

## 超低温冷冻对脊尾白虾精子几种酶活性的影响

浦蕴惠<sup>1,2</sup>, 许星鸿<sup>1</sup>, 高 焕<sup>1</sup>, 刘兆普<sup>2</sup>, 阎斌伦<sup>1\*</sup>

(1. 淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏省海洋生物学重点实验室, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 研究了超低温冷冻保存(-196 °C)对脊尾白虾精子内琥珀酸脱氢酶(SDH)、乳酸脱氢酶(LDH)、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽还原酶(GR)与顶体酶活性的影响, 以期为提高脊尾白虾精子超低温冷冻效果提供理论依据。设置对照组(未添加抗冻剂)、3 个实验组[分别添加 DMSO(V/V) 10.0%、12.5%、15.0%], 于冷冻 0、1、3、5、7、15 d 取样测定各酶活性。结果表明, 经冷冻后, 除 GR 外, 其他所测酶活性均出现显著下降( $P < 0.05$ ), 且以对照组酶活性下降幅度最大。GR 活性在冷冻 7 d 内显著升高, 且对照组明显高于实验组( $P < 0.05$ ), 在冷冻 15 d 时又出现下降。添加 15.0% DMSO 组所测酶活性均高于同期其它各组, 表明 15.0% DMSO 对精子内酶的保护作用较好。冷冻 15 d 后 15.0% DMSO 组的 SDH、LDH 和 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶活性由(28.500 ± 1.453) U/mL、(1290.836 ± 27.603) U/L 和(2.605 ± 0.232) μmol/(mg·h) 分别降至(15.300 ± 0.950) U/mL、(363.713 ± 13.943) U/L 和(0.542 ± 0.186) μmol/(mg·h); SOD 和 CAT 活性由(106.497 ± 7.217) U/mL、(383.632 ± 4.731) U/g 分别降至(17.036 ± 0.321) U/mL、(166.940 ± 1.910) U/g; 顶体酶活性从(3.521 ± 0.010) μIU/10<sup>6</sup> 降至(1.212 ± 0.043) μIU/10<sup>6</sup>; 而 GR 活性由(217.042 ± 6.962) U/L 上升至(302.787 ± 24.558) U/L。从冷冻后各酶下降幅度来看, 超低温冷冻对 SOD 活性的影响最大, 其次是 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶。

**关键词:** 脊尾白虾; 精子; 超低温冷冻; 酶活性

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)又名白虾、迎春虾, 隶属甲壳动物亚门(Crustacea)、十足目(Decapoda)、长臂虾科(Palaemonidae), 为热温带海区底栖虾类, 黄海和渤海产量较多, 其产量仅次于中国毛虾(*Acetes chinensis*)和中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)。近年来, 随着中国明对虾、日本囊对虾(*Penaeus japonicus*)等传统虾类养殖难度的加大, 脊尾白虾养殖面积迅速扩大, 成为池塘单养或与其它种类混养和虾池秋冬季养殖的重要品种。但是由于脊尾白虾个体相对较小, 相对抱卵量少, 养

殖者主要依靠自然纳苗、捕捞天然苗或投放亲虾自行繁殖苗种等, 人工养殖规模受到严重制约。目前在脊尾白虾的行为、营养、生长及育苗生产技术等方面都已有研究<sup>[1]</sup>, 但迄今未见有关脊尾白虾精子超低温冷冻方面的报道。超低温冷冻技术是长期冷冻种质资源的有效方法, 对人工繁殖、种质优选、雌核发育、建立优良种质库有重要意义<sup>[2]</sup>。本实验通过测定超低温冷冻前后脊尾白虾精子内几种酶活性的变化, 探讨了超低温冷冻对精子酶活性的影响规律, 以期为提高脊尾白虾精子超低温冷冻效果提供理

收稿日期:2012-02-22 修回日期:2012-10-22

资助项目:“十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD13B03);国家自然科学基金项目(31072213);江苏省水产三项工程项目(P2009-18)

通信作者:阎斌伦, E-mail: yanbinlun@yahoo.com.cn

论指导,并为脊尾白虾人工繁殖的深入研究打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品制备

脊尾白虾于2012年3月购于连云港市农贸市场,挑选雄性个体,体长 $(4.93 \pm 0.62)$  cm,体质量 $(2.16 \pm 0.58)$  g,约100尾。解剖后,取精巢于研钵,加入少量无钙离子人工海水<sup>[3]</sup> (NaCl 21.63 g, NaOH 0.19 g, KCl 1.12 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 4.93 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.53 g,加蒸馏水定容至1 000 mL),研磨后,用200目筛绢网过滤去除组织碎片,制作精子涂片,2% 薯红 B 染色液染色4 min,镜检精子活力,选取活力在90%以上的精子作为实验材料,1 000 r/min离心5 min,取得白色精子沉淀,4℃保存备用。

### 1.2 精子的冻存与复苏

取精子沉淀用任氏液<sup>[4]</sup> (NaCl 7.8 g, KCl 0.2 g, CaCl<sub>2</sub> 0.21 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.021 g,加蒸馏水定容至1 000 mL)制备成10<sup>6</sup>/mL的精子悬浮液。选取二甲基亚砷(DMSO)作为抗冻剂,实验组DMSO浓度梯度设置为10.0%、12.5%、15.0%体积分数(V/V),对照组不加抗冻剂。加入DMSO后,于4℃降温平衡30 min,将样品投入液氮(-196℃)中冷冻。分别于0、1、3、5、7、15 d,取出样品迅速放入40℃水浴中解冻。

### 1.3 酶活性检测方法

琥珀酸脱氢酶(SDH)、乳酸脱氢酶(LDH)、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP酶、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)与谷胱甘肽还原酶(GR)的测定方法参考南京生物工程研究所的试剂盒说明书进行。SDH采用比色法,酶活力单位定义为每毫克蛋白每分钟使反应体系的吸光度降低0.01为1个比活性单位(U)。LDH采用比色法,酶活力单位定义为1 000 mL血清37℃与基质作用15 min,在反应体系中产生1 μmol丙酮酸为1单位(U)。Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP酶采用比色法,酶活力单位定义为每小时每毫克样品中分解ATP产生1 μmol无机磷的量为一个ATP酶活力单位(U)。SOD采用黄嘌呤氧化酶法,酶活力单位定义为每毫升反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD量为一个SOD活力单位(U)。CAT采用紫

外分光法,活力单位定义为每克组织蛋白中过氧化氢酶每秒钟分解吸光度0.50~0.55的底物中的过氧化氢相对量为一个过氧化氢酶的活力单位。GR采用比色法,活力单位定义为每升样品中每分钟使反应体系中底物NADPH的浓度改变1 mmol/L所需的酶量为一个酶活力单位(U)。本实验精子顶体酶活力的测定参考Kennedy等<sup>[5]</sup>的方法,进行适当调整,用25℃降解1 μmol BAPNA/min来表示。

### 1.4 数据处理

每组实验设置3个重复,采用过SPSS 16.0进行双因素方差分析(Two-Way ANOVA)以检验精子冷冻前后各酶活性差异的显著性,差异显著水平为 $P < 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 超低温冷冻对SDH、LDH和Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP酶活性的影响

超低温冷冻1 d后,除15.0% DMSO组外,其他各组SDH活性均显著降低( $P < 0.05$ ),且各组间差异显著,以对照组SDH活性下降幅度最大(图1)。冷冻15 d后,15.0% DMSO组精子SDH活性降至 $(15.300 \pm 0.950)$  U/mL,显著高于其他各组,表明15.0% DMSO对脊尾白虾精子内SDH活性的保护作用显著( $P < 0.05$ )。

超低温冷冻对精子LDH活性的影响见图2。冷冻后脊尾白虾精子内LDH活性显著降低( $P < 0.05$ ),且随着冷冻时间延长,LDH活性呈下降趋势。脊尾白虾鲜精中LDH活性为 $(1 290.836 \pm 27.603)$  U/L,冷冻7 d后,各组LDH活性均降至鲜精活性的50%以下。15 d后15.0% DMSO组LDH活性显著高于其它三组,即15.0% DMSO对脊尾白虾精子内LDH活性的保护作用显著( $P < 0.05$ )。

随着冷冻时间延长,白虾精子中Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP酶活性逐渐降低(图3)。脊尾白虾鲜精中Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP酶活性为 $(2.605 \pm 0.232)$  μmol/(mg · h),冷冻3 d后,除15.0% DMSO组外其他各组均降至鲜精活性的50%以下。冷冻15 d后,15.0% DMSO组Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP酶活性降至 $(0.542 \pm 0.186)$  μmol/(mg · h),对照组Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP酶活性最低,各组降幅均较大。

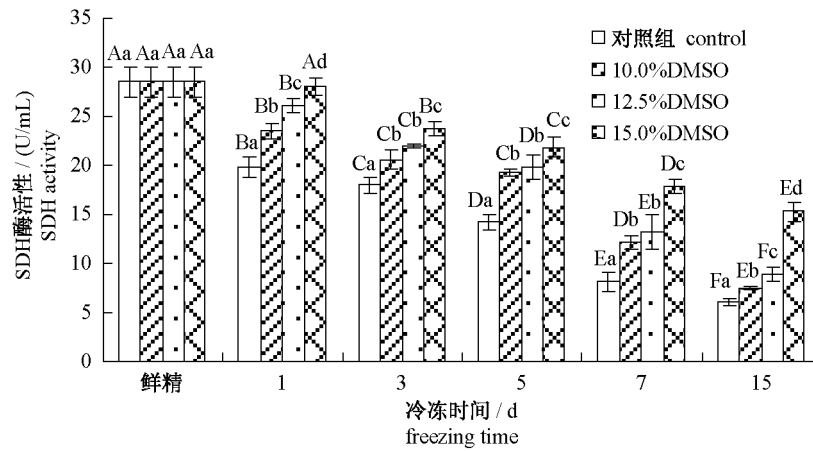


图 1 超低温冷冻对精子 SDH 活性的影响

同一时间点,所标小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ ),不同时间点,大写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ ),下图同。

Fig. 1 Effects of cryopreservation on the SDH activities

The same time spot, the different small letters on the straight column showed significant difference ( $P < 0.05$ ). the different time spots, capital letters showed significant difference ( $P < 0.05$ ). The same as the following.

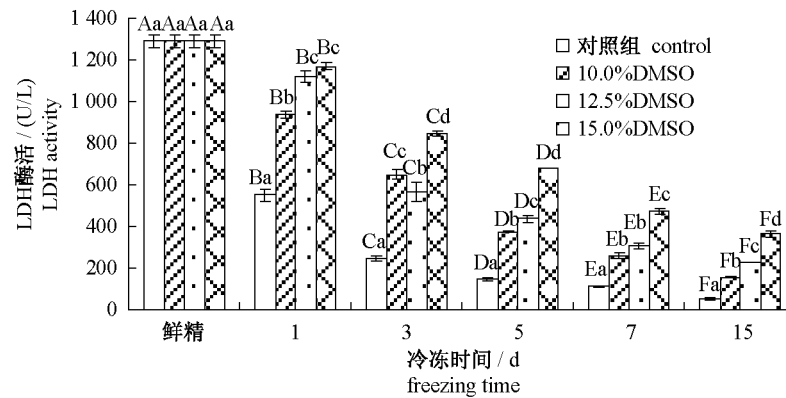
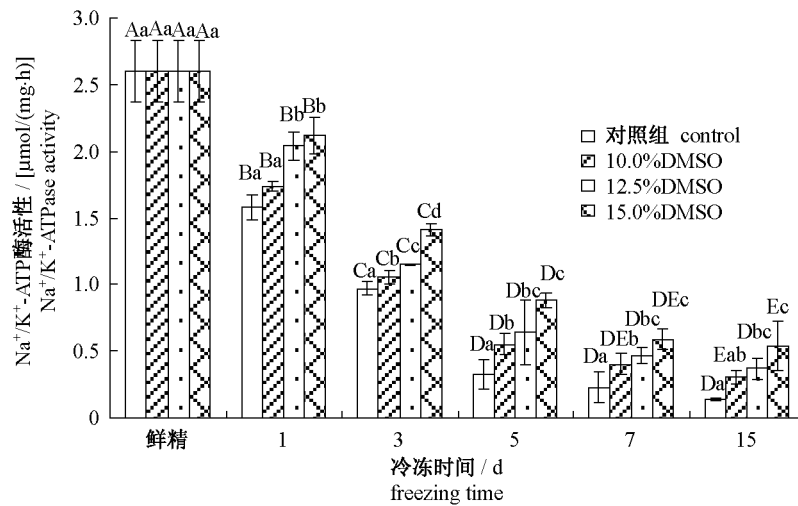


图 2 超低温冷冻对精子 LDH 活性的影响

Fig. 2 Effects of cryopreservation on the LDH activities

图 3 超低温冷冻对精子 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶活性的影响Fig. 3 Effects of cryopreservation on the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activities

## 2.2 超低温冷冻对 SOD、CAT 和 GR 活性的影响

超低温冷冻前后脊尾白虾精子内 SOD 活性有显著差异 ( $P < 0.05$ )。鲜精中 SOD 活性为  $(106.497 \pm 7.217)$  U/mL, 冷冻 15 d 后, 15.0% DMSO 组 SOD 活性最高, 为  $(17.036 \pm 0.321)$  U/

mL, 各组 SOD 活性较鲜精均大幅下降, 对照组降幅最大, 降至  $(7.393 \pm 0.557)$  U/mL (图 4)。结果表明, 15.0% DMSO 对脊尾白虾精子内 SDH 活性的保护作用显著 ( $P < 0.05$ ) 优于其它两种浓度, 且冷冻时间对精子中 SOD 活性的影响差异显著 ( $P < 0.05$ )。

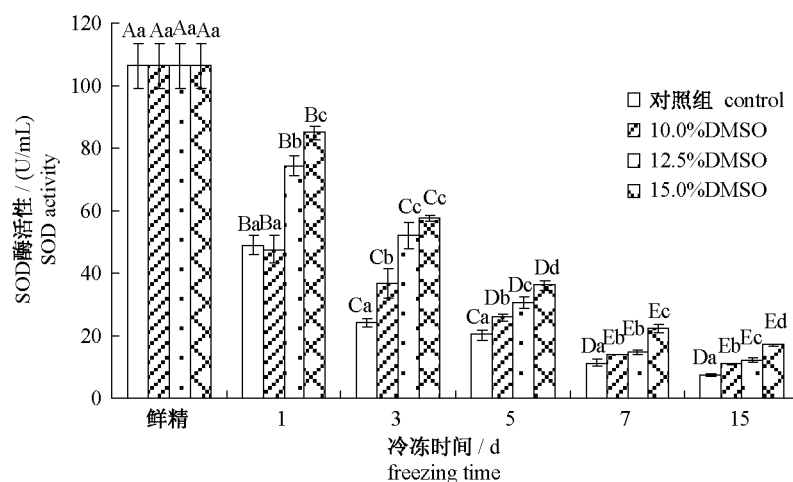


图 4 超低温冷冻对精子 SOD 活性的影响

Fig. 4 Effects of cryopreservation on the SOD activities

超低温冷冻后各组脊尾白虾精子的 CAT 活性显著降低 ( $P < 0.05$ ) (图 5)。冷冻 15 d 后, 15.0% DMSO 组 CAT 活性显著高于其他各组, 活性为  $(166.940 \pm 1.910)$  U/g, 对照组活性最低, 且

降幅最大。方差分析表明, 15.0% DMSO 对脊尾白虾精子内 CAT 活性的保护作用显著优于其它两种浓度 ( $P < 0.05$ )。

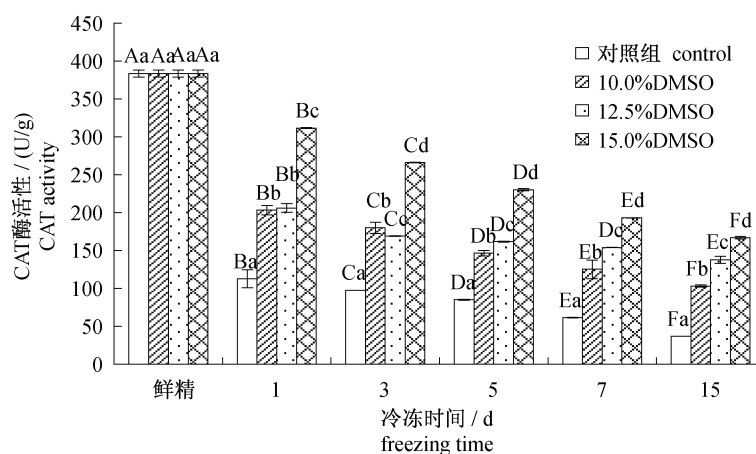


图 5 超低温冷冻对精子 CAT 活性的影响

Fig. 5 Effects of cryopreservation on the CAT activities

7 d 内, 随着冷冻时间延长, 各组 GR 活性呈升高趋势, 且对照组显著高于各实验组 ( $P < 0.05$ ), 但 15 d 后各组活力又有所下降。冷冻 15 d 后,

15.0% DMSO 组 GR 活性显著高于其它组 ( $P < 0.05$ ) (图 6)。方差分析表明, 超低温冷冻对脊尾白虾精子中 GR 活性有显著影响 ( $P < 0.05$ )。

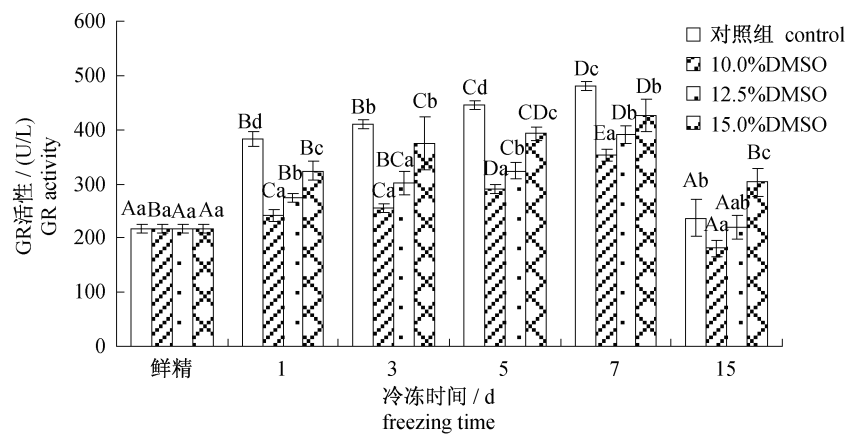


图 6 超低温冷冻对精子 GR 活性的影响

Fig. 6 Effects of cryopreservation on the GR activities

### 2.3 超低温冷冻对顶体酶活性的影响

脊尾白虾精子中顶体酶活性随着冷冻时间延长,活性显著降低( $P < 0.05$ ) (图 7)。白虾鲜精中顶体酶活性为 $(3.521 \pm 0.010) \mu\text{IU}/10^6$ ,冷冻 5 d 后,15.0% DMSO 组精子顶体酶活性降至

$(1.891 \pm 0.183) \mu\text{IU}/10^6$ ,均高于其它组。冷冻 15 d 后,15.0% DMSO 组顶体酶活性为 $(1.212 \pm 0.043) \mu\text{IU}/10^6$ ,而对照组顶体酶活性最低,表明 15.0% DMSO 对脊尾白虾精子顶体酶活性的保护作用显著优于其它两种浓度( $P < 0.05$ )。

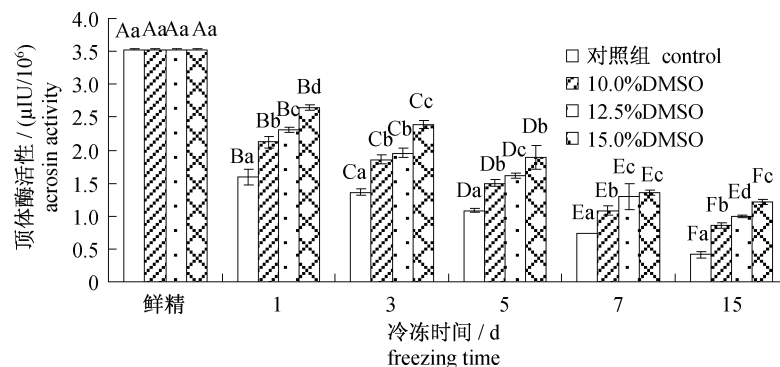


图 7 超低温冷冻对精子顶体酶活性的影响

Fig. 7 Effects of cryopreservation on the acrosin activities

## 3 讨论

### 3.1 超低温冷冻对脊尾白虾精子能量代谢酶活性的影响

LDH 是体内能量代谢过程中的一个重要酶,通过呼吸作用给精子提供能量<sup>[6-8]</sup>。由于 LDH 与精子存活的供能过程有密切关系<sup>[9-10]</sup>,该酶的活性是衡量精液质量的一个生化指标<sup>[11]</sup>。SDH 是线粒体的一种标志酶,是连接氧化磷酸化与电子传递的枢纽之一,可为真核细胞线粒体和多种原核细胞需氧和产能的呼吸链提供电子,因此 SDH 活性在一定程度上反映了精子线粒体的功

能。本实验中脊尾白虾精子在超低温冷冻后 SDH 和 LDH 活性显著降低,与黄晓荣等<sup>[12-13]</sup>对日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 和长鳍篮子鱼 (*Siganus canaliculatus*) 精子研究结果一致。Babiak 等<sup>[14]</sup>也发现,超低温冷冻后虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 精子中 LDH 的活性显著下降。

在人类中,精子 ATP 酶的活性水平是反映其受精能力的最好标志<sup>[7]</sup>,因此该指标也常用水生生物的同类研究中。闫秀明等<sup>[15]</sup>研究发现黄鳝 (*Monopteri albi*) 精子经超低温冷冻保存后,ATP 酶活性显著下降。 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶是 ATP

酶的一种,参与能量代谢、物质运输、氧化磷酸化的重要生化过程。本研究中脊尾白虾精子经超低温冷冻后, $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP酶活性也显著下降。这可能是超低温冷冻对白虾精子内 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP酶造成了损伤,使其活性显著降低,但具体损伤机理还有待进一步研究。

### 3.2 超低温冷冻对脊尾白虾精子抗氧化酶活性的影响

需氧生物在氧化还原循环中会产生大量的活性氧,如果不能被及时清除,它们将会攻击各种生物大分子,引起一系列氧化损伤,进而引起生物体各种生理病变<sup>[16]</sup>。生物体在长期的进化过程中,形成了一套完整的保护体系—抗氧化系统来清除体内多余的活性氧<sup>[17]</sup>。SOD和CAT是生物体内主要的酶类抗氧化剂,能维持细胞和机体的正常生理活动<sup>[18]</sup>。抗氧化酶活性的变化在一定程度上能反映生物体或细胞在不同环境条件下的生理状况,可作为衡量其是否受到外界环境胁迫或损伤的一个重要生理指标<sup>[13,16]</sup>。Marta等<sup>[19]</sup>研究表明,随着低温保存时间延长,马精子中SOD酶和CAT酶的活性均明显下降。章龙珍等<sup>[20]</sup>研究也表明,经过超低温冷冻后,俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedti*)精子内CAT活性显著下降。Sreejith等<sup>[21]</sup>报道,经过冷冻保存后牛精子内SOD酶活性明显下降,同时精浆中酶的活性上升。本研究中白虾精子经超低温冷冻后,SOD和CAT活性也显著降低,这意味着冷冻也将损害精子细胞内的抗氧化系统,由此积累的活性氧自由基分子必将进一步对精子本身造成伤害。

GR是一种将氧化型谷胱甘肽(GSSG)还原成为硫醇型谷胱甘肽的酶,而谷胱甘肽是一种重要的细胞抗氧化剂<sup>[22-23]</sup>,可维持细胞膜的完整性。此外,GR在缓解因冷胁迫所产生的活性氧危害也具有重要的功能。研究发现有些植物在冷强化时GR活力增加,这些植物抗冷基因型具有较高的GR活性,能保护低温下蛋白的巯基免受破坏,减少蛋白分子内二硫键的形成<sup>[24]</sup>。黄晓荣等<sup>[12]</sup>研究表明,经过超低温保存后日本鳗鲡精子和长鳍篮子鱼精子内GR活性均显著上升。这与本研究结果相似,本研究中GR随着冻存时间延长,也逐渐上升,但又有所下降,GR活性的降低有可能是长时间的超低温环境导致精子细胞结构损伤,抗氧化能力的下降所致。有关超低温冷冻

引起GR变化的原因有待进一步研究。

### 3.3 超低温冷冻对脊尾白虾顶体酶活性的影响

精子顶体酶是精子顶体部特有的胰蛋白酶,在顶体反应、精子和卵子透明带的结合及穿透中起重要作用。一般顶体酶是以未激活的原顶体酶前体形式存在,在顶体反应时通过特定的蛋白水解作用而激活,释放顶体酶原<sup>[25]</sup>。刘鹏<sup>[26]</sup>研究表明,经过超低温冷冻反应后,西伯利亚鲟(*Siberian sturgeon*)冻后精子表现为精子顶体膜损伤。林金杏等<sup>[27]</sup>研究发现经超低温冷冻保存后野牦牛(*Bos mutus*)精子内顶体酶活力显著下降,与本研究结果一致。本研究中脊尾白虾精子的顶体酶经过超低温保存后,活性显著下降( $P < 0.05$ ),推测可能低温使精子的顶体酶的结构受到一定的损伤,致使酶活性下降。许多研究表明,顶体酶活性高低与精子的质量成正相关,直接影响着受精结果<sup>[28-29]</sup>,因而可以通过精子顶体酶活性测定评价精子的质量。

### 3.4 超低温冷冻保存对脊尾白虾精子的损伤

低温保存种质细胞常常会导致一些细胞失去活力、细胞结构(特别是膜系统)不完整甚至破裂,导致胞内酶系统功能失调。关于冷冻损伤的形成有几种假说:机械损伤学说、盐至变性学说、细胞容积学说、重结晶学说等<sup>[30]</sup>。超低温冷冻保存时,在温度下降至 $-15 \sim -50 \text{ }^\circ\text{C}$ 时,细胞中形成的冰晶会造成致命的损伤,加入抗冻剂能减少冰晶的形成,从而维持细胞冻存后的活力<sup>[31]</sup>。陈松林等<sup>[32]</sup>研究发现DMSO是通过渗入到细胞内、提高胞内渗透压而起到抗冻保护作用。本实验中15.0% DMSO较其它两种浓度对精子中各种酶的保护作用最好,可能是由于15.0%的浓度能使精子达到一个适宜的渗透压,从而起到了保护作用。本研究结果显示,经过超低温保存后,脊尾白虾精子内除GR显著升高外,其余6种酶的活性显著下降,表明超低温冷冻保存对精子造成了冷冻损伤,但具体的冷冻损伤机理尚有待于进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 沈辉, 万夕和, 许璞, 等. 脊尾白虾的行为学观察研究[J]. 海洋科学, 2010, 34(10): 53-56.
- [2] 陈松林. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望[J]. 水产学报, 2002, 26(2): 161-168.
- [3] Tereza G C V, Halccrow K. Influence of some

- external factors on the acrosome reaction in the spermatozoa of *Homarus americanus* mine edwards1837 [ J ]. Journal of Crustacean Biology, 1988,8(3) :317 - 321.
- [ 4 ] Chen S L, Ji X S, Yu G C, *et al.* Cryopreservation of spermatozoa from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization [ J ]. Aquaculture, 2004,236(1 - 4) :547 - 556.
- [ 5 ] Kennedy W P, Kaminski J M, Van der Ven H H, *et al.* A simple, clinical assay to evaluate the acrosine activity of human spermatozoa [ J ]. Journal of Andrology, 1989,10(3) :221 - 231.
- [ 6 ] Afromeev V I, Tkachenko V N. Change in the percent of lactate dehydrogenase isoenzyme level in testes of animals exposed to superhigh frequency radiation [ J ]. Biofizika, 1999,44(5) :931 - 932.
- [ 7 ] Comhaire F H, Vermeulen L, Schoonjans F. Reassessment of the accuracy of traditional sperm characteristics and adenosine triphosphate (ATP) in estimating the fertilizing potential of human semen *in vivo* [ J ]. International Journal of Andrology, 1987,10(5) :653 - 662.
- [ 8 ] Comhaire F H, Vermeulen L, Ghedira K, *et al.* Adenosine triphosphate in human semen; a quantitative estimate of fertilizing potential [ J ]. Fertility and Sterility, 1983,40(4) :500 - 504.
- [ 9 ] Storey B T, Kayne F J. Energy metabolism of spermatozoa. VI. Direct intramitochondrial lactate oxidation by rabbit sperm mitochondria [ J ]. Biology of Reproduction, 1977,16(4) :549 - 556.
- [ 10 ] Gerez de Burgos N M, Burgos C, Coronel C E, *et al.* Correlation of lactate dehydrogenase isoenzyme C4 activity with the count and motility of spermatozoa [ J ]. Journal of Reproduction and Fertility, 1979,55(1) :107 - 111.
- [ 11 ] 陈田飞, 吴大洋, 李春峰. 冷冻保存对家蚕精液乳酸脱氢酶活性的影响 [ J ]. 西南农业大学学报:自然科学版, 2004,26(6) :764 - 768.
- [ 12 ] 黄晓荣, 章龙珍, 庄平, 等. 超低温冷冻对日本鳗鲡精子酶活性的影响 [ J ]. 海洋渔业, 2008,30(4) :297 - 302.
- [ 13 ] 黄晓荣, 章龙珍, 庄平, 等. 超低温冷冻对长鳍篮子鱼精子中几种酶活性的影响 [ J ]. 海洋科学, 2009,33(7) :16 - 22.
- [ 14 ] Babiak I, Glogowski J, Goryczko K, *et al.* Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow spermatozoa [ J ]. Theriogenology, 2001,56(1) :177 - 192.
- [ 15 ] 闫秀明, 张小雪. 超低温冷冻对黄鳝精子中几种酶活性的影响 [ J ]. 水生生物学报, 2011,35(5) :882 - 886.
- [ 16 ] Jin L H, Bahn J H, Eum W S, *et al.* Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 tat protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells [ J ]. Free Radical Biology & Medicine, 2001,31(11) :1509 - 1519.
- [ 17 ] 张克烽, 张子平, 陈芸, 等. 动物抗氧化系统中主要抗氧化酶基因的研究进展 [ J ]. 动物学杂志, 2007,42(2) :153 - 160.
- [ 18 ] 唐学玺, 张培玉. 葱对黑鲟超氧化物歧化酶活性的影响 [ J ]. 水产学报, 2000,24(3) :217 - 220.
- [ 19 ] Marta K, Gabriela K, Jorg A, *et al.* Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C [ J ]. Theriogenology, 2005,63(5) :1354 - 65.
- [ 20 ] 黄晓荣, 章龙珍, 庄平, 等. 超低温冷冻对俄罗斯鲟精子抗氧化酶活性的影响 [ J ]. 大连水产学院学报, 2009,24(6) :504 - 508.
- [ 21 ] Sreejith J, Nair A S, Brat C S, *et al.* A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature [ J ]. Animal Reproduction Science, 2006,96(1 - 2) :21 - 29.
- [ 22 ] Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification [ J ]. Journal of Biological Chemistry, 1988,263(33) :17205 - 17208.
- [ 23 ] Mannervik B. The enzymes of glutathione metabolism; an overview [ J ]. Biochemical Society Transactions, 1987,15(4) :717 - 718.
- [ 24 ] Leipner J, Fracheboud Y, Stamp P, *et al.* Effect of growing season on the photosynthetic apparatus and leaf antioxidant defenses in two maize genotypes of different chilling tolerance [ J ]. Environmental and Experimental Botany, 1999,42(2) :129 - 139.
- [ 25 ] Baba T, Kashiwabara S, Watanabe K, *et al.* Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure [ J ]. Journal of Biochemical, 1989,264(20) :11920 - 11927.
- [ 26 ] 刘鹏. 人工养殖西伯利亚鲟精子超低温冷冻保存研究及冷冻损伤观察 [ D ]. 上海:上海海洋大学, 2007.
- [ 27 ] 林金杏, 阎萍, 郭宪, 等. 冷冻保存对野牦牛精子酶

- 活性的影响[J]. 中国草食动物, 2007, 27(2): 10-12.
- [28] 王成忠, 肖春花, 许宗革, 等. 人精子顶体酶活性及影响因素分析[J]. 白求恩医科大学学报, 1999, 22(6): 583-585.
- [29] 高晓勤, 许爱萍, 张祥令, 等. 217例男性不育症精子顶体酶检测与分析[J]. 生殖医学杂志, 2003, 12(4): 202-205.
- [30] 李纯. 海洋经济动物精子超低温保存的研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2000.
- [31] 汪小锋, 樊廷俊. 鱼类精子冷冻保存的研究进展[J]. 海洋科学, 2003, 27(7): 28-31.
- [32] 陈松林, 章龙珍, 郭锋. 抗冻剂二甲亚砜对家鱼精子生理特性影响的初步研究[J]. 淡水渔业, 1987, 17(5): 17-20.

## Effects of cryopreservation on enzyme activity of *Exopalaemon carinicauda* spermatozoa

PU Yunhui<sup>1,2</sup>, XU Xinghong<sup>1</sup>, GAO Huan<sup>1</sup>, LIU Zhaopu<sup>2</sup>, YAN Binlun<sup>1\*</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** *Exopalaemon carinicauda* is one of the marine aquaculture species with high economic value in China. This paper studied the effects of cryopreservation ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) on the enzyme activity (SDH, LDH,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, SOD, CAT, GR and Acrosin) in *E. carinicauda* spermatozoa, in order to provide a theoretical basis for cryopreservation effect on *E. carinicauda* spermatozoa, and lay a foundation for artificial propagation of *E. carinicauda*. We set up a control group (without cryoprotectant), and three experimental groups (DMSO (V/V) 10%, 12.5%, 15%), detected the enzyme activities on day 0, 1, 3, 5, 7, 15. The result showed that, after cryopreservation, in addition to GR, the other enzyme activities decreased significantly ( $P < 0.05$ ), with the biggest drop in the control group. GR activity significantly increased in 7 days, and the control group was significantly higher than the experimental group ( $P < 0.05$ ), declining again in 15 days. The group of 15% DMSO measured enzyme activities were higher than other groups, indicating that 15% DMSO had protective effect on enzyme of spermatozoa. 15 days later, under the condition of 15% DMSO, the activities of SDH, LDH and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase decreased from  $(28.500 \pm 1.453)\text{ U/mL}$ ,  $(1290.836 \pm 27.603)\text{ U/L}$  and  $(2.605 \pm 0.232)\text{ }\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$  to  $(15.300 \pm 0.950)\text{ U/mL}$ ,  $(363.713 \pm 13.943)\text{ U/L}$  and  $(0.542 \pm 0.186)\text{ }\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$  respectively; the activities of SOD and CAT decreased from  $(106.497 \pm 7.217)\text{ U/mL}$ ,  $(383.632 \pm 4.731)\text{ U/g}$  to  $(17.036 \pm 0.321)\text{ U/mL}$  and  $(166.940 \pm 1.910)\text{ U/g}$  respectively; the activities of acrosin decreased from  $(3.521 \pm 0.010)\text{ }\mu\text{IU}/10^6$  to  $(1.212 \pm 0.043)\text{ }\mu\text{IU}/10^6$ ; but the activities of GR increased from  $(217.042 \pm 6.962)\text{ U/L}$  to  $(302.787 \pm 24.558)\text{ U/L}$ . From the decline range, cryopreservation had the biggest influence on SOD, followed by  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

**Key words:** *Exopalaemon carinicauda*; spermatozoa; cryopreservation; enzyme activity

**Corresponding author:** YAN Binlun. E-mail: yanbinlun@yahoo.com.cn