反应和 DNA 损伤,使精子结构的完整性遭到破坏,降低了精子质量,进而影响雌性动物的受胎率。在正常的生理状态下,生殖系统和精子能够有控制性地产生少量的活性氧(reactive oxygen species, ROS),精子中的 ROS 主要由线粒体呼吸链中的氧化还原酶系产生,此外精子膜上的 NADPH 氧化酶也可与其底物反应产生 ROS。正常的精子结构与功能是精液品质和受精能力的保证,少量的 ROS 在精子运动激活、高活跃性运动、获能以及顶体反应等方面发挥着重要的生理作用^[7-9],但 ROS 过多则会造成精子活力下降,抑制精子获能和顶体反应,使精子 DNA 发生氧化损伤等^[10-13]。

1.1 ROS 可引发精子质膜脂质过氧化损伤

精子通过在附睾中发育成熟,形成具有运动能力的精子,精子质膜的流动性和完整性是精子具有正常运动能力所必需的,而精子质膜上富含的多聚不饱和脂肪酸(polyunsaturated fat acid, PUFA)在维持精子质膜的流动性和完整性方面具有重要作用^[14]。但是精子质膜上的 PUFA 对 ROS 极为敏感,PUFA 在 ROS 作用下,很容易发生脂质过氧化级联反应,造成精子质膜的脂质过氧化损伤,使膜的流动性和完整性发生变化,最终导致精子运动能力下降,甚至完全丧失。多项研究证实,ROS 引发精子膜上的 PUFA 发生过氧化反应可产生大量脂类过氧化物及新的氧自由基,造成精子的完整性、运动性及代谢等遭受不可逆的破坏^[15-17]。ROS 引起精子运动功能障碍的机制涉及多个方面,而其中一个重要的方面就是精子质膜的脂质过氧化损伤。

1.2 ROS 可引发精子顶体结构发生损伤

顶体是由高尔基复合体构成的囊状结构,内含多种与受精过程有关的水解酶,因此顶体的完整性对精子能否发生顶体反应,及能否成功受精具有关键作用。ROS 攻击精子顶体,造成顶体脱落、破损、内含物丢失,进而妨碍精卵识别与融合,影响精子的正常受精功能^[18]。

1.3 ROS 可引发精子 DNA 损伤

精子在冷冻保存过程中,核蛋白对 DNA 双链的保护作用被削弱, DNA 双链发生变性,成为单链 DNA,造成精子线粒体和核基因组 DNA 损伤^[19]; DNA 碱基对氧化应激敏感,这些结构的过氧化能引起碱基修饰、DNA 双链断裂以及染色质交联。由过量 ROS 诱发的 DNA 损伤会加速精子的凋亡过程^[20]。

酶抗氧化系统广泛存在于哺乳动物的生殖系统和精液中,精浆中含有多种抗氧化酶,包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)等都能够有效清除 ROS,保护精子免受氧化损伤。精子本身也含有抗氧化酶,主要有 SOD^[21]。因此在正常情况下 ROS 的产生和清除可以保持动态平衡。但近年来研究表明精液的冷冻-解冻过程能够破坏这种平衡,使 ROS 增加。一方面,由于精子非常脆弱,冷冻耐受能力较差,使得冷冻解冻后精子抗氧化酶的活性降低;另一方面,精子冷冻-解冻过程产生的损伤和死亡的精子比正常精子产生更多的 ROS,是产生 ROS 的主要来源^[22]。精子受到氧化,造成精子质膜和顶体受损,甚至 DNA 遭到破坏,从而影响精子活力和受精能力等。

2 抗氧化剂在精子冷冻保存中的应用

哺乳动物精子在冷冻过程中所发生的理化变化,涉及细胞内外溶质浓度和渗透压增高、细胞脱水、蛋白变性、膜结构损伤和解冻期的危害等方面^[23],而精子遭受过氧化损伤是精子冷冻损伤的一个重要方面。因此人们尝试在精液中添加抗氧化剂,以阻止精子发生脂质过氧化反应,进而对其起到保护作用。根据化学性质和作用机制的不同,将抗氧化剂分为维生素类、酶类和其他抗氧化剂。

2.1 维生素类抗氧化剂

2.1.1 维生素 C (V_C)

维生素 C 又名抗坏血酸,具有强还原性,在体内许多氧化还原反应中起重要作用。V_C 可使氧化型的谷胱甘肽转变为还原型的谷胱甘肽,从而起到保护酶的活性基团-SH 的作用。V_C 还可以保护其他抗氧化剂,如维生素 A、维生素 E 和不饱和脂肪酸,防止自由基对人体的伤害。在精液中添加 V_C 可使精子中的遗传基因通过 V_C 的抗氧化功能而有效地维持其完整性。此外,精液解冻时精液迅速升温,或保存时温度变化,都可能会使精子自身产生

热应激,进而对细胞膜系统造成损伤,而 V_C 对缓解热应激,提高细胞对高温的耐受性和抵抗力有着显著的效果^[24]。Foote等^[25]研究证明 V_C 可提高冷冻-解冻后牛精子的活力和受精能力。任俊玲^[6]用含有不同浓度 V_C 的冷冻稀释液冷冻猪精子,解冻后10 mmol/mL V_C 使精子的活力、活率提高($P<0.01$),40 mmol/mL V_C 时,精子活力、活率有了明显改善。

2.1.2 维生素E (V_E)

维生素E又名生育酚,是有机体重要的抗氧化剂,对氧敏感,易被超氧阴离子(O_2^-)和羟基自由基($OH\cdot$)氧化,因而使细胞免受自由基的攻击而得到保护。 V_E 对细胞膜、线粒体或网状组织的磷脂有着特殊的亲和性,在这些膜的特定部位,能预防或阻止诱发的脂质过氧化反应,使之无法生成作为老化因子的过氧化脂质,保护精子膜免受氧化损伤,从而提高精子的完整性。罗海玲等^[26]发现将 V_E 加入到稀释液中能显著提高绵羊冷冻精液的精子活力($P<0.01$),在保护精子顶体和质膜完整性方面效果显著。Pena等^[27]实验证明添加 V_E 可以改善冷冻-解冻后的猪精子质量。

2.1.3 维生素 B_{12} (V_{B12})

维生素 B_{12} 又名钴维生素,是目前发现的唯一含有金属元素的维生素。它能提高精子活力这一作用可能与其辅酶活性有关。 V_{B12} 辅酶能使氧化型(-S-S-型)辅酶A还原成酶反应所需要的还原型(-SH型)辅酶A,也可使-S-S-型谷胱甘肽以及高胱氨酸还原为-SH型,而还原型谷胱甘肽对精细胞代谢具有非常重要的生物学活性^[28]。 V_{B12} 还具有改善精子外在环境理化特性的作用。周应敏等^[4]研究发现冻存液中添加 V_{B12} 的浓度为1 mg/mL时大熊猫精子顶体完整率有显著提高。蔡吉光等^[29]实验证明在常规稀释液中添加0.50%的 V_{B12} ,能极显著提高解冻后的牛精子顶体完整率,显著降低精子畸形率。

2.2 酶类抗氧化剂

2.2.1 超氧化物歧化酶(SOD)

超氧化物歧化酶是一种对超氧阴离子自由基(O_2^-)具有高度特异性的抗氧化酶,是生物体内清除自由基的首要物质。精子膜受到ROS攻击发生脂质过氧化反应会引起精子活动能力的下降,甚至丧失,而SOD能有效抑制这种脂质过氧化过程,修复受损细胞。在体内SOD通过歧化反应将 O_2^- 转化成 H_2O_2 ,然后通过过氧化氢酶(CAT)或者谷胱甘肽过氧化物酶-还原酶(GPX-GR)系统将 H_2O_2 转化成

H_2O 。Roca等^[30]在猪冷冻保存液中分别添加SOD、CAT和SOD与CAT的混合物,表明SOD和CAT可以有效清除精液冷冻保存过程中产生的ROS,尤其是两者联合添加能极显著地提高对精液的保护效果。

2.2.2 过氧化氢酶(CAT)

过氧化氢酶又称为触酶,是以铁卟啉为辅基的结合酶。它可促使 H_2O_2 分解为分子氧和水,清除体内的 H_2O_2 ,从而使细胞免于遭受 H_2O_2 的毒害,是生物防御体系的关键酶之一。任俊玲等^[6]研究发现单独添加SOD和CAT都可以显著提高冷冻猪精子的质量,但高浓度的SOD降低了精子质量,她认为随着SOD浓度的增大,精液中的 O_2^- 转化成 H_2O_2 而没有及时转化成 H_2O ,联合加入CAT后精子质量显著提高,说明 H_2O_2 对精子结构的损伤更大,所以两者联合添加是提高精液质量的一个可行的办法。

2.2.3 谷胱甘肽

谷胱甘肽,是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸以肽键形式缩合而成的一种三肽物质,有两种存在形式,即氧化型(GSSG)和还原型(GSH)。GSH可保护精子膜上的PUFA免受过氧化损伤,对维持精子膜的完整性具有重要作用。谷胱甘肽过氧化物酶-还原酶(GPX-GR)系统主要用于恢复和重新储存精子膜上PUFA等生理性成分的含量,而GSH是GPX-GR系统的辅助因子,GSH在GPX的作用下,把 H_2O_2 还原成 H_2O ,其自身被氧化为GSSG,GSSG在GR催化作用下还原成GSH,使自由基的清除反应能够持续进行,进而使精子膜免遭氧化损伤。Gadea等^[31]实验证明在冷冻稀释液中添加GSH,可提高解冻后猪精子活力、活率以及降低膜蛋白巯基基团发生改变的精子数;在冷冻稀释液中添加5 mol/L GSH,并没有提高冷冻解冻后猪精子质量和受精率,而在解冻液中添加GSH可以显著提高精子受精率,并具有剂量依赖性^[32]。张旭成等^[33]试验发现在冷冻稀释液中添加L-半胱氨酸能显著提高冻融后猪精子的活率、顶体完整率及体外受精率,同时能显著降低膜脂质过氧化水平。

2.3 其他抗氧化剂

2.3.1 褪黑素(melatonin, MLT)

褪黑素,主要是由哺乳动物的松果体产生的一种胺类激素,具有高度亲脂性和部分亲水性,可通过各种生理屏障,是迄今发现的最强的内源性自由基清除剂,在细胞中发挥强大的抗氧化作用。MLT的抗氧化机制不同于典型的抗氧化物。第一,MLT

可与 ROS 作用形成稳定产物, 不促进氧化反应, 且代谢产物能够持续有效清除 ROS; 第二, MLT 能够协同 V_C 、 V_E 和 GSH 发挥作用清除 ROS; 第三, MLT 可以提高谷胱甘肽过氧化物酶的活性; 第四, MLT 通过增强线粒体 Bcl-2 蛋白水平, 降低细胞内 Bax 蛋白水平, 抑制细胞凋亡^[34]。此外, MLT 还可保护 DNA 免受氧化损伤。杜立银等^[35]研究发现, 在 15℃ 保存的稀释精液中添加 1×10^{-5} mol/L MLT 能够抑制稀释、离心及冷冻保存猪精液中的精子氧化损伤, 显著提高精液保存质量。

2.3.2 海藻糖(trehalose, TH)

海藻糖, 是由两个葡萄糖分子构成的非还原性糖, 性质非常稳定。TH 能够有效地遏制 Ca^{2+} 的流动, 减缓细胞内外渗透压的瞬间变化, 保护细胞膜不被破坏。它还可以与精子膜上的氢结合, 形成一种保护层, 在精子膜破裂的情况下能有效地阻止精子内部有效成分的外流。另外, TH 可调控细胞内和溶液之间水分的变化, 在冷冻解冻过程中保护细胞免受损伤^[36]。咎林森等^[37]发现在公牛精液稀释液中添加 0.025 mol/L TH 对冻后精子活率和质膜完整率均有明显影响。

2.3.3 胆固醇

胆固醇, 是构成细胞膜的重要成分, 可以维护膜的稳定性, 而且能够抑制获能, 但由于胆固醇不溶于水, 所以外在添加胆固醇以维持精子膜稳定性不太可能。精子中的胆固醇硫酸盐(PCS)对精子膜具有稳定作用, 其胆固醇硫酸脂钾盐溶于水溶液, 且结构和胆固醇相似度高, 因此可以在冷冻稀释液中添加胆固醇硫酸脂钾盐, 其进入到精子内能够对质膜起到稳定作用, 还能防止胆固醇外流, 提高质膜抗冷冻打击能力, 进而提高精子质量。倪利平等^[38]研究证明添加适量 PCS 的稀释液在山羊精液解冻后, 精子质量在精子活率、顶体完整率和质膜完整性方面显著高于对照组。

3 小结与展望

多年来研究者一直尝试在冷冻稀释液中添加抗氧化剂以清除冷冻解冻过程中产生的过多 ROS, 提高冷冻精子质量, 但近年来人们对冷冻精子的超微结构进行了研究, 发现冷冻精子大部分超微结构的变化发生在解冻期, 冷冻复苏后精子的质膜变薄、变皱或破损, 顶体增宽, 线粒体外形变圆, 而冷冻状态下的精子质膜、顶体及线粒体结构基本正常, 因此进一步探索在解冻液中添加抗氧化剂以提

高冷冻精液质量将有重要意义。现阶段抗氧化剂在家畜精液冷冻保存中的应用通常都是单一的, 很少涉及到联合添加, 尤其是维生素类和酶类抗氧化剂的联合应用。Dalvit 等^[39]研究表明, 联合加入 V_C 和 V_E 能够更有效地保护精子免受 ROS 攻击, 提高精子质量。精液冷冻保存过程中添加抗氧化剂在牛、羊、猪等家畜中已有一些研究, 而将其应用到大熊猫等珍稀野生动物上却鲜有报道, 因此可以进行相关研究, 以提高冷冻精液质量和人工受精率。

[参 考 文 献]

- [1] 鲜红. 大熊猫精浆成分与精液质量关系及提高大熊猫冷冻精子体外受精能力的研究[D]. 四川农业大学硕士学位论文, 2005
- [2] 黄炎, 王鹏彦, 张贵权, 等. 大熊猫人工受精的研究. *Dev Reprod Biol*, 2002, 11(2): 88-94
- [3] 黄炎, 李德生, 杜军, 等. 大熊猫精液超低温冷冻的比较. *动物学杂志*, 2001, 36(2): 25-9
- [4] 周应敏, 吴代福, 汤纯香, 等. 冻存液添加维生素 B_{12} , 解冻液添加 BSA 及肝素对大熊猫精子的影响. *四川动物*, 2007, 26(3): 669-72
- [5] 侯蓉, 王基山, 张志和, 等. 大熊猫细管冻精制备程序的建立与应用. *中国兽医学报*, 2005, 25(3): 320-2
- [6] 任俊玲. 冷冻稀释液中添加抗氧化剂对猪精液冷冻保存效果的影响[D]. 四川农业大学硕士学位论文, 2007
- [7] Aitken RJ. Possible redox regulation of sperm motility activation. *J Androl*, 2000, 21(4): 491-6
- [8] de Lamirande E, Gagnon C. Paradoxical effect of reagents for sulfhydryl and disulfide groups on human sperm capacitation and superoxide production. *Free Radic Biol Med*, 1998, 25(7): 803-17
- [9] Ochsendorf FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*, 1999, 5(5): 399-420
- [10] Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl*, 1997, 20(2): 61-9
- [11] Ichikawa T, Oeda T, Ohmori H, et al. Reactive oxygen species influence the acrosome reaction but not acrosin activity in human spermatozoa. *Int J Androl*, 1999, 22(1): 37-42
- [12] Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, et al. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*, 1998, 13(4): 896-900
- [13] Agarwal A, Saleh RA. 氧化应激检测在男子不育临床中的应用. *中华男科学杂志*, 2002, 8(1): 1-9
- [14] Mammoto A, Masumoto N, Tahara M, et al. Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. *Biol Reprod*, 1996, 55(5): 1063-8
- [15] Chi HJ, Kim JH, Ryu CS, et al. Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod*, 2008, 23(5): 1023-8
- [16] Aqarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol*, 2008, 59(1): 2-11

- [17] Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004, 2(12): 1-7
- [18] 商学军, 黄宇烽, 熊承良, 等. 正常精子体外与活性氧作用后超微结构观察. *中华男科学杂志*, 2002, 8(2): 106-8
- [19] 张建瑞, 许成岩, 王丽, 等. 冷冻对人精子氧化应激水平、核DNA损伤的影响. *山东大学学报*, 2010, 48(1): 102-5
- [20] 王娜. 活性氧类物质对精子DNA的损伤及其检测. *中国医学导报*, 2009, 6(12): 5-6
- [21] 任俊玲, 马恒东, 李和平. 抗氧化剂在哺乳动物精液冷冻保存中的应用. *甘肃畜牧兽医*, 2007, 37(3): 39-42
- [22] Ball BA, Vo AT, Baumber J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am J Vet Res*, 2001, 62(4): 508-15
- [23] 赵宪林. 三种维生素对牛冷冻精液品质的影响[D]. 西北农林科技大学硕士学位论文, 2009
- [24] 姚桂东, 陶勇, 章孝荣. 维生素B₁₂、E和C在家畜精液保存中的应用. *动物医学进展*, 2006, 27(3): 36-9
- [25] Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci*, 2002, 71(1-2): 13-23
- [26] 罗海玲, 贾志海, 朱士恩. 维生素E对绵羊鲜精及冻精精液品质的影响. *中国草食动物*, 2004, 24(5): 14-6
- [27] Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M, et al. Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote*, 2004, 12(2): 117-24
- [28] 王和民, 齐广海. 维生素研究进展[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1993: 84-90
- [29] 蔡吉光, 孙淑琴, 王立阁, 等. 稀释液中添加不同浓度的维生素B₁₂对牛细管冷冻精液精子形态的影响. *辽宁农业职业技术学院学报*, 2004, 6(2): 10-1
- [30] Roca J, Rodriguez MJ, Gil MA, et al. Survival and *in vitro* fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J Androl*, 2005, 26(1): 15-24
- [31] Gadea J, García-Vazquez F, Matás C, et al. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J Androl*, 2005, 26(3): 396-404
- [32] Gadea J, Selles E, Marco MA, et al. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, 2004, 62(3-4): 690-701
- [33] 张旭成, 魏世宝, 袁慧敏, 等. L-半胱氨酸对冻融后精子质量参数和膜脂质过氧化反应的影响. *安徽农业大学学报*, 2010, 37(1): 51-3
- [34] 杜立银, 刘铁铮, 鲁金波. 抗氧化剂在猪精液冷冻保存技术中的应用. *中国畜牧杂志*, 2008, 44(1): 47-9
- [35] 杜立银, 曹少先, 郭炜, 等. 褪黑素在猪精液保存中的抗氧化作用. *江苏农业学报*, 2009, 25(2): 315-9
- [36] Bakas LS, Disalvo EA. Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology*, 1991, 28(4): 347-53
- [37] 咎林森, 张莺莺, 耿繁军, 等. 海藻糖和牛血清白蛋白对牛精液的冷冻效果. *西北农林科技大学学报*, 2008, 36(10): 53-8
- [38] 倪利平, 郑云胜, 宏伟, 等. 稀释液中添加PCS对冷冻保存过程中山羊精子质量的影响. *畜牧与饲料科学*, 2008, 5: 9-12
- [39] Dalvit GC, Cetica PD, Beconi MT. Effect of α tocopherol and ascorbic acid on bovine *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 1998, 49(3): 619-27