

DOI: 10.13376/j.cbls/2021061

文章编号: 1004-0374(2021)05-0582-11

雌性动物生殖道内精子储存的研究进展

杨 戈, 楚金雨, 李绍梅, 牟春燕*

(华中农业大学动物科学技术学院, 农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 雌性的精子储存是一类自然界广泛发生的生理现象, 主要包括精子进入雌性生殖道、暂时储存于雌性生殖道以及重新激活释放等过程。雌性精子储存是体内受精的动物异步交配与排卵的生殖基础, 在不同物种之间存在一定的差异性。影响雌性动物精子储存的因素众多, 其中最重要的是不同物种间形态各异的精子储存结构, 这是导致不同动物精子储存时间差异的直接原因。此外, 还有很多生理过程和生物因子调控雌性生殖道内的精子储存时长, 包括脂质的代谢、抗氧化水平的调节、微酸性pH微环境的维持、免疫反应的抑制等, 面对类似的生理需求, 雌性储存精子的机制在物种之间可能具有一定的保守性。该文综述不同物种雌性精子储存的结构差异和调控机制, 解读生物精子储存的多样性, 为进一步探索雌性精子储存机制提供思路。

关键词: 雌性生殖道; 精子储存; 脂质; 抗氧化; pH; 免疫反应; 激素

中图分类号: Q492.5; Q954.4 **文献标志码:** A

Advances in sperm storage within female reproductive tract

YANG Ge, CHU Jin-Yu, LI Shao-Mei, MOU Chun-Yan*

(Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Education, College of Animal Sciences and Technology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The long-term sperm storage is described as the temporary maintenance of sperm in sperm storage reservoir after entering into the reproductive tract, followed by the activation and release of sperm to move towards the fertility site. This phenomenon occurs across various female animals. The capacity of sperm storage provides a reproductive basis of asynchronous copulation and ovulation for organisms with internal fertilization, and presents greatly diversity among species. Of numerous factors affecting female sperm storage, the key point is the difference of sperm storage structure across species, which underlies the differential capacity of sperm storage. Besides, plenty of physiological processes and bio-factors including lipid metabolism, regulation of antioxidation, maintenance of acidic pH, as well as inhibition of immunoreaction, etc., have been suggested to function in female sperm storage. The mechanisms of sperm storage may be conserved among species considering the basic physiological requirement. This review aims to decipher the diversity of sperm storage, particularly the sperm storage structures and sites, and the general principles of female sperm storage, to drive deep thinking of this complicated phenomenon regarding the high efficiency of reproduction in human and other animals, as well as the rescue or preservation of animals from extinction.

Key words: female reproductive tract; sperm storage; lipid; antioxidation; pH; immunoreaction; hormone

在动物繁殖过程中, 精子和卵子的顺利结合至关重要, 是物种延续最重要的事件之一。体外受精的物种(如海胆和海鞘)通常同步产生两性配子, 辅以精子对卵子的趋化性保证受精^[1]。体内受精的动物, 交配、授精、受精以及分娩等生殖事件在时间

上通常不是同步的, 需要一种“精子储存”机制确保精子能够暂时停留在雌性生殖道, 并在雌性排卵

收稿日期: 2020-11-19; 修回日期: 2020-12-22

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0501301)

*通信作者: E-mail: chunyanmou@mail.hzau.edu.cn

之后及时释放精子完成受精, 这一过程不仅有利于选择更“优质”的精子, 而且有助于精子能够在正确的时间和场所结合卵子, 成功受精并繁殖后代。

什么是精子储存, 最常见的定义是将雄性的精子保留在雌性生殖道内一段时间^[2]。精子储存是生物异步交配与受精的生理基础, 在物种之间表现出一定的多样性。有的生物能够将精子储存在体内数年之久。然而, 在体外, 除非借助超低温冷冻, 否则精子通常在储存几天后就会失活。对精子储存现象的探索, 有利于解读生物繁殖的多样性和环境适应性, 优化现有体外精子保存方法、模式和理念, 服务于相关行业, 如生殖疾病的诊疗、濒危动物的种质资源保护以及养殖业的发展等。

1 雌性动物精子储存的时间差异

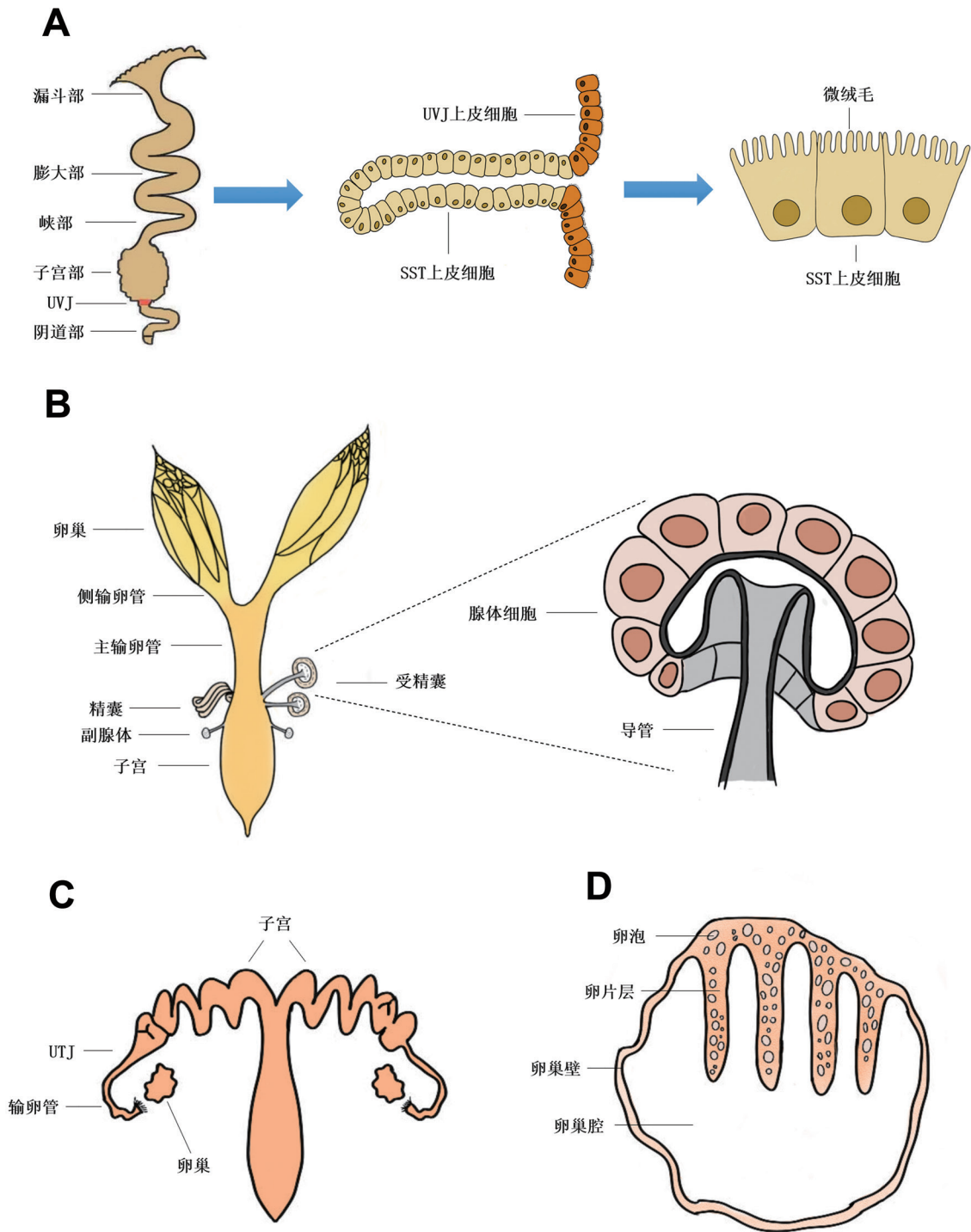
在交配后较短时间内, 雌性生殖道的精子若非处于自然储存部位, 所观察到的存活时间往往是精子自身的寿命, 而非真正的“精子储存”^[2]。不同物种精子储存时间的差异很大, 除了蝙蝠储存精子可达6个月, 大部分雌性哺乳动物仅能储存精子数小时至几天; 鸟类可以支持精子储存在雌性生殖道数周; 在一些爬行动物(如龟、鳖和蛇)、两栖动物(蝾螈类)、鱼类(鲨鱼等)中, 由于体温易变且繁殖周期较长的特性, 雌性的精子储存可达数月, 甚至几年^[3-5]。

为何物种之间的精子储存时间会有如此大的差异, 至今尚无定论。动物精子储存时间的长短可能与种群内交配的难易程度, 或者说交配频率有关, 易于交配的物种精子储存时间会自然地缩短, 反之亦然。在某种意义上, 精子储存现象是物种的固有习性, 如体温、冬眠、种群密度、迁徙、觅食等适应环境变化的表现形式。

2 雌性动物精子储存结构的比较

不同物种的精子储存方案通常存在一定的差异性, 例如形态各异的精子储存结构(表1)。在鸟类、爬行动物以及部分软骨鱼类中, 雌性精子储存依靠一种拥有盲端的特化上皮凹陷结构——精子储存小管(sperm storage tubule, SST)^[3], 这种管状腺体是常见且进化较为完全的精子储存结构。值得注意的是, 这些生物虽然都拥有可以储存精子的管状腺体, 但腺体的微观结构和所处部位在物种之间有所不同。在鸟类中, SST主要位于子宫和阴道交界的特定部位(uterovaginal junction, UVJ)(图1A), 通过

透射电镜观察到UVJ上皮由纤毛细胞和分泌细胞构成, 纤毛细胞具有丰富的纤毛, 核位于细胞顶端, 细胞内的分泌颗粒较大, 通过胞吐和外泌体释放分泌物, 主要发挥维持黏膜运动、辅助精子活动等功能; 而分泌细胞轴端存在微绒毛, 核位于细胞基部, 分泌颗粒较小且密集, 通过分泌囊泡、外泌体、多泡体等释放分泌物, 参与维持合适的管腔微环境^[6]。SST由单层柱状上皮细胞组成, 可能不具有分泌功能, 在管腔内存在细小的微绒毛^[7]。在爬行动物雌性生殖道的不同节段观察到SST, 包括输卵管漏斗、峡部、子宫、阴道等。不同的爬行动物雌性生殖道中的精子储存区域存在差异, 如中华鳖主要将精子储存在峡部的SST中^[8]。输卵管上皮由纤毛细胞和分泌细胞组成, 精子通常嵌入纤毛间, 甚至嵌入纤毛细胞的顶端凹陷中, 或者聚集于腺管中。透射电镜显示两种细胞具有明显的结构差异: 纤毛细胞中线粒体较多, 可能为上皮纤毛与精子的接触提供动力; 而分泌细胞中分泌颗粒较多, 其分泌物可能为精子储存提供合适的微环境^[5,9]。蛇类的SST主要位于漏斗的后部, 同样由纤毛细胞和分泌细胞构成, 利用透射电镜发现分泌细胞的超微结构存在季节性变化, 交配后在SST最深处观察到线性排列的精子^[10-11]。蜥蜴的SST主要位于UVJ, 细胞组成与中华鳖相似, 细胞内丰富的分泌颗粒以胞吐的方式释放到SST或输卵管的管腔, 但是, 透射电镜观察发现储存的精子与SST细胞没有明显的物理接触^[12]。雌性精子储存现象在鱼类中也有发现, 软骨鱼的精子储存区域位于输卵管与子宫之间, 分为棒状(club)区、乳头(papillary)区、隔板(baffle)区以及终末(terminal)区, 利用扫描电镜观察到精子主要成束储存于终末区的管状腺体中, 腺体靠近隔板区, 光镜下观察到腺体周围有高度血管化的结缔组织, 腺体由具有顶核的纤毛柱状细胞以及具有基底核与分泌颗粒的分泌柱状细胞组成, 排列于腺体上的纤毛可能负责精子进出SST, 而分泌产物被认为对精子储存起支持作用^[13-14]。此外, 在尾蟾(*Ascaphus truei*)的输卵管中也观察到储存精子的管状腺体位于输卵管壶腹部远端的卵囊处, 由有纤毛的非分泌细胞和无纤毛的分泌细胞组成, 透射电镜发现精子紧密排列于腺体中, 这是目前已知的唯一一种存在输卵管精子储存现象的无尾目两栖动物^[15-16]。在两栖动物无足目, 如蚓螈目动物的输卵管中也发现类似于尾蟾的精子储存结构: 呈放射状分布的简单管状腺体由大量分泌细胞组成, 阿尔新蓝(pH 2.5)-PAS



(A)鸟类精子主要储存于UVJ的SST中，SST由单层柱状无纤毛细胞组成，细胞表面分布有微绒毛；(B)昆虫果蝇精子主要储存于主输卵管与子宫之间的受精囊中，受精囊由腺体细胞形成荚膜，由导管连接输卵管；(C)哺乳动物主要将精子储存于输卵管峡部、UTJ以及子宫等部位的上皮细胞上，一般没有明显的腺体结构；(D)杜父鱼(硬骨鱼的一种)将精子储存于卵片层上皮之间的间隙中，而硬骨鱼通常将精子直接储存于卵巢管腔或卵巢液中。UVJ，子宫阴道交界处；SST，精子储存小管；UTJ，子宫输卵管交界处(utero-tubal junction)。

图1 四种代表性精子储存结构示意图

双染色显示胞质中含有中性黏多糖和颗粒物质。然而，有研究认为尾蟾以及蚓螈动物的这种管状腺体是输卵管上皮的简单延伸，仅仅是精子暂时停留的

场所而非生理意义上的长期精子储存结构^[17]。

昆虫中也存在精子储存的特殊结构，较为常见的是“受精囊”(spermatheca)，一般位于输卵管与

子宫之间^[18]。在果蝇中, 受精囊呈蘑菇状, 通过显微镜和电镜观察到外层由腺体细胞排列组成荚膜, 荚膜被脂肪体细胞(fat body cell)围绕, 包含一个由顶膜凹陷形成的内腔, 并通过导管与荚膜管腔相连(图1B), 受精囊可能产生两种类型的分泌物, 即腺体分泌物(包括糖蛋白和脂蛋白)和脂肪体分泌物, 共同支持着精子的长期储存^[19]。在双翅目昆虫生殖道可能存在其他的精子储存结构, 如黑腹果蝇从子宫壁腹侧延伸而起的盲端管状结构“精囊”(seminal receptacle)^[20]。其中, 精囊会储存大部分精子(65%~80%), 而受精囊中的精子会储存更久, 在精囊中的精子部分耗尽后才开始释放, 这可能代表了黑腹果蝇长期与短期两种不同的储精模式^[21]。通过受精囊储存精子的现象不仅在昆虫中发生, 两栖动物中蝾螈亚目的雌性生殖道内也存在来源于泄殖腔膜的受精囊, 精子可能嵌入受精囊上皮并保持静止, 而上皮细胞分泌物, 包括酸性糖蛋白、锌等可能支持着其中的精子储存, 这是目前已知的唯一拥有泄殖腔精子储存的脊椎动物^[16]。

雌性哺乳动物的精子储存位置因物种而异, 包括阴道、子宫、子宫输卵管交界处、输卵管峡部等(图1C), 精子与各部位的上皮细胞相互作用并附着而停留^[3,22-24]。由于哺乳动物中还存在胚胎着床和发育延迟等其他生殖事件的分离机制, 哺乳动物的精子储存结构特化程度相对较低, 精子储存时间一般

较短(除蝙蝠)^[4]。

相较于其他物种, 硬骨鱼的雌性精子储存模式与众不同(图1D)。花斑剑尾鱼能将精子储存在卵巢及生殖管中, 并与上皮细胞结合保持活力, 这些上皮细胞称为精子相关细胞(sperm-associated cell, SAC), 通过透射电镜观察发现SAC缺乏分布广泛的微绒毛和溶酶体活动, 精子可以储存于SAC表面凹陷, 甚至结合到SAC的细胞质中^[25]。在孔雀鱼的卵巢中发现精子位于卵泡表面的微囊中, 其是从卵巢腔延伸而出的盲道^[26]。此外, 精子储存于鱼类卵巢管腔, 甚至漂浮在卵巢液中的现象也有报道(图1D), 来自卵巢壁上皮的多糖、蛋白质、脂质等可能会为精子提供营养, 而卵巢液的微环境, 如酸性pH, 有利于维持精子长期储存^[27-28]。

综上, 精子储存结构在物种之间具有一定的多样性和保守性, 具体结构特征见表1。体外受精的物种通常不发生雌性的精子储存, 对于体内受精的动物, 精子储存是物种适应不同生态环境的表现之一。通过不同物种系统发育树分析, 结合形态学特征, 以及线粒体、蛋白质、核DNA序列的比较, 表明精子储存是经过反复进化的生殖策略之一, 是基于雄性或雌性或两性的自然选择^[29-30]。在自然选择的过程中, 雌性精子储存的特征可能会有偏向性的发展, 如精子形态的变化可能是雄性生殖系统进化的结果, 而储存精子的特殊结构显然源于雌性的选

表1 不同物种中的精子储存结构比较

精子储存结构	物种	结构特征	参考文献
输卵管腺体	鸟纲(鸡、鹌鹑、火鸡等)	SST位于UVJ, 非纤毛细胞组成, 管腔内有微绒毛。	[4,6-7]
	爬行纲(中华鳖)	SST位于输卵管(漏斗、子宫、阴道, 大部分位于峡部), 主要由纤毛细胞和分泌细胞组成。	[5,8-9]
	爬行纲(蛇)	SST位于漏斗的后部, 主要由纤毛细胞和分泌细胞组成。	[10-11]
	爬行纲(蜥蜴)	SST位于UVJ, 主要由柱状纤毛细胞和无纤毛细胞组成。	[12]
	两栖纲无尾目(尾蟾)	SST位于输卵管壶腹部远端的卵囊处。	[15-16]
	两栖纲无足目(鱼螈)	精子储存结构类似于尾蟾的输卵管腺体, 除了主管之外缺乏明显的SST。	[17]
受精囊	软骨鱼纲(星鲨、鳐)	管腺位于输卵管和子宫之间, 分为四个区域, 精子几乎只储存于终末区的小管中。	[13-14]
	昆虫纲(尺蠖、冈比亚按蚊等)	位于输卵管后部, 由腺体细胞、导管形成细胞, 以及扁平的角质层上皮组成。	[18]
	昆虫纲双翅目(果蝇)	位于输卵管后部, 有两个精子储存器官受精囊和精囊。	[19-21]
生殖道上皮或隐窝	两栖纲有尾目(蝾螈亚目)	唯一有泄殖腔精子储存腺(受精囊)的脊椎动物, 受精囊来源于泄殖腔膜。	[16]
	哺乳纲(猪、牛、狗、蝙蝠等)	储存部位因物种而异, 包括阴道、宫颈、子宫、UTJ、输卵管峡部等, 一般没有明显的腺体结构。	[22-24]
卵巢	硬骨鱼纲(孔雀鱼、杜父鱼等)	精子储存于卵巢腔或卵泡表面微囊, 或浮游于卵巢液。	[25-28]

择性进化,其构造的复杂性往往反映选择强度及进化成本^[4],这意味着即使精子储存的结构与过程相似,但不同物种涉及的机制可能有所差异。

3 精子特性对精子长期储存的影响

精子储存不仅是雌性生殖道对雄性精子进行选择的过程,也是精子之间互相竞争的结果,精子自身特性是精子储存的重要影响因素,包括精子的生理组分及形态特征。在蜂王精子储存期间,受精囊内精子膜的脂质成分加强了抗氧化酶介导的防御系统,有利于抵御过氧化反应^[31]。雄性中华鳖附睾中的精子可以通过自噬作用分解内源性脂滴以提供能量,维持长期储存^[32]。在雌性中华鳖输卵管中,精子发达的鞭毛和纤维鞘是通过糖酵解途径产生ATP的形态学条件^[33]。在果蝇精囊中,较长的精子更有利于延长储存时间^[30]。

4 雌性生殖道精子储存的影响因素

4.1 遗传因素

动物的精子储存能力是一种难以被观测的性状,因此,有关调控雌性生殖道精子储存的遗传学研究很少。对禽类,如鸡、鸭的育种实验发现,即使是同一物种,种群间及种群内的储精能力均存在较大的差异,而且种群的储精能力是可以通过选育进行提高的,间接说明了动物的精子储存受遗传因素的影响^[34-35]。通过对高、低储精能力的母鸡群体进行基因组测序检测出可能与母鸡储精能力相关联的单核苷酸多态性(SNPs)^[36],并鉴定出*TGFβ3*基因片段的SNPs和拷贝数变异(CNV)与母鸡储精能力之间有显著关联效应^[37]。

4.2 脂质代谢

脂质作为能量供应物质以及膜组分的合成原料对细胞的生命活动至关重要,众多研究表明了脂质在维持精子正常功能中的关键作用^[38]。有研究利用透射电镜在培养的火鸡SST细胞内观察到大量的脂质空泡^[7];此外,在鸡的UVJ组织中检测到大量脂滴、多种脂肪酶、脂质受体及脂肪酸,并证实添加不饱和脂肪酸的体外培养利于维持精子的活力^[39]。因此,特殊的脂质环境可能是支持雌性精子储存的重要因素,沉积的脂质在脂肪酶和脂质受体作用下分解成脂肪酸以维持精子的代谢需求。有趣的是,在蝙蝠中发现其体脂耗尽的时间与精子储存的周期相近^[40],类似于冬眠的动物需要囤积大量脂肪,长期的精子储存同样需要可供精子代谢的能量,微环

境中的脂质可能是一种选择。

然而,精子储存的另一种观点认为精子的代谢应该受到抑制^[41],这可能是延长精子在雌性生殖道内存活时间最有效的策略之一。雌性生殖道中沉积过多的脂质可能为精子提供了充足的能量,反而增强了精子的新陈代谢,干扰了精子在储存过程中的静息状态,以及过量脂肪酸可能诱导的过氧化,反而不利于精子的长期储存。

简而言之,脂质代谢对于雌性生殖道的精子储存至关重要,然而不同脂质的组成及含量对精子储存的具体作用尚未明确。机体会根据代谢水平进行调控,以维持精子储存过程中脂质的能量供应与脂质过氧化之间的动态平衡,从而支持精子的长期储存。

4.3 抗氧化水平的调节

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是一种不可避免的有害代谢副产物。由于精子的细胞质含量少、抗氧化能力低且细胞修复系统不完善,易通过自由基连锁反应导致脂质过氧化,影响细胞的结构和功能^[42],因此,氧化应激也是影响雌性生殖道精子储存的重要因素。

线粒体在维持精子内的氧化还原平衡方面至关重要,其内膜的电子传递链对产生内源ROS起主要作用,当ROS诱导氧化应激时,线粒体内的抗氧化酶,如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)等可能发挥作用以改变细胞的抗氧化状态^[43]。在精子体外保存实验中,由异常高水平的ROS引起的线粒体损伤诱导了线粒体依赖的凋亡级联反应,加速了精子凋亡^[44-45]。通过透射电镜观察到线粒体具有广泛的形态异质性,在中华鳖输卵管SST内储存的精子中存在由几层同心膜包被的“洋葱状”线粒体,这些线粒体可能为精子长期保存提供能量,而非通过ROS释放导致精子损伤^[46]。然而,Zhang等^[33]的研究提出,在储存的后期,洋葱状线粒体在输卵管内恢复了双膜结构,且伴随着ATP合成途径的变化,可能反映了其中精子代谢水平的变化。

在精子的体外保存中,添加抗氧化酶、维生素C等抗氧化剂以延长精子保存时间的应用由来已久^[47]。在体内,雌性生殖道也形成了高效的抗氧化系统,如发现抗坏血酸、GPx以及SOD等抗氧化剂在禽类的精子储存中起着重要作用^[48]。抗氧化系统在物种之间有独特的适应性和保守性,精子在不同生物中存活时间的差异与降低ROS水平的抗氧化酶

息息相关^[49]。雌性果蝇精子储存器官的转录图谱显示, 交配引起了精囊和受精囊中抗氧化相关基因的表达变化, 反映了其长期储存精子的需要^[21]。哺乳动物雌性生殖道内抗氧化防御系统以相似的机制工作, SOD、GPx以及过氧化氢酶在母牛的体内受精过程中发挥着清除过氧化物和调节ROS的重要作用, 并且输卵管液中的GPx和过氧化氢酶水平在排卵前达到最高^[50]。发情期母犬输卵管液中SOD活性显著高于乏情期和间情期, 且含SOD的培养液孵育精子有利于维持其存活^[51]。通过观察人类输卵管上皮细胞与精子的相互作用发现, 输卵管上皮细胞膜蛋白可以结合精子, 使其避免ROS诱导的氧化应激, 从而保持结构完整性与活力^[52]。在母鸡UVJ组织的代谢组学分析中发现, 低储精能力个体的丙二醛(脂质过氧化标志物)含量显著高于高储精能力个体, 进一步说明了抗氧化水平对雌性精子储存的影响^[53]。

4.4 pH的维持

pH值也是影响精子活力的重要因素, 精子对环境中的pH的变化十分敏感, 雌性输卵管不同节段的pH是不同的, 通常微酸性的pH更适合于精子的长期储存, 如母猪精子储存库的pH值为6.7^[54]。在体外实验中, 偏碱性的pH值对精子活力有明显的刺激作用, 反之降低pH显著抑制了动物的精子活力^[55]。对交配前后的母鸡输卵管各部位对比发现, 精子进入SST后诱导了pH调节相关基因的表达变化^[56]; 此外, 母鸡输卵管不同部位的转录组学分析显示相比于漏斗部, UVJ中诸如*CAIV*、*SLC444*等pH调节功能基因有着较高水平的表达^[57]。有趣的是, 根据猪和鸡精子储存部位的转录组学分析发现, pH调节机制在物种间是相对保守的, 两个物种的精子储存部位存在相似的候选功能基因调控网络^[58]。

雌性生殖道内的离子稳态与精子功能的维持息息相关^[59], 因为离子与质子的交换会精确迅速地改变细胞内外的pH值。碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)是一种可以介导上皮细胞分泌质子和碳酸氢盐的锌金属酶, 在调节酸碱平衡中起重要的作用^[60]。在大鼠附睾中, 碳酸酐酶在溶质载体蛋白(solute carrier, SLC)的协作下控制HCO₃⁻的生成和运输, 从而实现附睾液的酸化以维持精子储存期间的静息状态^[60]。碳酸酐酶的活跃往往伴随着HCO₃⁻的富集, 而碳酸氢盐被认为是一种可以刺激精子获能的因子^[61]。有研究提出, “精子延迟获能机制”是蝙蝠雌性生殖道中精子长期储存的基础^[62], 因为过早的

获能反应会破坏精子储存的生物学意义^[3]。人类的输卵管上皮细胞与精子的相互作用被认为可以延缓排卵前的提前获能, 对维持精子活力、延长精子储存时间有重要的作用^[63]。此外, 大量的HCO₃⁻会造成偏碱性的微环境, 据此, 是否说明高水平的碳酸酐酶会产生高浓度的碳酸氢盐, 从而不利于精子的长期储存呢? Holm等^[64]研究检测了母鸡输卵管各部位碳酸酐酶活性, 发现相比于漏斗部, UVJ和阴道部的碳酸酐酶活性处于略低的水平, 这个结果支持了该推测。除此之外, 还有各种离子通道蛋白, 如液泡质子ATP酶、氯离子通道CFTR、钠离子通道SCNN1B等均被报道在雌性繁殖中发挥重要作用, 这些pH调节因子的协同作用构建了支持精子长期储存的微环境。

4.5 免疫反应的平衡

精子和精液蛋白对于雌性生殖道免疫系统具有抗原性, 会使其产生排斥反应^[65]。精子储存的成功取决于精子在雌性生殖道内的免疫豁免权, 这也是雌性进行精子选择的有效保障。对交配前后的母鸡UVJ组织进行cDNA微阵列分析发现, 免疫调节相关基因呈现差异表达, 提示了免疫反应在禽类精子储存中的可能作用^[56]。在鸟类和哺乳动物中, TGFβ (transforming growth factor-β)家族可能通过抑制T和B淋巴细胞的增殖来介导免疫抑制^[65]。受精后, TGFβs (TGFβ2、TGFβ3和TGFβ4)及其受体在母鸡UVJ组织中的表达呈上升趋势^[66]。在鸡和火鸡中, 唾液酸作为精子糖萼的组分广泛分布于精子表面, 当精子在雌性的阴道中迁移时, 唾液酸可以隐藏精子表面的抗原位点, 这也是精子抗免疫反应的关键^[67]。

免疫抑制可能是物种间延长精子储存的共同机制。通过透射电镜在中华鳖输卵管上皮和固有层观察到稀少的免疫细胞, 可能是其输卵管精子储存过程中免疫耐受的表现^[5]。TLR (Toll-like receptors)级联是一种重要的先天性免疫反应, TLR的激活会导致炎性细胞因子和趋化因子的合成, 影响淋巴细胞活化的共刺激分子表达^[68]。中华鳖不同时期输卵管组织的转录组学分析发现, *TLR2*、*TLR4*等免疫调节基因在精子储存期间呈现显著的下调, 提示TLR级联反应与精子储存的潜在负相关^[69]。猪和鸡的精子储存部位的转录组学分析发现, 两者在精子储存过程中存在相对保守的免疫过程, 功能基因如*MMP27*、*ADAMTS3*、*MMP3*和*MMP12*等在交配后呈现下调趋势^[58]。在昆虫的精子储存研究中也观察到相似的事件: 埃及伊蚊的交配行为诱导了受精囊

中免疫反应的抑制以维持精子的储存^[70]；苍蝇的免疫激活会降低精子存活率，而且会显著影响雌性的精子储存时效性^[71]。

防御素作为一种抗菌肽，是先天性免疫的重要组成部分，在两性繁殖过程中发挥作用^[72]。已有11种 β -防御素被鉴定为在母鸡生殖道中具有重要功能^[73]，其中禽类 β -防御素-3可以保护精子不受雌性输卵管中的微生物感染^[74]。此外，抗菌肽等免疫物质广泛表达于昆虫以及哺乳动物的雌性生殖道，包括精子储存器官中，且表达水平受交配诱导所改变^[75-76]。这说明雌性生殖道内需要一定的免疫过程来维持微环境的稳定。

雌性生殖道内的精子储存需要一个免疫平衡的生理环境。长期精子储存要求一定的免疫抑制，这是被广泛观察到的现象。然而，精子是十分脆弱的，容易受到各种微生物的侵扰，所以，雌性生殖道内也需要通过免疫反应来保护精子的存活。在雌性生殖道的不同节段可能有侧重不同的免疫策略，如下生殖道内的免疫反应会比较强烈，不仅能防止微生物、细菌等的感染，还能起到精子选择优化受精的作用；而精子储存部位的抗精子免疫反应则会因精子储存的需要被削弱。

4.6 激素

作为重要的内分泌调节因子，激素也影响着雌性生殖道内精子的长期储存。性类固醇激素调节着雌性输卵管的生长、分化和物质分泌，在鸟类的SST细胞或UVJ组织可检测到孕酮(受体)、雌激素(受体)、促黄体激素受体和促卵泡激素受体的表达，并且雌激素和孕酮被认为可能在SST结构形成和UVJ组织发育，以及维持精子储存中发挥作用^[77-78]。此外，日本鹌鹑的前列腺素F2 α 可以诱导阴道收缩，利于精子进入SST，而孕酮是SST释放精子的关键因子^[79]。在中华鳖中，雄激素受体定位于输卵管的上皮和腺体细胞中，且表达模式与精子储存周期几乎同步，表明了雄激素及受体可能在精子储存中发挥重要作用^[8,80]。这与在大黄蝙蝠(*Scotophilus heathii*)中的发现一致，即大黄蝙蝠的雌性精子储存具有雄激素依赖性，高浓度的睾酮是维持输卵管中储存的精子的完整性和活力的必需因素^[41]。

4.7 其他

雌性的精子储存是精子自身特性与储存微环境相互作用的结果。研究发现受精以及排卵前后禽类生殖道中多种蛋白质的表达发生改变^[81-82]，类似地，在猪、兔等哺乳动物输卵管的蛋白质组学研究中

检测到受精后多种蛋白质在输卵管液中的表达发生改变^[83-84]。除了上述因素，还有很多分子在雌性的精子储存中发挥作用，如调节液体动态平衡和渗透压的水通道蛋白在生殖系统中互相协作以维持微环境稳态，从而为精子的渗透平衡提供合适的生理介质^[19,85]；以及物种间高度保守的分子伴侣蛋白——热休克蛋白，在雌性生殖道中可能起维持精子活力、限制精子代谢水平、调节精子质膜流动性的重要作用，从而促进精子的长期储存和精子从储存部位的释放^[86-87]；还有与大黄蝙蝠精子储存周期同步，在UTJ表达上升的Bcl-2与caspase-3蛋白^[41]，存活因子Bcl-2与凋亡因子caspase-3之间的平衡可能通过调节细胞凋亡程序支持雌性生殖道中精子的长期储存。

除此之外，碱性磷酸酶可影响SST细胞的分化和增殖，以及精子和SST上皮细胞之间的脂质转移过程^[88]。日本鹌鹑UVJ提取物中的L-乳酸可以抑制精子活力，维持其静息状态^[79]。在禽类SST管腔内还检测到丰富的金属元素，包括钙、锌、钾等，它们可能在维持微环境pH、抑制精子代谢与精子获能等事件中发挥重要作用^[89]。

精子在雌性生殖道的储存是一个连续的动态过程，主要包括精子进入下生殖道、暂时驻留在精子储存库、精子被激活释放，在这个过程中影响雌性精子储存的因素很多，概括而言可以说是三方面：精子的自身特性、特殊的储存微环境以及精子与储存环境上皮之间的相互作用。从目前的研究中收集到的线索来看，精子储存的机制在物种间存在一定的保守性和差异性，通过比较不同物种中精子储存现象的描述，有利于人们对雌性精子储存机制的进一步解读。

5 结语

自20世纪以来，雌性的精子储存现象在各物种中被广泛研究，但受限于很多野生物种实验取材的困难和繁殖周期较长等因素，至今未能取得较大的进展。建立规范的实验群体更有利于雌性精子储存相关研究的进行。近年来，禽类(如鸡、火鸡、鹌鹑)和爬行动物(如中华鳖)的应用尤为广泛，因为它们拥有较为成熟的精子储存结构，精子储存时间较长，受精及繁殖情况易于观察，维护成本相对较低，是值得鼓励利用的精子储存实验动物模型。

随着养殖业的规模化、集约化发展，人工授精技术被广泛应用于动物生产中，但精液保存时间

短、质量差却成为限制其推广的主要原因。此外,更重要的是,随着生态环境的剧烈改变,野生动物的种类和数量以惊人的速度减少,越来越多的动物沦为濒危物种,利用冷冻技术保存配子是目前遗传资源保护的一种常用方法,但是通常使用的超低温保存存在一个问题,即配子在解冻后往往难以恢复活力,而且不同物种的配子冷冻要求也有很大差别^[90]。因此,雌性精子储存现象的研究对于改善体外精子保存方法意义非凡,经历了选择进化无数年的动物们显然已经发明了解决精子储存问题高效且自然的方法,尽管人类进行了多年的研究,但仍然远远不足,通过对不同物种精子储存机制的探索,明确有助于精子储存的生物因子,有利于突破现有的精子保存方法。

雌性动物的精子储存是一个受遗传因素调控的数量性状,在畜禽生产中要求雌性精子储存时间越长越好,因为连续人工授精的频率会随精子储存时间的延长而减少,从而降低成本,所以品种的选育尤为重要。鉴于分子育种理论的快速发展,功能基因组学可能为识别与雌性精子储存相关的分子标记提供助力,从而优化精子储存性状,辅助良种选育。

[参 考 文 献]

- [1] Fitzpatrick JL, Willis C, Devigili A, et al. Chemical signals from eggs facilitate cryptic female choice in humans. *Proc Biol Sci*, 2020, 287: 20200805
- [2] Orr TJ, Zuk M. Sperm storage. *Curr Biol*, 2012, 22: R8-10
- [3] Holt WV, Fazeli A. Sperm storage in the female reproductive tract. *Annu Rev Anim Biosci*, 2016, 4: 291-310
- [4] Orr TJ, Brennan PL. Sperm storage: distinguishing selective processes and evaluating criteria. *Trends Ecol Evol*, 2015, 30: 261-72
- [5] Chen S, Zhang L, Le Y, et al. Sperm storage and spermatozoa interaction with epithelial cells in oviduct of Chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*. *Ecol Evol*, 2015, 5: 3023-30
- [6] Waqas MY, Yang P, Ahmed N, et al. Characterization of the ultrastructure in the uterovaginal junction of the hen. *Poult Sci*, 2016, 95: 2112-9
- [7] Talbot NC, Krasnec KV, Garrett WM, et al. Finite cell lines of turkey sperm storage tubule cells: ultrastructure and protein analysis. *Poult Sci*, 2018, 97: 3698-708
- [8] Liu T, Chu X, Huang Y, et al. Androgen-related sperm storage in oviduct of Chinese soft-shelled turtle *in vivo* during annual cycle. *Sci Rep*, 2016, 6: 20456
- [9] Le Y, Chen S, Hu L, et al. B-cell lymphoma-2 localization in the female reproductive tract of the Chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis* and its relationship with sperm storage. *Anat Rec (Hoboken)*, 2015, 298: 2011-7
- [10] Siegel DS, Sever DM. Seasonal variation in the oviduct of female *Agkistrodon piscivorus* (Reptilia: Squamata): an ultrastructural investigation. *J Morphol*, 2008, 269: 980-97
- [11] Silva KMP, Barros VA, Rojas CA, et al. Infundibular sperm storage and uterine muscular twisting in the Amazonian lancehead, *Bothrops atrox*. *Anat Rec (Hoboken)*, 2020, 303: 3145-54
- [12] Shankar G, Sagar BK, Kumari TR, et al. Ultrastructural features of sperm storage tubules in the oviduct of the Indian garden lizard, *Calotes versicolor*. *Anat Rec (Hoboken)*, 2015, 298: 1932-7
- [13] Moya AC, Acuna F, Diaz Andrade MC, et al. Glycan expression as a tool for a deeper understanding of a reproductive gland in a skate of economic importance. *J Fish Biol*, 2020: 1-11
- [14] Storrle MT, Walker TI, Laurenson LJ, et al. Microscopic organization of the sperm storage tubules in the oviducal gland of the female gummy shark (*Mustelus antarcticus*), with observations on sperm distribution and storage. *J Morphol*, 2008, 269: 1308-24
- [15] Sever DM, Moriarty EC, Rania LC, et al. Sperm storage in the oviduct of the internal fertilizing frog *Ascaphus truei*. *J Morphol*, 2001, 248: 1-21
- [16] Sever DM. Female sperm storage in amphibians. *J Exp Zool*, 2002, 292: 165-79
- [17] Kuehnel S, Kupfer A. Sperm storage in caecilian amphibians. *Front Zool*, 2012, 9: 12
- [18] Dallai R, Fanciulli PP, Mercati D, et al. Coevolution between female seminal receptacle and sperm morphology in the semiaquatic measurer bug *Hydrometra stagnorum* L. (Heteroptera, Hydrometridae). *Arthropod Struct Dev*, 2020, 60: 101001
- [19] Heifetz Y, Rivlin PK. Beyond the mouse model: using *Drosophila* as a model for sperm interaction with the female reproductive tract. *Theriogenology*, 2010, 73: 723-39
- [20] Mayhew ML, Merritt DJ. The morphogenesis of spermathecae and spermathecal glands in *Drosophila melanogaster*. *Arthropod Struct Dev*, 2013, 42: 385-93
- [21] Prokupek AM, Kachman SD, Ladunga I, et al. Transcriptional profiling of the sperm storage organs of *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol Biol*, 2009, 18: 465-75
- [22] Rath D, Schuberth HJ, Coy P, et al. Sperm interactions from insemination to fertilization. *Reprod Domest Anim*, 2008, 43 Suppl 5: 2-11
- [23] Apichela SA, Argañaraz ME, Giuliano S, et al. Llama oviductal sperm reservoirs: involvement of bulbourethral glands. *Andrologia*, 2014, 46: 290-5
- [24] Engl GC, Burgess CM, Clutterbuck AL, et al. Epithelial surface changes and spermatozoa storage in the reproductive tract of the bitch. *Vet J*, 2013, 195: 185-91
- [25] Potter H, Kramer CR. Ultrastructural observations on sperm storage in the ovary of the platyfish, *Xiphophorus maculatus* (Teleostei: poeciliidae): the role of the duct epithelium. *J Morphol*, 2000, 245: 110-29

- [26] Kobayashi H, Iwamatsu T. Fine structure of the storage micropocket of spermatozoa in the ovary of the guppy *Poecilia reticulata*. *Zoolog Sci*, 2002, 19: 545-55
- [27] Muñoz M, Koya Y, Casadevall M. Histochemical analysis of sperm storage in *Helicolenus dactylopterus* (Teleostei: Scorpaenidae). *J Exp Zool*, 2002, 292: 156-64
- [28] Koya Y, Munehara H, Takano K. Sperm storage and motility in the ovary of the marine sculpin *Alicichthys alcicornis* (Teleostei: Scorpaeniformes), with internal gametic association. *J Exp Zool*, 2002, 292: 145-55
- [29] Holt WV. Mechanisms of sperm storage in the female reproductive tract: an interspecies comparison. *Reprod Domest Anim*, 2011, 46 Suppl 2: 68-74
- [30] Zajitschek S, Zajitschek F, Josway S, et al. Costs and benefits of giant sperm and sperm storage organs in *Drosophila melanogaster*. *J Evol Biol*, 2019, 32: 1300-9
- [31] Wegener J, Zschörnig K, Onischke K, et al. Conservation of honey bee (*Apis mellifera*) sperm phospholipids during storage in the bee queen -- a TLC/MALDI-TOF MS study. *Exp Gerontol*, 2013, 48: 213-22
- [32] Chen H, Huang Y, Yang P, et al. Lipophagy contributes to long-term storage of spermatozoa in the epididymis of the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Reprod Fertil Dev*, 2019, 31: 774-86
- [33] Zhang L, Yang P, Bian X, et al. Modification of sperm morphology during long-term sperm storage in the reproductive tract of the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Sci Rep*, 2015, 5: 16096
- [34] Brillard JP, McDaniel GR, De Reviers M, et al. Expression of several traits of fertility in young and old dwarf broiler breeder hens inseminated with duplicate doses of semen. *Poult Sci*, 1989, 68: 558-63
- [35] Cheng YS, Rouvier R, Poivey JP, et al. Selection responses for the number of fertile eggs of the Brown Tsaiya duck (*Anas platyrhynchos*) after a single artificial insemination with pooled Muscovy (*Cairina moschata*) semen. *Genet Sel Evol*, 2002, 34: 597-611
- [36] Azmal SA, Nan J, Bhuiyan AA, et al. A genome-wide single nucleotide polymorphism scan reveals genetic markers associated with fertility rate in Chinese Jing Hong chicken. *Poult Sci*, 2020, 99: 2873-87
- [37] Gu L, Sun C, Gong Y, et al. Novel copy number variation of the TGFβ3 gene is associated with TGFβ3 gene expression and duration of fertility traits in hens. *PLoS One*, 2017, 12: e0173696
- [38] Walters JLH, Gadella BM, Sutherland JM, et al. Male infertility: shining a light on lipids and lipid-modulating enzymes in the male germline. *J Clin Med*, 2020, 9: 327
- [39] Huang A, Isobe N, Obitsu T, et al. Expression of lipases and lipid receptors in sperm storage tubules and possible role of fatty acids in sperm survival in the hen oviduct. *Theriogenology*, 2016, 85: 1334-42
- [40] Roy VK, Krishna A. Changes in the expression of HSL and OCTN2 in the female reproductive tract of the bat, *Scotophilus heathii* in relation to sperm storage. *Acta Histochem*, 2012, 114: 358-62
- [41] Roy VK, Krishna A. Sperm storage in the female reproductive tract of *Scotophilus heathii*: role of androgen. *Mol Reprod Dev*, 2011, 78: 477-87
- [42] Dutta S, Majzoub A, Agarwal A. Oxidative stress and sperm function: a systematic review on evaluation and management. *Arab J Urol*, 2019, 17: 87-97
- [43] Moraes CR, Meyers S. The sperm mitochondrion: organelle of many functions. *Anim Reprod Sci*, 2018, 194: 71-80
- [44] Liu T, Han Y, Zhou T, et al. Mechanisms of ROS-induced mitochondria-dependent apoptosis underlying liquid storage of goat spermatozoa. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11: 7880-98
- [45] Chen H, Huang Y, Bai X, et al. Apoptotic-like changes in epididymal spermatozoa of soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*, during long-term storage at 4°C. *Anim Reprod Sci*, 2019, 205: 134-43
- [46] Han X, Zhangli L, Li M, et al. Ultrastructure of anterior uterus of the oviduct and the stored sperm in female soft-shelled turtle, *Trionyx sinensis*. *Anat Rec (Hoboken)*, 2008, 291: 335-51
- [47] Kumar A, Prasad JK, Srivastava N, et al. Strategies to minimize various stress-related freeze-thaw damages during conventional cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Biopreserv Biobank*, 2019, 17: 603-12
- [48] Breque C, Surai P, Brillard JP. Antioxidant status of the lower oviduct in the chicken varies with age and dietary vitamin E supplementation. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73: 1045-51
- [49] Friesen CR, Noble DWA, Olsson M. The role of oxidative stress in postcopulatory selection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2020, 375: 20200065
- [50] Lapointe J, Bilodeau JF. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biol Reprod*, 2003, 68: 1157-64
- [51] Kobayashi M, Wada M, Hori T, et al. Superoxide dismutase activity in the oviductal and uterine fluid of the bitch and the effects of the enzyme on viability, motility and hyperactivation of canine sperm *in vitro*. *J Vet Med Sci*, 2014, 76: 741-3
- [52] Huang VW, Zhao W, Lee CL, et al. Cell membrane proteins from oviductal epithelial cell line protect human spermatozoa from oxidative damage. *Fertil Steril*, 2013, 99: 1444-52.e3
- [53] Wen C, Mai C, Wang B, et al. Detrimental effects of excessive fatty acid secretion on female sperm storage in chickens. *J Anim Sci Biotechnol*, 2020, 11: 26
- [54] Rodriguez-Martinez H. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*, 2007, 68 Suppl 1: S138-46
- [55] Mishra AK, Kumar A, Swain DK, et al. Insights into pH regulatory mechanisms in mediating spermatozoa functions. *Vet World*, 2018, 11: 852-8
- [56] Atikuzzaman M, Mehta Bhai R, Fogelholm J, et al. Mating induces the expression of immune- and pH-regulatory genes in the utero-vaginal junction containing mucosal sperm-storage tubuli of hens. *Reproduction*, 2015, 150: 473-83
- [57] Han J, Ahmad HI, Jiang X, et al. Role of genome-wide

- mRNA-seq profiling in understanding the long-term sperm maintenance in the storage tubules of laying hens. *Trop Anim Health Prod*, 2019, 51: 1441-7
- [58] Atikuzzaman M, Alvarez-Rodriguez M, Vicente-Carrillo A, et al. Conserved gene expression in sperm reservoirs between birds and mammals in response to mating. *BMC Genomics*, 2017, 18: 98
- [59] Yang L, Zheng X, Mo C, et al. Transcriptome analysis and identification of genes associated with chicken sperm storage duration. *Poult Sci*, 2020, 99: 1199-208
- [60] Bernardino RL, Carragea DF, Sousa M, et al. pH and male fertility: making sense on pH homeodynamics throughout the male reproductive tract. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76: 3783-800
- [61] Dona G, Tibaldi E, Andrisani A, et al. Human sperm capacitation involves the regulation of the tyrosine phosphorylation level of the anion exchanger 1 (AE1). *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 4063
- [62] Krutzsch PH, Crichton EG, Nagle RB. Studies on prolonged spermatozoa survival in Chiroptera: a morphological examination of storage and clearance of intrauterine and cauda epididymal spermatozoa in the bats *Myotis lucifugus* and *M. velifer*. *Am J Anat*, 1982, 165: 421-34
- [63] Murray SC, Smith TT. Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation. *Fertil Steril*, 1997, 68: 351-7
- [64] Holm L, Ridderstråle Y, Knutsson PG. Localisation of carbonic anhydrase in the sperm storing regions of the domestic hen oviduct. *Acta Anat (Basel)*, 1996, 156: 253-60
- [65] Das SC, Isobe N, Yoshimura Y. Mechanism of prolonged sperm storage and sperm survivability in hen oviduct: a review. *Am J Reprod Immunol*, 2008, 60: 477-81
- [66] Das SC, Isobe N, Nishibori M, et al. Expression of transforming growth factor- β isoforms and their receptors in utero-vaginal junction of hen oviduct in presence or absence of resident sperm with reference to sperm storage. *Reproduction*, 2006, 132: 781-90
- [67] Steele MG, Wishart GJ. Demonstration that the removal of sialic acid from the surface of chicken spermatozoa impedes their transvaginal migration. *Theriogenology*, 1996, 46: 1037-44
- [68] Luo L, Lucas RM, Liu L, et al. Signalling, sorting and scaffolding adaptors for Toll-like receptors. *J Cell Sci*, 2019, 133: jcs239194
- [69] Liu T, Yang P, Chen H, et al. Global analysis of differential gene expression related to long-term sperm storage in oviduct of Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Sci Rep*, 2016, 6: 33296
- [70] Camargo C, Ahmed-Braimah YH, Amaro IA, et al. Mating and blood-feeding induce transcriptome changes in the spermathecae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Sci Rep*, 2020, 10: 14899
- [71] Radhakrishnan P, Fedorka KM. Immune activation decreases sperm viability in both sexes and influences female sperm storage. *Proc Biol Sci*, 2012, 279: 3577-83
- [72] Zupin L, Polesello V, Martinelli M, et al. Human β -defensin 1 in follicular fluid and semen: impact on fertility. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36: 787-97
- [73] Mageed AM, Isobe N, Yoshimura Y. Expression of avian β -defensins in the oviduct and effects of lipopolysaccharide on their expression in the vagina of hens. *Poult Sci*, 2008, 87: 979-84
- [74] Shimizu M, Watanabe Y, Isobe N, et al. Expression of avian β -defensin 3, an antimicrobial peptide, by sperm in the male reproductive organs and oviduct in chickens: an immunohistochemical study. *Poult Sci*, 2008, 87: 2653-9
- [75] Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, et al. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev*, 2005, 206: 306-35
- [76] Cherasse S, Baer B, Schiott M, et al. Differential immune gene expression in sperm storage organs of leaf-cutting ants. *J Exp Biol*, 2018, 221: jeb173435
- [77] Khillare GS, Sastry KVH, Agrawal R, et al. Expression of gonadotropin and sex steroid hormone receptor mRNA in the utero-vaginal junction containing sperm storage tubules of oviduct during sexual maturation in Japanese quail. *Gen Comp Endocrinol*, 2018, 259: 141-6
- [78] Yoshimura Y, Koike K, Okamoto T. Immunolocalization of progesterone and estrogen receptors in the sperm storage tubules of laying and diethylstilbestrol-injected immature hens. *Poult Sci*, 2000, 79: 94-8
- [79] Matsuzaki M, Sasanami T. Sperm storage in the female reproductive tract: a conserved reproductive strategy for better fertilization success. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1001: 173-86
- [80] Chen H, Liu T, Holt WV, et al. Advances in understanding mechanisms of long-term sperm storage-the soft-shelled turtle model. *Histol Histopathol*, 2020, 35: 1-23
- [81] Long EL, Sonstegard TS, Long JA, et al. Serial analysis of gene expression in turkey sperm storage tubules in the presence and absence of resident sperm. *Biol Reprod*, 2003, 69: 469-74
- [82] Riou C, Brionne A, Cordeiro L, et al. Avian uterine fluid proteome: exosomes and biological processes potentially involved in sperm survival. *Mol Reprod Dev*, 2020, 87: 454-70
- [83] Georgiou AS, Snijders AP, Sostaric E, et al. Modulation of the oviductal environment by gametes. *J Proteome Res*, 2007, 6: 4656-66
- [84] Yu H, Hackenbroch L, Meyer FRL, et al. Identification of rabbit oviductal fluid proteins involved in pre-fertilization processes by quantitative proteomics. *Proteomics*, 2019, 19: e1800319
- [85] Zaniboni L, Bakst MR. Localization of aquaporins in the sperm storage tubules in the turkey oviduct. *Poult Sci*, 2004, 83: 1209-12
- [86] Moein-Vaziri N, Phillips I, Smith S, et al. Heat-shock protein A8 restores sperm membrane integrity by increasing plasma membrane fluidity. *Reproduction*, 2014, 147: 719-32
- [87] Hiyama G, Matsuzaki M, Mizushima S, et al. Sperm

- activation by heat shock protein 70 supports the migration of sperm released from sperm storage tubules in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Reproduction*, 2014, 147: 167-78
- [88] Bakst MR, Akuffo V. Alkaline phosphatase reactivity in the vagina and uterovaginal junction sperm-storage tubules of turkeys in egg production: implications for sperm storage. *Br Poult Sci*, 2007, 48: 515-8
- [89] Holm L, Ekwall H, Wishart GJ, et al. Localization of calcium and zinc in the sperm storage tubules of chicken, quail and turkey using X-ray microanalysis. *J Reprod Fertil*, 2000, 118: 331-6
- [90] Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, et al. Sperm cryopreservation: a review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online*, 2018, 37: 327-39