

冻融过程诱导精子凋亡及抗冻保护剂的研究进展

耿欣¹, 郭勇¹, 陈余², 王梁², 倪和民¹, 盛熙晖¹, 王相国¹, 邢凯¹, 肖龙菲¹, 齐晓龙^{1*}

(1. 北京农学院动物科学技术学院, 北京 102206; 2. 北京市畜牧总站, 北京 100107)

摘要 精子凋亡广泛存在于精液冻融过程, 冷应激或氧化应激刺激及获能样变化均可引起精子凋亡。产生凋亡样变化的精子其结构、线粒体功能、膜电位、DNA 完整性和参与凋亡反应的蛋白均发生变化, 导致精子死亡率升高, 活率下降。简述了冻融过程中精子凋亡的成因及抗冻保护剂的研究进展, 以期为进一步提高冻融后的精子质量提供理论参考。

关键词 精子; 冻融过程; 凋亡; 抗冻保护剂; 研究进展

中图分类号 S814 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)03-0019-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2022.03.005



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Research Progress on Sperm Apoptosis Induced by Freezing and Thawing Process and Cryoprotectants

GENG Xin¹, GUO Yong¹, CHEN Yu² et al (1. School of Animal Science and Technology, Beijing Agricultural College, Beijing 102206; 2. Beijing Animal Husbandry Station, Beijing 100107)

Abstract Sperm apoptosis is widespread in the process of semen freezing and thawing. Cold stress or oxidative stress stimulation and capacitation-like changes can cause sperm apoptosis. The sperm with apoptosis-like changes changes in its structure, mitochondrial function, membrane potential, DNA integrity, and proteins involved in the apoptotic response, resulting in increased sperm mortality and decreased sperm viability. This paper briefly describes the causes of sperm apoptosis during freezing and thawing and the research progress of cryoprotectants, in order to provides a theoretical reference for further improving the quality of sperm after freezing and thawing.

Key words Sperm; Freeze-thaw process; Apoptosis; Antifreeze protectant; Research progress

精子冷冻保存有助于动物种质资源的运输和储存, 以用于人工授精和其他先进的辅助生殖技术, 为保种育种工作提供便捷, 还可降低畜牧场生产成本。目前, 冷冻保存技术在猪和牛等哺乳动物上比较成熟。由于冻融过程会造成精子结构和代谢发生变化, 导致精子利用率显著降低。冷冻-解冻过程会导致精子膜破裂或褶皱、顶体暴露或脱落以及线粒体发生肿胀^[1], 超低温保存还会降低精子膜的流动性^[2], 而添加抗冻保护剂可以有效改善精子损伤。此外, 细胞凋亡也发生于精子冻融过程中, 凋亡精子常常伴随着顶体损伤、中段缺陷和产生细胞质滴等结构变化, 并与线粒体代谢之间存在显著相关性, 同时凋亡的产生也会直接影响冻融后精子参数以及受精率^[3]。因此, 研究精子冻融过程中凋亡的分子机制, 开发新型抗冻保护剂具有重要的理论和实践意义。

1 冷冻-解冻诱导的精子凋亡

1.1 冻融过程中线粒体的损伤 线粒体作为细胞凋亡的起源途径级联中心, 直接参与精子在冻融过程中受到的损伤。精子线粒体与体细胞线粒体结构一致, 仅数量相对较少。在精子发生过程中, 线粒体随细胞质的流失而减少, 剩余 22~75 条线粒体集中在精子中段^[4]。精子冷冻-解冻过程会严重破坏线粒体结构, 研究表明, 精子在冻融后含有完整线粒体膜电位的活精子数显著降低^[5]。线粒体膜电位的完整性

直接影响线粒体功能, 膜电位的变化也是细胞凋亡级联反应的起始步骤。在 Bcl-2 家族蛋白的作用下, 线粒体通透性转换孔打开, 使得凋亡因子释放到胞质中触发凋亡级联反应。体外添加线粒体通透性转换孔抑制剂可显著降低解冻后精子 caspases 活性, 提高解冻精子线粒体膜电位, 提示抑制线粒体通透性转换孔可有效减少精子超低温保存过程中的“凋亡样”变化^[6]。冻融过程还可引起精子线粒体膜破裂, 从而释放细胞色素 C, 其与凋亡蛋白酶激活因子结合并活化 caspases 蛋白, 最终致使染色质凝聚与核破裂^[7]。此外, 精子低温保存引起的质膜损伤还与细胞内 Ca^{2+} 浓度升高有关, 低温引起线粒体大量摄取 Ca^{2+} , 线粒体 Ca^{2+} 含量增加引起线粒体膜通透性增加, 导致线粒体基质肿胀, 外膜破裂, 促凋亡因子释放, 最终导致细胞凋亡^[8]。线粒体是产生活性氧 (ROS) 的主要细胞器之一, ROS 在一定程度上可以调节精子获能和顶体反应, 但过量的 ROS 会导致精子存活率、运动性、线粒体膜电位降低, 以及 DNA 损伤、形态学缺陷和脂质过氧化物的增加, 加速精子的凋亡^[9]。由此可见, 线粒体损伤是导致精子凋亡的重要因素, 保护线粒体结构的完整性是防止精子凋亡的重要途径。

1.2 冻融过程中凋亡标记的产生 冻融过程凋亡标记物呈上升趋势, 包括 caspase 活性升高, 磷脂酰丝氨酸 (PS) 向膜外转移, 线粒体膜电位的降低 (早期标记) 和 DNA 损伤 (晚期标记)^[10]。在冷冻-解冻后 PS 外化精子的百分比增加, 导致精子中大部分坏死细胞解体^[11], PS 外化还可受细胞色素 C 的介导^[12]。研究表明, 导致精子 DNA 断裂的主要途径是凋亡过程, 故 DNA 断裂也可作为精子凋亡的晚期标志, 但目前精子 DNA 断裂的作用机制有待阐明。此外, 精子冻融过程会使精子产生获能反应, 进而导致精子凋亡。精子质膜会产生

基金项目 现代农业产业技术体系北京市家禽创新团队项目 (BAIC04-2020); “十三五”国家重点研发计划 (2016YFD0700201); 2020 年农业科技项目-科技创新服务能力建设-农业科技新星计划项目 (20200210); 北京市农委“菜篮子”新型生产经营主体科技能力提升工程 (2018)。

作者简介 耿欣 (1997—), 女, 北京人, 硕士, 从事家禽营养调控与繁殖研究。* 通信作者, 副教授, 博士, 从事家禽营养调控与繁殖研究。

收稿日期 2021-01-22

获能样改变以及蛋白质酪氨酸磷酸化,该变化在精子冻融后尤为明显^[13]。在冻融过程中精子可能通过 cAMP-PKA 途径进行酪氨酸磷酸化(获能标记),同时也解释了冻融获能可能会导致细胞凋亡^[14]。凋亡标记的发现为改善冻融后的精液品质提供了新思路。

1.3 冻融过程中凋亡蛋白的作用

1.3.1 caspases 蛋白的作用。精子中 caspases 的存在是细胞凋亡的重要标志之一,同时也是调控细胞凋亡的关键蛋白。研究显示,caspases 蛋白家族中共 9 种蛋白参与细胞凋亡,根据其结构功能的不同可分为“启动子”(caspases-2、caspases-8、caspases-9、caspases-10、caspases-12)和“效应子”(caspases-3、caspases-6、caspases-7、caspases-14)^[15]。在死亡受体激活的生物反应下诱导启动子自激活,继而通过蛋白质分解或次级信使机制直接或间接激活下游 caspases (效应 caspases)。当启动子 caspases 激活时,同时激活效应子裂解细胞内的蛋白质和 DNA 完成细胞凋亡程序^[16]。在成熟精子中 caspases 主要集中在顶体管和细胞核周围,caspase-3、caspase-8 的表达相对较高,caspase-3 是最为关键的效应子^[17]。人精子冻融后可检测出 caspase-3 前体及其活性亚基、caspase-8 的前体和活化酶、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 前体、活性酶和 35 kDa 信号^[18]。精子冻融过程中的过度氧化应激也会触发凋亡,使得精子中 caspase-3 蛋白的表达量显著升高^[19]。同时 caspases 还是凋亡小体的组成成分,且凋亡小体的数量与 caspase-3 活性呈正相关^[20]。精液平衡 3 h 后即可表现出 caspase 活性^[21],冷冻解冻后,较高比例的精子显示出 caspase 活性,caspases 阳性的活精子占 30.2%~70.7%,死精子占 7.3%~24.0%,且具有 caspases 蛋白活性的活精子与线粒体膜电位呈负相关^[22]。有研究表明,冻融过程中的 caspase-3 活化和 DNA 断裂最终导致了精子细胞的凋亡^[23]。通过抑制调控精子凋亡的核心蛋白酶 caspase,可显著降低获能精子和磷酸化精子数^[24]。caspases 抑制剂处理可提高精子活力和线粒体膜电位,减少精子 DNA 断裂^[6]。caspases 依赖的凋亡机制可能起源于细胞质液滴或线粒体内,并在细胞核发挥作用。caspases 的存在还可能增加 PS 易位和 DNA 断裂^[25]。caspase 依赖和独立的凋亡机制在精子中的作用需要进一步分析,了解这些机制可能为操纵精子凋亡以提高冻融后精子质量提供新的思路。

1.3.2 Bcl-2 家族蛋白的作用。Bcl-2 调控精子凋亡主要作用于线粒体,该家族蛋白至少包括 18 个成员,但目前在精子凋亡中可能直接发挥作用的包括促凋亡蛋白 Bid、Bak 和 Bax 以及抗凋亡蛋白 Bcl-2,各蛋白之间可相互作用调节细胞凋亡过程。Bid 从外源性死亡受体途径接收凋亡信号,并通过其切割产物截短 Bid (tBid) 将其传递到线粒体激活内源凋亡途径。Bax 和 Bak 蛋白被认为是细胞凋亡的核心,是调节线粒体通透性关键效应器,也是线粒体功能障碍导致精子凋亡的关键因子^[26]。线粒体外膜的 Bax 或 Bak 寡聚形成小孔,释放细胞色素 C 并打开通透性转换孔复合体^[23]。Bcl-2 作为抗凋亡蛋白对精子的凋亡有抑制作用,其可抑制 Bax 和

Bak 的相互作用,减少通透性转换孔的开放。在凋亡的精母细胞中发现 Bcl-2/Bax 比值有降低趋势^[27],而后通过调节 Bax 和 Bcl-2 的表达可以减少精子凋亡,提高精子活力和卵裂率^[28]。由此可见,精子凋亡一定程度上受控于 Bcl-2/Bax 比例。相关试验并未在冻融后的精子中检测到抗凋亡因子 Bcl-2 的存在,但体外单独添加 Bcl-2 可以有效降低凋亡率^[21]。此外,Bik 可以通过促进细胞内 Ca^{2+} 的释放,破坏线粒体膜的通透性^[16],间接破坏线粒体结构影响凋亡的产生。上述研究表明,Bcl-2 蛋白家族对精子凋亡具有调控作用,但具体的作用机制尚不明确,有待于进一步深入研究。

2 抗冻保护剂

2.1 常规抗冻保护剂 常规抗冻保护剂如甘油、二甲亚砜(DMSO)和乙二醇等在生产上均可提高精子冻融后的使用效率。甘油作为一种渗透性抗冻保护剂,可进入精子膜内与水分结合降低冷冻液的渗透压,进而对精子起保护作用^[29-30]。近期研究表明,甘油还可通过抑制 caspase-2、caspase-8、caspase-13 的表达进而抑制凋亡的产生^[31],但高浓度甘油可促进精子凋亡产生,其原因可能通过对线粒体的直接毒性作用而激活 caspases^[18]。DMSO 作为一种渗透性低温保护剂,可替代甘油提高精子解冻后精液质量和繁殖能力,有效避免甘油的毒性作用^[32],还可抑制 caspase-2 和 caspase-8 的表达^[31]。此外,添加乙二醇也可以显著提高精子线粒体完整性、精子活率,被认为是另一种可替代甘油的精液冷冻保护剂^[33]。但是常规抗冻保护剂对精子的保护作用是有限的,同时添加抗氧化剂可以更有效地提高冻融后精子质量。

2.2 抗氧化剂 抗氧化剂的使用可很大程度降低线粒体损伤,从而减少凋亡的产生。常见的抗氧化剂包括维生素 C 和辅酶 Q10 等均对精子凋亡有抑制作用。在精子玻璃化冷冻前添加维生素 C 有利于改善精子质量,防止精子染色质异常和精子凋亡^[34]。补充 1~2 $\mu\text{mol/L}$ 辅酶 Q10 也可显著提高冻融后精子质量和生育率,但对 DNA 断裂和精子形态无影响^[35]。添加维生素 D 显著降低凋亡率^[36]。此外,白藜芦醇、左旋肉碱和姜黄素等抗氧化剂对精子凋亡亦有显著的抑制作用。白藜芦醇可显著提高冻融后精子线粒体膜电位,降低 ROS 的产生和凋亡样改变^[37],还可降低凋亡因子 Fas、P53、TNF- α 、Bax、caspase-3、caspase-8、caspase-9 的表达量,提高 Bcl-2 表达量^[38]。体外添加左旋肉碱亦可提高精子质量、精子染色质完整性和顶体完整性,下调 Bax 表达,上调 Bcl-2 表达,提高线粒体活性,抑制精子凋亡^[13]。添加姜黄素可降低冻融后精子的氧化应激和脂质过氧化,增强抗凋亡蛋白表达量^[39]。直接添加超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶也可改善精子质量,减少凋亡的产生,抗冻效果优于蛋黄和甘油^[40]。此外,添加适宜浓度 GSH 可降低精子 DNA 片段化的百分比,提高精子线粒体膜电位,GSH 可通过干扰精子的凋亡和超低温获能途径,利于精子存活,从而保护精子免受超低温保存的负面影响^[41]。总体而言,抗氧化剂可有效减少精子

凋亡的产生,提高精子结构的完整性,进而改善精液品质。

2.3 其他新型抗冻保护剂 凋亡的产生主要受精子内凋亡因子的调节,通过抑制凋亡蛋白的表达可有效降低凋亡的产生。PTD-FNK 为 Bcl-xL 蛋白的突变体,向精液稀释液中添加不同浓度的 PTD-FNK 可有效抑制 caspases 活性^[42]。添加 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Bcl-2 可提高精子解冻后的质量,而且对精子冻前质量无影响。此外,添加 2 mg/mL 肌醇可有效提高冷冻-解冻后的精子质量,提高精子的总抗氧化能力,减少 DNA 片段化^[43]。在精液稀释液中添加 12.5~25.0 ng/mL 松弛素,也可显著提高精子线粒体膜电位,并降低凋亡细胞的百分比,但对质膜和 DNA 完整性没有影响^[44]。一些合成类材料也对冻融导致的凋亡有抑制作用,由铜-半胱氨酸配合物和纳米白蛋白组成的超氧化物歧化酶模拟纳米酶 (NA Cu-Cys) 可有效防止精子冷冻引起的氧化应激,提高精子活力,抑制细胞凋亡^[45]。添加浓度为 1.0 mg/mL 的硒纳米颗粒,可改善荷斯坦公牛解冻后的精子质量,通过减少细胞凋亡、脂质过氧化和精子损伤,提高体内受精率^[46]。 κ -卡拉胶是从海藻中提炼出的胶体,试验表明体外添加 κ -卡拉胶可有助于提高精子活力和顶体完整性,防止细胞凋亡^[47]。由此可见,新型抗冻保护剂的研发进一步提高了精子冻融后的质量,但其抗凋亡作用机制仍有待于进一步研究。

3 小结

综上所述,冻融后精子质量的下降与线粒体介导的细胞凋亡通路存在相关性,冷冻保存可破坏线粒体结构释放凋亡蛋白及因子诱导精子凋亡,精子凋亡的产生伴随着精子结构的破坏,对冻融后精子质量有负面作用。而对于凋亡的产生,一些抗冻保护剂可直接抑制凋亡蛋白的表达、抗氧化剂则可以通过保护线粒体的完整性间接抑制凋亡的产生。随着研究的深入,学者已经逐渐认识到线粒体介导的细胞凋亡对提高精子冻融后质量的重要性,深入研究线粒体途径的细胞凋亡与各精子质量参数的联系有助于抗冻保护剂的开发,进而提高冷冻-解冻后精子质量。

参考文献

[1] HOLT W V, HEAD M F, NORTH R D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: Observations with experimental cryomicroscopy [J]. *Biology of reproduction*, 1992, 46 (6): 1086-1094.

[2] BLESBOIS E, GRASSEAU I, SEIGNEURIN F. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation [J]. *Reproduction*, 2005, 129 (3): 371-378.

[3] AZIZ N, SAID T, PAASCH U, et al. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index [J]. *Human reproduction*, 2007, 22 (5): 1413-1419.

[4] AMARAL A, LOURENCO B, MARQUES M, et al. Mitochondria functionality and sperm quality [J]. *Reproduction*, 2013, 146 (5): R163-R174.

[5] SŁOWIŃSKA M, LISZEWSKA E, JUDYCKA S, et al. Mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in liquid stored and cryopreserved turkey (*Meleagris gallopavo*) spermatozoa [J]. *Poultry science*, 2018, 97 (10): 3709-3717.

[6] PAGANO N, LONGOBARDI V, DE CANDITIS C, et al. Effect of caspase inhibitor Z-VAD-FMK on bovine sperm cryotolerance [J]. *Reproduction in domestic animals*, 2020, 55 (4): 530-536.

[7] MORDENTE A, MEUCCI E, SILVESTRI A, et al. Anthracyclines and mitochondria [J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 2012, 942: 385-419.

[8] TREULEN F, ARIAS M E, AGUILA L, et al. Cryopreservation induces mitochondrial permeability transition in a bovine sperm model [J]. *Cryobiology*, 2018, 83: 65-74.

[9] AITKEN R J, JONES K T, ROBERTSON S A. Reactive oxygen species and sperm function-In sickness and in health [J]. *Journal of andrology*, 2012, 33 (6): 1096-1106.

[10] TAYLOR S L, WENG S L, FOX P, et al. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: Potential utility as indicators of sperm quality [J]. *Molecular human reproduction*, 2004, 10 (11): 825-834.

[11] ANZAR M, HE L W, BUHR M M, et al. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility [J]. *Biology of reproduction*, 2002, 66 (2): 354-360.

[12] JIANG J F, SERINKAN B F, TYURINA Y Y, et al. Peroxidation and externalization of phosphatidylserine associated with release of cytochrome c from mitochondria [J]. *Free radical biology and medicine*, 2003, 35 (7): 814-825.

[13] REZAEI N, MOHAMMADI M, MOHAMMADI H, et al. Acrosome and chromatin integrity, oxidative stress, and expression of apoptosis-related genes in cryopreserved mouse epididymal spermatozoa treated with L-Carnitine [J]. *Cryobiology*, 2020, 95: 171-176.

[14] MOHAN R, ATREJA S K. Tyrosine phosphorylation of cytochrome c as a signaling event in frozen thawed buffalo spermatozoa at the cross-roads of capacitation and apoptosis [J]. *Cryobiology*, 2015, 70 (3): 253-261.

[15] HO P K, HAWKINS C J. Mammalian initiator apoptotic caspases [J]. *The FEBS journal*, 2005, 272 (21): 5436-5453.

[16] TSUJIMOTO Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: Apoptosomes or mitochondria? [J]. *Genes to cells*, 1998, 3 (11): 697-707.

[17] 徐亚茹, 杨万喜. 中华绒螯蟹精子发生过程中 Caspase 家族蛋白 (Caspase 3/Caspase 7/Caspase 8) 参与生精细胞凋亡机制的研究 [C]//浙江省第四届动物学博士与教授论坛、动物学与经济强省——浙江省动物学研究及发展战略研讨会论文集摘要集. 杭州: 浙江省科学技术协会, 2017.

[18] WÜNDRICH K, PAASCH U, LEICHT M, et al. Activation of caspases in human spermatozoa during cryopreservation: An immunoblot study [J]. *Cell and tissue banking*, 2006, 7 (2): 81-90.

[19] LIU Q, SI T L, XU X Y, et al. Electromagnetic radiation at 900 MHz induces sperm apoptosis through bcl-2, bax and caspase-3 signaling pathways in rats [J]. *Reproductive health*, 2015, 12 (1): 1-9.

[20] CASELLES A B, MIRO-MORAN A, MORILLO RODRIGUEZ A, et al. Identification of apoptotic bodies in equine semen [J]. *Reproduction in domestic animals*, 2014, 49 (2): 254-262.

[21] MARTIN G, CAGNON N, SABIDO O, et al. Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa [J]. *Human reproduction*, 2007, 22 (2): 380-388.

[22] BHAT G K, SEA T L, OLATINWO M O, et al. Influence of a leptin deficiency on testicular morphology, germ cell apoptosis, and expression levels of apoptosis-related genes in the mouse [J]. *Journal of andrology*, 2006, 27 (2): 302-310.

[23] JACOTOT E, DENIAUD A, BORGNE-SANCHEZ A, et al. Therapeutic peptides: Targeting the mitochondrion to modulate apoptosis [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2006, 1757 (9/10): 1312-1323.

[24] PAASCH U, SHARMA R K, GUPTA A K, et al. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa [J]. *Biology of reproduction*, 2004, 71 (6): 1828-1837.

[25] WENG S L, TAYLOR S L, MORSHEDI M, et al. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm [J]. *Molecular human reproduction*, 2002, 8 (11): 984-991.

[26] WEI M C, ZONG W X, CHENG E H, et al. Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death [J]. *Science*, 2001, 292 (5517): 727-730.

[27] DUAN P, HU C H, BUTLER H J, et al. 4-Nonylphenol induces disruption of spermatogenesis associated with oxidative stress-related apoptosis by targeting p53-Bcl-2/Bax-Fas/FasL signaling [J]. *Environmental toxicology*, 2017, 32 (3): 739-753.

[28] PAN Y Y, CUI Y, BALOCH A R, et al. Insulinlike growth factor I improves yak (*Bos grunniens*) spermatozoa motility and the oocyte cleavage rate by modulating the expression of Bax and Bcl-2 [J]. *Theriogenology*, 2015, 84 (5): 756-762.

- 岛:中国海洋大学,2015.
- [3] 尚卫敏. 淡水池塘养殖尾水处理技术[J]. 渔业致富指南,2020(20):38-40.
- [4] SANDU S I, BOARDMAN G D, WATTEN B J, et al. Factors influencing the nitrification efficiency of fluidized bed filter with a plastic bead medium[J]. Aquacultural engineering, 2002, 26(1):41-59.
- [5] 黄东珊. 凡纳滨对虾水处理技术及不同养殖模式效益的研究[D]. 湛江:广东海洋大学,2018.
- [6] 徐建平, 陈福迪, 尉莹, 等. 电絮凝技术在海水养殖尾水处理中的应用[J]. 渔业现代化, 2020, 47(1):7-15.
- [7] 周华, 孙建岐. 水产养殖业的水处理技术综述[J]. 渔业现代化, 2000, 27(4):27-29.
- [8] 张可可. 人工湿地对海水养殖尾水的净化性能及其微生物群落特征研究[D]. 上海:上海海洋大学, 2020.
- [9] 沈建筑, 李潇轩, 李志辉, 等. 浅析淡水养殖尾水处理技术及达标排放措施[J]. 水产养殖, 2019, 40(5):37-39.
- [10] 胡高宇, 张翔, 陈琛, 等. 海水养殖尾水处理系统中微生物群落对水处理阶段的响应[J]. 水生生物学报, 2021, 45(1):161-171.
- [11] 姜润龙. 超滤膜技术在环保工程污水处理中的应用[J]. 建筑与预算, 2020(8):5-7.
- [12] MAMERI N, ABDESSEMED D, BELHOCINE D, et al. Treatment of fishery washing water by ultrafiltration[J]. Journal of chemical technology and biotechnology, 1996, 67(2):169-175.
- [13] CHAO A C, MACHEMEHL J L, GALARRANGE E. 35th Industrial Waste Conf[R]. Lafayette: Purdue Univ, 1980:560-570.
- [14] 赵峰, 齐晓辉. 环境工程污水处理中超滤膜技术的应用分析[J]. 环境与发展, 2020, 32(10):92, 94.
- [15] 付晓燕. 污水处理膜技术-抗污染聚砜超滤膜研究[J]. 环境保护与循环经济, 2020, 40(7):23-25.
- [16] 李照杰. 环境工程污水处理中超滤膜技术的应用[J]. 环境与发展, 2020, 32(8):108-109.
- [17] LISTIARINI K, SUN D D, LECKIE J O. Organic fouling of nanofiltration membranes: Evaluating the effects of humic acid, calcium, alum coagulant and their combinations on the specific cake resistance[J]. Journal of membrane science, 2009, 332(1/2):56-62.
- [18] TANG C Y, KWON Y N, LECKIE J O. Fouling of reverse osmosis and nanofiltration membranes by humic acid-Effects of solution composition and hydrodynamic conditions[J]. Journal of membrane science, 2007, 290(1/2):86-94.
- [19] 王颢睿. 基于 Fe(II)/PMS 预处理方法对于纳滤膜处理水中有机污染物的效能研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2020.
- [20] 刘丹阳, 赵尔卓, 仲丽娟, 等. 低压纳滤膜用于微污染地表水深度处理的中试研究[J]. 给水排水, 2019, 45(4):15-23.
- [21] 李惠平. 纳滤膜在高品质饮用水处理中的应用研究[D]. 兰州:兰州交通大学, 2020.
- [22] 张万雷. 膜生物反应器在废水处理中的应用[J]. 智能城市, 2020, 6(17):101-102.
- [23] 赵昌爽, 徐晓平, 阮仁俊, 等. 组合式膜生物反应器处理微污染湖泊水机制研究[J]. 水处理技术, 2021, 47(2):90-94.
- [24] HONG J M, LI W B, LIN B, et al. Deciphering the effect of salinity on the performance of submerged membrane bioreactor for aquaculture of bacterial community[J]. Desalination, 2013, 316:23-30.
- [25] 沈加正. 膜生物反应器应用于海水养殖废水处理的基础研究[D]. 青岛:中国科学院研究生院(海洋研究所), 2011.
- [26] 林冰, 卢芳芳, 洪俊明. HRT 对缺氧-动态膜生物反应器处理海水养殖废水的影响[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2013, 34(6):678-681.
- [27] 李伟博, 洪俊明. 两种膜生物反应器工艺在养殖废水处理中的运行效果[J]. 化工进展, 2012, 31(12):2791-2796.
- [28] 桂双林, 麦兆环, 付嘉琦, 等. 超滤-反渗透组合工艺处理稀土冶炼废水[J]. 水处理技术, 2020, 46(9):108-112.
- [29] 刘国昌, 吕经烈, 李晓明, 等. 膜集成工艺处理海水工厂化养殖废水处理技术研究[J]. 渔业现代化, 2010, 38(4):16-20, 44.

(上接第 21 页)

- [29] ZENG C J, TANG K Y, HE L, et al. Effects of glycerol on apoptotic signaling pathways during boar spermatozoa cryopreservation[J]. Cryobiology, 2014, 68(3):395-404.
- [30] 丁丽. 甘油对猪冷冻精子细胞凋亡信号通路相关基因表达的影响[D]. 雅安:四川农业大学, 2014.
- [31] 丁丽, 方东辉, 何蓬, 等. 细胞凋亡相关 Caspases 在猪精子冷冻过程中的表达谱研究[J]. 四川农业大学学报, 2014, 32(1):68-75.
- [32] RAKHA B A, ANSARI M S, AKHTER S, et al. Use of dimethylsulfoxide for semen cryopreservation in Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) [J]. Theriogenology, 2018, 122:61-67.
- [33] 席利娟, 罗军, 杨地坤, 等. 渗透性冷冻保护剂对山羊精子的冷冻保护效果[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(8):27-32.
- [34] MANGOLI E, TALEBI A R, ANVARI M, et al. Vitamin C attenuates negative effects of vitrification on sperm parameters, chromatin quality, apoptosis and acrosome reaction in neat and prepared normozoospermic samples [J]. Taiwanese journal of obstetrics and gynecology, 2018, 57(2):200-204.
- [35] MASOUDI R, SHARAFI M, ZARE SHAHNEH A, et al. Supplementation of extender with coenzyme Q10 improves the function and fertility potential of rooster spermatozoa after cryopreservation[J]. Animal reproduction science, 2018, 198:193-201.
- [36] MOGHADAM M T, FARD Y A, SAKI G, et al. Effect of vitamin D on apoptotic marker, reactive oxygen species and human sperm parameters during the process of cryopreservation[J]. Iranian journal of basic medical sciences, 2019, 22(9):1036-1043.
- [37] SHABANI NASHTAEI M, AMIDI F, SEDIGHI GILANI M A, et al. Protective features of resveratrol on human spermatozoa cryopreservation may be mediated through 5' AMP-activated protein kinase activation[J]. Andrology, 2017, 5(2):313-326.
- [38] 王昕. 白藜芦醇对猪冷冻精子细胞凋亡及凋亡途径的影响[D]. 上海:上海海洋大学, 2015.
- [39] VAFA T S, EMADI M, SADOUGHI S D, et al. Effect of curcumin on Bax, Bcl-2, antioxidant enzymes and lipid peroxidation of sperm after freezing procedure[J]. Journal of Ardabil University of medical sciences, 2018, 18(1):120-130.
- [40] TRZCNSKA M, BRYŁA M. Apoptotic-like changes of boar spermatozoa in freezing media supplemented with different antioxidants [J]. Polish journal of veterinary sciences, 2015, 18(3):473-480.
- [41] SHAH N, SINGH V, YADAV H P, et al. Effect of reduced glutathione supplementation in semen extender on tyrosine phosphorylation and apoptosis like changes in frozen thawed Hariana bull spermatozoa [J]. Animal reproduction science, 2017, 182:111-122.
- [42] 李丹丹, 刘蛟, 王英群, 等. PTD-FNK 蛋白对猪精子的冷冻保护作用及其机制[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(11):217-221.
- [43] MOHAMMADI F, VARANLOO N, HEYDARI NASRABADI M, et al. Supplementation of sperm freezing medium with myoinositol improve human sperm parameters and protects it against DNA fragmentation and apoptosis [J]. Cell and tissue banking, 2019, 20(1):77-86.
- [44] ELKHAWAGAH A R, NERVO T, POLETTI M, et al. Effect of relaxin on semen quality variables of cryopreserved stallion semen [J/OL]. Animal reproduction science, 2020, 216 [2020-09-27]. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106351>.
- [45] DASHTESTANI F, GHOORCHIAN H, NAJAFI A. Albumin coated copper-cysteine nanozyme for reducing oxidative stress induced during sperm cryopreservation[J]. Bioorganic chemistry, 2018, 80:621-630.
- [46] KHALIL W A, EL-HARAIRY M A, ZEIDAN A E B, et al. Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation[J]. Theriogenology, 2019, 126:121-127.
- [47] KIM E J, TALHA N A H, JEON Y B, et al. Effect of k-carrageenan on sperm quality in cryopreservation of canine semen [J]. Journal of animal reproduction and biotechnology, 2019, 34(1):57-63.