

# 山羊冷凍精液稀釋液添加抗氧化劑對精子的 影響<sup>(1)</sup>

章嘉潔<sup>(2)(3)</sup>

收件日期：97年4月28日；接受日期：97年7月21日

## 摘要

本試驗探討添加三種抗氧化劑-維生素E (alpha-tocopherol, Vit E)、丁羟基甲苯 (butylated hydroxytoluene, BHT) 與麩胱甘肽 (glutathione, GSH) 於冷凍稀釋液對山羊冷凍精液解凍後品質的影響。採用 6 頭成熟阿爾拜因公羊，以假陰道法採取新鮮精液，並分別以 Tris-葡萄糖-檸檬酸-蛋黃 (Tris-glucose-citric acid-yolk; TCG) 之精液稀釋液稀釋，稀釋最終濃度為  $5 \times 10^8$  cell/mL。比較 TCG 精液稀釋液添加不同抗氧化劑 (antioxidant)，評估解凍後的精子存活率、精子活力及精子頭帽完整性等項目之差異。試驗結果顯示，在 TCG 稀釋液添加不同抗氧化劑，對於精子活力、存活率及精子頭帽完整性等，在統計上均無顯著差異。

關鍵詞：山羊、冷凍精液、抗氧化劑。

## 緒言

精液冷凍保存利於優良種畜推廣，延長精子的貯存時間，方便運輸，加速畜群育種工作，並能降低疾病傳播之風險等。為研製更為有效的精液冷凍稀釋液配方，充分發揮優良種畜之生產潛力，近年來在家畜精液冷凍保存技術中，應用抗氧化劑以提高冷凍精液品質的研究受到廣泛關注。據研究指出，添加丁羟基甲苯 (butylated hydroxytoluene, BHT) (Hammerstedt *et al.*, 1976, 1978)、維生素 E (alpha-tocopherol, Vit E) (Kasymov and Ahimov, 1975; Beconi *et al.*, 1991; Nishimura and Morii, 1992)、麩胱甘肽 (glutathione, GSH) (Alvarez and Storey, 1989) 等抗氧化劑，可有效改善精液冷凍保存之效果，保護精子頭帽、原生質膜和 DNA 之完整性，提高冷凍-解凍後精子之活力

---

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1468號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所台東種畜繁殖場。

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

及受精能力。關於在精液冷凍保存過程中使用抗氧化劑之作用，主要與精子原生質膜上之多不飽和脂肪酸含量有關。多不飽和脂肪酸在活性氧族 (reactive oxygen species, ROS) 的作用下，易發生脂質之過氧化，而為防止氧化對精子原生質膜造成冷凍損傷，故探討在稀釋液中添加抗氧化劑後再進行冷凍保存。在山羊精液冷凍保存之研究發現使用 Tris-葡萄糖-檸檬酸-蛋黃 (Tris-glucose-citric acid-yolk; TCG) 之精液稀釋液，其效果較使用脫脂乳粉 (Skimmed-milk; SKM) 之稀釋液可改善山羊精子的活力與存活率，因此本試驗以 TCG 稀釋液為基礎，並添加如 BHT, Vit E, GSH 等抗氧化劑，嘗試研發改善山羊精液冷凍保存之稀釋液。本研究將採集所得山羊精液，在冷凍前添加不同抗氧化劑，然後評估在冷凍前與冷凍後對精液品質之影響，以期尋求山羊精液冷凍保存之最佳條件。

## 材料與方法

### I. 精液收集與處理

採用 6 頭年齡約 4 至 5 歲之阿爾拜因 (Alpine) 公羊，以假陰道法採取新鮮精液。採集之精液經鏡檢總存活精子數及活力之後，使用精液洗滌液 (Krebs Ringer Phosphate Glucose Solution) 洗滌離心二次，第一次加入總精液量 10 倍洗滌液混合，以  $500 \times g$  離心 (約 1500 rpm) 10 分鐘後，經去除上層懸浮液後，再以上述同樣方法離心洗滌一次。其後以 TCG (Tris-glucose-citric acid-Yolk) 精液冷凍稀釋液 (成分如表 1) 進行稀釋，而此精液冷凍稀釋液依實驗條件添加不同種類抗氧化劑，並使最終稀釋精液每毫升含有  $5 \times 10^8$  個精子濃度。已稀釋完成之精液先置於  $4^{\circ}\text{C}$  平衡 2 小時，然後再裝填於 0.25 毫升的麥管中並予封口。將已封口之麥管分別放置液態氮液面上層約 16 公分處  $-80^{\circ}\text{C}$ 、2 分鐘，約 4 公分處  $-110^{\circ}\text{C}$ 、3 分鐘，然後再將麥管移入液態氮桶下方，以完成冷凍步驟。

表 1. 山羊精液冷凍稀釋液之組成

Table 1. The composition of semen extenders for goats

Components (100 ml)	TCG *
Egg yolk (%)	2.5
Glucose (g)	0.625
Tris (tris (hydroxymethyl) aminomethane) (g)	3.786
Citric acid monohydrate (g)	2.172
Crystalline penicillin (IU/ml)	50
Streptomycin sulphate (g/ml)	50

\* TCG formula adapted from Evans and Maxwell, 1987.

### II. 實驗設計

比較添加 0.5 mM GSH、0.5 mM BHT 及 1mg/mL Vit E 抗氧化劑於 TCG 精液冷凍稀釋液，在冷凍前、解凍後靜置  $37^{\circ}\text{C}$ ，5 分鐘與 120 分鐘之精液性狀，項目包括：精子存活率、活力、精子頭帽之完整性之評估於解凍後靜置 5 分鐘進行檢查。

### III. 精子存活率與活力之評估

精液解凍時，將麥管自液態氮儲存桶中取出，立即投入 37°C 溫水中解凍 30 秒，並於顯微鏡下評估解凍後精子之存活率與活力，以瞭解個別公羊精子之耐凍性。精子活力之檢測，取新鮮精液一小滴放置於預熱 37°C 之清潔載玻片上，並於 100 倍之顯微鏡下鏡檢精子之泳動波（wave motion），而精子活力等級之判定參考 Ax *et al.* (2000) 之方法，其範圍為 0-5。精子存活率之評估方式，取原精液製成抹片，以 eosin-nigrosin 染劑進行染色，再快速風乾後置於 400 倍顯微鏡下鏡檢，若染成紅色者即代表死精子。每一抹片計算 200 隻精子，並以活精子數除以總精子數，即為精子之存活率。

### IV. 精子頭帽完整性之評估

精子頭帽完整性之評估使用螢光素異硫氰酸鹽結合花生凝集素 Fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) (Sigma Chemical Co., St, Louis, MO)，其步驟依據 Fazeli *et al.* (1997) 之方法稍作修正，即取精液樣品 30  $\mu$ L 塗抹於載玻片上，經空氣乾燥後，以甲醇固定 10 分鐘。取 30  $\mu$ L 含 FITC-PNA 之 PBS 溶液，滴置於載玻片上，再移於可控制濕度之 37°C 培養箱內靜置 30 分鐘後，再以 PBS 沖洗，並經空氣乾燥後使用 5  $\mu$ L 的 Antifade 溶液 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) 封片，此溶液可有效保持螢光效果。精子頭帽完整性評估使用光學螢光顯微鏡 (1000 $\times$ ，油鏡)，激發波長 480 nm、射出波長 530 nm，隨機取數個視野至少計數 100 個細胞，且每一樣品重覆計算六次。在顯微鏡下觀察山羊精細胞頭帽染色，其判讀方式如下：(1)精細胞頭帽顯現完整密集明亮螢光，表示頭帽完整；(2)精細胞頭帽顯現部份螢光，表示頭帽部份受損；(3)精細胞頭帽未顯現螢光，表示頭帽之細胞膜及外頭帽層完全受損。

### V. 統計分析

山羊冷凍精液稀釋液添加不同濃度抗氧化劑之試驗所得資料均以一般線性模式 (General Linear Model Procedure, GLM) 進行分析，並以鄧肯氏新多變域測定法 (Duncan's New Multiple Range Test) 比較山羊精液性狀在各處理間之差異顯著性 (SAS, 2005)。

## 結果與討論

本試驗以 TCG 精液冷凍稀釋液進行稀釋冷凍，稀釋液之成分如表 1。比較分別添加不同種類抗氧化劑，並以未添加者為對照組，經完成冷凍步驟後，檢查冷凍前、解凍後、解凍後 37°C 靜置 5 分鐘及 120 分鐘之精液性狀，項目包括精子存活率及活力。試驗結果如表 2 與表 3 所示，其中解凍後 37°C 靜置 5 分鐘與解凍後 37°C 靜置 120 分鐘二組，在精子活力與存活率方面，在統計上並無顯著差異 ( $P > 0.05$ )。

表 2. 精液稀釋液添加不同抗氧化劑對精子活力冷凍保存之影響

Table 2. Effects of adding different type of antioxidants to semen extender on sperm motility during cryopreservation

Antioxidant	Before freezing	5 min postthawed	120 min postthawed
Control	4.3 $\pm$ 1.55 <sup>#</sup>	4.0 $\pm$ 1.71 <sup>#</sup>	3.1 $\pm$ 2.25 <sup>#</sup>
GSH (0.5 mM)	4.4 $\pm$ 1.38	4.2 $\pm$ 1.55	3.2 $\pm$ 2.08
BHT (0.5 mM)	4.4 $\pm$ 1.78	4.1 $\pm$ 1.83	3.3 $\pm$ 2.70
Vit E (1 mg/mL)	4.3 $\pm$ 1.63	4.1 $\pm$ 1.72	3.3 $\pm$ 2.40

<sup>#</sup> No significant differences between treatments.

GSH=Glutathione; BHT=Butylated hydroxytoluene; Vit E=alpha-tocopherol

表 3. 添加不同抗氧化劑於精液稀釋液於冷凍保存精子存活率之影響

Table 3. Effects of different type of antioxidants added to semen extender on sperm viability during cryopreservation

Antioxidant	Before freezing	5 min postthawed	120 min postthawed
Control	84.7±4.92 <sup>#</sup>	74.2±7.91 <sup>#</sup>	52.7±8.87 <sup>#</sup>
GSH (0.5 mM)	83.8±5.17	73.6±8.42	54.5±9.35
BHT (0.5 mM)	83.8±5.95	72.7±8.74	56.4±8.91
Vit E (1 mg/mL)	82.8±4.87	73.6±7.63	52.7±9.38

<sup>#</sup> No significant differences between treatments.

GSH=Glutathione; BHT=Butylated hydroxytoluene; Vit E=alpha-tocopherol

精子頭帽內含有許多能促進與卵子結合之酵素，而頭帽完整的精子與生育率具有高度的相關性 (Saacke, 1972)；尤其是精液在冷凍-解凍過程中，常會造成相當程度之冷休克損害，故以頭帽完整性做為家畜精液品質之分析項目，以分辨冷凍精液品質良窳 (Quinn and White, 1966; Graham and Pace, 1967; Pursel *et al.*, 1968)。經由顯微鏡觀察，可了解精細胞膜與頭帽在冷凍解凍後之受損情形，其結果如表 4。添加不同抗氧化劑於精液稀釋液對山羊精液冷凍解凍後頭帽完整性之評估，其統計結果並無顯著差異。

表 4. 添加不同抗氧化劑於稀釋液對山羊精液冷凍解凍後頭帽評估

Table 4. Effects of different type of antioxidants added to semen extender on acrosome status of the frozen-thawed goat semen

Antioxidant	Intact acrosome (%)	Partially damaged acrosome (%)	Damaged acrosome (%)
Control	75.7±5.67 <sup>#</sup>	16.1±6.07 <sup>#</sup>	8.2±6.46 <sup>#</sup>
GSH (0.5 mM)	75.5±7.98	17.7±7.94	6.8±7.94
BHT (0.5 mM)	76.9±6.51	17.0±4.68	6.1±9.08
Vit E (1 mg/mL)	76.0±6.63	17.8±5.04	6.2±7.83

<sup>#</sup> No significant differences between treatments.

GSH=Glutathione; BHT=Butylated hydroxytoluene; Vit E=alpha-tocopherol

由於精子之原生質膜內含高量之不飽和脂肪酸，且缺乏抗氧化物質，故易造成脂質過氧化現象，致原生質膜損傷，而影響精子之活力及受精能力 (Alvarez and Storey, 1989; Storey, 1997)。在精液稀釋之過程中為有效減輕氧化作用，必須於厭氧條件下操作，此為技術上較為困難之處 (Milovanov *et al.*, 1976; Shadjullin, 1977; Varnavskij and Varnavskaja, 1978)。因此選擇添加天然及人工合成之抗氧化劑，以阻止活性氧族 (reactive oxygen species, ROS) 之生成，而能有效減輕精子冷凍傷害並具保護作用，如 Vit E (Kasymov and Ahimov, 1975; Beconi *et al.*, 1991; Nishimura and Morii, 1992)、BHT (Hammerstedt *et al.*, 1976, 1978)、GSH (Alvarez and Storey, 1989) 等，而所使用之抗氧化劑其理化性質及功能，以及與 ROS 之交互作用亦不同。

Vit E 可以維持雄性家畜的生殖機能，促進精子之生成與活動，而為細胞膜之保護劑之一，能抗 ROS 及防止脂質過氧化 (Holliwel and Gutteridge, 1989; Surai *et al.*, 1998)，並保護精子避免超氧之毒性造成脂質過氧化之損害 (Aitken and Clarkson, 1988; de Lamirande and Gagnon, 1992)。許多評估 Vit E 對精子保護之效應，通常使用下列兩種添加方式，其中一種為直接添加在家畜之飼料中，如公豬連續 7 週給予 1000 IU/mL 水溶性 Vit E 類似物 (TROLOX)，結果其精子濃度顯著提高 ( $P < 0.05$ ) (Brezezinska-Slebodzinska *et al.*, 1995)。在綿羊之相關研究方面，亦發現 Vit E 有益於精液之生成及代謝 (Dokukin and Alyakae, 1986; Upreti *et al.*, 1997)。另一種方式是將 Vit E 添加於精液稀釋液，其研究結果則分歧，可分為有益 (Aitken *et al.* 1989; Ollero *et al.*, 1996, 1998; Pérez-Pé *et al.*, 2001)、無改善效果 (Srivastava *et al.*, 1987) 或對綿羊精子有輕微保護效果等 (Danov *et al.*, 1983)。Beconi *et al.*, (1993) 將 Vit E 添加於精液冷凍稀釋液中，結果可提高牛隻冷凍精液解凍後之精液品質。另於人卵細胞透明帶結合之試驗中，添加 Vit E 於精液之冷凍稀釋液可有效改善精子之活力並顯著影響精子之存活 (Kessopoulou *et al.*, 1995)。在豬精液稀釋液中添加 Vit E，經冷藏保存 5 日，結果可有效防止精子原生質膜之多不飽和脂肪酸的過氧化，顯著提高精子之活力 (Breininger *et al.*, 2005)。本研究在精液之稀釋液中添加 1mg/mL 之 Vit E，試驗結果在解凍後之精子活力、存活率與精子頭帽完整性之評估等方面，統計上並無顯著差異。本研究所添加之 Vit E 濃度並無不同，唯一差別在使用 Vit E-acetate 類，而有研究建議使用 Vit E-phosphate 類能顯著改善綿羊精子存活，但使用 Vit E-acetate 類則無改善效果 (Pérez-Pé *et al.*, 2001)，所以未來可進一步添加 Vit E-phosphate 類來測試。

BHT 是一種合成的脂溶性酚類食品添加劑，亦為廣泛使用的抗氧化劑，其作用角色類似自由基清除者，而具有穩定細胞膜之磷脂質組成分與降低精細胞膜通透性之功能 (Hammerstedt *et al.*, 1976, 1978)。在精液冷凍保存之研究上，BHT 添加於精液稀釋液已廣泛應用於牛 (Shoae and Zamiri, 2008)、豬 (Bamba and Crank, 1992) 及綿羊 (Watson and Anderson, 1983) 等動物。Bamba and Crank (1992) 添加 2mM 的 BHT 於豬精液之稀釋液中；而 Shoae and Zamiri (2008) 建議於牛精液稀釋液中添加 0.5-1mM 的 BHT，可顯著提高精子之活力及頭帽之完整性，但 4 mM 的 BHT 則會造成精之活力下降及頭帽損傷。另有研究指出，BHT 會抑制精子之活力 (Graham and Hammerstedt, 1992)。在綿羊之試驗中，發現 BHT 只有輕微保護精子之作用 (Marinov *et al.*, 1983; Waston and Anderson, 1983)。Roca *et al.* (2004) 之研究指出，在公豬精液之冷凍稀釋液中添加 0.025-3.2mM BHT 能有效抑制精子原生質膜之過氧化反應，而且在精液解凍後 0.5h 與 2.5h 之檢測結果發現，以 BHT 濃度為 0.2、0.4、0.8 mM 組之精子存活率顯著較高 ( $P < 0.05$ )；而添加 0.4 mM BHT 可使受精卵發育到囊胚的百分率顯著提高 ( $P < 0.05$ )，但受精卵的卵裂率則未受影響 (Roca *et al.*, 2004)。在本研究中，0.5 mM BHT 之添加量係參考 Shoae and Zamiri. (2008) 之報告，試驗結果解凍後精子之活力、存活率與頭帽完整性之評估等方面，在統計上均無顯著差異，在綿羊之試驗中，發現添加 2-4 mM BHT 於精液之稀釋液中，均可有效預防對精子之冷休克及提高精子之頭帽完整性，而對冷凍精液保存後精液品質之提升效果則不顯著 (Marinov *et al.*, 1983; Waston and Anderson, 1983)。khalifa and Saud (2006) 添加 0.6 mM BHT 於山羊之冷凍精液中，結果確能顯著改善精液之品質，因此也許未來可提高 BHT 之濃度再進行測試。

GSH 是由三條肽組組成，其在細胞內之主要作用乃抵抗含氧自由基及 ROS 對細胞之傷害 (Irvine, 1996)。GSH 廣泛存在於各類細胞中，但於不同物種如豬 (Gadea *et al.*, 2004)、牛 (Bilodeau *et al.*, 2000) 及人類之精液中之含量低。另外，在精液冷凍過程中會引起精子之活力降低、脂膜與原生質膜結構之成分改變，而導致 GSH 含量更顯著降低 (Gadea *et al.*, 2004; Stradaioli *et al.*, 2007)，因此在精液中添加 GSH 可減緩自由基對精子之傷害 (Alvarez and Storey, 1989; Munsu *et al.*, 2007)。Gadea *et al.* (2004, 2005) 以 1-5 mM 濃度的 GSH 添加於精液之稀釋液中，

結果可有效提高解凍後之精子的活力與存活率，而其中以添加 1 mM GSH 組對精子的保護效果最好。Slaweta (1987) 添加 5 mM GSH 於牛隻之精液稀釋液中，結果可有效提高夏季牛隻精子之活力。Munsi *et al.* (2007) 發現添加 0.5mM GSH 於牛隻之精液中，可顯著降低精子在冷藏保存之頭帽受損 ( $P < 0.01$ )。本試驗添加相同濃度 GSH 於 TCG 冷凍稀釋液配方中，結果解凍後之精子活力、存活率與頭帽完整性之評估等方面，在統計上均無顯著差異，或許日後可以提高 GSH 濃度再進一步測試。

總之，在山羊精液之冷凍保存技術之改善方面，宜再深入探討添加具有良好抗氧化作用物質的可行性，期能有效解決冷凍精液無法滿足生產需要之難題。

## 誌謝

本試驗承農業委員會科技計畫 93 農科-3.1.3-畜-L17 及 96 農科-1.1.4-畜-L1 (2) 經費補助，使本試驗得以順利進行，並承台東種畜繁殖場陳坤照場長添購儀器設備，試驗期間並承台東種畜繁殖場吳昇陽、陳威成先生及張溪泉主任提供試驗羊隻及協助飼養管理，謹此一併誌謝。

## 參考文獻

- Aitken, R. J. and J. S. Clarkson. 1988. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J. Androl.* 9:367-376.
- Aitken, R. J., J. S. Clarkson and S. Fishel. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol. Reprod.* 40:183-197.
- Alvarez, J. G. and B. T. Storey. 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.* 23:77-90.
- Ax, R. L., M. Dally, B. A. Didion, R. W. Lenz, C. C. love, D. D. Varner, B. Hafez and M. E. Bellin. 2000. Semen evaluation. in: *Reproduction in farm animals*, pp.365-375, eds. Hafez, E. S. E. and B. Hafez. Lippincott Williams & Wilkins, South Carolina, USA.
- Bamba, K. and D. G. Crank. 1992. Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. *J. Reprod. Fertil.* 95:69-77.
- Beconi, M. T., C. R. Francia, N G. Mora and M. A. Affranchino. 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology* 40:841-851.
- Beconi, M. T., M. A. Affranchino, L. M. Schang and N. B. Beorlegui. 1991. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. *Biochem. Int.* 23:545-553.
- Bilodeau, J. F., S. Chatterjee, M. A. Sirard and C. Gagnon. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 55:282-288.
- Breining, E., N. B. Berlegui and C. M. Oflaherty. 2005. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenolgy* 63:2126-2135.
- Brezenska-Slebodzinska, E., A. B. Slebodzinski and B. Pietras. 1995. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol. Trace. Elem. Res.* 47:69-74.
- Danov, D. T., K. D. Kovachev and D. V. Popov. 1983. Changes in the ultrastructure of ram spermatozoa due to freezing. I. The effect of the Triladil and Saccharine-based semen diluents (in Bulgarian). In: *Cryobiology of reproductive cells*. Bulgarian Academy of Science, Sofia, pp.155-173.

- de Lamirande, E. and C. Gagnon. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J. Androl.* 13:368-78.
- Dokukin, A. P. and A. M. Iyakaev. 1986. Vitamin E in rations for rams. *Ovtsevodstvo* 2:37-39.
- Evans, G. and W. M. C. Maxwell. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths, Sydney. p.127.
- Fazeli, A., W. J. Hage, F. P. Cheng, W. F. Voorhout, A. Marks, M. M. Bevers and B. Colenbrander. 1997. Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biol. Reprod.* 56:430-438.
- Gadea, J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology* 63:431-444.
- Gadea, J., E. Sellés, M. A. Marco, P. Coy, C. Matás, R. Raomar and S. Ruiz. 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 62:690-701.
- Graham, J. K. and R. H. D. Hammerstedt. 1992. Differential effects of butylated hydroxytoluene analogs on bull sperm subjected to cold-induced membrane stress. *Cryobiology* 29:106-117.
- Graham, E. F. and M. M. Pace. 1967. Some biochemical changes in spermatozoa due to freezing. *Cryobiology* 4:75-84.
- Hammerstedt, R. H., R. P. Amann, T. Rucinsky, D. P. Morse, J. Lepock, W. Snipes and A. D. Keith. 1976. Use of spin labels and electron spin resonance spectroscopy to characterize membranes of bovine sperm: effect of butylated hydroxytoluene and cold shock. *Biol. Reprod.* 14:381-397.
- Hammerstedt, R. H., A. D. Keith, W. Snipes, R. P. Amann, D. Arruda and L. Griel. 1978. Use of spin labels to evaluate effects of cold shock and osmolarity on sperm. *Biol. Reprod.* 18:686-696.
- Holliswell, B. and J. M. C. Gutteridge. 1989. Free radicals in biology and medicine (2<sup>nd</sup> edition). Oxford, Clarendon Press.
- Irvine, D. S. 1996. Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev. Reprod.* 1:6-12.
- Kasymov, K. T. and Z. B. Ahimov. 1975. Fertilizing capacity of deep-frozen ram spermatozoa (in Russian). *Ovtsevodstvo* 8:9-11.
- Kessopoulou, E., H. J. Powers, K. K. Sharma, M. J. Pearson, J. M. Reusell, I. D. Cooke and C. L. R. Barratt. 1995. A double blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertil. Steril.* 64:825-831.
- Khalifa, T. A. A. and B. E. El-Saidy 2006. Pellet-freezing of Damascus goat semen in a chemically defined extender. *Anim. Reprod. Sci.* 93:303-315.
- Marinov, P. I., P. A. Korvalan and S. T. Zlatarev. 1983. Effect of freezing regime on viability of ram spermatozoa (in Bulgarian). In: *Cryobiology of reproductive cells*. Bulgarian Academy of Science, Sofia. pp.128-138.
- Milovanov, V. K., A. N. Varnavskij and V. A. Varnavskaja. 1976. Method of deep freezing of ram semen for long-term storage (in Russian). *Zhivotnovodstvo* 8:57-65.
- Munsi, M. N., M. M. Bhuiyan, S. Majumder and M. G. Alam. 2007. Effects of exogenous glutathione on the quality of chilled bull semen. *Reprod. Domest. Anim.* 42:358-362.
- Nishimura, K. and H. Morii. 1992. Effect of alpha-tocopherol treatment on activity of frozen thawed boar spermatozoa. *J. Reprod. Dev.* 38:55-59.
- Ollero, M., R. Pérez-Pé, T. Muiño-Blanco and J. A. Cebrián-Pérez. 1998. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis.

- Cryobiology 37:1-12.
- Ollero, M., T. Blanco, M. J. López-Pérez and J. A. Cebrian Pérez. 1996. Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in an aqueous two-phase system. Effect of different cryoprotectants. *J. Chrom.* 680:157-164.
- Pérez-Pé, R., J. A. Cebrián-Pérez and T. Muño-Blanco. 2001. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology* 56:425-434.
- Pursel, V. G., I. A. Johnson and P. J. Gerrits. 1968. Glutamic oxaloacetic transaminase and lactic dehydrogenase activities of boar spermatozoa and seminal plasma. *J. Reprod. Fertil.* 18:176-177.
- Quinn, P. G. and I. G. White. 1966. The effect of cold shock and deep-freezing in the concentration of major cations in spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 12:263-270.
- Roca, J., M. A. Gil and M. Hernandez. 2004. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J. Androl.* 25:397-405.
- Saacke, R. G. 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. *NAAB Proc. 4 th Tech. Conf. Anim. Reprod. Artif. Insem.* 17.
- SAS<sup>®</sup>, 2005. User's Guide: Statistics, Version 9.1 Edition. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Shajdullin, I. N. 1977. Artificial insemination of ewes with deep-frozen semen (in Russian). *Zivotnovodstvo* 8:58-61.
- Shoae, A. and M. J. Zamiri. 2008. Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. *Anim. Reprod. Sci.* 104:414-418.
- Slaweta, R. 1987. Respiration of bull spermatozoa in presence of exogenous glutathione (GSH). *Acta. Physiol. Pol.* 38:31-35.
- Srivastava, R. S., A. K. Mathur and D. B. Kalra. 1987. Effect of alpha-tocopherol on preservability of ram semen. *Indian. J. Anim. Sci.* 57:553-554.
- Storey, B. T. 1997. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 3:203-213.
- Stradioli, G., T. Noro, L. Sylla and M. Monaci. 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology* 67:1249-1255.
- Surai, P., I. Kostjuk, G. Wishart, A. Macpherson, B. Speake and R. Noble. 1998. Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testis, and liver. *Biol. Trace Res.* 64:119-132.
- Upreti, G. C., K. Jensen, J. E. Oliver, D. M. Duganzich, R. Munday and J. F. Smith. 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically defined diluent containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.* 48:269-278.
- Varnavskij, A. N. and V. A. Varnavskaja. 1978. Formulation of a protectant for deep freezing of ram semen (in Russian). *Zhivotnovodstvo* 9:65-67.
- Watson, P. F. and W. J. Anderson. 1983. Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *J. Reprod. Fertil.* 69:229-235.

# Effect of the antioxidants on caprine spermatozoa frozen in semen extender<sup>(1)</sup>

Chia-Chieh Chang<sup>(2)(3)</sup>

Received : Apr. 28, 2008 ; Accepted : Jul. 21, 2008

## Abstract

This experiment was conducted to investigate the effects of three antioxidants-vitamins E (Vit E), butylated hydroxytoluene (BHT) and glutathione (GSH). The antioxidants were added to frozen semen extender of frozen- thawed semen in goats. Semen collected from six Alpine bucks by using an artificial vagina were diluted with Tris-glucose-citric acid-yolk (TCG) extender, which was brought to  $5 \times 10^8$  cell/mL in the final concentration. The effects of addition of antioxidants to TCG extenders were evaluated. The percentage of live sperm, motility and the acrosomal integrity of spermatozoa were recorded. It showed that no additional effect was found following addition of different antioxidants into TCG extender. In conclusion, goat sperm quality was not significantly improved when they were frozen in a semen extender containing antioxidant.

Key words : Goat, Frozen Semen, Antioxidant.

---

(1) Contribution No.1468 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Taitung Animal Propagation Station COA-LRI, Taitung, 954, Taiwan, R.O.C.

(3) Corresponding author, E-mail: janices@mail.tlri.gov.tw.

