



超低温冷冻对长鳍篮子鱼精子中几种酶活性的影响

黄晓荣^{1,2}, 章龙珍^{1,2}, 庄平^{1,2,3}, 江琪^{1,2}, 刘鉴毅¹, 姚志峰^{1,2}, 赵峰^{1,2},
张涛¹, 冯广朋^{1,2}

(1.中国水产科学研究院 东海水产研究所, 上海 200090; 2.上海海洋大学 生命科学与技术学院, 上海 200090; 3. 上海市高校水产养殖学 E-研究院, 上海 200090)

摘要: 研究超低温冷冻保存(-196℃)对长鳍篮子鱼(*Siganus canaliculatus*)精子内总ATP酶、肌酸激酶(CK)、琥珀酸脱氢酶(SDH)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽还原酶(GR)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)等酶活性的影响。运用试剂盒分别测定了冷冻前后长鳍篮子鱼精子内几种酶活性的变化。结果表明, 经过超低温冷冻保存后, 精子内GR活性显著升高($P<0.05$), 酶活性从冻前的 $163.54 \text{ U/L} \pm 17.14 \text{ U/L}$ 上升到 $239.33 \text{ U/L} \pm 22.24 \text{ U/L}$; 其余7种酶的活性均显著下降($P<0.05$), 超低温冷冻对长鳍篮子鱼精子内不同酶活性和精子活力均有较大影响。

关键词: 超低温冷冻; 长鳍篮子鱼(*Siganus canaliculatus*); 精子; 酶活性

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)07-0016-07

长鳍篮子鱼(*Siganus canaliculatus*)属鲈形目, 篮子鱼科。分布于非洲东岸至太平洋中部, 中国主要产区在南海和东海南部等海域。此鱼肉质细嫩, 味道鲜美, 营养丰富, 深受消费者喜爱, 近年来市场需求越来越大。因此, 长鳍篮子鱼在海水网箱和海水池塘的人工养殖逐渐规模化。有关长鳍篮子鱼研究的报道较少, 目前仅见长鳍篮子鱼基本生物学及肌肉营养成分与品质评价^[1,2], 长鳍篮子鱼精子的研究未见报道。在实际生产中, 常会遇到精卵发育不同步的问题, 超低温冷冻保存技术是长期保存种质资源的有效方法, 可解决雌雄发育不同步的难题, 利用低温生物学的原理开展长鳍篮子鱼精子的超低温冷冻保存具有重要的意义。

有关鱼类精子的冷冻保存已有许多报道, 在精子冷冻原理和方法的探讨上已取得了很大的进展, 有的研究成果已在鱼类种质资源的保护上发挥了重要作用。中国已建立了包括四大家鱼在内的淡水鱼类精子库^[3~5], 并建立了相关的技术规程^[3]。在海水养殖鱼类方面, 对少数种类进行了精子生物学特性和冷冻保存技术方面的探索^[6~11]。经过超低温冷冻保存后尽管精子能够复活, 但冻后的活力和受精率总难以达到鲜精的水平, 超低温冷冻保存对精子的冷冻损伤机理尚没有阐明^[12]。本研究通过测

定超低温冷冻(-196℃)前后长鳍篮子鱼精子内相关酶活性的变化, 探讨冷冻保存对精子酶活性的影响, 为提高长鳍篮子鱼精子冷冻保存效果和正确评估精子的质量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 精液采集

2008年5月在海南省琼海市东海水产研究所试验基地, 以促黄体素释放激素(LHRH-A₂)、鲤鱼垂体(PT)、绒毛膜促性腺激素(HCG)对长鳍篮子鱼进行催产, 用挤压法采集精液: 先用去离子水洗净生殖孔, 再用干毛巾擦去生殖孔周围及体表的水分, 轻压腹部, 用干净吸管将精液移入准备好的干净培养皿中, 精液保持无水、无血、无污染, 镜检精子活力, 选取活力在90%以上的精子作为试验

收稿日期: 2008-10-16; 修回日期: 2009-01-12

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2006BAD03B08-08); 国家科技基础条件平台项目(2006DKA30470_004); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2007T02)

作者简介: 黄晓荣(1978-), 女, 湖北应城人, 助理研究员, 博士研究生, 从事鱼类生理及低温生物学研究, 电话: 021-65807898, E-mail: hxr828@126.com; 章龙珍, 通信作者, E-mail: longzhen2885@hotmail.com

材料, 放置在冰瓶保存的塑料小管中备用。精子活力以激活后视野中运动精子的百分率表示。以 D 液 (134.5 mmol/L NaCl+20 mmol/L NaHCO₃+30 mmol/L KCl+1.3 mmol/L CaCl₂+1.6 mmol/L MgCl₂, pH8.1) 作为稀释液, 以 12% 的甘油作为抗冻剂, 精子与冷冻保护液的体积比为 1:1, 将精子与冷冻保护液混装好后放入 0.2 mL 的精子专用保存管中, 液氮面 1 cm 处平衡 1 min 后, 迅速放入-196 的液氮中保存。冻精用 38 的水浴解冻后获得, 解冻后精子的活力在 30% 左右。

1.2 酶活性检测方法

肌酸激酶 (CK)、总 ATP 酶、琥珀酸脱氢酶 (SDH)、乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽还原酶 (GR)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 均采用试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 检测, 相应操作参照说明书进行。其中, CK 采用钼酸铵法, 活性根据标准曲线计算所得。总 ATP 酶采用比色法, 酶活力单位定义为每小时每毫升样品中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位 (U)。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)。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 采用比色法, 活力单位定义为每分钟分解 1 μmol 的过氧化氢即为 1 个酶活力单位 (U)。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)。GSH-PX 采用比色法, 规定每 0.1 mL 血清在 37 反应 5 min, 扣除非酶促反应作用, 使反应体系 GSH 浓度减低 1 μmol/L 为一个酶活力单位。

冷冻前后分别测定了 5 尾长鳍篮子鱼精子内 8 种酶的活性, 每个样重复 3 次, 结果取平均值。

1.3 数据分析

采用 Excel 和 Statistica (Version 6.0) 软件进行处理分析, 利用方差分析 (One-Way ANOVA) 来检验精子冷冻前后所有酶活性差异的显著性, 差异显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 超低温冷冻对精子 CK 和总 ATP 酶活性的影响

图 1 和图 2 分别为超低温冷冻对 CK 活性和总 ATP 酶活性的影响。

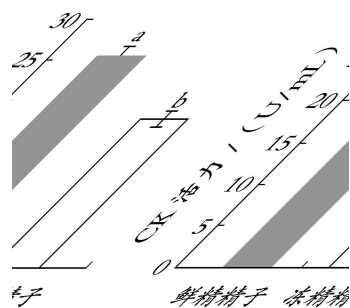


图 1 超低温冷冻对 CK 活性的影响

Fig.1 Effects of cryopreservation on the CK

从图 1 可见, 长鳍篮子鱼鲜精中肌酸激酶的平均活性为 25.59 U/mL±0.13 U/mL, 经超低温冷冻保存后, 酶平均活性降至 17.87 U/mL±0.56 U/mL。分析表明, 冷冻前后长鳍篮子鱼精子的肌酸激酶活性有显著性差异 ($P < 0.05$)。

从图 2 可知, 长鳍篮子鱼鲜精中总 ATP 酶平均活性为 9.20 U/mL±0.28 U/mL, 经超低温冷冻保存

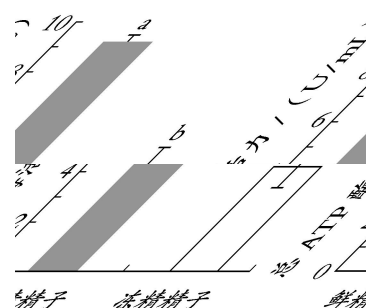


图 2 超低温冷冻对总 ATP 酶活性的影响

Fig.2 Effects of cryopreservation on the total ATP

后, 酶平均活性降至 4.18 U/mL±0.81 U/mL。分析表明, 超低温冷冻对长鳍篮子鱼精子内总 ATP 酶活性有显著性影响 ($P < 0.05$)。

2.2 超低温冷冻对精子 SDH 和 LDH 活性的影响

图 3 和图 4 分别为超低温冷冻对精子 SDH 和 LDH 活性的影响。

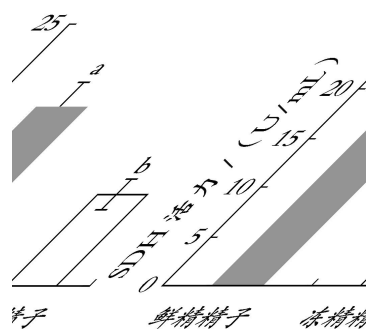


图3 超低温冷冻对精子 SDH 活性的影响

Fig.3 Effects of cryopreservation on SDH

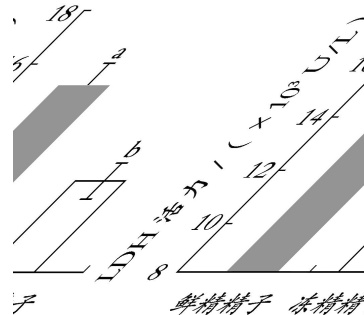


图4 超低温冷冻对精子 LDH 活性的影响

Fig.4 Effects of cryopreservation on LDH

从图3可知,长鳍篮子鱼鲜精中SDH的平均活性为 $18.33 \text{ U/mL} \pm 2.52 \text{ U/mL}$,经超低温冷冻保存后,精子的酶活性下降,平均酶活性降至 $9.33 \text{ U/mL} \pm 1.53 \text{ U/mL}$ 。分析表明,冷冻前后精子的SDH活性有显著性差异($P < 0.05$)。

从图4可见,长鳍篮子鱼鲜精中LDH的平均活性为 $14.828.66 \text{ U/L} \pm 866.56 \text{ U/L}$,经超低温冷冻保

存后,精子的平均酶活性下降到 $11.324.33 \text{ U/L} \pm 689.58 \text{ U/L}$ 。分析表明,超低温冷冻对长鳍篮子鱼精子的LDH活性有显著性影响($P < 0.05$)。

2.3 超低温冷冻对精子SOD和CAT活性的影响

图5和图6分别为超低温冷冻对精子SOD和CAT活性的影响。

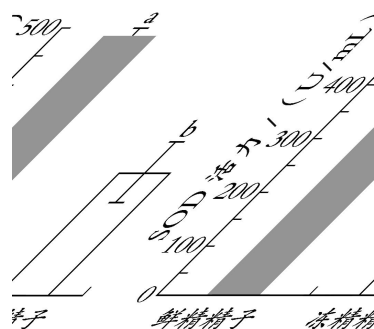


图5 超低温冷冻对精子 SOD 活性的影响

Fig.5 Effects of cryopreservation on SOD

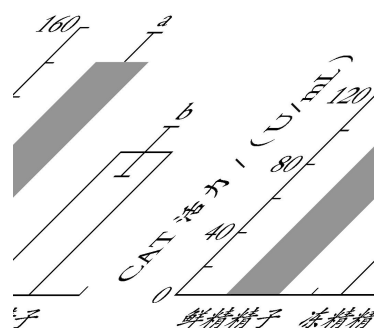


图6 超低温冷冻对精子 CAT 活性的影响

Fig.6 Effects of cryopreservation on CAT activity

由图5可知,长鳍篮子鱼鲜精中SOD活性较高,平均为 $421.68 \text{ U/mL} \pm 12.66 \text{ U/mL}$,经过超低温冷冻保存后,SOD活性下降,平均酶活性降至 $199.56 \text{ U/mL} \pm 50.55 \text{ U/mL}$ 。分析表明,冷冻前后长鳍篮子鱼精子内SOD活性有显著性差异($P < 0.05$)。

从图6可见,长鳍篮子鱼鲜精中CAT活性相对较高,平均酶活性为 $121.17 \text{ U/mL} \pm 15.04 \text{ U/mL}$,

经过超低温冷冻保存后,CAT活性下降,平均酶活性为 $74.60 \text{ U/mL} \pm 12.70 \text{ U/mL}$ 。分析表明,超低温冷冻对长鳍篮子鱼精子CAT活性有显著性影响($P < 0.05$)。

2.4 超低温冷冻对精子GSH-PX和GR活性的影响

图7和图8分别为超低温冷冻对精子GSH-PX和GR活性的影响。

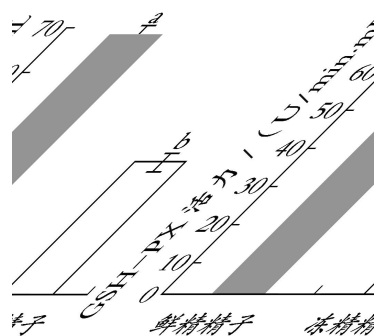


图7 超低温冷冻对精子 GSH-PX 活性的影响

Fig.7 Effects of cryopreservation on GSH-PX

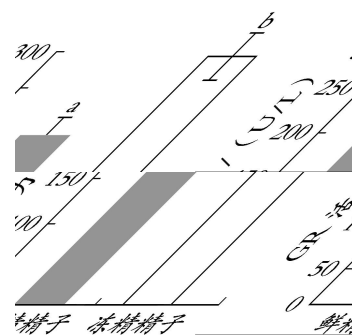


图8 超低温冷冻对精子 GR 活性的影响

Fig.8 Effects of cryopreservation on GR activity

由图7可知,长鳍篮子鱼鲜精中 GSH-PX 活性较高,平均为 $55.22 \text{ U}/(\text{min} \cdot \text{mL}) \pm 2.11 \text{ U}/(\text{min} \cdot \text{mL})$,经过超低温冷冻保存后, GSH-PX 活性下降,平均活性降至 $28.15 \text{ U}/(\text{min} \cdot \text{mL}) \pm 1.78 \text{ U}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 。分析表明,冷冻前后长鳍篮子鱼精子内 GSH-PX 活性有显著性差异 ($P < 0.05$)。

从图8可见,长鳍篮子鱼鲜精中 GR 平均酶活性为 $163.54 \text{ U}/\text{mL} \pm 17.14 \text{ U}/\text{mL}$,经过超低温冷冻保存后, GR 活性上升,平均酶活性升至 $239.33 \text{ U}/\text{mL} \pm 22.24 \text{ U}/\text{mL}$ 。分析表明,超低温冷冻对长鳍篮子鱼精子 GR 活性有显著性影响 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 超低温冷冻对长鳍篮子鱼精子能量代谢酶活性的影响

精子线粒体是维持精子正常生理功能的能量来源。SDH 是反映精子能量代谢的关键酶之一。在精子产生能量的三羧酸循环中,SDH 催化琥珀酸脱氢转变成延胡索酸,脱下的 H^+ 最后生成 ATP。因此 SDH 活性的强弱,反映精子能量代谢的活跃程度,SDH 活性检测对评价冷冻前后精子线粒体功能具有重要意义^[13~15]。ATP 酶可催化 ATP 水解生成 ADP 及无机磷的反应,这一反应放出大量能量,以供生物体进行各需能生命过程。ATP 酶存在于组织细胞及细胞器的膜上,是生物膜上的一种蛋白酶,机体在缺氧等状态下,ATP 酶受到损伤,活力下降。因此 ATP 酶活力的大小是各种细胞能量代谢及功能有无损伤的重要指标。Bilgeri 等^[16]认为人精子中 ATP 含量越高,精子活力和运动能力越好,受精潜在能力越大。另有学者发现精子活力与精子中 ATP

含量呈正相关^[17]。本研究中,长鳍篮子鱼鲜精中 ATP 酶和 SDH 的含量相对较高,经过超低温冷冻后,酶的活性显著降低,解冻后经镜检,发现精子的活力较低,推测认为长鳍篮子鱼精子在超低温冷冻后能量减少,从而影响了精子的活力。熊承良等^[18]研究表明人正常精子组中 SDH 和 ATP 酶含量显著高于弱精子组,SDH 和 ATP 酶含量的高低与精子的活力呈正相关。李凤芝等^[19]研究也表明随着冷冻温度下降,兔足肌肉中的 SDH 的活力逐渐下降。Babiak 等^[20]对虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 精子的研究表明,超低温冷冻后虹鳟精子中 CK、ATP 酶和 LDH 的活性显著低于鲜精。本研究也发现,长鳍篮子鱼精子经超低温冷冻保存后 CK 和 LDH 的活性显著下降,与前面研究结果一致。CK 通常存在于动物的心脏、肌肉以及脑等组织的细胞浆和线粒体中,是一个与细胞内能量运转、肌肉收缩、ATP 再生有直接关系的重要激酶^[21,22]。LDH 是一种糖酵解酶,是体内能量代谢过程中的一个重要酶,广泛存在于肌体组织内。精子中 LDH 主要集中于中后部的线粒体鞘上,通过呼吸作用给精子提供能量^[23~25]。林金杏等^[26]发现经超低温冷冻保存后野牦牛 (*Bos mutus*) 精子内 LDH 的活性下降,陈田飞等^[27]研究表明冷冻保存后家蚕精子中 LDH 向精浆中溢出,导致精子中 LDH 活性下降,精浆中 LDH 活性上升。这些都与本研究结果有相似之处。

3.2 超低温冷冻对长鳍篮子鱼精子抗氧化酶活性的影响

需氧生物在氧化还原循环中往往产生大量的超氧阴离子自由基、羟自由基、过氧化氢等活性氧。

此外,酶促反应、电子传递及小分子自身氧化等细胞正常的代谢过程也会产生活性氧。活性氧是自由基的重要组成部分,少量的自由基是生物体所必需的,它们作为第二信使,对信号传导起重要作用,影响基因的表达,但是自由基的性质极为活泼,过多的自由基如果不能被及时清除,它们将会攻击各种生物大分子,引起DNA损伤、酶失活、脂质过氧化等一系列氧化损伤,进而引起生物体各种生理病变^[28]。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^[29]。SOD、CAT等作为抗氧化剂中的主要酶类,具有清除氧自由基、保护细胞免受氧化损伤的作用,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。Sreejith等^[30]研究表明,经过低温冷冻后牛精子内SOD酶活性下降,同时精浆中酶的活性上升。Marta等^[31]研究表明,经5℃低温保存后随保存时间的延长,马精子中SOD酶和CAT酶的活性均下降。在本研究中,经超低温冷冻后黄斑篮子鱼精子内SOD、CAT酶的活性均显著低于鲜精,推测在超低温冷冻保存中,精子细胞内产生了较多的活性氧无法及时消除,脂质过氧化形成氧化损伤,导致冷冻保存后精子活力急剧下降。

GSH-PX是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶,它特异的催化还原型谷胱甘肽(GSH)对过氧化氢的还原反应,可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。GSH-PX具有清除脂质过氧化物的能力,大鼠组织在适冷过程中GSH-PX活性显著提高,将野鼠(*Microtus agrestis*)从22℃转移至8℃生长时,GSH-PX活性提高43%,这正是在低温下活性氧(ROS)大量产生时发生的变化,有助于ROS的清除,与抗冷是相关的^[32]。GR是一种黄素酶,可催化氧化型谷胱甘肽(GSSG),还原成还原型谷胱甘肽(GSH),GSH可使含巯基(-SH)的酶处于还原状态及活性状态,维持细胞膜的完整性。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,某些植物在冷强化时GR活力增加,玉米、西红柿抗冷基因型具有较高的GR活性,高活性的GR和高浓度的GSH,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^[33]。本研究中,经过超低温冷冻保存后,长鳍篮子鱼精子中GSH-PX的活性下降,同时GR活性显著上升,丁燊等^[34]对南极衣藻(*Chlamydomonas* sp.)的研究表明,在一定温度范围内,随温度的降低,GR的活性逐渐增加。与本研究结果有相似之处。有关超低温冷冻引起精子内GR活性升高的原因还有待更进一步研究。

3.3 超低温冷冻保存对精子的损伤效应

经过超低温冷冻保存后除GR外,长鳍篮子鱼精子内4种代谢酶和3种抗氧化酶的活性均显著下降,冻后精子的活力也显著下降。精子在冷冻、解冻过程中因冰晶的形成与消失对精子造成机械性损伤,精子膜中的类脂蛋白从细胞的结构中分离开来,使细胞膜原有的空间构象发生改变。细胞膜由肿胀、畸形和膜翻转到最终脱落,此时位于精细胞上的酶释放到精清中,因而精子中酶的活性下降、精清中酶活性上升,从而导致精子活力和受精能力的下降。低温促进生物细胞内自由基形成,加强细胞膜脂质过氧化,抗氧化酶活力与植物抗冻或冷适应的相关性已得到公认。谷胱甘肽系统通过多种方式来对抗活性氧,谷胱甘肽相关酶参与清除活性氧、排斥因脂质过氧化产生的毒物和维持GSH/GSSG的平衡。本研究中,因长鳍篮子鱼精子密度大,浓度高,无法离心出上层精浆,故只分析了冷冻前后精子中酶活性的变化,研究表明超低温冷冻保存对长鳍篮子鱼精子造成了冷冻损伤,有关冷冻损伤的机理还有待更进一步的研究。因此,在冷冻过程中寻找更合适的稀释液和抗冻剂,筛选更好的解冻方法,有效降低超低温冷冻保存对精子的损伤效应,也是今后开展此项工作需要重点解决的问题。

参考文献:

- [1] 张邦杰,梁仁杰,毛大宁,等.黄斑篮子鱼的池塘驯养及有关生物学初探[J].现代渔业信息,1999,14(4):11-16.
- [2] 庄平,宋超,章龙珍,等.黄斑篮子鱼肌肉营养成分与品质的评价[J].水产学报,2008,32(1):77-82
- [3] 鲁大椿,刘宪亭,章龙珍,等.鱼类精液冷冻保存技术操作规程[J].淡水渔业,1997,2(4):13-15.
- [4] 张轩杰.鱼类精液超低温冷冻保存研究进展[J].水产学报,1987,9(3):259-267.



- [5] 陈松林,刘宪亭,鲁大椿,等. 鲢、鲤、团头鲂和草鱼精液冷冻保存的研究[J]. 动物学报,1992,38(4):413-424.
- [6] 洪万树,张其永,许胜发,等. 花鲈精子生理特性及其精液超低温冷冻保存[J]. 海洋学报,1996,18(2):97-104.
- [7] 区又君,李加儿,江世贵. 保存和激活对真鲷精子生理特性的影响[J]. 热带海洋,1998, 17(3): 65-74.
- [8] 江世贵,苏天凤,喻达辉,等. 中华乌塘鳢精子的生物学特性及其超低温保存[J]. 水产学报,2000,24(2): 119-122.
- [9] 林丹军,尤永隆. 大黄鱼精子生理特性及其冷冻保存[J]. 热带海洋学报, 2002, 21(4): 69-75.
- [10] 黄晓荣,章龙珍,乔振国,等. 抗冻剂对日本鳗鲡精子活力及运动时间的影响[J]. 海洋渔业,2007,29(3):193-199.
- [11] 闫文罡,章龙珍,庄平,等. 日本黄姑鱼精子生理特性及超低温冷冻保存研究[J]. 海洋渔业, 2008, 30(2):145-151.
- [12] 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.
- [13] Rao M V, Sharma P S. Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice [J]. **Reprod Toxicol**,2001,15(6):705-712.
- [14] Ruiz-Pesini E, Alvarez E, Enriquez J A, *et al.* Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities [J]. **Int J Androl**,2001,24(6): 335-340.
- [15] Piasecka M, Wenda-Rozewicka L, Ogonski T. Computerized aic studies as methods to evaluate the function of the mitochondrial sheath in rat spermatozoa [J]. **Andrologia**, 2001,33(1):1-12.
- [16] Bilgeri Y R, Winckelmann A, Berzin M, *et al.* Denosine triphosphate levels in human spermatozoa [J]. **Arch Androl**, 1987, 18:183.
- [17] Chan S Y, Wang C. Correlation between semen adenosine triphosphate and sperm fertilizing capacity [J]. **Fertil Steril**, 1987, 47:717-725.
- [18] 熊承良, 黄勋彬, 沈继云, 等. 弱精子症患者精子中 ATP 和琥珀酸脱氢酶含量与精子活率的关系[J]. 同济医科大学学报,1999,28(4):289-291.
- [19] 李凤芝,刘国忠. 冷冻损伤程度与琥珀酸脱氢酶活性改变的关系[J]. 中国应用生理学杂志,1989,5(3):331-332.
- [20] Babiak I, Glogowski J, Goryczko K, *et al.* Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cyropreserved spermatozoa [J]. **Theriogenology**,2001,56: 177-182.
- [21] Lehninger A L. Bioenergetics[M]. Benjamin, Menlo Park. 1977, 67-77.
- [22] Seraydrarian M W, Abbot B C. The role of the creatine phosphokinase system in muscle[J]. **Mol Cell Cardiol**, 1976, 8: 741-746.
- [23] Afromeiev 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: 931-932.
- [24] 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]. **Int J Androl**, 1987, 10: 653-663.
- [25] Comhaire F H, Vermeulen L, Ghedira K, *et al.* Adenosine triphosphate in human semen: a quantitative estimate of fertilizing potential [J]. **Fertil Steril**, 1983, 40:500-512.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Li H J, Jae H B, Won S E, *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):1 509-1 519.
- [29] 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.
- [30] Sreejith J, Nair A S, Brar 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, 96:21-29.
- [31] 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 [J]. **Theriogenology**, 2005, 63:1 354-1 365.



- [32] Colin S, Jane S, Laren M, *et al.* Effect of long-term cold exposure on antioxidant enzyme activities in a small mammal[J]. **Free Radical Biology & Medicine**, 2000, 28: 1 279 -1 285.
- [33] 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]. **Environ Exp Bio**, 1999, 42:129-139.
- [34] 丁燊, 缪锦来, 王全富, 等. 温度对南极衣藻 ICE-L 谷胱甘肽含量及其相关酶活性的影响[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(2):154-161.

Effects of cryopreservation on enzyme activity of *Siganus canaliculatus* spermatozoa

HUANG Xiao-rong^{1,2}, ZHANG Long-zhen^{1,2}, ZHUANG Ping^{1,2,3}, JIANG Qi^{1,2}, LIU Jian-yi¹, YAO Zhi-feng^{1,2}, ZHAO Feng^{1,2}, ZHANG Tao¹, FENG Guang-peng^{1,2}

(1.East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
2.College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China;
3.Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai University, Shanghai 200090, China)

Received: Oct., 16, 2008

Key words: cryopreservation; *Siganus canaliculatus*; spermatozoa; enzyme activity

Abstract: This paper studied the effects of cryopreservation(-196 °C) on the enzyme activity(total ATP, CK, SDH, LDH, SOD, CAT, GSH-PX and GR) in *Siganus canaliculatus* spermatozoa. The changes of enzyme activity were analysed in the spermatozoa using the reagent box respectively. The results showed the activities of spermatozoa dropped after cryopreservation, GR activities increased significantly($P<0.05$), the activities added from $163.54 \text{ U/L} \pm 17.14 \text{ U/L}$ to $239.33 \text{ U/L} \pm 22.24 \text{ U/L}$, other seven kinds of enzyme activities descended significantly($P<0.05$). The activities of total ATP, CK, SDH dropped from $9.20 \text{ U/mL} \pm 0.28 \text{ U/mL}$, $25.59 \text{ U/mL} \pm 0.13 \text{ U/mL}$ and $18.33 \text{ U/mL} \pm 2.52 \text{ U/mL}$ to $4.18 \text{ U/mL} \pm 0.81 \text{ U/mL}$, $17.87 \text{ U/mL} \pm 0.56 \text{ U/mL}$ and $9.33 \text{ U/mL} \pm 1.53 \text{ U/mL}$ respectively, the activities of LDH, SOD and CAT declined from $14\ 828.66 \text{ U/L} \pm 866.56 \text{ U/L}$, $421.68 \text{ U/mL} \pm 12.66 \text{ U/mL}$ and $121.17 \text{ U/mL} \pm 15.04 \text{ U/mL}$ to $11324.33 \text{ U/L} \pm 689.58 \text{ U/L}$, $199.56 \text{ U/mL} \pm 50.55 \text{ U/mL}$ and $74.60 \text{ U/mL} \pm 12.70 \text{ U/mL}$ respectively. Activity of GSH-PX dropped from $55.22 \text{ U/(min} \cdot \text{mL)} \pm 2.11 \text{ U/(min} \cdot \text{mL)}$ to $28.15 \text{ U/(min} \cdot \text{mL)} \pm 1.78 \text{ U/(min} \cdot \text{mL)}$. Cryopreservation had a great effect on the enzyme activity and spermatozoa energy of *Siganus canaliculatus*.

(本文编辑: 康亦兼)