

# 藏红花素对冻融牛精子获能参数、抗氧化及抗凋亡的影响

李作臣<sup>1</sup>, 陈璇<sup>1</sup>, 汪秋月<sup>1</sup>, 高绘杰<sup>1</sup>, 张国梁<sup>2\*</sup>, 金一<sup>1\*</sup>

(1. 延边大学农学院, 吉林 延吉 133000; 2. 吉林省农业科学院, 吉林 公主岭 136100)

**摘要:** 本研究的主要目的是评估藏红花素(crocin)对冻融牛精子获能参数、抗氧化及抗凋亡的影响。试验分对照组和藏红花素处理组(浓度分别为0.5、1、1.5和2 mmol/L), 样本冻融处理后分别检测了获能参数、抗氧化相关基因及抗凋亡相关基因mRNA的表达。结果显示: 1) 0.5 mmol/L处理组冻融牛精子质量较佳, 与对照组无显著差异而与其他处理组相比差异显著; 2) 0.5 mmol/L处理组冻融牛精子获能处理后蛋白磷酸化水平显著高于其他组( $P < 0.05$ ); 3) 0.5 mmol/L处理组冻融牛精子抗氧化相关基因CAT与GPX基因mRNA的表达量显著高于其它组( $P < 0.05$ ); 4) 0.5 mmol/L处理组冻融牛精子凋亡相关基因Caspase-3, TNF- $\alpha$ 基因mRNA表达量显著低于其他组( $P < 0.05$ )。结论: 牛精子冻融前藏红花素处理显著改善冻融牛精子获能参数、抗氧化及抗凋亡能力, 添加量0.5 mmol/L藏红花素效果最佳。

**关键词:** 牛精子; 冷冻保存; 藏红花素; 磷酸化; 抗氧化性; 抗凋亡能力

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2019)05-0048-05

## Effects of Crocin on Capacitation Parameters, Antioxidant and Anti-apoptosis of Freeze-Thawed Bovine Sperm

LI Zuo Chen<sup>1</sup>, CHEN Xuan<sup>1</sup>, WANG Qiuyue<sup>1</sup>, GAO Huijie<sup>1</sup>, ZHANG Guoliang<sup>2\*</sup>, JIN Yi<sup>1\*</sup>

(1. College of Agronomy, Yanbian University, Yanji, 133000; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

**Abstract:** The main objective of this study was to evaluate the effects of crocin on capacitation parameters, antioxidant and apoptosis of frozen-thawed bovine sperm. The experiment was divided into control group and crocin treatment group (concentrations of 0.5, 1, 1.5 and 2 mmol/L, respectively). The capacitation parameters, mRNA expression of antioxidant related genes and mRNA expression of anti-apoptotic related genes were detected after frozen-thawed treatment. The results showed that frozen-thaw bovine sperm quality was better in the 0.5 mmol/L treatment group, there was no significant difference with the control group and significant difference with other treatment groups. The protein phosphorylation level of frozen-thaw bovine sperm treated with capacitation was significantly higher in the 0.5 mmol/L treatment group than in other groups ( $P < 0.05$ ). mRNA expression levels of CAT and GPX genes related to anti-oxidation in frozen-thaw bovine sperm in the 0.5 mmol/L treatment group were significantly higher than those in other groups ( $P < 0.05$ ). mRNA expression levels of apoptosis-related genes Caspase-3 and TNF- $\alpha$  genes in frozen-thaw bovine sperm treated with 0.5 mmol/L were significantly lower than those in other groups ( $P < 0.05$ ). In conclusion, crocin treatment before frozen-thaw significantly improved the capacitation parameters, antioxidant and anti-apoptosis ability of frozen-thawed bovine sperm. The effect of adding 0.5 mmol/L crocin was the best.

**Key words:** Bovine sperm; Cryopreservation; Crocin; Phosphorylation; Oxidation resistance; Antiapoptotic ability

收稿日期: 2019-06-02

基金项目: 吉林省科技厅农业重点技术攻关项目(20190301037NY)

作者简介: 李作臣(1979-), 男, 在读博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

通讯作者: 张国梁, 男, 博士, 研究员, E-mail: zgl777777@163.com

金一, 男, 博士, 教授, E-mail: yijin@ybu.edu.cn

精子冷冻是人工授精的重要步骤,人工授精是牛科应用最广泛的辅助生殖技术。冷冻过程中活性氧的产生与精子抗氧化能力的失衡导致氧化应激<sup>[1]</sup>和含有大量多不饱和脂肪酸的质膜发生脂质过氧化<sup>[2]</sup>。藏红花是一种天然食品添加剂<sup>[3]</sup>,具有抗氧化作用和多种治疗作用,已在体内外得到证实<sup>[4]</sup>。藏红花素是藏红花的主要成分之一,是一种天然存在的类胡萝卜素<sup>[5]</sup>。在人类疾病方面具有显著的消炎和抗氧化的药理作用<sup>[6]</sup>。如今,藏红花素作为抗氧化剂的保护作用被广泛研究<sup>[7]</sup>。作为强效抗氧化剂,藏红花素具有保护细胞免受自由基和单线态氧的影响<sup>[8]</sup>,降低脂质过氧化,线粒体、溶酶体膜损伤以及蛋白质降解的能力<sup>[9]</sup>,保护组织免受氧化损害<sup>[10]</sup>。本研究的目的是将藏红花素作为冷冻保护剂,检测其对冻融牛精子质量、获能参数及冷冻保存效果的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 精液来源

试验选择西门塔尔公牛精液,精液样本均来自于延吉市犇福种公牛场。

### 1.2 试剂与仪器

藏红花素、果糖、葡萄糖、丙酮酸钠、庆大霉素(Sigma);RIPA、PMSF、动物组织总RNA提取试剂盒、反转录试剂盒(碧云天)。

倒置显微镜(Nikon);低温高速离心机、反转录仪、台式微量高速离心机(Eppendorf);精子CASA仪(方正);生物超净工作台(上海苏净实业)。

### 1.3 试验设计

在冷冻保护剂中添加不同浓度的藏红花素(0 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L、1.5 mmol/L、2 mmol/L),经冻融后检测精子质量参数、获能参数、抗氧化及凋亡基因的表达。

### 1.4 精子稀释液配制

称取柠檬酸钠、Tris、葡萄糖、蛋黄、甘油,加

入双抗,在38℃水浴锅预热备用。

### 1.5 精子解冻

将装有精液的麦管放置到提前预热的38℃水浴锅中解冻40 s取出。

### 1.6 精子品质检测

#### 1.6.1 精子CASA检测

将解冻后的精子放在倒置显微镜下,通过CASA仪检测精子活力等指标。

#### 1.6.2 精子质膜完整性检测

精子冷冻-解冻后,进行低渗肿胀法(HOST法)检测,精子置于37℃低渗溶液中,在恒温培育箱培育30 min后记录尾部弯曲精子数量百分比。

#### 1.6.3 精子顶体膜完整性检测

精子冷冻-解冻后,进行考马斯亮蓝染色法检测,将样本滴到载玻片上,用考马斯亮蓝染液均匀覆盖,30 min后洗去染液,记录顶体完整的精子数量百分比。

### 1.7 蛋白免疫印记

用RIPA及PMSF提取精子总蛋白,进行SDS-PAGE电泳,转膜后TBST缓冲液(TBST)洗三遍每次10 min,封闭2 h后TBST洗三遍。一抗4℃孵育过夜,弃掉一抗后TBST洗三遍;二抗室温摇床孵育2 h,弃掉二抗后TBST洗三遍。将ECL显影试剂均匀覆盖在膜上,放入数字凝胶成像系统中,成像拍照。

### 1.8 PCR检测

将冷冻-解冻后的精子样本按照动物组织总RNA提取试剂盒说明提取RNA,再将RNA样本反转录成cDNA后进行PCR扩增,扩增体系为2 X Taq PCR MasterMix 6.5 μL,上下游引物各0.5 μL, cDNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 4.5 μL,扩增程序为95℃预变性3 min;95℃变性30 s、59℃退火30 s与72℃延伸30 s进行40个循环;72℃延伸5 min;最后温度到达4℃。结束后取5 μL PCR扩增产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测(引物序列见表1)。

表1 目的基因与内参GAPDH引物序列

基因	序列(5'→3')	产物大小(bp)	退火温度(℃)
CAT—F	AGTCCTGCTCCTGTTGTT	107	56
CAT—R	TACCGTGCCAGTCCCTAGT		
GPX—F	AGTCCTGCTCCTGTTGTT	131	60
GPX—R	GGAGGACAGGTTGAAGGGC		
MAD—F	CGAAGGAAGGGACGATGG	101	60
MAD—R	GTGGGACTGGGCAAGACC		

续表 1

基因	序列(5'→3')	产物大小(bp)	退火温度(°C)
<i>Caspase-3</i> —F	CAGTGGTGCTGAGGATGAC	137	56
<i>Caspase-3</i> —R	CACAAAGAGCCTGGATGAA		
<i>Caspase-8</i> —F	CTGCCCTCAAGTTCCTAAG	113	56
<i>Caspase-8</i> —R	GTTTTCCTCCAACATTCTC		
<i>TNE-α</i> —F	CCCTTTCCTCCACCCCTCAC	215	60
<i>TNE-α</i> —R	GGTCCACTGCTCTGCCAC		
<i>GAPDH</i> —F	CTGGTGCTGAGTATGTGGT	91	56
<i>GAPDH</i> —R	CAATCTTGAGGGTGTGT		

### 1.9 数据统计与分析

试验结果使用 Image J 软件对条带进行灰度值分析。所有数据使用 SPSS 19 软件进行分析, 试验数据均以“平均值±标准差”表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度藏红花素对冻融牛精子质量的影响

在冷冻保护剂中添加不同浓度的藏红花素经冻融后检测精子质量参数。如表 2 所示, 0.5 mmol/L 处理组的精子活力、质膜完整性以及顶体膜完整性与对照组相接近, 且显著高于其他处理组 ( $P < 0.05$ )。

表 2 藏红花素对冻融牛精子质量参数的影响

质量参数	对照组	藏红花素 (mmol/L)			
		0.5	1	1.5	2
精子活力(%)	89.26±2.59 <sup>a</sup>	89.53±0.70 <sup>a</sup>	84.04±3.06 <sup>b</sup>	81.73±2.71 <sup>c</sup>	81.34±3.73 <sup>c</sup>
质膜完整性(%)	66.14±0.45 <sup>a</sup>	66.10±0.54 <sup>a</sup>	57.71±0.58 <sup>b</sup>	55.51±2.14 <sup>b</sup>	50.92±3.26 <sup>c</sup>
顶体膜完整性(%)	66.88±1.87 <sup>a</sup>	66.96±0.91 <sup>a</sup>	57.18±2.67 <sup>b</sup>	54.06±0.79 <sup>b</sup>	48.49±0.78 <sup>c</sup>

注: 同行肩标不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 相同字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )

### 2.2 不同浓度藏红花素对冻融牛精子运动参数的影响

0.5 mmol/L 处理组精子的 VCL、VSL、VAP 以及 BCF 参数与对照组相接近, 且与其他处理组相

比效果较佳 (表 3)。VCL 为平均曲线运动速度; VSL 为平均直线运动速度; VAP 为平均路径运动速度; LIN 为运动的直线性; STR 为运动的前向性; BCF 为精子平均鞭打频率。

表 3 藏红花素对冻融牛精子运动参数的影响

CASA 结果	对照组	藏红花素 (mmol/L)			
		0.5	1	1.5	2
VCL (μm/s)	37.18±3.06 <sup>a</sup>	36.89±4.06 <sup>a</sup>	35.79±0.63 <sup>a</sup>	24.84±2.95 <sup>b</sup>	21.71±0.17 <sup>b</sup>
VSL (μm/s)	21.87±1.01 <sup>a</sup>	21.74±5.01 <sup>a</sup>	16.82±0.55 <sup>b</sup>	12.13±2.42 <sup>c</sup>	9.60±0.07 <sup>c</sup>
VAP (μm/s)	34.65±6.10 <sup>a</sup>	34.66±4.03 <sup>a</sup>	32.00±0.56 <sup>c</sup>	22.30±2.81 <sup>b</sup>	19.29±0.13 <sup>b</sup>
LIN (%)	57.89±5.47 <sup>a</sup>	52.16±2.98 <sup>b</sup>	46.99±2.28 <sup>c</sup>	47.07±0.02 <sup>c</sup>	44.20±0.93 <sup>c</sup>
STR (%)	63.20±4.99 <sup>a</sup>	57.83±3.32 <sup>b</sup>	54.22±1.92 <sup>c</sup>	53.29±1.57 <sup>c</sup>	49.75±0.95 <sup>d</sup>
BCF (Hz)	17.33±1.52 <sup>a</sup>	18.53±9.19 <sup>a</sup>	16.00±0.14 <sup>b</sup>	11.15±0.70 <sup>c</sup>	9.65±0.03 <sup>c</sup>

### 2.3 不同浓度藏红花素对冻融牛精子获能参数的影响

将对照组分别进行获能与非获能处理, 其他处理组均通过获能处理。将提取的蛋白进行免疫印迹分析, 结果如图 1A 所示, 分子量约为 32 kDa

处出现蛋白条带, 分析灰度值 (图 1B), 0.5 mmol/L 藏红花素处理组的蛋白酪氨酸磷酸化水平与获能对照组差异不显著, 而其他三组处理组蛋白酪氨酸磷酸化水平显著低于获能对照组 ( $P < 0.05$ )。

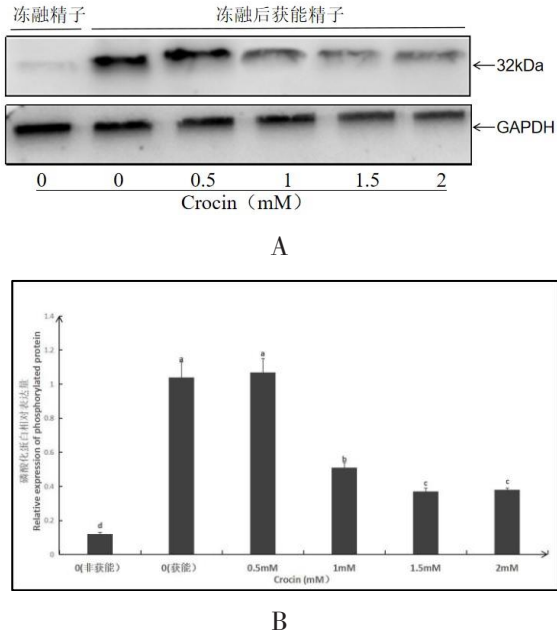


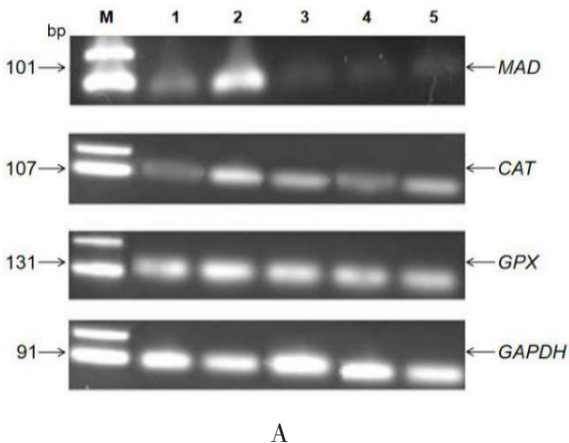
图1 藏红花素对冻融牛精子体外获能的影响

(A) 冷冻-解冻的牛精子蛋白质磷酸化水平。条带(从左到右)分别对应于冻融未获能精子(0 mmol/L)、冻融后获能精子0 mmol/L(对照组)、0.5 mmol/L、1 mmol/L、1.5 mmol/L和2 mmol/L藏红花素处理组。(B) 冷冻-解冻的牛精子蛋白质磷酸化水平的柱状图。a, b, c表示各试验组与对照组之间的显著差异(P<0.05)。

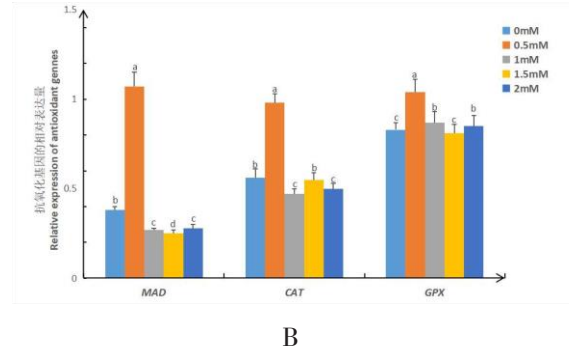
2.4 不同浓度藏红花素对冻融牛精子抗氧化相关基因 mRNA 表达量的影响

在冷冻保护剂中添加不同浓度的藏红花素,解冻后检测抗氧化相关基因 MAD、CAT与 GPX的 mRNA 表达量(图 2A),三种基因与内参 GAPDH 相比得出灰度值(图 2B),其中 0.5 mmol/L 藏红花素处理组 MAD、CAT与 GPX的 mRNA 表达量显著高于对照组(P<0.05)和 0.5 mmol/L 藏红花素表达量显著高于其他三组(P<0.05)。

2.5 不同浓度藏红花素对冻融牛精子凋亡相关基因 mRNA 表达量的影响



A

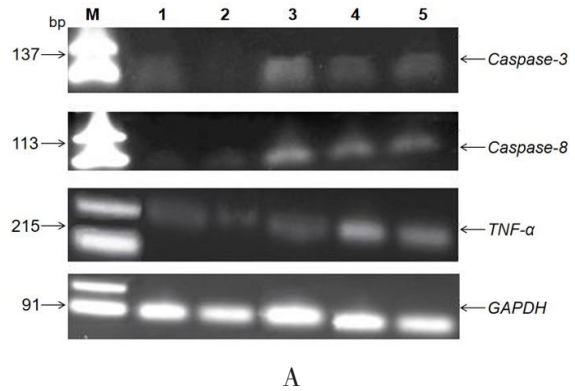


B

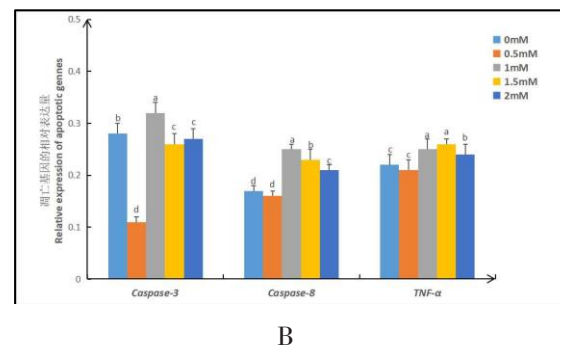
图2 藏红花素对冻融后牛精子 MAD、SOD 和 CAT 的 mRNA 表达水平的影响

(A) 冷冻-解冻的牛精子中 GAPDH(参考基因)、MAD、SOD 和 CAT 的 mRNA 表达水平。条带(从左到右)分别对应于 Marker、对照组(0 mmol/L)、0.5 mmol/L、1 mmol/L、1.5 mmol/L 和 2 mmol/L 组。(B) 抗氧化(MAD, CAT 和 GPX)基因的 mRNA 表达水平的柱状图。a, b, c 表示各试验组与对照组之间的显著差异(P<0.05)。

在冷冻保护剂中添加不同浓度的藏红花素,解冻后检测 Caspase-3, Caspase-8, TNF-α 三种凋亡基因的 mRNA 表达量(图 3A),三种基因与内参



A



B

图3 藏红花素对冻融后牛精子 Caspase-3, Caspase-8, TNE-α mRNA 表达量的影响

M. DNA 相对分子质量标准;1-5:0, 0.5, 1, 1.5, 2 mmol/L crocin (A) 冷冻-解冻的牛精子中 GAPDH(参考基因)、Caspase-3, Caspase-8 和 TNE-α 的 mRNA 表达水平。条带(从左到右)分别对应于 Marker、对照组(0 mmol/L)、0.5 mmol/L、1 mmol/L、1.5 mmol/L 和 2 mmol/L 组。(B) 凋亡(Caspase-3, Caspase-8 和 TNE-α)基因的 mRNA 表达水平的柱状图。a, b, c 表示各试验组与对照组之间的显著差异(P<0.05)

GAPDH 相比得出灰度值(图 3B), 0.5 mmol/L 藏红花素处理组的 Caspase-3, TNF- $\alpha$  基因表达量显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), Caspase-8 基因表达量与对照组差异不显著; 0.5 mmol/L 藏红花素处理组的基因表达量显著低于其他三组 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

氧化应激会对精子质膜的流动性、完整性和柔韧性产生有害影响, 这些特性与受精能力有关<sup>[11]</sup>。试验结果表明, 在牛精子低温保存过程中, 0.5 mmol/L 藏红花素对对照组的总活动性和快速精子产生有利的影响, 而对其他 CASA 运动参数没有影响。相关藏红花及其生物活性成分藏红花素对人、小鼠和马鹿的运动能力和生存能力的有益作用已得到证实<sup>[12]</sup>。此外, 0.5 mmol/L 的藏红花素的存在被证明对细胞有益<sup>[13]</sup>。

酪氨酸磷酸化被认为是精液冷冻和解冻过程中低温获能的基准事件之一, 其作为获能的标志之一, 在不同动物物种中已经报道了获能期间许多酪氨酸磷酸化蛋白<sup>[14]</sup>。据报道, 精子的冷冻保存促进了水牛、公牛、公猪和马精子的获能和蛋白酪氨酸磷酸化。本试验结果显示, 在冷冻保护剂中加入藏红花素, 在冷冻-解冻后, 进行获能处理, 其中浓度为 0.5 mmol/L 藏红花素处理的精子获能后蛋白酪氨酸磷酸化的表达效果最好。

在精子冷冻-解冻后, 其受精率降低的原因之一就是氧化应激反应引起的损伤。Gadea<sup>[15]</sup>提出, 在解冻后, 用抗氧化剂补充培养基会阻止 ROS 的产生或抵消氧中毒。本试验选择 *MAD*、*CAT* 与 *GPX* 基因进行检测, 数据显示 0.5 mmol/L 藏红花素处理组的精子可能具有很强的抗氧化性。

冻融循环通过激活半胱天冬酶, 线粒体跨膜电位降低, 精子 DNA 断裂从而降低精子的功能能力, 诱导精子中的程序性细胞死亡<sup>[16]</sup>。本试验检测了冻融牛精子的三组凋亡基因的表达量。数据表明, 0.5 mmol/L 藏红花素处理组的 *Caspase-3*, *TNF- $\alpha$*  基因表达量显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), *Caspase-8* 基因表达量与对照组差异不显著; 且 0.5 mmol/L 藏红花素处理组的基因表达量显著低于其他三个处理组 ( $P < 0.05$ )。

### 4 结论

添加 0.5 mmol/L 藏红花素可以显著改善冻融牛精子获能参数、抗氧化能力以及抗凋亡能力。

参考文献:

- [ 1 ] Aitken R J, Baker M A, Nixon B. Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? [J]. *Asian Journal of Andrology*, 2015(4): 633-639.
- [ 2 ] Tremellen K. Oxidative stress and male infertility - a clinical perspective [J]. *Human Reproduction Update*, 2008, 14, 243-258.
- [ 3 ] Assimopoulou A N, Papageorgiou V P, Sinakos Z. Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents [J]. *Phytotherapy Research*, 2010, 19(11):997-1000.
- [ 4 ] Tsantarliotou M P, Poutahidis T, Markala D, et al. Crocetin administration ameliorates endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rabbits [J]. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 2013, 24(3):305-310.
- [ 5 ] Nam K N, Park Y M, Jung H J, et al. Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 648(1-3):110-116.
- [ 6 ] Christodoulou E, Kadoglou N P, Kostomitsopoulos N, et al. Saffron: a natural product with potential pharmaceutical applications [J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2015, 67(12):1634-1649.
- [ 7 ] Alavizadeh S H, Hosseinzadeh H. Bioactivity assessment and toxicity of crocin: A comprehensive review [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 64:65-80.
- [ 8 ] Ríos J L, Recio M C, Giner R M, et al. An Update Review of Saffron and its Active Constituents [J]. *Phytotherapy Research*, 1996, 10(3):189-193.
- [ 9 ] Pham T Q, Cormier F, Farnworth E, et al. Antioxidant properties of crocin from *Gardenia jasminoides* Ellis and study of the reactions of crocin with linoleic acid and crocin with oxygen [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(5):1455-1461.
- [ 10 ] Abdullaev F I, Espinosa-aguirre J J. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials [J]. *Cancer Detection and Prevention*, 2004, 28(6):426-432.
- [ 11 ] Said T M, Agarwal A, Grunwald S, et al. Selection of non-apoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vivo model [J]. *Biology Reproduction*, 2005, 74: 80-87.
- [ 12 ] Sapanidou V, Taitzoglou I, Tsakmakidis I, et al. Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization [J]. *Theriogenology*, 2015, 84(8): 1273-1282.
- [ 13 ] Naresh S, Atreja S K. The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa [J]. *Cryobiology*, 2015, 70(3):211-216.
- [ 14 ] Buffone M G, Verstraeten S V, Calamera J C, et al. High Cholesterol Content and Decreased Membrane Fluidity in Human Spermatozoa Are Associated With Protein Tyrosine Phosphorylation and Functional Deficiencies [J]. *Journal of Andrology*, 2009, 30(5):552-558.
- [ 15 ] Gadea J. Cooling and Freezing of Boar Spermatozoa: Supplementation of the Freezing Media With Reduced Glutathione Preserves Sperm Function [J]. *Journal of Andrology*, 2005, 26(3): 396-404.
- [ 16 ] Martin G, Sabido P, Durand R, et al. Cryopreservation induces an apoptosis like mechanism in bull sperm [J]. *Biology Reproduction*, 2004, 71: 28-37.