

# 不同冷凍保護劑對紐西蘭白兔精子性狀之影響<sup>(1)</sup>

蔡佩均<sup>(2)(5)</sup> 陳裕信<sup>(3)</sup> 康定傑<sup>(4)</sup> 陳立人<sup>(2)</sup>

收件日期：111 年 9 月 14 日；接受日期：112 年 3 月 25 日

## 摘 要

本研究的目的是比較不同兔精液冷凍保存步驟，以找出最適合的冷凍方法，提升解凍後精子之活動力 (motility)、存活率 (vitality) 及精子前進值 (progressive motility) 等性狀表現。試驗將採樣自不同個體的兔精液先在 5°C 降溫後，以含有 0.5% BSA (bovine serum albumin) 與 0.1 M 或 0.058 M sucrose 之 Tris-citrate-glucose (TCG) 為基礎液，添加 6、10 或 16% DMSO (dimethyl sulfoxide)、4% Ficoll70 或 10% LDL (low-density-lipoprotein) 等不同組合冷凍稀釋液 (extender) 稀釋混合。再將此等精液混合液充填入 0.25 mL 之麥管在 5°C 中平衡 45 min，然後放置於液態氮蒸氣 (距液面 5 cm 處) 進行冷凍降溫 10 min，最後再移入液態氮中保存。冷凍解凍後以電腦輔助精子分析儀進行包含精子活力、精子存活率、精子前進值等性狀之分析。試驗結果顯示，最佳的兔精液冷凍操作條件為使用含 10% DMSO 作為冷凍保護劑，且以單一步驟冷凍法進行操作可以獲致解凍後於兔精子最佳活力 ( $40.19 \pm 7.65\%$ )、存活率 ( $31.45 \pm 6.6\%$ ) 及精子前進值 ( $15.23 \pm 2.77\%$ ) 之結果。

關鍵詞：冷凍保護劑、兔、精液冷凍保存。

## 緒 言

精子之冷凍保存技術可保存珍貴動物之遺傳資源及解決長途運送精子的問題。然而，由於兔之冷凍精液受精率遠低於冷藏者，故尚未被商業化應用在兔之人工授精 (artificial insemination, AI) (López and Alvarino, 2000; Mocé and Vicente, 2009; Kubovicova *et al.*, 2021)。冷凍保存極易改變精子中粒線體膜的特性與增加其自由基 (reactive oxygen species, ROS) 的含量，導致 DNA 斷裂而發生細胞凋亡 (apoptosis)，而降低精子存活率 (Kubovicova *et al.*, 2021)。此外，在精子冷凍解凍的過程中，冷凍降溫及解凍回溫時因滲透壓與溫度改變所造成的緊迫，以及細胞內冰晶 (crystal) 形成的傷害，乃為最終導致精子死亡的主要因子 (Holt, 2000)。使用具有細胞滲透性 (permeable) 且可使細胞脫水之冷凍保護劑 (cryoprotectants, CPAs)，可避免精子內冰晶之形成。不論是可滲透性的冷凍保護劑如甘油 (glycerol)、二甲基亞砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、乙二醇 (ethylene glycol)、醯胺 (amide) 與非滲透性的 (non-permeable) 冷凍保護劑，如醣類 (saccharide)、脂蛋白 (lipoprotein)、水溶性聚蔗糖 (Ficoll) 等都常被加入精子冷凍稀釋液。精子保存方法因不同物種而異，其遺傳特性影響精子大小、型態、膜特性及頭帽 (acrosome) 組成等，故對於冷凍傷害有不同耐受性 (Kulíková *et al.*, 2017)。

用於哺乳動物精子冷凍保存的技術傳統上採用 Polge 等人所研發的慢速冷凍方法 (Polge *et al.*, 1949)，即精液以含有 20% 甘油之卵黃－檸檬酸緩衝液 (egg-yolk-citrate buffer) 稀釋混合，採用慢速降溫進行冷凍保存。兔精子慢速冷凍保存所使用的稀釋液大都以 Tris-citrate-glucose (TCG) 當作基礎液並含有蛋黃、DMSO 或乙醯胺 (acetamide) 作為冷凍保護劑 (Mocé and Vicente, 2009)。此外，大部分試驗步驟是先於 5°C 中平衡，隨後以液態氮氣相層 (vapor phase) 降溫到 -125°C 後移置到液態氮中保存。含不同冷凍保護劑成分稀釋液的降溫速率不同，解凍則通常在 37°C 或更高溫度中以水浴法進行 (Mocé and Vicente, 2009)。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2742 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所產業組。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所。

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

玻璃化法 (vitrification) 則利用高濃度冷凍保護劑配合急速降溫，以避免冰晶形成 (Isachenko *et al.*, 2003)。Rossato and Iaffaldano (2013) 以僅稀釋於 TCG 基礎液，而不含任何冷凍保護劑之兔精子懸浮液 (最終濃度  $5 \times 10^7$  精子/mL)，直接滴入液態氮中進行急速降溫冷凍，解凍得到相當低之精子存活率 (1.8%)。經改善後，Rossato and Iaffaldano (2013) 使用玻璃化法配合一般慢速冷凍法，發現添加 BSA (bovine serum albumin) 及適當比例之蔗糖 (sucrose) 或海藻糖 (trahalose) 做為精子滲透壓保護劑時，DMSO 是最好的可滲性冷凍保護劑，且 10% DMSO 為毒性最低的劑量，可保留公兔精子最大之解凍存活率。其中 BSA/ 蔗糖的組合優於 BSA/ 海藻糖的組合。另外，Kubovicova *et al.* (2021) 在冷凍稀釋液中僅添加 BSA，0.1 M BSA 與 0.25 M 蔗糖或 BSA 與 0.25 M 海藻糖作為冷凍保護劑，可使玻璃化法冷凍的兔精子在解凍後具較高的活動力與細胞膜完整性。

兔精子呈現低滲水性以及高活化能，低滲水性意味著兔精子冷凍稀釋液需要使用較低分子量的冷凍保護劑如 DMSO，或較高滲水性之冷凍保護劑如醯胺，而非較高分子量的甘油或較低滲水性的卵黃 (egg yolk) (Curry *et al.*, 1995)。DMSO 在兔精冷凍過程中有避免細胞內及細胞外冰晶形成的作用。Viudes-De-Castro *et al.* (2014) 研究指出使用含 23.44% (即 3 M) DMSO，配合 0.1 M 非滲透性的冷凍保護劑之蔗糖之組合添加作為冷凍保護劑，比添加蛋黃作為兔精液冷凍保護劑有較佳的效果。Di Iorio (2014) 比較 DMSO (4% 及 8%) 及 DMA (dimethylacetamide) (4% 及 8%) 添加於以 TCG 當作基礎液的冷凍稀釋液中進行兔精子冷凍，結果顯示解凍後的兔精子活動力及存活率以 8% DMSO 組最優 (42.63%, 47.09%)，且頭帽完整性可達 92.02%。Hall *et al.* (2017) 在比較解凍後兔精液之活動力、存活率及體外受精 (in vitro fertilization, IVF) 之結果，指出 7% DMSO 及 17% 卵黃添加於 Tris-glucose-glycerol-saccharide (TGGS) 含 25 mM 葡萄糖 (glucose) 及 25 mM 蔗糖之配方為冷凍保存紐西蘭大白兔精子最有效的配方。

此外，Ficoll70 (Sigma, F2878) 添加於冷凍稀釋液是作為非滲透性冷凍保護劑之用，能夠改善解凍後兔精子之品質。Iaffaldano *et al.* (2014) 評估與蔗糖合併添加時，Ficoll70 當作第二個非滲透性冷凍保護劑對兔精子解凍後的效果，進行人工授精測試後，發現其仔兔出生率與以新鮮精液人工授精後結果很相近；且冷凍解凍後之兔精子頭帽及細胞膜完整度均比僅添加蔗糖者顯著較佳。推測 Ficoll70 之添加提高了冷凍稀釋液的黏稠度，在冷凍過程中可穩定精子之細胞膜、減少冰晶形成與機械性的傷害，因而提高精子存活率 (Iaffaldano *et al.*, 2014)。Kulíková *et al.* (2015) 將 Ficoll70 加入兔玻璃化精子冷凍稀釋液中當作非滲透性精子保護劑，發現對精子性能有大幅增進效果，特別是用 37°C 解凍後 30 min 內，Ficoll70 添加組之兔精子表現出顯著較高的精子活動力、存活率及精子前進值，且精子頭帽完整性也顯著高於對照組。基於前人研究結果，本試驗選用不同濃度的 DMSO 配合其他冷凍保護劑進行兔精液冷凍，以比較不同配方的冷凍保護劑及不同冷凍操作對於紐西蘭白兔精子冷凍解凍後性狀的影響。

## 材料與方法

### I. 試驗動物之飼養管理

試驗用之紐西蘭大白兔來自行政院農業委員會畜產試驗所兔舍，飼養於半開放式兔舍，籠架長 90 cm，寬 45 cm，高 50 cm；採自然光照，無冷氣空調控制溫濕度，飲水由自動給水裝置供應，飼料由畜產試驗所提供，飼料餵飼採任飼，公及母兔在 5 週齡離乳，為避免打鬥受傷，公兔於 3 月齡以上開始單獨飼養。本研究之動物試驗於行政院農業委員會畜產試驗所執行，動物之使用、飼養及實驗內容皆合乎行政院農業委員會畜產試驗所實驗動物照護之規定，並經使用小組審查同意進行 (動物實驗申請表暨同意書編號：106-1)。

### II. 精液採集

因兔精液量及精液品質受氣溫影響甚鉅 (Marai *et al.*, 2002)，在臺灣熱帶地區半開放式的養兔環境下，本試驗在 10 月底及 2 月中進行 (氣溫範圍 18 – 27°C)。選定 9 隻 7 個月齡以上性成熟之紐西蘭白公兔，及 6 月齡以上外陰部紅腫的紐西蘭白母兔，利用預熱 50°C 之假陰道 (圓筒形矽膠套上 1.5 mL 離心管，圖 1)，待公兔駕乘母兔時套在公兔陰莖進行精液收集。採到的兔精液，正常者為白色至米白色，若呈黃色為尿液污染，呈紅棕色則為血液污染，污染者不進行後續分析。

### III. 精子性狀分析

兔精子性狀分析係參考 Rosato and Iaffaldano (2013) 之步驟進行，將新鮮或解凍後的兔精液使用電腦輔助精子分析儀 (Computer Assisted Sperm Analyzer, CASA, microptic S.L., Spain) 之精子分類分析器 (Sperm Class Analyzer®, SCA evolution) 檢測分析精子活動力及前進值。亦即，將精液原液以 TCG 基礎液 (250 mM TRIS-hydroxymethylaminomethane, 88 mM citric acid, 47 mM glucose, pH 6.9) 稀釋成  $10^6$  sperm/mL，再於 37°C 加熱活化 7 min 後取 3  $\mu$ L 注入分析玻片 (standard count 4 chamber slide, Leja, 301115, Netherland)，於顯微鏡 (ECLIPSE Ci,

Nikon, Japan) 下對焦後在 CASA 系統中選取 mot (即活動力) 測定，讓 CASA 系統同時換算出精子濃度並分析其活動力及前進值。而精子存活率測定則是將精子以 1 µg/mL 之 Hoechst33342 (Sigma-Aldrich, B2261, USA) (藍色螢光 EX/EM = 355/465 nm) 及 0.2 mM 之 propidium iodide (Life, L7011, USA) (紅色螢光 EX/EM = 488/615 nm) 在 37℃ 下染色 5 min；精子呈現藍色為存活，橘紅色則為死亡，染色後精子則在螢光顯微鏡下利用濾鏡 Green filter/ Bandpass filter (UV-2A, EX 330-338, DM:400, BA:420) 以 CASA 進行分析，計算出存活率百分比。



圖 1. 採集兔精液之假陰道，一端接 1.7 mL 微量離心管。  
Fig. 1. Artificial vagina for rabbit semen collection. One end connects a 1.7 mL microcentrifuge tube.

IV. 兔精液冷凍

(i) 冷凍稀釋液配製：

兔精液冷凍稀釋劑係以為 TCG 基礎液，添加 DMSO (6、10 或 16%)、低密度脂蛋白 (low-density-lipoprotein, LDL) (10%)、蔗糖 (0.1 M 或 0.058 M) 或 4% Ficoll 70 等不同組合之冷凍稀釋液，並調整 pH 值至 6.9 供試。

(ii) 單一步驟冷凍法操作：

將兔新鮮精液放入 5℃ 隔水降溫 90 min，接著分 3 次每次 15 min (共 45 min) 徐徐加入已預冷至 5℃ 之冷凍稀釋液 (配方詳如表 1)，稀釋一倍後，接著將精液混合液填充入 0.25 mL 麥管 (mini straw, 006429, IMV Technologies, France)，再以封口粉 (straw powder, 018816, IMV Technologies, France) 封口，先在 5℃ 冷房中平衡 15 min 後，至於液態氮上方 5 cm 處 (約 -125 – -130℃) 降溫 10 min，再將麥管以 5 支為單位置入鋁製保存管移入液態氮桶中備用。

表 1. 單一步驟冷凍稀釋液配方

Table 1. The composition of the one-steps extender

Ingredients	6% DMSO + 0.1M Sucrose	10% DMSO + 0.1M Sucrose	16% DMSO + 0.058 M Sucrose	10% DMSO + 0.058 M Sucrose	10% DMSO + 0.058 M Sucrose + 4% Ficoll70
Tris, mM	250	250	250	250	250
Citric acid, mM	88	88	88	88	88
Glucose, mM	47	47	47	47	47
Sucrose, M	0.1	0.1	0.1	0.058	0.058
BSA, %	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
DMSO, %	6	10	16	10	10
Ficoll70, %	—	—	—	—	4

## (iii) 兩階段式冷凍法操作步驟：

將兔新鮮精液加 4 倍體積的第一階段稀釋液 (TCG 基礎液加 0.1 M sucrose, 0.5% BSA, 配方如表 2 所示) 放入 5°C 隔水降溫 120 min 形成 A 液；之後分 3 次 (每次 10 min) 加入已預先降溫為 5°C 之第二階段稀釋液，使其總體積為 A 液之 2 倍，即精液被稀釋 10 倍。接著將精液混合液填充入 0.25 mL 麥管，再以封口粉封口，在 5°C 冷房中平衡 15 min 後，以液態氮蒸氣降溫 10 min。之後全程於液態氮中操作，將麥管以 5 支為單位塞入鋁製保存管儲存於液態氮桶中。

表 2. 兩階段式冷凍稀釋液配方

Table 2. The composition of the 2 steps extender

Ingredients	First step extender	Second step extender				
		4% DMSO + 10% LDL	10% DMSO + 10% LDL	16% DMSO + 10% LDL	10% DMSO	16% DMSO
Tris, mM	250	250	250	250	250	250
Citric acid, mM	88	88	88	88	88	88
Glucose, mM	47	47	47	47	47	47
Sucrose, M	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
BSA, %	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
LDL, %	10	10	10	10	—	—
DMSO, %	—	4	10	16	10	16

## V. 精液解凍

將麥管從液態氮桶中拿出，隨即放入 37°C 水浴槽中加熱 30 s 或 50°C 加熱 10 s，剪開麥管，無去除抗凍劑，直接將解凍精液置於離心管中避光備用。

## VI. 統計分析

試驗結果以 SAS (2009) 套裝軟體 (SAS 9.3) 進行統計分析，使用一般線性模式程序 (general linear model procedure, GLM) 進行變方分析，再以最小平方平均法 (least square means, LSMEANS) 比較其差異，並以  $P < 0.05$  者為具顯著差異之依據。

## 結 果

## I. 精液採集

兔精液採集月份選在氣候較涼爽的 10 月底至 2 月中旬，試驗期間共採集 18 次兔精液。體積、濃度、活動力、存活率及精子前進值數據如表 3。

表 3. 新鮮採集紐西蘭白兔精性狀 (平均值 ± 標準偏差)

Table 3. Characters of freshly collected New Zealand rabbit semen (Mean ± SD)

Volume, mL	Concentration, M/mL	Motility, %	Vitality, %	Progressive motility, %
1.2 ± 0.4	672 ± 366	69.5 ± 15.1	62.5 ± 13.6	31.1 ± 8.0

## II. 兔精液單一步驟冷凍之 DMSO 最適添加濃度測試

以 TCG 當基礎稀釋液，添加 0.058 M sucrose、0.5% BSA 兩種非滲透性冷凍保護劑時，採單一步驟冷凍法，比較添加不同濃度之 6、10、16% DMSO 對解凍後兔精子性狀之影響的結果如圖 2 所示。試驗結果顯示，以



10% DMSO 作為冷凍保護劑較 6% 及 16% 者其解凍後精子之活動力 ( $28.61 \pm 3.59$  vs.  $24.84 \pm 3.75$  vs.  $22.79 \pm 4.41$ ) 及精子前進值 ( $7.37 \pm 2.03$  vs.  $5.27 \pm 2.43$  vs.  $4.32 \pm 2.45$ ) 均顯著地有比較佳之表現 ( $P < 0.05$ )；惟精子存活率方面只有 16% DMSO 數值 ( $15.38 \pm 4.14$ ) 顯著較其他兩種濃度低 ( $P < 0.05$ )，而 6% DMSO 及 10% DMSO 兩者 ( $20.42 \pm 4.84$  vs.  $21.69 \pm 6.12$ ) 無顯著差異，顯示 10% DMSO 為最佳可滲性冷凍保護劑之添加濃度 (圖 2)。

### III. 兔單一步驟冷凍精液解凍最適條件測試

當以 10%DMSO 作為冷凍保護劑時，利用單一步驟冷凍之兔精液採不同解凍的溫度及時間組合，對解凍後精子性狀影響之試驗結果如圖 3 所示。結果顯示，雖然兔冷凍精液於  $50^\circ\text{C}$  作用 10 秒組 ( $50^\circ\text{C}$  10 s)，解凍後之精子活動力 ( $30.36 \pm 2.24$  vs.  $20.87 \pm 6.17$ )、存活率 ( $31.83 \pm 8.8$  vs.  $27.18 \pm 8.08$ ) 及前進值 ( $24.56 \pm 5.6$  vs.  $15.24 \pm 4.4$ ) 雖與  $37^\circ\text{C}$  作用 30 秒組 ( $37^\circ\text{C}$  30 s) 間無統計之顯著差異，但卻有較佳趨勢。因此於後續試驗之解凍步驟將均以  $50^\circ\text{C}$  作用 10 s 的條件進行之。

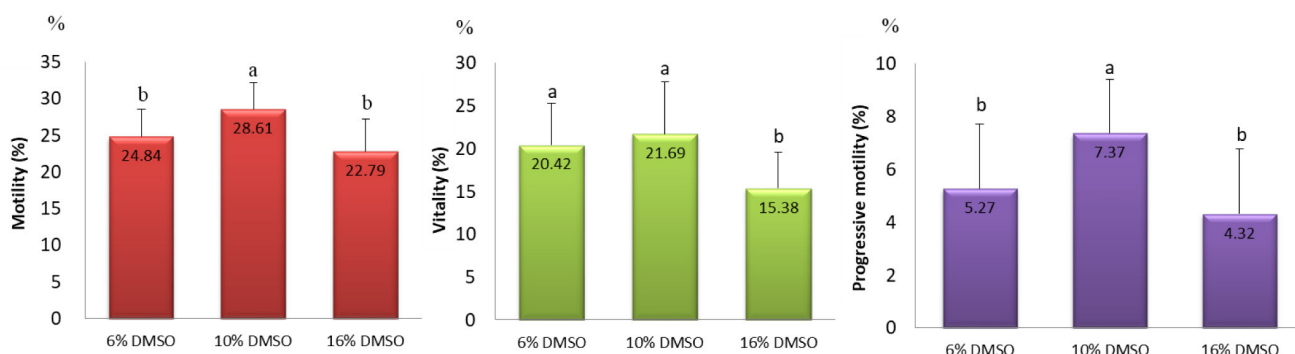


圖 2. 不同濃度 DMSO 對冷凍解凍後紐西蘭白兔精子活動力、存活率及精子前進值的影響。

<sup>a, b</sup> 表示兩組間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 2. The effect of different concentration of DMSO on the New Zealand rabbit sperm motility, vitality and progressive motility after frozen-thawed procedure.

<sup>a, b</sup> Means differ within groups ( $P < 0.05$ ).

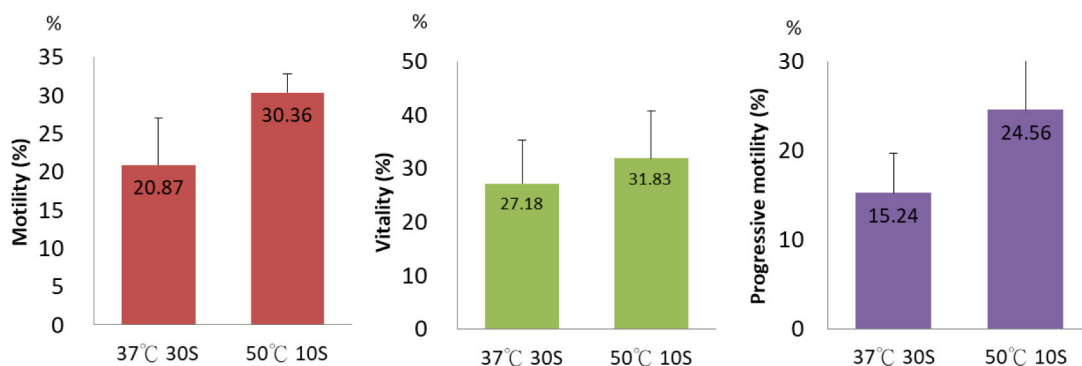


圖 3. 不同解凍溫度和時間對紐西蘭白兔冷凍精液解凍後之精子活動力、存活率及前進值的影響。

Fig. 3. The effect of different thawing temperature and time on the rabbit sperm motility, vitality and progressive motility after frozen-thawed procedure.

### IV. 單一步驟冷凍操作下，調整非滲透性冷凍保護劑之測試

以含 10% DMSO 與 0.5% BSA 之 TCG 作為兔精液單一步驟冷凍之基礎冷凍稀釋液，並調整冷凍稀釋液中 sucrose 或額外添加大分子 Ficoll70，對於冷凍解凍後兔精子性狀的影響結果如圖 4 所示。其中，在解凍後兔精子活動力的比較上，添加 0.058 M sucrose 組 ( $40.19 \pm 7.1\%$ )，顯著 ( $P < 0.05$ ) 高於添加 0.1 M sucrose 組 ( $33.35 \pm 2.77\%$ ) 以及同時添加 0.058 M sucrose 與 4% Ficoll70 組 ( $33.35 \pm 3.33\%$ )，且添加 0.1 M sucrose 組和同時添加 0.058 M sucrose 與 4% Ficoll70 組之間則無顯著差異。然而，冷凍解凍後精子的存活率和前進值，在添加 0.058 M sucrose 組、添加 0.1 M sucrose 組及添加 0.058 M sucrose 與 4% Ficoll70 組分別為  $31.45 \pm 6.6\%$ 、 $26.5 \pm 3.84\%$ 、 $31.38 \pm 4.36\%$  與  $15.23 \pm 2.77\%$ 、 $11.99 \pm 1.47\%$ 、 $13.58 \pm 3.37\%$ ，各處理間沒有顯著的差異。

## V. 使用兩階段式方法進行兔精液冷凍及解凍

以調整 LDL、DMSO 濃度及添加 4% Ficoll70 與否組合成不同稀釋液配方 (詳如表 2) 進行兩階段式兔精液冷凍之結果如圖 5 所示。其中冷凍解凍後的精子活動力以 16% DMSO + 4% Ficoll70 組顯著最佳 ( $20.57 \pm 4.4\%$ ,  $P < 0.05$ )；然而在解凍後精子存活率方面，則是以添加 10% LDL 的兩組最佳 ( $34.48 \pm 4.9\%$  and  $31.79 \pm 2.16\%$ ,  $P < 0.05$ )；另在精子前進值方面，4 組間則無顯著差異。

## VI. 含不同濃度之 DMSO 之稀釋液對解凍後兔精子品質之影響

以含 6、10 及 16% 三種不同 DMSO 濃度之 TCG 冷凍稀釋液，並以單一步驟冷凍保存至少 7 天解凍之兔精液，在 37°C 下放置 30、60、90 及 120 min 比較分析其活動力、存活率及精子前進值之結果如圖 6 所示。結果顯示，以含 10% DMSO 之 TCG 冷凍稀釋液解凍後之兔精子在 37°C 下放置 90 min 尚可保持較高於其他 DMSO 組的精子活動力 ( $28.72 \pm 4.74\%$  vs.  $25.09 \pm 3.42\%$  vs.  $20.86 \pm 2.77\%$ ,  $P < 0.05$ ) 及精子前進值 ( $7.91 \pm 3.28\%$  vs.  $4.91 \pm 1.62\%$  vs.  $3.22 \pm 1.33\%$ ,  $P < 0.05$ )，且均具有顯著性差異。而解凍後處在 37°C 下含 6、10 及 16% DMSO 之 TCG 持續放置 120 min 後的兔精子之存活率均隨之急遽下降到 22.4% 以下。雖然在含 10% DMSO 之 TCG 組之精子活力與前進值在 37°C 下放置 90 min 後有持續提升的趨勢，但整體而言，當 TCG 冷凍稀釋液中之 DMSO 含量為 6–16% 時，冷凍解凍後的兔精液維持在 37°C 下超過 90 min 其品質即急速劣化。因此，冷凍解凍後的公兔精液，保持於 37°C 的時間不宜太長，應儘速進行人工授精操作，以確保精液品質。且含 10% DMSO 的 TCG 能夠在 37°C 中保持至少 90 min 較佳的精子活力、存活率及精子前進值等，為製作冷凍精液配方較佳的選擇。

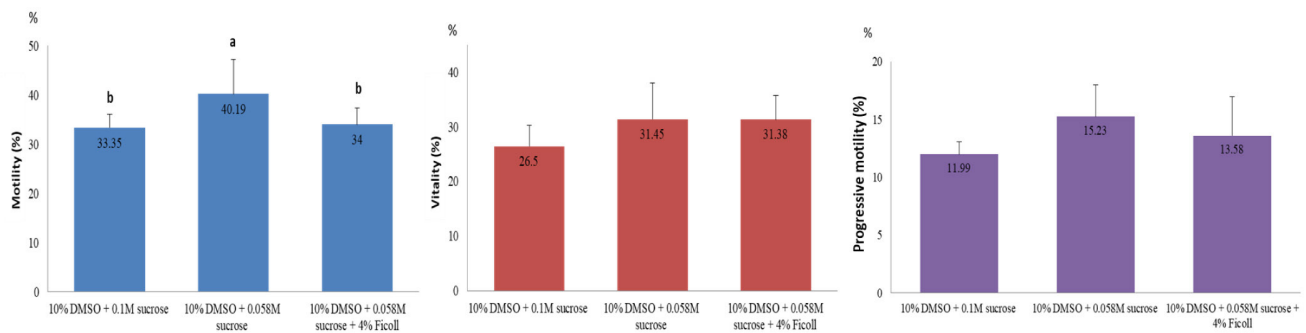


圖 4. 調整非滲透性冷凍保護劑對解凍後紐西蘭白兔精子活動力、存活率及前進值之影響。

<sup>a, b</sup> 表示兩組間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 4. The effect of different non-permeable cryoprotectants on the New Zealand rabbit sperm motility, vitality and progressive motility in one-step cryopreservation method.

<sup>a, b</sup> Means differ within groups ( $P < 0.05$ ).

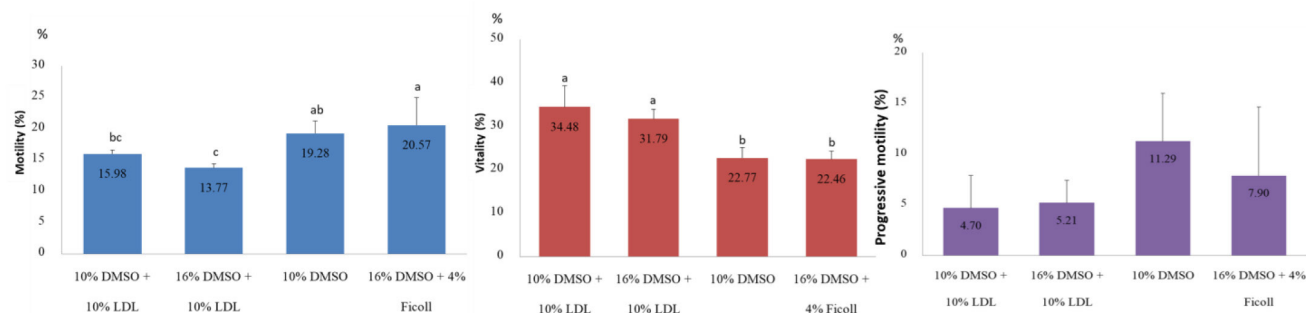


圖 5. 以兩階段式方法進行液態氮冷凍，測試不同稀釋液配方對精子活動力、存活率及精子前進值之影響。

<sup>a, b</sup> 表示兩組間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 5. The effect of different extender formulas on the rabbit sperm motility, vitality and progressive motility in two-step liquid nitrogen cryopreservation method.

<sup>a, b</sup> Means differ within groups ( $P < 0.05$ ).

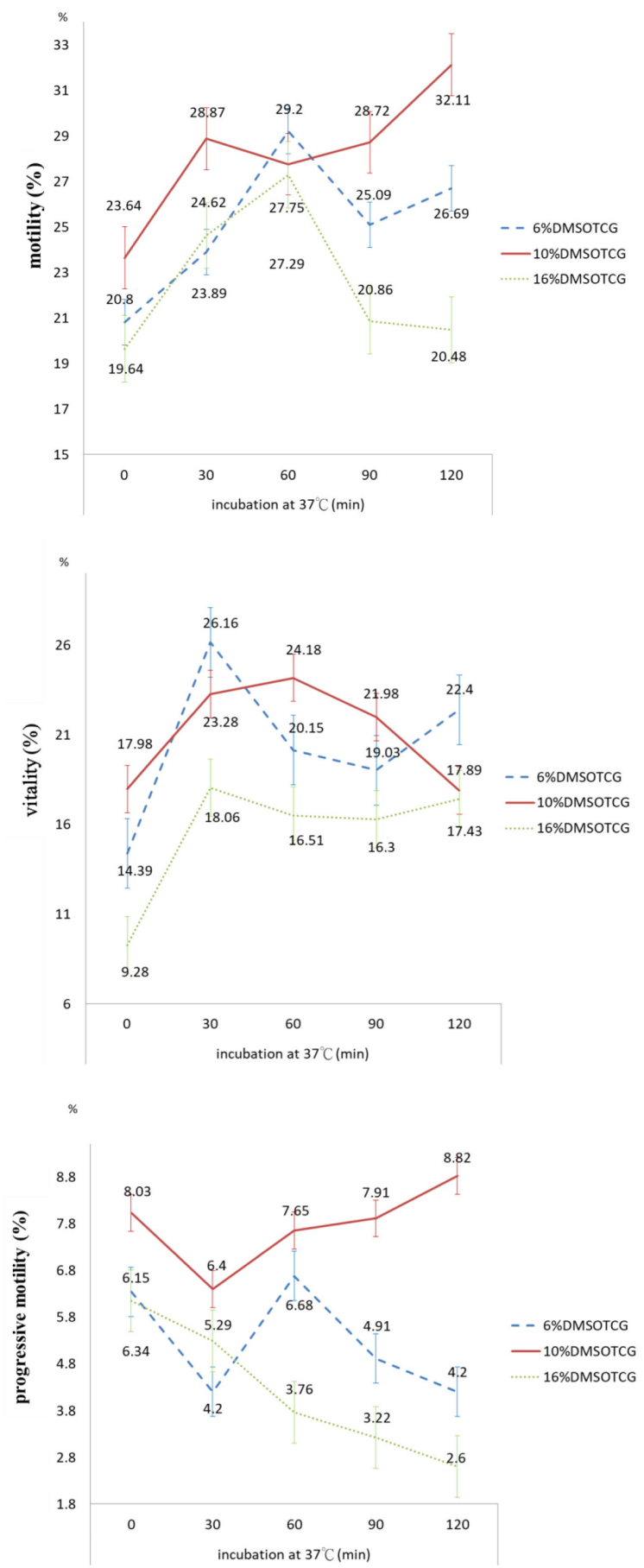


圖 6. 不同 DMSO 含量稀釋液中的紐西蘭白兔精子解凍後於 37°C 置放 30、60、90 及 120 min 對精子性狀之影響。  
Fig. 6. The effect of maintaining thawed New Zealand rabbit semen in TCG with 6, 10, and 16% DMSO at 37°C for 30, 60, 90, and 120 minutes on sperm characteristics.

## 討 論

在此研究中先用單一步驟法確定在紐西蘭白兔精液冷凍中最廣為使用之可滲透性冷凍保護劑 DMSO 的最佳使用濃度為 10% (圖 2)，在此濃度下常規的冷凍解凍方式對精子的傷害是最小的，此與 Rosato and Isalfaldano (2013) 的研究相符 (10% DMSO > 5% DMSO > 5% DMA)。其後，則進行最佳解凍溫度與時間的測試，已知解凍步驟對於解凍後精液品質十分重要。當冷凍之樣品回復到室溫，冷凍步驟的逆轉開始進行，解凍的速率視冷凍速率而定。在低溫長時間之慢速解凍時，冷凍時形成的小冰晶開始融化 (melt) 重組成大冰晶，此稱為再結晶現象，會傷害精子細胞；反之，而在高溫短時間之快速解凍過程中，通過再結晶時間較短暫，可減少大冰晶的形成，而增加了細胞的存活率 (Watson, 1995)。冷凍精液解凍一般都是在 37 – 39°C 或 50°C 進行 10 至 12 s，甚至還有提高溫度到 70°C 進行 10 至 12 s (Mocé and Vicente, 2009)；不過與 50°C 相比，70°C 解凍後精液進行人工授精之活仔數較低 (5 vs. 7.1) (Mocé *et al.*, 2003)，故本研究只測試了 37°C 30 s 及 50°C 10 s，結果並無統計上之差異 (圖 3)。

Rosato and Isffalfano (2013) 指出在 BSA 存在下，並添加 0.1 M sucrose 或 0.05 M sucrose 經慢速冷凍，其解凍後之兩者精子性狀並無顯著差異。本試驗以單一步驟冷凍下，最佳的非滲透性冷凍保護劑配方之研究如圖 4 所示，在 10% DMSO 及 0.5% BSA 之 TCG 作為基準冷凍稀釋液時添加 0.058 M sucrose 組冷凍兔精液解凍後之精子活力顯著高於添加 0.058 M sucrose 再加上 Ficoll70 以及添加 0.1 M sucrose 等之組合相比。

以兩階段冷凍方式探討非滲透性冷凍保護劑 LDL 與 Ficoll70 相較於 DMSO 對冷凍解凍後兔精子性狀的影響的結果如圖 5 所示，顯示加了 LDL 後，將導致精子活動力及精子前進值下降，此結果與 Di Iorio (2014) 與 Viudes-de Castro *et al.* (2014) 的結果相符。然而本研究中添加了 LDL 提高精子解凍後之存活率，與 Di Iorio (2014) 者不符，但與 Hall *et al.* (2017) 的結果相同。此外，Curry *et al.* (1995) 也指出兔精子所需之冷凍稀釋液不適合添加卵黃。因此使用 LDL 作為冷凍保護劑之效果有待進一步研究。另外，本研究結果顯示 Ficoll70 的添加對於冷凍解凍後精子的活動力有增進效果，此與 Di Iorio (2014) 及 Iaffalfano *et al.* (2014) 者相近，而 Di Iorio (2014) 指出 Ficoll70 的添加可增進解凍後精子在 37°C 中加熱 30 min 後的活力及精子的前進值，則有待進一步驗證。

Di Iorio (2014) 建議以 TCG 含 16% DMSO、2% 蔗糖 (0.058 M) 與 4% Ficoll70 作為冷凍稀釋液保存精子，其解凍後精子活力最佳，人工授精後受胎率及出生率也最佳。本試驗結果亦顯示，最佳的兔精子冷凍保存為以 TCG 當基礎液，添加 0.058 M 蔗糖與 10% DMSO，且以單一步驟操作僅以一比一稀釋精液者，可獲得到最佳的活動力、存活率及精子前進值。

## 結 論

綜而言之，本研究雖未進行單一步驟與兩階段冷凍操作之比較，但就採用單一步驟冷凍操作的兔精子，在 3 種不同配方條件冷凍解凍後，其精子活動力與存活率的數值均高於以兩階段冷凍操作者之事實。因此，考量操作步驟的簡繁度、所需的時間以及解凍後的精子性狀，仍建議採用單一步驟冷凍法保存紐西蘭白兔精液。

## 誌 謝

試驗期間承蒙本組兔舍陳念琪小姐、林明村先生及孫碧月小姐協助試驗動物照顧及試驗資料整理，特此誌謝。

## 參考文獻

- Curry, M. R., B. J. Redding, and P. F. Watson. 1995. Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa. *Cryobiology* 32: 175-181.
- Di Iorio, M. 2014. Cryopreservation of rabbit semen: effectiveness of different permeable and non-permeable cryoprotectants on post-thaw sperm quality and reproductive performances. Thesis, University of Molise, Italy.
- Hall, S. E., C. Negus, D. Johninke, and R. Bathgate. 2017. Adjusting cryodiluent composition for improved post-thaw quality of rabbit spermatozoa. *PLoS One* 12: e0175965.
- Holt, W. V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences.



- Theriogenology 53: 47-58.
- Iaffaldano, N., M. Di Iorio, M. P. Rosato, and A. Manchisi. 2014. Cryopreservation of rabbit semen using non-permeable cryoprotectants: Effectiveness of different concentrations of low-density lipoproteins (LDL) from egg yolk versus egg yolk or sucrose. *Anim Reprod Sci* 151: 220-228.
- Isachenko, E., V. Isachenko, I. I. Katkov, S. Dessole, and F. Nawroth. 2003. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod. BioMed. Online* 6: 191-200.
- Kubovicova, E., A. V. Makarevich, A. Balazi, J. Vasicek, and P. Chrenek. 2021. Factors affecting rabbit sperm cryopreservation: a mini-review. *Zygote* 30: 1-8.
- Kulíková, B., M. Di Iorio, E. Kubovicova, L. Kuzelova, N. Iaffaldano, and P. Chrenek. 2015. The cryoprotective effect of Ficoll on the rabbit spermatozoa quality. *Zygote* 23: 785-794.
- Kulíková, B., M. Oravcová, A. Baláži, P. Supuka, and P. Chrenek. 2017. Factors affecting storage of Slovak native rabbit semen in the gene bank. *Zygote* 25: 592-600.
- López, F. and J. Alvaríño. 2000. Effects of added caffeine on results following artificial insemination with fresh and refrigerated rabbit semen. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 147-154.
- Marai, I. F. M., A. A. M. Habeb, and A. E. Gad. 2002. Rabbits' productive, reproductive and physiological performance traits as affected by heat stress: a review. *Livest. Prod. Sci.* 78: 71-90.
- Mocé, E., J. S. Vicente, and R. Lavara. 2003. Effect of freezing–thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. *Theriogenology* 60: 115-123.
- Mocé, E. and J. S. Vicente. 2009. Rabbit sperm cryopreservation: a review. *Anim. Reprod. Sci.* 110: 1-24.
- Polge, C., A. U. Smith, and A. S. Parkes. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.
- Rosato, M. P. and N. Iaffaldano. 2013. Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology* 79: 508-516.
- SAS. 2009. SAS User's guide: Statistics. SAS Inst., Cary, NC. USA.
- Viudes-De-Castro, M. P., R. Lavara, H. Safaa, F. Marco-Jiménez, G. Mehaisen, and J. S. Vicente. 2014. Effect of freezing extender composition and male line on semen traits and reproductive performance in rabbits. *Animal* 8: 765-770.
- Watson, P. F. 1995. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil.* 7: 871-891.

# Effects of different cryoprotectants on semen traits in New Zealand rabbits <sup>(1)</sup>

Pei-Chun Tsai <sup>(2)(5)</sup> Yu-Hsin Chen <sup>(3)</sup> Ting-Chieh Kang <sup>(4)</sup> and Lih-Ren Chen <sup>(2)</sup>

Received: Sep. 14, 2022; Accepted: Mar. 25, 2023

## Abstract

The aim of this study was designed to identify a suitable freezing protocol for rabbit semen by comparing the effects of different operating procedures. In our study, pooled semen was diluted 1:1 or 1:4 (v:v) with a freezing extender composed of Tris-citrate-glucose solution [containing 0.5% BSA (bovine serum albumin) and 0.1 M or 0.058 M sucrose] and 6, 10, or 16% DMSO (Dimethyl sulfoxide), 4% Ficoll70 or 10% LDL (low-density-lipoprotein) after cooling down to 5°C. The semen suspension was then loaded into 0.25 mL plastic straws and equilibrated at 5°C for 45 minutes before freezing in liquid nitrogen vapor (5 cm above the liquid nitrogen surface). The sperm characteristics evaluated after thawing were sperm motility, vitality, and progressive motility. The best results of rabbit sperm freezing could be obtained by using 1:1 (v:v) dilution with the freezing extender consisting of 10% DMSO which contributed to the sperm characteristics after thawing of motility ( $40.19 \pm 7.65\%$ ), vitality ( $31.45 \pm 6.6\%$ ), and progressive motility ( $15.23 \pm 2.77\%$ ).

Key words: Cryoprotectant, Rabbit, Semen cryopreservation.

---

(1) Contribution No. 2742 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Animal Industry Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Hengchun Branch, COA-LRI, Pingtung 94644, Taiwan, R. O. C.

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