

不同濃度之低密度脂蛋白對臺灣荷蘭牛精液 冷凍解凍後品質之影響⁽¹⁾

李佳馨⁽²⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾ 楊明桂⁽²⁾ 郭廷雍⁽³⁾ 唐品琦⁽⁴⁾

收件日期：109 年 1 月 7 日；接受日期：109 年 5 月 8 日

摘 要

本試驗旨在探討添加不同濃度低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 之冷凍稀釋液，對國內荷蘭種公牛精液冷凍解凍後品質之影響。本試驗 3 頭公牛選自乳牛群性能改良計畫 (dairy herd improvement, DHI) 排名之天噸牛 (Ten Tons Cow) 所生之雄後代，以人工假陰道採集其精液，分別以含不同濃度 (6、7、8、9 及 10%) LDL 與 20% 蛋黃 (egg yolk, EY；對照組) 之稀釋液稀釋後，使最終精子濃度達到 3×10^8 細胞數/mL。冷凍解凍後之精液藉由電腦輔助精子分析儀 (computer-assisted sperm analysis, CASA) 與流式細胞儀 (flow cytometer)，分析精子之精子活力 (motility)、向前活動之精子活力 (progressive motility)、運動參數、存活率 (viability)、粒線體活性 (mitochondrial integrity) 與頭帽完整性 (acrosome integrity)。結果顯示，稀釋液中添加 8% LDL 時，公牛精液冷凍解凍後之存活率與頭帽完整性顯著高於蛋黃對照組 ($P < 0.05$)；添加 8% LDL 時，精子活力與向前活動之精子活力顯著高於其他處理組 ($P < 0.05$)；精子保存於含 8% LDL 稀釋液中，有較佳之運動參數，包含平均路徑速度 (average path velocity, VAP)、平均曲線運動速度 (curvilinear velocity, VCL) 與精子平均側擺幅值 (amplitude of lateral head displacement, ALH)。綜上所述，荷蘭公牛精液稀釋液中添加 8% LDL 可保持精子於冷凍解凍過程中有較佳之活力、向前活動之精子活力、精子運動參數以及存活率，此結果能有效提升國內荷蘭公牛冷凍精液品質。

關鍵詞：荷蘭公牛、低密度脂蛋白、冷凍稀釋液。

緒 言

人工授精 (artificial insemination, AI) 技術在酪農業中廣泛被使用，其成功部分可歸因於冷凍精液保存稀釋液 (extender) 之開發 (Foote *et al.*, 2002)，而使用之冷凍保護劑主要成分為甘油與蛋黃，以保護精子於冷凍保存過程中免受損傷。自發現蛋黃 (egg yolk, EY) 有保護精液特性以來 (Phillips and Lardy, 1940)，蛋黃做為非滲透性冷凍保護劑被認為是稀釋液中最重要之組分之一 (Vishwanath and Shannon, 2000; Crespilho *et al.*, 2012)。但近年來，卻有許多學者提出蛋黃稀釋液之負面效應，如 I. 蛋黃為一營養生物培養液，可促進微生物孳生，故亦可能導致精液污染發生 (Aires *et al.*, 2003)，或是引入外來疾病傳播的風險，如禽流感 (Yildiz *et al.*, 2013)；II. 蛋黃中之顆粒物質 (granules) 會阻礙精子之代謝轉換作用，或是降低精子活動力，尤其是蛋黃成分中之水溶性物質 (water soluble fractions) 與顆粒均不利於冷凍解凍後之精子活力 (Pace and Graham, 1974)，另有研究亦指出蛋黃顆粒中之助孕素 (progesterone) 可能為精子獲能作用之潛在原因，因此不利精子冷凍保存 (Kampschmidt *et al.*, 1953; Moreno *et al.*, 2013)；III. 蛋黃顆粒可能干擾精子生化檢驗分析結果，使得顯微鏡精液評估更加困難，尤其是當使用電腦輔助精子分析儀 (computer-assisted sperm analysis, CASA) 時，蛋黃顆粒可能造成無法正確分析 (Singh *et al.*, 2012)；IV. 由於雞蛋批次間之差異很大，故使蛋黃難以標準化，增加實驗室品質掌控之困難 (Bousseau *et al.*, 1998)。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2637 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(4) 國立中興大學動物科學系。

(5) 通訊作者，E-mail: jxlee@mail.tlri.gov.tw。

目前研究顯示，低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 為蛋黃稀釋液中提供保護之主要成分，可增加膽固醇 / 磷脂比例，防止精子細胞膜上磷脂之流失，提高精子抗凍性並減少冷休克傷害 (Medeiros *et al.*, 2002; Muiño *et al.*, 2007)。在 Pace and Graham (1974) 初次將蛋黃中之 LDL 與高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL) 分開後，分別添加至精子稀釋液使用中，結果發現蛋黃中 HDL 會破壞精子細胞膜，而 LDL 則能保留較多精子細胞膜之完整性，而在豬的冷凍精液中亦有相似的結果 (Demianowicz and Strzezek, 1996)。另在 Bergeron *et al.* (2004) 研究中，稀釋液添加含有 EY 或 LDL 之稀釋液，其牛精漿蛋白 (bovine semen proteins, BSP) 會減少 50 – 80%，且在培養期間精子細胞膜之膽固醇與磷脂顯著增加。推測係由於 LDL 可與 BSP 蛋白產生螯合作用，因而減少 BSP 主要蛋白與精子結合，可阻止精子細胞膜脂質流出，而此機制亦被推測應該為蛋黃中之 LDL 稀釋液可作為精子冷藏冷凍保護劑之原因。因此，本試驗旨在探討添加不同濃度 LDL 之冷凍稀釋液，對臺灣種公牛精液冷凍解凍後品質之影響。

材料與方法

I. 試驗動物

本試驗採用 3 頭 2 – 3 歲之荷蘭品種種公牛，為臺灣 DHI 數據排名之天噸牛後代年輕公牛，體重約在 650 – 800 kg，飼養於畜產試驗所新竹分所之西湖牧場。試驗公牛圈飼於個別牛欄，欄舍提供飲水、礦鹽與盤固乾草任飼，每日給予 1.5 – 2 kg 精料，採精期間補充苜蓿乾草每日 0.5 kg。

II. 雞蛋蛋黃 LDL 之萃取與組成分析

(i) LDL 之萃取

本試驗中 LDL 萃取方法係修正自 Moussa *et al.* (2002) 及康等 (2012) 等所述之萃取步驟。將蛋黃液加入 2 倍量之等滲透壓食鹽溶液 (0.17 M NaCl) 稀釋，並在 4℃ 下攪拌 1 h，其後，蛋黃液於 4℃ 以 10,000 × g 離心 45 min，取其上層液，上層液再以相同條件離心一次。離心後收集之上層液加入 40% 硫酸銨 (Sigma, A-4418) 於 4℃ 下充分攪拌 1 – 1.5 h 後取上層液。將上層液倒入透析膜中 (MW = 10,335; Sigma, D-9527)，置放於已滅菌過之蒸餾水中，於 4℃ 下續以磁石攪拌進行透析 24 h (透析過程共換水 6 次)，之後將透析袋內液體倒出，於 4℃ 以 10,000 × g 離心 45 min 後，再次將上層液重複透析步驟，完成共 48 h 透析，再次離心後可得清楚之分層，漂浮於上層濃稠流體即為 LDL，小心收集後將所得之 LDL 儲存於 4℃ 冰箱備用。

(ii) 乾物質含量分析

將 100 g 濕重之 LDL 樣品置於 104℃ 烘箱中烘乾 48 h，冷卻後秤重以計算乾物質含量。LDL 回收率 (recovery rate, %) 計算：(萃取前之蛋黃液重 (g) – 萃取後之蛋黃液重 (g)) / 萃取前之蛋黃液重 (g) × 100。LDL 回收率及乾物質含量分析結果如表 3 所示。

III. 冷凍稀釋液之配製

(i) 蛋黃稀釋液之配製

市售購得之新鮮雞蛋，先以 75% 酒精噴於蛋殼表面後，以紙巾將蛋殼表面之髒污去除，接著小心打開蛋殼，將蛋黃及蛋白分離，儘量瀝除蛋白。將蛋黃倒在 110 mm 濾紙上，使濾紙吸附剩餘蛋白以及繫帶，再以手術刀片輕輕劃開蛋黃膜，使蛋黃液流出，並將蛋黃液收集在事先準備之乾淨燒杯中預冷。收集之蛋黃液加入 2 倍量之 0.17 M NaCl 液體，為避免蛋黃液中細菌增生，於 10℃ 下以磁石攪拌混合 1 h，之後將混合液於 10℃ 以 8,000 × g 離心 45 min 後收集上層液，上層液再以上述條件離心一次，所收集之上層液即為所需要之蛋黃液。第一階段稀釋液成分為添加 2.42 g Tris、1.48 g citric acid、1.00 g fructose、250 µg gentamicin、150 µg penicillin 以及 20 mL 蛋黃液於二次蒸餾之滅菌水中並定量到 100 mL；第二階段稀釋液成分除額外添加 14% 甘油外，其餘成分比例皆同第一階段稀釋液之配方。

(ii) 不同濃度 LDL 稀釋液之配製

第一階段稀釋液成分為添加 2.42 g Tris、1.48 g citric acid、1.00 g fructose、250 µg gentamicin、150 µg penicillin 以及 8% LDL 於二次蒸餾之滅菌水中並定量至 100 mL，再以 0.22 µm 過濾膜過濾後，儲存於 4℃ 冰箱備用。第二階段稀釋液成分除添加 14% 甘油外，其餘皆同第一階段稀釋液。精子冷凍稀釋液配方如表 1 所示，各稀釋液之滲透壓如表 2 所示。

IV. 公牛精液之採集與處理

公牛於涼季 (10 月至隔年 5 月) 進行精液採集，精液收集係使用人工假陰道 (artificial vagina, IMV, France) 法進行，頻率為每頭每週 2 次，每次採集三管，收集於 15 mL 離心管內之精液，吸取部分進行新鮮精液之各項

精液品質分析，經稀釋 200 倍後於顯微鏡下評估，其精子活力率在 70% 以上、活力 4 級以上，且是三管中最優者，方進行試驗。

表 1. 公牛精子冷凍稀釋液成分

Table 1. The calculated composition of bull semen cryopreservation extenders

Component	Control	Treatment
Egg yolk (%)	20	-
LDL (%)	-	6 ~ 10
Tris (g)	2.42	2.42
Citric acid (g)	1.48	1.48
Fructose (g)	1.00	1.00
Gentamicine (μg)	250	250
Penicillin (μg)	150	150
Glycerol (%)	14	14
Total	100 mL	100 mL

表 2. 不含甘油與含 7% 甘油之不同 LDL 濃度之公牛精液冷凍稀釋液滲透壓

Table 2. The calculated osmotic pressure of bull semen cryopreservation extenders containing different LDL concentrations and with 7% of glycerol or without glycerol

Extenders	Osmotic pressure (mOsm / kg)	Osmotic pressure after adding 7% of glycerol
Fresh bull semen	287	—
Tris- citric acid- fructose (TCF)	269	—
TCF containing 20% egg yolk (control)	282	1,692
TCF containing 6% LDL	261	1,590
TCF containing 7% LDL	253	1,521
TCF containing 8% LDL	246	1,445
TCF containing 9% LDL	239	1,399
TCF containing 10% LDL	224	1,325

V. 精液冷凍與解凍程序

本試驗精子之冷凍操作皆使用電腦程式化冷凍降溫儀 (computer control freezer, IceCube™ Series 14) 進行。新鮮精液精子濃度計算後，分別加入適量之各種不同第一階段冷凍稀釋液均勻混合進行稀釋，使稀釋濃度調整為每毫升 6×10^8 個精子數，再將裝有精液之離心管置入裝有 35 – 37°C 溫水之燒杯中，以隔水降溫方式移入 4°C 冷房降溫，並於 4°C 條件下平衡 1 – 1.5 h。平衡後，加入等量第二階段冷凍稀釋液進行稀釋，並將稀釋液分為 3 等份緩慢加入，每份加入之間隔時間為 10 min，使稀釋精液最終濃度達每毫升 3×10^8 個精子數，並於 4°C 下將精液分裝充填至 0.5 mL 麥管 (IMV, France) 後予以封粉，置入 4°C 冷房中平衡 2 h，最後將麥管排列於程式降溫儀內進行梯度冷凍過程，條件依序為：4°C 至 -10°C (-5°C / min)，-10°C 至 -100°C (-40°C / min)，-100°C 至 -140°C (-20°C / min) 等三階段，以完成精液冷凍之降溫程序，本試驗之冷凍降溫過程中並無植冰 (seeding) 程序。最終將麥管裝入鋁架上，移置至液態氮桶中儲存 (-196°C)。所有試驗處理組別之解凍流程如下，將冷凍精液自液態氮桶移出後，立即投入 37°C 水浴槽中解凍 30 sec，解凍後再進行相關精子性狀之評估。

VI. 精液品質之評估

(i) pH 值測定

pH meter (pH 3110 set 2 incl. SenTix® 41) 經校正後，直接測量所採集公牛之新鮮精液 pH 值並記錄之。

(ii) 精子分析儀

應用結合電子、光學顯微、影像處理器與電腦運算技術之精液檢測產品，SQA-Vb™，進行新鮮精液或冷凍精液檢測，檢測參數包含：總精子濃度 (M/mL)、活動精子濃度 (M/mL)、向前活動精子濃度 (M/mL)、活動精子百分比 (%)、向前活動精子百分比 (%)、正常精子形態百分比 (%) 以及精子鞭毛擺動頻率 (μm/

sec)。

VII 電腦輔助精子分析儀 (CASA)

利用電腦輔助精子分析系統以及 CEROS II Animal 軟體程序 (Hamilton Thorne Biosciences, Inc, Beverly, USA) 進行評估精子活力 (motility) (%)、前進活力 (progressive motility; %)、平均路徑速度 (velocity of average path, VAP; $\mu\text{m/s}$)、平均直線運動速度 (velocity of straight line, VSL; $\mu\text{m/s}$)、平均曲線運動速度 (velocity of curvilinear, VCL; $\mu\text{m/s}$)、精子平均側擺幅值 (amplitude of lateral head displacement, ALH; $\mu\text{m/s}$)、精子平均鞭打頻率 (beat cross frequency, BCF; Hz)、運動的前向性 (sperm track straightness, STR, $\text{STR} = \text{VSL} / \text{VAP} \times 100$; %)、運動的直線性 (linearity index, LIN, $\text{LIN} = \text{VSL} / \text{VCL} \times 100$; %)。

VIII 流式細胞儀

本試驗使用之流式細胞儀為 Guava® EasyCyte™ HT System 並搭配 InCyte™ 軟體進行分析，內建包含流體系統 (fluidics system)、光學系統 (optics system) 以及電子系統 (electronics system)，分析項目包括：精子存活率分析 (viability assay, Live/ Dead™ Sperm Viability Kit, Invitrogen)、活精子頭帽完整性分析 (acrosome integrity and viability assay, EasyKit™, IMV)、精子粒線體潛能分析 (Mitochondrial activity assay, EasyKit™, IMV)、精子染色質結構完整性分析 (sperm chromatin structure assay)。

IX 統計分析

本研究中各處理組別精子之活力、前進活力、存活率、頭帽完整性、粒線體潛能以及染色質完整性均以統計分析套裝軟體 (statistical analysis system, SAS, 9.4 版) 進行統計分析，使用一般線性模式 (GLM) 進行變方分析，再以鄧肯氏多變域分析 (Duncan's new multiple range test, DMRT) 評估各項處理組間差異之顯著性，並以 $P < 0.05$ 判定為具有顯著差異。

結 果

本試驗探討不同 LDL 濃度 (6、7、8、9 及 10%) 以及 20% 蛋黃 (對照組) 之稀釋液對臺灣荷蘭種公牛精液冷凍解凍後品質之影響。CASA 分析荷蘭種公牛精子之精子之活力及向前精子活力結果如圖 1 所示，解凍後精子之精子活力表現於添加 7% (59.61%)、8% (64.69%) 與 9% (57.31%) LDL 之處理組，精子活力顯著 ($P < 0.05$) 高於對照組 (20% 蛋黃; 49.01%) 與 6% (51.77%) 及 10% (51.42%) LDL ($P < 0.05$) 之處理組，以添加 8% LDL 之處理組有最佳之精子活力；而添加 6% 及 10% LDL 處理組之精子活力與對照組之間無顯著差異。向前精子活力與精子活力亦有相似之結果，以 7% (21.98%)、8% (24.56%) 與 9% (20.92%) LDL 處理組之向前精子活力顯著 ($P < 0.05$) 高於對照組 (20% 蛋黃; 17.27%)、6% (18.36%) 與 10% (17.73%) LDL ($P < 0.05$) 之處理組；以 8% LDL 之處理組有最佳之向前精子活力，然而 6% 與 10% LDL 處理組之精子活力與對照組之間無顯著差異。精子運動參數如表 4 所示，VAP 平均路徑速度 ($\mu\text{m/s}$)、VSL 平均直線運動速度 ($\mu\text{m/s}$)、VCL 平均曲線運動速度 ($\mu\text{m/s}$)、ALH 精子平均側擺幅值 ($\mu\text{m/s}$)、BCF 精子頭部擺動與平均路徑交叉頻率 (Hz)、STR 直線趨勢 (VSL/VAP , %)、LIN 直線前進之比率 (VSL/VCL , %) 等精子移動參數之結果顯示，精子保存於 7、8 及 9% LDL 處理組中與對照組 (20% 蛋黃) 相比在 VAP、VSL 與 ALH 有顯著性差異 ($P < 0.05$)；而在 STR、LIN 及 BCF 並無顯著性差異。而 VCL 在 8% LDL 處理組中與對照組 (20% 蛋黃) 間有顯著性差異 ($P < 0.05$)；其他 LDL 組 (6%、7%、9%、10%) 與對照組間均無顯著差異存在。6 與 10% LDL 處理組僅只有 VSL 數值與對照組間有顯著性差異 ($P < 0.05$)，其他精子運動參數均無顯著差異存在。

以流式細胞分析儀不同 LDL 濃度之精子存活率、頭帽完整性、粒線體活性及 DNA 完整性之結果，如圖 2 及表 5 所示，在精子存活率與頭帽完整性，以 8% LDL (56.99 與 47.74%) 與對照組 (20% 蛋黃; 49.11 與 41.96%) 具有顯著性差異 ($P < 0.05$)，而其他添加 6、7、9 及 10% LDL 之處理組與對照組及 8% LDL 間並無顯著差異。在冷凍稀釋液添加不同 LDL 濃度之精子粒線體活性及 DNA 完整性之分析中，各處理組間均無顯著性差異。

討 論

本試驗自雞蛋中萃取低密度脂蛋白之方法係修正自 Moussa *et al.* (2002) 及康等 (2012) 等所述之萃取步驟，以透析 24 h 後將透析液回收以 4°C 、 $10,000 \times g$ 、60 min 離心，再透析 24 h，其 LDL 之回收率可達 $54.27 \pm 2.56\%$ ，其水分為 $59.28 \pm 1.43\%$ ，乾物質約為 $40.71 \pm 1.43\%$ (表 3)，LDL 回收率與康等 (2012) 研究所得之 LDL 回收率 $60.37 \pm$

7.02% 相似，其水分 (57.17%) 與乾物質 (42.83%) 百分比相近，而略低於 Moussa *et al.* (2002) 之 67% 之回收率。由於在透析過程需要使用硫酸銨以沉澱 β -livetintin，而硫酸銨對細胞具有毒性，若透析不完全易造成精子死亡。本試驗以測定透析前後之 pH 值之高低來判定硫酸銨之殘留，一般透析前蛋黃液中含有硫酸銨之 pH 值約在 5.5 – 5.6 間，未添加硫酸銨之蛋黃液約 5.9 – 6.0，透析後回收之 LDL pH 值約在 5.95，此代表硫酸銨已被去除。

本試驗過程中發現，利用雞蛋中萃取之低密度脂蛋白作為冷凍稀釋計成分，能有效減少 CASA 分析時利用蛋黃為稀釋液成分者之蛋黃顆粒干擾，在 Amirat *et al.* (2005) 的研究中亦有相同之結果，其以電子顯微鏡觀察精子於低溫下培養在蛋黃稀釋液及 LDL 稀釋液中，發現蛋黃稀釋液中之蛋黃顆粒會吸附於精子頭帽上造成精子膜之受損，進一步增加精子頭帽反應，而 LDL 稀釋液之處理組明顯有較少之蛋黃顆粒吸附於精子表面，且精子頭帽反應百分比明顯較蛋黃稀釋液少，顯示經萃取後之 LDL 稀釋液，大部分之蛋黃顆粒在透析過程明顯被去除，且有助於維持精子頭帽之完整性。

由試驗之結果顯示，於 TCF 稀釋液中添加 8% LDL 與傳統之 20% 蛋黃液之對照組比較，其解凍後之精子活力 (64.69 vs. 49.01%)、向前精子活力 (24.56 vs. 17.27%)、VAP (116.07 vs. 104.02 $\mu\text{m/s}$)、VSL (94.81 vs. 79.73 $\mu\text{m/s}$)、ALH (10.02 vs. 8.85 μm)、精子存活率 (56.99 vs. 48.61%) 與頭帽完整性 (41.96 vs. 47.74%) 之數據皆以 8% LDL 組顯著優於蛋黃組 (對照組)。顯示公牛稀釋液中添加 8% LDL 應可以取代 20% 蛋黃稀釋液作為公牛冷凍稀釋液使用。此與 Ali Al Ahmad *et al.* (2008) 所得山羊冷凍精液之最佳 LDL 添加量 8% 及 Moussa *et al.* (2002)、Hu *et al.* (2010) 與 Hu *et al.* (2011) 研究顯示荷蘭種公牛 (Holstein bull) 冷凍稀釋液中添加 8% LDL 有最佳之精子活動力及存活率之結果皆相同。此說明公牛稀釋液中添加 8% LDL 之冷凍稀釋液不僅可取代 20% 蛋黃稀釋液作為公牛冷凍稀釋液使用；甚至具有更佳之冷凍保護效果。然而，在前人研究中曾指出，蛋黃中之 LDL 的結構大約由 87% 脂質與 12% 蛋白質所組成，其中脂質包含 69% 三酸甘油酯，26% 磷脂質以及 5% 膽固醇酯，形成一個直徑約 35 nm 球形結構 (Cook and Martin, 1969; Evans *et al.*, 1969)。而 Bergeron *et al.* (2004) 觀察到，在稀釋液中添加 LDL 或蛋黃的處理組與不含蛋黃或 LDL 的稀釋液處理組相比，含有 LDL 或蛋黃的處理組與精子結合的 BSP 蛋白質減少約 50 – 80%。此外，在稀釋液中不添加蛋黃或 LDL 的處理組，在 4°C 下儲存 24 h 期間，精子膜中的膽固醇和磷脂持續流出。然而，當稀釋液中添加 LDL 或蛋黃時，反而觀察到精子膜上之膽固醇和磷脂有增加的趨勢。顯示蛋黃中之 LDL 不但可與 BSP 蛋白產生螯合作用，可減少 BSP 主要蛋白與精子的結合，阻止精子細胞膜脂質流出，增加精子細胞膜之膽固醇和磷脂含量，推測此應該是蛋黃中之 LDL 稀釋液可作為精子冷藏冷凍之保護機制 (Manjunath, 2012)。此也是 8% LDL 冷凍稀釋液較 20% 蛋黃稀釋液所產製者具較佳精液品質之重要關鍵。

另有許多研究也指出，蛋黃在經過冷凍過程時會產生凝膠化 (gelation) 現象，而 LDL 是造成此凝膠化現象之原因 (Wakamatu *et al.*, 1982; Kojima and Nakamura, 1985; Tsutsui, 1988)。LDL 的冷凍凝膠化現象發生在低於 -6°C 的溫度下，這種凝膠化現象主要是冰晶破壞 LDL 之結構，藉由增加 LDL 中之脂質與蛋白質相互作用，使 LDL 中之三酸甘油酯和磷脂在稀釋液中被釋放出來，與脫輔基蛋白 (apoproteins) 形成凝膠，此過程有利於冷凍過程引起細胞脫水之保護作用。Quinn and Chow (1980) 認為 LDL 被破壞後其中之磷脂可在精子膜表面形成保護膜。此外，Graham and Foote (1987) 和 Trimeche *et al.* (1996) 提出 LDL 的磷脂可以替代精子膜的某些磷脂，從而降低精子冷凍過程的溫度。Graham and Foote (1987) 亦觀察到單獨的磷脂酰絲氨酸 (phosphatidylserine) 或與磷脂酰膽鹼 (phosphatidylcholine) 結合是保護精子最有效的磷脂。

此外，表 4 之結果顯示，當 LDL 添加量達 10% 時，其精子活力及向前精子活力明顯較其他 LDL 處理組低，且於含 20% 蛋黃之對照組之數值相近，此結果與 Moussa *et al.* (2002) 及康等 (2012) 研究所顯示，當稀釋液中 LDL 濃度增加超過 10% 時，會導致解凍後精子性能降低之結果相同。此結果可能與稀釋液滲透壓有關 (表 2)，當稀釋液中 LDL 濃度增加時，滲透壓隨之下降。一般新鮮精液滲透壓為 287 mOsm/kg，含 20% 蛋黃之對照組在未添加甘油前之滲透壓為 282 mOsm/kg，而 10% LDL 於未添加甘油前之滲透壓已明顯降至 224 mOsm/kg，此已低於活體動物細胞正常滲透壓之 300 ± 30 mOsm/kg 範圍，而 Moussa *et al.* (2002) 及康等 (2012) 研究中亦指出，過低的滲透壓會導致精子死亡。本試驗第二階段稀釋液添加 7% 甘油，其滲透壓約在 $1,400 \pm 100$ mOsm/kg，略高於 Moussa *et al.* (2002) 使用甘油濃度為 6.2% 所測得之數據 $1,200 \pm 100$ mOsm/kg，是由於添加甘油百分比不同。本試驗稀釋液配方參照康等 (2012)，並未進一步試驗比較不同甘油濃度。但參照商業化稀釋液之滲透壓數據 (數據未顯示) 亦在 $1,400 \pm 100$ mOsm/kg 之間。Moussa *et al.* (2002) 針對高濃度之 LDL 提出兩假說，其一，稀釋液中之添加高濃度之 LDL，會與稀釋液中果糖及鹽類產生交互作用，造成 LDL 沉澱；另外一說為 LDL 濃度的增加會導致 LDL 聚集，進一步造成 LDL 作用的失活，此則可能是本試驗中利用較高 LDL 濃度組具較低之精液品質之另一原因。

綜合上述，公牛冷凍稀釋液中添加 8% LDL 濃度對冷凍解凍後之臺灣公牛精子具有顯著的冷凍保護特性，與稀釋液中使用 20% 蛋黃相比，可顯著提高精子活力、向前精子活力、精子運動參數、精子存活率與頭帽完整性。顯

示公牛稀釋液中添加 8% LDL 可以取代 20% 蛋黃稀釋液作為公牛冷凍稀釋液之使用。

表 3. LDL 乾物質含量分析結果

Table 3. LDL composition of dry matters

Recovery rate (%)	Moisture (%)	Dry matter (%)
54.27 ± 2.56	59.28 ± 1.43	40.71 ± 1.43

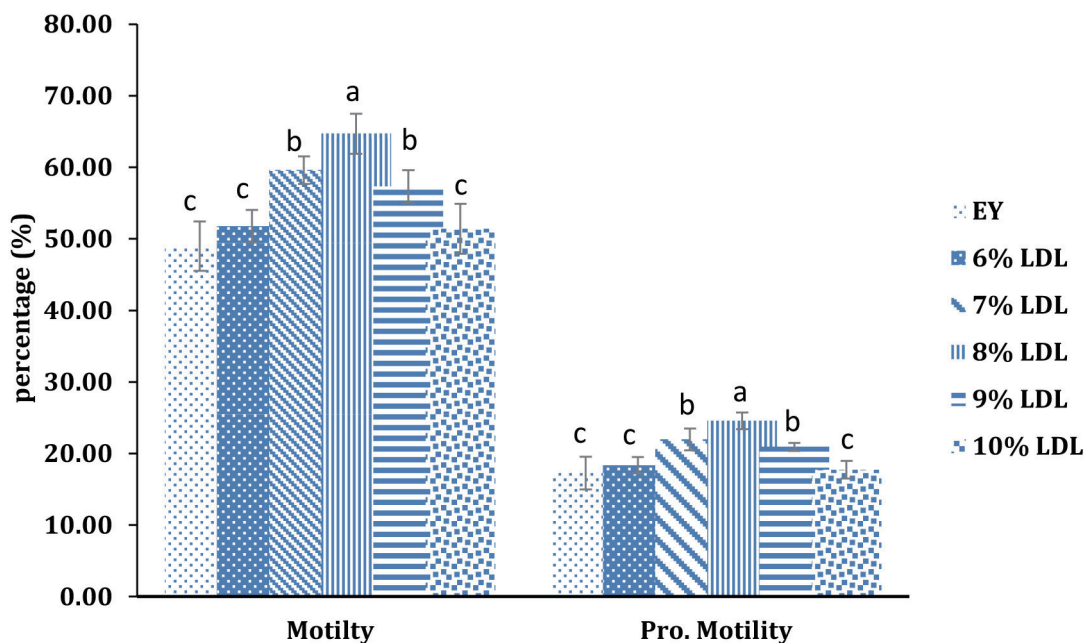


圖 1. 冷凍稀釋液中添加不同濃度低密度脂蛋白對精子活力與向前精子活力之影響。

Fig. 1. Effect of different concentrations of low-density lipoprotein (LDL) supplementation in the extenders on the motility and progressive motility (Pro. motility) of Taiwan Holstein bull spermatozoa after frozen-thawed process. Data were derived from 9 ejaculates (3 ejaculates × 3 bulls). Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). Five LDL concentrations were examined: 6, 7, 8, 9 and 10% (w/v). $n = 3$.

表 4. 冷凍稀釋液中添加不同濃度低密度脂蛋白對臺灣荷蘭公牛冷凍解凍後活力及移動參數之 CASA 分析結果

Table 4. Effects of different concentration LDL supplementation in extenders on the motility and movement characteristics of Taiwan Holstein bull spermatozoa after frozen-thawed process by CASA analysis

Items	EY	6% LDL	7% LDL	8% LDL	9% LDL
Motility (%)	49.01 ± 3.45 ^c	53.77 ± 2.29 ^c	59.61 ± 2.94 ^b	64.69 ± 2.80 ^a	57.31 ± 2.29 ^b
Pro. Motility (%)	17.27 ± 2.29 ^c	18.36 ± 1.14 ^c	21.98 ± 1.53 ^b	24.56 ± 1.15 ^a	20.92 ± 0.58 ^b
VAP (μm/s)	104.02 ± 2.19 ^c	107.95 ± 4.46 ^{bc}	110.47 ± 2.36 ^b	116.07 ± 3.79 ^a	112.13 ± 4.44 ^{ab}
VSL (μm/s)	79.73 ± 3.05 ^c	88.20 ± 5.08 ^{ab}	89.47 ± 5.21 ^{ab}	94.81 ± 5.26 ^a	88.96 ± 2.78 ^{ab}
VCL (μm/s)	194.19 ± 6.96 ^b	204.58 ± 4.46 ^{ab}	203.78 ± 9.23 ^{ab}	205.99 ± 8.92 ^a	205.57 ± 5.93 ^{ab}
STR (%)	76.68 ± 3.49	80.95 ± 3.20	81.67 ± 1.43	81.67 ± 4.27	79.38 ± 1.18
LIN (%)	42.85 ± 0.69	41.71 ± 1.66	44.28 ± 1.39	45.90 ± 1.37	43.28 ± 0.47
ALH (μm)	8.85 ± 0.44 ^c	9.14 ± 0.62 ^{bc}	9.59 ± 0.50 ^{ab}	10.02 ± 0.64 ^a	9.61 ± 0.41 ^{ab}
BCF (Hz)	26.44 ± 1.53	26.12 ± 1.60	26.70 ± 0.54	27.36 ± 1.90	25.76 ± 2.09

^a Values are mean ± SEM of 9 ejaculates (3 ejaculates × 3 bulls). Means with different superscripts within same row are significantly different ($P < 0.05$). EY: 20% egg yolk, LDL: low-density lipoprotein, Pro. Motility: progressive motility, VAP: average path velocity; VSL: straight line velocity; VCL: curvilinear velocity; STR: straightness of trajectory; LIN: linearity; ALH: amplitude of lateral head; BCF: beat cross frequency. Five LDL concentrations were examined: 6, 7, 8, 9 and 10 (w/v). $n = 3$.

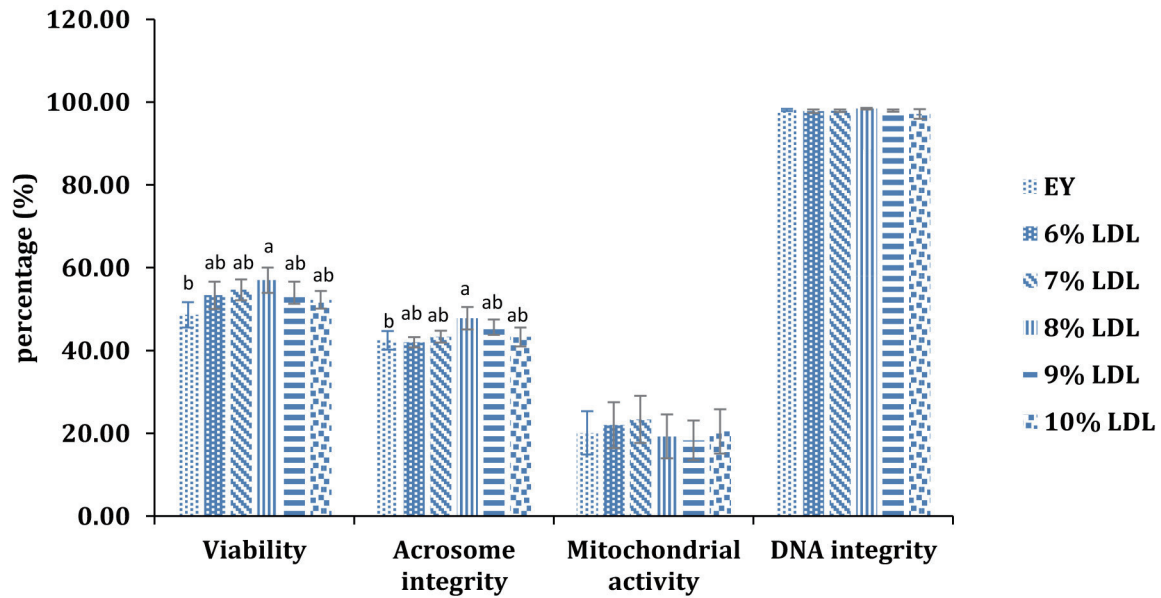


圖 2. 應用流式細胞儀分析牛冷凍稀釋液中添加不同濃度低密度脂蛋白 (LDL) 對精子冷凍解凍後之存活率、頭帽完整性、粒線體完整性以及 DNA 完整性之影響。

Fig. 2. Sperm viability, acrosome integrity, mitochondrial integrity, and DNA integrity with different concentrations of LDL supplementation after frozen-thawed process in Taiwan of Holstein bull spermatozoa by Flow cytometry analysis. Data were derived from 9 ejaculates (3 ejaculates \times 3 bulls). Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). Five LDL concentrations were tested: 6, 7, 8, 9 and 10% (w/v). $n = 3$.

表 5. 冷凍稀釋液中添加不同濃度之低密度脂蛋白經流式細胞儀分析之結果

Table 5. Sperm viability, acrosome integrity, mitochondrial activity and DNA integrity with different concentrations of LDL supplementation after frozen-thawed process in Taiwan Holstein bull spermatozoa by flow cytometry analysis

Items (%)	20% EY	6% LDL	7% LDL	8% LDL	9% LDL
Viability	49.11 \pm 2.78 ^b	52.63 \pm 2.56 ^{ab}	53.29 \pm 2.02 ^{ab}	56.99 \pm 2.88 ^a	54.05 \pm 2.50 ^{ab}
Acrosome integrity	41.96 \pm 0.86 ^b	42.65 \pm 1.95 ^{ab}	42.59 \pm 1.18 ^{ab}	47.74 \pm 2.48 ^a	46.21 \pm 1.66 ^{ab}
Mitochondrial activity	22.79 \pm 4.32	25.12 \pm 4.64	26.66 \pm 4.66	21.96 \pm 4.58	20.41 \pm 4.08
DNA integrity	97.98 \pm 0.22	97.77 \pm 0.32	97.80 \pm 0.23	98.30 \pm 0.18	97.92 \pm 0.18

Values are mean \pm SEM of 9 ejaculates (3 ejaculates \times 3 bulls).

Means with different superscripts within same row are significantly different ($P < 0.05$). $n = 3$.

EY: 20% egg yolk, LDL: low-density lipoprotein.

誌 謝

本研究承行政院農業委員會科技發展細部計畫 (106 農科 -6.3.1- 畜 -L1) 經費支持。試驗期間畜產試驗所新竹分所徐永耀同仁協助公牛採精，與總所遺傳育種組楊淳淳助理協助藥品製備，始克順利完成，謹此誌謝。

參考文獻

- 康定傑、沈朋志、邢湘琳、陳裕信、曲鳳翔、陳立人。2012。冷凍稀釋液中添加低密度脂蛋白對阿爾拜因山羊精液冷凍解凍後精子活力之影響。畜產研究 45：95-106。
- Aires, V. A., K. D. Hinsch, F. Mueller-Schloesser, K. Bogner, S. Mueller-Schloesser and E. Hinsch. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. Theriogenology. 60: 269-279.
- Ali Al Ahmad, M. Z. G. Chatagnon, L. Amirat-Briand, M. Moussa, D. Tainturie and M. Anton. 2008. Use of glutamine and

- low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reprod. Domest. Anim.* 43: 429-436.
- Amirat, L., M. Anton, D. Tainturier, G. Chatagnon, I. Battut and J. L. Courtens. 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction* 129: 535-543.
- Bergeron, A., M. H. Crete, Y. Brindle and P. Manjunath. 2004. Low-density lipoprotein fraction from Hen's egg yolk decrease the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol. Reprod.* 70: 708-717.
- Bousseau, S., J. Brillard, B. Marquant-Le Guienne, B. Guerin, A. Camus and M. Lechat. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 50: 699-706.
- Cook, W. H. and W. G. Martin. 1969. Structural and functional aspects of lipoproteins in living systems. Egg lipoproteins. In: Tria E, Scanu AM, editors. Academic Press pp. 579-615.
- Crespilho, A., M. Sá Filho, J. Dell'Aqua, M. Nichi, G. Monteiro, B. Avanzi, A. Martins and F. O. Papa. 2012. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Liv. Sci.* 149: 1-6.
- Demianowicz, W. and J. Strzezek. 1996. The effect of lipoprotein fraction of egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reprod. Dom. Anim.* 31: 279-280.
- Evans, R., D. Bauer, S. Vaghefi and C. Flegal. 1969. Influence of feeding cottonseed oil to laying hens on the low density lipoproteins of their eggs. *J. Nutr.* 99: 485-490.
- Foote, R. H., C. C. Brockett and M. T. Kaproth. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.* 71: 13-23.
- Graham, J. and R. Foote. 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chainlength, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 24: 42-52.
- Hu, J. H., Q. W. Li, L. S. Zan, Z. L. Jiang, J. H. An, L. Q. Wang and Y. H. Jia. 2010. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extender on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Anim. Reprod. Sci.* 117:11-17.
- Hu, J. H., Z. L. Jiang, R. K. Lv, Q. W. Li, S. S. Zhang, L. S. Zan, Y. K. Li and X. Li. 2011. The advantages of low density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology* 62: 83-87.
- Kampschmidt, R. F., D. T. Mayer and H. A. Herman. 1953. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *J. Dairy Sci* 36: 733-742.
- Kojima, E. and R. Nakamura. 1985. Heat gelling properties of hen's egg yolk low density lipoprotein (LDL) in the presence of other protein. *J. Food Sci.* 50: 63-66.
- Manjunath, P. 2012. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim. Reprod.* 9: 809-815.
- Medeiros, C., F. Forell, A. Oliveira and J. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why is't it better? *Theriogenology* 57: 327-344.
- Moreno, D., D. Bencharif, L. Amirat-Briand, A. Neira, S. Destrumelle and D. Tainturier. 2013. Preliminary results: the advantages of low-density lipoproteins for the cryopreservation of equine semen. *Equine Vet. Sci.* 33: 1068-1075.
- Moussa, M., V. Martinet, A. Trimeche, D. Tainturier and M. Anton. 2002. Low density lipoproteins extended from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57: 1695-1706.
- Muñoz, R., M. Fernandez and A. Peña. 2007. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reprod. Domest. Anim.* 42: 305-311.
- Pace, M. M. and E. F. Graham. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Anim. Sci.* 39: 1144-1149.
- Phillips, P. H. and H. A. Lardy. 1940. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J. Dairy Sci.* 23: 399-404.
- Quinn, P. J. and P. Y. W. Chow. 1980. Evidence that phospholipids protects spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J. Reprod. Fertil.* 60: 403-407.
- Singh, A., V. Singh, B. Narwade, T. Mohanty and S. Atreja. 2012. Comparative quality assessment of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen chilled (5°C) in egg yolk-and soya milk-based extenders. *Reprod. Domest. Anim.* 47: 596-600.
- Statistical Analysis System, SAS. 2016. User's Guide: Statistics, Version 9.4 Edition. SAS Inst., Inc., Cary, NC.

- Trimeche, A., M. Anton, P. Renard, G. Gandener and D. Tainturier. 1996. Quail egg yolk: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology* 34: 385-393.
- Tsutsui, T. 1988. Functional properties of heat-treated egg yolk low density lipoprotein. *J. Food Sci.* 53: 1103-1106.
- Vishwanath, R. and P. Shannon. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 23-53.
- Wakamatu, T., Y. Sato and Y. Saito. 1982. Identification of the components responsible for the gelation of egg yolk during freezing. *Agri. Biol. Chem.* 46: 1495-1503.
- Yildiz, C., Y. Bozkurt and I. Yavas. 2013. An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology* 67: 91-94.

Effects of different concentrations of low density lipoprotein in semen extender on the quality of frozen semen in Holstein bulls ⁽¹⁾

Chia-Xin Lee ⁽²⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾ Ming-Kuew Yang ⁽²⁾ Ting-Yung Kuo ⁽³⁾ and Pin-Chi Tang ⁽⁴⁾

Received: Jan. 7, 2020; Accepted: May 8, 2020

Abstract

The purpose of the study was to investigate the effects of concentrations of low density lipoprotein (LDL) in the semen extenders on the quality of semen after frozen-thawed process. Three young offspring, derived from Ten Tons Cows based on DHI data ranking, were chosen in this study. Semen was collected by an artificial vagina and diluted with extenders containing either different percentages of LDL (6, 7, 8, 9 or 10%) or 20% EY (egg yolk, control group) to the final sperm concentration of 3×10^8 cells/mL. The sperm motility, viability, mitochondria activity and acrosome integrity after frozen-thawed process were evaluated by computer-assisted sperm analysis (CASA) and flow cytometer. The results showed that sperms in the group of 8% LDL had significantly ($P < 0.05$) higher viability, acrosome integrity, motility and progressive motility than the control group. Besides, better motility parameters, including average path velocity (VAP), curvilinear velocity (VCL) and amplitude of lateral head displacement (ALH), were found in the extender with of 8% LDL. In conclusion, the cryopreservation extenders containing 8% LDL maintain sperms good mobility, progressive motility, movement characteristics and viability. This can effectively improve the quality of frozen semen of domestic Holstein bulls.

Key words: Holstein bull, Low density lipoproteins, Cryopreservation.

(1) Contribution No. 2637 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hsinchu Branch, COA-LRI, Miaoli 36841, Taiwan, R. O. C.

(3) Breeding and Genetics Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Department of Animal Science, National Chung Hsing University, Taichung 40249, Taiwan, R. O. C.

(5) Corresponding author, E-mail: jxlee@mail.tlri.gov.tw.